

- [12] 井晓荣,王超,梁秦川. 细胞因子水平与癫痫发作关系的研究进展[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2009, 8(6): 561-563.
- [13] 钱小燕,程庆璋. 脑梗死后癫痫患者免疫球蛋白与补体的变化及意义[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 17(19): 5-7.
- [14] Ferlazzo E, Gasparini S, Beghi E, et al. Epilepsy in cerebrovascular diseases: Review of experimental and clinical data with meta-analysis of risk factors [J]. *Epilepsia*, 2016, 57: 1205-1214.
- [15] Wang G, Jia H, Chen C, et al. Analysis of risk factors for first seizure after stroke in Chinese patients [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013(3): 702871.
- [16] 黄成锋,卢常盛,黄丹丹. 缺血性脑卒中后癫痫相关因素分析[J]. 中华临床医师杂志, 2015, 9(3): 139-141.
- [17] 谭家香,李丽萍,李玲. 脑卒中后癫痫 186 例临床特点[J]. 广东医学, 2002, 23(9): 934-936.
- [18] Berges S, Moulin T, Berger E, et al. Seizures and epilepsy following strokes: recurrence factors [J]. *Eur Neurol*, 2000, 43(1): 3-8.
- [19] Tada H, Takanashi J, Okuno H, et al. Predictive score for early diagnosis of acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion (AESD) [J]. *J Neurol Sci*, 2015, 358(1-2): 62-65.
- [20] Conrad J, Pawlowski M, Dogan M, et al. Seizures after cerebrovascular events: risk factors and clinical features [J]. *Seizure*, 2013, 22: 275-282.
- [21] 周发明,陈光辉. 卒中后癫痫的临床特点及视频脑电图分析[J]. 湖北医药学院学报, 2014, 33(5): 444-447.
- [22] Winstein CJ, Stein J, Arena R, et al. Guidelines for Adult Stroke Rehabilitation and Recovery: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association [J]. *Stroke*, 2016, 47: 98-169.
- [23] Glauser T, Ben-Menachem E, Bourgeois B, et al. Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes [J]. *Epilepsia*, 2013, 54: 551-563.
- [24] Sheth KN, Martini SR, Moomaw CJ, et al. Prophylactic Antiepileptic Drug Use and Outcome in the Ethnic/Racial Variations of Intracerebral Hemorrhage Study [J]. *Stroke*, 2015, 46: 3532-3535.
- [25] Guo J, Guo J, Li J, et al. Statin treatment reduces the risk of post stroke seizures [J]. *Neurology*, 2015, 85: 701-707.
- [26] Stephen LJ, Kwan P, Brodie MJ. Does the cause of localisation-related epilepsy influence the response to antiepileptic drug treatment? [J]. *Epilepsia*, 2001, 42(3): 357-362.

全外显子测序技术在癫痫诊断中的应用进展

丁思琦 综述 徐惠琴 审校

温州医科大学附属第一医院神经内一科,浙江省温州市 325003

摘要: 癫痫是一种大脑神经元异常放电引起的慢性脑部疾病,以短暂中枢神经系统功能失常为特征。根据病因分类,遗传性癫痫约占各类癫痫总数的 30%。全外显子测序(WES)通过目标序列捕获技术将基因组的全部外显子区域 DNA 捕获后进行高通量测序,因其功能强大且成本效益高,在寻找遗传性癫痫的致病基因中有愈加广泛的作用。本综述将讨论 WES 在癫痫诊断中的应用进展。

关键词: 癫痫; 全外显子组基因检测; 基因突变; 遗传

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2019.02.019

癫痫是由于大脑皮质神经元过度放电引起的脑功能失调,其在发作类型、发病年龄、临床特征、

脑电表现和治疗反应等方面都具有高度的异质性。由于癫痫通常发生在一个没有家族病史的个体中,

收稿日期:2018-04-25;修回日期:2018-11-28

作者简介:丁思琦(1993-),女,在读研究生,主要从事癫痫方向研究。

通信作者:徐惠琴(1972-),女,副教授,硕士生导师,副主任医师,硕士学位,主要从事癫痫药物治疗结局研究及抗癫痫药物作用机制研究。
E-mail: xuhuiqin1972@163.com。

