

• 综 述 •

沙眼衣原体检测技术与分型方法学研究及应用*

谢 翠 综述,熊礼宽[△]审校

(深圳市宝安区妇幼保健院中心实验室 518133)

关键词:衣原体,沙眼; 血清型; 检测; 鉴定; 综述**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.020**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2012)04-0427-04

沙眼衣原体(CT)是主要的性传播感染性疾病(STI)的病原体之一,也为沙眼、包涵体性结膜炎的病原体,常导致新生儿及儿童呼吸道感染。此外,还与反应性关节炎、未分化性关节炎、脊柱性关节炎等疾病的发病相关^[1]。CT感染后可通过炎症因子诱导 NO、活性氧等物质的生成,从而破坏人体泌尿生殖道上皮细胞及其功能,导致阴道炎、尿道炎,引起男性尿道紧缩、睾丸附睾炎,以及上行引起女性宫颈炎、子宫内膜炎、盆腔炎、输卵管炎等^[2]。近年来,由 CT 引起的泌尿生殖系统感染呈逐年上升的趋势,使 CT 的早期诊断及治疗刻不容缓。

根据 CT 外膜蛋白(MOMP)的抗原表位及空间构象差异,CT 可分为 15 种血清型,不同的血清型其流行病学特征各异。近年来,随着 CT 分子诊断技术的发展,如核酸扩增技术(NAAT)及其相关技术,以其高特异性及敏感性,已被广泛用于 CT 的检测,且实现了 CT 血清型的分型检测,不同血清型流行病学特征,血清型与临床症状、药效转归等关系的研究。本文就 CT 检测技术的发展及其应用综述如下。

1 CT 的常用检测技术

1.1 直接涂片镜检 CT 寄生于柱状上皮细胞内形成包涵体,通过碘染色或姬姆萨染色等可见细胞内包涵体。沙眼急性期患者取结膜刮片,包涵体结膜炎及性病淋巴肉芽肿,也可从病损局部取材涂片,染色镜检。但由于泌尿生殖道中完整细胞较少,以及细胞内包涵体脆性较大,造成敏感性过低,从而不推荐用于临床标本检查。

1.2 细胞培养 由于 CT 的专性细胞内寄生,在适宜的条件下,将含 CT 的标本接种于经放线菌酮处理过的单层 McCoy 细胞或 Hela-229 细胞,经孵育后染色,显微镜下可见包涵体。细胞培养由于其特异性和敏感性好,被认为是诊断 CT 感染的“金标准”。但各个实验室技术水平不同,标准化困难,且分离培养操作复杂,技术要求高,所需时间长,敏感性受标本采集、运送、保存等的影响较大,因而不适于临床,多用于科研和疑难病例的最终鉴定。

1.3 抗原检测

1.3.1 直接荧光抗体测定(DFA) DFA 检测快速,其敏感性在男性及女性样本中分别为 70%~100%和 68%~100%,特异性分别为 87%~99%和 82%~100%。DFA 不像培养法必须存在有活力的 CT,故对保存时间较长或质量欠佳的标本仍适用。对子宫内膜及输卵管样本,DFA 法敏感性高于培养法,且适用于直肠样本。但 DFA 法特异性和敏感性取决于单克隆抗体,由于荧光易淬灭,结果判定带有主观性和经验性,且不适

于检测大量标本^[3]。

1.3.2 酶免疫测定(EIA) 用酶标记的单克隆或多克隆抗体检测 CT 的脂多糖(LPS)或 MOMP,其敏感性为 64%~98%,特异性为 93%~98%。在高危人群中敏感性更高,而在新近感染及治疗监测中敏感性明显下降。EIA 的优点在于方法简便、操作自动化,适于短时内大批量标本的检测。其最大缺点在于,与其他常见微生物偶尔产生交叉反应,如金黄色葡萄球菌、A 群及 B 群链球菌、淋病奈瑟菌等^[3],随着高特异性的单克隆抗体试剂的产生,这一缺陷有望得到克服。

