






# 危重症救护

## 基因组学在炎症研究中的应用



枪伤、烧伤、心脏病发作、关节炎、哮喘和癌症间有什么共同点吗？如同其它疾病一样，这些疾病除了给患者带来痛苦以外，都会引起炎症。炎症是对外伤和感染的免疫反应，通常炎症具有保护作用，但有时候也会危及病人甚至夺去病人的性命。由免疫细胞在受伤部位积聚所引起的炎症，通常能防止感染，加速康复；这是一种重要的反应，本身不会引起疾病。但是炎症不受限制的蔓延或无法消退对数以百万计的人们构成了慢性和急性健康危害。例如，由于炎症混合物引起的呼吸道粘膜肿胀和粘液在肺部的扩散，导致哮喘病人无法呼吸。科学家认为，通过促进异常细胞的增殖，炎症还会恶变成癌症。感染或炎症扩散进入血流，引起的急性症状称之为脓毒症，会使重症病人发生器官衰竭和休克。根据美国国立综合医学科学研究所的统计，每年死于脓毒症的美国人高达 215000。根据发表在 1992 年 6 月号《胸科》(Chest) 杂志上的一篇调查报告，估计全世界每天有 1400 人死于脓毒症。

鉴于以上原因，炎症已成为生物医学研究的最热门领域之一。圣路易斯的华盛顿大学外科学与遗传学教授 J. Perren Cobb 说，许多医学学科得益于这些研究。“炎症是一种由多种疾病引起的综合征，其研究为多学科合作提供了机会，”他解释说，“炎症研究涉及到 NIH 的所有领域；它是将所有问题联系起来的人类生物学基本过程。”

越来越多的证据表明遗传学因素是决定个体炎症结局的重要因素。研究炎症的科学家正试图从炎症的发展过程中找到引起炎症的基因及生物标记物。美国国立癌症研究所儿科肿瘤部基因组变异分部负责人 Stephen Chanock 强调，目前这一危重症救护的研究方向扩展并延伸到环境卫生的众多学科。“外伤最终反映的是基因和环境的相互作用，”他解释道，“环境卫生通常着眼于慢性暴露，但在这种情况下，我们研究的是更危险和激烈的环境伤害。因此环境卫生中的‘环境’不只与污染有关，也与实际经验有关。我们正在建立炎症研究的实用方法，将其最终应用于解决重大公共卫生问题。”

### 深入了解炎症

如今，基因组学是炎症研究的最先进技术。基因组学研究，加上与之密切相关的蛋白质组学和代谢组学研究，其目的都是为了揭示一个古老的秘密：即为什么有些病人很容易从炎症中康复，而另一些病人则在饱受折磨后死于炎症。目前的研究重点集中在危重症救护，尤其是面临脓毒症并发症致命危险的外伤和烧伤病人的救护。理想情况

Digital Vision, Chris Reuther/EHP



下,新基因的发现将提供诊断性生物标记物,以预测其中哪些病人对炎症的反应能力低下,以及原因是什么。如果医生能事先可靠地预测这一结局,他们就可根据病人的自身炎症体系,选用抗生素和其它治疗方法,从而可能挽救生命。

Cobb 说,对炎症生物学的深入了解能产生新的治疗方法。2001 年面市的由 Eli Lilly 公司生产的名为 Xigris 的抗脓毒症最新药物,可帮助有些病人恢复,但其价格昂贵,每个疗程大约 7000 美元。此外,该药仅降低 6% 的死亡风险,而且还有象过度出血这样的副作用。

在推进炎症研究的众多项目中有一项由美国国立综合医学科学研究所资助的“胶水基金”,取意于像胶水一样将多学科的努力“粘在一起”,以解决任何单个研究组无法解决的生物医学问题。该项目名为炎症和宿主对外伤的反应,致力于研究为什么在遭受外伤和烧伤后不同病人会有显著不同的结局。由哈佛医学院外科学教授和马萨诸塞总医院烧伤科主任 Ronald Tompkins 领导的该项目,在遍布全国的 22 个临床中心应用基因组学和蛋白质组学方法研究炎症问题。在该项目的第一个五年期间,总共得到 3700 万美元的资助。

当炎症和宿主对外伤的反应项目在 2001 年启动时,其领导者就决定创建一个将统一研究方案置于首要地位的庞大研究基础体系。“我们最先遇到的挑战之一是制订指导原则,不只是样品收集和原则,还包括管理病人的原则,”佛

