

肿瘤基因单核苷酸多态性研究及个体化医疗的思考

许玲, 孙大志, 余志红

许玲, 孙大志, 余志红, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院中医科 上海市 200003

许玲, 女, 1967-3-8 出生, 浙江衢州人, 汉族, 1995 年毕业于上海中医药大学, 获博士学位, 副教授, 主要从事中西医结合防治肿瘤的临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271626

项目负责人: 许玲, 200003, 上海市凤阳路 415 号, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科, czzyk@smmu.edu.cn

电话: 021-63610109-73406

收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-01-20

摘要

单核苷酸多态性(SNPs)是指存在于某一人群或个体基因组内的单个碱基发生突变, 从而导致了群体与群体及个体与个体之间的差异。肿瘤患者个体治疗敏感性和与治疗相关的毒副反应等均与 SNPs 有关。解析人类基因组的碱基序列差异, 将为相关联的医药领域疾病的治疗带来革命性飞跃, 在不久的将来有望实现“量体裁衣”式的个体化给药治疗方案。

关键词: 单核苷酸多态性; 肿瘤; 基因; 个体化医疗

许玲, 孙大志, 余志红. 肿瘤基因单核苷酸多态性研究及个体化医疗的思考. 世界华人消化杂志 2005;13(5):592-595
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/592.asp>

0 引言

肿瘤是严重威胁人类生命健康的疾病之一, 目前已开展手术、化疗、放疗、生物治疗、中医药治疗等多种治疗方法, 然而疗效仍不能令人满意。化疗、放疗等疗效确凿, 但他们是“双刃剑”, 既能抑制肿瘤细胞的增生和转移, 又对患者机体产生毒副作用, 因此对于肿瘤的治疗急需一种能最大限度防治肿瘤、改善生活质量, 最大限度的降低毒副作用的个体化的治疗方案、剂量及疗程。因此“个体化医疗”对于肿瘤患者来说意义重大。

人类基因组图谱解码后, 生物科技研究展开崭新的一页, 科学家经解读及分析基因组所含的遗传信息, 发现人类基因组单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是疾病易感性、外显性、抵抗性以及药物反应性等生物学性状差别的重要遗传学基础^[1-2]。单核苷酸多态性研究所揭示的人种、人群和个体之间 DNA 序列的差异以及这些差异所表现的意义将对疾病的诊断、治疗和预防带来革命性的变化—实现针对个人量身打造的个体化医疗。

东汉末年, 祖国医学的医圣张仲景就创立了六经辨证和脏腑辨证的辨证论治体系, 开创了“个体

化医疗”的先河, 一千七百多年后的今天, 随着基因组学、蛋白质组学、药物基因组学和生物信息学的发展, 从多因素分析、基因的相互作用、多层次生物信息整合等着手研究, 现代医学科学家提出了个体化医学的思想^[3]。在为祖国医学自豪的同时, 我们应该思索如何进行中医现代化的研究。

1 人类基因组的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)特性及应用

基因组 DNA 是生物体各种生理、病理性状的物质基础。人类众多个体的基因组序列的一致性高达 99% 以上, 但个体之间各种性状的差异仍然很大, 包括对疾病的易感性、对同一疾病治疗药物的反应性等。基因的 SNPs 是形成个体间差异的重要遗传学基础。

SNPs 是指普通人群中发生在基因序列中的某一单个核苷酸改变的比率超过 1%, 这种单个核苷酸改变包括碱基对的替换、核苷酸插入和碱基缺失。SNPs 在人类基因组中广泛存在, 平均每 500-1 000 个碱基对中就有 1 个, 估计其总数达 300 万个甚至更多。

在基因组 DNA 中, 任何碱基均有可能发生变异, 因此 SNP 既有可能在基因序列内, 也有可能是在基因外的非编码区序列上。总的来说, 位于编码区的 SNP (cSNPs) 比较少, 因为在外显子内, 其变异率仅为周围序列的 1/5。但他在遗传疾病的研究中却有重要意义。因此 cSNPs 的研究更受关注。

从对生物的遗传性状的影响上来看, cSNPs 又可分为 2 种: 一种是同义 cSNPs (synonymous cSNPs), 即所致的编码序列的改变并不影响其所翻译的蛋白质的氨基酸序列, 突变碱基与未突变碱基的含义相同; 另一种是非同义 cSNPs (non-synonymous cSNPs), 指碱基序列的改变可使以其为蓝本翻译的蛋白质序列发生改变, 从而影响了蛋白质的功能, 这种改变常是导致生物性状改变的直接原因。cSNPs 中约有一半为非同义 cSNPs。

人类基因组单核苷酸多态性研究所揭示的人种、人群和个体之间 DNA 序列的差异以及这些差异所表现的意义将对疾病的诊断、治疗和预防带来革命性的变化。今后单核苷酸多态性的研究将在多个领域发挥重要作用, 其中包括: (1) 进行疾病的遗传连锁分析 (linkage analysis) 及关联分析 (association analysis), 用于疾病易感基因定位; (2) 在药物基因

组学(pharmacogenomics)研究中,可通过检测 SNPs 的遗传多态性标记揭示人群中不同个体对不同药物的敏感性差异的根本原因^[4]. 这些研究将为“个体化医疗”奠定基础.

