

• 综 述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.07.033

CRISPR/Cas 技术在病原体检测中的应用

陈逸凡¹综述,尹利民^{2△}审校

1. 昆明医科大学,云南昆明 650000; 2. 昆明市第一人民医院检验科,云南昆明 650000

关键词:分子诊断技术; CRISPR/Cas; 核酸检测; 新型冠状病毒肺炎

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)07-0981-05

1987 年在大肠埃希菌基因组中首次发现了成簇间隔短回文重复序列(CRISPR),具有切割外来入侵病毒核酸的获得性免疫功能^[1]。CRISPR 及其相关蛋白(CRISPR/Cas)系统是由编码 Cas 蛋白基因和由启动子加上重复序列与入侵核酸同源的间隔序列交替而构成^[2]。该系统的获得性免疫机制可以分为 3 个阶段:获得/适应、表达、干扰^[3]。获得阶段,首次入侵的外来核酸被 Cas1-Cas2 复合物选择并将其整合到 CRISPR 序列中,产生免疫记忆。随后表达阶段中外来核酸再次入侵,CRISPR 序列被转录成前体 CRISPR RNA(pre-crRNA),再由 Cas 蛋白或以 RNA 为底物的 RNA 水解酶(RNases)进一步加工成短的成熟的 CRISPR RNAs (crRNA)。最后的干扰阶段,成熟的 crRNA 引导 Cas 蛋白进入外来核酸,在其与靶序列结合时,Cas 蛋白识别靶序列上的原型间隔序列毗邻基序(PAM)并切割入侵核酸^[3],例如 Cas9 和 Cas12。Cas 蛋白按照其功能可以分为两大类(Class1、Class2)、六型、四十八个亚型^[4]。Class1 蛋白主要基于多亚基蛋白复合物负责采集病毒核酸,并产生免疫记忆,而 Class2 则是单效应蛋白,根据免疫记忆在 guideRNA(gRNA)或 crRNA 引导下切割再次入侵的病毒核酸,从而抵御外源性病毒入侵^[5]。Class2 包括 Cas9、Cas12、Cas13 和 Cas14,这 4 种 Cas 蛋白的性质见表 1。其中 Cas9 作为强大的基因编辑工具被广泛使用,其他则可应用于核酸检测^[6]。Cas12、Cas13 和 Cas14 主要凭借它们的“附带切割”能力进行核酸检测,即在 crRNA 与靶序列结合后激活 Cas 蛋白,从而对非靶向的核酸片段进行切割使得检测信号放大,达到检测目的。

表 1 Class2 Cas 蛋白的性质

Cas 蛋白	靶标	PAM	附带切割活性
Cas9	dsDNA, ssDNA, ssRNA	5'NGG	无
Cas12	dsDNA	5'TTN	有
Cas13	ssDNA	3'A、U 或 C	有
Cas14	ssRNA	无须 PAM 激活	有

目前经常应用于临床的病原体检测方法多为基

于聚合酶链反应(PCR)的分子检测方法,但是在临床实际应用中仍存在费用昂贵、对环境设备要求高、操作人员专业性要求高等问题。因此,开发出价格低廉、快速准确的病原体检测方法,是当前病原体诊断的主要挑战^[7]。基于 CRISPR/Cas 的病原体检测技术不断发展,以其灵敏度和特异度高、可操作性强等优点,有望成为理想的病原体核酸检测技术。

