

白血病的分子诊断技术研究进展*

姜慧慧¹, 弭苗苗¹, 辛 钰²综述, 孙成铭^{3△}审校

1. 青岛大学, 山东青岛 266000; 2. 滨州医学院, 山东烟台 264000;

3. 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院检验中心, 山东烟台 264000

关键词: 白血病; 染色体; 基因; 分子诊断

中图分类号: R446.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)04-0552-04

白血病是一种起源于造血干细胞的恶性增殖疾病,其特征是骨髓异常分化的原始细胞克隆性扩张。近年来,在白血病患者中发现了越来越多的细胞遗传学和分子遗传学标志物异常,突显了这种疾病的生物学异质性。大多数白血病都有某种染色体易位,而染色体易位会导致新的融合基因产生、癌基因的扩增、原癌基因点突变和抑癌基因的失活等。2016 年,WHO 对白血病提出了新的诊断与分型标准,更加突出了分子生物学在白血病诊断和治疗中的作用^[1]。详细的分子标志物监测对于白血病患者的治疗和预后评估至关重要,特别对于初步治疗后和长期随访期间监测微小残留病变(MRD)极其重要。近年来,随着各种分子生物学技术的不断发展,分子生物学检测在白血病诊治中的作用越来越重要。本文针对白血病的分子诊断技术的研究进展进行总结,以便更好地了解各种分子诊断技术,方便临床医生选择更合适的分子诊断方案。

1 染色体检测

白血病患者常伴有特征性的染色体改变,根据 2016 年 WHO 的分类,一些急性髓系白血病(AML)亚型是通过存在以下染色体或者分子异常来定义的,如 t(8;21)(q22;q22)(RUNX1-RunX1T1)、inv(16)(p13.1q22)或 t(16;16)(p13.1;q22)(CBFB-MYH11)、急性早幼粒细胞白血病(APL)合并 PML-RARA 等^[2]。慢性粒细胞白血病(CML)患者的染色体检测常见由 t(9;22)(q34;q11)易位引起的 Ph 染色体^[3]。

1.1 染色体核型分析 目前,染色体核型分析是评估染色体改变的常规检测方法,G 显带技术操作简单,带纹清晰,染色体标本可长期保存,因此,被广泛用于染色体异常的诊断和研究,该技术一直是实验室诊断 AML 和判断预后的金标准方法,但其在灵敏度和特异度上存在一定的局限。

1.2 荧光原位杂交(FISH) FISH 技术是一种更直接的方法,将荧光标记的探针与特定的染色体序列结

合,然后通过显微镜进行评估,根据探针的设计,可以识别染色体的结构或数字变化,该技术的主要优点是不依赖于细胞分裂,因此可以对处于细胞分裂间期的细胞进行分析。FISH 的分辨率比传统的核型分析高,有助于检测隐蔽或复杂的易位,但其不能检测到同一条染色体上小片段的插入和缺失等异常,这些都需要结合其他分子技术来判断^[4]。多重染色体异常的检测常使用多色荧光原位杂交(M-FISH)技术,M-FISH 技术是用颜料来识别单个中期染色体,能有效解决复杂的核型或形态不佳的中期染色体扩散问题,因为这些染色体仅通过 G 显带技术是很难识别的^[5]。

1.3 基因芯片 基因芯片又称染色体微阵列技术(CMA),基于阵列的比较基因组杂交(CGH)和单核苷酸多态性(SNP)的 CMA 比传统核型分析分辨率更高,该技术能够更精确地识别染色体断裂点和基因异常,在具有特殊特征的白血病或复发的难治性 AML 中,CMA 可以发现隐匿的染色体改变,它的结果通常与传统的核型分析结果是互补的。CGH 将来自白血病患者的遗传物质与正常个体的遗传物质进行比较,以确定测试标本中是否存在拷贝数变化^[6]。由于慢性淋巴细胞白血病(CLL)已知的遗传损伤是染色体上基因片段的重复与丢失,所以 CLL 就非常适合用拷贝数阵列进行分析^[7]。SNP 阵列的引入进一步提高了微阵列技术的分辨率,SNP 阵列可以在全基因组水平上进行评估,并识别出拷贝数变异非常小的区域。拷贝中性杂合性缺失(CN-LOH)在白血病,特别是 AML 中是一种常见的染色体异常,SNP 阵列能够检测 CN-LOH,除了测量拷贝数外,它还能提供基因分型信息^[5]。与常规细胞遗传学分析相比,CMA 的主要局限性是无法识别白血病中平衡的染色体重排,由于重排和融合基因在某些血液系统恶性肿瘤中对判断预后具有重要的意义,因此,有必要使用 FISH 或测序技术来补充 CMA,并且 CMA 的成本相对较高,尽管该方法普遍可用,但由于目前尚无指导方针,CMA 检测在各机构的诊断实验室中并不是常规