1.3.3 胶体金法 胶体金法具有快速、简单、仅 0.5 h 就能出结果以及结果判断直观等优点,但该法敏感性较低,特异性差、不同公司试剂或同一公司试剂批间差异大^[4],因此限制了其在临床及科研上的应用价值。

1.4 抗体检测 此方法是应用 CT 抗原检测待测者血清中有无 CT 抗体,常用的方法有微量荧光免疫法等。性病性淋巴肉芽肿(LGV)、附睾炎和输卵管炎患者血清中 CT 抗体水平明显升高,该方法有助于诊断。新生儿 CT 肺炎也可通过测定其特异性 IgM 抗体,若 IgM 抗体滴度大于 32,多具有临床诊断价值。但由于 CT 感染 2~3 周后血清中才可检出 IgG 抗体,因此,抗 CT IgG 检测阴性不能完全排除感染;而患者即便经治疗后,IgG 升高仍能持续较长时间,故阳性结果也不一定证明有感染存在;部分患者感染 CT 以后,并不产生抗体或仅产生少量抗体,此时也可能显示阴性结果。且微量免疫荧光法检测 CT,重复性差,目前也没有统一的标准,因此,不建议单独用于 CT 的诊断^[3]。

1.5 核酸检测 既往的直接检测核酸的技术,即原位探针技术,由于其成本高、步骤繁琐并随着核酸扩增技术的出现,该技术已失去了其应用价值。目前所认为的 CT 核酸检测技术,即基于核酸扩增技术发展起来的一系列新的技术,如聚合酶链反应(PCR)、链置换扩增技术(SDA)、转录介导扩增技术(TMA)等,其敏感性和特异性均优于传统的细胞培养法^[5],其中又以荧光定量 PCR 技术的应用尤为广泛。现检测 CT 扩增的目的基因多为质粒,因质粒为多拷贝,其敏感性高。

1.5.1 PCR 早先的 PCR 是建立在 PCR 扩增、电泳、染色后,紫外光检测有无相应目的基因,从而判断有无 CT 的感染。该方法具有较好的敏感性及特异性,但由于易污染,引起假阳性和不能定量测定等问题,已被新的技术所取代。

1.5.2 荧光定量 PCR 荧光定量 PCR 技术对 CT 的检测从定性到了定量检测。其原理为以参照物为标准,对 PCR 终产

* 基金项目:深圳市科技基金(医学卫生)资助项目(200902150)。

[△] 通讯作者,E-mail:xianglk@yahoo.com.cn。

物进行分析从而对待测样本中靶基因的拷贝数进行定量。其特异性高,敏感性好,且属于全闭环 PCR 扩增系统,免除了电泳导致的交叉污染,并通过参考样本制定标准曲线,能客观、准确地判断结果,且可以通过内标法及时发现由于抑制物的存在而造成的假阴性现象,或采用管家基因内参照法对 PCR 结果进行校正^[6]。雅培公司的 CT/淋病奈瑟菌(NG)多重实时荧光定量 PCR 可在 4.5 h 内完成 DNA 的自动提取、扩增、荧光信号的检测,以及检测结果的输出,且敏感性、特异性均较高^[7]。此外,目前的研究还认为泌尿生殖系统中 CT 的感染量与感染者的临床表现相关。因此,CT 定量检测对临床诊断及临床疗效的判断具有辅助价值^[8]。

1.5.3 PCR-限制性内切酶技术(PCR-RFLP) 以 CT MOMP 基因为引物,PCR 产物经内切酶切后,分析产物,即 PCR-RFLP。可用于对 CT 分型检测。PCR-RFLP 的发展实现了 CT 的分型检测,但操作繁琐,一次可检测的样本数量小,短时间内不能检测大量样本,其应用存在局限性。尤其是不适合 CT 不同血清型混合感染的鉴定^[9]。

1.5.4 PCR 产物直接测序 CT MOMP 基因经过 PCR 扩增后,再将 PCR 产物测序,多数可以准确地完成 CT 分型检测,此方法可作为单血清型 CT 感染分型检测的“金标准”,但测序法不适用于双重或多重感染^[9],而 CT 双重或多重感染率为 5%~15%。

