

综述

基因检测在肥厚型心肌病诊断、治疗及预后评估的应用进展

翟姗姗综述, 樊朝美审校

摘要 肥厚型心肌病(HCM)是由编码心肌小节蛋白的基因突变所导致的最常见的遗传性心脏病,其主要特点为无继发原因的左心室肥厚,发病率大约 1/500,亦是青少年和运动员心源性猝死(SCD)的最常见原因。随着二代测序技术在 HCM 疾病相关领域的广泛应用,基因检测在疾病早期诊断、治疗及预后方面的作用日益显著,本文分别从基因检测技术的进展及该进展在诊断与鉴别诊断、探讨异质性机制、开展新型药物、评估不同预后及优生优育等各方面进行阐述。

关键词 综述; 心肌病, 肥厚型; 基因

肥厚型心肌病(HCM)是指并非完全因心脏负荷异常引起的,以室壁厚度增加为表现的遗传性心脏病^[1],亦是青少年及运动员心源性猝死(SCD)的主要原因,尽早诊断、治疗尤为重要。基因检测有助于 HCM 的早期诊断,但一代测序技术的低检出率及高成本限制了其在临床中的应用,近年来二代测序技术(NGS)的广泛应用弥补了一代测序技术的不足。本文就基因检测在 HCM 诊断、治疗及预后评估的应用进展做一综述。

1 基因检测技术的进展

传统的化学降解法、双脱氧链终止法以及在它们的基础上发展来的各种 DNA 测序技术统称为第一代 DNA 测序技术,因其成本高、速度慢以及序列少等缺点,已不能满足深度测序和重复测序等大规模基因组测序的需求。所以,以高通量为特点的 NGS 应运而生,不再需要大肠杆菌进行体内扩增,而是直接通过聚合酶或者连接酶进行体外合成测序,可快速并低成本地获得大规模 DNA 序列信息。NGS 主要分为三类:(1)靶向基因测序(Target-NGS)是对特定疾病的所有已知致病基因进行测序,主要用于诊断;(2)全外显子测序(WES)是对基因所有编码区进行测序,多在 Target-NGS 无法测得突变时,用于明确可疑遗传性疾病的致病突变;(3)全基因组测序(WGS)是指对全基因组 30 亿 bp DNA 测序,包括编码区及非编码区,主要是用来明确新发致病基因与疾病的关系^[2]。

值得注意的是,NGS 亦存在以下不足:(1)高通量的实现以牺牲序列片段为代价,NGS 测序长度为 400 bp,小于一代测序的 1000 bp,NGS 序列长度的减少使得基因组或转录组的后续拼接较一代测序差,致其错误率偏高,故目前 NGS 测序后的结果仍需应用一代测序如 Sanger 法验证;(2)NGS 采用体外扩增的办法,样品处理须经过多重步骤,步骤的增加引入各种误差,可能导致假阳性率较高;(3)NGS 所得的海量数据是科研工作者面对的更大的挑战,如何充分挖掘隐藏在原始数据中的生物学意义并解释相应生物学现象是一大难

题,如肌联蛋白这一基因突变的 HCM 致病性较难分辨确认,因为约有 3% 的正常人可能携带该基因突变^[3]。

综上所述,鉴于 NGS 测序步骤及结果的复杂性,建议心脏病学家、基因遗传学家及基因咨询学家等多学科共同合作分析、解释测序结果并向患者及其家属提供适当建议^[3]。

2 基因检测在 HCM 诊断与鉴别诊断中的作用

HCM 基因检测最初仅限于实验室研究,现在主要用于 HCM 的诊断与鉴别诊断^[4]。随着 NGS 在 HCM 中的广泛应用,不仅能够检出罕见的肌节蛋白突变及非肌节蛋白突变^[5],还能够发现大片段 DNA 的拷贝数变异(CNV)、倒位(inversion)和平衡易位(balanced translocation)等结构变异(SV),以及表观遗传学中 DNA 甲基化水平和组蛋白修饰因子的改变,探讨这些结果的临床意义将有助于解释 HCM 的异质性及预后。NGS 还可检出非 HCM 致病突变如桥粒蛋白突变、离子通道蛋白突变,另外 NGS 亦可检出拟表型基因突变。如,Fabry 病的 α 半乳糖苷酶基因(GLA)突变,这有助于 HCM 的鉴别诊断。

