

中国

疾病相关基因与基因诊断

ZHONGGUO JIBING XIANGGUAN JIYIN
YU JIYIN ZHENDUAN
主编 余元勋 何光远 余国斌

在二十一世纪，我们将迎接分子医学。此书将使中国疾病基因水平的诊治达到更高水平。

中国

疾病相关基因与基因诊断

ZHONGGUO JIBING XIANGGUAN JIYIN YU JIYIN ZHENDUAN

爱玲路平
王胡李顾春娟

余国斌
马旭文霖梅军
祝文霖梅军
朱国华施

何光远
鲍远程
陈秀珍生萍
吴京妮娟
刘温晓娟
李

余元勋
黄邦良
邱维勤来立
唐久骏鹏
张范吴

主编：余元勋
副主编：黄邦良
编委：邱维勤
书：唐久骏
校：张范吴



安徽科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

中国疾病相关基因与基因诊断/余元勋,何光远,余国斌主编. —合肥:安徽科学技术出版社,2007.3

ISBN 978-7-5337-3754-2

I. 中… II. ①余…②何…③余… III. 疾病-关系-基因-医学遗传学-研究-中国 IV. Q78 R394

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 026262 号

中国疾病相关基因与基因诊断 余元勋 何光远 余国斌 主编

出 版 人: 朱智润

策划编辑: 杨小玲 责任编辑: 吴萍芝

封面设计: 王 艳

出版发行: 安徽科学技术出版社(合肥市跃进路 1 号, 邮编: 230063)

电 话: (0551)2833431

网 址: www.ahstp.com.cn

E-mail: yougoubu@sina.com

经 销: 新华书店

排 版: 安徽事达科技贸易有限公司

印 刷: 合肥远东印务有限公司

开 本: 787×1092 1/16

印 张: 77.25

字 数: 1 879 千

版 次: 2007 年 3 月第 1 版 2007 年 3 月第 1 次印刷

定 价: 190.00 元

(本书如有印装质量问题, 影响阅读, 请向本社市场营销部调换)

積極推進生殖保
健工作切实提高优
服務水平

蒋正華題



前 言

20世纪人类对疾病的临床表现和发病规律等已经从整体水平、细胞水平上升到分子水平。21世纪临床医学将进入分子医学时代,分子生物学及相关技术将向医学基础学科和临床各科不断渗透。尤其在全世界科学家联合完成人类基因组计划并进入后基因组计划以后,人类已开始对一两万种单基因病和多基因病相关基因及其突变,进行更深入的研究,同时各种基因诊断技术得到迅速发展,从而有助于阐明更多前所未知的致病分子机制,认识更深刻的疾病本质,对疾病进行分子水平诊断、分型和诊治,并运用基因芯片工程、蛋白质工程等生物信息技术和高新技术,包括基因分离、鉴定、重组,推进医学发展。为了反映国内外这方面的研究成果和进展,我们组织了国内许多知名专家和科研、医疗一线的学术带头人,收集整理汇编了2006年6月截止的国内外主要研究成果和进展,并结合自己的研究和所积累的丰富实践经验编成本书。本书资料新、图表多、内容丰富、讲解详实准确、基因诊断方法较多,实用性和可操作性很强,在相关理论的综合系统化上达到国内先进水平。本书可作为我国临床各科、妇幼保健、计划生育及相关生命科学等方面工作者,医药院校教师、研究生和从事分子医学研究和检验工作人员的有益参考书。为我国临床、妇幼、计生一线实验室开展基因诊断、产前诊断提供参考,有利于选择性终止患儿妊娠,减少病残儿出生,提高我国出生人口素质,做好优生优育工作。本书也可被推荐作为培养我国新一代青年医学专家及医务工作者继续教育的教科书。

我们在编写出版本书过程中曾受到全国人大常委会蒋正华副委员长的关心和指导,得到政府相关部门的帮助,也得到所在单位领导及许多国内知名医学专家和出版界领导的指点,在此我们特表谢意。由于分子医学发展迅速,新内容不断出现,我们的编写难免有不足之处,恳请前辈、同仁和广大读者不吝指正,以便以后再版时修订。

余元勋

2007年1月23日于合肥

目 录

第1章 心血管系统疾病

1 动脉粥样硬化	1
2 缺血性脑血管病	12
3 缺血性脑卒中	14
4 家族性高脂血症	18
5 共济失调毛细血管扩张症	35
6 先天性心脏病(CHD)	43
7 QT间期延长综合征(LQTS)及某些心律失常	54
8 心手综合征	60
9 家族性卵磷脂胆固醇脂酰转移酶缺陷	62
10 原发性高血压	64
11 Bloom综合征与遗传性出血性毛细血管扩张症	95

第2章 血液疾病

1 血友病A(HA)	99
2 血红蛋白病	126
3 红细胞酶病	171
4 铁粒幼细胞贫血	182
5 Fanconi贫血	184
6 血栓形成病	188

第3章 眼、耳疾病

1 视网膜色素变性	195
2 眼及皮肤白化病	200
3 听力异常	206
4 先天性视网膜劈裂症	213
5 高度近视	215
6 青光眼	220
7 非综合征性听力减退	225
8 综合征性听力减退(SHI)	231
9 先天性红绿色盲	237
10 视网膜母细胞瘤	239

