

## RNAscope 技术在细菌感染组织学研究的应用

毛昕 宋旭东

(华北理工大学 河北唐山 063000)

摘要: 细菌性感染对人类健康的威胁越来越严重, 逐渐受到广泛的重视。但细菌感染性疾病缺乏特异性临床表现及影像学改变而难以确诊, 细菌培养对标本要求高且耗时耗力, 病理学改变主要以肉芽肿性改变为主, 难以明确菌种类型, 影响患者进一步治疗。RNAscope 技术是一项新型的原位杂交技术, 在不破坏组织学的基础上对病变进行观察, 具有较高的敏感性及特异性。本文概述近年来 RNAscope 技术在细菌感染组织学诊断的应用。

关键词: RNAscope 技术; 细菌感染; 组织学

现阶段细菌感染仍然是威胁人类健康的重大疾病之一, 而金标准细菌培养对标本浓度及实验室要求较高, 严重影响患者及时治疗。随着科技不断发展, 对细菌的基因检测逐渐登上历史舞台。最常见的方法如实时荧光定量 PCR、二代测序技术等, 具有较高的灵敏度及特异度, 但缺点是对标本要求较高, 对实验室环境要求苛刻<sup>[1, 2]</sup>。RNAscope 技术在传统原位杂交技术进行创新, 利用新的信号放大系统并减少噪音污染, 并保持较高的敏感性及特异性。现综述 RNAscope 技术在细菌感染组织学中的应用价值。

### 1. RNAscope 技术简介

RNAscope 技术为一项新颖的针对 RNA 检测的原位杂交技术, 通过标本处理、探针杂交、扩增、显色等基本步骤, 在不破坏组织完整性的基础上实现单个 RNA 分子在显微镜下的可视化。该技术的最大亮点为独特的“DoubleZ”探针设计及信号联合放大系统, 可实现 300 碱基以上的特异区域检测, 大大降低物种基因的限制。另外, 该技术探针标记选择多样, 不仅可选择荧光标记, 还可以选择碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶标记, 实现明光显微镜直接计数观察, 更为实用<sup>[3, 4]</sup>。RNAscope 技术的亮点主要表现为: (1) 敏感性强 虽然每一个靶向探针都特异性设计 20 对“DoubleZ”探针, 但是 3 对双探针即可检测出单个 RNA 分子, 使部分被降解或仅部分可用的 RNA 片段也被灵敏的检测出来; (2) 特异性强 任何孤立探针的非特异性结合或无探针结合均不可与信号放大分子结合, 从而有效阻止了非特异性信号的放大; (3) 标本类型应用广泛 不仅可以应用与福尔马林包埋的石蜡组织, 也可用于单个细胞、新鲜组织及冰冻切片组织, 满足不同检测需要; (4) 单分子定性分析及可视化定量 杂交 3 个及以上的双探针即可获得可观察的点状信号。

现阶段, RNAscope 技术凭借自身的独特优势, 已经在各个领域广泛应用。Baltzarsen 等<sup>[5]</sup>利用该技术检测出人端粒逆转录酶 (hTERT) mRNA 在良性痣与黑色素瘤表达明显不同, 为两种疾病的鉴别诊断提供依据。Yin 等<sup>[6]</sup>应用 RNAscope 技术对面肩胛骨肌营养不良症 (FSHD) 及治疗后的内源性 DUX4mRNA 分别进行定量检测。国内有学者应用此技术对肝脏疾病组织学应用研究<sup>[7]</sup>、肿瘤病理学的应用以及非特殊型浸润性乳腺癌、非小细胞肺癌、胃肠道间质瘤、胃癌中程序性死亡受体 1 (PD-1)/程序性死亡受体-配体 1 (PD-L1) 的表达进行分析研究<sup>[8]</sup>。

