综述

文章编号:1000-5404(2005)19-1990-03

毒理学研究的新领域——毒理基因组学

Toxicogenomics: A new field in toxicology

敖 琳 综述,曹 佳 审校 (第三军医大学军事预防医学院卫生毒理学教研室,重庆 400038)

毒理基因组学是将基因组信息和技术应用于毒理学研究的一门新兴学科,主要采用以DNA微阵列为代表的高通量技术研究毒物和毒作用机制,其快速发展为毒理学开辟了新的研究领域。本研究综述了毒理基因组在毒理学研究中的应用,并探讨了目前面临的问题和挑战。

1 毒理基因组学的概念

毒理基因组学(toxicogenomics)来源于基因组学与毒理学的交叉和整合,是在人类基因组计划取得成功的基础上,将基因组理论和技术应用于毒理学的一门新兴学科,它从多基因、全基因组角度研究毒物作用与基因表达的相互影响。目前,毒理基因组学整合了多个研究领域的信息,包括利用微阵列技术进行基因组规模的转录表达谱分析,细胞或组织范围的蛋白表达谱分析,遗传多态性分析,以及相关的生物信息学分析和计算机模型的建立等。美国NIEHS在2000年还专门成立了国家毒理基因组学研究中心(National Center for Toxicogenomics, NCT),以推动毒理基因组学的快速发展[1]。

毒理基因组学的主要技术平台为高通量基因组分析技术,目前主要利用DNA微阵列工具研究基因转录表达谱的变化情况[2]。DNA微阵列,又称基因芯片,是由大量DNA或寡聚核苷酸探针密集排列所形成的探针阵列,通过杂交检测可以大规模地提取DNA或RNA信息。DNA微阵列具有高通量、微型化和标准化的特点,可以使毒理学家同时对成千上万的基因表达水平进行检测。随着各种专门用于毒理学研究的DNA微阵列的相继出现,"毒理芯片"为毒理学提供了一种以作用机制为基础的研究工具,使毒理基因组学得以快速发展。

2 毒理基因组学的应用

2.1 毒作用机制和预测毒理研究

传统毒理学使用大量的动物模型进行毒性测试,存在使用动物多、周期长、工作量大的缺点,并且反映毒性终点的各种表型改变、形态学指标等通常较为复杂、间接。目前认为,除了急速坏死,几乎所有的毒性作用都有相对应的基因改变。由于基因表达变化比传统的毒理学指标更敏感、更特异,并且DNA微阵列技术的发展,实现了对群体基因的平行检测,因此,直接对基因表达谱进行分析可能是未来毒理学研究的一个重要方向。

阐明毒作用机制和预测新化合物毒性的关键,在于识别毒物所特有的分子标志物或"基因指纹(fingerprints)",这通常依赖对基因转录表达的分析。但是单基因的检测方法,如Northern blot、RNA酶保护分析、RT-PCR等,其分析能力有限,很难识别化合物的毒作用指纹。因为大多数参与化合物与机体相互作用的基因,如代谢转化酶基因,通常是在相关化合物的诱导下发生表达变化,所以就单个基因而言,对化合物的反应往往具有交叉性,不具备单独作为"基因指纹"的特异性。而只有通过采用多种变量(如多个基因),分析其综合变化情况(如表达谱),才能描绘出化合物的特征性指纹[3]。因此,对毒作用"基因指纹"的识别应是基于基因群、甚至全基因组水平的分析,而要完成对成千上万基因表达的分析,只有高通量、平行检测的DNA微阵列技术才有可能。目前,运用此项技术分析基因表达谱,以阐明毒物、药物作用机制的研究报道已越来越多[1]。

此外,分析基因表达谱还能预测新化合物可能具有的毒性效应。如果我们已建立了足够的已知化合物毒作用信息的数据库,那么,在一种新化合物开发过程中,将其基因表达谱与已知化合物的"基因指纹"相比较,就可以从中推测新化合物是否具有某种相似的毒性效应,从而进一步设计更全面和更细致彻底的毒性检测,同时也为尽早筛选出可疑的有毒化合物提供了可能[4]。

