



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.11.001

<http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.11.001>

· 综述与讲座 ·

精准医学在疑难肝病中的应用

孔晓飞

[关键词] 慢性肝脏疾病; 遗传学; 精准医学

2008 年, 12 岁的 Elana Simon 被诊断为一种罕见的肝脏肿瘤——纤维板层型肝细胞癌 (FL-HCC), 这是一种好发于年轻人的恶性肝脏肿瘤, 部分患者因出现远处转移、没有有效治疗的方法而死亡^[1]。Elana 在纽约斯隆肿瘤中心 (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) 完成肝脏肿瘤切除手术, 而她的父亲 Sanford Simons 是一位国际著名的细胞生物学家, 研究细胞内不同囊泡之间的蛋白转运, 因为女儿的疾病转而开始研究一个全新方向——纤维板层型肝细胞癌。他采用全外显子测序和肿瘤细胞核糖核酸测序 (RNA-Seq) 技术对 15 例类似患者的肿瘤进行遗传分析, 发现所有患者遗传学上存在基因缺失的共同特点, 两个相邻的基因 DNAJB1 和 PRKACA 之间一段 DNA 序列消失, 在 mRNA 水平 DNAJB1 和 PRKACA 之间形成一种嵌合状态。PRKACA 在正常肝细胞中处于低表达状态, 而由于其固有基因调控区域的缺失, PRKACA 受到 DNAJB1 的启动子调节, 导致嵌合的 PRKACA 基因过度表达, 而 PRKACA 基因编码一个具备激酶活性的蛋白, 引起癌变。Elana 作为一名高中生, 学习之余在父亲的实验室研究自己的疾病, 并在《科学》杂志报道了研究成果, 受到总统接见, 19 岁时进入哈佛大学读本科^[2]。她的故事还在延续, 在后续的研究中她研究了嵌合激酶引起的下游基因活化, 而其他课题组则构建了动物模型, 筛选可以治疗此病的药物^[3]。Elana 的故事很有感染力, 她是一名年轻的患者, 也是一位科研人员, 在精准医学计划 (Precision Medicine Initiative) 的启动仪式上, 她用自己的经历告诉大家, 要从临床现象出发, 研究现象背后的本质, 理解年轻的她们或者应该说是“我们”, 为什么会患这样稀奇古怪的疾病, 有什么样的办法可以治愈? 在大学期间, 笔者的母亲诊断为不明原因肝硬化, 遗憾的是她没有 Elana 这样的资源, 在过去近二十年的临床和科研中, 笔者先后在上海

交通大学医学院附属瑞金医院、巴黎 Necker 儿童医院、纽约洛克菲勒大学和哥伦比亚大学学习与工作, 试图用遗传的方法, 以患者的需求为出发点, 以解决临床问题作为目的, 探索基因与疾病之间的内在联系。

本文旨在回顾和展望目前精准医学在肝脏疾病中的应用进展, 从纤维板层型肝细胞肝癌的遗传学研究入手, 强调精准医学在人类遗传大数据的进展和战略性计划, 阐述精准医学中易患人群、学术界和企业之间的相互关系, 回顾一些具有影响力的遗传改变引起的肝脏疾病, 包括代谢或免疫相关的肝脏疾病, 展望人工智能在肝脏疾病的临床与遗传诊断之间的转化作用。

一、精准医学的起源与兴起

精准医学 (Precision Medicine) 的起源来自于对遗传认知和分析技术的不断进步^[4], 孟德尔的豌豆, 达尔文的鸟嘴, 摩尔根的果蝇, 从 Crick-Watson 的双螺旋结构到 Oswald Avery 的转化因子试验, 从定位克隆到人类基因组计划, 从认识染色体到基因序列分析, 从诱导多能干细胞到基因编辑, 从电子病历系统到人工智能, 涌现出了一系列影响人类未来的技术性革命。二十一世纪是生命医学的世纪, 在这个历史进程之中, 基础科学的进步将给临床实践带来质的飞越, 试想如果没有核酸检测技术, 在一线战斗的我们又如何能鉴别感染性肺炎是由新型冠状病毒所引起? 2005 年前后, 第二代测序技术开始广泛应用于 DNA 和 RNA 的序列分析中, 与传统的第一代测序相比, 二代测序可以同时对人类所有基因进行序列分析, 产生海量数据, 而对这些数据进行筛选, 可以评估获得对疾病预防、诊断和治疗具有实际价值的信息。精准医学有别于随机对照双盲的临床试验, 是强调个体化的方案, 在躯体上表现出来的一种临床疾病, 尽管一群该病患者看上去很相似, 而实际上各有各的区别。靶向和个体化治疗已经在肿瘤的临床诊治中广泛运用。根据肿瘤遗传学特征, 如果发现 Bcl-Abl 融合基因或 C-Kit 基因变异, 就

