

· 综 述 ·

分子生物标志物及其应用

叶细标¹, 倪为民², 傅 华¹

(1. 复旦大学公共卫生学院, 上海 200032; 2. 上海市杨浦区中心医院职业病科, 上海 200090)

摘要: 本文从分子水平归纳了接触、效应和易感标志物。分子生物标志物的应用有助于我们早期识别生物学效应和易感人群, 从而有利于毒物危险度评估, 同时可用于发病机理和防治效果研究。应用时应考虑标志物的敏感性、特异性和变异性等问题。

关键词: 生物标志物; 分子生物学

中图分类号: Q7 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2002)01-0032-03

The application of molecular biomarkers

YE Xi-biao¹, NI Wei-min², FU Hua¹

(1. School of Public Health, Fudan University, Shanghai, 200032; 2. Yangpu Central Hospital, Shanghai 200090, China)

Abstract: The present paper reviewed the molecular biomarkers of exposure, effect and susceptibility. Molecular biomarkers can be used in early detection of biological effect, susceptible population, risk assessment and research on mechanism, treatment and prevention in diseases. Sensitivity, speciality and variety will be considered when we use biomarkers.

Key words: Biomarker; Molecular biology

1 分子生物标志物的定义和分类

广义的生物标志物 (biological markers, biomarkers) 是指生物材料中与有害因素接触有关的机体的各种变化, 包括生理、生化、免疫、细胞和遗传等方面的改变。随着分子生物学技术的发展, 许多研究者应用分子生物学技术从分子水平研究生物标志物, 以拓宽和加深接触和健康损害间关系的理解。分子生物标志物 (molecular biomarkers) 直接反映外来理化因

素与细胞靶分子, 特别是生物大分子如核酸和蛋白质的相互作用及其后果, 因而具有较高的敏感性。生物标志物分为接触标志物、效应标志物和易感性标志物三大类^[1], 它们之间的关系如图1所示^[2], 分子生物标志物同样可以分为上述三类。同一种生物标志物在一种情况下是接触标志物, 在另一种情况下则可能是效应标志物。

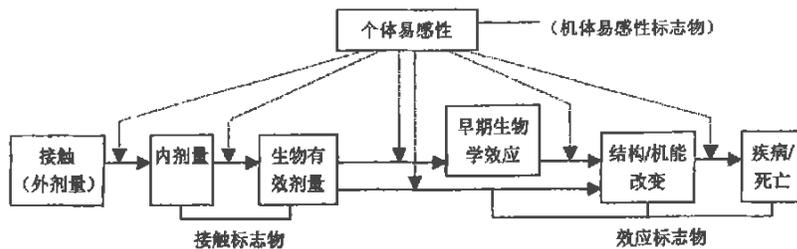


图1 接触标志物、效应标志物、易感标志物的相互关系

1.1 接触分子生物标志物 (molecular biomarkers of exposure)

分子水平的接触标志物主要是生物有效剂量生物标志物。生物有效剂量生物标志物是反映靶细胞分子内接触剂量的生物标志物, 主要包括蛋白质加合物 (Protein adduct)、DNA 加合物 (DNA adduct)、DNA 蛋白交联物 (DNA-protein crosslink, DPC)。研究较多的蛋白质加合物是外周血中的血红蛋白加合物和白蛋白加合物。如苯氧化物 (BO) 可与血红蛋白 (Hb) 和血清白蛋白 (Alb) 中的半胱氨酸结合形成蛋白质加合物, 80 年代末在动物实验中证实苯-蛋白质加合物的存在, 1998 年

Connell 等^[3]首次证明人的蛋白加合物与苯接触水平有关。近年来开始注意一些具有较长稳定性的蛋白质如染色质中的组蛋白和结缔组织中的胶原蛋白等, 以提供长期甚至终生接触的信息。DNA 加合物是一个受到最多关注的生物标志物, 因为它直接与所测化合物的遗传毒性相关。目前已检测出 100 余种化学物形成的 DNA 加合物。王春光等^[4]1993 年首次在染苯小鼠体内发现 DNA 加合物。DNA-蛋白质交联物是化学物引起的一种遗传损伤, 通过直接或间接的机制, 使细胞内 DNA 与蛋白质之间形成一种稳定的结合物, 这种损伤难以修复, 在体内保留时间较长, 作为一种生物标志物具有其独特的价值。紫外线、电离辐射、各种烷化剂、醛类化合物、铂类抗癌物、某些重金属如铬等均可引起这种改变。但由于其检测

