

分子诊断在检验科的发展与未来^{*}

欧红玲¹, 原 杰² 综述, 陈风华¹, 王欣茹¹ 审校(解放军第二炮兵总医院: 1. 检验科; 2. 感染性疾病科, 北京 100088)

【关键词】 分子诊断; 聚合酶链反应; 个体化治疗

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 22. 051 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)22-3202-02

随着人类基因组绘制的完成和生物学的发展, 分子诊断技术成为 21 世纪最有潜力的学科之一。分子诊断是将分子生物学原理和技术应用于疾病诊断而产生的一门新兴的检验医学技术, 是以疾病相关基因及其产物为检测对象, 从分子水平来探讨疾病发生和发展的机制, 从而为疾病的预防、诊断、疗效评估、预后判断等提供关键信息和决策依据。是当代医学发展的重要前沿领域之一, 其核心是基因诊断技术。

1 分子诊断的进展

分子诊断技术的开展基于人类对 DNA、RNA 和蛋白质不断深入的认识, 1953 年, Watson 和 Crick 发现了 DNA 双螺旋结构, 为人类揭开了生命本质神秘的面纱, 为分子诊断的产生奠定了基础。1963 年, 桑格发明了双脱氧测序方法, 为人类认识基因 DNA 提供了方向。1972~1973 年伯格等创建了重组 DNA 技术, 拓展了分子诊断技术。1976 年, Kan 等应用 DNA 分子杂交技术对 α 地中海贫血进行产前诊断, 实现了疾病的早期诊断, 标志着分子诊断技术开始应用于临床检验中。1985 年, 聚合酶链反应(PCR)技术问世, 极大地推动了分子生物学的发展, 成为生物医学领域中的一项革命性创举和技术发展的里程碑。PCR 及其衍生技术因其操作简便、快捷、适用性强, 成为当今分子诊断领域中广泛应用的技术方法。以生物芯片技术为代表的高通量密集型技术, 因其支持物上有大量的探针, 可以进行大量的检测和分析, 弥补了传统核酸杂交存在的自动化程度低、检测目的分子少、低通量等缺点, 具有样品处理能力强、用途广泛、自动化程度高等特点, 成为分子生物学技术领域的一大热点, 极大地促进了分子诊断学的发展。1990 年开始启动人类基因组计划, 到 2003 年, 基因组计划初步完成后, 使分子生物学研究进入了功能基因组学研究, 科学家们开始探索疾病和药物耐药性等与靶基因的相互关系, 使医学模式转向个体化治疗临床研究阶段。目前, 分子诊断在实验诊断市场中占的份额还不小, 但增长得十分迅速, 估计未来 10 年内, 分子诊断技术将在实验诊断中起主导作用。

2 分子诊断目前在检验科的应用

分子诊断是通过检测核酸的结构异常或蛋白的表达异常, 对疾病或潜在疾病作出试验诊断, 分子诊断的技术方法决定了试验诊断的应用。分子诊断的内容从单一诊断遗传性疾病发展到一个全新阶段, 广泛应用于感染性疾病、遗传性疾病和肿瘤诊断等多个领域。当前分子诊断学在临床应用主要有下面几个方面。

2.1 在感染性疾病诊疗中的应用 近年来不断突发一些传染性极强的新病原体, 如非典型性呼吸综合征(SARS)、H1N1 甲型流感、H7N9 禽流感, 严重影响了公众的健康和社会的安定。传统的细菌培养、病毒分离等病原学检测技术普遍存在耗时长、灵敏度差等不足, 有些病原体还有临床分离和培养难度大

