

- [21] Tian ZL, Jae HK, Hyun HC, et al. Therapeutic potential of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells differentiated with growth-factor-free coculture method in liver-injured rats[J]. *Tissue Engineering: Part A*, 2010, 8(16): 2649-2660.
- [22] Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 21(10): 1199-1205.
- [23] 方天翊, 闵军, 邓小耿. 含淤胆血清的培养体系体外诱导胚胎干细胞表达肝细胞功能的研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12(12): 726-729.
- [24] 李芙蓉, 侯卫平, 程锐, 等. SD 大鼠间充质干细胞的分离培养及生物学特性研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(5): 425-429.
- [25] Pan Q, Fouraschen SM, Kaya FS, et al. Mobilization of hepatic mesenchymal stem cells from human liver grafts[J]. *Liver Transplantation*, 2011, 17(5): 596-609.
- [26] 杨洋, 汤华, 浦永, 等. 甲胎蛋白的液相芯片法检测与方法学评价

· 综述 ·

[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(1): 96-98.

- [27] 任红英, 赵钦军, 邢文, 等. 脐带间充质干细胞体外分化为有功能的低免疫原性肝细胞样细胞[J]. *中国医学科学院学报*, 2010, 32(2): 190-196.
- [28] 周刚, 邱大卫, 秦大江, 等. 二重荧光定量 RT-PCR 检测胰腺癌患者 CD44v6 基因的表达[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(18): 2051-2054.
- [29] 付汉东, 张爱华, 鲁艳. 自体骨髓干细胞移植治疗肝硬化患者血清 IL-18、TNF- α 、TGF- β 1、HGF 水平变化及临床意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(3): 329-330.
- [30] Qiao H, Tong Y, Han H, et al. A novel therapeutic regimen for hepatic fibrosis using the combination of mesenchymal stem cells and baicalin[J]. *Pharmazie*, 2011, 66(1): 37-43.
- [31] Lee KD. Applications of mesenchymal stem cells: an updated review[J]. *Chang Gung Med J*, 2008, 31(3): 228-236.

(收稿日期: 2012-01-17)

易感基因和单核苷酸多态性与乳腺癌关系的研究进展^{*}

罗丹¹综述, 袁军²审校

(1. 湖南省长沙市中心医院检验科 410004; 2. 贵州省人民医院中心实验室, 贵阳 550000)

关键词: 乳腺肿瘤; 单核苷酸多态性; BRCA1 基因; BRCA2 基因; HER2 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.07.027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)07-0827-04

乳腺癌作为女性健康的杀手, 占各种恶性肿瘤的 7%~10%, 我国虽然是乳腺癌的低发地区, 但仍稳居城市女性肿瘤首位, 发病率为 49.25/100 000, 而且近年来呈现年轻化和病例数明显增加的趋势^[1]。随着细胞分子生物技术的发展, 人们对乳腺癌发病的分子遗传机制的研究也越来越深入, 乳腺癌的易感基因和单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 易感位点成为了研究的热点和难点。现将乳腺癌易感基因中应用最为广泛、研究较透彻的 BRCA1、BRCA2 及 HER-2 基因与乳腺癌易感 SNP 作一综述。

1 BRCA1、BRCA2 基因

乳腺癌的发生发展是一个多基因、多因素、多环节共同长期作用的结果。外部因素主要有个人生活方式、放射线、环境致癌物、使用激素、生殖方式、生活环境等^[2-3], 存在基因-环境交互作用 (gene-environment interaction, GEI)^[4]。内部因素主要与基因的遗传多态性相关。在相同的致癌背景下, 只有少数人群对某些致癌因素敏感, 称之为肿瘤的易感性。与肿瘤密切相关的基因或等位基因称之为肿瘤的易感基因。自 MikiI 等^[5]分离出第 1 个与家族性乳腺癌和卵巢癌相关的 BRCA1 基因以来, 目前 BRCA1 与 BCRA2 基因已经成为研究较为确切的与乳腺癌发生有密切关系的易感基因。

