



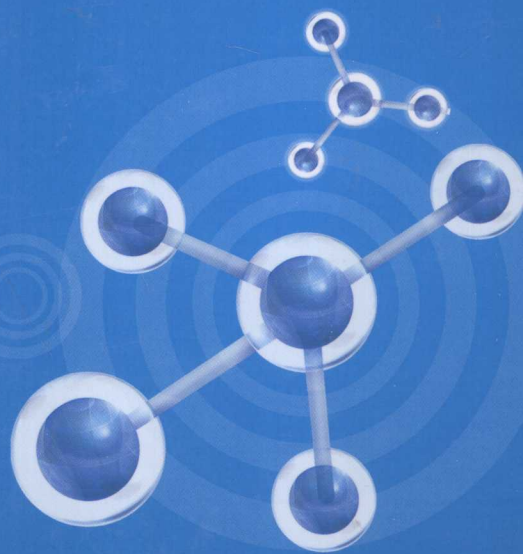
医药学院 610212043770

现代 分子生物学技术与哮喘

Modern Molecular Biological Technology and Asthma

主编 邱 晨

- 内容全面：涵盖了基因克隆、表观遗传、信号转导、细胞周期、蛋白质组学技术、干细胞技术、芯片技术、纳米技术和基因治疗这些现代生物技术在哮喘中的应用，使读者在短时间内对该领域有一个全面、客观的印象；
- 循序渐进：从基础理论入手，内容由浅入深，逐步拓宽；
- 内容新颖：反映学科最新进展；
- 注重拓展应用：总结当前可用分子生物技术的同时，详细阐述各个研究的方针策略。



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE



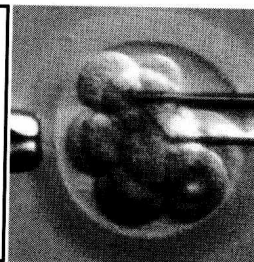
医药学院 610212043770



现代

分子生物学技术与哮喘

Modern Molecular Biological Technology and Asthma



主 编 邱 晨

副主编 史 菲 鄭孟洁

编 者 (按姓氏笔画排序)

王凌伟 方爱平 刘雯雯 杜 娟

李 娜 张 婷 张宏美 陈丹丹

徐笑洋 郭 琦 高伟良 彭文科



人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

现代分子生物学技术与哮喘/邱晨主编. —北京:
人民卫生出版社, 2012. 9

ISBN 978-7-117-16162-6

I. ①现… II. ①邱… III. ①分子生物学-应用-哮喘-诊疗 IV. ①R562.2②Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 149651 号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

现代分子生物学技术与哮喘

主 编: 邱 晨

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 北京汇林印务有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 19 插页: 2

字 数: 462 千字

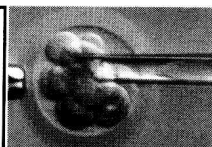
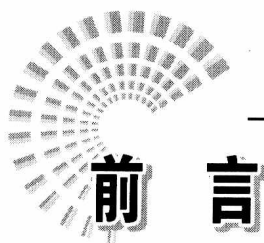
版 次: 2012 年 9 月第 1 版 2012 年 9 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-16162-6/R · 16163

定 价: 55.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)



支气管哮喘(简称哮喘)是一种以可逆性支气管痉挛和气道高反应性为特点的慢性气道炎症。资料显示,全世界约有3亿多的人患有哮喘,而且近年来哮喘患病率和死亡率还呈逐年上升趋势,我国哮喘发病率虽然低于西方国家,但是死亡率居于世界之首。明确哮喘发病机制、确定合适的治疗方法已成为一个无法回避的历史命题。医学的每一个新进展都与当时研究技术的支持密不可分,哮喘的最终攻克也不可避免地与现代科学技术关联起来。现代分子生物学技术是21世纪最具代表性的科学技术之一,它为攻克哮喘打开了一扇希望的窗户。

现代分子生物学及技术是一门从分子水平研究生命现象、生命本质、生命活动及其规律的科学。它与医学相结合后,在核酸、蛋白质等大分子水平研究人体在正常和疾病状态下生命活动及其规律。它主要研究人体生物大分子和大分子体系的结构、功能、相互作用规律及其同疾病发生发展的关系。哮喘作为一种多基因遗传性疾病,发病受到遗传和环境双重因素的影响,核酸和蛋白质水平都发生了显著的变化。因此现代分子生物学技术完全可能在哮喘的诊断、治疗和预防上发挥重要的作用。事实上,近年来将现代分子生物学技术运用到哮喘诊治上的研究逐渐增多,内容涉及基因组学、蛋白质组学、细胞信号转导、细胞周期和基因芯片等等。但总体发展相对不平衡,水平参差不齐,而且内容分散,广大科研工作者和临床医生迫切需要一本能系统阐述现代分子生物学技术在哮喘领域应用的参考书。

本书的编委均为活跃在临床科研一线的中青年学者,皆具有较丰富的分子生物学技术应用经验。编委们在广泛吸取国内外相关文献、著作精华的基础上,结合自己的工作体会,编撰了《现代分子生物学技术与哮喘》一书。在编写过程中,力求突出以下特点:①内容全面。全书共11章,涵盖了基因克隆、表观遗传、信号转导、细胞周期、蛋白质组学技术、干细胞技术、芯片技术、纳米技术和基因治疗这些现代生物技术在哮喘中的应用,使读者在短时间内对该领域有一个全面、客观的印象;②从基础理论入手,由浅入深,逐步拓宽。各章节前后呼应,各有重点,从不同角度反映现代分子生物学技术在哮喘中的应用;③内容新颖。引用的参考文献以近年文献为主,反映学科最新进展;④注重拓展应用。总结当前可用分子生物技术的同时,详细阐述各个研究的方针策略,使读者可以举一反三,将其思路应用到哮喘以外的其他学科其他疾病的研究中,更快地进入该领域的最新前沿,提高研究水平。

