

ATG16L1 基因启动子单核苷酸多态性可增加急性心肌梗死的易感性

韩发兰¹, 逢淑超², 崔英华³, 闫波^{2,4,5}

(1. 山东大学齐鲁医学院, 山东省济南市 250012; 2. 山东省心脏病诊疗重点实验室, 山东省济宁市 272029; 3. 济宁医学院附属医院心内科, 山东省济宁市 272029; 4. 济宁医学院附属医院心血管疾病分子遗传学中心, 山东省济宁市 272029; 5. 山东省中美转化医学合作研究中心, 山东省济宁市 272029)

[关键词] 急性心肌梗死; ATG16L1 基因启动子; 单核苷酸多态性; 转录因子

[摘要] **目的** 探讨 ATG16L1 基因启动子序列单核苷酸多态性(SNP)与急性心肌梗死(AMI)的相关性。**方法** 采用病例-对照研究方法,对 285 例 AMI 患者和 296 例对照人群的 ATG16L1 基因启动子采用聚合酶链反应扩增片段并测序,结合 DNA 测序后的序列及比对 SNP 数据库后进行数据统计和分析。运用 Hardy-Weinberg 平衡检验后,应用 χ^2 检验和 t 检验进行相关分析。采用 Logistic 回归对多种危险因素以及 3 个 SNP 位点与 AMI 易感性进行关联性分析。用 Haploview 4.2 软件和 SHEsis 在线软件进行连锁不平衡及单倍型分析。TRANSFAC 数据库用于预测可能受 SNP 影响的转录因子的结合位点。**结果** 多因素 Logistic 回归分析结果显示男性、吸烟史、高血压是 AMI 的独立危险因素($P < 0.05$),而高密度脂蛋白胆固醇是 AMI 的保护因素($P < 0.05$)。在 ATG16L1 基因启动子序列中的 3 个 SNP(rs1816753、rs12476635、rs2289477)中,rs1816753 的 TC 基因型与 AMI 间存在关联,可明显增加 AMI 的患病风险($OR = 2.519, 95\% CI: 1.130 \sim 5.615, P = 0.024$)。通过 Haploview 4.2 软件分析显示 3 个 SNP 之间呈强连锁。**结论** ATG16L1 基因启动子 SNP 可能与 AMI 易感性相关,rs1816753 的 TC 基因型可能是 AMI 的遗传危险因素。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

Single nucleotide polymorphism of ATG16L1 gene promoter increases susceptibility to acute myocardial infarction

HAN Falan¹, PANG Shuchao², CUI Yinghua³, YAN Bo^{2,4,5}

(1. Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Cardiac Disease Diagnosis and Treatment, Jining, Shandong 272029, China; 3. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining, Shandong 272029, China; 4. Center for Molecular Genetics of Cardiovascular Diseases, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining, Shandong 272029, China; 5. Shandong Provincial Sino-US Cooperation Research Center for Translational Medicine, Jining, Shandong 272029, China)

[KEY WORDS] acute myocardial infarction; ATG16L1 gene promoter; single nucleotide polymorphism; transcription factor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between single nucleotide polymorphism (SNP) of ATG16L1 gene promoter sequence and acute myocardial infarction (AMI). **Methods** The ATG16L1 gene promoter was amplified and sequenced by polymerase chain reaction in 285 AMI patients and 296 controls using case-control method. Combined with DNA sequencing sequence and alignment SNPs database, data statistics and analysis were carried out. After using the Hardy-Weinberg balance test, the χ^2 test and t test were used for correlation analysis. Logistic regression was used to analyze the association of multiple risk factors and three SNPs loci with susceptibility to AMI. Haploview 4.2 software and SHEsis online software were used for linkage disequilibrium and haplotype analysis. TRANSFAC database was

[收稿日期] 2020-10-19

[修回日期] 2021-03-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81370271,81870279)

[作者简介] 韩发兰,硕士研究生,研究方向为临床心血管病,E-mail 为 hanfalan@163.com。通信作者闫波,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为心脏分子遗传学,E-mail 为 yanbo@mail.jnmc.edu.cn。

used to predict the binding sites of transcription factors that may be affected by SNPs. **Results** Multivariate Logistic regression analysis showed that male, smoking history, and hypertension were independent risk factors for AMI ($P < 0.05$), while high density lipoprotein cholesterol was a protective factor for AMI ($P < 0.05$). Among the three SNPs (rs1816753, rs12476635, rs2289477) in the promoter sequence of ATG16L1 gene, the TC genotype of rs1816753 was associated with AMI, which significantly increased the risk of AMI (OR=2.519, 95% CI:1.130~5.615, $P=0.024$). Haploview 4.2 software analysis showed that the three SNPs were strongly linked. **Conclusion** The SNPs of ATG16L1 gene promoter may be associated with the susceptibility to AMI, and the TC genotype of rs1816753 may be a genetic risk factor for AMI.

