

遗传学 DNA 检测应用现状和展望(I)

俞 篪, Ronald JA Trent

(澳大利亚悉尼大学中央临床学院阿弗雷泽王子医院分子和临床遗传科, 悉尼 NSW 2050)

[中图分类号] Q987 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2004)05-0447-04

遗传学测试是“通过分析人类 DNA、RNA、染色体、蛋白和特定的代谢产物以检测临床上与遗传疾病相关的基因型、突变、表型或核型的改变”^[1]。DNA 检测作为一种新的诊断手段, 出现时间并不久。1978 年首次 DNA 检测用于镰刀性贫血的产前诊断^[2]。此后的 20 年里, 分子遗传学和基因组学有了飞速的发展, 人们已鉴定出近 1 500 种与人类疾病或症状相关的基因^[12]。这些成就不仅使我们对许多疾病的分子病理机理有了更深入地认识和理解, 同时也使 DNA 检测用于临床实践成为现实。

DNA 的特性使 DNA 检测在遗传疾病的检验中享有独特地位, 首先 DNA 比 RNA 和蛋白稳定, 而且从受孕至死亡是一成不变的。其次 DNA 组成(基因组)在所有有核细胞中都是相同的, 故 DNA 检测无需取病理活检标本。该特点对脑、心等难以获取活体标本的器官更有意义。DNA 检测不仅可检查有症状患者的基因缺陷, 还能检查那些目前尚无症状但以后会发病个体的基因缺陷。

目前 DNA 检测可分为间接法和直接法两类。间接法是使用 DNA 标记(多态性)通过家系连锁分析以确定遗传状态。直接法又可分为以下 5 种情况。①预测性检查: 对高危易感个体发病风险的评估。包括发病前诊断, 通常用于那些完全或几乎完全外显的遗传性疾病的诊断; 和易感性诊断, 预测一个无症状个体将来发病的风险概率, 但不确定其是否一定发病。②产前或胚胎植入前的遗传学诊断: 产前诊断可对怀孕期间发现具有严重遗传性疾病的胎儿, 作出是否继续妊娠的选择。胚胎植入前基因诊断在一定程度上可替代产前诊断, 它是在体外胚胎阶段做出的诊断。③临床诊断: 建立或证实有症状患者的临床诊断。一些 DNA 检测方法已替了传统的侵袭性操作如肌肉活检或肝活检。④携带者筛查: 用于生殖指导和对未知危险因素的特定人群筛查。⑤治疗监测: 用于治疗后的监测, 如追踪化疗后少量残余肿瘤细胞的变化; 亦可用于疾病的分类和分期。(见表 1)。

表 1 直接法基因 DNA 检测的分类

类型		举例
预测性	症状前	亨廷顿病
	易感性	乳腺癌 BRCA1/2 突变分析
产前或胚胎植入前		α -或 β -地中海贫血
临床	选择性/附加性	Duchenne's 肌营养不良/神经纤维瘤病
携带者筛查	生殖目的	夫妇中纤维囊性突变筛查
	人群普查	苯丙酮尿症的新生儿筛查
治疗监测	疾病的分类和分期	癌症时基因组基因表达谱
	治疗后监测	慢性粒细胞白血病 bcr-abl 嵌合子的常规检测

迄今为止, 已有 1 000 多种基因检测项目被常规应用或处在研发阶段^[3,13,14]。然而, 从临床和科

[收稿日期] 2003-12-04; [修回日期] 2004-07-06
[作者简介] 俞篪(1962-), 男, 博士。主攻方向: 分子遗传学和 DNA 检测。

学的角度来看,并非现有的(尤其是以赢利为目的的)DNA 检测都是必要的和有效的。

1 DNA 检测与临床医学

2003 年 5 月完成的人类基因组高质量测序,使生物医学的研究进入了后基因组时代^[4]。人类基因组计划所获得的丰富数据将有助于认识常见而又复杂疾病的遗传构成,并搞清楚这些疾病的多基因控制、基因-基因、基因-环境间的相互作用。在以后的 5~10 年里,人类 DNA 序列及其多样性的解读将有助于我们认识复杂疾病遗传因素,并可能达到当今成功剖析单基因遗传病的同样水平。确定遗传因素对常见复杂疾病的影响不仅可形成更多的、针对性的基因检测而且可实现基因组图谱的描绘。

