

DOI:10.13350/j.cjpb.221122

• 临床研究 •

多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染的临床特征及疗效分析

毛沛沛*, 乔莎, 贺莹

(南阳市中心医院血液内科, 河南南阳 473000)

【摘要】 **目的** 探讨和研究多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染的临床特征及常用真菌抗生素疗效。 **方法** 回顾性分析参与本次研究患者的基本资料,分析多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染患者的发病率、感染部位、临床症状及病原学检出情况。对比分析米卡芬净治疗组与两性霉素 B 治疗组两组患者的治疗效果及不良反应发生率。 **结果** 2017年1月-2021年12月,518例多发性骨髓瘤患者中21例并发侵袭性真菌感染,主要为DS-Ⅲ期,IgG-λ型,拟诊14例,G实验阳性11例。多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染的五年平均发病率为4.05%,2017-2021年发病率分别为2.11%、2.97%、5.62%、4.46%和4.96%,逐年递增,其中2019年发病率最高。21例并发侵袭性真菌感染患者,80.95%为单器官感染,主要为肺部感染。95.24%患者出现发热症状,不同部位侵袭性真菌感染患者,其临床症状不同。采集21例并发侵袭性真菌感染患者的分泌物标本,共分离菌株24株,主要为白色念珠菌和曲霉菌。不同标本的检出率不同,其中痰液标本的检出率最高,为71.43%。对比分析接受米卡芬净与两性霉素 B 治疗的患者情况,两组治疗效果无差异,两组不良反应发生率差异有统计学意义($P < 0.05$)。 **结论** 多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染患者主要为 IgG-λ 型,五年平均发病率为 4.05%,多发生于肺部,以白色念珠菌感染为主。米卡芬净与两性霉素 B 对多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染的治疗有效率均高于 70%,两性霉素 B 不良反应高于米卡芬净。

【关键词】 多发性骨髓瘤;并发侵袭性真菌感染;临床特征;治疗效果

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)11-1345-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Nov. ;17(11):1345-1348, 1355.]

Clinical characteristics and therapeutic effect of multiple myeloma complicated with invasive fungal infection

MAO Pei-pei, QIAO Sha, HE Ying (Department of Hematology, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China)*

【Abstract】 **Objective** To investigate the clinical characteristics of multiple myeloma complicated with invasive fungal infection and the efficacy of commonly used fungal antibiotics. **Methods** The basic data of the patients participating in this study were retrospectively analyzed, and the incidence rate, infection site, clinical symptoms and pathogenic detection of patients with multiple myeloma complicated with invasive fungal infection were analyzed. The therapeutic effect and adverse reaction rate of micafungin treatment group and amphotericin B treatment group were compared and analyzed.

Results From January 2017 to December 2021, 21 of 518 multiple myeloma patients were complicated with invasive fungal infection, mainly DS - III, IgG- λ Type A, 14 cases were suspected, 11 cases were G test positive. The five-year average incidence rate of multiple myeloma complicated with invasive fungal infection is 4.05%, and the incidence rate from 2017 to 2021 is 2.11%, 2.97%, 5.62%, 4.46% and 4.96% respectively, increasing year by year, with the highest incidence rate in 2019. Among 21 patients with invasive fungal infection, 80.95% were single organ infection, mainly pulmonary infection. 95.24% patients had fever symptoms, and the clinical symptoms of patients with invasive fungal infection in different parts were different. The secretion samples of 21 patients with invasive fungal infection were collected. A total of 24 strains were isolated, mainly *Candida albicans* and *Aspergillus*. The detection rate of different specimens was different, and the detection rate of sputum specimen was the highest, 71.43%. Comparative analysis of patients receiving micafungin and amphotericin B treatment showed that there was no significant difference between the two treatment groups in terms of treatment effect ($P > 0.05$), and there was a significant difference in the incidence of adverse reactions between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Multiple myeloma patients with invasive fungal infection are mainly IgG-λ The five-year average incidence rate was 4.05%, mostly occurred in the lungs, mainly C.

* **【通讯作者(简介)】** 毛沛沛(1983-),女,山东临沂人,硕士,主治医师,研究方向:多发性骨髓瘤,淀粉样变性,淋巴瘤等血液系统疾病。
E-mail: dtt12955@21cn.com

albicans infection. The effective rate of micafungin and amphotericin B in the treatment of multiple myeloma with invasive fungal infection was higher than 70%, and the adverse reaction of amphotericin B was higher than micafungin.

