

本文引用: 王 丽, 郜 雪, 刘 倩, 等. *NKX2-5* 基因启动子在急性心肌梗死患者中的遗传变异和初步功能分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(8): 736-742, 780. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.08.004.

· 临床研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2026)34-08-0736-07

NKX2-5 基因启动子在急性心肌梗死患者中的遗传变异和初步功能分析

王 丽^{1,2,3}, 郜 雪⁴, 刘 倩^{2,5}, 连福明^{1,2}, 闫 波²

1. 山东大学齐鲁医学院, 山东省济南市 250012; 2. 济宁医学院精准医学研究院, 山东省济宁市 272067;

3. 济南市长清区人民医院麻醉科, 山东省济南市 250300; 4. 济宁医学院附属医院心内科, 山东省济宁市 272029;

5. 山东第一医科大学药学院, 山东省济南市 250000

[摘 要] **[目的]** 探讨同源盒蛋白 *NKX2-5* 基因启动子区的遗传变异与急性心肌梗死发病的相关性。**[方法]** 采用病例对照研究方法, 收集 415 例急性心肌梗死患者和 388 例健康对照。利用聚合酶链反应和测序的方法获得 *NKX2-5* 基因启动子区的基因序列变异, 通过细胞培养和转染对 *NKX2-5* 基因启动子区的基因序列变异进行生物学功能分析, 利用 TRANSFAC 在线网站预测基因序列变异可能影响的转录因子结合位点。**[结果]** 在 *NKX2-5* 基因启动子区共发现 8 个基因序列变异, 其中遗传变异 g. 173236217 C>T、g. 173236119 T>A、g. 173235502 A>G 和 g. 173235141 C>T 仅在心肌梗死患者中出现, 遗传变异 g. 173236158 T>C 和 g. 173235283 G>A 仅在对照组中出现。转染结果显示, 遗传变异 g. 173236119 T>A 和 g. 173235502 A>G 显著降低 *NKX2-5* 基因启动子转录活性 ($P<0.01$), 但遗传变异 g. 173236158 T>C 和 g. 173235283 G>A 则增加了 *NKX2-5* 基因启动子转录活性 ($P<0.05$)。TRANSFAC 分析发现遗传变异 g. 173235502 A>G 和 g. 173236158 T>C 影响 *NKX2-5* 基因启动子与转录因子的结合。**[结论]** 急性心肌梗死病人中 *NKX2-5* 基因启动子的遗传变异可能通过影响转录因子的结合, 降低 *NKX2-5* 基因的转录活性, 从而可能作为一种罕见的低频变异参与急性心肌梗死的发生发展。

[关键词] *NKX2-5* 基因; 急性心肌梗死; 基因启动子; 基因序列变异

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Genetic variations and preliminary functional analysis of the *NKX2-5* gene promoter in patients with acute myocardial infarction

Wang Li^{1,2,3}, Gao Xue⁴, Liu Qian^{2,5}, Lian Fuming^{1,2}, Yan Bo²

1. Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China; 2. Institute of Precision Medicine, Jining Medical University, Jining, Shandong 272067, China; 3. Department of Anesthesiology, Jinan Changqing District People's Hospital, Jinan, Shandong 250300, China; 4. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining, Shandong 272029, China; 5. School of Pharmacy, Shandong First Medical University, Jinan, Shandong 250000, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association between genetic variations in the promoter region of the homeobox protein *NKX2-5* gene and the onset of acute myocardial infarction (AMI). **Methods** A case-control study was conducted involving 415 AMI patients and 388 healthy controls. Gene sequence variations in the promoter region of the *NKX2-5* gene were identified using polymerase chain reaction combined with sequencing. The biological functions of gene sequence variants in the *NKX2-5* promoter region was analyzed through cell culture and cell transfection assays. Transcription factor binding sites potentially altered by gene sequence variations were predicted using the TRANSFAC online platform. **Results** A total of eight gene sequence variations were identified. Therein, genetic variants g. 173236217 C>T,

[收稿日期] 2026-03-14

[修回日期] 2026-06-30

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82470451)

[作者简介] 王丽, 硕士研究生, 研究方向为临床心血管病, E-mail: wangli202320242025@163.com。通信作者连福明, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管病的分子机制, E-mail: fmlian@mail.jnmc.edu.cn。

g. 173236119 T>A, g. 173235502 A>G and g. 173235141 C>T were observed only in AMI patients, whereas genetic variants g. 173236158 T>C and g. 173235283 G>A were found only in the control group. Transfection experiments demonstrated that genetic variants g. 173236119 T>A and g. 173235502 A>G significantly reduced *NKX2-5* gene promoter transcriptional activity ($P<0.01$). In contrast, genetic variants g. 173236158 T>C and g. 173235283 G>A enhanced promoter activity ($P<0.05$). TRANSFAC analysis indicated that genetic variants g. 173235502 A>G and g. 173236158 T>C altered transcription factor binding to the *NKX2-5* promoter. **Conclusion** Genetic variations in the *NKX2-5* gene promoter may contribute to AMI susceptibility by decreasing transcriptional activity through altered transcription factor binding, suggesting their potential role as rare, low-frequency variations in the AMI pathogenesis.

