

47例不明原因婴儿期癫痫性脑病的基因突变分析

魏春苗¹ 夏桂枝^{1,2} 任榕娜²

(1. 蚌埠医学院福总教学医院儿科, 福建 福州 350025; 2. 福州总医院儿科, 福建 福州 350025)

[摘要] **目的** 探讨不明原因婴儿期癫痫性脑病(EE)的基因突变特点。**方法** 以47例不明原因婴儿期EE患儿为研究对象,利用二代测序技术对所有患儿及其父母进行基因突变分析。**结果** 47例患儿中23例检出基因突变,其中13例为新发突变、10例为父亲或母亲存在杂合突变。23例基因突变阳性患儿中,17例检出EE相关基因突变(14例为离子通道类基因突变),2例检出先天性遗传代谢病相关基因突变,2例检出脑结构异常相关基因突变,2例检出精神智力发育迟滞相关基因突变。**结论** 婴儿期EE可能存在基因突变,以离子通道类基因突变为主。

[中国当代儿科杂志, 2018, 20(2): 125-129]

[关键词] 癫痫性脑病; 基因突变; 二代测序; 婴儿

Gene mutations in unexplained infantile epileptic encephalopathy: an analysis of 47 cases

WEI Chun-Miao, XIA Gui-Zhi, REN Rong-Na. Department of Pediatrics, Fuzhou General Hospital, Clinical Medical College of Bengbu Medical University, Fuzhou 350025, China (Xia G-Z, Email: 18020882187@163.com)

Abstract: Objective To investigate the characteristics of gene mutations in unexplained infantile epileptic encephalopathy (EE). **Methods** A total of 47 infants with unexplained infantile EE were enrolled, and next-generation sequencing was used to analyze gene mutations in these infants and their parents. **Results** Of all 47 infants, 23 were found to have gene mutations, among whom 13 had *de novo* mutations and 10 had heterozygous mutations inherited from their father or mother. Among the 23 infants with gene mutations, 17 were found to have the gene mutations related to EE (among whom 14 had ion channel gene mutations), 2 had the gene mutations related to congenital inherited metabolic diseases, 2 had the gene mutations related to brain structural abnormality, and 2 had the gene mutations related to mental retardation. **Conclusions** Unexplained infantile EE may have gene mutations, mainly ion channel gene mutations.

[Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(2): 125-129]

Key words: Epileptic encephalopathy; Gene mutation; Next-generation sequencing; Infant

癫痫性脑病(epileptic encephalopathy, EE)为癫痫发作或癫痫样放电导致的进行性精神运动功能障碍的一种严重的脑部疾病,其主要特征为难以控制的癫痫发作、严重的脑电图异常、发育迟滞/倒退或智力低下^[1]。多种EE在婴儿期发病,包括早期肌阵挛性脑病、大田原综合征、婴儿痉挛症、Dravet综合征、婴儿恶性游走性部分性发作等已知综合征,以及其他不能明确分类的婴儿期EE。除了获得性脑损伤、脑结构异常、代谢性疾病、染色体病及表型明确的单基因病等病因,目前仍有半数

EE病因未明。70%以上的癫痫与遗传因素有关^[2]。随着新一代遗传诊断技术的发展,特别是二代测序技术的应用,越来越多的癫痫基因被发现^[3]。EE是一种遗传异质性很高的综合征,不仅临床表现多样,而且涉及多个致病基因,目前国内外发现的与EE相关的致病基因有70余种^[4-5]。明确婴儿期EE的致病基因不仅能帮助临床医生对婴儿期EE进行系统分类,而且可以显著提高婴儿期EE的诊疗水平,同时遗传病因学的明确将推进产前诊断、产前干预的发展,减少患病婴儿的出生^[6]。

[收稿日期] 2017-11-08; [接受日期] 2017-12-19

[作者简介] 魏春苗,女,硕士,住院医师。

[通信作者] 夏桂枝,女,副主任医师,副教授。

1 资料与方法

1.1 研究对象

以47例2014年1月至2017年1月福州总医院儿科收治的47例病因不明的婴儿期EE患儿为研究对象。纳入标准参照文献^[7-8]：1岁以内起病，临床表现为癫痫，伴以下条件之一：（1）新生儿痉挛、癫痫持续状态、耐药癫痫；（2）癫痫伴精神运动发育迟滞/倒退、运动障碍；（3）国际抗癫痫联盟确认的1岁内起病的早发性婴儿癫痫性脑病（early infantile epileptic encephalopathy, EIEE）；（4）特殊的脑电图改变（爆发-抑制、高度失律、发作间期弥漫性慢波背景伴癫痫样放电持续发放）。排除标准：（1）围生期脑损伤；（2）中枢神经系统感染、缺血缺氧、脑外伤；（3）神经影像学或血/尿遗传代谢病筛查提示遗传代谢病或神经系统退行性改变；（4）孤立的皮层发育异常；（5）染色体病及临床表型明确的单基因病。