【Key words】 Multiple myeloma; invasive fungal infections; clinical features; treatment effect

多发性骨髓瘤(Multiple myeloma, MM)是仅次于淋巴瘤发生率的血液系统恶性肿瘤,属于血液系统原发性浆细胞性肿瘤。据相关研究报告显示,2016年我国多发性骨髓瘤患者的发病率约为1.03/10万人^[1]。多发性骨髓瘤患者多为中老年人,以贫血、病理性骨折、并发感染、血小板减少等为主要临床症状,对患者的生理及心理造成严重影响^[2-3]。多发性骨髓瘤患者,由于其瘤细胞合成大量单克隆免疫球蛋白,自身体液免疫功能遭到严重损害,导致其免疫防御功能低下,从而容易引发侵袭性真菌感染(Invasive Fungal Infections, IFI)。多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染患者,通常引发多个器官出现并发症,甚至威胁患者生命健康。研究显示,近年来并发侵袭性真菌感染的发病率逐年上升,50%~80%的患者发生呼吸道、泌尿道及血液感染^[4]。

本研究通过分析21例多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染患者的发病率、感染部位、临床症状及病原学检出情况,对比分析米卡芬净治疗组与两性霉素B治疗组两组患者的治疗效果及不良反应发生率,以期有多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染患者的早期诊断及临床个体化用药提供参考依据。

材料与方法

1 研究对象

选取2017年1月~2021年12月,于本院进行住院治疗的518例多发性骨髓瘤患者。男性349例,女性169例。中位年龄42岁,年龄21~79岁。按照多发性骨髓瘤DS(Durie-Salmon)分期标准,可分为DS-I期46例,DS-II期140例,DS-III期332例。按照《血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第六次修订版)》标准^[5],多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染患者21例。

2 诊断与纳入标准

2.1 多发性骨髓瘤诊断标准 符合《中国多发性骨髓瘤诊治指南(2015年修订)》中的诊断标准^[6]:①骨髓单克隆浆细胞比例高于10%,组织活检可检测到有浆细胞瘤;②使用琼脂糖凝胶免疫固定电泳技术可在尿液或血液中检测出单克隆M蛋白;③靶器官出现损害表现(CRAB),矫正血清钙高于2.75 mmol/L,肾功能损害,贫血,通过影像学检查显示溶骨性破坏;④无靶器官损害表现,但指标异常(SLiM),骨髓单克隆浆细胞比例高于60%,受累/非受累血清游离轻链比高于

100, MRI检查出现5 mm以上局灶性骨质破坏。

2.2 IFI的诊断标准 根据患者临床特征、肺部影像学结果、痰培养结果、真菌涂片镜检、G实验及GM实验结果等确诊,符合《血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第六次修订版)》标准^[5]。诊断分为三个级别:确诊、临床诊断、拟诊。

2.3 纳入标准 ①初诊患者;②符合上述多发性骨髓瘤诊断标准;③符合并发侵袭性真菌感染标准;④既往病史无真菌感染者;⑤自愿参与本次研究者。

2.4 排除标准 ①临床资料缺失者;②妊娠期者;③年龄不满18岁者;④不明确其他类浆细胞疾病;⑤复发患者;⑥伴其他系统恶性肿瘤类危重症者;⑦伴其他感染性疾病者。

参与本次研究的患者,均已签署知情同意书,经过我院伦理会审核通过。

3 GM实验及G实验

3.1 GM实验 采集患者肘静脉血3~5 ml, 3 000 r/min(离心半径8.7 cm)离心10 min,取上清液加入处理液混匀,经加热后1 000 r/min离心10 min。取上清液与结合液各50 μL加入酶标板中,孵育60 min后加入100 μL酶标抗体。孵育40 min后加入100 μL显色液,再次孵育20 min,加入终止液,于波长450 nm下读取检测值并计算血清中半乳甘露聚糖抗原水平。

3.2 G试验 采集患者肘静脉血3~5 ml, 3 000 r/min离心10 min,取上清液加入处理液混匀,经加热后1 000 r/min离心10 min。经冷却后,加入酶反应主剂,插入MB-80微生物快速动态监测系统(北京金山川公司)计算(1,3)-β-D-葡聚糖水平。

