

分子流行病学研究及其应用

VI. 分子流行病学在慢性病研究中的应用

段广才 祁国明

许多慢性病对人类的危害日益严重, 心血管病、肿瘤等已构成人类健康和生命的巨大威胁。研究表明, 不同国家、地区和人群的心血管病和肿瘤的发病率可以相差几倍到几十倍, 甚至上百倍, 这类疾病的发生不仅与环境有着密切的关系, 也与不同人群的遗传和代谢极其相关。WHO估计, 在目前每年发生的约1200万心血管疾病死亡中, 经过有效的预防可挽救其中600万人的生命。预防和控制此类疾病, 不仅要进行宏观研究, 分子流行病学也大有可为。

肿瘤研究

恶性肿瘤是一类严重危害人类健康和生命的疾病。肿瘤的发生和发展与癌基因的异常表达、抗癌基因的失活、以及转癌基因的活化等有关。这些基因的异常与很多因素有关, 不从分子水平研究各种因素对这些异常基因形成的作用, 是无法预防和控制这类疾病的。如癌基因激活可以有以下几种途径: ①启动子插入; ②点突变; ③DNA甲基化程度的降低; ④基因重组; ⑤基因扩增; ⑥诱变剂的激活。在不同的肿瘤可以有不同的途径, 甚至在同种肿瘤的发生和发展中也可以有不同的激活途径。分子流行病学可以首先研究各种异常基因的分布, 进而研究各种危险因素与其分布的关系, 及有效的调控手段。目前这一领域的研究主要集中在以下方面。

一、病因探讨

1. 癌基因家族与肿瘤: 所谓癌基因家族是指与肿瘤发生和发展有密切关系的一组基因, 其中包括癌基因、抗癌基因、转癌基因等。早在1968年Duesberg等在Rous肉瘤病毒基因组中分离了一段核酸序列, 其在细胞的转化中起关键作用, 可使正常细胞转化为瘤细胞。其后又相继发现在其它癌病毒基因组中也有能使细胞向癌变转化的基因, 因为这些基因来自病毒而被命名为病毒癌基因。由于研究的不断深入, 人们发

现这些基因不仅在肿瘤细胞和肿瘤病毒基因组可以找到, 在几乎所有的高等脊椎动物正常体细胞中也存在类似的核酸序列。由于这些基因是在正常细胞中发现的被称为细胞癌基因或原癌基因, 其与抗癌或抑癌基因都是正常细胞中不可缺少的细胞生长和分裂的重要调节基因, 其高度保守, 也称“管家基因”。目前已发现的癌基因有60种之多。癌基因是引起肿瘤发生的关键基因。在正常的体细胞中, 癌基因和抗癌基因都有一定程度的表达, 以维持细胞的正常生长和分裂。

然而在某些因素的作用下, 这些基因发生了异常表达, 方引起肿瘤的发生。因此癌基因和抗癌基因等与肿瘤的关系仅有个体研究是不够的, 要从分子流行病学的角度出发研究什么因素在这类基因异常表达中起重要作用, 用什么样的手段可以最早、最快、最准确地检测这类基因的异常及其异常表达, 以及如何来预防和控制。如有学者应用Northern Blot和免疫细胞化学的方法测定急性白血病症(AML)和慢性白血病(CML)患者的c-myc癌基因的表达情况, 结果提示, c-myc癌基因的表达可作为临床治疗、转归和预后的灵敏指标。人乳头状病毒(HPV)感染可能是宫颈癌的病因之一, p53基因是一种较广泛的抗癌基因。为从分子水平研究HPV、宫颈癌及p53基因的关系, Crook等选择了28例原发宫颈癌患者用Southern blot和PCR方法进行研究。结果显示, p53蛋白正常功能缺失在宫颈癌发病中有重要地位, 在HPV阴性的情况下, 肿瘤发生需要p53基因的突变。

