

基因芯片技术在药物毒理学研究中的应用

刘 静^{1,2}, 张金晓¹, 胡金芳^{1,2}, 申秀萍^{1*}, 刘昌孝¹

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘 要: 随着基因芯片技术的发展, 逐渐被应用于研究药物的毒性作用及其作用机制。与传统的药物毒理学研究方法比较, 基因芯片技术具有周期短、高通量的优势, 基因芯片技术的介入也进一步推动了药物毒理学研究的发展。从新药的筛选、毒理安全性评价到临床应用, 基因芯片技术将成为贯穿整个药物毒理学研究的重要技术。就近期基因芯片技术在药物毒理学研究中的应用成果进行了回顾总结。

关键词: 基因芯片; DNA 微阵列; 毒理学; 标志物; 安全性评价

中图分类号: **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2011)02-0115-05

Application of gene chip technology in drug toxicology research

LIU Jing^{1,2}, ZHANG Jin-xiao¹, HU Jin-fang^{1,2}, SHEN Xiu-ping¹, LIU Chang-xiao¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: With the development of gene chip technology, it has been applied to research drug toxicity and mechanisms. Gene chip technology has shorter cycle time and higher throughput compared to traditional methods of drug toxicology, so as to improve the development of drug toxicology research. Gene chip technology is an important technique for the whole procedure of drug toxicology research including new drug selection, toxicological safety evaluation, and clinic application. This review summarized the recent application achievement of gene chip technology in drug toxicology research.

Key words: gene chip; DNA array; toxicology; markers; safety evaluation

随着对基因组结构和功能研究的深入及基因芯片技术的发展, 基因芯片技术也逐渐应用于研究药物的毒性作用及其作用机制^[1]。基因芯片技术也被称为 DNA 微阵列 (DNA array), 寡核苷酸微芯片 (oligo nucleotide microchip) 或寡核苷酸微阵列 (oligo nucleotide microarray)。它利用大规模集成的手段将千百万个 DNA 探针有规律地排列在固相支持物上, 再将要研究的样品 DNA / RNA 通过 PCR 扩增、体外转录等技术掺入荧光标记分子, 然后在芯片上与探针杂交, 通过共聚焦显微镜或电光倍增管进行激光诱导荧光扫描, 并配合计算机系统对每个探针上的荧光信号进行比较和定量分析, 从而获得样品中大量基因序列及表达的信息。其最显著的特点是高通量、高集成、多样化和自动化^[2-3]。根据

用途的不同, 基因芯片分类为基因表达芯片和基因测序芯片。与药物毒理学研究关系密切的为基因表达芯片。随着基因芯片技术的发展, 从新药的筛选、毒理安全性评价到临床应用, 基因芯片技术将成为贯穿整个药物毒理学研究的重要技术。

1 寻找毒性作用标志物

安全性和有效性是药物的两大基本属性, 而药物毒理学研究正是对药物的安全性进行研究, 以观察药物是否具有毒性作用及其可能的作用机制。传统的毒理学实验方法测定指标针对性不强, 反映的毒性靶点不确切, 但基因芯片技术可以利用基因表达芯片, 找出药物作用于机体后的表达差异基因, 再对不同类型的药物所对应的基因表达谱进行分类总结, 找出其特征性的表达规律。这样不同用途

收稿日期: 2011-01-15

基金项目: 国家科技支撑计划 (2007BA141B03)