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是冠心病(coronary heart disease, CHD)的一种严重类型,CHD 是一种由冠状动脉病变主要是冠状动脉粥样硬化引起的常见的复杂性疾病,由遗传和环境因素相互作用而引起,是导致全球死亡最主要的病因^[1]。自噬是真核生物中进化保守的由溶酶体介导的蛋白和细胞器降解,在维持细胞内稳态中起着至关重要的作用。此外,自噬在控制细胞死亡和凋亡及调节炎症中起着至关重要的作用^[2]。缺氧状态下自噬激活,细胞耐受缺氧能力提高而存活,增强的自噬在心肌缺血应激中延迟了细胞凋亡和坏死的发生,在细胞生存中起到至关重要的作用^[3]。在心血管系统中,自噬对心脏和血管的稳态和功能至关重要,有缺陷或过度的自噬活动会导致包括动脉粥样硬化在内的心血管疾病^[4]。自噬相关 16L1 (autophagy related 16 like 1, ATG16L1) 基因编码的蛋白质是自噬所必需的大蛋白质复合物的一部分,并在调节自噬膜的形成中发挥重要作用^[5]。内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞中的自噬功能失调在动脉粥样硬化形成过程中起有害作用,巨噬细胞自噬可预防动脉粥样硬化,增加 ATG16L1 的表达可增强巨噬细胞自噬,从而抑制白细胞介素 1 β 分泌,促进胆固醇外流,并减轻 C57BL/6 小鼠的动脉粥样硬化^[6]。最近的研究表明,ATG16L1 (T300A) 多态性与颈动脉内膜中膜厚度增加显著相关,证明 ATG16L1 变异与颈动脉粥样硬化相关联^[7]。

ATG16L1 蛋白是自噬早期阶段必不可少的蛋白质,已被证明与动脉粥样硬化发病机制有关。但是,尚不清楚 ATG16L1 基因是否与 CHD 或 AMI 发生发展有关。因此,有必要探究 ATG16L1 基因启动子区域的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与 AMI 易感性之间的关系,寻找 AMI 相关危险基因及基因类型,为 AMI 的风险评估、早期诊断及预防提供遗传学依据。

1 资料和方法

1.1 研究对象

随机选取 2016 年 2 月—2018 年 12 月就诊于济宁医学院附属医院并经临床明确诊断的 285 例 AMI 患者作为 AMI 组,男 207 例,女 78 例,年龄(63.88 ± 12.52)岁;选取同期来本院健康体检中心体检的人群 296 例为对照组,男 188 例,女 108 例,年龄(44.84 ± 12.24)岁。AMI 组纳入标准:严格依据 AMI 典型的临床表现、心电图改变和动态演变、血清心肌坏死标志物(心肌肌钙蛋白 T、心肌肌钙蛋白 I、肌酸激酶同工酶)的改变,结合超声心动图、核素心肌灌注显像、冠状动脉造影等辅助检查,达到国际诊断 AMI 的标准;排除标准:有心脏瓣膜病、主动脉夹层、心肌病、心肌炎或血管成形术病史及肿瘤的患者。对照组排除标准:具有 CHD、心肌梗死等心血管疾病家族史及严重肝肾功能不良及肿瘤的体检人员。本研究经济宁医学院附属医院医学伦理学委员会批准,患者知情同意。

1.2 实验主要仪器及试剂

PCR 扩增仪(ABI-9700);凝胶成像系统(Tanon-3500)。人外周血单个核细胞分离液(天津灏洋-LDS1075);血液/组织/细胞基因组提取试剂盒(北京天根-DP304-03);PCR Master Mix(美国 Promega-M7502)。

1.3 实验方法

1.3.1 标本收集 抽取 AMI 组治疗前和对照组清晨空腹外周血 3 mL,用人外周血单个核细胞分离液采用密度梯度离心法分离提取外周血单个核细胞,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.2 细胞基因组提取 按照 DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) 说明书操作,从单个核细胞中提取基因组 DNA,监测各样本吸光度比值 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 之间,浓度 $> 100\text{ mg/L}$,样本标记后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.3 引物设计及合成 参照 GeneBank 中人 ATG16L1 基因序列(NC_000002.12),ATG16L1 基

