

RAF1 基因新生突变致 LEOPARD 综合征 1 例并文献复习

张彩宁^{1,2} 王本臻¹ 纪志娴¹ 李自普^{1,3}

(1 青岛大学附属青岛妇女儿童医院心脏中心, 山东 青岛 266034;

2 保定市第二中心医院新生儿科; 3 青岛妇女儿童医院重症医学中心)

[摘要] 目的 对 1 例 LEOPARD 综合征患儿进行相关基因的检测,以明确其致病基因。方法 收集疑似 LEOPARD 综合征患儿及其父母临床资料和外周血,设计捕获芯片,通过高通量二代测序、生物信息分析及突变验证进行基因突变检测。结果 发现 RAF1 基因新生突变 c.1082G>C,其父母 RAF1 基因正常。患儿智力落后,认知异常,皮肤粗糙,特殊分布的雀斑样痣,面部特殊,听力正常,视力下降,心电图显著异常,心脏超声显示肥厚型心肌病。结论 RAF1 基因新生突变 c.1082G>C 为导致该患儿临床表型的原因。

[关键词] LEOPARD 综合征;基因检测;突变;RAF1 基因;体征和症状;儿童

[中图分类号] R725.4;R541.1

[文献标志码] A

LEOPARD SYNDROME DUE TO DE NOVO MUTATION OF THE RAF1 GENE: A CASE REPORT AND LITERATURE REVIEW

ZHANG Caining, WANG Benzhen, JI Zhixian, LI Zipu (Department of Heart Center, Qingdao Women and Children's Hospital of Qingdao University, Qingdao 266034, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the pathogenic gene of LEOPARD syndrome (LS) by conducting a series of gene detection tests. **Methods** Clinical data and peripheral blood samples were collected from a child suspected of LS and the parents, capture chips were designed, and then high-throughput next-generation sequencing, bioinformatics analysis, and mutation validation were performed for the detection of gene mutation. **Results** A de novo mutation, c.1082G>C, was found in the RAF1 gene of this child, while the parents had normal RAF1 gene. The child had the symptoms of mental retardation, abnormal cognition, rough skin, lentigines with special distribution, unusual facies, normal hearing, impaired vision, abnormal electrocardiographic findings, and hypertrophic cardiomyopathy on echocardiography. **Conclusion** The de novo mutation of the RAF1 gene (c.1082G>C) is the cause of the clinical phenotype of this child.

[KEY WORDS] LEOPARD syndrome; Genetic testing; Mutation; Raf1 gene; Signs and symptoms; Child

LEOPARD 综合征是一种罕见的、可累及全身多系统的常染色体显性遗传病,PTPN11、RAF1 和 BRAF 基因的突变可致其发病,其中大约 90% 的病例由 PTPN11 基因突变所致,10% 由 RAF1 和 BRAF 基因突变导致,其主要临床特征包括全身多发雀斑样痣、心血管缺陷、面部异常、生殖器异常、生长迟缓和感觉神经性耳聋等^[1]。本文对以肥厚型心肌病(HCM)就诊的 1 例 LEOPARD 综合征患者进行基因突变检测,并结合文献复习对 LEOPARD 综合征的临床特点及诊断方法进行探讨。

1 临床材料

患儿,女,14 岁 4 个月,体质量 38.8 kg,身高 138.1 cm,血压 13.3/8.3 kPa。出生后即发现面部及颈部散在数个咖啡斑和雀斑样痣。3 岁时因反复肺炎,查体发现心脏异常,超声心动图发现有肥厚型