作者简介: 刘 静, 硕士, 研究方向为药理毒理。Tel: 13802156015 E-mail: liuj@tjipr.com

*通讯作者 申秀萍, 研究员, 研究方向为药理毒理。E-mail: shenxp@tjipr.com

径的化合物都可以找到其特有的标志基因。当积累足够多的基因表达图谱数据, 就可以建立毒物的毒理效应数据库。这样, 当对毒性作用不清的药物进行研究时, 就可以将该药物的基因表达图谱与毒理效应数据库比对, 从而找出其毒性作用靶点。特别是在药物致癌性的研究中, 利用基因组学技术, 建立与致癌性相关的标志基因数据库, 就能很快的探测新的药物的致癌性, 从而缩短致癌性研究周期。Kazunari 等^[4]利用基因芯片技术寻找致癌标志基因, 从而建立短期的药物致癌性研究的生物鉴定系统。17 种肝致癌性药物、8 种其他器官致癌性药物及 14 种无致癌性药物处理大鼠肝癌细胞 MH1C1 3 d, 分析肝致癌性药物及无致癌性药物组间、致癌药物及无致癌性药物组间及肝致癌性药物及其他致癌性药物组间基因表达的变化, 寻找到药物肝致癌作用标记基因。

毒理学家通过寻找出来的某种特定毒性作用的标志基因或生物标志物将药物进行分类, 如有致癌性药物和无致癌性药物、有遗传毒性和无遗传毒性药物、有肝毒性作用无肾毒性作用药物和肝肾毒性均有的药物等等, 以便更好的对药物的作用特点进行研究。van Delft 等^[5]分析了 16 种药物的基因表达图谱, 找出具有遗传毒性和不具有遗传毒性的致癌药物的表达差异基因, 并验证了 6 种致癌药物有无遗传毒性。

在建立了毒性作用的标记基因的基础上通过进一步建立合适的生物模型系统, 便可通过基因表达谱变化来反映药物对人体的毒性。并且也可以将与毒性作用相关联的差异表达基因编码的功能蛋白作为毒性作用标志物, 用于监控及指导临床用药。Sul 等^[6]将大鼠分别暴露于正常空气及含有 5×10^{-6} 、 1×10^{-5} 的甲醛的空气中, 连续 2 周, 每天 6 h, 每周 5 d。取肺组织进行基因差异表达分析, 研究发现 21 个表达差异的基因, 其中上调基因 2 个, 下调基因 19 个, 其中羟甲基胆汁合酶、谷胱甘肽还原酶、碳酸酐酶 2、利纳肽受体 3、跨膜酶体关联蛋白 5 等 9 个基因被定量 RT-PCR 确定, 希望能作为甲醛引起的人类相关病变的潜在生物标记物。Rokushima 等^[7]通过静脉给予头孢噻啶后分析 Fischer 344 大鼠肾基因表达图谱, 找出具有时间、剂量依赖关系的差异表达基因, 发现肾损伤分子-1 (kim-1) 可以作为头孢类抗菌素肾损伤的监测指标。

2 药物毒性作用机制

目前, 明确药物的毒性作用机制已经成为新药风险评估的一个主要部分。采用传统的分子生物学技术对药物进行毒理学研究, 虽然能对药物的部分毒理机制进行研究, 但一次仅能检测部分毒性作用产物的量、个别酶活性变化及个别基因表达变化, 不能反映药物整体的毒性作用。而基因芯片可同时检测数千个基因对药物的反应, 具有一次检测信息量大、快速、高效、准确、灵敏度高等优点, 而且 Waring^[8-9]和连冬生等^[10]发现具有相似毒性机制的化合物所获得的基因表达谱具有相似性, 因而, 基因芯片技术逐渐成为研究药物毒性作用机制的有效方法之一, 在药物毒理机制的研究中的应用也越来越广泛。

近年, 具有肝毒性、肾毒性等常见毒性作用的药物毒性机制研究较多, 国内外应用基因组学技术进行药物肝、肾毒性作用机制等研究也常有报道, 形成了较为丰富的肝、肾毒性基因差异表达图谱数据。Waring 等^[8-9]和高利宏等^[11]均对肝、肾毒性基因差异表达图谱数据进行聚类分析, 根据不同的肝、肾毒性作用机制对药物的基因表达图谱进行分类, 使新药的肝、肾毒性作用机制研究更加确切。Akira 等^[12]利用基因组学技术进行三氧化二砷 (As_2O_3) 肾毒性的作用机制研究, 发现 73 个差异表达基因, 通过分析, 发现其肾毒性作用与 HMOX1 基因 (编码血红素加氧酶) 表达增加和活性氧族增加导致的细胞毒性有关, 并且其细胞毒性作用可被 α -类脂酸和活性氧族抑制剂等抑制。施畅等^[13]利用大鼠和人的全基因组芯片, 分析 Bay41-4109 对大鼠肝脏和人肝细胞基因表达谱的影响, 结果显示引起大鼠肝脏发生差异表达的基因有 41 个, 显示 Bay41-4109 的肝毒性与药物代谢酶表达异常以及脂肪能量代谢异常有关。

