

• 综 述 •

无创性产前诊断研究进展及甲基化技术的应用*

陈 熙 综述,熊礼宽[△] 审核

(广东省深圳市宝安区妇幼保健院 518133)

关键词:产前诊断; 甲基化; 实验室技术和方法; 研究

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.027

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)09-1084-03

出生缺陷可导致婴儿死亡、儿童患病或长期残疾,是当今世界各国引以重视的问题。出生缺陷干预的关键是预防,在很大程度上依赖于产前筛查和产前诊断。建立无创伤性、早期、快速、准确的产前诊断方法,降低产前诊断风险是近年来实验诊断学研究热点。

1 无创性产前诊断的研究进展

1.1 胎儿有核红细胞的分离 自 20 世纪 50 年代学者们从孕妇外周血中发现胎儿细胞后人们开始利用这类细胞进行无创性产前诊断的应用研究,目前常用的胎儿有核红细胞分离技术主要有密度梯度离心法、流式细胞仪分选法、磁激活细胞分选法以及亲和素分离法、单细胞显微操作分离法和微流控技术等^[1-2]。但因孕妇外周血胎儿红细胞数量少,分离纯化技术复杂且价格昂贵,限制了其临床推广应用。

1.2 胎儿游离 DNA

1.2.1 特点 随着对遗传病分子基础认识的不断深入,检测特异基因突变的技术能力不断提高,为发展以 DNA 检测为基础的产前诊断提供了理论和技术基础。最早于肿瘤患者血浆中证实存在肿瘤来源的 DNA,引起人们对外周血循环中游离核酸的生物学及其在诊断方面的应用价值产生了极大兴趣。1997 年 Lo 等^[3]利用传统聚合酶链反应(PCR)首次发现在孕妇血浆中存在游离的胎儿 DNA,不久其他学者也证实了循环胎儿 DNA 的存在,并已显示出其潜在的临床应用价值。胎儿游离 DNA 被认为是来源于胎盘滋养层细胞的溶解或是从自然凋亡的胎儿细胞中释放出来的。Lo 等^[4]通过对妊娠期、产后妇女血浆中胎儿细胞内 DNA 和胎儿游离 DNA 的比较发现,59%孕妇在孕 5~8 周时血浆中即能检测到胎儿游离 DNA,在孕 7~16 周时明显升高,并随孕周增加而升高,于分娩时达到高峰。在对胎儿游离 DNA 清除率的研究中发现,血浆中胎儿游离 DNA 半衰期短,平均 16.3 min,其水平能实时地反映胎儿 DNA 的生成和清除。因此,孕妇外周血中胎儿游离 DNA 的代谢动力学相对于有核红细胞具有浓度高、清除快、高敏感性、且易于分析的特征。这种循环胎儿游离 DNA 的存在为无创性产前诊断提供了一种新途径。

1.2.2 临床应用 目前研究主要集中在遗传病的产前诊断和妊娠并发症的筛查等方面。

1.2.2.1 性别鉴定 Duchenne 型肌营养不良症(DMD)是一种严重致死性 X 连锁隐性遗传病,其临床表现以肌肉的进行性萎缩和无力为特征,患者多在 20 岁前死亡,因而进行胎儿性别鉴定和 DMD 基因的产前诊断非常必要。Miura 等^[5]选取 3 例孕 9~12 周的妊娠 DMD 高风险患儿的孕妇血浆标本,通过

PCR 技术检测胎儿游离 DNA,准确鉴定胎儿性别,结果与后续追踪的绒毛、羊水染色体核型及 B 超检查结果一致。

1.2.2.2 血型检测 母婴 Rh 血型不合可导致胎儿宫内死亡和出生后核黄疸、智力障碍等新生儿溶血病(HDN),早期产前诊断和治疗具有重要意义。Achargui 等^[6]选取 120 例孕 10~40 周 RhD 阴性孕妇,通过传统的 PCR 检测母血浆 DNA 标本的 RhD 第 7、10 外显子,其结果与新生儿红细胞分析相比较,阳、阴性预测值的准确率分别为 98.7%、96.7%。Cardo 等^[7]从 111 例孕 9~13 周 RhD 阴性孕妇的外周血中提取 DNA 进行 RhD 基因第 5、7 外显子的定量 PCR 扩增,所得结果与新生儿脐血相比较,准确率仅为 97.0%,有待进一步提高。