因转录起始点 (transcription start site, TSS) 位于 233251828, 选取 TSS 上游基因启动子序列的 1 246 个碱基对, 用 Primer Premier 5.0 软件设计 ATG16L1 基因启动子序列引物, 生成两个重叠的 DNA 片段,

片段 1: 233250476 到 233251194 (719 bp), 片段 2: 233251120 到 +233251721 (602 bp), 并由上海生工公司制备合成。引物序列见表 1。

表 1. ATG16L1 基因启动子引物序列

Table 1. Primer sequence of the ATG16L1 gene promoter

引物名称	引物序列	位置	产物大小	退火温度
ATG16L1-F1	5'-TTCATCTCCCCCTTCAACA-3'	-1 095	719 bp	52 °C
ATG16L1-R1	5'-GCTTGGTACAGGGGAAACCT-3'	-377		
ATG16L1-F2	5'-ATGCTCCTGCTGTCAGGGTA-3'	-451	602 bp	57 °C
ATG16L1-R2	5'-GAGCTCACCTCCACACTG-3'	151		

1.3.4 目的片段 PCR 扩增 按照 PCR Master Mix (Promega-M7502) 使用说明操作。50 μ L PCR 反应体系: 模板 DNA 3.0 μ L, 上游、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.0 μ L, PCR Master Mix 25 μ L, 无核酸酶水 20 μ L。热循环条件: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 30 s, 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 35 个热循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 暂时保存。

1.3.5 目的片段测序 将 PCR 扩增的目的片段送往上海生工公司以 Sanger 法测序, 通过 Chromas 和 DNAMAN 软件将所测序列与野生型进行序列比对, 并在 GenBank 网站查找比对 SNP 位点。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 计数资料用 χ^2 检验, 计量资料用 *t* 检验。使用 χ^2 检验分析 AMI 组与对照组的基因型及等位基因频率的分布差异; 用 Logistic 回归分析 SNP 与 AMI 的相关性, 以优势比 (odds ratio, OR) 和 95% 置信区间 (95% confidence interval, 95% CI) 表示; 两组 SNP 连锁不平衡用 Haploview 4.2 软件分析, 采用 SHEsis 在线软件进行单倍型分析。使用 TRANSFAC 数据库分析 SNP 转录因子潜在的结合位点。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AMI 组及对照组临床特征分析

两组进行相关因素的比较显示, AMI 组中男性、吸烟史、高血压和糖尿病的比例及年龄均明显高于对照组 (P < 0.05)。AMI 组高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 水平明显低于对照组 (P < 0.001)。可能由于年龄等干扰,

AMI 组体质指数 (body mass index, BMI)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平明显低于对照组 (P < 0.05)。可能由于使用调节血脂药物如贝特类等, 两组甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平无显著性差异。见表 2。

表 2. 临床特征分析

Table 2. Analysis of clinical characteristics

参数	对照组 (n=296)	AMI 组 (n=285)	P
年龄/岁	44.84±12.24	63.88±12.52	0.000
男性/[例(%)]	188(63.5)	207(72.6)	0.019
女性/[例(%)]	108(36.5)	78(27.4)	
吸烟史/[例(%)]	51(17.2)	150(52.6)	0.000
高血压/[例(%)]	73(24.7)	132(46.3)	0.000
糖尿病/[例(%)]	25(8.4)	61(21.4)	0.000
BMI/(kg/m ²)	25.49±3.66	24.78±3.78	0.022
HDLC/(mmol/L)	1.31±0.29	1.07±0.43	0.000
LDLC/(mmol/L)	2.78±0.72	2.50±0.81	0.000
TG/(mmol/L)	1.46±1.01	1.52±0.99	0.505
TC/(mmol/L)	4.88±1.49	4.31±1.11	0.000

2.2 AMI 组及对照组的相关危险因素分析

拟合优度检验值为 83.4 (>60), 说明模型建立可靠。以 AMI 为因变量, 以年龄、性别、吸烟史、高血压、糖尿病、BMI、HDLC、LDLC、TG、TC 为自变量, 行多因素 Logistic 回归分析。结果显示, 男性、吸烟史、高血压是 AMI 的独立危险因素 (P < 0.05), 男性、吸烟史、高血压可明显增加 AMI 的患病风险; HDLC 是 AMI 的保护因素 (P < 0.05), 可明显降低

AMI 的患病风险。见表 3。

表 3. 相关危险因素的多因素 Logistic 回归分析
Table 3. Multivariate Logistic regression analysis of related risk factors

