

# 生物芯片技术在中枢神经系统感染性疾病应用方面的研究进展

李硕驰,李海鹏,汤海亮,张 茜,黄仁彬

(南华大学附属郴州医院神经内科,湖南 郴州 423000)

**摘要:** 中枢神经系统感染在诊断和治疗上存在很多难点,而生物芯片技术可将大量的探针同时固定于支持物上,满足大量的生物分子进行检测分析的需要,现已广泛应用于医学、生命科学等领域。本文主要就生物芯片技术在中枢神经系统感染性疾病病原的检测和诊断、耐药性的分析和致病机制的研究进行综述。

**关键词:** 中枢神经系统感染; 基因芯片; 蛋白芯片; 悬液芯片

**中图分类号:** R741

**文献标识码:** A

中枢神经系统感染是指脑实质、脊髓及其周围部位受到一种或多种病原微生物的入侵所致的神经系统的常见疾病,其重症患者病死率高,常导致不同程度的神经系统后遗症。中枢神经系统感染性疾病有多种分类方式,可按炎症反应部位、发作的急缓、入侵的途径、流行特征以及病原学的种类来分类,而在临床中确诊疾病通常以病原学诊断为标准。中枢神经系统感染按照病原类型大致可分为细菌性感染、病毒性感染、真菌性感染、螺旋体感染、寄生虫感染等。目前,中枢神经系统感染的诊断和治疗一直困扰着广大临床医生并且存在许多的难题,首先,中枢神经系统构造复杂、其症状又缺乏明显特异性,快速确诊存在困难;其次,其病原种类极多,即使确诊,也不易明确感染患者的病原菌。如今精准医疗是医疗发展的趋势,也就是要制定与患者分子生物病理学特征相匹配的个体化诊断和治疗策略,因此务需去尽早明确中枢神经系统感染的病原菌、作用机制,以使患者得到更加精准化的治疗,尽早恢复健康。

目前对于中枢神经系统感染相关性疾病的病原学检测方法包括如大多数医疗机构仍作为主要手段的脑脊液病原菌培养、分离技术以及分子诊断技术如 PCR、real-timePCR、ELISA、基因测序等。但上述方法都有着各自的明显缺点,培养分离技术耗时长、阳性率低,PCR、ELISA 不能同时检测多种病原体,

基因测序技术成本高、步骤繁琐,暂时不利于大批量应用<sup>[1]</sup>。而生物芯片技术具有高通量、低成本、微型化、效率高、精确度高等特点,为研究感染性疾病提供了新的思路和方法。

生物芯片技术是 90 年代中期以来影响最深远的重大科技进展之一,是融合微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的高度交叉的新技术,有着重大的研究价值与前景<sup>[2]</sup>。生物芯片主要分为:(1)基因芯片技术(GeneChip)又称 DNA 微阵列(DNA microarray),是最早出现的生物芯片技术。基因芯片与计算机芯片类似,但前者由成千上万的基因探针有序地高度集成而来,其技术主要包括 5 个环节:矩阵的构建、探针的准备、探针与矩阵的杂交、扫描和检测、标准化和数据分析<sup>[3]</sup>。(2)蛋白质芯片技术,其与基因芯片的基本原理相同,但它利用的不是碱基配对而是抗体与抗原的特异性结合即免疫反应来检测<sup>[4]</sup>。(3)液相芯片技术,这项技术是由美国 Luminex 公司研制的新一代生物芯片技术,它将芯片技术与流式检测联系起来,极大地延伸了流式检测平台<sup>[5]</sup>。生物芯片技术为中枢神经系统感染性疾病病原的检测和诊断、耐药性的分析和致病机制的研究提供了一个有效而强大的武器。

## 1 在中枢神经系统感染病原检测和诊断中的应用

在基因芯片的研究中,Díaz-BadilloA 等<sup>[6]</sup>建立了一种 DNA 微阵列可以检测两种不同型别登革热

收稿日期:2016-04-22;修回日期:2016-07-29

基金项目:南华大学附属郴州医院院内基金(编号:2013-001)。

\* 通讯作者,黄仁彬,E-mail:985539337@qq.com.

