

核酸依赖性扩增技术研究现状及展望

李锦澎¹综述, 吴 蓉^{2△}审校

1. 上海中医药大学附属普陀医院检验科, 上海 200062; 2. 上海市普陀区中心医院检验科, 上海 200062

摘要:自 19 世纪 90 年代以来, 等温核酸扩增技术及其衍生技术迅速发展。等温核酸扩增技术的流程简单、成本和应用要求更低, 应用前景广泛。其中, 核酸依赖性扩增技术(NASBA)已广泛用于病原体检测、单核苷酸突变检测和环境监测等领域。本文主要对近 5 年来 NASBA 技术的研究进展及其在分子诊断中的应用进行综述, 探讨 NASBA 技术的前景与瓶颈。

关键词:等温核酸扩增; 核酸依赖性扩增; 分子诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.02.021 **中图法分类号:**R440

文章编号:1673-4130(2023)02-0236-05 **文献标志码:**A

Research progress on nucleic acid sequence-based amplification*

LI Jinpeng¹, WU Rong^{2△}

1. Department of Laboratory, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 2. Department of Laboratory, Putuo Hospital, Shanghai 200062, China

Abstract: Since the 1890s, isothermal nucleic acid amplification technology and its derivatives have developed rapidly. The process of isothermal nucleic acid amplification technology is simple, the cost and application requirements are lower, and the application prospect is broad. Among them, nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) has been widely used in pathogen detection, single nucleotide mutation detection and environmental monitoring. This paper mainly reviews the research status of NASBA technology and its application in molecular diagnosis in the past five years, and discusses the prospects and bottlenecks of NASBA technology.

Key words: isothermal nucleic acid amplification; nucleic acid sequence-based amplification; molecular diagnosis

核酸扩增技术常常用于一些基因鉴定、亲子鉴定、病原微生物学等的检测。基于聚合酶链式反应(PCR)原理而开发出来的各式各样的核酸扩增技术已被广泛使用, 如普通 PCR、荧光定量 PCR 等。PCR 技术虽然具备特异度高、灵敏度强的特点, 但是因其实验操作繁杂、对环境设备要求较高、实验时间长等缺点, 其应用范围(如地方医疗、即时医疗等)受到一定的限制, 而等温核酸扩增技术则应运而生。自 1990 年以来, 已经开发了十多种等温核酸扩增技术以求替代 PCR 技术, 如环介导的等温核酸扩增技术、核酸依赖性扩增(NASBA)技术、链置换扩增技术、单引物等温扩增技术等。这些技术各具特点且无需繁杂操作步骤与要求严格的设备和环境, 只需 5~120 min 的时间和适合的水浴温度, 就能实现核酸的快速扩增并用于后续的检测。因此, 快速了解等温扩增技术的近年研究进展, 对技术的进一步研究具有重要的科学研究意义。本文就等温扩增技术中 NASBA 技术近五年来的技术研究及改良进行概述。

1 NASBA 技术

1.1 基本原理 NASBA 技术利用 AMV 逆转录酶、

核糖核酸水解酶 H、T7 RNA 聚合酶三种酶在 41 °C 恒温环境下 15~25 min, 经过约 20 个扩增循环, 便能实现对 RNA 模板的 109 倍扩增^[1]。NASBA 技术原理如图 1 所示。如今, NASBA 技术已经用于支原体、病毒、细菌等病原体和寄生虫的检测之中^[2]。

1.2 扩增产物检测方法 NASBA 核酸扩增后的检测手段众多: 电泳分析、化学发光、电化学发光法、酶联免疫吸附试验(MB)技术及其与 CRISPR/Cas 系统、数字化芯片、脱氧核酶、分裂探针等技术的联合应用。

1.3 NASBA 技术特点 优点: (1) 特异度高、灵敏度高检测所需的 RNA 水平可低至 aM 水平。(2) 操作步骤简单, 可直接加入没有经提取的 RNA 标本进行扩增; 采用“一锅法”扩增后可直接读取结果。(3) 设备环境要求低不需要昂贵的 PCR 仪, 只需要一台恒温设备, 甚至只是一个水浴锅。(4) 满足世界卫生组织(WHO)的“ASSURED”要求^[3]。

