

分子流行病学研究及其应用

Ⅱ. 分子流行病学主要研究内容

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所* 段广才 祁国明

分子流行病学虽处于初级发展阶段,其研究内容却非常丰富。归纳起来,大致如下。

一、研究传染性疾病:为便于以后的叙述,首先明确一下克隆(Clone)的概念。在分子流行病学中,克隆的执行定义是:虽然分离来源不同,地区不同,甚至时间不同,但这些病原微生物都具有许多特征性的表型和基因型,这些特征几乎只能解释为有共同根源,这样的病原微生物称为克隆。在这里,有几点需要注意:(1)克隆化的概念不是绝对的。即一个克隆的微生物随着检测特征的增多及检测方法的变化,可能就不是一个克隆了。再者,由于进化变异的存在,来源于同一祖先的微生物,随着时间的推移和环境变更,其特征也不可能完全相同。(2)这个定义中所确定的克隆是指有许多共同特征(表型的和基因型的),这些特征只能解释为有共同根源的微生物。随着检测特征的不同,克隆的意义也不同。如果以检测整个基因组为特征,所确定的克隆就是分子生物学上的克隆。如果以检测抗药性为特征(包括表型与基因型),则所谓克隆化的微生物可能不一定是同种微生物。如在医院感染中,由于耐药质粒的传递,医院感染的病人并不一定是同种细菌,但却具有共同来源的耐药质粒。这时,从流行病学的概念出发,仍可称这些菌株是克隆化的,或具有克隆关系。因为它们的一些特征具有共同根源。所谓克隆系或克隆群(Clonal Cluster)的概念是指遗传关系非常紧密的多个克隆微生物的集合。这里所谓遗传关系紧密也是相对的。在不同的条件下对不同的菌株,其所代表的遗传距离是有差异的。而且随着检测遗传位点的变化,遗传距离也会有所不同。但在确定检测方法和遗传位点之后,对一定的细菌,遗传距离是相对稳定的指标。

分子流行病学在传染性疾病中的研究内容,主要有以下几个方面。

1.对病原生物的研究:病原生物在传染性疾病的发生和流行中有着重要的作用,从分子水平研究其流行病学特征,是疾病防治中的重要内容,

首先是对病原微生物的分子遗传学分型和分类。在判断传染病的发生、爆发和流行中,对病原体进行准确的分型是一切工作的基础。由于表型特征的易变性和不稳定性,甚至有时表型无法进行分型,常给防治工作带来很大被动。而从分子及基因水平进行分型,可以直接反映病原体的遗传本质,稳定而可靠,并且还可以反映出各型之间的遗传关系,为流行病学提供重要手段。比如,流感嗜血杆菌的主要毒力因子是b型荚膜。而从爱斯基摩人和阿拉斯加居民中检出的流感嗜血杆菌b血清型菌株,经MEE法分析发现,其大多为一个克隆,但却不是阿拉斯加及其他地区引起发病的病原体,因其极少在侵袭性病人中发现,与其他引起侵袭性发病的b型菌株在遗传学上有所不同。看来仅从血清学上判断流感嗜血杆菌是很不够的,而从分子及基因水平进行分型,对传染病防治有重要意义。

其次,利用分子流行病学方法研究病原微生物的遗传结构,可以阐明其相互间的遗传关系。如Sclander等的研究指出,在自然群体中,大多数细菌存在明显的遗传多态现象,但细菌是以克隆系存在的。而且,大多数致病菌的克隆数相对来说是有限的。Caugant等的研究也表明,虽然致病菌多克隆存在,但引起严重病情及引起流行的菌株常是极少数几个克隆。

再者,病原体在人群中分布的变化,以及病原体在其生物群体中的分布规律,常是流行病学关心的问题。Musser等1985年用MEE法对美国近四十年来分离的流感嗜血杆菌b群菌株进行研究,发现近年来美国由侵袭性流感嗜血杆菌引起的发病,大多数由两个非常接近的ET(electrophoretic type)所致,并发现1939年到1954年间,有一个ET的出现频率快速增长,为阐明美国流感嗜血杆菌发病的流行规律及防治提供了宝贵资料。

2.传染源和传播途径的分析:及时准确查清传染性疾病的传染源和传播途径,对快速有效控制爆发流

* 北京市, 邮政编码 102206

行和分析流行规律都是很重要的。分子流行病学在这一方面显示出独特的优越性。杨永民等应用基因探针和染色体酶切图谱对某地霍乱流行进行分析,发现该地流行的菌株与同年所接收难民分离的菌株相同,而与既往该地菌株不同,结合其他资料确认这次流行是难民引起的。

