

• 综 述 •

# 艰难梭菌感染分子诊断研究现状及进展

张美兰 综述, 夏 云<sup>△</sup> 审校

(重庆医科大学附属第一医院检验科 400016)

**关键词:**艰难梭菌; 核酸扩增; 聚合酶链反应; 环介导恒温扩增; 依赖解旋酶的恒温扩增**DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.17.053 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)17-2533-05**

艰难梭菌是一种革兰阳性厌氧芽孢杆菌,在自然环境、动物以及人体肠道中广泛存在,是人体肠道的正常菌群。1935年在新生儿肠道发现,1978年确定与伪膜性肠炎有关,但直到2003年在北美引起大流行,艰难梭菌感染(CDI)才开始引起医务人员的重视。现已确定,艰难梭菌是医院感染性腹泻的主要病原菌,25%~33%的抗菌药物相关性腹泻、90%的伪膜性肠炎与之有关。CDI的疾病谱非常广泛,包括无症状携带者、自限性腹泻到中度腹泻、伪膜性肠炎,甚至是危及生命的暴发性肠炎。近年来,由于广谱抗菌药物的大量使用,放、化疗和质子泵抑制剂的使用,以及鼻胃管、灌肠等侵入性操作,艰难梭菌的感染率不断上升,尤其是自2003年北美发现高毒力菌株核糖体027型以来,因其具有更高的毒素量、更强的耐药性及传染性,感染者疾病的严重程度上升,治疗难度增加,治疗费用提高,给患者和医务人员造成了极大的挑战。快速、准确诊断CDI,不但可以使患者获益,还能防止其在人群中引起暴发流行。早期的诊断主要靠细胞培养毒素中和实验和产毒菌株培养,但这两种方法耗时长、技术要求高,现多用于新方法的评估;直接针对细菌毒素 tcdA 和/或 tcdB 的酶联免疫法(EIAs)因简单、快捷曾一度受到大多数实验室的青睐,但后来发现因毒素分解、表位改变等导致其敏感性不够;于是,针对细菌毒素基因 tcdA、tcdB 以及二元毒素基因 cdt、毒素调节基因 tcdC,敏感性高、特异性好、省时又省力的核酸扩增方法开始引起重视。近年来美国食品药品监督管理局(FDA)批准的核酸扩增方法就有10余种,很多实验室也建立了自己的实验方法。本文就近年来艰难梭菌的核酸扩增方法进行了详细阐述。

## 1 核酸扩增方法

早期的核酸扩增采用普通聚合酶链反应(PCR),其扩增产物需通过电泳来确定,但仍显示出极大的优越性。近年来,基于实时PCR(包括多重实时PCR)、环介导恒温扩增(LAMP)以及依赖解旋酶的恒温扩增(HDA)方法均有较多研究,下面就各种方法的实施方案及优缺点进行阐述。

### 1.1 PCR方法

**1.1.1 BD GeneOhm 检测** 2009年FDA通过了此方法。它是FDA通过的第一个直接从粪便中检测艰难梭菌毒素基因的方法。它采用分子信标探针,检测B毒素基因 tcdB。操作过程如下:将大便标本高速涡旋后用无菌拭子挑取标本至样本缓冲液,涡旋1 min后取10 μL至裂解管,再加入40 μL缓冲液,涡旋5 min后离心,95℃温育5 min后迅速放入冰中。取3 μL上述裂解的标本再加25 μL PCR预混液在SmartCycler上进行扩增和检测。有研究显示,BD GeneOhm的约登指数高于GeneXpert和ProGastro<sup>[1]</sup>。Nolte等<sup>[2]</sup>的研究显示和simplexa比较,BD的无效率要低,从而避免复查,降低成本。BD

GeneOhmassay的缺点:(1)需手工提取DNA,此过程约需45 min<sup>[2]</sup>。(2)它只给出结果(阳性、阴性或者无效),但如果要看扩增曲线需向厂家申请,并且其结果解释里没有对扩增曲线进行说明。

**1.1.2 BD Max 检测** BD Max与BD GeneOhm针对的是同一段 tcdB 基因序列。操作方法如下:用标准接种环挑取10 μL的粪便至样品缓冲管,涡旋60 s后将样品缓冲管和试剂加入BD MAX System(美国Becton Dickinson公司)中,开始自动提取DNA(约需60 min)及扩增。由于其扩增在微流控室,因此温度变化速度极快,热循环时间短,完成45个循环的扩增只需要30 min,整个过程约100 min。相对于BD GeneOhm,BD Max的最大优点在于其可以自动提取DNA,因此大大缩短了手工操作时间。Le Guern等<sup>[3]</sup>的研究表明,对同一批阳性标本,BD Max的循环阈值(CT)要低于BD GeneOhm,说明BD Max的敏感性更高。Shin等<sup>[4]</sup>的研究发现,在4种分子诊断方法的比较中,BD Max单独阳性的最多,提示BD Max的假阳性率可能高于其他方法。Leitner等<sup>[5]</sup>的研究发现,有4份阳性标本的CT值大于31,其扩增曲线均呈线性而非指数扩增,培养发现有一份标本为假阳性,有两份标本的培养时间均超过72 h。因此,Leitner等<sup>[5]</sup>建议线性扩增标本应报告为弱阳性。同BD GeneOhm一样,BD Max也需要向公司申请才可以看扩增曲线。