变量	B	S. E	OR	95% CI	P
年龄	0.106	0.323	1.111	0.591 ~ 2.091	0.743
男性	0.130	0.013	1.139	1.111 ~ 1.167	0.000
吸烟史	2.170	0.315	8.758	4.719 ~ 16.252	0.000
高血压	0.816	0.271	2.263	1.330 ~ 3.848	0.003
糖尿病	0.077	0.356	0.926	0.461 ~ 1.861	0.830
BMI	-0.016	0.039	0.985	0.912 ~ 1.063	0.691
HDLc	-1.340	0.357	0.262	0.130 ~ 0.527	0.000
LDLc	0.344	0.395	1.410	0.651 ~ 3.057	0.384
TG	0.235	0.175	1.265	0.897 ~ 1.784	0.180
TC	-0.603	0.324	0.547	0.290 ~ 1.032	0.063

2.3 ATG16L1 基因启动子序列 SNP 测序情况

测序结果显示,3 个 SNP rs1816753、rs12476635、rs2289477 位点既有纯合子突变,又有杂合子突变。见图 1。

2.4 Hardy-Weinberg 平衡检验、基因型和等位基因频率分析

对 3 个 SNP 位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,结果显示各 SNP 位点在两组中均符合 Hardy-Weinberg 平衡(HWE) ($P>0.05$),表明样本来自遗传平衡的群体,具有良好的代表性。基因分型结果显示,rs1816753、rs12476635 中 CC、TC、TT 3 种基因型在两组的差异无统计学意义,两组等位基因频率 T 和 C 差异亦无统计学意义。rs2289477 中 TT、TG、GG 3 种基因型在两组的差异无统计学意义,两组等位基因频率 T 和 G 差异亦无统计学意义。见表 4。

