

肿瘤等疾病的生物标志物而用于早期诊断。然而，迄今能在常规临床使用的新型生物指标还非常少。在蛋白质组问世以后，人们将疾病早期诊断的生物指标寄望于蛋白质组的技术和由血清蛋白质组得到的数据。无数的研究小组致力于追踪那些有可能成为疾病标志物的多肽或者代谢产物，使得寻找生物标志物的工作格外繁荣。目前的常用技术中，以双向电泳和质谱最为突出，两种方法都可以用于比较正常和疾病状态下蛋白质组的变化情况。

4同位素标志物相对和绝对定量(iTRAQ)技术是近年来最新开发的一种新的蛋白质组学定量研究技术，具有较好的定量效果、较高的重复性，并可对多达四种不同样本同时进行定量分析。研究人员采用iTRAQ蛋白质定量技术加速蛋白质的定量研究，当然这门新兴的技术仍然需要进一步的完善。iTRAQ的操作程序一般如下。将蛋白质裂解为肽段，然后用iTRAQ试剂进行差异标志物。再将标志物的样本相混合，这样就可以对其进行比较。与样本结合后，通常用MudPIT多维蛋白质鉴定技术进行下一步的操作，用2D液相色谱串联质谱进行分析。在质谱分析鉴定特殊肽离子片断结构的基础上，采用美国应用生物系统公司的软件包MASCOT和Protein Pilot对每一个肽段进行鉴定。

原文检索：

www.sciencemag.org

<http://zh.wikipedia.org/wiki/%E7%94%9F%E7%89%A9%E6%A0%87%E8%AE%B0>

<http://baike.baidu.com/view/63384.htm>

http://www.wellnesswest.ca/dmdocuments/TW_7_low%20res.pdf

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm_marketing/documents/generaldocuments/cms_040631.pdf

 YORK 筱玥/编译

2 生物标志物的开发与应用

2.1 癌症生物标志物的开发与应用

十年来，研究人员一直在寻觅一种有效且对机体无损伤的肿瘤检测方法。终于，在2003年，Cui等人宣称找到了一种理想的肿瘤检测方法^[1]。他们开发了一种基于DNA的血液检测法来评估病人罹患结肠癌(CRC)的风险。Cui的这项研究成果受到肿瘤生物学界密切关注，因为该成果是肿瘤检测生物标志物应用及开发领域所取得的重大进展。

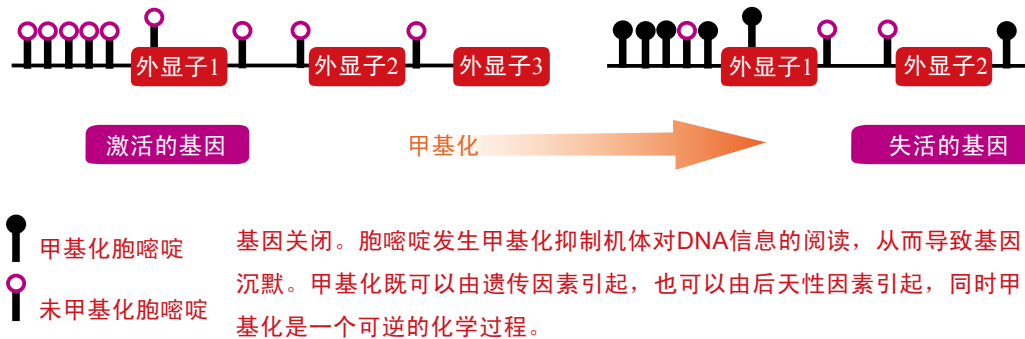
Cui等人对172例结肠癌病人的组织切片及血液样本进行了研究，分析了这些样本中胰岛素样生长因子II(IGF2)基因的印记缺失(LOI, 见文后小词典)

情况。

基因甲基化也可发生于生命晚期。Cui等人证明IGF2基因的印记缺失不仅与CRC家族病史相关，同时也证明与个人结肠腺癌和CRC病史相关^[1]。LOI与家族性CRC之间的关联尤为引人注目，因为多达30%—50%的散发性CRC都具有家族病史，但这其中的遗传机制目前还不清楚。然而人们目前已经发现了症状明显但是十分罕见的遗传性CRC综合症—家族性结肠腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis coli)及遗传性非息肉性结肠癌的分子发病机制。