1.5.5 PCR-杂交技术 PCR 产物与特异性探针在膜上进行 DNA 杂交,再用同位素放射自显影、酶显色或化学发光反应将结果放大,从而对 CT 进行检测,如反向斑点杂交技术(RDB)、反向线型杂交技术、反向线点杂交技术(RLB)等。由于其高敏感性 & 特异性,近年来被研究者所推崇。Xiong 等^[9]根据 MOMP VD2 编码基因设计 CT 基因型特异性探针,用巢氏 PCR 扩增相应 DNA 片段后与膜上探针杂交,然后通过检测化学发光判断杂交信号,从而对 CT 进行分型检测。该方法敏感性好,特异性高,对于双重或多重感染,明显优于 RFLP 或直接测序。

PCR 技术的发展,还使男性以尿液样本取代传统的尿道拭子,使样本的收集更为简易方便,为受检者所接受。针对同一病原体不同目的片段的二重 PCR 技术,如雅培公司的荧光定量 PCR,不仅可使敏感性提高,且对其某一目的基因片段发生突变的变异型 CT 的检测同样有效;针对不同病原体的二重 PCR,还可同时检测 CT 及 NG,其敏感性分别为 92.4% 和 99.2%,特异性分别为 96.7% 和 99.1%^[10]。此外,常用的 96 孔板的荧光定量 PCR,除去参考样本,一次可检测超过 80 个的样本量;而 45 槽道的反向线点杂交技术一次也可完成超过 40 个样本的分型检测。因此,PCR 技术较传统检测法通量高,适用于 CT 的大规模流行病学研究。

2 CT 检测技术的应用

由于 CT 的分型技术缺乏标准化,限制了其在临床上的应用,目前对 CT 的分型主要还是用于研究,如 CT 感染的流行病学研究等。

2.1 在 STI 流行病学研究中的应用 STI 发病率呈逐年上升趋势,尤其在 15~25 岁的人群中。不同血清型的 CT,其流行病学特征也有差异。因此,研究各地区、各人群的 CT 基因型分布具有重要意义。瑞典 CT 的感染主要以 E 型为主(47%),西班牙主要以 D 型感染为主(45.3%),E 型仅占 15.3%,俄罗

斯 F 型、H 型的感染率明显低于荷兰,而 G 型的感染率却明显高于荷兰^[11-12]。王峰等^[13]对我国深圳地区 2 048 例性病门诊病人进行 CT 检测与分型,发现主要以 F 型(21.6%)、E 型(20.9%)、J 型(19.9%)、D 型(12.9%)为主,Gao 等^[14]对我国 6 个城市 240 例高危女性抽样调查结果显示为 E 型(27.9%)、F 型(23.5%)、G 型(12.4%)和 D 型(11.1%)。此外,不同性别 CT 感染的血清型分布也有差异,有学者对澳大利亚墨尔本的女性及男同性恋患者的抽样调查研究结果显示,女性群体中的 E 型感染率高于男同性恋患者(17% vs 3%),而 D 型却明显低于男同性恋患者(7% vs 54%)。Petrovay 等对匈牙利女性工作者的抽样调查研究表明高危群体中,CT 感染的血清型分布为 D(34.4%)、E(21.9%)、F(18.8%)、G(9.4%)、J(9.4%)、H(3.1%)和 I(3.1%)^[15-16]。

