

冠心病遗传学

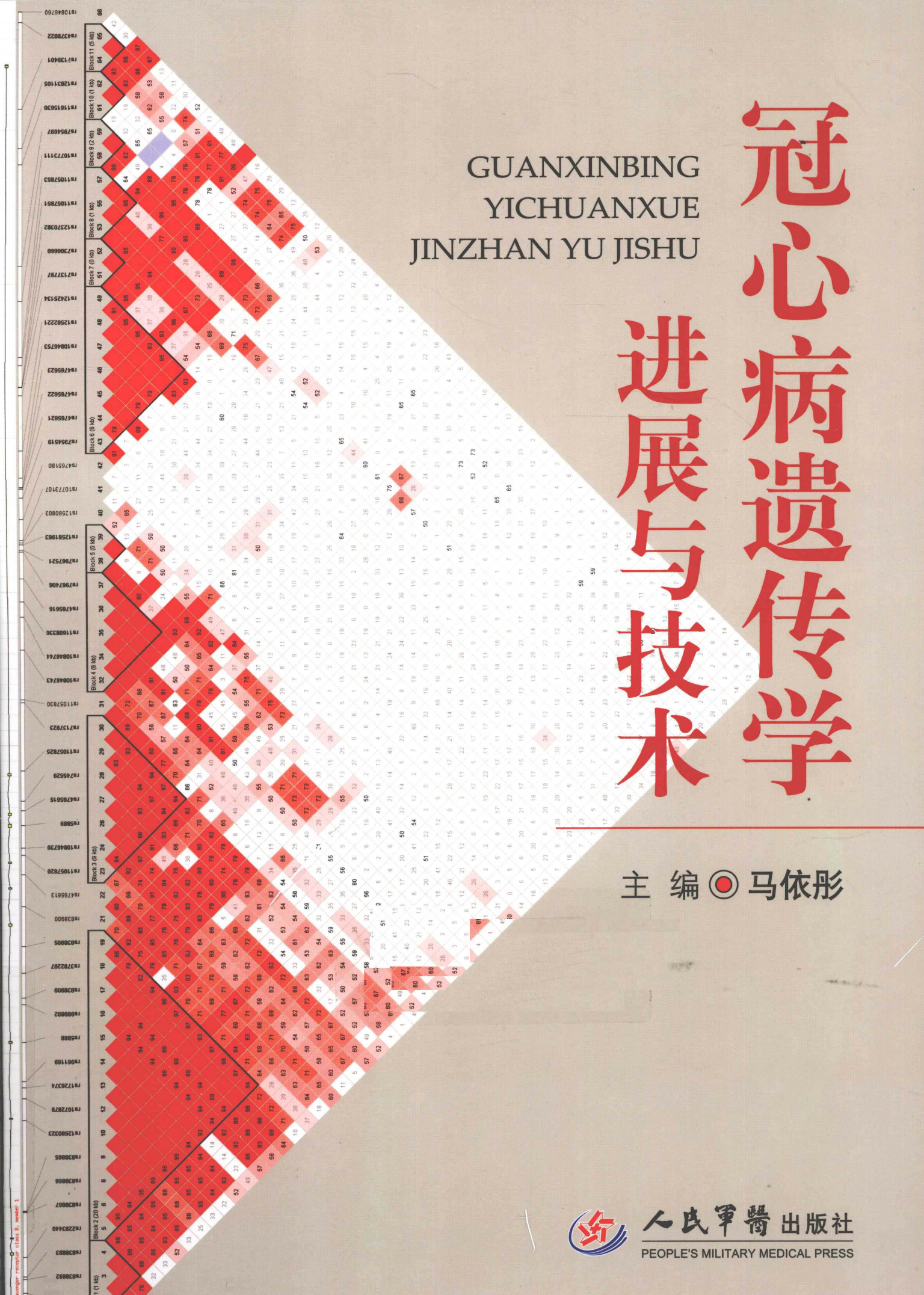
GUANXINBING
YICHUANXUE
JINZHAN YU JISHU

进展与技术

主 编◎马依彤



人民军医出版社
PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS



冠心病遗传学

进展与技术

THE INTERNATIONAL
SYMPOSIUM ON
CORONARY GENETICS

■ 国际冠心病遗传学研讨会

上海科技出版社
SHANGHAI SCIENCE & TECHNOLOGY PUBLISHERS

GUANXINBING YICHUANXUE JINZHAN YU JISHU

冠心病遗传学进展与技术

主 编 马依彤

副主编 杨毅宁 谢 翔 李晓梅
付真彦 马 翔 黄 莺



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目(CIP)数据

冠心病遗传学进展与技术/马依彤主编. —北京:人民军医出版社,2010.10

ISBN 978-7-5091-4277-6

I. ①冠… II. ①马… III. ①冠心病-遗传学 IV. ①R541.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 193129 号

策划编辑:秦速励 文字编辑:郁 静 杨善芝 责任审读:伦踪启

出 版 人:石 虹

出版发行:人民军医出版社 经销:新华书店

通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱 邮编:100036

质量反馈电话:(010)51927290;(010)51927283

邮购电话:(010)51927252

策划编辑电话:(010)51927286

网址:[www. pmmp. com. cn](http://www.pmmp.com.cn)

