

早期癫痫性脑病临床表型和基因突变特征及二代基因测序在病因诊断中的应用

刘晓军 张培元 雷梅芳 韦新平 于晓莉 李东 舒剑波 蔡春泉 张玉琴

【摘要】 目的 总结早期癫痫性脑病患者临床表型和基因突变特征,探讨二代基因测序在病因诊断中的应用。**方法** 收集 68 例早期癫痫性脑病患者临床资料,采集患儿及其父母外周静脉血,采用二代基因测序筛选可疑致病性突变,并经 Sanger 测序验证基因突变来源。**结果** 68 例早期癫痫性脑病患者中 18 例(26.47%)检测出癫痫相关致病基因,明确诊断为吡哆醇依赖性癫痫 1 例,系 *ALDH7A1* 基因突变所致;硫胺素代谢紊乱综合征 2 型 1 例,系 *SLC19A3* 基因突变所致。13 例病因明确的癫痫综合征中 Dravet 综合征 6 例,5 例系 *SCN1A* 基因错义突变所致,1 例系 *SCN1A* 基因无义突变所致;婴儿痉挛症 4 例,1 例系 *TSC1* 基因无义突变所致,但无法确定该基因的致病性,3 例未见可疑致病性突变;早期婴儿型癫痫性脑病(亦称为大田原综合征)2 例,1 例系 *STXBPI* 基因错义突变所致,1 例未见可疑致病性突变;婴儿严重局灶性游走性癫痫 1 例,未见可疑致病性突变。53 例非特异性癫痫性脑病中 9 例发现可疑致病性突变,1 例为 *SCN8A* 基因错义突变、1 例 *KCNQ2* 基因错义突变、1 例 *KCNH5* 基因错义突变、1 例 *CACNA1A* 基因错义突变、2 例 *CDKL5* 基因无义突变、1 例 *CDKL5* 基因框移突变、1 例 *PCDH19* 基因无义突变、1 例 *GRIN2A* 基因错义突变。均予 2 种及以上抗癫痫药物治疗,1 例明确诊断为吡哆醇依赖性癫痫后,予维生素 B₆ 20 mg/(kg·d);1 例明确诊断为硫胺素代谢紊乱综合征 2 型后,予维生素 B₁ 25 mg/(kg·d)和生物素 2 mg/(kg·d)。平均随访 6 个月至 8 年,15 例(22.06%)癫痫发作控制良好,21 例(30.88%)癫痫发作部分控制,32 例(47.06%)癫痫发作未控制。**结论** 早期癫痫性脑病临床表型多样,经基因检测明确诊断吡哆醇依赖性癫痫和硫胺素代谢紊乱综合征 2 型各 1 例,对于可治疗的遗传性疾病针对病因治疗,癫痫发作控制良好。3 例 *SCN1A* 基因错义突变、1 例 *STXBPI* 基因错义突变、1 例 *KCNH5* 基因错义突变、1 例 *CACNA1A* 基因错义突变、1 例 *CDKL5* 基因框移突变、1 例 *PCDH19* 基因无义突变为新发突变,丰富了早期癫痫性脑病的临床表型和基因谱。

【关键词】 癫痫; 脑疾病; 基因; 突变; 序列分析

Clinical phenotype, gene mutation and application of targeted next generation sequencing in patients with early-onset epileptic encephalopathy

LIU Xiao-jun¹, ZHANG Pei-yuan¹, LEI Mei-fang¹, WEI Xin-ping¹, YU Xiao-li¹, LI Dong¹, SHU Jian-bo², CAI Chun-quan³, ZHANG Yu-qin¹

¹Department of Neurology, ²Department of Neurosurgery, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300314, China

³Tianjin Institute of Pediatrics, Tianjin 300074, China

Corresponding author: ZHANG Yu-qin (Email: zhangyuqin0809@sina.com)

【Abstract】 Objective To study the clinical features and gene mutations of early-onset epileptic encephalopathy (EOEE) and to explore the application in pathogenic diagnosis of EOEE by next generation sequencing. **Methods** The clinical data of 68 cases diagnosed with unexplained EOEE between June 2014 and December 2017 were obtained and analyzed. Specimens were collected from the selected

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2018.06.008

基金项目:天津市自然科学基金青年科学基金资助项目(项目编号:16JCQNJC11900);天津市卫生行业重点攻关项目(项目编号:16KG166)

作者单位:300134 天津市儿童医院神经内科(刘晓军、张培元、雷梅芳、韦新平、于晓莉、李东、张玉琴),神经外科(蔡春泉);300074 天津市儿科研究所(舒剑波)

通讯作者:张玉琴 (Email:zhangyuqin0809@sina.com)

children and their parents. Next generation sequencing was used to detect epilepsy-related genes, and Sanger sequencing was performed to verify the results and confirm the source of parents, further to identify suspected pathogenic mutations of EOEE. **Results** Among 68 cases with EOEE, 18 cases (26.47%) were detected with epilepsy-related genes. One was diagnosed as pyridoxine dependent epilepsy (PDE), which was caused by *ALDH7A1* mutation. One was diagnosed as thiamine metabolism dysfunction syndrome 2 (THMD2), which was caused by *SLC19A3* mutation. Among 13 cases of epilepsy syndrome, 6 cases were diagnosed as Dravet's syndrome (DS), 5 caused by *SCN1A* missense mutation and one by *SCN1A* nonsense mutation; 4 cases were diagnosed as infantile spasm (IS), one caused by *TSC1* nonsense mutation but the pathogenicity can not be identified while pathogenic mutations were not detected in other 3 cases; 2 cases were diagnosed as Ohtahara's syndrome (OS), one caused by *STXBPI* missense mutation and pathogenic mutation was not found in the other; one case of malignant migrating partial seizures in infancy (MMPEI) was not found the pathogenic mutations. Among 53 cases with non-specific EOEE, suspected pathogenic mutations were detected in 9 cases: one case of *SCN8A* missense mutation, one case of *KCNQ2* missense mutation, one case of *KCNH5* missense mutation, one case of *CACNA1A* missense mutation, 2 cases of *CDKL5* nonsense mutation, one case of *CDKL5* frame-shift mutation, one case of *PCDH19* nonsense mutation and one case of *GRIN2A* missense mutation. All cases were treated by 2 and more antiepileptic drugs (AEDs), one case of PDE was given vitamin B₆ 20 mg/(kg·d), and one case of THMD2 was given vitamin B₁₂ 25 mg/(kg·d) and biotin 2 mg/(kg·d). After followed by 6 months to 8 years, 15 cases (22.06%) were seizure free, 21 cases (30.88%) were part of control and 32 cases (47.06%) were out of control. **Conclusions** The clinical phenotypes of children with unexplained EOEE are varied. One case was diagnosed as PDE and one as THMD2 after gene sequencing. After treated by etiological treatment, patients with remediable genetic disease were seizure free. Some gene sites were denovo mutations which have not been reported such as missense mutation for *SCN1A*, *STXBPI*, *KCNH5*, *CACNA1A*, frame-shift mutation for *CDKL5*, and nonsense mutation for *PCDH19*, which enriched the mutation spectrum of EOEE.

【Key words】 Epilepsy; Brain diseases; Genes; Mutation; Sequence analysis

This study was supported by Natural Science Foundation of Tianjin, China for Young Scholars (No. 16JCQNJC11900) and Key Project of Tianjin Health Care Professionals (No. 16KG166).