BRCA1 基因位于人类 17 号染色体 q21, 长约 100 kb, 由 22 个编码外显子和 2 个非编码外显子共同构成, 主要功能为抑制细胞生长、对细胞周期调控、基因转录调控、蛋白质泛素化以及 DNA 损伤修复和细胞凋亡、维持基因组稳定等。BRCA2 由 Wooster 等^[6]发现, 定位于人类染色体 13q12, 由富含 AT 核

苷酸的 10 254 个核苷酸组成, 包含 27 个外显子, 含半数编码序列的基因, 主要功能是在转录水平上调节基因表达以及 DNA 损伤修复、中心体功能等^[7]。

BRCA1 和 BRCA2 是 2 种致癌基因, 在乳腺癌、卵巢癌等肿瘤中高表达。在家族性和遗传性乳腺癌中 2 种基因突变检出率较高, 80% 以上的患者存在 BRCA1 基因结构和功能的变异。大约 40%~50% 的遗传性乳腺癌患者存在 BRCA1 基因突变, 约 80% 的乳腺癌和卵巢癌都高发的家族患者存在 BRCA1 基因突变。BRCA2 基因突变属于特异性微缺损, 80% 的男性家族性乳腺癌患者中 BRCA2 基因发生突变, 50% 的散发性乳腺癌患者的癌组织中 BRCA2 呈阳性表达^[8], 但体细胞中的突变却十分罕见。

BRCA1 和 BRCA2 同属抑癌基因, 常用于乳腺癌的风险评估。携带 BRCA1 和 BRCA2 的突变者患乳腺癌的风险为 47%~66% 和 40%~57%, 且易早年发病。BRCA1 和 BRCA2 在遗传性乳腺癌和卵巢癌中占有相当的比例, 发生乳腺癌的风险估计也明显增加, 约为 50%~80%。BRCA1 和 BRCA2 相关性乳腺癌一般发病早、双侧性、高分级、分化差、浸润性强, 髓样癌的比例高, 尤其是 BRCA1 基因突变者; 雌激素受体、孕激素受体和 HER-2、erb-BO2 的阳性检出率低而 p53、cyclinE 基因的突变率高。

BRCA 基因在指导乳腺癌的治疗方面也很关键性的作用。首先在外科治疗方面, 如果发生 BRCA 突变, 建议对双侧乳腺进行切除。研究表明, 在遗传性乳腺癌患者进行保乳手术后, 10 年累积局部复发率 (in-breast tumor recurrence, IBTR)

* 基金项目: 国际合作基金(黔科合外 G 字[2011]7038 号); 贵州省科技基础条件应用基金(黔科平台[2010]4005); 贵阳市科技创新基金([2008]筑科 4 第 27 号); 贵阳市科技创新平台([2010]筑科 4 第 3-1 号)。

为 27% (HR: 3.9, 95% CI: 1.1~13.8, $P=0.03$), 10 年累积对侧乳腺癌 (contralateral breast cancer, CBC) 发病风险为 25% ($P=0.03$), 在伴有 BRCA 突变的乳腺癌患者更是高达 43.3%, 若进行预防性切除则可减少 97% 的 CBC 的发生^[9]。其次, 在抗肿瘤药物选择上 BRCA 有很强的提示作用。伴 BRCA 突变的乳腺癌对 DNA 交联的化疗药物 (如卡铂、顺铂等) 十分敏感 [病理完全缓解 (pathologic complete remission, PCR) 达 83%], 但对紫杉类药物反应性较差 (PCR 仅 8%)^[10]。多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP) 抑制剂能影响 DNA 损伤修复并加速 BRCA 基因突变的细胞体内凋亡, 常与 DNA 交联药物联用, 在体内产生协同效应, 增强化疗效果^[11]。此外, BRCA 基因对高危乳腺癌预防也有指导意义, 他莫昔芬能降低遗传性乳腺癌的 IBTR 和 CBC ($P=0.08$, HR: 0.59, 95% CI: 0.35~1.01)。

