

本文引用: 白冠男, 郜雪, 闫波. 组织蛋白酶 D 基因启动子序列单核苷酸多态性与急性心肌梗死的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(11): 955-960. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2022.11.006.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-11-0955-06

· 临床研究 ·

组织蛋白酶 D 基因启动子序列单核苷酸多态性与急性心肌梗死的相关性

白冠男¹, 郜雪¹, 闫波^{2,3}

(1. 山东大学齐鲁医学院, 山东省济南市 250001; 2. 济宁医学院附属医院, 山东省济宁市 272029;
3. 济宁医学院, 山东省济宁市 272029)

[摘要] **[目的]** 探讨组织蛋白酶 D 基因启动子序列单核苷酸多态性与急性心肌梗死的关系。**[方法]** 采用病例-对照研究方法, 对 357 例急性心肌梗死患者和 347 例对照人群的组织蛋白酶 D 基因启动子采用聚合酶链反应扩增目的基因片段并测序, 结合目的基因测序后的序列及比对, GenBank 上查找相对应的单核苷酸多态性位点后, 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 2 个单核苷酸多态性位点与急性心肌梗死易感性进行关联性分析。用 Haploview4.2 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单核苷酸多态性影响的转录因子的结合位点。**[结果]** Logistic 回归分析结果显示年龄增大、吸烟史、高血压病史、甘油三酯增高是急性心肌梗死的独立危险因素 ($P < 0.05$), 可明显增加急性心肌梗死的患病风险; 高密度脂蛋白、胆固醇是急性心肌梗死的保护因素 ($P < 0.05$), 可明显降低急性心肌梗死的患病风险, 此结果可能与心肌梗死组服用调脂类药物有关, 需进一步扩大样本进行分析。在组织蛋白酶 D 基因启动子序列中的 2 个单核苷酸多态性位点与急性心肌梗死发病无关联性。进行连锁不平衡和单倍型分析提示, 该 2 个单核苷酸多态性位点处于同一个连锁不平衡区域 ($D' = 1.000, R^2 = 0.978$), 单倍体型均未增加急性心肌梗死易感性 ($P > 0.05$)。**[结论]** 组织蛋白酶 D 基因启动区两个单核苷酸多态性位点为完全连锁不平衡。该 2 个单核苷酸多态性位点及其单倍体型与急性心肌梗死发病无相关性, 但提供了组织蛋白酶 D 基因启动区多态性的群体遗传学资料。

[关键词] 基因启动子; 急性心肌梗死; 单核苷酸多态性; 危险因素

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Correlation of Cathepsin D gene promoter region single nucleotide polymorphism and acute myocardial infarction

BAI Guannan¹, GAO Xue¹, YAN Bo^{2,3}

(1. Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan, Shandong 250001, China; 2. Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining, Shandong 272029, China; 3. Jining Medical University, Jining, Shandong 272029, China)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between single nucleotide polymorphism (SNP) of Cathepsin D (CTSD) gene promoter and acute myocardial infarction (AMI) and its related risk factors. **Methods** The CTSD gene promoters of 357 AMI patients and 347 control population were amplified and sequenced by polymerase chain reaction in case-control study, combined with the sequence and comparison of DNA sequencing, SNP was searched in NCBI database for data statistics and analysis. 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 two SNP loci with susceptibility to AMI. Linkage unbalance and haplotype analysis were performed using Haploview4.2 software and SHEsis online software. TRANSFAC database was used to predict the binding sites of transcription factors that may be affected by SNP. **Results** Logistic regression analysis showed that age increase, smoking history, hypertension history and triglyceride in-

[收稿日期] 2022-03-22

[修回日期] 2022-05-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(2018-40-0516)