而耳毒性、脑毒性、免疫毒性等毒性作用也有国内外毒理学家进行研究, 但报道相对较少。陈平等^[14]采用基因表达谱芯片对大剂量水杨酸盐注射后的大鼠耳蜗和正常耳蜗进行基因差异表达分析, 研究水杨酸盐所致的耳聋和耳鸣等耳毒性的分子机制。结果显示表达上调 2 倍以上的基因和表达序列标签 (expressed sequence tags, ESTs) 有 42 个, 下调 2 倍以上的有 49 个。这些基因编码通道蛋白、信号分子、转录因子、细胞因子和各种酶类, 也有许多功能未知基因, 表明水杨酸钠影响各种离子通道和突触蛋白基因。洪岩等^[15]应用基因芯片技术观察

As₂O₃ 对小鼠小脑组织氧化还原相关酶基因表达谱的影响。与对照组比较, 染砷组中差异表达 2 倍以上的基因有 18 条, 显示 As₂O₃ 对小鼠小脑的氧化还原相关酶基因表达谱具有明显的影响, 提示这些小脑氧化还原相关酶基因很可能是砷的神经毒作用的靶点。

目前, 国外毒理学家也逐渐应用基因组学技术进行遗传毒性、致癌性等特殊毒性的作用机制研究。

3 发现药物潜在的毒性

对药物进行毒性安全评价, 是药物筛选过程中十分重要的一个环节。目前药物毒理学研究多通过大量的动物实验来确定药物的潜在毒性, 这种方法测定指标固定, 需要依赖病理组织学检查, 毒性作用容易出现假阴性。基因芯片技术可将药物毒性与基因表达特征联系起来, 通过基因表达分析确定药物毒性, 使得药物毒性或不期望出现的效应在临床试验前得以确认。而且, 基因芯片可以在一个实验中同时对成千上万个基因的表达情况进行分析, 可以反映药物对动物整体基因表达的影响, 从而发现常规毒理试验测定指标中难以发现的毒性作用。

在药物的早期研发过程中, 利用基因芯片技术对药物的有效性及作用机制进行确认时, 由于基因芯片能反映机体整体基因对药物的应激作用, 根据统计分析, 找出有显著差异表达的基因, 分析其药理作用相关基因及毒理作用相关基因, 对于药效剂量水平下药物的潜在毒性也能发现。Kiel^[16]和杨义强等^[17]在研究印度齿叶乳香树 *Boswellia serrata* Roxb 的提取物时发现该药高剂量不仅不改善肠炎的症状, 而且利用基因芯片分析肝脏基因的表达谱时发现, 高剂量组中与脂质代谢相关的大量基因表达失调, 表明高剂量给药时, 该药具有肝毒性。

在针对药物某个特定的毒性作用进行机制研究时, 利用基因芯片技术做基因表达分析, 在发现该毒性的机制时, 同样也能发现该药是否具有其他的潜在毒性作用, 为进一步研究该药的毒性作用指明方向。

4 混合药物中相互作用方式和机制

含有不同种类及比例的药物混合可产生协同、相加或拮抗等毒性效应。利用基因芯片技术可将混合药物作用下的基因表达改变与在单一毒物作用下的基因表达比较, 观察基因表达差异, 其毒理效应是否大于、小于或等于单一毒物的毒理效应, 并可以根据药物混合产生的协同、相加或拮抗等毒性