第4章 呼吸系统疾病

- 1 支气管哮喘 251
- 2 肺泡表面活性物质缺乏 261
- 3 慢性阻塞性肺部疾病 269

第5章 免疫性疾病

- 1 自身免疫性疾病 274
- 2 HLA复合物与相关疾病 282
- 3 遗传性免疫缺陷 287

第6章 皮肤疾病

- 1 表皮基因突变及营养不良性大疱性表皮松解症 295
- 2 结节性硬化症 302
- 3 单纯型大疱表皮松解症 304
- 4 交界型大疱表皮松解症 310
- 5 着色性干皮病(XP) 315
- 6 无汗/少汗性外胚层发育不良 325
- 7 高同型半胱氨酸血症 328
- 8 银屑病 331

第7章 泌尿系统疾病

- 1 成人多囊肾 345
- 2 阵发性睡眠性血红蛋白尿 357
- 3 肾源性尿崩症 363
- 4 Alport综合征 367
- 5 先天性尿道下裂 371
- 6 肾小球肾炎与肾病 372
- 7 狼疮性肾炎 376

第8章 骨骼和结缔组织疾病

- 1 囊性纤维化 384
- 2 软骨发育不全 394
- 3 骨质疏松症 400
- 4 非综合征型并指(趾)畸形 407
- 5 原发性颅缝早闭症 410
- 6 多发性骨骼发育不良 415
- 7 遗传性多发性外生骨疣 419

第9章 代谢性疾病

- 1 苯丙酮尿症 424
- 2 肥胖症 444
- 3 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症 454
- 4 糖原贮积症 465

5 黏多糖贮积症	475
6 胰腺的外分泌功能障碍	492
7 小肠和大肠功能紊乱	499
8 肝脏疾病(免疫性、药物性、酒精性、多囊性)	507
9 其他肝病	517
第10章 各种综合征与先天畸形	
1 脆性X综合征	534
2 马方综合征(MS、MFS1)	542
3 Prader-Willi和Angelman综合征	545
4 格雷格头、多指(趾)、并指(趾)综合征与肢体异常	556
5 阿-斯综合征	562
6 9p三体综合征	568
7 沃登伯格综合征(听觉-色素综合征)	570
8 口面裂(唇裂与腭裂)	574
9 Beckwith-Wiedemann综合征	578
10 成纤维细胞生长因子受体相关的骨骼异常	583
11 唐氏综合征	592
第11章 神经精神疾病	
1 肝豆状核变性(HLD)	603
2 精神分裂症	627
3 杜氏肌营养不良(DMD)	638
4 帕金森病	671
5 神经管缺陷	677
6 亨廷顿舞蹈病(HD)	688
7 线粒体遗传病	696
8 恶性高热病和中心轴空病	711
9 肢带型肌营养不良	716
10 遗传性感觉与自主神经病	718
11 遗传性淀粉样变性神经病	719
12 遗传性运动和感觉神经病	722
13 遗传性共济失调	734
14 家族性热性惊厥	744
15 常染色体显性遗传肢带型肌营养不良	745
16 Machado-Joseph病	748
17 遗传性痉挛截瘫	750
18 重症肌无力症	754
19 面肩肱型肌营养不良症	757
20 Leigh综合征	760

21 Tourette综合征	763
22 阿尔茨海默病	766
23 遗传性神经疾病的分子生物学	782
24 猫叫综合征	797
25 强直性肌营养不良症	799
26 Rett综合征	803
第12章 内分泌系统疾病	
1 睾丸疾病	807
2 糖尿病	837
3 多发性内分泌瘤2型	865
4 肾上腺疾病	875
5 垂体的功能与肿瘤形成	890
6 卵巢疾病	899
7 自身免疫性甲状腺疾病	914
8 多结节性甲状腺肿	916
9 甲状腺其他疾病	918
10 男子不育症	936
11 生长激素缺乏性疾病	944
12 甲状旁腺疾病	953
13 先天性肾上腺增生	958
14 21-羟化酶缺乏症	974
第13章 肿瘤	
1 相关基因、基因诊断与肿瘤	979
2 胃癌	1037
3 淋巴瘤	1045
4 白血病及血液系统其他恶性肿瘤	1056
5 肝癌	1083
6 肺癌	1093
7 家族性多发性息肉和直、结肠癌	1105
8 婴幼儿梭形细胞性肿瘤	1118
9 胶质瘤	1123
10 甲状腺髓样癌	1129
11 肾脏肿瘤	1133
12 多发性神经纤维瘤病1型及2型	1143
13 乳腺癌	1150
第14章 生殖系统疾病	
1 性反转综合征和性分化异常	1164
2 卵巢功能衰竭与早衰	1203
3 生殖器官发育异常	1210

