束时仍维持缓解。在依那西普组和安慰剂组中,缓解率、疾病低水平活动期及其他一些测量指标并无明显不同。在两组中疾病的活动都很常见。这项研究中依那西普组 56.2% 的患者和安慰剂中 57.1% 的患者有至少 1 项严重或者威胁生命的严重事件,或者死亡。有 6 例依那西普组患者发生了实体肿瘤,而安慰剂组却无病例发生。研究提示依那西普在韦格式肉芽肿治疗中对维持缓解并无效果。它仅对很小一部分患者维持缓解有效,但却伴随着治疗相关并发症的高发病率,由此提示不适合作为韦格式肉芽肿缓解治疗药物^[20]。对其他类型血管炎,目前还没有依那西普治疗的研究报道。

综上所述,ANCA 相关性血管炎是一种全身性的免疫性疾病,发病率、复发率、病死率较高。在诱导缓解治疗中,传统的糖皮质激素联合细胞毒药物沿用多年,有一定疗效,但对部分患者无效,复发率较高。与 CTX 相比,美罗华对复发病例治疗效果较好,且不影响生育。阿达木单抗、英利昔单抗都能减少泼尼松龙用量,降低激素不良反应。MMF 疗效较 CTX 好,且有利于患者肾功能恢复。在维持治疗中,糖皮质激素联合 CTX 是经典疗法。AZA、MTX 也有一定疗效。依那西普只有韦格纳氏肉芽肿患者的研究,疗效较差,不良反应较大,不宜采用。

参考文献

[1] Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference[J]. *Arthritis Rheumatism*, 1994, 37(2): 187-192.

[2] Savige J, Davies D, Falk RJ, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and associated diseases; a review of the clinical and laboratory features[J]. *Kidney Int*, 2000, 57(3): 846-862.

[3] 徐天,陈楠. 原发性小血管炎治疗进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2009, 10(9): 829-832.

[4] 李卫华,秦绍华,朱颖辉. ANCA 相关性小血管炎临床探讨[J]. *海南医学*, 2008, 19(4): 91-92.

[5] 杨宝峰. 药理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 476.

[6] 王新禹,梁前进. 环磷酰胺的毒副作用机制及应对措施[J]. *药学进展*, 2006, 30(10): 452-456.

[7] 戴青,鲍春德. ANCA 相关性血管炎的治疗与预后[J]. *实用医院临床杂志*, 2011, 8(1): 5-7.

[8] Smith K, Jones R, Burns S, et al. Long-term comparison of rituximab treatment for refractory systemic lupus erythematosus and vasculitis; Remission, relapse, and re-treatment[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(9): 2970-2982.

[9] Stone JH, Merkel PA, Spiera R, et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis[J]. *N*

Engl J Med, 2010, 363(3): 221-232.

[10] Cartin-Ceba R, Fervenza FC, Specks U. Treatment of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis with rituximab[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2012, 24(1): 15-23.

[11] Laurino S, Chaudhry A, Booth A, et al. Prospective study of TNF α blockade with adalimumab in ANCA-associated systemic vasculitis with renal involvement[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(10): 3307-3314.

[12] Booth A, Harper L, Hammad T, et al. Prospective study of TNF α blockade with infliximab in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(3): 717-721.

[13] 胡伟新,陈欣. 霉酚酸酯治疗小血管炎肾损害的临床研究[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2002, 11(2): 110-115.

[14] Hu W, Liu C, Xie H, et al. Mycophenolate mofetil versus cyclophosphamide for inducing remission of ANCA vasculitis with moderate renal involvement[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(4): 1307-1312.

[15] Stassen PM, Tervaert JW, Stegeman CA. Induction of remission in active anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis with mycophenolate mofetil in patients who cannot be treated with cyclophosphamide[J]. *Anne Rheum Dis*, 2007, 66(6): 798-802.

[16] 章友康,赵明辉. 原发性小血管炎及其肾损害的治疗[J]. *中华肾脏病杂志*, 1998, 14(1): 58-59.