研究人员在28%的具有CRC家族病史的病人体内发现了LOI，而这一数字在具有个人CRC病史的病人中更是高达56%。与之相反，正常人群中出现LOI的几率不到10%。如果LOI真是CRC的发病因素之一，那么它与CRC之间的这种关联不仅能够推动基于血液的诊断性生物标志物的开发，同时也加深了我们对于散发性CRC的生物学认识。

LOI很可能通过甲基化这一表观遗传学现象而与肿瘤的发生相关联。DNA甲基化和DNA突变都能够影响遗传信息在DNA-RNA-功能蛋白质这条途径上的传输。DNA中的胞嘧啶发生甲基化会影响基因的表达。在许多情况下，甲基化会抑制转录过程^[2]（见图）。



研究人员对甲基化调节这一复杂过程十分感兴趣，因为与DNA突变不同，甲基化过程具有化学可逆性，而且基因的甲基化可能是遗传所致或者由于外界环境所引起。

IGF2是一种重要的肿瘤生长因子，正常情况下，调节IGF2基因表达的DNA序列由于甲基化而被关闭。但是在LOI存在的情况下，这段DNA序列的甲基化状态发生了改变。在Cui领导的这项研究中，发现LOI可能由于遗传或其它原因在生命早期出现，因为他们在多份结肠癌组织切片及少量白细胞样本中都发现了这一表观遗传学现象。但若LOI出现于单集落细胞无性繁殖的生命晚期，则说明LOI可能是结肠组织采取的一种补救措施。

Cui等人开展的这项研究将非损伤性肿瘤检测方法研究又向前推进了一大步，但是该方法是否在临床上也同样有效还需要仔细考虑一下几个因素：

第一，LOI并不能直接代表CRC，而只能提示一种患病趋势。

这种趋势性的间接判断指标单独或其它标志物联合在临床上还是可能有其用武之地，但前提条件是它们要有足够的灵敏度，而且阴性检测结果必须能确定受检者罹患CRC的风险很低，只有做到以上两点，我们才能省略传统的筛查步骤^[3]。

鉴定出不需要进行活组织切片检查等传统筛查步骤的人群亚群，是开发肿瘤生物标志物的重要目标之一。开发其它类型的分子标志物的目的并不在

于检测一个人一生患腺瘤或CRC的风险和趋势，而是直接判断病人体内是否已经出现肿瘤组织。DNA突变就是这种标志物之一，它能够在一定程度上反映正常结肠组织正在向腺瘤及最后CRC发展的进程^[4]。病人的粪便^[5,6]和血液都可以作为样品来检测肿瘤内的DNA突变。

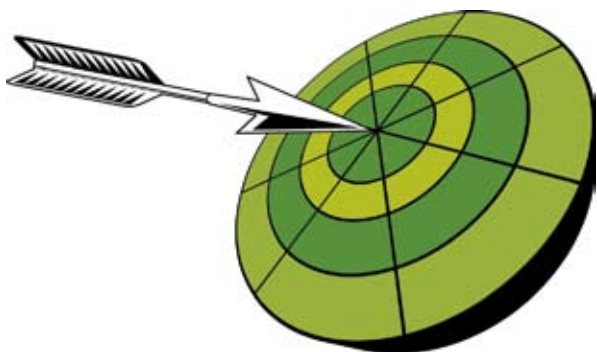
基于蛋白质组学的检测方法主要检测肿瘤及与之相关的蛋白产物，从而鉴定一个人是否罹患肿瘤^[7]。

目前生物标志物开发的主导方法有两种，但现在还不知道究竟哪一种方法的研究成果能够率先应用于临床实践。Cui采用的是一种基于假设的方法。在该方法中，首先假设IGF2分子与肿瘤发生相关，从而为研究提供了一个靶标。利用这种假说，便能够对可能的候选基因或蛋白逐个进行研究。

当然，很可能要整合多种标志物才能取得研究最后的成功，因为单一标志物无法提供足够的灵敏度和特异性^[6]。

任何一种新型标志物的研究首先都需要攻克技术难关^[5]。因此通常来说，一步一步脚踏实地，在已有的肿瘤生物学知识之上进行研究才是比较合理和有希望取得成果的方式。

另一种称为“基于发现的研究”（discovery-based research）^[8]的研究方法也开始逐渐流行起来，这首先要归功于高通量技术的发展，因为该技术能让研究人员同时对成千上万的基因或蛋白进行