### 2. RNAscope 技术在细菌感染病理诊断的应用

2.1 对细菌菌种的鉴定 越来越多的研究发现癌症相关的微生物群影响着癌症的发生及进展。Bullman 等<sup>[9]</sup>利用 RNAscope 技术发现部分结肠癌及同个体肝转移配对标本中均可见梭杆菌属的感染, 并且经进一步检测发现原发灶及转移灶存在相同及相似丰富度的梭杆菌种类, 证明梭杆菌属可能有助于肿瘤的复发及转移。Liang 等<sup>[10]</sup>应用 RNAscope 及免疫组化技术原位定量分析发现 Fn 阳性的癌细胞同样可见大量 NLRP3 及 MDSCs 标记物 (CD11b 和 CD33) 的高表达, 且表达程度存在显著一致性。Gelbard<sup>[11]</sup>等应用定量 PCR、RNAscope 及 Sanger 测序等技术对 30 例特发性声门下狭窄 (Idiopathic subglottic stenosis, iSGS) 和 20 例插管相关性气管狭窄的

分枝杆菌菌种的基因序列和炎症因子进行对比分析, 发现分枝杆菌菌属的存在和病理性炎症反应与 iSGS 关系更为密切。这说明 RNAscope 技术可以精准检测细菌的种类、感染部位及程度。Bonifacio 等<sup>[12]</sup>应用小鼠模型, 发现应用该技术比 FISH 或其他检测靶点较少的原位检测技术更好的展现呼吸道组织中肺部共生细菌的检测。随后不久, Shimbori 等<sup>[13]</sup>应用 RNAscope 双显色原位杂交技术同时标记肠道菌群 rRNA 及肥大细胞标记物, 结果显示在肠道固有层内接近肥大细胞处可见菌群阳性表达, 为证明 IBS 中存在细菌与肥大细胞的直接相互作用提供直观证据。说明 RNAscope 技术可直接分析不同生物标志物之间的空间分布, 定位区域、距离测量等信息, 对任何疾病的研究均有重要的应用意义。

2.2 在感染性致病因子相关的检测 结核病现阶段仍然是困扰我国人民健康的卫生难题之一, 越来越多的研究证明细胞因子及趋化因子等结核病的病情评估及治疗预后起着至关重要的作用, 但大部分研究仅仅基于血清学浓度改变, 不能和组织学进行结合分析。Palmer 等<sup>[14]</sup>应用 RNAscope 技术对感染牛分枝杆菌 15 天及 30 天的小牛肺组织的 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  等细胞因子检测, 结果提示 TFN- $\gamma$  的表达在两时期差异较大, 晚期表达较高; IL-1 $\beta$  虽在早、晚期均大量表达, 但早期病变区域与正常区域表达数量未见明显差异, 而在晚期主要以巨噬细胞表达为主。除此之外, 此作者<sup>[15]</sup>应用 RNAscope 技术对同期牛肺组织和淋巴结进行细胞因子的检测, 发现即使组织学较为相近, 肺组织与淋巴结细胞因子的表达也存在明显差异, 以上结果说明仅依靠肉芽肿形态或血清细胞因子表达水平得出对结核病的进展或严重程度较为片面, 探究肉芽肿细胞分子改变对了解结核病的发病机制及病情评估更为重要。同时, 该作者早、晚期肺组织肉芽肿的多核巨细胞检测发现均有不同程度的细胞因子表达, 且表达数量具有较大差异。同时, 细胞因子的表达水平与多核巨细胞的细胞大小及细胞核数量之间呈正相关。这些结果表明, 多核巨细胞是牛结核样肉芽肿的活跃参与者, 有助于形成和维持肉芽肿所需的细胞因子环境<sup>[16]</sup>。骨桥蛋白 (OPN) 被认为是一种促纤维化的细胞因子, Popovics 等<sup>[17]</sup>应用 RNAscope 技术在小鼠模型中发现被感染大肠埃希菌的前列腺组织 OPN 的 Spp1 基因表达显著增加, 主要位于前列腺背侧叶的上皮细胞及炎细胞, 经进一步研究发现缺乏 OPN 基因的小鼠通过降低炎症细胞的聚集及下降促纤维化基因的表达从而降低炎症及纤维化的进展, 为前列腺增生尤其是具有慢性炎症反应及纤维化显著的患者治疗提供靶点。

