

浅谈神经系统遗传性疾病基因诊断策略及问题

李洵桦 陈定邦 吴超

【摘要】 神经系统遗传性疾病临床症状复杂、诊断困难,基因检测是明确诊断的终极手段。近年来分子诊断技术的进步、方法的更新,尤其是二代基因测序技术的广泛应用,使从众多检测方法中选择适宜的基因检测方法成为临床医师的新挑战。本文拟从疾病临床表型出发,结合不同基因突变和基因检测方法,对神经系统单基因遗传病基因诊断策略及问题进行综述。

【关键词】 遗传性疾病,先天性; 神经系统疾病; 基因; 综述

Strategies and problems of genetic diagnosis for neurogenetic diseases

LI Xun-hua, CHEN Ding-bang, WU Chao

Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Sun Yat - sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

Corresponding author: LI Xun-hua (Email: lxh59xyh@sina.com)

【Abstract】 Neurogenetic diseases are difficult to diagnose due to complicated phenotypes. Genetic testing is always the option for final diagnosis. With the progress and update of molecular diagnostic techniques, especially widely usage of next - generation sequencing (NGS), choosing proper sequencing methods is a new challenge. This paper aims to review different strategies and problems of genetic diagnosis for monogenic neurogenetic diseases based on clinical phenotypes, gene mutation characteristics and gene sequencing methodology.

【Key words】 Genetic diseases, inborn; Nervous system diseases; Genes; Review

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81171070).

迄今已经确定的单基因遗传病近 5000 种,其中大多数累及神经系统,导致神经系统遗传性疾病。神经系统遗传性疾病种类繁多且罕见,临床症状复杂,具有高度遗传异质性和临床异质性,且各种疾病之间症状常重叠,故临床诊断困难,基因检测是明确诊断的终极手段。近年来,分子诊断技术的不断进步,尤其是二代基因测序(NGS)技术的广泛应用,使基因检测成本降低、时间减少,然而如何从众多方法中选择适宜的基因检测方法成为临床医师面临的新挑战,本文拟对神经系统单基因遗传病基因诊断策略和问题进行综述。

一、传统基因检测技术的合理选择

传统基因检测技术根据临床表型特征,对候选

基因逐个排查,检测成本高且检测时间长,二代基因测序技术可以显著降低检测成本、减少检测时间,尤其对于种类众多的致病基因。然而对于某些单基因遗传病,靶向单基因检测仍作为首选,这些疾病一般具有如下特征:(1)临床特征明显,可以结合血液生化、影像学等辅助检查明确诊断;家族史明确;确定为单基因致病性突变^[1]。临床明确诊断后,单基因检测阳性检出率较高,如 *ATP7B* 基因突变导致的肝豆状核变性[HLD, 亦称 Wilson 病(WD)]和 *DMD* 基因突变导致的 Duchenne 型肌营养不良症(DMD)。2016 年, Dong 等^[2] 报告大样本肝豆状核变性病例的 *ATP7B* 基因检测结果, 90.03% 患者(569/632)存在 2 种或以上病理性或可能病理性变异,其中 93.85% (534/569)存在 14 种最常见病理性变异中至少 1 种,可见单基因检测对肝豆状核变性的检测效率较高。(2)目前尚有部分遗传性疾病不适宜二代基因测序,如三核苷酸重复突变导致的疾病、亨廷顿病(HD)、部分脊髓小脑共济失调(SCA)、

doi: 10.3969/j.issn.1672-6731.2017.07.002

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81171070)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院神经内科

通讯作者:李洵桦 (Email:lxh59xyh@sina.com)

脆性X染色体综合征(FXS)等;较大缺失或重复突变导致的疾病如Duchenne型肌营养不良症、脊髓性肌萎缩症(SMA)、腓骨肌萎缩症1A型(CMT1A型)等;基因不明确需特殊检测,如面-肩-肱型肌营养不良症(FSHD)等。

选择传统基因检测要求临床医师必须具备充足的特殊基因突变致临床表型的相关知识和丰富的临床经验,以及作出正确诊断,极具挑战性。以腓骨肌萎缩症为例,包括PMP22基因在内的长度为1.50 Mb串联重复突变导致的CMT1A型是最常见类型,占40%~50%,约70%常染色体显性遗传性CMT1型和90%散发性CMT1型为CMT1A型^[3]。Saporta等^[4]研究显示,英国和美国CMT1型患者PMP22基因突变阳性检出率均超过70%,特别是具有典型临床症状且正中神经神经传导速度(NCV)为15~35 m/s的CMT1型患者,PMP22基因突变阳性检出率高达89%,因此,对于正中神经神经传导速度为15~35 m/s的CMT1型患者,应首选PMP22基因检测,若呈阴性再行其他靶向基因测序。但是由于临床医师和电生理学医师存在技术差异,准确分型成为难点,若PMP22基因呈阴性,再进一步行靶向基因测序套餐检测,检测成本可能更高、检测时间可能更长^[4],因此,对于经验不足的临床医师和某些难以临床诊断的病例,应直接选择二代基因测序技术更为便捷。