分析。基于发现的研究方法不需要事先找到一个靶标。例如，在RNA表达芯片技术的帮助下研究人员可以同时大部分的基因组进行筛查，从而预测肿瘤患者的预后^[9]。或者研究人员还可以利用质谱技术筛查病人血清全蛋白质组，以判定该患者是否罹患肿瘤^[7]。利用新方法我们得到了复杂的基因表达模式或质谱分析曲线，这些信息可以帮助我们找出一些能够被传统方法用来检测的基因或蛋白质^[10]。

与旧方法不同，新的生物标志物研究方法所得到的基因或蛋白质表达模式本身就可以成为一种检测手段，例如“特异性表达谱”^[9]或经过计算分析的蛋白质组模式^[7]，同时我们并不需要准确知道究竟是哪些基因或蛋白构成了这些模式。这种研究可

能最终能为我们提供大量有用的结果，但这些结果首先必须通过严格的验证，以避免产生一些所不希望发生的结果^[11]。

与30年前相比，今天的生物标志物研究领域更加生机勃勃，因为研究人员在肿瘤分子生物学领域取得的进步为生物标志物研究提供了大量潜在靶标。此外，实验技术的突破，例如PCR、芯片技术和质谱技术也大大推动了生物标志物研究的进展，因为只有在这些技术的帮助下，研究人员才能高通量地筛查靶标。

然而，采用这些新方法得到的数据是如此复杂，这既令人灰心丧气又令人着迷，它们就像一堆无论从整体看还是从细节分析都一样复杂的不规则碎片。这是因为，虽然人们能够观察到越来越多的微小现象，但这并不意味着人们对于这些微小现象的理解会随之自动深入和增加。生物标志物的研究之路还很长，人们需要更多的想象力，更严格的证实手段，当然，还需要一点运气^[12]。

原文检索：www.nature.com

 知易行难/编译

小词典

LOI (loss of imprinting)：是指基因在胚胎发育时期就通过甲基化作用发生沉默的一种表观遗传学现象。由于印记基因是父源或母源单等位基因表达，基因表达产物量在影响该基因功能方面有重要意义。印记基因引起疾病主要表现在两个方面，一是印记等位基因的再活化，即印记丢失 (LOI)；二是印记基因的另一拷贝等位基因异常造成该基因失活，而非印记基因是两等位基因同时失活引起疾病。

参考文献

1. H. Cui et al., Science 299, 1753 (2003).
2. M.Verma, S. Srivastava, Lancet Oncol. 3, 755 (2002).
3. C. A. Lang, D. F. Ransohoff, in Prevention and Early Detection of Colorectal Cancer: Principles and Practice, G. Young, B. Levin, P. Rozen, Eds. (Saunders, London, 1996), pp. 155-170.
4. B.Vogelstein et al., N. Engl. J. Med. 319, 525 (1988).
5. G. Traverso et al., N. Engl. J. Med. 346, 311 (2002).
6. D.A.Ahlquist et al., Gastroenterology 119, 1219 (2000).
7. E. F. Petricoin et al., Lancet 359, 572 (2002).
8. R. L. Stears et al., Nature Med. 9, 140 (2003).
9. M. J. van de Vijver et al., N. Engl. J. Med. 347, 1999 (2002).
10. S. Markowitz et al., Int. J. Biol. Markers 17, S43 (2002).
11. R. Simon et al., J. Natl. Cancer Inst. 95, 14 (2003).
12. D. F. Ransohoff, J. Clin. Epidemiol. 55, 1178 (2002)

2.2 接触、效应及易感性：三类生物标志物的开发与应用

生物标志物是一种可以反映机体发生改变的分子或细胞水平的内在指标，一个可靠的生物标志物可以成为联系人们所接触的环境与人体健康之间的特异性因素。

由于生物标志物可能与疾病密切相关，因而NRC在1989年出版的单行本论著《肺部毒理学中的生物标志物》（*Biologic Markers in Pulmonary Toxicology*）和《生殖毒理学中的生物标志物》（*Biologic Markers in Reproductive Toxicology*）中着重讨论了接触、效应及易感性这三大类生物标志物。图1所示为接触—疾病流程示意图，旨在强调运用生物标志物评估接触剂量、作用模式和疾病病因的重要性。