第 1 章

心血管系统疾病

1 动脉粥样硬化

1.1 概述

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是由遗传因素与环境因素相互作用的结果。与遗传因素有关的高脂血症、高血压、糖尿病等可直接引起血管壁细胞损伤,成为 AS 发生的原因。因此,上述疾病与冠心病的发生密切相关。此外,血管壁细胞接受致 AS 因子作用后,可发生内皮细胞的脱落。中膜平滑肌细胞(smooth muscle cell,SMC)在血浆中的生长调节因子(GRM)作用下,发生迁移、表型变化。SMC 细胞内自身基因调节发生改变,SMC 大量合成细胞外基质,可进一步促进 AS 的发生。研究显示,在相同种属的不同个体,SMC 对外源性 GRM 反应强度是不一致的。SMC 在增生过程中,细胞内一系列的基因表达可发生变化。提示 AS 的发生,在一定程度上具有多基因遗传倾向。

目前,对于 AS 基因诊断的研究集中在两方面:一是通过对高脂血症、高血压、糖尿病的基因诊断间接地作 AS 的基因诊断,这主要依赖于这些疾病之间的相关性;二是对 AS 斑块组织的直接基因表达及突变或多态性检测,主要见于动物实验及死后人体主动脉标本。最近对斑块的蛋白质组学研究进展很快,已发现铁蛋白轻链表达显著增加,并通过影响氧自由基和血管壁内脂质氧化,加速斑块的形成。另外,固醇反应元件结合蛋白、PZF 等可通过血管壁上的胆固醇特异性受体 CK 表达增加,而对斑块形成产生重要作用。

1.2 遗传与血管壁细胞生物学行为

已知 AS 及血管成形术后再狭窄的发生发展,与血管内皮受损后,中膜的 SMC 直接受内源性、外源性 GRM 作用引起的过度增生密切相关。引起 SMC 增生的 GRM 见表 1-1。一些研究资料显示,SMC 对 GRM 作用反应强度具有一定的遗传学基础。

1.2.1 内皮素受体

内皮素(ET)可由内皮细胞和 SMC 产生,它不仅具有强大的缩血管作用,而且是血管壁细胞受损后引起 SMC 增生的重要致丝裂原,在 AS 发生发展中起主要作用。研究表明,自发性高血压大鼠(SHR)常伴发 AS 和心肌肥大。SHR 大鼠在接受 ET 刺激后,血管 SMC 上 ET 受体及其 mRNA 数目比正常血压鼠(WKY)SMC 受体及其 mRNA 数目明显多(>75%)。这可能是 SHR 的 SMC 对

ET高反应性而易发高血压及伴发 AS、心肌肥大的原因之一。

表 1-1 引起 SMC 增生的 GRM

类型	GRM	类型	GRM
血管活性物质	内皮素	细胞因子	IL-1
	血管紧张素 II		IL-Ira
	5-羟色胺		IL-6
	凝血酶		IL-9
	儿茶酚胺		MCSF
	前列腺素 I ₂		GMCSF
生长因子	PGGR	凋亡因子	FAS(CD95)
	SDGF	细胞黏附分子	MCP-1
	bFGF		VCAM-1
	IGF		ICAM-1
	VEGF	多胺	腐胺
	TGF- β		精胺
	MDGF		精脒
	PDGF		

1.2.2 血管紧张素 II 受体

血管紧张素 II (Ang II) 在与其相应的受体(ATR)结合后,可调节血管壁张力,并可引起 SMC 异常增殖。对来自 SHR 和 WKY 鼠的动脉 SMC ATR mRNA 的分析显示,SHR ATR mRNA 含量明显比 WKY ATR mRNA 含量低,反映了遗传背景在决定 ATR 调节方面起重要作用;此外,SHR 鼠 SMC 在接受 Ang II 刺激后,细胞增殖及 DNA 合成速度明显大于 WKY 鼠的 SMC。基因连锁分析显示 ATR 与高血压呈共分离现象。而在人类高血压病人中亦发现有 ATR 基因多态性变化。

1.2.3 Gq 蛋白基因

Gq 蛋白在异源三聚体 G 蛋白(heterotrimeric G protein)中是唯一能激活肌醇磷脂途径引起细胞增殖的一种 G 蛋白(GTP-binding protein)。体内许多血管活性多肽如内皮素、血管紧张素 II、血管加压素、凝血酶等在与其相应的受体结合后均可与 G 蛋白结合,并通过 G α 亚基的 G α GDP 与 G α GTP 的“分子开关”形式,将上述 GRM 的促生长信号转入胞内,激活肌醇磷脂通路,引起一系列蛋白激酶磷酸化,并调控细胞核中与细胞增殖有关的许多基因的超常表达。用内皮素(ET)刺激体外培养的 SD 大鼠(正常血压)SMC,可明显引起 SMC DNA 合成、细胞核抗原(PCNA)表达增加及 SMC 增殖。然而,在 ET 刺激时,加用反义 G 寡聚脱氧核苷酸,则可拮抗(阻断)ET 的作用,说明 G 蛋白介导了 ET 作用。此外,在动脉内膜增厚组织中,G 蛋白表达量是正常组织的 5 倍。遗传学研究表明,SHR 和 WKY 鼠 SMC 接受刺激后,SMC 中 G 蛋白的水平变化在两者存在明显的差异。SHR SMC 在静息状态下 G α mRNA 水平低于 WKY SMC,在小牛血清(含 ET)刺激后 40 min,SHR SMC G 蛋白水平明显高于 WKY 鼠(约 253%),是基础状态的 409%。提示 SMC 对于促增殖因子的高反应与遗传有关,这种高反应由 G α 高表达引起。但到目前为止,尚未见 SMC G α 多态性或突变研究的报道。