2 HER-2 基因 HER-2 基因作为原位癌基因, 属于人类表皮生长因子受体, 是具有酪氨酸激酶活性的高同源性蛋白质, 位于 17 号染色体 q21 上, 编码 p185 跨膜糖蛋白。HER-2 基因的主要功能是上调血管内皮生长因子 (VEGF)/ 血管通透性因子 (VPF), 参与抑制细胞凋亡, 破坏机体组织抗侵袭屏障; 维持或促进肿瘤细胞生长, 促进肿瘤新生血管生成, 增加肿瘤细胞的侵袭力等。

1987 年 Slamon 等^[12] 在原位乳腺癌中发现了 HER-2 基因的过度扩增, 随后的研究显示, 该基因的过度表达是乳腺癌的预测和预后监测的分子标记物。HER-2 在乳腺癌患者唾液中检出率高于健康者 10 倍以上, 而且稳定性好、敏感性高、特异性强, 可作为乳腺癌早期筛查性诊断指标。HER-2 基因高表达与肿瘤细胞增殖活性高, 原发性肿瘤的组织学或细胞核分级差、DNA 多倍体、淋巴结阳性水平等呈正相关, 而与孕激素受体表达及肿瘤雌激素受体呈负相关。HER-2 过度表达的乳腺癌患者往往表现为淋巴结转移、肿瘤恶性程度高、病情发展迅速、生存率低下。

随着 HER-2 基因的研究深入, 其在临床上的指导作用也十分突出。在指导乳腺癌的手术治疗上, 如果术前 HER-2 高表达, 则应全腺切除, 以防预后不良, 反之则行导管原位癌 (DCIS) 保乳治疗^[13]。在乳腺癌的内分泌治疗上, HER-2 阳性常提示内分泌药物耐药, 如他莫昔芬能降低雌激素受体 (ER) 阳性的乳腺癌复发率, 但对 HER-2 也阳性的治疗却有不良反应。在乳腺癌靶向治疗方面, 根据 HER-2 抗原制作的 IgG 抗体赫赛汀 (Herceptin) 能阻断肿瘤细胞的生长信号, 促进 HER-2 受体蛋白内在降解, 增强免疫细胞的攻击和杀伤能力, 从而靶向杀死肿瘤细胞, 赫赛汀也能有效下调内皮生长因子发生转移性乳腺癌。Ritter 等^[14] 就发现赫赛汀能阻止 HER-2 的磷酸化, 激活 HER-2 的扩增。Kim 和 Serrero^[15] 也发现畸胎细胞源性生长因子 (PCDGF)/ 糖蛋白 (GP) 88 通过时间及剂量依赖性可诱导 HER-2 蛋白有丝分裂原的磷酸化, 从而使 HER-2 蛋白过度表达的肿瘤细胞获得对赫赛汀的耐药性。但其具体的耐药机制, 到目前还没完全清楚, 仍需要进一步研究和确证。

3 其他易感基因 通过群体遗传学研究, 乳腺癌相关性基因还有 10 余个。p53 和 PTEN 抑癌基因与乳腺恶性肿瘤的增殖和转移关系密切^[16]。PTEN 还能使 FAK 及 Shc 去磷酸化, 通过抑制 MAPK/ERK 信号途径阻止细胞的迁移, 抑制肿瘤的侵袭转移^[17]。HLA-DRB1 的等位基因 0408、0901 则是通过高分辨基因分型法得出的中国汉族乳腺癌中的高频基因^[18]。另

外, 还有 Bcl2/Bax、RAD50、FGFR-2 基因及受体、NBS1、c-Myc 基因、CHEK2、ATM 和 PALB2 等基因。这些基因任何一个突变都能显著增加患乳腺癌的风险, 但每个基因的突变都没有突变相对集中的“热点”。单个基因突变往往不会使患者患乳腺癌, 但多个细小的基因缺陷积累或叠加却会使患病的危险性大大增加。

