

· 论著 ·

血管结构异常的先天性心脏病患儿中 Vav2 基因突变的
筛查和功能分析陈颖慧¹ 冯奕源² 冯炜琦¹ 吴逸卓¹ 鲁亚南³ 于昱¹

(1. 上海交通大学医学院附属新华医院心血管发育与再生医学研究所, 上海 200092; 2. 上海交通大学医学院附属新华医院核医学科, 上海 200092; 3. 上海交通大学医学院附属新华医院儿心脏中心, 上海 200092)

【摘要】目的 通过全外显子组测序筛查血管结构异常类先天性心脏病(CHD)致病候选基因 Vav2 的新发突变 c. 701C > T; p. P234L, 探究 Vav2 及其新发罕见突变对内皮细胞功能的影响, 探索 CHD 发生的可能分子机制。**方法** 分析 117 例血管结构异常类 CHD 患儿及 200 例正常儿童的外周血全外显子组测序数据筛查 Vav2 突变。构建 Vav2 野生型及突变型表达质粒, 转染人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 Vav2、下游 Rac1 mRNA 和蛋白的表达水平; 通过 CCK-8、划痕试验和成管实验检测 Vav2 及突变对 HUVEC 增殖、迁移和成管能力的影响。**结果** 在血管结构异常类 CHD 患儿中发现的 Vav2 罕见突变 c. 701C > T; p. P234L, 在对照组中未出现且从未被报道。与野生型对比, P234L 突变能降低 Vav2 蛋白表达, CCK-8、划痕试验和成管实验发现该突变影响 Vav2 促进 HUVEC 增殖、迁移和成管等血管生成相关的功能, 但该突变不影响下游 Rac1 本底 mRNA 和蛋白表达。**结论** Vav2 的错义突变影响 Vav2 蛋白表达, 进而损害 Vav2 在 HUVEC 中促进增殖、迁移和成管等血管生成相关的功能, 可能是影响下游 Rac1 激活而非本底表达导致的。Vav2 是血管发育过程的关键分子, 可能参与调控血管结构异常类 CHD 发生, P234L 突变导致 Vav2 功能受损, 进一步提供了 Vav2 在血管结构异常类 CHD 中可能的致病分子机制。

【关键词】 血管发育; 血管结构异常; 先天性心脏病; Vav2; 错义突变; 人脐静脉内皮细胞**【DOI】**10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2023.08.019Identification and Functional Analysis of Vav2 Novel Variant in Congenital
Heart Diseases with Vascular MalformationCHEN Yinghui¹, FENG Yiyuan², FENG Weiqi¹, WU Yizhuo¹, LU Yanan³, YU Yu¹(1. *Institute for Developmental and Regenerative Cardiovascular Medicine, Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China*; 2. *Department of Nuclear Medicine, Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China*; 3. *Department of Pediatric Cardiology, Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China*)

【Abstract】Objective To identify novel variant c. 701C > T; p. P234L of pathogenic candidate gene Vav2 through whole exome sequencing, and investigate the effect of this variant on endothelial function to explore the pathogenesis of congenital heart diseases with vascular malformation (CHDs-VM). **Methods** The rare and novel Vav2 variant was identified in 117 CHDs-VM child patients and 200 healthy controls. Wild-type and variant Vav2 plasmids were constructed and transfected into human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). mRNA and protein expression levels were detected by qRT-PCR and Western blot. CCK-8, wound healing assay and tube formation assay were used to analyze endothelial function alternations. **Results** The Vav2 variant c. 701C > T; p. P234L was identified in CHDs-VM patients but not observed in healthy controls. This variant down-regulated Vav2 protein expression and attenuated the promoting effect of Vav2 in proliferation, migration and tube formation of HUVEC. However, the mRNA and protein expressions of downstream Rac1 showed no difference between wild-type and variant transfected HUVEC. **Conclusion** The missense variant of Vav2 down-regulated Vav2 protein expressions, further impaired positive functions of Vav2 in proliferation, migration and tube formation of HUVEC probably through affecting downstream Rac1 activation rather than background expression. Deleterious variant induced Vav2 loss of function, which would uncover possible molecular mechanisms of Vav2 in CHDs-VM.

