

论著·临床研究

## 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

马玉平 彭镜 王颖 陈云 吴丽文 尹飞

(中南大学湘雅医院儿科/湖南省儿童智力障碍研究中心, 湖南 长沙 410008)

**[摘要]** **目的** 研究不明原因早期癫痫性脑病(EEEs)患儿临床特点,并进行全基因组拷贝数变异检测,寻找致病性微缺失/重复。**方法** 收集2012年7月至2013年4月60例不明原因EEEs患儿临床资料进行分析,采集患儿及其父母样本,应用SNP array技术对患儿进行全基因组拷贝数变异检测,结合荧光原位杂交技术进行验证及父母来源分析,寻找可疑致病性拷贝数变异。**结果** 60例不明原因EEEs患儿诊断婴儿痉挛症34例,大田原综合征3例,婴儿严重肌阵挛性癫痫3例,余20例分型不明确。77%患儿伴有中重度智力障碍。颅脑影像学检查提示35%患儿脑发育不良或脑萎缩。54例患儿中,17%有小头畸形。经治疗28例患儿癫痫控制,16例未控制,5例死亡,1例失访。全基因组拷贝数变异分析结果:5人发现7个致病性或可疑致病性拷贝数变异。**结论** 不明原因EEEs临床表现多样,预后差。全基因组拷贝数变异分析可发现致病性或可疑致病性拷贝数变异,丰富癫痫脑病基因型数据库,促进对不明原因EEEs病因学的进一步认识,为患者家庭再生育的遗传咨询提供理论依据。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(11): 1100-1104]

**[关键词]** 早期癫痫性脑病; 临床特点; 全基因组拷贝数变异; 儿童

## Clinical features and genome-wide copy number variation analysis in 60 children with early-onset epileptic encephalopathies of unknown cause

MA Yu-Ping, PENG Jing, WANG Ying, CHEN Yun, WU Li-Wen, YIN Fei. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital of Central South University/Hunan Intellectual and Developmental Disabilities Research Center, Changsha 410008, China (Yin F, Email: yf2323@hotmail.com)

**Abstract: Objective** To study the clinical features of early-onset epileptic encephalopathies (EEEs) of unknown cause, and to identify pathogenic microdeletion/microduplication of EEEs by genome-wide analysis of copy number variations (CNVs). **Methods** The clinical data of 60 children diagnosed with unexplained EEEs between July 2012 and April 2013 were obtained and analyzed. Specimens were collected from the selected children and their parents. Single nucleotide polymorphism array was used to detect genome-wide CNVs, and fluorescence *in situ* hybridization was performed to verify the results and analyze the source of the parents, further to identify suspected pathogenic CNVs of EEEs. **Results** Among the 60 children with unexplained EEEs, 34 were diagnosed with West syndrome, 3 with Ohtahara syndrome, 3 with Dravet syndrome, and 20 with unclassified EEEs. In total, 77% of the patients were associated with moderate to severe mental retardation. Head imaging test implied that 35% of the patients had brain dysplasia or astrophy. Among 54 patients, 17% showed microcephalus. After treatment, 28 patients had clinical seizures under control, 16 out of control, 5 dead, and 1 lost to follow-up. Genome-wide analysis of CNVs showed that 7 pathogenic or suspected pathogenic CNVs were present in 5 patients. **Conclusions** EEEs of unknown cause are associated with high phenotypic heterogeneity and poor prognosis. Genome-wide CNVs analysis can demonstrate pathogenic or suspected pathogenic CNVs. This research expands the gene bank of EEEs and improves the understanding about possible etiology of unexplained EEEs. The results provide a reference for genetic counseling regarding reproduction in the patient's family.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(11): 1100-1104]