3 基因检测有助于解释 HCM 的异质性

HCM 异质性突出是临床面临的重大挑战。HCM 患者可无症状,也可早期发生 SCD,有研究表明这种异质性可能受以下因素的影响:(1)致病基因不同;(2)致病突变所累及氨基酸位置不同;(3)修饰因子的影响。

HCM 的致病基因突变可能与心室形态结构相关:早期研究提示 HCM 的室间隔呈反向曲线形者较乙状形者的突变阳性率更高(79% vs 8%)。Bos 等^[6]发现其原因在于反向曲线形肥厚的 HCM 患者多为肌节蛋白基因突变所致,乙状形肥厚的 HCM 患者多为 Z 盘基因突变所致,而最初应用一代测序的基因仅包括肌节蛋白基因并无 Z 盘基因,所以出现反向曲线形者突变阳性率高这一结论。Lopes 等^[7]发现细胞膜锚蛋白基因(ANK2)突变的 HCM 患者,其最大室间隔厚度较其他基因型明显增加。最近的 HCM 基因型与心脏磁共振成像对

基金项目:“重大新药创制”科技重大专项-《心血管创新药物临床研究技术平台建设》(2012ZX09303-008-001);2010 年国家临床重点专科建设项目-《卫生部重点实验室项目》

作者单位:100037 北京市,中国医学科学院 北京协和医学院 国家心血管病中心 阜外医院 卫生部心血管药物临床研究重点实验室
作者简介:翟姗姗 博士 主要从事肥厚型心肌病相关研究 Email:shan02shan09@163.com 通讯作者:樊朝美 Email:fred_fan2004@aliyun.com
中图分类号:R54 文献标识码:A 文章编号:1000-3614(2016)11-1136-03 doi:10.3969/j.issn.1000-3614.2016.11.021

照研究表明,局灶性心肌纤维化在基因型阳性者中较阴性者多见,而弥漫性心肌纤维化在基因型阴性者中较基因阳性者多见^[8]。以上研究初步提示,特定的基因突变与 HCM 心室形态结构可能有相关性。

HCM 与其他遗传性心肌病的致病基因突变重叠和并存: Haas 等^[9]应用 Target-NGS 发现扩张型心肌病(DCM)、HCM、离子通道心肌病等致病突变的重叠比例较高。Schaefer 等^[10]对一个 6 个月大小猝死的左心室致密化不全患者进行 NGS 测序分析,发现其携带肌球蛋白结合蛋白 C (MYBPC3) 双复合突变 (Lys505del、Pro955fs)。此外,亦有研究发现,同一个家系中同时存在两种以上遗传性心肌病的致病基因突变,如 Wang 等^[11]对一 HCM 合并长 QT 综合征 (LQT) 的家系进行基因检测,发现该家系同时存在 LQT1 与 HCM 致病突变。对 SCD 高危人群的基因型进行分析,发现其多突变比例较多^[12]。随着 NGS 在临床中的进一步应用,有可能发现更多不同心肌病之间致病基因的重叠以及并存的现象,这有可能是遗传性心脏病异质性显著的一个重要原因。