CT 感染可严重损害人体尤其是女性生殖系统健康,可引起女性盆腔炎、不孕、异位妊娠、自然流产、胎膜早破以及垂直传播给胎儿引起胎儿和新生儿眼部及呼吸道感染等。此外,CT 也是学龄儿童及成人呼吸道及肺部的感染的病原体之一。早在 1989 年,美国预防卫生服务工作组就提出应该对性活跃的妇女进行常规的 CT 筛查,以对 CT 感染者进行及时治疗,减少并发症;由于澳大利亚 CT 感染率的持续增长,该国政府也计划制定有效的 CT 筛查措施;而德国医疗保险体系也于 2008 年将对性活跃妇女进行 CT 筛查列入了常规医疗范畴。有学者对近年研究的未孕妇女、孕妇以及男性进行 CT 筛查及早期治疗感染者与 CT 在相应人群中的流行状况的报道进行综合分析发现:(1)取宫颈拭子或第 1 段尿液为样本,用 PCR 法检测 CT,其敏感性优于宫颈内膜样本细胞培养法;(2)对高危未孕妇女进行 CT 筛查及早期治疗,可降低该人群一年内盆腔炎的发病率;早期治疗 CT 检测阳性的孕妇,可减少妊娠及分娩并发症的发生率;(3)对 CT 感染率低的人群筛查高危者,对 CT 感染率高的群体进行全民 CT 普查,具有显著的经济效益及社会效益。Salmeri 等^[17]对 73 对不能生育的夫妇进行 CT 的筛查,发现其中有 6 对夫妇双方或其中一方感染有 CT,感染率约为 8.2%,这与 Wilkowska-Trojnel 等^[18]发现在波兰的不孕妇女中,CT 的感染率约为 8.3%~8.7%的结果一致。此外,Wilkowska-Trojnel 等^[18]还对 120 例自然流产至少 1 次的妇女进行宫颈拭子 PCR 检测 CT,血清 CT 特异性 IgG 和 IgA 的筛查,结果发现在有过自然流产史的妇女中,CT 感染率明显高于无流产史的妇女。Yu 等^[19]对中国重庆地区的 300 多对母婴进行 CT 的检测结果显示:该地区孕妇 CT 的感染率约为 11%,母婴垂直传播引起婴儿呼吸道 CT 感染率为 24%,其中又以阴道分娩垂直传播为主(66.7%)。Webley 等^[20]学者等对 182 例儿童的支气管肺泡灌洗液进行 CT 检测,发现有 77 例患儿 CT 检测阳性;且其对其中的 128 例哮喘患儿行 CT 培养,有 59 例培养阳性。由此可见,CT 感染严重损害着人类的健康,但由于 CT 特殊的生活周期,其感染常可逃避机体免疫防御而导致持续感染,使患者病情反复且迁延不愈,临床疗效也不一致。这些多与 CT 不同基因型的致病性有关。因此,建立快速有效的 CT 检测技术,特别是 CT 分型检测技术,加强 CT 的流行病学调查研究,对于妇女及儿童保健具有重要的意义。

2.2 CT 检测的临床应用 临床上对 CT 的检测主要用于对高危人群、围产期孕妇泌尿生殖道,以及新生儿急性呼吸道及

眼部 CT 感染的筛查,常用的方法有 DFA、EIA 以及荧光定量 PCR^[21]。由于大多数 CT 感染者并无特异性临床症状或症状轻微,主动就医者较少,可导致 CT 诊治延误,感染率上升。对高危人群,尤其是有泌尿生殖道症状的高危人群进行 CT 的筛查,治疗 CT 感染者及其性伴侣,对减少 CT 感染并发症及控制本病的传播具有积极的作用。Low 等^[21]分析了近年来对高危女性进行 CT 筛查的效益认为,对其进行 CT 筛查可降低该人群一年内盆腔炎的发病率。不同的 CT 基因型感染,其临床表现也不尽相同,Beni 等^[22]对 108 例 CT 阳性的女性临床表现分析发现,F 型及 G 型感染比其他血清型感染更容易下腹疼痛($P=0.02$),但 F 型感染较其他血清型感染引起的下腹疼痛症状轻($P=0.08$);也有研究还认为 E 型较其他血清型更容易表现为无症状性感染。CT 上行可引起宫内感染,造成胎盘功能不全,直接影响胎盘物质交换而致胎死宫内,胎儿生长迟缓、早产等严重后果;如果病原体局限宫颈管,可感染经阴道分娩的新生儿,引起结膜炎、咽炎以及眼部感染。因此,孕妇 CT 感染已经成为围产期重要的致危因素,对孕妇进行积极的 CT 筛查,早期诊断及治疗,对于改善妊娠结局以及遏止 CT 孕产妇垂直传播具有重要的现实意义。新生儿感染 CT 后,可引起急性的眼结膜炎,CT 肺炎,甚至呼吸、心力衰竭等严重的并发症。Rours 等^[23]对 148 例有呼吸道症状,且年龄小于 6 个月的婴儿的鼻黏膜拭子进行 CT、呼吸道合包病毒以及支原体等病原体检测结果显示,在这些患儿中,有 10 例 CT 阳性,其感染率(7%)仅次于呼吸道合包病毒。Gallo 等^[24]患有 CT 结膜炎的新生儿进行分型检测发现,E 型明显高于其他血清型($P<0.001$,相对危险度为 3.03,95%可信区间为 1.57~5.90)。因此,对高危新生儿以及有呼吸道症状的新生儿进行 CT 的检测,可尽早确诊或排除 CT 的感染,使患儿得到积极的治疗,降低新生儿死亡率。目前临床上常用的荧光定量 PCR,可定量检测 CT 感染,敏感性好,但无法实现 CT 的分型。随着 PCR-RLB 的发展,有望实现其临床应用,可为 CT 感染性疾病的诊治提供更加科学的依据。