二、基于二代基因测序的目标区域捕获测序

二代基因测序是一种高通量测序技术,一次运行即可产生数以亿计的短片段序列,显著缩短大规模基因测序时间。通过一系列寡核苷酸探针与全基因组DNA杂交,将基因组特定区域富集,同时进行二代基因测序,是目前应用最广泛的目标区域捕获测序技术。通过检索数据库和文献,筛选出某个临床表型的所有相关致病基因,针对各目标基因外显子区域进行基因测序,可以涵盖与个体临床表型相关的大部分变异。从传统基因检测一次仅能检测一种基因到二代基因测序检测一个基因组(panel),不仅降低检测成本、节省检测时间、提高DNA诊断敏感性,而且简化临床医师选择基因检测的策略。关于基因组的选择,首先,确定与疾病有较强的关联性、有充足的解读依据,且已作为单基因检测;其次,将临床表型重叠但致病基因不同的一组疾病进行基因组检测,可资鉴别诊断^[1]。与全基因组测序(WGS)和全外显子测序(WES)相比,目

标区域捕获测序更加简便、经济,成为目前临床基因检测的重心,广泛应用于神经系统遗传性疾病的基因检测。

1. 腓骨肌萎缩症 亦称遗传性运动感觉神经病(HMSN),是基因型和临床表型异质性较强的周围神经系统遗传性疾病,致病基因50余种,存在多种遗传方式。既往推荐的基因诊断策略主要是根据临床表型和遗传方式再结合基因突变频率选择相应基因检测^[5]。PMP22基因突变导致的CMT1A型是腓骨肌萎缩症的最常见亚型(占40%~50%),其次是MPZ基因点突变导致的CMT1B型(占3%~5%)^[6],而绝大多数X连锁遗传性腓骨肌萎缩症为GJB1基因突变所致,是第2位常见亚型(占7%~12%),因此,对于常染色体显性遗传性CMT1型和散发性CMT1型患者,首先检测PMP22基因大片段重复突变,若呈阴性且家系中无男男遗传,则考虑CMTX1型并检测GJB1基因,若呈阴性,则行MPZ和PMP22基因点突变分析,若仍呈阴性且条件允许,则进一步行常染色体显性遗传性CMT1型其他致病基因如SJMPLE、EGR2、NFL突变分析。由于腓骨肌萎缩症的遗传异质性,传统基因检测效率较低;随着二代基因测序技术的发展和检测成本的降低,通过目标区域捕获测序技术可以进行基因组检测,通常将各致病基因外显子和侧翼序列作为目标序列同时检测,既降低检测费用,又保证绝大部分致病基因的阳性检出率,而且也减少意义不明的基因突变分析。其缺点是与全基因组测序和全外显子测序相比,无法发现新的致病基因。

2. 遗传性痉挛性截瘫 遗传性痉挛性截瘫(HSP)是较罕见的具有高度临床异质性和遗传异质性的神经系统遗传性疾病,除表现为双下肢痉挛性截瘫的上运动神经元损害外,还可以合并多种神经系统及其他系统损害,且与某些神经系统遗传性疾病的临床表现相重叠,因此,即使是临床经验丰富的神经科医师也难以鉴别诊断。目前已克隆的基因有70余种,逐一检测,选择困难且耗时、费力。SPG4型是西方国家最常见的遗传性痉挛性截瘫亚型,系SPASTIN基因突变所致^[7],占40%以上,其次是ATL1基因突变导致的SPG3A型^[8],再次是REEPI基因突变导致的SPG31型^[9],均为常染色体显性遗传;而SPG11型、SPG7型和SPG5型是最常见的常染色体隐性遗传亚型^[10],其中,SPG7型表现为突出的小脑症状,SPG5型为单纯型遗传性痉挛性截

瘫,SPG11 型为单纯型遗传性痉挛性截瘫伴胼胝体变薄。因此,对于常染色体显性遗传家系,应依次检测 *SPG4*、*SPG3A* 和 *SPG31* 基因;对于常染色体隐性遗传家系,应结合临床症状,检测 *SPG11*、*SPG7* 和 *SPG5* 基因;对于散发性或家族史不明确的患者,应优先检测 *SPG4* 和 *SPG5* 基因^[11]。二代基因测序技术可以同时多个甚至所有已知的遗传性痉挛性截瘫致病基因进行检测,显著优化基因检测策略。2013 年,Kumar 等^[12]采用目标区域捕获测序对 27 例 *SPG4* 基因阴性的遗传性痉挛性截瘫患者进行 10 种常染色体隐性和 9 种常染色体显性致病基因检测,发现 7 例(25.93%)呈阳性结果。Balicza 等^[13]采用目标区域捕获测序结合全外显子测序对 58 个遗传性痉挛性截瘫家系的先证者进行基因检测,结果显示,20 例(34.48%)明确诊断。Koutsis 等^[14]对 1 例遗传性痉挛性截瘫患者进行 2731 种已知基因检测,发现 1 种新的致病基因——*ABCD1* 基因。根据目前的技术条件,从经济角度考虑可以先检测 *SPG4* 基因,若呈阴性,再采用二代基因测序技术进行其余基因检测,若仍呈阴性,则可以考虑行所有致病基因目标区域捕获测序或全外显子测序。