目前关于基因型-表型的关系仍无定论,相信大样本多中心 HCM 基因型随访研究的开展,将有助于揭示基因型-表型的关系。

4 基因检测在 HCM 治疗中的作用

4.1 药物治疗的新视点

药物、酒精消融术及手术治疗可以改善 HCM 患者的症状并提高生活质量。但并不能够逆转已病变的心肌,亦不能改善 HCM 患者的长期预后。针对以上问题,新开展了一些药物的探索性动物研究,并发现氯沙坦、辛伐他汀、螺内酯以及抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸等可以减轻 HCM 小鼠心肌纤维化程度和减少胶原成分,而以上小鼠均是某种特定 HCM 致病突变转基因所建立的动物模型。因此,将来基因检测结果可以指导特定致病基因突变的 HCM 治疗^[3]。亦有研究表明在 MYH7-Arg403Gln 或 MYH7-Arg719Trp 转基因小鼠发生左心室肥厚前,分别给予地尔硫卓、氯沙坦,可以减轻心肌纤维化程度并延缓左心室肥厚的进程^[3]。

现今, HCM 的早期干预临床研究相对较少,近期有人将 HCM 基因型阳性携带者随机分为地尔硫卓治疗组与安慰剂组,2 年后发现地尔硫卓治疗组左心室壁厚度及质量、舒张期充盈和心肌肌钙蛋白 I 水平均较安慰剂组有所改善^[13]。相信随着基因型阳性携带者的大规模随访队列研究的增多,将能明确 HCM 的早期干预是否有益。

4.2 组织工程和再生医学

HCM 新药的开发与设计受到两方面制约:(1) 缺少能够精准体现 HCM 病理生理的体外模型;(2) 业已建立的小鼠动物模型与人类基因组存在一定差异。所以,应用类似于正常心肌结构、生物力学的仿生成分和可分化为 HCM 心肌细胞的多能干细胞进行研究,不仅可以加深对 HCM 发病机制、基因型与表型相关性的理解,而且还可行特异突变 HCM 的药物研究,达到精准治疗目的^[14]。

心脏再生工程中成纤维细胞逆转为正常心肌细胞对于 HCM 的治疗尤为重要。如果在 HCM 发病早期就能够成功逆转左心室肥厚,就可以减少心肌纤维化、延缓病程、减少 SCD,尽管这种逆转可以实现,但其技术难度大、成功率低。纳米技术的出现将有效改进该逆转过程,它可携带包含逆转

所需 miRNA 和转录因子的载体靶向定位于 HCM 患者的成纤维细胞并促其逆转,从而达到治疗目的。此外,纳米技术凭借其高浓度、高选择性、高通透性、高联合性等四大优势,不仅可将特异药物运送到靶向细胞,还可运送特异的基因,可用于研究 HCM 特异基因致病机制及相应治疗方案。

5 基因检测在预后评估中的作用

5.1 基因检测可否确定良性与恶性突变

早期研究认为肌钙蛋白 T (TNNT2)、 β 肌球蛋白重链 (MYH7) 为“恶性突变”, MYBPC3 为“良性突变”,以上均为家族性 HCM 研究,随后大样本散发 HCM 研究发现上述结论并不成立。MYBPC3 与 MYH7 型 HCM 在发病年龄、室壁厚度、外科手术比例及猝死家族史等方面并无差异,随后 Page 等^[15]也发现 MYBPC3 并非均晚期发病、预后好,这类基因型的 HCM 临床表型仍存在极大异质性,故不能认为 MYBPC3 属于“良性突变”。TNNT2 基因型的大样本队列研究发现该突变患者的心血管死亡风险与正常人群无异,将其认为是“恶性突变”亦不合理^[16]。

尽管,某种特定致病基因与预后的明确相关性仍无定论,但大多数研究认为 HCM 基因型阳性者比基因型阴性者的预后差^[7],基因型阳性者发病年龄更早、更易发展为心力衰竭、SCD 家族史更为多见、非对称性左心室肥厚比例较多、左心室肥厚程度和心血管死亡风险更重。HCM 的良、恶性基因之分还存在很多争议,尚不能单纯依据基因测序来决定 HCM 的预后,仍需用传统临床危险分层指标来识别 SCD 高风险患者。

