

3 讨 论

胰岛素注射和血糖监测是 T2DM 患者治疗过程中不可或缺的血糖控制手段和监测方法。对于多数 T2DM 患者,早期胰岛素治疗能够得到更多的临床获益^[7-9]。有研究表明,胰岛素注射和血糖监测恐惧是糖尿病患者不愿意接受胰岛素治疗和血糖监测的主要原因^[10]。因此,减轻糖尿病患者胰岛素注射和血糖监测恐惧对提高胰岛素治疗意愿和血糖监测依从性具有重要临床意义。

新疆地区属于少数民族聚集区,有特殊的民俗文化和人口社会学特征,该地区 T2DM 人群的胰岛素注射和血糖监测恐惧可能不同。另外,国外一项研究表明,随着糖尿病病程延长,胰岛素注射及血糖监测的恐惧程度逐渐降低^[11],这也提示新诊断 T2DM 患者的胰岛素注射及血糖监测的恐惧程度可能更为严重。但是目前关于新疆地区新诊断 T2DM 患者对胰岛素注射和血糖监测恐惧现状尚不清楚,相关影响因素也尚未见报道。

本研究调查数据显示,新疆地区新诊断 T2DM 患者胰岛素注射及血糖监测恐惧的发生率为 45.4%,发生恐惧组患者胰岛素治疗意愿低于未发生恐惧组($P<0.05$),表明新疆地区新诊断 T2DM 患者胰岛素注射及血糖监测恐惧较为常见,且明显制约了患者启动胰岛素治疗,进一步提示了探讨胰岛素注射及血糖监测恐惧相关因素的重要性,为提高新诊断 T2DM 患者胰岛素治疗和血糖监测意愿和规范化行为提供参考依据。

进一步行多因素 Logistic 回归分析显示,性别、年龄、民族、糖尿病家族史、并发症、胰岛素和血糖监测认知均是新疆新诊断 T2DM 患者胰岛素注射和血糖监测恐惧的影响因素($P<0.05$)。女性和年龄 <60 岁的新诊断 T2DM 患者发生胰岛素注射及血糖监测恐惧比例分别高于男性和年龄 ≥ 60 岁患者。该结果中女性糖尿病患者更容易发生恐惧与 FU 等^[12]等研究中发现胰岛素延迟治疗的糖尿病患者中女性对胰岛素注射及血糖监测恐惧高于男性的结果类似。分析原因为个体的疼痛感受与胰岛素注射及血糖监测恐惧密切相关^[13],较男性相比,女性对疼痛可能更为敏感,更容易出现恐惧。随着年龄的增长,患者对疼痛的耐受能力可能更强,而且患者可能合并周围神经病变,疼痛敏感性下降^[14],对胰岛素注射和血糖监测带来的疼痛感觉弱于年轻患者,由此胰岛素注射和血糖监测恐惧发生风险相对低于年轻患者。与汉族患者相比,少数民族患者更容易发生胰岛素注射和血糖监测恐惧,这可能与少数民族患者健康意识薄弱和疾病认知水平差的因素有关^[15]。本研究显示,糖尿病家族史和存在并发症是新诊断 T2DM 患者发生胰岛素注射及血糖监测恐惧的保护因素($P<0.05$)。当新诊断 T2DM 患者有糖尿病家族史时,患者一方面因亲属患有糖尿病对糖尿病的疾病认知更为全面^[16],另一方面家属可能正在接受胰岛素治疗和血糖监测,患者更能明白胰岛素治疗和血糖监测对疾病治疗的意义,因

此有糖尿病家族史的新诊断 T2DM 患者胰岛素注射和血糖监测恐惧的程度相对较低。当患者并发糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、糖尿病周围神经病变等并发症时,新诊断 T2DM 患者则会认为自己的疾病更为严重,更需要接受胰岛素注射治疗和血糖监测,因此发生胰岛素注射和血糖监测恐惧的风险较无合并症的患者低。与具有正确胰岛素和血糖监测认知者相比,存在错误胰岛素和血糖监测认知的新诊断 T2DM 患者更容易发生胰岛素注射及血糖监测恐惧。分析原因为患者对胰岛素注射及血糖监测的认知常常存在片面性,部分患者甚至认为使用胰岛素会成瘾,部分曾经出现过低血糖不良反应患者则认为应用胰岛素一定会出现低血糖,部分患者认为血糖监测对疾病控制意义不大^[17],由此产生恐惧心理。

综上所述,新疆地区新诊断 T2DM 患者具有较高的胰岛素注射及血糖监测恐惧发生率。女性、年龄 <60 岁、少数民族、错误胰岛素和血糖监测认知是发生恐惧的危险因素,糖尿病家族史和存在并发症是发生恐惧的保护因素。因此,应当全面收集患者资料,对女性、年龄 <60 岁、少数民族及存在错误胰岛素和血糖监测认知的新诊断 T2DM 患者给予更多关注,针对患者具体情况,可以从加强健康教育和心理疏导等多个方面干预,避免或减轻胰岛素注射及血糖监测恐惧。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(4): 315-409.
- [2] MATHEW B K, ROZA J G D, LIU C, et al. Which aspect of patient-provider relationship affects acceptance and adherence of insulin therapy in type 2 diabetes mellitus? A qualitative study in primary care[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2022, 15: 235-246.
- [3] NGASSA PIOTIE P, WOOD P, WEBB E M, et al. Willingness of people with type 2 diabetes to start insulin therapy: evidence from the South African Tshwane Insulin Project (TIP)[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2020, 168: 108366.
- [4] 冯阳阳, 李春文. 新诊断 2 型糖尿病患者健康行为现状调查[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2020, 21(3): 389-392.
- [5] GOPALAN A, BLATCHINS M A, XU K K, et al. All in the family: a qualitative study of the early experiences of adults with younger onset type 2 diabetes[J]. J Am Board Fam Med, 2022, 35(2): 341-351.
- [6] 刘晓琴, 吴利平, 陈利平, 等. 糖尿病患者胰岛素注射和自我监测恐惧量表的汉化及其在 1 型糖尿病患儿中的信度效度检验[J]. 中国护理管理, 2022, 22(8): 1194-1198.
- [7] 中国胰岛素分泌研究组. 短期胰岛素强化治疗逆转 2 型糖尿病专家共识[J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(10): 949-959.
- [8] COETZEE A. An introduction to insulin use in type 2 diabetes mellitus[J]. S Afr Fam Pract (2004), 2023, 65(1): e1-e5.
- [9] THAMMAKOSOL K, SRIPHAPRADANG C. Effectiveness and safety of early insulin glargine administration in combination with continuous intravenous insulin infusion in the management of diabetic ketoacidosis: a randomized controlled trial[J]. Diabetes Obes Metab, 2023, 25(3): 815-822.

• 临床研究 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.20.030

舌压抗阻训练联合 NMES 在卒中后吞咽障碍患者中的应用*

陈旭辉^{1,2}, 张娟², 黄靓², 蔡华安², 唐雪琴³, 廖若夷^{4△}

1. 湖南中医药大学护理学院, 湖南长沙 410000; 2. 湖南省人民医院/湖南师范大学附属第一医院康复医学科三病区, 湖南长沙 410000; 3. 湖南省人民医院/湖南师范大学附属第一医院医务部, 湖南长沙 410000; 4. 湖南中医药大学第一附属医院护理部, 湖南长沙 410000

摘要:目的 探讨舌压抗阻训练联合神经肌肉电刺激(NMES)在卒中后吞咽障碍患者中的应用效果,并分析对功能性经口摄食量表(FOIS)评分、诱发电位、神经营养因子及并发症的影响。方法 选取 2022 年 1 月至 2023 年 3 月就诊于湖南省人民医院/湖南师范大学附属第一医院的 99 例卒中后吞咽障碍患者作为研究对象,采用随机数字表法将分为联合组、对照 A 组、对照 B 组,每组 33 例。对照 A 组采取舌压抗阻训练,对照 B 组采取 NMES,联合组采取舌压抗阻训练联合 NMES,干预时间均为 4 周。观察并比较 3 组临床疗效、干预前后洼田饮水试验评分、FOIS 评分、清蛋白(ALB)、前清蛋白(PA)、转铁蛋白(TRF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)水平及并发症情况。结果 联合组总有效率(90.91%)高于对照 A 组(66.67%)、对照 B 组(69.70%),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。重复测量方差分析结果显示,3 组洼田饮水试验、FOIS 评分均存在时间、组间、交互效应($P < 0.05$)。单因素重复测量方差分析结果显示,干预 2 周、4 周后,3 组洼田饮水试验评分均低于干预前,FOIS 评分均高于干预前,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。多变量方差分析结果显示,干预前,3 组洼田饮水试验、FOIS 评分比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);干预 2 周、4 周后,联合组洼田饮水试验评分均低于对照 A 组、对照 B 组,FOIS 评分高于对照 A 组、对照 B 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。重复测量方差分析结果显示,3 组血清 ALB、PA、TRF 水平均存在时间、组间、交互效应($P < 0.05$)。单因素重复测量方差分析结果显示,干预 2 周、4 周后,3 组血清 ALB、PA、TRF 水平均高于干预前,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。多变量方差分析结果显示,干预前,3 组血清 ALB、PA、TRF 水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。干预 2 周、4 周后,联合组血清 ALB、PA、TRF 水平高于对照 A 组、对照 B 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。重复测量方差分析结果显示,3 组血清 BDNF、NGF、IGF-1 水平均存在时间、组间、交互效应($P < 0.05$)。单因素重复测量方差分析结果显示,干预 4 周后,联合组、对照 B 组血清 BDNF、NGF、IGF-1 水平均高于干预前,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。多变量方差分析结果显示,干预前,3 组血清 BDNF、NGF、IGF-1 水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);干预 2 周、4 周后,联合组、对照 B 组血清 BDNF、NGF、IGF-1 水平高于对照 A 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。联合组并发症总发生率(6.06%)低于对照 A 组(30.30%)、对照 B 组(27.27%),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 舌压抗阻训练联合 NMES 治疗卒中后吞咽障碍患者效果可靠,可有效调控神经营养因子,促进神经功能修复,从而改善吞咽障碍,增强机体营养状态,且安全性高。

