

分子生物标志物在职业医学中的应用

庄志雄

随着分子生物学理论的发展和技术的广泛应用, 分子生物标志物 (molecular biomarkers) 的研究和利用作为一个崭新的领域引起了国内外预防医学界的共同关注。生物标志物 (biomarkers) 所反映的是生物体系与环境因子 (化学的、物理的或生物学的) 相互作用所引起的任何可测定的改变, 包括生化、生理、免疫和遗传等多方面的改变, 这些改变可发生在整体、器官、细胞、亚细胞和分子水平上。分子生物标志物则是指外来因子与机体、细胞, 特别是生物大分子 (核酸、蛋白质) 相互作用所引起的一切分子水平的改变。与其他生物监测指标比较, 分子生物标志物在准确、敏感地评价早期、低水平的损害方面具有独特的优势, 因而对评估外来化学物的危险度和预防措施的效果上具有广泛的应用前景。我国 90 年代以来在分子生物标志物的研究和利用方面取得了一些重要的成果。本文拟就分子生物标志物在职业医学中应用的有

关问题进行阐述。

1 分子生物标志物的分类

1.1 1989 年美国国家科学院 (NAS) 将生物标志物分为三大类

1.1.1 接触标志物 (biomarkers of exposure): 机体内某个隔室中测定到外来物质及其代谢产物 (内剂量), 或外来因子与某些靶分子或细胞相互作用的产物 (生物有效剂量或到达剂量)。

1.1.2 效应标志物 (biomarkers of effect): 机体内可测定的生化、生理或其他方面的改变。这些改变依程度不同, 可表现为确定的或潜在的健康损害或疾病。

1.1.3 易感性标志物 (biomarkers of susceptibility): 机体接触某种特定的外来物质时, 其反应能力的先天性或获得性缺陷的指标。

这些标志物可互为因果, 相互作用, 它们的相互关系见图 1。

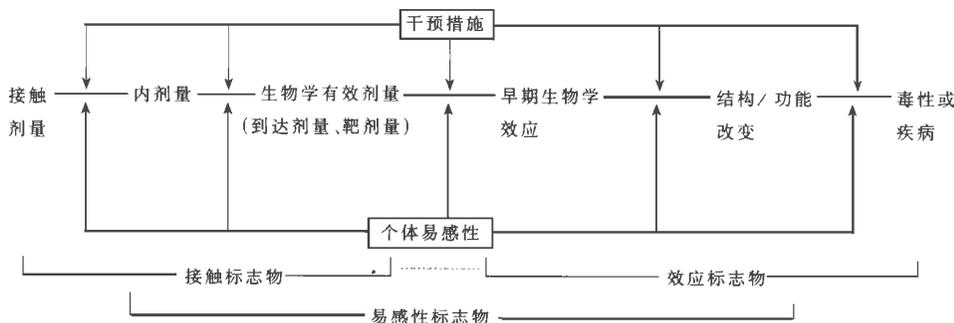


图 1 接触标志物、效应标志物、易感性标志物的相互关系

1.2 依照上述分类, 广义的分子生物标志物应包括五种

1.2.1 内剂量的生物标志物: 直接测定细胞、组织或体液中 (如血、尿、粪便、乳汁、羊水、汗液、毛发、指甲、唾液) 中的毒物及其代谢物的浓度。例如, 呼出气中的有机溶剂, 血液中的苯乙烯、铅、镉、砷等, 脂肪组织中的多氯联苯和多溴联苯、DDT 和 TCDD, 尿中的黄曲霉毒素和苯的代谢物及其他致突变物, 头发中的砷、铅等重金属, 血液中的碳氧血红蛋白、高铁血红蛋白等。

1.2.2 生物有效剂量 (到达剂量或靶剂量) 的生物标志物: 测定毒物与靶分子相互作用, 包括: (1) DNA 加合物: 迄今已发现各种烷化剂、多环芳烃、芳香胺和黄曲霉毒素等 100 多种致癌物和诱变剂可导致 DNA 加合物的形成, 如焦炉工外周血淋巴细胞中的苯并 (a) 芘 DNA 加合物, 肿瘤化疗病人白细胞中的顺铂-DNA 加合物, 亚硝酸胺摄入后胃肠道粘膜的⁶O-甲基脱