利用"毒物指纹"或"毒性指纹"还有望在基因组水平对化合物进行重新分类。传统上对化合物的分类主要依据化学结构、毒性终点、作用机制以及靶器官等,而基于基因表达谱的分类方法不仅直观、快速,而且由于容纳了大量甚至全部的基因信息,同时结合数据库支持和统计学处理,这种方法较传统分类法更加精确可靠。例如,化合物、多肽库中存在大量结构高度相似的异构体,以基因组信息为基础的分类法通过筛选高度特异的分子标志物,有可能区分物质间极微小的差异。此外,表达谱能同时分析多种效应的交互作用,因而还能识别具有双重或多重毒性效应的化合物。美国NCT的科学家已尝试利用DNA微阵列技术,对过氧化物酶体增生剂和酶诱导剂进行分

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(30125037);国家自然科学基金资助项目(30100241, 30271136)
Supported by the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30125037) and the National Natural Science Foundation of China (30100241, 30271136)

作者简介:敖 琳(1971-),女,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事分子毒理及毒理基因组学方面的研究。电话:(023)68752589
通讯作者:曹 佳,电话:(023)68752271, E-mail:caojia@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2004-04-30;修回日期:2004-07-14

类。结果表明，同一类化合物可以产生相似但又可互相区分的表达谱，不同种类化合物间的表达谱相似度低于同类化合物，进一步根据已获得的表达谱数据在双盲条件下对 3 种化合物进行了正确分类，成功预测了其毒性效应[3,5]。因此以基因表达谱分析为基础的化合物分类方法是可行的。NCT 希望在 5 年时间内建立一个组织特异性基因表达指纹的“百科全书”，计划首先建立肝毒性化合物的急性、亚慢性和慢性暴露基因表达谱，目前已有 6 种化合物列入研究[6]。

2.2　毒作用的量效关系和时效关系研究

化合物危险性评价的核心是获得剂量-效应和剂量-反应关系曲线，但这种关系曲线在某些情况下显得很复杂。例如某些 DNA 损伤剂在一定剂量范围内造成的遗传毒性，会因为细胞对损伤的有效修复而不表现出线性的量效关系，因而一些传统的反映遗传毒性的指标在此就显得无能为力[7]。此外，确定中毒阈剂量或无作用剂量也是一个难题，因为这需要在无明显损伤效应的情况下寻找敏感、特异的指标。

基因组技术筛选的效应分子有可能反映出毒物的量效关系。以 DNA 损伤剂为例，在人类已发现了 125 个与 DNA 修复有关的基因[8]，并且不同的 DNA 损伤会引起不同的修复基因参与，即不同类型、不同程度的损伤会有相应的效应信号分子。例如，程度较轻的 DNA 损伤可以激活 p53 基因及相关信号途径，阻滞细胞周期进展，继而开始多基因参与的修复过程。当毒物剂量过大造成严重损伤，机体不能给予正常修复时，就会有更多的相关基因参加进来，如激活 caspase 基因的级联反应，诱导损伤严重的细胞凋亡。此外，由于基因表达的变化常常是早期、敏感的分子事件，可能出现在毒性效应未发生或发生之前，因此基因组分析更有可能提供低剂量暴露的分子信息，如反映亚病理状态的基因/蛋白改变。所以各种基因组技术的应用将会加快低剂量暴露的毒理研究，更真实反映人类暴露状况，同时也有助于确定阈剂量。

基因表达谱可以被看作时间、空间上分子事件的瞬时反映，分析各个时间点基因的动态变化，将有助于认识化合物的时间—效应关系。例如，早期出现瞬时改变的基因可能与机体的应激反应有关，而长期作用下发生改变的基因可能与慢性毒作用有关或仅仅是机体的适应性反应，这种分析方法对于了解具有慢性毒性、致癌性或继发毒性效应的化合物非常有益，因为可以大大缩短研究周期，减少动物的用量。Hamadeh 对多个时间点的表达谱进行的聚类分析表明，在多个时间点上以同样模式变化的基因，有可能作为可靠的反映效应的生物标志物[3]。

