

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<sup>1</sup>, 石小燕<sup>2</sup>综述; 卢忠心<sup>1</sup>, 胡丽华<sup>3</sup>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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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, 包括支气管镜检查检查和 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<sup>[3-4]</sup>。

Morace 等<sup>[5]</sup>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<sup>[6]</sup>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<sup>[7]</sup>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, 均通过熔融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<sup>[8]</sup>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。

例临床确诊或疑似系统性念珠菌感染患者的血液标本进行了检测,结果显示两种方法的敏感性和特异性几乎相当。该 PCR 检测方法采用了两种可变的水解探针,一种是只针对白色念珠菌的 6-羧基荧光素 (FAM) 标记探针,另一种是针对五大主要念珠菌的四羧-6-羧基荧光素 (TET) 标记探针。两种探针诊断的敏感性均为 100%,特异性分别为 97% 和 72%<sup>[9]</sup>。此外,这两种探针与人类 rRNA 基因的部分序列具有相似性,与其他生物体如曲霉菌、酵母菌和镰刀菌等均有显著的交叉反应。由于念珠菌与许多其他常见的病原体相比,属系发育更多样化<sup>[10-12]</sup>,评估探针特异性以及引物和探针相互杂交的可能性是关键因素。此外,选择合适的标本种类和提高核酸提取效率也非常重要<sup>[13-15]</sup>。

### 3 PCR 技术诊断真菌感染的广谱筛查

混合真菌感染(尤其在抗真菌治疗)时,由于主菌的过度生长,其他菌可能不易被检测到。念珠菌属的系统发育具有多样性,对不同抗真菌药物敏感性也有所不同。多重 PCR 在检测真菌混合感染中可发挥重要作用。并非所有的病原真菌可以通过培养迅速繁殖,故阴性测试结果不能排除真菌感染的可能性<sup>[16]</sup>。广谱 PCR 检测的引物是针对该分类单元中所有生物体的高度保守基因序列。例如,广谱细菌 PCR 检测引物的特异性是针对细菌高度保守基因 16S rRNA 或 RNA 聚合酶基因序列<sup>[17]</sup>。这些基因几乎存在于所有细菌,且都包含与广谱引物作用理想的保守区和有利于确定物种的可变区序列。从理论上讲,广谱真菌 PCR 检测可以实现大多数真菌病原体的检测,将其与其他方法如熔融曲线分析相结合,可快速进行物种鉴定<sup>[18]</sup>。

PCR 扩增可以针对真菌 rRNA 基因操纵子的 ITS1 区,并进行测序,以确认物种的身份。为鉴别临床相关真菌病原体,除 ITS 的 rRNA 操纵子以外,18S rRNA 基因与 28S rRNA 基因的高变序列 D1-D2 区也常作为 PCR 检测的靶基因<sup>[19]</sup>。最近有研究表明,28S rRNA 基因中 D1-D2 区以外的序列也可用于广谱真菌 PCR 的检测<sup>[20]</sup>。虽然大多数广谱真菌 PCR 的研究都集中在有曲霉菌和念珠菌属感染的患者,而 Khot 等<sup>[21]</sup>成功鉴别了多种真菌,包括念珠菌、隐球菌、孢霉菌、曲霉菌、镰刀菌、丝孢菌属、外小杯菌、明脐菌属、鳞质霉属、放射毛霉属和根霉属。如果以培养和组织病理学方法作为金标准,其结果准确率分别为 93.6% 和 64.3%。

与特定病原体属种的 PCR 检测相比,广谱 PCR 检测 IFD 的诊断特异性可能由于假阳性率 (false-positive, FP) 较高而有所下降<sup>[22-24]</sup>。除了污染,FP 较高可能由定植于采样点的共生真菌引起,也可能由缺乏准确的 IFD 临床分类标准造成。提高广谱真菌 PCR 产物的物种鉴定水平是促进解析假阳性结果的关键因素。

