

atherosclerotic lesions in humans and mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(11): E312-E313.

[17] Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, et al. Complete sequencing and characterization of 21, 243 full-length human cDNAs [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(1): 40-45.

[18] Shiffman D, Chasman DI, Zee RY, et al. A kinesin family member 6 variant is associated with coronary heart disease in the Women's Health Study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(4): 444-448.

[19] 陈娟. 载脂蛋白 A5 基因多态性与脂类代谢疾病相关性研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(5): 554-556.

[20] Iakoubova OA, Tong CH, Rowland CM, et al. Association of the Trp719Arg polymorphism in kinesin-like protein 6 with myocardial infarction and coronary heart disease in 2 prospective trials: the CARE and WOSCOPS trials [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(4): 435-443.

[21] Shiffman D, O'meara ES, Bare LA, et al. Association of gene variants with incident myocardial infarction in the Cardiovascular Health Study [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(1): 173-179.

[22] Peng P, Lian J, Huang RS, et al. Meta-analyses of KIF6 Trp719Arg in coronary heart disease and statin therapeutic effect [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50126.

[23] Wu G, Li GB, Dai B. Association of KIF6 variant with lipid level and angiographic coronary artery disease events risk in the Han Chinese population [J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 11269-11280.

[24] 刘冰, 柯永胜. 他汀类药物强化调脂改善冠状动脉粥样硬化的研究进展 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2013, 21(3): 6-8.

[25] Iakoubova OA, Sabatine MS, Rowland CM, et al. Polymorphism in KIF6 gene and benefit from statins after acute coronary syndromes: results from the PROVE IT-TIMI 22 study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(4): 449-455.

[26] Iakoubova OA, Robertson M, Tong CH, et al. KIF6 Trp719Arg polymorphism and the effect of statin therapy in elderly patients: results from the PROSPER study [J]. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2010, 17(4): 455-461.

[27] Ference BA, Yoo W, Flack JM, et al. A common KIF6 polymorphism increases vulnerability to low-density lipoprotein cholesterol: two meta-analyses and a meta-regression analysis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28834.

(收稿日期: 2014-04-26)

• 综 述 •

骨髓活检组织检查中应用的分子诊断技术*

傅 强, 杨山虹 综述, 张秀明[△] 审校

(中山市人民医院检验医学中心, 广东中山 528400)

关键词: 骨髓活检组织; 聚合酶链反应; 荧光原位杂交技术
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 19. 041 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2014)19-2665-03

骨髓活检组织检查对恶性和非恶性造血系统疾病的诊断和分期至关重要^[1]。目前临床多采用细胞形态学和组织化学的方法(如苏木素-伊红染色、吉姆萨染色、铁染色等)对骨髓活检组织进行分析以达到诊断疾病的目的。此外, 流式细胞免疫表型分析和细胞遗传学分析也是骨髓活检组织检查常用的技术方法^[2]。近年来随着分子技术的发展, 分子诊断技术也作为骨髓活检组织检查的辅助诊断方法。尽管细胞形态学仍是诊断造血系统疾病最基本的方法, 然而分子诊断技术可以提高诊断的准确性, 进行疾病亚类的鉴别和提高微小残留病灶诊断的敏感性, 在造血系统紊乱的诊断中不可或缺^[3]。骨髓环钻活检和抽吸活检均是获得骨髓标本常用的方法, 嘱患者侧卧位从髂后上棘经活体组织穿刺针而得到。因为骨髓抽吸活检会破坏骨髓中各成分的分布、细胞的结构、造血成分和肿瘤细胞浸润的分布, 以及骨髓的内部结构, 所以在应用分子诊断技术对疾病进行辅助诊断时主要选用骨髓环钻活检的方法^[4]。骨髓环钻活检组织经甲醛固定、酸化、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)脱钙、石蜡包埋后即获得形态学完整的骨髓活检标本。本综述概述了分子诊断技术在骨髓环钻活检法制备的活检组织中的应用, 主要包括以 DNA 为基础的技术、以 mRNA 为基础的技术、DNA 和 mRNA 定量分析技术和荧光原位杂交技术。

1 普通聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)