收稿日期: 2001-04-02; 修回日期: 2001-06-04

作者简介: 叶细标 (1973-), 男, 江西人, 从事职业流行病学研究。

困难,能在人群调查中应用的很少。任泽舫等⁵研究提示DNA-蛋白质交联物可作为接触铬工人生物标志物。

1.2 效应分子生物标志物 (molecular biomarkers of effect)

是机体内可测定的生理、生化和其他方面的分子水平的改变。主要包括以下几类:(1)大分子氧化损伤及其产物:化学物导致的氧化应激可引起大分子主要是脂质、蛋白质和DNA的氧化损伤,这些损伤是衰老、退行性疾病、血管病变和肿瘤形成的基础。脂质过氧化常用的指标是丙二醛(MDA)、共轭二烯、氢过氧化物、短链烃等。DNA氧化常用的指标是8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)。蛋白质氧化可通过测定蛋白羰基(protein carbonyl)总量来反映。还可将蛋白氢过氧化物、蛋白结合多巴和各种氨基酸的氧化产物、体内抗氧化系统酶如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽氧化酶(GSH-Px)活性作为指标。(2)分子遗传学改变:包括DNA的初级损伤如DNA链断裂、交联、碱基改变,癌基因激活或抑癌基因失活,对细胞周期控制点的影响,对细胞信息传递的影响,异常的基因表达等。DNA链断裂可通过单细胞凝胶电泳(又称彗星试验)技术测定。倪祖尧等⁶测定了苯、甲苯、二甲苯工人的彗星细胞率,发现苯、甲苯、二甲苯浓度分别为15、20~40、50~150组与20~50、70~256、80~490 mg/m³组的彗星细胞率明显高于对照组,而且证明混苯浓度越高的工厂其工人的彗星细胞百分数越高。(3)癌基因:癌基因活化和抑癌基因失活是肿瘤形成的中心环节,与肿瘤形成关系密切。夏俊杰等⁷发现苯接触工人外周血白细胞有C-Ki-ras基因12位点G→T突变。夏昭林等⁸在41名苯作业工人中检出1名GGT→TGT(Gly→Cys)突变。细胞周期中存在G₁/S和G₂/M两个控制点,这种控制点对细胞生长增殖和保持细胞基因组稳定性起重要作用,毒物可以作用于这两个控制点使得细胞周期停止在G₁或G₂期。(4)金属硫蛋白(metallothionein, MT):MT是富含半胱氨酸的低分子量蛋白质,具有调节内源性金属Cu和Zn的平衡、对重金属污染解毒、清除自由基和参与某些应激反应的作用。MT可同时作为镉的接触生物标志物和早期生物学效应标志物。(5)应激蛋白和热休克蛋白(HSP):在高温、紫外线、重金属和某些外来化学物等应激因素的作用下,可诱导产生应激蛋白或热休克蛋白。近年来,已在氧化损伤、缺血、发热、炎症、心肌肥大、组织外伤、衰老、中暑、苯中毒等一系列疾病上观察到HSP的异常表达;在许多感染性疾病、自身免疫性疾病(如系统性红斑狼疮、胰岛素非依赖性糖尿病)、中暑、苯中毒、高血压、冠心病患者中血清或血浆中均检测出HSP抗体,进而提出HSP抗原抗体作为生物标志物的可能性。邬堂春等⁹对接触高温、一氧化碳、苯、粉尘等工人进行了HSP含量和HSP抗体滴度调查。陈胜等¹⁰调查发现血浆热应激蛋白70抗体滴度与接触苯工人健康状况密切相关。

1.3 易感性分子生物标志物 (molecular biomarkers of susceptibility)

