

· 专题研究 · 血脂管理 ·

分子生物技术在家族性高胆固醇血症诊疗中的进展

张硕¹, 张龙, 张岩, 李建平*

100000 北京市, 北京大学第一医院心血管内科

*通信作者: 李建平, 主任医师/教授/博士生导师; E-mail: lijianping03455@pkufh.com



扫描二维码
查看原文

【摘要】 家族性高胆固醇血症是一种遗传性脂质代谢疾病, 其主要特征是患者低密度脂蛋白胆固醇明显升高, 进而增加罹患动脉粥样硬化性心血管疾病的风险, 对个体、家庭和社会带来严重影响。分子生物学技术的发展对家族性高胆固醇血症患者筛查、诊断和治疗均至关重要。本文系统总结了基因检测技术, 特别是第二代基因检测技术的发展提高了家族性高胆固醇血症筛查的效率和诊断的准确性, 但同时也引入了许多意义不明的突变。与药物治疗不同, 转基因技术或基因编辑技术可纠正家族性高胆固醇血症患者体内的分子缺陷, 有望在分子层面根治此病。但相关临床研究结果显示这些治疗方式存在肝损伤等不良反应, 并且仍需长期随访明确其疗效。因此, 本文综述了基因检测和基因治疗等分子生物学技术在家族性高胆固醇血症诊疗中的最新进展, 旨在为后续该病的诊断和治疗相关研究提供新的视角。

【关键词】 高胆固醇血症; 基因检测; 遗传筛查; 基因编辑

【中图分类号】 R 589.2 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2024.0126

Advances in Molecular Biotechnology for Diagnosing and Treating Familial Hypercholesterolemia

ZHANG Shuo, ZHANG Long, ZHANG Yan, LI Jianping*

Department of Cardiology, Peking University First Hospital, Beijing 100000, China

*Corresponding author: LI Jianping, Chief physician/Professor/Doctoral supervisor; E-mail: lijianping03455@pkufh.com

【Abstract】 Familial hypercholesterolemia (FH) is an inherited disorder of lipid metabolism characterized by significant elevation of low-density lipoprotein cholesterol, increasing the risk of atherosclerotic cardiovascular disease and causing serious consequences for FH patients and the whole society. The development of molecular biotechnology is crucial for screening, diagnosing, and treating patients with FH. This paper systematically summarizes how the development of genetic testing technologies, particularly next-generation sequencing, has improved the accuracy of diagnosis and efficiency of genetic screening for FH, while also introducing many variations of unknown significance. In contrast to pharmacotherapy, transgenic technology and gene editing technology offer the potential to rectify the molecular aberration within the patient's physiological system, holding promise for eradicating FH at the molecular level. However, preliminary results have shown that patients could suffer from side-effects, such as liver damage, and long-term follow-up is needed to clarify the efficacy of these technologies. Therefore, this article reviews the latest advances in molecular biotechnology, including genetic testing technology and gene therapy technology, in the diagnosis and treatment of FH, aiming to provide new perspectives for FH related research.

【Key words】 Hypercholesterolemia; Genetic testing; Genetic screening; Gene editing

家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia, FH)是一种遗传性脂质代谢疾病, 其特征是患者血浆中低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平异常升高, 进而使患者罹患动

脉粥样硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD)的风险明显增加。因筛查地区及诊断方式不同, 我国FH患病率为1/526~1/212^[1-2], 估计总体有超过550万例患者。但我国FH诊断率和治疗率

基金项目: 国家重点研究计划(2021YFC2500600, 2021YFC2500601)

引用本文: 张硕, 张龙, 张岩, 等. 分子生物技术在家族性高胆固醇血症诊疗中的进展[J]. 中国全科医学, 2024, 27(36): 4498-4504. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2024.0126. [www.chinagp.net]

ZHANG S, ZHANG L, ZHANG Y, et al. Advances in molecular biotechnology for diagnosing and treating familial hypercholesterolemia [J]. Chinese General Practice, 2024, 27(36): 4498-4504.

© Editorial Office of Chinese General Practice. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license.