1.1 普通 PCR 的技术操作 从石蜡包埋组织中提取的 DNA 因受到组织固定、脱钙和包被的影响而被降解, 所提取的 DNA 片段长度大多低于 500 bp。提取 DNA 时要用适量蛋白酶 K (25~200 L) 在 55 ℃ 的条件下过夜消化, 这种粗提的 DNA 可直接作为模板应用于 PCR, 也可过柱后提纯 DNA (适用于已被严重降解的 DNA)^[5-6]。DNA 的质量对 PCR 扩增的影响不大, 在实际操作中, 多用两个不同的 DNA 模板浓度 (如 1~2 L 未稀释模板和 1:10 稀释后的模板) 同步进行 2 个 PCR 扩增, 循环数为 40 个。因标准定性的 PCR 扩增, 其扩增产物为 200~250 bp, 因此标准定性 PCR 能在骨髓活检组织中获得最佳的扩增效率^[5-6]。此外, 在骨髓活检组织中也可应用巢氏 PCR。巢氏 PCR 是一种改进的 PCR, 使用 2 对 PCR 引物扩增完整的片段。第 1 对 PCR 引物扩增片段和普通 PCR 相似。第 2 对引物称为巢式引物, 结合在第 1 次 PCR 产物内部, 使得第 2 次 PCR 扩增片段短于第 1 次扩增的片段。巢式 PCR 的好处在于, 如果第 1 次扩增产生了错误片断, 则第 2 次在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低。因此, 巢式 PCR 的扩增非常特异^[7-8]。

1.2 普通 PCR 技术的应用及在诊断中的意义 在实际应用中, 所有以 DNA 为基础的检测技术均可在骨髓活检组织中应

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81401645); 2014 年度广东省科研基金资助项目 (B2014447); 2014 年度中山市科技计划项目 (2014A1FC098)。 作者简介: 傅强, 男, 主管检验师, 主要从事骨髓细胞形态学研究工作。 [△] 通讯作者, E-mail: zxm0760@163. com。

用,包括突变分析和染色体失衡等。例如在突变分析的检测中,可应用靶向技术(如限制性酶消化或等位基因分析)来鉴定易复发的位点突变;或应用筛选技术(如单链构象多态性、变性高通量液相色谱分析、循环扩增测序)来鉴定突变^[9]。JAK2 V617F 位点突变会引起生长因子的受体突变,导致细胞对生长因子过度反应,引起骨髓的过度增殖。JAK2 V617F 位点突变是 Ph 阴性的慢性骨髓增殖性疾病的新型诊断分子标记^[10],该位点突变的检测还有利于慢性骨髓增殖性疾病与骨髓增生异常综合征的鉴别诊断^[11]。

以 DNA 为基础的分子诊断技术优点在于其检测速度快,所需模板 DNA 的量少,对模板 DNA 的质量要求不高,且有相对较高的灵敏度(1%~5%)^[4]。因此,PCR 技术可应用于少量活检组织(如针吸活检组织)或是甲醛固定石蜡包埋样品,这些活检组织中的模板 DNA 的质量相对低,会被降解成小分子片段^[12]。

2 反转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)

2.1 RT-PCR 的技术操作 尽管骨髓活检组织的分子诊断多采用 DNA 作为模板,但近年的研究已探讨从石蜡包埋的骨髓活检组织中提取 RNA,并以 RNA 为模板进行检测。RNA 片段的完整性相对于 DNA 更易于受多因素影响,组织的固定、脱钙、包埋及 RNA 提取过程中的步骤均会影响 RNA 的完整性,提取的 RNA 的平均长度不超过 200 bp。因此,在进行后续 PCR 扩增时,其产物长度限定在 100 bp 或更短^[13]。从石蜡包埋的骨髓活检组织中提取 RNA 时,蛋白酶 K 消化所需温度稍高(60℃),然后用 95℃灭活蛋白酶 K,采用酚-氯仿法提取 RNA。转移 RNA 提取过程中的水相后,含 RNA 的水相与异丙醇混匀,-20℃沉淀 RNA 以提高 RNA 的产量。另外, RNA 还可以用过柱法提取^[14]。提取的 RNA 反转录成 cDNA,进行后续的 PCR 扩增。在设计 PCR 扩增引物时,PCR 扩增产物最好跨内含子,以消除模板中残留组织 DNA 的影响。如若不能,应该用 DNase 消化提取的 RNA,以去除残留的 DNA 片段,以免产生假阳性,但是 DNase 消化过程会导致 RNA 的进一步降解^[15]。