印、装:三河市春园印刷有限公司

开本:850mm×1168mm 1/16

印张:27.5 彩页:4 面 字数:758 千字

版、印次:2010 年 10 月第 1 版第 1 次印刷

印数:0001~3000

定价:125.00 元

版权所有、侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

GUANXINBING YICHUANXUE JINZHAN YU JISHU

冠心病遗传学进展与技术

编委会名单

主 编 马依彤

副主编 杨毅宁 谢 翔 李晓梅

付真彦 马 翔 黄 莺

编 者 (以姓氏笔画为序)

于子翔	王 磊	王宝珠	王朝霞
韦亚林	古丽娜儿·白托拉		向 阳
刘 成	刘 芬	江 洁	安 勇
孙明慧	纪伟宁	李维琼	杨思进
张雪莲	陈 平	陈 铀	陈邦党
林 涛	郑红梅	郑颖颖	赵文丽
姚 娟	袁 山	高 霞	彭 潇
潘 硕			



内容提要

本书由著名心血管病学专家马依彤领衔编著。上篇论述冠心病遗传学技术与方法,包括概论、分子生物学技术的应用、冠心病遗传学研究设计、资料与标本的收集与利用、遗传学数据的分析及软件的应用、基因功能研究方法等;下篇论述冠心病遗传学应用与进展,包括炎症因子基因多态性与冠心病、凝血与纤溶系统基因多态性与冠心病、脂质代谢相关基因多态性与冠心病、内皮系统相关基因与冠心病、肾素-血管紧张素-醛固酮系统基因多态性与冠心病、其他基因多态性与冠心病、基因多态性与冠心病的药物治疗等。本书内容严谨实用,图文并茂,是不可多得的研究冠心病遗传学的学术专著,适合内科医师尤其心血管医师,以及医学院研究生和医学研究人员阅读参考。



序 言

心血管疾病是当今世界上严重威胁人类健康和生命的头号杀手,其发病率和病死率已超过肿瘤疾病而跃居世界第一位。近年研究发现冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)是一种复杂性疾病,其发病机制不仅和环境因素关系密切,还和遗传因素明显相关,其中遗传因素被认为是致病的基础。早在1745年,意大利著名医生 Lancisi 就曾提到:“心脏病变可以从父母传递给子女。心脏缺陷可以在瞬间由父母打上深深的烙印并传给下一代。”尽管这种说法在科学并不发达的当时仅仅是一种推测,缺乏充分的科学依据,但至少表明,早在18世纪,人类就意识到心血管疾病与遗传之间存在着千丝万缕的联系。此后,人类对于心血管疾病与遗传之间的关系作了大量的观察及研究。近年来,随着分子生物学技术的发展,心血管疾病的遗传学研究取得了飞速的发展。尤其是近年来随着人类单体型图计划的顺利开展,全基因组关联研究技术的突破,心血管疾病的遗传学研究取得了卓越的成绩。一批和冠心病相关的基因被克隆和鉴定,主要涵盖了编码炎症因子、脂质代谢、内皮系统等和动脉粥样硬化、冠心病发病机制相关的基因。有的基因已经用于临床检测和临床治疗,为心血管疾病的防治奠定了基础。为了更好地在国内开展冠心病的遗传学研究,为临床及基础研究的科研人员提供实用的科研技术和科研思路,马依彤教授主编了《冠心病遗传学进展与技术》一书。该书凝聚了编者多年的研究成果,从最基本的研究思路、研究方法和技术入手,包括如何设计课题、如何收集标本、如何采集相关的临床资料、如何进行相关的实验操作以及如何进行分析等;同时,该书结合国内外最新的研究成果和科研动态,对冠心病的遗传学研究方法和进展进行了系统的阐述,为临床医务工作者、基础研究的科研人员以及刚刚步入科研殿堂的博士、硕士研究生进行遗传学研究、分子生物学实验等提供了第一手资料和方法。本书内容新颖、实用,对一线从事科研的研究生和科研人员有较好的参考价值。