病毒的双重感染,并且证明其具有较高的敏感性和特异性;LiuY 等<sup>[7]</sup>开发了一种芯片,该芯片可以同时检测中枢神经系统感染中的疱疹病毒和肠道病毒,包括 HSV-1、HSV-2、EB 病毒、巨细胞病毒、EV-71、柯萨奇病毒 A16 和 B5。这项研究提供了一个能同时提取,扩增,杂交和检测 DNA 病毒和 RNA 病毒的创新方法,在临床研究中有一定意义。HuangW 等<sup>[8]</sup>设计了一个 EOPM (EasyOperatingPathogenMicroarray) 芯片平台,该芯片具有约 6 万条探针,根据病原菌的基因组序列可以快速检测大部分已知的病原菌,并且自主开发了一款针对此平台的基因芯片分析软件,大大减少了分析时间,其中在使用特异性引物的情况下,在 RNA 拷贝数为  $10^{12}$  的人体细胞中,肠道道病毒 RNA 拷贝数如果大于 1000,即可被系统检测到。

在蛋白芯片的研究中:早在 2002 年,MezzasomaL 等<sup>[9]</sup>利用风疹病毒、巨细胞病毒、疱疹病毒 1 型和 2 型作为诊断抗原,依据抗原抗体的特异性结合的原理,制备成抗体蛋白质芯片,并使用芯片同时检测这几种病原体,检测结果与传统的 ELISA 法结果相似。肖学文<sup>[10]</sup>使用蛋白芯片法对 160 例肺结核病患者、119 例其它疾病患者,279 例健康体检患者进行检测,得出蛋白芯片法检测肺结核病的敏感性显著高于抗酸菌涂片,而特异性稍低,具有简便、快速等特点。Kang X 等<sup>[11]</sup>开发了一种同时检测包括日本脑炎病毒、东方马脑炎病毒在内的五种脑炎病毒的 ELISA 阵列,并证明了该阵列较高的可靠性。

在液相芯片的研究中:Bovers M<sup>[12-13]</sup>团队先使用液相基因芯片技术从各类隐球菌性脑膜炎患者脑脊液中鉴定各种隐球菌属的基因类型,之后该团队还通过该技术检测脑脊液中的奈瑟双球菌、埃希氏菌、肺炎链球菌、葡萄球菌、单纯疱疹病毒 1 型、2 型、水痘带状疱疹病毒等病原体的核酸,由此达到能够同时高通量筛查诊断各种类型的脑炎和脑膜炎的目的。Foord AJ 等<sup>[14]</sup>在日本脑炎病毒的检测及分型的研究中,通过液相芯片技术,建立了 JEV 检测及分型系统,为临床 JEV 感染的诊断及流行病学监测提供了新的途径;并证明其操作简便的同时,具有较高灵敏度和特异性。石莹等<sup>[15]</sup>通过制备特异性单克隆抗体,用生物素标记后并将其固定于微球表面,建立起日本乙型脑炎病毒、登革热病毒等 5 种虫媒病毒的多重微球芯片检测技术,结果显示该技术

不仅与 ELISA 有着相近的特异性,并且有着高通量、高敏感性、检测速度更快等优点。刘畅等<sup>[16]</sup>人以猪囊尾蚴华支睾吸虫的特异性 ITS 基因为靶序列设计并合成探针及引物,之后对构建阳性重组质粒标准品进行测序,建立一种基于双重 PCR 的液相基因芯片检测方法,并为寄生虫感染性疾病提供了新的诊断思路。

## 2 在中枢神经系统感染病原的耐药基因检测的应用

耐药性是指病原体对治疗药物敏感性降低的一种状态,其主要原因有产生灭活酶、细菌胞膜透性的改变、细菌体内靶位结构的改变等,其机制多由于染色体、质粒等通过不同途径获得外源新基因而产生。目前由于抗生素的滥用、患者服药依从性差、细菌基因突变率增高、抗菌药物研制相对滞后等原因,多重耐药菌感染患者越来越多,且有一定可能在区域范围内流行,危害人类的健康。对于中枢神经系统感染性疾病的用药,临床上多以经验疗法为第一方案;而对患者脑脊液或痰进行培养通常耗时长,且特异性低,难以在疾病早期制订个体化治疗方案;因此芯片技术在耐药性的检测以及指导个体化用药中具有重要的意义。