罗里达大学医学院外科教授和“胶水基金”受资助者 Lyle Moldawer 说。“我们认识到各个受资助中心对外伤和烧伤病人的紧急救护方案都不同,我们担心早期处理上的这些差异可能会影响到基因表达的变化。”

Tompkins 说为该项目建立统一的基础体系就象建造高速公路,“我们需要加油站、入口、出口,”他说,“以前还从未有人曾经尝试过在危重症救护医学中引入这一技术。”随着标准操作程序的建立,该项目现已进入了第四年,科学家们开始解决下面的挑战:从该项目 22 个诊所得到的大量基因组学数据中提取有价值的信息。

与此同时,“胶水基金”项目正在加速进行,Cobb, NIH 的危重症救护医学部高级研究员 Anthony Suffredini 以及同部门的感染性疾病部负责人 Robert Danner 创建了脓毒症表达特征研究会,专门研究在危重症救护中应用基因组学方法的需求。该学会在举行了四次全国性会议后发展为 NIH 危重症和创伤的功能性基因组学系列研讨会,该研讨会现成为“胶水基金”受资助者以及其他人员讨论研究进展和结果的论坛。最近的一次讨论会由 NIH 主办,于 2005 年 4 月 21~22 日在 NIH 的 Bethesda campus 举行,来自 10 个国家的科学家参加了会议,他们都是致力于推动基因组学在炎症研究中应用的研究人员。

### 炎症入门

无论是由污染物、病原体、外伤、辐射还是

烧伤引起的炎症,一旦发生,都有着相似的进程。受影响组织局部的肥大细胞会产生一种使受损伤部位血管扩张,引起红肿和发热的化学介质—组胺。组胺还增加血管的通透性,使白细胞能到达损伤部位。白细胞被称为趋化因子的趋化蛋白吸引到损伤部位,这些蛋白质是由血管壁的内皮细胞分泌的。

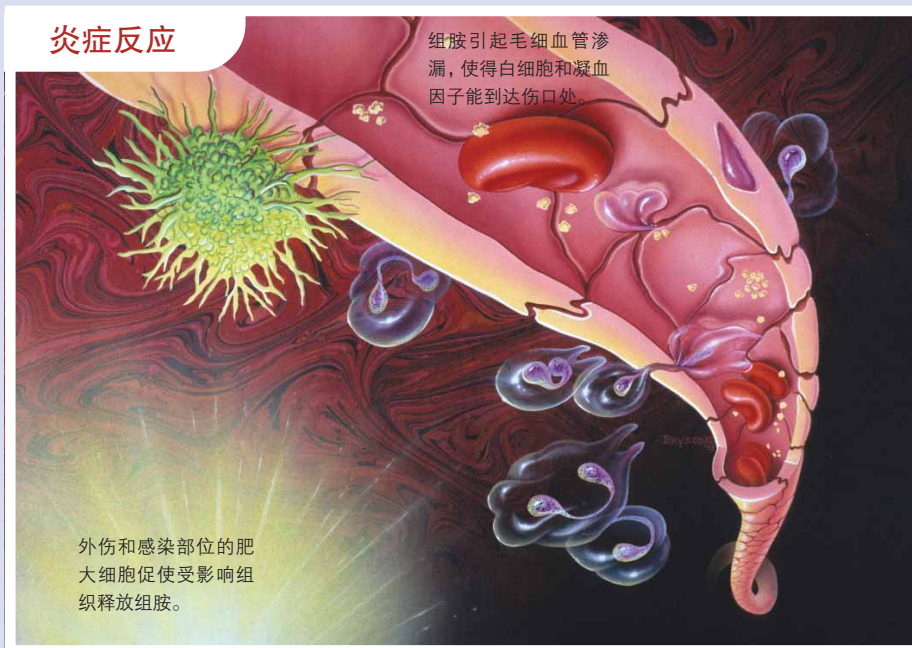
白细胞起源于骨髓,包括不同的细胞类型,如嗜中性粒细胞、嗜酸性细胞、嗜碱性细胞、单核细胞、淋巴细胞和巨噬细胞。嗜中性粒细胞最先到达受伤部位。这些有着特殊功能的细胞在体内到处漫游,需要时用由自由基和能破坏细菌细胞壁的蛋白质分解酶组成的毒性混合物杀死病原体。单核细胞吞噬细胞的碎片,成熟为巨噬细胞后是能吞噬整个细菌的较大白细胞。这些细胞还分泌各种细胞因子,以吸引和激活其他类型的细胞。淋巴细胞可分为两大类 B 细胞和 T 细胞,各自有不同的功能。B 细胞一旦被激活,会产生抗体攻击外源性物质,而 T 细胞则直接杀死受感染的细胞。