PCR 技术是诊断 IFD 的主要方向,但是如何继续发展,目前有两种观点。第一种观点认为,已经开发了通过 PCR 诊断真菌感染所需的大部分专有技术,现在是进行大规模临床检测验证时期。第二种观点则认为,需要做更多的研究,以对临床样本进行优化选择、进一步改善样本的收集和处理以及 DNA 提取方法、加强 PCR 检测技术的质量控制等,以最大限度地提升诊断特异性,有效提高诊断效率。高分辨率的熔融温度分析已广泛用于种属特定 PCR 或广谱真菌 PCR 检测,微球杂交技术如液相芯片技术等将更广泛地用于 PCR 产物的物种水平鉴定和质谱分析<sup>[25]</sup>。无论是单重 PCR 反应还是多重 PCR,将重点探讨发展可用于诊断混合感染的分析方法,实时定量模式将

成为真菌靶向检测的规范。

### 参考文献:

- [1] White PL, Bretagne S, Klingspor L, et al. Aspergillus PCR: one step closer to standardization[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1231-1240.
- [2] Cesaro S, Stenghele C, Calore E, et al. Assessment of the lightcycler PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis in paediatric patients with oncohaematological diseases [J]. Mycoses, 2008, 51(6): 497-504.
- [3] Metwally L, Fairley DJ, Coyle PV, et al. Comparison of serum and whole-blood specimens for the detection of Candida DNA in critically ill, non-neutropenic patients [J]. J Med Microbiol, 2008, 57(10): 1269-1272.
- [4] Eggimann P, Bille J, Marchetti O. Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU [J]. Ann Intensive Care, 2011, 37(1): 346-355.
- [5] Morace G, Pagano L, Sanguinetti M, et al. PCR-restriction enzyme analysis for detection of Candida DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(6): 1871-1875.
- [6] Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, et al. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(7): 2483-2489.
- [7] Dunyach C, Bertout S, Phelipeau C, et al. Detection and identification of Candida spp. in human serum by lightcycler real-time polymerase chain reaction [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008, 60(3): 263-271.
- [8] Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, et al. Rapid detection of Candida albicans in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(7): 3293-3298.
- [9] Vollmer T, Stormer M, Kleesiek K, et al. Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(6): 1919-1926.
- [10] Springer J, Loeffler J, Heinz W, et al. Pathogen-specific DNA enrichment does not increase sensitivity of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4): 1267-1273.
- [11] Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(2): 665-670.
- [12] Anandakumar S, Boosi KN, Bugatha H, et al. Phage displayed short peptides against cells of Candida albicans demonstrate presence of species, morphology and region specific carbohydrate epitopes [J]. PLoS One, 2011, 6(2): 172-181.
- [13] 邵青, 高丽, 王丽丽, 等. 定量 PCR 方法用于恶性血液病患者侵袭性真菌感染的诊断研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2): 499-504.
- [14] Spiess B, Seifarth W, Hummel M, et al. DNA microarray-based detection and identification of fungal pathogens in

- clinical samples from neutropenic patients[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(11): 3743-3753.
- [15] McMullan R, Metwally L, Coyle PV, et al. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults[J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(6): 890-896.
- [16] 刘金华, 史艳宇, 贺丹, 等. 应用实时荧光定量 PCR 技术检测烟曲霉菌的初步研究[J]. *生物技术*, 2009, 19(11): 34-36.
- [17] Thompson GR, Patterson TF. Pulmonary aspergillosis [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2008, 29(2): 103-110.
- [18] Serrano R, Gusmão L, Amorim A, et al. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati* [J]. *BMC Microbiol*, 2011, 82(11): 397-403.
- [19] Bergman A, Fernandez V, Holmstrom KO, et al. Rapid identification of pathogenic yeast isolates by real-time PCR and two-dimensional melting-point analysis[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007, 26(11): 813-818.
- [20] Millon L, Grenouillet F, Legrand F, et al. Ribosomal and mitochondrial DNA target for real-time PCR diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(3): 1058-1063.
- [21] Khot PD, Ko DL, Fredricks DN. Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad-range fungal PCR assays[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(6): 1559-1565.
- [22] Herrera ML, Vallor AC, Gelfond JA, et al. Strain-dependent variation in 18S ribosomal DNA copy numbers in *Aspergillus fumigatus* [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(5): 1325-1332.
- [23] Badiie P, Kordbacheh P, Alborzi A, et al. Study on invasive fungal infections in immunocompromised patients to present a suitable early diagnostic procedure[J]. *Int J Infect Dis*, 2009, 13(1): 97-102.
- [24] Tanriover MD, Metan G, Altun B, et al. False positivity for *Aspergillus* antigenemia related to the administration of piperacillin/tazobactam[J]. *Eur J Intern Med*, 2005, 16(7): 489-491.
- [25] Landlinger C, Preuner S, Willinger B, et al. Species-specific identification of a wide range of clinically relevant fungal pathogens by use of Luminex xMAP technology[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(4): 1063-1073.

