

关于临床判断致病性突变和无害突变的思考

张成

【关键词】 神经系统疾病； 遗传性疾病,先天性； 基因； 突变； 综述

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

Thought of distinguishing pathogenic gene mutation from no harm mutation in clinical practice

ZHANG Cheng

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

(Email: zhangch6@mail.sysu.edu.cn)

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81471280, 81271401), 2015 Production, Study and Research Special Project of Guangzhou, Guangdong Province, China (No. 1561000153), the National Natural Science Foundation of China for Young Scientists (No. 81601087), Non-Profit Study and Capability Building Special Fund Support Project of Guangdong Provincial Department of Science and Technology, China in the Year 2014 (No. 2014A020212130), and Joint Fund of National Natural Science Foundation of China and Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (No. U1032004).

近年来,二代基因测序(NGS)技术的普及使诸多既往难以确定的、遗传异质性较强的疾病,如肌萎缩侧索硬化症(ALS)、腓骨肌萎缩症(CMT)、遗传性痉挛性截瘫(HSP)、脊髓小脑共济失调(SCA)、肢带型肌营养不良症(LGMD)等的致病性突变位点得以明确,为临床诊断与遗传咨询提供重要信息。然而,临床上常可以看到这样一种现象,临床医师在面对二代基因测序技术提供的遗传学信息时仍十分困惑,这是由于有些基因检测结果与临床表型不符,例如,临床表现为肌肉病态疲劳,但检测出的基因杂合突变信息却是 Ullrich 型先天性肌营养不良症(UCMD);有些基因检测结果不精确,1 种疾病检测出 5~8 种基因突变信息,难以准确定位致病性突变位点,例如肌萎缩侧索硬化症;有些基因检测结果仅罗列出几种不相关疾病的错义突变,而让临

床医师分析和判断;有些基因检测结果包含 2 种及以上有害突变,如移码突变、无义突变、可能改变蛋白质结构和功能的突变,让临床医师选择和判断。上述情况不仅对临床工作无实质性帮助,还可能引起临床医师对基因检测的抵触;同时亦反映出我国基因检测设计与临床实践的脱节、对临床医师和患者需求和实用性考虑不周、基因检测报告不规范、部分临床医师亟待补充遗传学专业知识和对检测报告解读不熟悉等劣势。基因检测报告主要反映所检测的突变是致病性突变还是无害突变,从而用于遗传咨询和指导临床治疗,本文是笔者对临床判断致病性突变或无害突变的几点思考。

一、我国基因检测及结果分析现状与问题

1. 我国基因检测及结果分析的现状 我国的基因检测研究最早开始于医学院校或科研机构实验室,主要用于遗传性疾病诊断、突变基因携带者检测和产前诊断;此后涌现出第 3 方商业性基因检测机构,如中山大学达安基因有限公司、深圳华大基因科技有限公司、广州金域医学检验中心有限公司等,进行基因检测并对检测结果进行解读。随着基因检测技术的发展、检测成本的降低和检测知识的普及,该方法逐渐被临床医师和患者接受。特别是近年来二代基因测序技术的广泛应用,极大地提高遗传异质性较强的遗传性疾病亚型的明确诊断率,如 LGMD2A、2B 和 2D 型,家族性肌萎缩侧索硬化症

doi: 10.3969/j.issn.1672-6731.2017.08.001

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81471280);广东省广州市 2015 年产学研专项项目(项目编号:1561000153);国家自然科学基金青年科学基金资助项目(项目编号:81601087);广东省科学技术厅 2014 年度公益研究与能力建设专项资金资助项目(项目编号:2014A020212130);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81271401);国家自然科学基金-广东省联合基金重点资助项目(项目编号:U1032004)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院神经内科, Email: zhangch6@mail.sysu.edu.cn