2.2 RT-PCR 技术的应用及在诊断中的意义 以 RNA 为基础的分子诊断技术主要用于检测 BCR/ABL 融合基因 12552081 和异常基因表达的检测^[16]。例如,应用 RT-PCR 技术设计跨内含子引物可以扩增骨髓活检组织中的细胞周期蛋白 D1,其可作为鉴别诊断小 B 细胞淋巴瘤的重要分子诊断标记^[17]。此外,在肥大细胞白血病中,细胞周期蛋白 D1 的高表达可以与其他淋巴瘤进行鉴别诊断^[18]。

3 荧光定量 PCR

3.1 荧光定量 PCR 的技术操作 荧光定量 PCR 技术的发展为分子诊断提供更为有效的方法。荧光定量 PCR 中应用的特异性引物标记探针和结果判读中的融解曲线分析不仅可以节省凝胶电泳所消耗的时间,提高检测的效率;而且能够避免 PCR 体系反应管内已扩增产物的交叉污染,提高检测的特异性^[19]。此外,荧光定量 PCR 可达到对目的基因定量分析的效果^[20]。

应用特异性探针进行 PCR 扩增时,荧光定量 PCR 仪连续不断检测 PCR 扩增过程中产生的荧光,该方法检测的荧光强度与反应体系中初始模板量直接呈正比。普通 PCR 应用终点检测的方法,并因 PCR 反应试剂的不同扩增效率也不同。荧光定量 PCR 在体系反应的对数增长期不断检测 PCR 产物的

产生而达到实时监控的目的,因此可以进行定量检测^[21]。荧光强度达到特定阈值的扩增循环数,称作 Ct 值,该 Ct 值与初始模板量直接相关。根据标准扩增曲线 Ct 值可以推算反应体系中初始模板量,或与管家基因的模板量相比,应用 $\Delta\Delta Ct$ 法计算目的基因的相对浓度^[22]。然而,因基因不同程度的降解、反转录及扩增的有效性,在骨髓活检组织中计算绝对基因浓度并不适用。一般情况下,目的基因与一个或多个管家基因相比以消除不同样品组织的不同的扩增效率。但是,因为管家基因在不同细胞类型和不同情况下的扩增效率不同,用 $\Delta\Delta Ct$ 法也不能很好解决目的基因检测的标准化问题,所以研究人员就推荐用多个管家基因来计算目的基因相对浓度的方法^[22]。石蜡包埋组织的荧光定量 PCR 最常用 TaqMan 探针,探针上有标记荧光素(FAMTM)和淬灭剂(TAMRATM)。当探针未与模板 DNA 结合时,探针序列完整,荧光素会被淬灭剂抑制不能发出荧光。一旦探针与模板 DNA 结合后,Taq 聚合酶中 5'~3'核酸酶降解探针并释放荧光素发出荧光^[23]。DNA 结合染料(如 SYBR GreenTM)因其高的荧光背景不适用于石蜡包埋组织的 RNA 检测^[23]。

3.2 荧光定量 PCR 技术的应用及在诊断中的意义 当用荧光定量 PCR 法检测组织中的 DNA 时,如检测杂合性缺失、基因甲基化或基因扩增,根据疾病类型和需要研究的目的基因座而选取参考基因座,该参考序列要包括参考基因座及其周边序列^[24]。当用荧光定量 PCR 法检测组织中的 mRNA 时,PCR 引物设计跨内含子是最佳的,以去除样本中 DNA 的污染^[15]。荧光定量 PCR 克服了普通 PCR 和 RT-PCR 中应用的凝胶电泳而带来的不便,可定量分析普通 PCR 技术涉及的突变分析和染色体失衡,以及 RT-PCR 技术涉及的 BCR/ABL 融合基因和异常基因表达的检测。