[作者简介] 白冠男, 硕士, 研究方向为心肌梗死遗传学, E-mail: 1064464175@qq.com。通信作者闫波, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为遗传心脏病学, E-mail: yanbo@mail.jnmc.edu.cn。

crease were independent risk factors for AMI ($P < 0.05$), which significantly increased the risk of acute myocardial infarction. High density lipoprotein and cholesterol are protective factors of AMI ($P < 0.05$), which can significantly reduce the risk of AMI. This result may be related to the use of lipid-regulating drugs in the myocardial infarction group, which requires further analysis by expanding samples. The two SNP in the promoter sequence of CTSD gene were not associated with AMI. The linkage disequilibrium and haplotype analysis suggested that the two SNP loci were in the same linkage disequilibrium region ($D' = 1.000$, $R^2 = 0.978$), and haploid did not increase AMI susceptibility ($P > 0.05$). **Conclusion** The two SNP in the promoter region of CTSD gene are completely linked disequilibrium. The two SNP and their haploid types were not associated with the incidence of AMI, but provided the population genetic data of CTSD gene promoter region polymorphism.

[KEY WORDS] gene promoter; acute myocardial infarction; single nucleotide polymorphism; risk factors

心血管疾病是世界上主要的死亡原因,每年造成 1 790 万人死亡^[1]。急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是心血管疾病中最为严重的一种类型^[2],与患者的死亡率相关联^[3]。急性心肌梗死的发病机制是易损、富含脂质的冠状动脉粥样硬化斑块破裂或侵蚀,循环中的血小板在破裂的斑块表面聚集,形成血栓,阻塞冠状动脉管腔,导致心肌缺血坏死^[4]。炎症途径已成为斑块破裂和血栓形成的重要驱动因素^[5],大量的临床及实验数据表明,炎症贯穿了动脉粥样硬化的发生发展及动脉粥样硬化相关性心血管事件的全过程^[6]。

组织蛋白酶 D(Cathepsin D, CTSD)(EC 3.4.23.5)被定义为溶酶体天冬氨酸内肽酶,是一种酸性蛋白酶^[7]。通常位于溶酶体内,参与蛋白质降解和前体蛋白加工,除了对蛋白质周转的功能外,在包括细胞增殖、血管生成和凋亡在内的多个生理过程中发挥重要作用^[8];CTSD 对阿尔茨海默病和动脉粥样硬化、癌症等多种疾病的影响已在相关研究中得到证实^[9]。近年来,CTSD 在自噬中的作用及其在临床上的应用得到了广泛的研究,持续高表达的 CTSD 激活自噬体和溶酶体的融合,增强自噬通量^[8]。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。自噬在脂质代谢和炎症发生过程中具有关键作用^[10]。CTSD 在自噬的溶酶体降解中起关键作用,已被证明可促进动脉斑块的形成,并调节炎症反应;与动脉粥样硬化和心肌梗死的发病机制有关。在慢性心肌梗死小鼠模型中,在心肌梗死期间阻止心脏上调 CTSD 会不利于小鼠的心脏重塑以及加剧功能障碍^[11]。CTSD 的高表达可促进动脉斑块的形成,增加冠心病的风险^[12]。但目前国内外研究中,尚未有关于 CTSD 基因启动子中单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点与 AMI 相关性的报道,因此,本研究通过病例-对照研究,探究 CTSD 基因启动子区

域的两个 SNP 的相关性,寻找 AMI 相关危险基因及基因类型,为 AMI 的预防、诊疗及发病机制提供新的遗传学基础。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选取济宁医学院附属医院 2016 年 2 月—2018 年 12 月经临床诊断确诊为 AMI 的住院患者 357 例为 AMI 组,其中男性 253 例,女性 104 例,平均年龄(63.66 ± 12.23)岁。同期随机选取 347 例在济宁医学院附属医院体检的人群中相对健康者为对照组,其中男性 222 例,女性 125 例,平均年龄(45.76 ± 12.85)岁。

AMI 组纳入标准:典型的临床症状、心肌坏死标志物的变化[心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)或心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)的出现和增高],心电图出现新发病理性 Q 波;T 波高尖、ST 段明显抬高、ST 段回落、T 波倒置等动态演变的过程,冠状动脉造影或腔内影像学检查或尸检证实冠状动脉血栓,符合国际急性心肌梗死诊断标准。AMI 组排除标准:有心脏瓣膜病、主动脉夹层、心脏病、心肌炎或血管成形术病史及肿瘤的患者除外。