均不足1%，导致多数患者错失最佳治疗时机^[3-5]。因此早期发现并治疗FH对患者个人、家庭，以及社会意义重大。

DNA测序在FH筛查和诊断中扮演着关键角色，其大致经历了3个阶段：第一个阶段也是第一例FH分子诊断，是通过Southern印记杂交技术寻找限制片段长度多态性实现的。由于患者的低密度脂蛋白受体（low-density lipoprotein receptor, LDLR）基因中存在特定变异，导致在使用限制性酶切时可能产生不同长度的片段，不同片段之间的组合可以确定个体的基因型。之后通过验证基因型在家系中多名患病亲属间是否存在共分离现象可帮助判断该变异与FH之间的致病性关联^[6]。但这种方法仅能针对部分FH患者中较为常见的已知杂合变异位点，且阳性率有限，不适用于筛查未知变异。第二阶段为聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）时期，包括可检出LDLR基因中大片段缺失的多重连接依赖性探针扩增、早期用于分辨是否存在FH相关单碱基改变的单链构象多态性分析、变性高效液相色谱分析，以及后来发展出可快速、经济地检出已知FH致病变异的多重扩增阻滞突变系统PCR。随着基因检测技术的不断成熟，应用双脱氧（Sanger）测序技术直接对LDLR基因所有外显子区域、载脂蛋白B（apoprotein B, ApoB）基因及前蛋白转换酶枯草溶菌素9（proprotein convertase subtilin/kexin type 9, PCSK9）基因的部分热点突变进行测序，并结合多重连接依赖性探针扩增检测大片段缺失逐渐成为主要的诊断方法。此后，越来越多的国家开始建立起DNA检测实验室，促进了测序技术的快速发展，并最终进入可同时对大规模碱基、大量样本进行检测的高通量测序时代，也就是称为二代测序（next-generation sequencing, NGS）的第三阶段^[7-10]。这些技术可同时检测多名患者全外显子甚至是全基因组的突变情况，极大地提高了基因诊断的效能，同时还揭示了多种未知突变，为FH遗传数据库的建立提供基础。

随着对血脂代谢通路了解的不断深入，多种针对不同靶点的降脂药物不断出现并应用于临床。对于不携带突变基因的高胆固醇血症患者，临床上仍以他汀类药物作为治疗基石，但常需与其他药物联用以达到指南推荐的血脂目标^[11-12]。对于杂合子型FH（heterozygous familial hypercholesterolemia, HeFH）患者，目前临床常需联合针对PCSK9靶点的药物进一步控制患者体内LDL-C水平，进而降低ASCVD发生风险^[13-14]。但对于LDLR蛋白功能完全丧失的纯合子型FH（homozygous familial hypercholesterolemia, HoFH）患者，通常需要在联合药物降脂治疗的基础上定期进行脂蛋白分离，严重影响患者的预后。目前正在开发的转基因技术和基因编辑技术有望纠正FH患者的分子缺陷，为HoFH患者脱

离脂蛋白分离带来希望。因此本文综述了在分子生物技术发展的背景下FH的筛查、基因诊断，以及治疗的最新进展。期望为后续FH诊疗相关研究提供思路。

1 本文文献检索策略

计算机检索PubMed、Web of Science等数据库，检索时间设置为建库至2024年4月。检索的关键词包括“Familial Hypercholesterolemia”及相关主题词“genetic testing”“screening”“Next-Generation Sequencing”“CRISPR/Cas9”“gene editing”“atherosclerosis”“coronary heart disease”。纳入标准：符合遗传性血脂异常中以LDL-C升高为主的II型高胆固醇血症（即HeFH和HoFH），除外其他遗传性血脂异常疾病如家族性异常β-脂蛋白血症、家族性脂蛋白脂酶缺乏症、丹吉尔病、家族性卵磷脂胆固醇酰基转移酶（LCAT）缺乏症等。同时包含筛查、基因诊断以及治疗等主题相关的文献。排除标准：与本文无关、无法获得全文、内容存疑的文献。共纳入参考文献69篇。

2 FH基因筛查

FH的早期识别关键在于筛查。目前存在多种筛查方式，如普遍筛查、系统筛查、靶向筛查、机会筛查等。其中级联筛查主要针对已确诊FH患者的直系亲属，可高效识别潜在患者，在所有筛查方式中最为重要^[15]。鉴于儿童时期，特别是HoFH患儿更易被发现，因此有学者提出了“儿童-父母筛查”法^[16]：在婴儿12个月接种疫苗时检测血脂，若发现异常，再使用NGS技术确认是否存在FH变异。若存在阳性结果则进行父母及一级亲属的筛查。英国的一项试点项目已证明此方法经济高效，但仍需官方进一步批准^[17]。FH基因筛查可分为靶向基因检测（如基因芯片）和全基因组检测（如NGS技术）。靶向基因检测的优点是成本低、速度快，但仅能检测确定的基因突变。全基因组检测虽然成本高^[18]，但能更有效地发现少见基因的突变，如PCSK9基因、低密度脂蛋白受体衔接蛋白1（LDL receptor adaptor protein 1, LDLRAP1）基因。研究显示，对同一批可疑FH患者进行筛查，采用全外显子基因检测技术可发现约27%的患者存在基因突变；而使用靶向基因检测仅能发现8%的患者存在突变，漏诊率较高^[19]。BENEDEK等^[18]发现瑞典FH人群中存在特定的高频突变基因，其中LDLR基因突变占所有突变的96%，以（c.2311+1_2312-1）（2514）del（FH Helsinki）和c.259T>G突变为主。因此建议对可疑FH患者首先进行特定的靶向基因检测，再根据需要采用NGS进一步明确诊断。相比之下，ZHANG等^[20]对我国疑似FH患者基因突变的调查结果提示我国患者人群中无特定的高频