本书包含了大量前人的工作成果,参阅了大量国内外文献,包括相关书籍和杂志,在此



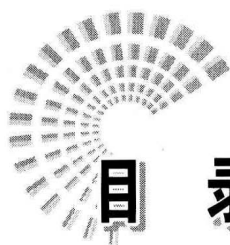
前 言 _____

谨向各位文献著作的原作者致以真诚的感谢;人民卫生出版社在该书的策划、组织、编写过程中给予了十分具体的指导,这种为作者、读者无私奉献的精神始终鼓励和鞭策着我们,在此致以最诚挚的谢意。

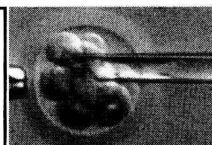
在本书编写过程中,尽管我们努力追踪学科最新发展,并希望尽可能详细地阐述清楚,但由于该领域发展十分迅速,且编者水平有限,书中难免挂一漏万,存在不足之处,殷切期望各位专家和同道们批评指正。

邱 晨

2012年7月20日于暨南大学第二临床医学院



目 录

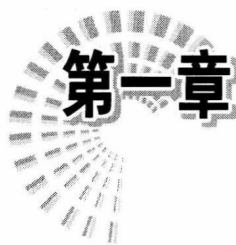


第一章 绪论	1
第一节 对哮喘认识的发展简史	1
第二节 分子生物学发展简史	4
第三节 哮喘与分子生物学新进展	5
第二章 哮喘的发病机制	7
第一节 哮喘的遗传学机制	7
第二节 哮喘的炎症及免疫机制	11
第三节 哮喘的其他相关机制	17
第四节 哮喘的诊断及治疗近况	22
第五节 哮喘的生物学研究前景	29
第三章 基因克隆与哮喘	37
第一节 基因克隆的概念及常见研究方法	37
第二节 哮喘发病相关基因的异常变异	46
第三节 哮喘相关基因的克隆策略	54
第四节 基因克隆在哮喘研究中的应用及前景	59
第四章 表观遗传与哮喘	63
第一节 表观遗传的概念及常见研究方法	63
第二节 哮喘发病过程中表观遗传的异常改变	74
第三节 哮喘的表观遗传学策略	76
第四节 表观遗传在哮喘研究中的应用及前景	92
第五章 信号转导与哮喘	98
第一节 信号转导的概念及常见研究方法	98
第二节 哮喘发病过程中信号转导的异常改变	113
第三节 哮喘的信号转导研究策略	117
第四节 信号转导研究在哮喘研究中的应用及前景	119
第六章 细胞周期与哮喘	124

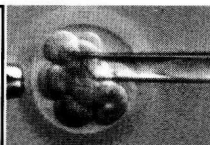


目 录

第一节	细胞周期的概念及常见研究方法	124
第二节	哮喘发病过程中细胞周期的异常改变	135
第三节	哮喘的细胞周期研究策略	142
第四节	细胞周期在哮喘研究中的应用及前景	150
第七章	蛋白质组学技术与哮喘	155
第一节	蛋白质组学技术概念及常见研究方法	155
第二节	哮喘发病过程中蛋白表达的异常改变	165
第三节	哮喘的蛋白质组学研究策略	171
第四节	蛋白质组学在哮喘研究中的应用及前景	182
第八章	干细胞技术与哮喘	189
第一节	干细胞技术的概念及常见研究方法	189
第二节	哮喘发病过程中干细胞的异常改变	202
第三节	哮喘的干细胞研究策略	209
第四节	干细胞研究在哮喘研究中的应用及前景	213
第九章	芯片技术与哮喘	219
第一节	芯片技术的概念	219
第二节	哮喘的芯片技术使用策略	231
第三节	芯片技术在哮喘研究中的应用及前景	234
第十章	纳米技术与哮喘	241
第一节	纳米技术的概念	241
第二节	哮喘的纳米技术使用策略	251
第三节	纳米技术在哮喘研究中的应用及前景	260
第十一章	基因治疗与哮喘	266
第一节	基因治疗的概念及常见研究方法	266
第二节	哮喘的基因治疗策略	271
第三节	基因治疗在哮喘研究中的应用及前景	280
附录	英中文对照表	289



绪论



支气管哮喘(简称哮喘)是一种以可逆性支气管痉挛和气道高反应性为特点的气道慢性炎症。早在两千多年前,祖国医学和西方医学都开始认识和治疗该病,19世纪以来,人们对哮喘的发病机制和治疗措施的认识得到了长足的发展,哮喘的诊治有了质的飞跃。令人惊讶的是,近年来哮喘患病率和死亡率仍然呈逐年上升趋势,虽然其中的原因仍不清楚,但越来越多的证据表明,哮喘仍是现代人类面临的一个医学难题。分子生物学是19世纪后逐渐兴起的一门新兴生命科学,近年来它蓬勃发展,展现强大的生命力,它的飞速发展为实现治愈哮喘带来了希望。

第一节 对哮喘认识的发展简史

哮喘是一种古老的疾病,它的英文单词为“asthma”,源自古希腊文“aazein”,含义为“急促的呼吸”,在公元前450年,希波克拉底第一个用这个单词来描述这种病况,而我国的《黄帝内经》中也有“上气”、“喘鸣”、“喘呼”等类似于哮喘的记载。从两千多年前起到现代,人类对哮喘疾病本质的认识和治疗史可简要地分为四个阶段。