对照组纳入标准:无冠心病及急性心肌梗死病史,无脑血管疾病、肿瘤疾病史,无急性心肌梗死的传统危险因素(如肥胖、吸烟、糖尿病)。对照组排除标准:严重肝肾功能不良及肿瘤的体检人员。

收集并记录两组人群与心肌梗死相关的个人史(饮酒史、吸烟史)、既往史(是否有高血压、糖尿病、肿瘤及重要脏器疾病史)、家族史(父母、兄弟姐妹是否有高血压、糖尿病、冠心病等类似疾病史)以及相关体格检查(身高、体质量、血压)及实验室检查(血脂四项)等。

本实验遵循赫尔辛基宣言,并经医院伦理委员会批准,所有研究对象签署知情同意书。

1.2 主要实验仪器和试剂

高速离心机 (GENESPEED-1730R)、梯度聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (ABI/美国-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 标本收集及提取白细胞

采集各研究对象 (AMI 组于入院治疗前采集, 体检健康者于体检时采集) 清晨空腹外周血 3 mL, 采用密度梯度离心法, 用人外周血单个核细胞分离液提取外周血单个核细胞。分离完的单个核细胞进行编号标记, -80 °C 超低温冰箱储存备用。

1.4 提取基因组

按照基因组提取试剂盒说明书从单个核细胞中提取基因组脱氧核糖核酸 (deoxyribo-nucleic acid, DNA), 留取质量浓度 >100 mg/L 且吸光度比值 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 的样本用于后续试验, 编号后储存于 -80 °C 超低温冰箱。

1.5 设计与合成引物

从 GenBank 数据库中, 根据人 CTSD 基因启动子序列 (NCBI: NC_000011.10), CTSD 基因启动子转录起始点 (transcription start site, TSS) 位于 1 763 927, 选取起始位点下游 30 bp 至上游 820 bp 序列, 通过 Primer5 引物设计软件设计 CTSD 基因启动子的 PCR 引物 (上游: 5'-GAGTTGACGTGAGTGGACAAA AGG-3', 下游: 5'-GTGCGCTTATAGCCGGGATGAC-3'), 并由上海生工公司合成。

1.6 扩增目的片段

PCR 反应体系 (50 μL): 模板 DNA 3.0 μL , 上/下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.0 μL , PCR Master Mix 25 μL , 无核酸酶水 25 μL 。

PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 运行 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 暂时保存。

取 1 μL 的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 根据 Marker 位置辨别目的条带, 符合条带位置的 PCR 产物送上海生工进行基因测序并分析结果。

1.7 基因分型

用 DNAMAN 软件将测序所得 CTSD 基因启动子序列与标准序列进行比对, 并通过测序峰图验证后统计每个样本多态性位点基因型, 在 GenBank 上查找相对应的 SNP 位点。

1.8 统计学分析

数量变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, AMI 组与对照组之间的

差异用 t 检验进行评估, 使用频率和百分比来表示分类变量; 运用 Hardy-Weinberg 平衡检验后, Logistic 回归分析部分危险因素对心肌梗死风险的可能影响; 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, 以比值比 (odds ratio, OR) 和 95% 可信区间 (95% confidence interval, 95% CI) 表示, 同时利用多因素 Logistic 回归分析校正年龄、性别、体质指数 (body mass index, BMI)、高血压、糖尿病和吸烟等混杂因素; 以上分析由 SPSS25.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 被视为有统计学意义。两组 SNP 连锁不平衡用 Haploview4.2 软件分析, 连锁不平衡系数 D' 及 R^2 界限定为 0.8, SHEsis 在线软件进行单倍型分析。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 急性心肌梗死组及对照组的基本信息和临床特征分析

这项研究涉及 704 例受试者, 包括 357 例 AMI 患者和 347 例健康对照者。通过比较两组的临床数据, 发现 AMI 组的平均年龄水平明显较高; AMI 组既往高血压病史、糖尿病史和吸烟史以及男性患者比例显著高于对照组 ($P < 0.01$), BMI、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平显著低于对照组 ($P < 0.05$); 两组之间甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平差异无显著性 ($P > 0.05$; 表 1)。