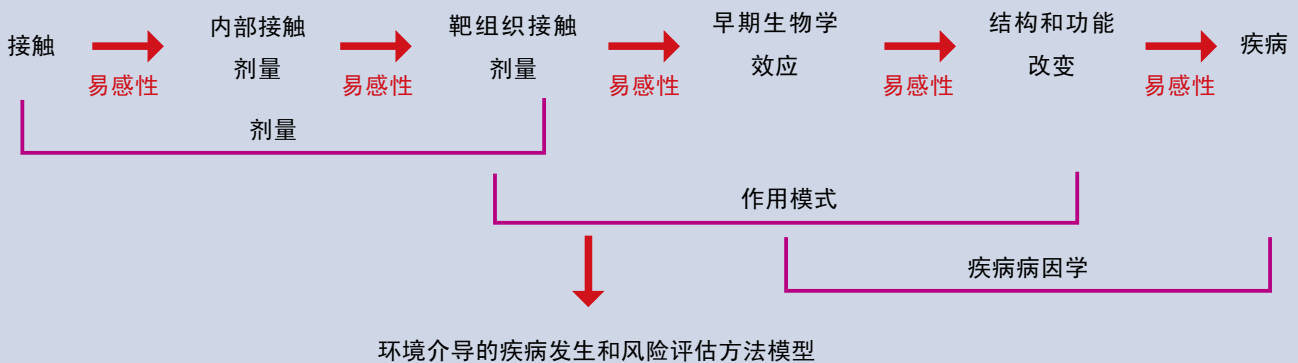


图1应用生物标志物进行接触剂量评估、作用模式和疾病病因研究

易感性生物标志物可能会影响流程中每一个元素所起的作用。同时，有助于疾病预防和治疗的生物标志物有可能出现在该途径中的任一环节上。那些早期标志物（即在接触很少剂量时就能够检测到的标志物）将大大有助于患者减少疾病的转移；而晚期标志物则通常与疾病具有更高的相关性。

在过去几十年，人们对生物标志物展开了大量研究，并大大推动了分子流行病学这一门新兴学科的发展。美国国立环境卫生研究院（NIEHS）及美国环境保护机构（U.S.EPA）的研究人员期望，在机体内部及体外环境研究中都能进一步挖掘出生物标志物对于风险评估的价值，同时他们还进行了大量生物标志物可靠性的证实工作，并尝试在临床中率先运用这些经过证实的生物标志物。与此同时，世界上其它组织所开展的生物标志物研究大多局限于实验室，实验室内的研究人员坚信，有朝一日生物标志物能够成功运用于改善公众健康或应对疾病突发事件。