【Key words】 Vascular development; Vascular malformation; Congenital heart disease; Vav2; Missense mutation; Human umbilical vein

基金项目: 国家自然科学基金(82170304, 82170232); 上海市自然科学基金(20ZR1435500)

通信作者: 于昱, E-mail: yuyu@xinhumed.com.cn

endothelial cell

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 是人类最常见的出生缺陷^[1], 每 1 000 例新生儿中出现 8~12 例^[2-3], 其中约 30% 属于危重 CHD, 需在婴儿期干预, 否则易导致急性死亡^[4]。CHD 包括胎儿发育过程中发生的心脏和大血管结构异常^[5], 其中新生儿血管解剖结构较为复杂, 诊断难度高, 易发生误诊或漏诊。血管结构异常的 CHD 常导致无法供给全身足够的氧合血液, 临床表现为症状迅速进展的致命发绀型, 常伴呼吸衰竭和心力衰竭, 需早期手术治疗, 部分疾病如不接受适当的干预, 患者在出生后第一年的死亡率接近 80%^[6], 例如完全性肺静脉异位连接 (total anomalous pulmonary venous connection, TAPVC)、法洛四联症中的主动脉骑跨、大动脉转位 (transposition of great arteries, TGA) 以及窗型动脉导管未闭 (patent ductus arteriosus, PDA)。CHD 中大血管结构异常的胚胎学发生机制一直是不断探索的主题, 但由于大多数 CHD 呈散发性, 死亡率极高, 以往的研究主要是基于散发病例进行生物信息学分析筛选致病候选基因, 例如, Bleyl 等^[7] 通过遗传连锁分析发现人类染色体 4q12 上的位点参与 TAPVC, 主要包括血管内皮生长因子受体 2 和血小板衍生生长因子受体 2 的位点; 通过对 3 个独立 CHD 患病家庭的全外显子组测序 (whole exome sequencing, WES) 鉴定出 FLT4 的新发突变 c. 244C>T; p. R82X 参与法洛四联症中血管缺陷^[8]。但是, CHD 往往由多基因导致, 病因复杂, 小样本测序数据只能解释个体 CHD 发病的部分机制。大样本测序的全面基因组数据能为 CHD 的预防、诊断和机制探索提供重要的数据支持, 但由于某些大血管结构异常发病率低和早期致死率高, 样本收集困难, 血管结构异常 CHD 相关高通量测序的研究报道非常少。

在之前的研究^[9]中, 本课题组收集了 78 例散发 TAPVC 以及 100 例健康儿童外周血行 WES, 报道了 TAPVC 高度相关的致病基因 Vav2; 同时, 在 39 例 PDA 患者和 100 例健康人外周血 WES 数据中, 筛选出 Vav2 可能与 PDA 发病高度相关^[10], 上述基于基因拷贝数变异的分析结果提示 Vav2 可能是血管发育的关键调控因子。Vav2 是 Vav 家族的第二个成员, 是一种鸟嘌呤核苷酸交换因子, 通过结合鸟苷三磷酸 (guanosine triphosphate, GTP) 激活 Rho GTP 酶家族。在一些物种中, Vav 家族成员的蛋白表达随着系统发育而变化^[11-13], 提示 Vav 家族可能参与胚胎发育, 其中 Vav2 常表达于高度血管化的器官, 例如心脏和胎盘。研究^[14]报道, Vav2 和 Vav3 在内皮细胞中共同作

用, 调节肝配蛋白 A1 诱导的体内和体外血管生成; 此外, Vav2 被广泛报道为肿瘤中的促血管生成因子^[15-16], 与血管生成高度相关。脉管系统早期发育依赖三个过程: 血管发生、血管生成以及动脉生成, 血管内皮细胞的迁移和增殖在这些过程中起着重要作用。既往研究^[17]报道, 内皮细胞形成的咽中部内皮链, 是肺总静脉的前体, 其排列错位会导致 TAPVC; 此外, 多能干细胞诱导的内皮细胞被报道可作为研究 TGA 的重要细胞模型^[18], 这些研究提示内皮细胞在此类大血管结构异常疾病发生机制中的重要作用。此前研究^[19]报道, Vav2 可作为血管内皮生长因子的下游, 选择性激活 Rac1 介导内皮细胞迁移和屏障功能; 糖尿病条件下, Vav2 激活 Rac1 促进 NADPH 氧化酶 2 的全酶组装加速毛细血管细胞凋亡^[20], Vav2 在不同条件下的不同作用, 提示 Vav2 在内皮细胞中的重要功能。