DNA 检测可显著提高诊断的敏感性。这种检测能进一步证实临床诊断,解决由于表型重叠导致诊断不明的情况。当家族史资料不全或在迟发性遗传病发病前父母已经去世导致家族史缺无时,DNA 检测可提供最好的实验诊断。它还能诊断早期隐性遗传病,为这些疾病的早期干预提供了可能。

DNA 检测将成为临床治疗决策的依据。例如就心律失常来说,传统的心律失常的治疗是采用反复试验的方法,DNA 检测为我们选择特异的治疗手段提供了可能。假如 DNA 检测揭示心律失常源于钾通道 HERG 基因突变,由于 HERG 通道对细胞外钾离子浓度很敏感,因此通过维持正常的电解质水平便可有效地达到抗心律失常效果。抗心律失常药物引起的心律失常并不少见^[5],这种现象从分子遗传学的角度来看并不足为奇。用钠通道阻滞剂来治疗钠通道基因突变引起的心律失常必然会导致病情恶化。因此 DNA 检测可指导临床治疗,避免类似医源性并发症的发生。

DNA 检测可影响临床的预防措施。如果缺乏 DNA 突变的知识,只用传统的标准去判断一个因长 QT 间期综合征近期死亡病人的兄弟姐妹是否为该病的携带者,那么 40% 的心内科医生会误认为他们是正常人而不予治疗^[6]。仅仅 25% 的医生会根据心电图,建议这些兄弟姐妹进行预防性的 β 受体阻滞剂治疗。待证实有 KVLQT1(钾通道)基因突变后,所有心内科医生都同意对其兄弟姐妹进行 β 受体阻滞剂治疗,其中 40% 的医生会考虑建议他们安装一个植入性除颤器。

展望未来,系统性分析基因突变、表观遗传学修饰、基因表达以及蛋白质,将可能发展成为分子分类学,从而达到对人类疾病进行再分类^[7]。届时 DNA 检测必将在疾病的检测、分类和/或分期、残留病灶的监测等方面发挥重要作用。van de Vijver 等人^[8]已使用基因组图谱的微阵列分析来区分哪些乳腺癌患者会受益于辅助治疗,哪些患者预后不良。

药物遗传学 DNA 检测及药物基因组图谱的描绘是另一个飞速发展的领域。这些检测可根据病人遗传特点对其用药的安全性和有效性做出预测。举例来说,华法令(Warfarin)是一种常用的抗凝药物。如果病人的细胞色素 P450 CYP2C9 基因有变异就会影响华法令的代谢,对此类患者必须减小其用量以防止出血性并发症^[9,10]。为使该类 DNA 检测成为临床医疗的常规检查,尚需要进行技术革新使其微型化,以便于有效地检测多种药物相关的基因多态性,这样才不会延误治疗。人们希望个体细胞色素 P450 系统 CYP 亚型和甲基转移酶等药物代谢性酶的基因谱检测能够成为所有接受相应药物治疗患者的常规检查。药物遗传学 DNA 检测及药物基因组图谱的描述将改变以前“合适的药物用于合适的疾病”的观念,而形成“合适的药物用于合适的病人”的观念。

目前对常见复杂疾病的 DNA 检测尚有局限性。人们已发现一些影响常见复杂疾病诸如高血压、早老性痴呆发生的易感基因,但与单基因致病基因相比,对易感基因的检测既不敏感也无特异性。因为这些疾病往往是遗传因素和环境因素共同作用的结果,单独易感基因既不足以导致疾病也不是致病的必须条件。此外,多基因检测仍是个挑战,需发展新的具有高效价比的技术。对常见复杂疾病,尤其是迟发性疾病,决定是否进行及何时进行 DNA 检测仍很困难。

2 DNA 检验技术面临的挑战

与遗传学检验相关的技术已取得了长足的进步。耗时费力的 Southern 印迹法检测 DNA 变异的方法已被 PCR 和自动化毛细管电泳所取代;生物芯片/微阵列和实时定量分析技术使基因检测的发展更上一层楼。因此 DNA 检测的重复性、特异性日益提高,检测周期不断缩短。DNA 模板需求量已从毫克(mg)下降到纳克(ng)水平;检测周期从数天降

