

植入前遗传学诊断的研究现状及展望执业医师资格考试 PDF  
转换可能丢失图片或格式，建议阅读原文

[https://www.100test.com/kao\\_ti2020/510/2021\\_2022\\_\\_E6\\_A4\\_8D\\_E5\\_85\\_A5\\_E5\\_89\\_8D\\_E9\\_c22\\_510346.htm](https://www.100test.com/kao_ti2020/510/2021_2022__E6_A4_8D_E5_85_A5_E5_89_8D_E9_c22_510346.htm) 遗传性疾病已经成为威胁人类健康的主要疾病之一。在没有找到一种有效的治疗方法之前，用产前诊断技术预防遗传病患儿的出生，是达到减少乃至杜绝遗传病发生的主要途径。本世纪60年代以来，羊膜腔穿刺技术、绒毛膜取样技术已经常规地应用于围产儿监测，有效地减少了遗传病患儿的出生，同时产前诊断技术本身也得到了不断的发展，主要表现在两个方面：无创性产前诊断及植入前遗传学诊断（preimplantation genetic diagnosis, PGD）。PGD指对配子或移入到子宫腔之前的胚胎进行遗传学分析，去除有遗传缺陷的配子或胚胎。它可以有效地避免传统的产前诊断技术对异常胚胎进行治疗性流产的要求，因而受到广泛关注。1989年，英国Handyside成功地用聚合酶链反应（PCR）技术分析卵裂球的性别构成，完成了世界上第一例PGD诊断，开创了产前诊断的新纪元。进入90年代，植入前诊断技术有了飞速发展。1994年，Moe用荧光原位杂交（fluorescent in situ hybridization, FISH）技术，在植入前诊断染色体非整倍体及胚胎性别获得成功。此后，多重PCR，荧光PCR，多色FISH等技术，特别是1999年以来开展的间期核转换（interphase nuclear conversion）技术，全基因组扩增（whole genome amplification, WGA），比较基因组杂交（comparative genomic hybridization, CGH）技术相继用于PGD，进一步促进了该技术的研究和应用。目前在全世界范围内，包括我国在内，已有18个国家，50多个PGD中心在从事相

应的研究，已经分娩的100多例新生儿发育良好，初步证实PGD是一种安全、可靠的产前诊断技术。

### 一、PGD的研究进展

#### 1.取材途径：PGD是指在胚胎移入到宫腔之前的诊断。其获取诊断标本的途径主要有：（1）获取精子或卵子进行诊断，（2）获取植入前的胚胎细胞进行DNA或染色体分析。

受精前取配子进行诊断的报道，目前尚不多。这种方法关键在于如何完成精子或卵子的遗传分析，同时又不影响其受精能力。已有报道，用流式细胞仪分离X、Y精子，用于植入前筛选胎儿的性别。而用卵子进行PGD，主要是利用第一极体或第二极体的遗传学分析，间接推断卵子正常与否。现在，可以利用极体的DNA进行单基因病的诊断，也可以用核转换技术，将极体由间期激活成中期，再用CGH技术分析其所有的染色体组成，或直接对极体的某些染色体进行FISH分析，诊断这些染色体有无数目异常。但是，用极体分析来推断卵子的基因组或其染色体结构和数目，并不能完全反映卵子遗传组成的真实情况，有时也必须同时分析第一极体和第二极体，才能判断卵子的染色体有无异常。

#### 卵裂球活检是现在PGD取材的主要途径。一般选6~10细胞期的卵裂球，此期的细胞具有全能分化的潜能，取出1~2个细胞，不会影响胚胎的发育。囊胚期活检是PGD诊断的另一潜在途径。这种方法是在体外将受精卵培养到囊胚期，取其滋养外胚层细胞进行遗传分析。因为不影响内细胞团，故不会累及胚胎发育。受培养技术的限制，多数胚胎不能在体外很好地发育到囊胚期。因此，无法获取囊胚期细胞进行PGD。最近，Veiga等（1999年）改进了培养方法，在体外培育后，可达到囊胚期的胚胎占39.3%，推测囊胚期活检有望成为一种有效的取材方

法。虽然取一定数量的囊胚期细胞不会影响胚胎的正常发育，但内细胞团和滋养外胚层细胞的遗传构成并非完全相同，故用滋养外胚层细胞进行PGD有可能造成误诊。诊断时分别用几个细胞分析比用单个细胞诊断的方法更好，可以降低误诊率。

2.基因病诊断：目前可诊断的单基因病包括地中海贫血，纤维囊性化，脆性X综合征，以及和性连锁遗传病有关的性别诊断等，可诊断的病种数目在不断增加。所用的方法主要是基于PCR技术的DNA分析，通过检测单细胞靶基因的数目及结构有无异常加以诊断。常规的PCR技术易受实验条件的影响，故从90年代后期开始，荧光PCR，多重PCR，巢式PCR技术用于PGD诊断的报道逐渐增加，有效地提高了诊断率。