1.2.4 结缔组织生长因子

结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)是一种新近发现的细胞因子,具有多样的生物学活性,在硬皮病、动脉粥样硬化、系统性硬化症、器官纤维化和一些良、恶性肿瘤等疾病中,CTGF均有不同程度的表达,与疾病的发生、发展有着密切的关系。许多学者通过体内、体外实验,对CTGF进行了大量的研究,对其多种生物学活性有了一定程度的认识。

1)CTGF分类和结构特点:CTGF属于以其命名的家族,该家族成员在氨基酸序列上有着高度的同源性,目前包括了CTGF(人)、Fisp12(鼠)、Cef10(鸡)、Cyr61(鼠)、Nov(鸡)等成员。1991年,Bradham等首先在人类脐静脉内皮细胞(HUVEC)的条件培养基中发现了人类的CTGF(hCTGF)。它是一种富含半胱氨酸的分泌性多肽,是一种单基因生长因子。其蛋白质结构中包括:①N末端的胰岛素样生长因子结合区,结构为Gly-Cys-Gly-Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys(Xaa为任何种类氨基酸);②vW(von Willebrand)因子C型重复区,其功能可能与蛋白质的复杂构成以及寡聚反应有关;③血小板反应素(thrombospondin,TSP)1型重复区,CTGF可能通过此区结构与可溶性的或者基质的大分子相结合,尤其是硫化聚糖;④富含半胱氨酸的C末端结合区,一共有4个主要结构区域。hCTGF共含有349个氨基酸残基,分子量为38 000。其基因定位于染色体6q23.1,结构与其他家族成员相似,均包含5个外显子和4个内含子,其中外显子与蛋白质的解码、表达有关。它的起始位点为AGT,其3'末端包含了3个ATTAA位点,3'末端非编码区(3'-UTR)其长度通常较长(>1 000碱基)。目前认为其序列中存在着多种调控元件,包括负性和正性调控元件,已经证实的有cis支持的负性调控元件等,而这些调控元件可能与CTGF基因表达有差异有关。

2)CTGF的生物学特性:CTGF基因属于即刻早期生长反应性基因,定位于许多细胞的细胞核中。与家族其他成员不同的是,CTGF mRNA的半衰期很短(10~15 min),因而CTGF mRNA在细胞核内具有较高的水平,而在胞质中却相对呈低水平状态。关于CTGF受体已经有多个报道。Nishida等在人类软骨细胞株HCS-2/8中首先发现了CTGF的特殊受体。Segarini等研究证实低密度脂蛋白受体相关蛋白/ α_2 巨球蛋白受体(LRP)也是CTGF的受体。CTGF可以与其相应的受体结合,从而发挥其生物学活性,认为其与调控细胞增殖、分化、凋亡、黏附、胚胎发育以及伤口愈合等有关。在成人结缔组织、心、脑、肾、肺、肝、肌肉、肾脏、胰腺以及胎盘等皆可以发现CTGF的表达,尤以肾脏表达水平最高。同时,多个研究发现除了正常生理表达之外,在人类一些疾病中,如硬皮病、动脉粥样硬化、系统性硬化症和一些良、恶性肿瘤等,CTGF表达水平均出现了不同程度的改变,在疾病的病理过程中扮演着重要的角色。

3)CTGF与相关疾病:

(1)肿瘤:已经发现CTGF在多种肿瘤中有着不同程度的表达或表达缺失。CTGF在肿瘤病理机制中的作用,目前尚不完全清楚。Shakunaga等通过免疫组化法研究了34例软骨瘤组织标本中CTGF以及增殖细胞核抗原(PCNA)的表达情况,发现CTGF在内生软骨瘤细胞中有70.1%的表达阳性率;而在软骨瘤细胞中,总表达阳性率为61.1%;病理分级1级的瘤细胞表达阳性率为84.0%,2级为53.7%,3级为26.8%,认为CTGF的表达与肿瘤的病理分级有着密切的关系。随着肿瘤的进展,CTGF的表达呈现下降趋势,与常用肿瘤细胞增殖的指标PCNA在瘤细胞中的表达水平呈负相关关系。同时研究也显示高表达CTGF的患者病死率低于低表达组,认为CTGF可以作为一个评估肿瘤病理分级和临床预后的重要指标。Hishikawa等在对人乳腺癌MCF-7细胞株的研究中证实,CTGF能够诱导MCF-7细胞的凋亡。他们发现采用牛血清培养基持续培养的

MCF-7 细胞株 CTGF mRNA 的表达缺失;而重组的 CTGF 蛋白能够剂量依赖性地诱导 MCF-7 细胞凋亡,并且减少抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,但其对 Bax 却没有影响;同时 CTGF 反义寡核苷酸也能够剂量依赖性抑制 TGF- β_1 所诱导的 MCF-7 细胞的凋亡。这些证据都充分证明了 CTGF 具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用。而 Hirasaki 研究了肝细胞肝癌中 CTGF 家族 Nov、Cyr61 和 CTGF 等基因的表达,发现肝癌组织中 Nov 和 CTGF 的表达明显高于癌周组织,在转移性肝癌中也有同样的趋势。但肿瘤的临床病理参数在基因阳性表达组和阴性表达组之间却没有差异。认为 Nov 和 CTGF 可能与肝脏肿瘤的发生、发展有一定的关系。另有多项研究证实,CTGF 表达与儿童纤维母细胞瘤、肺癌、脑膜瘤、结肠癌、胰腺癌以及血液肿瘤等存在相关性。

