中国结节性硬化症儿童的基因型和表现型分析

白大勇^{1†}, 赵军阳^{1†}, 李莉¹, 高军², 王旭^{3†*}

1. 国家儿童医学中心, 首都医科大学附属北京儿童医院眼科, 北京 100045;

2. 国家儿童医学中心, 首都医科大学附属北京儿童医院影像科, 北京 100045;

3. 国家儿童医学中心, 首都医科大学附属北京儿童医院神经内科, 北京 100045

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: zfwx05@126.com

收稿日期: 2018-06-12; 接受日期: 2018-07-20; 网络版发表日期: 2018-09-11

首都卫生发展科研专项项目(批准号: 2014-1-4091)资助

摘要 结节性硬化症(TSC)是一组常染色体显性遗传的神经皮肤综合征, 可伴有严重的临床表现和累及全身多个器官。回顾分析20例TSC患儿的临床资料及基因检测, 为疾病的诊断和防控提供依据。20例结节性硬化症(TSC)患儿的发病平均年龄 7.00 ± 5.30 岁, 14例患儿检测了TSC1及TSC2基因。皮肤损害(80%)、癫痫发作(75%)是最常见临床首发症状。14例(70%)检出视网膜错构瘤, 2例在外院行眼球摘除术。18例患儿头颅MRI示室管膜下结节, 16例可见皮质结节。非肾性错构瘤5例, 多发性肾囊肿5例, 心脏横纹肌瘤5例。14例患儿检测了TSC1及TSC2基因, 发现11例为TSC2型突变, 2例为TSC1型突变, 1例TSC1和TSC2基因均未发现可疑致病突变, 8例基因突变未见文献报道。TSC2临床表现较TSC1更重。本研究发现的基因突变与国外报道有所不同。对TSC的表现型和基因型的分析, 有利于临床工作中有助于该病的诊断和治疗。

关键词 中国儿童, 结节性硬化症, 基因, 基因型, 表现型

结节性硬化症(tuberous sclerosis, TSC)是一组常染色体显性遗传的神经皮肤综合征, 可累及全身多个系统和器官。临床症状包括癫痫、皮肤损害、智力损伤、肿瘤样异常组织增生^[1]。本病由Friedrich Daniel于1862年首次报道, 1880年Bourneville命名为结节性硬化症^[2]。

TSC的一些临床表现严重影响患者的生命健康, 对于患者的家庭往往也是灾难性的^[3]。这些临床表现的本质是多发性的错构瘤, 可影响皮肤、脑部、心脏、肾脏、肝脏和肺等。这些异常增殖的组织细胞恶性变少见^[4]。多变的临床表现往往给TSC的诊断和治

疗带来困难。TSC在不同的国家和地区发病情况不同。其在亚太地区的发病率尚不明确^[5]。流行病学调查资料显示, TSC的发病率在新生儿中1/5800, 10岁以下儿童发病率为1/12000~1/14000^[5]。由于轻中度临床表现的患者, 有些未被诊断, 因此TSC的实际发生率可能被低估了^[6]。目前, 雷帕霉素已经在临床中试验性治疗TSC。

目前认为结节性硬化症的致病基因为TSC1和TSC2基因(TSC2于1993被确认, TSC1于1997年被确认)。约85%的TSC患者具有TSC1或者TSC2基因突变^[3]。TSC1/2基因正常编码的蛋白可以抑制肿瘤基因和癫痫

引用格式: 白大勇, 赵军阳, 李莉, 等. 中国结节性硬化症儿童的基因型和表现型分析. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 967–974, doi: 10.1360/N052018-00090
英文版见: Bai D Y, Zhao J Y, Li L, et al. Analysis of genotypes and phenotypes in Chinese children with tuberous sclerosis complex. Sci China Life Sci, 2017, 60: 763–771, doi: 10.1007/s11427-017-9091-x

相关基因 $mTOR$ (哺乳动物雷帕霉素靶点)引起的异常细胞增殖^[7], 如果功能异常, 可以引起TSC的各种临床表现. $TSC1$ 基因定位于第9号染色体长臂上(9q34), 编码错构瘤蛋白(hamartin, 130 kD); $TSC2$ 基因定位于第16号染色体短臂上(16p13.3), 编码马铃薯球蛋白(tuberin, 180 kD), 这两种蛋白质在组织中广泛表达, 于体内形成hamartin-tuberin复合体, 调控细胞生长和增殖. 目前已报道超过1200种等位基因突变被发现, 这是TSC临床表现非常多变的原因^[2], 因此一些患者可能具有致命的临床症状, 而另外的病人可能毫无症状^[8].