尽管目前尚无关于 Vav2 影响心血管发育的详细分子机制报道, 但关于 Vav2 调控内皮细胞功能参与血管新生的研究以及本课题组的测序数据, 均提示 Vav2 在心血管发育中可能存在重要作用。为进一步研究 Vav2 与血管发育的详细关系, 本课题组汇总血管发育异常疾病的 WES 数据, 从遗传变异角度出发, 通过 gene-based 负荷分析和单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)-based 关联分析等生物信息学处理, 在血管结构异常的 PDA 患者中筛选得到候选基因 Vav2 的高度致病突变 c. 701C>T; p. P234L。本研究主要根据 WES 获得的生物信息, 进一步研究 Vav2 新发突变在人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 中的功能, 并探讨其对可能调控的下游靶基因的影响, 为血管结构异常类 CHD 发病遗传分子机制提供理论依据。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

在上海交通大学医学院附属新华医院收集确诊的血管结构发育异常患儿血液标本 117 例, 同时收集 200 例与病例组年龄和性别相匹配的健康儿童血液作为对照。该研究按照《赫尔辛基宣言》进行, 已获得上海交通大学医学院附属新华医院伦理委员会的批准, 样本采集均获得了受试者父母或监护人的书面知情同意。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

使用 Genome Analysis Toolkit 鉴定 WES 数据中 Vav2 非同义突变 (NC_000009.12, NM_001134398),

通过参考人群基因组常见数据库 gnomAD 和 ExAC, 筛选最小等位基因频率 < 0.01 的罕见突变, 通过 Mutation Taster、SIFT、LRT 以及 PROVEAN 等数据库评估筛选出致病可能性高的 Vav2 突变位点。Sanger 测序法验证入选病例及对照样本 DNA 序列。

1.2.2 质粒构建

Vav2 过表达质粒和阴性对照购于吉凯基因生物公司; 以野生型质粒为模板, 设计突变引物, 用 KOD-Plus-Neo (TOYOBO) 酶对模板进行定点突变, 得到突变质粒 P234L, 突变质粒经过 Sanger 测序确认。

1.2.3 细胞培养与转染

HUVEC 购于美国模式培养物研究所, 使用含有 10% 胎牛血清 (Biological Industries) 和 1% 青霉素-链

霉素混合液 (Yeasten) 的高糖培养基 (BasalMedia) 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。HUVEC 接种于 6 孔板, 待细胞融合度为 70% 时, 使用 Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific) 转染空载、Vav2 野生型质粒、Vav2 突变质粒 (P234L) 用于后续试验。

1.2.4 qRT-PCR

质粒转染 48 h 后, 根据说明书使用 TRIzol 提取 RNA。使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit (Takara) 将 1 000 ng RNA 逆转录为互补 DNA 链, 通过 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Takara) 10 μL 体系进行 qRT-PCR 扩增。以 β-actin 作为内参, 2^{-ΔΔCT} 法对 mRNA 表达量进行相对定量。引物由上海生工生物技术有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列

qRT-PCR (human)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Vav2	AACATACGCACCTTCTCTGAAAG	GTCAAAGGGGTCAAACAGCTC
Rac1	ATGTCCGTGCAAAGTGGTATC	CTCGGATCGCTTCGTCAAACA
ACTB	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

