

本文引用格式:刘泽岩,周姝,张浩,等.孟德尔随机化法探究TGF- β 与AAMI后左室舒张末容积的关系[J].安徽医学,2023,44(5):523-527.DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.05.007

孟德尔随机化法探究TGF- β 与AAMI后左室舒张末容积的关系

刘泽岩 周姝 张浩 程景林

[摘要] **目的** 采用孟德尔随机化方法(MR)探究转化生长因子- β (TGF- β)水平与急性前壁心肌梗死(AAMI)急性期后左室舒张末容积(LVEDV)的因果关系。**方法** 从基因组和表观基因组关联研究(GWAS/EWAS)数据库选取TGF- β 和AAMI后LVEDV数据。TGF- β 数据包括982例样本,LVEDV数据包括35 407例样本。选择与TGF- β 独立相关的显著基因位点作为工具变量,分别使用逆方差加权法(IVW)、加权中位数、加权模式法及MR-Egger回归研究TGF- β 与AAMI急性期后LVEDV的关系。**结果** 逆方差加权法(IVW)法结果显示,TGF- β 升高能增加AAMI后LVEDV扩大的风险($OR=1.021, 95\%CI: 1.007\sim 1.035, P=0.004$)。与加权中位数法($OR=1.017, 95\%CI: 1.008\sim 1.026, P=2.26\times 10^{-4}$)及加权模式法($OR=1.014, 95\%CI: 1.000\sim 1.028, P=0.043$),结果一致。MR-Egger回归截距为-0.002(95%CI: -0.018~0.014, $P=0.791$),表明工具变量几乎不存在多效性。散点图及漏斗图均提示,研究结果稳定可靠。**结论** TGF- β 水平与AAMI急性期后LVEDV存在正向因果效应,即TGF- β 升高能导致AAMI急性期后LVEDV扩大。

[关键词] 孟德尔随机化;转化生长因子- β ;心肌梗死;左室舒张末容积

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.05.007

Investigation the relationship between TGF- β level and left ventricular volume after AAMI based mendelian randomization

LIU Zeyan, ZHOU Shu, ZHANG Hao, CHENG Jinglin

Emergency Internal Medicine Department, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230000, China

Funding project: Anhui Medical University Youth Foundation (No. 2021xkj286)

Corresponding author: CHENG Jinglin, cjll197601@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the causal relationship between transforming growth factor- β (TGF- β) level and left ventricular end-diastolic volume (LVEDV) after acute anterior myocardial infarction (AAMI) by Mendelian randomization (MR). **Methods** TGF- β and LVEDV data were selected from genome and epigenome association study (GWAS/EWAS) database. TGF- β data included 982 samples and LVEDV data included 35 407 samples. Significant loci independently associated with TGF- β were selected as instrumental variables, and MR analysis was performed using inverse variance weighted, weighted median, weighed mode and MR-Egger regression respectively. **Results** The inverse variance weighting (IVW) method showed that TGF- β increased risk of LVEDV expansion after AAMI ($OR=1.021, 95\%CI: 1.007\sim 1.035, P=0.004$). The conclusion of different methods was consistent: weighted median method ($OR=1.017, 95\%CI: 1.008\sim 1.026, P=2.26\times 10^{-4}$); weighted mode method ($OR=1.014, 95\%CI: 1.000\sim 1.028, P=0.043$). The intercept of MR-Egger regression was -0.002 (95%CI: -0.018~0.014, $P=0.791$), indicating that there was almost no pleiotropy in instrumental variables. Both scatter plot and funnel plot suggested that the results were stable and reliable. **Conclusions** There is a positive causal effect between TGF- β level and LVEDV after acute phase of AAMI, that is, the increase of TGF- β can lead to the expansion of LVEDV after acute phase of AAMI.

[Key words] Mendelian randomization; Transforming growth factor- β ; Myocardial infarction; Left ventricular end-diastolic volume

急性前壁心肌梗死(acute anterior myocardial infarction, AAMI)是各种原因导致的前降支严重狭窄或阻塞,进而造成左室前壁心肌坏死,是死亡率较高的心血管急症^[1-2]。随着急诊PCI普及,AAMI急性期死亡率有所下降。但是,中后期心功能恢复情况仍不理想。究其原因,主要由于缺血损伤可通过多种机制,导致左