[17] Jayne D, Rasmussen N, Andrassy K, et al. A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(1): 36-44.

[18] Kallenberg CG. Treatment of ANCA-associated vasculitis, Where to Go[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2012, 43(3): 242-248.

[19] Metzler C, Hellmich B, Gause A, et al. Churg Strauss syndrome—successful induction of remission with methotrexate and unexpected high cardiac and pulmonary relapse ratio during maintenance treatment[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2004, 22(6 Suppl 36): S52-61.

[20] Wegener's Granulomatosis Etanercept Trial (WGET) Research Group. Etanercept plus standard therapy for Wegener's granulomatosis[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(4): 351-361.

(收稿日期:2012-10-11 修回日期:2012-12-28)

申克孢子丝菌聚合酶链反应诊断及其相关技术的研究进展

田超群 综述, 周 汛 审校(重庆医科大学附属第一医院皮肤科 400016)

【关键词】 申克孢子丝菌; 聚合酶链反应; 相关技术

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 10. 047 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)10-1288-03

孢子丝菌病又称玫瑰花园丁病,是由申克孢子丝菌引起的皮下组织真菌病,孢子丝菌由 Schenck 于 1898 年在美国分

离^[1]。申克孢子丝菌分布于全球的土壤中,而孢子丝菌病则局限于墨西哥、中南美洲和其他地区,最常见的感染方式是皮肤

接种,最典型皮损是淋巴皮肤型或者孢子丝菌病样型,即原发部位感染后沿淋巴管播散的类型。申克孢子丝菌为一种双相型真菌,在室温 25℃下为菌丝相,37℃下为酵母相,酵母相可在感染者体内增殖,形成小的芽生孢子而致病^[1]。临床上常根据患者病史、皮损状况、组织真菌分离培养、组织病理观察、血清学、免疫组化检测等方法诊断孢子丝菌病,但传统诊断方法不仅耗费时间且误诊率高。因此研究一项快速灵敏,特异性高的诊断技术十分必要。分子生物学诊断方法尤其是聚合酶链反应(PCR)及其相关技术,不但简单、快捷,且特异性高,近年来越来越受人们的重视。

1 PCR 技术

从 1994 年 Chua 等^[2]报道使用 PCR 技术检测申克孢子丝菌以来,基于其操作简单、快捷、准确性高等优点,这项技术越来越多地被人们用于孢子丝菌的研究。PCR 技术不仅可用于检测环境中、动物组织、临床皮损中的孢子丝菌,还可用于孢子丝菌与相关类群的分属学研究,发现新的种类,且可用于菌株耐药性研究。朱建国等^[3]筛选出申克孢子丝菌特异性引物 S2-R2 成功鉴定了动物组织、人石蜡切片和临床皮损中的孢子丝菌。应用该引物检测石蜡切片中的孢子丝菌阳性率高达 91%,检测临床新鲜活组织中的孢子丝菌,以真菌培养为参照,阳性率可达 100%。该方法能够快速、准确地检测出孢子丝菌,敏感性及特异性很高,可以用于临床快速诊断孢子丝菌病。Liu 等^[4]采用相同的方法检测临床皮损中的孢子丝菌,83.3%(25/30)的皮损中可检测出孢子丝菌,且 PCR 检测出的孢子丝菌皮损的病例有 95.6%真菌培养为阳性。2007 年 Marimon 等^[5]采用 PCR 技术联合不同培养基、不同温度菌株生长率等方法将 127 例孢子丝菌分为 7 类,包括 *S. mexicana*、*S. brasiliensis*、*S. globosa* 和 *S. schenckii* 等,并且发现前面 3 种新分类,这种分类方法一直被世界公认。Oliveira 等^[6]应用表型实验(phenotypic test)及 PCR 技术(以钙调蛋白基因为引物)研究 40 例 *S. schenckii*(包括 31 例从人体分离的菌株和 9 例从动物分离的菌株)及其对抗真菌药物的敏感性,结果这 40 例申克孢子丝菌被分成了 4 类:*S. albicans*($n=1$)、*S. brasiliensis*($n=1$)、*S. lueiei*($n=1$)和 *S. schenckii*($n=37$),他们的实验得出 *S. albicans* 和 *S. lueiei* 对伊曲康唑耐药,且对所有唑类药物耐药性均较高。从动物分离的孢子丝菌对伊曲康唑的耐药性高于从人体分离的菌株,但对于特比萘芬和两性霉素 B 所有菌株的敏感性相差不大,因此,孢子丝菌的准确分类对于治疗药物的选择是相当重要的。PCR 还可用于孢子丝菌双向转换技术的研究,Valle-Aviles 等^[7]用 PCR 检测出钙/钙调蛋白激酶家族中的新成员:SSCMK1,它可能参与孢子丝菌的双向转换。