2 单核苷酸多态性与肿瘤的治疗

肿瘤严重威胁着人类的生命健康,化疗、放疗等已在肿瘤治疗中广泛应用,但他们是“双刃剑”,既能抑制肿瘤细胞的增生和转移,又对患者正常组织、器官产生毒副作用,如消化道反应、骨髓抑制等,临床中发现不同的肿瘤患者其疗效和毒副反应有差异.近年来,随着人类基因组计划的开展,人们已认识到肿瘤是复杂性疾病,肿瘤的发生和进展与遗传变异有关.通过从遗传的角度研究疾病治疗中存在的遗传基础的个体差异,人们已经发现部分基因单核苷酸多态性(SNPs)与药物疗效、药物代谢、放射组织损伤等相关.

2.1 肿瘤药物治疗相关基因 不同个体对于药物治疗反应的殊异可由多种因素造成,并产生不同的后果.就遗传因素而言,药物靶体的基因变异,会改变药物与靶蛋白间的相互作用;靶蛋白合成的有关基因变异,可以改变药物的效应;药物运输蛋白的基因变异,会影响药物的吸收、分布和排出;药物代谢酶的基因变异,会改变药物的代谢;DNA 修复酶的基因变异,则可改变药物的安全性;谷胱甘肽合成酶或某些辅基合成酶的基因变异,会改变药物的代谢途径和安全性.就环境因素而言,药物代谢主要酶系细胞色素 P450 的表达诱导,可以使药物的疗效降低;P450 的抑制剂则可能引起药物与药物的相互不良作用.另外,年龄、疾病和炎症等生理病理因素的差异,均可改变药物的吸收、分布和排泄.以下就药物代谢基因、药物运输基因和疾病相关基因举例说明基因多态性在肿瘤药物治疗中的研究.

2.1.1 药物代谢基因 细胞色素 P450(cytochromes P450 CYP)系统为人体内代谢药物的主要酶系统,CYP450 的第 1 到第 3 家族是参与药物代谢的活性酶,而且绝大部分基因具有多态性.其中 CYP3A 亚家族的成员催化多种药物的氧化及过氧化过程,同时在人的肝脏和小肠内含量也是最为丰富的,分别占总 CYP 的 30% 和 70%^[5].有许多化疗药是 CYP3A 的作用底物,如足叶乙甙、威猛(Vm-26)、环磷酰胺、异环磷酰胺、长春碱类、紫杉醇等^[6]. CYP 酶的多态性对各种药物的个体敏感性和毒性作用影响很大,由于 CYP3A 表达存在相当大的个体差异,在某些人群中可相差 30 倍以上^[7],导致了不同个体对 CYP3A 底物的生物利用率和清除率的极大差别. CYP3A 表达的差别对于治疗用药谱较窄的底物如肿瘤化疗药等尤为重要,因为这种差别可造成临床疗效

和药物毒性作用的明显不同. 对人肝脏 CYP3A5cDNA 进行的分析表明,携带 CYP3A5*1 基因型的人其体内转录完整 CYP3A5mRNA 的量较高,且能表达出 CYP3A5 蛋白.而那些携带 CYP3A5*3 基因型的人在第 3 内含子中存在序列的突变,编码的是异常连接的 mRNA,这种 mRNA 很快被降解,所以由其翻译的蛋白量也较少^[7]. CYP3A5 的高表达往往提示对药物的清除率较高,而剂量限制性毒性作用的发生率则较低,所以对这类患者通常需要增加用药剂量才能达到满意的疗效.而对带有 CYP3A5*3 纯合子的患者,由于 CYP3A 的含量较低,药物清除较慢,所以药物在体内存留时间延长,这类患者治疗效果往往较好,但容易出现较大的毒副作用,应该适当减少药物用量.值得注意的是,药物经过 CYP 灭活后,并不是马上就能丧失毒性排出体外,有相当一部分化疗药经 CYP 代谢后转化成致癌物,对于长期存活的肿瘤患者来说有诱发第二肿瘤的危险,而这种第二肿瘤的发生也与 CYP3A 的多态性有关. Felix *et al* 研究了 CYP3A4 基因型与治疗相关性白血病之间的关系,发现野生型 CYP3A4 与化疗引起伴有 MLL 基因移位的白血病密切相关,而携带突变型 CYP3A4 的人化疗相关性白血病的发病率则较低.这种 CYP3A4 突变型在各人种中的分布也不同,在美国白人占 9%,美国黑人占 53%^[6].