据报道, $TSC2$ 临床症状比 $TSC1$ 严重^[9], 不是所有的TSC患者都有家族遗传病史, 有一些是散发病例^[2]. 虽然临床诊断和遗传学研究已经广泛应用于TSC的诊疗当中, 对于基因突变的研究仍然是疾病干预的重要依据.

笔者对20例中国结节性硬化症儿童进行详细全身检查及影像学检查, 14例行基因检查, 并对其临床表现型及基因型特点进行分析, 结果报告如下.

1 材料和方法

1.1 患者资料

共收集2014年6月~2015年3月在本院明确诊断为TSC的患者20例(符合美国国立卫生研究院共识会议National Institutes of Health Consensus Conference关于结节性硬化症的诊断标准)^[10]. 20例患儿来源于北京儿童医院眼科和神经内科门诊患者.

1.2 临床检查

所有病例详细分析病史, 全部病例进行眼科检查(包括直接眼底镜和间接眼底镜), 皮肤科及口腔科检查. 均行复方托吡卡胺散瞳后间接眼底镜检查(其中13例行Cannon彩色眼底照相, 7例行Retcam3眼底照相, 5例行OCT检查), 11例患者在赛飞杰散瞳下行检影验光.

视网膜错构瘤按照文献报道对视网膜错构瘤进行分型: 分为三型, I型呈扁平羽毛状, II型呈桑葚样伴有隆起钙化, III型介于I型和II型之间(图1)^[11]. 所有病例均行口腔科及皮肤科会诊.

1.3 影像学检查

所有患者行头颅MRI检查(3.0 T超导型全身MRI

图1 TSC的皮肤及牙龈表现

A: 面部血管纤维瘤(*)和脱色素斑(**); B: 鲨鱼皮斑(▲); C: 甲周纤维瘤(□); D: 牙龈错构瘤(矩形)

扫描仪Siemens Magnetom Trio Tim, Siemens, 德国), 腹部B超(百胜MyLab70, 意大利)、胸部正位X-射线检查.

1.4 基因分析

6例患者和家属拒绝基因检测. 14例行 $TSC1$ 和 $TSC2$ 基因检查^[12,13].

基因组DNA提取: 采集患儿及其父母肘静脉血2 mL置EDTA抗凝管中保存. 经碘酚-氯仿提取法测定外周血基因组DNA.

DNA提取后, 利用神经皮肤综合症相关基因芯片(Agilent, 美国)进行 $TSC1$ 和 $TSC2$ 基因外显子及内含子捕获并进行新一代高通量基因测序(HiSeq 2500, Illumina, 美国).

基因变异使用ANNOVAR软件进行分析(<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>), 基因的功能和等位基因的频率使用数据库dbSNP, 1000 Genomes (www.1000genomes.org), ESP6500 (evs.gs.washington.

edu/EVS/), ExAc (exac.broadinstitute.org/)分析. 错义突变的致病性使用SIFT (sift.bii.a-star.edu.sg), PolyPhen-2 (genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)和MutationTaster (www.mutationtaster.org/)分析. 根据美国医学遗传学和基因组学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)推荐标准对突变的基因致病性进行分析^[1,2]. 所有的变异将被归类为: 致病性的、可能致病性的, 意义不明的, 可能良性的和良性的突变.

采用Sanger法和MLPA技术进行家系验证.

2 结果

2.1 一般资料

共收集在本院确诊为TSC的患者20例, 20例中, 男16例, 女4例; 年龄7个月~17岁, 平均(7.00±5.30)岁, 5例有TSC家族史, 余15例(75%)无明确的TSC家族史. 1例(5%)因左眼底占位原因不明外院行左眼球摘除术, 术后病理诊断为左眼视网膜错构瘤; 1例(5%)因左眼虹膜脉络膜缺损在外院行左眼球摘除术(具体情况不详).