早期癫痫性脑病(EOEE)系指新生儿期或婴儿早期出现的临床频繁癫痫发作和发作间期脑电图持续的痫样放电,导致患儿认知功能、运动功能等全面发育迟滞,可伴孤独症谱系障碍(ASDs)等神经系统后遗症^[1],其中,癫痫发作特点包括多种发作类型和难治性癫痫。早期癫痫性脑病发生于婴幼儿期,正值脑发育的关键时期,使脑形态、神经环路和突触可塑性等结构和功能呈现不可逆性发育异常,预后极差。早期癫痫性脑病包括多种明确的癫痫综合征,如婴儿痉挛症(IS)、早期婴儿型癫痫性脑病[亦称大田原综合征(OS)]、Dravet综合征(DS)、早期肌阵挛脑病(EME)、婴儿严重局灶性游走性癫痫(MMPEI),但更多的是无法明确分型的非特异性癫痫性脑病。早期癫痫性脑病病因复杂,除围生期脑损伤、宫内感染、脑结构异常、遗传性和代谢性疾病等明确病因外,更多的是病因尚未阐明。近年研究显示,早期癫痫性脑病与基因突变和拷贝数变异(CNV)密切相关^[2]。自2013年以来,随着分子遗传学检测技术的日益先进,尤其是二代基因测序技术的迅速发展,儿科神经病学领域发生革命性改变^[3],

但是由于此类患儿无明确的基因型-临床表型关系,并且同一基因突变可以有多种临床表型,从而增加诊断的难度。本研究采用二代基因测序对68例病因不明的早期癫痫性脑病患者进行基因检测,并对比国内外已报道的早期癫痫性脑病相关致病基因,探讨中国早期癫痫性脑病患者临床表型特点及其与基因突变的关系,为明确病因、指导临床治疗,以及遗传咨询、选择再孕方式提供依据。

资料与方法

一、临床资料

1. 纳入标准 (1)癫痫性脑病的诊断均符合2010年国际抗癫痫联盟(ILAE)制定的标准:是一类由于难治性癫痫发作和严重脑电异常导致的脑疾病,主要特征为新生儿期或婴儿早期发病,难治性癫痫发作和严重脑电图异常放电,精神运动发育迟滞或倒退^[4]。(2)首次癫痫发作出现于出生后6个月内为早发性。(3)发作类型多样,发作频率频繁(发作间隔<1个月)。(4)常规抗癫痫药物(AEDs)难以控制发作。(5)认知功能、运动功能发育迟滞或倒

退。(6)病因不明。(7)本研究经天津市儿童医院道德伦理委员会审核批准,所有患儿及其父母均知情同意并签署知情同意书。

2. 排除标准 癫痫发作病因明确如围生期脑损伤、脑发育异常和血尿代谢障碍等。

3. 一般资料 选择 2014 年 6 月-2017 年 12 月在天津市儿童医院神经内科诊断与治疗的病因不明的早期癫痫性脑病患者共计 68 例,男性 44 例,女性 24 例;年龄 6 个月至 8 年,平均为 21 个月;发病年龄 2 天至 6 个月,平均 3 个月;均存在 2 种及以上发作类型,包括 13 例(19.12%)病因明确的癫痫综合征,分别为 Dravet 综合征 6 例(8.82%)、婴儿痉挛症 4 例(5.88%)、早期婴儿型癫痫性脑病 2 例(2.94%)、婴儿严重局灶性游走性癫痫 1 例(1.47%),55 例(80.88%)非特异性癫痫性脑病;发作频率 25~450 次/月,平均 150 次/月;发作间隔数分钟至 7 天,平均 5 h。所有患儿父母均为非近亲婚配,1 例非特异性癫痫性脑病患者母亲有癫痫病史,2 例 Dravet 综合征患儿为单卵双生子。

二、研究方法

1. 样本采集及基因组 DNA 提取 采集 68 例患儿外周静脉血 5 ml 及其父母外周静脉血各 2 ml,送检北京康旭医学检测所有限公司。采用 Qiagen FlexiGene DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司)提取患儿及其父母基因组 DNA,操作步骤严格按照试剂盒说明书;Nanodrop 2000 型超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)于 260 或 280 nm 波长处定量测定基因组 DNA;同时行琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性。

2. 二代基因测序 采用 SureSelect Target Enrichment System 目标序列富集试剂盒(美国 Agilent 公司)对患儿 DNA 样本制备目标基因捕获文库,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行;采用 SureSelect^{XT} Reagent Kit 将制备好的基因组 DNA 文库杂交至靶向特异性捕获文库,向基因组 DNA 文库样本中加入 SureSelect Block Mix 5.60 μ l,进行聚合酶链反应(PCR)扩增和纯化,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min、65 $^{\circ}$ C 延续 5 min;采用 NextSeq 500 测序仪(美国 Illumina 公司)对扩增产物进行单端测序,获得 Fastaq 格式数据,加入改良 DNA 聚合酶和含 4 种荧光标记的 dNTP 酶,获得每一模板的 DNA 片段序列。

3. 数据分析即致病基因筛选 采用 bcl2fastq.2 软件将所获得的原始数据转化为可识别的碱基序

列,Burrows-Wheeler Aligner.0.7.15 软件与人类参考基因组数据库(the hg19 reference genome, <http://hgdownload.cse.ucsc.edu>)进行比对,变异位点经 ANNOVAR.2014-11-12 软件进行注释,PolyPhen-2、SIFT 和 MutationTaster 预测软件对所有变异位点进行生物信息学分析。

4. 基因突变验证 将获得的变异位点序列与人类基因组数据库 GenBank 中的标准序列进行比对,以确定致病基因。对患儿父母相同位点进行一代基因测序(Sanger 测序),以确定基因突变来源。

结 果

68 例早期癫痫性脑病患者中 18 例(26.47%)检测出癫痫相关致病基因(表 1)。明确诊断吡哆醇依赖性癫痫(PDE)1 例,系 *ALDH7A1* 基因突变所致;硫酸素代谢紊乱综合征 2 型(THMD2)1 例,系 *SLC19A3* 基因突变所致(图 1)。13 例病因明确的癫痫综合征中 Dravet 综合征 6 例,5 例系 *SCN1A* 基因错义突变所导致,其中 2 例为单卵双生子,1 例系 *SCN1A* 基因无义突变所致;婴儿痉挛症 4 例,1 例系 *TSC1* 基因无义突变所致,但临床无其他证据支持结节性硬化症(TSC),故无法确定该基因的致病性,3 例未见可疑致病性突变;早期婴儿型癫痫性脑病 2 例,1 例系 *STXBPI* 基因错义突变所致,1 例未见可疑致病性突变;婴儿严重局灶性游走性癫痫 1 例,未见可疑致病性突变。53 例非特异性癫痫性脑病中 9 例发现可疑致病性突变,1 例 *SCN8A* 基因错义突变、1 例 *KCNQ2* 基因错义突变、1 例 *KCNH5* 基因错义突变、1 例 *CACNA1A* 基因错义突变、2 例 *CDKL5* 基因无义突变、1 例 *CDKL5* 基因框移突变(图 2)、1 例 *PCDH19* 基因无义突变、1 例 *GRIN2A* 基因错义突变。