收集患儿资料，包括：（1）家族史、个人史；（2）起病年龄、临床表现；（3）血生化、遗传代谢病筛查、神经影像学检查及脑电图特点；（4）治疗药物；（5）癫痫控制情况；（6）生长发育及认知功能。

本研究获得研究对象或其监护人知情同意，以及医院伦理委员会批准。

1.2 基因检测

采集患儿及其父母外周血2 mL（EDTA抗凝），使用BloodGen Midi Kit（CWBIO, China）提取全基因组DNA，操作按说明书进行。参照文献及OMIM数据库信息，将OMIM数据库所有与四千种单基因遗传病相关的基因组外显子区域定制罗氏NimbleGen捕获探针，然后制备捕获文库、Illumina平台进行二代测序，最后进行数据分析。

根据所验证位点的序列设计引物，采用PCR方法扩增，ABI 3730XL测序仪进行一代测序（Sanger法）验证，测序引物采用原PCR引物，进行基因序列分析和比对。二代测序和一代测序验证均由北京智因东方转化医学研究中心完成。

2 结果

2.1 临床和基因突变特点

47例患儿中23例（49%）检出基因突变。检测阳性的患儿中男19例、女4例；起病年龄2 d至11个月，3月龄以内起病的12例（52%）；轻度智力障碍的（IQ50~69）3例，中度（IQ35~49）6例，重度（IQ20~34）12例，极重度智力障碍（IQ<20）2例；有癫痫家族史的3例，有热性惊厥家族史5例，智力低下家族史1例；头颅MRI正常15例，表现为脑发育不良3例、脑萎缩2例、侧脑室增宽2例、蛛网膜囊肿1例；视频脑电图呈爆发-抑制4例、高度失律2例，其余17例均记录到局灶性、多灶性或广泛性癫痫样放电。23例患儿的血电解质及血、尿遗传代谢病筛查均正常，均应用2种以上抗癫痫药物治疗，其中3例联合生酮饮食治疗，均不能达到临床控制癫痫发作。23例患儿中临床诊断Dravet综合征5例、大田原综合征4例、婴儿痉挛症2例，其余12例不能明确分类。

23例基因突变的EE患儿中检出14种突变，其中已报道的突变5个，新的突变18个；13例患儿有新发突变，10例为父亲或母亲存在杂合突变；15例为错义突变，1例为无义突变，1例为剪接位点突变，6例为框移突变；17例为常染色体显性遗传，2例为X染色体显性遗传，4例为X染色体隐性遗传，13例为致病突变，10例为可能致病突变。见表1。

12例3月龄内起病的EE患儿中4例确诊为大田原综合征（2例为SCN2A突变，1例为KCNQ2突变，1例为STXBP1突变），8例不能明确临床分型（突变基因分别为SCN1A、SCN2A、SCN8A、ALG13、GABRA1、SLC6A8、SLC35A2）；11例3月龄后起病的EIEE中确诊Dravet综合征7例（6例为SCN1A突变、1例为PCDH19突变），婴儿痉挛症2例（1例为TSC2突变、1例为FLNA突变），其余2例不能明确临床分型（突变基因分别为SYNGAP1、KIAA2022）。见表2。

