

• 专 论 •

毒理基因组学在生物标志物研究中的应用

周晓冰, 汪巨峰, 李 波*

中国食品药品检定研究院 国家药物安全评价监测中心, 北京 100176

摘 要: 近年来, 毒理基因组学的快速发展为生物标志物的研究提供了一个更广阔的空间。生物标志物作为一种可以客观衡量和评价正常生理、病理过程及治疗药物药理学效应的指标, 如今已被广泛应用于临床诊断和新药开发等多个领域。就毒理基因组学在发现和筛选生物标志物方面的研究现状和进展进行综述。

关键词: 毒理基因组学; 生物标志物; 药物; 毒性

中图分类号: R99 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)02-0081-05

Application of toxicogenomics on research of biomarker

ZHOU Xiao-bing, Wang Ju-feng, LI Bo

National Center for Safety evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176

Abstract: Toxicogenomics has recently been developed greatly, and it has contributed a lot on identifying potential biomarkers of toxicity. Biomarker is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, and pharmacologic responses to a therapeutic intervention. Nowadays, biomarkers have already been used widely at clinical diagnosis and investigation of new drugs. The progression of application of toxicogenomics on discovery and Screening of biomarker is reviewed.

Key words: toxicogenomics; biomarkers; drug; toxicity

随着人类基因组计划的进行, 新的基因测序与分析技术不断出现, 为人类进行生命科学研究提供了一个全新的领域^[1]。这些技术发展也为毒理学研究开辟了更广阔的空间, 并已在基因组学领域形成了一个新的亚学科——毒理基因组学 (toxicogenomics), 该新学科是从多基因、全基因组水平研究毒物作用与基因表达的相互影响, 其研究内容主要包括 3 个方面: 促进环境应激原与疾病易感性关系的理解、阐明毒性分子机制、筛选和确认与疾病和毒物暴露相关的生物标志物 (biomarkers) ^[2-4]。

生物标志物作为一种可以客观衡量和评价正常生理、病理过程及药物疗效的指标, 如今已被广泛应用于临床诊断和新药开发等多个领域中, 尤其是对于耗时长、费用高、风险大的药物研发过程来说, 生物标志物是可用于做出继续或终止研发决策的依

据之一^[5-6]。目前欧美许多大制药公司已将生物标志物作为新药研发过程中的一项重要指标, 在向美国食品药品监督管理局 (FDA) 提交的新药申请中, 一些制药企业已开始将药效和毒理生物标志物的数据纳入临床研究报告中^[6-7]。因此, 筛选稳定、可靠和特异的生物标志物就显得尤为重要。近些年, 国内外研究人员运用不同技术和方法进行生物标志物的发现和筛选, 本文就毒理基因组学在发现和筛选生物标志物方面的研究现状和进展进行综述。

1 毒理基因组学用于发现生物标志物的优势

毒理基因组学的主要技术平台为高通量基因组分析技术, 目前主要利用基因芯片技术研究基因转录表达谱的变化情况。基因芯片, 又称为 DNA 微阵列, 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

收稿日期: 2012-03-04

基金项目: 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金 (2011C3)

作者简介: 周晓冰 (1980—), 女, 医学硕士, 助理研究员。研究方向为新药临床前安全性评价。Tel: (010) 67876252 E-mail: zhxb@nifdc.org.cn

*通讯作者 李 波, 男, 研究员, 博士生导师。E-mail: libo@nifdc.org.cn

取 DNA 或 RNA 信息。该方法具有高通量、微型化和标准化的特点^[8-9]。通过利用该方法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,从而将基因表达模式的改变与化合物毒性之间建立因果关系,比较大量同类化合物作用下的基因表达模式,确立此类毒性物质特定的基因表达谱,从而确定反应该类毒性物质作用的特殊生物标志物^[10-11]。

由于化合物相关毒性的复杂性,多数毒性反应并非仅由单个生物标志物引起,通常涉及复杂的基因级联调控机制^[5,12]。与传统毒性检测方法往往聚焦于一个基因或生物标志物改变相比较,毒理基因组学方法不仅可对多个样品同时进行检测,而且还可同时展现成千上万基因的整体表达模式及基因间的网络调控模式,从而检测和暴露待检化合物通过不同途径诱导的毒性反应^[7,12-13]。根据来自临床前研究的毒理基因组学分析结果,表明一些药物毒性作用引起的基因表达改变与组织病理学结果具有一定的相关性,且基因表达图谱的改变要早于且优于传统组织病理学的发现。由于传统毒理学检测毒性终点多在 14 d 后才进行毒性观察,而应用基因表达图谱生物标志物则只需用 1~3 d^[14]。因此,毒理基因组学方法的高通量和灵敏性的优势是传统毒理学研究无法比拟的。

