

· 综 述 ·

RNA 干扰技术在肿瘤基因治疗中的研究现状*

田瑞敏¹, 鄢佳程², 王含彦², 易 芳², 陈建业^{1△}

(川北医学院:1. 应用技术研究所;2. 生物化学教研室, 四川南充 637000)

关键词: RNA 干扰技术; 肿瘤基因; 基因功能沉默; 基因功能抑制; 肿瘤耐药

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.07.039

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)07-0811-04

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术是利用双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA), 高效、特异性降解细胞内同源信使 RNA(messenger RNA, mRNA), 从而阻断特定基因表达, 使细胞出现靶基因缺失的表型。1998 年 Fire 等^[1]首次应用 RNAi 技术将 dsRNA 正义链与反义链的混合物注入线虫体内, 结果发现注入 dsRNA 比单独注入单链 RNA 引起的基因沉默要强得多, 并可导致子一代同源基因的沉默。2001 年 Elbashir 等^[2]在哺乳动物细胞中首次观测到了 RNAi 现象, 从而开启了 RNAi 技术在哺乳动物细胞中应用研究的闸门, 使 RNAi 技术迅速成为后基因组时代基因功能研究和基因治疗研究领域最热门的研究工具之一, 进而得到广泛应用。迄今为止, RNAi 的确切机制尚不清楚。经过 10 多年的研究, 一些细节逐渐展现在人们面前。本文就现阶段 RNAi 已知的可能机制及 RNAi 技术在肿瘤基因治疗中的研究现状作一综述。

1 RNAi 的作用机制

有关 RNAi 现象的机制研究主要集中在果蝇等低等动物, 许多研究初步阐明了 RNAi 抑制 mRNA 转录与翻译的分子机制^[3-6]: 在 RNAi 引起基因沉默的过程中, 细胞内具有核糖核酸酶 III (ribonuclease III, Rnase III) 活性的核酸酶 Dicer 首先识别外源性或内源性 dsRNA, 将其切割成 21~23 nt 大小的 siRNA (small interfering RNA, siRNA); 随后 siRNA 与无活性的 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 结合, 在解螺旋酶的作用下 siRNA 双链解离为单链; 由于 siRNA 与 mRNA 具有高度同源性, 其反义链通过与靶基因 mRNA 进行特异性结合使 RISC 活化, 最后将靶基因 mRNA 剪切成碎片。同时, siRNA 还可作为合成 dsRNA 的引物, 引物 siRNA 与靶基因 mRNA 模板结合后, 在 RNA 依赖性 RNA 聚合酶的催化下, 合成新的 dsRNA, 后者被 Dicer 剪切成新的 siRNA, 从而产生级联放大效应, 增强靶基因的沉默效应^[4]。此外, siRNA 还可引起同源基因组 DNA 产生 RNA 定导甲基化、基因缺失、表型缺陷等系列分子生物学效应^[7], 进一步强化基因沉默效应。

2 RNAi 技术在肿瘤基因治疗中的研究现状

肿瘤是机体在多种致癌因素作用下, 局部组织细胞内的癌基因与抑癌基因表达失衡, 引起细胞分裂与生长的多基因调控网络失调, 导致细胞异常分裂、生长与分化而形成的病理性新生物。因此, 只针对单个突变基因进行的肿瘤基因治疗, 效果并不明显。Matsui 等^[8]研究发现, RNAi 技术对于内源性和外

源性基因都有明显的沉默作用。因此, 利用同一基因家族的多个基因具有高度保守同源序列的特性, 通过 RNAi 技术设计一种特异性的 dsRNA 分子, 就可以同时剔除多个同源基因, 从而达到肿瘤基因治疗的目的。此外, RNAi 能同时抑制肿瘤多个不同的基因, 而且抑制作用互不影响, 这就为由于多基因改变和多因素引起的肿瘤的治疗提供了可能^[9]。目前, RNAi 对肿瘤进行基因治疗主要集中在肿瘤发生和肿瘤转移相关基因(如癌基因、抑癌基因、肿瘤转移相关基因)以及肿瘤耐药基因、细胞凋亡、信号转导、有丝分裂有关的基因方面。

2.1 RNAi 对肿瘤发生与转移相关基因的沉默作用 基于 RNAi 技术在基因功能沉默与功能抑制中的优势, 利用该技术抑制肿瘤细胞内癌基因的功能表达, 分析其表型变化, 可以帮助进一步发现肿瘤发生与发展的分子机制, 为肿瘤的基因治疗提供可靠的理论依据。