4 SNP 与乳腺癌

在乳腺癌风险评估模型中, 除了易感基因外, SNP 也是一个极其重要的评估因素。SNP 是指在基因组上单个核苷酸的变异, 且变异频率须大于 1%, 形成遗传标记, 其数量很多, 所导致的 DNA 序列多态性丰富。SNP 包括置换、颠换、缺失和插入等几种形式, 从理论上讲每一个 SNP 位点都可以有 4 种不同的变异形式, 但实际上发生的只有 2 种, 即转换和颠换, 两者之比为 2:1。作为研究疾病易感性工具的第 3 代遗传标记, SNP 筛查疾病的高风险人群, 为个性化治疗提供根据, 为疾病预后、追踪提供分子标记。目前, 有中国、英国、瑞典、芬兰、德国等国家的研究人员分析了上万个病例中的上百个与乳腺癌相关的 SNP 位点。定位的染色体主要包含 1、2、3、5、8、9、10、14、15、16、17、19 号等 12 条。涉及的易感基因包含 ACTL7A、ANKLE、ANKRD16、CCND1、ABHD8、FGFR2、TOX3、ZMIZ1、ZNFGGL1、GRIK1、CDKN2B、RNF146、ROPN1L、LSP1、ORA0V1SLC4A7、COL1A1、MAP3K1、MRPS30、MYEOV、ECHDC1、ESR1、FBN1、FBXO18、FGF19、FGF3、FGF4、ABCC4、CDKN2A、KLF4、LOC643714、RAD23B、RAD51L1、TNRC9 等乳腺癌易感基因。

在不同种族、不同地区、不同环境, 不同的 SNP 位点对乳腺癌的患病风险都存在不同的影响。因此, 寻找乳腺癌中 SNP 突变位点成为众多研究的热点。Cai 等^[19] 最新进行了一个 4 期的全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS), 通过电泳等技术共对 17 153 例东亚女性患者和 16 943 例对照者进行分析, 发现 1 个重要的 SNP 位点, 即 rs10822013, 位于 10 号染色体上 q21.2, 属锌指蛋白 365 (ZNF365) 基因。rs10822013 潜在的功能能强烈受累 10q21.2 的基因变异, 说明在东亚女性中它能作为乳腺癌风险评估的指标。Chen 等^[20] 发现在细胞生长、活动度, 侵入性和血管新生中扮演重要角色的成纤维细胞生长因子受体 2 (FGFR2), 在乳腺癌危险因素中同样发挥着重要的作用。通过对 388 例乳腺癌患者和 428 例健康对照者的 FGFR2 的 7 个 SNP 位点 (rs2981582、rs17102287、rs17542768、rs10510097、rs11200012、rs375081 和 rs2981578) 进行 PCR 和测序测定, 发现 rs2981578 等位基因型 A, 是乳腺癌的保护性因子, 与乳腺癌有关的基因, 而 rs3750817 等位基因 CT 则是必不可少的一个潜在的危险因素。Hutter 等^[21] 发现, 位于 16q12.2 的 rs3803662 位点和位于 5p12 的 rs10941679 位点是非洲裔的美国女性乳腺癌的高危因子; Figueroa 等^[22] 研究认为 1p 11.2 的 rs11249433、rs999737 和 rs10483813 位点是欧洲白人女性的乳腺癌高危位点; Zhang 等^[23] 发现的 rs2046210 及 Liang 等^[24] 发现的 rs1219648、rs2420946 都是中国人群的乳腺癌易感位点。通过 GWAS 或是其他途径发现越来越多的与乳腺癌相关, 适应本地区的易感基因位点, 这些 SNP 位点相关基因的功能有的是抑癌作用, 有的是致癌作用, 其强烈程度和相关程度也各不相同^[25~32]。寻找本地区、本民族的 SNP 易感位点, 作为肿瘤的遗传标记物, 提高乳腺癌风险预测准确性, 进行早期诊断, 并最终应用于临床, 已经或可望成为现实, 如在冰岛已通过检测 SNP