(2)动脉粥样硬化:在动脉粥样硬化疾病的研究中,单克隆学说逐渐为人们所重视。认为每一个病灶都来源于一个单一平滑肌细胞的增殖,在多种细胞因子的调节下平滑肌细胞不断增殖并吞噬了脂质,最终导致粥样硬化发生,因而认为平滑肌细胞的增殖在粥样硬化疾病发生、发展中起着关键的作用。1997 年,Oemar 等首先发现动脉粥样硬化患者血管内 CTGF mRNA 的表达水平很高,而在正常人血管内却几乎检测不到。同时还发现转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、血小板衍生生长因子(PDGF)均能够特异地诱导血管平滑肌细胞内 CTGF 的表达。因此认为 CTGF 的高表达在动脉粥样硬化病理过程中充当了一个重要的角色。Hishikawa 等通过人类主动脉血管平滑肌细胞(HASCs)体外细胞培养,在一个巨细胞病毒启动子的推动下带全长度的 CTGF cDNA 转染入 HASCs,采用 Northern 印迹和 Western 印迹法分别观察 CTGF mRNA 和其蛋白水平的表达情况,结果发现在转染 48 h 后,两者均出现了高表达。并发现这种高表达能够显著抑制由 PDGF 诱导的 HASCs 增殖,同时也显著增加了 HASCs 的凋亡,而这两方面的作用对于动脉粥样硬化疾病中硬化斑块的稳定性以及损伤的形成有着重要的意义。最近的研究进一步显示,CTGF 诱导血管平滑肌细胞凋亡的作用可能是通过激活 caspase-3 的活性来实现的。发现使用重组的 CTGF 能够明显减弱血管平滑肌细胞的生长能力,增加其凋亡,同时也能增加 caspase-3 的活性。若在培养基中加入 CTGF 抗体和 caspase-3 抑制剂能够显著阻断 CTGF 所诱导的凋亡作用。

(3)系统性硬化症:1995 年,Igarashi 等研究了一些细胞因子如 TGF- β_1 、CTGF 等在系统性硬化症(SSc)病理机制中的作用。其通过地高辛标记探针的原位杂交实验观察了 CTGF 基因在 SSc 患者活检组织中的分布。发现在硬化性损伤中的成纤维细胞中存在强的 CTGF mRNA 表达,尤其在真皮深层,而正常对照组却没有表达。因而认为 CTGF 在 SSc 病理机制中起着重要的作用,而 TGF- β_1 则能够刺激成纤维细胞表达 CTGF 以及促进皮肤硬化形成。Sato 等采用 ELISA 法测定了 SSc 患者血清中 CTGF 水平,发现其水平明显高于系统性红斑狼疮(SLE)、原发性多发性肌炎(PM)和原发性皮炎(DM)等其他一些结缔组织疾病。同时也发现在 SSc 患者中,弥漫型患者的血清 CTGF 水平明显高于局限型患者的水平。认为 CTGF 与 SSc 纤维化的发展有着密切的关系,SSc 患者血清 CTGF 水平出现升高,且与皮肤硬化以及肺纤维化的严重程度呈正相关。对于 SSc 病理机制中基质合成的调控目前已成为研究的热点,认为过多基质的合成是导致 SSc 病理学改变的主要因素。而有研究表明,CTGF 能够调控基质成分的产生和积聚,其不仅有对成纤维细胞趋化和分裂的作用,而且可以刺激至少两种细胞外基质成分(I 型胶原和纤维连接蛋白)的合成,同时还具有上调纤维连接蛋白受体和整合素 $\alpha_5\beta_1$ mRNA 的表达的作用。

(4)器官纤维化疾病:CTGF 被视为 TGF- β_1 的下游反应元件,具有促进成纤维细胞的增殖以及参与细胞外基质(ECM)产生、积聚等功能。Tamatani 等采用 ELISA 法在胆道闭锁患者血清中检

测出的 CTGF 的含量明显高于正常人。此外组织学的研究也显示在人纤维化的肝组织中,CTGF mRNA 的水平均明显高于正常对照组,且 CTGF 水平的增高与肝纤维化进展程度相互平行,这些都证实了 CTGF 自始至终参与了纤维化的过程,与肝纤维化的发生、发展密切相关。多个研究证实肝脏星状细胞是 CTGF 的主要来源细胞。同时 Sedlacek 等在大鼠胆汁性肝纤维化模型中的研究发现,在肝脏中除了激活的星状细胞可以分泌 CTGF 以外,增殖的胆管内皮细胞也是主要来源细胞。同样,Lasky 等通过体外培养,发现人和鼠的肺实质细胞均能够表达 CTGF,培养基中加入 TGF- β_1 能够特异性地诱导 CTGF 的表达增加 2 倍以上,从而发挥其促进细胞分裂、胶原沉积等一系列生物学活性,与肺纤维化的发生、发展关系密切。研究表明 CTGF 在心脏纤维化、胰腺纤维化以及肾脏纤维化等多种疾病中,均出现了高表达,且与病理上纤维化的程度成正相关,提示其对于纤维化疾病的诊断和治疗具有重要的价值。同时 CTGF 表现出与其上游控件 TGF- β_1 不同的生物学活性,其作用更加局限于纤维化的发生,在纤维化疾患中起着关键的作用,为我们今后的抗纤维化治疗提供了一个新的靶点。