(收稿日期: 2012-08-23 修回日期: 2012-10-25)

· 综 述 ·

## 胰高血糖素样肽-1 的心血管保护作用

罗敏综述, 肖谦<sup>△</sup>审校

(重庆医科大学附属第一医院老年科 400016)

**关键词:** 胰高血糖素样肽-1; 冠状动脉疾病; 心血管保护; 心肌细胞凋亡; 糖尿病

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.07.041

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)07-0816-03

糖尿病是严重危害人类健康和生命的慢性代谢性疾病之一, 随着人们生活水平的提高, 其患病率和病死率急剧上升<sup>[1]</sup>。其中, 心血管并发症是糖尿病患者最主要的死亡原因, 约 80% 的糖尿病患者最终死于心血管疾病<sup>[2]</sup>。一项荟萃分析结果显示, 糖尿病患者心血管并发症, 包括冠状动脉疾病、心肌病等的发病率显著增加<sup>[3]</sup>。糖尿病患者的心血管并发症风险与血糖浓度密切相关, 据统计, 糖化血红蛋白每降低 1%, 心肌梗死的发生率同比降低 14%, 微血管并发症同比降低 37%。胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 是一种葡萄糖依赖性促胰岛素多肽, 除了能有效降低血糖外, 还具有抑制心肌细胞的凋亡、促进血管内皮细胞增殖、改善血管内皮细胞分化功能、修复血管内皮、降低血脂和血压、减轻体重等心血管保护作用。本文将 GLP-1 对心血管保护作用的研究进展作一综述。

### 1 GLP-1 的来源与功能

GLP-1 发现于 20 世纪 80 年代中期, 是胰升糖素原在枯草杆菌蛋白酶作用下生成的, 包含 30 个氨基酸, 主要由小肠远端和结肠的 L 细胞分泌。GLP-1 可激动胰岛  $\beta$  细胞上的 GLP-1 受体, 刺激胰岛素的合成和分泌, 从而降低血糖, 这种刺激作用

随着血糖水平的下降而逐渐减弱, 从而达到最佳胰岛素分泌和血糖控制, 即葡萄糖依赖性调节。GLP-1 进入循环后迅速被二肽酰基酶 4 (dipeptidyl-peptidase-4, DPP-IV) 降解而失活, 其生物半衰期仅数分钟, 因而限制了天然 GLP-1 的临床应用。GLP-1 通过配体-受体结合方式与细胞表面的特异性 GLP-1 受体 (glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R) 结合而发挥作用<sup>[4]</sup>。GLP-1R 含 463 个氨基酸残基, 属于跨膜 G 蛋白耦联受体超家族, 广泛表达于胰腺、胃肠道、心、肺、肾和中枢神经系统。提示 GLP-1 的生物学作用并不局限于胰腺, 可能还存在广泛的胰腺外作用。

### 2 GLP-1 的心血管保护途径

**2.1 抑制心肌细胞凋亡** 细胞凋亡在形态学上完全不同于坏死的细胞程序性死亡。大量的研究证实, 糖尿病心肌病的发生机制与细胞代谢异常和细胞器 (如线粒体、肌纤维膜、内质网等) 功能缺失引起细胞凋亡有关, 抑制心肌细胞凋亡可以有效保护心肌。Ravassa 等<sup>[5]</sup>研究发现, 心肌细胞的凋亡与星形孢菌素有关。GLP-1 可通过调节磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 和细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 1/2 的活性, 抑制星形孢菌素