等特点, 大大降低了检测效率, 难以在临床抗感染治疗中发挥有效的指导作用。随着各种病原体基因结构的阐明, 利用分子诊断技术能早期、快速、敏感、特异地检测感染性病原体的 DNA 或 RNA。目前, 与医学相关的几乎所有病原微生物均建立了 PCR 检测方法^[1-2], 可通过特异引物扩增来检测病原微生物的目标基因或者是通过通用引物扩增检测细菌的 16S rRNA 和真菌 28S rRNA 基因序列, 整个检测过程耗时 2~4 h, 与传统的细菌培养方法相比, 敏感度和特异度大大提高, 所以广泛应用于各个领域。现在 PCR 又发展到多重 PCR、巢式 PCR、反转录 PCR 以及实时定量 PCR 等。2000 年日本学者 Notomi 等^[3]公开了一种新的基因诊断技术, 即环介导等温扩增反应(LAMP), 受到了世界卫生组织(WHO)和各国学者的关注, 短短几年, 该技术已广泛应用于临床检验和医学研究中, 成功地应用于 SARS、禽流感、HIV 等疾病的检测中^[4-6], 在甲型 H1N1 流感事件中, 日本荣研化学公司接受 WHO 的邀请进行 H1N1 环介导等温扩增(LAMP)试剂盒的研制。通过荣研公司近十年的推广, LAMP 技术已广泛应用于日本国内各种病毒、细菌、寄生虫等引起的疾病检测、食品化妆品安全检查及进出口快速诊断中, 并得到了欧美国家的认同。LAMP 方法的优势除了高特异性、高灵敏度外, 操作十分简单, 对仪器设备要求低, 一台水浴锅或恒温箱就能实现反应, 结果的检测仅通过肉眼观察白色浑浊或绿色荧光的生成即可判断, 简便快捷, 适合基层快速诊断。使对病原微生物的分子诊断方法得到很大的改进。分子诊断不仅可以快速对病原体进行诊断和鉴别诊断, 还可进行病原分型, 以及病毒载量检测, 从而为个体化治疗提高依据。

另外, 细菌等病原微生物的耐药性问题也成为临床医生面临的一个难题, 即达不到预期疗效, 也存在医疗资源的浪费, 容易激化医患矛盾。细菌的耐药基因检测可有助于医生有针对性地选择和使用抗菌药物, 设计新型抗菌药物, 对临床正确用药和新药开发具有指导意义。各种病原菌耐药基因检测是当前耐药机制研究的热点, 通过设计引物、PCR 扩增目标基因片段、对扩增产物进行分析或测序比对, 获得检测结果, 对耐药菌株的早期检出能够及时准确使用抗菌药物减少耐药株的产生, 同时控制耐药性的传播。张苑怡等^[7]使用 LAMP 技术以 NDM-1 基因为靶基因检测多重耐药菌中产 β -内酰胺酶。Hanaki 等^[8]通过 LAMP 技术检测 MecA 和 femB 及 qacA/B 基因来鉴定耐消毒剂的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA), 能在 1 h 内做出敏感性和特异性较高的结果。

2.2 遗传性疾病 目前已知的遗传病有数千种, 尽管一些遗传病的发病率很低, 但是一旦患病, 患者的生活质量将大大降低, 甚至无法生存, 给家庭和社会带来沉重的负担。随着人类基因组计划的逐步完成, 人类已掌握了几乎所有已发现的遗传

* 基金项目: 全军十二五面上课题资助项目(CWS11J205); 军队十二五重大专项子课题“师团检验箱组”(424135S)。

病基因,通过遗传病分子诊断从基因方面进行筛查,可以避免遗传病患儿的出生,或者是尽早采取措施,提高患者的生活质量,减轻患者及家庭的经济和精神负担。所以临床分子诊断对遗传性疾病的诊断和产前筛查具有重要的意义。通过对血清或血浆进行 PCR 检测法布瑞氏症,使用微滴 PCR 检测遗传性耳聋、使用改良的反转聚合酶链式反应(I-PCR)检测血友病 A、通过 PCR 联合低密度基因芯片技术的导流杂交可简便、快速地从孕妇血浆中检测 20 种常见胎儿地中海贫血等^[9-12]。

2.3 肿瘤 经过长期、大量的研究,科学家对肿瘤的认知逐渐锁定到相应的基因方面,人类基因组序列和高通量分子分析技术的发展,使分子诊断技术在肿瘤的诊治方面得到快速发展,人们能够从 DNA、RNA 和蛋白质水平上对肿瘤进行全面研究,从个体基因组中分析和鉴别患者之间存在的疾病相关个体差异,利用这些差异来合理指导临床治疗,推动了肿瘤的个体化治疗方向^[13]。38 岁的好莱坞红星安吉丽娜·朱莉通过基因检测发现其乳腺癌易感基因 BRCA1 缺陷,切除双乳以预防乳腺癌和卵巢癌的发生^[14]。提示基因检测在肿瘤的诊断领域将有很大的发展。对于肿瘤的个体化治疗比较有代表意义的是对非小细胞肺癌(NSCLC)的靶向性治疗,约 20% 的 NSCLC 患者是由于表皮生长因子受体(EGFR)的突变导致的^[15],EGFR 是一种酪氨酸激酶,常见的突变发生于 EGFR 的外显子 18~21 上^[16]。外显子 18、19、21、20(S769D)参与酪氨酸激酶结构域的编码,突变导致 EGFR 活性增加,磷酸化水平明显升高,下游的增殖通路被激活,导致肿瘤的发生和恶化。因此,针对此类因基因突变引起的 NSCLC,使用 EGFR 酪氨酸激酶受体抑制剂(EGFR-TKIs)可有效抑制肿瘤。而如果是外显子 20(T790M)发生突变,则对 EGFR-TKIs 具有耐药性,因此美国食品与药品监督管理局要求在使用药物 EGFR-TKIs 之前要先进行基因检测,确定分子分型。并且对 18~21 外显子的突变可通过血浆对来自肿瘤的微量 DNA 进行检测,为临床上不能手术,同时不愿穿刺的患者提供了一种创伤小的替代检测方案。