可以采用靶向药物格列卫治疗。精准医学的研究目的是寻找与个体疾病直接相关的遗传和环境因素,广泛采用各种组学技术,而基因组学技术是精准医学的核心组成部分。

为了推动精准医学在临床中的应用,美国各大临床医学中心纷纷成立直接服务于临床的遗传检测机构、或隶属于病理系、或完全独立的分子遗传或基因组学中心,亦有遗传研究基础雄厚的临床科室直接担负重任。美国国立人类基因组研究所设立了与临床遗传相关的多中心研究项目,如肿瘤遗传图谱、临床基因组资源(ClinGen)、电子病历和基因组学网络(eMerge)、新生儿测序和公共卫生(NSIGHT)、未诊断疾病网络(UDN)^[5],同时也有伦理和法律相关的研究,这些研究项目是人类基因组计划的延续,也为临床遗传诊断提供了参考蓝图和信息资源。以 ClinGen 为例^[6],他们对导致人类单基因疾病的致病基因和相关变异进行了整理和分析,对既往报道有误的突变进行校正。以疾病类型分类,多个临床遗传专家根据现有的遗传和临床数据进行分析,来判断某个突变是否具有临床诊断价值,并以美国医学遗传协会(ACMG)临床遗传诊断指南为依据发布报告。UDN 以美国国立卫生研究院(NIH)为网络核心,提供多中心项目配套支持,为遗传疾病的诊断、基因功能分析和资源统一及整合提供基础。2015 年启动精准医学计划后,All of Us 计划对生活在美国的不同族裔总计一百万人进行健康研究。All of Us 计划收集电子病历数据、健康问卷、体格检查资料、电子健康资料及对生物学标本的系统分析(包括遗传分析)^[7]。目前大规模的数据库系统 Genome Aggregation Database(Gnomad)、Exome Variant Server(EVS)、HGMD、ClinVar 成为临床遗传诊断中不可或缺的工具。除政府之外,一些生物制药公司将目光瞄准遗传资源,研究中所发现的遗传改变成为治疗疾病的靶向,如 Regeneron 公司与 Geisinger 医院合作对数十万美国宾夕法尼亚州居民进行遗传体检,发现了脂肪肝和肝硬化相关的保护基因,而公司与医疗系统遗传合作的这一趋势目前仍在扩大。在欧洲,Orphanet 为罕见病患者和孤儿药提供信息服务,英国的生物样本库(UK Biobank)有近 50 万志愿者的遗传和长期随访临床数据,科研人员可以申请开放研究计划。如果没有这些遗传基础设施建设,单纯讨论一种疾病的精准医学应用则是水中月,梦中花。

二、代谢相关疾病的肝脏表现

在欧美国家,脂肪肝俨然已成为肝脏的“头号杀手”脂肪肝导致的终末期肝脏病已经成为接受肝移植

的首要原因。脂肪肝在临床上表现多样,有肥胖直接相关的脂肪肝,也有体重正常的脂肪肝。根据病理表现是否有炎症将非酒精性脂肪肝分为非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