### 3. 总结与展望

在细菌的实验检测研究手段中, 菌培养对标本浓度要求苛刻, 且极易造成污染。免疫组化虽然步骤较为简单, 但多对细菌分泌蛋白水平进行检测, 结果的敏感性及特异性值得关注。实时荧光定量 PCR 敏感性高, 特异性强, 可提供准确的分子信息及定量数据, 但同时也破坏了原有细胞及组织的空间结构顺序, 且不能区分活菌与死菌。二代测序技术具有更全面、更深度、高准确率的检测优点, 但造价高、步骤复杂, 对实验室及操作人员要求极高, 很难普及。RNAscope 技术聚集了敏感度及特异度高、检测范围广、操作较为

简单、可评估检测标记物与原位组织之间的空间分布特点等优点。有理由相信该技术在细菌种类的检测及细菌性疾病的治疗方面具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] 黄晶晶, 肖盟, 徐英春等. 二代测序技术在微生物和感染性疾病中的应用[J]. 协和医学杂志, 2018, 9(5): 448-452.
- [2] 王荣山, 吴亦栋, 尚世强. 实时荧光定量 PCR 检测细菌方法的建立及其临床应用[J]. 中华围产医学杂志, 2005, 8(4): 242-245.
- [3] Gross-Thebing T, Paksa A, Raz E. Simultaneous high-resolution detection of multiple transcripts combined with localization of proteins in whole-mount embryos[J]. BMC Biol, 2014, 12: 55.
- [4] Wang F, Flanagan J, Su N et al. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues[J]. J Mol Diagn, 2012, 14(1): 22-29.
- [5] Baltzarsen PB, Georgsen JB, Nielsen PS et al. Detection of mRNA of Telomerase Protein in Benign Naevi and Melanomas Using RNAscope[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2020, 28(1): 36-41.
- [6] Amini Chermahini G, Rashnnejad A, Harper SQ. RNAscope in situ hybridization-based method for detecting DUX4 RNA expression in vitro[J]. Rna, 2019, 25(9): 1211-1217.
- [7] 汤鸿, 朱颖炜, 陆忠华. RNAscope 技术在肝脏疾病组织学研究应用中的价值分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2020, (04): 365-368.
- [8] 杨海玉, 刘勇. RNAscope 原位杂交技术在肿瘤病理学中的应用[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(4): 283-285.
- [9] Bullman S, Pedamallu CS, Sicinska E et al. Analysis of Fusobacterium persistence and antibiotic response in colorectal cancer[J]. Science, 2017, 358(6369): 1443-1448.
- [10] Liang M, Liu Y, Zhang Z et al. Fusobacterium nucleatum induces MDSCs enrichment via activation the NLRP3 inflammasome in ESCC cells, leading to cisplatin resistance[J]. Ann Med, 2022, 54(1): 989-1003.
- [11] Gelbard A, Katsantonis NG, Mizuta M et al. Molecular analysis of idiopathic subglottic stenosis for Mycobacterium species[J]. Laryngoscope, 2017, 127(1): 179-185.
- [12] Bonifacio JPP, Schmolke M. Visualization of Respiratory Commensal Bacteria in Context of Their Natural Host Environment[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 678389.
- [13] Shimbori C, De Palma G, Baerg L et al. Gut bacteria interact directly with colonic mast cells in a humanized mouse model of IBS[J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2105095.
- [14] Palmer MV, Wiarda J, Kanipe C et al. Early Pulmonary Lesions in Cattle Infected via Aerosolized Mycobacterium bovis[J]. Vet Pathol, 2019, 56(4): 544-554.
- [15] Palmer MV, Thacker TC, Waters W.R. Differential Cytokine Gene Expression in Granulomas from Lungs and Lymph Nodes of Cattle Experimentally Infected with Aerosolized Mycobacterium bovis[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0167471.
- [16] Palmer MV, Thacker TC, Waters WR. Multinucleated giant cell cytokine expression in pulmonary granulomas of cattle experimentally infected with Mycobacterium bovis[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2016, 180: 34-39.
- [17] Popovics P., Jain A., Skalitzky K.O. et al. Osteopontin Deficiency Ameliorates Prostatic Fibrosis and Inflammation[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22):12461.

第一作者简介: 毛昕, 性别: 女, 民族: 汉族, 出生年月: 1996年6月, 籍贯: 河北省邢台市, 学历: 硕士, 专业: 临床病理学。