关键词:神经肌肉电刺激; 舌压; 抗阻; 反馈; 卒中; 吞咽障碍

中图法分类号:R743.33;R681.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)20-3093-07

Application of tongue pressure resistance training combined with
NMES in patients with dysphagia after stroke*

CHEN Xuhui^{1,2}, ZHANG Juan², HUANG Liang², CAI Huaan², TANG Xueqin³, LIAO Ruoyi^{4△}

1. School of Nursing, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410000, China; 2. Department of Rehabilitation Medicine, Hunan Provincial People's Hospital/the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410000, China; 3. Department of Medical Affairs, Hunan Provincial People's Hospital/the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410000, China; 4. Department of Nursing, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410000, China

Abstract: **Objective** To explore the application effect of tongue pressure resistance training combined with neuromuscular electrical stimulation (NMES) in patients with post-stroke dysphagia, and to analyze the effects on Functional Oral Intake Scale (FOIS) score, evoked potentials, neurotrophic factors and complica-

* 基金项目:湖南省长沙市 2022 年度指导性科技计划项目(kzd22045)。

作者简介:陈旭辉,女,在读硕士研究生,主要从事脑卒中吞咽障碍康复方面的研究。△ 通信作者,E-mail:1668898413@qq.com。

tions. **Methods** A total of 99 patients with post-stroke dysphagia who were treated in Hunan Provincial People's Hospital/the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University from January 2022 to March 2023 were selected as the research objects. They were divided into combined group, control group A and control group B by random number table method, with 33 cases in each group. The control group A was given tongue pressure resistance training, the control group B was given NMES, and the combined group was given tongue pressure resistance training combined with NMES. The intervention time was 4 weeks. The clinical efficacy, water swallow test, FOIS score, albumin (ALB), prealbumin (PA), transferrin (TRF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) levels and its complications before and after intervention were observed and compared among the three groups. **Results** The total effective rate of the combined group (90.91%) was higher than that of the control group A (66.67%) and the control group B (69.70%), and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Repeated measures analysis of variance showed that there were time, inter-group, and interaction effects in the WST and FOIS scores of the three groups ($P < 0.05$). The results of one-way repeated measures analysis of variance showed that after 2 and 4 weeks of intervention, the scores of Kubota drinking water test in the three groups were lower than those before intervention, and the FOIS scores were higher than those before intervention, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The results of multivariate analysis of variance showed that there were no statistically significant differences in the scores of Kubota water swallowing test and FOIS among the three groups before intervention ($P > 0.05$). After 2 and 4 weeks of intervention, the scores of Kubota drinking water test in the combined group were lower than those in the control group A and the control group B, and the FOIS scores were higher than those in the control group A and the control group B, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Repeated measures analysis of variance showed that there were time, inter-group and interaction effects on serum ALB, PA and TRF levels in the three groups ($P < 0.05$). The results of one-way repeated measures analysis of variance showed that after 2 and 4 weeks of intervention, the levels of serum ALB, PA and TRF in the three groups were higher than those before intervention, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Multivariate analysis of variance showed that there were no statistically significant differences in serum ALB, PA and TRF levels among the three groups before intervention ($P > 0.05$). After 2 and 4 weeks of intervention, the levels of serum ALB, PA and TRF in the combined group were higher than those in the control group A and the control group B, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Repeated measures analysis of variance showed that there were time, inter-group and interaction effects on serum BDNF, NGF and IGF-1 levels in the three groups ($P < 0.05$). The results of one-way repeated measures analysis of variance showed that after 4 weeks of intervention, the serum levels of BDNF, NGF and IGF-1 in combination group and control group B were higher than those before intervention, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Multivariate analysis of variance showed that there were no statistically significant differences in serum BDNF, NGF and IGF-1 levels among the three groups before intervention ($P > 0.05$). After 2 and 4 weeks of intervention, the serum levels of BDNF, NGF and IGF-1 in the combined group and the control group B were higher than those in the control group A, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The total incidence of complications in the combined group (6.06%) was lower than that in the control group A (30.30%) and the control group B (27.27%), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Tongue pressure resistance training combined with NMES is reliable in the treatment of patients with dysphagia after stroke, which can effectively regulate neurotrophic factors, promote the repair of nerve function, thereby improving dysphagia and enhancing the nutritional status of the body, with high safety.

Key words: neuromuscular electrical stimulation; tongue pressure; resistance; feedback; stroke; dysphagia

吞咽障碍是脑卒中常见并发症,是由脑、舌、咽及其相关神经组织出现损伤导致吞咽相关肌群运动失调引起^[1]。吞咽障碍发生后,患者出现明显进食障碍,易出现营养不良,且继发流涎、误吸、肺部感染、心理障碍等风险较高,极大降低患者生活质量,严重者还会造成卒中后死亡^[2]。因此,临床亟待探索有效治

疗吞咽障碍的方案。舌压抗阻训练是一种物理训练方式,通过训练舌体、口唇等肌肉组织提升肌群协调性与灵活性^[3]。神经肌肉电刺激(NMES)是无创电流刺激方式,可通过高效低频脉冲电流刺激咽喉部肌肉,诱导重建吞咽反射弧,实现神经功能重塑和恢复^[4]。虽已有研究将舌压抗阻训练与 NMES 联合方

案应用于吞咽障碍的治疗,但一方面相关研究并不广泛,临床适用性暂未得以完全证实;另一方面现有研究主要集中于在 NMES 基础上予以舌压抗阻训练,对于单纯舌压抗阻训练与其联合 NMES 技术间的疗效差异研究较少。此外,神经再生是卒中后吞咽障碍患者吞咽功能改善的重要途径,既往研究较少涉及舌压抗阻训练协同 NMES 对患者神经再生的影响机制。鉴于此,本研究采用随机对照研究法对 NMES 技术、舌压抗阻训练单一与联合方案进行分析,旨在为 NMES 联合舌压抗阻训练方案的推广提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2022 年 1 月至 2023 年 3 月就诊于湖南省人民医院/湖南师范大学附属第一医院的

99 例卒中后吞咽障碍患者作为研究对象,采用随机数字表法将其分为联合组、对照 A 组、对照 B 组,每组 33 例。纳入标准:经头颅 CT 检查确诊,符合脑出血/脑梗死诊断标准^[5-6];均为新发卒中患者;洼田饮水试验 ≥ 3 级,为中重度吞咽障碍;病程 ≤ 30 d;患者已度过危险期,病情稳定,意识清楚;均在本院接受相关治疗。排除标准:合并或既往存在颅脑损伤、气管切开、重症肌无力等其他原因引起的吞咽障碍者;合并严重器官功能障碍者;存在认知功能、感觉功能障碍者;依从性差,无法配合完成训练计划者;中途退出研究者。3 组一般资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。见表 1。所有研究对象及其亲属均知情同意本研究并签署知情同意书。本研究通过本院医学伦理委员会审核批准[(2023)-208]。

表 1 3 组一般资料比较[n/n 或 n (%)或 $\bar{x}\pm s$]

组别	n	男/女	年龄 (岁)	病程 (d)	体质量指数 (kg/m ²)	分型		住院时间 (周)
						脑梗死	脑出血	
联合组	33	19/14	36.45 $\pm$ 1.67	15.01 $\pm$ 2.03	22.94 $\pm$ 0.96	29(87.88)	4(12.12)	4.65 $\pm$ 0.29
对照 A 组	33	22/11	37.15 $\pm$ 2.82	14.41 $\pm$ 1.83	23.14 $\pm$ 1.03	27(81.82)	6(18.18)	4.71 $\pm$ 0.30
对照 B 组	33	20/13	36.79 $\pm$ 1.93	14.30 $\pm$ 2.15	23.46 $\pm$ 1.31	30(90.91)	3(9.09)	4.68 $\pm$ 0.28
F/ χ^2		0.598	0.839	1.196	1.842	1.240		0.353
P		0.742	0.435	0.307	0.164	0.538		0.704

1.2 方法 3 组均接受营养支持等对症治疗,并依据患者病情恢复情况开展面颊肌、舌肌、颈部、口唇运动、冷刺激、呼吸指导等康复护理。3 组抗阻训练均由同一名高年资康复科医生协助开展,且 NMES 也经同一名医生实施。

1.2.1 对照 A 组 接受舌压抗阻训练。(1)舌主动一辅助运动:用压舌板依次刺激患者舌头、左侧嘴角,嘱患者舌头向左运动,5 个为 1 组,每天 1 组,每周 6 d。(2)舌压抗阻训练:舌后缩抗阻训练:取纱布拉住患者舌前部,给予适当向前拉力,指导患者尽力向后缩舌,与治疗师施压压力形成对抗,达最大限度维持 4~10 s。(3)吸棉签训练:取棉签置于患者舌前部及上腭间,嘱患者舌面向上压,尽力吸干棉签上液体。(4)舌搅拌能力训练:取干净纱布稍微沾湿,置于患者口中,嘱患者在口腔内搅拌纱布,直至成为一团。(5)Mssako 训练:指导患者牙齿咬住舌尖,尽力将舌体置于靠前处,用力吞咽,感受咽后壁向前收缩、舌根收缩的力量。