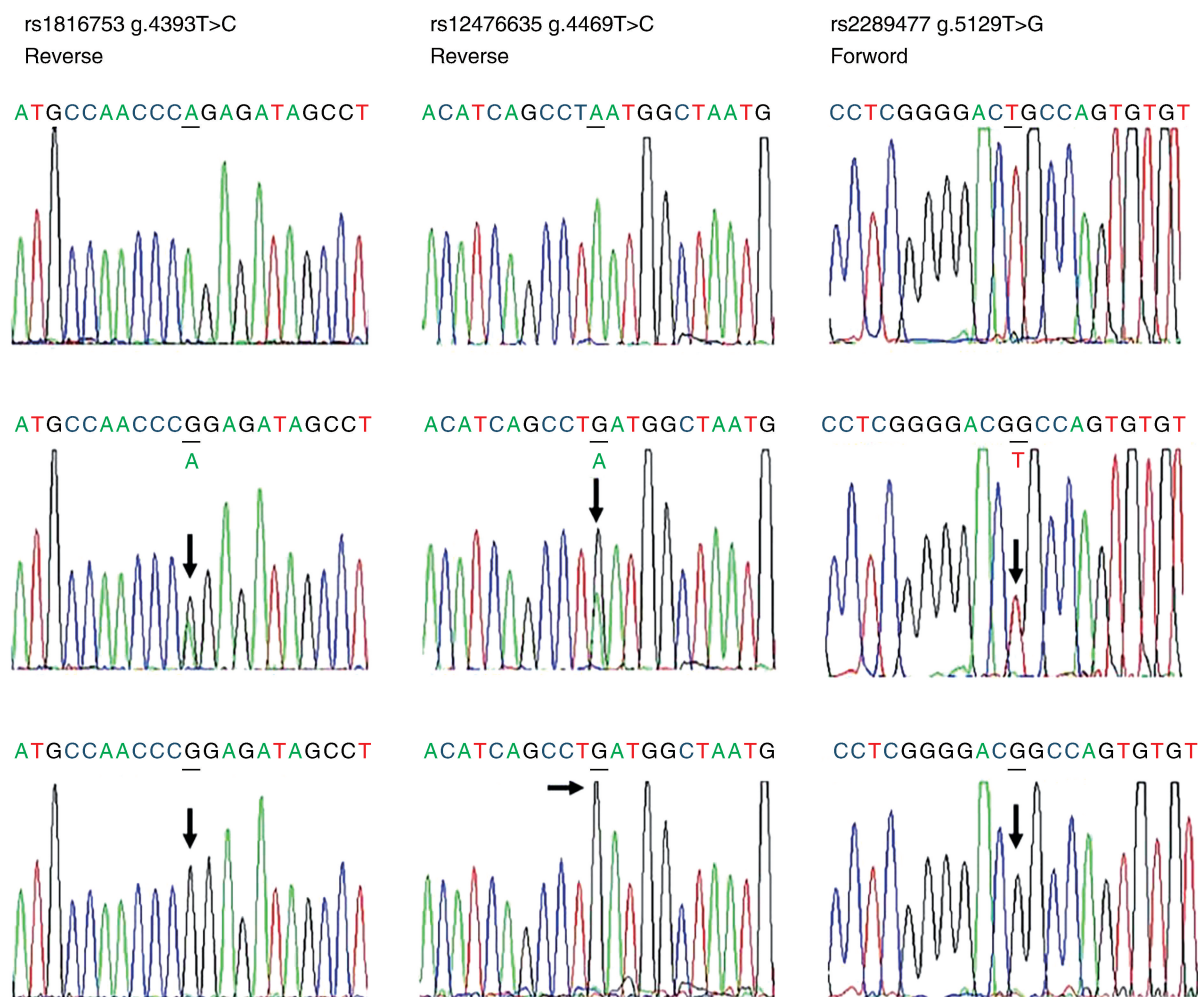


图 1. ATG16L1 基因启动子 SNP 测序峰图

上层为正常序列,中层为杂合子突变序列,底层为纯合子突变序列;箭头所示为 SNP。

Figure 1. Sequencing chromatogram of SNP in ATG16L1 gene promoter

表 4. AMI 组和对照组 SNP 位点的 Hardy-Weinberg 平衡检验、基因型和等位基因频率

Table 4. Hardy-Weinberg equilibrium test, genotype and allele frequency of SNP in AMI group and control group

SNP	等位基因 (A/B)	对照组/例			HWE	AMI 组/例			HWE	P	对照组等位 基因频数		AMI 组等位 基因频数		P
		AA	AB	BB	P	AA	AB	BB	P		A	B	A	B	
		rs1816753	T/C	76	139	81	0.298	58	154		73	0.158	0.183	291	
rs12476635	T/C	253	40	3	0.325	243	41	1	0.597	0.605	546	46	527	43	0.885
rs2289477	T/G	109	148	39	0.308	112	128	45	0.406	0.425	366	226	352	218	0.980

2.5 相关性分析

采用 Logistic 回归分析 SNP 不同基因型与 AMI 的相关性,结果发现 rs1816753 的 TC 基因型、TT 基因型和 rs2289477 的 TG 基因型、TT 基因型与 AMI 之间存在关联($P < 0.05$),可能是 AMI 的危险因素。校正性别、年龄、BMI、吸烟史、高血压、糖尿病、

HDLC、LDLC、TC、TG 等混杂因素后再次用 Logistic 回归分析,结果显示仅有 rs1816753 的 TC 基因型与 AMI 间存在关联,是 AMI 的独立危险因素,可明显增加 AMI 的患病风险($OR = 2.519, 95\% CI: 1.130 \sim 5.615, P = 0.024$)。见表 5。

表 5. AMI 组和对照组中 SNP 不同基因型的 Logistic 回归分析

Table 5. Logistic regression analysis of different genotypes of SNP in AMI group and control group

SNP	基因型	粗略分析			校正后分析		
		OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
rs1816753	TT	1.000	—	0.009	1.000	—	—
	TC	2.402	1.313 ~ 4.392	0.004	2.519	1.130 ~ 5.615	0.024
	CC	1.853	0.787 ~ 4.365	0.158	1.994	0.673 ~ 5.909	0.213
rs12476635	TT	1.000	—	0.428	1.000	—	—
	TC	0.784	0.421 ~ 1.459	0.442	1.467	0.651 ~ 3.308	0.355
	CC	0.230	0.021 ~ 2.550	0.231	0.051	0.002 ~ 1.628	0.092
rs2289477	TT	1.000	—	0.018	1.000	—	—
	TG	0.507	0.290 ~ 0.887	0.017	0.564	0.274 ~ 1.163	0.121
	GG	0.810	0.333 ~ 1.966	0.641	0.698	0.224 ~ 2.177	0.536

注:—:表示数据未获得。

2.6 连锁不平衡及单倍型分析

采用 Haploview 4.2 软件分析发现 ATG16L1 基因启动区 (rs1816753、rs12476635、rs2289477) 3 个 SNP 彼此连锁 [rs1816753/rs12476635 ($D' = 1.000, R^2 = 0.777$); rs1816753/rs2289477 ($D' = 0.928, R^2 = 0.748$); rs12476635/rs2289477 ($D' = 0.953, R^2 = 0.708$)]。见图 2。通过 SHEsis 在线软件对这 3 个 SNP 位点进行单倍型分析,结果并未提示单倍型与 AMI 发病相关($P > 0.05$)。见表 6。