在基因芯片的研究中,早在 1998 年 Gingeras 等<sup>[17]</sup>创造了针对 RNA 聚合酶  $\beta$  亚基基因而设计的基因芯片,在实现快速检测结核分枝杆菌的同时发现细菌对利福平的耐药性与该基因相关。2001 年 Mikhailovich V 等<sup>[18]</sup>针对该亚基基因并进行了实验方法的优化,制备出含更多寡核苷酸的芯片,其可以在短时间内识别该基因的多个突变位点,更全面研究该基因导致的耐药性。Yu G 等<sup>[19]</sup>挑选出包括 10 种已知的耐药基因在内的 92 个基因作为候选基因,并制作出基因微阵列,通过药物敏感性测试,表明这些耐药基因表达水平和耐药程度之间的极强的相关性;这些发现能在耐药机制的研究中提供更多的理论依据。Perreten 等<sup>[20]</sup>人早在 2005 年就建立起了革兰氏阳性菌的抗生素耐药性的基因检测寡核苷酸芯片。Strauss C 团队在 2015 年更是建立了一种基于芯片技术的新颖的 DNA 标记与扩增系统,该系统可以同时检测 117 种革兰氏阳性菌耐药基因,并且针对某一细菌,其可以检测出细菌内的多个基因,如金黄色葡萄球菌菌株 BM3318,检测到的基因多达

15 个,其特异性达到 95%<sup>[21]</sup>。

在液相芯片的研究中,周林甫<sup>[22]</sup>依据 katG、inhA 和 rpoB 等结核相关耐药基因,合成 8 段含不同检测位点及不同基因型的序列,与微球杂交后经液相芯片检测,结果显示该方法在检测不同位点、相同位点不同基因型等情况时均具有较高的特异性。最后作者收集了 153 例临床样本,用液相芯片法检测 4 个目的位点的 11 种基因型,并与基因测序法进行比较,结果显示液相芯片法能够快速有效地检测出各位点的基因型,与基因测序结果基本一致。Lee 等<sup>[23]</sup>对 357 例临床结核患者的 DNA 和结核分枝杆菌 H37RV 株通过多重 PCR 扩增,随后使用等位基因特异性引物延伸技术得到了 23 对引物。该产品最终使用悬液芯片微阵列检测,并将结果与基因测序的结果进行比较,得出该芯片技术在检测异烟肼耐药基因的敏感性和特异性分别是 83% 和 97%,利福平的分别是 90% 和 100%,乙胺丁醇的分别是 58% 和 86%,且该技术具有较高的经济效益。

### 3 在中枢神经系统致病机制的应用

目前几乎所有疾病发生和发展都是与基因或蛋白质功能及相互作用变化有关,生物芯片技术可以整体监测和分析病原体及其感染宿主的成千上万个基因及其表达水平,由此可研究病原体入侵宿主后在疾病的不同发展阶段的基因表达情况及其防御、逃避、转移机制,同时可以评价宿主免疫功能;生物芯片技术还可以通过对比宿主内环境发生改变时病原菌基因表达情况以及同种病原的不同基因型别在宿主体内的基因表达情况,分析并筛选出可能的致病基因。

在基因芯片的研究中,Laassri 等<sup>[24]</sup>通过对感染登革病毒和西尼罗河病毒患者的脑脊液及血液使用基因芯片技术分析,揭示了一些自发的现象导致核酸改变,这些位点常位于包膜蛋白(E)和非结构蛋白 NS4A,NS4B,NS5。赵雁林等<sup>[25]</sup>通过使用基因芯片技术和生物信息学方法对 63 例结核患者与 69 例肺癌患者的癌性胸腔积液和其外周血中单核细胞的 mRNA 表达水平进行分析比较,筛选出了 53 个差异性表达基因,为结核对宿主免疫功能的影响研究提供了理论依据,同时为结核性脑膜炎的相关研究打下了基础。Xu 等<sup>[26]</sup>使用人类全基因组微阵列用于分析感染肠病毒 71 型的神经母细胞瘤细胞。结果表明,EV71 感染导致 161 个细胞的 mRNAs 表达发