[**KEY WORDS**] *NKX2-5* gene; acute myocardial infarction; gene promoter; gene sequence variations

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是全球范围内发病率和死亡率居高不下的主要心血管疾病之一^[1-2]。尽管已报道部分遗传因素与 AMI 关联^[3],但其完整的遗传学病因和相关分子机制仍有待深入探索^[4]。研究发现转录因子与心血管疾病的发生发展密切相关^[5-7]。同源盒蛋白 *NKX2-5* 是所有脊椎动物心脏发生过程中最早表达的转录因子,在复杂的心脏发育中发挥重要的调节作用^[8-10]。研究显示在心血管前体细胞中可以检测到 *NKX2-5* 表达,且在 *NKX2-5* 基因敲除的斑马鱼中,咽弓动脉数量减少或缺失^[11-12]。此外,*NKX2-5* 在病理性血管重塑中驱动平滑肌细胞从收缩型向合成型转化,条件性敲除 *NKX2-5* 可减缓缺氧诱导的血管重塑和高血压进展^[13]。rs9481842 可通过 *NKX2-5* 介导的转录网络增加心房颤动风险^[14]。然而,目前 *NKX2-5* 启动子与 AMI 发病的关联研究,特别是调控区变异如何通过改变 *NKX2-5* 的表达或结合活性,进而参与心肌缺血损伤和修复的分子机制尚不明确。因此,本研究旨在系统分析 *NKX2-5* 基因启动子在 AMI 患者中的遗传变异特征,结合功能实验揭示这些变异对 *NKX2-5* 转录活性的影响,为 AMI 的精准诊断和靶向治疗提供新的理论依据。

1 资料和方法

1.1 研究对象

415 例 AMI (男性 302 例,女性 113 例) 来自山东省济宁医学院附属医院心内科已确诊的 AMI 患者。AMI 的纳入标准为 2018 年欧洲心脏病学会 (ESC) 制定的“心肌梗死通用定义”第四版,即急性心肌损伤 (血清心脏肌钙蛋白值增高和/或回落,且至少有一次值高于第 99 百分位参考上限),且同时有急性心肌缺血的临床证据,包括:(1) 急性心肌缺血症状;(2) 新出现的缺血性心电图改变;(3) 新发病理性 Q 波形成;(4) 影像学检查显示有新的存活

心肌丧失或新的局部室壁运动异常,且表现符合缺血病因;(5) 通过血管造影或尸检发现冠状动脉血栓。排除标准:(1) 不符合纳入标准者;(2) 年龄小于 18 周岁者;(3) 合并主动脉夹层、心脏瓣膜病、心肌炎、原发性心肌病或冠状动脉血管成形术后引起心绞痛的患者;(4) 有肿瘤疾病史者;(5) 有自身免疫性疾病者;(6) 资料不完善者;(7) 拒绝合作或无法完成合作者。

对照组为 388 例同期招募的相对健康体检者 (男性 203 例,女性 185 例),根据其症状、体征、体格检查、既往史、家族史、心电图检查和心肌酶排除了冠心病及其他心脏疾病。具体纳入标准:(1) 无心脏和血管疾病史;(2) 无肿瘤疾病史;(3) 心电图正常;(4) 心肌酶正常。排除标准:(1) 不符合纳入标准者;(2) 年龄小于 18 周岁者;(3) 有心血管疾病患病史及家族史和患有严重肝肾功能不全的人;(4) 有肿瘤疾病史者;(5) 有自身免疫性疾病者;(6) 资料不完善者;(7) 拒绝合作或无法完成合作者。收集并记录所有研究对象的临床资料。本研究遵循赫尔辛基宣言,经济宁医学院附属医院人类伦理委员会批准 (伦理编号为 2018-FY-070) 并获得所有参与者的知情同意。

1.2 资料收集

收集研究对象的基本信息和既往史、吸烟史、实验室指标等临床资料。(1) 体重指数 (body mass index, BMI) 的计算公式为体重 (kg)/身高 (m)²;(2) 吸烟史定义为每日吸烟 ≥ 1 支且连续吸烟 ≥ 1 年;(3) 糖尿病史依据既往明确诊断史,或本次入院后空腹 (禁食 ≥ 8 h) 血糖 ≥ 7.0 mmol/L 和/或口服 75 g 葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 后 2 h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L 和/或糖化血红蛋白 $\geq 6.5\%$;(4) 血脂检测:所有研究对象于清晨空腹 (禁食 ≥ 10 h) 状态下,抽取肘静脉血 3~5 mL,分离血清。由济宁医学院附属医院检验科使用日立 7600-120 全自动生物化学分析仪进行检测;(5) 收