效应来指导临床用药。药物混合产生毒性作用协同或相加, 则表明这种混合会增加药物毒性, 临床应禁止混合药物中的联合用药; 药物混合产生毒性作用拮抗, 则表明混合药物中某种或几种药物对其中的具有毒性作用的药物具有减毒作用, 可以用来治疗该药物引起的毒性作用。Mandimika 等^[18]研究了 α -查茄碱、 α -龙葵碱以及 α -查茄碱 - α -龙葵碱不同比例 (2.8 : 1、1.7 : 1) 对人肠细胞株 Caco-2 基因表达的影响, 并结合乳酸脱氢酶 (LDH) 的变化, 分析 α -查茄碱、 α -龙葵碱相互作用的关系及机制。发现在 α -查茄碱 - α -龙葵碱为 1.7 : 1 时具有协同作用。Kim 等^[19]亦从基因表达谱的整体水平探讨 14 种化合物及 1 种混合物对大肠杆菌基因表达的不同影响。

5 进行高通量筛选新药毒性

现在药物毒性安全评价研究多通过啮齿类、犬和猴等动物模型来确定药物的潜在毒性, 分为急性毒性试验、长期毒性试验、特殊毒性试验、致癌性试验等。急性毒性试验仅能筛选出毒性作用较强的药物, 而长期毒性试验、特殊毒性试验、致癌性试验等需要使用大剂量的药物, 试验周期长、费用高, 不利于新药的前期筛选。而基因组学技术的高敏感、高信息量优越性, 使其在新药筛选中的应用越来越广泛。利用基因芯片技术, 从体外模型系统中, 可以快速分析待测药物对基因表达谱的影响, 就能在药物研发的早期阶段很方便地鉴别出药物的药理作用及其毒理作用。这种方法用药量少、周期短, 可以同时多种药物进行分析, 减少实验动物的使用, 从而节省动物、人力、财力、物力和时间。

Kazunari 等^[4]用 17 种肝致癌性药物、8 种其他器官致癌性药物及 14 种无致癌性药物处理大鼠肝癌细胞 MH1C1, 基因表达图谱分析, 找到致癌标志基因, 从而建立短期的药物致癌性研究的生物鉴定系统。并利用该系统进行了另外 9 种样品的致癌性检测, 准确率达到 88.9%。

6 毒性作用与基因多态性相关性研究

不同的物种, 由于基因的不同, 对同一药物的反应也不同。利用基因芯片技术可对单个或多个药物进行分析, 推断药物对不同生物的毒性可比性, 找出敏感动物或敏感基因, 并为将其作用外推到人提供依据。Sano 等^[20]利用基因芯片技术, 分析三氯乙烯诱导的肝毒性引起的基因表达变化在小鼠及大鼠之间的种属差异, 以便进一步研究三氯乙烯对人

的肝毒性的作用与不同基因的关系。结果发现三氯乙烯对小鼠的TGF- β 通路和蛋白激酶信号通路有影响,而对大鼠则无显著性影响。

在人类基因组中,平均每1 000 bp就有一个单核苷酸多态,若这种碱基的多态性出现在调控毒性反应的基因上,将会影响个体对药物的耐受性或易感性,甚至有少数人表现为对某些药物毒性作用具有“高敏感性”。因此,基因的多态性与药物毒性作用强度之间可能存在一定关联。根据不同人群对同一药物的反应不同,利用基因芯片技术将人群快速分群,寻找对该药物毒性作用敏感的基因。Komissarova等^[21]发现不同人提供的淋巴母细胞对亚砷酸盐的毒性作用具有不同的敏感性,他们通过比较砷敏感的2种淋巴母细胞和砷抗性的两种淋巴母细胞的基因表达图谱,发现 γ -谷氨酰转肽酶和人B细胞 κ 轻链基因增强子核因子抑制因子 ϵ (Nfkbie)在砷抗性的淋巴母细胞中表达增加,提示 γ -谷氨酰转肽酶和Nfkbie可能可以作为砷遗传敏感性的生物标记物,并且这一方法同样适用于别的药物。