表 1. 急性心肌梗死组与对照组临床资料的比较

Table 1. Comparison of clinical data between AMI group and control group

项目	AMI 组 ($n=357$)	对照组 ($n=347$)	P 值
男性/[例(%)]	253(70.9)	222(64.0)	0.031
年龄/岁	63.66 \pm 12.23	45.76 \pm 12.85	<0.01
吸烟史/[例(%)]	187(52.3)	54(15.6)	<0.01
高血压病史/[例(%)]	164(45.9)	84(24.2)	<0.01
糖尿病史/[例(%)]	81(22.6)	29(7.8)	<0.01
BMI/(kg/m^2)	24.72 \pm 4.33	25.54 \pm 3.46	<0.01
HDLC/(mmol/L)	1.06 \pm 0.40	1.32 \pm 0.30	<0.01
LDLC/(mmol/L)	2.52 \pm 0.81	2.81 \pm 0.73	<0.01
TG/(mmol/L)	1.49 \pm 0.97	1.44 \pm 1.09	0.471
TC/(mmol/L)	4.31 \pm 1.09	4.95 \pm 1.44	<0.01

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验、基因型和等位基因频数分析

在两组中分别对 2 个 SNP 位点(rs531471601、rs144932926)进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,结果显示各 SNP 位点均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>$

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,rs531471601 中的基因型 CC、CG 和 rs144932926 中的基因型 TT、TC 在两组之间差异均无统计学意义,以及两组等位基因 C 和 G、T 和 C 频数之间均无统计学意义(表 2)。

表 2. 急性心肌梗死组和对照组单核苷酸多态性位点的 Hardy-Weinberg 平衡检验、基因型和等位基因频数
Table 2. 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 <i>P</i>	AMI 组/例		HWE <i>P</i>	<i>P</i>	对照组等位 基因频数		AMI 组等位 基因频数		<i>P</i>
		AA	AB		AA	AB			A	B	A	B	
rs531471601	C/G	328	19	0.971	330	27	0.862	0.123	675	19	687	27	0.108
rs144932926	T/C	328	19	0.971	331	26	0.860	0.168	675	19	688	26	0.144

2.3 急性心肌梗死组和对照组的相关危险因素分析

根据 SPSS25.0 软件进行 Logistic 回归分析,霍斯默-莱梅肖拟合优度检验(Hosmer-Lemeshow, H-L 检验) $P=0.139(P>0.05)$,说明模型拟合优度效果较好。该模型预测该方面的准确率是 83.5%,说明可信度较高。以 AMI 为因变量,以年龄、性别、吸烟史、BMI、糖尿病、高血压、HDLc、LDLc、TG、TC 为自变量,行 Logistic 逐步回归分析方法筛选危险因素分析。结果显示,年龄、吸烟史、高血压病史、TG 是 AMI 的独立危险因素($P<0.05$),年龄、吸烟史、高血压病史、TG 可明显增加 AMI 的患病风险;HDLc、TC 是 AMI 的保护因素($P<0.05$),可明显降低 AMI 的患病风险,这可能与心肌梗死组服用调脂类药物有关,需进一步扩大样本进行分析(表 3)。

2.4 单核苷酸多态性的不同基因型与急性心肌梗死的相关性分析

采用 Logistic 回归分析 SNP 与 AMI 的相关性,

结果发现 rs531471601 和 rs144932926 基因型在较正年龄前后与 AMI 的发生均无相关性($P>0.05$;表 4)。

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

相关变量	B	标准 误差	OR	95% CI	<i>P</i>
年龄	0.113	0.011	1.120	1.096 ~ 1.144	0.000
性别(男性)	0.294	0.285	1.342	0.768 ~ 2.346	0.301
吸烟史	2.270	0.287	9.676	5.5414 ~ 16.978	0.000
BMI	-0.051	0.034	0.950	0.889 ~ 1.015	0.130
糖尿病	0.404	0.322	1.497	0.797 ~ 2.815	0.210
高血压	0.829	0.243	2.291	1.423 ~ 3.688	0.001
HDLc	-1.314	0.424	0.269	0.117 ~ 0.617	0.002
LDLc	0.675	0.388	1.963	0.918 ~ 4.197	0.082
TG	0.373	0.164	1.453	1.053 ~ 2.003	0.023
TC	-0.988	0.299	0.372	0.207 ~ 0.669	0.001