1 基于靶向 DNA 的 CRISPR/Cas 技术

1.1 Cas12 Cas12a 属于 Class2 中的 V 型蛋白,也被称为 Cpf1,在一个富含 T PAM 的 crRNA 引导下识别裂解双链 DNA(dsDNA)或单链 DNA(ssDNA)^[8]。而 Cas12a 有 RuvC 结构可以切割靶标和非靶标 dsDNA^[9],与 Cas13 一样具有“附带切割”能力。2018 年,CHEN 等^[10]利用 LbCas12a 与重组酶聚合酶扩增(RPA)技术结合开发出 DETECTR 平台,成功在阿摩尔灵敏度水平快速检测出人乳头瘤病毒(HPV)16 型和 18 型。该平台不需要将扩增后的 DNA 产物再转录为 RNA,因此,将检测时间缩短到 1 h 内。同年,LI 等^[11]利用 Cas12a 的“附带切割”能力识别并切割非靶向 ssDNA,开发出 HOLMES 核酸检测平台,该平台检测乙脑病毒虽然具有较高的灵敏度和特异度,但其核酸扩增和靶向检测是两个独立的步骤,增加了交叉污染的风险。次年,为改善这一问题,LI 等^[12]开发出了 HOLMESv2 平台,将嗜热蛋白 Cas12b 与环介导等温扩增(LAMP)技术结合,实现了核酸扩增和靶向检测一步化,从而达到简化步骤、避免污染的目的。TENG 等^[13]同样利用 Cas12b 开发出了 CDetection 平台,研究表明该方法可以在 1 阿摩尔浓度人血浆中检测出 HPV DNA 的存在,达到亚阿摩尔水平灵敏度和单碱基分辨特异度。WANG 等^[14]将 RPA 技术与 Cas12a 相互分隔集成到一个反应容器中,开发出 Cas12aVDet 可视化核酸检测平台,先进行 RPA 反应再加入 Cas12a,从而实现一步式检测,可检测出细胞培养中的支原体污染。

除了与各种核酸扩增技术结合,CRISPR/Cas12 还可以与各种传感器相结合,进一步拓宽了 CRISPR 的应用。DAI 等^[15]开发出了一个基于 Cas12a 的电化学生物传感器(E-CRISPR),由于该平台为 Cas12a 在体外反向裂解创造了优越的电化学环境,没有任何酶

△ 通信作者,E-mail:ylmbj@163.com。

本文引用格式:陈逸凡,尹利民. CRISPR/Cas 技术在病原体检测中的应用[J]. 检验医学与临床,2022,19(7):981-985.

扩增,所以在 HPV16 和细小病毒 B19 检测中检测限达到了皮摩尔水平。E-CRISPR 有望成为精准、便携的即时检测诊断系统。

1.2 Cas14 2018 年有研究发现了 Cas14 蛋白,并将其作为 DETECTR 的一个辅助工具,开发出了 Cas14-DETECTR^[16]。Cas14 蛋白由 400~700 个氨基酸组成,体积只有其他 Cas 蛋白的一半。它同 Cas12、Cas13 一样具有“附带切割”能力,能够裂解 ssDNA,且它不需要 PAM 激活。Cas14-DETECTR 平台可应用于高保真单核苷酸多态性(SNP)基因分型和高灵敏度单链 DNA 病原体检测方法的研发,但目前还没有用 Cas14-DETECTR 平台进行检测病原体的报道^[6]。

2 基于靶向 RNA 的 CRISPR/Cas 技术

Cas13a 属于 Class2 中的 VI 型蛋白,也被称为 C2c2,只需要在 crRNA 的引导下靶向切割靶标单链 RNA(ssRNA)或非靶标 ssRNA^[5]。研究表明,Cas13a 还有双重酶活性,能够加工 crRNA 前体使其成为成熟的 crRNA^[17]。2017 年,GOOTENBERG 等^[18]将 Cas13a 与 RPA 技术结合开发出了 SHERLOCK 核酸检测系统。该系统原理是 dsDNA 通过 RPA 技术进行扩增,扩增后产物用 T7 聚合酶转录成靶 ssRNA,ssRNA 与 crRNA 互补配对,并激活 Cas13a 进行附带切割报告基团,使其释放荧光信号,见图 1。SHERLOCK 在检测寨卡病毒和登革热病毒