一、远古至19世纪末——哮喘认识的感性阶段

由于哮喘发作时主要表现为呼吸困难、喘鸣和咳嗽,这些症状在其他疾病中也经常见到。人们长期认为它们是一种临床表现,而没有将其单独地归为一种疾病。第一次将哮喘的临床表现与解剖所见联系起来,并做了系统研究的是意大利学者 Morgagni。1761年,他提出由于多种原因可以导致哮喘,而气管堵塞和支气管(肺部)分泌物的积聚是其中一种重要的病因。之后,学术界又相继提出了神经性哮喘和痉挛性哮喘的概念。1850年,学者 Gerhard 提出了“特异性的致病原因导致了哮喘的发生”的论断。1864年 Salter 报道了哮喘的发生与接触刺激性物体紧密相关,例如花粉症患者便经常发生哮喘。到19世纪末,学术界已经将花粉症和哮喘归为一类疾病,区别在于病变发生的部位不同,从此哮喘逐渐被归为一类特殊的疾病。

这个阶段里,人们对哮喘的认识尚处于感性阶段,有关哮喘基础和临床研究并无重大进展,相应的治疗也非常简单,没有针对性。有记载的治疗手段包括:17世纪印度人使用吸入曼陀罗叶烟雾治疗哮喘;18世纪使用浸有硝石溶液的纸燃烧后产生的烟雾吸入治疗哮喘;19世纪澳大利亚人曾用一种大戟属热带植物治哮喘;还曾有人利用曼陀罗叶制成哮喘粉供直接吸入来治疗哮喘病,其他方法包括喝咖啡和饮茶等,祖国医学很早就采用了麻黄治疗哮



喘,后来又有吸食洋金花治疗哮喘的记载,这些方法虽然有一定效果,但均没有取得理想临床疗效。

二、20 世纪初提出哮喘是一种变态反应性疾病

20 世纪初随着免疫学研究的进展,尤其是变态反应概念的提出大大促进了哮喘的研究发展。1910 年 Meltzer 提出哮喘的发作是一种变态反应,花粉、动物的排泄物、放射物等可以诱发变态反应发生,从而发生哮喘。人们将这一类与过敏原诱发有关的哮喘称为外源性哮喘,于是提出了通过躲避过敏原、脱离过敏环境和抗过敏疗法来治疗哮喘。但后来人们发现这些治疗方法并不能解决所有的哮喘发作。一些中老年患者在体质虚弱、营养不良、内分泌改变、精神因素或其他因素影响的基础上,呼吸道受到细菌或病毒的侵袭,出现气道反应性增高,哮喘常年性发作,这种情况下发生的哮喘不能用变态反应进行解释,称为内源性哮喘。内源性哮喘可进一步细分为感染性哮喘、月经性哮喘、妊娠性哮喘以及阿司匹林性哮喘。由于内源性哮喘的发病机制至今尚不明确,所以治疗效果不理想,预后也较差。

三、20 世纪 40 年代提出气道高反应性是哮喘的重要特征

随着纤维支气管镜在临床上推广应用,人们发现哮喘发作时均有支气管平滑肌痉挛的特点,又提出了哮喘是一种气道高反应性疾病的观点。即哮喘患者在小剂量激发剂的诱发下,产生严重的支气管痉挛反应,而这种支气管痉挛是源于气道平滑肌的功能异常(反复阵发性、可逆性的痉挛收缩)。 β 受体激动剂、阿托品和氨茶碱可扩张支气管,缓解哮喘症状。

但人们又发现气道高反应性并不能解释所有哮喘患者的发病机制,例如早期哮喘病例或最新诊断为职业性哮喘的患者,他们暴露在大量过敏原中,出现的症状可提示为哮喘,但对于大剂量的激发剂却只产生较小的反应而无气道高反应性;而临床上一部分非哮喘的健康人却表现有气道高反应性。因此气道高反应性不能完全解释哮喘的发病机制。

四、20 世纪 50 年代提出哮喘是多种细胞参与的慢性气道炎症

自 20 世纪 50 年代开始,大量哮喘死亡患者肺组织病理学研究表明气道普遍存在慢性炎症改变。80 年代以来随着纤维支气管镜的广泛应用,医生可以直接从哮喘患者的气道搜集组织活检标本和支气管肺泡灌洗液进行相关分析。这些研究发现,即使是轻症或无症状的哮喘患者,这些标本都提示炎症细胞(如肥大细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、B 细胞等)、炎症介质或细胞因子(IL-4、IL-5、IL-13 和 IgE 等)大量增加。此外,在慢性哮喘患者气道壁组织中,还可发现气道壁组织反复增生而发生气道重塑。气道炎性损伤-修复-再损伤-再修复是气道炎症慢性化的结果。

针对哮喘的气道炎症学说,哮喘患者治疗上采取以抗炎为主,在 20 世纪 50 年代末期随着糖皮质激素广泛应用,曾使得哮喘发病率一度明显下降,但糖皮质激素的滥用引起了许多毒副作用甚至终生损害而使人们改变了激素的摄入方法,吸入糖皮质激素逐渐成为治疗哮喘的重要药物,以辅舒酮、必可酮为代表的高脂溶性、局部抗炎活性强的吸入糖皮质激素等