心肌病。患儿系孕 1 产 1,足月剖宫产娩出,出生体质量 3 150 g,其他出生情况不详。患儿母亲孕 28 周时发生车祸,后保胎至患儿足月剖宫产娩出;患儿有一妹妹,体健;家族中无类似疾病患儿,父母非近亲婚配。临床表现:患儿生长发育迟缓,体质量、身高低于同年龄段儿童身高的第 10 百分位^[2];轻度智力落后,韦氏儿童智力量表评测智商为 60 分;认知能力异常,表现为没有明显情绪波动,依赖家人,无法单独进行社交活动等;皮肤粗糙,全身多发直径 1~12 mm 雀斑样痣和咖啡斑,雀斑样痣以双下肢皮肤为主;面部异常,表现为前额宽大、突出,瞳距宽,眉毛稀疏,鼻唇沟深,口唇厚,耳轮肥厚(图 1);视力减退,不能看清 6 m 外的事物,但听力正常;骨骼畸形,胸椎明显后凸,驼背,双手指和小腿细长,小手指末节不能伸直(图 1);肥厚型心肌病,胸骨左缘第 2、3 肋间闻及 3/6 级收缩期杂音;月经不规律,平均每年 2 次,月经量中等,每次持续 10 d 左右,外生殖器正常。辅助检查:超声心动图示左心房扩大,左心室明显肥厚,其室间隔基底段 2.2 cm,中间段 2.1 cm,

[收稿日期] 2019-08-19; **[修订日期]** 2019-09-27

[基金项目] 青岛市医疗卫生优秀人才培养项目资助(青卫科教字[2017]4 号)

[通讯作者] 李自普,Email:apuqd@sina.com

心尖段 1.3 cm,左心室游离壁基底段 1.5 cm,中间段 1.5 cm,心尖段 1.5 cm,左心室流出道梗阻,最大梗阻血流速度 3.7 m/s,压差 7.5 kPa,左心室射血分数 68%,二尖瓣叶略厚,二尖瓣中度反流,最大反流速度 4.6 m/s(图 2);心电图示窦性心律,左心室肥大,QT 间期延长和 ST 段下移(图 3)。胸片示双肺

胸廓对称、无畸形;气管纵膈居中;双肺纹理增多,肺内未见实质性病变;双肺门不大,双膈面光整;肋膈角清晰锐利,心膈角无异常;心胸比 0.58。血常规示白细胞计数 $10.76 \times 10^9/L$,红细胞计数 $5.20 \times 10^{12}/L$,血红蛋白 74 g/L,血小板计数 $282 \times 10^9/L$,血细胞比容 29.3%,提示存在中度贫血。

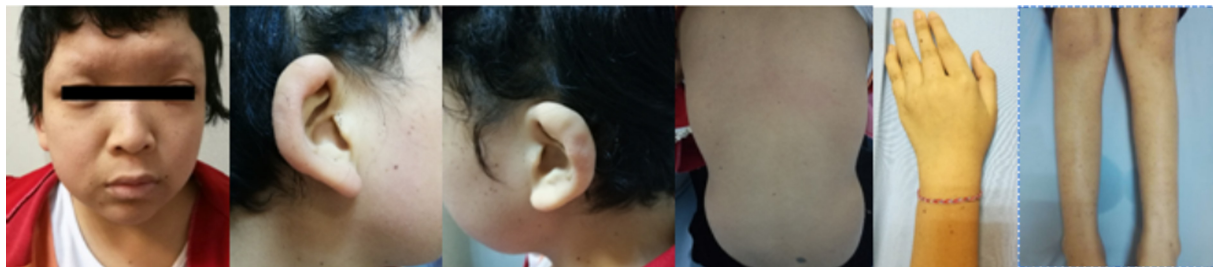
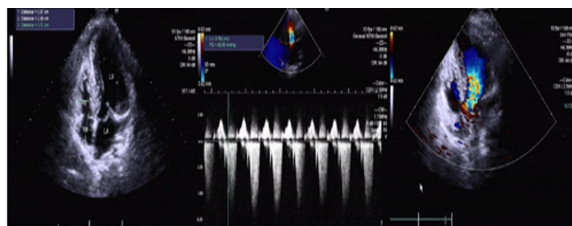