**1.1.3 Cepheid GeneXpert C. difficile PCR 检测** GeneXpert C. difficile检测是FDA批准的第一个全自动检测艰难梭菌毒素基因的分子诊断方法,它检测的也是 tcdB 基因。操作方法如下:用无菌棉拭子挑取大便标本至含有表面活性剂和异硫氰酸胍的瓶子中,折断棉拭子,盖好瓶子后涡旋10 s,将瓶子中的溶液全部转移至检测室,然后在GeneXpert Dx System上完成基因的自动提取、扩增和检测。整个过程只有2 min的标本准备需要人工操作。可以通过检查扩增曲线来对有疑问的标本进行分析。新一代的Xpert C. difficile/Epi PCR assay应用多重PCR技术,可以同时检测二元毒素基因 cdt 以及负向调节基因 tcdC 第117位碱基的缺失,从而预测高毒力菌株BI/NAP1/027(限制性内切酶分型BI/脉冲场凝胶电泳分型NAP1/核酸分型027)。Gilbreath等<sup>[6]</sup>在比较了Verigene、Simplexa、BD MAX和GeneXpert检测后发现GeneXpert检测在4种方法中敏感性最高,且需要重新检测的概率只有0.5%。Shin等<sup>[4]</sup>和Yoo等<sup>[7]</sup>的研究也证实了这一点。Chang等<sup>[8]</sup>的研究显示Xpert C. difficile/Epi PCR检测对不同基因型(即核糖体027型和核糖体027型)的样本检测时,其表现没有显著差异。GeneXpert检测因可自动提取DNA,因此操作简单,整个过程不到1 h,但其费用相对其他分子检测方法较高。

<sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:xiayun12cn@aliyun.com。

**1.1.4 ProGastro™ Cd PCR 检测** ProGastro 检测采用 Taqman 探针法检测 tcdB。操作方法如下:将大便标本与 S. T. A. R. (Stool Transfer and Recovery Buffer) 缓冲液以 1:5 比例稀释后高速离心 1 min, 取 20  $\mu$ L 上清液, 采用 NucliSENS easyMAG 提取 DNA, 将 5  $\mu$ L 洗脱的模板加入 20  $\mu$ L 预混液中进行扩增。根据说明书, CT 值 45 以下均为阳性, Kirk M. Doing 等的研究中对此一结果解释进行了修正: CT 值在 37~45 之间的定义为“不确定”, 需重新检测<sup>[9]</sup>。ProGastro 检测可利用 easyMAG 自动提取 DNA, 但其整个过程约需要 3h, 是所有分子诊断方法中最长的。在 Doing 等<sup>[9]</sup>的研究中, 其无效率为 2.7%, 但是当按照说明书的解释进行统计时, 无效率仅 0.9%。Selvaraju 等<sup>[10]</sup>的研究发现, 与 BD GeneOhm 相比, ProGastro 检测的灵敏度和阴性预测值更高(分别为 89.6% 比 100%、96.7% 比 100%), 但 BD GeneOhm 的特异性和阳性预测值高于 ProGastro 检测(分别为 96.7% 比 93.4%、89.6% 比 82.8%), 他们考虑其高灵敏度可能与 ProGastro 采用的是纯 DNA 模板有关。

**1.1.5 Focus Technologies Simplexa** Simplexa 检测的也是 tcdB。它使用的仪器是 3M integrated cycler, 采用双功能荧光探针。其操作如下:用棉拭子挑取大便标本后浸入 TE 缓冲液(需自己配置), 在 97  $^{\circ}$ C 加热 10 min, 然后取 2  $\mu$ L 上清液作为模板加入 PCR 预混液进行 PCR 扩增。结果为阳性(CT < 40, 内对照有效或无效)、阴性(CT = 0 或者 CT  $\geq$  40 且内对照阳性)、无效(CT = 0 且内对照无效)。Simplexa 检测不需要进行 DNA 的提取, 整个过程约需要 60 min。研究发现在四种 NAAT 方法中, Simplexa 是唯一不需要重复检测的, 这无疑降低了成本。但同时也发现其敏感性只有 87%, 低于其他报道<sup>[6]</sup>。Nolte 等<sup>[2]</sup>的研究发现在和 BD GeneOhm 的比较中, 两者的表现相差不大。Simplexa 检测的优势在于操作简单, 耗时短(不到 60 min), 并且高通量(一次最多可检测 96 份标本), 这对于标本量大的实验室可以节约很多时间; 另外, Simplexa 检测还可以看扩增曲线, 便于对结果不满意的标本进行分析<sup>[2]</sup>。