4 荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)

4.1 FISH 的技术操作 因骨髓活检组织的标本前期处理(如酸化脱钙)会引起标本自发荧光使 FISH 技术在骨髓活检组织中应用受限。因此,多采用 EDTA 作为脱钙剂。有报道发现,常规固定方法可以成功地应用 FISH 技术进行诊断^[2]。笔者以多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)为例简要介绍 FISH 技术的操作流程。制备 5 μm 的切片,切片经脱蜡和系列乙醇脱水后,经柠檬酸盐缓冲液(pH=6.0)微波 350 W 作用 40 min 进行抗原修复, DNA 在 70%甲酰胺中 75℃变性 15 min,梯度乙醇再次脱水后把切片晾干。探针为双色融合探针,分别检测 11q13 和 14q32,探针在 75℃条件下变性 5 min 后加在切片上。用橡胶薄膜封片在湿盒中,37℃孵育过夜后,用干片抗淬灭剂封片后完成原位杂交^[25]。为使诊断更为准确, FISH 技术常与免疫荧光技术结合,如在诊断 MM 时,加入浆细胞标记以区别细胞类型。在 FISH 检测时同步设立正常对照以判读阳性标本^[25-26]。

4.2 FISH 技术的应用及在诊断中的意义 众多造血系统疾病患者中会出现染色体数量或结构异常,如三倍染色体、染色体缺失或染色体易位,这些染色体异常往往是某一疾病的特征,可用于疾病的早期诊断和治疗^[27]。FISH 技术已经发展成为一个强大通用的技术,可以在增殖活性低的肿瘤中(如低评分的淋巴瘤或髓系肿瘤)或残留数量很少的异常细胞中检测染色体异常^[28]。以 MM 的检测为例,MM 是以克隆性浆细胞恶性增殖和异常积累为特征的肿瘤,染色体异常在该病中有极高

的发生率,且有独立的预后判断价值。由于骨髓瘤细胞有丝分裂指数低,加上骨髓浸润程度不同,传统细胞遗传学方法检测染色体异常率只有 33.3%。FISH 技术可分析大量的间期细胞,克服传统细胞遗传学检测放法的缺陷,大大提高核型异常的检出率^[26]。

5 展 望

随着分子生物学发展,越来越多分子诊断技术可以应用于骨髓活检组织。诊断技术的迅速发展可指导临床在造血系统肿瘤中发现特异性基因变异,并为疾病的靶向治疗提供更为广阔的前景。

参考文献

- [1] Bain JB. Bone marrow trephine biopsy[J]. J Clin Pathol, 2001, 54(10): 737-742.
- [2] Fend F, Tzankov A, Bink K, et al. Modern techniques for the diagnostic evaluation of the trephine bone marrow biopsy: methodological aspects and applications[J]. Prog Histochem Cytochem, 2008, 42(4): 203-252.
- [3] Woolthuis CM, Mulder AB, Verkaik-Schakel RN, et al. A single center analysis of nucleophosmin in acute myeloid leukemia: value of combining immunohistochemistry with molecular mutation analysis[J]. Haematologica, 2013, 98(10): 1532-1538.
- [4] Fend F, Bock O, Kremer M, et al. Ancillary techniques in bone marrow pathology: molecular diagnostics on bone marrow trephine biopsies[J]. Virchows Arch, 2005, 447(6): 909-919.
- [5] Gebhard S, Benhattar J, Bricod C, et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis of T-cell lymphoma in paraffin-embedded bone marrow biopsies: a comparative study[J]. Histopathology, 2001, 38(1): 37-44.
- [6] Maesako Y, Izumi K, Okamori S, et al. Inv(2)(p23q13)/RAN-binding protein 2(RANBP2)-ALK fusion gene in myeloid leukemia that developed in an elderly woman[J]. Int J Hematol, 2014, 99(2): 202-207.
- [7] Karkuzhali P, Shanthi V, Usha T. A case of chronic myeloid leukaemia presenting as megakaryocytic blast crisis(AML M7)[J]. Ecancermedicallscience, 2013, 7: 375.
- [8] Kremer M, Cabras AD, Fend F, et al. PCR analysis of IgH-gene rearrangements in small lymphoid infiltrates microdissected from sections of paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens[J]. Hum Pathol, 2000, 31(7): 847-853.
- [9] Sotlar K. C-kit mutational analysis in paraffin material[J]. Methods Mol Biol, 2013, 999: 59-78.
- [10] James C, Ugo V, Le Couédic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera[J]. Nature, 2005, 434(737): 1144-1148.
- [11] Kremer M, Horn T, Dechow T, et al. The JAK2 V617F mutation occurs frequently in myelodysplastic/myeloproliferative diseases, but is absent in true myelodysplastic syndromes with fibrosis[J]. Leukemia, 2006, 20(7): 1315-1316.
- [12] van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936 [J]. Leukemia, 2003, 17(12): 2257-2317.
- [13] Kelly VR, Jones SP, Sammartino HL, et al. Donor verification using Short Tandem Repeat(STR)analysis directly from blood col-