抗炎药物被广泛应用,开创了哮喘抗炎治疗的新时代,使哮喘疾病防治进入了一个崭新时代。除此之外,1965年 Altounyan 等从埃及植物阿密苣的种子发现提取了色甘酸钠,成为第一种预防哮喘病的药物,为哮喘病预防和治疗提供了一种重要抗炎药物。近年来,白三烯受体拮抗剂通过对抗白三烯,抑制支气管平滑肌收缩、血管通透性增高、炎症细胞活化等一系列炎症反应,为激素抗炎作用提供辅助支持,提高后者的疗效,尤其适用于阿司匹林过敏性哮喘和运动性哮喘的治疗。

1994年,在世界卫生组织(World Health Organization, WHO)指导下,美国国立心肺和血液研究所(National Heart, Lung and Blood Institute, NHLBI)首次举行了由17个国家数十位哮喘专家参与的全球哮喘病治疗和预防工作会议,制定了《全球哮喘病防治倡议》(Global Initiative for Asthma, GINA),GINA包括《全球哮喘治疗和预防策略——NHLBI/WHO会议工作报告》、《哮喘病的治疗和预防——公共卫生官员和卫生保健人员使用指南》、《哮喘病防治指南袖珍手册》、《关于哮喘:你和你的家庭能做些什么》等一系列文件,为世界各国专家、卫生官员、基层医生和哮喘病患者提供了参考。后面的7年间WHO和NHLBI又数次对GINA中的四个相关文件内容进行了修订。使得哮喘的治疗取得了显著的进步,大多数哮喘按GINA推荐的治疗方案进行规范治疗都可以获得良好的临床控制。

但人们发现,即使近年来努力推广GINA治疗方案,哮喘的发病率和死亡率仍逐年升高,部分中重度患者仍难以获得良好的临床控制;此外,目前以激素为主的治疗方案,并不能根治哮喘,而且长期应用激素,存在一定的副作用。这些情况都表明哮喘的研究亟待深入进行。

目前已发现体液中大量细胞因子和炎症介质(IL-4、IL-5、IL-13和IgE等)和多种免疫活性细胞或炎症细胞(肥大细胞、B细胞、嗜酸性粒细胞和Th2细胞等)以不同形式参与了哮喘的发病过程。人们基于这些发现,开发出一些新的单克隆抗体药物,希望能起到治疗哮喘的作用。其中奥马珠单抗是通过特异性地阻断IgE结合位点,使IgE不能再与肥大细胞、B细胞、单核巨噬细胞、嗜酸性粒细胞等炎症细胞表面的IgE受体结合,从而阻断IgE介导的炎症细胞活化和释放炎症介质。随机、双盲的“INNOVATE”临床研究即证实了奥马珠单抗治疗难治性哮喘的有效性,它已被GINA推荐用于哮喘的第5步治疗,但其他种类的单抗实验结果仍不尽如人意。

1. 抗IL-5单抗^[1,2] 截至目前,抗IL-5单抗(美泊珠单抗)治疗哮喘的临床研究报道大部分都不理想,临床研究终点结果或者为阴性,或者虽然能减少难治性哮喘患者的急性加重、减少嗜酸性粒细胞,但是不能改善肺功能、生活质量评分及气道反应性。

2. IL-4受体 α (IL-4R α)拮抗剂 IL-4R α 是IL-4和IL-13受体的共同信号传导亚基。AMG317是IL-4R α 特异性的单克隆抗体,当两者结合后,可以阻断IL-4和IL-13的作用。Corren等学者对AMG317进行相关研究^[3],但是结果显示,在哮喘控制问卷、1秒用力呼气容积、呼气峰流速和哮喘生活质量评分等项目中,治疗组和安慰剂组比较,两者无明显差异。

3. 抗TNF- α 单抗 从2005年开始陆续有多项TNF- α 阻断剂治疗哮喘的临床研究报道,初步研究结果证实该阻滞剂对哮喘有一定的治疗作用,但这些研究都存在研究例数少,疗效难以确定的不足。此外,在Wenzel等学者的研究中,还发现TNF- α 治疗组的严重感染和肿瘤发生率都要高于安慰剂组。该药物若要真的运用于临床,还需要解决其药物安全性的问题。



Wenzel 等学者还研究了抗 TNF- α 单抗伐利木单抗治疗哮喘的有效性和安全性^[4]。但结果却显示肺功能指标和急性加重率都无明显改善。

分析以上结果不理想的原因,可能与入选病例少、疗程较短、终点指标选择不当等有关。此外,也不能排除这些因素受到其他一些未知因素的调节,这些未知因素才是哮喘发病机制中的核心因素。面对逐年升高的哮喘病发病率和死亡率,迫切需要我们利用生命科学的最新成果来攻克哮喘。分子生物学是生命科学的领先学科,它与其他学科广泛交叉与渗透将大力促进相关学科的发展,分子生物学技术在哮喘研究中的应用也必然成为热点。

第二节 分子生物学发展简史

分子生物学是研究核酸、蛋白质等所有生物大分子的形态、结构特征及功能、相互关系的科学,分子生物学从萌芽到迅猛发展可分为三个阶段^[5]。

一、准备和酝酿阶段(19 世纪后期到 20 世纪 50 年代初)

19 世纪末 Buchner 兄弟在利用酵母无细胞提取液催化糖发酵为乙醇的过程中,发现了酶的存在。20 世纪 20 ~ 40 年代人类提纯出多种酶,如尿素酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、细胞色素 C 等,经研究证实其本质为蛋白质。之后的研究发现生命的许多基本现象(物质代谢、能量代谢、消化、呼吸、运动等)都与酶和蛋白质相关,并可用提纯的酶或蛋白质在体外实验中重复出来。