2.7 预测 SNP 影响的转录结合位点

采用 TRANSFAC 数据库,预测转录因子 (transcription factor, TF) 及在人类中受 SNP 影响的 TF 的结合位点。rs1816753 可改变 ATG16L1 基因启动子与转录抑制因子 GATA 结合 1 (transcriptional repressor GATA binding 1, TRPS1)、含 SAM 尖端结构域的 E26

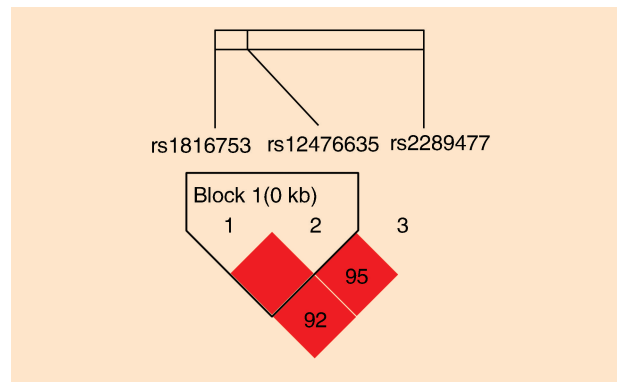


图 2. ATG16L1 基因启动区 3 个 SNP 的连锁不平衡检测图

图中红色未标数字的 D' 值为 1。

Figure 2. Linkage imbalance detection map of three SNP in the ATG16L1 gene promoter region

表 6. ATG16L1 基因启动区 SNP 位点单倍型与 AMI 易感性分析

Table 6. Analysis of SNP locus haplotype and AMI susceptibility in ATG16L1 gene promoter

rs1816753	rs12476635	rs2289477	对照组/ [频率(%)]	AMI 组/ [频率(%)]	χ^2	Fisher's P	OR	95% CI
C	C	T	46.00(0.078)	43.00(0.075)	0.032	0.857713	0.961	0.623 ~ 1.482
C	T	G	217.43(0.367)	213.67(0.375)	0.031	0.753001	1.022	0.805 ~ 1.297
C	T	T	37.57(0.063)	43.33(0.076)	0.653	0.454428	1.205	0.766 ~ 1.896
T	T	G	8.57(0.014)	4.33(0.008)	—	—	—	—
T	T	T	282.43(0.477)	265.67(0.466)	0.240	0.609977	0.944	0.749 ~ 1.190

注:—:表示数据未获得。

转化特异性因子 (SAM pointed domain containing ETS transcription factor, SPDEF)、GLI 系列锌指 2 (GLI family zinc finger 2, GLI2) 的结合;rs12476635 可改变 ATG16L1 基因启动子与转录因子 AP-2 (transcription factor AP-2, AP-2)、BARX 同源异型盒 2 (BARX homeobox 2, BARX2)、同源异型盒 (homeobox, HOX) 的结合;rs2289477 可改变 ATG16L1 基因启动子与锌指蛋白 (zinc finger protein, ZNF)、核因子 IB (nuclear factor IB, NFIB)、丘吉尔域包含 1 (churchill domain containing 1, CHURC1) 的结合。见表 7。这些 SNP 可能通过干扰 TF 与 ATG16L1 基因启动子的结合来改变 ATG16L1 基因启动子的活性进而影响 ATG16L1 基因的转录水平。

表 7. 预测人类受 SNP 影响的 TF 结合位点

Table 7. Prediction of TF binding sites affected by SNP in human

SNP	改变方式	TF 结合位点
rs1816753	创造	TRPS1, SPDEF
	消除	GLI2
rs12476635	创造	AP-2
	消除	BARX2, HOX
rs2289477	创造	ZNF
	消除	NFIB, CHURC1

3 讨论

CHD 和 AMI 是主要由动脉粥样硬化引起的慢性炎症性和代谢性疾病^[8]。动脉粥样硬化斑块可在脂质氧化、炎症和代谢应激下启动自噬,并通过降解受损的细胞内物质保护斑块细胞免受氧化损伤,血管平滑肌细胞的自噬缺陷会增加细胞死亡和动脉粥样硬化^[9]。自噬是一种进化保守的细胞质内容物被溶酶体消化的过程,自噬具有体内平衡功能,包括维持蛋白质和细胞器的完整性以及调节代