缺点: (1) 假阳性问题, 因非特异性扩增、NTPs 等因素而造成假阳性问题。(2) 涉及多种酶类, 考虑核酸扩增环境对酶活性的影响因素众多。(3) 模板

△ 通信作者, E-mail: rong701@126.com。

RNA 易降解,需要加入 RNA 酶抑制剂保护模板及扩增产物。

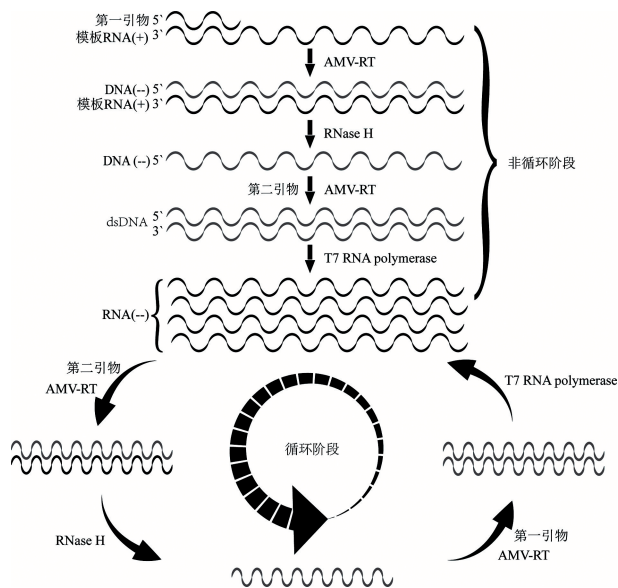


图1 NASBA 原理图

2 NASBA 的应用

2.1 NASBA 在植物疾病中的应用 早在 1998 年, MB 与 NASBA 技术的结合运用就被 LEONE 等^[4] 提出并应用于马铃薯卷叶病毒的检测中。加入限制性核酸内切酶和运用算法软件,便能实现对肝炎病毒 B 型、疱疹病毒 1 型和 2 型进行定量检测^[5]。最近, HEO 等^[6] 使用基于 MB 的实时定量核酸依赖性扩增技术 (qNASBA) 检测苹果锈果类病毒 RNA, 表明 qNASBA 技术与建立的 RT-PCR 技术相比具有更高的灵敏度和特异度。

2.2 NASBA 在食品安全中的应用 NASBA 技术在 1995 年已被运用在食物空肠弯曲菌的检测之中^[7]。ZHAI 等^[8] 运用基因组学技术和 NASBA 筛选并检测食物中丙型副伤寒沙门菌的特异性血清型标志物,成功地与伤寒沙门菌和甲型副沙门菌区别开来。ZHAI 等^[9] 设计靶向 xcd 基因的 qNASBA 检测 48 种沙门菌和 18 种非沙门菌,并于活细胞检测背景进行检测,如猪肉、牛头和鲜奶等,同样具有高特异度和达 10 CFU/25(g·mL) 的检测限。

2.3 NASBA 在人类疾病中的应用 TENG 等^[10] 通过固化于聚乙二醇的 MB 捕获聚苯乙烯微球上的扩增核酸产物,应用于流行性感病毒 A 型、流行性感病毒 B 型和呼吸道合胞病毒的检测而无交叉反应。RAMEZANI 等^[11] 利用 NASBA 联合 ELISA 快速检测结核分枝杆菌 EF-Tu mRNA。在 4 h 内,最低可以检测到 17.5 pg 的 RNA。对于临床标本,其灵敏度和特异度可达 97% 和 75%。LOENS 等^[12] 对 215 个咽拭子标本进行衣原体、支原体的检测, qNASBA 的结果与 qRT-PCR 具有较高的一致性。HUANG 等^[13] 对 6 篇利用 NASBA 技术检测肺炎支原体的文献进行荟萃分析,总体上发现 NASBA 技术检测肺炎支原体

的特异度和灵敏度分别为 98% 和 77%, 集成 ROC 曲线下面积达 0.987 5, 表明 NASBA 技术具有较高的诊断价值。已有多份临床研究使用 qNASBA 检测 HPV、疟原虫的 Pfs25 mRNA 和疟原虫特异性 18s rRNA, 结果表明与 RT-PCR 具有较高的一致性^[14-16]。