(5)肾脏疾病:对糖尿病性肾小球性硬化症,Rise 等通过正常大鼠肾小球系膜细胞(MC)体外培养和 db/db 糖尿病小鼠动物模型,研究了 CTGF 在糖尿病性肾小球性硬化症中的表达与调控。发现无外界刺激的 MC 表达的 CTGF 呈低水平状态,而当重组 CTGF 作用于 MC 时则能使 MC 分泌的纤维连接蛋白、I 型胶原以及 IV 型胶原均显著增加。提示 CTGF 的上调在系膜基质积聚以及肾小球硬化症进展病理机制中是一个重要的因素。同时发现随着葡萄糖浓度的逐渐升高,TGF- β_1 诱导的 CTGF mRNA 转录也相应地增加。体内实验进一步发现实验小鼠患糖尿病 3.5 个月肾小球中 CTGF 的表达比正常对照组平均升高 28 倍,而此时间质病变和蛋白尿尚未出现。在糖尿病肾病早期,当系膜大量增殖肿胀时,CTGF 就已经出现表达上调,因而认为其可以作为糖尿病性肾小球性硬化症的一种早期检测指标。

对增生性肾小球肾炎,最近研究发现在人增生性以及纤维化肾病中 CTGF 的表达明显上调。Ito 等采用原位杂交以及 RT-PCR 法研究了 CTGF 在实验大鼠增生性肾小球肾炎模型中的表达情况以及与 TGF- β_1 之间的相关性,发现正常鼠肾中仅有少许的肾小球内皮细胞表达 CTGF mRNA。而在注射抗 Thy-1.1 肾炎组,CTGF 的表达明显增加,表达主要分布于毛细血管外、肾小球系膜增殖区以及肾小球纤维化周边区等区域。同时研究显示在内皮细胞中,CTGF 的早期过表达与 TGF- β_1 的上调显著相关。CTGF mRNA 表达在第 7 h 达峰值水平,与 TGF- β_1 mRNA 及其蛋白表达增加程度相一致。认为 CTGF 表达活性的改变参与了一过性的肾脏损伤的修复过程。

(6)其他疾病:有研究报道 CTGF 参与了皮肤损伤的修复过程。关于 CTGF 在中枢神经系统损伤修复过程中的作用,Hertel 等研究分析了单红藻氨酸损伤小鼠的海马 CA3 区 CTGF 的分布和时间表达模式,发现了在海马损伤区神经元和胶质细胞中 CTGF mRNA 及其蛋白的表达明显增加,同时伴随着细胞外基质纤维连接蛋白的增加,认为这是由于 CTGF 作用的结果。实验结果显示 CTGF 参与了海马损伤后的结构重建过程中神经胶质瘢痕的形成。炎症性肠病(IBD)是一种多因素相关疾病,其特征主要为肠道内皮损伤以及间质病变,研究认为 CTGF 具有诱导成纤维细胞增殖以及促进结缔组织沉积的作用。

1998 年 Dammeier 等检测了 IBD 患者的外科组织标本,发现 CTGF mRNA 表达显著增加,并与炎症程度呈正相关。同时发现纤维连结蛋白以及整合素 α_5 的水平也明显升高。这些资料提示 CTGF 在 IBD 黏膜损伤修复、细胞外基质沉积、组织纤维化以及肠腔狭窄过程中均起着关键的

作用。

结缔组织生长因子在多种疾病出现不同程度的表达或表达缺失,与疾病的发生、发展等病理过程有密切的关系。对其生物学活性的进一步了解,能使我们更好地认识各种疾病的本质,从而达到诊断、治愈疾病的目的。

1.3 AS斑块组织基因表达检测及序列分析

1.3.1 原癌基因

原癌基因是编码调控细胞生长、分化的关键蛋白质的正常细胞基因,在细胞增殖、分化、个体发育和再生中发挥作用,在正常成年平滑肌细胞中不表达或有限制表达。当细胞受到生物、化学或物理因素作用时可被激活,出现异常表达,导致 SMC 生长、分化特征发生改变,呈现胚胎期主动脉 SMC 合成型特征(去分化)。