缩压和舒张压采用标准电子血压计测定,受试者取坐位或卧位、休息 ≥ 5 min后测量右上臂肱动脉血压,连续测量3次,取平均值用于统计分析。

1.3 实验仪器和试剂

实验仪器包括凝胶成像系统(Tanon-3500)、高速离心机(GENESPEED-1730R)、单管型多功能检测仪(Promega-GlomagE6080)、梯度聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(美国ABI-9700)。实验试剂包括减血清培养基(Invitrogen-31985-062)、Lipofectamine 2000 Reagent(Invitrogen-11668-019)、人外周血单个核细胞分离液(天津灏洋-LDS1075)、Dual-Luciferase Reporter Assay System 试剂盒(Promega-E1910)、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)、质粒小提试剂盒(TaKaRa-9760)、胎牛血清(FBS)(Hyclone-SH30084.03)和DMEM/Low GLUCOSE(Cytiva-SH30021)。

1.4 提取全基因组 DNA

采集研究对象晨起空腹静脉血3 mL,采用人全血单个核细胞分离液分离单个核细胞。通过DNA提取试剂盒从单个核细胞中提取全基因组DNA并保存在 -80°C 冰箱中用于后续实验。

1.5 引物设计

根据NCBI数据库中NKX2-5基因启动子序列(GenBank:NG_000005.10)设计引物。选取NKX2-5基因转录起始位点上游1 080个碱基对序列和转录起始位点下游122个碱基对序列进行分析。NKX2-5基因转录起始位点位于g.173235204(+1)。使用Primer Premier 5.0软件设计引物,通过NCBI Primer-BLAST(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)在线工具对引物序列进行特异性分析,选取高特异性引物(上游引物序列为5'-GGCATCACCCCACTTGCCCTGCCC-3',下游引物序列为5'-GGGTGGTGGCAGCGCCAGTCTCAC-3')由上海生工生物有限公司合成。

1.6 目的片段扩增

PCR体系为50 μL :模板3 μL ,上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)1 μL ,下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)1 μL ,Taq酶0.5 μL ,dNTP Mix 8 μL ,GC buffer I 25 μL ,双蒸水11.5 μL 。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸50 s,共35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 暂时保存。取2 μL PCR产物经20 g/L的琼脂糖凝胶电泳判断目的条带。

1.7 双萤光素酶报告法分析

采用含有Sac I-HF和Hind III-HF酶切位点的

引物[上游引物序列为5'-(Sac I-HF)GGCATCAC-CCCACTTGCCCTGCCC-3';下游引物序列为5'-(Hind III-HF)GGGTGGTGGCAGCGCCAGTCTCAC-3']构建表达载体,以分析NKX2-5基因启动子的功能。不含NKX2-5基因启动子的表达载体(pGL3-Basic)作为阴性对照。海肾萤光素酶报告基因质粒(pRL-TK;Promega)作为内参照。将HEK-293细胞和H9C2细胞接种到6孔板中,待融合度达到70%~90%时进行细胞转染。36~48 h后使用双萤光素酶报告基因检测系统检测转染细胞的双萤光素酶活性。萤火虫萤光素酶活性与海肾萤光素酶活性的比值代表NKX2-5基因启动子的活性。将野生型NKX2-5基因启动子的活性设定为100%。

1.8 统计学处理

细胞转染实验独立重复3次,每次重复3个样本,转染结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,并采用独立样本 t 检验对转染结果进行统计分析。临床资料[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)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、BMI、收缩压及舒张压]采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,并采用独立样本 t 检验进行统计学分析。定性资料(性别、吸烟史、糖尿病史)采用频数(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验进行统计学分析。基因型及等位基因在AMI组和对照组的频率分布采用R $\times$ C卡方检验进行分析。采用Logistic回归分析临床相关指标与AMI的相关性。使用SPSS 25.0软件进行上述统计分析。使用SNP Stats(<https://snpstats.net/start.htm>)进行单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与AMI风险之间的关联研究。使用TRANSFAC(<https://portal.genexplain.com/>)预测变异位点是否影响NKX2-5基因启动子与其他转录因子的结合。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AMI组和对照组临床基线特征分析

对两组患者临床资料进行比较,结果显示,与对照组相比,AMI组男性占比显著升高,患者年龄比对照组增加26.5%($P<0.01$);AMI组BMI是对照组的1.04倍,糖尿病患病率及吸烟占比较对照组显著升高,收缩压降低4.7%($P<0.01$);AMI组患者TG、TC、LDLC及HDL水平分别比对照组降低11.3%、11.3%、7.4%和15.1%($P<0.01$),而舒张压在两组之间差异无统计学意义($P>0.05$),这可能

与 AMI 患者心功能受损及口服降脂药有关(表 1)。

表 1. 临床特征分析

Table 1. Analysis of clinical characteristics

参数	对照组 (n=388)	AMI 组 (n=415)	P
男性/[例(%)]	203(52.3)	302(72.8)	<0.01
年龄/岁	49±12	62±12	<0.01
BMI/(kg/m ²)	25±6.5	26±4.3	<0.01
收缩压/mmHg	129±20	123±22	<0.01
舒张压/mmHg	77±12	77±15	0.417
吸烟史/[例(%)]	23(6.0)	237(57.1)	<0.01
糖尿病史/[例(%)]	24(6.2)	95(22.9)	<0.01
TG/(mmol/L)	1.60±1.04	1.42±1.07	<0.01
TC/(mmol/L)	4.95±0.86	4.39±1.00	<0.01
LDLC/(mmol/L)	2.84±0.79	2.63±0.77	<0.01
HDLc/(mmol/L)	1.26±0.28	1.07±0.25	<0.01