2 巢式 PCR 技术

巢式 PCR 同 PCR 一样不仅可用于孢子丝菌诊断,还可用于孢子丝菌分类及其对抗真菌药物的研究,而且有的实验还证明巢式 PCR 比普通 PCR 检测孢子丝菌的灵敏性更高^[8]。王连明等^[9]运用巢式 PCR 及特异性引物来检测实验小鼠组织中的申克孢子丝菌,11 只有明显皮损表现的小鼠中 9 只可检测出申克孢子丝菌特异性 DNA,但并不是所有研究都表明巢式 PCR 技术优于传统方法。Mendoza 等^[10]比较真菌镜检、真菌培养、巢式 PCR 技术和血清学检测小鼠器官中的孢子丝菌,其中真菌培养和抗体检测阳性率较高,而巢式 PCR 技术和真菌镜检的阳性率稍低。巢式 PCR 技术还可用于孢子丝菌分类,Xu 等^[11]运用巢式 PCR 技术检测 38 株不同地方的孢子丝菌,他们研究的菌株包括从动物和人体分离的孢子丝菌,并和其他类型的真菌作比较,结果表明巢式 PCR 技术对于鉴别不同种

类的申克孢子丝菌具有很高的敏感性和特异性,为孢子丝菌病的快速诊断提供了一种新方法。Galhardo 等^[12]分别从申克孢子丝菌的表型和基因型研究菌株对抗真菌药物的最低抑菌浓度,其研究表明菌株的耐药性和基因型是密切相关的,而不同地区的孢子丝菌对抗真菌药物的耐药性也是不同的。

3 限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)技术

PCR-RFLP 技术主要应用于孢子丝菌菌种的鉴别,由于其标记需使用内切酶,对实验室及操作人员要求较高,近年来研究较少。Kawasaki 等^[13]运用线粒体 DNA 联合 PCR-RFLP 技术鉴别申克孢子丝菌的两种不同基因型菌株 American Type Culture Collection 10268 of mtDNA type 1 和 KMU2025 of mtDNA type 4,这两种菌株主要不同点定位于 *atp9* 和 *cox2* 基因,并且发现这种运用限制性内切酶 *Asel* 的方法比其他运用核 DNA 内部转录区间的 PCR-RFLP 技术更适合于孢子丝菌种的鉴别。

4 反向 PCR 技术

反向 PCR 技术主要用于孢子丝菌的双向转换机制及其基因结构研究,对于了解孢子丝菌病的致病机制有重要意义。Robledo-Ortiz 等^[14]运用反向 PCR 技术及简并引物发现了申克孢子丝菌内质网葡萄糖苷酶 II 的编码基因 *rot2*,这个基因编码的蛋白与孢子丝菌的结构、致病性及免疫有关。Hou 等^[15]的实验中用实时定量的反向 PCR 技术表明 *SsDRK1* 基因在孢子丝菌的酵母相中比菌丝相中表达更高,表明 *SsDRK1* 基因可能与孢子丝菌的双向转换机制有关。Nishizawa 等^[16]发现在申克孢子丝菌的双相转换中 *Pho85* 细胞周期素依赖激酶的表达被抑制。通过定量反向 PCR 检测到在酵母相向菌丝相转换中 *PhoSs* 基因的表达下降了 30 倍,表明 *PhoSs* 可能参与申克孢子丝菌双向转换的调控。