4 真菌培养与检测

当患者出现发热等感染症状使用常规消炎药无效时疑似真菌感染,采集患者痰液、咽拭子、尿液(晨尿)、肺泡灌洗液、血液(静脉外周血10 ml)、粪便(挑取有脓血或粘液部分)、其他分泌物等标本。采用划线法接种于琼脂培养基,于37℃培养24~48 h,经染色后于高倍镜下观察,参考相关文献标准对检测结果进行判定^[7]。

5 分组治疗方案

依据《血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第六次修订版)》标准^[3],按照预防治疗、经验治疗、诊断驱动治疗及目标治疗的策略进行治疗。将21例IFI患者分为两组。一组采用米卡芬净治疗,100 mg/d静脉滴注,监测肝肾功能情况。合并

细菌感染者给予联合抗生素治疗。用药2周后,改用口服或继续静脉注射。另一组采用两性霉素B,注射前使用3~5 mg地塞米松,初始剂量为0.1 mg/d,每日逐渐递增至3 mg/d,平均用药10 d。

6 疗效标准

①好转,临床症状减轻,肺部阴影仍存在;②痊愈,临床症状消失,肺部阴影吸收;③无效,临床症状与肺部阴影无变化;④恶化,临床症状及肺部阴影加重;⑤有效包括痊愈及好转。

7 统计分析

采用SPSS 25.0对患者资料进行统计分析,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般资料

21例IFI患者,男性患者13例(61.90%),女性患者8例(38.10%)。中位年龄64岁,年龄范围52~79岁。按照DS分期标准,2例为DS-I期,5例为DS-II期,14例为DS-III期。按照血清M蛋白特点分型,其中IgG- λ 型9例,IgG- κ 7例,IgA- λ 2例,IgA- κ 2例,轻链型1例。21例IFI患者中,确诊3例(14.29%),临床诊断4例(19.05%),拟诊14例(66.66%)。其中,G实验阳性11例,阳性率52.38%,GM实验阳性7例,阳性率33.33%。

2 MM患者IFI的发病率

本次研究中,518例MM患者,其中21例并发侵袭性真菌感染,发病率为4.05%。2017年,MM患者95例,2例诊断为IFI,占2.11%;2018年,MM患者101例,3例诊断为IFI,占2.97%;2019年,MM患者89例,5例诊断为IFI,占5.62%;2020年,MM患者112例,5例诊断为IFI,占4.46%;2021年,MM患者121例,6例诊断为IFI,占4.96%。

3 感染部位分布及临床症状

3.1 感染部位分布 21例IFI患者中,单器官感染17例(80.95%),其中肺部感染10例(47.62%),肠道感染3例(14.29%),食道感染1例(4.76%),血流感染1例(4.76%),中枢神经感染2例(9.52%)。多器官感染4例(19.05%),其中肺、肾感染,肺、鼻窦感染,肺、中枢神经系统,肺、肝、肾感染均为1例(均为4.76%)。

3.2 临床症状 21例IFI患者中,20例出现发热(95.24%)。10例肺部IFI患者,10例发生咳嗽(100.00%),10例出现胸闷(100.00%),9例出现咳痰(90.00%),3例出现气促(30.00%),2例发生咯血(20.00%),2例出现双肺哮鸣音(20.00%),1例出现呼吸衰竭(10.00%)。3例肠道IFI患者,3例出现腹

泻(100.00%),2例出现腹痛(66.67%)。2例中枢神经IFI患者,2例出现头痛(100.00%),1例发生呕吐(50.00%)。不同部位IFI患者临床症状不同(表1)。

表1 不同部位IFI患者临床症状分布情况
Table 1 Distribution of clinical symptoms in patients with IFI at different sites

感染部位 Infection site	感染后临床表现 Clinical manifestations	病例数 Number of cases
肺部	咳嗽	10
	胸闷	10
	咳痰	9
	气促	3
	咯血	2
	双肺哮鸣音	2
	呼吸衰竭	1
肠道	腹泻	3
	腹痛	2
食道	胸骨后烧灼感	1
血流	扁桃体肿大	1
中枢神经	头痛	2
	呕吐	1
肺、肾	咯血	1
肺、鼻窦	上颌窦压痛	1
肺、中枢神经系统	呕吐	1
肺、肝、肾	肾衰竭	1