表 4. 急性心肌梗死组和对照组中单核苷酸多态性不同基因型的 Logistic 回归分析
Table 4. Logistic regression analysis of SNP genotypes in AMI group and control group

SNP	基因型	粗略分析			校正后分析		
		OR	95% CI	<i>P</i>	OR	95% CI	<i>P</i>
rs531471601	CC	1.000	—	0.938	1.000	—	—
	CG	1.412	0.770 ~ 2.590	0.264	1.692	0.823 ~ 3.477	0.153
rs144932926	TT	1.000	—	0.907	1.000	—	—
	TC	0.737	0.400 ~ 1.359	0.329	1.646	0.325 ~ 3.403	0.279

注:“—”表示数据无法获取。

2.5 连锁不平衡及单倍型分析

采用 Haploview4.2 软件对 CTSD 基因启动区 2

个 SNP(rs531471601、rs144932926)进行彼此连锁不平衡分析,结果显示: $D'=1.000>0.8$ 和 $R^2=0.978>$

0.8,证明这 2 个 SNP 位点处于同一完全连锁不平衡区域。根据连锁不平衡系数 D' 和 R^2 作图(图 1)。通过 SHEsis 在线软件对这 2 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($P>0.05$;表 5)。

表 5. 组织蛋白酶 D 基因启动区的单倍型与急性心肌梗死发病的关联性

Table 5. Association between haploid type of CTSD gene promoter region and incidence of AMI

SNP	单倍 体型	频率/%		χ^2	Fisher's P	OR (95% CI)
		AMI 组	对照组			
rs531471601	C	96.2	97.3	1.213	0.271	0.394 ~ 1.300
	G	3.8	2.7			
rs144932926	T	96.4	97.3	0.929	0.335	0.736 ~ 2.449
	C	3.6	2.7			

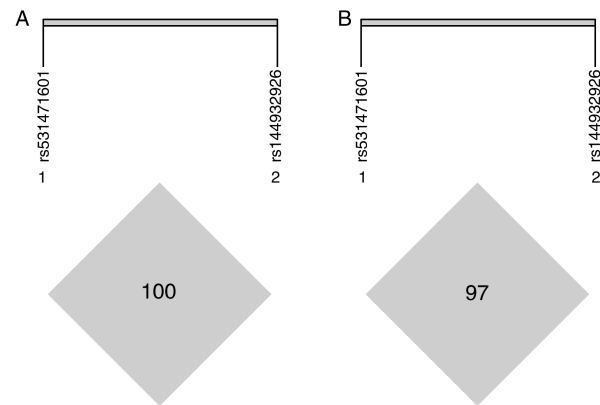


图 1. 组织蛋白酶 D 基因启动区 2 个单核苷酸多态性位点(rs531471601 和 rs144932926)连锁不平衡图

A 为显示 D' 值($D'=1.000$),B 为显示 R^2 值($R^2=0.978$)。

Figure 1. Linkage disequilibrium diagram of two SNP (rs531471601 and rs144932926) in CTSD gene promoter region

2.6 预测单核苷酸多态性影响的转录结合位点

采用 TRANSFAC 在线预测软件(<https://portal.genexplain.com/>)预测转录因子(transcription factor, TF)并对受 SNP 影响的转录因子结合位点进行分析,rs531471601 可影响 ATG12 基因启动子与类 Kruppel 因子 1、包含丘吉尔域 1、芳香烃受体、肿瘤蛋白 p53 的结合。rs144932926 可影响 ATG12 基因启动子与甲基 CpG 结合蛋白 2、髓样锌指 1、转录因子 CP2 样 1 的结合(表 6)。这些 SNP 可能通过影响 TF 与 ATG12 基因启动子的结合来改