**1.1.6 Nanosphere Verigene 检测** 不同于以上方法, Verigene C. d 检测采用的是多重 PCR, 它将终点 PCR 扩增与基于纳米颗粒的微阵列杂交技术结合, 可以同时检测 tcdA、tcdB、cdt 以及负向调节基因 tcdC 第 117 位碱基的缺失。操作方法如下:将棉拭子插入大便标本挑取标本后浸入标本缓冲液中, 涡旋 15 s 后离心 30 s, 吸取 100  $\mu$ L 上清液在 Verigene System (Nanosphere) 上进行检测。Verigene System 包括 Verigene Processor SPs(提取、纯化、扩增、杂交)和 Verigene Reader(读取结果)。扩增完成后, 将基因芯片插入 Verigene Reader 中进行光学检测, 读取结果。整个过程约需要 150 min。其结果报告会显示每种基因的结果。Gilbreath 等<sup>[6]</sup>的研究中发现了 1 株 tcdA+tcdB? 并且 tcdC 野生型的菌株, 虽然细菌培养未能成功分离出菌株, 但仍然提示检测多个基因的必要性。Verigene 检测一次只能检测 1 个标本, 故不能高通量操作。

**1.1.7 IMDx C. difficile for Abbott m2000 检测** IMDx 检测可以同时检测 tcdA、tcdB 以及 tcdB 变异基因 tcdBv。操作过程如下:在样品管中加入 2.5 mL TE 液, 用棉拭子挑取大便标本至样品管, 涡旋后取 100  $\mu$ L, 加入 400  $\mu$ L 蛋白酶 K 和 200  $\mu$ L 质控品, 再加入反应预混液和 15  $\mu$ L 溶菌酶, 放到 96 孔板后盖好盖子, 放入 m2000sp 进行扩增和检测。整个过程约需要 180 min。文献<sup>[4,7]</sup>的报道显示其敏感性较低(分别为 62.0%、84.3%), 但在半定量培养中发现, 去除少量生长(菌落

数小于 10)的标本后, 其敏感性大大提高<sup>[4,7]</sup>。Yoo 等<sup>[7]</sup>还发现在 5 份 tcdA<sup>-</sup>tcdB<sup>-</sup>的标本中, IMDx 出现了 4 份假阳性, 并且 tcdA 的 CT 值明显高于 tcdB。因此 IMDx 的表现还有待提高。

**1.2 LAMP 技术 Meridian Illumigene 检测** Illumigene 检测是基于 LAMP 方法, 检测的是艰难梭菌毒素 A 的编码基因 tcdA5'端的保守区域, 其理论基础是:(1)相对于 tcdB, tcdA 更加保守;(2)tcdA 一般在 3'端比较多变, 但在 5'端保守, Meridian Illumigene 检测的 tcdA 序列在缺乏 tcdA 的菌株(如核糖体 017 型)中仍然存在, 故其有能力检测出 tcdA<sup>-</sup>tcdB<sup>+</sup>的菌株。操作方法如下:用试剂盒中的取样刷挑取大便标本, 经稀释、滤过后取 5~10 滴至提取管中, 95  $^{\circ}$ C 温育 10 min。取 50  $\mu$ L 上述标本提取液加入反应缓冲液中涡旋后转移至反应仓(含标本仓和质控仓, 均含有扩增试剂), 在 Illumipro-10 incubator 上进行扩增。扩增副产物焦磷酸镁会使反应液浊度增加, 根据这一原理, 由 Illumipro-10 reader 对反应液进行读取, 其报告形式为阳性、阴性、无效。遗憾的是只能看到结果, 却无法回顾浊度值, 从而无法分析无效标本原因<sup>[9]</sup>。Illumigene 还可通过显色试剂实现肉眼判读结果。但是 Bo-Moon Shin 的研究表明其敏感性要低于其他实验<sup>[4]</sup>, Gyorko 等<sup>[11]</sup>认为可能与标本准备过程中的稀释有关, 而非基因多态性等导致 DNA 未扩增。有研究显示其敏感性高达 98%<sup>[12]</sup>, 因此其敏感性还有待更多的研究来确定。另外, 有研究显示在欧洲有约 3.3% 的菌株为 tcdA<sup>-</sup>, 而在亚洲地区, tcdA<sup>-</sup>的菌株比例更高<sup>[13]</sup>。Hong 等<sup>[14]</sup>的研究显示在检测 ATCC 9688 (tcdA<sup>+</sup>tcdB<sup>+</sup>cdtB<sup>-</sup>)时, 其敏感性和产毒菌株培养相当, 但在检测 ATCC 43598 (tcdA<sup>-</sup>tcdB<sup>+</sup>cdtB<sup>-</sup>)时, 其敏感性下降。可见对于不同菌株, Illumigene 的表现有差异, 实验室需根据当地菌株流行情况进行选择。该方法不需要昂贵的 PCR 扩增仪, 操作简单, 整个过程只需要不到 60 min。并且它在每一个反应中均加入了内对照, 因此只有在试剂换批次的时候才需要做外对照, 允许一天中多次检测但只需要做一次质控<sup>[9]</sup>。