2. 激素、生长因子与肿瘤: 肿瘤的一个重要特征是无限制极度生长。在人体血液和组织内有一些多肽和小分子蛋白质, 包括一些激素, 它们为细胞生长所必需, 这些物质统称为“生长因子”, 许多原癌基因都

本文作者单位: 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 102206 北京市

与这些物质有关。在细胞表面和细胞内有各种生长因子的相应受体,生长因子与受体的结合是细胞增殖的最初事件。由此可见,激发细胞极度生长的因素是很多的,如生长因子过多表达和聚集,受体增多或敏感性改变,细胞内生长信号传导系统异常,细胞生长抑制因子缺乏,及与细胞生长相关的其它基因异常等,都可以导致肿瘤的发生和发展。这一领域有很多亟待解决的课题。

3. 免疫与肿瘤: 正常免疫功能是人体抗御外界不良因素, 及维持体内稳定和平衡的必要条件。在肿瘤发生早期, 异常肿瘤细胞可被功能正常的免疫系统所消除。由于人类遗传学上的极大差异, 使不同群体和个体表现为免疫遗传学上的多态现象, 因此不可避免地出现免疫功能上的不同, 其在肿瘤发生和发展方面的作用也受到学者们极大的关注。如Kersey等报道, 在几种主要的原发性免疫缺陷患者, 有2%~10%发展成为恶性肿瘤。有原发免疫缺陷的儿童比普通人群发生恶性肿瘤的机率高出100~1000倍, 有时高达1万倍。兼有细胞免疫和体液免疫缺陷的共济失调-毛细血管扩张症与Wiskott-Aldrich综合征患者恶性肿瘤发生率高达10%。以体液免疫缺陷为主的Bruton氏缺陷丙种球蛋白血症患者恶性肿瘤的发生率为6%。再有, 白细胞介素II (IL-2) 是调节机体免疫功能的重要淋巴因子, 它通过激活和增强NK细胞、细胞毒T淋巴细胞(CTL)和非特异性杀伤细胞(LAK)等的活性而杀伤肿瘤细胞。恶性肿瘤的发生、发展、转移和预后都与IL-2有关。因此探讨肿瘤宿主外周血(或脾、淋巴结)淋巴细胞诱生IL-2活性及其对外源IL-2的反应与恶性肿瘤的关系, 已成为肿瘤研究方面的重要研究课题。

4. 环境、饮食与肿瘤: 环境、饮食习惯与肿瘤的关系已为众多的流行病学现场研究所证实, 但究竟是环境和饮食中的哪个(些)因素与肿瘤发生和发展中的哪个(些)过程有关呢? 这是目前肿瘤学家和流行病学家都极为关心的问题。从分子水平研究这些问题要可靠得多, 有力得多。

二、易感人群研究

在相同环境中, 人群中肿瘤的易发程度是很不相同的。已知大多数化学致癌物都没有直接的致癌作用。但当这些物质进入人体后, 经过肝脏微粒体的一系列酶的代谢作用, 可以把这些前致癌物转变成终致癌物。而肝脏中这些酶活性的高低, 及可诱导程度的差异是影响肿瘤发生易感性的重要因素。如芳(香)基

羟化酶(AHH)是一种可以诱导的肝脏代谢酶, 其活性可以使一些前致癌物变为致癌物, 也可以增强某些致癌物的致癌活性。研究表明, AHH在不同人群的活性和可诱导程度有很大差别, 基因分布也是多态的。在肺癌病人中总AHH活性与正常人相近, 但其酶诱导率要比正常人高得多。也有研究认为肺癌易感性与淋巴细胞或肺巨噬细胞的AHH活性有关。DNA修复能力已表明与肿瘤的发生有关, 但人类DNA修复的基因控制是极其复杂的, 研究不同肿瘤与DNA修复基因异常的关系, 将为高危人群的筛检提供重要指标。如有研究认为, 食管癌患者及其血缘亲属以及鼻咽癌患者的淋巴细胞DNA修复能力低下, 进一步研究这种DNA修复能力低下的分子特征将是很有意义的。现在的研究表明, 肿瘤遗传易感性主要分四类: 遗传性癌综合征、家族性癌、DNA修复缺陷综合征和无明显家族聚集遗传易感性。对这几方面进行深入研究是肿瘤预防和控制的重要课题。

