

无创性产前诊断单基因病的研究进展

孟梦 综述 段涛 审校

(同济大学附属第一妇婴保健院,上海 200040)

【摘要】 经过十余年的发展,利用母体外周血游离胎儿 DNA 进行无创性产前诊断的技术正逐步面向临床。目前无创性产前诊断单基因病正得到越来越多的研究及关注。本文综述了无创性产前诊断单基因病的思路及研究进展,着重阐述了游离胎儿 DNA 富集技术、基因突变位点的扩增及检测技术等研究热点。

【关键词】 游离胎儿 DNA; 母体外周血; 无创性产前诊断; 单基因病

无创性产前诊断,是指采用不刺激孕妇女子宫的途径获取胎儿遗传物质,进行遗传分析的诊断方法。利用母体外周血中游离胎儿 DNA (cell-free fetal DNA, cf-fDNA) 进行产前诊断主要是建立在改良的 PCR 技术基础上,达到检测胎儿遗传病的目的。由于 cf-fDNA 最早可于妊娠 4 周经母体外周血检出并随着孕周增长而含量增加,妊娠 7 周时稳定可测,产后 2 小时内即从外周血中消失。因此较之侵入性方法,它能够更早、更快、更安全地进行产前诊断。目前这一方法被考虑用于诊断或排除胎儿遗传性疾病、监控妊娠合并症等。cf-fDNA 用于单基因病产前诊断尚处于探索阶段。

1 无创性产前诊断单基因病的思路

无创性产前诊断的关键是寻找区别于母体的胎儿特异性分子信号。对该分子信号进行扩增并检测可达到诊断目的。cf-fDNA 中有一半是母源性的,与血浆背景中母体血浆 DNA 序列相同,无法作为胎儿特异性分子信号。而父源性 cf-fDNA 可携带不同于血浆背景的 DNA 序列,如基因突变位点、多态性序列等。

如果父母双方携带的是同一基因座位上的不同种突变位点,那么通过检测母血总 DNA 中是否含有该基因座位上父源性突变位点,即可明确父亲是否将携带在染色体上的致病基因传递给子代。如果

父母双方携带的是同一基因座位上的同种突变位点,那么须先筛查与父源性突变位点相关的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点,通过检测母血总 DNA 中是否存在该 SNP 位点,可明确父亲是否将携带在染色体上的致病基因传给子代,这需要分析待检人群的单倍体型,且存在无相关 SNP 位点的风险。因此,利用 cf-fDNA 产前诊断单基因病,仅限于明确胎儿是否遗传父源性致病基因,而尚不能明确母源性致病基因的遗传情况;对于双等位基因突变的情况,检测存在局限。

2 无创性产前诊断的研究进展

1997 年 Lo 等首次发现 cf-fDNA。2000 年 Amicucci 等^[1]首次在母血总 DNA 中检出父源性强直性肌营养不良蛋白激酶 (DMPK) 上的三核苷酸重复扩增序列 (trinucleotide repeat expansion),实现了单基因常染色体显性遗传病父系突变的诊断。此后,学者致力于技术改进,使其满足各种基因突变类型的检测。这一过程鉴于对两方面实验技术的探索:cf-fDNA 的富集技术、基因突变位点的扩增及检测技术。

2.1 cf-fDNA 的富集技术 cf-fDNA 仅占母体血浆总 DNA 含量的 3.4%~6.2%^[2]。虽然常规的 cf-fDNA 提取可达到要求的 DNA 模板水平,但低含量可造成假阴性结果,制约了分析诊断的精确性,因此 cf-fDNA 的富集技术一直是该领域的研究热点。

近年来有两种富集方法备受关注。其一是利用

基金项目:上海市科委基础研究重点项目(08JC1419800);

申康医院发展中心市级医院前沿技术联合攻关项目
(SHDC12006106)