2.2 临床表现

(1) 20例TSC的基本特征. 20例患者的临床表现和基本信息见网络版附表1, 临床表现见表1.

(2) 神经科临床表现. TSC影响神经科主要表现为癫痫、智力发育迟滞和行为异常^[14]. 出现癫痫发作的病例15例(75%), 发病年龄较早, 平均发病年龄4.82±3.78岁. 癫痫发作精神发育迟滞的患儿11例(55%). TSC1患者癫痫症状比TSC2患者轻.

(3) 皮肤临床表现. 16例患者首发和初诊的表现均以皮肤表现最常见(80%). 皮肤损害中最常见的症状是色素减退斑16例(80%) (图1A), 表现为卵圆形或柳叶状、圆形、不规则形和点彩样, 患者色素减退斑均在3个或3个以上; 其次皮肤表现是面部血管纤维瘤6例(30%) (图1A), 鲨革样皮疹2例(10%) (图1B). 甲周纤维瘤1例(5%) (图1C).

(4) 口腔临床表现. 牙釉质凹陷1例(5%), 牙龈错构瘤1例(5%) (图1D). 这两个病人均为TSC2患者.

(5) 眼部表现. 11例患者睫状肌麻痹下行检影验光, SE为-0.34±1.65D. 14例(70%)出现眼底错构瘤, 通过眼底彩色像检出12例, 2例通过OCT发现. 双眼发病7例(占35%), 单眼发病7例(占35%). 彩色眼底像下错构瘤分为三型(图2), I型视网膜错构瘤9例9眼(图2A), II型错构瘤1例1眼(图2B), III型错构瘤3例4眼(图2C).

5例患者行OCT检查, OCT显示错构瘤5例6眼, 某些间接眼底镜及彩色眼底像显示正常的部位, OCT扫描可见视神经纤维层异常增厚; 其中4例病人4个病灶在红外眼底像中显示, 彩色眼底像中未显示; 2例红外眼底像及彩色眼底像中均未显示(图2D和E), OCT扫描可见错构瘤(图2F). 1例在外院以RB待除外行眼球摘除, 1例因脉络膜缺损在外院行眼球摘除.

(6) 影像学检查结果. 18例(90%)患儿头颅MRI示室管膜下结节(90%, 图3), 16例(80%)可见皮质结节, 2例(10%)室管膜下巨细胞星形细胞瘤. 彩色超声检查5例(25%)可见心脏横纹肌瘤. 3例(15%)可见肾脏血管平滑肌瘤. 非肾性错构瘤5例(25%). 多发性肾囊肿5例(25%). 肝内错构瘤1例(5%).

表 1 TSC患儿的临床表现

临床表现	患者编号																				总计
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
癫痫	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
脱色素斑	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	16
牙龈错构瘤	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
视网膜错构瘤	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	14
视管膜下结节	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	18
皮质结节	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	15
心脏横纹肌瘤	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	5
肾脏血管纤维瘤	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
非肾性错构瘤	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	5
多发肾囊肿	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	5

图2 视网膜错构瘤(矩形)分为3型(A, B, C)

A: I型视网膜错构瘤; B: II型视网膜错构瘤; C: III型视网膜错构瘤. 一名患者的视网膜病变, 彩色眼底照相(D)或(E)红外眼底成像均未发现异常, 但OCT成像显示视神经纤维层异常增厚(矩形) (F)

(7) 基因检测结果. 14例结节性硬化综合征患儿及家系遗传学分析(表2). 14例病人均经基因捕获和高通量测序及家系验证结果, 数据分析结果见表2: 根据检测结果, 13例样本均存在TSC基因终止、剪切、移码及大片段缺失突变, 其中TSC1基因突变2例, TSC2基因突变11例, 1例TSC1和TSC2基因均未发现可疑致病突变; 13例存在基因突变的样本中, 10例为未见报道的新发突变, 其中9例父母均未携带相关基因突变, 4例突变源于母源.

