

# 二代测序技术在先天性骨髓衰竭综合征诊断中的合理应用与结果分析\*

## Rational application and result analysis of second generation sequencing technology in diagnosis of inherited bone marrow failure syndrome

竺晓凡<sup>1</sup>

[关键词] 先天性骨髓衰竭综合征;二代测序;诊断

**Key words** inherited bone marrow failure syndromes;next generation sequencing;diagnosis

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2020.11.003

[中图分类号] R555.1 [文献标志码] A



**专家简介:**竺晓凡,医学博士,教授,主任医师,博士生导师,中国医学科学院血液病医院儿童血液病诊疗中心主任。从事血液病基础研究和临床工作 30 余年,专长于儿童血液病的诊断、治疗和基础研究。担任中国抗癌学会小儿肿瘤专业委员会常委,中国抗癌学会天津小儿肿瘤专业委员会副主委,天津市医学会儿科分会血液学组组长,中华儿科杂志、中华血液学杂志、中国实用儿科杂志等核心期刊编委。以第一作者或通讯作者在 *Nature Genetics*, *Blood* 和 *Nucleic Acids Research* 等国内外知名杂志上发表文章 100 余篇。

先天性骨髓衰竭综合征(inherited bone marrow failure syndromes, IBMFS)是一类多伴有躯体发育异常、外周血至少一系血细胞减少、骨髓造血衰竭的一类疾病的总称。约 1/4 的患者伴有肿瘤性疾病的家族病史。IBMFS 包括 25 余种疾病,常见的有范可尼贫血(Fanconi anemia, FA)、先天性纯红细胞再生障碍性贫血(Diamond-Blackfan anemia, DBA)、先天性角化不良(dyskeratosis congenita, DC)等<sup>[1]</sup>。IBMFS 类疾病的诊断基于血液学、体格检查及某些特异的检测手段进行确诊,如染色体断裂试验用于诊断 FA、基因检测明确疾病类型等。由于技术手段的限制及对疾病认识的不足,临床发病真实数量可能被低估<sup>[2-5]</sup>。对于有典型临床特征及实验室检查结果阳性的 IBMFS 患者很容易诊断,但在临床中有 25%~50% 的患儿临床表现并不典型,常常被漏诊或误诊。一代测序技术曾经为临床解决了部分诊断的问题,但其检测通量低,数据量大、检测成本高等问题使临床应用受到较大限制。近年来,二代测序技术的发展,为临床诊断 IBMFS 提供了相对经济、快捷的手段,显著提

高了此类疾病的检出率<sup>[6]</sup>。但基于二代测序技术的多种检测方式在临床应用过程中仍有一些问题,如临床表现符合某种 IBMFS,但未检测到明确致病基因而多次重复检测;疾病表型信息提供不完整造成分析困难;以及临床与检测机构沟通欠缺,临床与分析的割裂状态导致漏诊、甚至误诊等。以下我们通过一个临床实例来反映常见的问题。

患儿,女,5 岁,主因“发现血小板减少 4 年余”于 2014 年在我院就诊,患儿 10 个月大时因感冒查血常规示血小板低,未行治疗,后间断复查血小板维持在  $60 \times 10^9/L$  左右。2014 年 3 月,患儿因皮肤瘀斑、伴发热及关节肿痛就诊于当地医院,诊断为“过敏性紫癜,急性上呼吸道感染”,予以抗过敏治疗(具体用药不详)后好转,但血小板降至  $51 \times 10^9/L$ ,为进一步诊疗来我院。入院体检:小眼小头畸形、全身可见牛奶咖啡斑。家族史:有一姐姐因患先天性心脏病夭折,其他家族史无特殊。入院时:WBC  $4.45 \times 10^9/L$ ,血红蛋白 120 g/L,PLT  $37 \times 10^9/L$ ,RBC  $3.49 \times 10^9/L$ ,中性粒细胞绝对值  $0.47 \times 10^9/L$ ,淋巴细胞绝对值  $3.63 \times 10^9/L$ ,单核细胞绝对值  $0.34 \times 10^9/L$ 。骨髓示:增生活跃,粒系占 27.5%,红系占 18.5%,巨核细胞 8 个,粒红两系增生,巨核系增生产板不良骨髓像。彗星试验:彗星细胞阳性率 41%,染色体断裂试验:28%。

\*基金项目:中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目(No:2016-12M-1-002)

<sup>1</sup>中国医学科学院血液病医院血液学研究所(天津,300020)  
通信作者:竺晓凡,E-mail:xfzhu@ihcams.ac.cn

二代测序基因结果 FANCA chr13-32968840 exon25 c. 9271G>A het, 根据患儿临床表现、相关实验室检查可明确诊断为 FA, 但由于患儿仅有 FANCA 的杂合突变, 按目前 FA 发病遗传规律, 并不能明确其基因类型。不同基因类型的 FA 患儿预后存在较大差异, 故仍需进一步实验来明确诊断<sup>[7]</sup>。