沉默信息调节因子 2 同源蛋白 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1) 是一种涉及从肿瘤发生到衰老多个层面不同细胞过程的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性蛋白去乙酰酶, 在肝细胞性肝癌和肝细胞癌细胞株中均高表达。Choi 等^[10]通过 RNAi 技术用化学合成的 siRNA 沉默肝癌细胞中 SIRT1 基因的表达, 发现肝癌细胞的生长与细胞周期进程被有效阻滞。核小体结合蛋白-1 (nucleosome binding protein-1, NSBP1) 是 HMGN 蛋白家族成员, 能够结合核小体并通过染色质重建调节基因转录, NSBP1 的表达与肿瘤分级、病理分期和淋巴结转移密切相关; NSBP1 基因的过表达促进癌细胞的生长与转移, 增强癌细胞的侵袭力。Wahafu 等^[11] 研究结果显示, 导致癌细胞生存率降低、细胞周期素 B1 表达降低、细胞周期被阻滞在 G₂/M 期。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在血管发生、内皮细胞形成和增殖中发挥重要作用。内皮癌时, 由于 VEGF 分泌增多, 从而促进了内皮细胞增殖和迁移, 抑制细胞凋亡和诱导血管透化。研究发现, 人结直肠癌患者体内的血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 表达常常过高, 它还与肿瘤的进展性和侵袭力相关。Qiu 等^[12] 采用慢病毒包装针对 VEGFA 基因的 RNAi 载体, 并导入结直肠癌细胞 RKO cell 后发现, VEGFA 表达被抑制后, 可以抑制肿瘤细胞的生长、迁移和增殖。另外, VEGFA 基因沉默也可以减少促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号肽和第 2 个线粒体衍生的胱天蛋白酶激活剂/低

* 基金项目: 四川省教育厅重点课题基金资助项目(2006J13-031)。 作者简介: 田瑞敏(1987~), 女, 硕士研究生, 主要从事人脑基因功能研究。 △ 通讯作者: Tel: 15082786213; E-mail: chenjianye2010@163.com。

等电点凋亡抑制蛋白直接结合蛋白(second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low PI, Smac/DIABLO)的表达,这都说明了用 RNAi 的方法沉默 VEGFA 表达,可以成为治疗结直肠癌的一种基因治疗方法。这些研究表明,利用 RNAi 技术沉默或者关闭与肿瘤发生相关的基因,可能是今后肿瘤治疗的一种新的策略。

2.2 RNAi 对肿瘤耐药相关基因的沉默作用 除手术治疗外,放疗和化疗在肿瘤的治疗中是最重要的两种辅助治疗方法。恶性肿瘤复发与化疗效果不佳甚至失败有重要关系,影响化疗效果的主要原因是肿瘤细胞容易产生耐药性,表现为原药耐药和多药耐药。采用 RNAi 的方法可以减少肿瘤的耐药性,增加肿瘤对放、化疗药物的敏感性。

多药抗性蛋白质 1/P 糖蛋白(multidrug resistance protein 1/P-glycoprotein, MDR1/P-gp)的过表达被认为与肿瘤组织多药抗性相关。上皮-间质转化及其转录调控因子(twist-related protein 1, Twist1)是一种高度保守的转录蛋白,属于螺旋-环-螺旋蛋白家族,在上皮细胞-间充质细胞转换中发挥重要的调节作用,从而可以促进肿瘤发生转移。Zhu 等^[13]首次发现了 Twist1 和 MDR1/P-gp 的关系,他们在人宫颈癌 HeLa 细胞中通过 RNAi 的方法干扰 Twist1 的表达后发现可以下调 MDR1/P-gp 的表达,可以抑制肿瘤细胞增殖和增强肿瘤细胞对顺铂化疗的敏感性。

研究发现,细胞周期蛋白 d1(cyclin D1)与多种肿瘤治疗过程中的化疗抗药性和放疗抵抗有关。Kothari 等^[14]通过 RNAi 的方法沉默 cyclin D1 基因在头颈部鳞状细胞癌的表达,然后检测细胞对顺铂的敏感性,发现沉默了 cyclin D1 基因的肿瘤细胞周期延迟,减慢了肿瘤进展,并且对顺铂的敏感性提高。