图4为病例8患儿及家系MLPA方法验证结果分析图. TSC1型患者2例具有癫痫发作病史, 其中1例患儿可见室管膜下结节, 1例可见皮质结节, 2例都具有色素减退斑, 1例具有鲨鱼皮斑, 1例患心脏横纹肌瘤, 目前未见其他部位病变. TSC1型患者病变主要累及颅内和心脏, 病情程度也较TSC2型轻.

3 讨论

TSC的病变非常复杂和广泛, 可能增加患者和其

图3 核磁共振显示室管膜下结节(▲)

家庭的沉重负担^[5]. 由于累及组织器官范围比较广泛, 系统的认识TSC以减少漏诊和误诊很重要^[15]. TSC的临床表现差异明细, 给诊断和治疗带来巨大的挑战^[2]. 近年来随着影像诊断技术的发展, 对TSC的认识逐步加深^[16].

本研究中对全身容易受累的器官中进行了检查, 以明确TSC的临床诊断. TSC为常染色体显性遗传, 遗传检查为进一步明确诊断. 如果在神经、皮肤、口腔、眼或心脏组织中显示病变的儿童都应考虑TSC的可能. TSC基因突变是反映疾病的另一个重要指标, 检出率为80%~85%^[5].

3.1 神经系统症状

神经系统症状是TSC患者最明显的问题之一, 因为这种疾病起源于发展分化神经系统和皮肤的上皮细胞的异常分化的外胚叶^[17]. 癫痫发作是儿童住院的主要原因, 80%的TSC患者癫痫在1岁以内出现^[18]. 在本研究中, 20例患者中有11例(55%)最初仅诊断为癫痫, 但有8例中发现脱色斑. 因此, 在儿童特别是婴儿癫痫患者中应考虑TSC的可能性, 早期诊断TSC有利于减少癫痫发作引起的中枢神经系统损害^[19].

表 2 14例TSC患儿的基因检测结果和家庭情况^{a)}

病人	突变基因	突变	外显子	Nt change	AA change	Report history	Family verification	ACMG
1	<i>TSC2</i>	移码突变	13	c.1330delA	p.N444fs	无	无	致病性
2	<i>TSC2</i>	移码突变	36	c.4714_4718del	p.1572_1573del	无	无	可能致病
3	<i>TSC2</i>	终止	34	c.4375C>T	p.R1459X	Jones et al, 1999	无	致病性
4	<i>TSC2</i>	剪切	8	c.774+2T>G	Splicing	无	无	致病性
5	<i>TSC2</i>	终止	15	c.1513C>T	p.R505X	Wilson et al, 1996	无	致病性
6	<i>TSC2</i>	剪切	34	c.4425-2A>G	Splicing	无	无	致病性
7	<i>TSC2</i>	终止	33	c.4340C>G	p.S1447X	无	无	致病性
8	<i>TSC2</i>	大片段缺失	1~11			无	母亲	致病性
9	<i>TSC2</i>	移码突变	8	c.681delC	p.C227fs	Bai et al, 2016	无	致病性
10	Negative	<i>TSC1</i> 或 <i>TSC2</i> 中未发现特异性片段缺失或点突变						
11	<i>TSC2</i>	剪切	12	c.1257+1G>T	Splicing	无	母亲	致病性
12	<i>TSC2</i>	大片段缺失	22~31			Bai et al, 2016	母亲	致病性
13	<i>TSC1</i>	终止	19	c.2371C>T	p.Q791X	Kovesdi et al, 2013	无	致病性
14	<i>TSC1</i>	大片段缺失	21~23			无	母亲	致病性

a) AA: 氨基酸; Nt: 核苷酸. ACMG: Classification of pathogenicity is based on the American College of Medical Genetics and Genomics. 13例基因突变的等位基因频率在dbSNP v147, ESP6500, 1000 Genomes, ExAC, Inhouse4000 databases数据库中未见报道

3.2 TSC引起的皮肤损害

脱色素斑、面部血管纤维瘤、前额纤维斑块、鲨革样皮疹、多发性甲周纤维瘤因形态和部位特殊, 有确定或协助诊断的意义. 本组资料中最常见、最早发生的皮肤表现是色素减退斑, 面部血管纤维瘤一般出现在5岁左右^[3]. 面部血管纤维瘤是本组患者就诊原因中最特异的皮肤表现, 皮损表现为面颊鼻翼两侧成蝶翼状分布的一些小的淡黄色、粉红色、红色、正常肤色或淡褐色质硬丘疹, 这些体征很容易被忽略. 此外还应检查患者是否有TSC的其他皮肤和内脏表现.