图 1 患儿面部、皮肤和肢体异常改变



LV:左心室,RV:右心室,LA:左心房,RA:右心房

图 2 超声心动图检查结果

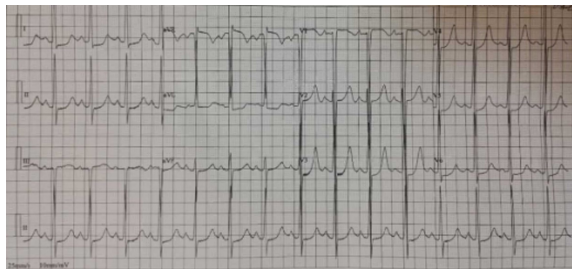
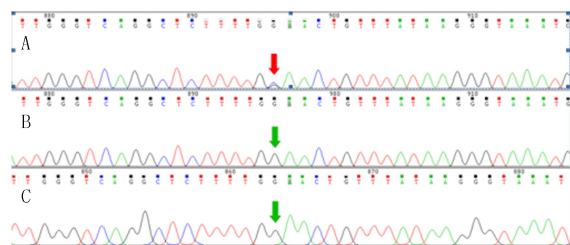


图 3 心电图检查结果

设计肥厚型心肌病捕获芯片,包含 168 个与肥厚型心肌病相关的基因;捕获探针由美国 Agilent 公司设计,覆盖上述基因的全部外显子区域及相邻内含子区域(50 bp)。从患儿及其父母外周血中提取基因组 DNA(QIAGEN, Germany),将基因组 DNA 随机打断成长 250~300 bp 的片段(Biorupter plus, Diagenode, Belgium),并且进行末端修复、连接接头,连接产物经 ligation-mediated PCR(LM-PCR)扩增、纯化,获得 DNA 文库,并对文库进行质量检测。随后将 LM-PCR 产物与捕获芯片进行探针杂交、捕获、富集和洗脱,通过定量 PCR 检测富集效率。应用 Illumina Hiseq X Ten 高通量测序仪进行测序,测序读长为 2×150 bp。对测序仪获取的原始短序列,运用 NextGene V2.3.4 软件(Softgenetics, USA)与 UCSC 数据库提供的人类基因组

hg19 参考序列进行比对,并对目标区域的覆盖度和测序质量进行评估,要求每个样本平均测序深度在 100 倍以上,目标区域覆盖度达 99% 以上;然后利用人类基因突变数据库 HGMD、千人基因组数据库、ESP 正常对照人群数据库(NHLBI Exome Sequencing Project)以及 dbSNP 数据库信息对查找出的变异位点进行注释,确定突变位点发生的基因、坐标、mRNA 位点、氨基酸改变,并用 SIFT、PolyPhen2、Mutation_Taster 等软件预测单核苷酸改变对蛋白质功能的影响;在候选的变异位点中去除掉在 dbSNP、千人基因组数据库中高频率($>5\%$)的变异位点,同时过滤掉 SIFT、PolyPhen2、Mutation_Taster 等软件预测对蛋白功能无影响的单核苷酸变异,最后将剩余变异位点作为疾病相关的候选变异位点,进行 Sanger 测序验证及父母传递分析。其中 Sanger 测序验证步骤如下:①DNA 的提取:采用德国 QIAGEN 试剂盒法提取外周静脉 EDTA 抗凝血 DNA。②PCR 反应:PCR 反应总体积为 25 μL ,其中含有提取的基因 DNA 1 μL , $10 \times$ Buffer 2.5 μL , 2.5 mmol/L Tap DNA 聚合酶 1.25 U, 10 $\mu mol/L$ dNTP 2 μL ,上、下游引物各 1 μL ,后用 17.25 μL 的双蒸水补齐。PCR 反应条件:94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}C$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 30 s, 总共 30 个循环,末次循环后 72 $^{\circ}C$ 延伸 5 min,冷却至 4 $^{\circ}C$ 。PCR 扩增产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶上电泳检测。结果在患儿送检的样本中发现 RAF1 基因 c.1082G>C(p.G361A)杂合突变(图 4),氨基酸改变为 p.G361A,生物信息分析软件 SIFT、PolyPhen2 和 Mutation_Taster 均预测有害;传递分析未在患儿父母送检样本中检出上述突变(图4)。根