3 NASBA 的改良研究

3.1 对核酸扩增反应的改良

3.1.1 对扩增效能的优化 传统的 NASBA 技术依赖于 T7 RNA 聚合酶合成 (-)RNA 单链, 是核酸扩增反应中的一大限速步骤。因此, 2021 年 JU 等^[17] 在传统 NASBA 技术的基础上加入切口核酸内切酶 (NE), 称为基于切口的指数型链式反应系统的核酸扩增 (NESBA)。NESBA 检测的合成 RNA 浓度达 1 aM 至 1 pM, 20~30 min 即达荧光阈值, 检测灵敏度要比传统的 NASBA 技术高 100 倍且在检测呼吸道合胞病毒和流感病毒等均未出现假阳性反应。JU 等^[18] 利用 NESBA 技术 30 min 内完成检测新型冠状病毒包膜基因 (E genes) 和核衣壳蛋白基因 (N genes), 以其超高的灵敏度可检测低至每反应管 10 copy, 与 RT-PCR 相比达到 100% 特异度和 100% 灵敏度。

WANG 等^[19] 研究 HIV-1 时联合了 MB 和数字化芯片平台技术, 并对用于 dLAMP 和 dRT-PCR 的微流控芯片进行管道改进, 称为数字化核酸依赖性扩增技术 (dNASBA)。dNASBA 技术可检测达 1 拷贝/微升的模板量, 其灵敏度比普通 qNASBA 要高一个数量级, 因其高特异性与灵敏度、低成本和高效而更加适用于即时诊断 (POC)。

借鉴于巢式 PCR, ABDOLAHZADEH 等^[20] 首次设计巢式 NASBA 引物和加入可编码 RNA Mango 适配子序列的内向引物, 构建巢式 NASBA (NMN) 检测大肠杆菌 ClpB 基因, 可使 NASBA 的 LOD 提高至 1.5 个 RNA 分子/微升, 即 aM 水平。相比于没有巢式引物的 NASBA, 其灵敏度提高了 6 个数量级。

3.1.2 对非特异性扩增反应的优化 假阳性结果一直是 NASBA 应用的一大痛点。因此, AUFDEM-BRINK 等^[21] 用多色的、基于核酸适配子识别的荧光探针, 独创性地加入没有靶基因片段、T7 RNA 聚合酶启动子序列和适配子编码序列的 40 bp 干扰核苷酸片段, 称为 Apta-NASBA, 并用于检测产毒素大肠杆菌 estP 和 estH RNA, 有效地抑制了传统 NASBA 非特异性核酸扩增带来的假阳性反应。

3.2 对扩增产物检测系统的改良

3.2.1 探针的应用及优化 适配子 (又称适体) 的强特异性和强亲和力特性给予了分裂探针检测扩增产物的应用基础^[22]。KIKUCHI 等^[23] 首先利用 dapoxyl DNA 适配子 (DAP-10) 设计了一对分裂杂交寡核苷酸适配子探针 (SDA), 检测经过 NASBA 技术扩增寨卡病毒的 Z-147 基因, LOD 值可达 10 nM 水平。

脱氧核酶(DNAzyme)是一段由脱氧核糖核酸构成的寡核苷酸链,其能形成一定的空间构象而发挥功能。DNAzyme 的稳定性和其功能一定程度上给予了分裂探针的应用基础。REED 等^[24]设计了基于磷酸二酯酶脱氧核酶的分裂探针(sDz)和加入酶底物显色,将 NASBA 扩增后的寨卡病毒 RNA 结果可视化,且可于 30 min 内判断结果,不与登革热病毒和西尼罗病毒产生交叉反应,其最低可检测到 2.5 nM 扩增产物或 $(0.4 \sim 8.0) \times 10^6$ copy/mL。DHAR 等^[25]利用基于磷酸二酯酶脱氧核酶的分裂探针(sDz)检测结核分枝杆菌 16s RNA,并成功地检测到 katG 基因的单核苷酸突变,其 LOD 值达 $(1.5 \sim 13.0)$ nM。CONNELLY 等^[26]使用 DAP-10-42 设计一对分裂杂交寡核苷酸适配子探针,检测耐异烟肼的、单核苷酸突变的结核分枝杆菌 katG 基因。相比于 DAP-10, DAP-10-42 可结合多种荧光染料,未来有望应用于多色比对检测平台中。应用免疫学方法半抗原标记探针,构建 ELISA 方法检测 NASBA 产物。ASTATKE 等^[27]首先提出 NASBA 技术结合 ELISA 夹心法,加入半抗原标记 DNA 探针分别检测埃博拉病毒 L 基因和登革热病毒,同时表明地高辛(DIG)标记相比于异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 DNA 探针具有更高的信噪比,其 LOD 值达到 10 拷贝数/反应管,达到 qNASBA 检测限水平。