3.3 TSC患者的眼部影响

TSC患者均应进行眼部检查. 本组资料显示, 患者视网膜错构瘤的发生率很高(70%), 这和文献报道一致^[20]. 但某些错构瘤位于视网膜周边部, 与视网膜前膜相似, 一般TSC儿童智力差, 很多不能配合眼部检查, 多数需要全麻下充分散瞳, 仔细眼底检查才能避免漏诊^[21]. 眼底照相检查提供了重要的参考. 本组4例病人4个病灶在红外眼底像中显示, 彩色眼底像中未显示; 2例红外眼底像及彩色眼底像中均未显示, OCT扫描可见错构瘤, 可见对于眼底错构瘤的检查, 最为敏感的方法是OCT扫描, 其次是红外眼底照相, 再次是彩色

眼底照相或者间接眼底镜检查^[20].

眼底镜检查可以查到视网膜错构瘤不同形态. 本研究中视网膜错构瘤在彩色眼底照片中分为三型. Shields等人^[22]报道 I 型错构瘤发生率最高, 达到60%, II 型最少. 但 II 型与早期的RB极其相似, 仅从眼底彩像结果很难判断, 视网膜错构瘤随着病情缓慢进展, 可以表现为层次性钙化, 因此 II 型错构瘤尤其和RB难以鉴别, 本组1例患儿被怀疑RB在外院行眼球摘除. 了解本病, 对于其全身表现予以认识是避免此类情况的关键.

3.4 头颅和腹部影像学表现

影像学研究可能会发现早期的TSC影响, 避免TSC的严重临床后果. 在本研究中, 颅脑的影像学研究显示TSC患者伴有结节性病变和钙化, 伴有精神发育迟滞. 因此, MRI证明对TSC的诊断至关重要. 对于年龄小于25岁的患者, 每1~3年建议使用MRI进行TSC患者的监测^[23].

腹部影像学检查是确定患者肝脏, 胰腺和其他腹部器官中主动脉瘤或肾外错构瘤存在的另一种诊断方法^[6]. 本研究发现非肾脏错构瘤, 多发性肾囊肿和心脏错构瘤更多见. 然而, 基于头部MRI或腹部成像的TSC

图 4 采用MLPA方法对病例8及她的父母进行基因分析

A: 患者TSC2基因1~11外显子的杂合性缺失; B: 患者的父亲没有发现突变; C: 患者的母亲TSC2基因外显子1~11中发现杂合性缺失

的诊断是不够的,这可能导致错过诊断.其他表现,如子宫颈巨细胞星形细胞瘤,肾血管平滑肌脂蛋白瘤或肺淋巴管平滑肌瘤病,通常在患儿的大龄儿童和青少年期也可见到,与TSC密切相关^[24].因此,TSC应进一步检查全身其他器官.

3.5 基因检查

已经证实TSC1和TSC2基因是TSC的致病基因^[5].不能通过症状和体征来确诊的病例,遗传学检查是用来证实TSC的唯一证据.TSC1基因编码错构瘤蛋白,TSC2基因编码马铃薯球蛋白,这两种蛋白质在体内形成hamartin-tuberin复合体调控细胞生长和增殖,抑制肿瘤形成^[25].TSC突变是一种常染色体显性遗传^[2].

本研究确定了14例中国TSC儿童患者TSC1和TSC2基因突变的情况,根据人类基因突变数据库(Human Gene Mutation Database, HGMD),其中仅有一种TSC1基因突变和2种TSC2基因突变被报道过,本课题组的另一项研究还报道了另外2种TSC2基因突变^[26],其余8个基因突变位点是新报道的.这表明,中国TSC基因突变的情况与高加索人不同.本课题组发现,TSC2基因突变的患病率是TSC1的5倍,与文献(5.5倍)相似^[27].11例TSC2患者具有60种临床体征,平均每例5.45种临床表现,2例TSC1患者具有2种临床体征,平均每例4种临床体征.TSC2比TSC1累及更多的组织和器官(表1),本课题组的临床资料显示,TSC2突变患者的病情比TSC1突变患者更严重.在TSC2突变患者中更容易出现严重的临床表现,包括严重的癫痫和智力残疾^[10,28,29].

