



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.11.005

<http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.11.005>

· 综述与讲座 ·

疑难肝病的基因诊断

库尔班江·阿布都西库尔 王建设

[关键词] 肝病; 基因诊断

随着人民生活水平的改善、病毒性肝炎预防及诊治水平的提高,感染性肝病的发病率逐年下降。近年来生物科技的迅速发展,越来越多的肝病分子生物基础得以明确,遗传性肝病已成为肝病常见的病因之一^[1]。1989 年囊性纤维化致病基因(CFTR)的发现开启了肝病分子机制研究的新篇章。上世纪 90 年代相继发现了高胆红素血症(UGT1A1 及 ABCC2)、肝豆状核变性(ATP7B)、血色病(HFE)、Alagille 综合征(JAG1)及进行性家族性肝内胆胆汁淤积症(ATP8B1、ABCB11 及 ABCB4)等致病基因^[2]。基因诊断技术在过去的 30 年见证了肝病分子机制的巨大突破。近年来国内基因诊断技术快速普及,越来越多的重症或疑难肝病患者不但得以确诊,也受益于针对病因的有效治疗措施。本课题组先后在国内首次报道多种进行性家族性肝内胆胆汁淤积症(PFIC)^[3-5]、Alagille 综合征^[6]及胆汁酸合成缺陷^[7-8]。2017 年及 2020 年先后首次在国际上报道 MYO5B、USP53 及 ZFYVE19 等新基因引起的遗传性肝病^[9-11]。此外,本课题组在国内首次报道了其他罕见遗传性肝病的新突变或新表型^[12-19]。本文将阐述肝病基因诊断的意义、肝病基因诊断思路及将来面临的挑战。

一、肝病基因诊断的意义

1. 基因诊断可帮助理解肝病的发病机制

1993 年及 1996 年分别克隆出了肝豆状核变性(Wilson 病)和遗传性血色病致病基因,并明确两者为单基因肝病。ATP7B 基因功能研究发现其金属结合区域与原核细胞重金属转运体类似,从而进一步研究得知铜转运在 Wilson 病发病机制中的重要作用。同样,血色病相关基因(HFE、SLC40A1、TFR2、HAMP 及 HJV)的发现及功能研究不仅为了解肝脏铁代谢及调

控奠定了扎实的基础,亦明确了相关基因突变导致血色病的病理生理机制。肝病第一次全基因组关联研究(GWAS)是针对胆结石进行的,ABCG5 及 ABCG8 基因是重要易感基因,后续关于自身免疫性肝病的 GWAS 研究发现数十个与原发性胆汁性肝硬化(PBC)、原发性硬化性胆管炎(PSC)及自身免疫性肝炎(AIH)相关的基因位点。多数基因位点与其他自身免疫性或免疫介导的疾病相关位点重合,提示自身免疫性肝病可能仅仅是自身免疫性疾病的肝脏表现。高危基因位点与主要组织相容性抗原(MHC)关系密切,提示 PBC、PSC 及 AIH 的病理生理机制与后天性或适应性免疫反应相关。然而,基因突变对自身免疫性肝病的贡献不足 10%,50% 以上的易感性可能来自环境因素。近年来,全外显子组测序(WES)技术成功应用于发现不明原因儿童肝衰竭等疑难肝病基因基础。也有之前未曾怀疑线粒体肝病的肝衰竭患儿检查 WES 后发现 MPV17 及 SERAC1 等基因突变。近期研究结果表明部分胆管受累及肝细胞脂肪变性的肝病与先天性糖基化障碍有关,提示糖基化异常可导致胆管发育异常及肝细胞能量代谢障碍^[20]。

2. 基因诊断可明确肝病亚型

50 年前报道的 Byler 病表现为严重程度不一的肝病,可表现为婴儿期发病的进行性家族性肝内胆胆汁淤积症(PFIC),在成人期前可以发展为肝纤维化或终末期肝病。在过去 20 年的基础研究中相继发现并克隆出了负责肝细胞顶端膜摄取、毛细胆管膜分泌胆汁酸及其他物质的转运蛋白。目前已知的 PFIC 亚型有 PFIC-1 型(ATP8B1 缺陷病)、PFIC-2 型(ABCB11 缺陷病)、PFIC-3 型(ABCB4 缺陷病)、PFIC-4 型(TJP2 缺陷病)、PFIC-5 型(NR1H4 缺陷病)及 PFIC-6 型(MYO5B 缺陷病)。本课题组不仅在国内首次报道 PFIC-1 型^[3]、PFIC-2 型^[4]及 PFIC-3 型^[5],在国际上首次发现的 MYO5B^[9]、USP53^[10]及 ZFYVE19^[11]等为婴儿胆汁淤积症致病的基因。同样以直接胆红素升高为主的高