炎症时白细胞释放多种化学介质。例如,细胞因子帮助控制炎症,而白介素则控制 T 细胞的活性并产生象发烧这样的系统反应。

通常,整个炎症过程具有自限性,持续时间不长;在感染因子消除以后,白细胞就分散开了,炎症在几小时或几天内消退。当炎症反应持续不退或发生系统性扩散,炎症过程破坏和杀死正常组织的时候,就出现问题了。慢性炎症能持续数年,引起各种炎性疾病,如气管炎、节炎和粘液囊炎。系统性炎症——脓毒症便是其中一种由于细胞因子进入血流并蔓延至全身使远离原受伤部位的器官受到伤害。

### 候选基因

没人确切知道一旦炎症失去控制会发生什么情况。多年的免疫学研究表明异常的炎症涉及数百个基因,但没有足够证据表明它们与特定结局的联系。在这些基因中,一种编码 C-反应蛋白(CRP)的基因可能最为著名。CRP 是一种急性炎症期分子,在系统性炎症时,其水平迅速升高。高 CRP 水平是心脏病和中风(两者都与炎症有关)的预后指标,但其在这些疾病中的作用仍不清楚。另一有名的基因——肿瘤坏死因子 alpha(TNF- $\alpha$ ) 是编码促炎症细胞因子的基因,这种细胞因子通常具有调节白细胞和内皮细胞活性的功能,同时还有其他功能。



然而，直到廿世纪九十年代，候选基因的研究仍未在炎症临床上产生效益。Suffredini说当时科学家们对缺乏进展感到倍受挫折。“人们感到绝望，感到似乎钻进了死胡同。”他说。

在新千年之际，情况出现了转机，人类基因组草图和基因芯片的出现使得同时评估成千上万基因的表达成为可能。“就好像多年以来，我们一直都是在地面上研究候选基因如何相互作用，”Cobb解释道，“但是，可以这么说，基因芯片使我们能从两万英尺的高度俯瞰基因组，这使我们能模拟更广泛的相互作用。”

有了这些工具，科学家们能够寻找全新基因和疾病过程涉及的分子途径。癌症研究人员最早将这一技术应用于临床的探索，Suffredini说，这种探索鼓舞了危重症救护领域的同仁也作同样的尝试。因而，炎症研究已进入了发现基因的新阶段，并将这一领域向前推进了一大步。科学家现正研究 TNF- $\alpha$  基因启动子区域的变异（在与转录因子结合后，该区域启动蛋白质合成），这一变异可能与脓毒症有关。

尽管癌症基因组学研究激励过危重症的类似研究，但毕竟两个学科是在有着巨大差异研究背景下进行的。举例说，癌症病人通常对血液和组织取样有较充裕的时间，而且能在患者清醒的情况下知情并同意。此外，研究的病例数通常较大，他们在年龄、性别、治疗史和其他可影响基因组特征的参数上相当。反之，创伤和烧伤病人，常常是在匆忙中不省人事地被推进急诊室或监护病房的，那儿的首要任务是进行挽救生命的治疗。在这种极其忙乱的情况下，很难保证患者知情和同意，研究取样放在了次要地位。

而且，癌症和外伤所诱导的基因表达类型也完全不同，肿瘤通常产生的是相应小部分基因组

### 数据分析

据 Tompkins 说，“胶水基金”项目的研究者选择了序贯性来研究正常和异常炎症的过程，以五年为周期。用顺利恢复的外伤和烧伤病人的样品编纂的正常过程的基因组学和蛋白质组学数据，现正分析中。



**外伤最终反映了基因与环境的相互作用。环境卫生通常着眼于慢性暴露，但在这种情况下，我们研究的是更危险和激烈的环境伤害。**

—Stephen Chanock  
美国国立癌症研究所

同时，项目科学家开展了临床研究，增加了对取样于接受细菌内毒素静脉注射的健康志愿者白细胞全基因组表达的研究。这些研究诱发低水平的系统炎症，允许对样本的处理方案进行验证，使科学家们能在不同时间对基线和炎症基因组变化进行比较。病人不会受到实验的伤害，所有的反应在 24 小时内会恢复正常。