与此同时,人类对核酸功能和结构两方面的认识也进一步深入,1944 年 Avery 证实肺炎球菌转化因子是 DNA,1952 年 Hershey 和 Chase 用 DNA^{35S} 和 ³²P 标记 T2 噬菌体的蛋白质和核酸,感染大肠杆菌的实验进一步证实核酸为遗传物质。

在该阶段,分子生物学实现了对生命本质认识上的两点重大突破:①确定了蛋白质是生命的主要基础物质;②确定了生物遗传的物质基础是 DNA。

二、现代分子生物学的建立和发展阶段(20 世纪 50 年代初到 70 年代初)

1953 年 Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构模型是现代分子生物学诞生的里程碑,这一阶段迎来了分子生物学的黄金时代。在此期间,建立了遗传信息传递中心法则,深入了对蛋白质结构与功能的认识;发现了 DNA 双螺旋结构;确立了核酸作为信息分子的结构基础;提出了碱基配对是核酸复制、遗传信息传递的基本方式;从而最后确定了核酸是遗传的物质基础,为认识核酸与蛋白质的关系及其在生命中的作用打下了最重要的基础。

三、初步认识生命本质并开始改造生命的深入发展阶段(20 世纪 70 年代后至今)

这阶段分子生物学的研究内容包括:①核酸(基因)的分子生物学:核酸的结构与功能、基因组、基因信息的传递及调控、基因操作、基因诊断与基因治疗等;②蛋白质的分子生物学



(包括酶与生物催化剂)、蛋白质的结构与功能、生物大分子间的相互作用;③细胞信号转导的分子生物学:研究细胞间通信和细胞内信号转导的分子机制;④细胞周期及其调控的分子机制、癌基因与抑癌基因和肽类生长因子等;⑤分子生物学技术:主要包括分子杂交技术、链反应技术、基因工程与蛋白质工程等。其中,基因组学研究、基因表达的调控研究及细胞信号转导研究是当前分子生物学研究的前沿。

这个阶段的划分是以基因工程技术的出现作为标志。其间的重大成就包括:重组 DNA 技术的建立和发展;基因组研究的发展;单克隆抗体及基因工程抗体的建立和发展;基因表达调控机制;细胞信号转导机制。

第三节 哮喘与分子生物学新进展

随着分子生物学的发展,它被广泛地应用到各个学科中,人们试图从分子生物学的角度,来解决各个学科中尚未解决的难题和新出现的问题,哮喘也不例外。《今日生物世界》(Bioworld Today)杂志曾报道,在巴西和南非之间的南大西洋之中的 Tristan da Cunha 火山岛上共有居民 300 人,其中 30% 的居民患有哮喘病,20% 的居民属于哮喘病易感者。由于该岛长期与世隔绝,岛上居民皆是近亲婚配,因此该岛的全体居民是一个患病人数多、隔离度高的大家系。美国西夸纳治疗公司(Sequana Therapeutics Inc)通过收集这些岛民的血样和基因组 DNA 样品,找到与哮喘病连锁的基因位点,这个位点的范围约占人基因组的 0.1% (即 3 厘摩的遗传距离)。这一“哮喘易感基因位点”的发现已被用于开发基因相关的药品和诊断产品,有着难以估量的科学价值和商业价值。这个例子生动地说明了分子生物学在哮喘研究中的重要地位。而事实上,近十余年来,哮喘与基因组学的关系、基因信息的传递及调控在哮喘中的应用、哮喘与蛋白质组学的关系、哮喘中信号转导通路的特点等研究大量涌现,更说明了分子生物学在哮喘研究中具有的深厚潜力和强大吸引力。

以往哮喘发病研究主要集中在免疫学机制方面,其经典的 Th1/Th2 失衡学说主要通过 ELISA、细胞培养、细胞病理等技术手段来检测气道内细胞数目及炎症介质表达的变化情况,而未能对哮喘病变发生的源头进行深入探寻。近年来,随着分子生物学新技术的广泛应用,有关哮喘的遗传学基因研究、基因靶点的干预、信号转导机制的介导、蛋白水平的调控等深层面机制研究都势如破竹地开展起来。现已证实,哮喘是一种由遗传因素和环境因素共同作用所致的多基因遗传性疾病,其发病涉及多基因调控、表观遗传性调控、信号转导调控、信号周期调控、蛋白表达谱异常、肺干细胞异常分化等诸多机制。这些分子生物学新进展揭开了哮喘的神秘面纱,也为人们从全新视角系统认识哮喘带来了曙光。

随着哮喘各发病环节的逐一阐明,其诊断及治疗研究也出现了划时代的变革。基因克隆、基因打靶、蛋白质组学、干细胞修复、芯片技术及纳米药物等分子生物学技术已开始广泛应用于哮喘基础研究,并使得哮喘的早期诊断、特异性干预治疗有望成为现实。目前,针对已知哮喘靶点的许多生物药物正在开发研究之中,包括重组的人 IgG₁ 单克隆抗体、人源化的抗 IL-5 单克隆抗体、可溶性 IL-4 受体 α 拮抗剂、可溶性 IL-5 受体拮抗剂、TNF- α 阻断剂、抗 GATA-3、抗 CD28、抗 CD80、抗 CD86、抗 CTLA-4 等。然而,这些药物在哮喘症状控制、安全性、疗效维持时间等方面尚存在一定缺陷,难以在短期内直接应用于临床。因此,研究、开发出更为安全、有效的药物及疗法仍是今后哮喘治疗的艰巨任务。