* 基金项目:山东省重点研发计划项目(2019JZZY011018);山东省自然科学基金项目(ZR2015HM073);山东省烟台市科技计划项目(2019MSGY133)。

△ 通信作者,E-mail:18953569897@163.com。

本文引用格式:姜慧慧,弭苗苗,辛钰,等.白血病的分子诊断技术研究进展.[J].检验医学与临床,2021,18(4):552-555.

方法。

2 融合基因检测

融合基因主要通过染色体重排或异常转录产生,许多白血病亚型中会检测到相当数量的融合基因,且部分融合基因是具有重要价值的诊断工具和治疗靶标^[8]。如 t(15;17)(q22;q21)和 t(9;22)(q34;q11)染色体易位会形成 PML-RAR α 融合基因和 BCR-ABL1 融合基因,这是诊断 APL 和 CML 的重要指标^[2]。

2.1 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 目前,PCR 是检测白血病融合基因常用的敏感而有效的方法。反转录 PCR(RT-PCR)能够在扩增反应完成后对产物进行评估,可提供对特定产物如融合基因的定性评估,但现在已在很大程度上被其他定量技术所取代^[5]。RT-qPCR 是现在被广泛使用的定量技术,RT-qPCR 测量白血病融合基因的欧洲标准化方案已于 2003 年公布,该技术是在 PCR 扩增过程中,通过荧光信号对 PCR 进程进行实时监测,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。RT-qPCR 能够快速检测,并且具有较高的灵敏度和特异度,通常还被用来监测 MRD。RT-qPCR 检测融合基因对于临床上白血病的分型、预后评估、选择治疗方案等都具有重要价值,是目前临床上应用最广泛的定量方法之一^[9]。

2.2 数字 PCR(DPCR) DPCR 代表了 PCR 的创新发展,与 RT-qPCR 相比具有许多实用优势,精密度高,重复性好,不需要标准曲线的循环阈值进行定量,可以实现绝对定量分析^[10]。有研究证实了 DPCR 在许多血液恶性肿瘤中监测 MRD 的可行性,目前,这一技术的主要缺点是成本仍然高于标准的 RT-qPCR,缺乏标准化的检测程序,以及配备 DPCR 仪器的实验室数量有限,因此,并未应用到临床常规检测中^[11]。近年来,DPCR 技术继续发展形成了微滴式数字 PCR(DDPCR)技术,DDPCR 是第三代 PCR 技术,这种方法是在 PCR 扩增前对样品进行微滴化处理,即将 DNA 模板分子分割成约 20 000 个油包水液滴,每个微滴不含待检核酸靶分子,或者含有一个至数个待检核酸靶分子。经 PCR 扩增后,逐个对每个微滴进行检测,含有荧光信号的液滴被判断为阳性。该技术已被应用于各种临床标本的等位基因定量、突变检测、拷贝数变异分析、DNA 甲基化和基因重排检测等,DDPCR 具有很高的灵敏度,可以检测到低至 0.1% 的突变等位基因片段,是检测 MRD 的一种较为有效的工具^[12]。有研究表明,在监测 BCR/ABL 阳性 CML 患者的 MRD 时,相比于 RT-qPCR,DDPCR 可以在 CML 患者体内检测到更多残留的白血病细胞^[13]。总之,DPCR 是一项旨在提供绝对核酸定量的突破性技术,该技术的真正优势可能会在未来几年变得更加明显。

3 基因突变检测

白血病是一种异质性疾病,其发病涉及多种染色体异常和基因突变,这些突变影响不同功能类别的基因,并随着时间的推移而导致疾病的发生,白血病常

见的突变基因有 FLT-3、CEBPA、RUNX1、DNMT3A、IDH1/2、TET2、TP53、WT1、ASXL1、MLL 等。因此,高效精准的基因突变筛查方法至关重要,了解白血病的基因突变情况可以为患者的靶向治疗、危险分层和临床护理提供依据。

