

论著·临床研究

全外显子组测序在危重症新生儿单基因遗传病中的临床应用

齐志业 段江 贺湘英 钟庆华 张彩营 谢云波 梁琨

(昆明医科大学第一附属医院儿科, 云南 昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨全外显子组测序(WES)检测技术在危重症新生儿单基因遗传病中的临床应用价值及意义。**方法** 选取2016年6月至2018年12月收治的怀疑有遗传性疾病或临床诊断不明的危重症新生儿为研究对象,采集患儿及父母全血标本进行WES检测。对检测出的基因变异进行分类,寻找与临床表现相关的变异,并进行Sanger测序验证。**结果** 共纳入新生儿45例,男22例,女23例,中位发病日龄为2.0 d。经分子诊断确诊单基因遗传病患儿12例,诊断阳性率为27%,中位确诊日龄为31.5 d,其中与部分临床表型相关、但对患儿临床表型再次进行补充与分析后诊断为单基因遗传病者占42%(5/12)。确诊单基因遗传病的患儿经临床治疗后好转率为67%(8/12)。**结论** WES检测技术是寻找危重症新生儿单基因遗传病基因变异的有力工具,并可在临床决策中起到关键作用,但数据结果的解读还需要临床医生结合患儿的表型与WES检测结果综合分析。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(7): 640-643]

[关键词] 单基因遗传病;全外显子组测序;新生儿

Clinical application of whole exome sequencing in monogenic hereditary disorders in critically ill newborns

QI Zhi-Ye, DUAN Jiang, HE Xiang-Ying, ZHONG Qing-Hua, ZHANG Cai-Ying, XIE Yun-Bo, LIANG Kun. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China (Liang K, Email: Kunliang_cn@126.com)

Abstract: Objective To explore the value and significance of the clinical application of whole exome sequencing (WES) in monogenic hereditary disorders in critically ill newborns. **Methods** The critically ill newborns in the neonatal intensive care unit with suspected hereditary diseases or unclear clinical diagnosis from June 2016 to December 2018 were enrolled. The whole blood samples from both newborns and parents were collected for WES. The detected genetic mutations were classified, the mutations associated with clinical phenotypes were searched for, and Sanger sequencing was performed to verify the mutations. **Results** A total of 45 newborns were enrolled, including 22 males and 23 females, and the median age of onset was 2.0 days. Of the 45 newborns, 12 (27%) were confirmed with monogenic hereditary disorders by molecular diagnostics, and the median age at diagnosis was 31.5 days. Of the 12 newborns with monogenic hereditary disorders, 5 (42%) were partially associated with clinical phenotypes but confirmed with monogenic hereditary disorders by additional information supplement and analysis. The improvement rate of newborns with monogenic hereditary disorders was 67% (8/12) after treatment. **Conclusions** WES technology is a powerful tool for finding genetic mutations in monogenic hereditary disorders in critically ill newborns and can play a crucial role in clinical decision-making. However, a comprehensive interpretation of sequence data requires physicians to take the clinical phenotypes and the results of WES into consideration simultaneously.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(7): 640-643]

Key words: Monogenic hereditary disorder; Whole exome sequencing; Newborn

[收稿日期] 2019-01-16; [接受日期] 2019-04-30

[作者简介] 齐志业,男,硕士研究生,主治医师。

[通信作者] 梁琨,女,主任医师,教授。Email: Kunliang_cn@126.com。

随着我国儿童疾病谱的变化及计划生育政策的调整,出生缺陷及遗传性疾病在新生儿疾病的诊疗工作中显得越来越重要^[1]。然而,很多出生缺陷相关的遗传综合征在新生儿期临床症状并不典型,并且这些新生儿往往病情危重,临床诊断困难^[2]。全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)是利用序列捕获技术将全基因组外显子区域脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)捕捉并富集后进行高通量测序的基因组分析技术,为寻找疾病的致病基因提供了一种全新研究方法,但其在危重症新生儿单基因遗传病的应用国内鲜有报道。本文就WES在危重症新生儿单基因遗传病中的临床应用情况做如下介绍。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2016年6月至2018年12月新生儿重症监护病房收治的怀疑有遗传性疾病^[3-4]或临床诊断不明的危重症新生儿^[5]为研究对象,发病时间均在新生儿期。