2.3 RNAi 对细胞凋亡相关基因的沉默作用 细胞凋亡是受许多基因调控的细胞清除的正常途径,细胞凋亡调控基因的表达紊乱与许多肿瘤的发生密切相关。B 细胞淋巴瘤-白血病-2 蛋白质家族(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、B 细胞白血病-长 x Bcl-2 家族成员之一(B cell leukemia-x long, Bcl-xL)、surviving、X 染色体连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)和 FLICE 抑制蛋白(FLICE inhibitory protein, FLIP)是常见的抗凋亡蛋白,通常在肿瘤细胞中过量表达,刺激肿瘤细胞异常生长,对凋亡诱导因素产生抵抗作用。因此,不断寻找新的抗凋亡蛋白然后利用 RNAi 技术沉默或下调肿瘤细胞中抗凋亡蛋白的表达,对肿瘤治疗具有重要的理论意义和实践价值。

许多研究证实, survivin 基因在肿瘤细胞中过表达,抑制 survivin 基因的表达,能够导致多种肿瘤的生长抑制。Wang 等^[15]利用 RNAi 技术将针对 survivin 基因的 dsRNA 转入食管鳞状细胞癌细胞系和动物模型中,结果发现,下调 survivin 基因的表达,能够显著诱导肿瘤细胞凋亡、抑制动物模型实体瘤的生长。XIAP 是凋亡抑制蛋白家族的重要成员,能够选择性抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3、-7、-9(caspase-3、-7、-9),还能通过其他途径抑制细胞凋亡,与肿瘤的发生、发展和预后关系密切。Hiscutt 等^[16]根据美国联合委员会癌症分期系统标准对 55 例皮肤原发性黑色素瘤细胞病变进行筛选和分组,通过 XIAP 特异性 siRNA 干扰黑色素瘤细胞中 XIAP 的表达,发现 XIAP 的表达促进黑色素瘤细胞病变的进程, XIAP 的沉默或

表达下调显著诱导黑色素瘤细胞的凋亡,提示 XIAP 可以作为黑色素瘤基因治疗的一个有效的治疗靶点。

2.4 RNAi 对肿瘤信号通路相关基因的沉默作用 肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, Ras)、肿瘤抑制蛋白(suppressor protein53, p53)、酪氨酸蛋白激酶类(protein tyrosine kinase, PTKs)信号通路是肿瘤发生常见的信号通路。PTKs 是重要的细胞信号转导分子,在人类多种肿瘤发生过程中常常发生突变,通过基因重排如染色体易位产生潜在的致癌性结合蛋白,导致细胞在激酶活性水平发生改变。断裂点聚集区-Abelson 小鼠白血病病毒癌基因同源物结合蛋白(breakpoint-cluster region-Abelson murine leukemia viral oncogene homolog, Bcr-Abl)是 PTKs 的一种突变产物,在人类慢性白血病细胞内普遍存在,用 siRNA 特异性沉默 Bcr-Abl 的转录,可以诱导白血病细胞凋亡^[17]。 β -连接素和腺瘤结肠息肉蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)都是 Wnt 信号通路的重要成员,与细胞增殖调控密切相关。APC 基因突变会上调 β -连接素的表达水平,促进肿瘤细胞增殖。运用 siRNA 技术沉默 β -连接素的表达可以引起 β -连接素依赖性相关基因的表达下调,从而抑制肿瘤细胞的生长^[18]。以上研究提示,可以运用 RNAi 技术沉默肿瘤信号通路中的关键或相关基因的表达,达到肿瘤基因治疗的目的。信号传导蛋白和转录激活物 5(signal transducer and activator of transcription 5, Stat5)在人的多种肿瘤中被发现高表达。抑制肿瘤细胞中 Stat5 的表达被认为与抑制肿瘤细胞的增殖和促进凋亡相关。Zhang 等^[19]以人的肝细胞癌细胞系 SMMC7721 为细胞模型,检测到 Stat5 在 SMMC7721 细胞中高表达,然后发现用 RNAi 介导的 Stat5 基因沉默可以抑制肿瘤细胞生长和诱导细胞凋亡。

