

• 综 述 •

无创性产前诊断染色体非整倍体的研究进展*

苗 杰, 黄 庆 综述, 府伟灵[△] 审校

(第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038)

关键词: 研究; 染色体; 无创性产前诊断; 胎儿游离 DNA; 胎儿游离 RNA

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.08.024

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)08-0877-03

染色体非整倍体是胎儿最常见的染色体畸形,也是胎儿出生缺陷疾病最常见的病因之一,其中以唐氏综合征最为常见。唐氏综合征又名 21-三体综合征(21-trisomy syndrome)或先天愚型,在新生儿中发病率约为 1/800。所以对先天性遗传病的产前检查、诊断是优生优育的重要保证。目前,唐氏综合征的产前检查对孕妇和胎儿都易造成危险,且检测指标也受多种因素影响。因此,急需一种安全、简便、可靠的无创性产前筛查诊断技术。本研究综述了母血胎儿细胞、胎儿游离 DNA、胎儿游离 RNA 的研究进展,并对其未来趋势进行展望,探讨其理论意义和实用价值。

1 孕妇外周血中胎儿有核红细胞用于检测染色体非整倍体疾病

1969 年有研究者在孕妇外周血中发现男胎的细胞分裂相,提出母血中可能存在胎儿细胞的假说。基于此,1979 年又有研究者利用荧光激活细胞分类技术首次从孕妇血中分离出胎儿细胞。此后的十几年研究者一直致力于胎儿细胞分离和富集技术的研究,主要是对胎儿有核红细胞的分离,因为它携带了胎儿基因组 DNA 的全部遗传信息。并且利用定量聚合酶链反应(PCR)和荧光原位杂交(FISH)准确诊断出胎儿性别和 21-三体。但胎儿细胞在孕妇血中含量非常稀少,且富集技术价格昂贵、效率低、灵敏度也不高,因此一定程度上限制了其临床应用和发展。2002 年,美国儿童健康和发展研究所(national institute of child health and development, NICHHD)对临床 2 744 例样本进行的相关研究证实了这点^[1]。因此,需要寻找一种新的方法,如直接检测母体循环血中胎儿核酸等。

2 胎儿遗传物质在无创性产前诊断染色体非整倍体病中的应用

2.1 胎儿游离 DNA 1977 年,研究者首次报道癌症患者血中存在游离 DNA,随后研究者在女性癌症患者血浆中检测出肿瘤相关癌基因突变,并且在小细胞癌患者血浆中检测出微卫星改变。通过这一启示,1997 年,Lo 等^[2]在怀有男胎的孕妇外周血中检测出胎儿 Y 染色体特异性 DNA 序列,由此为无创性产前诊断开辟了新纪元,取得了本质上的重大突破。

据报道,胎儿游离 DNA 最早可于怀孕后 5 周在母血中测出^[3],为无创性产前诊断提供了新的可能性依据,在很大程度上降低孕妇的身心负担。研究发现,胎儿游离 DNA 浓度在 21-三体和 13-三体男胎的孕妇血中高于正常孕妇,而在 18-三体的孕妇中无差别^[4]。Lo 等^[5]用定量 PCR 分析发现胎儿游离 DNA 在孕妇生产后 1 d 消失,平均半衰期为 16.3 min。胎儿游离 DNA 的更新和凋亡可能与滋养层细胞凋亡有关。早期报道胎儿游离 DNA 占母体血浆总 DNA 的 3%~6%。2008

年, Lun 等^[6]使用具有高精度性和灵敏性的微流体数码 PCR 技术定量检测母体血中胎儿游离 DNA,结果显示在妊娠的前 3 个月母血中胎儿 DNA 的浓度至少是先前报道的 2 倍。

基于此,许多研究者致力于提取 DNA 技术的研究。2004 年, Chan 等^[7]检测出胎儿 DNA 片段长度为 193~313 bp,远小于母血中的 DNA 长度。随后 Li 等^[8]用琼脂糖凝胶电泳从母血中成功分离出短的胎儿 DNA 片段。但这种方法只能用于定性检测且操作费时而且容易引起样本污染。另外, Dhallan 等^[9]报道利用甲醛可以减少母体血浆背景影响,以提高胎儿 DNA 的富集效率,这种方法尚存争议^[10]。近年,有研究者结合大小分级分离法和全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)法提高了胎儿游离 DNA 的富集效率^[11]。尽管如此,母体血中 DNA 仍然占主要部分,ccfDNA 用于无创性产前检测在很大程度上还会受到母源性血浆背景的影响,所以利用传统的 PCR 定量检测胎儿 DNA 会和母体血浆中 DNA 有一定的重叠。此外,用胎儿游离 DNA 只能检测出父源性遗传的基因突变,对母源性遗传的检测还有一定限制。解决上述困难需要改进技术提高胎儿 DNA 浓度以减少母体血浆背景的影响,或者寻找不依赖于胎儿性别和母体血浆的胎儿特异性标志物。