**Key words:** Early-onset epileptic encephalopathies; Clinical feature; Copy number variation; Child

[收稿日期] 2014-03-18; [接受日期] 2014-05-14

[基金项目] 国家自然科学基金(81370771); 中南大学研究生自主探索创新项目(2013zzts311)。

[作者简介] 马玉平,女,硕士研究生,住院医师。

[通信作者] 尹飞,男,教授。

早期癫痫性脑病(early-onset epileptic encephalopathies, EEEs)是指发生在新生儿或婴儿早期由反复临床惊厥或发作间期严重痫样放电导致认知、运动全面落后、重度智力障碍等灾难性神经系统后遗症的一类综合征<sup>[1]</sup>。国际抗癫痫联盟(International League Against Epilepsy, ILAE)确认的EEEs包括大田原综合征(Ohtahara syndrome, OS)、婴儿痉挛症(West syndrome, WS)、婴儿严重肌阵挛癫痫(Dravet syndrome)、早期肌阵挛脑病、非进展性的肌阵挛脑病和婴儿严重局灶性游走性癫痫。排除获得性脑损伤、脑结构异常、遗传代谢性疾病、染色体病及单基因病等原因,目前仍有半数病因不明。癫痫性脑病是一种遗传异质性很高的症候群,且临床表型谱宽泛。至今已明确EEEs致病基因有18个,部分基因通过全基因组拷贝数变异(copy number variations, CNVs)分析定位,全基因组CNVs是指与基因组参考序列相比数百bp至数Mb的微缺失/微重复<sup>[2]</sup>。目前研究较多的是CNVs与智力障碍、自闭症、精神分裂症的关系<sup>[3]</sup>;自2009年以来,Helbig等<sup>[4]</sup>及De Kovel等<sup>[5]</sup>发现全面性/部分性癫痫及癫痫脑病与CNVs密切相关,其中可能与多种全面性及局灶性癫痫相关的潜在致病性CNVs包括15q11.2、16p11.2、6p13.11等区域中的CNVs;Mefford等<sup>[6]</sup>于2011年对315例癫痫性脑病的患者进行全基因组CNVs分析提示,7.9%(25/315)患者携带的CNVs可能与其临床表型相关,并且发现了新的癫痫性脑病候选基因: CACNA2D1、SLC1A3、ADAM23。Bedoyan等<sup>[7]</sup>也发现16p11.2的CNVs与婴儿严重局灶性游走性癫痫相关;以上研究均表明CNVs是导致不明原因EEEs的重要原因,目前国内尚未见EEEs全基因组CNVs的分析报道。本研究将从临床特点和全基因组CNVs分析两方面对不明原因EEEs展开探讨。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

2012年7月至2013年4月我院小儿神经专科门诊及住院部诊断为不明原因EEEs患儿,纳入标准:1岁以内起病,临床表现为癫痫;伴以下条件之一:(1)新生儿不明原因的痉挛、耐药癫痫、

癫痫持续状态;(2)癫痫伴精神运动发育停滞或倒退、运动障碍、头围改变、步态异常;(3)国际抗癫痫联盟确认的可以在1岁内起病的EEEs;(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);(5)头颅MRI异常(胼胝体发育不良、脑萎缩等)。

排除标准:(1)血串联质谱和(或)尿气相色谱-质谱检查提示代谢病;(2)获得性脑损伤:缺血缺氧性脑病、脑血管病变、外伤、颅内感染、宫内感染等;(3)孤立的皮层发育异常;(4)染色体病及临床表型明确的单基因病。

### 1.2 资料采集

回顾性分析60例不明原因EEEs临床资料,包括家族史、母孕史、癫痫起病年龄、发作形式、精神运动发育评估、头围、血氨、血乳酸、脑电图、颅脑影像学表现、治疗及预后。

### 1.3 全基因组CNVs检测

经患儿家属同意后采集患儿及父母外周血5 mL, EDTA抗凝;采用血液基因组DNA提取试剂盒(天根公司)说明书操作提取DNA。全基因组CNVs检测使用Illumina公司的SNP array芯片系统平台, HumanCyto-SNP12 Beadchips 包含有30万个SNP探针位点,平均每张芯片上每个探针的重复数可高达30次,探针分布覆盖245种疾病位点, HumanOmni-zhonghua 包含90万个SNP探针位点。具体实验流程参照文献<sup>[8]</sup>。所得数据经正常人群数据库 DGV 数据库(<http://projects.tcag.ca/variation>), 异常表型数据库(<https://decipher.sanger.ac.uk>)在线孟德尔遗传性疾病数据库 OMIM ([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)) 以及 PUBMED 分析是否有已知致病性 CNVs, 对致病性或可疑致病性 CNVs 则行 FISH 检测, 并对父母进行检测做来源分析, 通过以上综合分析得出致病性 CNVs。目前认为:(1)新发的 CNVs 位于已知的微缺失微重复综合征区域内, 或者与相关的综合征临床表型相符考虑致病;(2)CNVs 片段的断裂点处打断某些已知的致病性基因, 且其临床表型符合相关基因突变的临床表型时考虑致病;(3)新发的 >3 Mb 的 CNVs 片段是致病的<sup>[9]</sup>;(4)新发的微缺失是致病的;(5)新发的重复可疑致病;(6) >1 Mb 的变异无论是否遗传或来源不明均可