代谢研究的辉煌时期是五十年前,通过生物化学的方法来研究各种代谢所需的底物、关键酶和下游产物。Banting 发现了胰岛素,李卓浩发现了促肾上腺皮质激素。一只被称为 ob/ob 的肥胖小鼠引起 Jeffrey Friedman 关注,历时 8 年,在遗传标志位点稀缺的时代,成功克隆了瘦素基因(Leptin)^[8]。临床上目前有瘦素、瘦素受体、MC4R、SIM1 等单基因缺陷引起的能量平衡障碍,并导致肥胖和脂肪肝的发生。Hobbs 等^[9]在达拉斯心脏研究队列中通过关注临床表现极端罕见的患者,发现 PCSK9 基因及其在胆固醇调节中具有重要作用,而针对 PCSK9 的单抗药物目前已用于临床高脂血症患者,尤其是对他汀类药物治疗无效的患者。Helen Hobbs 的团队在脂肪肝遗传因素的研究中还发现了 PNPL3 基因与脂肪肝的相关性,其团队和 Regeneron 同时报道了 HSD17B13 基因在脂肪肝和其他慢性肝病中的保护作用,而目前众多的制药企业已将 HSD17B13 作为治疗脂肪肝的靶向开发药物^[10-11]。

脂肪在肝脏中的异常堆积还可以出现在一些罕见的肝脏疾病中。急性妊娠脂肪肝(AFLP)是一种起病急、同时危及母婴安全的疾病。2005 年一名 27 岁的女性妊娠患者出现急性肝衰竭,伴胆酶分离、凝血功能异常、肝性脑病、脑水肿、低血糖、急性肾功能衰竭,在行紧急剖腹产术后,病情依然恶化,李宏为教授的肝移植团队对该患者行肝移植术,一个月后母婴转危为安^[12]。切除的肝脏病理检查结果提示肝细胞广泛微小囊泡状脂肪滴沉积,查阅文献提示线粒体脂肪酸代谢通路的异常可引起此病,于是在张欣欣教授的指导下,我们对患者及其家属进行脂肪酸代谢产物的质谱分析,并对长链脂肪酸脱氢酶基因(LCHAD)进行测序,但并未发现基因缺陷。虽然是一个阴性的遗传结果,但这名患者却指引我们继续考虑遗传学在临床肝病上的应用。此后,我们陆续收集到一些肝功能检查结果反复异常、临床病理诊断为脂肪肝的患者。一个家庭中两名十几岁的男孩转氨酶始终在 200 IU/ml 左右,保肝降酶处理并不能解决实际问题,这两名患者还偶尔有低血糖并伴肌酶异常,且在脂肪酸质谱检查时发现存在中链脂肪酸水平明显升高。李新华博士排除了其中链脂肪酸脱氢酶缺陷(MCAD)和 I 型糖原累积症的可能,在对患者临床代谢信息进一步整理和扩大疑似基因范围后,发现这两个患者都是 III 型糖原累积症^[13]。遗传学上的确诊为临床治疗提供了直接指导

依据,这一结果与国际上报道的糖原累积症引起的脂肪肝不谋而合。

肝脏作为重要的代谢器官,临床医生一方面要意识到广泛鉴别诊断的重要性,同时也需要一个可以协作的会诊中心。在过去的临床实践和遗传研究中,先后对患有红细胞生成型原卟啉病^[14]、急性间隙性卟啉病^[15]、Wilson's 病、血色素病、溶酶体病、先天性糖基化障碍、原发性高草酸尿症、囊性纤维化、抗胰蛋白酶缺陷的肝脏病患者进行了遗传诊断和随访治疗,这些遗传疾病的诊断与对应靶向孤儿药物应用已经越来越受到重视。

