

# 体细胞变异对神经系统常见肿瘤和发育异常类疾病的致病性

刘芳, 宋小珍, 谢华, 陈晓丽

首都儿科研究所, 儿童发育营养组北京市重点实验室, 北京 100020

**摘要:** 在生物体发育过程中各种内源性及外源性因素均可造成 DNA 损伤, 引起体细胞变异。研究表明体细胞变异对肿瘤具有致病性作用, 而体细胞变异对神经系统发育异常类疾病的致病性鲜有报道。新一代测序技术的发展, 尤其是全外显子测序、靶向深度测序的应用大大提高了低频体细胞变异检出的敏感性, 使科研人员重新认识了体细胞变异在神经系统肿瘤和发育异常类疾病发生中的致病性。本文综述了体细胞变异在神经系统肿瘤和发育异常类疾病致病性方面的研究进展, 旨在为今后研究该类疾病的遗传病因提供新的思路, 同时也为新药开发提供理论依据。

**关键词:** 体细胞变异; 神经系统肿瘤; 神经系统发育异常类疾病; 二代测序

## The pathogenicity of somatic mutation to common tumors and developmental malformation of the nervous system

Fang Liu, Xiaozhen Song, Hua Xie, Xiaoli Chen

Beijing Municipal Key Laboratory of Child Development and Nutriomics, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

**Abstract:** In the course of development, both endogenous and exogenous factors can cause DNA damage, which resulted in somatic mutations. It is recognized that somatic mutations are the causation of many nervous cancers, the pathogenicity of somatic mutation in developmental malformation of nervous system is unknown yet. With the development of next generation sequencing (NGS), especially the clinical application of the whole-exome sequencing and the targeted massively parallel sequencing, the somatic mutations with low levels can be detected precisely. The detection of low-level and tissue-specific somatic mutation in patients enables researchers to re-recognize the contribution of somatic mutation to neurological disorders. In this review, we systematically summarize the pathogenicity and characteristics of the somatic mutations in the common tumors and developmental malformation of nervous system, and the new technologies to detect somatic mutation in order to extend our understanding of its genetic etiologies and identifying the new drug targets in the

收稿日期: 2015-09-21; 修回日期: 2015-11-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81370708, 81401207), 北京市卫生系统 215 高层次人才项目, 北京市百千万人才工程创新研发类项目和 2014 年首都卫生发展科研专项项目(编号: 2014-2-1131)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81370708, 81401207), the Advanced Personnel Training Program (215) of Beijing Municipal Health Bureau to XLC, the Innovation Project of Beijing Municipal Human Resources and Social Security Bureau, and the Capital Health Research and Development of Special (No. 2014-2-1131)]

作者简介: 刘芳, 硕士研究生, 专业方向: 分子遗传学。E-mail: liufang\_1990@sina.cn

通讯作者: 陈晓丽, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: cxlwx@sina.com

DOI: 10.16288/j.ycz.15-400

网络出版时间: 2016-1-14 16:51:58

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160114.1651.006.html>

future.

**Keywords:** somatic mutation; nervous system tumors; developmental malforamtion; next generation sequencing (NGS)

体细胞变异一般是指在生物体发育过程中体细胞发生的基因变异。体细胞变异后,生物体总体细胞群或者某个组织内总细胞群由变异细胞和未变异细胞交错形成,类似马赛克,故把这种现象称为细胞嵌合体(Mosaicism),可通过检测变异体细胞所占比例即变异细胞频率来确定嵌合体的变异程度<sup>[1]</sup>。新一代测序技术的应用提高了体细胞低频变异的检出敏感性,从而促进科研人员重新认识体细胞变异的致病性,不再只局限于各系统肿瘤。目前研究发现,体细胞变异不仅参与神经系统肿瘤的发生发展,也是多个神经系统发育异常类疾病发生的遗传基础<sup>[1]</sup>,因此开展体细胞变异与神经系统常见肿瘤和发育异常类疾病的相互关系,对揭示其致病机理并最终探索疾病防治具有重要的意义。本文对体细胞变异的特点、致病性及其在神经系统常见肿瘤和发育异常类疾病中的研究进展进行了综述。

## 1 体细胞变异的特点及其致病性

### 1.1 体细胞变异的特点

在机体发育过程中,外源和内源因素均可引起基因组DNA损伤,如内源性的水解、氧化、烷基化以及外源性的辐射等因素。同样,在有丝分裂DNA复制过程(尤其是复制叉延伸过程中冈崎片段上)中也会发生碱基错配现象。一般情况下,大部分的DNA损伤及碱基错配可以通过直接修复、切除修复、复制后修复等方式进行修复。但由于这种现象常有发生,有一些损伤或错配也并没有得到完全修复,即遗留成为体细胞变异。体细胞变异可发生在某个组织内,即组织特异性体细胞变异,此时检测来源于血液和该组织的DNA,发现两个样本的基因型不同;体细胞变异也可以发生在同一组织内不同部位的细胞群体,如肿瘤部位特异性体细胞变异,此时检测病变组织和非病变组织,发现只有病变组织携带变异;或者两者的混合组织呈现杂合基因型,但两个基因型的峰值又不等同,即病变细胞特异性体细胞变异。

#### 1.1.1 体细胞变异率大于生殖细胞

物种的自然选择作用趋于将生殖细胞有利的基因变异保存下来,不利的基因变异不断被清除。对于功能非常重要的基因,如果发生生殖细胞变异,携带该变异的胚胎常常出现自然流产、无法存活、无法传代,自然选择作用使得在活体或活胎中携带该基因变异的生殖细胞数目大大减少。与生殖细胞基因变异相比,自然选择对体细胞变异的作用较小,因此生物体的体细胞变异率要远大于生殖细胞的新生变异率<sup>[1]</sup>。Rondelli等<sup>[2]</sup>收集了142个正常人的粒细胞,采用流式细胞术检测 *PIG-A* 基因的变异率,并以此来预测体细胞变异率为  $1.6 \times 10^{-6} \sim 37.5 \times 10^{-6}$ ,远远大于正常人生殖细胞新生变异率( $1.2 \times 10^{-8}$ )<sup>[3]</sup>。