表 1 23 例基因突变检测阳性的癫痫性脑病患者临床及基因突变特点

基因	病例编号	性别	起病年龄	智力落后程度	核苷酸改变	氨基酸改变	突变来源	致病性	是否报道
SCN1A	5	女	5 个月	轻	c.1125G>C(E10)	p.L375F	<i>de novo</i>	致病	未报道
	13	男	8 个月	轻	c.2876G>C(E17)	p.C959S	<i>de novo</i>	致病	未报道
	55	男	7 个月	极重	c.2317(E15)_c.2318(E15) ACCCATTTGTTGACCTGG	p.A773delinsDPFVDLA	<i>de novo</i>	可能致病	未报道
	71	男	4 个月	中	c.3730C>T(E21)	p.Q1244X,766	<i>de novo</i>	致病	未报道
	93	男	4 个月	中	c.32(E3)_c.36(E3) delCTGACinsA(E3)	p.P11Qfs*80	<i>de novo</i>	致病	未报道
	83	女	6 个月	中	c.1119(E10)delG	p.L373Ffs*6	<i>de novo</i>	致病	未报道
	98	男	2 个月	重	c.1200(E11)_c.1202(E11) delGAT	p.M400_I401delinsI	<i>de novo</i>	可能致病	未报道
SCN2A	3	男	21 d	重	c.2674G>A(E16)	p.V892I	<i>de novo</i>	致病	未报道
	105	男	23 d	重	c.2030A>G(E13)	p.E677G	父	可能致病	未报道
	56	男	1 个月	重	c.620T>C(E6)	p.F207S	母	可能致病	未报道
	108	男	9 d	重	c.1242C>G(E10)	p.F414L	<i>de novo</i>	可能致病	未报道
SCN8A	62	男	2 个月	重	c.4423G>A(E25)	p.G1475R	<i>de novo</i>	致病	未报道
PCDH19	51	女	11 个月	轻	c.1852G>A(E1)	p.D618N	母	致病	已报道
KCNQ2	41	男	2 d	重	c.622A>G(E4)	p.M208V	<i>de novo</i>	致病	已报道
GABRA1	91	男	2 个月	重	c.1079C>A(E10)	p.P360H	父	可能致病	已报道
STXBP1	18	男	20 d	重	c.1687(E18)_c.1688(E18) insG	p.563,W>Wfs25	<i>de novo</i>	致病	未报道
ALG13	65	男	2.5 个月	重	c.611G>A(E6)	p.G204E	母	可能致病	未报道
SLC35A2	28	女	2 个月	重	c.617(E4)_cc.620(E4) delAAGG	p.Q206Rfs*45	母	致病	未报道
SLC6A8	75	男	28 d	极重	c.107G>T(E1)	p.G36V	母	可能致病	未报道
TSC2	61	男	4 个月	中	c.2837+2T>C(E6)	剪切位点	<i>de novo</i>	致病	未报道
FLNA	74	男	5 个月	中	c.4579G>A(E27)	p.D1527N	母	可能致病	已报道
SYNGAP1	81	男	4 个月	中	c.3049T>A(E15)	p.F1017I	父	致病	未报道
KIAA2022	44	男	6 个月	重	c.1172A>G(E3)	p.E391G	母	可能致病	已报道

表 2 23 例基因突变检测阳性婴儿期癫痫性脑病患者的最后诊断及突变基因

最后诊断	例数	基因
大田原综合征	4	SCN2A、KCNQ2、STXBP1
婴儿痉挛症	2	TSC2、FLNA
Dravet 综合征	7	SCN1A、PCDH19
分型不明早发性癫痫性脑病	8	SCN1A、SCN2A、SCN8A、GABRA1、ALG13、SLC6A8、SLC35A2
分型不明癫痫性脑病	2	SYNGAP1、KIAA2022

2.2 基因突变分类

23 例基因突变检测阳性的患儿中 17 例（74%）检出 EE 相关的基因突变，其中 10 例为 EIEE 相关、7 例为 Dravet 综合征相关。10 例检出 EIEE 相关的基因突变，包括 SCN2A 突变 4 例，SCN1A、SCN8A、KCNQ2、GABRA1、STXBP1、ALG13 突变各 1 例；7 例检出 Dravet 综合征相关的基因突

变，分别为 SCN1A 6 例、PCDH19 1 例。17 例检出 EE 相关的基因突变，14 例的基因为 SCN1A、SCN2A、SCN8A、KCNQ2、GABRA1 等离子通道类基因，3 例的基因为 STXBP1、ALG13、PCDH19 等非离子通道类基因。除检出 EE 相关基因突变的 17 例患儿外，其它 6 例患儿中的 2 例检出先天性遗传代谢病相关基因突变：SLC6A8、SLC35A2；2

例分别检出结节性硬化病2型相关基因(TSC2)、脑室周围结节状异位1型相关基因(FLNA)突变;2例检出精神智力发育迟滞相关基因突变:SYNGAP1、KIAA2022。

3 讨论

二代测序(next generation sequencing, NGS)又称高通量测序,具有经济、快速、准确、阳性率高的特点,NGS已将EE致病基因的检出率从不足10%提高到25%以上^[9-10]。本研究采用NGS对不明原因的婴儿期EE患儿及其父母进行NGS检测,检测的基因序列为包括4812种疾病的4050个基因的临床外显子组,对每一个变异都进行平行比对和遗传共分离分析,检测结果更为准确。47例患儿中23例检测出基因突变,阳性率为49%,高于其他仅进行癫痫和/或智力落后相关基因NGS检测的阳性率^[11-12];检出的14种基因突变中已报道的突变5个,新的突变18个,扩大了EE的基因谱;检测阳性的患儿中13例为新发突变,10例为父亲或母亲存在杂合突变,突变来源分析为遗传咨询提供了有力的依据。