针对 Taqman 探针荧光基团和淬灭基团的分离与信号获得,CRISPR/Cas 系统也得以应用。XUE 等^[28]构建了基于 CRISPR/Cas13“疯切”作用的 NASBA (cNASBA)技术检测引起小鼠肠炎的沙门菌 16s RNA,判断沙门菌在肠道的分布及 qPCR 无法检测的活菌数目。

3.2.2 核糖开关的应用及改良 生物核糖开关最开始发现于细菌的基因表达调控机制中,如今逐渐应用于基因表达检测系统^[29]。CAO 等^[30]利用基于 RNA 的生物核糖开关调节 β -半乳糖苷酶的表达,以酶底物显色经 NASBA 扩增后呼吸道合胞病毒 A 型和 B 型,最低可检测 91 aM 的扩增产物,并且与人类冠状病毒 HKU1 和新冠病毒无交叉反应。WU 等^[31]在此基础上使用免疫磁珠富集法和滤纸作为冻干剂与载体,可检测低至 270 zM 诸如病毒的临床标本。

3.2.3 固相载体的应用及优化 此前,应用于 NASBA 的检测系统多为液相之中,而应用固相中的检测系统非常少,最常见的固相载体是横向流动试纸条。最近,MA 等^[32]提出固相化核酸依赖性恒温扩增(SP-NASBA)技术概念,并应用于检测金黄色葡萄球菌金黄色亚种(ATCC 12600)的 rRNA,验证其特异度和灵敏度,同时针对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 Sau3A-I 基因,对其进行定量检测。TAKAHASHI 等^[33]详细描述了利用基于纸的无细胞检测系统快速检测人肠道菌标志物的方法。YRAD 等^[34]应用横向

流动(LF)试纸条检测经 NASBA 扩增的登革热病毒 RNA,其最低判定值可达 0.01 μ M 或 1.2×10^4 pfu/mL 且不受寨卡病毒的干扰。

3.3 对扩增副产物检测系统的改良 核酸扩增的副产物有氢离子和无机焦磷酸两种。

应用酸碱指示剂检测反应溶液中的 pH 变化的检测方法对溶液初始酸碱度有较严格的要求,且受限的指示剂加入量又会降低溶液颜色变化的显著程度,导致较高的假阴性率,方法的应用和改良空间有限^[35]。

最近的研究则多数是针对无机焦磷酸副产物为切入点。ISOBE 等^[36]使用次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPT)、黄嘌呤氧化酶(XOD)和铁测定 Nitro-PSAP 法作为检测系统检测经 NASBA 扩增的人真皮成纤维母细胞 β -actin RNA,其构建的检测方法的 LOD 和定量限(LOQ)远低于 NASBA 所产生的焦磷酸浓度,证实了构建的方法的可行性、灵敏度和特异性。相比于已建立的、无酶的焦磷酸检测试剂盒,此构建的基于 HPT 等酶的焦磷酸检测方法不会出现因 NTPs 等因素影响而造成的假阳性结果,并且也可用于 PCR 的产物检测。因 ATP 存在于各种组织中而不适用基于 ATP 的酶-底物显色系统,KARASAWA 等^[37]利用丙酮酸磷酸双激酶和丙酮酸脱氢酶构建化学发光焦磷酸盐检测系统,检测经 NASBA 扩增的胰腺癌标志物 MiR-196a。