4 病原学检出情况

21例IFI患者,采集其痰液、咽拭子、肺泡灌洗液、尿液、血液、粪便、其他分泌物进行真菌培养,共送检标本64份,分离菌株24株,分别为白色念珠菌12株(50.00%),光滑念珠菌2株(8.33%),热带念珠菌1株(4.17%),克柔念珠菌1株(4.17%),光滑假丝酵母菌1株(4.17%),丝状真菌1株(4.17%),曲霉菌4株(16.67%),毛霉菌2株(8.33%)。其中痰液标本21份,检出菌株15株,检出率71.43%。咽拭子标本12份,检出菌株3株,检出率25.00%。肺泡灌洗液标本10份,检出菌株2株,检出率20.00%。血液标本12份,检出菌株1株,检出率8.33%。粪便标本5份,检出菌株1株,检出率20.00%。其他分泌物标本4株,检出菌株2株,检出率为50.00%。痰标本与血液标本真菌检出率差异有统计学意义($P < 0.05$)。

5 不同药物治疗效果对比分析

21例IFI患者,11例给予米卡芬净治疗,10例给予两性霉素B治疗。对比两组患者的性别、骨髓瘤类型、IFI类型、IFI感染部位,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表2)。米卡芬净组,8例治疗有效,有效率为72.73%。两性霉素B组,7例治疗有效,有效率为70.00%。两组治疗效果对比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。米卡芬净组,2例患者发生不良反应,发生率18.18%。1例出现恶心、呕吐,胃肠道反应。1例出现寒战高热。两性霉素B组,4例患者发生不良反

应,发生率 40.00%。2 例出现恶心、呕吐,胃肠道反应。1 例发生肾衰竭。1 例出现肝功酶学升高。两组不良反应发生率差异有统计学意义($P < 0.05$ (表 3))。

表 2 米卡芬净组与两性霉素 B 组患者资料对比
Table 2 Comparison of data between micafungin group and amphotericin B group

一般情况 General	米卡芬净组 Micafungin group	两性霉素 B 组 Amphotericin B group	P	
性别	男 女	7 4	6 4	>0.05
多发性骨髓瘤 类型	IgG-λ 型	5	4	
	IgG-κ 型	4	3	
	IgA-λ 型	1	1	>0.05
	IgA-κ 型	1	1	
	轻链型	0	1	
IFI 类型	确诊	2	1	>0.05
	临床诊断	2	2	
	拟诊	7	7	
IFI 感染部位	肺部	5	5	>0.05
	肠道	2	1	
	食道	1	0	
	血流	0	1	
	中枢神经	1	1	
	肺、肾	1	0	
	肺、鼻窦	0	1	
	肺、中枢神经系统	0	1	
	肺、肝、肾	1	0	

表 3 不同药物 IFI 疗效评价与不良反应发生率对比
Table 3 Comparison of efficacy evaluation and adverse reaction rate of IFI with different drugs

分组 Grouping	IFI 疗效评价(%) IFI Efficacy evaluation		不良反应发生率(%) Incidence rate of adverse reactions			
	有效 Valid	无效 Invalid	胃肠道反应 Gastrointestinal reaction	高热 Ardent fever	肾衰竭 renal failure	肝功酶学升高 Increased liver function enzymology
米卡芬净组	72.73	27.27	9.09	9.09	0.00	0.00
两性霉素 B 组	70.00	30.00	20.00	0.00	10.00	10.00
P	>0.05		<0.05			

讨论

多发性骨髓瘤的主要并发症为侵袭性真菌感染,接受化疗治疗、长期使用糖皮质激素治疗、造血干细胞移植、滥用抗生素是引发侵袭性真菌感染的主要因素^[8]。多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染患者通常病情发展快速,临床上早发现、早治疗,可以有效延缓病情发展。张淳嘉等^[9]研究显示,恶性血液病患者合并侵袭性真菌感染总发病率为 2.58%。本次研究中,2017-2021 年的多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染的总发病率为 4.05%,年发病率呈逐年上升趋势,其中 2019 年发病率最高。随着移植技术、化疗方案在多发骨髓瘤患者中的广泛应用,侵袭性真菌感染的发病率随之攀升,有关调查显示国内血液肿瘤患者中侵袭性真菌感染的发病率为 8.3%^[10]。