室出现病理性重构^[3]。目前研究^[4-7]认为,转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是急性缺血损伤-后期纤维化的关键靶点,而间质纤维化是AAMI后左室舒张末容积(left ventricular end diastolic volume, LVEDV)扩大的病理基础。但是,目前关于TGF- β 与LVEDV扩大是否存在因果关系,仍未明确。

基金项目:安徽医科大学基金青年项目(编号:2021xkj286)

作者单位:230000 安徽合肥 安徽医科大学第二附属医院急诊内科

通信作者:程景林, cjll197601@163.com

观察性研究结论受到逆因果关联及混杂因素的干扰,证据等级不足。而分子水平的随机对照实验(randomized controlled trial, RCT)受伦理及方法限制,难以实施。所以,本研究拟利用全基因组和表观基因组关联研究(genome-wide and epigenome-wide association study, GWAS/EWAS)数据,采用孟德尔随机化(mendelian randomization, MR)方法^[8-10],以 TGF- β 相关的遗传变异作为工具变量,推断其与 AAMI 后 LVEDV 扩大的因果关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究以 TGF- β 作为暴露因素,与 TGF- β 显著相关的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)作为工具变量(instrumental variable, IV),AAMI 急性期后 LVEDV 为结局变量,使用两样本孟德尔随机化的分析方法,以证实 TGF- β 与 AAMI 急性期后 LVEDV 扩大的因果关系。

采用 MR 方法须满足 3 个条件:①选择作为 IV 的遗传变异必须与暴露因素 TGF- β 特征相关。原则上,工具变量至少能解释暴露因素 1.5% 以上变异, F 统计量 >10 ,避免弱工具变量偏倚;②遗传变异(IV)不得与任何混杂因素相关联,可通过查阅文献及相关统计方法进行排除;③遗传变异(IV)必须仅通过 TGF- β 水平,而不是其他替代途径与结局事件相关联,主要通过统计方法进行检验。见图 1。

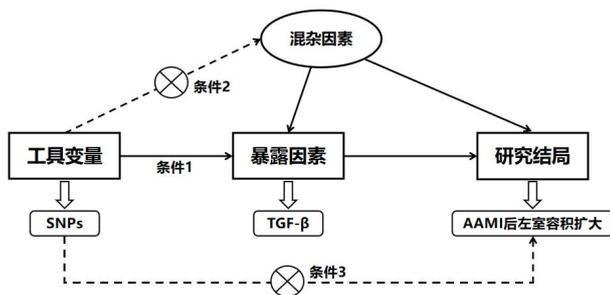


图 1 两样本孟德尔随机化研究设计思路图

1.2 数据来源 TGF- β 的数据来自一项对 982 位苏格兰血统的健康老年人中 70 种血浆衍生炎症蛋白生物标志物的水平进行全基因组和表观基因组关联研究(GWAS/EWAS)^[11]。平均年龄(69.8 \pm 0.8)岁,结果对年龄、性别及家庭人口结构,进行了协变量校正。LVEDV 数据包括 35 407 名欧洲血统的参与者,使用 BOLT-LMM(版本 2.3.2)的线性混合模型进行 GWAS/EWAS 分析^[12]。平均年龄(64.0 \pm 0.4)岁,52.9% 为女性。该研究确定了 45 个与左心室结构相关且尚未报告的基因位点。研究结果对血统、性别、出生年份、心脏磁共

振检查时年龄、心脏磁共振设备型号,进行了协变量校正。

1.3 统计学方法 统计分析均在 R3.5.3 软件中进行,MR 分析采用 MendelianRandomization 软件包^[13]。

1.3.1 工具变量的确定 本研究采用 PLINK 软件中的 clump 程序筛选出所有与 TGF- β 独立相关的显著基因位点作为 IV($P<5\times 10^{-5}$),IV 的连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)参数 r^2 阈值设为 0.001 和遗传距离窗口设置为 500 kb。根据 P 值选择有效 IV,避免连锁不平衡效应对研究结果的干扰。排除已被证实的,AAMI 后 LVEDV 扩大危险因素的相关 SNP。通过检索 GWAS catalog,剔除以往报道与其他复杂性状有关的 SNP。

1.3.2 因果关系验证 使用逆方差加权(inverse variance weighting, IVW)方法分析暴露对结局因果效应的估计。IVW 相当于使用个体水平数据进行的两阶段最小二乘或等位基因评分分析,在这里被用作主要的 MR 分析^[14],IVW 法不需要个体层面数据,可使用汇总数据直接计算因果效应值。在没有水平多效性或水平多效性平衡时,IVW 可以返回无偏估计。为了解释定向多效性,进一步验证因果效应。将结果与其他 2 种 MR 方法进行比较:加权中位数法^[15]和加权模式法^[16],保证结果的稳定性及准确性。