我相信,《冠心病遗传学进展与技术》一书能够为相关学科的医务工作者和广大的科研人员提供有益的帮助。

2010年9月7日



前言

本书从遗传学角度探讨冠心病的发病机制,包括冠心病的遗传学研究设计、研究方法和技术以及目前冠心病遗传学研究的现状和进展。全书分为上下两篇,上篇为技术与方法部分,主要阐述冠心病遗传学研究的目、现状、存在的问题以及主要科研过程的描述,包括资料和样本的收集、具体实验方法的原理、数据处理的方法和几种常用遗传学软件的应用等。主要针对临床科研人员、基础研究人员以及公共卫生人员进行冠心病的遗传学的研究设计、具体的数据分析方法以及有关基因功能的研究方法介绍。下篇为研究进展各论,主要针对参与冠心病发病机制的主要环节,筛选一批蛋白和基因,综述其研究现状和进展,包括炎症因子、凝血与纤溶系统、肾素-血管紧张素-醛固酮系统、脂质代谢相关因子及内皮系统等相关基因和冠心病的关系,同时对心血管药物抵抗的机制和基因多态性的关系进行了阐述。本书是一本基础研究结合临床应用的医学专著,可供心血管内科临床医师、各科基础研究人员、在读研究生、遗传学研究人员等相关科室的临床及科研工作者参考。由于时间有限,加之科学技术发展迅猛,对书中的错误、不足之处,恳请各位前辈、老师、同道及广大读者批评指正。

值本书出版之际,感谢为我国生物技术与科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,是他们的指导、培养和杰出的工作为我国中青年一代的发展奠定了基础,并为本书提供了参考。感谢人民军医出版社的同志们对本书的出版所付出的辛勤劳动和支持。感谢各位同道给予的鼓励和关心。

马依彤

2010年8月26日



目 录

上篇 技术与方法

第 1 章 概论..... 3	第 4 章 资料与标本的收集与利用 67
第一节 冠心病遗传学研究概况..... 3	第一节 资料的收集 67
第二节 遗传因素在冠心病发生中的 作用..... 8	第二节 标本的采集与保存 71
第三节 冠心病遗传学研究存在的问题 及展望 14	第三节 基因组提取方法介绍 73
第 2 章 分子生物学技术的应用 17	第四节 基因组的保存及注意事项 75
第一节 基因芯片技术 17	第 5 章 遗传学数据的分析及处理 79
第二节 单链构象多态性技术 22	第一节 引物设计软件的应用 79
第三节 限制性片段长度多态性技术 28	第二节 遗传学数据处理常用软件及 方法 90
第四节 聚合酶链反应 33	第三节 基因数据库的应用介绍 103
第五节 测序技术 38	第四节 基因-环境交互作用分析 方法 107
第 3 章 冠心病遗传学研究设计 45	第 6 章 基因功能研究策略 113
第一节 病例对照研究 45	第一节 基因转导技术 113
第二节 队列研究 50	第二节 RNA 干扰 120
第三节 基于家系的关联研究 55	第三节 转基因动物技术与基因 敲除 127
第四节 其他设计 58	

下篇 应用与进展

第 7 章 炎症因子基因多态性与冠心病..... 137	第十节 整合素基因 184
第一节 C 反应蛋白基因 137	第十一节 白三烯及其受体基因 187
第二节 肿瘤坏死因子基因 142	第十二节 热休克蛋白基因 192
第三节 白细胞介素基因 147	第十三节 血小板活化因子乙酰水 解酶基因 196
第四节 补体家族基因 155	第十四节 基质金属蛋白酶基因多 态性 200
第五节 髓过氧化物酶基因 159	第十五节 转化生长因子基因 多态性 208
第六节 血浆淀粉样蛋白 A 基因 165	第十六节 Fas 及其配体基因
第七节 TOLL 样受体基因 169	
第八节 CD40 基因多态性与冠心病 176	
第九节 E-选择素基因 182	



多态性·····	211	第一节	内皮素基因·····	308
第 8 章 凝血与纤溶系统基因多态性与		第二节	一氧化氮合酶基因·····	313
冠心病·····	217	第三节	血管内皮生长因子基因·····	317
第一节 凝血因子基因多态性·····	217	第四节	血栓调节蛋白基因·····	323
第二节 纤维蛋白原·····	227	第五节	G 蛋白基因·····	330
第三节 血管性血友病因子·····	230	第六节	血小板衍化生长因子·····	339
第四节 ADP 受体基因多态性·····	234	第七节	肝细胞生长因子基因·····	345
第五节 胶原受体基因·····	238	第八节	胎盘生长因子基因·····	353
第六节 血栓素合酶基因多态性·····	245	第九节	妊娠相关蛋白 A·····	359
第七节 前列环素合酶基因和前列		第 11 章 肾素-血管紧张素-醛固酮系统		
环素受体基因·····	250	基因多态性与冠心病·····	369	
第八节 环氧化酶基因·····	254	第一节 血管紧张素转换酶基因		
第九节 血栓素受体基因·····	258	多态性·····	369	
第 9 章 脂质代谢相关基因多态性与		第二节 血管紧张素原基因多态性·····	374	
冠心病·····	265	第三节 肾素基因多态性·····	380	
第一节 载脂蛋白家族基因多态性·····	265	第四节 醛固酮合酶基因多态性·····	384	
第二节 ABCA 家族基因多态性·····	273	第五节 血管紧张素受体基因多态性·····	389	
第三节 脂蛋白基因多态性·····	278	第六节 血红素加氧酶基因多态性·····	395	
第四节 LDL 受体基因多态性·····	283	第 12 章 基因多态性与冠心病的药物		
第五节 氧化型 LDL 受体基因		治疗·····	403	
多态性·····	288	第一节 基因多态性与阿司匹林抵抗·····	403	
第六节 HDL 受体基因多态性·····	292	第二节 基因多态性与氯吡格雷抵抗·····	410	
第七节 胆固醇酯转运蛋白基因		第三节 基因多态性与肝素抵抗·····	414	
多态性·····	297	第四节 基因多态性与他汀类药物·····	418	
第八节 糜酶基因多态性·····	302	第五节 基因多态性与 β 受体阻滞药·····	421	
第 10 章 内皮系统相关基因与冠心病·····	308	第六节 基因多态性与 ACEI 类药物·····	425	