3. 原发性肌张力障碍 原发性肌张力障碍是单基因遗传病,目前文献报道有 27 种肌张力障碍基因位点,即 DYT1~27 型。不同基因型致病机制不同,治疗效果也不尽相同,因此,通过基因检测确定基因型十分重要。既往通常根据临床特点选择基因,如 DYT1 型于儿童期或青春期发病,肌张力障碍逐渐自单侧肢体进展至全身;DYT5 型为多巴反应性肌张力障碍(DRD),表现为晨轻暮重,对左旋多巴反应极佳;DYT8~10 型为发作性肌张力障碍,其中 DYT10 型抗癫痫药物(AEDs)治疗有效。随着二代基因测序技术的发展,基因诊断更加简便、直接,并且在发现新的致病基因和致病性突变中发挥重要作用,Fuchs 等^[15]采用全外显子测序发现 DYT25 型致病基因为 *GNAL* 基因;随后 Zech 等^[16]采用该项技术发现 DYT27 型致病基因为 *COL6A3* 基因。如果根据某种特定临床表型检测相关基因后未发现阳性结果,可以选择目标区域捕获测序对所有已知基因进行检测。值得注意的是,对于原发性肌张力障碍,应严格把握基因检测指征,首先确定为肌张力障碍,其次排除继发性肌张力障碍,这是由于其他因素如药物不良反应、毒物毒性作用及其他遗传性疾病也可以引起肌张力障碍,如肝豆状核变性。进

行目标区域捕获测序前,若患者存在特定临床表型,可以选择相应诊断性治疗方法,如左旋多巴对多巴反应性肌张力障碍有戏剧性改善效果,卡马西平对发作性运动诱发性运动障碍(PKD)有显著疗效。如果上述诊断性治疗方法仍不能明确诊断或无助于筛选候选基因,则可以考虑采用目标区域捕获测序对所有 *DYT* 基因进行检测。

4. 遗传性肌病 遗传性肌病具有高度临床异质性和遗传异质性,主要包括肌营养不良症、先天性肌病、代谢性肌病、神经-肌肉接头病和离子通道病等,临床表现复杂且常重叠,相关致病基因种类繁多,且部分基因较大、外显子较多、致病性突变位点繁多。尽管肌肉病理学检测有助于候选基因的选择,但技术要求高且费用昂贵,常不能满足诊断需求。传统基因检测需根据临床表型逐个检测候选基因,耗时长、费用高,因此,遗传性肌病整体基因诊断率较低。目标区域捕获测序技术的高通量、高选择性、低成本优点对遗传性肌病的分子诊断具有明显优势。2015 年,傅晓娜等^[17]采用目标区域捕获测序对 134 例遗传性肌病患者进行 125 种相关基因检测,74 例确定致病性突变,阳性检出率达 55.22%,包括代谢性肌病、先天性肌病、Duchenne 型肌营养不良症、Emery-Dreifuss 肌营养不良症(EDMD)、先天性肌营养不良症(CMD)、抗肌萎缩蛋白病、肢带型肌营养不良症(LGMD)等,其中先天性肌营养不良症包括先天性肌营养不良症 1A 型(MDC1A 型)、Ullrich 型先天性肌营养不良症(UCMD)、Bethlem 肌病、核纤层蛋白相关先天性肌营养不良症等。Tian 等^[18]采用目标区域捕获测序技术对 35 个肌病家系进行 238 种相关基因检测,包括代谢性肌病、先天性肌无力综合征、先天性肌病、先天性肌营养不良症、先天性肌强直、运动神经元病(MND)、腓骨肌萎缩症等,21 个家系(60%)存在临床表型-基因型相匹配的致病性突变,8 个家系(22.86%)存在可疑致病性突变。2016 年,Kuhn 等^[19]对 58 例拟诊肢带型肌营养不良症但无法临床分型的患者进行目标区域捕获测序,包括 23 种 *LGMD* 基因和 15 种导致近似表型的基因,19 例(76%)明确诊断。上述研究结果提示,当特异性临床表型足以指向某一具体疾病或基因时,应首先选择特定基因诊断,例如,Duchenne 型肌营养不良症通常于幼年发病,腓肠肌肥大,血清肌酸激酶(CK)水平明显升高,肌肉病理学显示抗肌萎缩蛋白(dystrophin)表达缺失,均支持诊断,此时

可以直接行 *DMD* 基因检测而不必要行基因组检测。如果临床表型提示为一组疾病,如肢带肌和四肢近端肌无力和肌萎缩,血清肌酸激酶、肌电图和肌肉组织活检提示肌源性损害,临床疑诊肢带型肌营养不良症,可以考虑行 *LGMD* 基因组检测,如果不能准确分型,则可以考虑目标区域捕获测序检测所有相似表型的基因,较逐一检测成本低、时间短。