突变基因,其中LDLR基因突变占37%,ATP结合盒蛋白G超家族成员5/8基因突变各占7%,脂蛋白脂肪酶与脂肪酶C基因突变各占3%,双基因突变占7%。因此不建议我国采用靶向基因检测进行FH筛查。同时,BELLOWS等^[21]对美国FH筛查的研究提示单独使用基因检测时,每1000人筛查出约3.7例患者;单独使用DLCN(Dutch Lipid Clinic Network)诊断标准时,每1000人筛查出约3.8例患者。但将DLCN诊断标准与基因检测相结合时,每1000人筛查出6.6例患者,极大提高了筛查效率。因此根据我国FH流行病学特点,建议使用NGS结合相关临床诊断标准进行FH筛查,以提高成本效益。同时可在试点地区开展“儿童-父母筛查”法检验其在我国的社会和经济价值。

3 FH基因诊断

3.1 基因检测用于确诊FH

有研究显示,LDLR、ApoB、PCSK9、载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)和LDLRAP1基因的致病性突变是FH的主要病因(表1)^[22-27]。LDLR基因突变主要为单碱基突变,广泛分布在第2~14外显子,其中以第4外显子最多见,可能与其编码LDLR关键蛋白结构域有关^[28-31]。LDLR基因重排约占FH变异的10%,可归为拷贝数变异^[32]。LDLR基因的某些内含子变异,例如c.2140+103G>T^[33]和c.2141-218G>A^[34]也可能影响基因剪接或转录,进而导致FH的发生。ApoB基因突变多集中在第26号外显子,尤其是3500号密码子附近^[35]。目前已发现超过100个变异,其中90%是碱基置换、8%是缺失、2%是插入^[36]。近期发现ApoB基因的第3、第22和第29号外显子的某些变异,如p.(Arg50Trp)^[37]、p.(Arg3527Gln)^[38]和p.(Arg3527Trp)^[39],可能引起ApoB与LDLR结合障碍,进而导致LDL-C水平升高^[40]。PCSK9基因突变在FH中占比较少,以单核苷酸变异为主^[41]。ClinVar数据库记录了约1000种突变,其中仅15种被认为是致病或可能致病^[42]。这与PCSK9基因突变的类型较为复杂,难以判断其致病性有关。ApoE基因的某些突变与FH的表型有关,如p.(Arg163Cys)^[41]和p.(Leu167del)^[43]。在临床疑似的FH的患者也发现了其他ApoE基因突变,但因缺乏功能学分析和家系研究,目前尚无法明确分类^[44]。LDLRAP1基因突变导致的FH为常染色体隐性致病,目前记录约100种变异,其中34种被认为致病,多数为插入或缺失^[45]。与其他致病基因相比,LDLRAP1突变携带者的ASCVD事件发生率较低,且发病年龄更晚^[46]。

3.2 意义不明突变

随着全球越来越多的国家建立FH分子诊断实验室

并发展商业检测服务,识别出的变异数量显著增加^[7]。然而,仅在FH患者中发现突变并不能确认其致病性。2015年,美国医学遗传学与基因组学学会发布了一项基因突变分类指南^[47],根据多种数据类型(如人群数据、软件预测、功能数据、共分离数据等),将突变分为良性、可能良性、意义不明、可能致病和致病五类。英国临床基因组学协会根据美国医学遗传学与基因组学学会指南,将大部分LDLR基因变异分类为致病,少数仍视为意义不明。ClinGen(clinical genome resource)下属的FH变异解读专家组针对LDLR基因发布了特定解读规则^[31],明确了LDLR蛋白中半胱氨酸残基和功能域的重要性以及变异致病性的评估标准,如变异在健康和患者群体中的携带比例、家系共分离的证据等。这套解读标准有助于实验室统一判断新变异体的致病性。此外,目前还有多种生物信息学分析方法可基于NGS的结果预测拷贝数目变异是否致病,简化了FH基因序列分析流程^[48]。

3.3 基因检测发现获益的突变

近期BJORNSSON等^[49]在冰岛的家系中发现了一种增强LDLR基因功能的突变。该突变是LDLR基因3'非编码区尾端2.5 kb碱基的缺失,导致失去了一个抑制LDLR基因表达的microRNA靶点。这种突变使携带者的LDLR蛋白水平比非携带者高出1.79倍,从而使LDL-C水平降低了约74%。MENG等^[50]在我国维吾尔族人群中发现了2种PCSK9基因功能缺失突变E144K和C378W。这2种突变可抑制PCSK9蛋白的自裂解或内质网的释放,有效降低PCSK9蛋白的表达。因此对未经药物干预的血脂水平极低的患者进行基因检测并进行功能学研究可以更加深入了解蛋白功能,提供对血脂干预的新靶点,对临床具有重要的意义。