1.2.2 对照 B 组 接受 NMES。仪器选择 HB62DE 型吞咽神经和肌肉电刺激仪,指导患者取舒适仰卧位,分别在患者舌骨上方、甲状腺切迹下方置入 2 组电极(每组包括 2 块电极)对喉部肌肉进行电刺激治疗,设置仪器参数,波形:三角波,刺激强度:2.5~1.0 mA,频率:30~80 Hz,波宽:700 ms,每天 1 次,每次治疗 20 min,连续治疗 5 d,休息 2 d,开始下次治疗,共治疗 4 周。

1.2.3 联合组 接受舌压抗阻训练(具体方法同对照 A 组)+NMES(具体方法同对照 B 组),每天完成

NMES 治疗后,间隔 30~60 min 开始舌压抗阻训练,连续干预 4 周。

1.3 观察指标

1.3.1 临床疗效 参照相关文献^[5-6]并依据洼田饮水试验情况对治疗效果进行评估,临床治愈:洼田饮水试验好转至 1 级,患者能正常进食;显效:洼田饮水试验好转至 2 级或较干预前改善 2 级及以上;有效:洼田饮水试验好转至 3 级或较干预前改善 1 级;无效:洼田饮水试验无改善,甚至分级增加;总有效率=有效率+显效率+临床治愈率。

1.3.2 洼田饮水试验^[7] 干预前、干预 2 周后、干预 4 周后协助患者保持舒适坐位,平静状态下,指导其尝试饮用 30 mL 温开水,若患者在 5 s 内顺利饮下,无不适反应,为 1 级,记为 1 分;若患者分 2 次及以上并在 5~10 s 内饮下,期间未出现呛咳,为 2 级,记为 2 分;若患者 5~10 s 内一次饮下全部温开水,但有呛咳发生,为 3 级,记为 3 分;若患者在 10 s 内分 2 次及以上饮下,并出现呛咳,为 4 级,记为 4 分;若患者连续出现呛咳,且 10 s 内未能饮下温水,为 5 级,记为 5 分;等级越高提示吞咽功能越差。

1.3.3 经口进食评分 采用功能性经口摄食量表(FOIS)^[8]评估 3 组干预前、干预 2 周后、干预 4 周后吞咽障碍情况,共分为 7 级:完全无法经口进食,为 1 级;需采用鼻饲管营养供给,仅能接受少量食物或液体,为 2 级;不能经口进食,可采用鼻饲管供给大部分营养,为 3 级;可经口进食,但食物浓度固定且单一,为 4 级;可经口进食,能接受多种浓度食物,但仍需特殊处理,为 5 级;完全可经口进食,食物浓度按需准

备,不需要特殊处理,但饮食食物种类单一,为 6 级;患者完全可经口进食,无其他限制,为 7 级。1~7 组分别对应 1~7 分。

1.3.4 生化指标 干预前、干预 2 周后、干预 4 周后指导患者空腹 8 h,次日清晨取真空采血管采集静脉血 5 mL,以 3 000 r/min 转速离心 10 min,抽取上层血清置于超低温(−80 ℃)冰柜保存,仪器选择伯乐 imark 酶标仪,采用酶联免疫吸附试验测定 3 组胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)水平。采用日本 HITACHI 的 7600-020 型全自动生化分析仪测定前清蛋白(PA)、清蛋白(ALB)、转铁蛋白(TRF)。

1.3.5 并发症情况 统计 3 组干预 4 周期间肺部感染、脱水、误吸、营养不良等出现情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理与统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。重复测量资料进行重复测量方差分析,若存在交互效应,则进一步做单独效应分析,通过单因素重复测量方差分析组内效应,通过多变量方差分析组间效应。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组临床疗效比较 联合组总有效率(90.91%)高于对照 A 组(66.67%)、对照 B 组(69.70%),差异均有统计学意义($\chi^2=6.270, P=0.044$)。见表 2。

2.2 3 组洼田饮水试验、FOIS 评分比较 重复测量方差分析结果显示,3 组洼田饮水试验($F_{\text{组间}}=14.765, P_{\text{组间}}<0.001, F_{\text{时间}}=36.459, P_{\text{时间}}<0.001, F_{\text{交互}}=22.107, P_{\text{交互}}<0.001$)、FOIS 评分($F_{\text{组间}}=12.693, P_{\text{组间}}<0.001, F_{\text{时间}}=22.624, P_{\text{时间}}<0.001,$

$F_{\text{交互}}=17.854, P_{\text{交互}}<0.001$)均存在时间、组间、交互效应($P<0.05$)。单因素重复测量方差分析结果显示,干预 2 周、4 周后,3 组洼田饮水试验评分均低于干预前,FOIS 评分均高于干预前,差异均有统计学意义($P<0.05$)。多变量方差分析结果显示,干预前,3 组洼田饮水试验、FOIS 评分比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);干预 2 周、4 周后,联合组洼田饮水试验评分均低于对照 A 组、对照 B 组,FOIS 评分高于对照 A 组、对照 B 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 2 3 组临床疗效比较[n(%)]

组别	<i>n</i>	临床治愈	显效	有效	无效	总有效
联合组	33	11(33.33)	15(45.45)	4(12.12)	3(9.09)	30(90.91) ^{ab}
对照 A 组	33	6(18.18)	11(33.33)	5(15.15)	11(33.33)	22(66.67)
对照 B 组	33	5(15.15)	11(33.33)	7(21.21)	10(30.30)	23(69.70)

注:与对照 A 组总有效比较,^a $P<0.05$;与对照 B 组总有效比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 3 组血清 PA、ALB、TRT 水平变化比较 重复测量方差分析结果显示,3 组血清 ALB($F_{\text{组间}}=13.658, P_{\text{组间}}<0.001, F_{\text{时间}}=18.475, P_{\text{时间}}<0.001, F_{\text{交互}}=15.118, P_{\text{交互}}<0.001$)、PA($F_{\text{组间}}=14.021, P_{\text{组间}}<0.001, F_{\text{时间}}=19.627, P_{\text{时间}}<0.001, F_{\text{交互}}=16.347, P_{\text{交互}}<0.001$)、TRF($F_{\text{组间}}=12.528, P_{\text{组间}}<0.001, F_{\text{时间}}=16.594, P_{\text{时间}}<0.001, F_{\text{交互}}=13.529, P_{\text{交互}}<0.001$)水平均存在时间、组间、交互效应($P<0.05$)。单因素重复测量方差分析结果显示,干预 2 周、4 周后,3 组血清 ALB、PA、TRF 水平均高于干预前,差异均有统计学意义($P<0.05$)。多变量方差分析结果显示,干预前,3 组血清 ALB、PA、TRF 水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。干预 2 周、4 周后,联合组血清 ALB、PA、TRF 水平高于对照 A 和对照 B 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

表 3 3 组洼田饮水试验、FOIS 评分比较($\bar{x}\pm s$,分)

组别	<i>n</i>	洼田饮水试验			FOIS 评分		
		干预前	干预 2 周后	干预 4 周后	干预前	干预 2 周后	干预 4 周后
联合组	33	4.13±0.34	2.83±0.41 ^{abc}	1.64±0.32 ^{abc}	2.62±0.68	4.30±0.72 ^{ab}	5.25±0.58 ^{ab}
对照 A 组	33	4.21±0.35	3.25±0.43 ^a	2.00±0.41 ^a	2.74±0.71	3.83±0.68 ^a	4.77±0.54 ^a
对照 B 组	33	4.18±0.33	3.40±0.40 ^a	2.16±0.43 ^a	2.76±0.73	3.57±0.64 ^a	4.55±0.51 ^a
<i>F</i>		0.466	16.847	15.42	0.379	9.748	14.284
<i>P</i>		0.629	<0.001	<0.001	0.686	<0.001	<0.001

注:与同组干预前比较,^a $P<0.05$;与干预后同一时间点对照 A 组比较,^b $P<0.05$;与干预后同一时间点对照 B 组比较,^c $P<0.05$ 。

2.4 3 组血清 BDNF、NGF、IGF-1 水平比较 重复测量方差分析结果显示,3 组血清 BDNF($F_{\text{组间}}=8.326, P_{\text{组间}}<0.001, F_{\text{时间}}=11.628, P_{\text{时间}}<0.001, F_{\text{交互}}=9.857, P_{\text{交互}}<0.001$)、NGF($F_{\text{组间}}=7.625, P_{\text{组间}}<0.001, F_{\text{时间}}=10.774, P_{\text{时间}}<0.001, F_{\text{交互}}=8.102, P_{\text{交互}}<0.001$)、IGF-1($F_{\text{组间}}=13.659, P_{\text{组间}}<0.001, F_{\text{时间}}=19.689, P_{\text{时间}}<0.001, F_{\text{交互}}=15.332, P_{\text{交互}}<0.001$)水平均存在时间、组间、交互效应($P<$

0.05)。单因素重复测量方差分析结果显示,干预 4 周后,联合组、对照 B 组血清 BDNF、NGF、IGF-1 水平均高于干预前,差异均有统计学意义($P<0.05$)。多变量方差分析结果显示,干预前,3 组血清 BDNF、NGF、IGF-1 水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);干预 2 周、4 周后,联合组、对照 B 组血清 BDNF、NGF、IGF-1 水平高于对照 A 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 5。