2.5 RNAi 对肿瘤细胞有丝分裂相关基因的沉默作用 肿瘤细胞的无限繁殖伴随着细胞 DNA 的快速复制与细胞分裂的不断进行,利用 RNAi 技术沉默肿瘤细胞周期调控基因,中断细胞分裂进程,减慢或停止肿瘤细胞增殖,从而使肿瘤根治成为可能。目前研究较多的肿瘤细胞有丝分裂调控基因有 polo 样激酶 1(polo-like kinase 1, PLK1)、S 相激酶关联蛋白 2(S-phase kinase associated protein, Skp-2)、细胞周期素(cyclins)等。PLK1 在细胞分裂不同时期都具有十分重要的作用,能够促进和加速有丝分裂,增加 PLK1 的活性能够促进 M 期细胞增殖。Spänkuch-Schmitt 等^[20]用 RNA 干扰技术分别沉默乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、肺癌细胞系中 PLK1 的表达,许多癌细胞出现了纺锤体形成受阻、有丝分裂停止等微观形态变化。SKP2 是细胞从 G₁ 期进入 S 期的必需因子,能够促进细胞增殖,加速细胞周期进程,与肿瘤的发生、发展关系十分密切。研究发现,当用 RNAi 技术沉默人小细胞肺癌细胞中 SKP2 的表达,癌细胞的生长则受到明显的抑制^[21]。细胞周期素是细胞周期进程的主要引擎分子,在细胞增殖过程中发挥关键调控作用。研究证明,通过 RNAi 方法沉默裸鼠肝癌细胞中细胞周期素 E(cyclin E)的表达,可以抑制癌细胞生长与增殖,促进癌细胞凋亡^[22]。纺锤体驱动蛋白(kinesin-like spindle protein, KSP)是微管驱动蛋白超家族的成员之一,在有丝分裂中关于纺锤体的形成、分布和维护中发挥重要作用。若抑制 KSP 的功能,可以使细胞有丝分裂周期停滞,最终导致细胞死亡。Marra 等^[23]通过电转移法转染 siRNA 进入某些确定损伤的组织中发现, KSP 特异性的小干扰 RNA 可以显著减轻皮下黑色

素瘤和卵巢癌的损害。

3 RNAi 技术在肿瘤基因治疗方面的主要问题与前景展望

目前, RNAi 技术在肿瘤基因治疗方面仅仅停留在细胞与动物实验水平, 虽然显示出种种优势与可行性, 但还存在着许多不容忽视的问题, 离实际应用还有漫长的路要走。首先, RNAi 对基因沉默具有相对特异性, 可能出现脱靶现象^[24]。这就需要从 siRNA 的设计、特异性修饰等方面来改善。其次, siRNA 的设计和筛选上还存盲目性。一种完全符合肿瘤基因治疗要求的 siRNA 需要经过反复实验才能筛选出有效作用位点, 这一现状需要更多的实验研究从实验原理和技术方法上来加以完善。此外, siRNA 导入肿瘤细胞后可能与细胞内原有微 RNA(microRNA, miRNA) 形成竞争, 这种竞争作用可能会影响肿瘤细胞内原本由 miRNA 控制的一些基因的表达, 从而影响细胞的生理病理过程^[25], 这就要求不断发现和深入研究新的 miRNA 序列, 以解决 siRNA 与 miRNA 间的竞争问题。最后, siRNA 体内转染效率低下、对机体的长期影响尚属空白, 这是 RNAi 技术应用于临床的最大难题。各类表达载体的安全性及合成 RNA 的不良反应, 也限制了其应用于临床^[26]。

传统的肿瘤治疗方法如放、化疗存在着诸多局限性, 随着 RNAi 的发现, 为肿瘤的基因治疗带来了希望之光。RNAi 技术在肿瘤基因治疗的实验研究上已经取得了诸多成果, 有望在此基础上研究出治疗肿瘤的核酸药物, 单独或者与其他方法联合用于治疗肿瘤。虽然, 目前 RNAi 技术应用于临床还有一定的距离, 但有理由相信随着新靶标的不断发现、RNAi 技术难题的不断破解和安全性的不断提高, 肿瘤基因治疗的目标终究会实现。

参考文献:

