

消化系统毒理学生物标志物研究新进展

王 洁, 夏振娜, 车爱萍, 袁伯俊, 陆国才 (第二军医大学新药评价中心, 上海 200433)

[摘要] 毒理学生物标志物是机体对化学物质毒性剂量暴露后的生物学变化, 可特异性地反映毒性效应。对毒理学生物标志物进行全面评估, 并尽快应用于临床, 可以有效地减少药物研发风险。新近发现与消化系统毒理学研究有关的生物标志物有肠脂肪酸结合蛋白、二胺氧化酶、牛磺酸、山梨醇脱氢酶、羧酸酯酶-2、转化生长因子 $\beta 1$ 、组织多肽特异性抗原、再生基因蛋白 Reg4、S100 蛋白、血清糖蛋白 YKL-40 等。

[关键词] 生物标志物; 消化系统; 毒理学

[中图分类号] R994.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)04-0247-04

Progress on the study of toxicologic biomarkers in digestive system

WANG Jie, XIA Zhen-na, CHE Ai-ping, YUAN Bo-jun, LU Guo-cai (Center for New Drug Evaluation, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Toxicologic biomarkers, indicating specific toxic effects, are biological changes of body when exposed to toxic doses of chemicals. Comprehensive assessment and clinical application of toxicologic biomarkers at early stage could effectively reduce the risk in drug research and development. Recently discovered toxicological biomarkers of the digestive system were intestinal fatty acid binding protein, diamine oxidase, taurine, sorbitol dehydrogenase, carboxylesterase-2, transforming growth factor $\beta 1$, tissue polypeptide specific antigen, regenerating gene protein Reg4, S100 protein and serum glycoprotein YKL-40 etc.

[Key words] biomarkers; digestive system; toxicology

1987年美国国立卫生研究院将生物标志物定义为生物体或样品可测出的由外来化合物导致的细胞学或生物化学组份过程、结构或功能的变化^[1]。毒理学生物标志物是机体对化学物质毒性剂量暴露后的生物学变化, 可特异性地反映毒性效应。据美国食品药品监督管理局估计, 约有30%的新药就是因严重的安全性问题而导致研发失败, 故毒理学在新药研发中起着越来越重要的作用, 它可在创新药物的研发早期, 对所合成的系列新化合物实体进行毒性筛选, 从而发现和淘汰因毒性问题而不适于继续研发的化合物, 而生物标志物能敏感有效地反映出生物体因药物作用而发生严重损伤之前的生物变化, 并能准确评估生物体所处的不利状态及其潜在危害, 为可能发生的严重毒性损害提供早期警报, 因此在新药研发过程中, 生物标志物的作用功不可没。本文讨论新近发现的消化系统毒理学生物标志物。

1 非肿瘤毒理学生物标志物

1.1 胃肠道

1.1.1 肠脂肪酸结合蛋白 肠脂肪酸结合蛋白 (intestinal fatty acid binding protein, I-FABP) 是脂肪酸结合蛋白 (fatty acid binding protein, FABP) 中的一种, 仅存在于肠道黏膜, 含量丰富, 占细胞蛋白总量的2%~3%, 具有较好的器官特异性, 可以作为缺血性肠炎的血浆生物标志物。I-FABP在黏膜中的含量最丰富, 绒毛处的含量高于陷窝处的含量^[2]。由于黏膜层对缺血最为敏感, 在肠缺血的早期或炎症局限黏膜下层时, 黏膜层就已有改变^[3]。因此, 黏膜层酶的释放往往较肌层的酶早。在正常人血清中, I-FABP的含量微乎其微, 当药物造成肠系膜血管收缩或内脏血流量降低时, 可引起缺血性肠炎, 此时 I-FABP能较早释放, 且在缺血时细胞膜的通透性较大, 其分子可以通过细胞膜而释放入血浆。当肠道缺血发生后15 min血清中 I-FABP迅速增加。大多数血清酶为热不稳定酶, 测定时需保持酶的活性, 而血清 I-FABP在室温下24 h相当稳定, 可保持活性的95%, 并且与传统血清学指标相比, I-FABP具有出现早、特异性强的特点。因此 I-FABP是早期诊断药物引起的

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项 (2008ZXJ09014-0095, 2009ZX09301-011)。