只有30%的TSC突变患者有遗传的病史,这表明TSC基因的自发突变率很高^[27].这是由于生殖细胞为嵌合体的健康的父母可以生产TSC的孩子^[2].TSC基因的肿瘤抑制能力的丧失主要是由于杂合性突变引起的^[30,31].本研究中,TSC2中的突变比TSC1中的突变更为普遍,表明TSC2中的突变率更高.

确定TSC的诊断标准对于指导治疗决定很重要.对TSC的认识进步可以通过临床知识的积累和数据库收集达到,如通过TSC自然历史数据库,以及欧洲的TSC登记(tuberous sclerosis registry to increase disease awareness, TOSCA)实现.

4 结论

对儿童中TSC的体征和症状,包括癫痫发作、皮肤病变和视网膜错构瘤等需要特别关注.对TSC病理生理学的了解有助于初步诊断,可通过各种影像学检查加以支持.在中国儿童中,TSC1和TSC2的大多数突变是新发突变.与TSC2突变相关的症状比TSC1更为严重.基因分析对TSC的诊断具有重要的意义.

5 利益冲突和伦理情况

作者声明没有利益冲突.首都医科大学附属北京儿童医院伦理委员会批准了这项回顾性研究.所有参与者自愿参与并提供书面知情同意书.所有的临床数据和遗传突变数据被存入罕见病数据库——eRAM <http://www.pediascape.org/eram/>.

参考文献

- DiMario F J Jr., Sahin M, Ebrahimi-Fakhari D. Tuberous sclerosis complex. *Pediatric Clinics North Am*, 2015, 62: 633–648
- Schwartz R A, Fernández G, Kotulska K, et al. Tuberous sclerosis complex: advances in diagnosis, genetics, and management. *J Am Acad Dermatol*, 2007, 57: 189–202
- Yates J R W. Tuberous sclerosis. *Eur J Hum Genet*, 2006, 14: 1065–1073
- Toyoshima M, Ohno K, Katsumoto T, et al. Cellular senescence of angiofibroma stroma cells from patients with tuberous sclerosis. *Brain Dev*, 1999, 21: 184–191
- Lawson J A, Chan C F, Chi C S, et al. Managing tuberous sclerosis in the Asia-Pacific region: refining practice and the role of targeted therapy. *J Clin Neurosci*, 2014, 21: 1180–1187
- Osborne J P, Fryer A, Webb D. Epidemiology of tuberous sclerosis. *Ann NY Acad Sci*, 1991, 615: 125–127
- Orlova K A, Crino P B. The tuberous sclerosis complex. *Ann New York Acad Sci*, 2010, 1184: 87–105
- Franz D N, Belousova E, Sparagana S, et al. Everolimus for subependymal giant cell astrocytoma in patients with tuberous sclerosis complex: 2-year open-label extension of the randomised EXIST-1 study. *Lancet Oncol*, 2014, 15: 1513–1520