特异株中表现出较高的灵敏度和特异度,标志着 CRISPR/Cas 诊断技术的正式建立。为改善该系统缺乏量化、依赖荧光检测设备读取结果等局限性,进一步开发出了 SHERLOCKv2^[19]。首先,SHERLOCKv2 同时运用 LwaCas13a、CcaCas13b、As-Cas12a、PsmCas13b 实现四通道多重分析。根据不同 crRNA 与相应的 Cas 蛋白结合,切割不同的核酸,建立了 4 个颜色不同的荧光通道。其次,找到了合适的引物水平,并引入 Csm6 与 Cas13 耦联,使灵敏度达到阿摩尔水平,检测信号增强。最后,将结果读取方式改为金标层析格式,将荧光素和淬灭剂换成 FAM 和生物素(biotin)。当报告 RNA 没有被切割时,形成金纳米颗粒-FAM 抗体-FAM-RNA-biotin 耦合物,只出现第一条线。而报告 RNA 被切割时,形成金纳米颗粒-FAM 抗体-FAM 释放,进一步出现第二条线。这种方式类似于人绒毛膜促性腺激素(HCG)早孕试纸,检测方便、快速,有助于该系统在非医院环境中的使用。2018 年,HUDSON 技术被发明^[20]。HUDSON 技术通过加热法和化学还原法先灭活核酸酶再灭活病毒颗粒,从而使 SHERLOCK 可直接从患者体液标本中分析采集读取信号。“HUDSON+SHERLOCK”的设计实现了所有反应均在一个容器内进行,不需要提取和纯化,并且结果读取使用荧光或金标均可。这对于病原体实现即时检测有着重要意义。

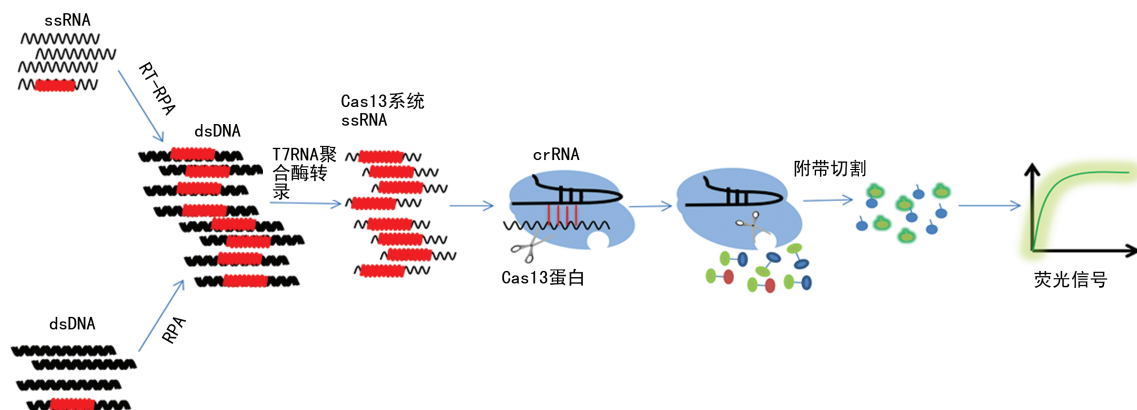


图 1 SHERLOCK 检测原理示意图

随后,基于 Cas13 的病原体检测方法的研究被大量报道。LIU 等^[21]利用 LwCas13a 的纳米机制和便携式荧光探测器成功快速检出甲型禽流感病毒。QIN 等^[22]运用 Cas13a 识别并切割埃博拉病毒 RNA 后,引入微流控技术开发出了基于 CRISPR 的自动化多通路微流控检测平台。由于该平台体积小,灵敏度高,没有复杂的操作步骤,因此很适合用于埃博拉病毒流行、资源匮乏的发展中国家。ACKERMAN 等^[23]将微流体技术引入 Cas13 检测系统开发出 CARMEN-Cas13 高通量多通路病原体检测平台。该平台可同时检测 169 种不同的人类相关病毒和十几种人类免疫缺陷病毒耐药突变株,灵敏度可达阿摩尔