5. 其他疾病 目前,共济失调、运动神经元病、癫痫、线粒体病、糖原沉积病等多种按照临床表型分类的疾病群也可以采用目标区域捕获测序。相信随着技术进步、成本下降,目标区域捕获测序技术将越来越多地应用于临床,从而使越来越多患者获得明确诊断。通过某一临床表型将已知相关基因合并为基因组检测,使临床医师无需为选择准确的目标基因和减轻患者经济负担煞费苦心,也似乎降低临床医师对掌握临床表型和诊断策略的要求。

三、全外显子测序或全基因组测序

高通量测序技术的发展和检测成本的降低,使全外显子测序和全基因组测序在神经内科临床和科研中得到广泛应用。全外显子测序系通过序列捕获技术将全基因组外显子区域靶向捕获并富集,再进行高通量测序的基因组分析方法^[20]。人类基因组约含 3×10^9 个碱基对,其中仅 1%~2% DNA 序列编码蛋白质,约 85% 的遗传变异集中于蛋白编码区,即外显子。因此,全外显子测序可以确定大多数罕见神经系统疾病的致病基因^[21]。全基因组测序可以获得非编码区信息,是对全外显子测序的重要补充,但检测成本较高,而且由于涉及大量非编码序列,信息量较大、基因分析较复杂^[22]。

对于单基因遗传病,特别是能够通过单个基因或基因组明确诊断的疾病,采用全外显子测序甚至全基因组测序,一方面耗费人力和物力,另一方面不能保证足够的测序深度和广度,使测序敏感性下降。例如,对于有明确家族史的共济失调患者,基因组检测即可检出常见基因突变,仅当基因组检测呈阴性时,方启动全外显子测序,此时有可能发现新的基因突变位点,如 *SCA35* 型致病基因 *TGM6* 基因^[23]。因此,临床表型难以确定某一基因组的疾病;存在多系统症状的疾病,如伴共济失调的痉挛性截瘫(痉挛性截瘫基因组检测呈阴性);经常规基因检测或表型相关基因组检测未发现基因突变而临床表型高度提示单基因遗传病,方启动全外显子测序或全基因组测序^[1]。值得注意的是,由于捕获

效能的原因,无论是全外显子测序还是全基因组测序均无法覆盖全部外显子和基因组,因此应检测单核苷酸变异或长度不超过 8~10 bp 的多核苷酸变异,而不应检测致病性重复序列或长片段缺失。鉴于此,临床医师在制定全外显子测序和(或)全基因组测序前,应首先仔细分析家族史,明确核心症候群,再广泛查阅相关文献,谨慎决定^[20]。通常有 25%~60% 进行全外显子测序的患者能够确定致病基因^[20,24],然而,测序的同时可以产生大量不确定的基因突变,对其致病性的解读应严格按照国际标准与指南^[25]。还应注意的是,基因检测结果的解读是动态发展的,随着科学知识的积累,数据意义常发生变化,因此,对于关键的候选致病基因,严密的功能学试验有助于确定其致病性并寻找适宜的干预措施。

全外显子测序和(或)全基因组测序的应用可以显著加速发现疾病新基因的进程,但测序策略的合理选择是筛查致病基因的重要保障。对于常染色体隐性遗传性疾病,分析基因检测结果时应首先考虑纯合突变和复合杂合突变;对于常染色体显性遗传性疾病,全外显子测序常检测到大量候选杂合突变,故应结合多种策略进一步确定致病性突变。当疾病基因异质性明显时,基因检测策略即显得更加重要。筛查家族性帕金森病致病基因时,常通过大家系或数目众多的正常对照确定可能的致病基因,如 *VPS35* 和 *DNAJC13* 基因^[26-27]。在无足够大家系的情况下,Farlow 等^[28]设计两阶段研究方案,包括 1 个拥有 32 个帕金森病家系 93 例帕金森病患者的发现组和 1 个拥有 49 例帕金森病患者的重复组,进行全外显子测序,结果显示,发现组患者 *TNK2* 和 *TNR* 基因的可能致病性突变亦见于重复组;发生上述突变的 12 个家系中 *TNK2* 和 *TNR* 基因共检出 9 种变异,均经 Sanger 测序证实可能是帕金森病新的可疑致病性突变。

高通量测序技术的推广必将加速罕见病新的致病基因的发现,同时也将带来新的问题和挑战:(1)全外显子测序可以缩短病因筛查过程,但在绝大多数情况下,寻找到致病性突变并不意味着治愈患者。(2)全外显子测序有时可以意外发现与主要疾病无关的致病性突变,此时临床医师应根据临床需求进行医疗监控,甚至启动必要的治疗措施。(3)全外显子测序并未覆盖全部基因组序列,即使呈阴性结果也不能完全排除某种遗传学病因。因此,当基