是反映机体先天具有或后天获得的对接触某种特定的外

来化学物的反应能力。美国NIEHS已启动环境基因组计划(Environmental Genomic Project, EGP)¹¹,该计划应用人类基因组计划所使用的方法,鉴定与环境相关疾病的易感等位基因多态性,建立这些基因多态性的中心数据库,进而服务于疾病流行病学中环境与基因相互作用的研究。目前列入研究项目中的基因包括异源生物体代谢和解毒基因、激素代谢基因、受体基因、DNA修复基因、细胞周期相关基因、细胞死亡控制基因、参与免疫和感染反应的基因、参与营养过程的基因、参与氧化过程的基因以及信号传导有关的基因,同时还致力于发现新的易感性基因。这些基因多态性可以作为易感性分子生物标志物。目前研究较多的是药物/毒物代谢酶如细胞色素P450(CYP1A1, CYP2A1, CYP2E1)、谷胱甘肽转移酶(GSTM1, GSTT1)、N-乙酰化酶(NAT)、对氧磷酶(PON)、乙酸脱氢酶(ADH)多态性和DNA修复基因如剪切杂交互补(ERCC)基因、X线修复杂交互补(XRCC)基因、DNA连接酶基因、DNA聚合酶β基因多态性。郑玉新等¹²发现CYP2D6L等位基因频率在锰中毒工人和无中毒工人之间的差异有显著性,CYP2D6L基因型在锰中毒患者中的分布明显低于对照组,提示CYP2D6基因可能是与锰中毒有关的易感/耐受基因。ALAD基因多态性与血铅水平有关,提示基因多态性可能与铅中毒易感性有关¹³。

2 分子生物标志物在职业医学中的应用¹⁴

分子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、职业病临床中得到广泛应用,有良好的前景。

2.1 接触评价和生物监测

生物有效剂量的分子生物标志物反映了毒物或其代谢产物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、蛋白加合物、DNA蛋白交联物,这类标志物实际上又是早期生物效应标志物。

2.2 职业健康监护

(1)早期生物效应的识别:应用早期生物效应标志物识别早期生物效应,有利于早期发现职业有害因素对职业人群的健康损害,以便早期采取措施阻止或延缓损害进一步发展。(2)疾病的筛检和早期诊断:有些生物标志物在正常人体的生物材料中并不存在,只在疾病发生时才出现。如微卫星不稳定性仅在肿瘤细胞中发现,它可作为肿瘤早期诊断和筛检的生物标志物。但需要提出的是,生物标志物要用于疾病的筛检和诊断还需进行细致的综合分析。(3)易感人群的筛选:易感性生物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属于分子生物标志物,如代谢酶多态和DNA修复酶缺陷,可用分子生物学和生物化学的方法对它们的基因型和表现型进行测定。

2.3 治疗和干预措施效果评估

对职业病治疗和现场干预前后的生物标志物进行比较,可以评价治疗和干预措施的效果。

2.4 探讨发病机理

分子生物标志物涵盖了机体从接触毒物到疾病发生的整个过程。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,解释毒作用机理。以职业性肿瘤为例,一些化学致癌物可以与DNA形成结合物,或产生活性氧和自由基导致大分子氧化损伤,或引起细胞遗传学改变,或激活癌基因等,综合应用这些生物标志物可以帮助我们理解化学致癌物的作用机理。

3 分子生物标志物的选择标准

3.1 关联性

即生物标志物和接触与疾病之间存在统计学联系,这是生物标志物能够应用于职业流行病学研究的前提。另外,还要考虑这种生物标志物存在时间的长短。

3.2 敏感性和特异性

一般来说,敏感性和特异性是相互制约的,提高了敏感性,就会降低特异性,反之亦然。因此,必须权衡利弊,选择适宜的截断点,使二者兼顾,有时需要采取一组综合指标。

3.3 变异性

生物标志物存在个体内变异、个体间变异和组间变异。当研究慢性接触时,应选择个体内变异小、能较好反映个体暴露情况的生物标志物。

3.4 简便易行,无创伤。同时还要考虑伦理学、社会和法律问题。

参考文献:

- [1] WHO. IPCS Environmental Health Criteria Vol 155: Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles [Z]. Geneva, World Health Organization, 1993.
- [2] Hulka BS, Garrett P. Influence of biomarkers on the design, methods, and interpretation of epidemiologic studies [J]. J Toxicol Environ Health,

1993, 40: 2-3, 389.