所有患儿均予 2 种及以上抗癫痫药物治疗,包括丙戊酸钠、托吡酯、左乙拉西坦、奥卡西平、氯硝西泮,11 例(16.18%)予以生酮饮食,5 例(7.35%)间断予以激素治疗,3 例(4.41%)予以癫痫外科手术。1 例明确诊断为吡哆醇依赖性癫痫后,予维生素 B₆ 20 mg/(kg·d),并逐渐减停抗癫痫药物,未再出现癫痫发作,语言发育稍落后;1 例明确诊断为硫酸素代谢紊乱综合征 2 型后,加用维生素 B₁ 25 mg/(kg·d)和生物素 2 mg/(kg·d),未再出现癫痫发作,精神运动发育落后。

所有患儿随访 6 个月至 8 年,平均 3 年 8 个月。15 例(22.06%)癫痫发作完全控制,21 例(30.88%)癫

表 1 68 例早期癫痫性脑病患儿中 18 例阳性基因检测结果

Table 1. Results of 18 cases with positive gene mutations in 68 children with EOE

Case	Gene	Mutation site	Chromosome	Hereditary mode	Variation type	Reported or not	Diagnosis
1	<i>ALDH7A1</i>	c.1442G > C (p.Arg481Thr) c.1246C > T (p.Gln416Ter)	Chr5	AR	Heterozygosis	No	PDE
2	<i>SLC19A3</i>	c.137T > C (p.Leu46Pro)	Chr2	AR	Homozygosis	No	THMD2
3	<i>SCN1A</i>	c.136G > A (p.Glu46Lys)	Chr2	AD	New	Yes	DS
4	<i>SCN1A</i>	c.664C > T (p.Arg222Ter)	Chr2	AD	New	Yes	DS
5	<i>SCN1A</i>	c.4190T > C (p.Leu1397Ser)	Chr2	AD	New	No	DS
6	<i>SCN1A</i>	c.825T > A (p.Asn275Lys)	Chr2	AD	New	Yes	DS
7	<i>SCN1A</i>	c.568T > C (p.Trp190Arg)	Chr2	AD	New	Yes	DS
8	<i>SCN1A</i>	c.568T > C (p.Trp190Arg)	Chr2	AD	New	Yes	DS
9	<i>STXBPI</i>	c.1652G > A (p.Arg551His)	Chr9	AD	New	No	OS
10	<i>SCN8A</i>	c.475A > G (p.Lys159Glu)	Chr12	AD	Heterozygosis	No	EOEE
11	<i>KCNQ2</i>	c.637C > T (p.Arg213Trp)	Chr20	AD	New	Yes	EOEE
12	<i>KCNH5</i>	c.1388T > C (p.Ile463Thr)	Chr14	Undefined	New	No	EOEE
13	<i>CAGNA1A</i>	c.3544G > A (p.Val1182Tie)	Chr19	AD	New	No	EOEE
14	<i>CDKL5</i>	c.2854C > T (p.Arg952Ter)	ChrX	XL	Heterozygosis	Yes	EOEE
15	<i>CDKL5</i>	c.858C > A (p.Tyr286Ter)	ChrX	XL	New	No	EOEE
16	<i>CDKL5</i>	c.1363delG (p.Ala455LeufsTer38)	ChrX	XL	New	No	EOEE
17	<i>PCDH19</i>	c.2566C > T (p.Gln856Ter)	ChrX	XL	Heterozygosis	No	EOEE
18	<i>GRIN2A</i>	c.2279G > T (p.Gly760Val)	Chr16	AD	New	Yes	EOEE

AR, autosomal recessive, 常染色体隐性遗传; AD, autosomal dominant, 常染色体显性遗传; XL, X-linked inheritance, X 连锁遗传; PDE, pyridoxine-dependent epilepsy, 吡哆醇依赖性癫痫; THMD2, thiamine metabolism dysfunction syndrome 2, 硫胺素代谢紊乱综合征 2 型; DS, Dravet's syndrome, Dravet 综合征; OS, Ohtahara's syndrome, 大田原综合征; EOEE, early-onset epileptic encephalopathy, 早期癫痫性脑病

痫发作部分控制(发作频率减少 $\geq 50\%$), 32 例(47.06%)癫痫发作未控制。有 6 例患儿(8.82%)家庭根据基因检测结果行遗传咨询计划再生育。

讨 论

本研究 68 例早期癫痫性脑病患儿中男性 44 例, 接近女性(24 例)的 2 倍, 与国内文献报道相符^[5]; 非特异性癫痫性脑病 53 例, 是病因明确的癫痫综合征(13 例)的 4 倍; 2 例明确诊断, 1 例系 *ALDH7A1* 基因突变导致的吡哆醇依赖性癫痫、1 例系 *SLC19A3* 基因突变导致的硫胺素代谢紊乱综合征 2 型; 13 例病因明确的癫痫综合征中 7 例(7/13)检测出致病性突变, 基因突变阳性率是非特异性癫痫性脑病(16.98%, 9/53)的 3.17 倍; 由此可见, 非特异性癫痫性脑病的临床表型和脑电图特征及随时间推移病情演变尚无明确规律可循, 仍在探索中。本研究明确诊断吡哆醇依赖性癫痫和硫胺素代谢紊乱综合征 2 型各 1 例, 并针对病因治疗, 癫痫发作完全控制, 预后良好; 基因检测显示, 钠离子、钾离子、钙离子通道相关基因

突变 10 例(10/18), 表明离子通道相关基因突变是早期癫痫性脑病的重要病因; *CDKL5* 和 *PCDH19* 基因突变是女性癫痫以及儿童癫痫认知和运动发育落后的重要病因, 越来越受到关注, 本研究有 3 例存在 *CDKL5* 基因突变和 1 例存在 *PCDH19* 基因突变, 丰富了早期癫痫性脑病的临床表型和基因谱。

本研究吡哆醇依赖性癫痫患儿存在 *ALDH7A1* 基因 c.1442G > C 错义突变和 c.1246C > T 无义突变, 分别源自父母, 均属复合杂合突变, 符合常染色体隐性遗传方式。该例患儿出生第 2 天开始出现肢体抽搐, 局灶性肌阵挛发作继发全面性肌阵挛发作, 予以 2 种抗癫痫药物治疗并且间断口服维生素 B₆ 30 mg/d, 癫痫发作部分控制。一经明确诊断后增加维生素 B₆ 至 20 mg/(kg·d), 逐渐减停左乙拉西坦后再逐渐减停托吡酯, 随访 18 个月未再出现抽搐发作。*ALDH7A1* 基因定位于染色体 5q31, 编码的蛋白产物 α -氨基己二酸半醛脱氢酶(α -AASDH)参与赖氨酸分解代谢, 其突变可以引起 α -AASDH 积聚, 进而引起哌啶酸积聚, 除导致最常见的吡哆醇依赖性