- lected in PAXgene RNA tubes[J]. Biopreserv Biobank, 2014, 12(3): 217-219.
- [14] Kashofer K, Viertler C, Pichler M, et al. Quality control of RNA preservation and extraction from paraffin-embedded tissue: implications for RT-PCR and microarray analysis[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e70714.
- [15] Drosten C, Meyer B, Müller MA, et al. Transmission of MERS-coronavirus in household contacts[J]. N Engl J Med, 2014, 371(9): 828-835.
- [16] Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, et al. Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction[J]. J Mol Diagn, 2000, 2(2): 84-91.
- [17] Specht K, Kremer M, Müller U, et al. Identification of cyclin D1 mRNA overexpression in B-cell neoplasias by real-time reverse transcription-PCR of microdissected paraffin sections [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(9): 2902-2911.
- [18] Specht K, Haralambieva E, Bink K, et al. Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels[J]. Blood, 2004, 104(4): 1120-1126.
- [19] 叶丰, 陈昱, 何度, 等. 应用荧光定量聚合酶链反应对疑似结核组织的 DNA 分析[J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(8): 534-537.
- [20] Ladetto M, Brüggemann M, Monitto L, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders [J]. Leukemia, 2014, 28(6): 1299-1307.
- [21] Takahashi T, Tamura M, Takasu T, et al. Current advancement of the PCR-based molecular diagnosis for tuberculous meningitis [J]. Rinsho Shinkeigaku, 2013, 53(11): 1187-1190.
- [22] Han H, Hu Z, Sun S, et al. Simultaneous detection and identification of bacteria and fungi in cerebrospinal fluid by TaqMan probe-based real-time PCR[J]. Clin Lab, 2014, 60(8): 1287-1293.
- [23] Fringuelli E, Gordon AW, Rodger H, et al. Detection of neoparasitosis by duplex quantitative taqman real-time PCR in formalin-fixed, paraffin-embedded atlantic salmonid gill tissues [J]. J Fish Dis, 2012, 35(10): 711-724.
- [24] Zhang YG, Jin ML, Li L, et al. Evaluation of ALK rearrangement in Chinese non-small cell lung cancer using FISH, immunohistochemistry, and real-time quantitative RT-PCR on paraffin-embedded tissues[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64821.
- [25] Ni IB, Ching NC, Meng CK, et al. Translocation t(11;14)(q13; q32) and genomic imbalances in multi-ethnic multiple myeloma patients: a malaysian study[J]. Hematol Rep, 2012, 4(3): e19.
- [26] Sasaki K, Lu G, Saliba RM, et al. Impact of t(11;14)(q13; q32) on the outcome of autologous hematopoietic cell transplantation in multiple myeloma [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2013, 19(8): 1227-1232.
- [27] Caceres G, McGraw K, Yip BH, et al. TP53 suppression promotes erythropoiesis in del(5q) MDS, suggesting a targeted therapeutic strategy in lenalidomide-resistant patients[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(40): 16127-16132.
- [28] Mir Mazloumi SH, Appaji L, Madhumathi DS. G-banding and fluorescence in situ hybridization in childhood acute myeloid leukemia from South India[J]. Arch Iran Med, 2013, 16(8): 459-462.