2.3 CT 分型检测的科研价值 PCR-RLB 技术的发展,大大提高了 CT 分型检测的敏感性和特异性。由于 CT 基因型不同,其流行病学特点也有差别,不同基因型 CT 感染后,其临床特征也是不同的。因此,对 CT 进行分型检测,具有极大的科研价值。通过研究不同地区或人群中,CT 不同基因型的流行病学特征,有助于调查该地区或该人群中 CT 主要的传播途径以及传染源,从而协助 CT 预防措施的制定、实施和更有效的控制 CT 感染的蔓延。CT 不同基因型感染后可引起不同的疾病,即使同一疾病,其临床表现也不尽相同;不同 CT 基因型感染后,疾病的迁延进展,如被机体自行清除或为表现为持续性感染的可能性,也不一样。因此,通过与特异性探针杂交,对 CT 进行分型检测,了解不同基因型 CT 感染后临床表现以及疾病进展方式的相同与差异之处,是我们研究不同基因型 CT 感染的潜在致病机制、自然进程与转归的重要工具。不同基因型 CT 感染者,其对同一种药物的敏感性也不一样。因此,CT 分型检测技术的发展,可实现判断同一药物对不同基因型 CT 的疗效,药物作用于不同基因型病原体可能机制的研究,以及指导靶向性新药的开发等。此外,不同基因型 CT 感染后,可引发机体不同的免疫反应,因此对 CT 分型检测,也是特异性疫苗研发以及有针对性的疫苗接种的基础。

综上所述,建立简便、快速、敏感、特异和通量高的 CT 检测技术,从而提高 CT 感染者,尤其是无症状的 CT 携带者的早期诊断率,使其得到及时的治疗,是遏制 CT 感染率上升的重要手段。近年来广泛使用的分子诊断技术,如 PCR-RLB 技术,尤其是巢氏 PCR-RLB 技术,不仅大大提高了 CT 检测的敏感性,操作相对简易,检测周期短,检测通量高,而且能够对 CT 进行血清型分型检测,可用于 CT 流行病学调查的推广应用,且有利于研究在不同地区或不同人群中,CT 各种血清型的流行病学特征,母婴垂直传播的流行病学情况,以及研究 CT 血清型与临床症状,及药效转归之间的关系。