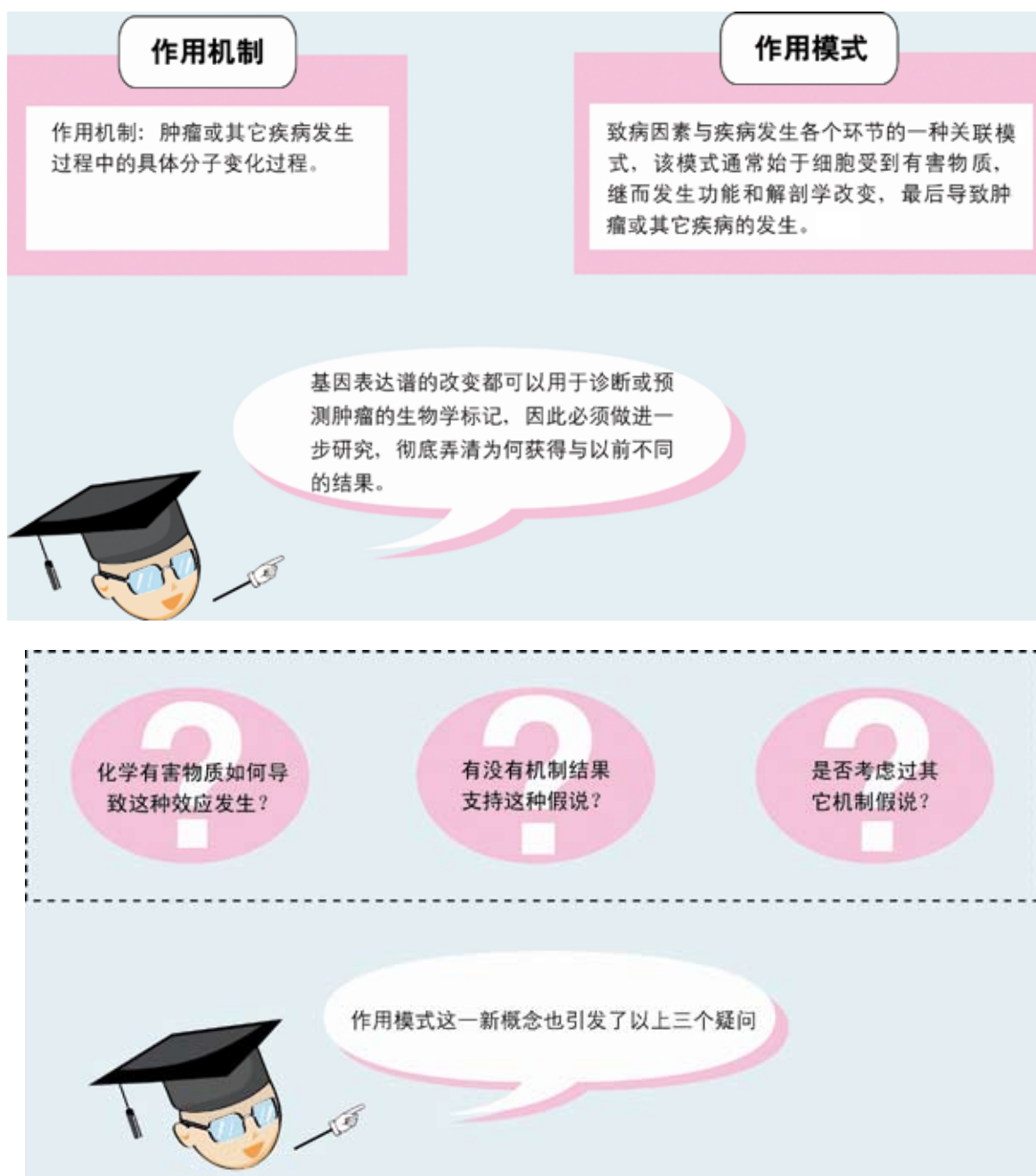
► 风险评估生物标志物

人们应该大力发展基于生物学的风险评估方法，因为接触类生物标志物能够大大提高人们对于靶组织所接受有害物剂量的估计精度。通过生物反应或效应标志物以及它们与相应疾病之间的关联机制，人们能够更好地描述疾病的风险特征。研究人员将会根据仅凭肉眼无法观察到的剂量—反应曲线形态，加强对于公共卫生的干预，同时也从潜在的敏感人群中鉴定出一些可供未来研究的靶分子。接触标志物、效应标志物和易感性标志物三者之间其实存在着内部关联；从概念上，人们似乎希望能够明确的区分这三者，但是事实上，它们是一个相互关联的有机整体。对这种内在关联的认识有助于利用生物标志物来验证已出现的一些假说。但实现这一目标需要打破常规，使用全新的理念来设计实验，需要多学科知识的交叉。

在U.S.EPA出版的《致癌物质风险评估指导

建议》(Proposed Guidelines for Carcinogen Risk Assessment) 以及最近的《化学物质安全国际计划》(International Programme for Chemical Safety) 所提出的通用“风险评估体系”中都建立了一个类似的体系, 以将各种不同的科学信息整合到风险评估中来。这一基本的框架体系适用于各种疾病, 无论是肿瘤还是非肿瘤。

作用模式这一概念在风险评估体系中居于最为重要的地位。首先必须区分作用模式与作用机制这两个概念。



为了证明作用模式这一假说确实成立, 人们通常需要罗列出导致中毒或疾病发生的各个事件环节, 同时找到可检测的关键事件, 而通常承担这一角色的就是生物标志物。接下来的工作就是仔细分析这些信息, 判断这些罗列出的关键事件是否确实与疾病的发生存在因果关系。关键事件被定义为从经验分析能够肉眼观察到的预兆, 同时这一事件是作用模式中一个不可或缺的元素, 或者是这一元素的一个标志物。通常, 关键事件包括代谢、受体-配体改变、细胞生长速率和器官重量增加、荷尔蒙分泌失调和其它生理功能紊乱、异常增生现象以及细胞过度增殖等。