三、危险人群筛检及早期诊断

肿瘤标志物是应用分子生物学、生物化学和免疫学等手段研究体内蛋白质、酶、激素、抗原成分及可检测的基因特征在不同人群中的分布, 以发现不同肿瘤在不同阶段的特征检测物, 为高危人群的筛检、肿瘤病人的早期诊断及治疗、转移、预后等评价提供科学依据。因此仅从癌组织出发研究某种成分与肿瘤的关系显然是不够的, 而要从分子水平出发研究不同组织、不同人群及不同肿瘤某些特征基因变异和特征物质的分布, 才能有力判断这种(些)特征与肿瘤的关系及其在防治方面的意义。

四、疗效评价

雌激素受体(ER)是一种具有特定功能的蛋白质, 其分化程度高则功能全, 否则功能也差。研究表明, 在高分化乳腺癌中ER阳性率为96.9%, 而低分化仅为17.1%。在腋淋巴结无转移患者ER阳性为66.7%, 而腋淋巴结转移者为46.6%。Hubay等对318例乳腺癌患者用同样治疗方案治疗, 结果ER和PR(孕激素受体蛋白)的阳性率与患者5年生存率极其相关。ER⁺/PR⁺的患者较ER⁺/PR⁻的患者5年生存率高, ER⁺/PR⁻的患者较ER⁻/PR⁻患者5年生存率高, 都具有显著性差异。由此可见, ER和PR可以作为乳腺癌患者的治疗、预后的评价指标。当然, 这方面更多更细致的研究仍是今后的重要课题。如有学者应用PCR技术研究白血病患者治疗和缓解以后体内病理细胞及基因的分布情况来判断治疗的效果和复发的可能性等。

心血管病研究

一、病因探讨

心血管病是一类疾病的总称,其发病机理复杂多样,其中危害最为严重的是高血压和动脉粥样硬化性疾病。目前需要分子流行病学进行认真研究和探讨的心血管病因主要有如下几个方面:

1. 心血管系统活性物质与心血管病的关系: 心血管活性物质主要是指血管活性多肽,包括一些神经肽、心血管源性多肽和一些内分泌腺或细胞所分泌的肽类激素。它们在体内起着神经内分泌、循环内分泌、自分泌和旁分泌的作用,调节心血管系统的功能和代谢,许多还具有促进细胞生长的功能,在心血管病的发生和治疗中有十分重要的作用。目前发现的血管活性多肽有近30种。这些因子都是人体的正常成分,且在病理和生理情况下,表达量甚微,要研究这类因素与心血管病的关系,首先要从分子和基因水平研究其在不同人群中的分布,然后才有可能研究其与心血管病的关系以及受哪些外界因素的影响,如何进行有效的预防和控制。