长期以来被认为是散发或后天的,而不是遗传的。基因组学技术的出现,提高了对整个基因组进行突变扫描的能力,在过去的十年加速了我们对癫痫这一疾病的认识,如今越来越多的癫痫基因已被定位。根据病因分类,遗传性癫痫约占各类癫痫总数的 30%^[1]。传统分子遗传学相关的概念方法指导我们通过单基因测序解决基因检测问题。最初的基因检测是根据临床影像和癫痫患者的脑电图(electroencephalogram, EEG)结果来进行选择的。如果没有发现致病基因突变,随后可能会要求进一步的基因检测,并根据与可能表型之间的关系,对特定的基因进行连续测试。然而,这个过程很昂贵,且耗费时间。全外显子组测序技术(whole exome sequencing, WES)利用序列捕获技术选择性地将人类基因组外显子区域 DNA 捕捉并富集后进行高通量测序,具有成本低、针对性强、覆盖率大及数据分析效率高等优点,极大地改变了诊断工作流程,使大量的基因能够同时测序,并使越来越多的病人迅速获得分子诊断,已经成为寻找癫痫致病基因的重要方法。本文将对全外显子测序技术在癫痫领域的研究进展进行概述,以更好的辅助癫痫的临床诊断。

1 全外显子测序技术的介绍及优势

传统的第一代测序技术虽然具有高度准确性和简单、快捷等优点,但由于其测序通量低,难以对没有明确候选基因或是候选基因数量较多的大样本病例进行筛查,对于患病数较少的家族来说很难找到致病基因,于是第二代测序技术应运而生。第二代测序技术的诞生,重塑了人类对生命科学的认知,甚至催生了精准医学时代^[2,3]。

第二代测序(next-generation sequencing, NGS)包括全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)、全外显子基因测序(whole exome sequencing, WES)、临床外显组测序(clinical exome sequencing, CES)和基因面板测序(gene panel)。WGS 需要对全基因组进行覆盖,因此有更大的机会检测到结构重组和拷贝数变异。然而,由于我们破译编码区域以外突变的能力还不完善,WGS 的数据分析通常局限于编码基因,造成工作量巨大而获得有效信息少,不利于推广使用。2009 年,Ng 等^[4]首次运用全外显子测序技术来搜寻单基因病致病基因,在 4 例无血缘关系的弗里曼谢尔登综合征患者中,发现位于 MYH3 的点突变是其致病基因。此后,全外显子组测序技术的大规模应用在疾病的病因探索中

发挥了重要作用。

WES 又称为定向外显子组捕获技术,通过外显子 DNA 序列芯片或探针,将基因组中外显子区域的 DNA 序列捕获后集中进行高通量测序,主要包括 3 个步骤:①目标区域序列的富集;②DNA 测序;③生物信息学统计,最后筛选出候选基因,然后通过 Sanger 法验证,最终找到致病基因。比起 WGS, WES 的复杂性和成本都更低,因为外显子区域只占基因的 1%,却涵盖了与基因功能相关的绝大多数功能性变异,即使只对编码区域进行高通量测序,依然能解释至少 85% 的致病基因多态性^[5],从而减少测序的数据总量,降低测序费用,提升捕获区域的测序深度^[6]。通过该方法,已有许多常染色体隐性遗传疾病的致病基因被找到^[7,8]。

2 全外显子测序技术在癫痫诊断中的应用

过去在遗传性癫痫的诊断中,一代测序是主力军,用于检测指定的某个基因的外显子编码区序列。这需要医生对该疾病有个准确的预先诊断,根据癫痫基因关系列表,找到相关的一个或几个基因,申请检测。可想而知,在高通量测序诞生之前,基因检测阳性率非常低,对于新生突变更是大海捞针。在过去,只有少数基因发现与癫痫相关,并且主要集中在一些离子通道(KCNQ2、KCNQ3、KCNT1、KCNA1、CACNA1A、SCN1A 和 SCN2A 等)。当时一个普遍的看法,即诱发癫痫的基因数量很少,并且每一种癫痫综合征仅仅是一个基因突变的结果^[7]。