5.2 多突变与预后的关系

即使在没有传统 SCD 危险因素时,多突变 HCM 患者的恶性心律失常、SCD、左心室极度肥厚、终末期心力衰竭的发生率等心血管死亡风险均较单基因突变的 HCM 患者明显升高^[17]。随着 NGS 的应用, HCM 双突变率从一代测序技术所发现的 5% 上升到 38%, 三突变或更多突变达 12.8%^[9]。Girolami 等^[18]提出多突变 HCM 的临床表型加重为基因剂量效应所致,即两种或以上异常基因过度表达叠加产生的效应。但另有研究表明基因突变之间存在相互作用,双突变或多突变在 HCM 中的致病机制并非为单纯的剂量叠加,而是第二个突变与第一个突变相互作用从而加重表型^[19]。多突变引起表型加重的机制需在分子、细胞、动物实验中进一步分析,现已发现钙离子通道调节基因表达下调以及转录因子 STAT-3 的上调与双突变致病性加重相关^[12],这一发现对今后的研究将有极大帮助。

6 基因检测与家系筛查

先证者家系成员基因筛查的前提是先证者的致病突变已明确,值得注意的是,采用一代测序技术能够明确突变的先证者仅占 50%,而且其中很多突变致病性质未明。因此,仅有有限的先证者家系可以进行基因筛查。NGS 则可以显著提高 HCM 先证者致病突变检出率,并显著降低先证者家系基因筛查成本。现在基因筛查的主要应用目的为在家族性 HCM 的家系成员中筛查出基因型阴性的成员并告知其无发病可能,减少其心理负担和不必要的长期随访。但是, HCM 的“无罪宣告”需特别谨慎。同时必须向基因型阴性的成员告知如有不适,也需及时就诊。究其原因归为以下四点:(1) 既往认为无或不确定致病性的突变有可能为致病突变;(2) 先证者可

能为多突变,而使用一代测序技术的基因筛查仅进行单个突变的筛查,遗漏了第 2 个或第 3 个致病突变;(3)实验室等因素的人为错误;(4)原始突变,初期先证者并无突变,子代新生的原始突变。总之,HCM 家系成员基因筛查的应用看似容易,但其结果的解释与建议需要多学科合作方能最优化。

7 基因检测与优生优育

产前遗传诊断是指在妊娠初期对患者外周血、羊水及脐带血等进行基因检测,有助于早期发现胎儿是否携带致病基因,但是该方法除在检测时机、准确性、安全性诸多方面仍存在问题外,如何处理基因型阳性携带者还存在医学伦理问题。因为并非所有致病基因携带者在其一生中均会出现临床表型。产前遗传诊断在大部分国家非合法,其他手段如收养、人工授精、使用捐赠的配子以及胚胎植入前遗传学诊断(PGD)等有助于优生优育。其中,PGD 是一种用于阻断遗传性疾病的新兴技术,它是经体外受精或卵胞浆内单精子显微注射技术获得的多个受精卵,在体外培养至 8~10 细胞期的胚胎卵裂球时,移出 1~2 个卵裂球进行 PCR 或 FISH 检测,筛选掉其中携带致病突变的胚胎卵裂球,仅移植未携带致病突变的遗传型正常的胚胎。这种方法的优点是体外培养的达到 6~8 细胞期的卵裂球都被认为是全能的,1 个或 2 个卵裂球的移去不会影响胚胎的进一步发育。该技术不仅避免出生遗传性疾病胎儿,还可使因为遗传问题而不能生育的夫妇顺利生育健康婴儿,PGD 明显优于传统产前诊断方法。随着单细胞分子生物学检测手段的不断完善,对更多的遗传性疾病进行 PGD 已成为可能。近期 Kuliev 等^[20]对 9 组遗传性心脏病的夫妻行 PGD,明确了其在遗传性心脏病中应用的优势及安全性,尤其是对有青年 SCD、植入型心律转复除颤器(ICD)、室性心动过速、心脏移植等家族史的夫妻有很大帮助,达到遗传性心脏病的生殖阻断目的。