表 4 3 组血清 PA、ALB、TRT 水平比较($\bar{x}\pm s$,g/L)

组别	n	ALB			PA		
		干预前	干预 2 周后	干预 4 周后	干预前	干预 2 周后	干预 4 周后
联合组	33	36.64±4.46	43.69±3.74 ^{abc}	48.95±3.634 ^{abc}	0.22±0.07	0.30±0.034 ^{abc}	0.35±0.054 ^{abc}
对照 A 组	33	37.15±3.67	40.00±4.32 ^a	43.34±4.21 ^a	0.21±0.08	0.26±0.05 ^a	0.29±0.04 ^a
对照 B 组	33	36.96±4.10	39.87±3.96 ^a	44.10±3.75 ^a	0.20±0.09	0.25±0.04 ^a	0.28±0.06 ^a
F		0.131	9.636	20.393	0.510	13.860	18.429
P		0.877	<0.001	<0.001	0.602	<0.001	<0.001

组别	n	TRF		
		干预前	干预 2 周后	干预 4 周后
联合组	33	2.22±0.50	3.12±0.524 ^{abc}	3.89±0.614 ^{abc}
对照 A 组	33	2.11±0.60	2.63±0.41 ^a	2.64±0.50 ^a
对照 B 组	33	2.16±0.48	2.70±0.46 ^a	2.60±0.48 ^a
F		0.357	10.695	62.481
P		0.700	<0.001	<0.001

注:与同组干预前比较,^a $P<0.05$;与干预后同一时间点对照 A 组比较,^b $P<0.05$;与干预后同一时间点对照 B 组比较,^c $P<0.05$ 。

2.5 3 组并发症情况比较 联合组并发症发生率 (27.27%),差异均有统计学意义($P<0.05$)。见 (6.06%) 低于对照 A 组 (30.30%)、对照 B 组 表 5。

表 5 3 组血清 BDNF、NGF、IGF-1 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	BDNF(pg/mL)			NGF(pg/mL)		
		干预前	干预 2 周后	干预 4 周后	干预前	干预 2 周后	干预 4 周后
联合组	33	16.57±4.12	18.96±5.67 ^a	26.35±4.58 ^{ab}	21.63±4.02	26.04±4.69 ^a	30.36±5.12 ^{ab}
对照 A 组	33	15.96±4.60	16.00±3.96	16.10±5.10	22.10±3.96	22.96±3.74	22.63±4.57
对照 B 组	33	16.20±3.85	18.75±5.00 ^a	24.96±4.67 ^{ab}	21.74±4.76	25.78±4.96 ^a	29.68±5.36 ^{ab}
F		0.177	3.708	44.489	0.110	4.768	23.918
P		0.838	0.028	<0.001	0.896	0.011	<0.001

组别	n	IGF-1(μg/mL)		
		干预前	干预 2 周后	干预 4 周后
联合组	33	76.69±10.67	82.00±12.67 ^a	104.28±12.36 ^{ab}
对照 A 组	33	78.10±9.12	80.65±11.28	79.62±10.57
对照 B 组	33	75.98±7.85	81.59±10.57 ^a	102.67±11.96 ^{ab}
F		0.446	0.119	46.237
P		0.642	0.888	<0.001

注:与同组干预前比较,^a $P<0.05$;与干预后同一时间点对照 A 组比较,^b $P<0.05$;与干预后同一时间点对照 B 组比较,^c $P<0.05$ 。

表 6 3 组并发症情况比较[n(%)]

组别	n	肺部感染	误吸	营养不良	脱水	总发生
联合组	33	1(3.03)	0(0.00)	1(3.03)	0(0.00)	2(6.06)
对照 A 组	33	3(9.09)	4(12.12)	2(6.06)	1(3.03)	10(30.30) ^a
对照 B 组	33	2(6.06)	3(9.09)	3(9.09)	1(3.03)	9(27.27) ^a

注:与联合组比较,^a $P<0.05$ 。

3 讨 论

老年卒中后合并吞咽障碍患者因进食障碍、饮水呛咳阻碍营养物质获取与吸收,严重影响预后^[9]。探究有效治疗方式一直是临床研究重点。

3.1 舌压抗阻训练的应用效果分析 临床研究指出,针对性、重复、规范的舌压抗阻训练能显著改善患者舌体周围肌肉功能及协调性,还能反向刺激吞咽相关神经调控路径,有助于脑神经修复^[10-11]。本研究结果显示,干预 2 周、4 周后,联合组洼田饮水试验评分均低于对照 A 组、对照 B 组,FOIS 评分高于对照 A 组、对照 B 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。说

明联合舌压抗阻训练可有效改善患者吞咽功能。舌压抗阻训练是通过舌肌活动调整与吞咽相关肌肉运动协调性,通过舌主动-辅助运动、舌后缩抗阻训练、吸棉签训练、舌搅拌能力训练、Mssako 训练持续性给予舌部感觉刺激,促使舌肌产生有效推力,从而训练咽喉肌肉及局部肌力协调能力,并可反馈于咽喉部吞咽调节神经^[12]。因中枢神经系统具有较高的功能可塑性,舌压抗阻训练中反复长效刺激可促使中枢神经重建运动投射传导,促使功能损伤组织恢复结构与功能^[13]。专项舌压抗阻训练充分锻炼舌肌相关肌群协调性,不断改变舌流体静压,提升舌肌力量,恢复舌头正常活动功能,且物理方式安全无创,可循序渐进改善舌部功能,增强舌体抗阻能力,从而改善吞咽功能^[14]。

3.2 NMES 的应用效果分析 NMES 是通过适当频率的电流作用于咽喉部,刺激并启动引起吞咽障碍的神经-肌肉组织活性,恢复调节吞咽过程的功能^[15]。

本研究联合 NMES 治疗,发现干预 2 周、4 周后,联合组血清 ALB、PA、TRF 水平高于对照 A 组和对照 B 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。提示 NMES 联合治疗可调控机体营养状态,这可能与该组患者吞咽功能好转更明显有关。且 CAMPOS 等^[16]在机械通气患者早期活动中增加 NMES,发现,患者住院时间更短、肌肉力量更好。CARSON 等^[17]同样在瘫痪患者中证实 NMES 的促神经修复及代偿肢体障碍功能。从机制角度分析,NMES 以外源性电流刺激替代内源性神经,驱动外周神经等组织,募集传出与传入纤维,引起吞咽相关运动神经元兴奋,产生肌肉收缩,可补偿吞咽障碍,完成吞咽活动^[18]。邢彬等^[19]在报道中指出,不同频率 NMES 发挥作用不同,高频(45~60 Hz)电流能有效刺激肌肉毛细血管生成,引起肌纤维表型转换,提升肌肉活动能力,且 NMES 作用于咽喉部促使肌肉产生非自主性收缩,避免周围组织因去神经支配造成肌纤维损失,有助于保持肌肉结构及功能完整性^[20]。同时 NMES 发射电流信号引起运动神经轴突去极化,直接将下行信号输送至运动终板,引起肌肉或神经干活动,启动肌肉感觉纤维,实现吞咽运动神相关经元去极化,有助于重建吞咽反射弧,改善吞咽障碍,提升治疗效果^[21]。

相关研究证实,训练后神经再生及重新支配相关肌肉改善程度与神经肌肉接头相关介质的稳态可塑性密切相关^[22]。刺激后运动单位扩张依靠末端和节点轴突萌芽与原始轴突结构在突触处完成新的神经肌肉连接,而神经营养因子供给充足是轴突再生的重要基础^[23]。其中 NGF 可调控神经细胞增殖、发育和损伤修复,IGF-1 参与神经细胞增殖分化,两者均具有神经保护功能^[24]。另 BDNF 是介导轴突再生的重要因子,可调控酪氨酸激酶受体 B 信号通路,加速轴突萌芽,并传递下游信号,促使轴突萌芽与肌肉纤维建立神经肌肉接头,还能特异性结合神经末梢 p75 受体,避免轴突过度分化,实现功能连接,恢复吞咽调控功能^[25]。本研究结果中,干预 2 周、4 周后,联合组、对照 B 组血清 BDNF、NGF、IGF-1 水平高于对照 A 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。干预 4 周后,联合组、对照 B 组血清 BDNF、NGF、IGF-1 水平均高于干预前,差异均有统计学意义($P<0.05$)。说明 NMES 治疗可有效提高神经营养因子表达水平。低频脉冲电流可通过改善大脑血液循环,促进受损神经末端轴突再生,加快神经轴突与肌肉效应器之间的反馈,从而激活神经细胞,发挥神经营养的作用。KIMURA 等^[26]表示,增加 NMES 治疗可显著提升血清 BDNF。张瑞等^[27]研究也显示,在常规西药及康复治疗基础上辅以 NMES,可加强脑梗死患者脑部血流灌注,促进脑组织损伤恢复。

3.3 舌压抗阻训练联合 NMES 的应用效果分析 本研究结果还显示,联合组总有效率(90.91%)高于对照 A 组(66.67%)、对照 B 组(69.70%),差异