3 展望

分子诊断学将成为 21 世纪检验医学的主题。分子诊断技术将朝着高效、便捷、灵敏和无创伤性的方向发展;21 世纪分子诊断学的技术优势和巨大潜力,尤其是生物芯片的发展,将成为最有希望为改善世界各国人们的健康状况做出贡献的生物技术之一。随着人类基因组计划的完成和蛋白质组计划的启动,分子诊断方法将极大地推动现代检验医学的发展,通过一滴血、一滴尿以及其他体液或组织,就可以简单、方便地检测几乎所有的病原微生物、一些遗传病基因和肿瘤标记物、还可以同步建成是否存在耐药基因及耐药位点的突变,并可以在更深层次揭示疾病的本质,指导临床诊治。

参考文献

- [1] Riahi R, Mach KE, Mohan R, et al. Molecular detection of bacterial pathogens using microparticle enhanced double-stranded DNA probes[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(16): 6349-6354.
- [2] Schuller M, Sloots TP, James GS, et al. PCR for clinical microbiology: An Australian and International Perspective [M]. Heidelberg: Springer, 2010: 14-33.
- [3] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.

- [4] Yang K, Sun K, Srinivasan KN, et al. Immune responses to T-cell epitopes of SARS CoV-N protein are enhanced by N immunization with a chimera of lysosome-associated membrane protein[J]. *Gene Ther*, 2009, 16(11): 1353-1362.
- [5] Zhang J, Feng Y, Hu D, et al. Rapid and sensitive detection of H7N9 avian influenza virus by use of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(11): 3760-3764.
- [6] Krawczyk P, Nicoo M, Powrózek T, et al. Sensitive methods for the detection of an insertion in exon 20 of the HER2 gene in the Metastasis of non-small cell lung cancer to the central nervous system[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(4): 1063-1067.
- [7] 张苑怡, 武娜, 朱宝利, 等. 快速检测 NDM-1 基因的环介导恒温扩增技术的建立与评价[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(8): 1232-1238.
- [8] Hanaki K, Sekiguchi J, Shimada K, et al. Loop-mediated isothermal amplification assays for identification of anti-septic- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *J Microbiol Methods*, 2011, 84(2): 251-254.
- [9] Nakano S, Morizane Y, Makisaka N, et al. Development of a highly sensitive immuno-PCR assay for the measurement of α -galactosidase A protein levels in serum and plasma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): 78588.
- [10] Schrauwen I, Sommen M, Corneveaux JJ, et al. A sensitive and specific diagnostic test for hearing loss using a microdroplet PCR-based approach and next Generation sequencing[J]. *Am J Med Genet A*, 2013, 161(1): 145-152.
- [11] He ZH, Chen SF, Chen J, et al. A modified I-PCR to detect the factor VIII Inv22 for genetic diagnosis and prenatal diagnosis in haemophilia A[J]. *Haemophilia*, 2012, 18(3): 452-456.
- [12] Yamada T, Azuma K, Muta E, et al. EGFR T790M mutation as a possible target for immunotherapy; identification of HLA-A * 0201-restricted T cell epitopes derived from the EGFR T790M mutation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78389.
- [13] Sui X, Chen R, Wang Z, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(16): 838.
- [14] Niskier J. A public health education initiative for women with a family history of breast/ovarian cancer: why did it take Angelina Jolie[J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2013, 35(8): 689-694.
- [15] Reguart N, Cardona AF, Carrasco E, et al. BRCA1: a new genomic marker for non-small-cell lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2008, 9(6): 331-339.
- [16] Liu Y, Wu BQ, Zhong HH, et al. Screening for EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung carcinomas using DNA extraction by hydrothermal pressure coupled with PCR-based direct sequencing[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(9): 1880-1889.