#### 1.1.2 胚胎发育早期可发生体细胞变异,变异细胞频率随着年龄的增长而增加,且具有组织特异性

Li等<sup>[4]</sup>证实在生物体发育早期体细胞可发生单核苷酸变异(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)。该研究中收集33对正常同卵双胞胎的血细胞,首先针对506786个SNPs位点进行基因分型检测,有80个SNPs位点在同卵双胞胎中存在差异。最终,Sanger测序和二代测序证实了2个SNPs位点(rs32598和rs17197101)存在差异。rs32598和rs17197101在同卵双胞胎中携带参考等位基因细胞频率分别为1 vs. 0.6和1 vs. 0.5,由此推测体细胞变异确实可发生在胚胎发育早期,之后随着变异体细胞不断增殖发育,最终才在血液中检测出50%的体细胞变异。这与Frank等<sup>[5]</sup>的研究结果一致。

在上述Li等<sup>[4]</sup>的研究中因人组织样本来源受限,无法获得多种人组织样本来更好地评估变异细胞频率与年龄增长的关系以及是否存在组织特异性等,因此很多科研工作者在小鼠模型上进一步探索体细胞变异特点。研究发现,随着年龄的增长,变异细胞频率增加<sup>[6]</sup>,而且具有组织特异性<sup>[7]</sup>。Dolle等<sup>[6]</sup>发现小鼠从出生到34个月,肝脏组织内变异细胞频率增长较快,而脑组织内变异细胞从出生到4~6个

月增长较快。此外,通过观察 3~33 个月的小鼠发现:随着年龄的增长,体细胞变异类型在各组织间差异也变大。比如发育晚期,小肠组织内体细胞变异大部分为点变异(G>T, G>C, A>C, G>A),而在心脏组织内,在体细胞变异类型中,50%为大片段基因组重组(长达 34 cM, 约 60~70 Mb),其余为 CpG 岛区域的点变异(以 G>A 为主)<sup>[7]</sup>。

## 1.2 体细胞变异的致病性

体细胞变异可以发生在正常生物体组织内,随着年龄的增长,变异细胞频率增加,达到一定频率则会引起整个组织形态发生变化,出现功能失调,引起机体衰老<sup>[8]</sup>。体细胞变异也可引起疾病,致病性与基因的功能、变异发生的时期(胚胎发育过程中的时间点)、基因变异的分布组织、变异细胞频率等有关<sup>[9~14]</sup>。变异发生的时期决定该体细胞变异所在的组织种类、同一组织内携带变异的体细胞频率。对于功能较重要的基因,生殖细胞变异会导致胚胎死亡或产后短暂存活,而体细胞变异的生物体能够生存但表型较严重。此外,一般在胚胎发育过程中体细胞变异发生时期越早,表型越严重。变异细胞频率越高,表型越严重。如在 McCune-Albright 综合征<sup>[9]</sup>、Sturge-Weber 综合征<sup>[10]</sup>、Proteus 综合征<sup>[11]</sup>和半侧巨脑畸形<sup>[12~14]</sup>中,患儿表型严重程度与体细胞变异发生时期、携带变异的体细胞频率等一致。

根据 Knudson 的二次打击学说,患者从父母遗传一个隐性的生殖细胞变异,同时另一个等位基因发生体细胞变异,此时体细胞变异作为二次打击,对生殖细胞变异起修饰作用而共同引起表型,如 *NFI* 的杂合变异和 *NFI* 的体细胞变异共同导致神经纤维瘤 I 型<sup>[15]</sup>。在致病机理研究中还涉及到体细胞变异是否会遗传给下一代引起疾病,Riviere 等<sup>[13]</sup>在巨脑症的 1 个家系中发现,3 个患病子代血液中均携带 *PIK3R2* 基因变异,父母及其未患病子代唾液和血液中均未发现该变异,提示患者父母可能存在生殖细胞嵌合型变异。Acuna-Hidalgo 等<sup>[16]</sup>为了证实这一观点,对之前认定为子代新生变异的 4081 个变异位点的全基因组测序数据重新分析,挑选出 11 个变异位点,这些变异位点特点为先证者携带,其父亲或者母亲全基因组测序数据中仅有 2 个 reads 存在

该变异。之后利用深度扩增子测序(Amplicon-based deep sequencing, ADS)技术对先证者父母的这 11 个变异位点进行重新测序(DNA 来源于血液),发现 4 个先证者父母携带与先证者一样的基因变异,但变异细胞频率极低(分别是 6.15%、5.25%、2.56%、0.22%),而 Sanger 测序却无法检测到。这种低水平的嵌合体变异说明,4 个患者的基因变异并非新生变异,而由父母的生殖细胞的低水平嵌合体变异遗传而得。这项研究证实生殖细胞和体细胞一样也存在嵌合型变异。因此,生殖细胞中低频率基因变异也属于体细胞变异范畴。

## 2 体细胞变异参与神经系统常见肿瘤和发育异常类疾病的发生发展

### 2.1 体细胞变异与神经系统常见肿瘤

神经系统肿瘤是一类危害性较大、病因及治疗尚未明确的疾病。目前有很多研究致力于体细胞变异在神经系统肿瘤发生发展中的致病性,并证实胶质母细胞瘤、神经节细胞瘤、神经纤维瘤、脑干胶质瘤等神经系统肿瘤都存在肿瘤组织特异性体细胞变异<sup>[17~19]</sup>。如 Park 等<sup>[17]</sup>对 48 个胶质母细胞瘤患者的 *hTERT* 基因进行测序,发现 29 个患者携带 *hTERT* 基因启动子区域的体细胞变异(C228T 或 C250T),qRT-PCR 结果表明该体细胞变异能够使 *hTERT* 基因表达增加,端粒酶反转录酶活性增加,导致恶性胶质瘤细胞无限增殖。Chen 等<sup>[18]</sup>在单纯性小脑发育不良性神经节细胞瘤的患者脑组织中发现 *PTEN* 基因的体细胞变异。Wiest 等<sup>[19]</sup>发现 *NFI* 体细胞变异对 *NFI* 生殖细胞变异效应起修饰作用,共同引起神经纤维瘤。