因检测得不到确定结论时,临床医师和遗传咨询师有责任帮助患者及其家属正确看待检测结果^[29-30]。

四、染色体微阵列分析

染色体微阵列分析(CMA)技术可以检测人类基因组 DNA 重复和缺失的拷贝数变异(CNV),是一种分子核型分析技术,可以检出核型分析检测不到的基因组微缺失或微重复变异。根据芯片设计与检测原理的不同,染色体微阵列分析技术可以分为两种类型:基于微阵列的比较基因组杂交(aCGH)技术和单核苷酸多态性微阵列(SNP array)技术^[31],主要用于检测大片段缺失和重复,适用于孤独症谱系障碍(ASDs)、儿童精神发育迟缓、先天性畸形等。

染色体微阵列分析技术应用前,儿童精神发育迟缓和先天性畸形的病因诊断是临床医师的难题,近 10 年来其诊断率有所提高。Sagoo 等^[32]的 Meta 分析显示,13 926 例经核型分析无异常的精神发育迟缓和先天性畸形患儿中约 10% 经染色体微阵列分析检出致病性突变。袁海明等^[33]对 2000 例先天性缺陷(包括智力低下、发育迟缓、多发性畸形、自闭症、癫痫等)患儿进行染色体微阵列分析,阳性检出率达 26.10%(522/2000)。Roberts 等^[34]对 215 例孤独症、孤独症谱系障碍、发育迟缓或学习障碍患者分别进行包含 105×10^3 和 180×10^3 个探针的寡核苷酸微阵列分析,结果显示,45 例(20.93%)拷贝数变异,包括 49 种,其中 32 种确定为致病性拷贝数变异,余 17 种临床意义不明。Schaefer 等^[35]对 68 例孤独症患儿进行染色体微阵列分析,拷贝数变异阳性检出率为 20.59%(14/68)。文献报道的染色体微阵列分析对孤独症和学习障碍的阳性检出率高于核型分析和脆性染色体检测。Michelson 等^[36]总结 1980-2009 年的 7000 篇文献采用不同检测方法对全面性发育迟缓(GDD)和智力障碍患儿的阳性检出率,染色体微阵列分析为 7.8%,G 显带核型分析为 4%,亚端粒荧光原位杂交(FISH)为 3.5%;约 10% 患儿系 X 连锁基因突变所致,其中在有确切 X 连锁家族史的男性患儿中约 42% 可以检出 X 连锁基因突变,例如,2% 轻至中度智力障碍患儿可以检出 *FMR1* 基因全扩增,1.5% 中至重度全面性发育迟缓或智力障碍女性患儿可以检出与 Rett 综合征相关的 *MeCP2* 基因突变。染色体微阵列分析可以用于特发性全面性癫痫的遗传风险评价。特发性全面性癫痫约占所有癫痫的 30%,虽然预测与遗传因素有关,但绝大多数未检出致病基因。研究显示,有 1.0% ~

1.3% 单纯特发性全面性癫痫患儿(排除孤独症、情感障碍和严重智力障碍)可以检出 15q13.3 区域 *CHRNA7* 基因缺失,该突变与智力障碍、孤独症和精神分裂症有关^[37-38]。染色体微阵列分析还可以用于其他神经系统疾病的风险评价,Shoichet 等^[39]采用基于微阵列的比较基因组杂交技术检测 72 例散发性肌萎缩侧索硬化症(ALS)患者,检出 11 种长度 < 1 Mb 的变异(包括重复突变 6 种、缺失突变 5 种),其中 5 种仅见于肌萎缩侧索硬化症患者,提示拷贝数变异可能是肌萎缩侧索硬化症易感性的候选病因。

然而,染色体微阵列分析的适应症主要是精神运动发育迟缓、自闭症、多发性畸形等,且临床表型多样的阳性检出率远高于单一临床表型^[33]。除适应症外,该项技术还存在一定局限性,不能检出染色体平衡易位,不能检出点突变和重复突变等,因此,对于染色体微阵列分析呈阴性的患者还应行核型分析、原位荧光杂交或点突变和重复突变检测。

综上所述,对于临床医师而言,临床表型是首先获得的信息,临床表型和基因型异质性使致病基因的筛选变得复杂。对于某些特征性临床症状,能够直接指向某一具体疾病和基因,不建议进行大范围基因检测,而是首先选择单一基因检测;某种临床表型涉及的基因达数千种、数十种甚至数百种,而已知致病基因的临床表型也有多种,可能存在未发现但与该基因相关的临床表型,建议选择目标区域捕获测序对相关基因进行筛查。在进行检测结果解读时,是否为致病性突变位点、基因突变是否与临床表型一致,临床医师不能依赖基因检测机构的结论,必须对临床表型和基因型的相关性具备一定识别能力,要有自己的判断。此外,尽管人类基因组遗传多态性和致病性突变数据库信息不断丰富,但关于许多罕见病的遗传学数据仍不完善,仍有许多突变位点的致病性尚不确定,二代基因测序技术检出基因突变及其位点较多,但其致病性信息不足,检测结果的判断不准确,可能使部分患者不能明确诊断。因此,基因诊断是一个临床信息和生物学信息不断沟通、不断更新的过程。