研究表明,动脉粥样硬化时 SMC 的增殖和表型改变与某些原癌基因的激活和异常表达有关。直接取 AS 患者动脉粥样硬化病变血管进行研究,发现病变血管 sis 基因 mRNA 比正常非粥样硬化的血管高 5~12 倍。应用 DNA-RNA 杂交,对人的 AS 斑块深、浅层细胞以及斑块旁组织进行了 sis 和 myc 基因表达的检测,发现斑块浅层细胞与深层细胞相比,2 种基因表达量无明显增加,而 AS 斑块组织则比斑块旁组织 sis 和 myc 基因表达增高。此外,用人的大隐静脉进行器官培养,14 天后发现有由致密包裹的 SMC 参与组成的新生内膜的形成;检测组织 sis 基因表达,发现器官培养前 SMC 比新生内膜 SMC 的 sis 表达明显低;提示原来和新生的内膜细胞来源可能不一致,斑块组织与斑块旁组织的 SMC 的 sis 表达不一致,活跃增生的 SMC 与静止的 SMC 的 sis 表达不一致。有人曾试图借此用于 AS 分型或分期,但到目前一直未取得突破性进展。原因主要是 SMC 无论接受任何一种刺激(生物、化学或物理的),均可能有许多细胞内原癌基因的高表达,如 C-ras、myc、fos、sis、jun 和 myb 等。还未发现有特异的致 AS 的原癌基因。

1.3.2 癌基因、抑癌基因突变与动脉粥样硬化

癌基因的激活、抑癌基因失活已成为肿瘤发生的重要机制之一,这些在 AS 发生当中也能找到存在的证据。提取人的动脉粥样斑块中的 DNA,再转染到小鼠 NIH3T3 细胞中,发现受转染的细胞发生转化,呈肿瘤样生长。如将这些细胞种植到裸鼠体内则可发展成肿瘤。而从正常的非动脉粥样硬化血管中用同样方法提取的 DNA 并转染细胞,则没有此作用,提示在动脉粥样硬化斑块中的平滑肌细胞中可能存在致癌基因。此后,一些研究结果证实斑块的平滑肌中有病毒基因的存在。推测动脉粥样硬化的发生可由于病毒感染引起平滑肌细胞癌基因突变或基因激活,进而不断增殖,并在其他因素,如高血脂、高血压及高胰岛素血症的促进下发展成粥样斑块。到目前为止还未见有斑块平滑肌细胞中有癌基因突变的报道。但 Kiaris 用 RFLP 方法研究显示斑块中 H-ras 基因微卫星核心(minisatellite core)重复数(repetition number)发生改变,即 H-ras 微卫星不稳定性可能与 AS 有关。

p53 基因是一种抑癌基因,该基因的突变或缺失导致野生型 p53 的低表达或突变型 p53 的高表达,与细胞增殖密切相关。在许多肿瘤组织中,已发现有该基因的突变或缺失。人的 p53 基因定位于 17 号染色体短臂 1 区 3.1 带(17p13.1),含 11 个外显子,长约 20 kb。该基因的高发突变区在第 5~8 外显子。基于动脉粥样硬化斑块也是以细胞增生为主要特征的疾病,因此国内学者曾报道在实验性家兔的 AS 斑块中发现有野生型 p53 的低表达和突变型 p53 的高表达。随之在人的

AS的斑块中也发现有 p53 第 8 外显子 T272C 点突变,免疫组化也证实有突变型 p53 的蛋白表达。提示 p53 突变也可能是 AS 发生原因之一。但国外学者(Agostini 等,1995)对 32 例腹主动脉外科手术病人获得的 AS 斑块中膜组织进行了 PCR 和免疫组化分析,结果均未能找到有 p53 基因突变的证据,在斑块 SMC 中也未见有野生型 p53 蛋白的变化,但序列分析显示在所检病人中有 10.5%病人斑块中有 p53 基因多态现象,即 213 密码子中有 AT 转换为 GC,但并不发生氨基酸的替换(Arg→Arg)。总之,用检测 p53 突变作为 AS 基因诊断的方法,仍然需要积累更多的资料。

1.3.3 基质金属蛋白酶基因

在 AS 新生内膜斑块形成以及血管成形术(angioplasty)后再狭窄(restenosis)发生中,SMC 从中膜迁移到内膜是关键的一环。研究显示,SMC 迁移与血管内膜受损伤或者中膜 SMC 受牵拉后 SMC 中多种基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPS)基因高表达有关。MMPS 在金属存在下,能快速降解细胞外基膜和细胞外基质成分,使 SMC 迁移到内皮下层异常增殖。研究发现,应用辛伐他汀等后,可减少组织之中基质金属蛋白酶的表达,并起到稳定斑块的作用。

近年发现,凋亡因子 FAS/FASL 介导的凋亡与本病相关,FASL 是 II 型膜蛋白,有 218 个氨基酸残基(MW26 000),基因在 1 号染色体,属于 TNF 亚家族,主要表达于 T 及 NK 细胞;FASL 的受体 FAS,是一种调节细胞凋亡的 I 型跨膜糖蛋白受体,有 325 个氨基酸残基(MW45 000)。FASL 与 FAS 结合,导致 FAS 胞内部分形成三聚体,再使 FADD(FAS 死亡区结合蛋白)变构,又使 FLICE(caspases 蛋白酶前体)与 FADD 结合,FLICE 的裂解产物 p10 和 p20 启动 caspase 相关蛋白酶级联反应,最后导致凋亡,并可见于本病心梗、心绞痛等病变中。

1.4 AS 相关基因诊断技术

1.4.1 AS 斑块组织 p53 抑癌基因、p21 ras 癌基因突变检测

(1)取材:主动脉组织标本可取自死亡 12 h 之内低温保存的病例或取材于动脉成形术时。肾、髂动脉取自外科手术。对照:意外死亡的成人主动脉组织或健康献血员的外周血粒细胞。