上述二代测序基因结果与临床诊断的不一致性的原因可能有: ①基因的大片段缺失; ②内含子突变; ③新发的基因突变; ④基因的嵌合状态等。如何更进一步明确致病基因? 需利用多重连接探针扩增技术 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 检测是否存在基因的大片段缺失? 或通过全基因组检测以发现新的致病突变等。

现就如何应用二代测序及联合其他多种检测方式来诊断疾病和如何分析做初步探讨。

### 1 如何合理联合基于二代测序的多种检测方式来诊断 IBMFS 疾病

基于二代测序的检测方式包括靶向测序、全外显子组测序、全基因组测序及转录组测序, 各种方法的合理联合应用, 对临床诊断 IBMFS 有重要意义。对各种测序方式优缺点的理解有助于临床上合理使用, 减少患者的经济负担, 表 1 列举了各种方法的优劣势。

#### 1.1 靶向测序

靶向测序也称目标区域测序, 是对目的基因组区域进行捕获和富集并进行高通量测序的一种技术手段。其优点是检测通量极大提高, 可实现较高的测序深度, 但不同检测公司使用的测序平台和基因 panel (已知基因列表组合) 内容设计不尽相同, 以致临床高度怀疑疾病对应基因未全部测得而漏诊; 该方法仅能检测出已知突变基因, 不能发现新

的突变基因, 新的致病基因所致疾病可能被遗漏。

#### 1.2 全外显子组测序

全外显子组测序主要用于识别和研究与疾病、种群进化相关的编码区及 UTR 区域内的变异。目前其普遍检测深度较低 (通常在 150× 以下), 且受制于成本往往收费较高, 临床广泛应用受限, 仅用于靶向测序不能诊断患者的进一步检测。

#### 1.3 全基因组测序

全基因组测序是对人类不同个体或群体进行全基因组测序, 并在个体或群体水平上进行生物信息分析。此方法可全面挖掘 DNA 水平的突变信息, 为临床寻找新的致病基因、新的突变位点及发病机制提供基因层面较全面的信息。其优点是可发现新的致病基因, 缺点是价格昂贵, 对大片段缺失的判断较差。

#### 1.4 转录组测序

转录组测序可全面快速地获得特定细胞或组织在某一状态下几乎所有转录本的序列信息和表达信息。其检测内容包括编码蛋白质的 mRNA 和各种非编码 RNA。有利于发现未知转录本和稀有转录本, 从而准确地分析基因表达差异、基因结构变异、筛选分子标记等生命科学的重要问题。此方法一般与基因突变联合检测来验证患者疾病类型, 并可探索新的突变是否具有致病性。

除二代测序技术外, 临床上, 还有一种技术 MLPA, MLPA 结合了 DNA 探针杂交和 PCR 技术, 具有高效、特异、快速、简便的优点, 可用于检测基因的缺失或重复。但也有其局限性, 如需要精确测量 DNA 的浓度, 样本容易被污染、不能用于单个细胞的检测, 不适合检测未知的点突变类型、不能检测染色体的平衡易位。

表 1 各种检测方式在 IBMFS 诊断中的优缺点及临床应用情况

检测方法	优势	不足	临床选择情况
Sanger 测序	可检测单碱基突变和小片段插入缺失, 方法简便, 分辨率高, 成本低, 序列长度高于二代测序	一个反应只能得到一条序列, 测序通量很低; 单个反应价格低廉, 但是获得大量序列的成本很高	作为检测标准, 对新一代测序 (二代测序) 技术的结果进行验证
靶向测序	相比于一代测序技术, 通量提高了上万倍; 单条序列成本非常低	序列读长较短 (通常 250~500 bp), 一些含量较少的序列可能无法被大量扩增 若 Panel 更新周期长, 可能出现未包括新发现的致病突变导致漏诊	广泛应用于临床
全外显子测序	覆盖人类全外显子 可发现新发的致病突变基因	检测深度低, 低频突变检出率可能低于高深度靶向测序, 检测费用较高	无已知突变基因、寻找新的致病基因的检测
全基因组测序	覆盖外显子、内含子区 可发现新的致病突变基因	昂贵、大片段缺失不易发现	无已知突变基因、寻找新的致病基因的检测
转录组测序	覆盖所有编码蛋白质的 mRNA、各种非编码 RNA, 可分析基因表达差异、基因结构变异 (融合基因等)、筛选分子标记	需与基因突变检测协同分析	与基因突变检测协同分析对疾病进行诊断
MLPA	针对性强、快速、准确、可发现大片段缺失或重复	不能进行检测未知的点突变、样本要求高	用于靶向测序后的补充

根据以上阐述内容可以看出,各种检测方式优缺点不同,如何选择或联合多种检测方式需要根据临床具体问题做出决定。本文提供的病例临床表型符合 FA,经过与检测机构沟通,通过 MLPA 技术检测,结果显示患儿 FANCA exon2-4 存在大片段缺失,最终确定基因型为 FANCA 型 FA,避免了重复检测。