4 总结与展望

核酸扩增技术尚存在许多问题亟待解决,如低拷贝分析物的分析灵敏度问题、反应体系酶类温度控制问题等。其中,最突出的问题是假阳性扩增反应。对于 NASBA 的非特异性扩增反应,MU 等^[38]指出可能是因高浓度 Mg^{2+} 诱导的 T7 RNA 聚合酶的自发性转录。AMV-RT 通过蛋白质间相互作用抑制 T7 RNA 聚合酶活性的问题也有待解决。NASBA 扩增产物检测使用的核酸适配子探针相比于传统的核苷酸探针具有更高的特异性和亲和性,但目前的核酸适配子探针设计软件(如 G-Quadruplexes 等)算法还有待改进,特别是对于环境离子变化所带来的核酸结构改变的识别和预测仍需要提高^[39]。

NASBA 技术不仅继承了 PCR 技术高灵敏度、高特异度的特点,而且具备实验操作简易、流程时长短、不需要特定仪器等特点,已报道应用于有害藻类的环境检测中^[40]。基于纸的无细胞检测系统与 NASBA 的联合运用则更加适用于地方性、偏远地区医疗的即时诊断。从提出到如今,NASBA 及其衍生技术不断向着缩短扩增时间、提高特异度和灵敏度、简化结果读取等方向发展。基于多重微阵列技术的检测、即时诊断、食物安全、环境检测和单核苷酸突变分子诊断等领域更凸显了 NASBA 技术与其他技术联合应用的重要性,其在未来的研究与应用值得深究。