1.2.2.3 珠蛋白生成障碍性贫血(旧称:地中海贫血)筛查 珠蛋白生成障碍性贫血是由于常染色体遗传性缺陷,引起珠蛋白肽合成障碍,导致珠蛋白肽链数量不足或完全缺乏,而造成血红蛋白合成量减少。该病严重影响儿童健康,加剧患儿家庭经济负担。Ho 等^[8]采用荧光定量 PCR(FQ-PCR)对 30 例 α -珠蛋白生成障碍性贫血高危孕妇的血浆标本中胎儿游离 DNA 进行染色体微卫星标志(16PTEL05、16PTEL06)内的断裂点区域缺失分析,准确地排除了 10 例非 HbBart's 病胎儿,避免了有创性产前诊断的实施。

1.2.2.4 子痫预测 先兆子痫是妊娠过程中发生卒中的风险因素,合体滋养层的小片段脱落进入母血循环刺激炎症应答被认为是其潜在的原因。Illanes 等^[9]收集孕 11~14 周妊娠男性胎儿的孕妇血浆标本,使用实时荧光定量 PCR 对 Y 染色体上 DSY14 基因进行定量检测,发现在后来发展成为先兆子痫孕妇外周血中胎儿游离 DNA 水平在早孕期已明显高于同孕龄正常孕妇对照组,增加约 1.67 倍。而且通过逻辑回归分析,母血中胎儿游离 DNA 水平与先兆子痫和胎儿宫内生长受限发生的风险率呈等级相关,提示孕妇外周血中胎儿游离 DNA 水平变化是一项预测和诊断子痫前期发病与疾病程度的新指标,具有较高的临床应用价值。

因此,利用孕妇外周血中胎儿游离 DNA 对胎儿性别、血型鉴定,以及性连锁遗传性疾病^[10]、珠蛋白生成障碍性贫血^[11]等基因病的诊断,子痫的预测,非整倍体胎儿的筛查^[12]是一种简便、快速、但特异性和准确性还有待进一步提高的产前诊断方法。由于母亲血浆中的胎儿游离 DNA 处于一种母体 DNA 背景过多的环境中,对孕妇外周血中游离胎儿核酸的应用大多局限在检测胎儿从父亲一方继承来的基因或突变,如多数学者以 Y 染色体上性别决定因子 SRY 基因等特异序列为标记进行胎儿 DNA 的检测,该方法虽然特异性高,但仅限

* 基金项目:深圳市科技计划基金资助项目(201103047);广东省科技厅社会发展基金资助项目(2011B031800384)。 [△] 通讯作者, E-mail: xionglk@yahoo.com.cn。

于对男性胎儿 DNA 的检测,因此,受胎儿性别限制程度大。也有学者通过分析胎儿来源于父方与母方不同的核苷酸序列的遗传多态性来鉴别胎儿 DNA^[13],但需要有多重遗传标志来保证母体和胎儿 DNA 的区别,实验复杂程度高,目前尚难应用于临床。

2 表观遗传学中甲基化检测技术及 CpG 岛位点的研究

DNA 甲基化是指由 DNA 甲基化转移酶介导,以 S-腺苷-L-甲硫氨酸为甲基供体,在胞嘧啶 5' 位碳原子上加入一甲基基团,使之变成 5'-甲基胞嘧啶的化学反应。采用亚硫酸氢盐对 DNA 进行化学修饰,是 DNA 甲基化研究的一种常用方法,其原理是单链 DNA 中未发生甲基化的胞嘧啶残基可被亚硫酸氢盐脱氨基而转变成尿嘧啶残基,而甲基化的胞嘧啶残基将不发生改变。甲基化特异性 PCR(MS-PCR)是在使用亚硫酸氢盐处理的基础上进行引物特异性的 PCR。利用 PCR 对所需要的基因序列进行扩增,然后对 PCR 产物进行测序分析与未经修饰的基因序列进行比较,这样甲基化和未甲基化 DNA 序列的差异性可在经亚硫酸氢盐修饰后利用不同引物区分开来,从而判断特定基因位点是否发生了甲基化。