2.2 NKX2-5 基因启动子区测序结果、基因型和等位基因频率分析

本研究人群共发现 8 个 NKX2-5 基因启动子区序列变异位点。其中 4 个遗传变异(g. 173236217 C>T、g. 173236119 T>A、g. 173235502 A>G、g. 173235141 C>T)仅见于 AMI 患者,对照组中未检出。此外,g. 173236104 G>A

和 g. 173235491 A>G 在 AMI 患者及对照组中均有检出,Hardy-Weinberg 平衡检验结果显示,各 SNP 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,但是它们的频率分布差异无显著性($P>0.05$)。遗传变异 g. 173236158 T>C 和 g. 173235283 G>A 只在对照组中出现。遗传变异的位置分布见图 1。基因型和基因频率分析显示,g. 173236104 G>A 和 g. 173235491 A>G 在两组中的基因型和等位基因频率分布差异均无显著性($P>0.05$;表 2)。

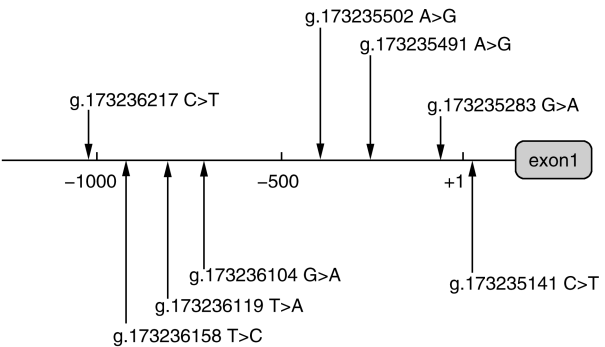


图 1. NKX2-5 基因启动子变异位点位置

突变位点根据其在 NKX2-5 基因组序列(美国国家生物技术信息中心,基因库编号:NG_000005.10)中的位置进行命名。转录起始于第一个外显子的 173235204(+1)位置。

Figure 1. Locations of NKX2-5 gene promoter variants

表 2. 遗传变异的基因型和等位基因频率分析

Table 2. Genotypic and allelic frequency analysis of genetic variants

单位:例(%)

变异位点	基因型	对照组(n=388)	AMI(n=415)	P
g. 173236217 C>T(rs546313027)	CT	0	1	—
	TT	0	0	—
g. 173236158 T>C	TC	1	0	—
g. 173236119 T>A(rs3763052)	TA	0	1	—
	TT	0	0	—
g. 173236104 G>A(rs572793923)	GA	3(0.8)	2(0.5)	0.677
	GG	385(99.2)	413(99.5)	
	G 等位基因	773(99.6)	828(99.8)	0.601
	A 等位基因	3(0.4)	2(0.2)	
g. 173235502 A>G(rs561472902)	AG	0	1	—
g. 173235491 A>G(rs118026695)	AG	67(17.3)	63(15.2)	0.205
	GG	0	3(0.7)	
	AA	321(82.7)	349(84.1)	
	AG+GG	67(17.3)	66(15.9)	0.603
	G 等位基因	67(8.6)	69(8.3)	0.811
	A 等位基因	709(91.4)	761(91.7)	
g. 173235283 G>A	GA	1	0	—
g. 173235141 C>T	CT	0	1	—

注:“—”表示数据无法获取。

2.3 遗传变异在不同区域人群的分布频率

为进一步明确本研究发现的基因变异频率情况,本研究通过 gnomADv4-Genomes 查阅了它们在不同地区的变异频率(表 3),发现变异频率存在种族及地区差异,本研究人群中的变异频率和东亚人群是相似的,表明我们的研究符合遗传背景。因为

遗传变异 g. 173235141 C>T 和 g. 173236158 T>C、g. 173235283 G>A) 系首次报道,未被收录到 NCBI dbSNP 数据库,所以未查阅到它们的变异频率。为进一步明确本研究中的变异位点与冠心病的关联,我们查阅了 openGWAS 数据库中关于冠心病的数据集,未发现与之相同的变异位点。

表 3. 不同区域人群的变异频率

Table 3. Variant frequencies of populations in different regions

单位:%

区域/人群	rs3763052 (g. 173236119 T>A)	rs546313027 (g. 173236217 C>T)	rs118026695 (g. 173235491 A>G)	rs572793923 (g. 173236104 G>A)	rs561472902 (g. 173235502 A>G)
全球	0.0107	0.0054	0.2527	0.008	0.0014
欧洲	0	0.008	0.005	0	0
美国	0	0	0.043	0	0
东亚	0.31	0.02	7.17	0.23	0.04
南亚	0	0	0.25	0	0