1.3.3 敏感性分析 使用 MR-Egger 回归的截距项测试来评估多效性效果,若回归方程截距项为 0,则可以认为不存在水平多效性。为了验证可能存在的对估计有较大影响的水平多态性离群值,先进行了 Leave-one-out(LOO)法分析。逐一删除各 SNP,统计剩余 SNP 合并效应。再使用 MR 多态性残差和离群值(mendelian randomization pleiotropy residual sum and outlier, MR-PRESSO)法分析^[17]。评估各 SNP 对结果的影响,排除单个 SNP 对结果的主要效应作用,判断结果的稳定性,剔除离群值。

2 结果

2.1 工具变量的确定 使用 clump 程序在全基因组水平上初步选出能有效预测 TGF- β 的 SNPs 作为潜在 IV,再根据上述 IV 确定方法进一步筛选,最终得到 12 个独立的、不存在连锁不平衡的 SNP 用于后续 MR 分析。见表 1。

2.2 两样本孟德尔随机化结果 通过 IVW 方法发现 TGF- β 可以增加 AAMI 后 LVEDV($OR=1.021, 95\%CI: 1.007\sim 1.035, P=0.004$)。不同方法分析可以得出一致的结论:Weighted-mode($OR=1.014, 95\%CI: 1.000\sim 1.028, P=0.043$);加权中位数法, ($OR=1.017, 95\%CI:$

表 1 最终确定的 SNP 信息

SNP	染色体	位置	效应等位基因	其他等位基因	β 系数 ^①	标准误
rs4006563	8	126531464	C	T	-0.57448	0.037209
rs78662696	9	106219339	A	C	-0.54718	0.035925
rs1957620	14	54609559	C	G	-0.24031	0.015924
rs9379205	6	898893	G	A	-0.22104	0.01491
rs10001092	4	122677177	T	C	-0.21478	0.01341
rs2000226	14	53851806	G	T	0.21536	0.014259
rs9848522	3	22124179	A	T	0.24666	0.015066
rs6720052	2	228817235	G	A	0.27289	0.018447
rs6693604	1	43944531	C	A	0.28618	0.017436
rs76046914	3	29511612	A	G	0.30819	0.020448
rs6838804	4	5921219	T	C	0.31953	0.020838
rs77860457	11	79857787	C	T	0.47042	0.031812

注: ^① β 系数按升序排列, $P < 0.5 \times 10^{-5}$ 。

1. 008~1. 026, $P = 2. 26 \times 10^{-4}$)。见表 2。

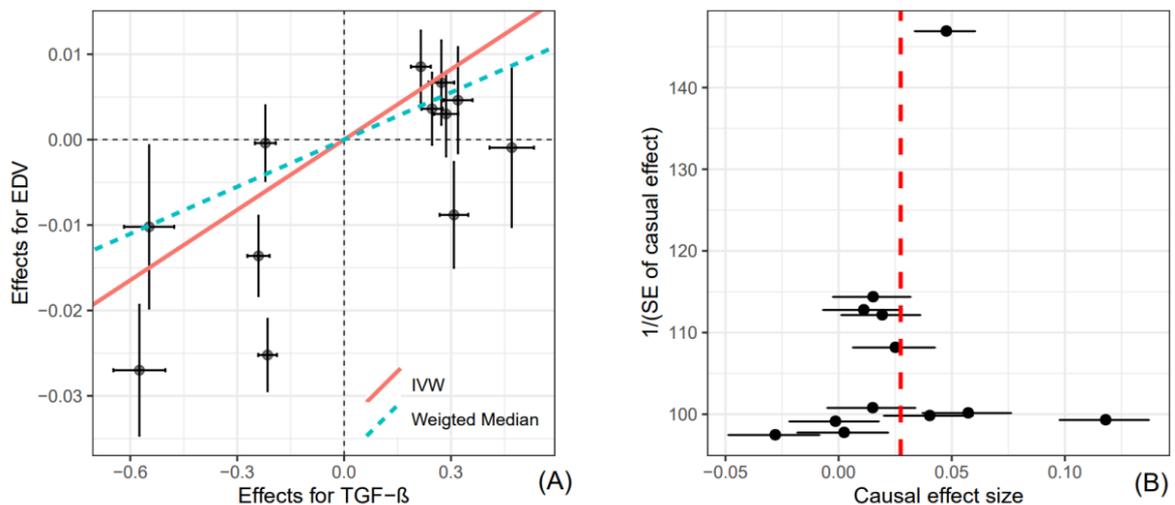
漏斗图证实, 每个 IV 所得的因果效应基本呈对称分布, 提示结果受潜在偏倚的影响可能性较小, 稳定性良好。见图 3。