4 FH基因治疗

基因治疗是利用特定的工具纠正患者体内的遗传分子缺陷,恢复正常的生理功能。因此理论上基因治疗有望在分子层面根治FH,具有广阔的应用前景。当前主要包括2种基因治疗手段:一种是以腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体的转基因技术,目前已获美国食品药品监督管理局批准用于治疗遗传性视网膜营养不良和脊髓性肌萎缩症等疾病^[51-52]。AAV-8介导的基因治疗在LDLR基因敲除小鼠的临床前研究中显示,该方法可在小鼠体内重新产生LDLR蛋白并降低LDL-C水平,进而逆转动脉斑块的进展^[53-54]。但针对HoFH患者AAV-8介导的基因治疗I/II期临床试验(NCT02651675)并未显示患者体内LDL-C水平显著下降,并且观察到受试者的转氨酶呈剂量依赖性升高,考虑与T细胞对病毒载体的自身免疫有关^[55-56]。另一种

表 1 家族性高胆固醇血症致病基因基本信息

Table 1 Basic information on genes responsible for familial hypercholesterolemia

名称	定位	长度 (kb)	功能	占比
LDLR	19号染色体 p13.1-13.3	45	通过受体介导的内吞作用回收 LDL-C	93%~95%
ApoB	2号染色体 2p24.1	43	作为 LDLR 蛋白的配体, 协同调控 LDL-C 的回收	4%~5%
PCSK9	1号染色体 p32 短臂	39	介导 LDLR 蛋白定向运输至溶酶体内降解	<1%
ApoE	19号染色体 q13.32	3.6	参与肝细胞摄取乳糜微粒、极低密度脂蛋白和高密度脂蛋白, 促进脂蛋白清除	极少
LDLRAP1	1号染色体 p36.11	29	构建 LDLR 蛋白内吞囊泡的关键结构成分	极少

注: LDLR= 低密度脂蛋白受体, ApoB= 载脂蛋白 B, PCSK9= 前蛋白转换酶枯草溶菌素 9, ApoE= 载脂蛋白 E, LDLRAP1= 低密度脂蛋白受体衔接蛋白 1, LDL= 低密度脂蛋白胆固醇。

手段是利用 CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated systems) 技术精确编辑生物体内 DNA 序列的基因编辑技术, 目前该技术已应用于治疗淀粉样变性和镰刀型地中海贫血^[57-58]。目前使用 CRISPR/Cas 技术开发的针对不同胆固醇代谢靶点的基因治疗方式正在进行临床前研究^[59-62]。据最新的非灵长类动物实验结果, 使用脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticles, LNPs) 传递的 CRISPR 能破坏实验动物 PCSK9 基因的表达, 使其血液中的 PCSK9 蛋白水平降低 83%, LDL-C 水平降低 69%, 疗效可持续至给药后 476 d。观察到的主要不良反应为一过性肝酶升高, 但肝脏病理解剖未见特殊改变, 提示该方法具有临床应用的可能性^[63]。目前相关的人体 I 期临床试验 (NCT05398029) 已经启动。针对胆固醇代谢靶点的疫苗研究正处于早期阶段。其预期效果类似于单克隆抗体, 但能在体内持续产生抗体, 可达到更持久的效果。2 种针对 PCSK9 蛋白的疫苗已进行 I 期安全性检测, 其中 1 种候选疫苗 (AT04A) 在 90 周时显示 LDL-C 水平可降低 7.2%, 其较常见的全身治疗相关不良事件包括疲劳、头痛和肌痛^[64]。血管生成素样蛋白 3 蛋白 (angiopoietin like 3, ANGPTL3) 可抑制脂蛋白脂肪酶和内皮脂肪酶, 进而参与脂质代谢的调节^[65]。因其调节血脂不依赖于 LDLR 蛋白, 故理论上可用于 FH 患者的治疗。目前已有利用抑制 ANGPTL3 的全人源单克隆抗体 Evinacumab 治疗 HoFH 及 HeFH 的临床试验证明该药物具有明确的降脂效果和良好的安全性^[66-68]。针对 ANGPTL3 的疫苗同样正处于临床前开发阶段, 并且在 FH 小鼠模型中初步证明存在减轻 ASCVD 的疗效^[69]。但仍需更多的