7 提高药物研究的成功率

研究药物的毒性作用与基因多态性的关系,能提高药物研究的成功率,减少不必要的药物淘汰。有些药物虽然效果很好,但对一部分人不良反应太大而不得不被淘汰。若是研究出该药对某些基因组患者有效,而对另一些基因组患者无效或有不良反应,然后在用药前先对患者用基因芯片诊断,就能对一部分患者进行很好的治疗,另一部分患者可以改用他药。这样该药就会继续发挥作用而不必被淘汰。而且利用基因芯片技术进行药物基因组学的研究,根据遗传差异对患者分型,从而进行新药临床试验,能够减少试验人数而得到统计学结果,从而降低费用和时间。

8 结语

在传统的药物毒理安全性评价研究中,采用常规动物模型的方法居多,动物选择范围有限,以大鼠、比格犬、猴居多,与人的遗传背景差异较大,不能很好的反映药物在人体上的作用;而且存在试验周期长、药物用量大、容易出现毒性作用假阴性等缺点。随着分子生物技术水平的发展,药物毒理学评价研究的方向逐步转向使用遗传背景与人更相似的动物,如转基因动物;在基因水平、分子水平、细胞水平等不同层次研究药物对机体的影响;对药物进行早期、高通量的毒理筛选;增加测定指标,

重点进行药物对心、肝、肾等主要器官的毒性早期观测;寻找人类药物不良反应的关联基因及关联因素等方向,而基因芯片技术的成熟进一步推动了药物毒理学研究的发展。

目前,利用基因芯片技术检测药物的潜在毒性作用、探索药物毒性作用机制的研究较为广泛,而利用基因芯片技术进行高通量的新药毒理筛选、研究混合药物的毒性机制、毒性作用与基因多态性相关性方面的研究才刚刚起步。随着基因组学研究的深入,利用基因芯片技术将不同患者进行分群,药物的毒性作用与特定基因间的关系也将被阐明,根据毒性作用的易感基因开发出用于特定基因人群的药物并指导临床患者用药,将是药物毒理学研究发展的趋势。

然而,基因芯片技术还存在不少问题:① 费用昂贵:相关仪器、试剂和芯片价格均较高;② 背景干扰:在使用全核酸片段进行杂交时,应考虑常见的背景干扰单个被检核酸变异的问题;③ 重复性:不同的RNA提取方式会导致结果的不同,这给不同实验室之间实验数据的交流带来困扰,因此每次试验要求重复2~3次来证实最初的结果,为节约费用,建议用Norfilem blots或liT-PCR技术来验证;④ 特异性和敏感性:在信号的获取与分析上,当前多数方法使用荧光法进行检测和分析,重复性较好,但灵敏性仍然不高;⑤ 标准化:在杂交信号的定量分析上,由于标记染料的不同,不同来源的检测结果在标准化上存在欠缺。尽管基因芯片技术仍存在很多问题,但其发展和应用前景非常广阔,随着基因芯片技术的日渐成熟,新药的安全性评价技术也将更加完善。

参考文献

- [1] 陈立军,姚丽,靳秋月,等. 基因芯片技术分析青蒿琥酯抑癌作用机制[J]. 中草药, 2008, 39(9): 452-456.
- [2] 张仲林,彭成. 基因芯片技术在中医药研究领域中的应用[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(2): 190-192.
- [3] 石恩林. 基因芯片技术在法医毒理学中的研究及应用前景[J]. 中国法医理论与实践, 2005, 15(10): 1540-1541.
- [4] Kazunari T, Makoto A, Shugo S, et al. Prediction of carcinogenic potential by a toxicogenomic approach using rat hepatoma cells[J]. Cancer Sci, 2006, 97(10): 1002-1010.
- [5] van Delft J H M, van Aken E, van Breda S G J, et al. Comparison of supervised clustering methods to