所有进行检测的新生儿均告知患儿家属检测的目的、意义及局限性,并签署知情同意书。

1.2 标本采集

采集患儿及父母双方全血各2 mL,采用EDTA抗凝2~8℃冷藏保存,进行高通量WES检测。

1.3 检测方法

标本处理:采用QIAGEN公司mini blood全血试剂盒及其标准DNA抽提方法提取基因组DNA,用美国ThermoFisher公司生产的NanoDrop紫外分光光度仪测定样本的浓度及定量。参照ClearSeq捕获试剂盒说明书,基因组DNA经超声打断、末端修复、接头连接、杂交捕获。高通量测序采用Illumina HiSeq平台进行全外显子测序。测序实验使用安捷伦(Agilent)Agilent ClearSeq Inherited Disease试剂盒、Illumina Cluster和SBS试剂盒。目标区域平均测序深度180~200X,其中目标序列的98%深度达20X以上。

变异注释和筛选流程:变异采用VEP软件(Variant Effect Predictor, Ensembl 73)进行注释。使用ClinVar数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>)、人类在线孟德尔遗传数据库

(OMIM, <http://omim.org>)、人类基因突变数据库(HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>)进行已知或疑似致病突变筛选。依据美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)发布的序列变异解读标准和指南^[6]对每个变异进行分类。序列变异使用人类基因组变异学会(Human Genome Variation Society, HGVS)制订的变异位点命名规则命名。最终纳入报告的变异位点包括致病变异、可能致病变异和意义未明变异,不包括良性变异和可能良性变异。

检测结果解读:基于患儿的临床表型,按照复旦大学附属儿科医院高通量测序数据分析流程^[7-8],选用人类表型标准术语(Human Phenotype Ontology, HPO)和/或OMIM术语筛选候选致病基因。按照变异与临床表型相关性将候选致病基因变异分为与临床表型相关变异、与部分临床表型相关变异及与临床表型无关变异。对检测报告中的基因变异位点及父母相关基因位点进行Sanger测序明确变异来源。经Sanger测序验证,患儿存在符合变异遗传方式并且与临床表型相关的变异,则诊断为单基因遗传病。如患儿存在符合变异遗传方式但与部分临床表型相关的变异,补充临床表型,若变异位点与全部表型相关,亦诊断为单基因遗传病,计算单基因遗传病的分子诊断阳性率。单基因遗传病分子诊断阳性率=诊断单基因遗传病患儿数/送检标本数×100%。

2 结果

2.1 一般情况

共纳入新生儿45例,其中男22例(49%),女23例(51%),发病日龄为2.0(1.0, 14.5)d。最终确诊单基因遗传病患儿12例,其中男6例,女6例,确诊日龄为31.5(28.3, 37.5)d。送检患儿单基因遗传病的分子诊断阳性率为27%(12/45)。

2.2 确诊单基因遗传病患儿的临床资料

12例确诊单基因遗传病患儿中,主要临床诊断中存在神经肌肉系统疾病的有5例(16N02、16N03、17N18、17N21、18N01);存在内分泌和代谢系统疾病的有5例(17N02、17N05、17N21、17N22、18N03);存在消化系统疾病的有3例(17N16、18N04、18N10);存在呼吸系统疾病

的有 3 例 (17N18、18N01、18N04)；存在心血管系统疾病的有 2 例 (16N02、18N01)。

在变异与临床相关性关系的分析中，与临床表型相关变异有 7 例 (16N02、16N03、17N05、17N21、17N22、18N01、18N10)，占 58% (7/12)；与部分临床表型相关变异有 5 例 (17N02、17N16、17N18、18N03、18N04)，占 42% (5/12)。对与部分临床表型相关变异的 5 例患儿，再次进行临床表型补充与分析，结合 WES 结果，最终确诊为单基因遗传病。所有确诊病例经临床治疗后好转 8 例 (16N03、17N02、17N05、17N16、

17N21、17N22、18N03、18N10)，治疗好转率为 67% (8/12)。

2.3 确诊单基因遗传病患儿的基因突变信息

12 例确诊单基因遗传病患儿中，常染色体隐性遗传病 9 例 (75%)，常染色体显性遗传病 2 例 (17%)，X-连锁隐性遗传病 1 例 (8%)。在发现的 20 个基因突变位点中，明确为致病变异的有 14 个 (70%)，可能致病变异的有 5 个 (25%)，意义未明变异的有 1 个 (5%)，其中，致病变异和可能致病变异占 95% (19/20)。见表 1。