### 1.3 依赖解螺旋酶的恒温扩增(HDA)

**1.3.1 Great Basin Portrait Analyzer Portrait 检测** 结合了 blocked primer HDA (bpHDA) 技术与芯片技术, 检测 tcdB。操作方法如下:用无菌棉拭子挑取大便标本至预先盛有提取液的滤器中, 涡旋 30 s 过滤, 取 180  $\mu$ L 滤液加入检测盒的样品孔, 将检测盒放到 Portrait Dx Analyzer 上进行扩增和检测。Buchan 等<sup>[15]</sup>的研究显示与产毒菌株培养相比, 其敏感性和特异性分别为 98.2% 和 92.8%。Denys 等<sup>[16]</sup>的研究显示其最低检测限为 10 CFU。有研究表明其无效率低于 BD GeneOhm 和 Illumigene 检测<sup>[17]</sup>。

**1.3.2 Quidel AmpliVue C. difficile 检测** AmpliVue 采用解螺旋酶扩增法结合恒温扩增技术扩增 tcdA5'端的保守区域, 然后采用自带的层析试纸条检测结果。操作方法如下:用无菌棉拭子挑取大便标本至装有稀释液的管中, 取 50  $\mu$ L 大便稀释液, 加入裂解液, 95  $^{\circ}$ C 加热 10 min, 取 50  $\mu$ L 上述裂解的大便标本至反应管中, 将反应管置于 64  $^{\circ}$ C 温育 60 min 后插入检测盒中(公司自带), 10 min 后肉眼判读结果。结果报告为阳性(检测线为红色, 质控线为红色或无)、阴性(只有质控线为红色)、无效(质控线及检测线均未见到红色)。手提式、便于携带是 AmpliVue 的最大优势。有研究发现其表现同 Illumigene 检测没有明显差异, 但 AmpliVue 无效率要低于 Illumigene 检测<sup>[18]</sup>。和 Illumigene 检测一样, AmpliVue 检测也不需要特殊

的仪器和人员培训,并且不用批量操作,因此可以随时检测,特别适用于标本量不大的实验室。基于 PCR 的核酸扩增法 BD GeneOhm、BD MAX、ProGastro、Xpert 检测已经得到了广泛、充分的评估,基于 LAMP 及 HDA 的方法因无需昂贵的 PCR 仪器、操作简单也日益受到重视。

## 2 核酸扩增诊断存在的问题

**2.1 临床解释** 目前影响 NAATs 应用的最大争议及障碍在于如何对检测结果给出合理的临床解释。艰难梭菌为人体肠道的正常菌群,健康人的携带率为 0%~15%,而在住院患者中则达到 16%~35%<sup>[19]</sup>。毒素基因阳性患者可能为定植、不表达或少量表达、大量表达。准确区分这几种情况对临床决策非常重要。在一项有 12 000 份标本的研究中,研究者比较了细胞培养毒素中和实验和产毒菌株培养实验后发现,毒素与临床诊断的符合度更好<sup>[20]</sup>。Humphries 在比较了 EIAs 及 NAATs 后也发现,CDI 的严重程度与酶联免疫法即毒素的相关性更好<sup>[21]</sup>。因此,NAATs 的特异性受到了质疑。为了提高 NAATs 的特异性,必须严格控制标本送检要求(患者须有临床症状、危险因素等)。因此,应该加强对临床医生及护士的宣教工作。然而,在一项对 1 051 例病例进行的研究发现 PCR 方法与 CDI 临床诊断符合度好。他们采用包括主治医师、消化科医生、微生物专家、院感护士的多学科团队来评估患者临床表现(布里斯托大便分级、大便次数、腹痛、腹胀、肠梗阻、发热、低血压等)、是否使用泻药、危险因素(是否使用抗菌药物、质子泵抑制剂、住院时间、手术史、是否患炎症性肠病、是否合并其他基础疾病)、实验室检查结果(C 反应蛋白、白细胞计数、血清清蛋白、血清肌酐等)、影像学 and 内镜检查结果来得出是否为 CDI 的临床诊断,以临床诊断为金标准,发现 PCR 方法比细胞培养毒素中和实验敏感性更好(99.1%比 51%),同时 PCR 的阳性预测值达到 91.9%,因此认为 PCR 的结果是可信的<sup>[22]</sup>。Hong 等<sup>[14]</sup>的研究也发现,单独使用 Illumigene 和 Illumigene 联合 VIDAS 检测艰难梭菌毒素比较,后者并未提高特异性。此外,有学者认为为了避免院内交叉感染,即使是携带者也应该隔离<sup>[23]</sup>。因此,他们推荐 NAATs 作为一线诊断方法。