均有统计学意义($P<0.05$)。与付婷婷等^[28]研究观点相似,说明联合治疗效果优于单一治疗方案。另有报道指出,吞咽障碍患者因水分、食物经口摄入困难,患者易出现噎食、呛咳,还可能出現误吸等引起窒息,增加肺炎发生率^[29]。本研究结果显示,联合组并发症发生率(6.06%)低于对照 A 组(30.30%)、对照 B 组(27.27%),差异均有统计学意义($P<0.05$)。这是因为联合方案一方面通过舌压抗阻训练增强舌体移动、抵抗阻力、搅拌等能力以增强肌群力量,另一方面 NMES 可作用于受损神经组织,促进神经功能好转,从而改善吞咽障碍,降低营养供给障碍引起的多种并发症。

综上所述,NMES 与舌压抗阻训练联合应用于卒中后吞咽障碍患者中,可提升吞咽相关肌群功能,上调神经营养因子,促进神经组织修复,从而改善吞咽困难,效果安全可靠。但本研究样本量较小、干预时间较短,下一步还需开展深入研究以验证本文结论。

参考文献

- [1] TERRÉ R. Oropharyngeal dysphagia in stroke: diagnostic and therapeutic aspects[J]. Rev Neurol, 2020, 70(12): 444-452.
- [2] OUYANG M, BOADEN E, ARIMA H, et al. Dysphagia screening and risks of pneumonia and adverse outcomes after acute stroke: an international multicenter study[J]. Int J Stroke, 2020, 15(2): 206-215.
- [3] WANG T, TAI J, HU R, et al. Effect of tongue-pressure resistance training in poststroke dysphagia patients with oral motor dysfunction: a randomized controlled trial[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2022, 101(12): 1134-1138.
- [4] ALRWAILY M, SCHNEIDER M, SOWA G, et al. Stabilization exercises combined with neuromuscular electrical stimulation for patients with chronic low back pain: a randomized controlled trial[J]. Braz J Phys Ther, 2019, 23(6): 506-515.
- [5] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国脑出血诊治指南 2019[J]. 中华神经科杂志, 2019, 52(12): 994-1005.
- [6] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9): 666-682.
- [7] 王娇, 陈筱诗, 蒋琦, 等. 洼田饮水试验用于评估全身麻醉患者术后早期进水可行性的研究[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2021, 42(11): 1199-1201.
- [8] 赵灿, 蔡燕, 何泽液, 等. 项针对脑梗死吞咽功能障碍 FOIS 评分、炎症反应及血清 NSE、VEGF、BDNF 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(6): 221-224.
- [9] MATOS K C, OLIVEIRA V F D, OLIVEIRA P L C D, et al. An overview of dysphagia rehabilitation for stroke patients[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2022, 80(1): 84-96.
- [10] NAMIKI C, HARA K, TOHARA H, et al. Tongue-pressure resistance training improves tongue and suprahyoid muscle functions simultaneously[J]. Clin Interv Aging, 2019, 14: 601-608.

- [11] KILINÇ H E, ARSLAN S S, DEMİR N, et al. The effects of different exercise trainings on suprahyoid muscle activation, tongue pressure force and dysphagia limit in healthy subjects[J]. *Dysphagia*, 2020, 35(4): 717-724.
- [12] HUANG H, LI W, JIN H, et al. Tongue strength training increases daytime upper airway stability in rats[J]. *Nat Sci Sleep*, 2021, 13: 1653-1661.
- [13] SHEN J. Plasticity of the central nervous system involving peripheral nerve transfer[J]. *Neural Plast*, 2022, 2022: 5345269.
- [14] OH J C. Effects of resistive jaw-opening exercise with elastic resistance bands on suprahyoid muscle activation and tongue strength in the elderly: a pilot study[J]. *Folia Phoniatr Logop*, 2021, 73(5): 376-383.
- [15] ALAMER A, MELESE H, NIGUSSIE F. Effectiveness of neuromuscular electrical stimulation on post-stroke dysphagia: a systematic review of randomized controlled trials[J]. *Clin Interv Aging*, 2020, 15: 1521-1531.
- [16] CAMPOS D R, BUENO T B C, ANJOS J S G G, et al. Early neuromuscular electrical stimulation in addition to early mobilization improves functional status and decreases hospitalization days of critically ill patients[J]. *Crit Care Med*, 2022, 50(7): 1116-1126.
- [17] CARSON R G, BUICK A R. Neuromuscular electrical stimulation-promoted plasticity of the human brain [J]. *J Physiol*, 2021, 599(9): 2375-2399.
- [18] MAROTTA N, DEMECO A, INZITARI M T, et al. Neuromuscular electrical stimulation and shortwave diathermy in unrecovered bell palsy: a randomized controlled study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(8): e19152.
- [19] 邢彬, 刘聪龙, 张海莲, 等. 神经肌肉电刺激预防老年肌萎缩的机制研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2022, 44(4): 381-384.
- [20] SALAZAR A P, PAGNUSSAT A S, PEREIRA G A, et al. Neuromuscular electrical stimulation to improve gross motor function in children with cerebral palsy: a Meta-analysis[J]. *Braz J Phys Ther*, 2019, 23(5): 378-386.
- [21] HARBO T, MARKVARDSEN L K, HELLFRITZSCH M B, et al. Neuromuscular electrical stimulation in early rehabilitation of Guillain-Barré syndrome: a pilot study [J]. *Muscle Nerve*, 2019, 59(4): 481-484.
- [22] OHKAWARA B, ITO M, OHNO K. Secreted signaling molecules at the neuromuscular junction in physiology and pathology[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2455.
- [23] STANGA S, BOIDO M, KIENLEN C P. How to build and to protect the neuromuscular junction; the role of the glial cell line-derived neurotrophic factor[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 136.
- [24] KIMURA T, YAMADA H, TERAOKA M, et al. Intratympanic insulin-like growth factor-1 administration via the Otic bulla in a severe facial paralysis model[J]. *Otol Neurotol*, 2021, 42(9): e1376-e1381.
- [25] LI Y, ZHANG W, SHI R, et al. Prenatal caffeine damaged learning and memory in rat offspring mediated by ARs/PKA/CREB/BDNF pathway [J]. *Physiol Res*, 2018, 67(6): 975-983.
- [26] KIMURA T, KANEKO F, IWAMOTO E, et al. Neuromuscular electrical stimulation increases serum brain-derived neurotrophic factor in humans[J]. *Exp Brain Res*, 2019, 237(1): 47-56.
- [27] 张瑞, 尉灵芝. 神经肌肉电刺激辅助治疗对脑梗死患者脑部血流、CXC 型趋化因子配体 16 及神经细胞因子的影响 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2020, 47(2): 136-140.
- [28] 付婷婷, 梁洪文, 付立新. 舌压抗阻反馈训练联合神经肌肉电刺激对脑卒中后吞咽障碍患者自主进食时间、VFSS 评分及不良反应的影响 [J]. *武警后勤学院学报 (医学版)*, 2021, 30(11): 174-176.
- [29] KIM D Y, PARK H S, PARK S W, et al. The impact of dysphagia on quality of life in stroke patients[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(34): e21795.

(收稿日期: 2024-03-25 修回日期: 2024-07-11)

(上接第 3092 页)

- [10] TANAKA N, YABE D, MUROTANI K, et al. Mental distress and health-related quality of life among type 1 and type 2 diabetes patients using self-monitoring of blood glucose: a cross-sectional questionnaire study in Japan[J]. *J Diabetes Investig*, 2018, 9(5): 1203-1211.
- [11] ALIDRISI H A, BOHAN A, MANSOUR A A. Barriers of doctors and patients in starting insulin for type 2 diabetes mellitus[J]. *Cureus*, 2021, 13(9): e18263.
- [12] FU S N, WONG C K H, CHIN W Y, et al. Association of more negative attitude towards commencing insulin with lower glycosylated hemoglobin (HbA1c) level: a survey on insulin-naïve type 2 diabetes mellitus Chinese patients [J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2016, 15: 3.
- [13] 张慧君, 樊宽鲁, 宋红. 动态血糖监测下 2 型糖尿病患者自我管理现状调查与影响因素分析[J]. *护理实践与研究*, 2020, 17(1): 25-27.
- [14] 鲁中芸, 潘尉洲, 金华. 不可忽视的性别差异: 疼痛领域的探索[J]. *中国细胞生物学学报*, 2022, 44(6): 1219-1228.
- [15] 陈亚玲, 孙子林. 国内外不同种族-民族生活习惯与糖尿病发病风险的研究现状[J]. *中华糖尿病杂志*, 2018, 10(5): 367-369.
- [16] RAMALLO-FARIÑA Y, RIVERO-SANTANA A, GARCÍA-PÉREZ L, et al. Patient-reported outcome measures for knowledge transfer and behaviour modification interventions in type 2 diabetes-the INDICA study: a multiarm cluster randomised controlled trial [J]. *BMJ Open*, 2021, 11(12): e050804.
- [17] MIRAHMADIZADEH A, DELAM H, SEIF M, et al. Factors affectin insulin compliance in patients with type 2 diabetes in South Iran, 2017: we are faced with insulin phobia[J]. *Iran J Med Sci*, 2019, 44(3): 204-213.