23例基因突变检测阳性的患儿中,17例检出EE相关的基因突变,其中14例为离子通道类基因突变,非离子通道类基因突变仅3例,可见离子通道类EE相关基因突变为婴儿期EE最主要的基因突变,因此EE的治疗可根据基因突变的检测结果选择作用于相应靶点的抗癫痫药物,而对于基因突变不明确的病例,可优先选择作用于离子通道类基因突变靶点的药物。7例Dravet综合征患儿中6例检出SCN1A突变,1例女性患儿为PCDH19突变,提示Dravet综合征主要由SCN1A基因突变引起,与文献^[13]相符。而对于SCN1A基因突变检测阴性的Dravet综合征女性患儿,应注意PCDH19突变^[14]。2例Dravet综合征患儿于病程中出现过强直发作,而强直发作形式在Dravet综合征中极为少见^[15],最终经过NGS证实2例均存在SCN1A新发错义突变,确诊为Dravet综合征,并且根据突变检测结果停用钠离子通道阻滞剂奥卡西平,改为丙戊酸钠联合托吡酯治疗,2例患儿的癫痫发作次数较前明显减少,持续时间较前缩短。

2例临床诊断为婴儿痉挛症的患儿中,1例为4个月婴儿,频繁痉挛发作,视频脑电图表现为高度失律,头颅MRI未见异常,基因突变检测出TSC2新发剪接位点突变,TSC2突变是结节性硬化症的主要致病原因,但该患儿临床表现与基因突变检测结果不相吻合。有文献^[16]报道1例诊断为婴儿痉挛症的患儿,基因突变检测发现TSC2(c.2197 C>G)新发错义突变,但当时结节性硬化症诊断依据不足,随访至9岁时头颅MRI出现脑室管膜下结节,确诊为结节性硬化症。因此对于本研究临床诊断婴儿痉挛症的1例患儿也需考虑结节性硬化症可能,应随访观察并定期复查头颅CT或MRI;另1例3个多月起病,头颅MRI未见异常,基因突变检测出FLNA错义突变,提示X连锁显性脑室周围结节状异位1型,母亲为杂合突变、但表型正常,考虑X染色体失活,与文献^[17]相符,也需随访观察并定期复查头颅MRI。另外2例不明原因的EIEE患儿均表现为3月龄内反复癫痫发作,抗癫痫药物治疗不佳,脑电图严重的癫痫样放电,重度或极重度智力落后,头颅MRI无异常,血氨、血浆乳酸及血、尿遗传代谢病筛查未发现异常,分别检出先天性糖基化紊乱II m型相关基因SLC35A2框移突变和X连锁隐性遗传肌酸缺乏综合征相关基因SLC6A8错义突变,提示这2例患儿为代谢异常导致的EIEE。而且文献^[18-19]报道这两种基因突变均可导致EIEE。23例患儿中2例分别检出了精神智力发育迟滞相关基因SYNGAP1和KIAA2022的突变。文献^[20]报道SYNGAP1突变可以引起智力落后、孤独症及癫痫发作;Carvill等^[21]在EE患儿检出SYNGAP1突变。因此,SYNGAP1突变除引起智力落后外也可能是引起EE的病因。KIAA2022为X连锁隐性遗传的精神智力发育迟滞相关基因,基因功能目前尚不明确,但研究认为其对大脑的早期发育具有重要作用,可以导致男性患儿重度智力障碍^[22]。de Lange等^[23]发现14例KIAA2022基因突变的女性患儿中12例表现为难治性癫痫,但智力障碍较男性轻。本例检测出KIAA2022突变的患儿为6个月男性患儿,既表现有重度智力障碍又有难治性癫痫,文献未见类似报道。SYNGAP1和KIAA2022基因突变是否为婴儿期EE的致病基因需进一步研究证实。

47例患儿中24例未检测出基因突变,可能的原因有:(1)检测没有覆盖到全部的外显子;(2)突变在非编码区;(3)未检测其他变异形式:如CNV、中型缺失重复及动态突变等;(4)未检测某种致病机制:如mtDNA等;(5)检测技术和结果分析的局限性。