因此,对于胎儿 DNA 检测的技术方法,表观遗传的变化开始受到研究者的广泛关注。近几年比较热门是表观遗传学改变、数字化 PCR 和大量平行基因组测序(massively parallel genomic sequencing, MPGS)。2002 年, Poon 等^[12]检测出母体和胎儿间不同的甲基化模式,首次将表观遗传标志物用于无创性产前诊断。随后, Chim 等^[13]研究发现定位于 18 号染色体的编码 *maspin* 的 *SERPINB5* 基因在胎盘中处于低甲基化,而在母血中高甲基化。因此,通过表观遗传等位基因比率法,就可以诊断 18-三体的患儿。Chan 等^[14]也发现 *RASSF1A* 基因在胎盘中高甲基化而在母血中处于低甲基化状态。基于此,研究者们开始寻找唐氏综合征 21 号染色体上的表观遗传标记。2007 年, Old 等^[15]经筛选发现位于 21q22.3 (*AIRE*、*SIM2*、*ERG* 基因)的 3 个差异甲基化序列,其中发现 *AIRE* 启动子区域的 CpG 位点高度差异甲基化,可作为无创性产前诊断唐氏综合征的候选表观遗传标记。2008 年, Chim 等^[16]系统搜索位于 21 号染色体上的胎盘 DNA 甲基化标志物,在研究的 114 个 CpG 岛中,显示母体和胎儿间甲基化差异的有 22 个(19%),这些可能会进一步用于无创性诊断唐氏综合征的研究中。2010 年, Tong 等^[17]提出一个结合胎儿特异性表观遗传和遗传标记的新方法检测 21-三体,分析 24 个来自整倍体怀孕的母体血浆样本和 5 个 21-三体产妇的血浆样本,结果发现一个

* 基金项目:国家计生委课题(2009-GJKJS-019)。△ 通讯作者, E-mail: weilingfu@yahoo.com。

整倍体样本假阳性,其具有较高的阳性率。表观遗传的染色体剂量方法是无创性产前诊断 21-三体的一种新方法,这可能成为以后无创性诊断 21-三体普遍可用的临床技术方法。

近几年基于无创性产前诊断的新技术主要还有数码 PCR 和大量平行基因组测序(massively parallel genomic sequencing,MPGS)。这两项分子水平的技术可以解决胎儿 DNA 在母血中含量少、检测易受母源性血浆背景影响等不足之处。2008 年,Lun 等^[18]利用微流体数码 PCR 技术,这个技术克服了以往技术(比如实时 PCR)存在的缺陷,而且具有更高的临床灵敏度,可以对胎儿游离 DNA 进行精确定量分析,可用于诊断和研究分析,有望适用于临床应用。传统的检测方法只能检测到父源性遗传或突变的单基因疾病,但近年有报道联合数码相对突变剂量(relative mutation dosage,RMD)方法和数码核酸大小选择(nucleic acid size selection,NASS)方法可以检测到母源性基因突变^[19],这对于无创性产前诊断单基因疾病具有重要意义。尽管数码 PCR 方法对于胎儿 DNA 检测是一个重大进步,但胎儿游离 DNA 只占母血 DNA 的一小部分,所以定量检测还是受到一定的干扰。Chiu 等^[19]利用 MPGS 方法就克服上述方法的不足之处,这个方法不依赖于特定基因,所以在相同容积的血样本条件下可以很大程度上增加非整倍体目标分子的数量。但由于其价格昂贵尚未适用于临床。有学者预测这项技术在未来十年内将会被许多研究小组常规使用。随着检测技术的不断发展提高,无创性产前诊断染色体非整倍体疾病普遍适用于临床有可能会成为现实^[20]。

2.2 胎儿游离 RNA 胎盘是胎儿特有的组织,如果能够提出检测到胎盘特异性 mRNA,那么会产生新的胎儿特异标志物,对其后续的扩增及检测也会具有针对性,可以调高检测的特异性和灵敏性。2000 年,Poon 等^[21]在怀有男胎的母体血中检测出 Y 染色体特异性转录的 mRNA。有研究已证实胎盘是 mRNA 的主要来源,且 mRNA 具有极好的稳定性,并于产后迅速从母血中清除,所以 mRNA 用于无创性产前诊断具有较好的临床应用价值。2004 年,Tsui 等^[22]使用微阵列的方法测出胎盘 mRNA 标志物。2007 年,Lo 等^[23]在母血中检测出定位于 21 号染色体上基因转录的胎盘特异性 PLAC4 (placenta-specific 4)mRNA,和胎儿游离 DNA 一样,也于产后迅速从母血中消失。由于胎儿 RNA 独立于母体血背景且不受性别干扰,所以适用于无创性产前诊断胎儿染色体非整倍体疾病。