2. 血浆成分与心血管病的关系: 脂蛋白是人血浆中运输甘油三酯、胆固醇、胆固醇酯和磷脂的载体。冠心病的发病率和血浆中的LDL的胆固醇水平呈正相关,而与HDL胆固醇水平呈负相关。血浆脂蛋白中的蛋白成分称为载脂蛋白(apolipoprotein, apo)。其有多种类型,分子生物学对它们的结构基因特征进行了详尽的研究。其中,apoE主要分布于血浆VLDL和HDL中。apoE结构的变异会影响对受体的识别,导致Ⅲ型高脂蛋白血症,其主要症状是血浆胆固醇、甘油三酯升高,具黄色瘤和早发的动脉硬化。对不同家族的研究结果表明,不同的apoE表现型主要是由于在一个apoE的基因位点有三个共同的等位基因,分别命名为 ϵ_4 , ϵ_3 和 ϵ_2 ,由其产生的蛋白质为E4、E3和E2。人群中有三个纯合子和三个杂合子,共有六个遗传型,分别是E4/4, E3/3, E2/2, E4/3, E4/2, E3/2。大量的人群研究结果证实, ϵ_3 出现频率最高为74%~78%,其次是 ϵ_4 为14%~15%, ϵ_2 为8%~12%。apoE多态性在Ⅲ型高脂蛋白血症中起重要作用。Ⅲ型高脂蛋白血症患者有90%是E2/2表型,而在正常人群中E2/2表型仅为1%。因为高脂蛋白血症与动脉粥样硬化形成过程中包含许多基因结构和功能的变化,有学者认为,如果在发病之前检查出那些携带了功能异常的基因的人,就可以及早给予密切注视,并给予特殊

的预防以减少其后果的严重性。

此外,纤溶和血凝系统、原癌和抗癌基因、免疫系统及遗传因素与心血管病的关系正在受到分子流行病学工作者的重视,并已有有些初步研究报道。

二、高危人群研究

研究心血管病的高危人群,可以早期发现病人,进行早期治疗和控制,也可以进行疾病自然史和病因研究,不断提高诊疗水平和预防效果。脂蛋白酶(LPL)缺乏是导致高乳糜微粒血症的主要原因,但是由于脂蛋白酶基因的缺失还是因为某些微小突变而导致脂蛋白酶缺乏呢?Fojo等(1992年)对两个高乳糜微粒血症综合症的家族进行研究,他们提取LPL的mRNA进行RT-PCR扩增而获得cDNA,对这些cDNA进行限制性内切酶图谱和核酸序列分析。结果发现,两个家族中都不是LPL的结构基因缺失,而是基因点突变造成的酶分子失活。其中一个家族是由于基因第781位点的突变,使氨基酸转换,酶切图谱也显示有一个SfaN1位点丢失,结果是酶分子活性的丧失。另一个家族的LPL基因为两个位点突变,造成两个氨基酸的取代,结果也是酶分子活性丧失。将这些基因导入人胚肾293细胞进行表达,结果只产生无活性蛋白质,从而更进一步证明单点突变或几点突变足以导致该酶蛋白分子活性的丧失。为早期发现病人以及进一步研究突变发生机理和病因提供了重要资料。家族性高胆固醇血症是由于低密度脂蛋白受体基因突变引起的常染色体显性遗传。目前已报道至少有22种基因部分缺失、1种外来DNA片段插入突变、5种点突变和1种移码突变。Catapano等研究表明,在一个有中度高胆固醇血症的家族中,突变基因已传递了三代,所有带有突变基因的家族成员都是杂合性的,并都有高胆固醇血症。据Bertolin等报道,他们对122个具有LDL受体变异导致的高胆固醇血症(FH)家族进行限制性片段多态度(RFLPs)分析发现,在用限制酶Pvu II、ApaI和Ava II/Xba I进行酶切后,所产生的四个RFLPs具有该基因突变的诊断意义,并对97个家族中的72(74%)个家族的遗传者进行诊断。在其它25个家族中,应用Pvu II、ApaI和BstE II/EcoR I的RFLPs可以诊断66%。应用RFLPs可以区分杂合子和纯合子,并能研究基因缺陷家族是否有基因重组以及他们的高胆固醇血症是否由于LDL受体的缺陷而引起等。Davignon等(1992)对163个诊断为家族性高胆固醇血症的杂合子进行研究,发现仅有

一例是家族性apo B100 (FDB) 缺陷。通过这个先证者他们发现这个家族中有八个表现为FH临床表现型和FDB基因突变型。经过对这个家族的进一步研究发现, FDB基因突变在这个家族中由于遗传环境的不同可以有很大的临床表现变异性。具有FDB基因突变的个体可以由于apo E等因素的作用使其没有临床表现。同时还表明, 临床上的FH并不一定具有LDL受体的缺陷。