位点来进行乳腺癌风险预测服务。

5 小结

继易感基因和易感 SNP 位点的发现,其功能和临床应用则成为另一个研究的热点。基于易感基因、易感 SNP 位点及其他相关危险因素(如生育史、绝经年龄、环境等)建立起了风险评估模型,并在某些国家已经开始了临床运用,如日本、美国等,但这些经验型或基因型模型都没有完全考虑遗传性和非遗传性因素,存在很大的局限性。乳腺癌的发病风险与 SNP 位点和易感基因的突变个数及其本身的危险性呈高度相关,突变个数越多,突变的 SNP 位点和易感基因的危险性越高,发生乳腺癌的概率也就越大。随着国内外的乳腺癌流行病学和遗传多态性的研究深入,建立和应用适合于我国人群的乳腺癌风险评估平台并为广大高危人群进行健康咨询和预防保健服务,已经成为一项十分必要且完全能完成的任务。但目前也存在诸多技术和研究瓶颈,如寻找能适合全体的而不是地域化的易感基因和 SNP 位点、研制遗传多态性检测芯片、建立科学而完善的风险评估平台等,都成了需要解决的难题。

参考文献

- [1] 赵平,陈万青.2008 年中国肿瘤登记本[M].北京:军事医学出版社,2009;34-35.
- [2] Benaon-Larsen S, Vogel U, Christensen J, et al. Interaction between ADH 1C Arg(272) Gln and alcohol intake in relation to breast cancer risk suggests that ethanol is the causal factor in alcohol related breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2010, 295(2): 191-197.
- [3] Bhatti P, Struwing JP, Alexander BH, et al. Polymorphisms in DNA repair genes, ionizing radiation exposure and risk of breast cancer in U. S. Radiologic technologists[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(1): 177-182.
- [4] Khoury MJ, Wacholder S. Invited commentary: from genome-wide association studies to gene-environment-wide interaction studies-challenges and opportunities[J]. *Am J Epidemiol*, 2009, 169(2): 227-230.
- [5] Miki Y, Swensen J, Shattuck ED, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1[J]. *Science*, 1994, 266(5182): 66-71.
- [6] Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13[J]. *Science*, 1994, 265(5181): 2088-2090.
- [7] 薛丽,杨芳,张贺龙,等. *Centrobin* 与 *BRCA2* 蛋白间相互作用及其细胞定位[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(11): 1017-1023.
- [8] 陈东祥,伍欣星,李军川,等. *BRCA2* 在散发性乳腺癌组织中的表达及意义[J]. *武汉大学学报*, 2007, 28(3): 359-361.
- [9] Garcia CA, Barile M, Gentilini OD, et al. Breast-conserving surgery in *BRCA1/2* mutation carriers: are we approaching an answer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(8): 3380-3387.
- [10] Byrski T, Gronwald J, Huzarski T, et al. Pathologic complete response rates in young women with *BRCA1*-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(12): 375-379.
- [11] Evers B, Drost R, Schut E, et al. Selective inhibition of *BRCA2* deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(3): 3916-3925.
- [12] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *HER2 neu* oncogene[J]. *Science*, 1987, 235(4785): 177-182.
- [13] Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, et al. A meta-analysis on the interaction between *Her-2* expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 4741-4748.
- [14] Ritter CA, Perez TM, Rinehart C, et al. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo epidermal growth factor receptor and *ERBB* ligands and remain dependent on the *ERBB* receptor network[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(16): 4657-4659.
- [15] Kim WE, Serrero G. PC cell-derived growth factor stimulates proliferation and confers trastuzumab resistance to *Her-2* overexpressing breast cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(14): 4192-9.
- [16] Won SH, Lee HJ, Jeong SJ, et al. Tanshinone II A induces mitochondria dependent apoptosis in prostate cancer cells in association with an inhibition of phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway[J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(11): 1828-1834.
- [17] Schneider E, Keppler R, Prawitt D, et al. Migration of renal tumor cells depends on dephosphorylation of Shc by PTEN[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(3): 823-831.
- [18] 黄春秀,程良红,刘远智,等. *HLA-DRB1* 座位的等位基因多态性与乳腺癌遗传易感关系的研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(7): 728-733.
- [19] Cai Q, Long J, Lu W, et al. Genome-wide association study identifies breast cancer risk variant at 10q21.2: results from the Asia Breast Cancer Consortium[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 9(20): 1223-1226.
- [20] Chen F, Lv M, Xue Y, et al. Genetic variants of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) are associated with breast cancer risk in Chinese women of the Han nationality[J]. *Immunogenetics*, 2011, 61(4): 28-30.
- [21] Hutter CM, Young AM, Ochs-Balcom HM, et al. Replication of breast cancer GWAS susceptibility loci in the women's health initiative african american SHARe study[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 20(9): 1950-1959.
- [22] Figueroa JD, Garcia-Closas M, Humphreys M, et al. Associations of common variants at 1p11.2 and 14q24.1 (*RAD51L1*) with breast cancer risk and heterogeneity by tumor subtype: findings from the Breast Cancer Association Consortium[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 9(20): 31-38.
- [23] Zhang W, Long JR, Gao YT, et al. Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(3): 324-328.
- [24] Liang J, Chen PZ, Hu ZB, et al. Genetic variants in fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) contribute to susceptibility of breast cancer in Chinese women[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(12): 2341-2346.
- [25] Milne RL, Goode EL, Garcia-Closas M, et al. Confirmation of 5p12 ss as a susceptibility locus for progesterone-receptor-positive, lower grade breast cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 4(23): 68-71.
- [26] Jiang Y, Shen H, Liu X, et al. Genetic variants at 1p11.2 and breast cancer risk: a two-stage study in Chinese women[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): 21563-21566.
- [27] Huang Y, Ballinger DG, Dai JY, et al. Genetic variants in the MRPS30 region and postmenopausal breast cancer risk[J]. *Genome Med*, 2011, 3(6): 42-45.