发现与肿瘤相关的体细胞变异,尤其是找到作为肿瘤驱动因子(Driver mutations)的体细胞变异,对于神经系统肿瘤的早期诊断、致病机理研究以及新药开发均有重要的意义。Wei 等<sup>[20]</sup>提出对疾病发展的不同时期所获取的病理组织同时进行 DNA 检测、RNA 测序以寻找肿瘤驱动因子。该研究首先对 1 例转移性神经母细胞瘤患者尸检时获取的肝转移组织进行全基因组测序,发现了 45 个体细胞变异位点。针对所发现的体细胞变异位点,对之前获得的骨髓

组织和肾上腺原发病灶组织进行检测,结果其中只有15个体细胞变异位点同时存在于这3种组织中。进一步对这15个位点所在基因进行RNA测序,发现3个基因(*LPAR1*、*GATA2*和*NUFIPI*)表达水平增高,而*LPAR1*表达水平最高,提示*LPAR1*基因体细胞变异可能为该患者发生神经母细胞瘤的驱动因子。Zhang等<sup>[21]</sup>发现*PPMID*第6外显子的体细胞变异作为主要驱动因子参与脑干胶质瘤的发生发展,该变异使*PPMID*抑制DNA损伤反应蛋白CHK2激活的能力增强,其可能是患者放射治疗效果不佳的发生机理,因此科研人员考虑将该体细胞变异位点作为新药开发的一个强有力的候选靶标,希望能关闭其促进癌细胞生长的能力。以上研究都促进了神经系统肿瘤致病机理研究及新药开发等。

## 2.2 体细胞变异与神经系统发育异常类疾病

神经祖细胞增殖、分化、迁移至新生的皮质板形成大脑皮层,在这一发育过程中细胞分裂增殖的速度很快,妊娠4周时神经祖细胞的数量还很少,到妊娠24周时,人脑组织神经元细胞数已经达到 $10^{10}$ 。保守估计在这20周胚胎发育期间,神经细胞分裂速度为 $10^5/\text{min}$ ,这比其他任何体细胞甚至癌细胞分裂速度都快<sup>[22]</sup>。快速细胞分裂过程中神经祖细胞/神经干细胞可能更容易发生碱基错配变异,而神经发育相关基因错配就可能引起大脑皮质发育畸形及其相关表型,如药物难治性癫痫、智力低下、局部神经损伤、自闭症等。

既往对这些大脑皮质发育畸形及其相关表型的研究中,科研人员一直认为患者的变异基因都由父母的变异基因遗传而来,或者子代胚胎期基因发生新生变异所致,而关于神经组织的体细胞变异对神经系统发育性疾病的致病性,研究甚少。两个因素限制了科研者对以上问题的认识:(1)大脑组织内神经细胞取材困难,除了少数可在手术切除的病理组织获得,大多数只能利用疾病人群死后捐献的脑组织开展假设研究;(2)携带变异的神经细胞和正常神经细胞共存,采用过去的一些测序技术(如Sanger测序等)无法识别外周血中,甚至脑组织内的低水平嵌合变异。但一些经典神经发育性疾病的体细胞变异嵌合体现象还是给了科研人员一些启发,比如最

经典致儿童精神心理发育异常的脆性X综合征<sup>[23,24]</sup>。脆性X染色体综合征(Fragile X syndrome, FXS)是X连锁显性遗传病,是智力低下、学习困难、孤独症的主要遗传病因之一。其致病分子基础是由于定位于X染色体上的*FMRI*基因5'UTR区的三核苷酸(CGG)重复序列不稳定扩增(即动态突变)所造成的,可分为全突变(CGG重复序列数>200)和前突变(CGG重复序列数为55~200)<sup>[25]</sup>。而*FMRI*基因重复数呈现嵌合体状态是该病的最常见特征。据报道,80%的FXS患者CGG重复数既有>200的,也有90~150的<sup>[23]</sup>。对于一些认定为携带*FMRI*基因新生缺失变异的FXS患者,深度测序发现其母亲的血液DNA携带*FMRI*基因低频嵌合缺失<sup>[24]</sup>。这些都表明*FMRI*基因体细胞变异对脆性X综合征具有致病性,同时提示体细胞变异可能参与其他神经系统发育异常类疾病的发生发展。

新一代测序技术(Next generation sequencing, NGS)的发展给神经系统发育性疾病研究带来巨大变化。研究人员能对不同组织、同一组织内的不同细胞甚至单一细胞中多个可能与大脑发育相关的基因进行平行测序比较,最终验证了体细胞变异在神经系统发育性疾病中的作用及与疾病表型严重程度的相关性。如图1所示,不同胚胎发育时期神经细胞变异部位、比例不同使得患者脑组织的基因测序结果不同于血液样本。Jamuar等<sup>[26]</sup>应用Illumina测序平台对158个脑畸形患者淋巴细胞DNA进行了靶向基因测序(测序深度200×)。根据脑畸形表型差异将测序基因分为两类:一类针对脑畸形中双皮质综合征,多小脑回合并巨脑畸形以及脑室周围结节性异位,包括10个已知致病基因和4个候选基因;一类针对脑畸形中的巨脑回畸形,包括18个已知致病基因和36个候选基因。在158个患者中发现27个患者携带致病基因变异,其中8个患者(30%)携带体细胞变异,主要是在双皮质综合征(*DCX*和*LISI*)、脑室旁结节性异位(*FLNA*)、巨脑回(*TUBB2B*)的患者中。

在大脑皮质发育、神经元分化过程中,mTOR信号通路起到了重要的调控作用,诸多研究利用二代测序技术探索该通路相关基因的体细胞变异对大脑皮质发育畸形的致病性。Lim等<sup>[27]</sup>对4个局灶性