水平,与 SHERLOCK 和基于 PCR 的方法灵敏度相当。

3 基于靶向 DNA 或 RNA 的 CRISPR/Cas 技术

Cas9 蛋白属于 Class2 的 II 型蛋白,在由反式激活 crRNA(tracrRNA)和成熟 crRNA 整合形成的单向导 RNA(sgRNA)引导下,识别靶 dsDNA 上的 PAM 并特异性切割 dsDNA^[24-25]。当靶 ssDNA 或 ssRNA 存在起 PAM 作用的寡核苷酸时,sgRNA/Cas9 同样可以切割 ssDNA 和 ssRNA^[7]。2016 年,PARDEE 等^[26]将 CRISPR/Cas9 与核酸依赖性扩增检测(NASBA)技术结合开发出了 NASBACC 平台,这也是 CRISPR/Cas 技术在核酸检测中的首次亮相,

用于检测非洲和美国寨卡病毒变异体,该平台利用 Cas9 对寨卡病毒 RNA 经 NABSA 扩增并反转录而产生的 dsDNA 进行特异性切割,再通过纸基传感器实现结果可视化判读。该研究表明 NASBACC 平台具有检测基因突变的能力,可适应病毒的不断变异^[26]。HUANG 等^[27]利用 Cas9 切割和 NEase 介导的核酸扩增开发出一种新的 CRISPR/Cas9 触发等温指数扩增(CAS-EXPAR)反应,结合 SYBR GREEN 荧光显色,用于快速、位点特异性核酸检测。该平台能够在阿摩尔水平单碱基分辨率下成功在 1 h 内检测出李斯特菌。

没有切割活性的 Cas9(dCas9)依然具有识别能力,同样可应用于病原体检测。2016 年,ZHANG 等^[28]在成对的两个 dCas9 上连接荧光素酶,分别位于一个 dCas9 的 N 端和另一个 dCas9 一半的 C 端。这对 dCas9 在 sgRNA 的引导下,识别并结合到靶 DNA 上下游,使荧光酶重组发出荧光信号。该方法在结核分枝杆菌的检测中表现出良好的灵敏度及特异度。2017 年,GUK 等^[29]采用 CRISPR 介导 DNA-FISH 方法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,该方法使用 dCas9/sgRNA 复合物作为靶向材料,SYBRGreenI (SGI)为荧光探针。由于不需要细胞裂解进行基因分离步骤,所以该方法可以在 30 min 内灵敏地检测靶基因,而且通过改变 sgRNA 序列从而适用于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌以外的任何靶点。2019 年,HAJIAN 等^[30]将 CRISPR/Cas9 与石墨烯场效应晶体管(gFET)技术结合,开发出了 CRISPR-Chip 平台。该平台将 dCas9 固定在石墨烯晶体管上,并与 sgRNA 形成 dRNP 复合物,识别结合靶序列并产生电化学信号。该方法不需要扩增技术,简化了检测使用的仪器和操作步骤。

4 总结与展望

上述基于 CRISPR/Cas 的病原体检测方法,证明了该系统不仅是强大的基因编辑工具,还对病原体分子诊断方法的发展进步作出了巨大贡献。截至 2021 年 6 月 22 日,全球报告新型冠状病毒肺炎病例数量超过 1.77 亿,死亡人数超过 385 万^[31]。实现 COVID-19 的快速准确诊断成为控制疫情的关键,但目前基于 PCR 的检测方法的准确度和效率依赖于标本采集部位是否存在足够数量的病毒,因此,急需开发出一种精确、快速、简便的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)检测方法^[32]。研究表明,基于 CRISPR/Cas 方法在病原体核酸检测方面表现出色,一定程度上可以弥补传统 PCR 检测方法的缺陷,有望成为理想的诊断方法^[33]。AZHAR 等^[34]应用 Cas9 的同源物 FnCas9 开发了 FELUDA 平台,该平台拥有与金标准 qRT-PCR 相同的准确度,可广泛应用于病原体的单核苷酸变体和核酸序列检测。BROUGHTON 等^[35]将 DETECTR 与 RT-LAMP 技术结合开发出了一快速可视化的实时 RT-PCR 替代方法,总用时只需 30~40 min,检测限低至 10 copy/ μ L。JOUNG 等^[36]将