注: Forward primer, 正向引物; Reverse primer, 反向引物; ACTB, β-actin。

1.2.5 Western blot

质粒转染 48 h 后, 用含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的裂解液收集 HUVEC 蛋白, 浓度测定后, 高温变性蛋白。取 20 μg 蛋白样本进行 SDS-PAGE 电泳后转移至聚偏二氟乙烯膜 (Millipore), 经过 5% 牛血清白蛋白 (Aladdin) 室温封闭 2 h, 在 4 °C 下与一抗 anti-Vav2 (Santa Cruz Biotechnology)、anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology)、anti-Rac1 (Proteintech) 或 anti-Flag (Sigma) 4 °C 孵育过夜。第 2 天用过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H + L) 二抗 (Yeasten) 室温孵育 2 h 后, 经过化学发光试剂盒 (雅酶) 显影蛋白。

1.2.6 细胞增殖检测

质粒转染 48 h 后, 按照 3 000 个/孔将 HUVEC 接种于 96 孔板, 于培养后的 24、48 和 96 h 去除培养基, 加入 100 μL 10% CCK-8 溶液 (碧云天), 在 37 °C、5% CO₂ 孵育 2 h 后测定 OD450 评价细胞活力。

1.2.7 划痕试验

质粒转染 48 h 后, 待 HUVEC 密度接近 100%, 用 200 μL 无菌枪头垂直于孔板制造细胞划痕, 磷酸盐缓冲液清洗后, 加入培养基, 镜下观察并拍照记录 (0 h), 放回培养箱继续培养, 于 8 h 和 24 h 后分别镜下观察并拍照记录, 以划痕愈合率 (%) 评价迁移能力。

1.2.8 成管实验

预冷 96 孔板, 每孔加入 60 μL 的基质胶 (Corning) 凝固后, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 细胞总数为 2×10^4 个, 4 h 后镜下拍照记录, 以成管交点和形

成小管直径评价成管能力。

1.3 统计学方法

所有数值均以平均值 ± 平均值的标准误差表示, 每组实验至少独立地重复三次。使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计学检验, 组间单一协变量间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sanger 测序结果和突变保守性分析

Sanger 测序结果显示入选病例的第 8 外显子区 c. C701T 导致第 234 位氨基酸从脯氨酸变成亮氨酸, 该杂合突变位点在正常对照组中未发现 (图 1A), 且入选病例父母否认家族性 CHD 病史。跨物种蛋白序列比对显示, 该突变位点在脊椎动物中高度保守 (图 1B), 提示该突变可能导致 Vav2 的功能改变。Mutation Taster 网站预测该突变位点具有高度致病性; SIFT 评分为 0.037, 数值越小, 提示引起蛋白质功能改变的可能性越大; 其中, PROVEAN 评分为 -4.42, 进一步提示该突变可能影响 Vav2 蛋白功能, 该突变具体信息详见表 2。

2.2 P234L 突变对 Vav2 mRNA 和蛋白表达的影响

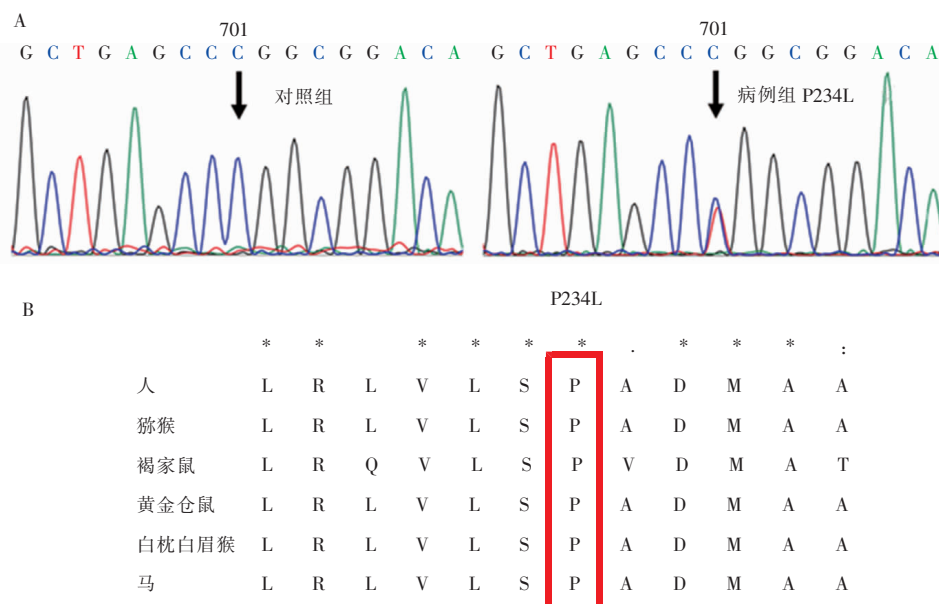
质粒转染 HUVEC 后, 野生型 Vav2、突变 P234L 转染组间 Vav2 mRNA 表达量无明显差异 (图 2A)。但与野生型相比, 该突变的蛋白表达量降低 (图 2B、图 2C), 表明这个错义突变影响 Vav2 蛋白表达。