上 篇

技术与方法



第 1 章

概 论

第一节 冠心病遗传学研究概况

一、简 史

医学遗传学亦称人类遗传学,是医学与遗传学相结合的一门边缘学科,是遗传学知识在医学领域中的应用。医学遗传学不仅与生物学、生物化学、微生物及免疫学、病理学、药理学、组织胚胎学、卫生学等基础医学密切相关,而且已经渗入各临床学科之中。作为它的分支学科,研究临床各种遗传病(genetic disease)的形成机制、传递方式、诊断、产前诊断、治疗、预后、复发风险、预防措施和遗传咨询的学科称为临床遗传学(clinical genetics)。遗传性心血管病既是临床常见病、多发病,又是主要遗传性疾病之一,属于临床遗传学的重要组成部分。

心血管疾病是当今世界上严重威胁人类健康的疾病之一,其发病率和病死率已超过肿瘤疾病而跃居世界第一位。研究发现,心血管疾病与遗传和环境因素相关,其中遗传因素被认为是致病的基础。早在 1745 年,意大利著名医生 Lancisi 就曾提到:“心脏病变可以从父母传递给子女。心脏缺陷可以在瞬间由父母打上深深的烙印并传给下一代。”尽管这种说法在科学并不发达的当时仅仅是一种推测,缺乏充分的科学依据,但至少表明,早在 18 世纪,人类就意识到心血管疾病与遗传之间存在着千丝万缕的联系。此后,人类对于心血管疾病与遗传之间的关系做了大量的观察及研究。

20 世纪 50 年代以前,是人类对心血管疾病与遗传之间密切关系的初步认识时期。在这一时期,关于心血管疾病的家族性病例报道层出不穷,特别是 1865 年孟德尔揭示出遗传学的两个基本规律——分离规律和自由组合规律及 1900 年,他的发现被欧洲 3 位不同国籍的植物学家在各自的豌豆杂交试验中分别予以证实后,遗传学的研究从此也就很快地发展起来。1962 年,现代实验生物学奠基人,美国的生物学家与遗传学家摩尔根发表了《基因论》,发现了染色体的遗传机制,创立了染色体遗传理论,从遗传学上给人们提供了研究心血管疾病的理论基础。此后,临床医生纷纷应用遗传规律和基因论来解释和探讨心血管疾病的家族发病倾向。这一时期的工作为以后的心血管遗传学研究奠定了坚实的基础。

20 世纪 50 年代后,心血管疾病遗传学研究迅速发展并开始形成一门新的分支学科。随着医学科学的发展,自然与社会因素的改变,疾病谱发生变化,心血管疾病成为严重威胁人类健康和生命安全的最大危险因素之一。这一时期,医学遗传学取得了一系列重点突破。1953 年由沃森和克里克两人提出了遗传物质脱氧核糖核酸(DNA)的双螺旋结构模型,使遗传学从原来的描述性学科发展成一门实验性的学科,从静态观察发展到对生命活动过程的分析和测定。遗传学经历了漫长的发展过程,形成了系统而完整的科学体系,进入了模拟和试验技术阶段,帮助我们理解

最基本的生命过程。在短短的 20 年里,心血管疾病的遗传学得到了迅速的发展并取得了一系列重要成就。20 世纪 60 年代 Narkang 编撰的《先天性心血管病与遗传》和 Mckusick 编著的《人类孟德尔遗传》集中反应了这一时期的研究成果。最重要的是这一时期许多学者通过遗传学方法,对最常见的心血管疾病的研究证实了遗传因素对其发病的影响,基本上确定了这些疾病是多基因遗传病及其遗传度和后代发病的风险值。