**2.2 价格较贵** 有研究发现,细胞培养毒素中和实验花费为 13 美元/标本,产毒菌株培养为每个标本 22 美元,但 NAATs 中最便宜的 ProGastro Cd 每个标本检测需要 25 美元,而 GeneXpert 检测每个标本则需要 45 美元<sup>[24]</sup>。有研究发现应用两步法可以节约 36%的成本<sup>[10]</sup>。因此,很多实验室更推崇两步法(GDH 初筛后用 NAATs 来确证)。但是,及时、准确的诊断可以缩短住院时间、减少传播。研究发现将实验方法从二步法或酶联免疫法改为单独用 NAATs 方法后 CDI 感染率大大下降<sup>[25]</sup>。同时,由于 NAATs 的高敏感性及较低的无效率,可以减少反复检测。这些都可以平衡 NAATs 检测费用较其他方法高的问题。

## 3 展望

**3.1 定量** 本文介绍的 FDA 批准的 NAATs 均为定性实验,有学者比较了 GeneXpert 检测(建立了标准曲线以定量)与免疫法后发现,毒素阴性的标本其菌株 DNA 水平比毒素阳性的要低  $10 \sim 10^4$  copy/mL,且大部分 PCR 与毒素检测结果不符合的菌株 DNA 水平均较低<sup>[26]</sup>。以 DNA 含量和毒素实验结果作 ROC 曲线发现,以  $4.10 \lg C. d/mL$  为截点时, $\geq 95\%$  的毒素阳性标本以及 70% 的毒素阴性标本可以被正确区分<sup>[26]</sup>。在比较了定量培养(系列稀释大便标本)和定量 PCR 的结果后也发现,PCR 阳性而培养阴性的标本菌株 DNA 含量比 PCR 阳性培养阳性的标本低,并且发现毒素阳性的标本菌株 DNA

含量高于毒素阴性的标本<sup>[27]</sup>。这些研究都提示,或许 DNA 定量可以预测菌株是否产毒,从而也可以解决 NAATs 特异性不足的问题,但合适的截点还有待于更多的实验来验证。目前国内对于艰难梭菌 qPCR 的研究均不多,应用反转录定量 PCR (RT-qPCR)检测艰难梭菌 23S rRNA 发现,RT-qPCR 比 qPCR 的敏感性要高 400 倍,并发现 RT-qPCR 与不同生长阶段的菌落计数相关性更好<sup>[28]</sup>。

**3.2 多重扩增** 艰难梭菌的主要毒素基因为 tcdA(肠毒素)和 tcdB(细胞毒素),一些高毒力菌株还含有二元毒素基因 cdt,此外,负向调节基因 tcdC 可以影响 tcdA 和 tcdB 的表达。上述 NAATs 方法中,除 IMDx、Verigene、Xpert C. difficile/Epi PCR 检测外,均为单独检测 tcdA 或 tcdB。Squire 等<sup>[29]</sup>发现,分离自乳猪的核糖体 237 型不含 tcdA,而核糖体 033 型(毒素分型 XI)缺少一部分 tcdA,它们均不能被单纯检测 tcdA 的核酸诊断方法检测出来。tcdA 及 tcdB 在 CDI 中的作用均已被认可,而同时含有二元毒素的高毒力菌株可以引起更高的病死率和复发率。Geric B 的实验表明 tcdA-tcdB-CDT+ 的菌株仍可引起 CDI<sup>[30]</sup>,但此类菌株很少被检测到,可能与现有的检测方法有关。基于上述几种毒素均在 CDIs 中发挥作用,再考虑到基因的变异,建立可以同时检测 tcdA、tcdB、CDT 以及 tcdC 的实验方法很重要,而且还可以节约成本及时间。