随着对孕妇外周血中胎儿核酸的发现和研究的深入,人们认识到母婴之间的交换是一个相互影响的过程。因此,推论表观遗传学或许可在分析细胞和 DNA 在母婴之间是如何转移的过程中起一定作用。在哺乳动物中 DNA 甲基化主要发生在 CpG 双核苷酸序列的胞嘧啶上,与其他双核苷酸序列相比,这种序列在基因组中出现的频率很低,但在基因组的某些区域 CpG 序列的密度很高,达均值的 5 倍以上,这些 CpG 聚集区域被形象的称为 CpG 岛。许多研究认为 CpG 岛内胞嘧啶甲基化而形成的 5'-甲基胞嘧啶与许多人类疾病特别是肿瘤和遗传病的发生密切相关^[14-16]。人们推测孕妇外周血中也有可能出现相似现象或许可以利用母亲和胎儿的 DNA 甲基化的差异性来突破在母血浆中检测胎儿 DNA 的局限性。

3 候选生物标记及甲基化检测技术在无创性产前诊断中的应用

3.1 18 号染色体上的基因 maspin 基因表达于人正常乳腺上皮细胞中,其编码蛋白是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族中的一种,在妇科肿瘤的发生过程中起重要作用。Chim 等^[17]研究发现孕妇自身血细胞中位于 18 号染色体上的 maspin 基因的启动子区域呈超甲基化状态,而在胎盘组织中呈低甲基化状态。通过实时定量 PCR 可以检测到孕妇血浆中低甲基化的 maspin 基因序列中存在胎儿 SNPs 基因型,但在分娩后 24 h 内低甲基化的 maspin 片段很快被清除,提示母血中来自胎盘组织来源的低甲基化状态 maspin 基因启动子是一个良好的通用型胎儿特异标记物,不受胎儿性别和遗传多态性的影响,为定量分析通用型胎儿特异标记物带来了希望。Tong 等^[18]用等位基因比率法分析 18-三体 and 整倍体胎儿的 maspin 基因,发现所有检测的 18-三体样本的等位比值都明显偏离了整倍体样本的比值,成功诊断出 7 例 18-三体胎儿。

3.2 3 号染色体上的基因 Ras 相关结构域家族基因 1A (RASSF1A)是近年来发现的候选肿瘤抑制基因,其可能是 Ras 下游信号传导中的一个效应物,抑制了 Ras(癌蛋白)的活化。启动子 CpG 岛异常甲基化是 RASSF1A 失活的重要机制,RASSF1A 表达缺失可能使 Ras 更多地发挥促进生长效应而最终导致肿瘤的发生。Chan 等^[19]和 Bellido 等^[20]发现 RASSF1A 基因在胎盘细胞中处于高甲基化而在母体自身血细胞中处于低甲基化。Zejskova 等^[21]应用甲基化敏感限制性内切酶 (MSRE) PCR 检测母血浆胎盘来源的高甲基化 RASSF1A 基因。常见的 MSRE 有 Hpa II、BstU I 等,MSRE

能将 CCGG 序列切开,而当 CCGG 序列中的第 2 个 C 发生甲基化时则不能切开该序列,因此,可以对存在甲基化差异状态的基因序列进行甲基化敏感的限制性酶切处理。与亚硫酸氢盐方法相比,这种基于 PCR 的方法使其在母血浆中更易实现检测,也更利于将来的临床高通量分析及应用。除检测 RASSF1A 基因外,MSRE-PCR 同样对发现其他染色体上的特异位点甲基化差异具有借鉴作用。