SHERLOCK Cas12b 同样与 LAMP 结合开发出 STOP 平台,用于 SARS-CoV-2 的检测,被称为 STOPCovid。该平台的优势是不需要进行样品提取,并且可以像 HCG 试纸一样简单可视化读取结果,从而简化流程,减少污染,精准检测。在疫情暴发后,ACKERMAN 等^[23]在 CARMEN-Cas13 的冠状病毒板中加入了 SARS-CoV-2,该平台用单个 mChip 可检测 400 多份标本。这种可扩展的高通量多通路病原体检测平台极大地帮助了传染性疾病的诊断和疫情的防控。

CRISPR/Cas 系统在保证其灵敏度和特异度的同时,还具有不需要复杂的核酸提取、检测时间短、易于操作、不需要昂贵的设备和专业的实验环境等优点。尽管 CRISPR/Cas 系统在病原体检测中表现优秀,但该系统仍然存在有待解决的问题:第一,脱靶效应可导致假阴性结果。脱靶效应指设计的 sgRNA 会与非靶点 DNA 序列错配引起非预期的基因突变^[37]。脱靶效应主要发生在基于 Cas9 的检测方法中,通过优化 sgRNA 的设计和开发高保真的 Cas9 变体可以有效减少甚至避免脱靶效应。第二,识别靶位点依赖于 PAM 序列。不同的 Cas 蛋白识别不同的 PAM 序列,从而在增加检测系统特异性的同时降低了 sgRNA 设计的灵活性,增加了实验设计的难度。第三,大多数基于 CRISPR/Cas 的检测方法都需要核酸扩增技术。有的结合 RPA 技术,有的运用 LAMP 技术,虽然较 PCR 技术简单但是仍阻碍了即时检测的实现。第四,sgRNA 易被核酸酶缩短或降解。第五,目前大多数运用该系统的检测方法还无法实现像 SHERLOCKv2 一样的高通量多病原体检测。

未来应进一步研究和发现更多适用于病原体分子诊断的新 Cas 蛋白,从而使 CRISPR 工具更加多样化,同时也可以加入新材料或进一步优化信号放大系统真正实现一步化检测。CRISPR/Cas 系统还应进一步与其他技术平台结合,如与计算机领域结合开发出适用于个人通信设备的软件或系统,方便数据的储存与及时上传,从而步入完全的即时检测时代。

总之,基于 CRISPR/Cas 系统的病原体检测方法虽然存在着一些有待解决的问题,但凭借其方便、快速、准确等优势,它仍然是目前最具潜力的病原体分子诊断工具。

参考文献

- [1] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in escherichia coli, and identification of the gene product[J]. J Bacteriol, 1987, 169 (12): 5429-5433.
- [2] WIEDENHEFT B, STERNBERG S H, DOUDNA J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. Nature, 2012, 482(7385): 331-338.
- [3] HILLE F, RICHTER H, WONG S P, et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward[J]. Cell, 2018, 172