2.1.2 药物运输蛋白基因 人体内有很多蛋白质负责输送药物出入细胞,称为药物运输蛋白(transporters),其中一大类为 MRP 蛋白.他们输送的药物包括抗癌药物和抗病毒的核苷类药物等.在不同个体中,这类蛋白质的表达可有极大差异.如在肝癌患者的癌周组织中,属于 MRP 的一种 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的表达水平,要比正常肝组织为低.这类表达水平以及活力的差异,可以直接影响到药物在细胞内的有效浓度,进而影响药物的疗效.并且最近有研究发现表明 MRP 基因多态性与肿瘤化疗敏感性相关^[8];MRP 基因促进子及第 28 外显子单核苷酸多态性与铂类化疗效果无明显相关性,而 MRP 第 10 外显子(第 1 249 位点)的 SNP 与卵巢癌的化疗效果密切相关,提示第十外显子突变型携带者对铂类化疗药敏感.

2.1.3 疾病相关基因 除药物代谢过程中出现的基因突变外,导致疾病的致病基因本身发生突变后也同样可以导致机体对药物的反应发生变化.例如,癌症患者的癌细胞常可以表达一种多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein MRP),他主要是 MRP 基因突变后表达,这种蛋白可以将癌症化疗时进入肿瘤细胞的药物自发地转运到细胞外,因而对于许多化疗药物的作用影响很大^[9]. MDR1 的编码产物 P-gp 是一种跨膜蛋白,作为泵将细胞内的一些药物转运到细

胞外. Kim *et al* 对美国人MDR1基因的研究发现了10个人的单核苷酸多态性, 其中4个是同义的, 6个是非同义的突变, 并可导致编码氨基酸的替换, MDR1*1基因型在人群中最常见, 其次是MDR1*2, 他一般同时包含了3个多态性, 即12外显子C1236T, 21外显子G2677T和26外显子C3435T, 其中21外显子G2677T是非同义的, 可造成编码蛋白Ala893Ser的替换, 而另外2个多态性则是同义的, 体内及体外实验发现, 与MDR1*1基因型比较, 在小肠黏膜细胞上表达的MDR1*2基因型所编码的P-gp具有更强的药物转运能力, 可把口服的P-gp底物泵出细胞, 排到肠腔内, 从而减少对这类口服药物的吸收. 这种MDR1单核苷酸多态性造成的P-gp将药物从细胞内转运到细胞外能力的差异, 势必会影响肿瘤化疗的疗效, 可以预见与MDR1*1基因型比较, 携带MDR1*2基因型的患者化疗疗效较差, 且易形成耐药^[10-11].

很多研究报道了醌氧化还原酶(NAD(P)H:quinone oxidoreductase, NQO1)基因多态性与发生胃癌危险性之间存在相关性^[12-13], Kolesar *et al*在对II/III期非小细胞肺癌生存期的研究中发现NQO1基因的纯合子型SNP的生存期比杂合子型、野生型显著缩短, 同时认为在肺癌化疗敏感性和预后方面, NQO1基因型很重要, 而且可能是治疗非小细胞肺癌的药物遗传学策略的有用组成部分^[14].

胃肠道肿瘤的化疗药物中5-氟尿嘧啶(5-Fu)是常用药, 目前临床上也常配合亚叶酸钙进行治疗. Kawakami *et al*研究了在胃肠肿瘤组织中亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)与叶酸库容的关系, 研究表明MTHFR在叶酸的新陈代谢中有重要作用, MTHFR基因型(C667T, Ala/Val-type)与MTHFR的活性密切相关, MTHFR基因型患者可以适合于基于5-FU的化疗, 特别适合于用亚叶酸钙进行补充治疗的针对性治疗策略中.