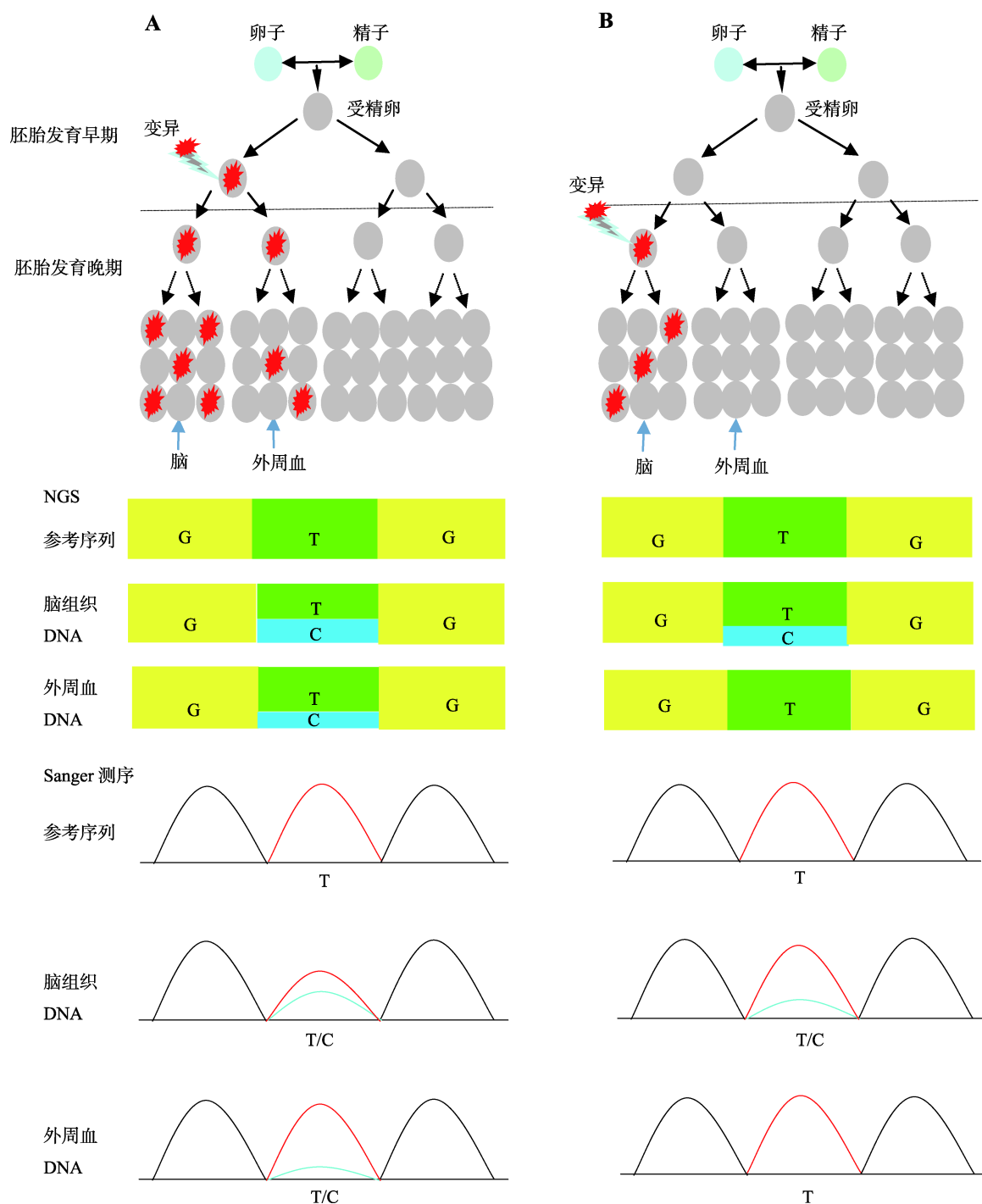


图 1 基因变异的发生时间、变异部位、筛查方法和受检样本四者与基因变异检出率关系模式图

Fig. 1 The mode chart of the relationship between detection rates of somatic mutation and its influencing factors, including the time points, the regions, the type of tissues of somatic mutation and the detection techniques

A: 体细胞变异发生在胚胎发育早期时患者脑组织、外周血 DNA 测序结果。体细胞变异发生在胚胎干细胞, 使其呈现嵌合体状态, 随着胚胎的发育, 体细胞变异不仅存在于脑组织内, 也存在于神经系统外组织中, 比如外周血。NGS 和 Sanger 测序结果表明此时脑组织中该基因变异频率大于外周血。值得注意的是, 当外周血中携带变异基因的体细胞频率较低(<15%), 直接对外周血进行 Sanger 测序, 可能会因为变异基因峰值太低而把其看做测序电流峰或杂峰被忽略。B: 体细胞变异发生在胚胎发育晚期时患者脑组织、外周血 DNA 测序结果。携带变异基因的体细胞仅存在于神经干细胞或其子细胞中, 而神经外组织内无此类细胞。随着胚胎的发育, 该基因变异仍存在于脑组织等神经系统组织中, 外周血无法检测到基因变异。图 1 参考文献[1,26]绘制。

皮质发育不良Ⅱ型(Focal cortical dysplasia type II, FCDII)患者的手术切除的脑组织、外周血 DNA 同时进行全基因组测序(测序深度为 412~668×),仅在脑组织中发现了 3 个相同的 *MTOR* 基因变异位点,之后利用靶向测序(测序深度为 100~347 499×)对其进行验证。结合两个测序结果,发现 2 个该病患者脑组织中均存在 *MTOR* 基因的体细胞变异 c.7280T>C(p.Leu2427Pro),而外周血中未发现以上基因变异。之后利用捕获测序或扩增子混合平行测序对 73 个 FCDII 患者的脑组织的 *MTOR* 基因开展深度测序(平均深度>500×),在 10 个患者中又发现了 8 个不同的体细胞变异,即 15.6%(12/77)的 FCDII 患者的脑组织携带 *MTOR* 基因体细胞变异,细胞变异频率为 1.26%~12.6%,这些变异均未在外周血中发现。为进一步验证 mTOR 信号通路基因体细胞变异对大脑发育畸形具有致病性, Lim 等<sup>[27]</sup>在小鼠 E14 时期转入包含同时存在于两个患者脑组织的 *MTOR* 基因变异位点 c.7280T>C 的质粒,发现超过 90%的小鼠神经细胞迁移异常且有原发性癫痫,第 1 次抽搐发生在出生后 6 周,这和 FCDb II 患者约 4 岁时第 1 次发病表型一致。此外, Riviere 等<sup>[13]</sup>利用深度测序对巨脑症患者进行测序时发现了细胞变异频率低至 1%的 *PIK3CA* 体细胞变异。