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [2] Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate [J]. *EMBO J*, 2001, 20(23): 6877-6888.
- [3] Heo I, Kim VN. Regulating the regulators: posttranslational modifications of RNA silencing factors [J]. *Cell*, 2009, 139(1): 28-31.
- [4] Gregory J, Hannon. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 244-251.
- [5] Sashital DG, Doudna JA. Structural insights into RNA interference [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2010, 20(1): 90-97.
- [6] Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs [J]. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(1): 23-36.
- [7] Mahmood ur-Rahman, Ali I, Husnain T, et al. RNA interference: The story of gene silencing in plants and human [J]. *Biotechnol Adv*, 2008, 26(3): 202-209.
- [8] Matsui K, Sasaki Y, Komatsu T, et al. RNAi gene silencing using cerasome as a viral-size siRNA-carrier free from fusion and cross-linking [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(14): 3935-3938.
- [9] Jacques JM, Karjane T, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418(6896): 435-438.
- [10] Choi HN, Bae JS, Jamiyandorj U, et al. Expression and role of SIRT1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(2): 503-510.
- [11] Wahafu W, He ZS, Zhang XY, et al. The nucleosome binding protein NSBP1 is highly expressed in human bladder cancer and promotes the proliferation and invasion of bladder cancer cells [J]. *Tumour Biol*, 2011, 32(5): 931-939.
- [12] Qiu JF, Zhang ZQ, Yong W, et al. Lentivirus-mediated RNAi knockdown of VEGFA in RKO colorectal cancer cells decreases tumor formation and growth in vitro and in vivo [J]. *Clin Exp Pathol*, 2012, 5(4): 290-298.
- [13] Zhu K, Chen L, Han X, et al. Short hairpin RNA targeting Twist1 suppresses cell proliferation and improves chemosensitivity to cisplatin in HeLa human cervical cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4): 1027-1034.
- [14] Kothari V, Mulherkar R. Inhibition of cyclin D1 by shRNA is associated with enhanced sensitivity to conventional therapies for head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(1): 121-128.
- [15] Wang Y, Zhu H, Quan L, et al. Downregulation of survivin by RNAi inhibits the growth of esophageal carcinoma cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(9): 974-978.
- [16] Hiscutt EL, Hill DS, Martin S, et al. Targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein to increase the efficacy of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis for melanoma therapy [J]. *Invest Dermatol*, 2010, 130(9): 2250-2258.
- [17] Zaree Mahmodabady A, Javadi HR, Kamali M, et al. Bcr-abl silencing by specific small-interference RNA expression vector as a potential treatment for chronic myeloid leukemia [J]. *Iran Biomed J*, 2010, 14(1/2): 1-8.
- [18] Xu WL, Wang Q, Du M, et al. Growth inhibition effect of beta-catenin small interfering RNA-mediated gene silencing on human colon carcinoma HT-29 cells [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2010, 25(5): 529-537.
- [19] Zhang L, Zhao Z, Feng Z, et al. RNA interference-mediated silencing of Stat5 induces apoptosis and growth suppression of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Neoplasma*, 2012, 59(3): 302-309.
- [20] Spänkuch-Schmitt B, Bereiter-Hahn J, Kaufmann M, et al. Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells [J]. *Natl Cancer Inst*, 2002, 94(24): 1863-1877.
- [21] Sumimoto H, Miyagishi M, Miyoshi H, et al. Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interfer-

ence[J]. *Oncogene*, 2004, 23(36):6031-6039.

- [22] Li K, Lin SY, Brunicardi FC, et al. Use of RNA interference to target cyclin E-overexpressing hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(13):3593-3597.
- [23] Marra E, Palombo F, Ciliberto G, et al. Intratumoral electro-transfer of small interfering RNA against kinesin spindle protein(KSP) slows down tumor progression[J]. *Cell Physiol*, 2012 May 2. doi:10.1002/jcp.24103.
- [24] Rassouli FB, Matin MM. Ene silencing in human embry-

onic stem cells by RNA interference[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390(4):1106-1110.

- [25] 李高峰, 王宏梅, 陈龙华. RNAi 对肝癌细胞放射增敏的实验研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(12):1492-1496.
- [26] Higuchi Y, Kawakami S, Hashida M, et al. Strategies for in vivo delivery of siRNAs: recent progress [J]. *Bio Drugs*, 2010, 24(3):195-205.

(收稿日期:2012-08-21 修回日期:2012-10-18)

· 综 述 ·

PCR 技术对侵袭性真菌感染诊断的研究进展*

毛晓露¹, 石小燕²综述; 卢忠心¹, 胡丽华³审校

(1. 武汉市中心医院检验科, 武汉 430014; 2. 武汉市中心医院中心实验室, 武汉 430014; 3. 华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科, 武汉 430022)