3.3 21 号染色体上的基因 Robert 等^[22]采用传统的亚硫酸氢盐进行 DNA 化学修饰方法,通过对 21 号染色体上 AIRE 基因的甲基化状态的分析检测发现,在孕妇外周血中特别是在孕晚期妇女的样品中 AIRE 基因存在明显甲基化,而在对照样品中无明显甲基化现象发生。该实验表明胎儿出生后 AIRE 基因出现了脱甲基化变化,胎儿 DNA 甲基化现象可用于无创性产前诊断的研究,但其研究需要利用亚硫酸氢盐方法进行处理,这样会损失大量的 DNA 模板,可能严重阻碍随后的分析,使得这种方法费力且敏感性低。Robert 等^[22]直接应用 MSRE-PCR 检测 21 号染色体上的 ERG 基因,ERG 基因位于 21q22,是转录因子成红细胞转化特异基因 (ETSG)家族的一员,参与细胞的分化、增殖和凋亡。结果提示 ERG 基因在母体自身血细胞和绒毛组织中可能存在甲基化差异,被认为是无创性产前诊断唐氏综合征患儿的候选生物标记。Tong 等^[23-24]发现位于 21 号染色体上的全羧化酶合成酶基因 (HLCS)在母体自身血细胞和胎盘组织中也存在甲基化差异,可以作为一种检测胎儿游离 DNA 的新途径。其将亚硫酸氢盐修饰与 MSRE 方法相结合,通过微流体数字 PCR 检测孕妇血浆中高甲基化状态的 HLCS 基因水平,成功鉴定出 5 例 21-三体胎儿。

3.4 Y 染色体上的基因 Nygren 等^[25]发现另外两种在孕妇血浆中呈高甲基化状态的胎儿 DNA 标记,即位于 Y 染色体上性别决定区域的 SOX14 和 TBX3,并采用 MSRE-PCR 与 MALDI-TOF 质谱分析相结合的方法对 200 例孕妇血浆标本中的胎儿游离 DNA 进行检测,其敏感性为 99%,特异性为 100%。

4 展 望

孕妇外周血中相对丰富的胎儿 DNA 促进了非侵入性产前诊断的临床应用研究,表观遗传学进展拓宽了 DNA 甲基化技术与传统的基因诊断技术协同应用于无创性产前诊断的研究领域。随着对人类基因组认识的不断提高以及 DNA 甲基化分析技术的不断发展,DNA 甲基化作为一种潜在的通用检测标志物越来越受到重视。希望在不久的将来可利用的胎儿表观遗传学标记物的数量会迅速增长,利用胎儿表观遗传学标记物的无创性产前诊断技术也会得到更多的推广,以此应用于临床,指导疾病的早期诊断,减少缺陷儿的出生,为家庭、国家和社会节省医疗、教育费用,成为落实优生优育政策非常有效的技术手段。

参考文献:

- [1] 肖克林,王辉林,熊礼宽. 孕妇外周血中胎儿有核红细胞分离和应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(6): 669-670.
- [2] Lee D, Sukumar P, Mahyuddin A, et al. Separation of model mixtures of epsilon-globin positive fetal nucleated red blood cells and anucleate erythrocytes using a microfluidic device[J]. Chromatogr A, 2010, 1217(11): 1862-1866.
- [3] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350: 485-487.
- [4] Lo Y, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum implications for noninvasive prena-

tal diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62: 768-775.

[5] Miura K, Higashijima A, Shimada T, et al. Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant carriers of X-linked genetic disorders[J]. J Hum Genet, 2011, 56(4): 296-299.

[6] Achargui S, Tijane M, Benchemsi NF, et al. RHD genotyping by PCR using plasma from D negative pregnant women[J]. Transfus Clin Biol, 2011, 18(1): 13-19.

[7] Cardo L, Garcia BP, Alvarez FV. Non-invasive fetal RHD genotyping in the first trimester of pregnancy[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48 (8): 1121-1126.

[8] Ho SS, Chong SS, Koay ES, et al. Noninvasive prenatal exclusion of haemoglobin Bart's using foetal DNA from maternal plasma [J]. Prenat Diagn, 2010, 30(1): 65-73.

[9] Illanes S, Parra M, Serra R, et al. Increased free fetal DNA levels in early pregnancy plasma of women who subsequently develop preeclampsia and intrauterine growth restriction[J]. Prenat Diagn, 2009, 29(12): 1118-1122.

[10] Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by micro fluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA[J]. Blood, 2011, 117(13): 3684-3691.