在传播途径的分析中,分子流行病学也同样得到广泛应用。如1981年美国的Ohio, Georgia等州发生*Salmonella muenchen*菌感染爆发,最初的调查研究未能确立食物是传播途径。Taylor等的进一步研究表明,在Michigan地区,76%的病人有大麻暴露史,而对照仅为21%。从病家获得的大麻标本中分离出*S. muenchen*菌,每克大麻含菌量达 10^7 。但这些与爆发有关的菌株抗生素检测均敏感,并且在表型上与其他来源的菌株无法区分,既往也没有大麻作为病原菌传播途径的报道。然而,他们通过质粒谱分析发现,所有与暴露大麻有关的菌株都含有两个小分子量的质粒(3.1和7.4Md),而在对照菌株中没有这两个质粒。从而确立了大麻作为这次爆发的传播途径。

3. 疾病流行规律分析和疫情快速准确报告: Caugant等于1986年对70年代中期以来从挪威北部开始向南部发展、并开始进入西欧的流行性脑脊髓膜炎大流行进行研究发现,这次大流行是由22个遗传关系非常相近的ET所引起(称为ET-5群),这一ET群还可追踪到南非、南美和古巴,以及迈阿密、佛罗里达等地的流脑爆发。这些地区的流行和爆发是古巴难民引起的。很重要的是这一ET群与流脑奈氏菌的其他型遗传差异很大,是个独特的群体,而不是来自挪威以前流行菌株的突变和重组修饰。霍乱是烈性传染病,在我国是甲类传染病,也是国际检疫传染病。因此,快速准确的检测和报告显得尤其重要。Shirai等报道,用PCR技术通过特异引物的设计,直接从标本中扩增特定的霍乱毒素基因片段,大大节省时间,而且灵敏度和特异性都很高,仅需1pg的染色体DNA或者仅含3个活菌的样品。

4. 人体易感水平的研究: 人体不仅对传染病、寄生虫病有易感性的不同,而且对各种慢性病也同样有易患程度的差异。如Hill等对西部非洲的研究表明,人群HLA抗原基因的分布与疟疾发病的严重程度有密切关系。这不仅证明了人体主要组织不相容复合体基因的高度多态性最初是由于病原体所造成的自然选择进化的学说,而且也为阐明疾病流行规律和疾病防治提供了很好的资料。

5. 高危人群的筛选: AIDS病是严重危害人们生命与健康的传染性疾病。由于该病目前尚无可靠的治疗措施,因而早期诊断HIV携带者,是防治该病的重要手段。病毒分离及血清学方法等常不易达到快速、准确的目的。尤其在新生儿和婴儿,由于母体的抗体经胎盘传给新生儿,可以造成假阳性。另一方面,患儿缺乏产生HIV特异抗体的能力,又可造成假阴性。而应用PCR技术可以解决这一问题。如Loche等(1988年)用PCR技术从16例血清学反应阴性(但其性伙伴为HIV血清学反应阳性)的样本中发现5例有特异HIV-1 DNA存在。Imagawa等证实,PCR方法可以比免疫学方法提前35个月检测到HIV特异DNA的存在。Rogers等分别检测了HIV阳性及阴性母亲的新生儿和婴儿,在检测到7例HIV阳性的新生儿中有5例平均在9.8个月发生AIDS。6例HIV阳性的婴儿(平均4月龄)也发展为AIDS。Sohn等用PCR方法从25例高危婴儿中筛选到7例阳性患儿,其中2例血清学检查及病毒学培养均不明确。

二、研究心血管疾病、肿瘤等慢性疾病: 心血管疾病严重危害着人们的健康和生命,目前在死亡原因中占居第二、三位。中国目前有高血压病人6000万,其中4000万为确定性高血压,每年脑卒中新病例约130万,城乡现有脑卒中患者500万人,其中75%有不同程度的劳动力丧失。有学者认为,今后十年心血管病的研究将是分子生物学的时代,人们将从分子水平来揭示心血管活动和疾病发生的本质,从分子生物学的角度,应用生物学高技术,寻找防治心血管疾病的新途径。因此,心血管病的流行病学研究必将是分子水平的。目前有些学者已开始进行分子流行病学的研究。如有学者认为癌基因的异常表达是平滑肌细胞增生的始动因素。Negoro等报道,自发性高血压大鼠心肌和平滑肌细胞内myc癌基因表达较WKY对照大鼠高50~100%。Keteletov等应用限制性内切酶长度多态性分析证明,自发性高血压大鼠的癌基因与WKY的不同。自发性高血压大鼠的c-fos经Hind III、Pst I和EcoRI酶切片段分别是1.6、3.4和4.0kb,而WKY大鼠相应为2.1、4.1和4.6kb,前者较后者为短。说明高血压大鼠c-fos癌基因可能发生了突变,是原发高血压具有遗传性的基础。汤健等从原发性高血压患者及健康者的血淋巴细胞提取DNA,经EcoRI酶切,进行核苷酸片段分析,观察到fos基因的片段(5.6kb)明显短于正常人(6.9kb),提示原发高血压患者的原癌基因可能发生了某些突变。检查这些异常情况,在蛋白质水平可