(2)引物序列:如表 1-2。

表 1-2 检测 p53、p21ras 基因引物序列(5'→3')

外显子	上游引物	下游引物
p53:		
1	GTG ATA AGG GTT GTG AAG GA	AGC TGA AAA TAC ACG GAG CC
2	CCA GGT GAC CCA GGG TTG GA	AGC ATC AAA TCA TCC ATT GC
3	CCA GGT GAC CCA GGG TTG GA	AGC ATC AAA TCA TCC ATT GC
4	TGA GGA CCT GGT CCT CTG AC	AGA GGA ATC CCA AAG TTC CA
5	TGT TCA CTT GTG CCC TGA CT	AGC AAT CAG TGA GGA ATC AC
6	TGG TTG CCC AGG GTC CCC AG	TGG AGG GCC ACT GAC AAC CA
7	CTT GCC ACA GGT CTC CCC AA	AGG GGT CAG CGG CAA GCA GA
8	TTG GGA GTA GAT GGA GCC T	AGT GTT AGA CTG GAA ACT TT
9	TTG GGA GTA GAT GGA GCC T	AGT GTT AGA CTG GAA ACT TT

续 表

外显子	上游引物	下游引物
10	TCT ACT AAA TCG ATG TTG CT	GGA TGA GAA TGG AAT CCT AT
11	AGA CCC TCT CAC TCA TGT GA	TGA CGC ACA CCT ATT GCA AC
p21ras:		
H12	CAG GAG ACC CTG TAG GAG GA	CAC CTG GAC GGC GGC GCT AG
H61	GGA GAG GCT GGC TGT GTG AA	AAA AGA CTT GGT GTT GTT GA
H12	ACA TGT TCT AAT ATA GTC AC	CTA TTG TTG GTA CAT ATT CG
K61	TTG AGT TGT ATA TAA CAC CT	CAT GGC ATT AGC AAA GAC TC
N12	GAC TGA GAT CAA ACT GGT GG	CTC TAT GGT GGG ATC ATA TT
N61	GAT TCT TAC AGA AAA CAA GT	TCC TAG TAC CTG TAG AGG TT

(3)PCR-SSCP:有突变的PCR产物出现异常电泳带。

(4)PCR产物测序分析:SSCP筛查出现异常泳动带的PCR产物进行测序,结果可直接读出。

1.4.2 动脉斑块组织细胞 c-sis、Gα 基因表达的检测

动脉斑块组织细胞基因表达的检测主要有逆转录PCR、PCR-SSCP、Northern杂交及原位杂交等。c-sis、Gα cDNA探针已商品化。

1.4.3 PCR-酶切法检测 apoE 基因多态性与动脉粥样硬化的关系

1)研究表明,载脂蛋白E(apolipoprotein E,apoE)等位基因对于血浆中脂质含量有重要的作用,据 Boerwinkle 等的统计结果,血浆中总胆固醇的浓度变异中大约有 8%是 apoE 基因多态性引起的。一般来说, ϵ_4 等位基因可显著提高血浆中总胆固醇的浓度,而 ϵ_2 等位基因可降低血浆胆固醇的浓度。应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism,PCR-RFLP)技术,可分析 apoE 等位基因频率在冠心病人群、脑梗死人群和正常人群中的分布,探讨 apoE 基因多态性与心脑血管疾病之间的相关关系。外周静脉血样本均用 ACD 抗凝,-70℃保存至提取基因组DNA。

(1)PCR引物:PCR反应引物按 Wenham 等报道设计。

上游引物序列为:5'-TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCCA-3';

下游引物序列为:5'-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACACTGCCA-3'。

(2)基因组DNA提取:采用常规方法,经蛋白酶K-SDS处理,酚/氯仿抽提,无水乙醇沉淀提取基因组DNA。应用DNA/RNA Calculator(pharmacia biotech)检测基因组DNA的浓度和纯度。

(3)apoE基因的PCR扩增:以基因组DNA为模板,扩增apoE基因第4外显子包含编码第112位和第158位氨基酸残基的序列在内、长度为227bp的DNA片段。PCR扩增在20μl反应体系中进行,其中包括基因组DNA 200 ng,dNTPs各100 μmol/L,各引物0.5 pmol/μl,二甲亚砜10%,MgCl₂ 2.5 mmol/L,Taq DNA聚合酶1U。先进行94℃10 s、68℃10 s、72℃30 s共4个循环;再进行94℃10 s、68℃10 s、72℃30 s共30个循环;最后置于72℃延续7 min。经2%琼脂糖凝胶电泳,EB染色检测PCR扩增结果。

(4)限制性内切酶消化:限制性酶切反应在20μl体系中进行,其中包括PCR反应产物12 μl,Cfo I限制酶10 U(10 U/μl,Boehringer Mannheim)。轻轻混匀后置37℃消化过夜,加1 μl 0.5 mol/L EDTA终止反应。

(5)聚丙烯酰胺凝胶电泳分型:应用常规方法制备中性聚丙烯酰胺凝胶(浓度为8%,交联度