认为可疑致病<sup>[6]</sup>。(7)在正常人群的CNVs研究中,3个以上的研究小组均发现有该CNVs的记录,可以认为是多态性改变。

## 2 结果

### 2.1 临床特点

60例不明原因EEEs患儿中,男44例,女16例,起病年龄为2d至1岁,3个月内起病21人,4~6个月起病26人,7~12个月起病13人,平均起病年龄 $5.1 \pm 3.3$ 个月。根据临床表现及脑电图特点临床诊断:WS 34例(57%),OS 3例(5%),Dravet综合征3例(5%),余20例(33%)分型不明确。

60例患儿中1例为领养儿,余59例家族中有癫痫和(或)智力低下者8人。母亲既往有自然流产史者4例,死胎史者1例;母孕期间有先兆流产表现12例。

34例WS患儿表现为痉挛发作,6例合并强直或强直-阵挛发作,1例合并部分运动性发作;3例OS患儿表现为痉挛发作,其中1例合并强直-阵挛发作;3例Dravet综合征患儿以肌阵挛、强直阵挛发作为主,可伴部分性发作;20例分型不明确EEEs患儿中8例为强直或强直阵挛发作;5例为肌阵挛发作;3例为多种发作形式(强直-阵挛并部分运动性发作或痉挛发作);2例为痉挛发作;2例为部分性运动发作。

根据世界卫生组织(WHO)和美国智力低下协会(AAMD)的智力低下分级标准<sup>[9]</sup>,轻度智力缺损(IQ 50~69)14人(23%),中度智力缺损(IQ 35~49)22人(37%),重度智力缺损(IQ 34以下)24人(40%)。

共统计了54例患儿头围,其中( $\bar{x}+s \sim \bar{x}+2s$ )2例(4%),( $\bar{x} \sim \bar{x}+s$ )3例(6%),( $\bar{x}-s \sim \bar{x}$ )11例(20%),( $\bar{x}-2s \sim \bar{x}-s$ )11例(20%),( $\bar{x}-3s \sim \bar{x}-2s$ )18例(33%), $\leq \bar{x}-3s$  9例(17%)。

51例患儿检测了血氨(参考值10~47  $\mu\text{mol/L}$ ),平均 $44 \pm 24$   $\mu\text{mol/L}$ ,其中15人(29%)血氨升高(平均 $68 \pm 30$   $\mu\text{mol/L}$ ),最高值144  $\mu\text{mol/L}$ ;46人检测了血乳酸(参考值0.5~2.22 mmol/L),平均 $2.8 \pm 1.4$   $\mu\text{mol/L}$ ,其中19人升高( $3.8 \pm 0.93$  mmol/L),最高值6.4 mmol/L。

34例WS患儿脑电图改变为发作间期高度失律或间断高度失律,其中1人醒睡各期或非快速眼动期(non-rapid eye movement, NREM)放电指数达95%;3例OS患儿脑电图表现为睡眠期间断爆发-抑制,1例醒睡各期或NREM期放电指数达95%。3例Dravet综合征患儿中,2例提示全导棘慢波、多棘慢波发放,1例为局灶尖棘波发放;20例分型不明确不明原因EEEs患儿4例提示高度失律,4例全导棘波、棘慢波、多棘慢波爆发。4例提示电背景活动慢化,4例为多灶性尖波、尖棘波发放,其中2例监测到部分运动性发作;2例表现为爆发-抑制,1例为发作期全导低电压,1例为全导慢波阵发。

60例不明原因EEEs患儿6例完善头部CT平扫或平扫增强,54例完善颅脑MRI平扫或平扫增强,其中11例提示脑外侧裂增宽或外部性脑积水,4例侧脑室增宽,胼胝体发育不良3例,3例脑白质异常信号,2例透明隔囊肿,3例蛛网膜下囊肿,34例无明显异常。

34例WS患儿中27例采用ACTH冲击治疗联合1~3种抗癫痫药物,2例采用2~3联抗癫痫治疗,1例单药治疗,20例癫痫已控制,12例未控制,2例死亡。20例未分型癫痫脑病患儿9例单药治疗,11例2~3种抗癫痫药物联合治疗,8例癫痫已控制,8例未控制,3例死亡,失访1例。3例Dravet综合征患儿予3联抗癫痫治疗、3例OS患儿予ACTH联合1~2种抗癫痫药物治疗均未控制。

### 2.2 全基因组CNVs分析结果

(1)全基因组CNVs结果:60例不明原因EEEs患儿中,5例患儿携带7个致病性或可疑致病性CNVs,阳性率为8%,具体位点见表1。

(2)基因型表型分析:①1q43q44微缺失可导致一系列已明确临床症状,包括不同程度的智力障碍、语言发育迟缓、面部及手足异常、小头畸形、胼胝体发育不良、癫痫<sup>[10]</sup>,与患儿1临床表现相符。经FISH验证及父母来源分析确定为1q43q44微缺失合并9p24微重复新发突变,致病性明确,且为首次报道。②异常表型数据库265334患者2q37.3出现0.15 Mb微缺失,表现为智力低下、多动及面容异常,表明2q37.3可能与智力障碍及癫痫相关,为可能致病性突变。