自从 2009 年全外显子捕获测序技术开展以来,为测序提供了更全面、更经济的选择,成功发现了数百种孟德尔遗传疾病的致病基因,给癫痫致病基因的发现带来了新思路。2012 年,美国医学遗传学和基因组学学院(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)提出了关于全基因组外显子测序的适用对象的指南^[9]:①患者所患疾病是遗传因素导致,且其临床表现不符合目前已知的任何综合征;②患者的临床表现提示该疾病具有显著的遗传异质性;③尽管目前关于此疾病的检查能部分解释患者的临床表现,但仍不能明确地由一种病因解释。根据上述指南,全外显子测序技术适用于原因不明的癫痫患者的病因学检查。利用全外显子测序技术高通量方法检测 DNA,发现了许多意想不到的突变,如涉及染色质的重构和转录调控、神经兴奋性、突触传递、神经元代谢等的各种

基因突变。这些基因包括了原钙黏蛋白 19 (PCDH19) 的基因突变, STXBP1 基因和解旋酶 DNA 结合蛋白 2 (CHD2) 的突变等^[8, 10], 极大地提高了我们对癫痫病因和病理生理学的认识。尽管每个新致病基因的发现可能只发生在一小部分癫痫患者, 但每一项发现都可能为探索该疾病的发生机制提供新的策略, 成为治疗干预的潜在靶点。

以 Dravet 综合征 (Dravet syndrome, DS) 为例, 过去发现有 70% ~ 80% 的 DS 与编码电压门控钠离子通道 $\alpha 1$ 亚单位的基因 SCN1A 突变有关, 但仍有约 25% 的患者为 SCN1A 阴性。2013 年 Suls 等^[11] 运用全外显子测序技术在 9 例 SCN1A 突变阴性的 DS 患者中, 发现了 3 例 CHD2 (染色质解旋酶 DNA 结合蛋白, CHD) 基因突变, 首次提出 CHD2 基因突变与 DS 的相关性。同时研究者发现, 敲除了 CHD2 基因的斑马鱼出现癫痫样放电, 证明 CHD2 的功能突变导致了癫痫性脑病。CHD2 是一个转录激活因子, 主要参与基因转录调控和染色质结构的重塑, 截止 2016 年, 已有 20 多名 CHD2 突变的患者已被明确诊断^[8]。因此, 使用全外显子测序技术来明确癫痫遗传学病因, 从而提高风险评估和治疗的精确性, 是非常有必要的。

Veeramah 等^[12] 通过对 10 个家系 (包括患儿和未患病的父母) 进行了全外显子测序, 这些患儿都表现为难以控制的癫痫发作, 以及发育迟缓、癫痫性脑病、自闭症、认知障碍或运动缺陷等, 测序发现了 15 个新生突变, 其中有 4 个突变与先前发现的严重癫痫相关 (SCN1A、CDKL5 和 EEF1A2), 另有 3 个突变 (KCNH5、CLCN4 和 ARHGEF15) 以往认为与人类癫痫无关, 但目前显示具有高度相关性。

在表现为与 Dravet 综合征类似的与发热相关的癫痫病患者中, Nava 等^[13] 利用相似的方法, 对其中 39 名患者进行全外显子测序, 以及其他 157 名患者随访研究, 结果在 HCN1 基因上发现了 6 个新的突变。HCN1 属于一个超极化激活的、受 cAMP 调控的离子通道, 能调节神经元的兴奋性。先前的研究表明, HCN1 和 HCN2 的罕见变异是特发性癫痫 (idiopathic generalized epilepsy, IGE) 的危险因素^[14]。