2. 3 敏感性分析 MR-Egger 回归的截距为 -0. 002 (95%CI: -0. 018~0. 014, $P = 0. 791$), 表明 IV 基本不存在多效性。进一步进行 MR-PRESSO 分析, 统计量为 80. 479, $P < 0. 001$, 表示可能存在潜在的水平多效性。存在 3 个离群值 (rs4006563, rs1957620, rs76046914), 排除可能的离群值后 MR-PRESSO 分析 OR 值为 0. 015 (95%CI: 0. 007~0. 035, $P = 0. 010$), 此时 global test 统计量为 11. 369, P 值为 0. 216, 不存在潜在的水平多效性。留一法 (Leave-one-out) 分析发现不存在对结果

产生较大影响的工具变量, 排除任何一个 SNP 之后, 因果关联仍具有统计学意义, 未发现对结果存在强影响效应的 IV。散点图和漏斗图也证明关联的鲁棒性。见表 3、图 2。

3 讨论

左心室容积扩大是导致急性前壁心肌梗死中后期临床预后不良的主要结构基础, 临床上主要根据彩超 LVEDV 指标进行评判。有学者^[18]提出, AAMI 后 6 个月患者 LVEDV 较入院时增加超过 20%, 则称为心室重构。扩大的心室往往伴随着室壁变薄、心脏收缩功能下降, 临床上以顽固性心力衰竭、室性心律失常为主要表现。目前认为, 即使时间窗内开通罪犯血管, 仍不能



注: A, 红实线代表 IVW 估计值, 绿虚线代表 weighted median 估计值; B, 红虚线代表使用所有 SNP 的因果效应 (IVW 方法)。

图 2 TGF- β 与 LVEDV 之间因果关联的散点图(A)与漏斗图(B)

表 2 不同方法推断 TGF- β 对加 AAMI 后 LVEDV 的因果效应

方法	OR(95%CI)值	P 值	异质性检验	
			t 值	P 值
IVW (fixed)	1.021 (1.015, 1.026)	8.70E-14	65.414	<0.001
IVW (random)	1.021 (1.007, 1.035)	0.004	-	-
Weighted mode	1.014 (1, 1.028)	0.043	-	-
Weighted median	1.017 (1.008, 1.026)	2.26E-04	-	-
MR-Egger (slope)	1.027 (0.973, 1.084)	0.291	-	-
MR-Egger (intercept)	-0.002 (-0.018, 0.014)	0.791	-	-
MR-PRESSO	1.015 (1.007, 1.036)	0.010	-	-

表 3 留一法敏感性分析

SNP	OR 值	95%CI	P 值
rs4006563	1.015	1.002 ~ 1.029	0.027
rs78662696	1.021	1.005 ~ 1.037	0.008
rs1957620	1.018	1.004 ~ 1.031	0.010
rs9379205	1.022	1.007 ~ 1.038	0.003
rs10001092	1.021	1.007 ~ 1.035	0.004
rs2000226	1.019	1.004 ~ 1.035	0.011
rs9848522	1.021	1.006 ~ 1.038	0.007
rs6720052	1.020	1.005 ~ 1.037	0.009
rs6693604	1.022	1.007 ~ 1.038	0.005
rs76046914	1.024	1.013 ~ 1.037	0.000
rs6838804	1.021	1.006 ~ 1.037	0.006
rs77860457	1.022	1.008 ~ 1.038	0.002

完全避免心室扩大或心室重构的发生。缺血作为启动因素,激活 TGF- β 介导的经典 TGF- β /Smad 通路,引起心肌炎症反应及间质纤维化,是 AAMI 急性期后心室容积扩大的主要机制之一^[19]。

