新 进 展 文章编号:0253-3626(2011)07-0769-03

基因组技术在肿瘤分子诊断中的应用

陈 希[1],包黎明[2]

(1. 重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心,重庆 400014;2. 美国辛辛那提儿童医学中心,俄亥俄州 45229)

【摘 要】肿瘤是基因组疾病,基因组变化在肿瘤发生和发展中起着重要的作用。近 20 年来随着肿瘤基因组研究的不断深入,发现了许多肿瘤基因组在 DNA、基因表达、遗传表观等不同水平的变化特征,为基因组水平肿瘤分子诊断和分型奠定了理论基础。由于肿瘤临床标本的特殊性,传统的分子生物学技术无法有效地分析肿瘤基因组变化。随着以基因芯片和第二代 DNA 测序(Next generation sequencing,NGS)技术为代表的全基因组分析技术的迅速发展,为高容量和高精密度分析肿瘤基因组变化提供新的手段。本文综述目前国际上主要的基因组分析技术,重点介绍其在肿瘤分子诊断中的应用价值,展望全基因组技术在肿瘤诊断和个体化治疗上的应用前景。

【关键词】肿瘤;基因组;分子诊断;基因芯片;第二代 DNA 测序技术

【中国图书分类法分类号】R730.4 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-06-06

Implication of genome analysis methodsin cancer molecular diagnosis

CHEN Xi[1], BAO Li-ming[2]

(1.Clinical Molecular Medical Central, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; 2.Cincinnati Children's Hospital Medical Center)

【Abstract】Cancers are genome diseases characterized with significant aberrations in cancer genome.Over the past two decades, significant progresses have been made in understanding of molecular tumorigenesisat the DNA, RNA and epigenetic levels. Such advances lay out foundations for molecular diagnoses of cancers at genome levels. Clinical cancer samples available for diagnosis are usually small in quantity and suboptimal in quality, which poses challenges for assessing genetic abnormalities using conventional molecular techniques. With the development of the latest whole genome technologies, mainly array-based and next generation sequencing methods, it becomes possible to comprehensively exam cancer genome with high specificity and sensitivity. This review provides overview on new genome analysis technologies that are relevant to cancer diagnosis, and their potential implications in management of cancer patients including diagnosis, treatment and follow-up.

【Key words】cancer; genome; molecular diagnosis; microarray; next generation sequencing

迄今为止,形态学检查和免疫学分析仍是诊断肿瘤的主要方法。形态学检查是分析肿瘤组织和细胞结构、形态的异常;免疫学检测包括免疫组织化学和流式细胞仪分析等,分析肿瘤细胞的蛋白结构异常。尽管这 2 种方法在肿瘤诊断中发挥着重要作用,但是存在着明显的缺陷。形态学检查有时会带有主观性,显微镜检查的分辨率也有限,不容易发现微量肿瘤细胞;免疫学检查需特殊的抗体。此外,传统的形态学和免疫学方法的自动化程度低。

1 肿瘤基因组

肿瘤是基因组疾病,肿瘤基因的改变可发生在 DNA、RNA和表现修饰的水平,在肿瘤的发生和发展中起着重要的作用。按其在肿瘤发生中的作用,肿瘤基因突变可分驱动型突变(Driver mutations)和伴随型突变(Passenger mutations)[1]。前者主要涉及细胞增殖和凋亡有关基因,而后者通常累及 DNA 修复和损伤基因。伴随型突变多于驱动型突变。从上世纪初提出肿瘤的发生和细胞染色体数目改变有关的假设以来的一百多年间,对肿瘤的基因变化认识有了很大提高。上世纪60年代,发现第 9 和 22 号染色体改变而形成的费城染色体是慢性粒细胞性白血病的特征改变,首次显示肿瘤与基因的特征改变有着密切的关系,从而揭开了研究肿瘤基因变化的新篇章。在此后的 30 多年时间内,发现了一大批肿瘤抑制基因(Tumor suppressor genes)和致癌基因(Oncogenes)。在 2004 年至 2009 年的 6 年内间,发现与肿瘤有关的基因突变数目从不到 1 000 个上升至 13 000 多个,大大地加深了对肿瘤发生发展机理的认识。目前已知,肿瘤基因突变以体细胞性改变为主,不同肿瘤的基因改变在突变的数目和累及的基因等不一样,而同一肿瘤的不同病程其基因变化的特征也不同[1]。传统分析肿瘤基因突变的技术主要以 PCR 和 DNA 测序为