以用生化和物理技术检查其多态性、功能、分子量及电荷的变化。在基因水平可用DNA分子杂交技术、限制性内切酶图谱技术等,检查其基因结构的变化。

恶性肿瘤是目前人类死亡的主要原因之一。据WHO估计,全世界按50亿人口计算,每年死于肿瘤的有540万左右,发生恶性肿瘤新病例740万。据美国1988年报道,1985年癌症死亡率为170.5/10万,占总死亡率22.1%,仅次于心脏病(37.0%)而居死因第二位。中国1973~1975年死亡回顾调查,癌患者的死亡数每年70万左右,但到80年代中期已增至90万。在50年代到70年代,流行病学对肿瘤病因学和肿瘤防治曾作出过重大贡献。如不同肿瘤在地区、人群中的分布研究,环境和生活因素与肿瘤发生的关系,以及防治措施和评价等方面都做了大量工作。但进入80年代以后,流行病学在肿瘤研究方面没有大的进展,而实验医学在肿瘤研究中却有很大成就,如癌基因、抗癌基因、转癌基因的研究等,其主要原因之一,是实验医学迅速将分子生物学的最新研究成就引入肿瘤研究,而流行病学则大部分仍停留在大体观察和简单实验检测的阶段,还没有进入分子水平。当然,近年来也有一些学者利用分子流行病学研究肿瘤,只是与流行病学在肿瘤防治中应发挥的作用仍相距甚远。

微粒体混合功能氧化酶系在体内或体外证明是可以诱导的,但它的诱导性在小鼠中证明是受遗传控制。以芳(香)基羟化酶(AHH)为例,在一半稍多些的近交系小鼠对酶有反应,而其余的无反应。这种遗传属常染色体显性遗传,有关座位被命名为Ah座位。Ah座位与化学致癌物诱发肿瘤的易感性有关。实验证明诱导反应不同的近交系动物对一些致癌物(如多环芳烃、芳香胺等)的反应不同。在人群中,也证明有Ah座位。Kellerman等在致分裂原刺激的淋巴细胞中检测67个家庭353个健康人个体对3-甲基胆蒽的AHH诱导反应,结果证明,AHH诱导程度的分布呈“低、中、高”三相性。低和高诱导等位基因频率分别为0.717与0.283。对支气管肺癌、其他肿瘤患者和健康人的群组比较研究结果表明,中度诱导性和高度诱导性表型个体要比低诱导个体发生肺癌的风险分别高出10和46倍。Ah座位表达及其他遗传变异与肿瘤易感性的关系有待进一步研究。有研究表明ras肿瘤基因编码的P21蛋白可被常见的职业致癌物激活,也经常在职业癌中检出,有些情况下在癌发生过程的早期已经表达。因此学者们认为,用ras等肿瘤基因作生物标志为职业癌分子流行病学评价提供了一种新的手

段。

三、研究遗传及代谢性疾病: 各种遗传及代谢性疾病都有一定的遗传基础,因此从分子及基因水平对其进行研究极其重要。在这一方面分子流行病学的研究刚刚开始,尚未受到足够的重视。但从目前的研究成果及其前景看,这一领域,包括有害基因的分布及遗传规律、病人筛检、高危人群研究,尤其是优生优育,将是人们感兴趣的课题。强直性肌营养不良症(DM)是一种常染色体显性遗传病,临床上以发病晚、症状表现多样为特征。谭骏等应用19号染色体上与DM基因紧密连锁的单拷贝片段LDR152(D19S19)在中国上海地区人群及一个DM家系中进行限制性内切酶片段长度多态性的连锁分析。结果表明,等位片段19kb和11kb在人群中的分布频率分别为43.44%和56.56%,其中19kb纯合子为22.95%,11kb纯合子为36.07%,19kb和11kb杂合子为40.98%,此结果与国外报道的明显不同。说明种族间可能有差异。在所分析的这例DM家系中,发现DM基因与19kb等位片段相连锁,并呈孟德尔式遗传。进而对两例无任何临床症状的DM基因携带者作出了明确的诊断,并对家系中患DM的危险成员进行了风险估计。