氧鸟苷等, 黄曲霉毒素污染区居民尿中的黄曲霉毒素-N⁷-鸟苷加合物, 接触辐射和其他形式的氧化应激后尿中的碱基氧化产物 8-羟基脱氧鸟苷等。DNA 加合物最常用的检测方法是 ³²P-后标记方法, 此外, 某些加合物可用放射免疫和 ELISA 方法以及紫外荧光光谱法测定。(2) 蛋白质加合物: 目前在人群中应用的包括芳香胺、多环芳烃、黄曲霉毒素、溴化甲烷、环氧丙烷、乙烯、丁二烯、苯乙烯、氯乙烯、苯、TNT 等 20 余种毒物的血红蛋白加合物, 还有黄曲霉毒素的白蛋白加合物。蛋白质加合物主要以缬氨酸、半胱氨酸和组氨酸加合物的形式存在。可用不同方法水解后用 HPLC 或 GC-MS 方法检测, 也可用免疫学方法测定。(3) DNA-蛋白质交联物: 紫外线、电离辐射、各种烷化剂、醛类化合物、铂类抗癌物、某些重金属 (镍、铬) 等可引起这种改变, 可用碱洗脱法、滤膜过滤法、梯度离心法、凝胶电泳法进行定量检测。最近建立的 SDS-KCL 沉淀法和 ¹²⁵I-后标志法在人群监测方面具有较高应用价值。

作者单位: 518020 深圳市卫生防疫站

1.2.3 早期生物学效应的分子生物标志物: 用于测量毒物与细胞相互作用的分子水平的后果。(1) 初级 DNA 损伤的生物标志物: 包括由各种诱变剂及氧化应激引起的 DNA 单链断裂, DNA 双链断裂、DNA 链内和链间交联, 脱嘌呤和脱嘧啶等。(2) 靶基因和报告基因的遗传学改变: 癌基因活化, 抑癌基因失活, 体细胞基因(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 HGPRT, 人类白细胞抗原 HLA、血型糖蛋白 GA) 突变, 胸苷激酶及其他靶基因的突变(点突变、缺失、重排)。基因突变可用分子生物学方法(如 PCR、直接测序法、差异显示杂交法、核酸酶切割法、变性梯度凝胶电泳法、碳化二亚胺法、错配化学布位切割法、单链构型多态、限制性片段长度多态、异源双链分析和荧光原位杂交技术等)检测基因型改变, 也可用 Northern blot 和 Western blot 方法检测其表达产物, 或用生物化学方法检测其表型改变。(3) 细胞遗传学改变: 染色体畸变, 姐妹染色单体交换, 微核形成等。(4) 氧化应激的生物标志物: 脂质过氧化产物, 血液和靶组织中的丙二醛、共轭二烯、脂质过氧化物、氢过氧化物、呼出气中的短链烃; 蛋白质氧化产物, 蛋白羰基, 蛋白氢过氧化物, 蛋白结合多巴和各种氨基酸氧化产物, DNA 氧化产物, 8-羟基脱氧鸟嘌呤及其他碱基氧化产物; 抗氧化酶活性的改变, 超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化氢酶(CAT), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px), 谷胱甘肽还原酶(GSH Red), 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD); (5) 毒物代谢酶的诱导及其他酶活性的改变: 细胞色素 P-450 系统的诱导, 谷胱甘肽硫转移酶、UDP-葡萄糖醛酸转移酶和 DT-黄递酶的变化。(6) 特定蛋白质的诱导生成: 如热应激和其他应激因素引起的热休克蛋白(HSP90, HSP72, HSP70, HSP60) 和泛素; 过渡金属引起的金属硫蛋白(MT) 诱导。