3.1 第一代测序技术 Sanger 测序法作为检测癌症基因突变的“金标准”,具有较高的准确性,但其检测效率低、灵敏度低、检测突变类型有限,且成本较高,对于没有明确候选基因或候选基因数量较多的患者较难完成筛查。焦磷酸测序的复杂性较低,涉及的步骤更少,并且检测极限更高,已被用于检测一些基因的突变,例如 JAK2V617F^[14],临床上还可以用于检测 CML 的耐药性突变,如 BCR-ABL1 激酶结构域内的突变,这有助于为患者提供药物反应的相关信息。

3.2 下一代测序技术(NGS) 如果说 Sanger 测序的发展使生物学研究发生了革命性的变化,那么随着 2005 年 NGS 方法的使用,测序技术的影响变得更加深远。NGS 是指基于一系列现代大规模平行测序(MPS)的测序技术。根据分析的复杂性和要获得的信息,可以进行几种测序试验,包括全基因组测序(WGS)、转录组测序(RNA-SEQ)、全外显子测序(WES)和靶向基因测序。NGS 能在一次测试中对数千个基因进行全序列测定,可同时检测缺失、插入、碱基替换、拷贝数改变和易位,包括平衡重排。NGS 目前已经进入临床实践,用于 AML 诊断时的初始突变筛查,90% AML 患者的分子畸变可以通过 NGS 来识别^[15]。基于 NGS 的 MRD 分析广泛适用于 AML 患者,对患者的复发率和存活率有很高的预测价值,可能有助于改进 AML 患者的移植和移植后管理。

单细胞测序是近几年发展迅速的一种以 NGS 为基础的测序技术,2013 年曾被《Nature Methods》评为年度技术,2019 年第 61 届美国血液病年会报道了众多单细胞测序技术在血液疾病中的应用,为深入了解白血病的发病机制提供了更广阔的思路。PETTI 等^[16]创新性地利用基因分型联合单细胞测序技术研究 AML,揭示了 AML 患者体内存在不同功能子集及其相关的驱动因子。总之,NGS 在过去十年里促进了医学领域知识的爆炸性增长,虽然越来越多的研究有助于对疾病分子水平上的认识,但同时也带来了如何将这信息应用于日常临床实践的问题,必须找到一种切实可行的方法来开发利用它们。NGS 将发展成为一个合适的平台,以高通量和高准确性为优势,提供更多分子突变数据,从而进军标准的分子诊断领域。

3.3 第三代测序技术 相比 NGS,第三代测序技术在临床上的应用有明显优势,第三代测序技术不需要 PCR 扩增,可直接对单个分子进行测序。有研究者利用单分子测序技术发现了许多 Ph 染色体 ALL 患者存在多个具有单一突变预先存在的耐药细胞^[17]。还有研究者对携带多个 TP53 突变的 AML 和 MDS 患者进行了单分子实时 DNA 测序技术(SMRT),发现

所有这些变异都定位在不同的亚克隆基因上,说明患者间异质性较大^[18]。尽管第三代测序技术优势很多,但并不意味着单分子测序无所不能,也并非毫无瑕疵。目前,第三代测序并不能取代 NGS,而是作为对其一种补充共同发展。总体来讲,第三代测序技术还处于起步的发展阶段,仍有未知的空间等待进一步探索。

3.4 其他方法 其他几种检测基因突变的方法灵敏度也比较高,比如 PCR-单链构象多态性技术(PCR-SSCP)、低温变性共扩增 PCR 技术(COLD-PCR)、高分辨率熔解曲线分析(HRM)、双梯度变性梯度凝胶电泳(DGDGGE)、基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)、变性高效液相色谱(DHPLC)等^[19]。PCR-SSCP 依据点突变引起单链 DNA 分子立体构象的改变,可通过聚丙烯酰胺凝胶电泳将不同迁移率的突变单链 DNA 分离,从而达到对反应产物的检测,常用于白血病突变基因的检测,研究 MRD 的存在^[20]。COLD-PCR 是一种新型的 PCR 方法,不管突变存在于什么位置,该技术均能从野生型和含突变的序列基因混合物中选择性扩增出为数不多的等位基因,LI 等^[21]最先描述了这项技术,他们用 COLD-PCR 取代了常规 PCR 后,在肿瘤标本中发现了 TP53、EGFR 和 KRAS 的突变,该方法与其他检测方法相比灵敏度大大提高。HRM 具有灵敏、经济、快速、操作简单的特点,能根据其变性(熔解)行为表征 PCR 产物,可用于检测与真性红细胞增多症相关的 JAK2 基因第 12 外显子的突变,是一种普遍适用的诊断分析方法^[22]。近年来质谱技术以其微量、快速、灵敏、高精确度等优良性能而迅速发展,对于低水平的基因突变检测,其灵敏度很高,可用于白血病的诊断、