在一些神经系统综合征中也发现了体细胞变异,如 Pieras 等<sup>[28]</sup>对 1 例诊断为非典型 Rett 综合征的男孩进行遗传病因诊断时,发现该患儿携带 *MECP2* 的体细胞变异(Y120X),在血液和皮肤中细胞变异频率分别为 10%和 15%。Shirley 等<sup>[10]</sup>在 88%的 Sturge-Weber 综合征患者、92%的非综合征性鲜红斑痣患者中检测到 *GNAQ* 的错义变异(c.548G→A, p.Arg183Gln),变异细胞频率为 1.0%~18.1%。研究中还指出 *GNAQ* 体细胞变异的致病性与变异发生时间有关,与非综合征性鲜红斑痣相比, Sturge-Weber 综合征患儿 *GNAQ* 体细胞变异发生在胚胎发育早期,携带该变异的细胞种类更多,进而引起综合征的复杂表型。

基于以上发现,一些临床遗传学家、临床诊断实验室在神经系统发育异常类患者的临床遗传检测流程中采用非外周血 DNA 作为检测样本,以提高体细胞变异检出率,为临床提供更准确的遗传病因诊断,如朗热综合征(Cornelia de Lange syndrome, CdLS)

疑似患者,采用口腔拭子提取的 DNA 筛查 *NIPBL* 基因<sup>[29]</sup>。

## 2.3 神经系统疾病研究中体细胞变异检测技术的发展

体细胞变异与神经系统疾病有着紧密的联系,而体细胞变异能否被准确检出将依赖于基因测序方法的应用。目前检测技术有 Sanger 测序、克隆测序、二代测序技术、单细胞测序等。

Sanger 测序作为基因变异检测的金标准,方法简便,测序片段长,一直以来在各实验室得到普遍应用。但是 Sanger 测序一次只能对单个样本单个基因进行检测,不适合神经系统疾病等多基因疾病遗传因素筛查,适用于对筛查出来的基因变异进行验证。而利用 Sanger 测序对体细胞变异进行验证时,体细胞变异检出的敏感性较低,仅当体细胞变异频率介于 15%~20%时能够准确检出。体细胞变异频率过低, Sanger 测序往往误读为无变异,体细胞变异频率过高(60%~70%), Sanger 测序结果则误读为生殖细胞变异<sup>[26]</sup>。

二代测序技术(Next generation sequencing, NGS),又称为深度平行测序,是指一次性对几百万条到十亿条 DNA 分子进行并行、重复性测序,测序既快,又可以检出既往测序技术无法察觉的低水平基因嵌合体变异,提高体细胞变异检出的敏感性。随着测序成本的减少及测序深度的增加,二代测序技术尤其是全外显子测序(Whole exome sequencing, WES)、靶向深度测序技术在临床遗传学诊断中得到普遍应用<sup>[30,31]</sup>,在神经系统常见肿瘤及发育异常类疾病的遗传因素研究中起到了很重要的作用。特别是当患者临床表型不特异,临床医生无法给予提示性诊断信息时,这种深度、高通量测序在筛查致病性体细胞变异时具有绝对优势。Rohlin 等<sup>[32]</sup>比较了 Sanger 测序、单链构象多态性分析/异源双链分析(SSCP/HD)、蛋白质截短实验(PTT)、变性高效液相色谱(DHPLC)技术、NGS 在检测体细胞变异方面的应用,发现 NGS 是最适合于体细胞变异的检测,当测序深度 1000×,甚至可以检测出变异频率为 1%的体细胞变异。

然而,利用 NGS 开展神经系统疾病的研究,尤其是临床应用、遗传诊断中仍存在较多的问题,包

括如何提高体细胞变异的筛查能力, 如何对体细胞变异的致病性进行评估, 对患者完成遗传诊断。其中第一个属于实验室的技术问题, 可以通过一些实验技巧给予解决: (1) 对多个样本 DNA (比如血样、主要致病组织) 同时进行基因变异检测<sup>[33]</sup>, 如在 Gutmann 等<sup>[34]</sup>的研究中, 对 1 个 I 型神经纤维瘤患者检测了 7 个癌组织和 2 个对照组织 (血液以及正常皮肤组织) 的 *NF1* 基因。这将有助于正确评估不同组织中变异细胞所占比例, 对于变异的致病性分析也有一定的提示作用。(2) 测序结果受测序深度的影响, 尤其是当变异细胞频率较低时, 有可能因为测序深度太低而漏检。通过提高靶向测序的深度来提高低频体细胞变异检出的敏感性。(3) 建立不同基因体细胞变异在二代测序平台的分析方法, 比如利用已知变异细胞频率的 DNA, 对新建的二代测序平台进行准确性、敏感性、重复性评估, 然后依次建立该测序板块的体细胞变异的生物信息学分析模式, 以更好的区分体细胞变异、杂合变异、测序引入的变异等。然而, 在二代测序产生的海量数据中, 如何对基因变异数据进行正确解读, 完成临床致病性分析是另一个重要问题<sup>[35]</sup>, 对初期的测序数据完成质量、信息学分析, 依靠多种方法获取多方面证据来完成致病性评估。综合评价基因变异的致病性通常需要结合以下几方面因素: 该基因变异在正常人群及病人中的频率; 在公开疾病相关数据库 (如 HGMD、Clin Var 和 LOVD) 及实验室已有数据库中是否报道; 患者临床表型与基因型是否具有的一致性; 关于该基因变异的最新文献报道; 实验室检测者 (分子遗传学家、技术员) 根据自己的经验对该基因变异致病性的认识等。不同预测软件因其算法及评判标准的细微差别而使预测结果存在差异, 临床医生对病人疾病表型的正确描述等也都会影响分析结果, 因此使用高通量基因组测序技术对神经系统疾患开展精准诊断时, 需要生物信息学家、遗传研究人员、临床/分子遗传学家、专科医生的共同参与。最近, 美国医学遗传学与基因组学学会 (ACMG) 联合分子病理学会 (AMP) 和美国病理学家协会 (CAP) 发布了《基因变异解读标准和指南》, 指南中指出判断变异的致病性需要根据人群数据、功能预测数据、相关功能实验数据、是否发生基因型与表型分离、其他数据库的