综上所述,NGS是对不明原因婴儿期EE进行基因突变检测的有效方法,对于婴儿期EE病因的明确以及治疗的指导和遗传咨询具有重要作用。但仍有部分患儿未检测出基因突变,因此对于不明原因婴儿期EE的基因突变检测手段还需进一步完善。

[参考文献]

- [1] Engel J Jr, International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE task force on classification and terminology[J]. *Epilepsia*, 2001, 42(6): 796-803.
- [2] Hildebrand MS, Dahl HH, Damiano JA, et al. Recent advances in the molecular genetics of epilepsy[J]. *J Med Genet*, 2013, 50(5): 271-279.
- [3] Thomas RH, Berkovic SF. The hidden genetics of epilepsy-a clinically important new paradigm[J]. *Nat Rev Neurol*, 2014, 10(5): 283-292.
- [4] Nordli DR Jr. Epileptic encephalopathies in infants and children[J]. *J Clin Neurophysiol*, 2012, 29(5): 420-424.
- [5] Helbig I, Tayoun AA. Understanding genotypes and phenotypes in epileptic encephalopathies[J]. *Mol Syndromol*, 2016, 7(4): 172-181.
- [6] Scheffer IE. Epilepsy genetics revolutionizes clinical practice[J]. *Neuropediatrics*, 2014, 45(2): 70-74.
- [7] Kong W, Zhang Y, Gao Y, et al. SCN8A mutations in Chinese children with early onset epilepsy and intellectual disabilities[J]. *Epilepsia*, 2015, 56(3): 431-438.
- [8] 马玉平, 彭镜, 王颖, 等. 60例不明原因早期癫痫性脑病临床特点及全基因组拷贝数变异分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2014, 16(11): 1100-1104.
- [9] Martin HC, Kim GE, Pagnamenta AT, et al. Clinical whole-genome sequencing in severe early-onset epilepsy reveals new genes and improves molecular diagnosis[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(12): 3200-3211.
- [10] Schnekenberg RP, Németh AH. Next-generation sequencing in childhood disorders[J]. *Arch Dis Child*, 2014, 99(3): 284-290.
- [11] Zhang Q, Li J, Zhao Y, et al. Gene mutation analysis of 175 Chinese patients with early-onset epileptic encephalopathy[J]. *Clin Genet*, 2017, 91(5): 717-724.
- [12] Gokben S, Onay H, Yilmaz S, et al. Targeted next generation sequencing: the diagnostic value in early-onset epileptic encephalopathy[J]. *Acta Neurol Belg*, 2017, 117(1): 131-138.
- [13] Dravet C. The core Dravet syndrome phenotype[J]. *Epilepsia*, 2011, 52(Suppl 2): 3-9.
- [14] Depienne C, Bouteiller D, Keren B, et al. Sporadic infantile epileptic encephalopathy caused by mutations in PCDH19 resembles Dravet syndrome but mainly affects females[J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(2): e1000381.
- [15] Gataullina S, Dulac O. From genotype to phenotype in Dravet disease[J]. *Seizure*, 2017, 44: 58-64.
- [16] Wang Y, Du X, Bin R, et al. Genetic variants identified from epilepsy of unknown etiology in Chinese children by targeted exome sequencing[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40319.
- [17] Epi4K and EPGP Investigators. De novo mutations in the classic epileptic encephalopathies[J]. *Nature*, 2013, 501(7466): 217-221.
- [18] Koder H, Nakamura K, Osaka H, et al. De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy[J]. *Hum Mutat*, 2013, 34(12): 1708-1714.
- [19] Leuzzi V, Mastrangelo M, Battini R, et al. Inborn errors of creatine metabolism and epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2013, 54(2): 217-227.
- [20] Berryer MH, Hamdan FF, Klitten LL, et al. Mutations in SYNGAP1 cause intellectual disability, autism and a specific form of epilepsy by inducing haploinsufficiency[J]. *Hum Mutat*, 2013, 34(2): 385-394.
- [21] Carvill GL, Heavin SB, Yendle SC, et al. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(7): 825-830.
- [22] Van Maldergem L, Hou Q, Kalscheuer VM, et al. Loss of function of KIAA2022 causes mild to severe intellectual disability with an autism spectrum disorder and impairs neurite outgrowth[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(16): 3306-3314.
- [23] de Lange IM, Helbig KL, Weckhuysen S, et al. De novo mutations of KIAA2022 in females cause intellectual disability and intractable epilepsy[J]. *J Med Genet*, 2016, 53(12): 850-858.

(本文编辑: 俞燕)