注:此数据来自 gnomADv4-Genomes。

2.4 相关性分析

以 AMI 为因变量,年龄、性别、吸烟史、糖尿病史等临床因素为自变量,采用 Logistic 回归分析临床因素与 AMI 的关系,结果显示,年龄、吸烟史、舒张压、LDLC、糖尿病史与 AMI 发生呈显著正相关($P<0.05$),上述因素可能参与了 AMI 的发病过程;而收缩压、HDL C、TC 与 AMI 发生呈显著负相关($P<0.01$),其中 TC 的负相关可能受 AMI 患者常规服用调脂药物的影响。在本研究模型中,BMI、TG 和性别未显示与 AMI 具有显著相关性($P>0.05$),可能与样本量少所导致的偏差有关,下一步需扩大样本量进一步分析(表 4)。

表 4. 临床危险因素的相关分析

Table 4. Correlation analysis of clinical risk factors

变量	OR	95% CI	P
年龄	1.116	1.092 ~ 1.141	<0.01
收缩压	0.950	0.934 ~ 0.966	<0.01
舒张压	1.063	1.036 ~ 1.092	<0.01
HDL C	0.160	0.061 ~ 0.420	<0.01
LDLC	1.736	1.048 ~ 2.877	0.032
TG	1.233	0.931 ~ 1.633	0.145
TC	0.370	0.226 ~ 0.605	<0.01
BMI	1.009	0.973 ~ 1.045	0.639
吸烟史	21.217	11.666 ~ 38.588	<0.01
糖尿病史	2.841	1.472 ~ 5.483	0.02
男性	0.723	0.447 ~ 1.168	0.185

使用 SNP Stats 在线分析软件对遗传变异 g. 173235491 A>G 进行 5 种遗传模型(共显性、显性、隐性、超显性和加性)分析,结果显示,在调整年龄和性别后,遗传变异 g. 173235491 A>G 与 AMI 的发生无相关性。因携带遗传变异 g. 173236104 G>A 的研究对象例数较少,未进行 5 种遗传模型分析(表 5)。

表 5. NKX2-5 基因启动子区 SNP 与 AMI 的相关性分析

Table 5. Correlation analysis between SNP in the promoter region of NKX2-5 gene and AMI 单位:例

SNP	遗传模型	基因型	AMI 对照组	OR	P
g. 173235491 A>G	显性	AA	349 321	1.00	0.68
		AG+GG	66 67	0.91	
	共显性	AA	349 321	1.00	0.3
		AG	63 67	0.88	
		GG	3 0	—	
	超显性	AA+GG	352 321	1.00	0.55
		AG	63 67	0.87	
	隐性	AA+AG	412 388	1.00	0.15
		GG	3 0	—	
	加性	—	—	0.95	0.82

注:“—”表示数据无法获取。

2.5 遗传变异对 NKX2-5 基因启动子转录活性的影响

采用双荧光素酶报告系统检测遗传变异对 NKX2-5 基因启动子转录活性的影响,结果显示在

HEK-293 细胞中,仅在 AMI 患者中发现的遗传变异 g. 173236119 T>A 和 g. 173235502 A>G 显著降低 *NKX2-5* 基因启动子转录活性 ($P<0.01$), 转录活性降低的幅度分别为 24.82% (g. 173236119 T>A) 和 33.48% (g. 173235502 A>G)。仅在 AMI 患者中发现的遗传变异 g. 173236217 C>T 和 g. 173235141 C>T 未显著改变 *NKX2-5* 基因启动子的转录活性 ($P>0.05$)。仅在对照组中发现的遗传变异 g. 173236158 T>C 和 g. 173235283 G>A 增加了 *NKX2-5* 基因启动子的转录活性 ($P<0.05$), 转录活性增加的幅度分别为 9.56% (g. 173236158 T>C) 和 32.72% (g. 173235283 G>A)。在 H9C2 细胞中获得了与 HEK-293 细胞相似的结果, 仅在 AMI 组发现的遗传变异 g. 173236119 T>A 和 g. 173235502 A>G 显著降低 *NKX2-5* 基因启动子的转录活性 ($P<0.01$), 转录活性降低的幅度分别为 31.42% (g. 173236119 T>A) 和 30.34% (g. 173235502 A>G)。仅在对照组中发现的遗传变异 g. 173236158 T>C 和 g. 173235283 G>A 增加了 *NKX2-5* 基因启动子的转录活性 ($P<0.05$), 转录活性升高的幅度分别为 39.87% (g. 173236158 T>C) 和 18.71% (g. 173235283 G>A)。仅在 AMI 中发现的遗传变异 g. 173236217 C>T 和 g. 173235141 C>T 同样未显著改变 *NKX2-5* 基因启动子的转录活性 ($P>0.05$)。上述结果表明,这四个遗传变异 (g. 173236119 T>A、g. 173235502 A>G、g. 173236158 T>C、g. 173235283 G>A) 改变了 *NKX2-5* 基因启动子的转录活性 (图 2)。

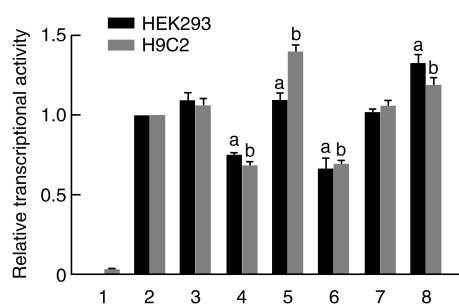


图 2. *NKX2-5* 基因启动子在 HEK293 细胞和 H9C2 细胞中的相对转录活性 ($n=9$)