**3.3 联合其他生物标志物** 即便严格规范标本送检及采取定量检测,但单纯 NAATs 仍然无法避免对携带者的误诊,因此,联合其他指标对 CDI 的正确诊断尤为重要。相对病理及内镜检查,非侵袭性的炎症标志物检查更容易为患者所接受。美国医疗保健流行病学学会(SHEA)及美国感染病学会(IDSA)认为血清白细胞大于  $15\ 000/\mu L$  或肌酐增加 1.5 倍以上即为严重 CDI。王浦<sup>[31]</sup>亦认为清蛋白及肌酐浓度可以作为判断 CDI 的独立标志物。Yong 等<sup>[32]</sup>的研究则显示大便乳铁蛋白稳定性及敏感性比大便白细胞更好,因此推荐大便乳铁蛋白而非大便白细胞作为判断是否有肠道炎症的指标。此外,白细胞介素-8(IL-8)及白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )也被认为与肠道感染有关,且可作为监测病情好转的指标<sup>[33]</sup>。但白细胞介素的检测目前尚没有商品化的试剂盒。

核酸扩增敏感性高、特异性好、操作简单、耗时短,已经有学者建议将核酸扩增作为诊断 CDI 的一线选择,阴性可迅速排除 CDI,阳性患者可及时采取治疗、隔离措施,这对于暴发性感染的控制尤为重要。FDA 批准的核酸扩增方法不断增多,已经有很多商品化的试剂盒,但考虑到仪器、人力、成本、时间、操作难易度、标本量等实际情况,各实验室可结合自身情况选择相应的核酸扩增方法。

## 参考文献

- [1] Chapin KC, Dickenson RA, Wu FA, et al. Comparison of five assays for detection of clostridium difficile toxin[J]. J Mol Diagn, 2011, 13(4): 395-400.
- [2] Nolte FS, Ribeiro-Nesbitt DG. Clinical comparison of simplex universal direct and BD GeneOhm tests for detection of toxigenic clostridium difficile in stool samples[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(1): 281-282.
- [3] Le Guern R, Herwegh S, Grandbastien BA, et al. Evaluation of a new molecular test, the BD max cdiff, for detection of toxigenic clostridium difficile in fecal samples[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(9): 3089-3090.