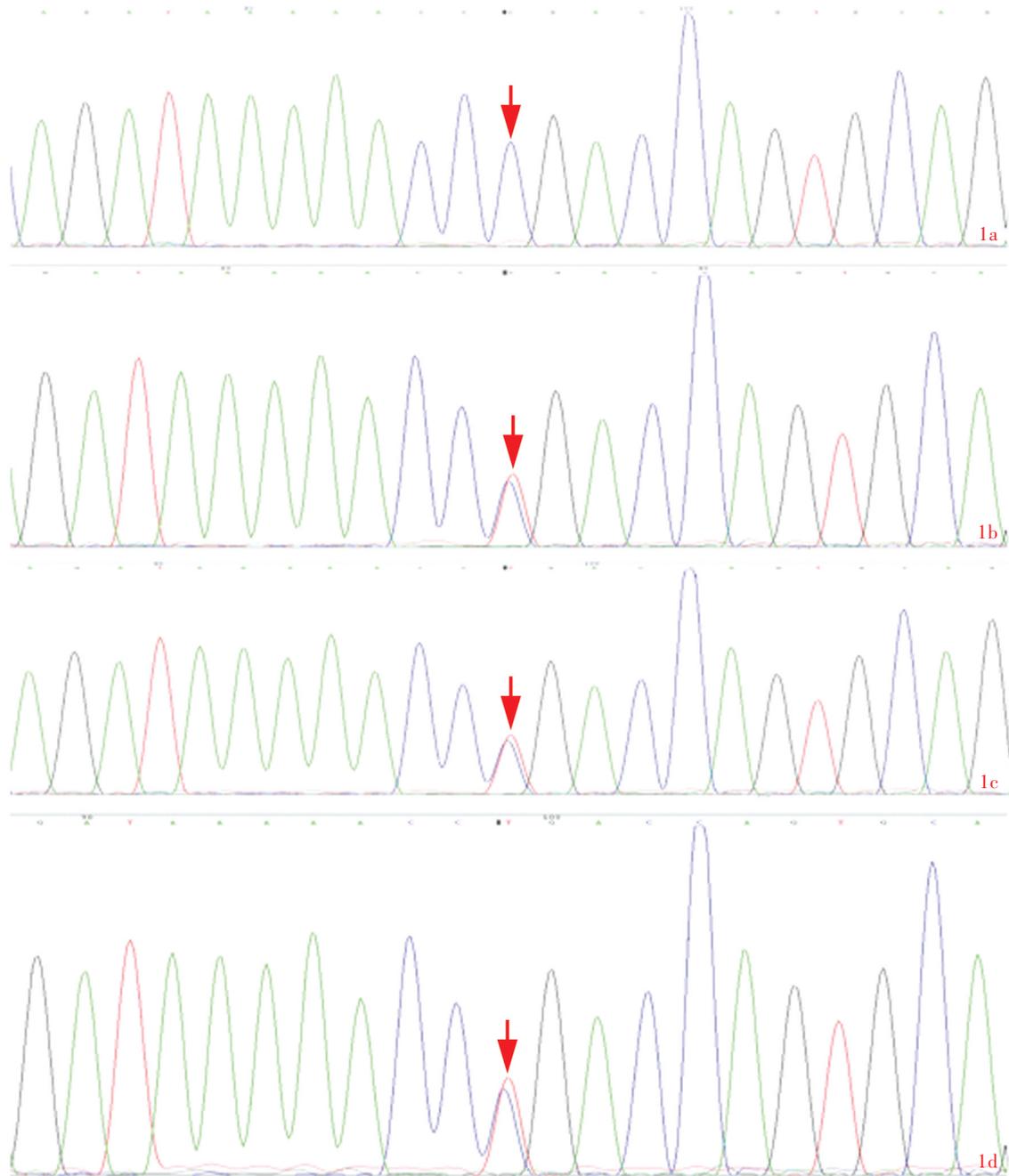


图 1 女性患儿, 2 个月, 临床诊断为硫胺素代谢紊乱综合征 2 型。患儿及其父母和姊基因检测所见 1a 患儿存在 *SLC19A3* 基因 228566898 位点 c.137T>C 纯合突变(箭头所示) 1b 其父存在 *SLC19A3* 基因 228566898 位点 c.137T>C 杂合突变(箭头所示) 1c 其母存在 *SLC19A3* 基因 228566898 位点 c.137T>C 杂合突变(箭头所示) 1d 其姊存在 *SLC19A3* 基因 228566898 位点 c.137T>C 杂合突变(箭头所示)

Figure 1 A 2-month-old infant girl was diagnosed as THMD2. Gene detection results of the patient and her family members The patient was detected *SLC19A3* gene in chr2: 228566898 locus c.137 T > C homozygous mutations (arrow indicates, Panel 1a). Her father was detected *SLC19A3* gene in chr2: 228566898 locus c.137 T > C heterozygous mutations (arrow indicates, Panel 1b). Her mother was detected *SLC19A3* gene in chr2: 228566898 locus c.137 T > C heterozygous mutations (arrow indicates, Panel 1c). Her sister was detected *SLC19A3* gene in chr2: 228566898 locus c.137 T > C heterozygous mutations (arrow indicates, Panel 1d).

癫痫外, 还可见过氧化物酶功能障碍、高赖氨酸血症、脯氨酸代谢缺陷、肝功能异常等。目前报道该基因存在 80 余种突变位点, 包括错义突变、无义突

变、缺失、插入和剪切位点突变等, 其中错义突变约占 60% [6]。研究显示, 我国吡哆醇依赖性癫痫患儿内含子 11 IVS11 + 1G > A 突变阳性率达 31.25%, 可