基于此,Lo 等^[23]提出 RNA-SNP 等位基因比率法(allelic ratio)检测母血中 21 号染色体上 PLAC4 mRNA 的剂量。理论上,如果是正常二倍体胎儿,由胎盘 PLAC4 mRNA 转录释放到母血中的等位基因量应该是等同的,那么这两个 RNA-SNP 等位基因比例应为 1:1;如果是 21-三体,RNA-SNP 等位基因比率应为 1:2 或者 2:1。同时,证实了用这个方法诊断 21-三体的灵敏度和特异性分别是 90.0%和 96.5%^[23]。由此可见这个方法是诊断 21-三体的比较精确的方法,且不受母血浆影响独立于胎儿性别,有望以后普遍在临床使用。但是,该方法的主要限制就是胎儿的 SNP 位点必须是杂合子,因此对于 SNP 位点是纯合子的胎儿或者未知样本的检测受到一定的限制。随后,Tsui 等^[24]用相同的方法成功检测出 18-三体患儿的 *SERPINB2* RNA-SNP 位点。2008 年,Go 等^[25]使用部分变性高效液相色谱确定杂合子样本,并用淬灭延伸反应检测 21-三体胎儿。由于当前的方法需要高精密专业的仪器设备,所以这种新方法有望取代原来的方法用于染色体非整倍体胎儿的检测。

近年,Chim 等^[26]在母血中测出 microRNA,其在母血中比胎儿 RNA 更稳定,并且在基因表达中起着重要作用,有望成为新的胎儿标志物用于无创性产前诊断的筛查。

3 结 论

无创性产前筛查和诊断染色体非整倍体疾病已是未来产前检查的趋势,与传统的产前检查相比,具有高灵敏度和特异性的特点,关键从人文角度考虑,孕妇可以在早期及时终止妊娠,可有效减少对身体的创伤,并且可以降低孕妇的心理和精神负担。当前,无创性产前检查技术日新月异,但是仍然没有在临床上被广泛推广和应用,相信在不久的将来一定会有更多更新的技术出现,最终取代传统的产前检查,为众多家庭以及社会所受益。

参考文献

- [1] Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National institute of child health and development fetal cell isolation study[J]. Prenat Diagn, 2002, 22(7): 609-615.
- [2] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(9076): 485-487.
- [3] Bustamante-Aragones A, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, et al. Foetal sex determination in maternal blood from the seventh week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the fetuses of female carriers[J]. Haemophilia, 2008, 14(3): 593-598.
- [4] Wataganara T, LeShane ES, Farina A, et al. Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18[J]. Hum Genet, 2003, 112(2): 204-208.
- [5] Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma[J]. Am J Hum Genet, 1999, 64(1): 218-224.
- [6] Lun FM, Chiu RW, Allen Chan KC, et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2008, 54(10): 1664-1672.
- [7] Chan KC, Zhang J, Hui AB, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2004, 50(1): 88-92.
- [8] Li Y, Di Naro E, Vitucci A, et al. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma[J]. JAMA, 2005, 293(7): 843-849.
- [9] Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, et al. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation[J]. JAMA, 2004, 291(9): 1114-1119.
- [10] Chung GT, Chiu Y, Rossa WK, et al. Lack of dramatic enrichment of fetal DNA in maternal plasma by formaldehyde treatment[J]. Clin Chem, 2005, 51(3): 655-658.
- [11] Jorgez CJ, Bischoff FZ. Improving enrichment of circulating fetal DNA for genetic testing: size fractionation followed by whole gene amplification[J]. Fetal Diagn Ther, 2009, 25(3): 314-319.
- [12] Poon LL, Leung TN, Lau TK, et al. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2002, 48(1): 35-41.
- [13] 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 U S A, 2005, 102(41): 14753-14758.