外界因素与心血管病中的作用已为众多的研究所证实, 研究这些因素与体内某些大分子物质及相关基因表达的关系及用什么样的手段可以改变疾病发生和病理过程仍是分子流行病学将要研究的重要内容, 此外心血管病临床疗效评估的客观指标也需分子流行病学进行探讨。

其它慢性病研究

类风湿性关节炎(RA)是与免疫有关的疾病, 深入探讨其病因对该病的预防、控制和治疗是很有必要的。有学者应用反向高效液相色谱法进行外周血淋巴细胞白三烯(LTB₄)与RA关系的研究, 他们发现RA患者外周血淋巴细胞生成的LTB₄明显高于对照组

($P < 0.01$), 而活动性RA又明显高于非活动性RA ($P < 0.05$)。说明LTB₄是RA疾病过程中一项很有意义的指标, 在病情程度和治疗评价中有一定价值。糖尿病是一种与遗传因素有关的疾病, Horn等研究发现HLA-DQ2位点有8个等位基因变异, 在DQβ基因位点有13个等位基因变异, DQ2、DQ3和DQ血清型由DQβ亚单位决定, 而DQβ第57位氨基酸的性质与胰岛素依赖型糖尿病的易感性有关。自身免疫性皮肤病天疱疮(PV)与HLA-DR4和-DRW6有关。Scharf等应用核酸分子杂交和PCR序列分析技术对DR、DQ2和DQβ等位基因在PV病人中的分布频率进行了研究发现, 在PV患者中有90% (34/38) DR4型包含有一个特异的DRβ I序列, 而对照仅为36% (16/44) ($P < 0.001$), 这个序列在DRW6中也可发现, 但其只在25%的DRW6病人中出现。结果显示, PV的易感程度在DR4和DRW6中是由不同的序列决定的。这些研究为进一步探讨易感基因和发病机理提供了重要依据。

慢性病研究是极为广扩的领域, 分子流行病学能否在这一领域中应发挥重要作用, 相信在不远的将来会有明确的答案。

计划免疫在洪涝灾害预防医学中的作用

李方军

纵观解放四十年我省洪涝灾害史和计划免疫针对传染病流行史, 每次较大的洪涝灾害之后, 都会造成计划免疫针对传染病较大范围的流行, 并持续2~3年。1991年是我省解放以来最大的一次洪涝灾害, 但灾后没有发生计免针对传染病的较大流行, 白喉、百日咳保持稳定下降趋势, 脊髓灰质炎在前两年流行未完的基础上, 也呈现出大幅度下降的势头, 麻疹疫情虽然上升幅度较大, 但客观的分析表明, 其上升并非灾害直接所致。取得上述成绩的主要因素如下。

1. 1985年以来的常规计划免疫工作, 有效地控制了针对传染病的发病率, 使其一直处于较低水平, 从而限制了灾后疫情爆发的动能;

2. 由于计划免疫疫苗接种后, 体内抗体水平的维持大多数在5~10年以上, 因此常规计划免疫工作有效地提高了重点人群对相应传染病的免疫力, 减低了

相应传染病流行的势能;

3. 在灾害发生过程中和灾害发生以后, 及时采用各种强化免疫措施, 着重加强重点人群的免疫服务, 提高灾民聚集点卫生服务能力, 从而提高了灾后高危人群对相应传染病的应急能力;

4. 灾后进行深入广泛的社会宣传, 充分利用外援, 增加疫苗购置、冷链设备更新、维修等经费的投入, 对于进一步巩固计划免疫成果, 防止灾害对相应传染病的滞后效应发挥了重要作用。

以上四点, 不仅是计划免疫取得灾后无大疫的基础, 同时也是保持今后几年不发生大疫的有利条件。

(收稿: 1992-12-07)

本文作者单位: 安徽省卫生防疫站 230061 合肥市