表 1 12 例确诊单基因遗传病患儿的基因突变信息及相关疾病名称

编号	基因	基因突变信息	ACMG 致病性分级	合子类型	变异与临床相关性	遗传模式	疾病名称
16N02	NEB	exon120:c.188800T>C exon54:c.7342C>T	致病变异 致病变异	Het Het	与临床表型相关	AR	杆状体肌病
16N03	KCNQ2	exon3:c.1229del	致病变异	Het	与临床表型相关	AD	良性家族性新生儿惊厥
17N02	PAH	exon6:c.442-1G>A exon7:c.728G>A	致病变异 致病变异	Het Het	与部分临床表型相关	AR	苯丙酮尿症
17N05	MUT	exon3:c.729_730insTT exon9:c.1663G>A	致病变异 致病变异	Het Het	与临床表型相关	AR	甲基丙二酸血症 Mut 型
17N16	SLC25A13	exon17:c.1814G>A exon8:c.790G>A	可能致病变异 致病变异	Het Het	与部分临床表型相关	AR	Citrin 蛋白缺乏所致新生儿肝内胆汁淤积症
17N18	SMARCB1	exon2:c.110G>A	可能致病变异	Het	与部分临床表型相关	AD	Coffin-Siris 综合征
17N21	MMACHC	exon4:c.567dupT exon4:c.656_658del	致病变异 可能致病变异	Het Het	与临床表型相关	AR	甲基丙二酸血症 chlC 型
17N22	MTHFR	exon6:c.1004G>A exon9:c.1408G>T	可能致病变异 致病变异	Het Het	与临床表型相关	AR	亚甲基四氢叶酸还原酶缺乏性同型半胱氨酸血症
18N01	GNPTAB	exon4:c.88_89delAC	可能致病变异	Hom	与临床表型相关	AR	粘脂贮积症
18N03	MCCC1	exon10:c.980C>A exon8:c.863_865delAGG	致病变异 致病变异	Het Het	与部分临床表型相关	AR	3-甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶缺乏症
18N04	ADA	exon8:c.778G>A exon8:c.704G>A	意义未明变异 致病变异	Het Het	与部分临床表型相关	AR	部分腺苷脱氨酶缺乏症
18N10	FLNA	exon47:c.7917_7918delCT	致病变异	Hemi	与临床表型相关	XR	先天性短肠综合征 / 慢性假性肠梗阻

注：[Het] 杂合子；[Hom] 纯合子；[Hemi] 半合子；[AR] 常染色体隐性遗传；[AD] 常染色体显性遗传；[XR] X-连锁隐性遗传。

3 讨论

人类基因组图谱的完成和新一代高通量测序技术的出现，为疾病病因的研究提供了全新的思路^[9]。人类基因组外显子区域只占全基因组序列的 1%，但人类 85% 的致病基因变异位于外显子区^[10]。WES 技术一次性对全外显子组进行序列分析，为寻找疾病的致病基因和易感基因提供了一种全新

研究方法，并在疑难或复杂性疾病和疑难危重症的研究中有明显优势^[11]。

近年来，越来越多的研究表明，WES 开始在单基因疾病诊断中显现其独特的价值^[12]。Meng^[13]等通过 WES 确诊了 102 例单基因遗传病患儿，分子诊断阳性率为 36.7%。本研究中，单基因病的临床诊断率为 27%，低于文献报道的分子诊断阳性率，可能与本文纳入的研究病例较少有关。因此，

在危重症新生儿中开展 WES 检查对临床诊疗工作具有重要意义。

新生儿期很多出生缺陷相关遗传综合征的诊断存在困难。一方面,这些综合征在新生儿期临床症状不典型^[4]。本研究所纳入新生儿中也存在临床症状多样性及不典型的特点,最常见的神经肌肉、内分泌和代谢系统疾病也仅各占 11% (5/45),这往往需要基因检测结果支持临床诊断。另一方面,这些新生儿期疾病(如代谢性疾病)进展迅速,需要依靠快速、准确的检测方法对所有可能的致病基因进行检测,而目前常规的基因检测技术不能满足临床需求。WES 对于临床不能诊断的、需要快速明确病因的严重疾病,可以在最短的时间内找到病因^[14]。而对于可以治疗的疾病,早期诊断对改善预后具有至关重要的意义^[13]。本研究所有确诊患儿中位确诊日龄为 31.5 d,而治疗好转率达到 67%,很好的验证了 WES 这一优点。