(FALS)1、6和10型,这些均是产前诊断的前提。二代基因测序技术还可以检出可治性遗传性疾病,如多巴反应性肌张力障碍(DRD)^[1]、Pompe病^[2]、结节性硬化症(TSC)^[3]、核黄素反应性脂质沉积病^[4]、肝豆状核变性[HLD,亦称Wilson病(WD)]、甲基丙二酸血症(MMA)、苯丙酮尿症,并经特异性治疗明显改善临床症状、改变疾病结局。基因检测还可以指导临床医师对某种特殊临床表型的观察,例如,SCA34型是一种罕见亚型,主要表现为共济失调,应进行共济失调基因包检测,检测结果提示可能是SCA34型;进而查阅相关资料发现该病除共济失调外,还有皮肤损害,且随年龄增长皮肤损害症状逐渐减轻;再次检查患者皮肤,可见背部和颈部皮肤损害,但不太明显,无疼痛和瘙痒;追问病史,10岁前皮肤损害明显,现26岁皮肤损害明显减轻,符合SCA34型临床特点;进一步分析其家系,发现该基因突变存在共分离现象,最终明确诊断。此外,基因检测提示发作性共济失调6型(EA6型)时亦提醒临床医师在询问病史时应注意共济失调的规律性。ATP结合盒转运体D1(ABCD1)基因突变的确定对明确诊断肾上腺脊髓神经病(AMN)至关重要,可以排除其他遗传性痉挛性截瘫。近3年内国内成立数十家基因检测机构,为全国各地患者提供服务,各有特色,但在检测程序、服务质量、检测结果解读和与临床医师沟通方面仍存在问题。

2. 我国基因检测及结果分析存在的问题 基因检测机构方面,基因检测报告设计不合理、不规范;罗列出数十个基因突变位点,让临床医师自己分析和判断;相关信息未经归类整理,重点不突出;阳性检出率低,例如,一家检测1万余例血液标本的基因检测机构阳性检出率仅约20%。基因数据分析方面,人为漏掉有价值的基因信息。临床医师方面,由于临床工作十分繁忙,门诊没有时间对基因检测结果认真分析;对遗传学专业知识掌握不全面;对基因检测报告列出的基因名称、相应临床表现不熟悉,难以与患者相对应;面对花费高额基因检测费用的患者和家属,其检测结果为临床意义未明,即使有很多原因,临床医师仍难以向患者解释;未有效动员核心家系成员对临床意义不明的突变位点进行验证;对各种基因包内容不熟悉,如对有明确临床表型的Duchenne型肌营养不良症(DMD)患者未进行相应基因包检测。患者方面,对于基因检测的各种变异,仅希望知道是否为致病性突变,希望

获得明确答复;基因检测结果提示是否能够对治疗有帮助,能否预防疾病发生,以阻断疾病在该家系中传递。

二、导致上述问题的原因

临床医师方面,未提供较为详细和重要的临床信息,包括病史,临床特点,生物化学、电生理学和病理学资料,家族史;送检的血液标本不系统,只有先证者而无家系中其他成员血液标本;线粒体脑肌病(ME)患者只有血液标本而无肌肉标本等。基因检测方面,对所检测疾病症状与体征、诊断要点不熟悉;从未见过所检测的患者;漏掉对疾病诊断有价值的信息;未识别出已检测到的致病性突变信息,如纯合突变,而其他基因检测机构再次测序时结果相同并识别出致病性突变。患者方面,未提供详细、准确的家族史;重要家族成员未进行检测而无法分析该基因在家系中是否存在共分离现象,而不能明确诊断。