5 其他 PCR 相关技术

其他 PCR 相关技术,例如交错式热不对称 PCR(TAIL-PCR)、随机扩增多态性 DNA(PAPD)等常用于孢子丝菌的流行病学及转基因等。Zhang 等^[17]将玉米转基因系统用于申克孢子丝菌的插入诱变研究中,并运用 TAIL-PCR 克隆 T-DNA (Transferred DNA 转化 DNA),为未来医学上重要真菌的正向和反向遗传学研究提供了重要的突变体。Reis 等^[18]运用 PAPD 技术及 DNA 指纹分析技术分析了里约热内卢 19 例从人体分离的孢子丝菌、25 例从猫分离的孢子丝菌和 2 例其他来源的孢子丝菌,实验表明里约热内卢的动物和人孢子丝菌病有共同的传染源,同时猫在孢子丝菌病的播散中起重要作用。

PCR 及其相关技术具有快速、简单、敏感、特异性高等优点,不仅能用于快速诊断孢子丝菌病,还能用于孢子丝菌的分类、药物选择、孢子丝菌病的流行病学研究等方面,具有较大发展空间,是今后孢子丝菌病诊断及孢子丝菌研究的发展方向。对于孢子丝菌病的诊断,尤其对于临床表现不典型及系统性播散型孢子丝菌病的诊断具有更重大的意义,可以明显降低孢子丝菌病的误诊率。而且这些技术能帮助研究孢子丝菌的双向转化机制,对其致病性有更好的了解,能从病因上研究孢子丝菌病。但这些技术由于对操作人员技术及实验室条件要求高,目前仅用于实验室诊断孢子丝菌病,暂未能在临床上大量推广。随着分子生物学技术的不断发展,相信在不久的将来会成为孢子丝菌病临床快速、准确诊断的手段。目前发现与孢子丝菌双向转化相关的基因不多,对其双向转化机制尚不能完全明确,这需要科学工作者作出更大的努力。相信随着新技术的不断开发和研究的进展,最终会明确孢子丝菌双向转化的机制。