[作者简介] 王 洁 (1985-), 男, 硕士研究生。Tel: (021) 81871035, E-mail: wj-superstar@163.com。

[通讯作者] 陆国才。Tel: (021) 81871032, E-mail: newdrug@smmu.edu.cn。

肠缺血的敏感而特异性的指标。

1.1.2 二胺氧化酶 二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)是人类和哺乳动物小肠黏膜上层绒毛中具有高度活性的细胞内酶,在组胺和多种多胺代谢中起作用,其活性与黏膜细胞的核酸和蛋白合成密切相关,能够反映肠道机械屏障的完整性和损伤程度。据相关报道^[4],血液中DAO的活性与小肠黏膜绒毛中DAO的活性以及由抗癌药物引起的小肠黏膜损伤有显著的相关性。Moriyama等^[5]将大鼠分为抗癌药物S-1组和FCD组。其中S-1组给予1-(2-四氢呋喃)-5-氟尿嘧啶、5-氯-2,4-二羟基吡啶和氧嗪酸钾,3种药物比率为1:0.4:1。FCD组给予1-(2-四氢呋喃)-5-氟尿嘧啶和5-氯-2,4-二羟基吡啶,两种药物比率为1:0.4。氧嗪酸钾为5-氟尿嘧啶引起胃肠黏膜损伤的保护剂。连续给药7d,结果发现,FCD组大鼠空肠黏膜面积明显小于S-1组,FCD组的大鼠血浆中DAO的活性比S-1组大鼠血浆中DAO的活性显著降低。病理组织切片显示,FCD组大鼠空肠黏膜的绒毛发生萎缩,但在S-1组并没有观察到此现象。因此DAO是一种非常敏感的血浆生物标志物,在定量评价由5-氟尿嘧啶等癌症药物引起的小肠黏膜损伤中非常有用。

1.2 肝脏

1.2.1 牛磺酸 肝毒性是药物常见的不良反应,当毒性物质对肝脏薄壁组织产生损伤时,肝细胞会发生凋亡或坏死,胞浆酶如谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、山梨醇脱氢酶,有时线粒体标记酶如鸟氨酸氨甲酰转移酶(ornithine carbamoyltransferase, OCT)会被释放进入血液^[6]。牛磺酸是人体内含量最丰富的一种氨基酸。牛磺酸浓度的变化通常随应激状态(如渗透压的变化,缺氧,长期照明光感受器,充血性心力衰竭,细胞增殖,或大脑发育等)的变化而变化。Ghandforoush和Mashayekh^[7]通过高效液相色谱法测定217名对乙酰氨基酚阳性患者和100名对乙酰氨基酚阴性患者以及90名正常患者体内的血浆牛磺酸浓度,结果发现,给予对乙酰氨基酚的患者的牛磺酸的平均血药浓度(26.4 ± 1.6 mg/L)明显高于对照组(5.6 ± 0.2 mg/L),因此药物对肝脏有毒性时,肝脏合成牛磺酸增加,并从受损的肝细胞渗出,导致血浆和尿液中牛磺酸的浓度增加。

1.2.2 山梨醇脱氢酶 山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase, SDH)可以氧化还原山梨醇,果糖以及NADH。它广泛分布于机体的各个组织中,主要是存在于肝脏、肾脏和精囊的胞浆和线粒体中,在啮齿类动物以及人体中,它是表征急性肝损伤的具体指

标。由四氯化碳引起的肝小叶坏死、烯丙醇引起的门静脉周围坏死、 α -萘基异硫氰酸盐(α -naphthylisothiocyanate, ANIT)引起的胆管坏死等可以用14种血清生化测试预测出来。谷氨酸脱氢酶(glutamic dehydrogenase, GLDH)、SDH、ALT是这14种测试分析中最有价值的几种^[8]。GLDH和ALT的活性分析可以很好的预测由ANIT和烯丙醇引起的损害。SDH的活性是肝毒性的一个标志,在评价2,3,7,8-四氯苯二噁英(tetrachlorodibenzodioxin, TCDD)对肝功能的影响中^[9],成年雄性恒猴单剂量递增法口服给予TCDD,每只恒猴都用它自身的SDH、ALT和GGT做对照,时间为给药前4周以及给药后17周。SDH和ALT的活性在所有给予TCDD的动物中都有提高。在另一项研究中^[9],比格犬剂量递增法给药杀扑磷(methidathion),没有发现明显的死亡以及不良的临床症状,但在所有给予杀扑磷的比格犬中(雄性和雌性),血清中胆汁酸和酶的活性(ALT, SDH和碱性磷酸酶)有统计学意义的增加。因此SDH是一个临床前肝毒性生物标志物,血清SDH活性是否可以增加ALT活性有待进一步研究。