参 考 文 献

- [1] Xue Y, Ankala A, Wilcox WR, Hegde MR. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genet Med*, 2015, 17:444-451.
- [2] Dong Y, Ni W, Chen WJ, Wan B, Zhao GX, Shi ZQ, Zhang Y,

- Wang N, Yu L, Xu JF, Wu ZY. Spectrum and Classification of ATP7B Variants in a Large Cohort of Chinese Patients with Wilson's Disease Guides Genetic Diagnosis. *Theranostics*, 2016, 6:638-649.
- [3] Gess B, Schirmacher A, Boentert M, Young P. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a German neuromuscular center population. *Neuromuscul Disord*, 2013, 23:647-651.
- [4] Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SM, Siskind CE, Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol*, 2011, 69:22-33.
- [5] Zhang RX, Tang BS. Classification and molecular diagnostic procedure for Charcot-Marie-Tooth diseases. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2012, 29:553-557.[张如旭, 唐北沙. 腓骨肌萎缩症的分型与分子诊断流程. *中华医学遗传学杂志*, 2012, 29:553-557.]
- [6] Birouk N, Gouider R, Guern E, Gugenheim M, Tardieu S, Maisonneuve T, Forestier N, Agid Y, Brice A, Bouche P. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication: clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain*, 1997, 120:813-823.
- [7] Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, Paternotte C, Samson D, Artiguenave F, Davoine CS, Cruaud C, Dürr A, Wincker P, Brottier P, Cattolico L, Barbe V, Burgunder JM, Prud'homme JF, Brice A, Fontaine B, Heilig B, Weissenbach J. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet*, 1999, 23:296-303.
- [8] Sauter SM, Engel W, Neumann LM, Kunze J, Neesen J. Novel mutations in the *Atlastin* gene (*SPG3A*) in families with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia and evidence for late onset forms of HSP linked to the *SPG3A* locus. *Hum Mutat*, 2004, 23:98.
- [9] Hewamadduma C, McDermott C, Kirby J, Grierson A, Panayi M, Dalton A, Rajabally Y, Shaw P. New pedigrees and novel mutation expand the phenotype of *REEP1*-associated hereditary spastic paraplegia (HSP). *Neurogenetics*, 2009, 10:105-110.
- [10] Stevanin G, Santorelli FM, Azzedine H, Coutinho P, Chomilier J, Denora PS, Martin E, Ouvrard-Hernandez AM, Tessa A, Bouslam N, Lossos A, Charles P, Loureiro JL, Elleuch N, Confavreux C, Cruz VT, Ruberg M, Leguern E, Grid D, Tazir M, Fontaine B, Filla A, Bertini E, Dürr A, Brice A. Mutations in *SPG11*, encoding spatacsin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat Genet*, 2007, 39:366-372.
- [11] Rong TY, Chen SD. The clinical features and the strategy of genetic diagnosis in hereditary spastic paraplegia. *Zhen Duan Xue Li Lun Yu Shi Jian*, 2011, 10:175-178.[戎天艺, 陈生弟. 遗传性痉挛性截瘫的临床表现与基因诊断策略. *诊断学理论与实践*, 2011, 10:175-178.]
- [12] Kumar KR, Blair NF, Vandebona H, Liang C, Ng K, Sharpe DM, Grünewald A, Gölntz U, Saviouk V, Rolf A, Klein C, Sue CM. Targeted next generation sequencing in *SPAST*-negative hereditary spastic paraplegia. *J Neurol*, 2013, 260:2516-2522.
- [13] Balicza P, Grosz Z, Gonzalez MA, Bencsik R, Pentelenyi K, Gal A, Varga E, Klivenyi P, Koller J, Züchner S, Molnar JM. Genetic background of the hereditary spastic paraplegia phenotypes in Hungary - An analysis of 58 probands. *J Neurol Sci*, 2016, 364:116-121.
- [14] Koutsis G, Lynch DS, Tucci A, Houlden H, Karadima G, Panas M. A novel *ABCD1* mutation detected by next generation sequencing in presumed hereditary spastic paraplegia: a 30-year diagnostic delay caused by misleading biochemical findings. *J Neurol Sci*, 2015, 355:199-201.
- [15] Fuchs T, Saunders - Pullman R, Masuho I, Luciano MS, Raymond D, Factor S, Lang AE, Liang TW, Trosch RM, White S, Ainehsazan E, Hervé D, Sharma N, Ehrlich ME, Martemyanov KA, Bressman SB, Ozelius LJ. Mutations in *GNAL* cause primary torsion dystonia. *Nat Genet*, 2013, 45:88-92.
- [16] Zech M, Lam DD, Francescato L, Schormair B, Salminen AV, Jochim A, Wieland T, Lichtner P, Peters A, Gieger C, Lochmüller H, Strom TM, Haslinger B, Katsanis N, Winkelmann J. Recessive mutations in the $\alpha 3$ (VI) collagen gene *COL6A3* cause early-onset isolated dystonia. *Am J Hum Genet*, 2015, 96:883-893.
- [17] Fu XN, Liu AJ, Yang HP, Wei CJ, Ding J, Wang S, Wang JM, Yuan Y, Jiang YW, Xiong H. Application of targeted technology and next generation sequencing in molecular diagnosis of inherit myopathy. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2015, 53:741-746.[傅晓娜, 刘爱杰, 杨海坡, 魏翠洁, 丁娟, 王爽, 王静敏, 袁云, 姜玉武, 熊晖. 靶向捕获二代测序技术在遗传性肌病诊断中的应用. *中华儿科杂志*, 2015, 53:741-746.]
- [18] Tian X, Liang WC, Feng Y, Wang J, Zhang VW, Chou CH, Huang HD, Lam CW, Hsu YY, Lin TS, Chen WT, Wong LJ, Jong YJ. Expanding genotype/phenotype of neuromuscular diseases by comprehensive target capture/NGS. *Neurol Genet*, 2015, 1:E14.
- [19] Kuhn M, Gläser D, Joshi PR, Zierz S, Wenninger S, Schoser B, Deschauer M. Utility of a next-generation sequencing-based gene panel investigation in German patients with genetically unclassified limb-girdle muscular dystrophy. *J Neurol*, 2016, 263:743-750.
- [20] Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, Braxton A, Beuten J, Xia F, Niu Z, Hardison M, Person R, Bekheirnia MR, Leduc MS, Kirby A, Pham P, Scull J, Wang M, Ding Y, Plon SE, Lupski JR, Beaudet AL, Gibbs RA, Eng CM. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med*, 2013, 369:1502-1511.
- [21] Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakkaloglu A, Ozen S, Sanjad S, Nelson-Williams C, Farhi A, Mane S, Lifton RP. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106:19096-19101.
- [22] McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, Hirschhorn JN. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet*, 2008, 9:356-369.
- [23] Wang JL, Yang X, Xia K, Hu ZM, Weng L, Jin X, Jiang H, Zhang P, Shen L, Guo JF, Li N, Li YR, Lei LF, Zhou J, Du J, Zhou YF, Pan Q, Wang J, Wang J, Li RQ, Tang BS. *TGM6* identified as a novel causative gene of spinocerebellar ataxias using exome sequencing. *Brain*, 2010, 133:3510-3518.
- [24] Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet*, 2012, 20:490-497.
- [25] Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, 2015, 17:405-424.
- [26] Vilariño-Güell C, Wider C, Ross OA, Dachsel JC, Kachergus JM, Lincoln SJ, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Wilhoite GJ, Bacon JA, Behrouz B, Melrose HL, Hentati E, Puschmann A, Evans