2 毒理基因组学筛选与鉴定生物标志物的基本原则

在毒理基因组学领域,已报道多种方法应用于毒性的预测和毒性机制相关基因表达数据的分析,但进行生物标志物发现和筛选研究还没有形成统一标准化的方法。目前应用毒理基因组学进行生物标志物研究的方法主要包括:应用基因芯片分析挖掘基因表达谱数据库中的差异表达基因;分析临床前研究中的基因表达数据,以发现与病理相关或先于病理学改变的差异表达的基因;或者直接从临床前研究或临床试验获得血液样品进行基因表达谱分析^[2,5,13-14]。

具有可预测性、特异性强和重复性好是保证生物标志物有效性的前提条件^[14]。Goodsaid 等^[15]推荐应用基因组学技术筛选并鉴定的生物标志物应符合以下几条原则:① 在传统组织病理学检测发现前已有基因表达;② 基因的表达应与化合物不良反应引起组织病理改变的进展呈现一定的相关性;③ 基因的表达与研究化合物浓度存在量效关系;④ 基因的表达应具有一定特异性。对于用于临床诊断和考察

治疗疗效的生物标志物研究,应该通过非损伤性方式取得组织进行其生物标志物分析,并对发现的潜在生物标志物进行严格验证。理论上,特定生物标志物应能从药效应答者中将非应答者区分开^[13-16]。而在临床前安全性评价研究中,可通过基因组学技术和方法系统地对相关动物模型各种组织器官的进行毒性生物标志物的筛选研究,以发现一些特定的生物标志物,同时也可探讨在临床前研究中生物标志物 mRNA 与其蛋白水平的相关性分析。由于基因 mRNA 转录水平与蛋白翻译水平存在一定的差异性,对于那些临床前研究中筛选出的基因组学生物标志物最终应通过反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)、免疫组化方法等进行验证,从而为其蛋白水平标志物的发现奠定基础^[17-18]。

3 各种生物标志物的研究

3.1 肾毒性生物标志物

在临床上,不同治疗药物能通过不同作用机制引起肾毒性或肾损伤,如抗病毒药物阿昔洛韦常被认为通过结晶沉淀引起肾损伤^[19],肾皮质近端小管的上皮细胞为氯仿诱导细胞毒性和细胞增殖再生的初始靶组织^[20],氯化汞(HgCl_2)能诱导近端小管上皮细胞的细胞质和细胞核的改变引起急性肾损伤^[21-22],氨基核苷嘌呤霉素能影响肾小球上皮细胞表面层改变从而而引起蛋白尿^[23],吡喹酮能引起大鼠肾脏部分的磷脂聚集^[24]。然而,传统的肾脏毒性评价指标如血清肌酐及尿素氮往往在肾小球滤过率损伤超过 50% 以上才出现明显改变,缺乏敏感性和特异性,而传统的肾脏组织病理学检查必须通过组织切片检查才能获得肾脏损伤的结果^[25-26]。因此,研究探索发现新的肾毒性生物标志物用于检测早期肾毒性以及跟踪其损伤进展就显得尤为重要。

研究结果表明,血清脂质运载蛋白(lipocalin, Lcn)对急性肾损伤具有早期诊断价值^[25]。近年研究人员也发现 Lcn 可能为慢性肾损伤的生物标志物。通过对儿童慢性肾病患者血清中 Lcn 和半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C (cystatin C, CysC) 的检测,发现上述两个标志物与肾病发展呈现一定相关性^[26]。随着研究深入,多种技术和方法被用于肾毒性生物标志物的发现和鉴定,其中包括毒理基因组学技术。研究结果表明肾毒性或肾损伤能使很多基因调节失衡,这些生物标志物包括:肾损伤分子 1 (KIM-1)、丛生蛋白、纤维蛋白原多肽、分泌性磷蛋白、骨桥蛋白以及金属蛋白酶的抑制剂等^[25,27-28]。2008