2 肿瘤毒理学生物标志物

由于个体差异的存在,某些药物在体内的代谢速率和代谢方式会有不同,对于目标靶点的起效剂量也有不同,机体对药物产生的反应也不同,有些药物及其代谢物可能会与DNA等靶点结合,产生基因毒性,并可能导致肿瘤的发生。因此血液中的蛋白质和DNA可以作为验证药物是否具有致癌性的生物标志物。

2.1 肝脏

2.1.1 羧酸酯酶-2 羧酸酯酶-2(carboxylesterases-2, CE-2)是羧酸酯酶亚家族中的成员,由550个氨基酸组成,相对分子质量为61 807。血清中的CE-2主要在肝脏中合成,并通过高尔基体分泌到血液循环中。最近研究表明,CE-2可作为肝癌的新标志物。肝脏恶性肿瘤患者血清中CE-2含量减少,而结肠癌及其它肿瘤患者血清中CE-2含量基本无改变^[10]。CE-2在大肠癌组织表达量随着病情的加重逐渐减少,但血清中CE-2的量和结肠癌病情无关;其他肿瘤,包括乳腺癌、肺癌、舌血管平滑肌肉瘤、非霍杰金淋巴瘤,血清中CE-2的量和正常人基本相似^[10]。与此相反,肝癌患者血清中CE-2表达量比正常人显著减少,提示肝癌病人血清中CE-2含量比正常人显著减少可能是特异的,有望作为肝脏肿瘤特异的标志物。

2.1.2 转化生长因子 β 1 转化生长因子 β 1

(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 为公认的致肝纤维化最主要的细胞因子之一,其贯穿肝纤维化的整个过程,主要由激活的肝枯否细胞、肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)等以自分泌、旁分泌的形式产生,可在局部形成高浓度。而正常肝组织一般无或仅有极少 TGF- β 1 存在,在所有类型细胞中, TGF- β 1 均以无活性的形式合成和分泌,其活性形式为同源二聚体。活化后的 TGF- β 1 必须与其受体结合才能表现出相应生物活性,如使肝星状细胞转化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)等^[11]。在慢性肝炎、肝硬化组织中,由于病毒持续存在,引起免疫损伤和炎症反应,刺激间质细胞分泌 TGF- β 1,它是最强的促纤维生成的细胞因子,不但参与维持 HSC 活化表型,而且刺激活化的 HSC 合成、分泌大量的细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)及 ECM 降解蛋白酶抑制剂,抑制 ECM 降解,增加 ECM 沉积。TGF- β 1 作用的结果是 ECM 的合成增多,导致肝纤维化形成。在 57 例肝硬化患者肝组织中^[12] TGF- β 1 蛋白表达的阳性率为 98.38%,而正常肝组织未见阳性表达,差异有统计学意义,且 TGF- β 1 表达的阳性信号均位于肝细胞胞浆中。

2.1.3 组织多肽特异性抗原 组织多肽特异性抗原(tissue polypeptide specific antigen, TPS)是从组织多肽抗原(tissue polypeptide antigen, TPA)中纯化而来,其实质是细胞角蛋白 18 片段上的 M3 决定簇,在细胞周期的 S 晚期和 G2 期,伴随着 DNA、蛋白质的合成,TPS 合成并于细胞分裂后不久释放入血或体液中。所以血清 TPS 水平常反映肿瘤细胞的分裂增殖活性。研究发现:TPS 仅与肿瘤大小有关。Duller 等^[13]分别对 69 例肝细胞癌患者,57 例健康人,56 例慢性肝炎患者和 49 例肝硬化患者应用单克隆 TPS 免疫放射分析法测定其血清 TPS 水平,同时还测定了甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)值。结果显示:TPS 血清水平仅高于正常对照组,与肝硬化及肝炎组无显著差异;TPS 与 AFP 无显著相关性;血清 TPS 仅与肿瘤大小之间存在显著相关性;AFP 与肿瘤大小,门脉癌栓及肿瘤分化程度之间存在显著相关性。血清 TPS 与肝细胞癌肿瘤侵袭性之间无显著相关性。但与肝功能受损程度相关性显著,导致在部分肝硬化患者或肝炎患者中出现了高水平表达。因此,TPS 虽然尚不能够独立诊断肝细胞癌,但是对肝病患者血清 TPS 的升高应注意结合其它相关的临床指标加以具体分析,以便能够达到早期诊断肝细胞癌的目的。