参考文献

- [1] COMPTON J. Nucleic acid sequence-based amplification [J]. *Nature*, 1991, 350(6313): 91-92.
- [2] HARTMANN E M, HALDEN R U. Analytical methods for the detection of viruses in food by example of CCL-3 bioagents[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404(9): 2527-2537.
- [3] KOZEL T R, BURNHAM-MARUSICH A R. Point-of-care testing for infectious diseases: past, present, and future[J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(8): 2313-2320.
- [4] LEONE G, VAN SCHIJNDEL H, VAN GEMEN B, et al. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(9): 2150-2155.
- [5] DEIMAN B, JAY C, ZINTILINI C, et al. Efficient amplification with NASBA of hepatitis B virus, herpes simplex virus and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* DNA[J]. *J Virol Methods*, 2008, 151(2): 283-293.
- [6] HEO S, KIM H R, LEE H J. Development of a quantitative real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA) assay for early detection of apple scar skin viroid[J]. *Plant Pathol J*, 2019, 35(2): 164-171.
- [7] UYTENDAELE M, SCHUKKINK R, VAN GEMEN B, et al. Detection of *Campylobacter jejuni* added to foods by using a combined selective enrichment and nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(4): 1341-1347.
- [8] ZHAI L, LIU H, LI J, et al. A duplex real-time NASBA assay targeting a serotype-specific gene for rapid detection of viable *Paratyphi C* in retail foods of animal origin[J]. *Can J Microbiol*, 2022, 68(4): 1-10.
- [9] ZHAI L, LIU H, CHEN Q, et al. Development of a real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for the rapid detection of *Salmonella* spp. from food[J]. *Braz J Microbiol*, 2019, 50(1): 255-261.
- [10] TENG F, WU X, HONG T, et al. Integrating nucleic acid sequence-based amplification and microlensing for high-sensitivity self-reporting detection[J]. *Analyst* 2020, 145(23): 7528-7533.
- [11] RAMEZANI R F, RASAEI M J. Development of sensitive and rapid RNA transcription-based isothermal amplification method for detection of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2019, 11(2): 169-175.
- [12] LOENS K, URSI D, GOOSSENS H, et al. Evaluation of the nucliSens miniMAG RNA extraction and real-time NASBA applications for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in throat swabs[J]. *J Microbiol Methods*, 2008, 72(2): 217-219.
- [13] HUANG C, HUANG P T, YAO J Y, et al. Pooled analysis of nuclear acid sequence-based amplification for rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(5): e22879.
- [14] ROTH J M, SAWA P, OMWERI G, et al. *Plasmodium falciparum* gametocyte dynamics after pyronaridine-artemunate or artemether-lumefantrine treatment [J]. *Malar J*, 2018, 17(1): 223.
- [15] SCOTTO G, FAZIO V. Hepatitis B and asymptomatic malaria coinfection in sub-saharan african immigrants: epidemiological and clinical features of HBV-infection [J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2018, 51(5): 578-583.
- [16] BEBYN M G, SLEDZINSKA P, WOJTYSIK J, et al. HPV RNA and DNA testing in polish women screened for cervical cancer-a single oncological center study[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2022, 268: 129-134.
- [17] JU Y, KIM H Y, AHN J K, et al. Ultrasensitive version of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) utilizing a nicking and extension chain reaction system[J]. *Nanoscale* 2021, 13(24): 10785-10791.
- [18] JU Y, KIM J, PARK Y, et al. Rapid and accurate clinical testing for COVID-19 by nicking and extension chain reaction system-based amplification (NESBA) [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 196: 113689.
- [19] WANG J, KREUTZ J E, THOMPSON A M, et al. SD-chip enabled quantitative detection of HIV RNA using digital nucleic acid sequence-based amplification (dNASBA) [J]. *Lab Chip*, 2018, 18(22): 3501-3506.
- [20] ABDOLAHZADEH A, DOLGOSHEINA E V, UNRAU P J. RNA detection with high specificity and sensitivity using nested fluorogenic Mango NASBA [J]. *RNA*, 2019, 25(12): 1806-1813.
- [21] AUFDEMBRINK L M, KHAN P, GAUT N J, et al. Highly specific, multiplexed isothermal pathogen detection with fluorescent aptamer readout [J]. *RNA*, 2020, 26(9): 1283-1290.
- [22] PARK K S. Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 102: 179-188.
- [23] KIKUCHI N, REED A, GERASIMOVA Y V, et al. Split dapoxy aptamer for sequence-selective analysis of nucleic acid sequence based amplification amplicons [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(4): 2667-2671.
- [24] REED A J, CONNELLY R P, WILLIAMS A, et al. Label-free pathogen detection by a deoxyribozyme cascade with visual signal readout [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2019, 282: 945-951.
- [25] DHAR B C, REED A J, MITRA S, et al. Cascade of deoxyribozymes for the colorimetric analysis of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 165: 112385.
- [26] CONNELLY R P, MADALOZZO P F, MORDESON J E, et al. Promiscuous dye binding by a light-up aptamer: application for label-free multi-wavelength biosensing [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2021, 57(30): 3672-3675.
- [27] ASTATKE M, TIBURZI O, CONNOLLY A. A novel RNA detection technique for point-of-care identification of pathogens [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2022, 43(2): 1955380.
- [28] XUE T, LU Y, YANG H, et al. Isothermal RNA amplification for the detection of viable pathogenic bacteria to

- estimate the salmonella virulence for causing enteritis [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(5):1670-1678.
- [29] CHUSHAK Y, HARBAUGH S, ZIMLICH K, et al. Characterization of synthetic riboswitch in cell-free protein expression systems [J]. *RNA Biol*, 2021, 18(11):1727-1738.
- [30] CAO M, SUN Q, ZHANG X, et al. Detection and differentiation of respiratory syncytial virus subgroups A and B with colorimetric toehold switch sensors in a paper-based cell-free system [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 182:113173.
- [31] WU K, GREEN A A. Detection of norovirus using paper-based cell-free systems [J]. *Methods Mol Biol* 2022, 2433:375-390.
- [32] MA Y, TENG F, LIBERA M. Solid-phase nucleic acid sequence-based amplification and length-scale effects during rna amplification [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(11):6532-6539.
- [33] TAKAHASHI M K, TAN X, DY A J. Cell-free paper-based analysis of gut microbiota and host biomarkers [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2433:351-374.
- [34] YRAD F M, CASTANARES J M, ALOCILJA E C. Visual detection of dengue-1 RNA using gold nanoparticle-based lateral flow biosensor [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2019, 9(3):74.
- [35] TANNER N A, ZHANG Y, EVANS T C. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes [J]. *Biotechniques*, 2015, 58(2):59-68.
- [36] ISOBE A, IWABUCHI Y, YAJIMA M, et al. A highly sensitive and rapid enzymatic method using a biochemical automated analyzer to detect inorganic pyrophosphate generated by nucleic acid sequence-based amplification [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 511:298-305.
- [37] KARASAWA K, ARAKAWA H. Detection of microRNA by a combination of nucleic acid sequence-based amplification and a novel chemiluminescent pyrophosphate assay [J]. *Luminescence*, 2022, 37(5):822-827.
- [38] MU X, GREENWALD E, AHMAD S, et al. An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(10):5239-5249.
- [39] BRYAN T M. G-Quadruplexes at telomeres: friend or foe? [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2020, 25(16):3686.
- [40] LOUKAS C M, MOWLEM M C, TSALOGLOU M N, et al. A novel portable filtration system for sampling and concentration of microorganisms: Demonstration on marine microalgae with subsequent quantification using IC-NASBA [J]. *Harmful Algae*, 2018, 75:94-104.