年 Wang 等^[27]对一些研究肾毒性生物标志物应用动物模型报道进行验证,通过应用 RT-PCR 对大鼠重复给药已知肾毒性的药物例如庆大霉素、杆菌肽、万古霉素和顺铂进行基因表达水平分析,证实了 24 种基因与肾毒性特异相关的候选生物标志物,包括 KIM-1、Lcn2 和骨桥蛋白。Kondo 等^[28]应用 Affymetrix Genechip 对肾毒性动物模型的基因表达谱进行分析,发现 KIM-1、铜蓝蛋白、丛生蛋白以及金属蛋白酶的抑制剂等 92 种相关基因,并将基因分类,作为候选生物标志物。这些基因主要涉及机体组织修复、炎症反应、细胞增殖及代谢的调节。

3.2 肝毒性生物标志物

尽管人体全身每个器官都可能被药物诱导毒性所影响,但最常见的为肝脏。肝毒性也是上市药物被召回的最常见原因之一。超过 600 种药物与肝毒性相关,也是美国 50% 急性肝功能衰竭的诱因^[29]。尽管与肝毒性相关的传统生物标志物,如丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、总胆红素与 γ -谷氨酰胺转移酶等血清学检测指标已经使用多年,但是由于在灵敏度和特异性方面存在许多局限性,已无法满足当前药物安全评价的要求^[30-32]。因此,寻找和验证新的高灵敏度和高特异性的肝毒性生物标志物已成为国内外高度关注的热点问题。

近年来,毒理基因组学的快速发展为肝毒性生物标志物的研究提供了新的技术手段。国外研究报道一些肝细胞损害相关的基因作为候选生物标志物^[31-32],如加氧酶 (oxygenase)、脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide binding protein) 和 Lcn。Uehara 等^[33]将日本基因组学辅助毒性评价系统 (genomics-assisted toxicity evaluation system) 应用于大鼠动物模型评价肝致癌物的生物标志物发现研究,建立预测肝致癌物毒性基因表达分类系统,验证结果发现特定基因表达谱可做肝毒性评价的生物标志物。通过基因转录组学研究发现,微 RNA (microRNA) 作为肝毒性的潜在生物标志物具有较高的灵敏度和肝脏特异性^[34]。

3.3 心血管毒性标志物

目前,在临床上很多治疗性药物均能引起未预期的心血管毒性反应,如蒽环类药物 anthracyclines、注射用曲妥珠单抗 trastuzumab^[35,40]。近些年,COX-2 选择性非甾体类抗炎药 (NSAID),如伐地考昔,也由于涉及严重心血管不良反应,被美国 FDA 要求自愿召回^[36]。此外,III 类抗心律失常药物胺碘酮

的常见不良反应为通过阻断人 ether-a-go-go-related-gene (hERG) 钾离子通道而延长心电图的 QT 间期,从而增加心率失常的概率^[37]。因此,研究发现理想的心血管毒性生物标志物可用于预测和发现药物相关不良反应,尤其是那些将临床和临床前连接起来的生物标志物,加强新药的安全性监测。

外源性药物对心血管系统的损害可引起复杂的病理生理过程,引起机体心律失常、心瓣膜损害以及心肌梗死等病变。研究报道机体心肌梗死中心肌坏死过程导致死亡心肌细胞的多种蛋白释放到循环系统中,成为可鉴别的稳定的生物标志物。目前很多血清生物标志物被推荐或已用于心肌损伤包括急性心肌梗死的诊断,这些生物标志物包括肌钙蛋白、肌酐激酶、乳酸脱氢酶、肌红蛋白、脂肪酸结合蛋白^[35,38],其中肌钙蛋白目前为心血管毒性生物标志物的研究热点。2011 年 Keller 等^[39]发现对那些因为胸痛而被急诊部门收治的病人来说,检测患者肌钙蛋白可帮助排除心肌梗死的诊断,而在病人收治 3 h 后检测这一生物标志物的浓度改变可能有助于确诊心肌梗死。由于心脏细胞损伤并不能使心肌细胞膜通透性改变,与血清中肌钙蛋白升高没有相关性,因此血清中肌钙蛋白并不能直接与心律失常、离子失衡、心瓣膜病、收缩失常等相关^[38,40]。