三、遗传缺陷和肝脏感染与炎症

目前,病毒性肝炎仍是危害人类健康的重要疾病,对病毒性肝炎宿主遗传易感性的研究由来已久,是否存在单基因缺陷从而导致病毒性肝炎感染相关的严重临床表现目前仍在探索之中,而全基因关联分析(GWAS)结果对临床的指导价值有限。在这个领域可以关注周刚桥、贺福初、Andrian V. S Hill、David Goldstein 等在遗传易感性^[16]、干扰素治疗应答方面的研究。我们曾尝试在乙型肝炎病毒(HBV)感染中采用病例对照设计研究干扰素相关基因单核苷酸基因多态性与临床表型的相关性,主要问题是明显的统计学差异下微弱的相对危险度。近年来李文辉团队发现 HBV 受体 SLC10A1(NTCP)其中基因的一个 S267F 单核苷酸多态性(SNP)在体外的细胞学研究中存在功能障碍,部分报道称该 SNP 与 HBV 患者的临床预后具有相关性^[17],但未能在大规模的 GWAS 数据中证实^[18]。在丙型肝炎病毒(HCV)感染领域,随着 Sofia 等^[19]对原药进行开创性的侧链改造,研发可以治愈 HCV 的关键药物索非布韦,目前用于支持丙型肝炎的研究基金急剧萎缩,而在临床一线甚至已将 HCV 感染者作为肝移植的供体。

病毒感染导致暴发型肝炎是一种临床罕见的急性肝衰竭,患者既往无肝脏疾病史,起病 2 周内出现以凝血障碍和肝性脑病为主的症候群,病理结果表现为大片肝组织坏死。我的博士导师 Jean-Laurent Casanova 一直致力于儿童重症感染与单基因缺陷的研究。最近在一例近亲结婚的家系里,先证者在感染甲型肝炎病毒后发生肝衰竭,通过家系全外显子测序,发现先证者存在常染色体隐性(AR)白细胞介素(IL)-18BP 缺陷,IL-18BP 能够抑制炎症反应的过度激活,而 IL-18BP 的缺陷导致免疫系统攻击肝细胞,类似与炎症风暴中看到的肝脏损伤^[20]。在单基因缺陷导致的免疫缺陷性疾病中,一系列患者出现肝脏问题,STAT-1 基因能够

调节三种不同亚型干扰素的应答,播散性疱疹病毒感染[EB 病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)、人疱疹病毒(HHV)-6]引起重症肝损伤在 AR STAT-1 完全缺陷患者中已有报道。I 型干扰素受体 IFNAR1 和 IFNAR2 完全缺陷患者可以出现接种活疫苗之后的严重感染,包括由麻腮风三联疫苗(MMR)、黄热病疫苗引起的肝脏损害,均可能出现继发性噬血细胞淋巴细胞增生症(HLH)^[21-22]。在单基因缺陷导致的自身免疫性淋巴细胞增生性增殖症(ALPS)中,患者存在淋巴细胞凋亡障碍,90% 患者有脾肿大,40%~50% 的患者出现脾肿大,FADD 基因缺陷的患者出现严重肝脏病变^[23]。肝内金黄色葡萄球菌感染引起的脓肿在慢性肉芽肿病患者中时有报道^[24],而肺炎克雷伯氏菌感染导致的肝脏脓肿其遗传因素尚在研究中。肝内侵袭性真菌感染在功能获得型(Gain-of-function)STAT1 和 AR CARD9 缺陷患者中被报道^[25]。此外,隐孢子虫引起的胆道感染、胆管炎和肝硬化是 IL-21 受体(AR IL-21R)完全缺陷的重要临床表现^[26]。

部分原发性免疫缺陷的患者临床可以出现自身免疫性肝炎的表现,如 AIRE 基因缺陷导致的自身免疫多内分泌腺病综合征(APECED)。普通异变型免疫缺陷(CVID)又称迟发性低丙种球蛋白血症,其临床表现谱极广泛,患者有反复慢性感染,IgG 水平低下,对疫苗应答差。CVID 既可能是单基因引起的免疫缺陷,也可以是多基因参与致病,致病基因涵盖 ICOS、TACI、BAFF-R、PIK3CD 等,这一系列基因在 B 淋巴细胞发育、增殖和分化中具有重要功能。自身免疫病、淋巴细胞增殖性疾病和肿瘤在 CVID 患者中并不罕见。在部分 CVID 患者中可以同时出现免疫性肠病(如乳糜泻[Celiac Disease])和肝脏疾病,后者可以表现为碱性磷酸酶升高、NRH、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化(PBC)/原发性硬化性胆管炎(PSC),甚至发展为肝硬化和肝癌^[27]。