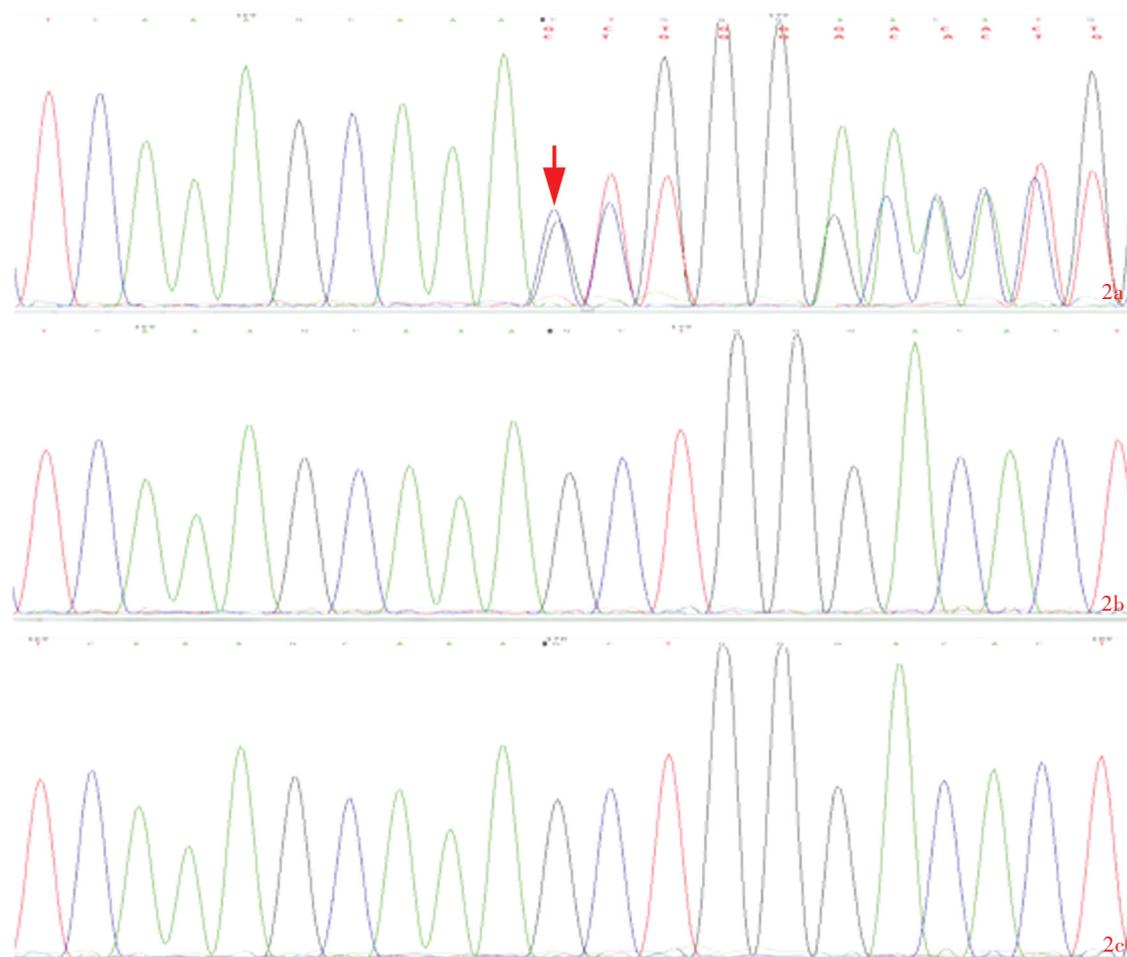


图2 女性患儿,4个月,临床诊断为早期癫痫性脑病。患儿及其父母基因检测所见 2a 患儿存在 *CDKL5* 基因 18622407 位点 c.1363delG 突变(箭头所示),为新生框移突变 2b 其父 *CDKL5* 基因 18622407 位点未见相应突变 2c 其母 *CDKL5* 基因 18622407 位点未见相应突变

Figure 2 A 4-month-old infant girl was diagnosed as EOOE. Gene detection results of the patient and her parents. The patient was detected *CDKL5* gene in chrX: 18622407 locus c.1363delG mutation (arrow indicates), which was denovo frame-shift mutation (Panel 2a). Her father was not detected mutation in *CDKL5* gene in chrX: 18622407 locus (Panel 2b). Her mother was not detected mutation in *CDKL5* gene in chrX: 18622407 locus (Panel 2c).

能是热点突变。吡哆醇依赖性癫痫患儿需终身补充吡哆醇,长期维持剂量尚不明确,婴儿推荐剂量为 15~30 mg/(kg·d)、新生儿为 200 mg/d、成人高达 500 mg/d,上述剂量长期维持治疗的安全性业已得到证实^[7]。

硫胺素代谢紊乱综合征 2 型亦称为硫胺素-生物素反应性基底节脑病(BTBGD)。本研究明确诊断 1 例硫胺素代谢紊乱综合征 2 型患儿,存在 *SLC19A3* 基因 c.137T>C 纯合错义突变,分别源自父母,符合常染色体隐性遗传方式,同时检测其姊存在该基因杂合突变,但临床表型正常。此例患儿出生后 40 天出现抽搐发作,局灶性肌阵挛发作合并痉挛发作,予以 2 种抗癫痫药物的同时口服维生素 B₁

30 mg/d,癫痫发作部分控制。一经明确诊断增加维生素 B₁ 至 25 mg/(kg·d) 并加服生物素 2 mg/(kg·d),随访 10 个月未再出现抽搐发作,但认知和运动发育明显落后。*SLC19A3* 基因定位于染色体 2q36.3,编码蛋白产物硫胺素转运蛋白-2(THTR-2),其突变可以导致 THTR-2 功能缺陷,使硫胺素由近端小肠吸收进入组织细胞,形成硫胺素焦磷酸(TPP),使能量代谢通路受阻。临床以亚急性脑病作为特征,常伴发热和频繁呕吐、意识障碍、癫痫发作,逐渐进展至运动障碍(四肢瘫),进而出现吞咽困难、构音障碍、木僵状态,彻底丧失言语功能和理解能力,最终死亡^[8]。MRI 以对称性基底节区异常信号为主,类似 Leigh 病或 Wernicke 脑病。硫胺素代谢紊乱综合征

2 型临床罕见,最早于 1998 年报告 10 例沙特阿拉伯病例,为高发地区^[9],黎巴嫩、印度和日本也有个案报道^[9],国内尚未见报道。治疗方面建议补充硫酸素 10~40 mg/(kg·d)和生物素 1~2 mg/(kg·d),总体预后不良,病残率和病死率较高,早期诊断与及时治疗可以有效改善预后,提高生存率。

离子通道相关基因中钠离子通道相关基因 *SCN1A* 最早检测出,常为无义突变和框移突变,导致蛋白翻译截短,故临床表型较严重。文献报道的癫痫相关 *SCN1A* 基因突变类型有 300 余种^[6],除导致 Dravet 综合征外,还可以导致全面性癫痫伴热性惊厥附加症 (GEFS+) 和肌阵挛-站立不能性癫痫 (MAE) 等。本研究 6 例 Dravet 综合征患儿均为散发病例,其中 2 例单卵双生子存在 *SCN1A* 基因 c.568T>C 错义突变;1 例存在 *SCN1A* 基因 c.664C>T 无义突变,均为国际已报道的新生突变,予 2 种及以上抗癫痫药物,癫痫发作未控制,认知功能障碍较重,无法上学;余 3 例分别存在 *SCN1A* 基因 c.825T>A、c.4190T>C、c.136G>A 错义突变,均为未报道的新生突变,分别予 2 种及以上抗癫痫药物,癫痫发作部分控制。*SCN8A* 基因突变方式以错义突变为主,在中枢神经系统兴奋性和抑制性神经元中均有表达,由以兴奋性神经元表达为主,属功能增强型突变,钠拮抗剂如卡马西平、奥卡西平和苯妥英钠治疗有效;功能减弱型突变表现为共济失调、孤独症谱系障碍、智力低下、痴呆,伴或不伴抽搐发作^[9]。本研究有 1 例患儿存在 *SCN8A* 基因 c.475A>G 错义突变,源自母亲,为未报道的新生突变,追问病史,其母幼儿期曾患癫痫,口服卡马西平后癫痫发作完全控制,该例患儿表现为局灶性肌阵挛发作,先后给予托吡酯、丙戊酸钠治疗,癫痫发作未控制,根据基因检测结果,加用奥卡西平 28 mg/(kg·d),随访 18 个月未再出现癫痫发作,言语功能和运动功能均较前改善。*KCNQ2* 是钾离子通道相关基因。传统观点认为,*KCNQ2* 基因是良性基因,其错义突变可以导致良性家族性新生儿惊厥 (BFNC) 和早期癫痫性脑病两种临床表型。2010 年首次在早期婴儿型癫痫性脑病患者中发现 *KCNQ2* 基因。国内有 *KCNQ2* 基因无义突变致死的个案报道,同一基因突变其临床表型不同、预后亦不同^[10]。本研究有 1 例患儿存在 *KCNQ2* 基因 c.637C>T 错义突变,为已报道的新生突变。该例患儿出生后 1 个月出现部分性运动发作,予以 2 种抗癫痫药物,癫痫发作完全控