- (6):1239-1259.
- [4] 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.
 - [5] 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.
 - [6] AMAN R, MAHAS A, MAHFOUZ M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies[J]. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(6):1226-1233.
 - [7] 冯春风, 王云霞, 蒲晓允, 等. 基因魔剪 CRISPR/Cas: 核酸精准检测的新宠和利器[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(3):257-261.
 - [8] LI S Y, CHENG Q X, LIU J K, et al. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA[J]. *Cell Res*, 2018, 28(4):491-493.
 - [9] SWARTS D C, VAN DER OOST J, JINEK M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a[J]. *Mol Cell*, 2017, 66(2):221-233.
 - [10] 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.
 - [11] LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. *Cell Discov*, 2018, 4:20.
 - [12] 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.
 - [13] TENG F, GUO L, CUI T, et al. CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity[J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1):132.
 - [14] WANG B, WANG R, WANG D, et al. Cas12aVDet: a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(19):12156-12161.
 - [15] DAI Y, SOMOZA R A, WANG L, et al. Exploring the trans-cleavage activity of CRISPR-Cas12a (cpf1) for the development of a universal electrochemical biosensor[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(48):17399-17405.
 - [16] 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.
 - [17] EAST-SELETSKY A, O'CONNELL M R, KNIGHT S C, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection[J]. *Nature*, 2016, 538(7624):270-273.
 - [18] 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.
 - [19] 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.
 - [20] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2018, 360(6387):444-448.
 - [21] LIU Y, XU H, LIU C, et al. CRISPR-Cas13a nanomachine based simple technology for avian influenza A (H7N9) virus on-site detection[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2019, 15(4):790-798.
 - [22] QIN P, PARK M, ALFSON K J, et al. Rapid and fully microfluidic ebola virus detection with CRISPR-Cas13a[J]. *ACS Sens*, 2019, 4(4):1048-1054.
 - [23] ACKERMAN C M, MYHRVOLD C, THAKKU S G, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13[J]. *Nature*, 2020, 582(7811):277-282.
 - [24] JIANG F, DOUDNA J A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms[J]. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46:505-529.
 - [25] KONERMAN S, BRIGHAM M D, TREVINO A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex[J]. *Nature*, 2015, 517(7536):583-588.
 - [26] 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.
 - [27] HUANG M, ZHOU X, WANG H, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(3):2193-2200.
 - [28] ZHANG Y, QIAN L, WEI W, et al. Paired Design of dCas9 as a systematic platform for the detection of featured nucleic acid sequences in pathogenic strains[J]. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(2):211-216.
 - [29] GUK K, KEEM J O, HWANG S G, et al. A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 95:67-71.
 - [30] HAJIAN R, BALDERSTON S, TRAN T, et al. Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor[J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(6):427-437.
 - [31] World Health Organization. Weekly epidemiological update on COVID-19-22 June 2021[EB/OL]. (2021-06-22) [2021-07-15] <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---22-june-2021>.
 - [32] XIANG X, QIAN K, ZHANG Z, et al. CRISPR-cas systems based molecular diagnostic tool for infectious diseases and emerging 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia[J]. *J Drug Target*, 2020, 28(7/8):727-731.
 - [33] 赵爽, 陈鸣. CRISPR/Cas 系统在感染性疾病诊断中的应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 44(2):83-88.
 - [34] AZHAR M, PHUTELA R, KUMAR M, et al. Rapid and accurate nucleobase detection using FnCas9 and its application in COVID-19 diagnosis[J]. *Biosens Bioelectron*,

2021,183;113207.

[35] 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.

[36] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics[J]. medRxiv, 2020, 2020: 32511521.

[37] MANGHWAR H, LI B, DING X, et al. CRISPR/Cas systems in genome editing: methodologies and tools for sgRNA design, off-target evaluation, and strategies to mitigate off-target effects[J]. Adv Sci (Weinh), 2020, 7(6): 1902312.

(收稿日期: 2021-10-16 修回日期: 2022-01-09)

• 综 述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.07.034

血清学指标检测在胃癌诊断中的研究进展

林煜展 综述, 朱钱迎[△]审校

温州医科大学附属第三医院检验科, 浙江温州 325200

关键词: 血清学检测; 胃癌诊断; 筛查; 预测

中图分类号: R446.1; R446.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)07-0985-03

胃癌是全球第五大常见癌症,也是第三大癌症死亡原因^[1]。2019 年我国胃癌死亡人数为 421 539 例^[2]。早期胃癌患者术后生存率高达 90%,而进展期胃癌预后差,5 年生存率低于 30%^[3]。因此,寻找有效的胃癌血清分子标记物对于早期胃癌的筛查、诊断、治疗显得尤为重要。胃镜对于胃癌的诊断有着重要的作用,但该方法对患者有创,且操作时间长,无法大规模筛查无症状的高危人群。临床上虽有许多胃癌相关的血清学指标,如胃蛋白酶原(PG)、胃泌素-17(G-17)、糖类抗原(CA)724、癌胚抗原(CEA)、CA19-9、CA12-5 等,但由于缺乏特异性,极少用于临床诊断。近年来,有研究报道了相关学者通过分子免疫学技术对胃癌进行早期诊断、预后评估^[4]。笔者通过阅读大量国内外文献,对现阶段的新型胃癌血清学指标做一综述,为临床提供有效参考。