以空载体 pGL3-basic 作为阴性对照。将野生型 *NKX2-5* 基因启动子的转录活性设定为 100%, 计算变异型 *NKX2-5* 基因启动子的相对活性。1 为 pGL3-basic, 2 为 pGL3-WT, 3 为 pGL3-173236217T, 4 为 pGL3-173236119A, 5 为 pGL3-173236158C, 6 为 pGL3-173235502G, 7 为 pGL3-173235141T, 8 为 pGL3-173235283A。a 为 $P<0.05$, 转染变异质粒的 HEK293 与转染野生型质粒的 HEK293 比较; b 为 $P<0.05$, 转染变异质粒的 H9C2 与转染野生型质粒的 H9C2 比较。

Figure 2. Relative transcriptional activity of wild-type and variant *NKX2-5* gene promoters in HEK293 and H9C2 cells ($n=9$)

2.6 预测遗传变异对转录因子的影响

采用 TRANSFAC 在线数据库预测 *NKX2-5* 基因启动子序列变异对转录因子结合的影响, 结果显示, 遗传变异 g. 173235502 A>G 产生了 *NKX2-5* 基因启动子序列中转录因子芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 的结合位点, 遗传变异 g. 173236158 T>C 消除了 *NKX2-5* 基因启动子序列中转录因子 Krüppel 样因子 4 (Krüppel-like factor 4, KLF4) 的结合位点。然而, 没有预测到遗传变异 g. 173235283 G>A 和 g. 173236119 T>A 对 *NKX2-5* 基因启动子序列中转录因子结合位点的影响。这表明遗传变异 g. 173235502 A>G 和 g. 173236158 T>C 可能通过影响转录因子与 *NKX2-5* 基因启动子的结合改变了 *NKX2-5* 的转录水平, 但仍需对预测结果进一步验证。

3 讨论

冠心病是一种由遗传和环境因素共同导致的多因素疾病。已有研究表明遗传变异与心肌梗死相关^[15-16], 但 *NKX2-5* 基因启动子遗传变异与 AMI 相关性的研究尚未报道。

本研究通过 Logistic 回归分析进一步分析了 AMI 与临床相关指标的相关性, 结果显示 TC 与 AMI 的发生呈负相关, 这可能与 AMI 患者服用降脂药物有关。BMI、TG 水平和性别与 AMI 发生无显著相关性。年龄、吸烟史、舒张压、LDLC、糖尿病史与 AMI 发生呈显著正相关, 提示以上因素可能参与了 AMI 的发生。我们分析了两组研究对象的临床资料, 虽然 AMI 组的年龄、男性占比、糖尿病比例、BMI、吸烟比例均高于对照组, 但是收缩压低于对照组, 这可能与心肌梗死后心功能不全或心源性休克有关。而 AMI 组血脂水平低于对照组, 这可能与 AMI 患者口服降脂药物有关。

本研究针对 *NKX2-5* 基因启动子区域的遗传变异进行分析, 发现 2 个 SNP (g. 173235491 A>G 和 g. 173236104 G>A) 在对照组及 AMI 组中均存在, 但是在两组中的分布频率差异无统计学意义。进一步对 SNP (g. 173235491 A>G) 进行了 5 种遗传模型的相关性分析, 同样未发现其与 AMI 相关性。因携带遗传变异 g. 173236104 G>A 的研究对象例数较少, 未进行 5 种遗传模型分析。同时我们查阅了 clinVar 数据库, 亦未发现这两个遗传变异与 AMI 相关。SNP (g. 173235491 A>G、g. 173236104 G>A) 已有研究报道, 并非首次发现, 即这两个遗传变异可能不影响 *NKX2-5* 启动子的转录活性, 所以我们未

对其进行功能学分析。

双荧光素酶报告实验发现,AMI 患者携带的遗传变异 g. 173236119 T>A 和 g. 173235502 A>G 显著降低启动子转录活性,提示这些变异可能通过下调 *NKX2-5* 表达,改变心肌细胞对缺血损伤的耐受性或修复能力,从而增加 AMI 风险。相反,对照组中发现的遗传变异 g. 173236158 T>C 和 g. 173235283 G>A 增强启动子的转录活性,可能具有心脏保护作用。