据患儿临床特点和基因检测结果,符合 *RAF1* 基因新生突变导致的 LEOPARD 综合征 2 型。



A:先证者;B:先证者父亲;C:先证者母亲

图 4 Sanger 测序验证结果

2 讨 论

LEOPARD 综合征和 NOONAN 综合征是常染色体显性遗传综合征^[3-4](称为“RAS 病”)新分类家族的一部分,通常是由参与调节正常细胞增殖、存活和分化的 RAS-MAPK 信号转导途径的组分突变所引起^[5-6],皮肤上的改变是区分两者的重要依据之一^[7]。1936 年 ZEISLER^[8]首次概括了 LEOPARD 综合征的临床特征,为累及全身多系统的综合征,主要临床表现有全身皮肤多发性雀斑样痣、心电图异常、瞳距过宽、肺动脉狭窄、生殖器异常、生长发育迟缓及感音性耳聋等^[9-12];并根据上述临床特点的英文首字母缩写,命名为 LEOPARD 综合征,该综合征曾被称为心脏皮肤综合征、多发痣综合征等^[9]。虽然 HCM 不包括在 LEOPARD 首字母缩略词中,但却是该综合征最常见的心脏异常表现^[1,13-14],其中 *RAF1* 基因突变所导致的 HCM 是一种非肌小节 HCM^[15-16]。早期该病是通过临床关键特征进行诊断,但随后发现没有任何一种临床特征是其所独有的,VORON 等^[17]最先提出了 LEOPARD 综合征诊断标准:满足至少 3 项典型的临床表现^[18]。在儿童早期,LEOPARD 综合征的临床表型可能是典型的 NOONAN 综合征,如身材矮小、面部畸形、生殖器异常以及肺动脉瓣狭窄等^[4],但随年龄增长,LEOPARD 综合征的其他特征,包括痣、HCM 和听力丧失可能出现。所以,对于此类患儿来说,遗传咨询、相关酶学检测和基因检测是确诊的必要手段^[16,19-20]。

目前已知的 LEOPARD 综合征致病基因主要有 *PTPN11*、*RAF1* 以及 *BRAF*^[21-22],约 90% 是由 *PTPN11* 基因突变所导致,而非 *PTPN11* 基因突变患儿中 *RAF1* 基因突变占主要位置^[7],*BRAF* 基因突变次之^[23-26]。与 LEOPARD 综合征有关的基因突变主要有 *PTPN11* 基因的 7、12 和 13 号外显

子突变,*RAF1* 基因的 7、14 和 17 号外显子突变,以及 *BRAF* 基因的 6 号外显子突变^[23,27-29]。*RAF* 是一类丝氨酸/苏氨酸激酶,在 RAS-*RAF*-MEK-ERK 信号转导途径中起重要的作用,对细胞的增殖、分化、生长、凋亡的调控至关重要,而 *RAF1* 是 *RAF* 家族中的成员之一。目前研究发现,*RAF1* 错义突变和 *RAF1* 激酶活性的功能增益效应是 NOONAN 综合征和 LEOPARD 综合征合并 HCM 高发病率的原因^[23,28]。

本例患儿发现在 *RAF1* 基因 9 号外显子上(c.1082G>C)存在杂合突变,属于 LEOPARD 综合征 2 型。LEOPARD 综合征 2 型是一种罕见的、显性遗传的、影响多器官系统的遗传疾病。2011 年有学者曾报道 2 例 LEOPARD 综合征 2 型患儿,其致病基因是 *RAF1* 基因(c.770C>T)突变,是同一基因中 7 号外显子不同位置发生了 *Ser259Leu* 突变所致^[30],2 例患儿分别属于两个家系,两个家系之间及两位患儿的父母之间无血缘关系。此 2 例患儿与本例患儿一样具有全身皮肤多发雀斑样痣、心电图异常、面部畸形、HCM、生殖系统发育异常、生长发育迟缓等 LEOPARD 综合征典型临床特征,但听力均正常,由此我们可以推测,是否 *RAF1* 突变导致的 LEOPARD 综合征 2 型并不发生听力下降?