当然，对本底值的了解也将有助于对接触剂量—反应的分析。当进行风险评估时，应格外关注某一特定接触对总体风险所造成的影响。因此，在研究之前，人们需要了解通过上述作用模式影响人类健康的有害化学物质的本底水平。最终人们想知道的是疾病发生的本底值（见文后小词典），只有知道了这一信息，人们才能够在接触剂量—反应曲线上进行定位。在这一领域中，生物标志物的作用不可估量。

► 易感性生物标志物

遗传原因和非遗传原因，如年龄、健康状况、饮食等都可能造成一个人对于环境介导疾病的易感性。基因的多态性就是一种易感性生物标志物。随着人类基因组计划和环境基因组计划的顺利开展，越来越多的基因及其多态形式被发现。通过研究人们能够找到究竟是哪一个基因在环境导致疾病的发生环节中出现了异常。这些发生变化的基因，大多行使机体的日常功能，基本都能够应用于易感性评估。例如，这些单个基因或成群基因能够影响或控制细胞分化、细胞凋亡、细胞周期或DNA修复过程。由受体介导的疾病发生途径会引起信号转导的变化，从而导致一系列健康异常状况的出现。人类基因组中有相当多的遗传多态性，以至于在它们的帮助下，有时可以预测机体对一个人工给予的接触所产生的反应状况。

在基因芯片等新技术的帮助下，研究人员得以对基因表达模式进行大规模的研究。随着美国国立卫生研究所（NIH）和其它数据库中积累的信息和数据的不断增加，目前的迫切任务是弄清楚这些遗传多态性所对应的生理功能以及遗传多态性变化将如何导致疾病的发生。研究人员通过整合基础实验、临床实验和流行病学资料，逐步揭开这一谜底。尽管有少量研究针对哮喘等疾病开展，但目前绝大多数遗传易感性研究都以肿瘤为研究对象。在遗传多态性功能研究不断取得进步的同时，同样不能忽略这些研究对于个人和社会所带来的伦理道德问题。

► 接触生物标志物

多学科交叉推动了接触类生物标志物研究的不断进步。接触生物标志物是联系机体外部接触和内部接触剂量的纽带，为剂量—反应评估研究提供了一个可检测的指标，同时也为流行病学和临床评估中的接触研究提供了大量有用信息。

那些能够综合反应各种不同接触模式的生物标志物格外受到研究人员的青睐，特别是对于那些进行多接触物研究的研究人员。基因芯片技术能够鉴定出基因的公共表达模式。因此，即使在比较复杂的情况下也能够鉴定机体是与某一物质接触，但这并不意味着不再需要进行蛋白质功能研究。