20 世纪 70 年代以后是遗传性心血管病研究进一步发展和完善时期,人们进一步补充、验证和总结过去所取得的成果并积极地将取得的成果应用于临床,以协助识别发病风险较高的人群和制定相应的预防对策,提高诊断治疗遗传性心血管疾病的水平,使遗传学心血管疾病成为现代心血管病学中的一个不可缺少的有机组成部分。Palarrogo 和 Zabarskie 等分别应用遗传标记测定法和单克隆技术,来识别具有风湿热遗传发病倾向的个体,为进一步降低风湿热发病率和探索风湿热遗传易感性的本质提供了新手段。20 世纪 80 年代,国内外许多学者通过对高血压病患者及其亲属以及高血压动物的细胞学研究,提出高血压病可能是一种遗传缺陷所致的细胞膜病。大量针对家族性心血管病的研究、对遗传性心血管病人的亲属发病风险的估计和对有阳性家族史者实行重点防治的建议,为控制心血管病起到了积极作用。在其发病机制中,可能存在某种共同的遗传缺陷和细胞水平的功能障碍。这一研究对探讨心血管疾病发病机制和遗传防治开辟了一条新途径。

随着遗传性心血管病研究的发展,作为其分支,冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary atherosclerotic heart disease, CHD)遗传学研究也取得了长足的进步。冠心病是心血管疾病中的常见病和多发病,流行病学与临床研究表明,冠心病是多数发达国家和许多发展中国家成人发病和死亡的主要原因。预计到 2020 年,冠心病将成为全球排名第 1 位的疾病。虽然冠心病的病因迄今尚未阐明,但近期研究认为,大多数冠心病的发病是个体遗传与环境因素相互作用的结果,家族和遗传因素在冠心病的发生中起着重要的作用,冠心病遗传学成为遗传性心血管病的重要研究内容。

早在 20 世纪 70 年代,Posonen 和以色列学者对死亡儿童冠状动脉解剖结构的研究,已证实了遗传因素对冠状动脉的影响在出生时即已存在,并对以后的冠心病发病情况具有决定作用。20 世纪 80 年代在动脉硬化、冠心病的遗传研究上已深入到分子水平,而且阐明了一些重要问题,如发现 Ag 位点多态性与 Apo B 位点多态性紧密连锁, Apo B 基因异常对动脉硬化的易感性有重要作用等。对高脂蛋白血症调控基因的研究,为以后利用基因工程控制高脂血症和冠心病的发生打下了良好的基础。

Zdravkovic 等在瑞典进行的双生子队列研究观察了 20 966 个双生子(生于 1886—1925 年,并且在 1961 年双生子对的两个个体均存活),分别在 1987 年、1992 年和 1996 年进行了随访,结果显示,因冠心病死亡的遗传度在男性为 0.57 (0.45~0.69),女性为 0.38 (0.26~0.50)。在 3 次随访中,1987 年的遗传度估计值最高,随着随访时间延长,遗传度略有降低,尽管没达到统计学显著性,但仍提示在生命的早期,遗传效应较强。

多年来,我国学者也对冠心病遗传学做了大量的研究,如 1980 年陈家畅等对胎儿冠状动脉的解剖,1981 年吴英恺等对冠心病流行病学的探讨等。而 1984 年李树林结合自己的研究编译的《心血管系统疾病》,1990 年张开滋等主编的《遗传学心血管病》等均对冠心病的遗传性做了相应的介绍。1982 年陈灏珠主编的《中国医学百科全书——心脏病学》及《实用内科学》,1994 年李广铨主编的《心血管病遗传病学》等也以一定篇幅对冠心病遗传学做了介绍。

二、现 况

过去 50 年来的临床和流行病学研究证明,冠心病病因是多因素的,冠心病可能是受各种环境损害与复杂的遗传基础相互作用而引起的具有不同原因的疾病。随着现代医疗技术的发展,尽管冠心病临床综合诊疗技术的快速发展以及对传统危险因子的积极控制在一定程度上缓解了病情,改善了预后,但并未能有效降低 CHD 的发生。相反,流行病学研究显示,今后 20 年 CHD 发病和死亡在世界范围内仍呈上升趋势。



(一) 基因变异研究

近年来,冠心病的诊断和治疗有了很大发展,溶栓药物、介入治疗和冠脉搭桥手术等大大改善了冠心病患者的预后,但术后一部分病人由于严重的血管内皮细胞损伤带来的血小板沉积和血栓形成,使得支架内再狭窄或血管桥(特别是静脉桥)在3~5年又出现不同程度的狭窄,患者被迫接受第2次甚至第3次手术,严重影响了患者的生活质量,甚至威胁到患者的生命,特别是有些患者心肌有坏死及瘢痕形成,加上冠心病本身严重的并发症使得治疗更为棘手。故而,以病因学与发病机制为基础的基因研究已经成为研究的新方向。