参考文献

- [1] Valle-Aviles L, Valentin-Berrios S, Gonzalez-Mendez RR, et al. Functional, genetic and bioinformatic characterization of a calcium/calmodulin kinase gene in *Sporothrix schenckii*[J]. BMC Microbiol, 2007, 29(7):107.
- [2] Chua SS, Momany M, Mendoza L, et al. Identification of three chitin synthase genes in the dimorphic fungal pathogen *Sporothrix schenckii* [J]. Curr Microbiol, 1994, 29(3):151-156.
- [3] 朱建国, 华永川, 徐晶. 申克孢子丝菌引起皮下感染[J]. 临床检验杂志, 1998, 16(5):304.
- [4] Liu X, Zhang Z, Hou B, et al. Rapid identification of *Sporothrix schenckii* in biopsy tissue by PCR[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2012, 20:12030.
- [5] Marimon R, Cano J, Gené J, et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(10): 3198-3206
- [6] Oliveira DC, Lopes PG, Spader TB, et al. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil[J]. J Clin Microbiol, 2011, 48(8):3047-3049.
- [7] Valle-Aviles L, Valentin-Berrios S, Gonzalez-Mendez RR, et al. Functional, genetic and bioinformatic characterization of a calcium/calmodulin kinase gene in *Sporothrix schenckii*[J]. BMC Microbiol. 2007, 29(7):107-117.
- [8] Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, et al. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene[J]. Mycoses, 2001, 44(7-8):261-265.
- [9] 王连明, 辛晓敏. 应用巢式 PCR 检测实验小鼠组织中申克孢子丝菌[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(7):872-874.
- [10] Mendoza M, Brito A, Schaper DA, et al. Technical evaluation of nested PCR for the diagnosis of experimental sporotrichosis [J]. Rev Iberoam Micol, 2012, 29(3):120-125.
- [11] Xu TH, Lin JP, Gao XH, et al. Identification of *Sporothrix schenckii* of various mtDNA types by nested PCR assay [J]. Med Mycol, 2010, 48(1):161-165.
- [12] Galhardo MC, De Oliveira RM, Valle AC, et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil [J]. Med Mycol, 2008, 46(2):141-151.
- [13] Kawasaki M, Anzawa K, Mochizuki T, et al. New strain typing method with *Sporothrix schenckii* using mitochondrial DNA and polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique [J]. J Dermatol, 2012, 39(4):362-365.
- [14] Robledo-Ortiz CI, Flores-Carreón A, Hernández-Cervantes A, et al. Isolation and functional characterization of *Sporothrix schenckii* ROT2, the encoding gene for the endoplasmic reticulum glucosidase II [J]. Fungal Biol, 2012, 116(8):910-918.
- [15] Hou B, Zhang Z, Zheng F, et al. Molecular cloning, characterization and differential expression of DRK1 in *Sporothrix schenckii* [J]. Int J Mol Med, 2013, 31(1):99-104.
- [16] Nishizawa M, Suzuki K, Fujino M, et al. The Pho85 kinase, a member of the yeast cyclin-dependent kinase (Cdk) family, has a regulation mechanism different from Cdk5 functioning throughout the cell cycle [J]. Genes Cells, 1999, 4(11):627-642.
- [17] Zhang Y, Li G, He D, et al. Efficient insertional mutagenesis system for the dimorphic pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. J Microbiol Methods, 2011, 84(3):418-422.
- [18] Reis RS, Almeida-Paes R, Muniz Mde M, et al. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009, 104(5):769-774.

(收稿日期:2012-12-26)

糖原磷酸化酶同工酶 BB 的临床应用

杨云净 综述, 罗 艳 审校 (重庆医科大学附属第一医院检验科 400016)

【关键词】糖原磷酸化酶同工酶 BB; 急性冠状动脉综合征; 子痫前期; 早期诊断

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.10.048 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)10-1290-03

糖原磷酸化酶同工酶 BB(GPBB)是一种心肌细胞中含量较高的酶,该酶对心肌缺血缺氧敏感,在心肌损伤早期(小于4 h)即可释放入血,是急性心肌损伤早期诊断的一项很好的指标。随着生物化学、免疫、分子生物学及其检测技术的发展,发现 GPBB 对缺血性心肌损伤的早期诊断、产科、儿科学等方面的研究颇具价值。

1 GPBB 的组织分布及释放机制

GP 是一种由相同亚基组成的二聚体,在人体组织中存在 3 种同工酶:GPBB(心肌、脑型)、GPLL(肝型)、GPMM(肌型)^[1]。尽管心脏组织都能产生同工酶 BB 和 MM,但同工酶

BB 的含量占绝对优势。GPBB 在脑组织中的含量与心肌组织相当,GPMM 主要存在于骨骼肌中,GPLL 主要存在于肝脏组织中,少量存在于心脏、骨骼肌、脑以外的其他组织。有证据证明,GPBB 并不局限于心、脑组织,已经发现白细胞、血小板、脾脏、肾脏、膀胱、睾丸、消化道及主动脉中均含有 GPBB,但其含量极低,在这些组织中,GPLL 是主要的同工酶。

GP 是一种糖原分解反应的关键酶,它在糖原分解反应的第一步中利用无机磷酸盐将糖原转化为 1-磷酸葡萄糖(G-1-P)。在心肌细胞中,GPBB 与糖原和肌浆网紧密结合形成大分子复合物-肌浆网糖原复合物。心肌的代谢状态决定了 GPBB