(收稿日期:2022-03-12 修回日期:2022-07-28)

(上接第 230 页)

关,共同参与脑出血的发展过程,可能作为脑出血临床治疗的靶点。

参考文献

- [1] MADANGARLI N, BONSACK F, DASARI R, et al. Intracerebral hemorrhage: blood components and neurotoxicity [J]. *Brain Sci*, 2019, 9(11):316-331.
- [2] YU H H, LI G G, TANG Y X, et al. Fractalkine/CX3CR1 pathway is neuroprotective in intracerebral hemorrhage through facilitating the expression of TGF- β 1 [J]. *Brain Hemorrhages*, 2020, 1(3):146-151.
- [3] 马阳, 张萍, 唐洲平. 脑出血后免疫炎症反应及相关临床研究进展 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2019, 14(2):87-90.
- [4] LIU Q L, LEI C B. Neuroprotective effects of miR-331-3p through improved cell viability and inflammatory marker expression: Correlation of serum miR-331-3p levels with diagnosis and severity of Alzheimer's disease [J]. *Exp Gerontol*, 2020, 144(1):1-7.
- [5] 吴宇娟, 高巨. 核苷酸结合寡聚化结构域样受体在创伤性脑损伤中的研究进展 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2019, 35(11):1133-1135.
- [6] LI R, ZHU S. NLRP6 inflammasome [J]. *MOL ASPECTS MED*, 2020, 76(2):100859-100867.
- [7] NIE H, HU Y, GUO W, et al. MiR-331-3p inhibits inflammatory response after intracerebral hemorrhage by directly targeting NLRP6 [J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020(6):1-13.
- [8] 饶明俐. 《中国脑血管病防治指南》(五) [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2006, 23(3):260-260.
- [9] 龚浩, 郑波, 何俊, 等. 急性脑出血病人血清 TNF- α 、TGF- β 1、ICAM-1 水平与神经功能损伤及预后的相关性 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19(13):2264-2267.
- [10] 王丽琴, 安娜, 田超, 等. 活血化瘀法治疗脑出血作用机制实验研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(5):220-226.
- [11] 向成明, 周桂银, 侯小红, 等. microRNAs 对脑出血神经炎症损伤作用的研究进展 [J]. *山东医药*, 2021, 61(13):90-92, 96.
- [12] 朱金源, 白吉佳, 张小亚. lncRNASNHG14/miR-331-3p/CCR1 轴在急性肺损伤中的作用机制研究 [J/CD]. *世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊)*, 2020, 20(97):248-249.
- [13] MENG C, ZHANG J, ZHANG L, et al. Effects of NLRP6 in cerebral Ischemia/Reperfusion (I/R) injury in rats [J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 69(3):411-418.
- [14] XIAO H, CHEN H, JIANG R, et al. NLRP6 contributes to inflammation and brain injury following intracerebral haemorrhage by activating autophagy [J]. *J Mol Med*, 2020, 98(9):1319-1331.
- [15] GITAÍ DLG, DOS SANTOS YDR, UPADHYA R, et al. Extracellular vesicles in the forebrain display reduced miR-346 and miR-331-3p in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(9):1674-1687.

(收稿日期:2022-03-12 修回日期:2022-07-28)