甲醛抗母体外周血中细胞的裂解,以间接提高 cf-fDNA 的含量。Dhallen 等^[3]首先报道这种方法可达到富集 cf-fDNA 的目的:通过向血样中加入含 4% 甲醛的中性缓冲液(0.225 mL),cf-fDNA 的含量增至约 20%。此后,Alexandra Benachi 等^[4]也报道用甲醛有效富集 cf-fDNA 的结果。2007 年 Dhallen 等^[5]将本法用于产前诊断唐氏综合征,成功检测了 21 号染色体上的 SNP 位点,获得突破性进展。但也不乏富集失败的报道^[6,7]。目前这种方法尚存在争议。其二是大小分级分离法(size fractionation)。研究表明 80% 以上的 cf-fDNA 片段长度不足 200 bp,明显低于母体血浆 DNA^[8]。Li 等^[9]据此用琼脂糖凝胶电泳分离血浆总 DNA,提取其中长度为 100~300 bp 的条带,洗脱后用作 DNA 模板,提高了 cf-fDNA 的纯度。与常规提取总 DNA 而未进行电泳分离的样品相比,这种方法显著提高了突变位点的检出率^[10,11]。但本法有外界污染的可能,也可能在分离过程中损失部分 cf-fDNA。Lo 等^[12]认为这种方法仅能适度提高 cf-fDNA 含量,无法从根本上解决富集问题。关于如何高效抽提 cf-fDNA 的问题也进行了探讨。Tobias J. L 等^[13]联合全球十二家实验室及 Qiangen 公司系统评估目前常用十种方法的提取效果,发现 QIAamp DSP Virus Kit 最佳,QIAamp DNA Blood Mini Kit 稍逊一筹,而 QIAamp DNA Blood Midi Kit 不满意。该研究为日后实验室的标准化运作提供了依据。但以上试剂盒均非专门 cf-fDNA 提取试剂盒,存在样本量要求较大(>500 μl),提取纯度较低的缺陷。目前已普遍采用 QIAamp DSP Virus Kit 作为专用抽提试剂盒。

为了能从根本上区分胎儿 DNA 与母体 DNA,实验室已在寻找独立于性别的胎儿特异性标记(universal fetal marker),如能成功,那么这一标记将成为 cf-fDNA 定量检测的工具,或在临床检测中作为阳性对照,避免因样本量过少低于检测下限导致的假阴性。这方面的努力体现在两点:一是寻找母胎间的表观遗传学差异作为标记,目前认为胎盘是 cf-fDNA 的主要来源^[14-16],而对骨髓移植患者的血液分析表明^[17,18],骨髓是血浆 DNA 的主要来源。

根据不同组织来源甲基化程度的差异有望实现 cf-fDNA 的富集。目前已经发现的标记物有抑癌基因 maspin^[19]和 RASSF1A^[20],这两个基因启动子区的甲基化程度存在母胎间的差异;二是寻找胎盘特异性 mRNA,母体外周血中存在由胎盘中活性基因转录后释放入血的 RNA 片段,胎盘特异性 RNA 与胎儿性别无关,且独立于母体背景,可作为标记物区分母胎差异,已经发现的有 21 号染色体上的 PLAC4 基因^[21]。

2.2 基因突变位点的扩增及检测技术 产前诊断单基因病的实质是要检测 cf-fDNA 中父源性突变位点。初期研究者们多利用 PCR-限制性内切酶谱分析法(PCR combined with restriction enzyme digestion),先用 PCR 从 cf-fDNA 中扩增含突变位点的致病基因片段,再选择适当的限制性内切酶水解 PCR 产物,根据酶切产物在电泳图谱上的片段数量和大小作出判断。这种方法成功诊断了软骨发育不良、囊性纤维变性、血红蛋白 E 等单基因病的父源性突变位点^[22-24]。但这种方法敏感性较低。这一时期的研究样本量较小,不具说服力。

为了提高检测敏感性,Chiu 等^[25]利用突变特异性实时 PCR (mutation-specific real-time PCR) 对 100 位高危孕妇进行检测。实验针对突变位点设计了一对引物及一枚荧光 TaqMan 探针,利用正常孕妇血浆和羊水作对照,用荧光强度控制反应进程,准确率达 100%,成功排除了地中海贫血最常见的突变型之一(condon 41/42 (-CTTT 缺失))。但这种方法难以对单碱基位点设计高特异性引物,加上 cf-fDNA 在母血中含量甚微,检测单碱基突变仍存在很大困难。

质谱技术在单碱基突变的检测中发挥了巨大作用。通过对检测结果进行生物信息学分析,可较为准确地给出诊断结果。Ying Li 等^[26]评估了质谱技术用于非侵入性产前诊断检测的效果,认为质谱仪的使用是一种适用于检测单碱基突变或 SNP,且特异性和敏感性均较高的方法。但是由于目前质谱技术价格昂贵,成本较高,对于临床应用存在一定的困难。在此技术上,Ding 等^[27]先用实时 PCR 对相应位点进行扩增,再利用单个等位基因碱基延伸反应