参考文献

- [1] Carter JD, Hudson AP. The evolving story of Chlamydia-induced reactive arthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2010, 22(3): 424-430.
- [2] Shao R, Zhang SX, Weijdegrd B, et al. Nitric oxide synthases and tubal ectopic pregnancies induced by Chlamydia infection: basic and clinical insights[J]. Mol Hum Reprod, 2010, 16(12): 907-915.
- [3] Domeika M, Savicheva A, Sokolovskiy E, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections in East European countries[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2009, 23(10): 1353-1363.
- [4] Nadala EC, Goh BT, Magbanua JP, et al. Performance evaluation of a new rapid urine test for chlamydia in men: prospective cohort study[J]. BMJ, 2009, 339(21): 2655.
- [5] Bachmann LH, Johnson RE, Cheng H, et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis rectal infections[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11): 1827-1832.
- [6] Flores E, Rodríguez JC, García-Pachón E, et al. Real-time PCR with internal amplification control for detecting tuberculosis: method design and validation[J]. APMIS, 2009, 117(4): 592-597.
- [7] Marshall R, Chernesky M, Jang D, et al. Characteristics of the m2000 automated sample preparation and multiplex real-time PCR system for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(5): 747-751.
- [8] 向华国,熊礼宽,涂植光.沙眼衣原体的分子生物学诊断研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(3): 427-429.
- [9] Xiong L, Kong F, Zhou H, et al. Use of PCR and reverse line blot hybridization assay for rapid simultaneous detection and serovar identification of Chlamydia trachomatis[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(13): 1413-1418.
- [10] Gaydos CA, Cartwright CP, Colaninno P, et al. Performance of the Abbott RealTime CT/NG for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(12): 3236-3243.
- [11] Pieiro L, Montes M, Gil-Setas A, et al. Genotyping of Chlamydia trachomatis in an area of northern Spain[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2009, 27(3): 462-464.
- [12] Spaargaren J, Verhaest I, Mooij S, et al. Analysis of Chlamydia trachomatis serovar distribution changes in the Netherlands (1986-2002)[J]. Sex Transm Infect, 2004, 80(1): 151-152.
- [13] 王峰,洪福昌,周华,等.性病门诊人群泌尿生殖道沙眼衣原体混合感染及分型研究[J]. 中国艾滋病性病, 2007, 13(3): 250-252.
- [14] Gao X, Chen XS, Yin YP, et al. Distribution study of Chlamydia trachomatis serovars among high-risk women in China performed using PCR-restriction fragment length polymorphism genotyping

[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(4): 1185-1189.

[15] Petrovay F, Balla E, Németh I, et al. Genotyping of Chlamydia trachomatis from the endocervical specimens of high-risk women in Hungary[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(6): 760-764.

[16] Regan DG, Wilson DP, Hocking JS. Coverage is the key for effective screening of Chlamydia trachomatis in Australia[J]. J Infect Dis, 2008, 198(2): 349-358.

[17] Salmeri M, Santanocita A, Toscano MA, et al. Chlamydia trachomatis prevalence in unselected infertile couples[J]. Syst Biol Reprod Med, 2010, 56(6): 450-456.

[18] Wilkowska-Trojnieł M, Zrodowska-Stefanow B, Ostaszewska-Puchalska I, et al. Chlamydia trachomatis urogenital infection in women with infertility[J]. Adv Med Sci, 2009, 54(1): 82-85.

[19] Yu J, Wu S, Li F, Hu L. Vertical transmission of Chlamydia trachomatis in Chongqing China[J]. Curr Microbiol, 2009, 58(2): 315-320.

[20] Webley WC, Tilahun Y, Lay K, et al. Occurrence of Chlamydia trachomatis and Chlamydia pneumoniae in paediatric respiratory infection[J]. Eur Respir J, 2009, 33(2): 360-367.

[21] Low N, Bender N, Nartey L, et al. Effectiveness of chlamydia screening: systematic review[J]. Int J Epidemiol, 2009, 38(3): 435-448.

[22] Beni BT, Motamedi H, Ardakani MR. Genotyping of the prevalent Chlamydia trachomatis strains involved in cervical infections in women in Ahvaz, Iran[J]. J Med Microbiol, 2010, 59(9): 1023-1028.

[23] Rours GI, Hammerschlag MR, Van Doornum GJ, et al. Chlamydia trachomatis respiratory infection in Dutch infants[J]. Arch Dis Child, 2009, 94(6): 705-707.

[24] Gallo Vaulet L, Entrocassi C, Corominas AI, et al. Distribution study of Chlamydia trachomatis genotypes in symptomatic patients in Buenos Aires, Argentina: association between genotype E and neonatal conjunctivitis[J]. BMC Res Notes, 2010, 3(1): 34.