理论上,心肌细胞通常被认为是终极分化细胞,但研究发现该类细胞迫于压力也会出现显著性基因表达的改变,如病理性心脏肥大,胎儿基因在成人心中非正常再表达,包括 β -肌凝蛋白重链和 α -骨架肌纤蛋白伴随 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* 基因表达^[41]。因此,应用基因组学技术进行新的心血管毒性生物标志物的研究具有重要实用价值。Mori 等^[42]应用毒理基因组学技术研究探讨 3 种能引起心血管毒性化合物 (异丙肾上腺素、多柔比星和虫螨威) 在动物体内对基因表达谱的影响作用,结果显示一些功能与组织再生、细胞增殖相关基因出现过高表达,与组织病理学所观察到心肌细胞退变和炎症反应相吻合,其中 *Spp1*、*Fhl1*、*Timp1*、*Ccl7* 和 *Reg3b* 基因在 3 种化合物给药动物模型中均出现持续过高表达,建议可做潜在的心血管毒性生物标志物。应用毒理基因组学进行心血管毒性生物标志物的筛选研究,可鉴定出一系列候选生物标志物,从而提供探析疾病机制的可能,经大规模临床试验可证实新发现的生物标志物对于心血管疾病的诊断、风险评价以及治疗效果评价的应用价值。

4 结语

毒理基因组学作为一门新兴学科,正在飞速地发展,在应用其进行生物标志物的研究过程中,应结合其他技术和方法,对发现各种潜在的生物标志物进行科学严谨的验证,以便获得特异、敏感和有效的生物标志物。尽管目前应用其进行生物标志物的发现和筛选研究并没有标准化统一方法。但该方法具有高通量和灵敏度好的独特优势,通过发现先于传统组织病理学可见的生物标志物,预测药物毒性和深入了解毒物的作用机制,从而减少新药上市的成本和时间。在未来,相信随着研究的深入,作为一种潜在的强有力毒理学评价工具,毒理基因组学的应用也日趋成熟,在发现和筛选生物标志物研究方面也必将开辟更广阔的空间。

参考文献

- [1] Holmes C, McDonald F, Jones M, *et al.* Standardization and omics science: Technical and social dimensions are inseparable and demand symmetrical study [J]. *OMICS*, 2010, 14(3): 327-332.
- [2] Daston G P, Naciff J M. Predicting developmental toxicity through toxicogenomics [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2010, 90(2): 110-117.
- [3] Afshari C A, Hamadeh H K, Bushel P R. The evolution of bioinformatics in toxicology: Advancing toxicogenomics [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 120(Suppl 1): S225-237.
- [4] McHale C M, Zhang L, Hubbard A E, *et al.* Toxicogenomic profiling of chemically exposed humans in risk assessment [J]. *Mutat Res*, 2010, 705(3): 172-183.
- [5] Collings F B, Vaidya V S. Novel technologies for the discovery and quantitation of biomarkers of toxicity [J]. *Toxicology*, 2008, 245(3): 167-174.
- [6] Wagner J A, Williams S A, Webster C J. Biomarkers and surrogate end points for fit-for-purpose development and regulatory evaluation of new drugs [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 81: 104-107.
- [7] Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, 69(3): 89-95.
- [8] Uehara T, Ono A, Maruyama T, *et al.* The Japanese toxicogenomics project: application of toxicogenomics [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54(2): 218-227.
- [9] Yasokawa D, Iwahashi H. Toxicogenomics using yeast DNA microarrays [J]. *J Biosci Bioeng*, 2010, 110(5): 511-522.
- [10] Choudhuri S. Looking back to the future: From the development of the gene concept to toxicogenomics [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2009, 19(4): 263-277.
- [11] Ellinger-Ziegelbauer H, Aubrecht J, Kleinjans J C, *et al.* Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 186(1): 36-44.
- [12] Burczynski M E. Pharmacogenomic approaches in clinical studies to identify biomarkers of safety and efficacy [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 186(1): 18-21.
- [13] Mendrick D L. Genomic and genetic biomarkers of toxicity [J]. *Toxicology*, 2008, 245(3): 175-181.
- [14] Bailey W J, Ulrich R. Molecular profiling approaches for identifying novel biomarkers [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2004, 3(1): 137-151.
- [15] Goodsaid F M. Identification and measurement of genomic biomarkers of nephrotoxicity [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2004, 49(1): 183-186.
- [16] Foster W R, Chen S J, He A, *et al.* A retrospective analysis of toxicogenomics in the safety assessment of drug candidates [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(5): 621-635.
- [17] Gatzidou E T, Zira A N, Theocharis S E. Toxicogenomics: a pivotal piece in the puzzle of toxicological research [J]. *J Appl Toxicol*, 2007, 27(4): 302-309.
- [18] Cui Y, Paules R S. Use of transcriptomics in understanding mechanisms of drug-induced toxicity [J]. *Pharmacogenomics*, 2010, 11(4): 573-585.
- [19] Davis J W, Kramer J A. Genomic-based biomarkers of drug-induced nephrotoxicity [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006, 2(1): 95-101.
- [20] Templin M V, Jamison K C, Wolf D C, *et al.* Comparison of chloroform-induced toxicity in the kidneys, liver, and nasal passages of male Osborne-Mendel and F-344 rats [J]. *Cancer Lett*, 1996, 104(1): 71-78.
- [21] Stacchiotti A, Borsani E, Rodella L, *et al.* Dose-dependent mercuric chloride tubular injury in rat kidney [J]. *Ultrastruct Pathol*, 2003, 27(4): 253-259.
- [22] Stacchiotti A, Lavazza A, Rezzani R, *et al.* Mercuric chloride-induced alterations in stress protein distribution in rat kidney [J]. *Histol Histopathol*, 2004, 19(4): 1209-1218.
- [23] Kramer J A, Pettit S D, Amin R P, *et al.* Overview on the application of transcription profiling using selected nephrotoxins for toxicology assessment [J]. *Environ Health Perspect*, 2004, 112(4): 460-464.
- [24] Fernández-Tomé M C, Sterin-Speziale N B. Short- and long-term treatment with indometacin causes renal phospholipid alteration: A possible explanation for indomethacin nephrotoxicity [J]. *Pharmacology*, 1994, 48(6): 341-348.