三、解决上述问题的建议

1. 熟悉判断致病性突变和无害突变的原则和方法 基因突变可以分为致病性突变和无害突变。因此,临床医师应了解致病性突变类型,包括无义突变、移码突变、剪接位点突变、起始密码突变、缺失突变、重复突变、动态突变,这些突变破坏基因所编码的蛋白功能而致病。关于错义突变,重点分析其是否破坏所在基因功能且在家系中存在共分离现象^[5]。通常致病性突变仅有1种,如DMD基因缺失突变、重复突变或点突变,而2种或以上突变少见,如DMD基因双段缺失或重复突变^[6]。亦有少数患者同时患2种遗传性疾病,例如,同时患Duchenne型肌营养不良症和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症(G-6-PD)^[7],此类患者既有DMD基因致病性突变,亦有G6PD基因致病性突变;也有同时患Duchenne型肌营养不良症和腓骨肌萎缩症^[8-9]、Duchenne型肌营养不良症和先天性免疫缺陷综合征^[10]的病例报告。因此,如果基因检测报告提示存在2种基因致病性突变或2个致病性突变位点,应判断是否同时罹患2种遗传性疾病。无害突变包括同义突变;大样本普通人群中中等位基因频率>5%的突变;同一家系中患者和正常对照者的基因型是混合的,正常对照者出现这种变异而患者未出现这种变异;同一例患者如果已发现明确的致病性突变且与临床表型相符,则新发现的错义突变可能是无害突变^[11]。

2. 根据临床特征选择不同基因检测方法 对于临床表现独特的遗传性疾病,如 Duchenne 型肌营养不良症、脊髓性肌萎缩症(SMA)、I 型神经纤维瘤病(NF1)、结节性硬化症等单基因遗传病,临床医师和基因检测人员易熟悉其临床特征和诊断要点,仅需检测 1 种基因即可发现致病性突变;若未发现致病性突变,则应对检测结果重新核查,判断是否误诊或有特殊情况;若无,则基因检测人员应再次仔细核查检测程序或分析检测过程中有无失误。对于遗传异质性较强的遗传性疾病,如脊髓小脑共济失调、肌萎缩侧索硬化症、腓骨肌萎缩症、遗传性痉挛性截瘫、肢带型肌营养不良症等,应选择合适的基因检测包,从而快速判断基因型,如 ALS10 型、SCA34 型、CMT1B 型、HSP7 型、LGMD2D 型等。

3. 对临床意义不明的突变应积累更多的临床资料和遗传学信息 收集更完整的家系资料及相关重要家族成员标本,分析临床意义不明的突变在家系中的共分离现象,以及在正常人群中的分布。通过临床资料和遗传学信息的累积、基因检测证据的增加,原来很可能致病性突变可能转变为确定致病性突变;同样,原来很可能无害突变也可能转变为确定无害突变。

4. 临床医师应熟悉常用基因检测方法及其局限性 临床医师应明确何种方法检测何种基因突变,如外显子缺失突变、重复突变应选择多重连接依赖性探针扩增(MLPA),点突变应选择二代基因测序技术。根据临床拟诊选择相应的检测方法和检测范围,例如,对于确定的遗传性疾病如 Duchenne 型肌营养不良症、脊髓性肌萎缩症可以首选 MLPA 法,如果呈阴性再进一步行基因测序;对于遗传异质性较强的遗传性疾病,如脊髓小脑共济失调、腓骨肌萎缩症、肢带型肌营养不良症,应选择相应的基因检测包。

5. 基因检测机构在基因检测设计上应与临床紧密结合 基因检测机构实验室的检测服务、软硬件设施、人员资质、操作流程应标准化,应具备基因检测界公认的质控和规范;检测报告的解读应充分、客观、准确;应从临床医师角度设计基因检测包;检验结果分析和发报告人员应熟悉所检测疾病的临床和生物化学特征、诊断要点。最近有基因检测人员在分析遗传性痉挛性截瘫患者的检测报告时注意到存在肾上腺脊髓神经病的可能,临床医师根据检测报告进一步补充肾上腺皮质功能试验和血浆

极长链脂肪酸(VLCFA)检测,并进行相应治疗,患者临床症状明显改善,支持肾上腺脊髓神经病的诊断。基因检测机构还应进行病例追踪,以利于基因检测技术更好地应用和服务于临床,在临床实践中不断改进基因检测设计。