生物标志物可以用于特异位点突变评估，例如Superfund

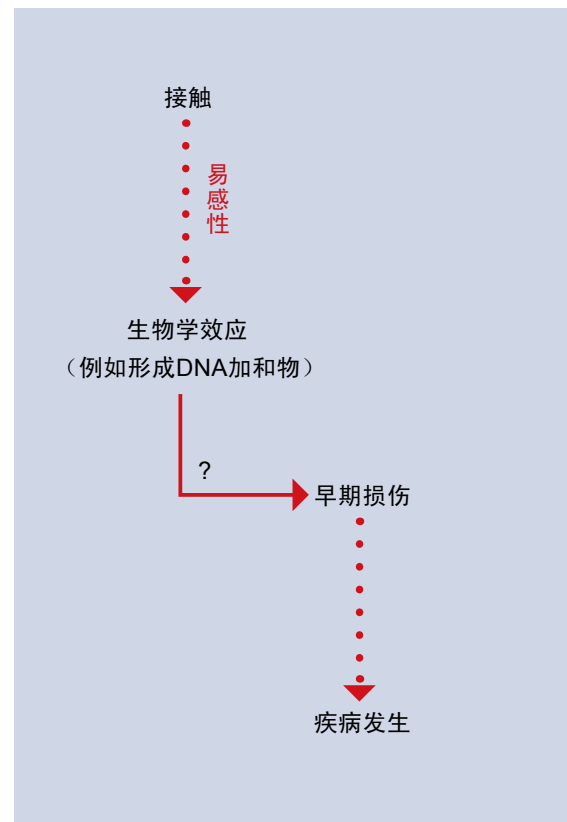


图2 效应生物标志物是否真的与疾病发生相关？

位点研究。很明显，生物标志物可以用于急性接触评估和作为一系列后果的导火索，这就包括汞接触和甲基对硫磷（一种农药）接触。血液、血浆和骨骼中的铅含量是一个绝佳的接触和效应生物标志物。除此之外，铅生物标志物研究还教会人们如何充分利用所获得的信息。假如在一小群儿童或一小块区域的人群内检测到很高的血液铅含量，这就是一个十分明显的信号，提示我们要格外给予关注。但在另一种情况下，即所调查区域人群血液含铅量相对于其它地区人群或者对照组并没有显著提高，这是否意味着该地区人群不存在铅中毒，也不需要采取任何措施呢？事实上，我们必须审慎的对待这一结果，即还需要对样本的代表性和所采用的统计学方法再作斟酌。

U.S.EPA主持开展了一项名为“国家人群有害接触评估调查”（National Human Exposure Assessment Survey, NHEXAS）的研究项目，该项目是一次在社区或区域水平针对有害接触开展的大范围调查。研究人员首先从血液、尿液和呼吸量着手找出患病人群，接着通过分析饮水、食物及周围空气中的有害成分来鉴定出暴露人群，最后得以研究这二者之间是否存在关联。NHEXAS所获得的数据目前还正在分析之中，相信这一项目肯定将为人类提供需多有用的信息。

► 效应生物标志物

效应生物标志物可能是中毒或疾病发生途径中的一个早期事件，也可能是位于主要途径之外的中毒或疾病前奏事件，例如这些标志物可能会与中毒过程或疾病发生过程同步变化（图2）。

目前想要通过人体和动物实验找到生物标志物与疾病发生之间的关联还存在一定困难。一些研究方法需要从接触有害物质或高度接触人群着手，以寻找到与生物效应或疾病相关的生物标志物；而另一些人则首先寻找疾病自身的早期生物标志物，然后再观察拥有不同有害物质的人群体内，该生物标志物会不会随着接触强度升高而升高。不论哪一种研究方法，它们的核心都是确立生物标志物与疾病之间的关联性。

新技术的出现将有助于在人体内进行生物标志物研究。核磁共振和正电子发射断层摄影术（positron-emission tomography, PET）引起了研究人员极大的兴趣，因为这两种成像技术不需要对人体造成任何损伤就能在分子水平检测标志物的改变。