至数小时,甚至以分钟计算。然而,为满足分子诊断的需求,适应呈指数级增长的遗传学及基因组学的发展,DNA 检验技术仍然需要不断改进。

在需求高通量 DNA 检测时,高效性和精确性是 DNA 检验技术的两大要素。而敏感性是高效性的关键之一,当我们面对例如源于单个细胞少量 DNA 模板时,DNA 检测的敏感度更不可忽视。等位基因的漏检是任何一个分子诊断实验室所不能接受的。解决 DNA 模板量少的方法之一是在合理的时间内如一个晚上,对基因组 DNA 进行如实扩增。Amersham Biosciences 公司研发的 Genomiphi™ DNA 扩增试剂盒,就能将人类基因组 DNA 从 1 纳克扩增到数微克。同时,为了使检测的敏感性达到极限,选择高效的扩增技术非常重要。PCR 能将一个靶基因 DNA 扩增上百万倍,而巢式 PCR 和引入荧光标记可进一步提高了检测的敏感性。在特定时间内完成 DNA 的检测是达到高效性的另一关键。胚胎植入前诊断,产前诊断及未来的药物基因组检测均有时间限制。PCR 设置、点样、电泳、记录和分析的自动化流程将有助于高效性的 DNA 检测。

在提高敏感性的同时常常会碰到精确性或特异性的问题。非特异性扩增可由以下原因所致:非最佳 PCR 条件下的异位引物延伸,产前诊断样本中混入母体细胞,实验操作人员对样本的污染,不洁试剂和受污枪头等。我们决不能以牺牲特异性来满足敏感性。因此我们必须建立严密的防污染措施、严格执行 PCR 操作方案以及坚持常规的仪器质控,从而防止所有可避免的错误的发生,确保 DNA 检测的精确性。作为参考,可在因特网上查阅“实验室认证标准及核酸检测技术指南”^[15]。

DNA 检测阴性结果与阳性结果具有同样的价值。比如说,如果 CAG 重复序列数目正常就可以排除亨廷顿病。这种除外性诊断可解除有高危个体的焦虑。当然,现今的技术还不能将所有的突变都一一检出。家族性肥厚性心肌病是符合孟代尔遗传规律的单基因遗传病,但它具有明显的等位基因和基因座的异质性。据报道与心肌病相关的至少有 9 个肌小节基因,其突变数超过 250 个^[16]。这些突变无优势“热点”,绝大多数属于各家系中独有的。况且,上述 9 个肌小节基因中有些具有 35—40 个外显子。这给高效性 DNA 检测带来了极大的挑战。高通量的 dHPLC 可分析整个基因编码区以及外显子

和内含子交界区,机器人工作台可进一步提高效率。然而,现阶段大规模的 dHPLC 扫描还较昂贵。随着生物芯片/微阵列技术的发展,同时检测成百上千个已知基因突变也将是可行的。但就当今的技术来看,要想涵盖所有的启动子、外显子和内含子的基因突变尚不太可能。

对常见复杂病的 DNA 检测将成为基因检验技术主要挑战。例如:对早老素(presenilin)1,2 和淀粉样前体蛋白基因突变分析,其阴性结果并不能除外早老性痴呆的发病。这是由于检测的敏感度不够(50%~70%)及受未知因素的影响所致,包括一些环境危险因素也能促使早老性痴呆发病。DNA 的检测在上述情况下只限于排除单纯由于特殊基因突变而引发的早发型早老性痴呆。因此,一个 DNA 检测的阴性预测值的价值是有限的。另一方面,一个常见复杂疾病的阳性预测值的价值亦不尽人意。由于突变的不完全外显和疾病的多基因遗传以及环境因素相互作用的复杂性使其阳性预测价值下降。

除了以上提及的检验技术挑战外,对越来越复杂的数据的处理是未来 DNA 检测的另一大挑战。计算机为基础的实验室信息管理系统可减少数据处理错误。今后尚需进一步开发新的预测工具和高效的演算法则,以用于单倍型或综合变异信息的分析,并达到较高的可信度。通过多基因位点及其相互作用来评估易感性也将是个挑战。Yang 等人^[11]最近报道了如何通过同时分析多种易感基因和环境因素来预测静脉血栓的形成。他们根据 3 种 DNA 检测的结果估测静脉血栓发生的可能性。单一检测结果仅能提供 0.5%~3.1% 的预测信息,而同时考虑 3 种检测结果,在未加以选择的病人中其预测值升高了 8 倍(达 20.3%),在选择的病人中其预测值竟上升了 20 倍(达 61.6%)。