目前,我国CHD/MI发病机制的遗传学研究仍处于起步阶段。沈阳军区总医院处于我国CHD高发地区,从2004年开始,沈阳军区总医院心血管病研究所实验室开始建立早发、多发MI患者核心家系,应用resequencing分析建立中国北方汉族人群特异的SNP位标,通过候选基因的关联研究筛查多个我国北方汉族人群MI发生的遗传易感基因。并进一步通过开展复制研究及功能研究,确定我国人群CHD易感基因。国内其他中心也相继开展了冠心病遗传学的研究。这些研究工作的顺利进行及以此为基础的疾病转录组、蛋白组和代谢组学等功能研究的深入,必将有力推动我国人群的CHD疾病基因组学研究,并可能为CHD等在内的多基因疾病的发病机制、开发诊断和个体化防治研究提供新的思路和方向。

基因多态性研究为揭示冠心病临床表型多样化产生的实质和冠心病个体化的临床治疗打下了基础。多态性(polymorphism)是指在一个生物群体中,同时和经常存在两种或多种不连续的变异型或基因型(genotype)或等位基因(allele),亦称遗传多态性(genetic polymorphism)或基因多态性。从本质上来讲,多态性的产生源于基因水平上的变异,一般发生在基因序列中不编码蛋白的区域和没有重要调节功能的区域。对于一个体而言,基因多态性碱基顺序终生不变,并按孟德尔规律世代相传。

遗传学和基因组学用于冠心病的防治,其重要目标是确认出有助于预告疾病危险及冠心病防

治。冠心病偶尔是一种单基因紊乱,如家族性高胆固醇血症系血低密度脂蛋白(LDL)细胞表面受体缺陷,但更多的是一种由多种遗传因素和环境因素共同作用所致的复杂的多基因遗传病。多基因遗传病是由许多对微效累加基因和某些环境因素共同作用而引起的一大类遗传病,由于发病过程中需要许多因子共同参与,故又称为多因子遗传病或复杂性疾病。由于与疾病危险性相关的突变往往在机体遗传和环境因素双重作用下,才导致机体发病,并且CHD确切发病机制目前尚不清楚,以及存在着遗传异质性、种族差异、节俭基因型等因素,这在客观上限制了其易感基因的研究进展。冠心病这类多基因遗传病是多个遗传因素影响不同的易感基因和(或)同一易感基因的一个以上相关位点以及其后天环境因素共同作用的结果,在正常人群中亦存在这些基因变异。患病群体和非患病群体间只是基因频率(gene frequency)上的差异。基因多态性不仅可用于经典的遗传分析(遗传病的基因诊断和连锁分析),还可用于疾病的关联分析、疾病相关基因的定位、法医学的个体识别与亲权鉴定、疾病发生的分子遗传机制的阐明、环境因素易感基因的检出以及药物基因组学中指导用药和药物设计等。

复杂性疾病更倾向于应用遗传易感性和危险因素的概念。CHD是理解慢性疾病表型与基因型间复杂关系的典型范例,等位基因变异通过其产物与环境因素相互作用,可引起CHD生物学危险因素的变化,最终导致疾病的发生。近年来迅速发展的分子生物学实验技术和遗传流行病学方法为疾病易感基因研究提供了方法和手段。易感基因在冠心病的发生发展中起重要作用,当前CHD易感基因研究策略仍旧主要采用候选基因关联研究和定位克隆,但值得注意的是所采用的策略方法并非孤立,而是相互穿插融合。随着分型技术的发展和成本的降低,以及对各种策略方法认识的加深,其研究规模不断扩大。筛查冠心病发生的易感基因,从基因水平阐明冠心病的发病机制并进行针对性地个体化防治,成为冠心病基础研究的重要方向。近年来,随着人类疾病基因治疗研究的不断深入,有许多学者已着手对冠心病心肌梗死的基因治疗进行了很多实验及临床研究,并取得了一定成绩。

随着人类基因组计划的完成以及 HapMap 计划和蛋白质组计划的实施,寻找冠心病这类复杂疾病相关基因的研究策略不断发展,定位克隆、定位候选克隆、基因表达谱研究、候选基因分析以及目前基于家系和大规模病例对照的全基因组关联研究等研究策略逐步完善,对于发现冠心病等复杂疾病易感基因研究发挥了重要的作用。