(single allele base extension reaction, SABER) 扩增特异性碱基,经基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight MS system)检测,成功诊断了12例地中海贫血中的常见突变,并对位于11号染色体上的11个SNP位点进行了检测。但这种方法在随后的血红蛋白E的诊断中出现了假阳性。此后Jason C. H等^[28]在SABER的基础上改进的等位基因特异性碱基延伸反应(the allele-specific base extension reaction, ASBER)提高了检测的特异性。

然而质谱技术由于其仪器要求高,专业性强,临床开展尚存在困难。用肽核酸(peptide nucleic acid clamping, PNA)增强PCR的特异性,可能解决这一难题。PNA是一种N-(2-aminoethyl)-glycine形成的肽骨架,经亚甲基羰基连接不同的碱基,形成的稳定的化学结构,可以抵抗水解反应。PNA能正确识别DNA和RNA序列,且不易被核酸酶、蛋白酶、pH和温度降解,结合后在热稳定和抵抗离子方面有良好特性。Li等^[29]运用大小分级分离法富集cf-fDNA,再用PCR锁止技术(PCR clamping)的办法使PNA结合血浆背景中野生型等位基因位点,利用PCR扩增单碱基突变位点,经SYBR Green染色检测扩增产物。在对-地中海贫血的另外四种常见突变(IVSF110(G>A)、codon 39(C>T)、IVSF6(T>C)、IVSH1(G>A))的检测中,敏感性达100%,特异性达93.8%。2006年,Silvia Galbiati等^[30]将PNA技术与基因芯片、测序等方法结合,预试验提示这种方法前景广阔。2008年Silvia Galbiati等^[31]报道成功利用PNA紧密结合微电子芯片分析检测了-地中海贫血的6种常见突变,结果提示与侵入性诊断结果完全一致。

此外,一些新的检测手段获得尝试。Ana B. A等^[32]尝试利用SNaPshot——一种以微序列反应为基础的方法检测囊性纤维变性,认为该方法具有敏感、简易、价廉的优点,适于临床应用。此后该小组又分别用单碱基引物延伸反应(Single base primer extension reaction)及融解曲线分析方法检测了一例丙酸血症高危胎儿,证明以上两种方法对于单碱基突变的检测具有一定的敏感性及特异

性^[33]。但以上报道仅为个例,尚需更多资料积累。

需要说明的是,上述检测手段仅能检测胎儿父源性位点,可检测的病种有:父源性突变致病的常染色体显性遗传病、胎儿系杂合突变的常染色体隐性遗传病。通过检测外周血DNA中的父源性突变,前者可实现常染色体显性遗传病的诊断,后者可排除胎儿患病风险,避免50%的侵入性诊断。而对于胎儿系双等位基因突变的常染色体隐性遗传病,临床应用尚有相当距离。目前有望行临床诊断的单基因病有:亨廷顿舞蹈病、软骨发育不全、肌营养不良、Aperts综合征、扭转痉挛等常染色体显性遗传病,以及囊性纤维化、-地中海贫血、血红蛋白Lepore病、先天性肾上腺皮质增生等常染色体隐性遗传病。

最近,香港Fiona等^[34]针对cf-fDNA中母源性突变位点的检测进行了一些尝试:根据胎儿和母体游离DNA片段的长度差异,利用数字化核酸片段长度筛选(nucleic acid size selection, NASS)联合数字化突变位点相对定量(relative mutation dosage, RMD)技术,通过扩增片段长短不同的PCR产物,并对产物定量分析,统计后确定孕妇外周血中野生型和突变型产物的比例,据此判定胎儿基因型。他们尝试检测5例母胎基因型不同的孕妇外周血,其中3例与预期相符。这个结果虽然不够理想,但使通过检测cf-fDNA明确胎儿基因型成为可能。文中提出可以显像、测序以及物理学手段进行检测,具有相当的研究前景,值得进一步探索深入。

3 总结

总的来说,非侵入性产前诊断较之传统的侵入性产前诊断,有效地避免了一些不良后果,由于母血中胎儿DNA的出现较早,故有望实现孕早期产前诊断的可能;同时这种方法诊断周期较短,不失为一种安全、快速、早期的产前诊断方法。在对单基因遗传病的诊断方面,目前技术上虽有不成熟之处,但相信经过一定时间的探索,有望取代传统的产前诊断方式,最终真正走向临床。