研究证明其安全性和有效性。

5 总结与展望

FH 作为一种较为常见的遗传性脂质代谢紊乱疾病, 其诊疗的进步与分子生物技术的不断演进密切相关。分子生物技术在 FH 诊疗中的多方面发挥着关键作用, 主要包括 (1) 筛查优化: 在早期发现 FH 方面, 目前各国广泛采用级联筛查这一手段。最近提出的“儿童-父母筛查”法结合了普查与反向筛查两种优点, 不仅有助于早期发现 FH 患儿, 还能追溯潜在携带 FH 致病突变基因的父母, 在理论和初步实践中均呈现出良好的经济效益。同时根据不同国情, 选择适宜的基因筛查方式至关重要。我国疑似 FH 患者基因突变种类繁多, 采用固定基因芯片筛查可能导致漏诊率升高, 并且基因检测联合 DLCN 等临床标准可显著提高筛查的效率。因此倡导我国使用 NGS 联合 DLCN 等临床标准进行 FH 筛查。(2) 基因检测优化: 随着 NGS 技术的不断进步, 疑似 FH 患者的确诊率持续升高。对于最新发现意义不明的突变, 国际上已发布相关基因突变解读指南, 有助于对其进行分类, 同时有望利用生物信息分析方法简化其分析流程。对血脂降低的患者进行基因检测可发现潜在降脂治疗新靶点, 对临床诊疗也具有重要意义。(3) 基因治疗: 采用基因编辑或转基因技术治疗 FH 的可行性已经在动物实验中得到验证。数个 I / II 期临床试验正在进行, 旨在验证在人体中的疗效及安全性, 为根治 FH 带来新的希望。

目前的研究尚存在一些不足。首先, “儿童-父母筛查”法尚未获得伦理和政府批准, 需要在更多地区的人群中进行验证以明确其筛查效能。其次, 由于 NGS 技术普及时间较短、成本偏高, 目前大多数研究仍采用 Sanger 测序方法检测部分靶基因片段, 因此存在漏诊的可能, 导致对 FH 患病率的低估。随着 NGS 技术的推广及成本的下降, 后续研究可以采用全外显子检测甚至全基因组检测以提高研究的准确性。最后, 对于 FH 的基因治疗, 目前利用腺相关病毒载体或 CRISPR/Cas 基因编辑技术进行的基因治疗在临床前研究中取得了一定的成果, 但初步结果提示其存在肝损伤等不良反应, 仍需要长期随访以明确治疗相关不良反应、降脂疗效和对患者的预后价值。

作者贡献: 张硕负责文章的构思、研究资料的收集与整理、论文撰写; 张龙负责论文修订、文章的质量控制及审校; 张岩、李建平负责研究命题的提出、设计、文章质量的审校、对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