展望未来,分子生物新技术的飞速发展将为既往哮喘治疗中的难点解开枷锁,并为这一领域开辟新的方法和思路。从近期来看,要进一步开发副作用更少、作用更强的抗炎药物等;从远期来看,应将目光从局部气道炎症逐渐转向基因编码、表观遗传调控、蛋白谱表达等分子生物学层面,从环境、遗传、免疫多角度来调整哮喘患者体内的遗传基因异常及免疫功能缺陷,进而对信号转导网络、细胞周期进程及细胞因子网络进行精细调控,这也是21世纪哮喘治疗的主要发展方向。

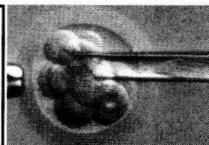
当今的科学技术日新月异,作为一名科研工作者若不能将新的科学技术应用于自身的专业,一个临床医生若不能对这些最新进展有相应的了解,则难以跟上时代发展的脚步。期望本书能给科研工作者及临床医生有所帮助和启发,并能为您的临床科研提供新的思路。

主要参考文献

- [1] Nair P, Pizzichini MM, Kjarsgaard M, et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *N Engl J Med*, 2009, 360:985-993.
- [2] Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med*, 2009, 360:973-984.
- [3] Corren J, Busse W, Meltzer EO, et al. A Randomized, Controlled, Phase 2 Study of AMG 317, an IL-4R α Antagonist, in Patients with Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181:788-796.
- [4] Wenzel SE, Barnes PJ, Bleeker ER, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of tumor necrosis factor- α blockade in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179:549-558.
- [5] 朱玉贤, 李毅, 郑晓峰. 现代分子生物学. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2009.



哮喘的发病机制



第一节 哮喘的遗传学机制

多基因遗传病是遗传信息通过两对以上致病基因的累加效应所致的遗传性疾病,这些基因之间无明显的显隐性区别,其遗传效应亦多受环境因素影响。遗传流行病学调查证实^[1],哮喘也是一种多基因遗传性疾病,具有遗传异质性,是遗传因素与环境因素(过敏原反复接触、感染、冷空气、运动及烟草烟雾等)相互作用的结果。随着分子生物学技术的迅速发展,人们发现遗传因素在哮喘的发病中扮演着越来越重要的作用。国内外学者采用不同的遗传学研究方法对哮喘的发病机制、易感基因、基因多态性等进行了大量相关性研究,从更高的研究水平和途径揭开了哮喘病的遗传特征,进而对哮喘病的发病机制有了更深的了解。

据统计,哮喘的遗传度约为 70% ~ 80%,如儿童的父母中有一方罹患哮喘,其哮喘发病率则与其他儿童的 2 ~ 5 倍。这些遗传性特征不仅是导致哮喘发病的高危因素,还决定着哮喘的治疗效果,如编码 β 肾上腺素受体的基因多态性与不同 β_2 激动剂的疗效相关。此外,尚有部分基因与糖皮质激素的反应性及白细胞应答的修饰相关。哮喘的发病不仅与多个致病基因的染色体序列改变有关,还与表观遗传学改变密切相关,这些多基因遗传学机制直接影响着哮喘的发病及预后情况。

一、哮喘相关基因

1997 年,哮喘遗传学协作研究组将哮喘候选基因粗略定位于 5p15、5q23-31、6p23、11p15、12q14-24.2、13q21.3、14q11.2-13、17p11.1-17q11.2、19q1.3、21q21 和 2q33。近几年随着分子遗传学、分子生物学技术的飞速发展,一些新的哮喘易感基因如 IL-18R1、IL-33、SMAD3、ORMDL3、HLA-DQ、IL2RB 等基因陆续被发现,迄今为止已有哮喘易感基因近 200 种,其定位主要涉及 10 多条染色体^[2,3]。目前人类染色体上与哮喘相关的部分基因如图 2-1-1 所示。

由于哮喘发病自身特有的复杂性,加上各研究间种族差异、病例筛选标准及研究方法差别等因素的影响,多数研究结果的一致性、重复性较差,尚需进行深入研究来确认上述基因与哮喘的关系。

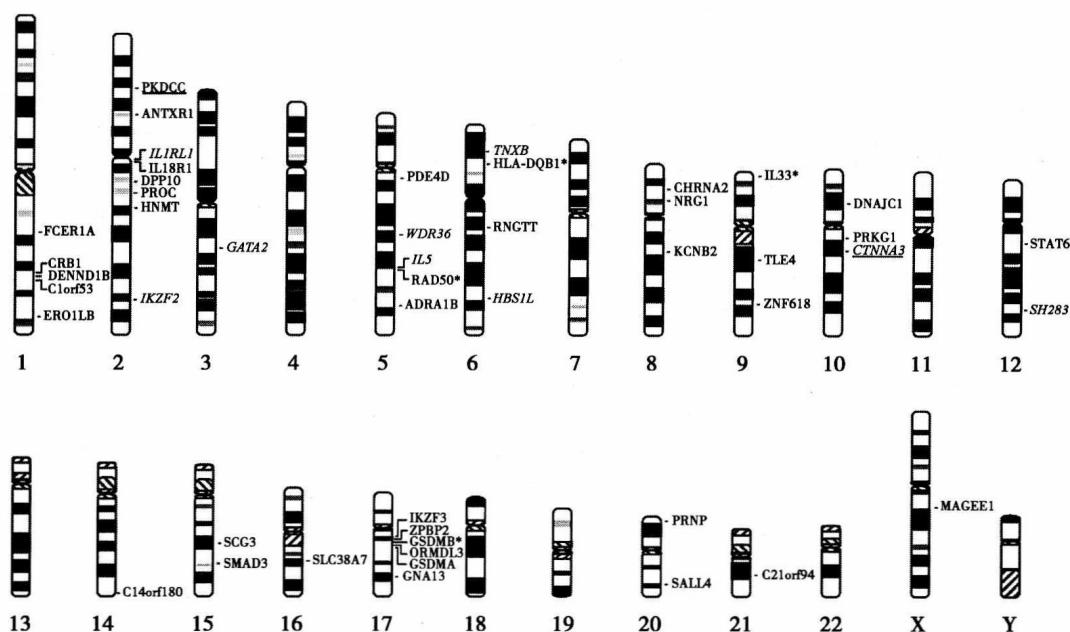


图 2-1-1 全基因组关联分析分析人类染色体上哮喘相关基因图

(引自: Akhabir L, et al. *Respirology*, 2011, 16(3):396-406)