数据等方面的证据, 将变异的致病性分为致病、可能致病、意义不明确、可能良性、良性<sup>[36]</sup>。

单细胞测序技术能够在单个细胞的水平上对基因组进行高通量测序分析, 可以使系统评估人类大脑的基因组多样性成为可能, 使科研人员能够以更新的视角看待神经科学问题, 能在单个细胞水平上将体细胞变异和生殖细胞变异真正分开。如 Evrony 等<sup>[37]</sup>对采集自 3 个正常个体的 300 个大脑皮层和尾状核来源的单个神经元进行全基因组 L1 元件插入分析, 在绝大多数神经元中都检测不到体细胞插入, 提示 L1 元件插入并非是导致大脑皮层和尾状核神经多样性的一个主要来源。此外根据单细胞测序技术还能较准确推测基因变异的时间节点 (在胚胎发育过程中哪个时期发生), 比如对携带 *AKT3* 体细胞变异的单侧巨脑畸形 (HMG) 患者进行单细胞测序, 发现神经元细胞和神经胶质细胞都携带 *AKT3* 体细胞变异, 变异细胞占 1/3, 因此推测体细胞变异发生在神经元-神经胶质始祖细胞阶段。

目前神经系统疾病体细胞变异研究的难点在于脑组织细胞的获得有限, 而头发根部、脑脊液、口腔黏膜细胞可以替代脑组织细胞作为神经系统疾病研究的最佳组织细胞, 因为这些组织与脑组织细胞都发育于同一胚胎组织——外胚层。研究的另一个难点在于不同二代测序平台检出体细胞变异的灵敏度、特异度及准确性差异较大<sup>[38-40]</sup>。不同序列比对软件、不同参数设置 (如测序深度、测序质量、变异频率等) 都可以提高基因体细胞变异检出率, 尤其是插入缺失变异的检出率。在 Jamuar 等<sup>[26]</sup>的研究中, 应用 Illumina 测序平台时, 测序深度  $200\times$  方可以检出  $<20\%$  的体细胞基因变异。而 Ion Torrent 一些测序平台, 其筛查 Indel 特异性远远低于 Illumina 测序技术, Daber 等<sup>[41]</sup>改善了 Ion Torrent 数据分析流程, 不仅使单核苷酸变异检出灵敏性及特异性达到 100%, 同时长达 90 bp 的 Indel、低水平体细胞变异 (4%) 也可检出。

### 3 结语与展望

在生物体发育的任何时期均可发生类型多样的体细胞变异, 且细胞变异频率随年龄的增长而增加并存在组织特异性, 这些体细胞变异可引起正常生

物体衰老,也可引起疾病<sup>[8-14]</sup>。如上述可知,体细胞变异和神经系统肿瘤及发育异常类疾病的发生有着密切的关系,变异基因的功能、变异发生的时期(胚胎发育过程中的时间点)、基因变异的分布组织、变异细胞频率等均可影响疾病表型严重程度。新一代测序技术大大提高了体细胞变异检出的敏感性,可以检出既往测序技术无法察觉的低水平基因嵌合体变异,使临床遗传学家能够为患者提供更准确的遗传病因诊断<sup>[30-32]</sup>。而未来随着单细胞技术的发展及应用,科研人员能够系统的评估人类大脑的基因组多样性,能够更准确地知道相关体细胞变异发生的时期,细胞变异频率等,进而更准确地认识神经系统肿瘤及发育异常类疾病的发病机制,促进其临床诊断及新药的研发<sup>[37]</sup>。