变 ATG12 基因启动子的活性进而影响 ATG12 基因的转录水平。

表 6. 预测人类受单核苷酸多态性影响的转录因子结合位点

Table 6. TF binding sites predicted to be affected by

SNP in humans

SNP	改变方式	转录因子结合位点
rs531471601	创造	类 Kruppel 因子 1、包含丘吉尔域 1
	消除	芳香烃受体、肿瘤蛋白 p53
rs144932926	创造	甲基 CpG 结合蛋白 2
	消除	髓样锌指 1、转录因子 CP2 样 1

3 讨论

心肌梗死是世界上死亡和致残的主要原因,其发病机制涉及环境因素与遗传因素的相互作用^[13]。心肌梗死处于多基因控制之下,是多种基因改变和环境因素共同作用的结果^[14]。全基因组关联研究已经确定了约 152 个与人类 AMI 和冠心病相关的基因位点^[15]。SNP 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸变异所引起的 DNA 序列多态性,是人类可遗传的变异中最常见的一种。随着科学研究的不断深入及精准医疗的不断发展,研究 SNP 与 AMI 潜在关联对心肌梗死发病风险的预测、预防及后续治疗具有重要意义。

CTSD 基因位于 11 号染色体短臂的 p15 区域,是一种酸性蛋白酶,在体外有 β -和 γ -分泌酶样活性^[16]。CTSD 存在于几乎所有的细胞、组织和器官中,并且是从人类自噬数据库中提取的自噬相关基因^[17]。在体外或体内模型中进行的研究表明,CTSD 的过度表达可促进动脉斑块的形成,并增加冠心病的风险。然而,CTSD 与冠心病自噬调节的关系尚不清楚^[18]。本研究初步探索了 CTSD 基因启动子序列中 2 个 SNP 位点(rs531471601、rs144932926)和其它危险因素与 AMI 发病的相关性。首先对样本相关的临床资料进行统计学分析,BMI、HDL-C、LDL-C 和 TC 水平显著低于对照组($P<0.05$),其原因可能与心肌梗死患者使用降脂药物、饮食控制和其他与年龄相关的消耗性疾病有关。两组之间 TG 水平差异无显著性($P>0.05$),这可能是由于本研究的样本量较小或心肌梗死的患者服用调脂类药物所致。然后对 2 个 SNP 位点的基因型分布、等位基因频率进行分析显示,SNP(rs531471601)的基因型 CC 和 CG 以及 SNP(rs144932926)的基因型 TT 和 TC 在 AMI 组和对照组中均有发现,SNP(rs531471601)

的单倍型 C 基因频率 AMI 组为 96.2%, 对照组为 97.3%; SNP(rs144932926) 的单倍型 T 基因频率 AMI 组为 96.4%, 对照组为 97.3%; 两组均无统计学差异($P>0.05$)。把临床资料引入 Logistic 回归分析后提示, 较高年龄、高血压病、吸烟、LDLC 和 TG 升高是人群中 AMI 发病的独立危险因素。另外, 在两种遗传模式下未发现与 AMI 发病有关的 SNP。在本研究中证实了此 2 个 SNP 位点处于同一完全连锁不平衡区域($D' = 1.000 > 0.8$ 和 $R^2 = 0.978 > 0.8$), 通过 SHEsis 在线软件分析结果显示, 存在 4 种单倍型, rs531471601G 和 rs144932926T 最常见, 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, rs531471601、rs144932926 均可改变 CTSD 基因启动子与 TF 的结合。rs531471601 可创造与类 Kruppel 因子 1、包含丘吉尔域 1 的结合位点, 消除与芳香烃受体、肿瘤蛋白 p53 的结合位点; rs144932926 可创造与甲基 CpG 结合蛋白 2 的结合位点, 消除与髓样锌指 1、转录因子 CP2 样 1 的结合位点。TF 结合位点的改变可能会改变 CTSD 基因启动子的活性, 从而影响 CTSD 基因的转录水平, 最终影响心肌梗死的发生发展。