谢^[10]。有研究发现,自噬的水平会随着年龄的增加而降低,实验证明衰老的大鼠中,心脏和肌肉等组织中的自噬被抑制,适当地增加自噬水平可以减少年龄相关的蛋白质聚集体以及细胞中受损细胞器的积累,从而预防机体衰老^[11]。自噬与高脂血症之间也存在着非常密切而复杂的关系,细胞内脂质含量的差异会影响细胞自噬水平,短期的脂质刺激可显著促进自噬,但长期或特定类型的脂质刺激可抑制自噬水平^[12]。研究表明,巨噬细胞自噬可介导胆固醇外流、炎症、氧化应激和细胞死亡等过程,与动脉粥样硬化发生发展密切相关,促进自噬能有效减少细胞内脂质沉积,从而抑制泡沫细胞形成^[13]。在缺血性心肌病中,心肌缺血和再灌注都会对心肌造成损伤,这两个过程都会增加自噬,自噬在此过程中具有保护心肌的作用^[14]。

ATG16L1 定位于染色体 2q37.1,其中包含 19 个外显子,在人类组织中广泛表达。ATG16L1 是自噬的关键调控因子,在自噬的启动及自噬体膜的形成中发挥重要作用^[15]。以往研究表明,ATG16L1 的缺乏加重了白细胞介素 22 信号转导的有害作用,导致上皮细胞过度死亡^[16]。ATG16L1 的这种细胞保护功能与自噬促进线粒体稳态的作用有关^[17]。ATG16L1 缺陷可导致胆固醇在细胞内积累,破坏细胞膜的修复和溶酶体的胞吐作用,导致细胞膜修复缺陷^[18]。ATG16L1 是内皮细胞蛋白激酶 A 活性的靶点,ATG16L1 的磷酸化可降低内皮细胞的自噬,抑制 ATG16L1 的磷酸化可以促进血管生成^[19]。此外,AMP 激活的蛋白激酶在内皮细胞中被血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 激活,并参与 VEGF 诱导的血管生成,自噬是 VEGF 诱导血管生成所必需的,ATG16L1 的磷酸化和微管相关蛋白轻链 3B 的偶联触发了自噬的启动及自噬体的形成,激活自噬启动途径可能有助于启动血管生成^[20]。ATG16L1 的可逆磷酸化在自噬的缺氧复氧调控中发挥重要作用,缺氧复氧可增加培养的心肌细胞自噬,促进

ATG16L1 磷酸化,可能在保护心肌细胞在代谢应力下的凋亡中发挥潜在作用^[21]。以上研究表明,自噬相关因子 ATG16L1 在心血管的调节过程中发挥重要的作用,但具体作用机制仍未明了,且对其潜在的分子机制的挖掘更少,因此,本研究分析了 ATG16L1 基因启动子区域的 SNP 与 AMI 的相关性,可能对阐述 AMI 的潜在分子机制有重要作用。

本研究对 285 例 AMI 患者和 296 例对照人群的 ATG16L1 基因启动子的 SNP 分析发现,在 ATG16L1 基因启动子序列中的 3 个 SNP (rs1816753、rs12476635、rs2289477)中,rs1816753 的 TC 基因型与 AMI 间存在关联,是 AMI 的危险因素,致 AMI 的患病风险是正常人的 2.519 倍。通过 Haploview 4.2 软件分析 3 个 SNP 之间的连锁强度,结果显示 3 个 SNP 呈强连锁。通过 SHEsis 在线软件分析结果显示,存在 5 种单倍型,以 rs1816753C/rs12476635T/rs2289477G 和 rs1816753T/rs12476635T/rs2289477T 单倍型最多见,但未发现与 AMI 易感性存在相关性。通过 TRANSFAC 数据库分析预测在人类中受 SNP 影响的 TF 的结合位点发现,rs1816753、rs12476635、rs2289477 均可改变 ATG16L1 基因启动子与 TF 的结合。rs1816753 可创造与 TRPS1、SPDEF 的结合位点,消除与 GLI2 的结合位点;rs12476635 可创造与 AP-2 的结合位点,消除与 BARX2、HOX 的结合位点;rs2289477 可创造与 ZNF 的结合位点,消除与 NFIB、CHURC1 的结合位点。TF 结合位点的改变可能会改变 ATG16L1 基因启动子的活性,从而影响 ATG16L1 基因的转录水平,进而改变自噬水平及功能以影响 AMI 的发生和发展。