张硕 : <https://orcid.org/0009-0004-0192-3867>

参考文献

- [1] AIHAITI X, CHEN S F, LI J X, et al. Prevalence of familial hypercholesterolemia and its association with coronary artery disease: a Chinese cohort study [J] . *Chronic Dis Transl Med*, 2023, 9 (2) : 134–142. DOI: 10.1002/cdt3.69.
- [2] ZHOU Y C, LUO G, ZHANG A, et al. Genetic identification of familial hypercholesterolemia within whole genome sequences in 6820 newborns [J] . *Clin Genet*, 2024, 105 (3) : 308–312. DOI: 10.1111/cge.14453.
- [3] AMERIZADEH A, JAVANMARD S H, SARRAFZADEGAN N, et al. Familial hypercholesterolemia (FH) registry worldwide: a systematic review [J] . *Curr Probl Cardiol*, 2022, 47 (10) : 100999. DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2021.100999.
- [4] CHEN P P, CHEN X, ZHANG S Y. Current status of familial hypercholesterolemia in China: a need for patient FH registry systems [J] . *Front Physiol*, 2019, 10: 280. DOI: 10.3389/fphys.2019.00280.
- [5] SHI Z M, YUAN B J, ZHAO D, et al. Familial hypercholesterolemia in China: prevalence and evidence of underdetection and undertreatment in a community population [J] . *Int J Cardiol*, 2014, 174 (3) : 834–836. DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.04.165.
- [6] FUTEMA M, TAYLOR–BEADLING A, WILLIAMS M, et al. Genetic testing for familial hypercholesterolemia—past, present, and future [J] . *J Lipid Res*, 2021, 62: 100139. DOI: 10.1016/j.jlcr.2021.100139.
- [7] TAYLOR A, WANG D, PATEL K, et al. Mutation detection rate and spectrum in familial hypercholesterolaemia patients in the UK pilot cascade project [J] . *Clin Genet*, 2010, 77 (6) : 572–580. DOI: 10.1111/j.1399–0004.2009.01356.x.
- [8] BODAMER O A, BERCOVICH D, SCHLABACH M, et al. Use of denaturing HPLC to provide efficient detection of mutations causing familial hypercholesterolemia [J] . *Clin Chem*, 2002, 48 (11) : 1913–1918.
- [9] JENSEN H K, JENSEN L G, HANSEN P S, et al. High sensitivity of the single–strand conformation polymorphism method for detecting sequence variations in the low–density lipoprotein receptor gene validated by DNA sequencing [J] . *Clin Chem*, 1996, 42 (8 Pt 1) : 1140–1146.
- [10] TAYLOR A, TABRAH S, WANG D, et al. Multiplex ARMS analysis to detect 13 common mutations in familial hypercholesterolaemia [J] . *Clin Genet*, 2007, 71 (6) : 561–568. DOI: 10.1111/j.1399–0004.2007.00807.x.
- [11] CUCHEL M, RAAL F J, HEGELE R A, et al. 2023 Update on European Atherosclerosis Society Consensus Statement on Homozygous Familial Hypercholesterolaemia: new treatments and clinical guidance [J] . *Eur Heart J*, 2023, 44 (25) : 2277–2291. DOI: 10.1093/eurheartj/ehad197.
- [12] IYEN B, AKYEA R K, WENG S, et al. Statin treatment and LDL–cholesterol treatment goal attainment among individuals with familial hypercholesterolaemia in primary care [J] . *Open Heart*, 2021, 8 (2) : e001817. DOI: 10.1136/openhrt–2021–001817.
- [13] WATTS G F, GIDDING S S, HEGELE R A, et al. International Atherosclerosis Society guidance for implementing best practice in the care of familial hypercholesterolaemia [J] . *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20 (12) : 845–869. DOI: 10.1038/s41569–023–00892–0.
- [14] WATTS G F, SULLIVAN D R, HARE D L, et al. Integrated guidance for enhancing the care of familial hypercholesterolaemia in Australia [J] . *Heart Lung Circ*, 2021, 30 (3) : 324–349. DOI: 10.1016/j.hlc.2020.09.943.
- [15] MACH F, BAIGENT C, CATAPANO A L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk [J] . *Eur Heart J*, 2020, 41 (1) : 111–188. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz455.
- [16] WALD D S, BESTWICK J P, MORRIS J K, et al. Child–parent familial hypercholesterolemia screening in primary care [J] . *N Engl J Med*, 2016, 375 (17) : 1628–1637. DOI: 10.1056/NEJMoa1602777.
- [17] MCKAY A J, HOGAN H, HUMPHRIES S E, et al. Universal screening at age 1–2 years as an adjunct to cascade testing for familial hypercholesterolaemia in the UK: a cost–utility analysis [J] . *Atherosclerosis*, 2018, 275: 434–443. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.05.047.
- [18] BENEDEK P, JIAO H, DUVEFELT K, et al. Founder effects facilitate the use of a genotyping–based approach to molecular diagnosis in Swedish patients with familial hypercholesterolaemia [J] . *J Intern Med*, 2021, 290 (2) : 404–415. DOI: 10.1111/joim.13287.
- [19] STURM A C, TRUTY R, CALLIS T E, et al. Limited–variant screening vs comprehensive genetic testing for familial hypercholesterolemia diagnosis [J] . *JAMA Cardiol*, 2021, 6 (8) : 902–909. DOI: 10.1001/jamacardio.2021.1301.
- [20] ZHANG Q W, CHANG G Y, TANG Y J, et al. Genotypic and phenotypic features of dyslipidemia in a sample of pediatric patients in China [J] . *BMC Pediatr*, 2023, 23 (1) : 138. DOI: 10.1186/s12887–023–03952–z.
- [21] BELLOWS B K, KHERA A V, ZHANG Y Y, et al. Estimated yield of screening for heterozygous familial hypercholesterolemia with and without genetic testing in US adults [J] . *J Am Heart Assoc*, 2022, 11 (11) : e025192. DOI: 10.1161/JAHA.121.025192.
- [22] SRIVASTAVA R A K. A review of progress on targeting LDL receptor–dependent and–independent pathways for the treatment of hypercholesterolemia, a major risk factor of ASCVD [J] . *Cells*, 2023, 12 (12) : 1648. DOI: 10.3390/cells12121648.
- [23] RODRÍGUEZ–JIMÉNEZ C, DE LA PEÑA G, SANGUINO J, et al. Identification and functional analysis of ApoB variants in a cohort of hypercholesterolemic patients [J] . *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (8) : 7635. DOI: 10.3390/ijms24087635.