③2q24.3-q31.1微缺失部分包括17个基因,其中



表1 致病性或可疑致病性 CNVs 详情

| 编号 | 性别 | 诊断         | 芯片类型     | 致病 / 可疑致病 CNVs |           |           |         |     | 来源分析 | 致病性 |
|----|----|------------|----------|----------------|-----------|-----------|---------|-----|------|-----|
|    |    |            |          | 染色体区域          | 起始位点      | 终止位点      | 大小 (bp) | 类型  |      |     |
| 1  | 女  | 分型不明 EEEs  | Cyto-12  | 1q43-q44       | 242243178 | 249202755 | 6959578 | 微缺失 | 新发   | 致病  |
|    |    |            |          | 9p24           | 46587     | 4600804   | 4554218 | 微重复 | 新发   | 致病  |
| 2  | 男  | 分型不明 EEEs  | Cyto-12  | 2q37.3         | 237531744 | 239021690 | 1489947 | 微缺失 | 母源   | 可疑  |
| 3  | 男  | Dravet 综合征 | zhonghua | 2q24.3-q31.1   | 166974754 | 170076332 | 3101579 | 微缺失 | 新发   | 致病  |
| 4  | 男  | 分型不明 EEEs  | Cyto-12  | 3p24.1-23      | 29639871  | 31695245  | 2055375 | 微重复 | 未知   | 可疑  |
| 5  | 男  | WS         | zhonghua | 3q25.32-25.33  | 157985647 | 159399554 | 1413908 | 微重复 | 未知   | 可疑  |
|    |    |            |          | 17q12          | 35018282  | 36244358  | 1226077 | 微重复 | 未知   | 可疑  |

包括部分 SCN1A: 电压门控钠离子通道  $\alpha$  亚单位神经亚型 I 型 (OMIM: 182389), 为 Dravet 综合征致病基因<sup>[11-12]</sup>, 符合患儿临床诊断, 经 FISH 验证及父母来源分析为新发突变, 致病性明确。缺失部分还包括 SCN9A (OMIM: 603415)、SCN7A (OMIM: 182392), Singh 等<sup>[13]</sup>认为 SCN9A 对 Dravet 综合征有修饰作用, 而 Gorter 等<sup>[14]</sup>发现癫痫大鼠模型及癫痫患者海马区 SCN7A 基因的持续表达可能与颞叶癫痫的进展相关, 因此 SCN9A、SCN7A 与 Dravet 综合征的关系值得进一步探讨。④ 3p24.1-23 微重复片段共包含 5 个非癫痫相关基因。异常表型数据库 275459 患儿 3p24.1 的微重复与精神异常相关; Chioza 等<sup>[15]</sup>经全基因组连锁分析证实 3p23-p14 与儿童失神癫痫相关。⑤异常表型数据库 285007 患儿 3q25.32 存在 0.15 Mb 微重复, 与智力障碍及肥胖有关。异常表型数据库多个患者 (282150、281079、278411 等) 17q12 的微重复与智障、癫痫、小头畸形相关, 提示为致病性变异可能性大。

### 3 讨论

本研究 60 例不明原因 EEEs 患儿中, 男性病例较多, 男女比例为 2.75:1, 且多于新生儿期及婴儿早期起病, 平均发病年龄  $5 \pm 3$  个月, 78% 在 6 个月以内起病。在所有已知 EEEs 中以婴儿痉挛症发病率最高, 为 0.16~0.45%<sup>[16-17]</sup>, 本组患儿中, 婴儿痉挛症 (WS) 最常见, 占 57%, 而分型不明确者占 33%。已知综合征患儿临床及脑电图表现典型, 分型不明确的不明原因 EEEs 患儿癫痫发作形式以强直/强直-阵挛、肌阵挛及痉挛发作为主, 脑电图表现多样, 包括高度失律、全导棘波、尖棘波、棘慢波爆发, 电背景活动慢化、爆发-抑制等。

由于其临床表现多样, 脑电图表现无规律可循, 目前对分型不明确癫痫性脑病报道甚少, 加强对该类患儿临床特点总结及遗传病因学诊断, 有助于提高不明原因 EEEs 的诊疗水平。