NKX2-5 通过一组核心转录因子严密调控心脏发育^[17]。前期研究表明,*NKX2-5* 在转录水平上受 *NKX2-5* 上游的许多转录因子和顺式调控元件的调节。这些转录过程能够在不同时间调控 *NKX2-5* 的表达^[18]。BRG1 相关因子 250a (BRG1-associated factor 250a, BAF250a)、T-box 转录因子 3 (T-box transcription factor 3, TBX3) 和组蛋白去乙酰化酶 3 (histone deacetylase 3, HDAC3) 共同作用抑制 *NKX2-5* 的表达进而导致窦房结传导异常,引发心动过缓^[19]。利用 RNA 干扰技术敲低细胞内信号转导及转录活化因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 发现, *NKX2-5* 的表达降低^[20]。此外,骨形态发生蛋白 4 (bone morphogenetic protein 4, BMP4) 通过 GATA 结合蛋白 4 (GATA-binding protein 4, GATA4) 调控 *NKX2-5* 的表达促进脂肪来源干细胞向中胚层来源细胞分化^[21]。结合细胞转染和 TRANSFAC 预测结果,我们推测遗传变异 g. 173235502 A>G 产生了 AhR 结合位点,遗传变异 g. 173236158 T>C 消除了 KLF4 的结合位点。然而,没有预测到遗传变异 g. 173235283 G>A 和 g. 173236119 T>A 改变转录因子结合位点,它们可能是影响了其他未知潜在的转录因子。

本研究存在以下局限性:AMI 组与对照组在年龄和性别分布上存在显著差异,这主要源于 AMI 自身的流行病学特点(好发于高龄男性)。我们在统计分析中采用 Logistic 回归对年龄和性别进行了校正,未来需要在更大规模、多中心且年龄与性别匹配更均衡的独立人群中加以验证。

综上所述,*NKX2-5* 基因启动子变异可能影响转录因子的结合,改变 *NKX2-5* 基因的转录活性,进而影响 AMI 的发生和发展。后续我们将会扩大样本量进行深入的机制研究,探索变异位点影响的具体转录因子,为 AMI 的发病分子机制提供遗传学依据,并提供潜在的分子治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Clemente-Moragón A, Suárez-Barrientos A, Gómez Tech M, et al. Pharmacogenomics and chronotherapy of drug-induced cardioprotection in acute myocardial infarction[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 10450.
- [2] Zhou J, Yuan H, Park S. Predicting structure-targeted food bioactive compounds for middle-aged and elderly Asians with myocardial infarction: insights from genetic variations and bioinformatics-integrated deep learning analysis[J]. *Food Funct*, 2024, 15(18): 9497-9511.
- [3] Akter S, Ibrahim M N B, Mahmud Z, et al. Genetic association and computational analysis of CYP2R1 gene polymorphisms rs2060793 and rs12794714 with vitamin D deficiency and acute myocardial infarction in the Bangladeshi population: a case control study[J]. *PLoS One*, 2026, 21(6): e0350994.
- [4] Yang W, Cao J, Mcvey D G, et al. Allele-specific epigenetic regulation of FURIN expression at a coronary artery disease susceptibility locus[J]. *Cells*, 2023, 12(13): 1681.
- [5] Zhang S, Wang Y, Feng Y, et al. SLC11A1 drives ferroptosis in acute myocardial infarction via Sp1-mediated transcriptional repression of GPX4[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2026, 19(1): 62.
- [6] 张圆, 林浩, 朱晓庭, 等. 转录因子 EB 与心肌缺血损伤的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2025, 33(11): 997-1003.
Zhang Y, Lin H, Zhu X T, et al. Research progress of transcription factor EB and myocardial ischemic injury[J]. *Chin J Arterioscler*, 2025, 33(11): 997-1003.
- [7] 王慧莹, 刘雨舒, 赵勇, 等. 转录因子 SOX9 在心血管系统中的作用研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2025, 33(6): 531-538.
Wang H Y, Liu Y S, Zhao Y, et al. Research progress on the role of transcription factor SOX9 in cardiovascular system[J]. *Chin J Arterioscler*, 2025, 33(6): 531-538.
- [8] Henry S, Kokity L, Pirity M K. Polycomb protein RYBP activates transcription factor Plagl1 during *in vitro* cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells[J]. *Open Biol*, 2023, 13(2): 220305.
- [9] Peña-Martínez E G, Rivera-Madera A, Pomales-Matos D A, et al. Disease-associated non-coding variants alter *NKX2-5* DNA-binding affinity[J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2023, 1866(1): 194906.
- [10] Wei J, Huang P, Chen L, et al. Combined effects of maternal periconceptional environmental exposures and infant cardiac transcription factor polymorphisms on congenital heart disease risk[J]. *Ann Med*, 2026, 58(1): 2688397.
- [11] López-Muneta L, Linares J, Casis O, et al. Generation of *NKX2.5*^{GFP} reporter human iPSCs and differentiation into functional cardiac fibroblasts[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 797927.
- [12] Cao C, Li L, Zhang Q, et al. *Nkx2.5*: a crucial regulator of cardiac development, regeneration and diseases[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1270951.
- [13] Papaioannou I, Dritsoula A, Kang P, et al. *NKX2-5* regulates vessel remodeling in scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension[J]. *JCI Insight*, 2024, 9(10): e164191.
- [14] Assum I, Krause J, Scheinhardt M O, et al. Tissue-specific multi-omics analysis of atrial fibrillation[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 441.