1.2.4 细胞结构/功能改变的生物标志物: 反映毒物与细胞相互作用后形态和/或功能改变。(1) 疾病状态的血清酶标志物: 如肝损害时血清 GSTs, ALA 和 SDH 活性的升高, 心肌损害时 SGOT 和肌酐激酶活性升高, 有机磷农药中毒时胆碱酯酶活性抑制, 铅中毒时 ALAD 活性抑制。(2) 增生的生物标志物: 有丝分裂频率, 胸腺嘧啶标记指数, 细胞增生核抗原, 鸟氨酸脱羧酶, 多胺水平等。(3) 分化的生物标志物: 细胞骨架蛋白, 谷氨酰胺转移酶。(4) 异常的基因表达: 上皮生长因子(EGF), 肿瘤生长因子(TGF-B), 血清 α -胎球蛋白, 癌胚抗原等。(5) 其他细胞/组织毒性改变: 最近, 美国环境保护局和 WHO 环境卫生标准系列又提出了血液毒性, 肾毒性, 肝毒性, 免疫毒性, 肺毒性, 生殖和发育毒性, 神经毒性等系统效应标志物, 其中有不少是从分子水平来探查这些器官系统的毒性机理及表现。

1.2.5 易感性标志物

(1) 药物/毒物代谢酶多态: 这类酶的多态性直接影响到毒物在体内的去向和结局以及与细胞和大分子的相互作用, 细胞色素 P-450 (CYPs) 多态, 乙酰化酶 (NATs) 多态和谷胱甘肽硫转移酶 (GSTs) 多态与某些人类肿瘤的关系已得到证实。(2) DNA 修复酶缺陷: 已经克隆的人类 DNA 修复基因有

剪切修复杂交互补 (ERCC) 基因, X 线修复杂交互补 (XR-CC) 基因, 多聚腺苷二磷酸核糖基转移酶 (PARP) 基因, 着色干皮病剪切修复 (XPAC) 基因, Franconi's 贫血修复 (FACC) 基因, O⁶-甲基鸟嘌呤甲基转移酶 (MGMT) 基因, DNA 连接酶 (DNA ligase I) 基因和 DNA 聚合酶 β (Poly β) 基因等十余种。与这些修复酶的先天性遗传缺陷有关的人类疾病有运动失调性毛细血管扩张症 (Ataxia telangiectasia)、着色干皮病 (Xeroderma pigmentosum)、先天性全血细胞减少症 (Franconi's anaemia)、Bloom's 综合征和 Cockayne's 综合征等, 这类先天性遗传缺陷素质的病人对某些理化因素诱发的肿瘤特别敏感。(3) 其他遗传易感性素质: α -1-抗胰蛋白酶缺陷素质的个体易发生肺气肿; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷对氧化应激、芳香胺和硝基化合物的耐受能力下降, 易有溶血倾向; 镰刀细胞表型及地中海贫血表型及红细胞卟啉症患者对血液毒物易感性增加, 易发生贫血。

2 分子生物标志物在职业医学研究中的应用

生物标志物在职业危险度评价、生物监测和职业流行病学调查、职业病临床等方面已经展现出广阔的应用前景。

2.1 确定毒物在机体的存在及其所产生的损害的性质和程度

接触的分子生物标志物能用于肯定和评价个体或群体对特定物质的接触, 提供外环境接触与进入机体的内剂量之间的联系。与环境监测比较, 生物标志物能更准确地反映机体及靶组织的实际接触量。而且, 由于某些接触标志物综合了多途径进入的毒物和一段时间内接触毒物的总和, 排除了不同时间毒物浓度涨落的影响和不同吸收途径对毒物分布的影响, 因而能描绘出机体接触状态的完整图像和消长规律。生物有效剂量的生物标志物反映了毒物或其代谢产物直接与细胞内靶分子相互作用的性质和程度, 如各种致癌物引起的 DNA 加合物、蛋白质加合物、DNA-蛋白质交联物, 这类标志物一方面是毒物进入机体的后果, 同时又是产生遗传损害和致癌过程的原因, 因此, 这类标志物实际上又是早期生物效应标记物。在职业流行病学调查和危险度评价时, 往往需要选择合适的终点来确定毒物所引起损害, 以区分有无不良反应的个体, 特别是那些隐匿的、轻微的、早期的改变, 分子生物标志物可为筛选这类终点提供高效、敏感和方便的工具。