2.2 胰腺

2.2.1 再生基因蛋白 Reg4 (regenerating gene-4, Reg4) Reg4 是再生基因家族成员之一,编码 17 kD 的分泌性蛋白。Reg4 基因是 2001 年由 Har-tuppee 最先报道的基因,目前是 Reg 家族中最短小的一员,定位于染色体 1p12 ~ 13-1,人类的 Reg1 和 Reg3 均定位于染色体 2p12,但它们亦存在许多共同特性,如序列同源性,在组织表达上的相似性及内含子-外显子连接处基因结构相似性等。Reg4 基因由 17 557 个碱基对构成,包含 7 个外显子及 6 个内含子,由于差异剪接,外显子并不表现在所有转录物中。Reg4 的翻译产物为 158 个氨基酸的蛋白质,包含一个 22 氨基酸的信号肽和一个保守的钙依赖性的糖识别域^[14]。Reg4 蛋白分子量为 17 kD,其氨基端呈高度疏水性,且包含一个含 22 氨基酸的信号序列。应用生物信息学软件对 Reg 家族成员进行蛋白序列的比较显示,Reg4 与另外几个成员 Reg1 α , Reg1 β 和 Reg3 在一级结构上相似性均超过 30%,三维结构模拟结果亦相似,说明 4 个成员在进化上的保守性。Reg4 可作用于相邻的正常或肿瘤细胞,与细胞生存、再生、增殖和细胞黏附有关。Reg4 在与肿瘤标志物 CA19-9 相比的实验中^[15]发现,胰腺癌患者的血清 Reg4 和 CA19-9 的 AUC 没有显著性差异。胰腺癌患者组和健康对照组相比,胰腺癌患者的血清 Reg4 水平要高于健康对照组。这表明血清 Reg4 可以作为诊断胰腺癌的一个有用指标。

2.2.2 S100 蛋白 S100 蛋白存在于各种细胞的细胞质和细胞核中,可参与调节细胞周期、细胞分化等过程。S100 家族属于钙离子结合蛋白,在分子结构上具有共同的 EF 双螺旋手性结构,含有能与钙离子高选择性、高亲和性结合的 14 个氨基酸序列,与钙离子结合后通过钙离子信号传导途径可在细胞增殖、分化、肌肉收缩、基因表达、分泌及细胞凋亡中发挥重要作用^[15]。S100 家族共有 23 个成员,它们在结构上具有 25% ~ 65% 的同源性,为低分子质量的酸性蛋白,因其可在 100% 中性饱和硫酸铵溶液中溶解而被命名为 S100 蛋白。S100 蛋白基因位于 4p16,它编码的蛋白质,除了与 Ca²⁺ 结合外,还与 Zn²⁺ 和 Mg²⁺ 结合。S100 蛋白是含有 95 个氨基酸的蛋白质,是在胎盘中分离发现的。从那以后,在胃癌、胆囊癌、膀胱上皮以及食管上皮的细胞分化中也同样发现。Oliveira 等^[16]用反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 和原位杂交试验证明了有 2% 的胰腺上皮内瘤-1A (pancreatic intraepithelial neoplasia-1A, PanIN-1A), 13% 的 PanIN-1B, 31% 的 PanIN-2, 43% 的 PanIN-3 以及 92% 的侵袭性胰腺癌都有 S100 蛋白的表达。这表明 S100 蛋白的

比例在逐渐增加,并且具有显著性意义。而在正常的胰管中未发现有 S100 蛋白的表达。

2.3 口腔 血清糖蛋白 YKL-40 YKL-40 又名人类软骨糖蛋白-39 (human cartilageglycoprotein-39, HCgp-39), 是哺乳动物 18 糖蛋白家族中的一员, 是一种肝素和甲壳质相结合的凝集酶。在生理条件下, YKL-40 可由巨噬细胞、中性粒细胞、软骨细胞、血管平滑肌细胞分泌, 在炎症相关性疾病特别是多种恶性肿瘤中, YKL-40 有高水平的表达。近年来, YKL-40 已被发现是一种潜在的肿瘤血清学新生物标志物。可用于评估卵巢癌等多种人类恶性肿瘤的发生、发展和预后。有研究证明, YKL-40 的含量参数可以对肺、乳房、前列腺以及肾的癌变做出预测, 对口腔癌变也有很好的预测作用。有实验对口腔癌患者以及健康的志愿者的血浆 YKL-40 水平做了如下分析: 对 56 名口腔癌患者(35 名男性, 21 名女性, 平均年龄 61.8 岁) 以及 17 名健康志愿者的血清 YKL-40 浓度作了分析, 结果发现, 口腔癌患者的 YKL-40 水平(平均 199.01 mg/L) 明显高于健康志愿者^[17]。Johansen 等^[19,20] 在 13 种不同类型的肿瘤患者(2 500 例) 血清中发现, YKL-40 比其它的肿瘤标志物如表皮生长因子受体 2、癌胚抗原、上皮癌抗原、前列腺特异抗原和乳酸脱氢酶等具有更好的特异性。