(下转第 780 页)

- [9] Miller E S, Saade G R, Simhan H N, et al. Trajectories of antenatal depression and adverse pregnancy outcomes[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2022, 226(1): 108. e1-108. e9.
- [10] Kamphof H D, Marijnen M C, Damhuis S E, et al. Predictive value of fetal doppler velocimetry, fetal growth trajectory and maternal serum biomarkers for short-term adverse perinatal outcome; secondary analysis of DRIGITAT study[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2025, 66(4): 470-479.
- [11] International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(3): 676-682.
- [12] 中华医学会妇产科学分会产科学组, 中华医学会围产医学分会, 中国妇幼保健协会妊娠合并糖尿病专业委员会. 妊娠期高血糖诊治指南(2022)[第一部分][J]. *中华妇产科杂志*, 2022, 57(1): 3-12.
- Obstetrics Subgroup of Chinese Society of Obstetrics and Gynecology of Chinese Medical Association, Chinese Society of Perinatal Medicine of Chinese Medical Association, Professional Committee of Gestational Diabetes Mellitus of China Maternal and Child Health Association, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of hyperglycemia in pregnancy (2022)[Part 1][J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2022, 57(1): 3-12.
- [13] Naja K, Anwardeen N, Albagha O, et al. Lipid subclasses differentiate insulin resistance by triglyceride-glucose index[J]. *Metabolites*, 2025, 15(5): 342.
- [14] Li L, Zhou Y L, Li H, et al. Pre-pregnancy BMI modifies the associations between triglyceride-glucose index in early pregnancy and adverse perinatal outcomes: a 5-year cohort study of 67 936 women in China[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2024, 16(1): 311.
- [15] 赵建勇, 郭春月, 宋翠. 中老年人群甘油三酯葡萄糖乘积指数与高血压的关联研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(7): 583-589.
- ZHAO J Y, GUO C Y, SONG C. Association between triglyceride-glucose index and hypertension in middle-aged and older adults[J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(7): 583-589.
- [16] Xu X, Luo S, Lin J, et al. Association between maternal lipid profiles and lipid ratios in early to middle pregnancy as well as their dynamic changes and gestational diabetes mellitus[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2024, 24(1): 510.
- [17] Artemieva K A, Stepanova Y V, Stepanova I I, et al. Morphofunctional and molecular changes in placenta and peripheral blood in preeclampsia and gestational diabetes mellitus[J]. *Dokl Biol Sci*, 2023, 513(1): 387-394.
- [18] Wang J, Wu D, Peng B, et al. The associations between maternal glycolipid metabolism and fetal growth in term births[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 38591.
- [19] Yang X F, Zhong Q M, Huang M W, et al. Causal relationship between gestational diabetes and preeclampsia: a bidirectional mendelian randomization analysis[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2024, 210: 111643.
- [20] Liu J, Ma H, Chen X, et al. Association between triglyceride-glucose body mass index and risk of hypertensive disorders of pregnancy: a case-control study[J]. *Front Med (Lau-sanne)*, 2026, 13: 1844562.
- [21] 罗健敏, 梁敏仪, 林小媚, 等. TyG-BMI 指数和血脂水平对高龄妊娠期糖尿病孕妇妊娠结局的预测价值[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2026, 23(1): 61-65.
- Luo J M, Liang M Y, Lin X M, et al. The predictive value of TyG-BMI index and blood lipid levels on pregnancy outcomes in advanced-age pregnant women with gestational diabetes mellitus[J]. *J Hunan Norm Univ (Med Sci)*, 2026, 23(1): 61-65.
- (此文编辑 文玉珊)

(上接第 742 页)

- [15] 韩发兰, 逢淑超, 崔英华, 等. 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[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(12): 1040-1046.
- Han F L, Pang S C, Cui Y H, et al. Single nucleotide polymorphism of ATG16L1 gene promoter increases susceptibility to acute myocardial infarction[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(12): 1040-1046.
- [16] 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.
- Bai G N, Gao X, Yan B. Correlation of cathepsin D gene promoter region single nucleotide polymorphism and acute myocardial infarction[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(11): 955-960.
- [17] Serpooshan V, Liu Y H, Buikema J W, et al. Nkx2.5⁺ cardiomyoblasts contribute to cardiomyogenesis in the neonatal heart[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12590.
- [18] Villavicencio-Guzmán L, Sánchez-Gómez C, Jaime-Cruz R, et al. Human heart morphogenesis: a new vision based on *in vivo* labeling and cell tracking[J]. *Life*, 2023, 13(1): 165.
- [19] Wu M, Peng S, Yang J, et al. Baf250a orchestrates an epigenetic pathway to repress the Nkx2.5-directed contractile cardiomyocyte program in the sinoatrial node[J]. *Cell Res*, 2014, 24(10): 1201-1213.
- [20] Mehta A, Ramachandra C J A, Chitre A, et al. Acetylated signal transducer and activator of transcription 3 functions as molecular adaptor independent of transcriptional activity during human cardiogenesis[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(10): 2129-2137.
- [21] Wu L, Du J, Jing X, et al. Bone morphogenetic protein 4 promotes the differentiation of Tbx18-positive epicardial progenitor cells to pacemaker-like cells[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(4): 2648-2656.
- (此文编辑 许雪梅)