2.2 研究毒物作用的剂量-效应关系

在职业危险度评价和流行病学研究中, 常常必须阐明剂量-效应(反应)关系、原因(接触)与后果(疾病)的关系, 而接触生物标志物与效应标志物则可定量地对这两者的关系进行评价, 了解其关联程度。易感性标志物则通过影响毒物从进入、吸收、代谢、分布到排泄等各种体内过程而影响毒物的生物效应。这种剂量-效应关系可通过横断面调查、病例-对照研究和前瞻性队列研究得以实现。在这些研究中, 分子生物标志物可提供客观可信的评价指标, 由于其敏感性较高, 特别适于人类接触的大多数环境化学物的低剂量情况。

2.3 探究和阐明毒物作用机理

分子生物标志物为分子水平深入洞察毒物从吸收到产生

生物学效应乃至疾病的全过程提供了重要的工具。不同阶段的分子生物标志物的组合可反映疾病发生发展过程的详情和因果关系,解释毒物作用机理。例如,DNA加合物是许多化学物致癌物与DNA相互作用的产物,它可导致DNA复制、表达与修复过程的错误,如将此类标志物与基因突变指标、癌基因活化、抑癌基因失活及肿瘤生物标志指标结合起来,则可提供化学致癌机制(遗传或遗传外)的重要线索。平面的芳香烃化学物通过芳香(Ah)受体结合而诱导CYP1A的转录,这种改变与这些化学物的毒性作用和致癌性有关。与内剂量和早期生物学反应的生物标志物一样,易感性标志物也可提供疾病机理的线索,例如,芳香胺引起的膀胱癌患者中慢性乙酰化者比例增多,提示乙酰化速率影响这种化合物的解毒。

2.4 分子生物标志物作为职业健康监护的指标

2.4.1 筛选易感人群,减少接触危险性:易感性标志物反映了机体接触有害物质后发生毒性反应的危险性增加,可用于识别和筛选对某种特定有害物质易感的个体,从而保护这些个体。大多数易感性生物标志物都属于分子生物标志物的范畴,如各种代谢酶多态和抗氧化酶及DNA修复酶的缺陷,可分别用分子生物学方法或生物化学方法对它们的基因型和表达型进行测定。

2.4.2 早期生物学效应的生物学标志物可尽早发现可逆的和亚临床病变,保证有效的康复。

2.4.3 利用接触和效应的生物标志物可检查和鉴定预防措施的效果。

2.5 关于分子生物标志物选择和评估

研究生物标志物的最终目的是应用于人群,因此,在选择和评估分子生物标志物时,必须考虑下面几个因素。首先,衡量一个分子生物标志物应用价值的最重要的因素是它与所研究的生物学现象之间的联系既关联性,例如癌基因活化及肿瘤抑制基因失活与肿瘤发生的关系,胆碱酯酶活性与有机磷农药中毒临床表现的关系。其次,这种指标要能反映出比较早期和低水平接触所引起的轻微的改变,以及多次重复低水平接触累加所引起的远期效应,并能确定这些改变是由某种特定因子引起的独特改变,也就是方法的敏感性和特异性。一般而言,保证某一指标的敏感性往往会以牺牲其特异性为代价,反之亦然,人们在选择合适的分子生物标志物时,必须根据上述需要,综合分析,权衡利弊。有时需要采取一组综合的评价指标。最后,由于分子生物标志物的最终对象是人体,因此必须考虑受检对象的可接受程度,如采样方法的无损性或低损伤性,简便易行,便于推广应用,既检测方法的实用性,并有较好的可重复性和准确性。此外,一些伦理学问题也须加以考虑,如受检者对该检查的认识、信念和态度、提供相关信息可能性和合作程度、是否涉及个人隐私以及标志物的法规效能等。

3 分子生物标志物的发展趋势

3.1 多学科多实验室通力协作、共同攻关。例如癌基因的研究已吸引成千上万来自不同国度不同实验室的科学家,包括

生物化学、分子生物学、病理学、肿瘤学、药理学、毒理学、临床医学和流行病学领域的科学家的共同关注。近十年发表的论文已达6万余篇,分别从不同角度进行深入的研究,取得了丰硕的成果。

