

早发动脉粥样硬化——家族性高胆固醇血症的基础与临床研究

王 绿 娅

(首都医科大学附属北京安贞医院 北京市心肺血管疾病研究所动脉粥样硬化研究室, 北京市 100029)

冠心病是严重危害人类健康的重要疾病, 家族性高胆固醇血症 (FH) 是以血浆胆固醇水平大幅度增高、多部位皮肤肌腱黄色瘤和早发冠心病为特点的遗传代谢性疾病, 纯合子发生率为百万分之一, 儿童期即可因严重的冠心病而死亡; 杂合患者发生率为 1/500 在早发心肌梗死患者中占 5%, 我国大约有 2 600 000 例潜在患者, 20~40 岁间冠心病的危险性增加约 100 倍。给社会带来严重危害。目前我国缺乏适合于临床应用的基因筛查方法, 若按照临床诊断标准仅能预测出大约 1/4 的 FH 病例, 大多数患者直到中年才能得到确诊, 失去早期治疗机会。由于 FH 患者不能早期明确诊断, 在预防上较那些有心脏结构和功能异常的心脏病患者更加被动和消极。结合临床观察开展了 FH 汉族家系致病基因的研究, 有助于了解我国 FH 的分子基础, 深入探讨血浆 LDL 水平的调节机制。本研究从临床动脉粥样硬化 (As) 表现和分子生物学层面探讨脂代谢紊乱导致 As 机制, 对于 As 预防有重要意义。

1 FH 先证者的临床资料收集

1.1 血脂等临床资料的收集

本课题组共收集 30 例汉族 FH 先证者全部符合纯合 FH 的临床诊断标准, 其中男 15 例, 女 15 例, 年龄 1.5~50 岁, 血清总胆固醇 (TC) 10.1~31.2 mmol/L, 均有多部位黄色瘤和家族病史。将 FH 先证者 30 例及其家系核心家系成员共 130 人进行了外周血淋巴细胞 EB 病毒转化以利于长期保存, 同时保存血清和 DNA 样本, 为今后的研究提供了可靠的资源保证。本研究通过本单位伦理审查委员会批准并与全部先证者和家族成员签定知情同意书。

1.2 动脉粥样硬化的超声表现

采用彩色超声诊断仪对先证者进行颈动脉内膜中膜厚度 (MT)、主动脉、心脏瓣膜和冠状动脉血流储备检查 (CFVR)。结果发现, 18 例先证者颈总动脉 MT 有不同程度的增厚, 平均为 0.144 ± 0.013 cm, 6 例颈总动脉见斑块形

成, 直径狭窄率为 $44.67\% \pm 51.6\%$ 。主动脉瓣反流 10 例, 主动脉瓣膜狭窄 3 例, 二尖瓣反流 14 例, 主动脉瓣上狭窄 7 例。20 例汉族先证者进行负荷试验, 16 例 $CFVR \leq 3.0$ 其中 11 例 $CFVR \leq 2.0$ 仅 4 例 $CFVR > 3.0$ (正常参考值), 提示 FH 先证者的冠状动脉血流储备功能明显减低, 即冠状动脉弹力降低导致舒张功能降低。

2 FH 先证者基因突变分析

2.1 基因突变分析

PCR 扩增产物直接测序法对 30 例汉族先证者进行基因分析, 结果发现, 排除载脂蛋白 B100 基因的 3500 附近位点突变和隐性遗传 ARH 基因突变; 19 例先证者检测到 LDLR 基因突变, 其中 6 种为新突变 (C183Y、A459V、C210R、T383K、S565X 和 157deA); 6 例检测到 PCSK9 基因新突变 (R306S、A53V、G27C 和 1474V); 11 例先证者未检测到。

2.2 基因型分析

检测到上述基因突变的先证者中, LDLR 基因纯合突变 4 例, 复合杂合突变 4 例, 杂合突变 5 例; PCSK9 基因复合杂合突变 1 例, LDLR/PCSK9 双基因复合杂合突变 5 例。上述复合杂合的突变组合类型上未见报道, 可能是我国特有的突变类型。

3 突变体体外表达及其对细胞 LDLR 代谢功能的影响

3.1 新 LDLR 基因突变体与绿色荧光融合蛋白表达载体的构建

正常汉族人肝细胞中提取的 RNA 为模板, 构建含野生型 LDLR 全长和 GFP 绿色荧光报告蛋白融合表达的载体。采用定点诱变试剂盒对 6 个新突变体 (G157Fs、K204Fs、C210R、T383K、A459V 及 S565X) 进行测序验证。

3.2 新突变体对细胞 LDL 结合及内化能力的影响

将野生型及构建的 6 种新突变体质粒转染 HEK-293 细胞, 用 DiI-LDL 标记细胞流式细胞仪分别检测 LDLR 结合、内化 LDL 的能力。结果发现, 6 个 LDLR 基因新突变体导致细胞结合能力不同程度降低。