综上所述,本研究发现 ATG16L1 基因启动子区域的单核苷酸多态性 rs1816753 的 TC 基因型与 AMI 间具有显著相关性,是 AMI 的危险因素。本研究未发现 rs12476635 和 rs2289477 的基因型与 AMI 之间具有相关性,可能与本研究中样本量少或存在选择性偏倚及研究对象地域、种族和环境等多方面因素有关,因此今后有必要开展大样本、多地域、多种族、广泛人群的实验研究,以及 AMI 遗传生物学的功能研究,为 AMI 的发生发展机制提供更多的基因遗传学证据。

[参考文献]

- [1] LOPEZ A D, MATHERS C D, EZZATI M, et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001; systematic analysis of population health data[J]. *Lancet*, 2006, 367(9524): 1747-1757.
- [2] DOHERTY J, BAEHRECKE E H. Life, death and autophagy[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(10): 1110-1117.
- [3] 张晓红, 时景璞. 缺氧诱导因子-1 调控缺氧状态下心肌细胞自

噬和凋亡的研究进展[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2020, 27(9): 1087-1093.

- [4] GATICA D, CHIONG M, LAVANDERO S, et al. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system[J]. *Circ Res*, 2015, 116(3): 456-467.
- [5] FUJITA N, MORITA E, ITOH T, et al. Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin[J]. *J Cell Biol*, 2013, 203(1): 115-128.
- [6] LENG S, IWANOWYCZ S, SAAOUD F, et al. Ursolic acid enhances macrophage autophagy and attenuates atherogenesis[J]. *J Lipid Res*, 2016, 57(6): 1006-1016.
- [7] ORSATTI C L, SOBREIRA M L, SANDRIM V C, et al. Autophagy-related 16-like 1 gene polymorphism, risk factors for cardiovascular disease and associated carotid intima-media thickness in postmenopausal women[J]. *Clin Biochem*, 2018, 61: 12-17.
- [8] HANSSON G K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(16): 1685-1695.
- [9] OSONOI Y, MITA T, AZUMA K, et al. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances cell death and atherosclerosis[J]. *Autophagy*, 2018, 14(11): 1991-2006.
- [10] WANG Y T, ZAITSEV K, LU Q, et al. Select autophagy genes maintain quiescence of tissue-resident macrophages and increase susceptibility to *Listeria monocytogenes*[J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(2): 272-281.
- [11] 易欧阳, 台适, 卜兰兰, 等. 自噬在天然药物活性成分抗心血管衰老中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(2): 175-180.
- [12] MIAO J, ZANG X, CUI X, et al. Autophagy, hyperlipidemia, and atherosclerosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1207: 237-264.
- [13] 王斌驿, 李菲菲, 吴东方, 等. 巨噬细胞自噬在动脉粥样硬化中作用的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(5): 439-444.
- [14] DU J, LI Y, ZHAO W. Autophagy and myocardial ischemia[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1207: 217-222.
- [15] BOMONT P. GAN (gigaxonin) E3 ligase and ATG16L1: master and commander of autophagosome production [J]. *Autophagy*, 2019, 15(9): 1650-1652.
- [16] ADEN K, TRAN F, ITO G, et al. ATG16L1 orchestrates interleukin-22 signaling in the intestinal epithelium via cGAS-STING[J]. *J Exp Med*, 2018, 215(11): 2868-2886.
- [17] MATSUZAWA-ISHIMOTO Y, SHONO Y, GOMEZ L E, et al. Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium[J]. *J Exp Med*, 2017, 214(12): 3687-3705.
- [18] TAN J M J, MELLOUK N, OSBORNE S E, et al. An ATG16L1-dependent pathway promotes plasma membrane repair and limits *Listeria monocytogenes* cell-to-cell spread [J]. *Nat Microbiol*, 2018, 3(12): 1472-1485.
- [19] ZHAO X, NEDVETSKY P, STANCHI F, et al. Endothelial PKA activity regulates angiogenesis by limiting autophagy through phosphorylation of ATG16L1[J]. *Elife*, 2019, 8: e46380.
- [20] SPENGLER K, KRYEZYU N, GROBE S, et al. VEGF triggers transient induction of autophagy in endothelial cells via AMPK α 1 [J]. *Cells*, 2020, 9(3): 687.
- [21] SONG H, PU J, WANG L, et al. ATG16L1 phosphorylation is oppositely regulated by CSNK2/casein kinase 2 and PPP1/protein phosphatase 1 which determines the fate of cardiomyocytes during hypoxia/reoxygenation[J]. *Autophagy*, 2015, 11(8): 1308-1325.

(此文编辑 曾学清)