二、多基因调控与哮喘的关系

(一) IgE 基因调控与哮喘

当易感人群受到抗原刺激后能产生持续高 IgE 血症而诱发哮喘,故血清 IgE 升高是哮喘重要的危险因素,其水平高低与哮喘变应性的严重程度呈正相关,即便在非过敏性哮喘患者体内也是如此。目前,许多研究支持 IgE 遗传模式为常染色体隐性遗传,调控血清总 IgE 水平的基因定位研究主要集中在染色体 11q 和 5q 区域。其中,11q 区域主要包括编码 *fcγRIβ* 链的等位基因,而 5q 区域则编码多种细胞因子基因,如 IL-3、5、6、9、单核-巨噬细胞集落刺激因子等。这些基因对 IgE 合成具有直接或间接的调控作用,并直接影响着哮喘的气道炎症进程。此外,一些细胞因子基因如 IL-13、IL-4RA、Eotaxin 等基因间的相互作用也会显著影响哮喘患者血清中的总 IgE 水平^[5,6]。

现已发现,哮喘患者体内 IgE 生成的遗传调控至少有以下两种方式:①非特异性 IgE 反应,体内 IgE 的基础水平受 IgE 调节基因所控制;②特异性 IgE 反应,由特定的变应原引起。双生子研究表明,不同变应原对应的遗传率也存在一定差异,但其具体基因调控机制尚不明确。由于母体 IgE 不能通过胎盘,脐血中 IgE 水平高的儿童日后发生过敏性哮喘的概率也显著增加,这也表明人体 IgE 的遗传调控与哮喘发病密切相关。

(二) 气道高反应性 (airway hyperresponsiveness, AHR) 的基因调控与哮喘

AHR 是哮喘的一个重要特征,也是该病发生、发展的主要病因。动物实验结果提示,哮喘与非哮喘离体平滑肌的反应性并无显著差异,这提示哮喘发作过程中的 AHR 并非由平滑肌细胞自身差异所致。AHR 与染色体上 5q 上的遗传标记物 D5S436 及 D5S658 间存在连锁关系,且 AHR 易感基因就位于染色体 5q 上 IgE 调节基因的附近,故 AHR 的基因调控与哮喘



喘血清中总 IgE 水平密切相关。此外,染色体 11q13 上高亲和性 IgE 受体(FcγR1B)基因第 5 内含子上微卫星 DNA 标记的高度多态性与 AHR 间存在连锁关系;而 AHR 基因与 11q 上 D11S527 的 168 等位基因也可能存在相关性,但这些均有待进一步的研究结果来证实。

三、基因多态性与哮喘的关系

(一) 细胞因子基因多态性与哮喘

细胞因子是在哮喘发病过程中各炎症细胞间重要的信息传递者,这些细胞因子间的相互作用可促进变应原诱导的支气管高反应性、嗜酸性粒细胞增多、上皮细胞损伤及杯状细胞增生,并直接影响着炎症反应的严重程度和持续时间,而细胞因子的基因多态性则与哮喘复杂多变的遗传状况密切相关。如 IL-4 基因是一个多功能基因,定位于染色体 5q31-33 区域,其第 589 位点的碱基突变可能参与支气管哮喘的发病过程,并与体内血清总 IgE 水平升高、一秒用力呼气量降低及哮喘发作密切相关,但与特异性 IgE 水平无显著相关性^[7];此外,IL-4RA 与 IL-13 间的相互作用尚能显著增加个体的哮喘易感性。IL-13 基因多态性与哮喘发作的严重程度及患病率间亦存在密切关系,其中,IL-13+2044GA(rs20541)与哮喘体内总 IgE 升高、嗜酸性粒细胞增多及迟发型哮喘发作相关,而 IL-13-1112CT(rs1800925)虽与重度哮喘呈负相关,但对哮喘儿童而言,其应用吸入激素治疗时可能会增加重症哮喘的发生率。

(二) 细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1) 基因多态性与哮喘

ICAM-1 属于黏附分子免疫球蛋白超家族,该基因定位于染色体 19q13.3-13.2,共有 3 个常见的多态性位点,分别为:Lys29Met、Arg241Gly 和 Lys469Glu。现已证实 ICAM-1 基因多态性与哮喘等多种炎症性疾病有关^[8],并与哮喘儿童易感性密切相关;以北京地区 40 所小学抽取的 293 例哮喘患儿和 668 例健康儿童为对照进行研究,再以问卷调查环境影响因素,采集口腔黏膜细胞提取 DNA,分析 ICAM-1 基因多态性,用 Logistic 回归分析不同基因型与儿童哮喘患病易感性的关系。结果发现^[9],ICAM-1 Lys469Glu 位点变异基因型(AG 或 GG)和杂合基因型 AG 均明显降低患哮喘的危险性($p < 0.05$);病例组变异的 G 等位基因频率(28.5%)亦显著小于对照组(33.0%);在被动吸烟的样本人群中,携带 AG 或 GG 基因型的个体患哮喘的危险性是携带 AA 基因型的个体的 0.73 倍(95% CI 为 0.52 ~ 1.02, $p = 0.066$)。因此,ICAM-1 Lys469Glu 的变异与儿童哮喘易感性有关联,并能显著降低罹患哮喘的风险。