Epi 等^[15] 也利用 WES 来确定婴儿痉挛症 (infantile spasms) 和 Lennox-Gastaut syndrome (LGS) 两种典型的癫痫性脑病患者的新生突变, 对 264 名先证者及其父母的外显子进行测序, 发现在 305 个基因

中有 329 个基因突变, 大多数致病突变都是已知的, 包括 SCN1A、SCN8A、STXBP1 和 CDKL5 等, 但有两种致病基因 (GABRB3 和 ALG13) 是新发现的。实验表明, 将 WES 应用于家系分析, 通过先证者和双亲的三人 (trois) 检测方法, 对于未知病因的癫痫病患者来说, 具有相当大的价值。更有趣的是, 该研究对患者临床表现的评估, 揭示了婴儿痉挛症和 LGS 有显著的遗传异质性: 在婴儿痉挛症和 LGS 的患者中均存在 SCN8A、STXBP1、DNM1 和 GABRB3 的突变, 但是存在这些基因突变的患者中, 有的 LGS 患者是由婴儿痉挛症发展而来, 而其中有 3 个案例的 LGS 患者, 最初并没有出现婴儿痉挛, 表明了与这些基因突变相关的表型异质性。

3 全外显子测序技术的局限性

全外显子组测序技术作为一种新工具, 对传统基因筛查后仍未能找到明确致病因素的疾病, 以及分析疾病的遗传基础都发挥了巨大作用, 成为目前研究的热点。但我们应意识到每一种基因技术都有一定的局限性, 全外显子测序无法对整个基因组进行扫描, 且测序后得到海量数据的质量参差不齐, 存在一些假阴性和假阳性, 如何筛选出有意义的突变成为难点与重点^[16]。

Lee 等^[17] 学者对 WES 在实际临床研究中的局限性作了总结: ①在 WES 诊断中, trois 分析费用高, 且有可能在无症状父母中检出阳性, 临床医生可能不会采纳该方法; ②非随机化分组中混杂因素的干扰可能影响诊断率; ③WES 并不能发现所有具有潜在因果关系的基因突变型, 甚至出现严重的遗漏; ④WES 平均序列覆盖率有限, 也不能取样所有的蛋白编码碱基; ⑤WES 家系诊断在对表型数据和变异型两者之间联系的解释分析能力上还有待提高。

由于 WES 是将全基因组外显子区域 DNA 富集后, 进行高通量测序的基因组分析方法, 不能检测到在染色体末端重复区域内的外显子、不能够检测出片段的缺失和插入、三核苷酸重复、染色体结构上的重排、表观遗传学上的修饰以及内含子区域, 无法发现线粒体基因中的突变、非编码区域的突变。鉴于全外显子测序技术上的不足, 我们应当明确, 当外显子分析没有显示致病的基因变异, 不一定患者的 DNA 中没有致病变异, 可能是因为变异所在的区域没有被分析, 也就是说 WES 阴性的结果不能完全用于排除疾病。因此, 当外显子组测序

无法获得预期的表现,我们可能还需要进一步使用疾病特异的靶向基因 panel 进行检测。由于癫痫的遗传异质性强,根据患者临床表现,即使是在已发现的基因中,也很难对具体的责任基因进行预测。这表明,在癫痫诊治过程中,基因诊断的未来将重点放在整个基因组上,而不是单一基因或是基因面板。随着测序成本持续下降,可能会逐渐从外显子测序转移到全基因组测序。然而,利用这些更全面的基因检测技术获得分子诊断数据,关键在于对非编码变异的理解,这既是一个挑战,也是一个机遇。

4 结语

遗传学和基因组学的进步明确表明了遗传因素在癫痫这一疾病中的重要作用,让我们在分子水平上对癫痫有了更深层次的认识。全外显子组测序技术的临床价值在于,可对那些仅靠临床或实验室检查难以确诊的,基因突变型未知的不典型疾病做出诊断,从而更全面地了解疾病的病因及发展史,以期指导特异性治疗^[18]。临床医生应了解何时需要使用 WES 诊断,明确检测的目的、意义、局限性,结合患者的癫痫发作特征以及其他实验室结果,最终得出诊断,对癫痫患者给予遗传咨询的指导,避免为追求诊断而增加患者不必要的经济负担和家庭矛盾。