只有明白了生物标志物在健康与疾病之间扮演着何种角色，人们才能成功地运用接触和效应等生物标志物。目前，大部分生物标志物还需要进一步证实其用于风险评估的可靠性。

► 易感性评估和疾病干预中的生物标志物

环境有害物生物标志物的发展与进步离不开代谢知识、相关产物的形成及综合作用机制的帮助。证实一个生物标志物的可靠性必须要通过平行实验和人体实验。

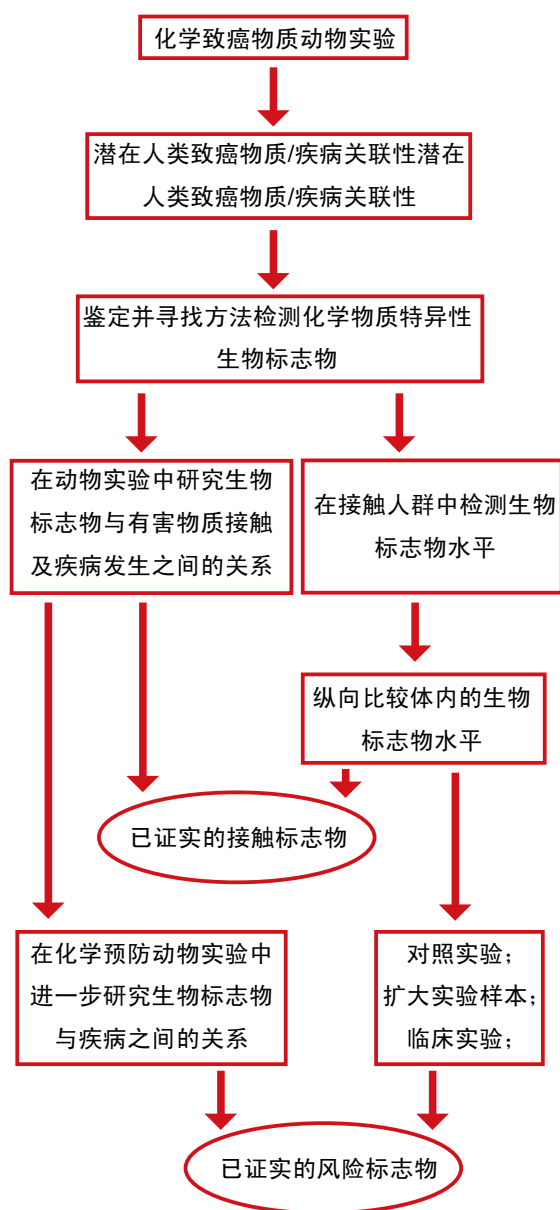


图3 化学特异性标志物验证模式

图3所示为在人体内证实和运用一个化学物质特异性生物标志物的系统方法。该流程的两个末端是已经证实的接触标志物和风险标志物。该图所示方法不仅适用于肿瘤，也适用于其它疾病。

这种证实方式已经应用于以下研究之中：

- a) 黄曲霉毒素B1接触；
- b) 肝癌病原学研究；
- c) 化学药物奥替普拉（oltipraz）预防肝癌研究。

上述研究所采用了血清中的黄曲霉毒素-白蛋白加合物（afatoxin-albumin adducts）以及分泌到尿液中的黄曲霉毒素-硫醚氨酸（afatoxin-mercapturic acid）作为生物标志物。

由于肿瘤和其它人类慢性疾病的发病过程都是一个长时间多环节的过程，因此能够成为风险标志物的化学物质特异性生物标志物是相对较少的。而且这一过程中的风险标志物不仅含有化学物质特异性生物标志物，也会包含其它类型的标志物，它们各自在一定程度上反映了机体所受到的总体风险。

► 流行病学研究中的生物标志物

生物标志物通常被用于分子流行病学，以研究对接触剂量和遗传或非遗传因素引起的易感性所进行的评估。

最近一项针对环境污染中的致命化学物质多环芳烃（PAH）的接触研究就是一个利用分子流行病学鉴定潜在致病因子的很好例子。该项研究希望形成一些假说，从而对今后的研究产生帮助。为了补充环境监控的一些不足和确认一些有疑问的数据，这项研究的研究人员通过生物标志物来评估胎儿所接触的毒物剂量。

研究人员将脐带血白细胞中的PAH-DNA加合物以及血浆可替宁作为生物标志物，以检测通过胎盘的PAH数量和吸烟对胎儿产生的影响。可替宁是尼古丁的一种代谢产物，

因此它可以作为一种特异性指标来衡量吸烟对PHA-DNA加合物及其它一些所观测到的机体异常所产生的影响。

很遗憾，研究人员目前还无法利用分子流行病学知识找到一个能够用于筛选研究、疾病预防和临床诊断的与疾病密切相关的临床前标志物。由于患病人群和正常人群都处在一个个极为复杂的环境之中，这就为研究带来了很大困难，人们难以找出究竟哪一个因素起着主导作用。因此可能需要采用多种生物标志物来解决这种复杂性所带来的问题。

► 生物标志物研究实验模型设计

风险评估模型通常依赖于个体而不是群体水平的信息。一般情况下，还必须使用替代标志物来代表靶组织。实验模型则能减少物种差异带来的研究误差，同时也更有利于进行低剂量接触效应的研究。此外，实验模型还能够整合流行病学与临床资料，体内和体外实验结果以及结构与活性之间的关系。

该领域的研究，需要我们在个体水平上共享资源。想通过在仅含有均值和标准差的纸上统计数据，设计和证实风险评估模型几乎是不可能的事情。模型设计需要在个体水平（人类或实验动物）上掌握大量而详细的信息资料。明白这一点十分重要，特别是对于研究人员和尝试使用这些信息的社区人群。

原文检索：<http://www.ehponline.org>

 知易行难/编译

小词典

本底值：亦称环境背景值。是指在不受污染的情况下，环境组成的各要素，如大气、水体、岩石、土壤、植物、农作物、水生生物和人体组织中与环境污染有关的各种化学元素的含量及其基本的化学成份。它反映环境质量的原始状态。