[28] Antoniou AC, Wang X, Fredericksen ZS, et al. A locus on 19p13 modifies risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers and is associated with hormone receptor-negative breast cancer in the general population[J]. Nat Genet, 2010, 42(10): 885-892.

[29] Antoniou AC, Kartsonaki C, Sinilnikova OM, et al. Common alleles at 6q25.1 and 1p11.2 are associated with breast cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers[J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(16): 3304-3321.

[30] Mukherjee N, Bhattacharya N, Sinha S, et al. Association of APC and MCC polymorphisms with increased breast cancer risk in an

· 综述 ·

Indian population[J]. Int J Biol Markers, 2011, 26(1): 43-49.

[31] Thomas G, Jacobs KB, Kraft P, et al. A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1)[J]. Nat Genet, 2009, 41(5): 579-581.

[32] Ahmed S, Thomas G, Ghoussaini M, et al. Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2[J]. Nat Genet, 2009, 41(5): 585-588.

(收稿日期:2012-01-24)

高分辨率熔解曲线技术在结核耐药检测中的应用进展

杨 辉^{1,2} 综述, 张国良², 张明霞² 审校

(1. 广州医学院 2010 级硕士研究生, 广州 510000; 2. 广东省深圳市第三人民医院肝病研究所 518000)

关键词: 高分辨率熔解曲线; 结核分枝杆菌; 耐药

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.07.028

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2012)07-0830-03

结核病是严重危害人们健康的重大公共卫生问题和社会问题^[1]。为此大量研究人员致力于快速诊断结核分枝杆菌耐药的研究。高分辨率熔解曲线 (high resolution melting, HRM) 技术是一种基于核酸的物理性质, 使用饱和染料反映核酸的熔解曲线变化来进行分析的技术, 其不受突变碱基位点和种类的局限, 既可以对未知突变进行筛查、扫描, 也可以对已知突变进行分析。现就使用 HRM 技术检测结核分枝杆菌耐药的研究进展作一综述。

1 HRM 技术介绍

HRM 分析技术是 2002 年美国犹他大学 Carl Wittwer 实验室与爱德华科技公司合作开发的一种新技术, 这种方法最初应用于单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 检测分析^[2]。其实质是在常规 PCR 的基础上加入饱和染料, 无需使用特异性探针, 在 PCR 反应扩增完后进行熔解分析, 得到检测结果。