RAF1 基因 9 号外显子(c.1082G>C)突变所致的 LEOPARD 综合征,在国内是首次发现并报道的致病位点,这不仅丰富了 LEOPARD 综合征的遗传数据库,而其独有的临床特征——雀斑样痣特殊分布特征(面部、双下肢远端分布较密集,躯干及双上肢散在分布);全身皮肤粗糙;双侧耳轮偏大、肥厚;听力正常,视力下降——也将为 LEOPARD 综合征的临床评估提供思路。本研究存在一些缺点,首先是只对患儿父母突变位点进行了验证,缺乏在正常人群大样本的验证;其次是未进行突变基因功能学上的验证。下一步,将加强对正常人群大样本突变位点的验证、突变基因功能学研究及患儿后期随访,为此基因突变类型提供更多的临床和遗传学信息。

[参考文献]

- [1] SARKOZY A, CONTI E, DIGILIO M C, et al. Clinical and molecular analysis of 30 patients with multiple lentigines LEOPARD syndrome[J]. J Med Genet, 2004, 41 (5): e68. DOI:10.1136/jmg.2003.013466.
- [2] 李辉,季成叶,宗心南,等. 中国 0~18 岁儿童、青少年身高、体重的标准化生长曲线[J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(7): 487-

- 492.
- [3] SPATOLA M, WIDER C, KUNTZER T, et al. PTPN11 mutation manifesting as LEOPARD syndrome associated with hypertrophic plexi and neuropathic pain[J]. BMC Neurol, 2015, 15:55.
 - [4] 郭敏,李书聆,李锐洁,等. 一个 LEOPARD 综合征小家系临床表型及遗传学特征分析[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2018,26(4):358-361.
 - [5] LAURIOL J, KONTARIDIS M I. PTPN11-associated mutations in the heart: Has LEOPARD changed its RASpots[J]? Trends Cardiovasc Med, 2011, 21(4):97-104.
 - [6] KEILHACK H, DAVID F S, MCGREGOR M, et al. Diverse biochemical properties of Shp2 mutants. Implications for disease phenotypes[J]. J Biol Chem, 2005, 280(35):30984-30993.
 - [7] 杭霏,樊朝关. LEOPARD 综合征[J]. 中华心血管病杂志, 2016,44(12):1006-1009.
 - [8] ZEISLER E P. Generalized Lentigo[J]. Arch Derm Syphilol, 1936,33(1):109.
 - [9] GORLIN R J, ANDERSON R C, MOLLER J H. The Leopard (multiple lentigines) syndrome revisited[J]. Birth Defects Orig Artic Ser, 1971,7(4):110-115.
 - [10] CANÇADO F H, SILVA L C, TAITSON P F, et al. Do you know this syndrome? Leopard syndrome[J]. An Bras Dermatol, 2017,92(1):127-129.
 - [11] ZHANG J, SHEN J W, CHENG R H, et al. Identification of a PTPN11 hot spot mutation in a child with atypical LEOPARD syndrome[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(3):2639-2643.
 - [12] GHOSH S K, MAJUMDAR B, RUDRA O, et al. LEOPARD Syndrome[J]. Dermatol Online J, 2015,21(10):1-5.
 - [13] SARKOZY A, DIGILIO M C, DALLAPICCOLA B. Leopard syndrome[J]. Orphanet J Rare Dis, 2008,3:13.
 - [14] 姜殿东,韩波. 基因突变在先天性心脏病发病中的作用研究进展[J]. 山东医药, 2018,58(3):106-109.
 - [15] DHANDAPANY P S, FABRIS F, TONK R, et al. Cyclosporine attenuates cardiomyocyte hypertrophy induced by RAF1 mutants in NOONAN and LEOPARD syndromes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011,51(1):4-15.
 - [16] 王本臻,纪志娴,万浩,等. 基因检测在儿童非肌小节肥厚性心肌病诊断中的价值[J]. 精准医学杂志, 2018,33(5):385-390.
 - [17] VORON D A, HATFIELD H H, KALKHOFF R K. Multiple lentigines syndrome[J]. Am J Med, 1976,60(3):447-456.
 - [18] 刘佳玮,刘薇,马东来. 以泛发性雀斑样痣为皮肤表现的临床综合征[J]. 国际皮肤性病学杂志, 2017,43(3):142-145.