## 2 测序结果常见问题及分析中的注意事项

### 2.1 靶向测序中未发现与临床相关的突变基因

如 IBMFS 的临床表型明确,如 FA 的小头畸形、指(趾)发育异常、皮肤牛奶/咖啡斑;DC 的皮肤色素沉着与脱失的网格状改变、指(趾)甲的角化不良及口腔黏膜白斑等,但基因检测未发现相关突变基因,或有突变但不能确诊(如文中病例所示),应与检测机构沟通,再次核对临床信息并分析数据,排除突变基因为大片段缺失或易位、患者为新发突变基因或 Panel 久未更新等,上述 3 种情况可通过全外显子测序、转录组测序和 MLPA 方法进行验证。

### 2.2 临床诊断 IBMFS,但经过全面测序后仅发现相关疾病的杂合突变

如 FA 患者经靶向测序、全基因组测序仅发现某一种 FA 基因的杂合突变,而这个突变不足以证实患者为 FA。出现这个结果的原因可能与体细胞基因突变嵌合状态有关,后续可通过单细胞测序方法证明是否有致病基因为嵌合状态,靶向测序未能实现目的基因检出。

### 2.3 临床不能确诊 IBMFS,但发现了 IBMFS 基因的杂合突变

如临床诊断为再生障碍性贫血患者,但出现了 FA、DBA 或 DC 等相关基因的杂合突变,出现这样的结果需要探讨突变基因是否具有致病性,首先可以通过查阅文献,如为报道过的致病突变,但突变是来源于父母一方,且父母临床表型正常的情况,仅能诊断为携带者。如果存在 2 个不同位点同一基因的杂合突变,且突变分别来源于父亲、母亲,尽管父母临床表型正常,这种复合杂合突变仍可确定其致病性,在临床实践中这种情况并不罕见。因此,靶向基因测序检测同时进行父母样本验证极为必要。

### 2.4 同时发现多种 IBMFS 疾病的突变,但与临床表现不符

由于这类突变不能明确诊断疾病,且目前缺乏其长远的临床预后意义的报道,目前仅可诊断为携带者。但后续该类患者的临床队列建立及长期追踪随访是回答上述问题的必要手段。

基于各种测序方式对临床诊断的意义,建议在高度拟诊 IBMFS 的患者进行基因诊断过程中可考虑以下流程(图 1):当根据患者临床表现及肿瘤疾病家族史等拟诊或疑诊为 IBMFS 时,通过基本检

测筛查除外引起血细胞减少的其他疾病后建议首先进行靶向测序,如靶向测序可找到相应突变基因可确诊;如靶向测序不能测出,建议进一步行全外显子测序寻找突变基因,如经济条件允许,可进行转录组测序协助诊断,如检测发现可能存在大片段缺失,可以利用 MLPA 技术进行验证;如经以上检测仍未发现有符合临床表现的有意义的突变,可考虑行全基因组测序寻找是否有内含子部位等特殊突变发生,如经以上所有方法仅发现可疑基因的杂合突变,根据疾病遗传特性,必要时可做单细胞测序进行诊断。

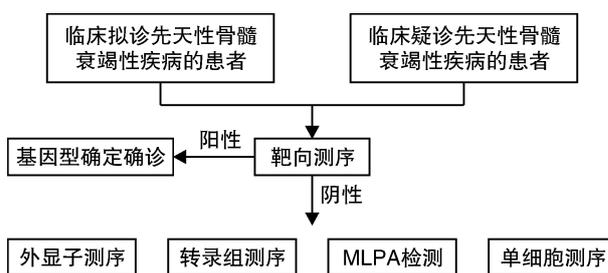


图 1 临床检测技术的选择

综上所述,二代测序技术的出现为临床诊断 IBMFS 的基因型提供了多种可选择的检测方式,但各种检测方式均有优劣,需根据临床遇到的具体问题合理选择。在结果分析中,需要充分考虑出现结果的可能原因,逐一排除后得到合理与准确的诊断。

## 参考文献

- [1] Sakaguchi H, Nakanishi K, Kojima S. Inherited bone marrow failure syndromes in 2012[J]. Int J Hematol, 2013, 97: 20-29.
- [2] Zhu X. Current insights into the diagnosis and treatment of inherited bone marrow failure syndromes in China[J]. Stem Cell Investig, 2015, 2: 15.
- [3] Longerich S, Li J, Xiong Y, et al. Stress and DNA repair biology of the Fanconi anemia pathway [J]. Blood, 2014, 124: 2812-2819.
- [4] Ruggero D, Shimamura A. Marrow failure: a window into ribosome biology [J]. Blood, 2014, 124: 2784-2792.
- [5] Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. Bone marrow failure and the telomeropathies [J]. Blood, 2014, 124: 2775-2783.
- [6] Zhang MY, Keel SB, Walsh T, et al. Genomic analysis of bone marrow failure and myelodysplastic syndromes reveals phenotypic and diagnostic complexity [J]. Haematologica, 2015, 100: 42-48.
- [7] 常丽贤,任媛媛,杨文钰,等. 范可尼贫血患者临床转归与基因突变关系分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(8): 742-745.

(收稿日期:2020-09-29)