分类和监测。由美国 Sequenom 公司研发的 MassARRAY 系统现在已被广泛应用于各种遗传分析中,包括 SNP 基因分型、拷贝数变异分析、定量基因表达分析和甲基化检测等,顺应了当前基因在疾病机制研究和临床诊断中迅猛发展的趋势^[23]。

4 小结与展望

各种分子遗传学方法在白血病诊断中的应用比较见表 1。在过去的几年里,对白血病的研究取得了许多进步,分子诊断技术的发展促进了白血病的诊断和分型,并且已成为监测 MRD 的首选方式,对临床管理具有重要意义。随着 PCR 技术的日益发展,会发现更多标志性的融合基因,获得更多的分子诊断和治疗靶点。通过检测标志性融合基因的表达,可以针对这些融合基因进行药物个体化治疗,在此之后,可以更详细地对疾病进行分类,这样可以有效地提高白血病的治愈率。未来的 PCR 技术也需要在灵敏度、特异性、测试时间和成本效益方面进一步提高,并且随着 NGS 越来越多地应用于临床研究,当前与白血病相关的基因可能会得到进一步扩展,基于 NGS 的基因组诊断程序将取代对单个基因突变的常规检测。全基因组测序尽管仍然存在技术和生物学方面的障碍,但这项技术未来将很快应用于所有白血病的诊断。虽然一些针对白血病的分子诊断技术已经成功地应用于临床,但是目前仍然面临一系列挑战,例如如何在临床上在尽可能少的时间内以患者可承受的成本为每位患者提供更多的相关基因突变的测试。随着分子生物学技术的发展,研究者们将会寻求到更有力的技术来帮助临床医生对疾病进行诊断,以便监测患者对各种治疗方法的反应,并改善患者的预后。

表 1 分子遗传学方法在白血病诊断中的应用比较

检测方法	灵敏度	分辨率	染色体平衡易位	其他染色体结构异常	全基因组水平	基因突变	基因表达	临床常规检测
核型分析	5.0%~10.0%	3~5 Mb	√	√	√	×	×	√
FISH	0.5%~1.0%	100 kb	√	√	×	×	×	√
M-FISH	0.5%~1.0%	100 kb	√	√	√	×	×	×
aCGH	20.0%~30.0%	50 kb	×	√	√	×	×	×
SNP	20.0%~30.0%	25 kb	×	√	√	×	×	×
Sanger 测序	20.0%突变	1 bp	×	×	×	√	×	√
焦磷酸测序	5.0%突变	1 bp	×	×	×	√	×	√
NGS	1.0%突变	1 bp	√	√	√	√	√	×
第三代测序	1.0%突变	1 bp	√	√	√	√	√	×
PCR	×10 ⁻⁵ copy	1 bp	×	×	×	√	×	√
RT-qPCR	×10 ⁻⁵ copy	1 bp	√	×	×	√	√	√
DPCR	×10 ⁻⁶ copy	1 bp	√	√	×	√	√	×

注:√表示能达到该项检测水平;×表示不能达到该项检测水平。

参考文献

[1] CAZZOLA M. Introduction to a review series: the 2016 revision of the WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues[J]. Blood, 2016, 127(20): 2361-2364.

[2] ARBER D A, ORAZI A, HASSERJIAN R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. Blood, 2016, 127(20): 2391-2405.

[3] SOVERINI S, BASSAN R, LION T. Treatment and monitoring of Philadelphia chromosome-positive leukemia patients: recent advances and remaining challenges[J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1): 39-43.