(收稿日期: 2024-02-05 修回日期: 2024-06-18)

基于 CRISPR/Cas 的分子诊断技术在病毒检测中的应用*

尹佳祺¹, 折小娟², 和林洁²综述, 季乐乐^{2,3,△}审校

空军军医大学:1. 学员六大队 24 中队;2. 基础医学院生理与病理生理学教研室;
3. 国家级基础医学实验教学示范中心, 陕西西安 710032

摘 要:2019 年, 新型冠状病毒感染疫情的爆发对快速、特异、灵敏、简便且廉价的诊断技术提出了迫切需求, 分子诊断技术成为备受关注的热点。但目前常用的聚合酶链反应分子诊断技术存在诸多局限性。近年来, 新兴的规律间隔成簇短回文重复序列及其相关蛋白 (CRISPR/Cas) 系统作为新型基因编辑工具为解决上述需求提供了可能。本研究综述了 CRISPR/Cas 系统的作用机制, 并以不同 Cas 蛋白类型为线索, 重点综述了多种 CRISPR 分子诊断及平台的原理及应用, 同时关注其在病毒检测领域中的研究进展, 并对 CRISPR 分子诊断技术的发展现状进行了总结。尽管 CRISPR 分子诊断技术目前处于起步阶段, 存在污染、脱靶效应及序列依赖等局限性, 该技术在分子诊断领域仍表现出革命性的发展潜力。

关键词:CRISPR; 分子诊断; II 类 Cas 蛋白; 病毒检测; 小分子检测

中图分类号:R446.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2024)20-3100-05

Application of CRISPR/ Cas-based molecular diagnostic techniques in virus detection*

YIN Jiaqi¹, SHE Xiaojuan², HE Linjie², JI Lele^{2,3,△}

1. 24 Squadron of the 6th Cadet Brigade; 2. Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences; 3. National Demonstration Center for Experimental Teaching of Basic Medicine, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract: In 2019, the outbreak of COVID-19 put forward an urgent need for rapid, specific, sensitive, simple and inexpensive diagnostic techniques, and molecular diagnostic techniques have attracted much attention. However, the commonly used polymerase chain reaction molecular diagnostic technology has many limitations. In recent years, the emerging clustered regularly interspaced short palindromic repeats and associated proteins (CRISPR/Cas) system as a new gene editing tool provides the possibility to solve the above needs. This review introduces the mechanism of CRISPR/Cas system, and focuses on the principle and application of various CRISPR molecular diagnostic techniques and platforms based on different Cas protein types. Meanwhile, it also focuses on the research progress in the field of virus detection and summarizes the development status of CRISPR molecular diagnostic technology. Although CRISPR molecular diagnostic technology is currently in its infancy and has some limitations such as contamination risk, off-target effects and sequence dependence, this technology still shows revolutionary development potential in the field of molecular diagnosis.

Key words: CRISPR; molecular diagnostics; class II Cas protein; virus detection; small molecule testing

疾病的早发现、早治疗对于降低病死率, 改善患者预后和提高患者生活质量具有重要意义。2019 年爆发的新型冠状病毒感染疫情严重威胁人类健康, 更对疾病的快速诊断提出了挑战^[1]。分子诊断技术通过对核酸分子进行快速检测, 从而实现早期迅速识别病原体并提供有关疾病信息, 为疾病预防及临床治疗提供指导, 是控制疾病的重要保证^[2]。目前最成熟的分子诊断技术是聚合酶链反应 (PCR) 技术。然而, 传统 PCR 检测病原体核酸具有诸多局限性, 例如需要复杂的仪器和试剂、专门的实验室和专业技术人员, 且检测耗时长等^[3]。因此, 亟需挖掘新一代快速、特异、灵

敏、简便且廉价的诊断技术, 以应对大型突发公共卫生问题。

成簇的规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 和 CRISPR 相关蛋白 (Cas) 组成的 CRISPR/Cas 系统于 2012 年首次被证明可作为基因编辑工具^[4]。此后, 该系统在分子诊断领域表现出了巨大的潜力。2017 年, 有研究首次提出了 CRISPR 分子诊断的概念^[5], 并建立了首个基于 CRISPR/Cas 技术的分子诊断平台: SHERLOCK 分子诊断平台, 这标志着 CRISPR 分子诊断技术的正式建立。自此, CRISPR 分子诊断技术开始蓬勃发展。与传统 PCR 技术相比, CRISPR 技术

* 基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (82170597); 陕西省创新能力支撑计划项目 (2022KJXX-104); 陕西省自然科学基金基础研究计划 (2021JZ-28)。

△ 通信作者, E-mail: jilele@fmmu.edu.cn。

有高热异度、高灵敏度、迅速、便利且成本低廉等多种优势^[6]。尽管其仍处于起始阶段,CRISPR 技术已经展现出良好的发展前景。

本综述以不同 Cas 蛋白类型为线索,重点介绍了各种 CRISPR 分子诊断技术的原理及应用,以及其在病毒检测中的研究进展,并对该技术在病毒检测中的前景进行了展望。

1 CRISPR/Cas 系统简介

CRISPR/Cas 系统是存在于许多细菌与绝大多数古细菌中的一种适应性免疫系统,其免疫防御的作用机制包含 3 个阶段:适应、表达和干扰^[7-8]。当噬菌体、病毒等外源性遗传物质入侵时,CRISPR/Cas 系统发挥作用,在适应阶段,细菌通过 Cas 蛋白复合体(如 Cas1-Cas2)识别外源基因中的原间隔子相邻序列(PAM),并切割下外源基因中的原间隔子整合到细菌的 CRISPR 序列中,以形成感染记忆。在表达阶段,CRISPR 序列转录形成前体 CRISPR RNA (pre-crRNA),使感染记忆恢复,并由 Cas 蛋白或细胞 RNA 酶进一步将 pre-crRNA 加工为成熟的 crRNA,crRNA 可与 Cas 蛋白形成复合体,具有特异性核酸内切酶活性。最后,在干扰阶段,成熟的 crRNA 将 Cas 核酸酶引导至同源的外源遗传物质,当 crRNA 与靶序列结合时,Cas 蛋白裂解外源核酸,以保护原核生物免受外源基因入侵。

基于其成分和作用机制的差异,CRISPR 系统分为 2 类 6 型^[9]。I 类 CRISPR-Cas 系统包括 I、Ⅲ和Ⅳ型,依靠多亚基蛋白 crRNA 效应复合体介导外来基因的结合及加工,该复合体包括多个执行单一功能的 Cas 蛋白。Ⅱ类 CRISPR-Cas 系统包括Ⅱ、Ⅴ和Ⅵ型,依靠单一、多结构域的 crRNA 结合蛋白即可发挥与 I 类系统中复合体类似的功能。因此,相比于 I 类系统,Ⅱ类系统使用更加简便高效,应用更为广泛^[10]。

目前,Ⅱ类 Cas 效应蛋白在基于 CRISPR 的病毒检测领域一直处于研究热点,以 Cas9、Cas12、Cas13 等为代表,根据不同效应蛋白的作用模式,其在分子诊断中的应用模式也有所不同^[11]。

2 基于 CRISPR/Cas 的病毒核酸诊断技术

2.1 基于 CRISPR/Cas9 特异性识别双链 DNA(ds-DNA)的检测技术

Cas9 是最早发现的 Cas 酶之一,也是迄今为止研究最深入、应用最广泛的 Cas 酶。其工作机制与上述免疫防御 3 阶段相似,不同点为成熟的 crRNA 需与反式激活的 crRNA(tracrRNA)结合为单链向导 RNA(sgRNA)后,再与 Cas9 结合形成活性复合体,引导裂解外源基因^[12]。在具有附带切割活性的 Cas 蛋白(如 Cas12a、Cas13a、Cas14)被应用之前,研究人员已开发出利用 Cas9 的特异性来识别病毒株的方法^[13]。

PARDEE 等^[13]结合核酸依赖性扩增检测技术(NASBA)扩增、toehold 传感器和 Cas9 的切割活性开发了 NASBACC 技术,用于寨卡病毒的检测。该技术首先利用 NASBA 对病毒 RNA 进行扩增,若扩增

过程中产生的 dsDNA 含有特异性 PAM 序列及 sgRNA 靶点,Cas9 即将其裂解,而无特异性 PAM 序列的 DNA 可不被裂解并转录为长 RNA,激活 toehold 传感器发生颜色变化而实现病毒检测,这是首个基于 CRISPR 的诊断方法。WANG 等^[14]开发出一种名为 CASLFA 的 dsDNA 检测技术,通过将 Cas9 的切割作用直接整合到侧流层析试纸条中,实现对 DNA 的可视化检测,该技术可以在 1 h 内特异性地对非洲猪瘟病毒进行检测。JIAO 等^[15]发现 tracrRNA 可与细胞 RNA 结合形成非经典 crRNA(ncrRNA)来引导 Cas9 靶向。基于这一特性,JIAO 等^[15]设计了一个名为 LEOPARD 的 RNA 检测平台,该平台利用重编程 tracrRNA 识别目标 RNA 并结合为 ncrRNA,从而引导 Cas9 靶向裂解对应的 DNA,特定的 DNA 被裂解即表明样品中存在目标 RNA。由于每个 DNA 序列都是独一无二的,故该技术允许在单次试验中检测来自不同病毒的多种 RNA,且可区分新型冠状病毒及其变体,在患者样品中有单碱基分辨率。

2.2 基于 CRISPR/Cas13 特异性识别 RNA 的检测技术

CRISPR/Cas13 由 Cas13a、Cas13b、Cas13c 和 Cas13d 四种亚型组成。有团队利用 Cas1 作为“诱饵”来寻找细菌基因组中与 CRISPR 相关联的蛋白,经过分析验证,发现了 53 个候选基因,总共分成 3 大类:C2c1、C2c2 和 C2c3^[16]。其中 C2c2 后来被命名为 Cas13a。相较于 Cas9,最显著的区别在于 Cas13a 的目标分子为 RNA,而 Cas9 为 DNA,且 Cas13a 仅需要 crRNA 作为引导 RNA,而不需要 tracrRNA 的引导。除此之外,Cas13a 还表现出一种“附带切割活性”,即当其识别并切割指定的 RNA 目标后,Cas13a 进入激活状态,可以对混合物中存在的其他 RNA 分子进行非特异性切割,而在无目标 RNA 时 Cas13a 将处于沉默状态,这一特点为构建高热异度、高灵敏度的分子诊断平台创造了条件^[17-18]。