6. 患者及其家属应理解和配合相关基因检测 由于遗传性疾病的特殊性,单纯进行先证者基因检测是不够的,还需要分析和验证家族重要成员的基因信息,尤其是父母和兄弟姊妹,不管是否出现相应临床症状,均对临床医师诊断和分析疾病有益。对于家族中阳性病史患者,即使不是近亲,也应进行基因检测。患者及其家属应理解某些疾病的基因检测程序较为复杂,目前的技术尚无法得出明确结论。

7. 临床医师是基因检测过程的中心环节 建议患者及其家属进行基因检测的是临床医师,对基因检测结果进行解读的是临床医师,回答患者及其家属各种疑问的是临床医师,因此,临床医师处于基因检测结果解读最重要的位置。基因检测是明确诊断遗传性疾病的重要方法,若检测结果能够回答临床问题、符合临床规律,则临床医师予以采用;若不符合,则应与基因检测和出报告人员及时沟通,考虑是否重新分析基因检测结果、补充其他基因或增加家族成员的基因检测。基因检测和出报告人员对有疑问或临床意义不明的基因检测结果,应提醒临床医师注意事项或提出补充内容,尽量满足临床需求。因此,临床医师应以临床为立足点解读基因检测结果。对于需行产前诊断的家系,更要求完整的家系资料,符合遗传规律方可行产前诊断。

8. 有些临床问题亟待科学技术水平的提高 对于经过患者及其家属、临床医师和基因检测机构共同努力仍不能确定致病性突变或无害突变、临床意义不明的基因检测结果,应收集更多的临床资料和遗传学信息,等待更好的技术出现后再进行检测和分析,因为目前的科学技术水平尚不能解答所有的临床问题。

四、展望

随着基因检测技术的普及,临床医师与基因检测和报告人员通过沟通,结合临床表型进行基因检测结果解读,尽可能给患者及其家属明确的致病性突变或无害突变的判断,并进行遗传咨询和产前诊断,对减少我国遗传性疾病的发生、提高人口素质具有重要作用。

参 考 文 献

- [1] Li J, Hu CH, Yu CS, Cao JQ, Yang J, Li YQ, Zhan YX, Zhang C. Long-term follow up of four patients with dopa-responsive dystonia. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 2013, 46:153-158. [刘焯霖, 梁秀龄, 张成. 神经遗传病学. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1-14.]
- [2] Yang J, Cao JQ, Liu ZH, Zhan YX, Liang YY, Mo GL, Li YQ, Sun YM, Li MZ, Li J, Zhang C. Clinical features and genetic analysis of 7 patients with late-onset glycogen storage disease type II. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2014, 14: 405-410. [杨娟, 操基清, 刘振华, 詹益鑫, 梁颖茵, 莫桂玲, 李亚勤, 孙毅明, 李敏子, 利婧, 张成. 七例晚发型糖原贮积病II型患者临床特征及基因突变分析. 中国现代神经疾病杂志, 2014, 14:405-410.]
- [3] Li YQ, Cao JQ, Yang J, Zhang BF, Feng SW, Wang YY, Zhang Y, Chen F, Kong J, Zheng MY, Zhang X, Zhang C. Clinical features and genetic analysis of tuberous sclerosis pedigrees. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2012, 12:300-306. [李亚勤, 操基清, 杨娟, 张保峰, 冯善伟, 王艳云, 张瑶, 陈菲, 孔杰, 郑民纓, 张旭, 张成. 结节性硬化症家系临床特点与基因分析. 中国现代神经疾病杂志, 2012, 12:300-306.]
- [4] Cao JQ, Zhang C, Li YQ, Yang J, Liang YY, Feng SW, Zhang X, Li J, Zhang HL, Zhu YL, Geng J, Yang LQ. Clinical characteristics and gene mutation analysis of riboflavin-responsive lipid storage myopathy: report of 3 cases in 2 families and review of literature. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2014, 14:479-484. [操基清, 张成, 李亚勤, 杨娟, 梁颖茵, 冯善伟, 张旭, 利婧, 张惠丽, 朱瑜龄, 耿嘉, 杨丽卿. 核黄素反应性脂质沉积性肌病临床特征与基因突变分析: 两家系三例报告并文献复习. 中国现代神经疾病杂志, 2014, 14:479-484.]
- [5] Liu ZL, Liang XL, Zhang C. Neurogenetic disease. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011: 1-14. [刘焯霖, 梁秀龄, 张成. 神经遗传病学. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1-14.]
- [6] Yan J, Li SY, Li YQ, Cao JQ, Feng SW, Wang YY, Zhan YX, Yu CS, Chen F, Li J, Sun XF, Zhang C. MLPA-based genotype-phenotype analysis in 1053 Chinese patients with DMD/BMD. *BMC Med Genet*, 2013, 14:29.
- [7] Lu XL, Zhang C, Chen SL, Huang W. A case with progressive muscular dystrophy and G6PD. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2003, 20:185. [卢锡林, 张成, 陈松林, 黄文. 进行性肌营养不良症伴葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症一例. 中华医学遗传学杂志, 2003, 20:185.]
- [8] Vondracek P, Hermanova M, Sedlackova J, Fajkusova L, Stary D, Michenkova A, Gaillyova R, Seeman P, Mazanec R. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A combined with Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Neurol*, 2007, 14:1182-1185.
- [9] Wang Z, Cui F, Chen D, Pu C, Chen Z, Yang F, Wu H, Huang X. Coexistence of peripheral myelin protein 22 and dystrophin mutations in a Chinese boy. *Muscle Nerve*, 2013, 48:979-983.
- [10] Gussoni E, Bennett RR, Muskiewicz KR, Meyerrose T, Nolte JA, Gilgoff I, Stein J, Chan YM, Lidov HG, Bönnemann CG, Von Moers A, Morris GE, Den Dunnen JT, Chamberlain JS, Kunkel LM, Weinberg K. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest*, 2002, 110:807-814.
- [11] 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.