四、肝脏疾病遗传诊断的人工智能开发

在基因和临床表型因果关系中,目前 OMIM 数据库已知引起肝脏异常的单基因疾病共涉及 400 余基因,在笔者过去的临床遗传诊断中,有 JAG1 基因变异导致的 Alagille 综合征,或 NOTCH 相关基因变异引起的胆道闭锁,凝血因子 V 基因缺陷导致的肝内血栓,HNF1A 变异引起的肝细胞腺瘤,TALDO1 基因(转醛醇酶)变异引起的肝病,显性和隐性多囊肾多囊肝,胆汁代谢障碍和进行性家族性肝内胆汁淤积症。随着二代测序的普及,单基因缺陷导致的肝脏疾病仍在不断的生长,如胆道闭锁患者与 PKD1L1^[28]、非特异性门脉

高压症患者与 DGUOK^[29]、反复肝衰竭与 NBAS 和 RINT1^[30-31] 等。

如何利用临床数据和下一代基因测序分析对疑难肝脏疾病进行快速准确的诊断是很多科研人员关心的问题。一套人工智能诊断系统势在必行,部分研究已经开始将人工智能应用于临床,如把 OMIM 单基因疾病所涉及的临床问题换成 ICD-10,一个基因对应数个相关的 ICD-10;而在遗传方面,把 400 余个肝脏相关基因的致病变异进行标记。这样一方面能在患者电子病历中调用 ICD-10 code,寻找 OMIM 中可能的疾病,另一方面从测序的结果中筛查可能致病的突变,再返回 OMIM 之中寻找最佳的临床表型-基因型的配对,以此对患者进行快速的遗传诊断^[32]。

综上所述,随着精准医学的发展,我们通过遗传研究不断更新知识,认清疾病的本质,也为未来医学科学的发展提供方向。

参 考 文 献

- [1] Honeyman JN, Simon EP, Robine N, et al. Detection of a recurrent DNAJB1-PRKACA chimeric transcript in fibrolamellar hepatocellular carcinoma[J]. Science, 2014, 343(6174): 1010-1014.
- [2] Kaiser J. Obama gives East Room rollout to Precision Medicine Initiative [EB/OL]. [2020-1-30]. <https://www.sciencemag.org/news/2015/01/obama-gives-east-room-rollout-precision-medicine-initiative>.
- [3] Engelholm LH, Riaz A, Serra D, et al. CRISPR/Cas9 Engineering of Adult Mouse Liver Demonstrates That the Dnajb1-Prkaca Gene Fusion Is Sufficient to Induce Tumors Resembling Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma[J]. Gastroenterology, 2017, 153(6): 1662-1673.
- [4] Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine[J]. N Engl J Med, 2015, 372(9): 793-795.
- [5] Gahl WA, Wise AL, Ashley EA. The undiagnosed diseases network of the National Institutes of Health: A National Extension[J]. JAMA, 2015, 314(17): 1797-1798.
- [6] Gene Curation. The Gene Curation Working Group aims to develop evidence-based methods for evaluating gene-disease associations to support gene curation activities across the ClinGen project [EB/OL]. [2020-4-30]. <https://clinicalgenome.org/working-groups/gene-curation/>.
- [7] Denny JC, Rutter JL, Goldstein DB, et al. The "All of Us" Research Program[J]. N Engl J Med, 2019, 381(7): 668-676.
- [8] Friedman JM. A tale of two hormones[J]. Nat Med, 2010, 16(10): 1100-1106.
- [9] Hobbs H, Neill US. A conversation with Helen Hobbs[J]. J Clin Invest, 2015, 125(10): 3725-3726.
- [10] Abul-Husn NS, Cheng X, Li AH, et al. A Protein-Truncating HSD17B13 Variant and Protection from Chronic Liver Disease[J]. N Engl J Med, 2018, 378(12): 1096-1106.
- [11] Kozlitina J, Stender S, Hobbs HH, et al. HSD17B13 and Chronic Liver Disease in Blacks and Hispanics[J]. N Engl J Med, 2018, 379(19): 1876-1877.
- [12] Kong XF, Zhang XX, Yu YY, et al. No mutation was found in the alpha-subunit of the mitochondrial tri-functional protein in one patient with severe acute fatty liver of pregnancy and her relatives[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(12): 2107-2111.
- [13] Li XH, Gong QM, Ling Y, et al. Inherent lipid metabolic dysfunction in