2.2 肿瘤非药物治疗相关基因 肿瘤患者的局部肿瘤对放射的敏感性及其正常组织对放射的反应问题一直受到关注, 科学家已经建立了有效的放疗患者的组织和数据库, 包括精确的放疗剂量和随访. 在对临床预后参数进行仔细的评价后发现, 肿瘤和正常组织对放疗的反应性在不同患者之间明显不同, 而且有证据表明患者对这些反应的差异性至少绝大多数来自于遗传因素. 六个乳腺癌患者放疗后其中三个发展成为严重的纤维化, 而另外三个则没有, 研究表明这是由于成纤维细胞的细胞因子表达谱有内在的不同. Andreassen *et al*报道了41例非选择性乳腺癌患者接受了乳腺切除术后放疗, 检测患者成纤维细胞中五个候选基因的SNPs:XRCC1(密码子399)、XRCQ(密码子241)、APEX(密码子148)、SOD2(密码子16)和TGF- β 1(-509,

密码子10和密码子25), 通过这些患者详细的剂量、疗效数据, 建立了量-效反应曲线, 估计急性皮肤反应、皮肤毛细血管扩张和皮下纤维化的增强率. 发现XRCC1(密码子399)基因型和SOD2(密码子16)基因型与放疗诱导的皮下纤维化发生有关;XRCC3密码子241基因型与放疗诱导的皮下纤维化和毛细血管扩张均有关;TGF- β 1(密码子10)基因型与放疗诱导的皮下纤维化发生有关TGF- β 1(密码子25)基因型与放疗诱导的毛细血管扩张有关. 这些发现支持如下假说:临床正常组织放射敏感性是几个基因变异综合作用的结果, 以多种遗传标记为基础建立起来的量效模式可能对预测放疗后正常组织反应有潜在的价值.

肿瘤易感基因、肿瘤治疗相关基因与基因单核苷酸多态性关系的研究目前正广泛开展, 由于研究条件的差异、研究对象的人种、生活地域的不同、生活习惯的不同等因素使研究结果存在分歧. 同时必须注意到, 并非所有的SNP都有临床意义. 对疾病发生和药物治疗有重大影响的SNP, 估计只占数以百万计SNP的很小一部分. 从数百万存在于整个基因组的SNP, 到导致蛋白质氨基酸编码改变或基因表达调控改变的SNP, 到导致蛋白质体外活力改变的SNP, 到导致药物代谢动力学改变的SNP, 最后到导致临床药物效应改变的SNP, SNP的数目每一步都在快速递减. 怎样从数百万SNP中, 找到确有临床意义的功能性SNP, 是药物遗传学和个体化医学所面临的重大挑战. 因此, 目前尚不足以根据现有的研究来制定防治肿瘤的个体化方案. 今后需构建与肿瘤相关的人类基因信息数据库(包括SNP数据库), 同时发展有效地分析基因分型数据的生物信息学算法, 特别是将SNP数据与肿瘤和致病因素相关的计算方法. 当一个致癌基因被确定后, 我们可以研制针对该基因的有效药物;当多态性和基因表达谱等生物学特性与药物反应密切相关时, 就有望实现针对个体的最优化治疗. cDNA微阵列和高通量SNP筛选技术提供了探测DNA和RNA突变的系统方法, 相信不久的将来肿瘤的个体化医疗将成为现实, 彻底改变目前的抗癌化疗、放疗的状况.

3 辨证论治—中医的个体化医疗

随着现代医学的发展, 尤其是基因的问世和“后基因工程”的提出, 科学家预测“个体化”思想可能是未来医学的一种模式, 而且医学界也正在自觉或不自觉地把“个体化”的思想运用于临床. 事实上, “个体化医疗”这个问题在古今中药临床应用中, 可以说在中医诊疗系统的理论产生和发展过程中产生过巨大影响. 从某种角度而言, 中医诊疗系统之所以存在, 其主要价值在于指导中药处方等各种

疗法的选择,以进行治疗.从其产生和发展的过程来看,中医诊疗系统在发展过程中形成了辨病和辨证两个系统,如《金匱要略》、《千金要方》和《外台秘要》等属于辨病系统,《伤寒论》等属于辨证系统.其中辨病的出发点是针对疾病的产生和发展规律,而辨证系统的应用则在一定程度上解决了疾病罹患和发展过程中体质及机体反应性等因素所引起的各种变化规律,即“个体化医疗”的问题.

辨病论治,是在确立疾病诊断之后,根据疾病确立治疗原则.对于比较简单的疾病来说,辨病论治比较容易做到.但是,许多疾病都是比较复杂的过程,在这个过程中,每个阶段的病理变化不尽相同,很难找到一个一成不变的治疗方法.因此,只能根据疾病发展过程中每一阶段的病理状况来确定治疗方针,也就是说,不是单纯根据病,而是结合证来确定治疗方法.因此中医学强调辨证论治.