生改变,包括 74 个上调的基因和 87 个下调的基因。生物信息学分析表明,差异表达的 mRNA 的可能在细胞的增殖,凋亡以及细胞因子、趋化因子应答中起作用,并且该微阵列的结果与传统的 realtime RT-PCR 的结果有高度的一致性。这一发现将有助于解释 EV71 感染和病毒宿主的发病机制相互作用。

在蛋白芯片的研究中,Li R 等<sup>[27]</sup>人使用蛋白质微阵列研究疱疹病毒的丝氨酸/苏氨酸激酶,并证明其对疱疹病毒在人类细胞中的复制过程中发挥重要作用;随后他们利用人类蛋白质组芯片从单纯疱疹病毒,人类巨细胞病毒,EB 病毒,和卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒中确定了病毒共同的激酶基质,同时发现 DNA 损伤应答途径的上游调控因子乙酰转移酶 TIP60 在疱疹病毒复制中必不可少,这一发现为抗疱疹病毒药物的研发提供帮助。

在液相芯片的研究中,Beran 等<sup>[28]</sup>针对脑膜炎球菌疾病患者 CSF 和血中的促炎细胞因子,设计了一种高通量的液相芯片,通过检测促炎细胞因子的变化从而来反映疾病的严重程度。van Heteren 等<sup>[29]</sup>通过使用 luminex 系统,对病毒性脑炎、AGS 和不名原因的发热患者脑脊液和血清中的细胞因子进行检测和分析,从而证实了干扰素- $\alpha$  和趋化因子 10 抗体在 AGS 综合征的发病机制中的作用。Ye N 等<sup>[30]</sup>通过使用 Luminex 技术,把感染肠道病毒 71 型的患者与健康儿童的血浆和脑脊液中的细胞因子和趋化因子进行了对比,发现了在较危重病人中,血浆中的 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, 和 IL-8 较高;脑脊液 IL-6, IL-8, 和 IP-10 的水平较高,而 RANTES 较低;并且恢复期脑脊液中细胞因子的水平较治疗期低;通过对细胞因子变化情况的分析,可以为感染患者的治疗提供帮助。Durrant DM 等<sup>[31]</sup>使用 CCR5 受体缺陷小鼠并建立了一个西尼罗河病毒性脑膜炎的模型,通过液相芯片技术,对中枢神经系统区域趋化因子的表达进行分析,揭示了 CCR5 配体,CCL4 和 CCL5 表达的重要性,并验证了 CCR5 在大脑区域内限制病毒复制的作用。

### 4 不足与展望

由于中枢神经系统感染性疾病种类繁多,且有着较高的致残率和致死率,随着近年来细菌、病毒耐药性的增加以及新型病毒不断出现,而传统的检测方法有着通量低、操作繁琐、耗时长等明显劣势,目