随着社会的进步,优生学在医学中将会占有重要地位。在人群中进行分子流行病学研究,控制有害基因的分布,促进健康基因的分布,对人类健康和优生有着重要意义。遗传印迹是近年来提出的新概念,它的含义是,一种遗传物质,人们随着母方或父方遗传的此物质而有不同的遗传表现。如有一种称为Prader-Willi综合征的疾病,报道已有30多年,是一种特殊征候群——婴儿期出现肌张力低,幼儿期开始肥胖、食欲过旺、生殖能力低下、智力障碍、小手小脚及特殊面容。10年前发现此病是15号染色体一段缺失(15q11-13),最近用分子探针发现有这一段缺失的染色体都是父源的。而另一种病叫Angelman综合征,报道已有25年,表现为性格快乐、智力障碍、笑声频发而异常、有奇特而对称的共济失调、大嘴等,染色体缺失段也是15q11-13,分子生物学研究发现,缺失那段的染色体是母源性的。同一段染色体的缺失,但母源和父源的临床表现完全不同。母源印迹基因遗传规律是:带此基因的妇女将其传给她的子女后,子女都不发病,但带有这个基因的儿子将此基因传给他的子女时,因为是父源的,就会表现出来而呈病态,她的女儿所生的子女则不发病。父源印迹基因的规律与此相反。因此,研究这些基因及其他有害基因在人群中的分布

及分布规律,进而控制其传递,降低其分布,对促进人群健康有重要价值。

四、研究健康及其他与医学有关的事件: 医学不仅仅研究疾病,健康及医学有关事件已成为医学研究的重要内容。人群白细胞表面抗原(HLA)是人体血液中的活化石,其不仅记载着人类防病能力方面最复杂的遗传信息,而且也可作为探索人类的起源及迁移的指标。1988年以来,中日友好医院等单位对沿丝绸之路人群白细胞表面抗原的分布进行研究。他们使用分子生物学方法直接检测人群的HLA基因,研究结果表明,在丝绸之路上,不同地区基因的迁移方向由东

向西有明显的差别,如西北少数民族既有华夏基因,又有一定程度的白人基因,其频度自西向东逐渐减少,直至丝绸之路的发祥地西安,其基因频度已与华北人群一致,呈典型的东方人种特征。另一方面,新疆维吾尔族虽有白种人基因,却又明显不同于纯白种人,而与汉族有密切的血缘关系。由此反映出中国历史上随着经济文化交往而带来人口迁移的特征,也说明中国各民族间血统的融汇。

由此看来,分子流行病学作为一门发展中的年轻分支学科,研究范围在不断扩大,研究内容也将日趋丰富和深入。

山东临沂地区1989年脊髓灰质炎流行病学调查

刘智宝¹ 张玉军¹ 杨守堂¹ 梁青¹ 朱登磴¹ 李永军¹ 张忠诚² 付沛祥³

我区自70年代初广泛服用脊髓灰质炎(简称脊灰)减毒活疫苗以来,发病率显著下降,1988年降至最低(0.01/10万),但1989年又出现了局部爆发,全区共发生脊灰病人103例,发病率为0.90/10万,死亡15例,病死率为14.56%。

一、流行特征: 1.地区分布:疫情波及12个县市,37处乡镇,84个行政村。病人主要集中在郯城、苍山和临沭3个县。2.时间分布:1989年2月15日发生首例病人,7月份病人开始增多,8、9月为发病高峰。3.年龄及性别分布:发病年龄最小为57天,最大不足4岁,2岁以内发病占81.6%。男女之比为1.78:1。4.临床症状、体征:患者大多在发病5~10天内出现弛缓性瘫痪。据统计,103例病人中,单侧下肢瘫痪占33.98%,双下肢瘫痪占51.46%,双下肢及单侧上肢瘫痪占1.94%,单侧上下肢瘫痪占0.97%,四肢瘫痪占11.65%。其中15例病人因呼吸肌麻痹导致呼吸衰竭而死亡。5.服苗史:103例病人中从未服过疫苗者58例,只服过一次者33例,服2次者9例,仅有3例为全程服苗后发病。在不全程服苗者中,有28例是脊灰流行时的应急服苗者,其中有6例为应急服苗2次后发病。6.经病原学和血清学证实,本次流行是由I型

脊灰病毒引起。

二、流行原因分析: 1.经流行病学调查,未服苗和不全程服苗是造成这次脊灰流行的主要原因。对未服苗原因分析表明,乡村医生未给接种占85%;宣传不够,家长不知道要接种占4.8%;家长拒服占10.2%。2.疫情报告不及时,延误了疫点、疫区处理和应急服苗等措施的落实。

三、讨论: 1.本次脊灰流行病情急、症状重、病死率之高是近年来所少见的。这是否是由于脊灰病毒毒力增强或变异造成,值得进一步探讨。2.一旦出现脊灰爆发,应尽早做出病原学诊断,以便针对流行毒株进行应急服用单价脊灰疫苗会收到更好的效果。3.鉴于1岁内儿童发病比较多,故在脊灰流行地区推行WHO推荐的“0”次脊灰疫苗接种是可取的。4.为如期实现消灭脊灰的目标,必须加强脊灰疫情报告和监测工作,实行“0”病例报告制度是非常必要的。

1 临沂地区卫生防疫站, 邮政编码 276004

2 郯城县卫生防疫站

3 苍山县卫生防疫站