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81873543)

作者单位:201102 上海,复旦大学附属儿科医院肝病科

通讯作者:王建设, E-mail: jshwang@shmu.edu.cn

胆红素血症可以通过基因诊断分为 ABCB2 基因突变导致的 Dubin-Johnson 综合征及 SLC01B1/SLC01B3 双基因突变引起的 Rotor 综合征。以间接胆红素升高为主的高胆红素血症通过临床表型及 UGT1A1 基因突变类型可分为 Gilbert 综合征、Crigler-Najjar 综合征 2 型及 Crigler-Najjar 综合征 1 型^[21]。Alagille 综合征可分为 JAG1 基因突变引起的 1 型及 NOTCH2 基因突变引起的 2 型。

3. 基因诊断可帮助肝病分类

脂肪肝通常是因饮酒或肥胖引起,化疗及其他药物也可引起脂肪肝。仅 10% ~ 20% 的饮酒或肥胖人群会出现严重脂肪肝、严重肝纤维化或肝硬化。GWAS 发现 PNPLA3 基因 p. I148M 变异与非酒精性脂肪性肝炎(NASH)风险相关,也会增加酒精性脂肪性肝病的严重程度。p. I148M 变异在欧洲人群中频率较高(21% ~ 28%),该位点的变异会增加 3 倍的 NASH 患病风险,增加 12 倍的肝癌患病风险。科学家们建议携带 PNPLA3 基因变异的 NASH 患者进一步分类为 PNPLA3 相关脂肪性肝炎(PASH),加强生活方式及饮食方面的干预,提前预防病情加重。目前已知近 200 个基因与纤毛功能异常有关,常表现为先天性肝纤维化(肝功能正常的门脉高压症)、胆管扩张、肝囊肿或慢性胆汁淤积性肝硬化,可合并肾囊肿、慢性肾功能不全、慢性肺病、不孕症、脑积水、听力异常及视网膜病变。这类疾病由胆管板发育不良导致,统称为纤毛病(又称肝肾纤维囊性病或胆管板发育不良),治疗原则为利胆治疗^[22]。

4. 基因诊断可帮助肝病治疗

GWAS 研究发现编码干扰素 $\lambda 3$ 的 IL28B 基因变异与慢性丙型肝炎患者干扰素治疗应答相关。IL28B 及 IL29 基因变异不仅与丙型肝炎病毒(HCV)感染自愈相关,也决定了病毒性肝炎的严重程度。与 NASH 危险因素相关的 PNPLA3 及 TM6SF2 等基因也与影响心血管疾病风险相关。关于阿莫西林克拉维酸钾相关的特发性药物性肝损伤(DILI)的 GWAS 研究发现人类白细胞抗原(HLA)相关区域与 DILI 发病有关,提示人体对药物本身、药物代谢产物或药物诱导的抗原会产生免疫反应,早期糖皮质激素治疗可能有效阻断肝病进展。基因确诊后的肝病患者接受针对病因的治疗可延缓病情进展或逆转肝脏病变,大大改善了患者预后及生存质量,如胆汁淤积症利胆及补充脂溶性维生素治疗、胆汁酸合成缺陷补充初级胆汁酸、肝豆状核变性排铜、遗传性血色病排铁或放血、肝糖原累积病饮食治疗等。随着生物技术的发展,针对特定基因或特定突变类型的治疗措施可能会逐渐成为现实,如

影响蛋白折叠的错义突变可通过分子伴侣治疗改善蛋白功能^[23]、终止码突变使用小分子“readthrough”治疗可能会达到基因继续翻译的目的^[24]。

二、肝病的基因诊断思路

1. 肝病的临床表现可作为基因诊断的重要线索

肝病的临床表现多样,包括转氨酶升高、高胆红素血症、胆汁淤积症、肝功能衰竭、肝肿大、肝硬化、肝纤维化、门脉高压、低蛋白血症、腹腔积液、凝血功能异常、瘙痒及肝脏肿瘤等,也可有肝外器官系统受累。以胆汁淤积症为主要表现的患者根据谷氨酰转肽酶(GGT)水平高低分别筛查低 GGT 胆汁淤积症相关 PFIC-1、2、4、5、6 型等相关基因及高 GGT 相关 PFIC-3 型基因。以转氨酶升高、肝肿大及低血糖为主要表现的肝病患者应首选排查糖原累积病相关基因。婴幼儿期急性或反复发热相关肝功能衰竭患者应排查 NBAS、RINT1 及 SCYL1 等基因。以肝脾肿大、神经系统及肺部疾病为主要表现的患者应排查溶酶体病相关基因^[25]。