1 常规实验室项目

常规血清学检查包括 PG、G-17、幽门螺杆菌抗体检测,被广泛应用于临床^[5]。

1.1 PG PG 分为 PG I 型和 PG II 型,PG I 型由主细胞与黏液颈细胞分泌,PG II 型由幽门腺与 Brunner 腺分泌,二者比值被发现与胃癌癌前病变,如萎缩性胃炎和肠上皮细胞化生存在相关性^[5]。现普遍认为 PG 参考值为 PG I ≤ 70 ng/mL、PG I / PG II (PG 比值) ≤ 3,二者的灵敏度与特异度分别为 66.7%~84.6%和 73.5%~87.1%,许多国家已将 PG 设为筛查胃癌的主要手段^[6-7]。一位日本学者的 Meta 分析发现,PG 试验阳性者患胃癌的风险是 PG 试验阴性者的 4 倍,同时该学者还提出联合 PG 与血清幽门螺杆菌抗体对具有患胃癌的高风险人群进行筛查在中年人群中有着重要的诊断价值^[8]。将多个与疾病关联性强的临床指标结合,可加强对疾病诊断的准

确度。

1.2 G-17 G-17 由胃窦部 G 细胞分泌,释放于血液或组织中,可调节胃酸的分泌及胃黏膜细胞的生长,血清 G-17 水平取决于胃内酸度和胃窦中 G 细胞的数量。胃酸分泌过多或萎缩性胃炎患者的空腹 G-17 水平较低,其在血液中的水平可反映胃黏膜相关疾病的严重程度。G-17 在不同胃相关疾病中的分泌量不同,在胃癌患者中发现有明显的升高,在萎缩性胃炎中 G-17 分泌量较胃癌少。有报道称,联合血清 PG 后,血清 G-17 可以诊断一些局限于胃窦(即低 G-17 水平)或胃体(即高 G-17 水平)的癌前病变^[8]。G-17 的分泌还受饮食影响,如在血清检测前摄入了富含蛋白质的食物,可引起胃的 G-17 分泌升高,可以此来作为区别 G-17 分泌下降的原因,从而提高 G-17 在疾病诊断中的作用。我国常用的 G-17 参考值为 G-17 > 7 pmol/L,其诊断胃癌的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和准确度分别为 59.31%、70.59%、68.54%、30.95% 和 88.65%^[9]。当 G-17 > 15 pmol/L 时,其水平与胃癌的癌前病变有着高度的相关性,G-17 在诊断萎缩性胃炎时有重要的作用,但在疾病进展的后期 G-17 的作用较之前减弱。

1.3 血清幽门螺杆菌抗体检测 血清幽门螺杆菌抗体(IgG、IgM)是人体针对幽门螺杆菌产生的一类免疫性抗体,对诊断既往感染或现症感染有着重要的作用,同时也可以为治疗相关疾病提供事实依据。幽门螺杆菌感染是引起慢性胃炎、胃癌的主要原因之一。全球近半数人口存在幽门螺杆菌感染,幽门螺杆菌与胃炎、胃溃疡、胃癌等的发生有密切的关系,有数据显示血清幽门螺杆菌抗体阳性者患胃癌风险是幽门螺杆菌抗体阴性者的 3 倍^[9]。同时也有报道发现,幽门螺杆菌与低度恶性胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤

[△] 通信作者, E-mail: 1016099047@qq.com。

本文引用格式: 林煜展, 朱钱迎. 血清学指标检测在胃癌诊断中的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(7): 985-987.