- [3] Connell KY, Rothman N, Smith MT, et al. Hemoglobin and albumin adducts of benzene oxide among workers exposed to high level of benzene [J]. Carcinogenesis, 1998, 19: 1565-1571.
- [4] 王春光, 李桂兰, 尹松年. 苯染毒小鼠体内DNA加合物及其持续时间的研究 [J]. 中华预防医学杂志, 1993, 11: 344-345.
- [5] 任泽舫, 庄志雄, 林寿梧, 等. DNA-蛋白质交联物作为接触铬工人生物标志物的研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1996, 14 (1): 7-9.
- [6] 倪祖尧, 逢兵, 孟建峰, 等. 单细胞电泳检测接触苯、甲苯和二甲苯工人外周血细胞DNA损伤 [J]. 卫生毒理学杂志, 1996, 10: 267-268.
- [7] 夏俊杰, 张国高, 毕勇毅, 等. 接触苯工人白细胞癌基因激活的研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1994, 12: 79-82.
- [8] 夏昭林, 金锡鹏, 袁弥涛, 等. 苯作业工人白细胞Ki-ras癌基因点突变分子检测初探 [J]. 中国工业医学杂志, 1995, 8: 193-195.
- [9] 邹迎春, 贺涵贞, 张国高. 热应激蛋白研究的进展与前景 [J]. 中华预防医学杂志, 2000, 34 (1): 6-7.
- [10] 陈胜, 董美阶, 朱海燕, 等. 接触苯工人血浆热应激蛋白70抗体滴度分析 [J]. 中华预防医学杂志, 2000, 34 (1): 8-10.
- [11] Genomic Environmental Project. <http://www.niehs.nih.gov/environom/home.htm>.
- [12] 郑玉新, 何凤生, 陈彪, 等. 慢性锰中毒易感性与基因多态性的病例对照研究 [J]. 中华预防医学杂志, 1999, 33 (2): 78-80.
- [13] 叶细标, 倪为民, 傅华, 等. ALAD基因多态性与血铅水平关系的meta分析 [J]. 广东微量元素科学, 2001, 8 (9): 22-26.
- [14] Vainio H. Use of biomarkers-new frontiers in occupational toxicology and epidemiology [J]. Toxicol Lett, 1998, 102-103, 581-589.

急性CO中毒引起ST-T改变1例报告

高兵¹, 吴海川²

(1. 沈阳市第九人民医院, 2. 沈阳市职业病防治院)

患者,女,69岁。该患于2001年1月7日11时燃煤气蒸馒头(当时门窗紧闭,居室面积16 m²),13时许自觉头晕、乏力、恶心,遂卧床休息,症状逐渐加重,15时12分被家人发现,呼之不应,急送我院。门诊检验:HbCO35%,门诊行高压氧治疗后以“急性CO中毒”为诊断收入院。病人既往无心脏病史。查体:BP 135/75 mmHg, P 86次/分, R 18次/分, T 36℃,意识不清,双瞳孔等大正圆,光反射正常。双肺呼吸音清,心律齐,四肢活动正常。心电图示窦性心律;ST-T改变,I、II、III、aVL、aVF、V₃、V₅示ST段下移,最多达0.15 mV;T波降至等电位线;Q-T间期延长,最多可达0.52秒。实验室检查:HbCO35%,血RT:WBC 11.2×10⁹/L,血糖5.8 mmol/L,血K⁺4.9 mmol/L,Na⁺138 mmol/L,Cl⁻102 mmol/L,

BUN 5.68 mmol/L。临床诊断:急性CO中毒。给予高压氧治疗及营养神经、心肌抗感染治疗后,患者自觉症状好转。第二天,复查心电图示正常,心电图ST段回到等电位线,II、V₅、T波直立达到0.3 mV。实验室检查HbCO 10%。

讨论:由于居室面积小,门窗紧闭造成煤气燃烧不充分,产生大量CO,CO与血中Hb紧密结合,使机体组织不能接受正常情况下HbO₂的供氧,导致组织缺氧致中毒。当中毒程度较严重时可引起心肌组织严重缺氧,由于内膜下心肌对缺氧较外层心肌更为敏感,因此心内膜下心肌首先出现因缺氧而引起的心肌弥漫性损伤和坏死,故无明显的局灶性。此外,由于心肌组织缺氧影响了心肌细胞的动作电位过程,主要表现为复极期3相延迟。据有关文献报道:CO中毒可有以下心电图特点:(1)除aVR导联外,其余导联ST段下移,T波变平、倒置,双支不对称;(2)Q-T间期延长;(3)上述表现无心电图定位特征;(4)随CO中毒程度的缓解,ST-T改变也一并改善。本例患者CO中毒后形成心电图特征性ST-T改变,第二天给予高压氧治疗后,CO中毒得到缓解,心电图恢复正常。

收稿日期:2001-07-31;修回日期:2001-09-19