GOOTENBERG 等^[5]开发出一种基于等温核酸扩增和 CRISPR/Cas13a 系统的新型体外分子诊断技术,并将其命名为 SHERLOCK,开启了 CRISPR 分子诊断技术的大门。SHERLOCK 技术以 Cas13a 为中心,并在检测平台中引入了一种 RNA 报告分子。该报告分子一端连接荧光基团,另一端连接淬灭基团,当荧光基团与淬灭基团分离时可释放出荧光。SHERLOCK 技术首先使用高灵敏度的重组酶聚合酶扩增(RPA)或反转录重组酶聚合酶扩增(RT-RPA)对待测核酸分子进行扩增,提高检测灵敏度,再通过 T7 转录将扩增出的 DNA 转化为可被 Cas13a 识别的 RNA,随后加入到 Cas13a-crRNA 复合物和 RNA 报告分子混合的反应体系中。当 crRNA 识别并引导 Cas13a-crRNA 复合物与目标序列结合后,Cas13a 的非特异性 RNA 酶活性被激活,可非特异性切割 RNA 报告分子使其两端的荧光基团和淬灭基团分离,从而释放出荧光信号,表明样本中存在目标序列(见图 1)。SHERLOCK 的灵敏度高,能够检测阿

托摩尔(10~18 M)浓度的靶分子,且特异性可达到单碱基分辨率,已被证实可用于检测寨卡病毒和登革热病毒的特定毒株。BARNES 等^[19]成功在塞拉利昂和

尼日利亚使用 SHERLOCK 技术对当地暴发的埃博拉病毒和出血热病毒进行检测,证明了 SHERLOCK 技术应对暴发疫情的能力。

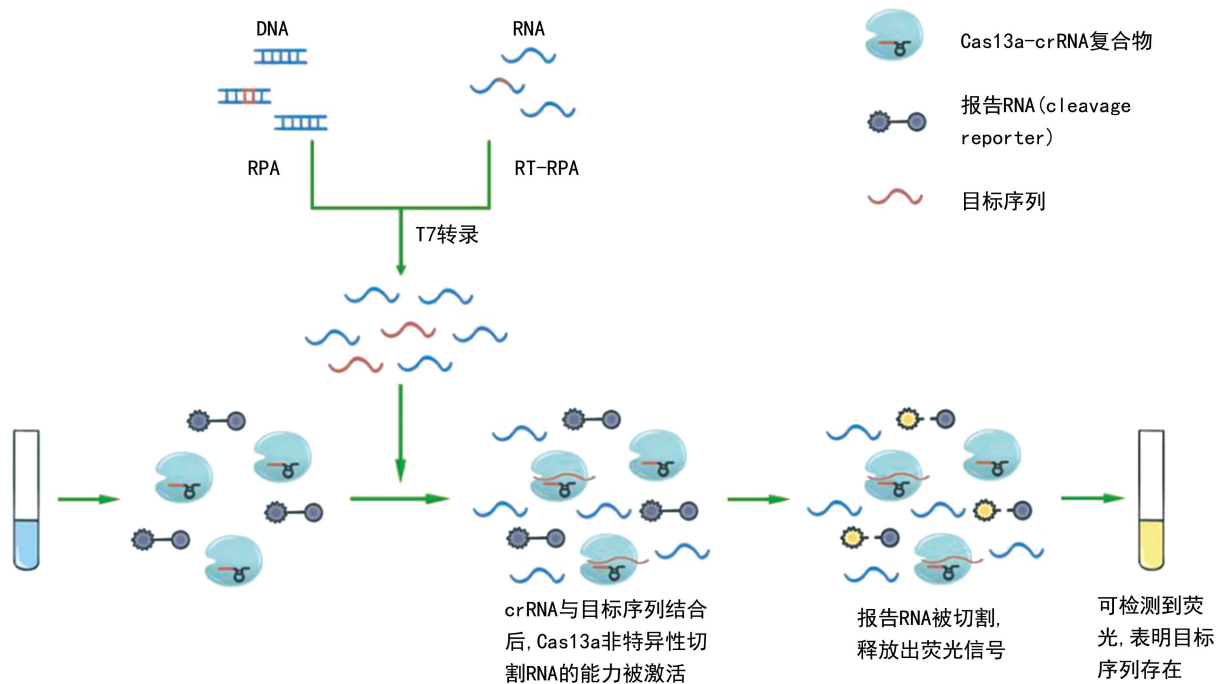


图 1 SHERLOCK 技术原理图

有关团队着手完善 SHERLOCK 技术,推出了 SHERLOCKv2^[20]。Csm6 是Ⅲ型 CRISPR 系统中的一种效应核酸酶,具有放大检测信号的功能,将 Csm6 与 Cas13 串联使用,进一步提高了反应的灵敏度。同时,通过在体系中加入靶向不同的多种 Cas 蛋白,成功实现单次检验中分析多种核酸。此外,该团队还将纸基传感器引入系统,实现了无仪器检测,使 SHERLOCK 的使用更加便捷。而基于将 Csm6 与 Cas13 进行串联这一想法,LIU 等^[21]开发了无扩增技术 FIND-IT,由于减少了扩增步骤,检测速度大大提升,该技术可以在 20 min 内对新型冠状病毒进行高灵敏度检测。

为了简化核酸提取工作,实现快速检测,MYHR-VOLD 等^[22]开发了 HUDSON 技术,这是一种利用热力和化学还原裂解病毒颗粒并使体液中高水平核糖核酸酶失活的方法,经 HUDSON 处理的尿液或唾液可不需要稀释或纯化直接加入 RPA 反应混合物中。该方法与 SHERLOCK 技术配合,可在 2 h 内直接从患者体液中实现无仪器检测病毒。2020 年,ARIZTI-SANZ 等^[23]对 HUDSON 技术进行了进一步优化,开发了 SHINE 技术,该技术可以在 10 min 迅速灭活鼻咽拭子和唾液中的新型冠状病毒,且可以从未提取的样本中检测出新型冠状病毒 RNA,大大提升了检测能力。同时,该团队创新了 RT-RPA-Cas13a 一管化体系,简化了分析前所需的准备工作并缩短了运行时间。ARIZTI-SANZ 等^[24]通过对原有 SHINE 技术进行简化,进一步推出 SHINEv. 2 技术,

通过省去加热步骤和试剂冷藏的需要,使 SHINE 技术更加具有实用性。

在实际公共卫生事件中,需对多种病原体进行大规模检验。ACKERMAN 等^[25]以 SHERLOCK 技术为基础,结合高通量病毒检测技术,开发出 CARMEN 技术,该技术使用了微流体芯片,单一芯片一次可以在 1 000 多个样本中检测一种病毒,或在少量样本中检测多达 169 种病毒,其中包括新型冠状病毒。WELCH 等^[26]在 CARMEN 的基础上开发了 mCARMEN 技术,缩减了样本处理时间,简化了前期人工准备的步骤,且可以对样本中的病毒数量进行定量检测。

2.3 基于 CRISPR/Cas12 特异性识别 dsDNA 的检测技术 CRISPR/Cas12 系统包括 Cas12a 和 Cas12b。Cas12a 也称 Cpf1,与 Cas13 相似,Cas12a 仅需要 crRNA 作为引导而不需要 tracrRNA,它识别目标区域上游富含 T 的 PAM,在 PAM 远端位点通过 DNA 双链交错断裂来切割 DNA^[27]。CHEN 等^[28]发现 Cas12a 也具有类似于 Cas13 的附带切割活性,不同点在于 Cas12a 的目标分子为 dsDNA,且 Cas12a 与目标 dsDNA 片段结合后会释放出非特异性单链 DNA(ssDNA)裂解活性,完全降解周围 ssDNA 分子。利用这种活性,CHEN 等^[28]将 Cas12a 与 RPA 结合,创建了 DETECTR 分子诊断平台。该技术与 SHERLOCK 相似,Cas12a-crRNA 复合物在 crRNA 的引导下结合目标 DNA 后,Cas12a 的附带切割活性被激活,非特异性降解周围的 ssDNA,使预先加入的 ssDNA 报告分子的荧光基团与淬灭基团分离,释放出

荧光信号,实现对目的 DNA 的检测。该方法检测 DNA 的灵敏度达到了阿托摩尔级别,已证实能够快速、特异地检测患者样本中的人类乳头瘤病毒。后续,BROUGHTON 等^[29]利用 DETECTR 技术从呼吸道拭子 RNA 提取物中检测新型冠状病毒,结果表明 DETECTR 可以快速(<40 min)且准确地对新型冠状病毒进行检测,证明了 DETECTR 技术的应用前景。