综上所述, 本研究对 CTSD 基因启动子区 2 个 SNP 位点在 AMI 人群中的易感性进行了初步探索分析, 对其连锁不平衡及单倍型进行了相关分析, 并证实了 2 个 SNP 位点为完全连锁不平衡, 虽未证实该 2 个 SNP 位点及其组成的单倍型 GG/AA 与 AMI 发病有相关性, 但提供了 CTSD 基因启动区多态性的群体遗传学资料。而且本研究未发现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] MARTIN T P, MACDONALD E A, ELBASSIONI A, et al. Pre-clinical models of myocardial infarction: from mechanism to translation[J]. Br J Pharmacol, 2022, 179(5): 770-791.
- [2] RAMACHANDRA C, HERNANDEZ-RESENDIZ S, CRESPO-AVILAN G, et al. Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection[J]. EBioMedicine, 2020, 57: 102884.
- [3] 杜正任, 张现朝, 王玉强, 等. 急性心肌梗死患者 PCI 术前冠状动脉内应用尿激酶原的疗效和安全性分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(2): 156-165.

- DU Z R, ZHANG X Z, WANG Y Q, et al. The analysis of the efficacy and safety of prourokinase administration in coronary artery of patients with acute myocardial infarction before PCI[J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(2): 156-165.
- [4] LIBBY P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy[J]. N Engl J Med, 2013, 368(21): 2004-2013.
- [5] GALLUZZI L, GREEN D R. Autophagy-independent functions of the autophagy machinery[J]. Cell, 2019, 177(7): 1682-1699.
- [6] 董亚兰, 胡德胜. 动脉粥样硬化的炎症应答特征及运用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(4): 304-312.
- DONG Y L, HU D S. Characteristics and application of inflammatory response in atherosclerosis[J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(4): 304-312.
- [7] MINAROWSKA A, GACKO M, KARWOWSKA A, et al. Human cathepsin D[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2008, 46(1): 23-38.
- [8] ZHENG W, CHEN Q, WANG C, et al. Inhibition of cathepsin D (CTSD) enhances radiosensitivity of glioblastoma cells by attenuating autophagy[J]. Mol Carcinog, 2020, 59(6): 651-660.
- [9] BENES P, VETVICKA V, FUSEK M. Cathepsin D--many functions of one aspartic protease[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2008, 68(1): 12-28.
- [10] MIZUSHIMA N, LEVINE B. Autophagy in human diseases[J]. N Engl J Med, 2020, 383(16): 1564-1576.
- [11] WU P, YUAN X, LI F, et al. Myocardial upregulation of cathepsin D by ischemic heart disease promotes autophagic flux and protects against cardiac remodeling and heart failure[J]. Circ Heart Fail, 2017, 10(7): e004044.
- [12] KAKIMOTO Y, SASAKI A, NIIOKA M, et al. Myocardial cathepsin D is downregulated in sudden cardiac death[J]. PLoS One, 2020, 15(3): e0230375.
- [13] DO R, STITZEL N O, WON H H, et al. Exome sequencing identifies rare LDLR and ApoA5 alleles conferring risk for myocardial infarction[J]. Nature, 2015, 518(7537): 102-106.
- [14] ZHANG Z, LI Y, YANG X, et al. Susceptibility of multiple polymorphisms in ADIPOQ, ADIPOR1 and ADIPOR2 genes to myocardial infarction in Han Chinese[J]. Gene, 2018, 658: 10-17.
- [15] HAN F, PANG S, SUN Z, et al. Genetic variants and functional analyses of the ATG16L1 gene promoter in acute myocardial infarction[J]. Front Genet, 2021, 12: 591954.
- [16] DI Y Q, HAN X L, KANG X L, et al. Autophagy triggers CTSD (cathepsin D) maturation and localization inside cells to promote apoptosis[J]. Autophagy, 2021, 17(5): 1170-1192.
- [17] MOUSSAY E, KAOMA T, BAGINSKA J, et al. The acquisition of resistance to TNF α in breast cancer cells is associated with constitutive activation of autophagy as revealed by a transcriptome analysis using a custom microarray[J]. Autophagy, 2011, 7(7): 760-770.
- [18] DAI J, ZHANG Q, WAN C, et al. Significances of viable synergistic autophagy-associated cathepsin B and cathepsin D (CTSB/CTSD) as potential biomarkers for sudden cardiac death[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2021, 21(1): 233.

(此文编辑 许雪梅)