- discriminate genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profiling [J]. *Mutat Res*, 2005, 575 (1-2): 17-33.
- [6] Sul D, Kim H, Oh E, *et al*. Gene expression profiling in lung tissues from rats exposed to formaldehyde [J]. *Arch Toxicol*, 2007, 81(8): 589-597.
- [7] Rokushima M, Fujisawa K, Furukawa N, *et al*. Transcriptomic analysis of nephrotoxicity induced by cephaloridine, a representative cephalosporin antibiotic [J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(6): 1186-1196.
- [8] Waring J F, Jolly R A, Ciurlioni S R, *et al*. Clustering of hepatotoxins based on mechanism of toxicity using gene expression profiles [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, 175(1): 28-31.
- [9] Waring J F, Ciurlionis R, Jolly R A, *et al*. Microarray analysis of hepatotoxins *in vitro* reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2001, 120(1-3): 359-368.
- [10] 连冬生, 赵树进. 基因芯片技术及其在医药领域的应用 [J]. 中国药事, 2008, 22(12): 1097-1104.
- [11] 高利宏, 敖林, 胡冉, 等. 4种药物致小鼠肝脏毒性的基因表达谱聚类分析 [J]. 解放军预防医学杂志, 2008, 26(1): 25-29.
- [12] Akira S, Yasuo O, Akio F. An approach to elucidate potential mechanism of renal toxicity of arsenic trioxide [J]. *Exp Hematol*, 2007, 35(2): 252-262.
- [13] 施畅, 吴纯启, 廖明阳, 等. 基因芯片技术研究抗病毒药物 Bay41-4109 的肝毒性机制 [J]. 癌变·畸变·突变, 2008, 20(1): 0030-0035.
- [14] 陈平, 凡启军, 肖伯奎. 单次大剂量水杨酸钠注射所致大鼠耳蜗基因表达谱改变 [J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(12): 1659-1662.
- [15] 洪岩, 朴丰源, 王艳艳, 等. 三氧化二砷对小鼠小脑氧化还原相关酶基因表达谱的影响 [J]. *Toxicol*, 2008, 22(4): 263-265.
- [16] Kiela P R, Midura A J, Kuscuglu N, *et al*. Effects of *Boswellia serrata* in mouse models of chemically induced colitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 288(4): 798.
- [17] 杨义强, 王春艳. 基因芯片技术在药学研究中的应用 [J]. 齐鲁药事, 2009, 28(5): 293-295.
- [18] Mandimika T, Baykus H, Vissers Y, *et al*. Differential gene expression in intestinal epithelial cells induced by single and mixtures of potato [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(24): 10055-10066.
- [19] Kim C B, Gu B M. Discrimination of toxic impacts of various chemicals using chemical-gene expression profiling of *Escherichia coli* DNA microarray [J]. *Process Biochem*, 2007, 42(3): 392-400.
- [20] Sano Y, Hiroshi N, Noriyuki Y, *et al*. Trichloroethylene liver toxicity in mouse and rat: microarray analysis reveals species differences in gene expression [J]. *Arch Toxicol*, 2009, 83(9): 835-849.
- [21] Komissarova V E, Li P, Uddin N A, *et al*. Gene expression levels in normal human lymphoblasts with variable sensitivities to arsenite: Identification of GGT1 and NFkB expression levels as possible biomarkers of susceptibility [J]. *Toxicol Applied Pharmacol*, 2008, 226(2): 199-205.

版权合作声明

中国药学会于 2009 年与中国学术期刊(光盘版)电子杂志社签订数字出版独家合作协议, 在协议期间, 中国药学会主办的 19 种科技期刊(包括天津**中草药**杂志社出版的 3 本期刊《**中草药**》、《现代药物与临床》、《药物评价研究》杂志)的网络版由中国学术期刊(光盘版)电子杂志社(其出版和信息服务网站为“中国知网”)独家出版发行, 读者可登陆“中国知网”(www.cnki.net)查阅浏览全文。

天津**中草药**杂志社

网址: www.中草药杂志社.com

www.tiprpress.com