2.3　物种间外推

由于生化途径、受体亲和力等不同，物种间的毒性效应存在较大的差异，在某些情况下甚至出现毒作用质效应的差异。在毒理学研究中，如何将动物实验结果外推到人是一个长期未能解决的问题，而这一问题的关键在于寻找能够在不同物种间进行毒性比较的生物标志物，Aardema 形象地称之为“桥式生物标志物（bridging biomarkers）”[9]。由于物种间基因的同源性，在某些物种之间甚至具有高度同源性，这就为从基因水平寻找桥式生物标志物提供了可能。例如，最新公布的包括大鼠 90% 遗传物质的基因组草图表明，大鼠染色体上有 27.5 亿个碱基对，与人类染色体上的 29 亿个碱基对相当接近，并且在已破译基因组的 3 种哺乳动物中（人类、小鼠和大鼠），有大约 90% 的基因是相同的[10]。因此，采用高通量的 DNA 微阵列技术，可以从大量甚至全部基因分子中筛选出适当的“桥式生物标志物”，用于比较化合物毒作用的种属间差异，从而将动物实验结果外推到人。此外，比较不同物种间基因表达谱的相似程度，还有助于寻找与人类反应最接近的实验动物，使毒理学研究更接近人类实际情况。

2.4　混合物联合毒性效应

人类经常同时接触多种化合物，并且绝大多数环境物质都以混合物形式存在。化学混合物在机体内常呈现复杂的交互作用，或影响彼此的生物转运、生物转化，或竞争同一受体，甚至相互直接发生反应，从而影响各自的毒性或综合毒性。此外，混合物的种类、剂量配比、接触顺序等因素使暴露效应变得更为复杂。由于技术条件限制，目前大多数毒性测试只针对单一化合物，危险性评价也未涉及混合物，因此试图将一系列单一化合物实验结果外推，用于解释混合物的作用效应是不科学，不合理的。毒理基因组技术在解释混合物效应中显示出了较好的优势，在已知单一化合物毒性的前提下，将各种单一化合物和混合物的表达图谱进行比较，就有可能评价化合物的相加、协同、拮抗等效应是否存在。此外，将混合物的表达谱与参考化合物的表达谱数据库进行对比，则有助于分析混合物的成分，识别混合物中的微量污染物，因而有望取代目前极为繁琐的污染物分析方法。

2.5　危险性评价

对环境物质正式的评价通常需要长达 10～15 年的实验和标准制订。为缩短评价周期，同时更好反映化合物对人类的威胁，依赖于传统毒性测试方法的危险性评价正朝着对各种科学数据进行整合的方向发展，在此，生物标志物就显得尤为重要。目前研究中的标志物多为毒物代谢物、DNA 加合物、组织病理以及生化改变，数量有限且不一定具备足够的敏感性和特异性。基因组技术为毒理学研究提供了大量可供筛选的生物信息分子，结合生物信息学分析技术，有望确定敏感、特异的生物标志物。此外，环境反应基因的多态性研究能提供大量的易感基因标志物，寡核苷酸基因芯片技术也使个体的遗传多态性检测、基因分型变得简单快捷，因此，将个体易感性分析融入危险性评价，建立以个人特征为基础的危险性评价将是未来毒理学的发展趋势。

基因组科学在生物医学各个领域已取得了大量成功，基因组技术对于毒理学家更深入地认识毒性机制和加强对毒物的预测能力起了重要作用。可以设想，随着毒理基因组研究的不断深化，将给环境健康研究开拓新的局面。同时应该看到，毒理基因组学是一门发展中的学科，还处于幼年阶段，全面认识其潜能还需要很长时间。作为一个技术工具，它只是提供大量的需要进一步分析解释的数据，而并非研究的终点，必须正确认识其结果的真实性和有效性。