3.2 新技术新方法迅速进入分子生物标志物的研究领域。新的现代仪器分析技术如GC-MS、光质谱、加速电子质谱、HPLC、ESR、MNR、荧光及化学发光等检测技术不断完善,并广泛应用于外来化学物及其代谢物、生物大分子及二者相互作用产物的定性和定量检测。分子生物学技术不断更新,如近年发展的高保真度PCR技术,差异显示杂交技术、荧光原位杂交技术、穿梭质粒和转基因动物技术迅速为分子毒理学和分子生物标记物的研究所采用。例如,单细胞凝胶电泳技术几年前还只是用于检测单个细胞DNA断裂的一个较敏感和简便的方法。最近两年来,这种方法不断完善,并已扩展到检测DNA交联和DNA-蛋白质交联,最近又有作者报道用这种方法结合荧光原位杂交研究染色体结构的细微变化。

3.3 计算机化的信息处理系统应用于分子生物标志物资料的分析,并拟合出相应的数学模型,为预测生物标志物在体内的动态变化提供线索。

3.4 天然物质、内源性物质及相关产物的分子生物标志物引起重视。

3.5 生物标志物的实验室研究和基础研究成果迅速向市场转化,一些成熟的检测方法,包括计算机分析软件的快速商品化,一些检测试剂和试剂盒在短时间内投放市场,推动了分子生物标志物的广泛应用。

4 关于发展我国分子生物标志物研究的刍议

我国环境与职业毒物的生物监测工作始于50年代初,但当时的监测指标主要局限在监测体液或排泄中的毒物及其代谢产物,随后又开展了一系列生化效应指标(如血中胆碱酯酶、转氨酶、 δ ALA、血卟啉、高铁血红蛋白等)和细胞遗传学指标(微核、染色体畸变、姐妹染色单体交换)的研究。改革开放以来,特别是90年代以来,随着分子生物学技术在毒理学中的广泛应用,大大推动了我国分子生物标志物研究的进程。目前,一些新的分子生物标志物已在我国开展,如DNA加合物、蛋白质加合物、DNA-蛋白质交联物及其他DNA损害(DNA链断裂、8-OHdG、DNA交联)的指标、外来化学物引起基因变化的指标(P_{21} 、 P_{53} 、HGPRT等)、HSPs、MT以及DNA修复及代谢酶多态的指标(CYPs、GSTs、NATs等)。

就总体而言,我国的分子生物标志物的研究无论在数量与质量、广度与深度方面与国外都有较大差距,主要表现在以下几个方面:(1)由于大多数分子生物标志物的检测要求较先进的仪器设备和技术条件,耗费较大,限于我国的经济水平和发展水平和基层的设备技术条件,目前此项研究工作仍局限于几个较大的科研机构 and 高等院校,推广难度较大。(2)许多分子生物标志物存在着特异性不高、指标的不确定性以及人群个体差异大等局限性。目前,可利用于广泛人群监测的有针对性的分子生物标志物较少,所获得的信息量有限。(3)

我国现行的一些分子生物标志物的检测大多沿用国外现成的方法,具有我国特色的独创的方法不多。(4)缺乏各不同实验室实验结果的比较和相关指标的比较资料,许多分子生物标志物尚无统一的操作规程和技术标准、质量控制系统,对方法的可信度、可行性缺乏技术监督机制。(5)我国对分子生物标志物的理论研究较为薄弱,或者存在着理论与实际应用脱节的现象,不能正确理解分子生物标志物的意义与价值。

鉴于我国生物技术发展水平和分子生物标志物研究的现状,笔者认为,当前应着手解决以下几个问题:(1)加强分子生物标志物应用的技术规范化管理,尽快将分子生物标志物的应用列入国家卫生标准研制计划,讨论制订分子生物标志物有关规则,统一标准化的方法,建立质量控制系统,提供参照值,确定可供应用的分子生物标记物项目,达成共识,克服分子生物标志物研究和利用的混乱状态。(2)根据我国国情,确定分子生物标志物优先发展领域,如我国当前应用最广泛、危害程度大的毒物的分子生物标志物;简易而又适于基层应用的分子生物标志物;反映慢性、低水平接触的敏感生物标志物;研究和探讨多种生物标志物在机体内消长规律,组织分布特性和时相,以便把握最佳监测时机,提高检出率。(3)加强实验研究与人群应用的结合,实验科学家、毒理学与职业流行病学工作者联合起来,协同作战。(4)加强分