参考文献

[1] Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, et al. Prenatal

- diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2000, 46:301-302.
- [2] YM Lo, MS Tein, TK Lau, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62: 768-775.
- [3] 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.
- [4] Alexandra B, Amina Y, Martine O, et al. Impact of Formaldehyde on the in Vitro Proportion of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum[J]. *Clin Chem*, 2005, 51:242-244.
- [5] Ravinder Dhallan, Xin Guo, Sarah Emche, et al. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study[J]. *Lancet*, 2007, 369: 474-481.
- [6] Chung GT, Chiu RW, Chan KC, et al. Lack of dramatic enrichment of fetal DNA in maternal plasma by formaldehyde treatment[J]. *Clin Chem*, 2005, 51: 655-658.
- [7] Satheesh KR, Wolfgang H, Olav L, et al. Treatment of Maternal Blood Samples with Formaldehyde Does Not Alter the Proportion of circulatory fetal nucleic acids in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2005, 51:652-655.
- [8] Chan KC, Jun Zhang I, Hui B Y, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2004, 50:88-92.
- [9] Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, et al. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms[J]. *Clin Chem*, 2004, 50: 1002-1011.
- [10] 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, 293:843-849.
- [11] Li Y, Godelieve CML, Page-Christiaens GC, et al. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay [J]. *Prenat Diagn*, 2007, 27: 11-17.
- [12] YM Lo, RW Chiu. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids[J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8:71-77.
- [13] Tobias JL, Zhong L, Ariadni M. et al. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma [J]. *Prenat Diagn*, 2007, 27: 824-829.
- [14] H Masuzaki, K Miural, Ki Yoshiura, et al. Detection of cell free placental DNA in maternal plasma: direct evidence from three cases of confined placental mosaicism[J]. *J Med Genet*, 2004, 41: 289-292.
- [15] SC Chim, YK Tong, RW Chiu, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 14753-14758.
- [16] Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetal-placental DNA[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169: 400-404.
- [17] Lui YY, NC Wai, Chiu RW, et al. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation [J]. *Clin Chem*, 2002, 48: 421-427.
- [18] Lui YY, KS Woo, AY Wang, et al. Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation [J]. *Clin Chem*, 2003, 49: 495-496.
- [19] Stephen SC, YK Tong, RW Chiu. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma [J]. *PNAS*, 2005, 102(41): 14753-14758.
- [20] KC Chan, Chunming Ding, A Gerovassili. Hypermethylated RASSF1A in Maternal Plasma: A Universal Fetal DNA Marker that Improves the Reliability of Noninvasive Prenatal Diagnosis[J]. *Clin Chem*, 2006, 52:2211-2218.
- [21] YM Lo, FM Lun, KC Chan. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy[J]. *PNAS*, 2007, 104(32): 13116-13121.
- [22] Saito H, A Sekizawa, T Morimoto, et al. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma[J]. *Lancet*, 2000, 356:1170.
- [23] Gonzalez-Gonzalez MC, M Garcia-Hoyos, MJ Trujillo, et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma[J]. *Prenat Diagn*, 2002, 22: 946-948.
- [24] Fucharoen G, W Tungwiwat, T Ratanasiri, et al. Prenatal detection of fetal hemoglobin E gene from maternal plasma [J]. *Prenat Diagn*, 2003, 23:393-396.
- [25] Chiu RW, Lau TK, Leung TN, et al. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma [J]. *Lancet*, 2002, 360: 998-1000.
- [26] Ying L, Wolfgang H, Vivian K, et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry Compared With Real-Time PCR for Detection of Fetal cell-free DNA in maternal plasma [J]. *Clin Chem*, 2006, 52(12): 2311.
- [27] Ding C, Chiu R W, Lau TK, et al. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: application to noninvasive prenatal diagnosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(29): 10762-10767.
- [28] Pimlak C, Katherine CK, Jason CH, et al. Mass Spectrometry-Based Detection of Hemoglobin E Mutation by Allele-Specific Base Extension Reaction [J]. *Clin Chem*, 2007, 12: 2205-2209.
- [29] Li Y, Di NE, 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):8439.
- [30] Silvia G, Gabriella R, Barbara F, et al. Different Approaches for Noninvasive Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases Based

on PNA-Mediated Enriched PCR[J]. Ann N Y Acad Sci , 2006 ,1075 :137-143.