- [24] ABIFADEL M, VARRET M, RABÈS J P, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia [J]. *Nat Genet*, 2003, 34 (2): 154–156. DOI: 10.1038/ng1161.
- [25] MARAIS A D. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease [J]. *Pathology*, 2019, 51 (2): 165–176. DOI: 10.1016/j.pathol.2018.11.002.
- [26] ISMAIL A B, BALCIÖĞLU Ö, ÖZCEM B, et al. ApoE gene variation's impact on cardiovascular health: a case-control study [J]. *Biomedicines*, 2024, 12 (3): 695. DOI: 10.3390/biomedicines12030695.
- [27] GARCIA C K, WILUND K, ARCA M, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein [J]. *Science*, 2001, 292 (5520): 1394–1398. DOI: 10.1126/science.1060458.
- [28] HOBBS H H, BROWN M S, GOLDSTEIN J L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia [J]. *Hum Mutat*, 1992, 1 (6): 445–466. DOI: 10.1002/humu.1380010602.
- [29] GARCÍA-GARCÍA A B, REAL J T, PUIG O, et al. Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Spain: ten novel LDLR mutations and population analysis [J]. *Hum Mutat*, 2001, 18 (5): 458–459. DOI: 10.1002/humu.1218.
- [30] JEON H, BLACKLOW S C. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor [J]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 535–562. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133354.
- [31] CHORA J R, IACOCCA M A, TICHÝ L, et al. The Clinical Genome Resource (ClinGen) Familial Hypercholesterolemia Variant Curation Expert Panel consensus guidelines for LDLR variant classification [J]. *Genet Med*, 2022, 24 (2): 293–306. DOI: 10.1016/j.gim.2021.09.012.
- [32] BERBERICH A J, HEGELE R A. The role of genetic testing in dyslipidaemia [J]. *Pathology*, 2019, 51 (2): 184–192. DOI: 10.1016/j.pathol.2018.10.014.
- [33] REESKAMP L F, HARTGERS M L, PETER J, et al. A deep intronic variant in LDLR in familial hypercholesterolemia [J]. *Circ Genom Precis Med*, 2018, 11 (12): e002385. DOI: 10.1161/CIRCGEN.118.002385.
- [34] REESKAMP L F, BALVERS M, PETER J, et al. Intronic variant screening with targeted next-generation sequencing reveals first pseudoexon in LDLR in familial hypercholesterolemia [J]. *Atherosclerosis*, 2021, 321: 14–20. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.02.003.
- [35] MISEREZ A R, KELLER U. Differences in the phenotypic characteristics of subjects with familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15 (10): 1719–1729. DOI: 10.1161/01.atv.15.10.1719.
- [36] VRABLIK M, TICHÝ L, FREIBERGER T, et al. Genetics of familial hypercholesterolemia: new insights [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 574474. DOI: 10.3389/fgene.2020.574474.
- [37] THOMAS E R A, ATANUR S S, NORSWORTHY P J, et al. Identification and biochemical analysis of a novel ApoB mutation that causes autosomal dominant hypercholesterolemia [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2013, 1 (3): 155–161. DOI: 10.1002/mgg3.17.
- [38] HUMPHRIES S E, WHITTALL R A, HUBBART C S, et al. Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk [J]. *J Med Genet*, 2006, 43 (12): 943–949. DOI: 10.1136/jmg.2006.038356.
- [39] GAFFNEY D, REID J M, CAMERON I M, et al. Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15 (8): 1025–1029. DOI: 10.1161/01.atv.15.8.1025.
- [40] ALVES A C, ETXEBARRIA A, SOUTAR A K, et al. Novel functional ApoB mutations outside LDL-binding region causing familial hypercholesterolaemia [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23 (7): 1817–1828. DOI: 10.1093/hmg/DDT573.
- [41] KARCZEWSKI K J, FRANCIOLI L C, TIAO G, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141, 456 humans [J]. *Nature*, 2020, 581 (7809): 434–443. DOI: 10.1038/s41586-020-2308-7.
- [42] LANDRUM M J, LEE J M, RILEY G R, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42 (Database issue): D980–985. DOI: 10.1093/nar/gkt1113.
- [43] MARDUEL M, OUGUERRAM K, SERRE V, et al. Description of a large family with autosomal dominant hypercholesterolemia associated with the ApoE p.Leu167del mutation [J]. *Hum Mutat*, 2013, 34 (1): 83–87. DOI: 10.1002/humu.22215.
- [44] WINTJENS R, BOZON D, BELABBAS K, et al. Global molecular analysis and ApoE mutations in a cohort of autosomal dominant hypercholesterolemia patients in France [J]. *J Lipid Res*, 2016, 57 (3): 482–491. DOI: 10.1194/jlr.P055699.
- [45] FELLIN R, ARCA M, ZULIANI G, et al. The history of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH). From clinical observations to gene identification [J]. *Gene*, 2015, 555 (1): 23–32. DOI: 10.1016/j.gene.2014.09.020.
- [46] NAOUMOVA R P, NEUWIRTH C, LEE P, et al. Autosomal recessive hypercholesterolaemia: long-term follow up and response to treatment [J]. *Atherosclerosis*, 2004, 174 (1): 165–172. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.01.020.
- [47] RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology [J]. *Genet Med*, 2015, 17 (5): 405–424. DOI: 10.1038/gim.2015.30.
- [48] IACOCCA M A, WANG J, DRON J S, et al. Use of next-generation sequencing to detect LDLR gene copy number variation in