- [25] Devarajan P. Proteomics for the investigation of acute kidney injury [J]. *Contrib Nephrol*, 2008, 160(1): 1-16.
- [26] Mitsnefes M M, Kathnlan T S, Mishra J, *et al.* Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease [J]. *Pediatr Nephrol*, 2007, 22(1): 101-108.
- [27] Wang E J, Snyder R D, Fielden M R, *et al.* Validation of putative genomic biomarkers of nephrotoxicity in rats [J]. *Toxicology*, 2008, 246(2-3): 91-100.
- [28] Kondo C, Minowa Y, Uehara T, *et al.* Identification of genomic biomarkers for concurrent diagnosis of drug-induced renal tubular injury using a large-scale toxicogenomics database [J]. *Toxicology*, 2009, 265(1-2): 15-26.
- [29] Xu J, Henstock P V, Dunn M C, *et al.* Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury [J]. *Toxicol Sci*, 2008, 105(1): 97-105.
- [30] Ozer J, Ratner M, Shaw M, *et al.* The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity [J]. *Toxicology*, 2008, 245(3): 194-205.
- [31] Muller P Y, Dieterle F. Tissue-specific, non-invasive toxicity biomarkers: Translation from preclinical safety assessment to clinical safety monitoring [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2009, 5(9): 1023-1038.
- [32] Ramaiah S K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(9): 1551-1557.
- [33] Uehara T, Minowa Y, Morikawa Y, *et al.* Prediction model of potential hepatocarcinogenicity of rat hepatocarcinogens using a large-scale toxicogenomics database [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 255(3): 297-306.
- [34] Cortez M A, Calin G A. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(6): 703-711.
- [35] Ky B, Carver J R. Biomarker approach to the detection and cardioprotective strategies during anthracycline chemotherapy [J]. *Heart Fail Clin*, 2011, 7(3): 323-331.
- [36] FDA. Alert for Healthcare Professionals Valdecocib (marketed as Bextra) [EB/OL] (2005-04-07) [2012-01-15]. <http://www.fda.gov/cder/drug/InfoSheets/HCP/valdecocibHCP.htm>.
- [37] Recanatini M, Poluzzi E, Masetti M, *et al.* QT prolongation through hERG K (+) channel blockade: Current knowledge and strategies for the early prediction during drug development [J]. *Med Res Rev*, 2005, 25(2): 133-166.
- [38] Cardinale D, Sandri M T. Role of biomarkers in chemotherapy-induced cardiotoxicity [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 53(2): 121-129.
- [39] Keller T, Zeller T, Ojeda F, *et al.* Serial changes in highly sensitive troponin I assay and early diagnosis of myocardial infarction [J]. *JAMA*, 2011, 306(24): 2684-2693.
- [40] Goel S, Beith J M. Troponin I as a predictor for trastuzumab-related cardiotoxicity: Current data do not provide mechanistic insights or allow for incorporation into clinical practice [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(7): e175-e176.
- [41] Rozich J D, Barnes M A, Schmid P G, *et al.* Load effects on gene expression during cardiac hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27(1): 485-499.
- [42] Mori Y, Kondo C, Tonomura Y, *et al.* Identification of potential genomic biomarkers for early detection of chemically induced cardiotoxicity in rats [J]. *Toxicology*, 2010, 271(1-2): 36-44.