LI 等^[30]也开发出了与 DETECTR 技术相似 HOLMES 技术,不同之处在于 HOLMES 使用 PCR 技术对目标核酸进行扩增,而 DETECTR 使用 RPA 技术。HOLMES 技术检测狂犬病毒和日本脑炎病毒的灵敏度与 SHERLOCK 相当。2019 年,LI 等^[31]进一步推出 HOLMESv2,利用来自酸土环脂芽孢杆菌的 AacCas12b 以及环介导等温扩增(LAMP)技术,开发出 LAMP-Cas12b 的一管化 CRISPR 诊断体系,可以避免扩增后开盖转移液体所带来的气溶胶污染。JOUNG 等^[32]基于这一原理改进了 SHERLOCK 流程,将来自嗜酸耐热菌的 AapCas12b 与 LAMP 联合,开发出了 SHERLOCK 的一管化系统 STOP。并且,该团队通过加入磁珠来富集样本中的 RNA,提高了起始 RNA 水平,进一步提高了技术的灵敏度。STOP 有灵敏度高、特异度和检测速度快的特点,可以在 10~15 min 内实现飞摩尔级(10^{-15} M)的检测,在不到 1 h 内阿托摩尔级的检测^[33]。

2.4 基于 CRISPR/Cas14 特异性识别 ssDNA 的检测技术 HARRINGTON 等^[34]从古细菌基因库里发现了之前未被识别的基因 Cas14,其所编码的 Cas14 蛋白酶体积较小($40\sim70\times10^3$),大约是先前已知的 II 类 CRISPR RNA 引导酶大小的一半。Cas14 具有与 Cas12a 相似的附带切割活性,被激活后亦可非特异性切割其他 ssDNA,不同之处在于 Cas14 结合的目标序列为 ssDNA,而 Cas12 目标序列为 dsDNA。基于以上特点,建立了 Cas14-DETECTR。该平台在扩增 DNA 底物时使用含硫代磷酸酯的引物,以保护一条链不被 T7 核酸外切酶降解,从而留下可被 Cas14a 检测到的 ssDNA,实现使用 Cas14a 检测 ssDNA 病原体的目的。与 Cas12a 相比,Cas14 的识别序列没有 PAM 的限制,且 Cas14 对识别序列的特异性要求更高,因此可以建立在不受 PAM 序列约束的情况下,使用 Cas14a 高保真检测 DNA 单核苷酸多态性(SNPs)的方法。

ssDNA 病毒是已知最小的病毒之一,大量存在于人类的消化道。由于 Cas14 可以特异性识别 ssDNA,故 CRISPR-Cas14 系统可用于研究细菌和古生菌的噬菌体中的 ssDNA 对人类病毒组的贡献,这对于解释病毒与疾病的关联至关重要^[35]。

3 结论与展望

本文详细综述了多种 CRISPR/Cas 分子诊断技术在病毒核酸检测领域的最新进展与应用。相比于 PCR 等操作复杂、耗时长传统病毒检测方法,基于 CRISPR/Cas 系统的检测技术检测速度快,且特异

度、灵敏度高,不依赖复杂的仪器设备,在病毒检测中表现出了巨大的潜力和优势。近年来,具有附带切割活性的 II 类 Cas 蛋白,如 Cas12、Cas13、Cas14 等出现在公众视野,为 CRISPR 分子诊断提供了可能,这些蛋白分别可以特异性识别 dsDNA、RNA 和 ssDNA,与 Cas9 共同构成了全面且灵活多样的 CRISPR 分子诊断工具。

目前,CRISPR/Cas 分子诊断技术依然存在许多挑战以及局限性:(1)大多技术均需要借助核酸扩增技术扩增靶标以提升灵敏度,不仅增加了检测的复杂度,还容易引起气溶胶污染,造成假阳性结果^[36];(2)存在脱靶效应,sgRNA 可能会与非靶点核酸序列错配而发生错误切割,导致检测结果假阴性或者假阳性,影响对疾病的判断^[37-38];(3)sgRNA 对靶标的识别过度依赖 PAM 序列,限制了靶标区域的选择^[39];(4)需根据已知核酸序列来设计 crRNA,难以应对新型病毒等^[40]。

因此,未来 CRISPR/Cas 技术需要针对这些局限性不断进行优化和改进:(1)简化诊断程序,减少对核酸扩增技术等步骤的依赖;(2)检测及减少脱靶效应,确保检测结果的准确性;(3)降低对 PAM 序列依赖性,提高技术的适用性等。尽管目前 CRISPR/Cas 分子诊断技术面临一定挑战,但其在病毒核酸检测领域拥有突出优势,发展潜力巨大。期待后续的研究和创新将推动其在临床应用中进一步突破,为疾病的早期诊断和控制提供更有效的手段。

参考文献

- [1] VELAVAN T P, MEYER C G. The COVID-19 epidemic[J]. Trop Med Int Health, 2020, 25(3): 278-280.
- [2] AFZAL A. Molecular diagnostic technologies for COVID-19: limitations and challenges[J]. J Adv Res, 2020, 26: 149-159.
- [3] LI J, WANG Y, WANG B, et al. Application of CRISPR/Cas systems in the nucleic acid detection of infectious diseases[J]. Diagnostics (Basel), 2022, 12(10).
- [4] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821.
- [5] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356(6336): 438-442.
- [6] WENG Z, YOU Z, YANG J, et al. CRISPR-Cas biochemistry and CRISPR-Based molecular diagnostics[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2023, 62(17): e202214987.
- [7] WANG J Y, PAUSCH P, DOUDNA J A. Structural biology of CRISPR-Cas immunity and genome editing enzymes[J]. Nat Rev Microbiol, 2022, 20(11): 641-656.
- [8] FAURE G, MAKAROVA K S, KOONIN E V. CRISPR-Cas: complex functional networks and multiple roles beyond adaptive immunity[J]. J Mol Biol, 2019, 431(1): 3-20.

- [9] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems; a burst of class 2 and derived variants[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(2):67-83.
- [10] ADLER B A, TRINIDAD M I, BELLINENY-RABELO D, et al. CasPEDIA database; a functional classification system for class 2 CRISPR-Cas enzymes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(D1):D590-D596.
- [11] FREIJE C A, SABETI P C. Detect and destroy; CRISPR-based technologies for the response against viruses[J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(5):689-703.
- [12] WANG S, GAO C, ZHENG Y, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1):57.
- [13] PARDEE K, GREEN A A, TAKAHASHI M K, et al. Rapid, low-cost detection of zika virus using programmable biomolecular components[J]. *Cell*, 2016, 165(5):1255-1266.
- [14] WANG X, XIONG E, TIAN T, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(2):2497-2508.
- [15] JIAO C, SHARMA S, DUGAR G, et al. Noncanonical crRNAs derived from host transcripts enable multiplexable RNA detection by Cas9[J]. *Science*, 2021, 372(6545):941-948.
- [16] SHMAKOV S, ABUDAYYEH O O, MAKAROVA K S, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems[J]. *Mol Cell*, 2015, 60(3):385-397.
- [17] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONER-MANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. *Science*, 2016, 353(6299):aaf5573.
- [18] CALIENDO A M, HODINKA R L. A CRISPR way to diagnose infectious diseases[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(17):1685-1687.
- [19] BARNES K G, LACHENAUER A E, NITIDO A, et al. Deployable CRISPR-Cas13a diagnostic tools to detect and report Ebola and Lassa virus cases in real-time[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):4131.
- [20] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. *Science*, 2018, 360(6387):439-444.
- [21] LIU T Y, KNOTT G J, SMOCK D C J, et al. Accelerated RNA detection using tandem CRISPR nucleases[J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(9):982-988.
- [22] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2018, 360(6387):444-448.
- [23] ARIZTI-SANZ J, FREIJE C A, STANTON A C, et al. Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):5921.
- [24] ARIZTI-SANZ J, BRADLEY A D, ZHANG Y B, et al. Simplified Cas13-based assays for the fast identification of SARS-CoV-2 and its variants[J]. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(8):932-943.
- [25] ACKERMAN C M, MYHRVOLD C, THAKKU S G, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13[J]. *Nature*, 2020, 582(7811):277-282.
- [26] WELCH N L, ZHU M, HUA C, et al. Multiplexed CRISPR-based microfluidic platform for clinical testing of respiratory viruses and identification of SARS-CoV-2 variants[J]. *Nat Med*, 2022, 28(5):1083-1094.
- [27] ZETSCHE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3):759-771.
- [28] CHEN J S, MA E, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science*, 2018, 360(6387):436-439.
- [29] BROUGHTON J P, DENG X, YU G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7):870-874.
- [30] LI S, CHENG Q, WANG J, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. *Cell Discov*, 2018, 4:20.
- [31] LI L, LI S, WU N, et al. HOLMESv2; a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation[J]. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(10):2228-2237.
- [32] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(15):1492-1494.
- [33] KELLNER M J, KOOB J G, GOOTENBERG J S, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(10):2986-3012.
- [34] HARRINGTON L B, BURSTEIN D, CHEN J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. *Science*, 2018, 362(6416):839-842.
- [35] AQUINO-JARQUIN G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic[J]. *Nanomedicine*, 2019, 18:428-431.
- [36] ZHANG J, LV H, LI L, et al. Recent improvements in CRISPR-Based amplification-free pathogen detection[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12:751408.
- [37] WANG D C, WANG X. Off-target genome editing; a new discipline of gene science and a new class of medicine[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2019, 35(3):179-183.
- [38] 刁韵, 柴春霞, 王伟. CRISPR/Cas 系统在病毒检测中的应用研究进展[J]. *病毒学报*, 2023, 39(6):1693-1702.
- [39] PANDYA K, JAGANI D, SINGH N. CRISPR-Cas systems: programmable nuclease revolutionizing the molecular diagnosis[J]. *Mol Biotechnol*, 2023, 66(8):1739-1753.
- [40] 潘兴, 林永红, 杨柳, 等. CRISPR/Cas 系统在感染性疾病诊断中的应用进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2023, 44(20):2542-2548.