前急需一种高通量、高效率、高精度的技术去及时准确的诊断此类疾病,因此生物芯片技术在中枢神经系统感染中的研究中取得了突飞猛进的进展,并且在科研以及临床实践过程中不断完善,但目前该技术仍有许多不足,如在基因芯片检测中,目标基因和探针杂交发生错配,漏配,需要进一步提高其特异性;在对 mRNA 表达情况的进行检测时,由于编码蛋白的表达往往需要进行基因的乙酰化、甲基化修饰,修饰后基因检测的准确性有待提高。在悬液芯片和蛋白芯片的检测中,待检样品的成分复杂多变,各个生物分子之间的相互作用、抗原或抗体与芯片或微球非特异结合等均可导致检测结果的特异性降低,同时成千上万蛋白质的纯化以及生物学活性的保持也是具有挑战性的任务<sup>[32]</sup>;生物芯片目前在国内外价格较高,实验流程较多,且操作标准、数据分析标准均未达成一致的意见;绝大多数科研人员仅仅是大量重复国外的研究,创新性的缺乏及生物芯片的高端核心技术缺少也是制约着我国芯片技术发展的重要原因。随着更多专业人员的共同努力,该技术将在中枢神经系统感染相关领域发挥更加重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] Rosenstierne MW, McLoughlin KS, Olesen ML, et al. The microbial detection array for detection of emerging viruses in clinical samples—a useful panmicrobial diagnostic tool. *PLoS One*, 2014, 9(6): e0100813.
- [2] Thissen JB, McLoughlin K, Gardner S, et al. Analysis of sensitivity and rapid hybridization of a multiplexed Microbial Detection Microarray[J]. *J Virol Methods*, 2014, 201: 73-78.
- [3] Nimse SB, Song K, Sonawane MD, et al. Immobilization techniques for microarray: challenges and applications [J]. *Sensors (Basel)*, 2014, 14(12): 22208-22229.
- [4] Zhu H, Snyder M. Protein arrays and microarrays [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5(1): 40-45.
- [5] Xie C, Wang GM. Development and application of Luminex liquichip [J]. *Fudan U niv J Med Sci*, 2010, 37(2): 241-244.
- [6] Diaz-Badillo A, Munoz Mde L, Perez-Ramirez G, et al. A DNA microarray-based assay to detect dual infection with two dengue virus serotypes [J]. *Sensors (Basel)*, 2014, 14(5): 7580-7601.
- [7] Liu Y, Duan C, Zhang C, et al. Evaluation of a viral microarray based on simultaneous extraction and amplification of viral nucleotide acid for detecting human herpesviruses and enteroviruses [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0117626.
- [8] Huang W, Yang Y, Zhang X, et al. An easy operating pathogen microarray (EOPM) platform for rapid screening of vertebrate pathogens [J]. *BMC Infect Dis*, 2013, 13: 437.
- [9] Mezzasoma L, Bacarese-Hamilton T, Di Cristina M, et al. Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases [J]. *Clin Chem*, 2002, 48(1): 121-130.
- [10] 肖学文. 结核分枝杆菌蛋白芯片法检测对结核病辅助诊断的应用 [J]. *中国热带医学*, 2015, 10: 1238-1240.
- [11] Kang X, Li Y, Fan L, et al. Development of an ELISA-array for simultaneous detection of five encephalitis viruses [J]. *Virol J*, 2012, 9: 56.
- [12] Bovers M, Diaz MR, Hagen F, et al. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(6): 1874-1883.
- [13] Boving MK, Pedersen LN, Moller JK. Eight-plex PCR and liquid-array detection of bacterial and viral pathogens in cerebrospinal fluid from patients with suspected meningitis [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(4): 908-913.
- [14] Foord AJ, Boyd V, White JR, et al. Flavivirus detection and differentiation by a microsphere array assay [J]. *J Virol Methods*, 2014, 203: 65-72.
- [15] 石莹, 田绿波, 樊学军, 等. 5 种重要虫媒病毒液相蛋白芯片多重检测方法的建立及应用 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 21: 3604-3607.
- [16] 刘畅, 路义鑫, 杨朋欣, 等. 猪囊尾蚴和华支睾吸虫液相基因芯片检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2015, 5: 387-391.
- [17] Gingeras TR, Ghandour G, Wang E, et al. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic mycobacterium DNA arrays [J]. *Genome Research*, 1998, 8(5): 435-448.
- [18] Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, et al. Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(7): 2531-2540.
- [19] Yu G, Cui Z, Sun X, et al. Gene expression analysis of two extensively drug-resistant tuberculosis isolates show that two-component response systems enhance drug resistance [J]. *Tuberculosis*, 2015, 95: 303-314.
- [20] Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, et al. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 2291-2302.
- [21] Strauss C, Endimiani A, Perreten V. A novel universal DNA labeling and amplification system for rapid microar-