染色体数目异常的诊断有两种途径：用传统的染色体计数及用荧光PCR进行多态位点定量分析。荧光PCR是近年发展起来的新技术，敏感度很高。对多细胞水平的定量分析来说，它是一种稳定可靠的技术，但因选择性扩增的缘故，单细胞的定量分析中有25%的诊断结果不可靠。荧光PCR已用于21三体的植入前诊断。随着荧光PCR定量检测技术的广泛应用，现正在开发一种同步检测技术，以便实时测定荧光PCR的扩增效果，并进一步提高其诊断的可靠性，促进该技术的临床应用。

在基因病诊断以及染色体病诊断的过程中，主要的限制因素之一是，如何获取满足诊断需求的DNA.解决的途径主要靠WGA.WGA目前常用的方法有两种：简并寡核苷酸引物PCR（degenerated oligonucleotide primed PCR，DOP-PCR）法及扩增前引物延伸法（primer extension preamplification，PEP）。用WGA法能够无选择偏见地扩增整个基因组。从理论上讲，任何基因都能

从WGA的产物中检测出来。同时也可将信息保存起来。目前，WGA尚未广泛用于临床，但是对多基因病诊断及CGH技术的发展，势必要求WGA技术不断地完善，并推动其临床应用。

3.染色体病的诊断：在植入前遗传学诊断领域，染色体病的诊断占了很大的比例。CGH和间期细胞核转换技术的应用，标志着染色体分析技术可能有了一种通用的程序。然而，FISH仍是目前诊断染色体病的主要方法。主要用来诊断非整倍体，特别是13、18、21、X和Y染色体的数目异常。用双色、多色探针可以在单细胞水平诊断染色体数目畸变。既可以用不同的探针同步杂交单一细胞核，也可用重复杂交同一细胞核的方法完成诊断。染色体结构异常，例如平衡易位携带者可用其卵裂球或极体进行PGD.罗氏易位的诊断可用商售的探针进行。最常见也最难诊断的是相互易位，需要进行染色体涂抹，同时还要进行着丝粒及近端粒探针杂交以确定染色体断裂位点。由于断裂位点的不可预见性，相互易位很难制备商售的探针。因此，相互易位的诊断耗时、费力，操作也比较困难。用常规FISH仅能分析有限的染色体，对相互易位等复杂畸变不易诊断。因此人们用早熟染色体凝集技术将间期细胞核转换成中期细胞核，然后分析其染色体数目及结构有无异常，以达到诊断目的。Verliky将极体或卵裂球注入到去核卵子或去核的受精卵中，电刺激使之融合，利用胞质内的因素促使极体或卵裂球转化成分裂状态。这样得到的染色体可用于染色体涂抹，多色FISH或光谱核型（SKY）分析，因对核转变技术要求高、耗时、易受制备因素的影响，也受到伦理因素的制约，使其发展受限。CGH是另一种很有希望的诊断染色体异常的技术。用WGA方法获取

基因组DNA，然后用杂交技术结合计算机分析可诊断任何超过20Mb的染色体区域的拷贝数有无异常，从而诊断染色体玻影响CGH的主要因素是如何得到足够的DNA.一般要求100ng ~ 1 μgDNA，大约相当1万个细胞所含的DNA量。应该强调的是，用WGA获取足够数量DNA的同时，还要确保得到的DNA是准确的复制品。制约CGH临床应用的另一因素是诊断时间必须缩短，目前的诊断时间大约是7d左右，尚不能满足临床的需要。

4.其他方面：PGD除了用于遗传病诊断之外，也可应用于研究人类基因，特别是一些有特殊遗传缺陷的基因，在发育早期的表达。这对于了解人类胚胎的正常发育有重要意义。例如对PGD技术用于人类肿瘤易感综合征的易感性分析。与肿瘤有关的各种抑癌基因与细胞周期的调节、细胞凋亡的途径及胚胎分化的时机和极性都有密切的关系。

Sutterlin (1999年) 等用巢式PCR和单链多态性分析技术，对单细胞进行视网膜母细胞瘤的易感性分析，在植入前确定胚胎未来发生肿瘤的可能性大小，为PGD应用于人类胚胎基因表达的研究开辟了暂新的途径。此外，Delhanty等发现，体外受精的胚胎存在染色体嵌合现象，虽然还不清楚自然受精的胚胎是否也有同样问题，但是这些发现无疑对改进诊断程序设计，甚至在将来改善体外受精的成功率都有重要意义。

百考试题网站整理

## 二、存在的问题与解决方法

### 1.等位基因脱失

等位基因脱失 (allele drop-out, ADO) 是影响基因病诊断的主要因素之一。发生率约为5% ~ 20%。它是指两个等位基因只能扩增出1个，另1个不能扩出或扩增的数量有限，达不到诊断的水平。这对于单一基因异常所致的遗传病如常染色体显性遗传病的诊断有较大影响，容易导致误诊。单纯应