- DM, Conibear E, Wasserman WW, Aasly JO, Burkhard PR, Djaldetti R, Ghika J, Hentati F, Krygowska-Wajs A, Lynch T, Melamed E, Rajput A, Rajput AH, Solida A, Wu RM, Uitti RJ, Wszolek ZK, Vingerhoets F, Farrer MJ. VPS35 Mutations in Parkinson Disease. *Am J Hum Genet*, 2011, 89:162-167.
- [27] Vilarinho-Güell C, Rajput A, Milnerwood AJ, Shah B, Szu-Tu C, Trinh J, Yu I, Encarnacion M, Munsie LN, Tapia L, Gustavsson EK, Chou P, Tatarnikov I, Evans DM, Pishotta FT, Volta M, Beccano-Kelly D, Thompson C, Lin MK, Sherman HE, Han HJ, Guenther BL, Wasserman WW, Bernard V, Ross CJ, Appel-Cresswell S, Stoessl AJ, Robinson CA, Dickson DW, Ross OA, Wszolek ZK, Aasly JO, Wu RM, Hentati F, Gibson RA, McPherson PS, Girard M, Rajput M, Rajput AH, Farrer MJ. DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet*, 2014, 23:1794-1801.
- [28] Farlow JL, Robak LA, Hetrick K, Bowling K, Boerwinkle E, Coban - Akdemir ZH, Gambin T, Gibbs RA, Gu S, Jain P, Jankovic J, Jhangiani S, Kaw K, Lai D, Lin H, Ling H, Liu Y, Lupski JR, Muzny D, Porter P, Pugh E, White J, Doheny K, Myers RM, Shulman JM, Foroud T. Whole-exome sequencing in familial Parkinson disease. *JAMA Neurol*, 2016, 73:68-75.
- [29] Hayden EC. Sequencing set to alter clinical landscape. *Nature*, 2012, 482:288.
- [30] Bowdin S, Gilbert A, Bedoukian E, Carew C, Adam MP, Belmont J, Bernhardt B, Biesecker L, Bjornsson HT, Blitzer M, D'Alessandro LC, Deardorff MA, Demmer L, Elliott A, Feldman GL, Glass IA, Herman G, Hindorff L, Hisama F, Hudgins L, Innes AM, Jackson L, Jarvik G, Kim R, Korf B, Ledbetter DH, Li M, Liston E, Marshall C, Medne L, Meyn MS, Monfared N, Morton C, Mulvihill JJ, Plon SE, Rehm H, Roberts A, Shuman C, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Valverde K, Waggoner DJ, Wilkens A, Cohn RD, Krantz ID. Recommendations for the integration of genomics into clinical practice. *Genet Med*, 2016, 18:1075-1084.
- [31] Cooperative Group of Application of Chromosomal Microarray Analysis in Prenatal Diagnosis. Expert consensus about application of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2014, 49:570-572. [染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用协作组. 染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用专家共识. *中华妇产科杂志*, 2014, 49:570-572.]
- [32] Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13 926 subjects. *Genet Med*, 2009, 11:139-146.
- [33] Yuan HM, Zhu JP, Deng XY, Chen MF, Li XW, Li QL, Lü F. Chromosomal microarray analysis of 2000 pediatric cases. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2016, 33:247-251. [袁海明, 朱钧萍, 邓小燕, 陈梦帆, 李欣蔚, 李秋丽, 吕芬. 染色体微阵列技术在 2000 例儿科患者中的应用. *中华医学遗传学杂志*, 2016, 33:247-251.]
- [34] Roberts JL, Hovanes K, Dasouki M, Manzardo AM, Butler MG. Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic services. *Gene*, 2014, 535:70-78.
- [35] Schaefer GB, Starr L, Pickering D, Skar G, Dehaai K, Sanger WG. Array comparative genomic hybridization findings in a cohort referred for an autism evaluation. *J Child Neurol*, 2010, 25:1498-1503.
- [36] Michelson DJ, Shevell MI, Sherr EH, Moeschler JB, Gropman AL, Ashwal S. Evidence report: genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*, 2011, 77:1629-1635.
- [37] Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, Guipponi M, Fichera M, Franke A, Muhle H, de Kovel C, Baker C, von Spiczak S, Kron KL, Steinich I, Kleefuss-Lie AA, Leu C, Gaus V, Schmitz B, Klein KM, Reif PS, Rosenow F, Weber Y, Lerche H, Zimprich F, Urak L, Fuchs K, Feucht M, Genton P, Thomas P, Visscher F, de Haan GJ, Möller RS, Hjalgrim H, Luciano D, Wittig M, Nothnagel M, Elger CE, Nürnberg P, Romano C, Malafosse A, Koeleman BP, Lindhout D, Stephani U, Schreiber S, Eichler EE, Sander T. 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet*, 2009, 41:160-162.
- [38] Dibbens LM, Mullen S, Helbig I, Mefford HC, Bayly MA, Bellows S, Leu C, Trucks H, Obermeier T, Wittig M, Franke A, Caglayan H, Yapici Z; EPICURE Consortium; Sander T, Eichler EE, Scheffer IE, Mulley JC, Berkovic SF. Familial and sporadic 15q13.3 microdeletions in idiopathic generalized epilepsy: precedent for disorders with complex inheritance. *Hum Mol Genet*, 2009, 18:3626-3631.
- [39] Shoichet SA, Waibel S, Endruhn S, Sperfeld AD, Vorwerk B, Müller I, Erdogan F, Ludolph AC, Ropers HH, Ullmann R. Identification of candidate genes for sporadic amyotrophic lateral sclerosis by array comparative genomic hybridization. *Amyotroph Lateral Scler*, 2009, 10:162-169.