- ray-based detection of 117 antibiotic resistance genes in Gram-positive bacteria [J]. *J Microbiol Methods*, 2015, 108:25-30.
- [22] 周林肯.液相芯片技术在中枢神经系统感染性疾病诊断中的应用研究[D].第四军医大学,2011.
- [23] Lee SH, Choi HB, Yu SY, et al. Detection of first-line anti-tuberculosis drug resistance mutations by allele-specific primer extension on a microsphere-based platform [J]. *Ann Lab Med*, 2015, 35(5):487-493.
- [24] Laassri M, Bidzhieva B, Speicher J, et al. Microarray hybridization for assessment of the genetic stability of chimeric West Nile/dengue 4 virus [J]. *J Med Virol*, 2011, 83(5):910-920.
- [25] 赵雁林,端木宏谨,李亮,等.结核病患者免疫相关基因表达变化的基因芯片研究, *中华结核和呼吸杂志* [J], 2005, 28(5):301-304.
- [26] Xu LJ, Jiang T, Zhang FJ, et al. Global transcriptomic analysis of human neuroblastoma cells in response to enterovirus type 71 infection [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e65948.
- [27] Li R, Zhu J, Xie Z, et al. Conserved herpesvirus kinases target the DNA damage response pathway and TIP60 histone acetyltransferase to promote virus replication [J]. *Cell Host Microbe*, 2011, 10(4):390-400.
- [28] Beran O, Lawrence DA, Andersen N, et al. Sequential analysis of biomarkers in cerebrospinal fluid and serum during invasive meningococcal disease [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009, 28(7):793-799.
- [29] van Heteren JT, Rozenberg F, Aronica E, et al. Astrocytes produce interferon-alpha and CXCL10, but not IL-6 or CXCL8, in Aicardi-Goutieres syndrome [J]. *Glia*, 2008, 56(5):568-578.
- [30] Ye N, Gong X, Pang LL, et al. Cytokine responses and correlations thereof with clinical profiles in children with enterovirus 71 infections [J]. *BMC Infect Dis*, 2015, 15:225.
- [31] Durrant DM, Daniels BP, Pasioka T, et al. CCR5 limits cortical viral loads during West Nile virus infection of the central nervous system [J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12:233.
- [32] Amaya M, Baer A, Voss K, et al. Proteomic strategies for the discovery of novel diagnostic and therapeutic targets for infectious diseases [J]. *Pathogens and disease*, 2014, 71:177-189.

(本文编辑:蒋湘莲)

## 知识介绍

### 临床试验中的随机化分组

随机化分组就是将参加临床试验的受试者随机分配到试验组和对照组的方法。这样做的目的可以保证每一个受试者均有相同的机会被分配到试验组或对照组,并且保证一些可能影响试验结果的临床特征和干扰因素在两组之间分配均衡,使两组具有可比性。在进行随机化分组时,应遵循的原则为所有的干预方案和评估方法这时应已确定而不能再改变,研究者中的直接处理人员和受试者不能参与分配,临近处理实施之时才能揭晓分组结果,一旦分组结果公布,受试者不能再交换组别。随机化分组有下述几种方法:

(1) 完全随机化分组:先将受试者编号,再用抽签或随机数字表的方法分组。这种情况适合于一些主要干扰因素在受试者之间的分布比较均匀的样本人群。

(2) 区段随机化分组:根据受试者进入临床试验的时序分为若十个区段,再对每个区段随机化分组。这种设计比较适合临床特点,根据患者陆续就医的情况,将患者按就医先后分成不同区段,然后在每组随机分配,可提高研究效率。

(3) 分层随机化分组:先根据干扰因素或受试者的临床特征分层,然后再在每层随机化分组。这种情况适合于受试者之间干扰因素分布不均衡时,可以消除干扰因素对预后的影响。

在临床实践中,患者往往是陆续就医的,研究者不可能待患者都集中后再分组进行治疗试验,所以,应在研究开始前即按就医的顺序号将患者分组,一旦患者就医并符合入选条件时,就可将患者随机地分配到试验组或对照组。