WES 数据解读非常复杂,相关疾病致病突变的鉴定仍是一个持续的挑战^[8]。WES 检测结果未提示表型和基因型之间的联系,并不代表患儿无遗传性疾病,这可能与 WES 技术方面的限制(对结构变异与非编码区变异的研究局限性等)、基因与疾病之间的关联是否明确、表观遗传、多基因疾病或非遗传因素有关。但另外一个主要原因则是报告解读者对患儿表型没有充分理解与利用,或者临床医生未完整提供临床表型。以色列 Raphael Recanati 遗传研究所对疑似遗传病患者的 WES 检测结果进行了重新分析^[15],15.5% 的患者获得了新的遗传病诊断,其中大部分是因为结果解读者对临床表型认识不足或患者出现了新的临床症状而漏诊。本研究确诊的遗传病患儿中,在变异与临床相关性分析中,与部分临床表型相关变异占 42% (5/12),而对患儿临床表型再次进行补充与分析,结合 WES 检测结果,这些患儿亦诊断为单基因遗传病。因此,WES 技术数据结果的解读除了需有经验的专业遗传工作人员进行分析外,还需要临床医生结合患儿的临床症状综合分析,才能发现表型和基因型之间的联系。

总之,WES 的应用给新生儿危重、疑难疾病诊疗带来了全新思路,进一步扩展了人们对疾病谱的认知度。如果能对新生儿期遗传病进行早期明确诊断,可以指导临床治疗及判断预后,有效

降低伤残率和病死率;而对于尚无有效治疗方法的遗传病,可针对可能出现的并发症进行规范化的治疗、改善预后,并可以为遗传咨询、产前诊断提供依据,为家庭的优生、优育提供更好的指导。

[参 考 文 献]

- [1] 孙丽雅,邢清和,贺林.中国出生缺陷遗传学研究的回顾与展望[J].遗传,2018,40(10):800-813.
- [2] 王慧君,周文浩.精准医疗时代新生儿遗传病临床干预面临的机遇与挑战[J].中华儿科杂志,2018,56(4):244-246.
- [3] 吴怡,程蔚蔚.出生缺陷概况及产前筛查[J].中国计划生育和妇产科,2016,8(1):29-33,52.
- [4] Smith LD, Willig LK, Kingsmore SF. Whole-exome sequencing and whole-genome sequencing in critically ill neonates suspected to have single-gene disorders[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015, 6(2): a023168.
- [5] 中华医学会急诊学分会儿科学组,中华医学会儿科学分会急诊学组、新生儿学组.新生儿危重病例评分法(草案)[J].中华儿科杂志,2001,39(1):42-43.
- [6] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. 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[J]. Genet Med, 2015, 17(5): 405-424.
- [7] 黎籽秀,刘博,徐凌丽,等.高通量测序数据分析和临床诊断流程的解读[J].中国循证儿科杂志,2015,10(1):19-24.
- [8] 杨琳,董欣然,彭小敏,等.复旦大学附属儿科医院高通量测序数据分析流程(第二版)对遗传疾病候选变异基因筛选用时和准确性分析[J].中国循证儿科杂志,2018,13(2):118-123.
- [9] 姜烈君,陆晓旭,黄华艺.下一代测序技术的临床应用规范化问题—参考美国医学遗传学与基因组学会行业标准[J].分子诊断与治疗杂志,2016,8(4):217-221.
- [10] Choi M, Scholl UI, Ji W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(45): 19096-19101.
- [11] 饶书权,杜廷福,许琪.外显子组测序在人类疾病中的应用[J].遗传,2014,36(11):1077-1086.
- [12] Wright CF, FitzPatrick DR, Firth HV. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children[J]. Nat Rev Genet, 2018, 19(5): 253-268.
- [13] Meng L, Pammi M, Saronwala A, et al. Use of exome sequencing for infants in intensive care units: ascertainment of severe single-gene disorders and effect on medical management[J]. JAMA Pediatr, 2017, 171(12): e173438.
- [14] Miller NA, Farrow EG, Gibson M, et al. A 26-hour system of highly sensitive whole genome sequencing for emergency management of genetic diseases[J]. Genome Med, 2015, 7: 100.
- [15] Salmon LB, Orenstein N, Markus-Bustani K, et al. Improved diagnostics by exome sequencing following raw data reevaluation by clinical geneticists involved in the medical care of the individuals tested[J]. Genet Med, 2019, 21(6): 1443-1451.

(本文编辑:王颖)