关键词：毒理基因组学；毒理学；DNA微阵列
中图法分类号：R99 **文献标识码**：A

参考文献：

[1] Waters M D, Olden K, Tennant R W. Toxicogenomic approach for assessing toxicant-related disease[J]. Mutat Res, 2003, 544(2-3): 415-424.
[2] Orphanides G. Toxicogenomics: challenges and opportunities[J]. Toxicol Lett, 2003, 140-141: 145-148.
[3] Hamadeh H K, Bushel P R, Jayadev S, *et al*. Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles[J]. Toxicol Sci, 2002, 67(2): 219-231.
[4] Waring J F, Gum R, Morfitt D, *et al*. Identifying toxic mechanisms using DNA microarrays: evidence that an experimental inhibitor of cell adhesion molecule expression signals through the aryl hydrocarbon nuclear receptor[J]. Toxicology, 2002, 181-182: 537-550.
[5] Hamadeh H K, Bushel P R, Jayadev S, *et al*. Prediction of compound signature using high density gene expression profiling[J]. Toxicol Sci, 2002, 67(2): 232-240.
[6] Cunningham M L, Bogdanffy M S, Zacharewski T R, *et al*. Workshop overview: use of genomic data in risk assessment[J]. Toxicol Sci, 2003, 73(2): 209-215.
[7] 曹佳,周紫垣,方福德, 等. 毒理基因组学与DNA微阵列技术的应用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2000, 14(5): 336-340.
[8] Ronen A, Glickman B W. Human DNA repair genes[J]. Environ Mol Mutagen, 2001, 37(3): 241-283.
[9] Aardema M J, MacGregor J T. Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies[J]. Mutat Res, 2002, 499(1): 13-25.
[10] Gibbs R A, Weinstock G M, Metzker M L, *et al*. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution[J]. Nature, 2004, 428(6982): 493-521.

（编辑 汪勤俭）

综述

文章编号：1000-5404(2005)19-1992-03

脑出血后继发脑损伤机制的研究进展

Mechanism of brain damage after intracerebral hemorrhage

李 玲 综述，陈康宁 审校 （第三军医大学西南医院神经内科，重庆 400038）

脑出血是指脑实质的非外伤性出血，起病凶险，预后差，有着较高的致残率和病死率。其最重要的病理改变是血肿形成、扩大及其周围脑组织的缺血缺氧和水肿。本研究拟就以下3个方面对脑出血的病理损伤机制研究进展进行综述，以期对临床治疗有所帮助。

1 血肿对周围脑组织的损害作用

脑血肿本身压迫周围脑组织3 d以上即可造成不可逆性神经元损伤。由于占位效应，脑血肿还可引起脑组织水肿，并使颅内压增高，脑血流减少。以往人们普遍认为，脑出血后仅存在短暂的活动性出血，时间为20～30 min，但随着CT和MRI的使用，人们发现血肿明显扩大的患者占较高比例。血肿扩大常出现于起病后6 h以内，也有人认为是在24 h以内[1]，临床表现为起病后常有数小时甚至数十小时的症状持续加重期。Fujii等[2]对627例起病后24 h内入院的自发性ICH病例进行多变量分析后，认为能够独立预测血肿的因素包括起病至入院时间、酗酒、意识障碍、血肿外形不规则、纤维蛋白原水平低等，而不包括血肿量、入院时和入院后的收缩压。学者们普遍认为，血肿扩大与临床症状恶化之间有显著相关性，但血肿扩大并不一定引起临床症状恶化。这可能还与活动性出血速度、颅腔代偿能力及早期血肿周围脑组织缺氧水肿程度等诸多因素有关。但是毋庸置疑，对于大部分患者，在超早期（≤4 h）在立体定向下利用t-PA溶解血凝块后抽吸血肿能明显解除对周围脑组织的压迫，减少脑水肿体积，防止进一步的血管源性水肿[3]，对患者是有积极意义的，只是手术对象、时机要有所选择。

有一种特殊类型的脑出血，即溶栓所致的脑出血，其周围脑组织水肿体积明显小于自发性脑出血周围水肿体积（31 ml *vs* 69 ml）[4]，提示血肿形成后，其释放的某些活性成分和血液本身的成分也参与了血肿周围神经元损伤的过程，这将在后面叙及。

2 局部脑血流下降

实验及临床研究均证实脑出血后相当一段时间内，在脑血肿周围甚至远隔区域可出现广泛的局部血流下降，且不随出血的手术清除而逆转，从而导致相应血肿周围的缺血性脑损害，使受损脑组织体积明显大于入院时血肿的体积。这一现象的发生机制可能为：①出血部位具有收缩血管的活性物质释放和吸收，比如5-HT、ET-1可收缩脑血管使脑血流下降。②白细胞

作者简介：李 玲（1975-），女，山东省肥城市人，博士研究生，主治医师，主要从事脑血管病方面的研究。电话：(023)68765253
收稿日期：2004-07-10；修回日期：2004-12-21