未来 DNA 检测将远远超出我们当今的想象,便于使用的 DNA 诊断试剂盒将大量涌现;微系统装置将使现场快速检测成为可能;测定单个细胞总体 DNA 甲基化状态也非幻想。事实上某些“想象”的检测项目现在已在酝酿之中,例如实时细胞功能的监测,使用分子探针技术在体内原位显示基因和蛋白质表达的动态变化,从而可以此为依据判断疾病的状态或评估治疗反应。

3 小结

随着分子遗传学和基因组学领域的快速进展,

基因 DNA 检测也在不断地扩展。这种检测方法已进入临床实践的主流,并为疾病的防治创造了机会。新技术的出现一定会使基因 DNA 检测更加敏感、更加特异。综合的 DNA 检测终将用于常见复杂病。由于诸如心血管病、肿瘤、糖尿病、哮喘和早老性痴呆等常见病仍是公共卫生的主要问题,DNA 检测将对公众健康产生深远的影响。(本文翻译:陶月红,校对:杨毅,郭履□)

[参 考 文 献]

[1] Holtzman NA, Watson MS. Promoting safe and effective genetic testing in the United States. Final report of the Task Force on Genetic Testing [J]. J Child Fam Nurs, 1999, 2(5): 388—390.

[2] Kan YW, Dozy AM. Antenatal diagnosis of sickle cell anaemia by DNA analysis of amniotic fluid cells [J]. Lancet, 1978, 2 (8096): 910—912.

[3] Williams-Jones B. Where there's a web, there's a way: commercial genetic testing and the Internet [J]. Community Genet, 2003, 6(1): 46—57.

[4] Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. US National Human Genome Research Institute. A vision for the future of genomics research [J]. Nature, 2003, 422(6934): 835—847.

[5] Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias [J]. Cell, 2001, 104(4): 569—580.

[6] Ansell SM, Ackerman MJ, Black JL, Roberts LR, Tefferi A. Primer on medical genomics. Part VI: Genomics and molecular genetics in clinical practice [J]. Mayo Clin Proc, 2003, 78 (3): 307—317.

[7] Wagner KR. Genetic diseases of muscle [J]. Neurol Clin, 2002, 20(3): 645—678.

[8] van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer [J]. N Engl J Med, 2002, 347

(25): 1999—2009.

[9] Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment [J]. Blood, 2000, 96(5): 1816—1819.

[10] Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM, et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy [J]. JAMA, 2002, 287(13): 1690—1698.

[11] Yang Q, Khoury MJ, Botto L, Friedman JM, Flanders WD. Improving the prediction of complex diseases by testing for multiple disease—susceptibility genes [J]. Am J Hum Genet, 2003, 72(3): 636—649.

[12] Locus Link [database on the Internet] Bethesda (Mb): National Center for Biotechnology Information (VS) [cited 2004 Jun 30]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/RSstatistics.html>.

[13] Gene clinics.org [homepage on the Internet]. Seattle: University of Washington; c 1993—2004 [updated 2004 Aug 19; cited 2004 Aug 19]. Available from: <http://www.geneclinics.org>.

[14] Gendia.net [homepage on the Internet]. Belgium: Patrick (MD, PhD) [updated 2004 June 30; cited 2004 June 30]. Available from: <http://www.gendia.net/> Accessed on: June 30, 2004.

[15] National Pathology Accreditation Advisory Council, eds. Laboratory accreditation standards and guidelines for nucleic acid detection techniques [monograph on the Internet]. Canberra: Commonwealth of Australia; 2000 [cited 2004 June 30]. Available from: <http://www.health.gov.au/npaac/pdf/nad.pdf>.

[16] DNA Mutation Database: family hypertrophic cardiomyopathy [database on the Internet]. Fouya: Department of Molecular and Clinical Genetics, Royal Prince Alfred Hospital 2004 [updated 2004 March; cited 2004, June 30]. Available from: <http://www.angis.org.au/Databases/Heart/>.

(本文编辑:钟乐)