3 展望

在新药研发的各个阶段发现和利用生物标志物是一项极具挑战性研究。在临床前和临床研究中仍有很多药物毒性靶器官缺乏良好的毒理学生物标志物, 因此当务之急是结合基因组学、蛋白质组学等前沿学科寻找到与药物毒性靶器官相对应的生物标志物, 对其进行全面的评估, 并尽快推广应用, 这样就可以有效地减少药物研发风险^[19,20]。

【参考文献】

- [1] Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, *et al.* National Research Council. Committee on biological markers[J]. *Environ Health Persp*, 1987, 74:3.
- [2] Liu RZ, Li XD, Godbout R. A novel fatty acid-binding protein (FABP) gene resulting from tandem gene duplication in mammals; transcription in rat retina and testis[J]. *Genomics*, 2008, 92: 436.
- [3] Vreugdenhil A, Wolters VM, Van den Neucker A, *et al.* 193 Enhanced I-FABP levels in children with celiac disease rapidly recover after gluten free diet. Potential marker for diagnosis and follow-up of celiac disease[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136: A36.
- [4] Luk GD, Vaughan WP, Burke PJ, *et al.* Diamine oxidase as a plasma marker of rat intestinal mucosal injury and regeneration after administration of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine[J]. *Cancer Res*, 1981, 41:2334.
- [5] Kenji M, Yasuhide K, Hidenobu M, *et al.* Diamine oxidase, a plasma biomarker in rats to GI tract toxicity of oral uorouracil anti-cancer drugs[J]. *Toxicology*, 2006, 217:23.
- [6] Huang JS, Chuang LY, Gu JY. Effect of taurine on advanced glycation end products-induced hypertrophy in renal tubular epithelial cells[J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2008, 233: 220.
- [7] Ghandforoush-Sattari M, Mashayekh S. Evaluation of taurine as a biomarker of liver damage in paracetamol poisoning[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 581:171.
- [8] Ramaiah SK. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters[J]. *Toxicology*. 2007, 45: 1551.
- [9] Ozer J, Ratner M, Shaw M, *et al.* The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity[J]. *Toxicology*, 2008, 245: 194.
- [10] Allen C, Abdolsamad B, Philip M, *et al.* Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues; Examination of intestinal liver and serum carboxylesterases[J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2007, 221: 1.
- [11] Gressner S, Jafari ME, Frank Y, *et al.* Evaluation of serum percent trisialotransferrin as potential predictive biomarker of hepatocellular dedifferentiation in chronic liver disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2009, 403:188.
- [12] 蒋莹, 阿依吐拉. 转化生长因子 β 1 和基质金属蛋白酶抑制因子 β 1 在肝硬化组织中的表达及其临床意义[J]. *临床肝胆病杂志*, 2009, 25:39.
- [13] Duller P, Stiegler M, Schweiger T, *et al.* Sensitive serum parameters for hepatocellular carcinoma recurrence monitoring after liver transplantation: A case report [J]. *Transpl P*, 2007, 39: 3281.
- [14] Takayama R, Nakagawa H, Sawaki A, *et al.* Serum tumor antigen Reg4 as a diagnostic biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134: A695.
- [15] Salama I, Malone PS, Mihameed F. A review of the S100 proteins in cancer[J]. *Eur J Surg Onc*, 2008, 34:357.
- [16] Oliveira-Cunha M, Siriwardena AK, Byers R. Molecular diagnosis in pancreatic cancer[J]. *Diagn Hist*, 2008, 14:214-222.
- [17] Kacira T, Hanimoglu H, Kucur M, *et al.* Elevated cerebrospinal fluid and serum YKL-40 levels are not associated with symptomatic vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage[J]. *J Clin Neurosci*, 2008, 15:1011.
- [18] Scheer M, Wild S, Kuebler AC, *et al.* YKL-40 as prognostic biomarker in patients with oral cancer[J]. *J Cranio Maxill Surg*, 2008, 36: S190.
- [19] Jain KK. *The Handbook of Biomarkers*[M]. New York: Humana Press, 2010:1-84.
- [20] Azuaje F. *Bioinformatics and Biomarker Discovery* [M]. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010:173.

[收稿日期]2010-10-13

[修回日期]2010-12-02