本研究通过 GWAS/EWAS 大型公共数据库获得初步数据,获取与暴露(TGF- β)有关联的独立 SNP 位点,通过全面的孟德尔随机化方法证实 TGF- β 与 AAMI 后 LVEDV 存在正向因果效应。研究结果发现 TGF- β 水平每增加一个标准差,LVEDV 增加 2%。首先,本研究暴露因素的选择存在理论基础。其次,使用 MR 方法,有如下优势。①传统观察性研究,受混杂因素干扰,可能低估或误估两者关联效应。遗传变异作为 MR 方法重要媒介,属于天然稳定暴露因素,保证了研究可靠性^[20]。②相比单个 SNP 的基因多态性研究,MR 方法提高了研究结论特异性^[21]。③分子水平研究,MR 与 RCT 均随机化分组,研究效果相同^[22]。④MR 研究样本

量更多,结论更为可靠^[23]。虽然有动物实验^[24]证实,抑制 TGF- β 表达,AAMI 大鼠心肌炎症反应、纤维化及左室容积扩大的程度,表现出与 TGF- β 水平一致的变化。也有临床观察性研究证实,TGF- β 水平与 AMI 远期死亡率有关^[25]。但是,上述动物实验结论不能直接应用于临床或指导临床决策。传统观察性临床研究结论的证据等级不足,无法证实 TGF- β 与心室容积扩大是因果关系或仅有相关性。同时,分子水平的 RCT 设计伦理及方法问题,难以实现。鉴于本次研究结果,证实 TGF- β 水平是导致 AAMI 后左心室扩大的危险因素后,临床上可以早期进行 TGF- β 指标检测,识别 AAMI 后心室扩大的高风险患者,做到早识别早干预。治疗上,可以针对 TGF- β 因子或 TGF- β /Smad 通路进行靶向药物研究。

综上所述,本研究证实 TGF- β 与 AAMI 后心室容积扩大存在因果联系的推断。AAMI 后心室扩大导致的慢性心力衰竭是临床治疗难点,严重影响患者中后期生存率及生存质量。首先,急诊 PCI 开通闭塞血管不能中止缺血引起的后续病理反应。其次,现有药物,如干预 RAAS 系统的 ACEI/ARB、干预交感系统的 β 受体阻滞剂及干预利钠肽系统的 ARNI 类药物,虽然一定程度降低了 AAMI 后心室扩大的发生风险或程度,但仍有约 25% 的 AAMI 患者,出现了心室病理性扩大,甚至达到重构标准^[26]。所以,有学者认为,除上述途径外,仍存在尚未被探索的生物通路,参与 AAMI 后心室扩大的病理过程。本研究以此为切入点,立足于解决临床问题,依据动物实验结论及病理机制为基础,利用 MR 方法进行 TGF- β 与 AAMI 后 LVEDV 扩大的因果关系论证。在论证过程中,IVW、WME 及 MR-Egger 法所得结果一致,进一步说明结果稳定可靠。近几年,MR 方法发展较快,已从流行病学层面向临床应用拓展,用 MR 方法解决临床实际问题是临床研究的新方向,所得结论具有与传统 RCT 研究类似的效力,可以用来指导临床实践^[27]。

但是,本研究仍存在以下局限性:①两样本 MR 方法,不能解释暴露因素与结局的非线性关系;②未进行亚组分析,如性别、年龄及发病至开通闭塞血管的时间等因素,可能不同亚组会存在不同强度的关联效应;③数据来源均为欧洲人种,不能直接套用于国人,仅具参考价值。有待以国内数据库(CHARLS 公共数据库)为来源,进一步研究。

参考文献

- [1] 季润青,余苑,李静.急性心肌梗死指南推荐治疗在我国应用现状[J].中国循证心血管医学杂志,2020,12(2):250-252.
- [2] 马丽媛,王增武,樊静,等.《中国心血管健康与疾病报告