作者介绍:陈 希(1983-),女,技师,硕士,研究方向:白血病的诊断与治疗。

通信作者:包黎明,男,副教授,Email:lbaogene@yahoo.com。

主，但这些分子生物学方法不能有效地分析全基因组变化；经典分析肿瘤细胞全基因组变化的方法是肿瘤细胞染色体核型分析，但该方法的分辨率低，无法检测微小的 DNA 水平突变。随着人类基因工程的完成，特别是近 20 多年来新的全基因组检测技术的发展，把肿瘤基因改变研究推到了一个新的高度。

2 新的肿瘤基因组分析技术

近 10 年来，以基因芯片和第 2 代测序技术为代表的新的基因组分析技术飞速发展，为揭示肿瘤基因组改变的特征和肿瘤的分子诊断提供了有效的方法。

2.1 基因芯片分析肿瘤基因组

研究发现，基因拷贝数变化（Copy number variation）包括基因片段的缺失（Deletions/losses）、扩增（Gains/duplications）以及杂合性缺失（Loss of heterozygosity，LOH）是肿瘤中常见的改变，和肿瘤的发生、发展关系密切，也可做为预测肿瘤预后的指标。检测全基因组基因拷贝数改变的方法主要有比较基因组杂交芯片（Array comparative genomic hybridization，A-CGH）和 SNP（Single nucleotide polymorphisms）基因芯片，此类芯片含有覆盖全基因组的 DNA 探针，其分辨率可达到 50 碱基，能够有效地检测全基因组范围内基因拷贝数目的改变，能够发现染色体核型分析检测不出的亚微基因拷贝数改变，此外 SNP 类基因芯片还能检测出与肿瘤有关的 LOH 变化，此类芯片已逐渐运用于包括白血病在内的多种肿瘤诊断中[2]。

人体中大约有 400 多种细胞，每种细胞有着特征性的基因表达谱或基因转录 RNA 水平[3]，肿瘤细胞的基因表达谱不同于正常的细胞，分析肿瘤细胞的基因表达特征有助于肿瘤的诊断和分型。表达谱基因芯片是分析全基因组基因或一部分基因的 RNA 水平。Hefarlaoh 等用基因表达谱芯片技术诊断 3 000 多例白血病和骨髓异常增生综合征，其准确率达到 95%以上[2]，准确率明显高于传统的方法。基因表达谱分析在诊断原发灶不明的肿瘤中也可发挥重要作用。5%肿瘤的细胞形态在转移后发生改变而难以确认原发病灶，此类肿瘤是西方国家十大肿瘤之一，仅美国每年此类肿瘤的病例多达 7 万多例，我国这类肿瘤病例估计会更多，肿瘤的原发灶不能确定为肿瘤的诊断和治疗带来了很大的困难。通过用基因表达芯片分析肿瘤细胞的基因表达谱为诊断此类疑难肿瘤提供了新的途经。

除了分析转录蛋白质的基因表达谱之外，基因表达谱芯片还包括分析不翻译蛋白质基因的 RNA 水平，如小 RNA（Micro RNA，miRNA）基因的表达谱。miRNA 基因转录短小的单链 RNA，这类 RNA 不翻译蛋白质，但参与调解基因，其中包括肿瘤基因的调节。目前已知的 *miRNA* 基因已达 1 000 个以上，不同肿瘤基因的 miRNA 基因表达谱彼此不同，其特征性 miRNA 表达谱可做为肿瘤诊断和分型的依据[4,5]。由于 miRNA 在组织和体液中稳定，尤其适宜于临床诊断。