子生物标志物检测方法的技术交流培训,尽快将成熟方法推广应用于基层。(5)加强各实验室之间的沟通与合作,尽可能做到资源共享,包括技术与信息的共享,建立分子生物标志物的信息库。(6)正确认识分子生物标志物的优势和目前的局限性,客观评价分子生物标志物的应用价值。

5 参考文献

- 1 WHO. IPCS Environmental Health Criteria, Vol 155: Biomarkers and Risk Assessment; Concepts and Principles Geneva, World Health Organization 1993
- 2 Mendelsohn ML, Peeters JP, Nomandy MJ Biomarkers and Occupational Health: Progress and Perspectives. Washington, D. C. Joseph Henry Press, 1995.
- 3 Hulka BS, Griffith HJ, Wilosky TC. Biological Markers in Epidemiology, New York: Oxford University Press, 1990
- 4 Smith MT, Suk WA. Application of molecular biomarkers in epidemiology, Environ Health Perspect 1994, 102 (suppl1): 229 ~ 235
- 5 Perera FP, Mooney IA, Dickey CP, et al Molecular epidemiology in environmental carcinogenesis. Environ Health Perspect 104 (suppl3): 441 ~ 443
- 6 庄志雄, 张桥. 分子生物标志物研究的现状与展望. 中华劳动卫生职业病杂志, 1997, 15 (3): 131 ~ 133

收稿: (1998-06-10)

丙烯酰胺致职业性接触性皮炎 1 例报告

龚希学 赵东霞 张翠琴

现将我所收治的丙烯酰胺致职业性接触性皮炎 1 例报告如下。

史某,男,31岁,科研人员,住院号 0024。因四肢、躯干红斑、丘疹、瘙痒反复发作 1 年 4 个月,于 1997 年 8 月 2 日来我所住院治疗。

职业史:1996 年 3 月至今从事防火玻璃的研制工作,近 1.5 年,经常接触丙烯酰胺。实验中将丙烯酰胺按比例配好加入到各种玻璃原料中搅拌、加温、成型,手工操作。实验室及操作间没有通风防尘设备,洗手等卫生设备利用不好,自我防护意识差。

现病史:接触丙烯酰胺 1 个月后,手背及前臂出现多处浅红色斑,自觉瘙痒。经扑尔敏治疗皮疹一度消退。以后再次接触丙烯酰胺仍出现红斑、瘙痒,停止接触休息数日后好转。由于在 1 年多的时间内多次接触丙烯酰胺致使红斑反复出现,并扩散到头面部,四肢近端,前胸及后背皮肤。自觉瘙痒难忍,伴有头痛、头晕。

既往身体健康,无药物过敏史。

查体:内科检查无异常发现。颜面水肿,尤以两眼周围明显,面部有少量浅红色斑。四肢、躯干皮肤可见大量的浅红色斑、抓痕,伴有轻度水肿,部分红斑融合,分布以手背、前臂为多。红斑直径约 0.5 ~ 2cm。

实验室检查:入院后查血常规、尿常规、肝功能、心电图及 B 超,均无异常改变。

以 1% 的丙烯酰胺水溶液做皮肤闭合斑贴试验。24 小时后局部皮肤呈现浅红斑,48 小时观察见浅红斑范围扩大,约 1cm,部分开始融合。去掉斑贴 48 小时后,浅红斑开始部分消退,7 天后斑贴部位皮肤恢复正常,诊断为职业性接触性皮炎。

经强的松 (10mg,口服,日三次)、强力解毒敏 (2ml,肌注,日 2 次)及 VitC (2.0g)、VitB₁ (0.2g) 与病毒唑 (0.5g) 静滴,半月痊愈。

(收稿:1998-01-22 修回:1998-09-18)