近年来,国际上应用基于候选基因的关联分析和基于全基因组的连锁分析和关联分析策略,在冠状动脉粥样硬化及其并发症的相关基因研究方面取得了重要进展。首先,在心肌梗死家系连锁分析方面,2003 年 Wang 等采用全基因组扫描方法对一个有 13 个冠心病患者的家系进行了分析,发现肌细胞增强因子 2A (MEF2A) 基因是导致该家系患病的致病基因。其他冠心病或心肌梗死家系研究证实该基因是冠心病的致病基因。采用相同的家系连锁分析方法,Helgadottir 等分离到两个心肌梗死的致病基因,即涉及炎症和免疫通路的 ALOX5AP 和 LTA4H 基因,它们在冠心病发生中的作用得到许多研究的证实。目前用家系连锁分析方法已经定位了近 30 个基因位点,为进一步分离冠心病相关基因奠定了基础。分离和鉴定心血管病易感基因的另一个研究策略是候选基因关联分析,即选择参与冠心病发生发展过程中的相关基因,分析基因内多态位点在患者和正常对照群体中的频率差异,从而确定该多态位点在疾病发生中的作用。采用此方法已发现了数十个冠心病相关基因易感等位基因,如 ApoE 基因的 E4,MEHFR 基因的 C677T,ACE 基因的 DD, ApoB 基因的 GG,PAI1 基因的 4G/5G 等。Ozaki 等在 2 139 位研究对象(1 133 位心肌梗死患者)中共筛查了 13 738 个基因,发现 LTA(lymphotoxin- α)252A $\rightarrow$ G 和 10G $\rightarrow$ A 是心肌梗死的危险因素。Broeckel 等对 513 个 CHD 家族共 1 406 人进行全基因组扫描,利用方差分量法(variance component approach)结合心肌梗死危险因素分析,将其易感位点定位于 14 号染色体。近年来在 CHD 易感基因领域,虽然已进行了广泛深入的研究,但仅有 ApoE 和 LTA 与 CHD 的关系比较确定,其他均存在争议。

新近发展起来的以第三代 DNA 多态位点——单核苷酸多态位点(single nucleotide pol-

ymorphism, SNP) 为标记的基于全基因组的关联研究策略是一种不基于假设的、无偏倚的、全面筛选新基因的策略,从而克服了以往方法存在的局限性,所利用的多态位点 SNP 在基因组中分布广、密度高、易于分型,对于鉴定复杂疾病的易感基因具有巨大的潜力。通过连锁或关联分析定位疾病易感基因后,SNP 不仅可以作为遗传标记,而且某些 SNP 本身即可直接导致疾病,称为功能性 SNP。因此,SNP 在复杂疾病的早期预测、早期预防、早期诊断和早期治疗方面具有重大应用价值。随着 SNPlexTM, 多重 PCR-INVADER, GenomeLabTM SNPstream 等高通量基因型鉴定技术的发展,使得采用数千个甚至更多标记位点在全基因组中扫描疾病相关变异成为可能,为在分子水平上研究冠心病的发生和发展机制开辟了全新的思路,2002 年, Ozaki 等应用高通量的多重 PCR-INVADER 检测方法,采用 13 738 个基因的 92 788 个 SNPs 标记,对 1 133 例心肌梗死患者和 1 878 例正常对照者进行了关联分析和功能研究,发现淋巴毒素- α (lymphotoxin- α , LTA) 的基因变异(252A $\rightarrow$ G, Thr26Asn)是心肌梗死的易感基因。他们的进一步研究还发现,LTA 的配体基因 LGALS2 也是心肌梗死的易感基因,提示了分析基因网络作用的重要性。2005 年,美国 CELERA 研究小组采用分层分析方法从 6 891 个基因的 11 053 个 SNPs 中筛选出 4 个心肌梗死易感基因。国内研究机构对冠状动脉粥样硬化发病机制密切相关的抗氧化通路、炎症通路和凝血-纤溶通路、脂质代谢通路中的近 300 个重要基因进行了单倍型标签 SNP(TagSNP)筛查,确定了这些基因中的约 3 000 个 SNP 位点,并对其中 1 500 个 SNP 进行了系统的研究。利用目前国际上最先进的高通量基因分型系统(Illumina BeadLab Genotyping System)进行了基因分型工作及与冠心病的关联分析,发现 116 个 SNP 和 41 个单倍型与冠状动脉粥样硬化相关($P < 0.05$, $P_{\min} = 0.00008$),初步确定了 38 个中国人冠心病易感基因。其中炎症通路中的 ITGA2, CD36, VCAM1, 抗氧化通路中的 PON1 和凝血-纤溶通路中的 F5 等与冠状动脉粥样硬化的发生高度相关。