- [14] Chan KC, Ding C, Gerovassili 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(12): 2211-2218.
- [15] Old RW, 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.
- [16] Chim SS, Jin S, Lee TY, et al. Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21; toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21[J]. Clin Chem, 2008, 54(3): 500-511.
- [17] Tong YK, Jin S, Chiu S, et al. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach [J]. Clin Chem, 2010, 56(1): 90-98.
- [18] Lun F, Tsui NB, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(50): 19920-19925.
- [19] Chiu RW, Chan KC, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(51): 20458-20463.
- [20] Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis in 2020[J]. Prenat Diagn, 2010, 30(7): 702-703.
- [21] Poon LL, Leung TN, Lau TK, et al. Presence of fetal RNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2000, 46(11): 1832-1834.
- [22] Tsui NB, Chim S S, Chiu RW, et al. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling[J]. J Med Genet, 2004, 41(6): 461-467.
- [23] Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection[J]. Nat Med, 2007, 13(2): 218-223.
- [24] Tsui NB, Wong BC, Leung TY, et al. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study[J]. Prenat Diagn, 2009, 29(11): 1031-1037.
- [25] Go AT, Visser A, Betsalel OT, et al. Measurement of allelic-expression ratios in trisomy 21 placentas by quencher extension of heterozygous samples identified by partially denaturing HPLC [J]. Clin Chem, 2008, 54(2): 437-440.
- [26] Chim SS, Shing TK, Hung EC, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2008, 54(3): 482-490.

(收稿日期: 2011-02-04)

• 综 述 •

麻疹病毒病原学最新研究进展及其变异对疫苗保护性的影响

任增志 综述, 许红梅[△] 审校

(重庆医科大学儿童医院感染消化科 400014)

关键词: 麻疹病毒; 疫苗; 变异(遗传学); 病原学

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 08. 025

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)08-0879-03

麻疹(measles)是麻疹病毒(measles virus, MV)引起的急性呼吸道传染病,是常见的传染病之一,为全球性传染病,世界上大部分地区均有此病流行的报道。该病主要发生在 5 岁以下婴幼儿,可引起发热、上呼吸道感染、结膜炎、口腔麻疹黏膜斑又称柯氏斑(koplik's spot)以及皮肤特殊性斑丘疹。个别的患者可引起肺炎、喉炎、心肌炎等严重并发症。

1 麻疹病毒病原学

麻疹是由 MV 引起的疾病。MV 属副粘病,为单股负链 RNA 病毒,长度为 15 893 bp,有 6 个结构基因,编码 6 个结构蛋白。从 3 端开始依次为:核蛋白(N)60×10³、磷酸蛋白(P)72×10³、基质蛋白(M)37×10³、融合蛋白(F)60×10³、血凝素蛋白(H)78×10³~80×10³及依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(L)210×10³。另外 P 基因还编码 V 蛋白和 C 蛋白,他们都是无结构蛋白。各蛋白在 N 蛋白的基因包装、复制和表达方面起主要作用,并使病毒的基因组壳体化。在麻疹病毒急性感染期主要是 N 蛋白介导人体的细胞和体液免疫,然而它也同时引起体内的免疫抑制,同时 N 蛋白还可结合 eIF3-p40 进而抑制宿主翻译^[1],另外 N 蛋白还可通过其磷酸位点的磷酸化作用促进病毒 mRNA 的转录和基因组的复制^[2]。

P 蛋白为聚合酶结合蛋白,它参与 RNA 的包膜和调控 N 蛋白的细胞定位。V 蛋白和 C 蛋白,在细胞毒素细胞上生长

时不起作用但是在病毒的致病性方面起一定的作用。类浆细胞树突状细胞的重要作用是在病毒感染机体后激活免疫反应刺激 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)后其强大的表达 α-干扰素(interferonα, IFN-α)的作用进而抑制病毒入侵。但是 MV V 蛋白通过抑制 Ik B 激酶 α(Ik B kinaseα, IKKα)和 IFN 调节因子 7(IFN regulatory factor 7, IRF7)的活性进而阻断 TLR 介导的 IFN 的产生,使机体处于免疫抑制状态从而促进 MV 的入侵;C 蛋白并不直接抑制 IFN 的产生,通过影响病毒聚合酶的活性进而调节 MV RNA 的转录、复制和合成,作为间接抑制 IFN 诱导的途径^[3-4]。但是 V 蛋白抑制作用比 C 更强^[5]。此外 C 蛋白还是 MV 在体内复制时必需的蛋白并且可以在细胞核和细胞质之间自由穿梭^[6-7]。

M 蛋白、F 蛋白和 H 蛋白共同形成病毒的外膜。M 蛋白能下调病毒聚合酶的活性进而影响到 MV mRNA 的转录和基因组的复制^[8],另外 M 蛋白还通过和 H 蛋白胞质尾部相互作用影响病毒的组装和细胞间的融合进而调节 MV 在不同类型细胞上的生长和通过与 N 蛋白相互作用调节 MV RNA 的合成和组装。F 蛋白的核苷酸序列保守,是副粘病毒科成员共有的特征蛋白。F 蛋白能激活体内替代的补体途径,并在病毒入侵细胞过程中起融合细胞膜的作用。H 蛋白和 F 蛋白组成糖蛋白复合物在麻疹病毒入侵时起受体结合和融合细胞膜的

[△] 通讯作者, E-mail: xuhongmwp@x@yahoo. com。