### 参考文献(References):

- [1] Poduri A, Evrony GD, Cai X, Walsh CA. Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. *Science*, 2013, 341(6141): 1237758. [DOI]
- [2] Rondelli T, Berardi M, Peruzzi B, Boni L, Caporale R, Dolara P, Notaro R, Luzzatto L. The frequency of granulocytes with spontaneous somatic mutations: a wide distribution in a normal human population. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54046. [DOI]
- [3] Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Wong WSW, Sigurdsson G, Walters GB, Steinberg S, Helgason H, Thorleifsson G, Gudbjartsson DF, Helgason A, Magnusson OT, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Rate of *de novo* mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*, 2012, 488(7412): 471-475. [DOI]
- [4] Li R, Montpetit A, Rousseau M, Wu SYM, Greenwood CMT, Spector TD, Pollak M, Polychronakos C, Richards JB. Somatic point mutations occurring early in development: a monozygotic twin study. *J Med Genet*, 2014, 51(1): 28-34. [DOI]
- [5] Frank SA. Somatic evolutionary genomics: mutations during development cause highly variable genetic mosaicism with risk of cancer and neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(Suppl. 1): 1725-1730. [DOI]
- [6] Dollé MET, Giese H, Hopkins CL, Martus HJ, Hausdorff JM, Vijg J. Rapid accumulation of genome rearrangements in liver but not in brain of old mice. *Nat Genet*, 1997, 17(4): 431-434. [DOI]
- [7] Dollé MET, Snyder WK, Gossen JA, Lohman PHM, Vijg J. Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(15): 8403-8408. [DOI]
- [8] Vijg J. Somatic mutations and aging: a re-evaluation. *Mutat Res/Fund Mol M*, 2000, 447(1): 117-135. [DOI]
- [9] Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med*, 1991, 325(24): 1688-1695. [DOI]
- [10] Shirley MD, Tang H, Gallione CJ, Baugher JD, Frelín LP, Cohen B, North PE, Marchuk DA, Comi AM, Pevsner J. Sturge-Weber syndrome and port-wine stains caused by somatic mutation in *GNAQ*. *N Engl J Med*, 2013, 368(21): 1971-1979. [DOI]
- [11] Lindhurst MJ, Sapp JC, Teer JK, Johnston JJ, Finn EM, Peters K, Turner J, Cannons JL, Bick D, Blakemore L, Blumhorst C, Brockmann K, Calder P, Cherman N, Dardorff MA, Everman DB, Golas G, Greenstein RM, Kato BM, Keppler-Noreuil KM, Kuznetsov SA, Miyamoto RT, Newman K, Ng D, O'Brien K, Rothenberg S, Schwartzentruber DJ, Singhal V, Tirabosco R, Upton J, Wientroub S, Zackai EH, Hoag K, Whitewood-Neal T, Robey PG, Schwartzberg PL, Darling TN, Tosi LL, Mullikin JC, Biesecker LG. A mosaic activating mutation in *AKT1* associated with the Proteus syndrome. *N Engl J Med*, 2011, 365(7): 611-619. [DOI]
- [12] Poduri A, Evrony GD, Cai XY, Elhosary PC, Beroukheim R, Lehtinen MK, Hills LB, Heinzen EL, Hill A, Hill RS, Barry BJ, Bourgeois BFD, Riviello JJ, Barkovich AJ, Black PM, Ligon KL, Walsh CA. Somatic activation of *AKT3* causes hemispheric developmental brain malformations. *Neuron*, 2012, 74(1): 41-48. [DOI]
- [13] Rivièrè JB, Mirzaa GM, O'Roak BJ, Beddaoui M, Alcantara D, Conway RL, St-Onge J, Schwartzentruber JA, Gripp KW, Nikkel SM, Worthylake T, Sullivan CT, Ward TR, Butler HE, Kramer NA, Albrecht B, Armour CM, Armstrong L, Caluseriu O, Cytrynbaum C, Drolet BA, Innes AM, Lauzon JL, Lin AE, Mancini GM, Meschino WS, Reggin JD, Saggat AK, Lerman-Sagie T, Uyanik G, Weksberg R, Zirn B, Beaulieu CL, Majewski J, Bulman DE, O'Driscoll M, Shendure J, Graham JM, Jr., Boycott KM, Dobyns WB. De novo germline and postzygotic mutations in *AKT3*, *PIK3R2* and *PIK3CA* cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet*, 2012, 44(8): 934-940. [DOI]
- [14] Lee JH, Huynh M, Silhavy JL, Kim S, Dixon-Salazar T, Heiberg A, Scott E, Bafna V, Hill KJ, Collazo A, Funari V,



- Russ C, Gabriel SB, Mathern GW, Gleeson JG. *De novo* somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat Genet*, 2012, 44(8): 941–945. [DOI]
- [15] Garcia-Linares C, Fernández-Rodríguez J, Terribas E, Mercadé J, Pros E, Benito L, Benavente Y, Capellà G, Ravello A, Blanco I, Kehrer-Sawatzki H, Lázaro C, Serra E. Dissecting loss of heterozygosity (LOH) in neurofibromatosis type 1-associated neurofibromas: Importance of copy neutral LOH. *Hum Mutat*, 2011, 32(1): 78–90. [DOI]
- [16] Acuna-Hidalgo R, Bo T, Kwint MP, van de Vorst M, Pinelli M, Veltman JA, Hoischen A, Vissers LELM, Gilissen C. Post-zygotic point mutations are an underrecognized source of *de novo* genomic variation. *Am J Hum Genet*, 2015, 97(1): 67–74. [DOI]
- [17] Park CK, Lee SH, Kim JY, Kim JE, Kim TM, Lee ST, Choi SH, Park SH, Kim IH. Expression level of *hTERT* is regulated by somatic mutation and common single nucleotide polymorphism at promoter region in glioblastoma. *Oncotarget*, 2014, 5(10): 3399–3407. [DOI]
- [18] Chen XY, Lu F, Wang YM, Yang Y, Wei GQ, Wu D, Wang LF, Wu YM. *PTEN* inactivation by germline/somatic c.950\_953delTACT mutation in patients with Lhermitte-Duclos disease manifesting progressive phenotypes. *Clin Genet*, 2014, 86(4): 349–354. [DOI]
- [19] Wiest V, Eisenbarth I, Schmiegner C, Krone W, Assum G. Somatic *NF1* mutation spectra in a family with neurofibromatosis type 1: toward a theory of genetic modifiers. *Hum Mutat*, 2003, 22(6): 423–427. [DOI]
- [20] Wei JS, Johansson P, Chen L, Song YK, Tolman C, Li S, Hurd L, Patidar R, Wen XY, Badgett TC, Cheuk AT, Marshall JC, Steeg PS, Vaqué Díez JP, Yu YL, Gutkind JS, Khan J. Massively parallel sequencing reveals an accumulation of *de novo* mutations and an activating mutation of *LPAR1* in a patient with metastatic neuroblastoma. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77731. [DOI]
- [21] Zhang LW, Chen LH, Wan H, Yang R, Wang ZH, Feng J, Yang SH, Jones S, Wang SZ, Zhou WX, Zhu HS, Killela PJ, Zhang JT, Wu Z, Li GL, Hao SY, Wang Y, Webb JB, Friedman HS, Friedman AH, McLendon RE, He YP, Reitman ZJ, Bigner DD, Yan H. Exome sequencing identifies somatic gain-of-function *PPM1D* mutations in brainstem gliomas. *Nat Genet*, 2014, 46(7): 726–730. [DOI]
- [22] Insel TR. Brain somatic mutations: the dark matter of psychiatric genetics? *Mol Psychiatry*, 2014, 19(2): 156–158. [DOI]
- [23] Chen XL, Wang JM, Xie H, Zhou WJ, Wu Y, Wang J, Qin J, Guo J, Gu Q, Zhang XZ, Ji TY, Zhang Y, Xiong ZM, Wang LW, Wu XR, Latham GJ, Jiang YW. Fragile X syndrome screening in Chinese children with unknown intellectual developmental disorder. *BMC Pediatr*, 2015, 15: 77. [DOI]
- [24] Luo SY, Huang W, Xia QP, Xia Y, Du Q, Wu LQ, Duan RH. Cryptic *FMR1* mosaic deletion in a phenotypically normal mother of a boy with fragile X syndrome: case report. *BMC Med Genet*, 2014, 15: 125. [DOI]
- [25] Peprah E. Fragile X syndrome: the *FMR1* CGG repeat distribution among world populations. *Ann Hum Genet*, 2012, 76(2): 178–191. [DOI]
- [26] Jamuar SS, Lam ATN, Kircher M, D'Gama AM, Wang J, Barry BJ, Zhang XC, Hill RS, Partlow JN, Rozzo A, Servattalab S, Mehta BK, Topcu M, Amrom D, Andermann E, Dan B, Parrini E, Guerrini R, Scheffer IE, Berkovic SF, Leventer RJ, Shen YP, Wu BL, Barkovich AJ, Sahin M, Chang BS, Bamshad M, Nickerson DA, Shendure J, Poduri A, Yu TW, Walsh CA. Somatic mutations in *MTOR* cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nat Med*, 2015, 21(4): 395–400. [DOI]
- [27] Lim JS, Kim WI, Kang HC, Kim SH, Park AH, Park EK, Cho YW, Kim S, Kim HM, Kim JA, Kim J, Rhee H, Kang SG, Kim HD, Kim D, Kim DS, Lee JH. Brain somatic mutations in *MTOR* cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nat Med*, 2015, 21(4): 395–400. [DOI]
- [28] Pieras JI, Muñoz-Cabello B, Borrego S, Marcos I, Sanchez J, Madruga M, Antiñolo G. Somatic mosaicism for Y120X mutation in the *MECP2* gene causes atypical Rett syndrome in a male. *Brain Dev*, 2011, 33(7): 608–611. [DOI]
- [29] Huisman SA, Redeker EJW, Maas SM, Mannens MM, Hennekam RCM. High rate of mosaicism in individuals with Cornelia de Lange syndrome. *J Med Genet*, 2013, 50(5): 339–344. [DOI]
- [30] Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(4): 295–300. [DOI]
- [31] Pagnamenta AT, Lise S, Harrison V, Stewart H, Jayawant S, Quaghebeur G, Deng AT, Murphy VE, Akha ES, Rimmer A, Mathieson I, Knight SJ, Kini U, Taylor JC, Keays DA. Exome sequencing can detect pathogenic mosaic mutations present at low allele frequencies. *J Hum Genet*, 2012, 57(1): 70–72. [DOI]
- [32] Rohlin A, Wernersson J, Engwall Y, Wiklund L, Björk J, Nordling M. Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: comparison with four diagnostic DNA screening techniques. *Hum Mutat*, 2009, 30(6): 1012–1020. [DOI]