8 总结与展望

基因检测有助于 HCM 早期诊断,二代测序技术不仅能提高致病突变检出率与经济效益比值,还可发现新发的致病突变及突变形式,并进一步揭示基因型与表型的关联性。基因检测在评价 HCM 预后及优生优育方面亦有帮助,多突变有可能是 HCM 患者 SCD 危险因素之一。尽管心脏组织工程、再生医学、纳米技术处于起步阶段,但联合研究将有助于了解 HCM 的发病机制和开发新的药物。

参考文献

- [1] Elliott PM, Anastakis A. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 2014, 35: 2733-2779.
- [2] MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature*, 2014, 508: 469-476.
- [3] Ho CY. Genetics and clinical destiny: improving care in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 2010, 122: 2430-2440.
- [4] 崔宏丽,王东,冯新星,等.肥厚型心肌病致病基因型与临床表现的关系及基因筛查在肥厚型心肌病筛查及疾病鉴别诊断中的作用. *中国循环杂志*, 2015, 30: 149-153.
- [5] 李世杰,王继征,朱昌盛,等.非心肌特异肌小节相关基因在肥厚型心肌病患者中的表达研究. *中国循环杂志*, 2015, 30: 27-28.
- [6] Bos JM, Ommen SR, Ackerman MJ. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: one, two, or more diseases? *Curr Opin Cardiol*, 2007, 22: 193-199.
- [7] Lopes LR, Syrris P, Guttman OP, et al. Novel genotype-phenotype associations demonstrated by high-throughput sequencing in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart (British Cardiac Society)*, 2015, 101: 294-301.
- [8] Ellims AH, Iles LM, Ling LH, et al. A comprehensive evaluation of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy with cardiac magnetic resonance imaging: linking genotype with fibrotic phenotype. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2014, 15: 1108-1116.
- [9] Haas J, Frese KS, Peil B, et al. Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 2015, 36: 1123-1135.
- [10] Schaefer E, Helms P, Marcellin L, et al. Next-generation sequencing (NGS) as a fast molecular diagnosis tool for left ventricular noncompaction in an infant with compound mutations in the MYBPC3 gene. *Eur J Med Genet*, 2014, 57: 129-132.
- [11] Wang L, Zuo L, Hu J, et al. Dual LQT1 and HCM phenotypes associated with tetrad heterozygous mutations in KCNQ1, MYH7, MYLK2, and TMEM70 genes in a three-generation Chinese family. *Europace*, 2016, 18: 602-609.
- [12] Kelly M, Semsarian C. Multiple mutations in genetic cardiovascular disease: a marker of disease severity? *Circ Cardiovasc Genet*, 2009, 2: 182-190.
- [13] Ho CY, Lakdawala NK, Cirino AL, et al. Diltiazem treatment for pre-clinical hypertrophic cardiomyopathy sarcomere mutation carriers: a pilot randomized trial to modify disease expression. *JACC Heart Failure*, 2015, 3: 180-188.
- [14] Vunjak Novakovic G, Eschenhagen T, Mummery C. Myocardial tissue engineering: in vitro models. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4: a014076.
- [15] Page SP, Kounas S, Syrris P, et al. Cardiac myosin binding protein-C mutations in families with hypertrophic cardiomyopathy: disease expression in relation to age, gender, and long term outcome. *Circ Cardiovasc Genet*, 2012, 5: 156-166.
- [16] Pasquale F, Syrris P, Kaski JP, et al. Long-term outcomes in hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac troponin T gene. *Circ Cardiovasc Genet*, 2012, 5: 10-17.
- [17] Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Double or compound sarcomere mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a potential link to sudden death in the absence of conventional risk factors. *Heart Rhythm*, 2012, 9: 57-63.
- [18] Girolami F, Ho CY, Semsarian C, et al. Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55: 1444-1453.
- [19] Dorn GW, McNally EM. Two strikes and you're out: gene-gene mutation interactions in HCM. *Circulation Research*, 2014, 115: 208-210.
- [20] Kuliev A, Pomerantseva E, Polling D, et al. PGD for inherited cardiac diseases. *Reprod Biomed Online*, 2012, 24: 443-453.

(收稿日期:2016-03-06)

(编辑:王宝茹)