发表于 2005 年 8 月 31 日《自然》(Nature) 杂志上的结果表明炎症网络确实非常复杂，据研究作者之一 Moldawer 说，被激活的基因数在 3000~5000 个间，约占整个基因组的 20%。“研究揭示的变化程度远比我们期望的大得多，”他说，“我们预期在急性期能看到应激相关基因的正调控，然而令我们非常吃惊的是，变化的多样性比我们原来想像的大得多。”

其中许多变化，Moldawer 补充道，见之于参与线粒体能量转移、蛋白质合成和抗原识别—简单说，就是能使白细胞成为更有效抗微生物物质的生物学过程的基因中，他说。初步分析表明内

结局和不良炎症结局的研究可能取得有希望的结果。发表于 2005 年 3 月 29 日的《美国科学院院报》(Proceedings of the National Academy of Sciences) 上的该研究，取得了几项重要发现。首先住院治疗 and 反复取样对健康志愿者的基因表达影响不大。因此，住院治疗的经历（强制卧床休

息和保证营养摄入）不太可能影响基因表达，因而不会破坏特殊炎症结局信号特征的检测。其次，研究人员证明从严重外伤病人抽取的全血白细胞基因表达的差异可按伤害特异性分类。论文的合作者 Tompkins 说，总而言之，这些发现表明基因表达特征的研究可能会“唾手”得到高度相关的数据。

### 脓毒症相关基因与生物学的联系

与此同时，德国的研究人员发现基因群可以与脓毒症直接有关。这些研究者中有领导 Justus-Liebig 大学医学微生物学研究所的 Trinad Chakraborty。Chakraborty 正在完成一项与多发性外伤和肺炎病人脓毒症有关的基因组因子研究。该研究的意图是想更清楚地了解为什么相同外伤和疾病患者的结局会不同，研究涉及在伤后 14 天期间对外周血高达 20000 个基因的筛查。他们对 185 名患者进行了研究，发现 690 个基因的表达似乎与脓毒症有关。在今后的研究中，Chakraborty 计划在有脓毒症表型倾向的候选基因中进行单核苷酸多态性研究，找到基于蛋白的生物标记物用于诊断。

Chakraborty 补充道，运算上的挑战是只拦路虎。“在我们开始研究时，要得到足够耐用的基因芯片曾经是研究的瓶颈，”他说道，“现在，我们已经解决了这个问题，而生物信息学却成了瓶颈。”他和同事希望能将这 690 个基因减少到 25 个左右。“那样我们就可能研究出在缩小了的基因群中识别其特征的运算方法，以决定你是否有可能患脓毒症。”

美国科学家也将基因和脓毒症联系起来，并运用这些发现提出了脓毒症致命性的初步机制。



**炎症是由多种疾病引起的综合征，其研究为多学科合作提供了机会... 它是将所有问题联系起来的人类生物学研究的基本过程。**

—J. Perren Cobb  
华盛顿大学（圣路易斯市）

的局部稳定表达，而重伤引起的是巨大基因组学变化，影响到所有的组织，并且在短时间内迅速变化。在危重症救护取样中，时间因素极为重要，因为它们对于基因特征有重大影响；受伤 15 分钟后的样品与几个小时后的样品有着巨大差异。

毒素反应的程度和性质与实际病人所见到的反应有一定相似性。文章发表时，实际病例队列的临床数据仍在评估中。

尽管基因组数据的巨大运算量让人望而生畏，但另一项研究的最新证据表明区分良性炎症



在辛辛那提儿童医院医学中心的危重症救护医学部主任 Hector Wong 的领导下,科学家们应用基因芯片比较脓毒症幸存儿童和死亡儿童的基因特征。Chanock 说,儿童对脓毒症反应独特,表现在他们的死亡率比成年人低得多,大约为 10%,与之相比较,成年人死亡率达 30%。

Wong 怀疑儿童对脓毒症反应较佳的部分原因是因为他们较少同时患有多种疾病,如糖尿病和心脏病(这种疾病一定程度上随儿童肥胖症的上升而变化)。但他也怀疑使他们结局改善的重要生物学差异的根本原因是基因因素,尽管他还无法对此进行解释。