51 例检测了血氨水平的患儿中 15 例 (29%) 血氨升高; 46 例检测了血乳酸的患儿中, 19 例 (41%) 血乳酸升高, 提示不明原因 EEEs 患儿存在不同程度的代谢异常。54 例检测了头围的患儿中, 49 例 (91%) 头围位于同性别同龄均值及以下, 小头畸形占总人数的 17%。35% 患儿颅脑影像学检查提示脑发育不良或脑萎缩。经抗癫痫治疗后 47% 患儿癫痫已控制, 但 76% 患儿伴有中重度智力障碍, 随访 1~1.5 年有 5 例死亡, 说明不明原因 EEEs 致残致死率高。

如何明确不明原因 EEEs 病因, 通过提高产前诊断水平减少此类患儿出生是目前亟待解决的问题。本研究是国内首次对不明原因 EEEs 行全基因组 CNVs 筛查, 阳性率达 8% (5/60), 与 Mefford 等<sup>[6]</sup>报道相仿。5 例患儿携带可疑或致病性 CNVs, 涉及区域有 1q43-q44、9p24、2q37.3、2q24.3-q31.1、3p24.1-23、3q25.32-25.33、17q12, 未包含 Mefford HC 团队已报道的癫痫脑病热点 CNVs: 15q13.3、16p13.11、15q11.2, 可能与样本量少或种族差异有关。全基因组 CNVs 分析费用低、周期短, 在有效检测微缺失/重复的同时还可定位新的 EEEs 候选基因, 但遗憾的是由于本组样本量较少, CNVs 阳性结果中无重复变异片段, 因此未发现新的 EEEs 候选基因。本研究通过全基因组 CNVs 分析丰富了不明原因 EEEs 基因型, 提高了对不明原因 EEEs 的病因诊断水平, 为患儿家庭再生育的遗传咨询提供了理论依据, 是一种值得推荐的检测手段。

[参 考 文 献]

- [1] Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, et al. 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(4): 676-685.
- [2] Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome[J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(2): 85-97.
- [3] Mefford HC, Eichler EE. Duplication hotspots, rare genomic disorders, and common disease[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19(3): 196-204.
- [4] Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, et al. 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(2): 160-162.
- [5] De Kovel CG, Trucks H, Helbig I, et al. Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies[J]. *Brain*, 2010, 133(Pt 1): 23-32.
- [6] Mefford HC, Yendle SC, Hsu C, et al. Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies [J]. *Ann Neurol*, 2011, 70(6): 974-985.
- [7] Bedoyan JK, Kumar RA, Sudi J, et al. Duplication 16p11.2 in a child with infantile seizure disorder[J]. *Am J Med Genet A*, 2010, 152A(6): 1567-1574.
- [8] 刘静. 373例不明原因智力障碍/生长发育迟缓, 多发畸形患者的全基因组拷贝数变异分析 [D]. 中南大学, 2013.
- [9] 何慧静, 万国斌, 韦臻. 223例智力障碍儿童的病因分析 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2010, 18(6): 142-143.
- [10] Ballif BC1, Rosenfeld JA, Traylor R, et al. High-resolution array CGH defines critical regions and candidate genes for microcephaly, abnormalities of the corpus callosum, and seizure phenotypes in patients with microdeletions of 1q43q44[J]. *Hum Genet*, 2012, 131(1): 145-156.
- [11] Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, et al. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(6): 1327-1332.
- [12] Depienne C, Trouillard O, Saint-Martin C, et al. Spectrum of SCN1A gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients[J]. *Med Genet*, 2009, 46(3): 183-191.
- [13] Singh NA, Pappas C, Dahle EJ, et al. A role of SCN9A in human epilepsies, as a cause of febrile seizures and as a potential modifier of Dravet syndrome[J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(9): e1000649.
- [14] Gorter JA, Zurolo E, Iyer A, et al. Induction of sodium channel Na(x) (SCN7A) expression in rat and human hippocampus in temporal lobe epilepsy[J]. *Aronica E Epilepsia*, 2010, 51(9): 1791-1800.
- [15] Chioza BA, Aicardi J, Aschauer H, et al. Genome wide high density SNP-based linkage analysis of childhood absence epilepsy identifies a susceptibility locus on chromosome 3p23-p14[J]. *Epilepsy Res*, 2009, 87(2-3): 247-255.
- [16] Covanis A. Epileptic encephalopathies(including severe epilepsy syndromes) [J]. *Epilepsia*, 2012, 53(Suppl 4): 114-126.
- [17] Pellock JM, Hrachovy R, Shinnar S, et al. Infantile spasms: AU.S. Consensus report[J]. *Epilepsia*, 2010, 51(10): 2175-2189.

( 本文编辑: 王庆红 )