[31] Silvia G, Barbara F, Maurizio T, et al. Peptide-nucleic acid-mediated enriched polymerase chain reaction as a key point for non-invasive prenatal diagnosis of beta -thalassemia [J]. Haematologica , 2008 , 93(4) :610-614.

[32] A Bustamante-Aragones , C Pérez-Cerdá , B Pérez , et al. New strategy for the prenatal detection/ exclusion of paternal cystic fibrosis mutations in maternal plasma [J]. J Cyst Fibros , 2008 ,7(6) :505-510.

[33] A Bustamante-Aragones , C Pérez-Cerdá , B Pérez , et al. Prenatal diagnosis in maternal plasma of a fetal mutation causing propionic academia[J]. Mol Genet Metab , 2008 , 95 (1-2) :101-103.

[34] Fiona L , Nancy B Y , Tsui KC , et al. Allen Chan Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma[J]. PNAS , 2008 ,105(50) :19920-19925.

(收稿日期:2009-04-23)

读者 · 作者 · 编者

第五届亚洲及太平洋地区母胎医学大会通知

5th Asia Pacific Congress in Maternal Fetal Medicine



为了加强国内外妇产科专业人士之间的交流与合作,香港中文大学妇产科、英国胎儿医学基金会、中华胎儿医学基金会联合举办的第五届亚洲及太平洋地区母胎医学大会(5th Asia Pacific Congress in Maternal Fetal Medicine, APCMF, 简称“亚太地区母胎医学大会”)将于 2009 年 11 月 6~8 日在香港特别行政区召开,会议还特别邀请了多名国际知名专家与我们分享他们的专业知识和经验。其中有当今母胎医学领域的领军人物、英国胎儿医学基金会主席 Kypros Nicolaides 教授;Ultrasound in Obstetrics and Gynaecology《妇产超声杂志》主编,法国 Versailles 大学妇产科主任 Yves Ville 教授;美国 Kansas 医学院分子生理学教授,妇产科主任 Carl Weiner 教授;Journal of Maternal - Fetal and Neonatal Medicine《母胎医学和新生儿医学杂志》主编,意大利 Perugia 大学妇产科主任 Gian Carlo Di Renzo 教授,香港中文大学化学病理系主任 Dennis LO 教授及香港中文大学母胎医学中心主任刘子建教授等作专题报告(<http://www.fetalmedicine.hk/en/apcmf/Speakers.asp>)。全面介绍国际、国内母胎医学的最新研究成果和难点问题。我们热烈欢迎来自国内外从事母胎医学基础和临床研究的相关专家、学者和同道们前来参加此次盛会,共同探讨近年来母胎医学领域的新成果和新进展。

一、组织机构

香港中文大学妇产科学系、英国胎儿医学基金会、中华胎儿医学基金会

大会主席:刘子健教授(香港中文大学 妇产科学系 教授) Kypros NICOLAIDES 教授(英国胎儿医学基金会 主席)

二、会议时间

2009 年 11 月 6~8 日

三、会议地点

香港凯悦酒店 - 沙田(地址:香港新界沙田泽祥街 18 号)

四、大会内容

胎儿医学(染色体异常的产前筛查和诊断,双胎妊娠,非侵入性产前诊断,胎儿治疗及干细胞治疗);产科超声;分子及细胞遗传学;母体医学(子痫及先兆子痫,妊娠合并糖尿病,妊娠合并肝病,乙型肝炎的垂直传播);围产医学(早产,产科手术)

五、会议须知

请详细填写报名表,传真或发电子邮件至大会联络处,2009 年 8 月 31 日前报名缴费可享有提早报名优惠。本次会议正式语言为英语(部分演讲以中文进行)。

六、参会费用

标准注册费:HK \$3000. - (港币叁仟元正)

七、酒店预订

大会联系的酒店公布在大会网站

<http://www.fetalmedicine.hk/en/apcmf/accommodation.asp>

八、查询

如果想了解更多会议信息,请登陆大会网站:

<http://www.fetalmedicine.hk/en/apcmf/apcmf.asp>

或联系

大会秘书处

地址:香港新界,香港中文大学妇产科学系/沙田 威尔斯亲王医院妇产科学系

联系人:刘玉如(Clara)

电话:852-2632 1535

传真:852-2636 0008

电子邮件:apcmf@med.cuhk.edu.hk