在 2005 年 4 月份 NIH 举行的讨论会上 Wong 报告的最新研究中,发现在未存活的儿童中,编码金属硫蛋白的六个基因出现高度表达,金属硫蛋白能和锌结合将之从血液中清除。这些发现使他提出这样一个假说:如果患严重脓毒症儿童的血液金属硫蛋白水平高,那么他们的血锌水平可能相应较低。“而事实上证明确实如此。”他说。

另一有趣的发现是一群依赖锌或者参与锌动态平衡的蛋白质基因出现表达模式改变的特征。“所以,有许多生物学原理需要探索,”Wong 说道,“我们不知道锌是如何或是否参与其中;从中得到的有关急性锌缺乏影响的信息很少。我发现脓毒症的基础是锌这点难以置信,不过……我想对此可以进行验证。”在对这一情况作了进一步分析后,Wong 补充道这就是高产出量研究的价值之所在:它们提出了科学家能够在实验室内进一步探索的生物学机制。



小进展: 儿童脓毒症的死亡率比成人低得多,所以可从儿童身体如何对付炎症中得到很多启发。

### 未来的需求

今天,基因组学研究的学风正在慢慢渗透到危重症和重伤救护的前沿中。但是建立这一学风并不容易,急诊室和重症监护病房环境在许多方面是对研究者的挑战。Tompkins 说,参加研究的知情同意和反复侵入性血液取样以评估基因组



期变化很难操作。理想情况下,新技术将减少所需取样量,缩短基因芯片分析所需时间(现在平均为 24 小时),并降低基因芯片的成本,达到容许临床常规使用的条件。

Chakraborty 接着说,基因芯片的操作平台也要适应样品降解的情况。他说,现在的状况是,在急诊室抽取的血液样品中的 RNA,较之严格控制的研究实验室环境中抽取样品中的 RNA 更容易降解。“这一平台需要变得更有效,”Chakraborty 说,“那样,如果 RNA 的质量下降 50% 或 70%,只要不达到 100%,我们仍然能够得到有意义的结果。”参加“胶水基金”项目的研究人员也在寻求制定标准化研究程序的指导方针,这将有助于减少样本降解的可能性。

炎症基因组学也提出了巨大的计算挑战。研究缺乏足够的统计学精确性一直是个问题,Cobb 说——急诊室和重症监护病房的病人数一般都少于理想人数,病人在外伤后住院,因而他们不能作为他们的自身对照。同时,经基因芯片实验确定的炎症特异基因名单中的基因需要整合到生物模型中

以解释它们的分子相互作用。不过,生物信息学研究和相关数据库正在不断发展以满足这些需求,不论在美国还是国外,研究组间的合作正在帮助推动科学向前发展。

Cobb 强调指出,尽管炎症研究有着广泛的公共卫生影响,但仍未达到像癌症或心脏病那样

我们需要更努力地让人们明白这项研究的重要性。

—J. Perren Cobb  
华盛顿大学(圣路易斯市)

受到公众关注的程度。“我们需要更努力地让人们明白这项研究的重要性。”他说。这意味着不仅要对其他科学家,而且也要对公众进行教育,他们的关注常常能促使研究得到资助。

与此同时,基因组方法使我们对炎症的了解在不断深入。科学家们对这一极其复杂现象的研究还刚刚开始,但也许在不远的将来,病人能从科学家的研究中得益。

—Charles W. Schmidt  
译自 EHP 113:A816–A821 (2005)

## 霉菌染色体

2005 年 12 月 22 日的《自然》(Nature)杂志上刊登了一条有关新近解密的染色体的消息: *Aspergillus fumigatus*, 一种最常见的能导致感染的霉菌,以及 *A. oryzae*, 一种非致病性霉菌,2000 年来他们均被用来制作日本米酒,日本豆面酱和酱油; *A. nidulans* 同时也被作为实验室霉菌体而被广泛使用。对这些霉菌染色体测序是一项国际性的工作,参与的人员来自三大洲。参与这个研究项目的科学家们希望通过他们的努力能够了解 *A. fumigatus* 的工作机制,从而能够有效地治疗重度哮喘、过敏和其他一些与这些真菌相关的疾病。

—Erin E. Dooley  
译自 EHP 114:A217 (2006)