- [4] Shin BM, Yoo SM, Shin WC. Evaluation of Xpert C. difficile, BD MAX Cdiff, IMDx C. difficile for Abbott m2000, and Illumigene C. difficile assays for direct detection of toxigenic clostridium difficile in stool specimens[J]. *Ann Lab Med*, 2016, 36(2): 131-137.
- [5] Leitner E, Michaela E, Grisold AJ, et al. Evaluation of the BD MAX Cdiff assay for the detection of the toxin B gene of Clostridium difficile out of faecal specimens[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 76(3): 390-391.
- [6] Gilbreath JJ, Verma P, Abbott AN, et al. Comparison of the Verigene Clostridium difficile, Simplexa C. difficile Universal Direct, BD MAX Cdiff, and Xpert C. difficile assays for the detection of toxigenic C. difficile[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 80(1): 13-18.
- [7] Yoo J, Lee H, Park KG, et al. Evaluation of 3 automated real-time PCR (Xpert C. difficile assay, BD MAX Cdiff, and IMDx C. difficile for Abbott m2000 assay) for detecting Clostridium difficile toxin gene compared to toxigenic culture in stool specimens[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2015, 83(1): 7-10.
- [8] Chiang D, Ng S, La MV, et al. Performance assessment of the BD MAX Cdiff assay in comparison to Xpert C. difficile assay in a setting with very low prevalence of toxigenic Clostridium difficile PCR ribotype 027[J]. *Anaerobe*, 2014, 30(12): 156-158.
- [9] Doing KM, Hintz MS. Prospective evaluation of the Meridian Illumigene? loop-mediated amplification assay and the Gen Probe ProGastro? Cd polymerase chain reaction assay for the direct detection of toxigenic Clostridium difficile from fecal samples[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012, 72(1): 8-13.
- [10] Selvaraju SB, Gripka M, Estes K, et al. Detection of toxigenic Clostridium difficile in pediatric stool samples: an evaluation of Quik Check Complete Antigen assay, BD GeneOhm Cdiff PCR, and Pro Gastro Cd PCR assays[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 71(3): 224-229.
- [11] Gyorke CE, Wang S, Leslie JL, et al. Evaluation of Clostridium difficile fecal load and limit of detection during a prospective comparison of two molecular tests, the illumigene C. difficile and Xpert C. difficile/Epi tests[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(1): 278-280.
- [12] Norén T, Alriksson I, Andersson J, et al. Rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification test for Clostridium difficile detection challenges cytotoxin B cell test and culture as gold standard[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(2): 710-711.
- [12] Noren T, Alriksson I, Andersson JA, et al. Rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification test for Clostridium difficile detection challenges cytotoxin B cell test and culture as gold standard[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(2): 710-711.
- [13] Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, et al. Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey[J]. *Lancet*, 2011, 377(9759): 63-73.
- [14] Hong G, Park KS, Ki CS, et al. Evaluation of the illumigene C. difficile assay for toxigenic Clostridium difficile detection: a prospective study of 302 consecutive clinical fecal samples[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 80(3): 177-180.
- [15] Buchan BW, Mackey T, Daly JA, et al. Multicenter clinical evaluation of the portrait toxigenic C. difficile assay for detection of toxigenic clostridium difficile strains in clinical stool specimens[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(12): 3932-3936.
- [16] Denys GA. Portrait toxigenic clostridium difficile assay, an isothermal amplification assay detects toxigenic C. difficile in clinical stool specimens[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2014, 14(1): 17-26.
- [17] Novak-Weekley SM, Marlowe EM, Miller JM, et al. Clostridium difficile testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(3): 889-893.
- [18] Neuendorf M, Guadarrama-Gonzalez R, Lamik B, et al. A prospective study of two isothermal amplification assays compared with realtime PCR, CCNA and toxigenic culture for the diagnosis of Clostridium difficile infection[J]. *BMC Microbiol*, 2016, 16(1): 19-23.
- [19] Aslam S, Hamill RJ, Musher DM. Treatment of clostridium difficile-associated disease: old therapies and new strategies[J]. *Lancet Infect Dis*, 2005, 5(9): 549-557.
- [20] Planche TD, Davies KA, Coen PG, et al. Differences in outcome according to Clostridium difficile testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of C difficile infection[J]. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13(11): 936-945.
- [21] Humphries RM, Uslan DZ, Rubin Z. Performance of clostridium difficile toxin enzyme immunoassay and nucleic acid amplification tests stratified by patient disease severity[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(3): 869-873.
- [22] Berry N, Sewell B, Jafri S, et al. Real-time polymerase chain reaction correlates well with clinical diagnosis of Clostridium difficile infection[J]. *J Hosp Infect*, 2014, 87(2): 109-114.
- [23] Ananthakrishnan AN. Clostridium difficile infection: epidemiology, risk factors and management[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8(1): 17-26.
- [24] Stamper PD, Babiker W, Alcabasa R, et al. Evaluation of a new commercial TaqMan PCR assay for direct detection of the clostridium difficile toxin B gene in clinical stool specimens[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(12): 3846-3850.
- [25] Catanzaro M, Cirone J. Real-time polymerase chain reaction testing for Clostridium difficile reduces isolation time and improves patient management in a small community hospital[J]. *Am J Infect Control*, 2012, 40(7): 663-666.
- [26] Leslie JL, Cohen SH, Solnick JV, et al. Role of fecal Clostridium difficile load in discrepancies between toxin tests and PCR: is quantitation the next step in C-difficile testing? [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(12):

3295-3299.

[27] Naaber P, Stsepelova J, Smidt I, et al. Quantification of clostridium difficile in Antibiotic-Associated-Diarrhea patients[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(10): 3656-3658.

[28] Matsuda K, Tsuji H, Asahara TA, et al. Sensitive quantification of clostridium difficile cells by reverse Transcription-Quantitative PCR targeting rRNA molecules[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(15): 5111-5118.

[29] Squire MM, Carter GP, Mackin KE, et al. Novel molecular type of clostridium difficile in neonatal Pigs, Western Australia[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(5): 790-792.

[30] Geric B, Carman RJ, Rupnik M, et al. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative Clostridium difficile strains are enterotoxic but do not cause disease in ham-

sters[J]. J Infect Dis, 2006, 193(8): 1143-1140.

[31] 王浦. 华南地区艰难梭菌流行病学研究与新型分子生物学检测技术评估[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.

[32] Yong WH, Mattia AR, Ferraro MJ. Comparison of fecal lactoferrin latex agglutination assay and methylene blue microscopy for detection of fecal leukocytes in clostridium difficile-associated disease[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(5): 1360-1361.

[33] Enocksson A, Lundberg J, Weitzberg E, et al. Rectal nitric oxide gas and stool cytokine levels during the course of infectious gastroenteritis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11(2): 250-254.