- glycogen storage disease IIIa[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 455(1-2): 90-97.
- [14] Kong XF, Ye J, Gao DY, et al. Identification of a ferrochelatase mutation in a Chinese family with erythropoietic protoporphyria[J]. J Hepatol, 2008, 48(2): 375-379.
- [15] Kong XF, Han Y, Li XH, et al. Recurrent porphyria attacks in a Chinese patient with a heterozygous PBGD mutation[J]. Gene, 2013, 524(2): 401-402.
- [16] Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus[J]. Nature, 2009, 461(7265): 798-801.
- [17] Peng L, Zhao Q, Li Q, et al. The p. Ser267Phe variant in SLC10A1 is associated with resistance to chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2015, 61(4): 1251-1260.
- [18] Zhang Y, Li Y, Wu M, et al. Comprehensive assessment showed no associations of variants at the SLC10A1 locus with susceptibility to persistent HBV infection among Southern Chinese[J]. Sci Rep, 2017, 7: 46490.
- [19] Sofia MJ. Enter Sofosbuvir: The Path to Curing HCV[J]. Cell, 2016, 167(1): 25-29.
- [20] Belkaya S, Michailidis E, Korol CB, et al. Inherited IL-18BP deficiency in human fulminant viral hepatitis[J]. J Exp Med, 2019, 216(8): 1777-1790.
- [21] Duncan CJ, Mohamad SM, Young DF, et al. Human IFNAR2 deficiency: Lessons for antiviral immunity[J]. Sci Transl Med, 2015, 7(307): 307ra154.
- [22] Hernandez N, Bucciol G, Moens L, et al. Inherited IFNAR1 deficiency in otherwise healthy patients with adverse reaction to measles and yellow fever live vaccines[J]. J Exp Med, 2019, 216(9): 2057-2070.
- [23] Bride K, Teachey D. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease[J]. F1000 Res, 2017, 6: 1928.
- [24] Lublin M, Bartlett DL, Danforth DN, et al. Hepatic abscess in patients with chronic granulomatous disease[J]. Ann Surg, 2002, 235(3): 383-391.
- [25] Corvilain E, Casanova JL, Puel A. Inherited CARD9 Deficiency: Invasive Disease Caused by Ascomycete Fungi in Previously Healthy Children and Adults[J]. J Clin Immunol, 2018, 38(6): 656-693.
- [26] Kotlarz D, Ziegler N, Uzel G, et al. Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome[J]. J Exp Med, 2013, 210(3): 433-443.
- [27] Song J, Lleo A, Yang GX, et al. Common Variable Immunodeficiency and Liver Involvement[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2018, 55(3): 340-351.
- [28] Berauer JP, Mezina AI, Okou DT, et al. Identification of Polycystic Kidney Disease 1 Like 1 Gene Variants in Children With Biliary Atresia Splenic Malformation Syndrome[J]. Hepatology, 2019, 70(3): 899-910.
- [29] Vilarinho S, Sari S, Yilmaz G, et al. Recurrent recessive mutation in deoxyguanosine kinase causes idiopathic noncirrhotic portal hypertension[J]. Hepatology, 2016, 63(6): 1977-1986.
- [30] Haack TB, Stauffer C, Köpke MG, et al. Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy[J]. Am J Hum Genet, 2015, 97(1): 163-169.
- [31] Cousin MA, Conboy E, Wang JS, et al. RINT1 Bi-allelic Variations Cause Infantile-Onset Recurrent Acute Liver Failure and Skeletal Abnormalities[J]. Am J Hum Genet, 2019, 105(1): 108-121.
- [32] Bastarache L, Hughey JJ, Hebring S, et al. Phenotype risk scores identify patients with unrecognized Mendelian disease patterns[J]. Science, 2018, 359(6381): 1233-1239.

(收稿日期:2020-10-14)

(本文编辑:余晓曼)