- familial hypercholesterolemia [J]. *J Lipid Res*, 2017, 58 (11): 2202–2209. DOI: 10.1194/jlr.D079301.
- [49] BJORNSSON E, GUNNARSDOTTIR K, HALLDORSSON G H, et al. Lifelong Reduction in LDL (low-density lipoprotein) cholesterol due to a gain-of-function mutation in LDLR [J]. *Circ Genom Precis Med*, 2021, 14 (1): e003029. DOI: 10.1161/CIRCGEN.120.003029.
- [50] MENG F H, LIU S, XIAO J, et al. New loss-of-function mutations in PCSK9 reduce plasma LDL cholesterol [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2023, 43 (7): 1219–1233. DOI: 10.1161/ATVBAHA.122.318839.
- [51] RUSSELL S, BENNETT J, WELLMAN J A, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2017, 390 (10097): 849–860. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31868-8.
- [52] MENDELL J R, AL-ZAIDY S, SHELL R, et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377 (18): 1713–1722. DOI: 10.1056/NEJMoa1706198.
- [53] KASSIM S H, LI H, VANDENBERGHE L H, et al. Gene therapy in a humanized mouse model of familial hypercholesterolemia leads to marked regression of atherosclerosis [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (10): e13424. DOI: 10.1371/journal.pone.0013424.
- [54] GREIG J A, LIMBERIS M P, BELL P, et al. Nonclinical pharmacology/toxicology study of AAV8.TBG.mLDLR and AAV8.TBG.hLDLR in a mouse model of homozygous familial hypercholesterolemia [J]. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2017, 28 (1): 28–38. DOI: 10.1089/humc.2017.007.
- [55] TROMP T R, CUCHEL M. New algorithms for treating homozygous familial hypercholesterolemia [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2022, 33 (6): 326–335. DOI: 10.1097/MOL.0000000000000853.
- [56] GEORGE L A, SULLIVAN S K, GIERMASZ A, et al. Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377 (23): 2215–2227. DOI: 10.1056/NEJMoa1708538.
- [57] GILLMORE J D, GANE E, TAUBEL J, et al. CRISPR-Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis [J]. *N Engl J Med*, 2021, 385 (6): 493–502. DOI: 10.1056/NEJMoa2107454.
- [58] FRANGOUL H, ALTSHULER D, CAPPELLINI M D, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384 (3): 252–260. DOI: 10.1056/NEJMoa2031054.
- [59] MUSUNURU K, CHADWICK A C, MIZOGUCHI T, et al. In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in Primates [J]. *Nature*, 2021, 593 (7859): 429–434. DOI: 10.1038/s41586-021-03534-y.
- [60] DOERFLER A M, PARK S H, ASSINI J M, et al. LPA disruption with AAV-CRISPR potently lowers plasma apo (a) in transgenic mouse model: a proof-of-concept study [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2022, 27: 337–351. DOI: 10.1016/j.omtm.2022.10.009.
- [61] ZHA Y W, LU Y Y, ZHANG T, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of ApoC3 stabilizes plasma lipids and inhibits atherosclerosis in rabbits [J]. *Lipids Health Dis*, 2021, 20 (1): 180. DOI: 10.1186/s12944-021-01605-7.
- [62] MUSUNURU K. Moving toward genome-editing therapies for cardiovascular diseases [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132 (1): e148555. DOI: 10.1172/JCI148555.
- [63] LEE R G, MAZZOLA A M, BRAUN M C, et al. Efficacy and safety of an investigational single-course CRISPR base-editing therapy targeting PCSK9 in nonhuman primate and mouse models [J]. *Circulation*, 2023, 147 (3): 242–253. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.062132.
- [64] ZEITLINGER M, BAUER M, REINDL-SCHWAIGHOFER R, et al. A phase I study assessing the safety, tolerability, immunogenicity, and low-density lipoprotein cholesterol-lowering activity of immunotherapeutics targeting PCSK9 [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2021, 77 (10): 1473–1484. DOI: 10.1007/s00228-021-03149-2.
- [65] DEWEY F E, GUSAROVA V, DUNBAR R L, et al. Genetic and pharmacologic inactivation of ANGPTL3 and cardiovascular disease [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377 (3): 211–221. DOI: 10.1056/NEJMoa1612790.
- [66] KUEHN B M. Evinacumab approval adds a new option for homozygous familial hypercholesterolemia with a hefty price tag [J]. *Circulation*, 2021, 143 (25): 2494–2496. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.055463.
- [67] STEFANUTTI C, CHAN D C, GIACOMO S D, et al. Long-term efficacy and safety of evinacumab in patients with homozygous familial hypercholesterolemia: real-world clinical experience [J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15 (11): 1389. DOI: 10.3390/ph15111389.
- [68] ROSENSEN R S, BURGESS L J, EBENBICHLER C F, et al. Evinacumab in patients with refractory hypercholesterolemia [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383 (24): 2307–2319. DOI: 10.1056/NEJMoa2031049.
- [69] FUKAMI H, MORINAGA J, NAKAGAMI H, et al. Vaccine targeting ANGPTL3 ameliorates dyslipidemia and associated diseases in mouse models of obese dyslipidemia and familial hypercholesterolemia [J]. *Cell Rep Med*, 2021, 2 (11): 100446. DOI: 10.1016/j.xcrm.2021.100446.

(收稿日期: 2024-03-20; 修回日期: 2024-05-20)

(本文编辑: 赵跃翠)