中医认识和治疗疾病,既辨证又辨病.同一种病,由于致病因素、气候地域、机体反应性的不同,常常表现为不同的证.所以必须在辨病的基础上结合辨证,才能有效地施治.例如胃癌这一疾病,临床中可见到脾胃虚寒型、瘀毒内阻型、胃热伤阴型、痰湿凝结型、气血双亏型等,治疗用方大相径庭.因此,辨证论治既不同于头痛医头、脚痛医脚的对症疗法,又不同于不分阶段和主次,一方一药对一病的治疗方法.

尽管“个体化医疗”问题在一千多年前就引起了中医的重视,无论在医疗理论和方法方面,还是在医药经验积累方面都在解决“个体化医疗”这个问题上形成了独特的优势,并使中医理论形成了一套行之有效的应对体系,即辨证论治体系.但是以中医药理论为基础的辨证论治体系中普遍存在着许多模糊性概念和现象,例如患者的病态信息是模糊信息的综合体.中医诊法中的望、闻、问、切就是模糊信息.这些模糊概念使中医学研究不能定量,不能重复,制约了中医的发展.另外,近年来大多采用从某个局部、某些细胞或某些基因来研究中医的“证”,就好比“瞎子摸象”,难以把握“活着的整体的人”的“证”本质.

生物信息学和后基因组学在肿瘤等复杂疾病的研究中提出:“序列→结构→相互作用→基因调控、蛋白质相互作用网络→功能”的模式,复杂性疾病在大量数据资料的分析处理基础上,正由局部朝向整体,由孤立朝向系统进行研究.中医分析和诊治疾病时,重视人体各脏腑的功能,认为人体外在的表现(症状、体征、舌象和脉象)是脏腑功能改变的反映,这种从宏观、整体的角度研究功能应该与从序列、基因调控等微观研究功能有相关性.从SNP的研

究中可以看出,SNP与人的体质、疾病的易感性、药物的反应性密切相关,而这些也正是中医辨证论治中的重要内容.因此,现代生物科技的发展也为中医药搭建了一个研究平台.

假若我们能运用循证医学和模糊数学的方法将中医的“证”的内涵予以一定程度的量化,将侧重于宏观的中医药学及其诊疗特色与侧重于微观的生物信息学进行有机结合,合理分析高通量的SNP数据,综合多层次信息,用系统的、全局的观念去研究中医证候多层次的现象及其本质,那么不久的将来,中医的个体化治疗—辨证论治,可以与疾病的分子诊断相结合,实现中医治疗理论的现代化.

4 参考文献

- 1 Taningher M, Malacarne D, Izzotti A, Ugolini D, Parodi S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat Res* 1999;436:227-261
- 2 Mohrenweiser HW, Jones IM. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation? *Mutat Res* 1998;400:15-24
- 3 汉雨生, 王明荣. 单核苷酸多态性分析技术及其在肿瘤研究中的应用. 国外医学肿瘤学分册 2003;30:189-193
- 4 基因有限公司专家组. 单核苷酸多态性研究前沿及主要技术方法. 生物学教学 2004;29:3-4
- 5 Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 1996;49:311-318
- 6 Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winick NJ, Cheung NK, Lovett BD, Nowell PC, Blair IA, Rebbeck TR. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13176-13181
- 7 Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;27:383-391
- 8 杨兴升, 关根正幸, 仓田仁, 田中宪一. MRP2基因单核苷酸多态性对晚期卵巢癌铂类化疗敏感性的影响. 实用妇产科杂志 2004;20:153-155
- 9 王佐广, 温绍君, 吴兆苏. 临床药物应用与单核苷酸多态性. 中国医药导刊 2002;4:45-46
- 10 Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR. Identification of functionally variant MDR1 alleles among european americans and african americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:189-199
- 11 迟志宏, 刘端祺, 张积仁. CYP 和 MDR1 的单核苷酸多态性对肿瘤化疗疗效的影响. 解放军医学杂志 2003;28:752-753
- 12 Ross D, Traver RD, Siegel D, Kuehl BL, Misra V, Rauth AM. A polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1): relationship of a homozygous mutation at position 609 of the NQO1 cDNA to NQO1 activity. *Br J Cancer* 1996;74:995-996
- 13 Lin P, Wang HJ, Lee H, Lee HS, Wang SL, Hsueh YM, Tsai KJ, Chen CY. NAD(P)H:quinone oxidoreductase polymorphism and lung cancer in Taiwan. *J Toxicol Environ Health A* 1999;58:187-197
- 14 Kolesar JM, Pritchard SC, Kerr KM, Kim K, Nicolson MC, McLeod H. Evaluation of NQO1 gene expression and variant allele in human NSCLC tumors and matched normal lung tissue. *Int J Oncol* 2002;21:1119-1124