[11] Chen Y, Ou QS, Zhou HR. Detection of deletional alpha-thalassemia from free fetal DNA in maternal plasma[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2010, 18(3): 679-682.

[12] Tsui DW, Lam YM, Lee WS, et al. Systematic identification of placental epigenetic signatures for the noninvasive prenatal detection of Edwards syndrome[J]. PLoS One, 2010, 5(11): e15069.

[13] Qin F, He J, Zhu FM, et al. Detection of fetal short tandem repeat loci in maternal plasma as gender-independent fetal DNA marker [J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2010, 18(6): 1624-1626.

[14] Kawakami K, Brabender J, Lord R V, et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92: 1805-1811.

[15] Hanada N, Takahata T, Zhou Q, et al. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1): 66.

• 综 述 •

[16] Chowdhury S, Erickson SW, MacLeod SL, et al. Maternal genome-wide DNA methylation patterns and congenital heart defects[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16506.

[17] Chim SS, Tong YK, Chiu RW, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 14753-14758.

[18] Tong YK, Ding C, Chiu RW, et al. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: theoretical and empirical considerations[J]. Clin Chem, 2006, 2: 2194-2202.

[19] Chan KC, Ding C, Gervassili A, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis[J]. Clin Chem, 2006, 52: 2211-2218.

[20] Bellido ML, Radpour R, Lapaire O, et al. MALDI-TOF mass array analysis of RASSF1A and SERPINB5 methylation patterns in human placenta and plasma[J]. Biol Reprod, 2010, 82(4): 745-750.

[21] Zejskova L, Jancuskova T, Kotlabova K, et al. Feasibility of fetal-derived hypermethylated RASSF1A sequence quantification in maternal plasma—next step toward reliable non-invasive prenatal diagnostics [J]. Exp Mol Pathol, 2010, 89(3): 241-247.

[22] Robert WO, Crea F, Puszyk W, et al. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome[J]. Reprod Biomed Online, 2007, 15(2): 227-235.

[23] Tong YK, Jin S, Chiu RW, et al. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach[J]. Clin Chem, 2010, 56(1): 90-98.

[24] Tong YK, Chiu RW, Akolekar R, et al. Epigenetic-genetic chromosome dosage approach for fetal trisomy 21 detection using an autosomal genetic reference marker[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15244.

[25] Nygren AO, Dean J, Jensen TJ, et al. Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination[J]. Clin Chem, 2010, 56(10): 1627-1635.

(收稿日期: 2012-01-08)

临床实验室质量控制综述*

余文辉 综述, 何进才 审校
(广东省深圳市中医院检验科 518033)

关键词: 实验室, 医院; 质量控制; 全面质量管理
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 09. 028

文献标识码: A **文章编号:** 1673-4130(2012)09-1086-04

实验室质量控制(quality control, QC)不单纯是操作方法, 也是质量管理的一项内容。临床实验室要保证质量, 应该实施总体质量管理(total quality management, TQM)原则。也许时至今日许多实验室技术人员都不知道实验室 QC 的来龙去脉, 因此, 对 QC 史的回顾与认识显得尤为重要, 既可以引导人们洞察未来, 也可以防止人们重复犯同一错误。现就 QC 的发展史作一综述。

1 QC 的起源

20 世纪 30 年代 Shewhart 将 QC 引入工业生产中, 当时 Shewhart 是贝尔(Bell)实验室统计员, 其高级文章“制造业中

经济实用的质量控制”为统计 QC(statistical quality control, SQC)提供了理论和实践指南^[1]。该理论被应用于产品分组抽样和确定样品组的均值与临界特征范围, 至今仍为制造业的标准化实操技术指南。

20 世纪 40 年代 Deming(Shewhart 的同事)负责为美国工业提供 SQC 训练, 以确保战时产品质量^[2]。美国军备的重要特征之一是质量过硬, 因而 SQC 在美国工业界得到广泛应用。

20 世纪 40 年代末到 50 年代 Deming 被委派到日本, 帮助日本改进工业品质量, 尤其是电话通信等设备的质量。此外, Juran^[3]开始为质量管理提供更大范围的培训。他们的努力造

* 基金项目: 深圳市科技计划项目(201003126)。