- [4] GONZALES P R, MIKHAIL F M. Diagnostic and prognostic utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis in acute myeloid leukemia[J]. Curr Hematol Malig Rep, 2017, 12(6): 568-573.
- [5] MASON J, GRIFFITHS M. Molecular diagnosis of leukemia[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(5): 511-526.
- [6] CHEUNG S W, BI W. Novel applications of array comparative genomic hybridization in molecular diagnostics[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2018, 18(6): 531-542.
- [7] SHAHJAHANI M, MOHAMMADIASL J, NOROOZI F, et al. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis[J]. Cell Oncol (Dordr), 2015, 38(2): 93-109.
- [8] WANG Y, WU N, LIU D, et al. Recurrent fusion genes in leukemia; an attractive target for diagnosis and treatment[J]. Curr Genomics, 2017, 18(5): 378-384.
- [9] YIN J A, O'BRIEN M A, HILLS R K, et al. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse; results of the United Kingdom MRC AML-15 trial[J]. Blood, 2012, 120(14): 2826-2835.
- [10] QUAN P L, SAUZADE M, BROUZES E. dPCR: a technology review[J]. Sensors (Basel), 2018, 18(4): 1271-1279.
- [11] CILLONI D, PETITI J, ROSSO V, et al. Digital PCR in myeloid malignancies: ready to replace quantitative PCR? [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2249-2253.
- [12] BRAMBATI C, GALBIATI S, XUE E, et al. Droplet digital polymerase chain reaction for DNMT3A and IDH1/2 mutations to improve early detection of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Haematologica, 2016, 101(4): e157-e161.
- [13] WANG W J, ZHENG C F, LIU Z, et al. Droplet digital PCR for BCR/ABL (P210) detection of chronic myeloid leukemia: a high sensitive method of the minimal residual disease and disease progression [J]. Eur J Haematol, 2018, 101(3): 291-296.
- [14] BULLINGER L, DOHNER K, DOHNER H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways[J]. J Clin Oncol, 2017, 35(9): 934-946.
- [15] THOL F, GABDOULLINE R, LIEBICH A, et al. Measurable residual disease monitoring by NGS before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML [J]. Blood, 2018, 132(16): 1703-1713.
- [16] PETTI A A, WILLIAMS S R, MILLER C A, et al. A general approach for detecting expressed mutations in AML cells using single cell RNA-sequencing [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3660-3671.
- [17] SCHMITT M W, PRITCHARD J R, LEIGHOW S M, et al. Single-molecule sequencing reveals patterns of preexisting drug resistance that suggest treatment strategies in philadelphia-positive leukemias [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(21): 5321-5334.
- [18] LODE L, AMEUR A, COSTE T, et al. Single-molecule DNA sequencing of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes with multiple TP53 alterations[J]. Haematologica, 2018, 103(1): e13-e16.
- [19] HARRINGTON C T, LIN E I, OLSON M T, et al. Fundamentals of pyrosequencing[J]. Arch Pathol Lab Med, 2013, 137(9): 1296-1303.
- [20] SHEYBANI Z, RAHGOZAR S, GHODOUSI E S. The Hedgehog signal transducer and microRNA-326: pathogenesis and regulation of drug resistance in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 7621-7630.
- [21] LI J, WANG L, MAMON H, et al. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing[J]. Nature Med, 2008, 14(5): 579-584.
- [22] JONES A V, CROSS N C, WHITE H E, et al. Rapid identification of JAK2 exon 12 mutations using high resolution melting analysis[J]. Haematologica, 2008, 93(10): 1560-1564.
- [23] LAMBROS M B, WILKERSON P M, NATRAJAN R, et al. High-throughput detection of fusion genes in cancer using the Sequenom MassARRAY platform[J]. Lab Invest, 2011, 91(10): 1491-1501.

(收稿日期: 2020-06-10 修回日期: 2020-11-12)

• 综述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2021.04.040

军团菌检测方法研究进展*

夏兰兰¹, 宿振国²综述, 王 涛^{1△}审校

1. 滨州医学院附属医院检验科, 山东滨州 256600; 2. 滨州医学院烟台附属医院检验科, 山东烟台 264000

关键词: 军团菌; 军团菌病; 分离鉴定; 免疫学; 核酸检测

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)04-0555-04

军团菌是一类革兰阴性菌, 1976 年在美国费城召开退伍军人大会议期间, 暴发了一种不明原因的肺炎,

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(201710440056)。

△ 通信作者, E-mail: wangtaoliwang@163.com。

本文引用格式: 夏兰兰, 宿振国, 王涛. 军团菌检测方法研究进展[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(4): 555-558.