(收稿日期:2017-05-26)

欢迎订阅 2017 年《中国现代神经疾病杂志》

《中国现代神经疾病杂志》为国家卫生和计划生育委员会主管、中国医师协会主办的神经病学类专业期刊。办刊宗旨为:理论与实践相结合、普及与提高相结合,充分反映我国神经内外科临床科研工作重大进展,促进国内外学术交流。所设栏目包括述评、专论、论著、临床病理报告、应用神经解剖学、神经影像学、循证神经病学、流行病学调查研究、基础研究、临床研究、综述、临床医学图像、病例报告、临床病理(例)讨论、新技术新方法等。

《中国现代神经疾病杂志》为国家科技部中国科技论文统计源期刊,国内外公开发刊。中国标准连续出版物号:ISSN 1672-6731;CN 12-1363/R。国际大 16 开型,彩色插图,48 页,月刊,每月 25 日出版。每期定价 15 元,全年 12 册共计 180 元。2017 年仍由邮政局发行,邮发代号:6-182。请向全国各地邮政局订阅,亦可直接向编辑部订阅(免邮寄费)。

编辑部地址:天津市津南区吉兆路 6 号天津市环湖医院 A 座二楼西区,邮政编码:300350。

联系电话:(022)59065611,59065612;传真:(022)59065631。网址:www.xdjb.org(中文),www.ejcn.org(英文)。