(收稿日期: 2011-10-12)

• 综 述 •

循环 miRNA: 潜在的肿瘤标志物*

吴汪泽 综述, 卢忠心[△] 审校

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院检验科, 湖北武汉 430014)

关键词: 微小 RNAs; 血液; 肿瘤; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 04. 021 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2012)04-0430-04

在最新一期的美国《国家科学院院刊》上,报道一则振奋人心的消息:“验血可比 CT 扫描提前 28 个月发现肺癌”。据称美国俄亥俄州大学综合癌症中心的研究人员通过分析肺癌患者血浆中 miRNA 表达谱,从而了解肿瘤患者疾病的状况及其侵袭性^[1]。全球每年约有 700 万人死于肿瘤,肿瘤的早期诊断和早期治疗对患者的预后生存率是极其重要的。临床上急切需要寻找灵敏度高和特异强的生物标志物,以便于对肿瘤进行早期诊断、鉴别分期、预后判断和疗效监测等。最近的研究发现,人类外周血中存在一些稳定性良好的循环 miRNA,并且肿瘤患者血液中存在特异性的 miRNA 表达谱。因此,循环 miRNA 很可能成为肿瘤诊断的新型生物标志物。

1 循环 miRNA 概述

2008 年 Lawrie 等^[2]首次在人类血清中检测到 miRNA 分子。他们发现 60 例弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者血清中 miR-155、miR-210 和 miR-21 表达量明显高于 43 例健康对照者,并且 miR-21 的水平与患者无复发生存率密切相关。紧随其后, Mitchell 等^[3]从健康人血浆中分离出的 18~24 nt RNA,对其进行测序后与基因组数据库中的数据比对分析,发现 73% 的 RNA 序列与已知的 miRNA 序列是相同的。几乎同时, Chen 等^[4]采用高通量 Solexa 测序技术对健康人血清中 miRNA 进行了分析,在男性和女性血清中分别发现了超过 100 种和 91 种 miRNA 分子。这些研究均说明外周血中存在成熟的 miR-

NA 分子。Mitchell 等^[3]为了验证血浆中 miRNA 分子源于肿瘤细胞,他们将人前列腺癌细胞 22Rv1 移植到 NOD/SCID 免疫缺陷小鼠体内。在小鼠血浆中检测到 miR-660 和 miR-629 (小鼠并不具有这两种同源基因),说明 miR-660 和 miR-629 是由 22Rv1 细胞释放进入小鼠外周血中。

循环 miRNA 在血液中是否稳定是其作为生物标志物的前提之一。鉴于血液中含有丰富的 RNase,人们猜想血液中 miRNA 是极不稳定的,研究结果却出乎意料。Mitchell 等^[3]将合成的 3 种新秀丽小杆线虫 miRNA 加入到 RNase 未灭活的人类血浆中,3 种外源性 miRNA 在 2 min 内就被迅速降解,而 3 种内源性 miRNA 却没有明显的改变。Chen 等^[4]从肺癌 A549 细胞中提取 RNA,扩增后得到 7 种 miRNA。用 RNase 对其处理 3 h 后,50 % 以上的 miRNA 仍是完整的,而对照组的大分子 RNA(18S rRNA、28S rRNA、GAPDH、 β -actin 和 U6 RNA)均被彻底降解。另外,将血浆放置于室温 24 h,或经过 8 次反复冻融,甚至以强酸(pH=1)、强碱(pH=13)或 DNase 处理 3 h,血浆中 miRNA 没有显著变化^[3-4]。这些研究证实了循环 miRNA 是十分稳定的。目前的研究发现,循环 miRNA 即可以与核磷蛋白 1(NPM1)、家族蛋白 2(Ago2)和高密度脂蛋白(HDL)等物质结合^[5-7],以复合物的形式存在于外周血中,也可以包含于外泌体、微小体和凋亡小体中^[8-10],从而免受 RNase 的降解。但是,循环 miRNA 稳定的机制还需进一步

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81071921);人力资源与社会保障部 2009 年度留学人员科技活动项目择优资助项目;武汉市科技攻关计划项目(201060938366-02)。 [△] 通讯作者, E-mail: lzx71@yahoo. com。