制,但认知和运动发育稍落后。*KCNH5* 基因编码钾离子通道 α 亚单位 (Kv10.2),广泛表达于神经系统,其致病性突变的报道甚少。2013 年, Yang 等^[11] 报告 1 例早期癫痫性脑病伴孤独症样行为患儿,系 *KCNH5* 基因突变 (p.Arg327His) 所致,证实该基因与维持钾离子通道关闭状态的稳定性密切相关,其突变可以导致神经细胞功能紊乱。本研究有 1 例患儿存在 *KCNH5* 基因 c.1388T>C 错义突变,为未报道的新生突变,临床表型是全面性强直性发作和局灶性运动发作,予 3 种抗癫痫药物,癫痫发作未控制。既往有文献报道,抗心律失常药奎尼丁对 *KCNT1* 基因突变导致的婴儿严重局灶性游走性癫痫有效^[12],因此根据基因检测结果,对作用于钾离子通道的药物进行研发将会为治疗带来一线生机。*CACNA1A* 基因定位于染色体 19p13,编码的蛋白产物 Cav2.1 是 P/Q 型电压门控性钙离子通道 (VGCC) α 亚基,其突变可以导致神经细胞兴奋性增强,加速钙离子内流,使细胞内钙超载,从而导致癫痫,同时亦影响长时程增强 (LTP) 的产生,导致学习和记忆能力均下降^[13]。2015 年, Damaj 等^[14] 报告来自 4 个无血缘关系家系的 16 例 *CACNA1A* 基因突变患者,9 例存在 *CACNA1A* 基因单倍体,均出现癫痫发作,首次发作发生于 6 个月至儿童期,以部分性运动发作为主,多伴发热诱因,其中 1 例表现为失神发作,此类患儿认知功能障碍和孤独症样行为较癫痫发作更突出。因此,对于病因不明的认知运动发育迟滞合并癫痫发作的患儿,应早期进行遗传学检测。本研究有 1 例患儿存在 *CACNA1A* 基因错义突变,该例患儿出生后 4 个月因认知运动发育落后首诊,2 个月后出现抽搐发作,表现为全面性强直-阵挛发作合并痉挛发作,予 2 种抗癫痫药物,随访 5 个月,癫痫发作完全控制,尚待进一步延长随访时间观察其转归。

CDKL5 基因是 1998 年意大利学者 Montini 等^[15] 采用外显子捕获技术在染色体 Xp22 区域克隆出的基因,定位于 Xp22.13。2003 年, Kalscheuer 等^[16] 首次将 *CDKL5* 基因断裂与婴儿痉挛症伴智力发育迟滞的女性患儿相联系。迄今已有 80 余种 *CDKL5* 基因突变被报道,并明确 *CDKL5* 基因是早期婴儿型癫痫性脑病 2 型的致病基因,呈 X 连锁遗传方式,特别是在女性早期癫痫性脑病和婴儿痉挛症中的突变阳性率达 20% 以上^[17]。*CDKL5* 基因突变的典型临床表型和脑电图特征为:第一期,出生后数天至 2 个月出现癫痫发作,以全面性强直性发作为主要表现;第

二期,出生后 2~3 个月出现早期癫痫性脑病,约 50%为婴儿痉挛症;第三期,2 岁后痉挛发作逐渐消失,代之以多灶性运动发作和肌阵挛发作^[18]。本研究有 3 例 *CDKL5* 基因突变患儿临床表型为:(1)癫痫发作发生于出生 6 周内(最大 40 天)。(2)均以部分性运动发作首发,其中 1 例女性患儿出生后 9 个月转变为单次痉挛发作,对多种抗癫痫药物反应较差,激素和癫痫外科手术亦疗效较差。(3)伴严重认知和运动发育落后,其中 2 例随访 2~8 年,1 例仅能独坐、大把抓物,无言语,不认人;1 例 6 个月女婴,不能抬头,视听反应差,与文献报道基本一致^[19]。*CDKL5* 基因突变的女性患儿常伴孤独症样行为,本研究有 1 例男性患儿,不伴孤独症样行为;1 例 8 岁女性患儿,认知和运动发育极度落后,呈木僵状态,无法表现为孤独症样行为;1 例 6 个月女婴,年龄较小,尚待密切随访是否出现孤独症样行为。既往研究显示,男性和女性出现 *CDKL5* 基因突变临床表型的差异可能是由于女性一条 X 染色体发生基因突变,另一条 X 染色体野生型基因起一定代偿作用,导致女性发生轻型突变(错义突变)而不致病,男性仅有 1 条 X 染色体,推测轻型突变也可以致病。本研究有 1 例母源性突变的男性患儿,其母临床表型正常且基因突变类型为无义突变,考虑可能与 X 染色体随机失活有关,Intusoma 等^[20]亦有该位点的相同报道。本研究 *CDKL5* 基因存在 c.2854C>T 无义突变和 c.858C>A 无义突变,均为已报道的致病性突变,而 c.1363delG 框移突变是外显子 10 第 1363 位碱基缺失鸟嘌呤(G),从而使第 455 位遗传密码子由鸟嘌呤-胞嘧啶-胸腺嘧啶(GCT)转变为胞嘧啶-胸腺嘧啶-鸟嘌呤(CTG),导致丙氨酸突变为亮氨酸,并产生一段包括 38 个异常氨基酸的肽段,且在突变位点后第 38 个密码子出现终止密码子,提前终止翻译,突变的蛋白产物较正常蛋白少 538 个氨基酸,该突变尚未见诸报道,为新发突变,并且证实为致病性突变^[21]。新生儿期或婴儿早期出现部分性运动发作和痉挛发作,同时伴精神运动发育落后的癫痫性脑病尤应注意该基因突变。

PCDH19 基因定位于染色体 xq22,编码 PCDH19 蛋白,包括介导细胞、细胞间相互作用的胞外结构域、穿过质膜的短段和锚到细胞骨架以及整合细胞内信号转导通路的细胞质域,主要参与脑发育中神经元连接形成和(或)出生后早期选择性重塑突触连接,但是 PCDH19 蛋白的作用尚不清楚^[22]。

PCDH19 基因于 2008 年首次报道为仅限于女性癫痫和智力障碍(EFMR)的致病基因,其遗传方式特殊:杂合子女性发病,半合子男性不发病,既非显性遗传亦非隐性遗传^[23]。对于一般 X 连锁遗传性疾病而言,携带该基因的半合子男性均可发病,但该疾病男性均不发病,作用机制尚不明确。目前较为公认的细胞干扰机制假说是,无 *PCDH19* 基因突变的正常男性和女性仅表达野生型 PCDH19 蛋白,以确保机体处于纯合的神经网络环境,而杂合子女性患者因体内存在 2 种不同 PCDH19 蛋白(突变型和野生型)的细胞,细胞间相互作用而发病,男性患者因细胞仅表达 1 种 PCDH19 蛋白(突变型或野生型)而不发病。女性癫痫和智力障碍与 Dravet 综合征的临床表现有相似之处,但前者的病程和转归更好,女性癫痫和智力障碍也易与热性感染相关性癫痫综合征(FIRES)相混淆。研究显示,遗传性突变仅占 30%,散发性新生突变占大多数。当家族中女婴早期出现全面性和(或)局灶性发作,甚至多个女性罹患癫痫、药物难治性癫痫和热敏感特征时,应注意 *PCDH19* 基因突变。因此,*PCDH19* 基因是继 *SCN1A* 基因后的第 2 位致病基因,尤其是女性婴儿期癫痫的主要致病基因^[24]。本研究有 1 例女性患儿存在 *PCDH19* 基因 c.2566C>T 无义突变,尚未见诸报道,为新生突变。该例患儿出生后 5 个月首次出现发热、抽搐发作、全面性痉挛发作,予以 2 种抗癫痫药物,癫痫发作部分控制,具有热敏感特征,目前 4 岁 8 个月,全面发育落后,认知功能障碍严重。