本次研究中,21 例并发侵袭性真菌感染的患者,

主要为肺部单器官感染,其次为肠道感染。95.24%患者出现发热症状,肺部侵袭性真菌感染患者均出现咳嗽与胸闷。肠道侵袭性真菌感染患者均出现腹泻。不同部位并发侵袭性真菌感染的患者,其临床症状表现各异。陈丽丽等^[11]关于多发性骨髓瘤合并侵袭性真菌感染的临床特征及危险因素研究显示,61.84%为肺部感染,其次为上呼吸道与血液。相关报道显示,深部真菌感染主要为肺部、消化道、中枢神经系统、泌尿系统等^[12],与本研究结果相符。

赵小强等^[13]研究发现,白假丝酵母、克柔假丝酵母、光滑假丝酵母等在检出病原菌中的比例高达 55.22%,是真菌感染的主要致病菌,与 Noginskiy 等^[14]研究结果一致。本次研究共分离菌株 24 株,主要为白色念珠菌,痰液标本检出率高达 71.43%。近年来黄曲霉、黑曲霉、土曲霉等感染病例逐年增加,各地区病原检测结果差异较大,可能与与各地区患者临床特征、感染部位及菌种鉴定技术不同相关。

临床上出现发热等感染症状的多发性骨髓瘤患者,在给予广谱抗生素治疗无效时,可给予经验性抗真菌药物治疗,推荐米卡芬净、伏立康唑、两性霉素 B 及泊沙康唑等。Jodi 等^[15]研究显示,米卡芬净、伊曲康唑临床有效率为 60%~75%。本次研究分为米卡芬净治疗组与两性霉素 B 治疗组,两组治疗效果差异显著,不良反应发生率两性霉素 B 较高。临床进行治疗时,应优先选择不良反应率低的抗菌药物,减少对脏器损害的可能性,以获得最佳的治疗效果。

【参考文献】

- [1] Liu J, Liu W, Mi L, et al. Incidence and mortality of multiple myeloma in China, 2006-2016; an analysis of the global burden of disease study 2016[J]. Hematol Oncol, 2019, 12(1): 136.
- [2] Moreau P, Attal M, Facon T. Frontline therapy of multiple myeloma[J]. Blood, 2015, 125(20): 3076-3084.
- [3] Brigle K, Rogers B. Pathobiology and diagnosis of multiple myeloma[J]. Semin Oncol Nurs, 2017, 33(3): 225-236.
- [4] Valkovic T, Gacic V, Nacinovic-Duletic A. Multiple myeloma index for risk of infection[J]. J Cancer, 2018, 9(12): 2211-2214.
- [5] 中国医师协会血液科医师分会, 中国侵袭性真菌感染工作组. 血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第六次修订版)[J]. 中华内科杂志, 2020, 59(10): 754-763.
- [6] 耿传营, 陈文明. 《中国多发性骨髓瘤诊治指南(2015 年修订)》治疗部分解读[J]. 临床血液学杂志, 2016, 29(6): 923-926.
- [7] 余青, 马越娥, 史玉玲. 真菌感染检测方法的研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2017, 12(4): 252-256.
- [8] Whittle SB, Williamson KC, Russell HV. Incidence and risk factors of bacterial and fungal infection during induction chemotherapy for high-risk neuroblastoma[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2017, 34(5): 331-342.

(下转 1355 页)

DOI:10.13350/j.cjpb.221123

• 综述 •

CRISPR 在临床疾病诊断中的应用*

张晓宇,张郁勃,沈方园,葛萧,李猛,李恒**

(潍坊医学院医学检验学院,山东潍坊 261053)

【摘要】 由成簇的规律间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)和 CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)组成的 CRISPR/Cas 系统是细菌、古生菌特有的自身免疫系统,当外源基因入侵细菌时,CRISPR 可特异性的识别并利用 Cas 蛋白对外源基因进行特异切割,从而达到自我防御的目的。CRISPR/Cas 系统因其高效、特异、高灵敏度、且成本低廉的优势,在基因编辑、农业、医学、食品、环境等领域具有广阔前景。本文介绍了 CRISPR 系统的原理、技术特点及类别等,对基于 CRISPR 系统的多种核酸检测工具的优缺点进行了比较,综述了 CRISPR 在金属离子、蛋白质、小分子检测、临床诊断与治疗等方面的应用展望。

【关键词】 CRISPR/Cas; 核酸检测; 小分子检测; 综述

【中图分类号】 R37

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)11-1349-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Nov. ;17(11):1349-1355.]