- 2021》概要[J].中国介入心脏病学杂志,2022,30(7):481-496.
- [3] 急性心肌梗死后心室重构防治专家共识[J].中华心血管病杂志(网络版),2020,3(1):1-7.
- [4] WU Y, CHEN S, WEN P, et al. PGAM1 deficiency ameliorates myocardial infarction remodeling by targeting TGF- β via the suppression of inflammation, apoptosis and fibrosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 534:933-940.
- [5] LEANCĂ S A, CRI U D, PETRI A O, et al. left ventricular remodeling after myocardial infarction: from pathophysiology to treatment[J]. Life (Basel), 2022, 12(8):1111.
- [6] 何凤屏,徐新,张社兵,等.血浆 miR-21 和 TGF- β_1 水平在心肌梗死后与心室重构的关系[J].国际检验医学杂志, 2016,37(18):2513-2516.
- [7] 宋晓英,冯丽.吡非尼酮通过调节急性心肌梗死大鼠 TGF- β_1 /Smad 通路改善心室重构[J].内科急危重症杂志, 2021,27(6):505-510.
- [8] MARTIJNB K. Apolipoprotein e isoforms, serum cholesterol, and cancer[J]. Lancet, 1986, 327(8479): 507 - 508.
- [9] LAWLOR D A, HARBORD R M, STERNE J A C, et al. Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology[J]. Stat Med, 2008, 27(8) : 1133-1163.
- [10] 于天琦,徐文涛,苏雅娜,等.孟德尔随机化研究基本原理、方法和局限性[J].中国循证医学杂志,2021,21(10):1227-1234.
- [11] HILLARY R F, TREJO-BANOS D, KOUSATHANAS A, et al. Multi-method genome- and epigenome-wide studies of inflammatory protein levels in healthy older adults[J]. Genome Med, 2020, 12(1):60.
- [12] PIRRUCCELLO J P, BICK A, WANG M, et al. Analysis of cardiac magnetic resonance imaging in 36,000 individuals yields genetic insights into dilated cardiomyopathy[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):2254.
- [13] BROADBENT J R, FOLEY C N, GRANT A J, et al. MendelianRandomization v0.5.0: updates to an R package for performing Mendelian randomization analyses using summarized data[J]. Wellcome Open Res, 2020 (5):252.
- [14] BURGESS S, SMALL D S, THOMPSON S G. A review of instrumental variable estimators for Mendelian randomization [J]. Stat Methods Med Res, 2017,26(5):2333-2355.
- [15] BURGESS S, THOMPSON S G. Interpreting findings from Mendelian randomization using the MR-Egger method[J]. Eur J Epidemiol, 2017, 32(5):377-389.
- [16] BOWDEN J, SMITH G D, HAYCOCK P C, et al. Consistent estimation in Mendelian randomization with some invalid instruments using a weighted median estimator[J]. Genetic Epidemiology, 2016, 40(4):304-314.
- [17] YAVORSKA O O, BURGESS S. Mendelian Randomization: an R package for performing Mendelian randomization analyses using summarized data[J]. Int J Epidemiol, 2017, 46(6): 1734-1739.
- [18] 陶逸菁,夏智丽,高程洁,等.急性心肌梗死再血管化成功后预测左心室重构相关生物标志物的分析[J].上海交通大学学报(医学版),2019,39(1):60-64.
- [19] MA Y, ZOU H, ZHU X X, et al. Transforming growth factor β : a potential biomarker and therapeutic target of ventricular remodeling.[J].Oncotarget,2017,32:53780-53790.
- [20] BURGESS S, DAVEY SMITH G, DAVIES N M, et al. Guidelines for performing Mendelian randomization investigations [J]. Wellcome Open Res, 2020, 4: 186.
- [21] BOWDEN J, DAVEY S G, BURGESS S. Mendelian randomization with invalid instruments: effect estimation and bias detection through Egger regression[J]. Int J Epidemiol, 2015, 44(2):512-525.
- [22] HAYCOCK P C, BURGESS S, WADE K H, et al. Best (but oft-forgotten) practices: the design, analysis, and interpretation of Mendelian randomization studies[J]. Am J Clin Nutr, 2016, 103(4): 965-978.
- [23] 丁景苗,周晓蓉,俞可,等.孟德尔随机化探究2型糖尿病与急性心肌梗死的性别特异性因果关系[J].现代预防医学, 2021,48(12):2120-2123, 2148.
- [24] 赵博,彭建军,李广平,等.灯盏花素通过 TGF- β_1 /Smads 通路减轻急性心肌梗死大鼠心室重构[J].中国免疫学杂志, 2021,37(4):410-414.
- [25] 彭伟,刘畅,李勇,等.急性心肌梗死患者血清 IGFBP-6、TGF- β_1 水平变化及与冠状动脉病变程度和预后的关系 [J]. 检验医学与临床, 2022,19(16):2185-2188.
- [26] BOLOGNESE L, NESKOVIC A N, PARODI G, et al. Left ventricular remodeling after primary coronary angioplasty: patterns of left ventricular dilation and long-term prognostic implications[J]. Circulation, 2002,106(18):2351-2357.
- [27] 和思敏,张雨,彭刘庆,等.倾向性评分与孟德尔随机化国内研究现状[J].中华疾病控制杂志,2022,26(3):325-330.

(2022-09-20收稿)

(本文编校:崔月婷,张迪)