基因芯片分析也在肿瘤的个体化治疗中发挥重要的作用。通过分析肿瘤细胞的基因表达谱，可以把肿瘤病预后的凶险程度分为高危、中危和低危等，也可以发现对抗肿瘤药物敏感或耐药（不敏感）的病例，为准确预测肿瘤预后、合理和有效选择肿瘤治疗方案提供依据，使肿瘤治疗做到个体化，进而提高疗效，减低医疗费用。

2.2 第 2 代 DNA 测序技术分析肿瘤基因组

近年来飞速发展起来的第 2 代 DNA 测序技术（Next generation sequencing，NGS）为基因组分析提供了新的手段。和第 1 代测序（Sanger）技术不同，NGS 技术通过反复测序同一区域的 DNA 片段，达到很高的灵敏度和准确度，同时大通量、自动化程度高，能在很短的时间内完成对上百亿碱基的测序，使得在几天内完成人类全基因组测序成为可能[6-8]。NGS 能检测包括点突变、基因拷贝数改变和基因重组（染色体移位）等在内的多种基因改变，还可以同时分析与肿瘤相关的微生物的基因组，分析肿瘤和微生物的关系。NGS 所需的样本量少，具有灵敏度高、大通量、自动化程度高的特点，尤其适合于分析肿瘤基因组改变。自 Ley 等[9]在 2008 年首次报道了用 NGS 技术分析了 1 例正常核型的急性髓细胞性白血病的基因组后，NGS 已被用于分析 30 多例不同肿瘤的基因组，不仅增进了对肿瘤基因组病因机理的认识，也为肿瘤的早期诊断和个体化治疗提供了新的方法。用 NGS 技术分析肿瘤诊断标本的全基因，可以在全基因组范围内发现肿瘤的特征性的有诊断和分型价值的基因改变，也可发现可用于监测肿瘤病程的随访指标，有利于发现微量肿瘤细胞，及时有效地治疗复发肿瘤细胞。由于 NGS 能检测出各种类的基因突变，其中能检测出特异性的肿瘤基因改变，为选择有针对性的抗肿瘤分子/基因靶导药物提供依据，使得肿瘤治疗个体化成为现实。

综上所述，以基因芯片和 NGS 技术为代表的基因组分析技术充分显示了高精度、高分辨率、高灵敏度、高通量和高自动化的特点，为肿瘤的早期诊断、分子分型、分子基因随访和个体化治疗提供了新的有效工具。这些技术目前也逐渐运用于包括血液系统肿瘤、乳腺癌、结肠癌等在内的多种肿瘤的诊断和治疗中。包括重庆市分子医学诊断中心暨重庆医科大学分子医学检测中心和重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心在内的国内一些分子病理检测机构已在肿瘤基因组检测方面开展了许多开创性的工作。可以预见，随着我们对肿瘤基因组变化认识的不断深入，新的肿瘤基因分析技术的不断完善和提高，分析成本的进一步降低，相关技术将会被更广泛地运用于临床，在提高肿瘤的诊断和治疗水平中发挥重要的作用。

参 考 文 献

[1] Greenman C，Stephens P.Patterns of somatic mutation in human cancer genomes[J].Nature，2007，446：153-158.

[2] Haferlach T，Kohlmann A.Clinical Utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia：

Report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group[J].Journal of Clinical Oncology,2010,28(15):2529-2537.

[3] Sotiriou C,Piccart M J.Taking gene-expression profiling to the clinic:when will molecular signatures become relevant to patient care [J]? Cancer,2007,7:545-553.

[4] Couzin J.Small RNAs make big splash[J].Science,2002,298(5602):2296-2297.

[5] Lu J,Getz G L. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J].Nature,2005,435:835-838.

[6] Margulies M.Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J].Nature,2005,437(7057):376-380.

[7] Fedurco M. BTA,a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies[J].Nucleic Acids Res,2006,34(3):1818-1822.

[8] Shendure J.Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome[J].Science,2005,309(5741):1728-1732.

[9] Timothy J,Elaine L,Mardis R,et al.DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemiagenome[J].nature,2008,456:66-72.