GRIN2A 基因编码 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)重要调节亚基,其突变可以导致 NMDAR 活性增强,引起神经系统过度兴奋,从而导致癫痫的发生。2010 年首次证实 *GRIN2A* 基因突变可以导致癫痫发作等神经系统症状,随后相继报道该基因突变可以导致伴中央颞区棘波的儿童良性癫痫(BECTS)、获得性癫痫失语(LKS)等^[25]。在本研究中,1 例患儿存在 *GRIN2A* 基因 c.2279G>T 错义突变,为已报道的致病性突变,临床表现为局灶性运动发作继发全面性强直-阵挛发作,为难治性癫痫。2014 年首次证实谷氨酸受体阻断剂美金刚对 *GRIN2A* 基因相关早期癫痫性脑病有效,而利鲁唑可以减少神经末梢释放谷氨酸,是一种 NMDAR 调节剂,也可以作为治疗靶点^[26]。

本研究除 18 例明确致病性突变外,还有 2 例存在 *SCN9A* 基因 c.3734A>G 和 c.2132T>C 错义突变,

1 例存在 *GRIN3A* 基因 c.3215G>A 错义突变, 均未见致病性报道, 分别源自父母。由于已报道的上述基因突变均为常染色体显性遗传, 患儿父母临床表型正常, 但上述突变不属于多态性突变, 应考虑基因外显不全、大片段缺失可能是致病因素。2014 年, 马玉平^[27]采用全基因组拷贝数变异分析 87 例早期癫痫性脑病患者, 发现 10 例 (11.49%) 携带致病性和 (或) 可疑致病性拷贝数变异。本研究未行拷贝数变异分析, 对明确病因尚存缺憾。

早期癫痫性脑病亦称婴幼儿期灾难性疾病, 预后不良, 大多数为遗传物质突变导致的散发病例。二代基因测序可以辅助明确遗传性病因, 可治疗的遗传性疾病针对病因治疗, 癫痫发作控制良好; 不断发现新发突变, 丰富我国早期癫痫性脑病临床表型和基因谱, 并提供遗传咨询和产前诊断。

参 考 文 献

- [1] Holland KD, Hallinan BE. What causes epileptic encephalopathy in infancy: the answer may lie in our genes[J]? *Neurology*, 2010, 75:1132-1133.
- [2] Mefford HC, Yendle SC, Hsu C, Cook J, Geraghty E, McMahon JM, Eeg-Olofsson O, Sadleir LG, Gill D, Ben-Zeev B, Lerman-Sagie T, Mackay M, Freeman JL, Andermann E, Pelakanos JT, Andrews I, Wallace G, Eichler EE, Berkovic SF, Scheffer IE. Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies[J]. *Ann Neurol*, 2011, 70:974-985.
- [3] Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372:793-795.
- [4] Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009[J]. *Epilepsia*, 2010, 51:676-685.
- [5] Hu CH, Wang LF, Wang H. Clinical features and gene mutations analysis in 62 children with early-onset epileptic encephalopathy of unknown causes[J]. *Zhonghua Shi Yong Er Ke Lin Chuang Za Zhi*, 2016, 31:371-375.[胡春辉, 王龙飞, 王华. 不明原因早发性癫痫脑病 62 例临床特点及相关基因突变分析[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2016, 31:371-375.]
- [6] Mullen SA, Scheffer IE. Translational research in epilepsy genetics: sodium channels in man to interneuronopathy in mouse [J]. *Arch Neurol*, 2009, 66:21-26.
- [7] Yang ZX, Xue J. Vitamin B6 related epilepsy[J]. *Zhonghua Shi Yong Er Ke Lin Chuang Za Zhi*, 2016, 31:1841-1848.[杨志仙, 薛姣. 维生素 B6 相关性癫痫[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2016, 31:1841-1848.]
- [8] Pronicki M, Piekutowska-Abramczuk D, Jurkiewicz E, Rokicki D, Ciara E, Trubicka J, Iwanicka-Pronicka K, Pajdowska M, Migdał M, Grajkowska WA. Neuropathological characteristics of the brain in two patients with *SLC19A3* mutations related to the biotin-thiamine-responsive basal ganglia disease [J]. *Folia Neuropathol*, 2017, 55:146-153.
- [9] Singh R, Jayapal S, Goyal S, Jungbluth H, Lascelles K. Early-onset movement disorder and epileptic encephalopathy due to de novo dominant *SCN8A* mutation[J]. *Seizure*, 2015, 26:69-71.
- [10] Hu CH, Wang LF, Wang H. One case of missense mutation for *KCNQ2* gene in early-onset epileptic encephalopathy [J]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2015, 53:788-789.[胡春辉, 王龙飞, 王华. *KCNQ2* 基因无义突变所致早发性癫痫脑病一例[J]. *中华儿科杂志*, 2015, 53:788-789.]
- [11] Yang Y, Vasylyev DV, Dib-Hajj F, Veeramah KR, Hammer MF, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Multistate structural modeling and voltage-clamp analysis of epilepsy/autism mutation Kv10.2-R327H demonstrate the role of this residue in stabilizing the channel closed state[J]. *J Neurosci*, 2013, 33:16586-16593.
- [12] Barcia G, Fleming MR, Deligniere A, Gazula VR, Brown MR, Langouet M, Chen H, Kronengold J, Abhyankar A, Cilio R, Nitschke P, Kaminska A, Boddart N, Casanova JL, Desguerre I, Munnich A, Dulac O, Kaczmarek LK, Colleaux L, Nabbutt R. De novo gain-of-function *KCNT1* channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy [J]. *Nat Genet*, 2012, 44:1255-1259.
- [13] Allen NM, Conroy J, Shahwan A, Lynch B, Correa RG, Pena SD, McCreary D, Magalhães TR, Ennis S, Lynch SA, King MD. Unexplained early onset epileptic encephalopathy: exome screening and phenotype expansion[J]. *Epilepsia*, 2016, 57:E12-17.
- [14] Damaj L, Lupien-Meilleur A, Lortie A, Riou É, Ospina LH, Gagnon L, Vanasse C, Rossignol E. *CACNA1A* haploinsufficiency causes cognitive impairment, autism and epileptic encephalopathy with mild cerebellar symptoms [J]. *Eur J Hum Genet*, 2015, 23:1505-1512.
- [15] Montini E, Andolfi G, Caruso A, Buchner G, Walpole SM, Mariani M, Consalez G, Trump D, Ballabio A, Franco B. Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region[J]. *Genomics*, 1998, 51:427-433.
- [16] Kalscheuer VM, Tao J, Donnelly A, Hollway G, Schwinger E, Kübart S, Menzel C, Hoeltzenbein M, Tommerup N, Eyre H, Harbord M, Haan E, Sutherland GR, Ropers HH, Gécz J. Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation [J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 72:1401-1411.
- [17] Sartori S, Polli R, Bettella E, Rossato S, Andreoli W, Vecchi M, Giordano L, Accorsi P, Di Rosa G, Toldo I, Zamponi N, Darra F, Dalla Bernardina B, Perilongo G, Boniver C, Murgia A. Pathogenic role of the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 and aristaless-related homeobox genes in epileptic encephalopathy of unknown etiology with onset in the first year of life [J]. *J Child Neurol*, 2011, 26:683-691.
- [18] Bahi-Buisson N, Nectoux J, Rosas-Vargas H, Milh M, Boddart N, Girard B, Cances C, Ville D, Afenjar A, Rio M, Héron D, N'guyen Morel MA, Arzimanoglou A, Philippe C, Jonveaux P, Chelly J, Bienvenu T. Key clinical features to identify girls with *CDKL5* mutations [J]. *Brain*, 2008, 131(Pt 10):2647-2661.
- [19] Zhang QP, Zhao Y, Bao XH, Zhang XY, Li JR, Wei LP, Wu XR. Clinical features and gene mutations for *CDKL5* gene in children with early-onset epileptic encephalopathy [J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2016, 33:404-407.[章清萍, 赵滢, 包新华, 张晓英, 李佳瑞, 魏丽萍, 吴希如. 早发性癫痫脑病患儿的 *CDKL5* 基因突变特点与临床特征[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2016, 33:404-407.]
- [20] Intusoma U, Hayeederh F, Plong-On O, Sripo T, Vasikanante P, Janjindamai S, Lusawat A, Thammongkol S, Visudtibhan A, Limprasert P. Mutation screening of the *CDKL5* gene in cryptogenic intractable epilepsy and review of clinical sensitivity [J]. *Eur J Paediatr Neurol*, 2011, 15:432-438.
- [21] Wang QJ, Shen YP, Wu LQ, Chen SK, Chen ZJ, Fang XD, Fu