 - [19] MABUCHI H, NOHARA A, NOGUCHI T, et al. Molecular genetic epidemiology of homozygous familial hypercholesterolemia in the Hokuriku district of Japan[J]. Atherosclerosis, 2011, 214(2):404-407.
 - [20] 余时娟,王华. LEOPARD 综合征一例[J]. 中华皮肤科杂志, 2018,51(12):908.
 - [21] SARKOZY A, CONTI E, SERIPA D, et al. Correlation between PTPN11 gene mutations and congenital heart defects in NOONAN and LEOPARD syndromes [J]. J Med Genet, 2003,40(9):704-708.
 - [22] MARTÍNEZ-QUINTANA E, RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ F. LEOPARD syndrome: Clinical features and gene mutations [J]. Mol Syndromol, 2012,3(4):145-157.
 - [23] PANDIT B, SARKOZY A, PENNACCHIO L A, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy[J]. Nat Genet, 2007,39(8):1007-1012.
 - [24] SARKOZY A, CARTA C, MORETTI S, et al. Germline BRAF mutations in NOONAN, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: Molecular diversity and associated phenotypic spectrum[J]. Hum Mutat, 2009,30(4):695-702.
 - [25] KOUDOVA M, SEEMANOVA E, ZENKER M. Novel BRAF mutation in a patient with LEOPARD syndrome and normal intelligence[J]. Eur J Med Genet, 2009,52(5):337-340.
 - [26] 臧东杰,许星海,周城,等. LEOPARD 综合征一例 PTPN11 基因突变研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2015,48(6):429-430.
 - [27] DIGILIO M C, SARKOZY A, DE ZORZI A, et al. LEOPARD syndrome: Clinical diagnosis in the first year of life[J]. Am J Med Genet A, 2006,140(7):740-746.
 - [28] RAZZAQUE M A, NISHIZAWA T, KOMOIKE Y, et al. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause noonan syndrome[J]. Nat Genet, 2007,39(8):1013-1017.
 - [29] NEMES E, FARKAS K, KOCIS-DEÁK B, et al. Phenotypic diversity of patients with LEOPARD syndrome carrying the worldwide recurrent p.Tyr279Cys PTPN11 mutation[J]. Arch Dermatol Res, 2015,307(10):891-895.
 - [30] KUBUROVIĆ V, VUKOMANOVIĆ V, CARCAVILLA A, et al. Two cases of LEOPARD syndrome: RAF1 mutations firstly described in children[J]. Turk J Pediatr, 2011,53(6):687-691.

(本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 400 页)

- lymphadenitis in SLE associated with skin lesions[J]. Lupus, 2011, 20(8):809-819.
- [14] 刘霆. 外周 T 细胞淋巴瘤的诊断和治疗进展[J]. 中华血液学杂志, 2014,35(4):361-366.
 - [15] 宋红杰,马捷. 组织细胞坏死性淋巴结炎的研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015,31(5):569-571.
 - [16] BEZEK S, TUCCI V, KALRA S, et al. State of the globe;

Time to revisit Kikuchi Fujimoto disease[J]. J Glob Infect Dis, 2014, 6(4):139-140.

- [17] BEHDADNIA A, ALLAMEH S F, GHARABAGHI M A, et al. Systemic Kikuchi-Fujimoto disease bordering lupus lymphadenitis: A fresh look?[J]. Intractable Rare Dis Res, 2016, 5(4):301-305.

(本文编辑 耿波 厉建强)