2. 肝病基因诊断对象的选择

所有不明原因肝病及肝胆受累的多系统疾病患者,除外感染、免疫、药物及解剖异常等因素后应排查遗传性肝病可能。临床已确诊非遗传性肝病但治疗效果不如预期或出现不明原因的并发症者也应考虑尽早进行基因诊断,排查潜在或合并存在的基因异常^[1]。

3. 肝病基因诊断方法的选择

(1)单基因 Sanger 测序:适用于明确怀疑单基因突变的肝病患者,如肝豆状核变性、Alagille 综合征、Citrin 缺陷病及高胆红素血症等,也适用于高通量测序发现的基因突变位点的验证;(2)多基因芯片(Panel)测序:适用于怀疑牵涉多个基因的某个代谢通路功能障碍引起的肝病患者,如糖原累积病、血色病、胆汁淤积症及胆汁酸合成障碍等;(3)WES:适用于明确怀疑遗传性肝病、但未能通过单基因或多基因芯片等测序方法找到致病基因的患者;(4)全基因组测序(WGS):适用于 WES 检查未能确诊、怀疑内含子区突变或结构性变异导致肝病的患者;(5)线粒体基因测序:适用于怀疑线粒体肝病但 WES 或 Panel 测序未能找到影响线粒体功能的核基因突变患者;(6)单基因或全基因组拷贝数变异:适用于怀疑特定基因或染色体片段拷贝数变异导致的肝病患者;(7)快速 WES 或 WGS 检查:可在数天内筛查遗传性疾病,能够帮助指导急危重患者得到及时有效的诊治。随着二代基因测序成本下降,既往单基因 Sanger 测序已被肝病相关多基因靶向测序所替代。相信在不久的将来,WES 及 WGS 可能

成为遗传性肝病常规筛查手段。

4. 正确解读基因报告

应由熟悉患者临床表现、发生突变的基因及基因突变性质的遗传性肝病专科医生解读基因报告。判断基因变异的致病性应遵循美国遗传学及基因组学学院 (ACMG) 相关指南^[26], 务必结合患者临床表型综合判断。基因检查发现意义不明变异 (VUS) 的致病性判断, 需要依靠代谢组学测定明确对应的代谢异常、酶活性测定判断蛋白功能改变或检测特异性生化标志物。如胆汁酸合成障碍需要检查胆汁酸谱、氨基酸、脂肪酸及有机酸代谢障碍需检查血串联质谱及测定尿有机酸谱、溶酶体病、NGLY1 缺陷病酶活性、糖基化障碍糖组学等。确诊或排除遗传性肝病需要在临床表型、基因型、生化标志物及功能研究方面有充分的依据。

三、肝病基因诊断面临的挑战及机遇

基因诊断数据量庞大, 筛查并判断众多可疑致病突变与临床表型的相关性需要较长时间及大量的功能验证工作。近期发现的众多疾病相关基因仍缺乏针对性治疗措施, 明确分子机制后仍需要建立细胞模型及动物模型以寻找有效药物或其他干预措施。最终有效治疗措施经过人体试验验证并普及到所有受累患者需要大量的时间、人工及经济成本。

虽然基因诊断已成功应用于单基因或双基因肝病的诊治, 部分复杂或疑难肝病仍无法明确其分子机制, 考虑可能为环境因素与多基因代谢通路相互作用所致。WGS 的优点在于覆盖了整个基因组序列, 标本处理更加简便、测序数据准确性更高、基因确诊率更高。但 WGS 发现的变异更多, 数据分析难度更大, 有时无法辨别独立致病的变异、参与致病的变异及决定疗效的变异。虽然不是所有发现的变异均有临床应用价值, 但随着临床表型及基因型数据库的不断完善, 肝病个体化医疗很可能在不久的将来成为现实。

参 考 文 献

- [1] 库尔班江·阿布都西库尔, 丘倚灵, 王建设. 重视遗传性肝病诊治[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26(12): 881-884.
- [2] Karlsten TH, Lammert F, Thompson RJ. Genetics of liver disease: From pathophysiology to clinical practice[J]. J Hepatol, 2015, 62(1 Suppl): S6-S14.
- [3] Liu LY, Wang XH, Wang ZL, et al. Characterization of ATP8B1 gene mutations and a hot-linked mutation found in Chinese children with progressive intrahepatic cholestasis and low GGT[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2010, 50(2): 179-183.
- [4] Liu LY, Wang ZL, Wang XH, et al. ABCB11 gene mutations in Chinese children with progressive intrahepatic cholestasis and low gamma glutamyltransferase[J]. Liver Int, 2010, 30(6): 809-815.
- [5] Fang LJ, Wang XH, Knisely AS, et al. Chinese children with chronic intrahepatic cholestasis and high γ -glutamyl transpeptidase: clinical features and association with ABCB4 mutations[J]. J Pediatr