1.1 HRM 技术检测原理 HRM 技术建立在核酸分子的物理性质不同的基础上。每个核酸分子的 GC 含量、分布、核酸长度都是不同的, 通过实时监测升温过程中的饱和染料与 PCR 产物的结合情况, 仪器通过收集这些信息进入分析软件, 形成各自的熔解曲线^[3]。因此核酸在扩增后进行熔解分析时会有其独特的熔解曲线, 并且熔解曲线性质、位置都是不同的。

目前的研究发现导致结核分枝杆菌发生耐药主要是在药物相关基因发生突变所致。在利用 HRM 扩增含有碱基突变位点的耐药相关基因的过程中, 由于突变位点的碱基不匹配, 结合力相对较弱, 双链 DNA 分子在升温过程中会比野生型先熔解, 荧光染料从局部解链的 DNA 分子释放, 其熔解温度反映在熔解曲线上就会相应降低, 根据荧光强度和温度的曲线就可以判断是否存在碱基突变。而且不同的基因位点、不同突变形式都会影响熔解曲线的峰形, 因此, HRM 能有效地检测结核耐药的发生情况。

1.2 HRM 技术的实验基础

1.2.1 饱和染料的出现 由于饱和染料对 PCR 反应存在抑制作用^[4]。因此在平时实验中使用的浓度很低, 远远低于将 DNA 双螺旋结构的饱和浓度, 由于使用浓度未达到饱和, 加之某些染料本身特性, 会使结果不准确。饱和染料 LC Green 等

有着更强的 DNA 结合能力和较小的抑制作用, 在 DNA 解旋过程中不会发生重排等现象, 更能体现高分辨曲线^[5]。

1.2.2 精确控温设备和高密度数据采集的仪器的开发及其专业化分析软件的出现 DNA 熔解要尽可能精确, 温度变化信息要尽可能采集, PCR 反应孔间温差要小, 并通过技术的改良来研究它的潜力^[2]。

1.3 HRM 的技术优势 HRM 技术是一个简单的闭孔系统, 被污染的可能性很小, 同时具有高通量、高灵敏度、高特异性, 快速、操作简单、重复性好、成本低廉、使用范围和检测范围广等优点^[6-9]。

1.4 HRM 技术的主要应用

1.4.1 SNP 分析 SNP 现象在生物体内广泛存在, 是正常生物遗传变异的表现之一, 因此对 SNP 进行分析有着极为重要的意义。Vossen 等^[10]通过 HRM 分析 69 例个体的 MBL2, 发现了 3 处 SNP 位点, 目前正在研究其与炎性和感染性疾病的相关性。Jin 等^[11]研究 PARP 1 基因上 2 个 SNP 位点时发现, 这 2 个 SNP 的 5 种多态性变化均可以不同程度地降低非霍奇金淋巴瘤的发病率。

1.4.2 突变扫描 HRM 技术既能筛查未知突变, 也能检测已知突变。Hill 等^[12]利用 HRM 比较 13 例慢性肉芽肿疾病患者和 96 例健康个体的 CYBB 外显子时发现, 此外显子的 19 个突变位点与 X 连锁慢性肉芽肿疾病的发生有密切关系。Ong 等^[13]通过研究结核病患者的 rpoB, katG, ahpC, mabA-inhA 基因, 发现当这些基因发生突变时, 会出现利福平和异烟肼的耐药, 这为临床用药提供了重要依据。

1.4.3 甲基化分析 DNA 甲基化是 DNA 碱基序列的一种正常共价修饰。Snell 等^[14]应用 HRM 验证了 BRCA1 和 BRCA2 基因启动子的甲基化水平与家族性乳腺癌的发生密切相关。HRM 技术的其他用途主要有等位基因频率分析、物种鉴定、亲子鉴定等, 由于其独有的技术优势, 使用范围越来越广。

2 HRM 技术应用于结核分枝杆菌耐药检测的现状

随着分子生物学理论和技术的发展, 结核分枝杆菌的耐药机制和分子基础大部分已被发现, 因此, 科学家们开辟了一条新的检测结核分枝杆菌耐药的通道, 利用结核分枝杆菌的耐药