（责任编辑：冉明会）

个案与短篇 文章编号：0253-3626（2011）07-0771-02

脂质沉积性肌病诊断及随访分析

欧阳锋，李天炼，刘　涛，黄培坚，文国强

（海南省人民医院神经内科，海口　570311）

【中国图书分类法分类号】R746　　【文献标志码】B　　【收稿日期】2011-02-17

自 1973 年 Engel 和 Angelini 首次报道脂质沉积性肌病（Lipid storage myopathy，LSM）以来，关于该病的散发报道日渐增多，我们总结了 7 例 LSM 患者临床及随访资料并复习文献，以加深对此病的认识。

1　临床资料

1.1　一般资料

系 2005 年 3 月至 2009 年 1 月我院神经内科收治的经临床及病理确诊的 7 例 LSM 患者。均为男性，年龄 10~75岁，发病时年龄 3~52 岁，平均发病年龄 37 岁，病程 1 个月~28年，平均病程 11 年，曾被误诊为其他病 5 例，1 例有家族史，符合常染色体隐性遗传。

1.2　临床表现

3 例亚急性起病（病程 1~2 个月），4 例慢性起病（病程 6 个月~28 年），3 例进行性加重，4 例症状反复，2 例有明显的缓解复发。主要表现为运动耐受差和不同程度的肌无力，4例肌痛或肌压痛，3 例肌萎缩，2 例眼肌、颈肌受累，3 例有消化道症状，3 例末梢型感觉障碍。1 例伴心悸、胸闷。

1.3　神经系统检查

四肢肌力均减退者 6 例，近端肌力减退者 4 例，肌力为 2~4 级，5 例腱反射减弱或消失，2 例四肢远端浅感觉减退，3 例有肌萎缩，受累肌肉分别为冈上肌、冈下肌、肱二头肌、三角肌、臀肌及大腿肌群。Gower's 征阳性者 3 例。7 例患者病理征均为阴性。

1.4　实验室检查

肌酸激酶（CK）273~5 676 U/L（正常值 45~220 U/L），正常范围内 1 例，较正常值升高 5 倍以上者 5 例，升高 10 倍以上者 2 例；肌酸激酶同工酶（CK-MB）19.2~1 597.7 U/L（正常值<24 U/L），正常者 2 例，较正常值升高 5 倍以上者 4 例，升高 10 倍以上者 2 例；乳酸脱氢酶（LDH）199.9~4 857 U/L（正常值 109~245 U/L），正常者 2 例，较正常值升高 5 倍以上者 4 例，升高 10 倍以上者 2 例；肌红蛋白（Mb）36.6~1 717.7 μg/L（正常值<70 μg/L），正常者 5 例，较正常值升高 5 倍以上者 3 例；谷丙转氨酶（ALT）轻度升高者 3 例，较正常值升高 5 倍以上者 5 例。心电图检查 1 例表现为 V1~V3 导联 ST 段下移 0.1 mV，偶发室性期前收缩。

1.5　神经电生理检查

6 例肌电图呈肌源性损害，1 例表现为神经源性合并肌源性损害。

1.6　病理学检查

7 例患者均行肌肉活检，分别取肱二头肌、股四头肌或腓肠肌活检。其病理共同点为：HE 染色可见大小不等筛状空泡，可见肌纤维散在萎缩，未见明显炎症细胞。Gomeri 染色未见 RRF 纤维。ORO 染色可见Ⅰ型肌纤维大量脂滴沉积。NADH 染色肌原纤维网紊乱。PAS 染色均匀。ATP 染色无簇状肌纤维受损表现。电镜下肌纤维内可见大量脂滴沉积，呈串珠样排列或融合成片状，3 例线粒体轻度至中度增多，但均未见线粒体内结晶及线粒体明显畸形，均未见明显炎症细胞浸

（下转第 776 页）

作者介绍：欧阳锋（1963-），男，副主任医师，
研究方向：脑血管病及肌病。
通信作者：李天炼，女，副主任医师，Email：litianlian@163.com。