WES 的发展慢慢将临床有用性和可执行性结合起来,世界各地的多个癫痫中心正在努力建立协作关系,建立临床实验室外显子组序列检测的标准和准则,改进 WES 的技术、统计和生物信息的方法,培养临床医生参与基因诊断临床决策的能力。不论是临床医生,还是癫痫患者,都对未来癫痫的诊治充满了期待,我们有理由相信,随着全外显子组测序技术的普及,基因技术的升级,癫痫精准诊疗将指日可待。

参 考 文 献

- [1] McTague A, Howell KB, Cross JH, et al. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(3): 304-316.
- [2] Vezryoglou K, Cross JH. Targeted Treatment in Childhood Epilepsy Syndromes [J]. *Curr Treat Options Neurol*, 2016, 18(6): 29.
- [3] Rizzo F, Ambrosino P, Guacci A, et al. Characterization of two de novo KCNT1 mutations in children with malignant migrating partial seizures in infancy [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2016, 72: 54-63.
- [4] Ng SB, Turner EH, Robertson PD, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes [J]. *Nature*, 2009, 461(7261): 272-276.
- [5] Rabbani B, Tekin M, Mahdih N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics [J]. *J Hum Genet*, 2014, 59(1): 5-15.
- [6] Besnard T, Garcia-Garcia G, Baux D, et al. Experience of targeted Usher exome sequencing as a clinical test [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2014, 2(1): 30-43.
- [7] Mei D, Parrini E, Marini C, et al. The Impact of Next-Generation Sequencing on the Diagnosis and Treatment of Epilepsy in Paediatric Patients [J]. *Mol Diagn Ther*, 2017, 21(4): 357-373.
- [8] Myers CT, Mefford HC. Genetic investigations of the epileptic encephalopathies: Recent advances [J]. *Prog Brain Res*, 2016, 226: 35-60.
- [9] ACMG Board of Directors. Points to consider in the clinical application of genomic sequencing [J]. *Genet Med*, 2012, 14(8): 759-761.
- [10] Orsini A, Zara F, Striano P. Recent advances in epilepsy genetics [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 667: 4-9.
- [11] Suls A, Jaehn JA, Kecskes A, et al. De novo loss-of-function mutations in CHD2 cause a fever-sensitive myoclonic epileptic encephalopathy sharing features with Dravet syndrome [J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 93(5): 967-975.
- [12] Veeramah KR, Johnstone L, Karafet TM, et al. Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies [J]. *Epilepsia*, 2013, 54(7): 1270-1281.
- [13] Nava C, Dalle C, Rastetter A, et al. De novo mutations in HCN1 cause early infantile epileptic encephalopathy [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(6): 640-645.
- [14] Tang B, Sander T, Craven KB, et al. Mutation analysis of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels HCN1 and HCN2 in idiopathic generalized epilepsy [J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 29(1): 59-70.
- [15] Epi4K Consortium; Epilepsy Phenome/Genome Project, Allen AS, et al. De novo mutations in epileptic encephalopathies [J]. *Nature*, 2013, 501(7466): 217-221.
- [16] Steward CA, Parker APJ, Minassian BA, et al. Genome annotation for clinical genomic diagnostics: strengths and weaknesses [J]. *Genome Med*, 2017, 9(1): 49.
- [17] Lee H, Deignan JL, Dorrani N, et al. Clinical Exome Sequencing for Genetic Identification of Rare Mendelian Disorders [J]. *JAMA*, 2014, 312(18): 1880.
- [18] Johansen Taber K, Dickinson B, Wilson M. The promise and challenges of next-generation genome sequencing for clinical care [J]. *JAMA Intern Med*, 2014, 174(2): 275-280.