- 9 Hung C C, Su Y N, Chien S C, et al. Molecular and clinical analyses of 84 patients with tuberous sclerosis complex. *BMC Med Genet*, 2006, 7: 72
- 10 Krueger D A, Northrup H, Northrup H, et al. Tuberous sclerosis complex surveillance and management: recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatric Neurol*, 2013, 49: 255–265
- 11 Zimmer-galler I E, Robertson D M. Long-term observation of retinal lesions in tuberous sclerosis. *Am J Ophthalmol*, 1995, 119: 318–324
- 12 Jang M A, Hong S B, Lee J H, et al. Identification of *TSC1* and *TSC2* mutations in Korean patients with tuberous sclerosis complex. *Pediatric Neurol*, 2012, 46: 222–224
- 13 Mettin R R, Merkenschlager A, Bernhard M K, et al. Wide spectrum of clinical manifestations in children with tuberous sclerosis complex—Follow-up of 20 children. *Brain Dev*, 2014, 36: 306–314
- 14 Cheadle J P, Reeve M P, Sampson J R, et al. Molecular genetic advances in tuberous sclerosis. *Hum Genet*, 2000, 107: 97–114
- 15 Lopez E, Escovich L, Vigna A. Tuberous sclerosis: presentation of a clinical case with oral manifestations. *Med Oral*, 2003, 8: 122–128
- 16 Rodrigues D A, Gomes C M, Costa I M C. Tuberous sclerosis complex. *An Bras Dermatol*, 2012, 87: 184–196
- 17 Yamamoto T, Pipo J R, Feng J H, et al. Novel *TSC1* and *TSC2* mutations in Japanese patients with tuberous sclerosis complex. *Brain Dev*, 2002, 24: 227–230
- 18 Jóźwiak S, Kotulska K, Domańska-Pakieła D, et al. Antiepileptic treatment before the onset of seizures reduces epilepsy severity and risk of mental retardation in infants with tuberous sclerosis complex. *Eur J Paediatr Neurol*, 2011, 15: 424–431
- 19 Monteiro T, Garrido C, Pina S, et al. Esclerosis tuberosa: caracterización clínica e intento de correlación fenotipo/genotipo. *Anales de Pediatría*, 2014, 81: 289–296
- 20 Xu L, Burke T R, Greenberg J P, et al. Infrared imaging and optical coherence tomography reveal early-stage astrocytic hamartomas not detectable by funduscopy. *Am J Ophthalmol*, 2012, 153: 883–889.e2
- 21 Roach E S, DiMario F J, Kandt R S, et al. Tuberous Sclerosis Consensus Conference: recommendations for diagnostic evaluation. *J Child Neurol*, 1999, 14: 401–407
- 22 Shields C L, Benevides R, Materin M A, et al. Optical coherence tomography of retinal astrocytic hamartoma in 15 cases. *Ophthalmology*, 2006, 113: 1553–1557
- 23 de Ribaupierre S, Dorfmueller G, Bulteau C, et al. Subependymal giant-cell astrocytomas in pediatric tuberous sclerosis disease: when should we operate? *Neurosurgery*, 2007, 60: 83–89
- 24 Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet*, 2008, 372: 657–668
- 25 Slegtenhorst M. Identification of the tuberous sclerosis gene *TSC1* on chromosome 9q34. *Science*, 1997, 277: 805–808
- 26 Bai D Y, Wang X, Zhao J Y, et al. Comparison of color fundus photography, infrared fundus photography, and optical coherence tomography in detecting retinal hamartoma in patients with tuberous sclerosis complex. *Chin Med J*, 2016, 129: 1229–1235
- 27 Nellist M, Brouwer R W W, Kockx C E M, et al. Targeted next generation sequencing reveals previously unidentified *TSC1* and *TSC2* mutations. *BMC Med Genet*, 2015, 16: 10
- 28 Dabora S L, Jozwiak S, Franz D N, et al. Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of *TSC2*, compared with *TSC1*, disease in multiple organs. *Am J Hum Genet*, 2001, 68: 64–80
- 29 Staley B A, Vail E A, Thiele E A. Tuberous sclerosis complex: diagnostic challenges, presenting symptoms, and commonly missed signs. *Pediatrics*, 2011, 127: e117–e125
- 30 Consortium E C T S. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell*, 1993, 75: 1305–1315
- 31 Ewalt D H, Sheffield E, Sparagana S P, et al. Renal lesion growth in children with tuberous sclerosis complex. *J Urol*, 1998, 160: 141–145
- 32 Jones A C, Shyamsundar M M, Thomas M W, et al. Comprehensive mutation analysis of *TSC1* and *TSC2*—and phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis. *Am J Hum Genet*, 1999, 64: 1305–1315
- 33 Wilson P J, Ramesh V, Kristiansen A, et al. Novel mutations detected in the *TSC2* gene from both sporadic and familial TSC patients. *Hum Mol Genet*, 1996, 5: 249–256
- 34 Kövesdi E, Hadzsiev K, Komlósi K, et al. Novel *TSC1* mutation associated with variable phenotypes in tuberous sclerosis. *Orvosi Hetilap*, 2013, 154: 914–918