(收稿日期: 2016-03-29 修回日期: 2016-05-04)

• 综 述 •

## 长链非编码 RNA 在肝癌中作用机制的研究进展

任 利 综述, 高 建<sup>△</sup> 审校

(重庆医科大学附属第二医院消化内科 400010)

关键词: 肝癌; 长链; 非编码 RNA

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.17.054 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)17-2537-03

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其病死率在恶性肿瘤中居第 2 位, 严重威胁了人们的健康及生命<sup>[1]</sup>。目前, 外科手术切除、肝移植为早期肝癌的有效治疗方式。近几年, 随着手术治疗和药物治疗的发展, 肝癌患者的 5 年生存率有所增加。但是因为进展期肝癌缺乏有效的治疗干预手段, 而且容易在早期发生血行转移, 临床上前来就诊的肝癌患者多数已存在微转移灶。肝癌发生、发展中的许多复杂分子机制仍不清楚。临床上迫切需要有效的分子生物学标志物用于肝癌的诊断、治疗和预后。许多研究者研究发现长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 在肝癌细胞中差异性表达, 并与肝癌的发生、发展有密切关系, lncRNA 在肝癌的发病机制和转移复发中扮演着不可或缺的角色<sup>[2-3]</sup>。lncRNA 是一类转录本长度超过 200 个核苷酸的无编码功能的 RNA 分子, 它可以在表观遗传水平、转录和转录后水平调控的基因表达。最初有研究者认为其是 RNA 聚合酶 II 转录的副产物, 不具备生物学功能, 但目前多项研究发现 lncRNA 参与各种细胞活动<sup>[7-25]</sup>, 比如细胞增殖、分化、凋亡和细胞周期, 证据显示 lncRNA 在肿瘤的生物学上饰演着重要的角色, 从而为诊断治疗肿瘤提供了一种新的方式<sup>[4-5]</sup>。目前关于 lncRNA 分子在肝癌调控机制中的研究还处于起步阶段, 目前研究与肝癌相关性较强的 lncRNA 基因有: H19、HOX 转录反义 RNA (HOX transcript antisense RNA, HOTAIR)、肺腺癌转移相关转录子 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)、肝癌高表达基因 (highly up-regulated in liver cancer, HULC) 和母系印记基因 3 (maternal expressed gene 3, MEG3) 等<sup>[6]</sup>。lncRNA 基因的认识及其在肿瘤发生发展过程中的分子机制, 对肝癌的诊断、预防和治疗起着重要作用。

### 1 lncRNA 在肝癌中发挥原癌基因作用

#### 1.1 结肠癌相关转录因子 1 (colon cancer associated tran-

script-1, CCAT1) Deng 等<sup>[7]</sup>在 66 对肝癌组织和正常组织中使用体外细胞增殖和迁移试验的方法, 通过实时聚合酶链反应来检测 CCAT1 的表达水平, 评估 CCAT1 对肝癌细胞增殖和迁移的影响, 研究发现 CCAT1 在肝癌组织中表达上调, 且上调水平和肿瘤大小、血管侵犯及血清甲胎蛋白水平相关, 研究显示 CCAT1 的高水平表达可能与肝癌患者的预后相关, 进一步研究证实 CCAT1 的表达增强可促进肝癌细胞的增殖和转移, 而抑制 CCAT1 的表达同时也抑制了肝癌细胞的增殖和转移, 故 CCAT1 在肝癌中可能发挥了原癌基因的作用。

1.2 INK4 位点反义非编码 RNA (antisense non-coding RNA in the INK4 locus, ANRIL) ANRIL 在肝癌中表达上调, 高表达的 ANRIL 与肝脏的肿瘤直径和巴塞罗那分期 (Barcelona Clinic Liver Cancer, BCLC) 有关。Huang 等<sup>[8]</sup>在肝癌细胞中发现抑制 ANRIL 的表达可能影响细胞在体内体外的增殖、迁移以及诱导细胞的凋亡。通过进行生物信息学分析, 发现转录因子 KLF2 在肝癌细胞中表达下调, 而降低肝癌细胞中 ANRIL 的表达可以上调 KLF2 的信使核苷酸和蛋白水平, 过表达的 KLF2 抑制肝癌细胞的增殖和促进肝癌细胞的凋亡, ANRIL 可以通过表观遗传沉默 KLF2 在体内外调节细胞生长。进一步研究发现 ANRIL 启动子区域有 13 个 SP1 的结合位点, 提示 SP1 可能在肝癌细胞中调控 ANRIL 的转录, 染色质免疫沉淀反应 (芯片) 的测定表明 SP1 可以直接结合 ANRIL 的启动子区域从而沉默 ANRIL 的转录。此外, 过表达的 SP1 可以上调 ANRIL 的表达水平, 而降低 SP1 可降低 ANRIL 在肝癌细胞中的表达, ANRIL 的下降可诱导细胞凋亡, 影响肝癌细胞的迁移和侵袭能力, 研究表明 ANRIL 可能在肝癌的增殖和凋亡中起到重要作用。

1.3 BRAF 激活的长链非编码 RNA (BRAF-activated noncoding RNA, BANCR) BANCR 位于第 9 号染色体, 是基因编码

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: 982213482@qq.com.