Application of CRISPR in pathogen detection

ZHANG Xiao-yu, ZHANG Yu-bo, SHEN Fang-yuan, GE Xiao, LI Meng, LI Heng (*Department of Medical Laboratory, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China*)

【Abstract】 The CRISPR/Cas system composed of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein (Cas) is a unique autoimmune system of bacteria and archaea. When exogenous genes invade bacteria, CRISPR can specifically recognize and use Cas protein to specifically cleave exogenous genes for self-defense. Because of its high efficiency, specificity, high sensitivity and low cost, CRISPR/Cas system has broad prospects in gene editing, agriculture, medicine, food and environment. In this paper, we introduce the principle, technical characteristics and categories of CRISPR system, compare the advantages and disadvantages of various nucleic acid detection tools based on CRISPR system, and summarize the application of CRISPR in metal ions, proteins, small molecule detection, clinical diagnosis and treatment.

【Key words】 CRISPR/Cas; nucleic acid detection; small molecule detection; review

***成簇的规律间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)于1987年在大肠埃希菌中首次被发现^[1], 2012年 Jennifer Doudna 和 Emmanuelle Charpentier^[2]第一次将 CRISPR 和 CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)组成的 CRISPR/Cas 系统作为基因编辑工具,证明了在双链 RNA 指导下 Cas 蛋白可以精确切割双链 DNA。自此,CRISPR 技术迎来革命式的进步。CRISPR/Cas 介导的免疫防御包括适应、表达和干扰 3 个阶段^[3]。当外源基因入侵细菌时,免疫防御进入适应阶段,细菌获取外源基因,并切割成一定长度的间隔区序列插入到自身基因组中,当外源基因再次入侵,CRISPR 基因组转录出带有间隔区序列的 RNA(CRISPR RNA, crRNA)与 Cas 蛋白形成复合体发挥切割作用,从而达到自我防御目的。通过设计 crRNA 的序列,使 crRNA/Cas 蛋白复合体特异识别外源片段,激活 Cas 蛋白的核酸剪切酶活性,对体系中的外源片段发挥切割作用。CRISPR/Cas 系统具有灵活、便捷、高效的特点,已被广泛应用于肿瘤功能基因筛选、信号通路研究、药物靶点及耐药靶点筛选等领域。作为一种高通量基因筛选技术,CRISPR/Cas 系统有望更高效、全面地筛选出靶标基因,为临床疾病的诊治提供新思路、新方法。

1 CRISPR/Cas 系统的分型

原核生物的 CRISPR/Cas 适应性免疫系统根据效应子模块组织分为两个不同的类别。1 类 CRISPR/Cas 系统利用多蛋白效应复合物,2 类 CRISPR/Cas 系统利用单一蛋白效应器。基于不同的效应蛋白家族,1 类系统分为 3 种类型和 12 种亚型^[4];2 类系统可分为 3 种类型和 9 个亚型^[5]。CRISPR/Cas 系统有众多 Cas 蛋白分型,下文针对常见的 CRISPR/Cas9、CRISPR/Cas12、CRISPR/Cas13 进行了简要分析(表 1)。

1.1 CRISPR/Cas9 CRISPR/Cas 系统中 crRNA 与 tracrRNA(反式激活的 crRNA)形成嵌合 RNA 分子,即 sgRNA (Single guide RNA)。sgRNA 通常有 100 个核苷酸,通过碱基配对,5'端 20nt 的 DNA 与靶 DNA 序列杂交,可以介导 Cas9 蛋白在特定序列处进行切割,导致靶 DNA 双链断裂。Cas9 核酸酶有两个内切酶功能域:RuvC 和 HNH^[6]。Cas9 在与靶基