冠心病全基因组关联研究显示,PON1-162G/A, R160G 和 C 反应蛋白基因(CRP)-717A $\rightarrow$ G 多



态是中国汉族人群冠心病发生的遗传易感因素,-717A等位基因携带者更加易于患冠心病,PON1 基因-107T/C 多态独立地或与吸烟和饮酒联合影响血浆 PON1 活性。血管紧张素 II-1 型受体基因(AGTR1)rs2276736 和 rs5182 多态是心肌梗死发生的遗传易感因素。MMP3 基因-1612 5A/6A 多态与心肌梗死显著关联,5A 等位基因增加了发病的危险性。2000 年发现常染色体隐性家族性高胆固醇血症(autosomal recessive hypercholesterolemia, ARH)致病基因,2003 年发现第一个常染色体显性遗传冠心病致病基因——肌细胞增强因子 2A(myocyte enhancer factor 2A,MEF2A),均成为采用全基因组扫描连锁分析定位致病基因的范例。虽然人们通过全基因组扫描和候选基因策略,已在人类的染色体上定位了许多可能含有各种冠心病基因的位点,但具体的基因突变位点尚未被最终证实。

(二)基因治疗研究

基因治疗是指将基因导入人体的细胞,使其发挥生物学效应,从而达到治疗疾病目的的技术方法,随着心脏疾病分子学和基因基础研究的发展,基因治疗成为治疗心脏疾病一种可行的手段。通过转基因治疗,可以修饰心肌细胞,增强或抑制重要蛋白的表达,以达到治疗效果。基础研究提供了基因治疗的理论依据,新的影像技术推动了移植技术的发展。

1990 年美国对腺苷脱氨酶(ADA)基因缺陷的疾病进行了首例基因治疗并获成功,开创了人类基因治疗的历史。同年有学者做裸 DNA 心肌内直接注射基因治疗研究,如血管内皮生长因子注入心肌后可促进血管的新生和侧支循环的建立,使梗死部位的血流恢复,减轻甚至抑制心肌的缺血坏死,但此方法的基因转移效率不高,表达水平也因基因的不同而变异较大,且随时间的延长迅速下降。1993 年美国利用低密度脂蛋白受体(LDL-R)基因,成功地治疗了家族性高胆固醇血症,为心血管病基因治疗开辟了新的里程碑。后来有多名学者利用腺病毒载体将外源治疗性基因导入心肌或血管方面的试验,此方法的基因转移效率较高,且目的基因可长期表达,如 Charles 等在 Yorkshire 猪冠状动脉右回旋支放置缩窄环造成的慢性心肌缺血模型中,将 VEGF₁₂₁ 的 cDNA

构建到复制缺陷型腺病毒载体中形成 Ad_{Gv} VEGF₁₂₁,再将重组的 Ad_{Gv} VEGF₁₂₁ 直接多点心肌注射,3 周后血管造影发现缺血心肌侧支血管数目明显增加,同时心肌血流灌注和功能都有显著改善。腺病毒载体目前已成功地用于多项基因治疗的临床试验,但由于腺病毒致病基因未能完全去除,腺病毒载体对细胞有直接的细胞毒性作用,并诱发对转基因细胞的免疫反应,不能使目的基因长期表达,因此,腺病毒载体在需要目的基因长期表达的心脏疾病基因治疗中受到限制。

由于基因治疗成功与否的关键问题是载体及载体转移技术问题,故而近年来有关腺相关病毒载体(adeno-associated virus serotype, AAV)的研究和开发进展迅速,其完全去除 AAV 表达的病毒蛋白基因,本身无直接细胞毒性作用或免疫原性,且 AAV 载体能够转染分裂和非分裂细胞,具有整合到宿主基因组的特点,可使目的基因长期表达,这些特点使其具有腺病毒不能比拟的优点,更适用于心肌细胞的基因转移。AAV 载体在 1984 年被首次用于将新霉素抗性基因转导哺乳细胞,正是由于 AAV 载体在人体中至今没有检测到其所导致的病原性,因此被广泛应用于多种疾病的临床前研究,而且,rAAV 载体介导的外源基因能长期稳定表达,且有着广泛的宿主范围或细胞嗜向性,表现出作为人类基因治疗最有前景的载体之一。有研究发现,不同血清型的 AAV 具有不同的组织嗜向性,AAV1 和 AAV8 可将基因高效地传递给心肌,AAV9 对心肌有很强的靶向亲和性,其被心肌吸收的能力是 AAV1 的 200 倍,是 AAV8 的 5~10 倍。国外学者的研究结果表明,rAAV9 介导的基因能够有效和持久地转导到体外灌注的移植心脏中,认为 rAAV9 是一种基因治疗心脏疾病很有前途的载体。Inagaki 等研究认为,rAAV9 同 rAAV8 一样,是很合适的可应用于基因治疗的载体,而且作为特异性的心脏基因转导载体来说,rAAV9 明显优于 rAAV8。大量研究显示,AAV 已成功用于心脏转基因治疗的动物实验中,为进一步用于临床研究奠定了基础。

还有学者采用冠状动脉腔内基因定位转移导入的方法完成基因治疗,如我国熊一力等采用多聚赖氨酸包被球囊导管,将含 VEGF-cDNA 的真