- SB, Gong YQ, Huang GY, Huang GN, Huang HF, Huang S, Hao XK, Ji XP, Li H, Liang B, Liao C, Qiao J, Su HX, Wei J, Wang L, Wang SY, Wang XH, Xing QH, Xu XM, Yuan HJ, Yang ZL, Zhou CR, Zhou WH, Zeng Y, Zhang XJ, Huang TS, Zheng Q, Qin SY, Yu SH, Guan J, Wang HY, Wang DY, Zhao LD, Wang HJ, Kong LY, Xuan LM, Mao Y, Zhu YJ, Xu JL, Wang JQ, Wang L, Zhao T, Qin YD, Xia YY, Fan LX, Zhao DD, Qiu H, He L. Standards and guideline for the interpretation of sequence variants [J]. Zhongguo Ke Xue: Sheng Ming Ke Xue, 2017, 47:668-688.[王秋菊, 沈亦平, 邬玲玲, 陈少科, 陈子江, 方向东, 傅松滨, 龚瑶琴, 黄国英, 黄国宁, 黄荷凤, 黄山, 郝晓柯, 冀小平, 李红, 梁波, 廖灿, 乔杰, 苏海翔, 魏军, 王磊, 王树玉, 王晓红, 邢清和, 徐湘民, 袁慧军, 杨正林, 周从容, 周文浩, 曾勇, 张学军, 黄涛生, 郑茜, 秦胜营, 于世辉, 关静, 王洪阳, 王大勇, 赵立东, 王慧君, 孔令印, 宣黎明, 冒燕, 祝轶君, 徐君玲, 王剑青, 王莉, 赵婷, 秦一丁, 夏滢颖, 樊丽霞, 赵丁丁, 邱浩, 贺林. 遗传变异分类标准与指南[J]. 中国科学: 生命科学, 2017, 47:668-688.]
- [22] Trivisano M, Specchio N, Vigeveno F. Extending the use of stiripentol to other epileptic syndromes: a case of PCDH19-related epilepsy[J]. Eur J Paediatr Neurol, 2015, 19:248-250.
- [23] Dibbens LM, Tarpey PS, Hynes K, Bayly MA, Scheffer IE, Smith R, Bomar J, Sutton E, Vandeleur L, Shoubbridge C, Edkins S, Turner SJ, Stevens C, O'Meara S, Tofts C, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Halliday K, Jones D, Lee R, Madison M, Mironenko T, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Dicks E, Butler A, Menzies A, Jenkinson A, Shepherd R, Gusella JF, Afawi Z, Mazarib A, Neufeld MY, Kivity S, Lev D, Lerman-Sagie T, Korczyn AD, Derry CP, Sutherland GR, Friend K, Shaw M, Corbett M, Kim HG, Geschwind DH, Thomas P, Haan E, Ryan S, McKee S, Berkovic SF, Futreal PA, Stratton MR, Mulley JC, Géczy J. X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment[J]. Nat Genet, 2008, 40:776-781.
- [24] Long WW, Jiang L, Liao JX. Research progress of epilepsy and mental retardation limited to female [J]. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2016, 54:470-472.[龙妮微, 蒋莉, 廖建湘. 仅限于女性的癫痫和智力障碍研究进展[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54:470-472.]
- [25] Ende S, Rosenberger G, Geider K. Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes [J]. Nat Genet, 2010, 42:1021-1028.
- [26] Chang YY, Hu XQ. Pay attention to neuroprotective treatment of central nervous system inflammatory demyelinating diseases [J]. Zhongguo Shen Jing Mian Yi Xue He Shen Jing Bing Xue Za Zhi, 2017, 24:240-244.[常艳宇, 胡学强. 重视中枢神经系统炎性脱髓鞘疾病的神经保护治疗[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2017, 24:240-244.]
- [27] Ma YP. Clinical features and genome-wide copy number variations scanning of 87 early-onset epileptic encephalopathy patients with unknown cause [D]. Changsha: Central South University, 2014.[马玉平. 87例不明原因早期癫痫性脑病患者临床特点及全基因组拷贝数变异分析[D]. 长沙: 中南大学, 2014.]

(收稿日期: 2018-04-28)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国现代神经疾病杂志》编辑部关于稿件参考文献的要求

《中国现代神经疾病杂志》编辑部对来稿的参考文献一律按照 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》采用顺序编码制著录, 依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号标出。尽量避免引用摘要作为参考文献。内部刊物、未发表资料、个人通信等请勿作为文献引用。每条参考文献著录项目应齐全, 不得用“同上”或“ibid”表示。参考文献中的主要责任者(专著作者、论文集主编、学位申报人、专利申请人、报告撰写人、期刊文章作者、析出文章作者)均全部列出。外文期刊名称用缩写, 以 *Index Medicus* 中的格式为准, 中文期刊用全名。每条参考文献均须著录起止页码。中英文双语形式著录时, 文献序号后先列出完整的中文文献英译文, 再列出中文文献。作者姓名的英译文采用汉语拼音形式表示, 姓大写, 名用缩写形式, 取每个字的首字母, 大写。期刊名称以汉语拼音注录。

(1) 期刊著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志]. 刊名, 年, 卷: 起页-止页.

举例: [1] Gao S. Ten-year advance of transcranial Doppler ultrasonography [J]. Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi, 2010, 10:127-136.[高山. 经颅多普勒超声十年进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2010, 10:127-136.]

(2) 著作或编著著录格式: 主要责任者. 题名: 其他题名信息[文献类型标志/文献载体标志]. 其他责任者(例如翻译者). 版本项(第1版不著录). 出版地: 出版者, 出版年: 引文起页-止页.

举例: [2] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO classification of tumours of the central nervous system [M]. 4th ed. Li Q, Xu QZ, Trans. Beijing: Editorial Office of Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 2011: 249-252.[Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. 中枢神经系统肿瘤 WHO 分类 [M]. 4 版. 李青, 徐庆中, 译. 北京: 诊断病理学杂志社, 2011: 249-252.]

(3) 电子文献著录格式: 必须于题名后著录[文献类型标志/文献载体标志], 一般同时于起页-止页后著录[引用日期]以及获取和访问路径.

举例: [3] Foley KM, Gelband H. Improving palliative care for cancer [M/OL]. Washington: National Academy Press, 2001 [2002-07-09]. <http://www.nap.edu/books/0309074029/html>.