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81902170)。

** **【通讯作者】** 李恒, E-mail: Leehome1985@163.com

【作者简介】 张晓宇(1998-),女,山东济宁,硕士,主要从事结核分枝杆菌的分子诊断的研究。E-mail: zhangxiaoyu1143@163.com

- [46] Yi W, Li J, Zhu X, et al. CRISPR-assisted detection of RNA-protein interactions in living cells[J]. Nat Methods, 2020, 17(7):685-688
- [47] Barber KW, Shrock E, Elledge SJ. CRISPR-based peptide library display and programmable microarray self-assembly for rapid quantitative protein binding assays[J]. Mol Cell, 2021, 81(17):3650-3658
- [48] Diane CW, Xiangdong W. Off-target genome editing: A new discipline of gene science and a new class of medicine[J]. Cell Biology and Toxicology, 2019, 35(3):179-83
- [49] Doench JG, Fusi N, Sullender M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9[J]. Nat Biotechnol, 2016, 34(2):184-191
- [50] Zhang XH, Tee LY, Wang XG, et al. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2015, 4:e264
- [51] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9):822-826
- [52] Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases[J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(2):187-197
- [53] Kim D, Bae S, Park J, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells[J]. Nat Methods, 2015, 12(3):237-243
- [54] Tsai SQ, Nguyen NT, Malagon-Lopez J, et al. CIRCLE-seq: a highly sensitive *in vitro* screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets[J]. Nat Methods, 2017, 14(6):607-614
- [55] Wienert B, Wyman SK, Richardson CD, et al. Unbiased detection of CRISPR off-targets *in vivo* using DISCOVER-Seq[J]. Science, 2019, 364(6437):286-289
- [56] Kocak DD, Josephs EA, Bhandarkar V, et al. Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures[J]. Nat Biotechnol, 2019, 37(6):657-666
- [57] Zhang J, Lv H, Li L, et al. Recent improvements in CRISPR-based amplification-free pathogen detection [J]. Front Microbiol, 2021, 12:751408
- [58] Yue H, Shu B, Tian T, et al. Droplet Cas12a assay enables DNA quantification from unamplified samples at the single-molecule level[J]. Nano letters, 2021;21(11):4643-4653
- [59] Dai Y, Somoza RA, Wang L, et al. Exploring the trans-cleavage activity of Crispr-Cas12a (cpfl) for the development of a universal electrochemical biosensor[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2019, 58(48):17399-17405
- [60] 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
- [61] Bruch R, Baaske J, Chatelle C, et al. CRISPR/Cas13a-powered electrochemical microfluidic biosensor for nucleic acid amplification-free miRNA diagnostics[J]. Adv Mater. 2019;31(51):e1905311.
- [62] Sha Y, Huang R, Huang M, et al. Cascade CRISPR/cas enables amplification-free microRNA sensing with fM-sensitivity and single-base-specificity[J]. Chem Commun (Camb), 2021, 57(2):247-250.

【收稿日期】 2022-07-24 【修回日期】 2022-10-09

(上接 1348 页)

- [9] 张淳嘉. 41例恶性血腥病患者合并侵袭性真菌感染的临床分析[D]. 暨南大学, 2012.
- [10] Sun Y, Huang H, Chen J, et al. Invasive fungal infection in patients receiving chemotherapy for hematological malignancy: A multicenter, prospective, observational study in China [J]. Tumor Biology, 2015, 36(2):757-767.
- [11] 陈丽丽, 张俊玲, 杨娜. 等. 多发性骨髓瘤合并侵袭性真菌感染的临床特征及危险因素研究[J]. 航空航天医学杂志, 2020, 31(12):1432-1433.
- [12] Suan N, O'Brien, Nicole M, et al. Infections in patients with hematological cancer: recent developments [J]. Hematology, 2003, 24(6):438-472.
- [13] 赵小强, 汤平, 杨海平. 伏立康唑治疗多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染效果与 CYP2C19 基因多态性的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(13):1968-1972.
- [14] Noginskiy I, Samra A, Nielsen K, et al. A case of multiple myeloma presenting as *Streptococcus pneumoniae* meningitis with candida auris fungemia[J]. Case Rep Oncol, 2018, 11(3):705-710.
- [15] Jodi L, William WH. Itraconazole: an update on pharmacology and clinical use for treatment of invasive and allergic fungal infections[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2013, 9(7):911-926.

【收稿日期】 2022-06-19 【修回日期】 2022-09-07