- [33] Cohen ASA, Wilson SL, Trinh J, Ye XC. Detecting somatic mosaicism: considerations and clinical implications. *Clin Genet*, 2015, 87(6): 554–562. [DOI]
- [34] Gutmann DH, McLellan MD, Hussain I, Wallis JW, Fulton LL, Fulton RS, Magrini V, Demeter R, Wylie T, Kandoth C, Leonard JR, Guha A, Miller CA, Ding L, Mardis ER. Somatic neurofibromatosis type 1 (NF1) characterizes NF1-associated pilocytic astrocytoma. *Genome Res*, 2013, 23(3): 431–439. [DOI]
- [35] Vrijenhoek T, Kraaijeveld K, Elferink M, de Ligt J, Kraendonk E, Santen G, Nijman IJ, Butler D, Claes G, Costessi A, Dorlijn W, van Eyndhoven W, Halley DJ, van den Hout MC, van Hove S, Johansson LF, Jongbloed JD, Kamps R, Kockx CE, de Koning B, Kriek M, Deprez RLD, Lunstroo H, Mannens M, Mook OR, Nelen M, Ploem C, Rijnen M, Saris JJ, Sinke R, Sistermans E, van Slegtenhorst M, Sleutels F, van der Stoep N, van Tienhoven M, Vermaat M, Vogel M, Waisfisz Q, Weiss JM, van den Wijngaard A, van Workum W, Ijntema H, van der Zwaag B, van Ijcken WF, den Dunnen JT, Veltman JA, Hennekam R, Cuppen E. Next-generation sequencing-based genome diagnostics across clinical genetics centers: implementation choices and their effects. *Eur J Hum Genet*, 2015, 23(9): 1142–1150. [DOI]
- [36] Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. 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. *Genet Med*, 2015, 17(5): 405–423. [DOI]
- [37] Evrony GD, Cai XY, Lee E, Bunjung Hills L, Elhosary PC, Lehmann HS, Parker JJ, Atabay KD, Gilmore EC, Poduri A, Park PJ, Walsh CA. Single-neuron sequencing analysis of L1 retrotransposition and somatic mutation in the human brain. *Cell*, 2012, 151(3): 483–496. [DOI]
- [38] Goode DL, Hunter SM, Doyle MA, Ma T, Rowley SM, Choong D, Ryland GL, Campbell IG. A simple consensus approach improves somatic mutation prediction accuracy. *Genome Med*, 2013, 5(9): 90. [DOI]
- [39] Koboldt DC, Larson DE, Wilson RK. Using VarScan 2 for Germline Variant Calling and Somatic Mutation Detection. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2013, 44: 15.4.1–15.4.17. [DOI]
- [40] Xu HL, DiCarlo J, Satya RV, Peng Q, Wang YX. Comparison of somatic mutation calling methods in amplicon and whole exome sequence data. *BMC Genomics*, 2014, 15: 244. [DOI]
- [41] Daber R, Sukhadia S, Morrisette JJD. Understanding the limitations of next generation sequencing informatics, an approach to clinical pipeline validation using artificial data sets. *Cancer Genet*, 2013, 206(12): 441–448. [DOI]

(责任编辑: 吴志英)