- Gastroenterol Nutr, 2012, 55(2): 150-156.
- [6] 王建设, 王晓红, 王中林, 等. Alagille 综合征五例临床和病理特点[J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(4): 308-309.
- [7] 杨天娇, 谢新宝, 姚玮蕾, 等. β -羟基- Δ 5-C27-类固醇脱氢酶缺陷一例分析及文献复习[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(8): 625-629.
- [8] Zhao J, Fang LJ, Setchell KD, et al. Primary Δ 4-3-oxosteroid β -reductase deficiency: two cases in China[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(47): 7113-7117.
- [9] Qiu YL, Gong JY, Feng JY, et al. Defects in myosin VB are associated with a spectrum of previously undiagnosed low γ -glutamyltransferase cholestasis[J]. Hepatology, 2017, 65(5): 1655-1669.
- [10] Zhang J, Yang Y, Gong JY, et al. Low-GGT intrahepatic cholestasis associated with biallelic USP53 variants: Clinical, histological and ultrastructural characterization[J]. Liver Int, 2020, 40(5): 1142-1150.
- [11] Luan W, Hao CZ, Li JQ, et al. Biallelic loss-of-function ZFYVE19 mutations are associated with congenital hepatic fibrosis, sclerosing cholangiopathy and high-GGT cholestasis[J]. J Med Genet, 2020: jmedgenet-2019-106706.
- [12] Li JQ, Qiu YL, Gong JY, et al. Novel NBAS mutations and fever-related recurrent acute liver failure in Chinese children: a retrospective study[J]. BMC Gastroenterol, 2017, 17(1): 77.
- [13] Li LT, Zhao J, Chen R, et al. Two novel VPS33B mutations in a patient with arthrogryposis, renal dysfunction and cholestasis syndrome in mainland China[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(1): 326-329.
- [14] Gong JY, Setchell KDR, Zhao J, et al. Severe Neonatal Cholestasis in Cerebrotendinous Xanthomatosis: Genetics, Immunostaining, Mass Spectrometry[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2017, 65(5): 561-568.
- [15] 黎佳琪, 陆怡, 丘倚灵, 等. DCDC2 基因变异致新生儿硬化性胆管炎二例并文献复习[J]. 中华儿科杂志, 2018, 56(8): 623-627.
- [16] Li JQ, Xie XB, Feng JY, et al. A novel homozygous mutation in the glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 gene in a Chinese patient with transient infantile hypertriglyceridemia: a case report[J]. BMC Gastroenterol, 2018, 18(1): 96.
- [17] Zhang MH, Knisely AS, Wang NL, et al. Fibrinogen storage disease in a Chinese boy with de novo fibrinogen Aguadilla mutation: Incomplete response to carbamazepine and ursodeoxycholic acid[J]. BMC Gastroenterol, 2016, 16(1): 92.
- [18] Abuduxikuer K, Feng JY, Lu Y, et al. Novel methionyl-tRNA synthetase gene variants/phenotypes in interstitial lung and liver disease: a case report and review of the literature[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(36): 4208-4216.
- [19] Abuduxikuer K, Li ZD, Xie XB, et al. Novel Melanocortin 2 Receptor Variant in a Chinese Infant With Familial Glucocorticoid Deficiency Type 1, Case Report and Review of Literature[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 359.
- [20] 库尔班江·阿布都西库尔, 王建设. 先天性糖基化障碍与肝脏疾病[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(8): 1684-1689.
- [21] Abuduxikuer K, Fang LJ, Li LT, et al. UGT1A1 genotypes and unconjugated hyperbilirubinemia phenotypes in post-neonatal Chinese children: A retrospective analysis and quantitative correlation[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(49): e13576.
- [22] Reiter JF, Leroux MR. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(9): 533-547.
- [23] Tran ML, G  nissou Y, Ballereau S, et al. Second-Generation Pharmacological Chaperones: Beyond Inhibitors[J]. Molecules, 2020, 25(14): 3145.
- [24] Friesen WJ, Johnson B, Sierra J, et al. The minor gentamicin complex component, X2, is a potent premature stop codon readthrough molecule with therapeutic potential[J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0206158.
- [25] 库尔班江·阿布都西库尔, 王建设. 遗传性肝病之“百变面孔”[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(8): 1657-1662.
- [26] 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.

(收稿日期: 2020-09-16)

(本文编辑: 余晓曼)