(收稿日期:2017-05-12)

· 小 词 典 ·

中英文对照名词词汇(一)

- 阿尔茨海默病 Alzheimer's disease(AD)
- γ -氨基丁酸 γ -aminobutyric acid(GABA)
- 胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤 cytosine-adenine-guanine(CAG)
- 背根神经节 dorsal root ganglia(DRG)
- Creutzfeldt-Jakob病 Creutzfeldt-Jakob disease(CJD)
- 不宁腿综合征 restless legs syndrome(RLS)
- 长时程增强 long-term potentiation(LTP)
- 常染色体显性遗传 autosomal dominant(AD)
- 常染色体隐性遗传 autosomal recessive(AR)
- 成簇的规律间隔的短回文重复序列 clustered regulary interspaced short palindromic repeats(CRISPR)
- 单核细胞趋化蛋白-1 monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)
- 癫痫持续状态 status epilepticus(SE)
- 多巴反应性肌张力障碍 dopa-responsive dystonia(DRD)
- 多重连接依赖性探针扩增 multiplex ligation-dependent probe amplification(MLPA)
- 多形性黄色瘤型星形细胞瘤 pleomorphic xanthoastrocytoma(PXA)
- 额颞叶痴呆 frontotemporal dementia(FTD)
- 发作性运动诱发性运动障碍 paroxysmal kinesigenic dyskinesia(PKD)
- 反义寡核苷酸 antisense oligonucleotide(AON)
- 非运动症状 non-motor symptoms(NMS)
- 腓骨肌萎缩症 Charcot-Marie-Tooth disease(CMT)
- 腓骨肌萎缩症神经病变评分 Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Score(CMTNS)
- 6分钟步行试验 6 Minute Walking Test(6MWT)
- 复合肌肉动作电位 compound muscle action potential(CMAP)
- RNA干扰 RNA interference(RNAi)
- 甘氨酸-tRNA合成酶 glycyl-tRNA synthetase(GARS)
- 肝豆状核变性 hepatolenticular degeneration(HLD) [Wilson病 Wilson's disease(WD)]