3.3 新 LDLR 基因突变体对细胞 LDLR 蛋白表达的影响

提取 HEK-293 细胞总蛋白, 以抗融合蛋白 GFP 标签的抗体, Western blotting 检测细胞 LDLR 表达。结果发现, LD-

[收稿日期] 2009-02-12 [修回日期] 2009-05-10

[基金项目] 国家自然科学基金 (30771986、30772356) 和北京市自然科学基金 (7052021、7062010、7092016) 资助

[作者简介] 王绿娅, 研究员, 博士研究生导师, 主要研究方向为血脂代谢异常与动脉粥样硬化, 为 Email: wangluya@126.com。

LR 基因突变导致编码蛋白改变不同, 终止突变导致 LDLR 的 565 位丝氨酸变为终止信号导致蛋白截短。

4 PCSK9 基因新突变体对细胞 LDLR 代谢功能的影响

4.1 野生型 PCSK9 全长与绿色荧光融合蛋白表达载体的构建

正常汉族人肝细胞中提取的 RNA 为模板, 逆转录合成 cDNA, 扩增 PCSK9 全长, 构建含野生型 LDLR 全长和 GFP 绿色荧光报告蛋白融合表达的载体方法同上。

4.2 PCSK9 基因突变体对细胞 LDL 结合及内化能力影响

将 PCSK9 野生型和新突变体转染细胞后流式法检测细胞对荧光标记 LDL 的结合与内吞能力的变化。结果发现, 对照组细胞经无脂血清诱导后 LDLR 表达增高, 平均荧光强度高; 野生型 PCSK9 组荧光强度降低; 阳性对照 F216R 组平均荧光降低最为明显, 与国外研究结果一致; R306S 突变体组 LDLR 表达量轻度降低, 提示新突变可以影响 LDLR 功能与野生型相似。

4.3 新 PCSK9 基因突变体对细胞 LDLR 蛋白表达的影响

PCSK9 基因突变体对细胞 LDLR 蛋白表达的影响不同; PCSK9 基因突变体转染细胞后提取总蛋白, 野生型 PCSK9 质粒导致 LDLR 成熟蛋白显著降低; 阳性对照 F216L 质粒后成熟 LDLR 条带消失, R306S 突变体导致成熟 LDLR 显著降低至 12%。提示新突变体 R306S 明显降低细胞 LDLR 成熟蛋白表达, 该突变通过此途径降低导致血清胆固醇增高, 是致病性突变。

5 FH 先证者细胞基因突变与临床表型的关系

本研究 30 例汉族临床确诊的纯合 FH 患者, 但经基因诊断 19 例发现 LDLR 基因突变和 PCSK9 基因突变由于不同类型基因突变对患者 LDLR 结构和功能影响不同, 所致患者同时残余的 LDLR 活性有较大的差别, 在临床表现为如血脂水平、As 的严重程度均存在较大差异, 存在 LDLR 基因终止

突变、第 4 外显子突变和 LDLR /PCSK9 双基因复合杂合突变的 FH 患者 As 临床表型较重, 其次为 LDLR 基因复合杂合患者, LDLR 基因杂合患者最轻。

6 讨论

血脂异常是体内脂质代谢紊乱的临床表现, 但其对健康的损害则主要在心、脑血管系统, 最终导致冠心病、缺血性脑卒中及全身 As 等重大疾病。本研究对 FH 先证者进行血管系统超声检查, 发现颈总动脉 MT 有不同程度的增厚和斑块形成, 主动脉瓣、二尖瓣关闭不全或主动脉瓣膜狭窄, 冠状动脉血流储备功能明显减低。基因检测发现新突变: LDLR 基因 6 种新突变 (C183Y、A459V、C210R、T383K、S565X 和 157delA); PCSK9 基因的 4 种点突变 (R306S、A53V、G27C 和 I474V); 证实我国也存在 LDLR 以外基因突变。新 LDLR 基因突变体引起细胞结合能力不同程度降低, 内化能力明显降低, 提示该 6 个突变可能是导致血清胆固醇增高的致病性突变。新 PCSK9 基因突变体对细胞 LDLR 功能的影响: R306S 突变体与野生型、阳性对照组均明显降低细胞 LDLR 成熟蛋白表达, 该突变可能通过此途径降低导致血清胆固醇增高, 是致病性突变。基因突变与临床表型关系分析显示, 存在 LDLR 基因第 4 外显子突变和 LDLR /PCSK9 双基因复合杂合突变的 FH 患者临床表型较重。

我国血脂异常患病率已达 18.6%, 总患病人数已达 1.6 亿, 其中 1/4 高胆固醇血症, 对人民健康形成严重和持续的威胁, 并给国民经济带来沉重负担。我们以血脂极度增高的患者为对象, 直接展示其 As 快速进展和胆固醇代谢缺陷的分子机制。通过我们相关研究, 不仅告诫医生要重视血脂异常的危害, 有助于推动国内相关研究的开展, 也教育广大的血脂异常患者积极控制血脂水平。将我们建立的技术方法应用到更广泛的高胆固醇血症患者, 评价其代谢功能和降脂治疗的效果, 为个体化治疗提供依据。

(此文编辑 文玉珊)

• 作者 • 读者 • 编者 •

消 息

本刊网上投稿系统正在试用阶段, 预计 9 月 1 日正式启动, 网域名 www.dnzzbj.net 欢迎各位专家、作者、读者登陆网上投稿系统。