关键词: 真菌病/诊断; 聚合酶链反应; 曲霉病; 念珠菌; 广谱筛查

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.07.040

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)07-0814-03

侵袭性真菌病(invasive fungal disease, IFD), 又称侵袭性真菌感染, 是真菌侵入人体组织和血液, 并在其中生长繁殖导致组织损害、器官功能障碍和炎症反应的病理、生理过程。近年来, 由于环境因素的危害和药物因素影响(如免疫移植、肿瘤放疗、大剂量广谱抗生素的长期使用、糖皮质激素和免疫抑制剂的广泛应用等), 造成了 IFD 的患病率和病死率均呈显著上升趋势。免疫力低下的 IFD 患者大多病情凶险, 常无特征性临床表现, 易被原发病或继发细菌、病毒感染掩盖, 且对传统抗真菌药物的敏感性降低, 故临床早期诊断非常困难, 后期治疗十分棘手。真菌感染的检测技术, 目前以人工镜检、培养和组织病理检查等传统方法分析为主, 但这些方法检测时间较长、敏感性较低且受主观因素影响较大。因此, 快速检测此类病原菌是治疗和改善预后的关键。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术具有快速、简便、敏感性和特异性高等优点, 在一定程度上可以弥补传统方法的不足。本文就其在 IFD 快速诊断的研究进展及临床应用远景进行综述。

1 PCR 技术在诊断曲霉病中的应用

由曲霉属真菌感染引起的疾病包括过敏性支气管肺曲霉病、肺曲霉球病和侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA)。血液和肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage, BAL)是临床检测的常规标本。最近研究表明, 大量血清和 BAL 沉渣与少量血清和经离心 BAL 的上清液相比, 更容易检出真菌病原体^[1]。采用实时定量 PCR 检测血液和 BAL 标本进行 IA 诊断分析有助于节省检测时间, 可在物种水平鉴定基础上更有针对性地进行抗真菌药物治疗, 具有较好的临床应用价值, 并建议对 PCR 技术进行标准化^[2]。虽然 PCR 标准化有利于诊断性能的验证, 但仍存在一些问题, 如 DNA 的提取效率提高至多少可以增加诊断的敏感性, 哪类临床标本更能有利于指导临床诊断及血中何种组分含有最多真菌 DNA 等。

2 PCR 技术在诊断念珠菌病中的应用

念珠菌是人体黏膜最常见的共生菌, 也是免疫功能低下患

者感染最常见的真菌病原体。约 50% 的感染由白色念珠菌引起, 其他几种念珠菌也可引起侵袭性疾病, 如近平滑念珠菌、热带念珠菌、都柏林念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、葡萄牙念珠菌等。由于念珠菌属的基因决定了对不同抗真菌药物敏感性有所不同, 尽快正确鉴定念珠菌种属以采取适当的药物治疗对提高临床疗效和降低病死率非常重要。通过血培养检测念珠菌的敏感性通常较低(大约为 50% 或更低), 其他基于抗原、抗体和代谢物的念珠菌检测技术都有各自的优势和价值, 但缺乏特异性和敏感性。PCR 检测提供了一个快速诊断并正确鉴定念珠菌到达种属水平的方法。念珠菌是口腔和上呼吸道的共生体, 呼吸道标本可能被念珠菌污染。因此, 从呼吸道标本分离出的念珠菌, 包括支气管镜检查 and BAL(甚至标本保护刷)的试样, 在没有病原菌入侵的活检证据时不考虑诊断为 IFD。在 BAL 中检测到高水平的念珠菌可建议诊断为念珠菌性肺炎, 尽管这种临床实例非常罕见。血液标本由于最可能包含循环中完整有机体形式或细胞外形式的真菌 DNA 而作为首选的临床检测标本。最近有研究对 104 例确诊为非中性粒细胞减少患者的全血与血清进行了 PCR 检测分析, 结果显示血清的阳性率可达 100%, 而全血的阳性率只有 70%, 这表明血清比全血具有更高的敏感度^[3-4]。

Morace 等^[5]分别用 PCR 和血培养方法检测全血及血清中的念珠菌, 结果显示 PCR 技术具有更高的敏感性。Ahmad 等^[6]报道了通过半套式 PCR 检测念珠菌 rRNA 基因操纵子的转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)可鉴别混合念珠菌感染, 而这种双重感染通过培养不易检出, 特别是当某一种菌株的增长速度显著增高时检测更加困难。Dunyach 等^[7]对两种实时 PCR 检测方法的灵敏度进行了评估, 一种是针对 5 种念珠菌的 ITS 区域, 另一种是将 18S rRNA 作为目的基因, 均通过熔解曲线形态来进行分析。结果表明, ITS 扩增长度的变异可导致分析灵敏度发生相应变化, 后者具有更高的灵敏度。

Maaroufi 等^[8]分别用血培养和实时定量 PCR 方法对 69

* 基金项目:武汉市卫生局课题(WX10C13)。 作者简介:毛晓露(1978~), 主管技师, 博士, 主要从事临床免疫学及分子生物学检验工作。