用PCR技术诊断胚胎的性别，也易因ADO而造成误诊。用多重PCR方法扩增致病基因及其紧密连锁的多态片段，可以降低因ADO而造成的误诊率。此外，改进样本的制作及用热启动PCR，也可减少ADO的发生率。Roy（1999年）发现，用设计好的引物，严格的操作及固定专人及专门用于PGD的设施，单细胞PCR也可收到良好的效果。

2.污染：这是影响基因病诊断，产生误诊及诊断失败的另一个重要因素。污染物主要来源于透明带内残余的精子及母体的卵泡细胞。前者可用单精子胞浆注射的方法避免，后者可用多重PCR同时检测胎儿及其父母的DNA指纹加以鉴别。前次诊断残留的扩增产物，是污染物的另一来源，除了按PCR常规严格操作之外，用巢式PCR或荧光PCR对减少此类污染很有帮助。

3.FISH的有关问题：首先是用FISH诊断与年龄有关的非整倍体是否应作为常规尚有争论。这方面需要进一步的研究。FISH的错误率约为15%。体外受精期的嵌合体发生率较高、FISH信号尚缺乏统一的标准等问题都是影响FISH诊断率的因素，这些问题的解决有赖于多中心大规模的合作研究，以确定合理的分析标准及标准化的操作程序。

4.多基因异常的诊断问题：涉及多个突变位点的单基因病诊断、多基因病诊断、染色体组分析如CGH，都要求获得足够的DNA。目前，相关的研究集中在用DOP-PCR或PEP方法扩增单细胞DNA方面。DOP-PCR的扩增效率在80%左右，选择合适的引物有望进一步提高扩增效率。

5.诊断取材：现行植入前遗传病诊断，主要利用卵裂球的DNA进行分子诊断或用间期FISH诊断染色体数目异常。与之相比，用囊胚期细胞进行诊断，可以分析多个细胞，提高诊断率。利用联合培养或顺序培养（sequential culture）能够提

高囊胚期细胞培养的成功率。百考试题网站整理 三、展望 在过去的10年里，PGD取得了显著的成绩，展望未来，PGD技术可望在下述方面进一步发展。

- 1.多重突变分析：利用多重PCR、CGH、WGA，以及间期核转换技术，人们已经能够诊断涉及不同位点的突变以及全染色体核型分析。但是，这方面的诊断仍受到一定限制。目前，国外一些研究中心正在探索DNA芯片技术在PGD领域的应用前景。利用这种技术，可以同时分析单一细胞内上千种基因突变，能够极大地提高诊断效率。此外，变性梯度凝胶电泳及单链多态分析技术也正受到广泛关注。在不远的将来，单细胞将可能有效地用于诊断多个突变或染色体组核型分析。
- 2.诊断标准化：目前，在世界范围内要求PGD的人越来越多，已有的研究中心无法满足需要，客观上要求将PGD的诊断程序标准化。在我国，PGD的相关研究尚处在初始阶段，鉴于我国经济基础比较薄弱，遗传病散在发生的特点，很有必要集中人力、物力，建立各大区的植入前诊断中心，这对于规范诊断标准，加强管理，提高诊断水平有重要意义。
- 3.伦理学研究：PGD中不可避免地涉及有关伦理学问题，例如植入前诊断中的性别选择，肿瘤易感性分析都会激起广泛的兴趣。
- 4.相关领域研究：在胚胎期发现染色体嵌合、人类胚胎体外的有效培养和定向诱导分化、人体基因在胚胎早期的特异表达与PGD的深入研究及发展有密切关系。人类胚胎体外的有效培养和定向诱导分化，可望使人类能够移植自身的组织或脏器，从而大大提高器官移植的成功率。许多肿瘤易感综合征的发病都是迟发性的，并且可以用外科手术进行治疗；也并非所有携带肿瘤易感基因的个体都会发生恶性肿瘤；PGD可能会使这部分

人在得知自身有较高遗传易感性，容易发生恶性肿瘤的情况下，注重采取有效的预防措施避免肿瘤的发生。另一方面，有些肿瘤综合征例如视网膜母细胞瘤发病早，外显率高甚至完全外显；有些呈多脏器原发肿瘤因而需要多次手术；这部分人行PGD可能会带来一些问题，例如会使当事者产生心理及情感上的巨大压力。因此，上述情况是否都适合于进行植入前诊断，在伦理学方面有较大的争议。可以预见这方面的研究将是热点之一。医学教育网搜集整理 PGD已在全球50多个诊断中心开展，并已经积累了一些经验。PGD是一种可行的产前诊断技术，但是PGD中心相对来说还很少，特别在国内更是如此，亟待发展。我们相信在不远的将来，PGD将成为一种标准的产前诊断技术，并造福于人类。"#F8F8F8"

100Test 下载频道开通，各类考试题目直接下载。详细请访问  
[www.100test.com](http://www.100test.com)