(三) β_2 肾上腺素能受体(β_2 -adrenergic receptor, β_2 ADR) 多态性与哮喘

β_2 ADR 相关功能失调在哮喘发病过程中的作用已备受关注^[10]。 β_2 ADR 基因位于染色体 5q 区域,其编码产物存在 Arg/Gly16 及 Gln/Glu27 变异的多态性。现已证实,激素依赖患者 75% 第 16 氨基酸为甘氨酸,而非精氨酸的纯合子个体;Arg/Gly16 处基因变异与哮喘的激素依赖性增高及夜间发作性哮喘相关; β_2 ADR 的 Ban2 I 内切酶 RFLP 可能与哮喘发作及哮喘患者对 β_2 激动剂的反应有密切关系。此外,Gln27 型 β_2 ADR 基因多态性虽与血清总 IgE 水平相关,但 Arg/Gly16 及 Gln/Glu27 变异的多态性与哮喘发作及特异性相关的证据不足。

(四) 血管紧张素转换酶(ACE) 基因多态性与哮喘

ACE 是血管紧张素(AT)系统的关键酶、高度表达于肺部,主要存在以下两个方面的作



用:①促使 AT-I 转换为 AT-Ⅱ,引起气道平滑肌及肺血管收缩、加重微血管渗漏及气道内炎症反应、促使内皮素等有强烈收缩作用的炎性介质作用于气道平滑肌;②导致缓激肽、速激肽及 P 物质等哮喘炎性介质失活。

ACE 的编码基因位于常染色体 17q23 区域,基因长度约为 21kD,其基因多态性主要由 -287bpDNA 片段在第 16 内含子中存在或丢失所引起^[11]。ACE 等位基因如含有此片段则称为 I 型等位基因,如不含此片段则称为 D 型等位基因,并由此产生了以下三种不同的基因型:①I/I 型——两条 17 号染色体均插入该片段;②D/D 型——两条 17 号染色体均缺失此片段;③I/D 型——17 号染色体中的一条插入该片段而另一条染色体缺失该片段。大量研究表明,ACE 基因多态性与血浆及细胞内的 ACE 水平密切相关,其 ACE 水平以 D/D 型最高,故携带 D/D 基因型的个体可因循环中高水平 ACE 而诱发肺内 AT-Ⅱ产生增多,后者可直接作用于气道平滑肌而参与哮喘的发病。临床研究也证实,携带 D/D 基因型或 D 等位基因的人群具有较高的哮喘易感性。因此,ACE 基因 I/D 多态性的检测对哮喘早期诊断和预防可能有一定的帮助。然而,在不同种族、地区人群中,ACE 基因多态性的分布趋势存在着显著差异,故 ACE 基因多态性尚不能成为哮喘发病的筛查指标。

(五) HLA 基因多态性与哮喘

HLA-Ⅱ类抗原(包括 DP、DQ 和 DR)在抗原呈递过程中起关键作用,并对气道免疫反应的特异性有重要影响。在人类第 6 号染色体 HLA 的 DR 区域存在着对某种特异性抗原起反应的免疫反应基因,该基因的遗传方式为常染色体显性遗传,而这些 HLA-Ⅱ类基因的多态性则与哮喘发病密切相关。研究表明^[12],HLA DRB1 * 1501、DQB1 * 0602 及 DPB1 * 0501 基因是甲苯二异氰酸酯(toluene diisocyanate,TDI)诱发哮喘的危险基因型,而 HLA DQA1 * 0501/DQB1 * 0601 基因型则是 TDI 诱发哮喘的保护性基因型;还有研究提示,HLA DQA1 * 0104 和 DQB1 * 0201 基因型与哮喘特异性密切相关,而 HLA DQA1 * 0301 和 DQB1 * 0301 基因型则能提供保护性作用,降低哮喘发生率,故上述 HLA 基因型在哮喘发病中的具体作用尚有待确认。

HLA-Ⅱ类基因多态性虽与哮喘发病相关,但不同作者对不同种族研究的结果却不尽相同,可能存在以下原因:①不同种族间的遗传背景不同,疾病的免疫遗传学特征也存在一定差异;②不同哮喘患者的过敏原各不相同,机体所产生的免疫应答类型也存在一定差异,故将特异性个体联合分析可能出现假阳性或假阴性的结果;③HLA 2DQ 基因位于 HLA 2DR 基因和 HLA 2DP 基因之间,存在连锁不平衡,亦会影响群体与家系结果的一致性。

四、哮喘的其他基因调控机制

(一) 原癌基因的调控与哮喘

c-fos 是一种原癌基因,参与细胞增殖周期和分化过程中多个基因的转录过程,并在哮喘气道内高表达。哮喘发作时,气道内多种炎性介质释放,如组胺、细胞因子、二十烷类等可通过磷酸肌醇系统激活蛋白激酶 C、促进蛋白磷酸化,同时激活 *c-fos* 基因,使之表达 *c-fos* 蛋白,并参与了哮喘气道炎症的调控。

(二) 蛋白酶抑制物(α_1 -PI)基因与哮喘

α_1 -PI 对血小板活性因子合成及释放过程有重要的调节功能,而血小板活性因子则是引