2.3 野生型 Vav2 和 P234L 突变对 HUVEC 增殖能力的影响

通过 CCK-8 检测野生型 Vav2 及突变 P234L 对

HUVEC 增殖能力的影响,与空载组相比,野生型 Vav2 转染组 HUVEC 在 24、48 和 72 h 增殖率明显升高

($P < 0.01$);突变 P234L 转染组在 24、48 及 72 h 不影响 HUVEC 增殖(图 3)。

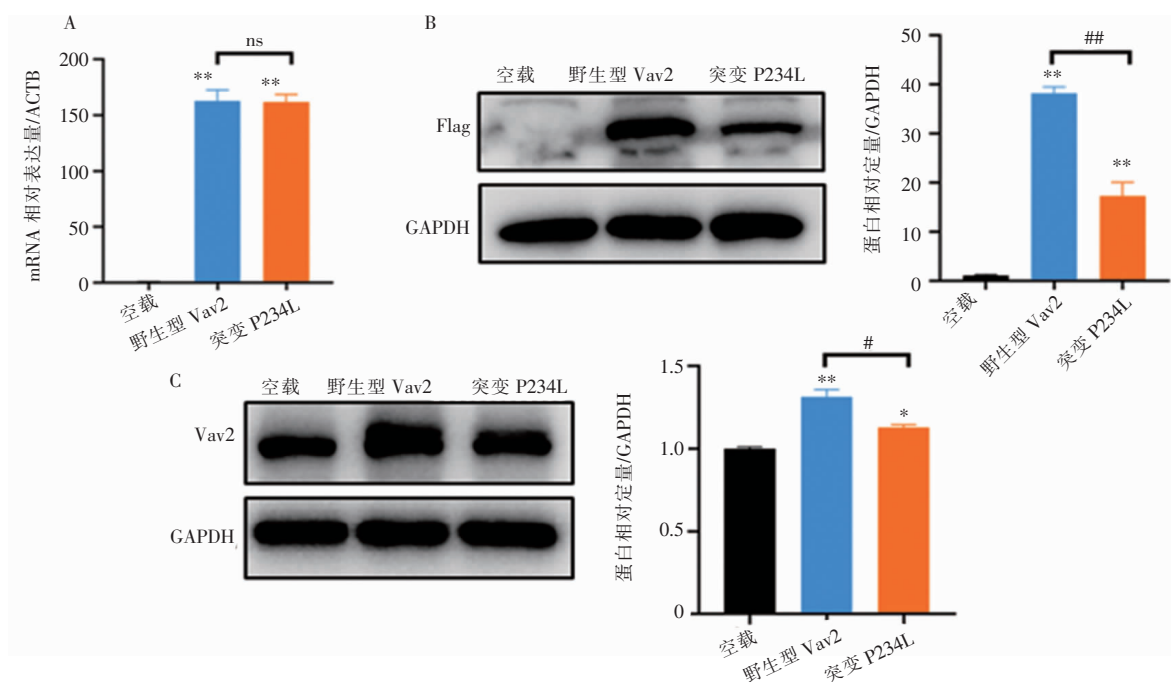


注:图 A 为对照组和病例组的 Vav2 测序峰图,黑色箭头指示突变位点;图 B 为 P234L 突变在不同物种中的蛋白序列保守性分析;* 表示该氨基酸在不同物种间高度保守。

图 1 对照组和病例组 Vav2 测序峰图及 P234L 突变位点保守性分析

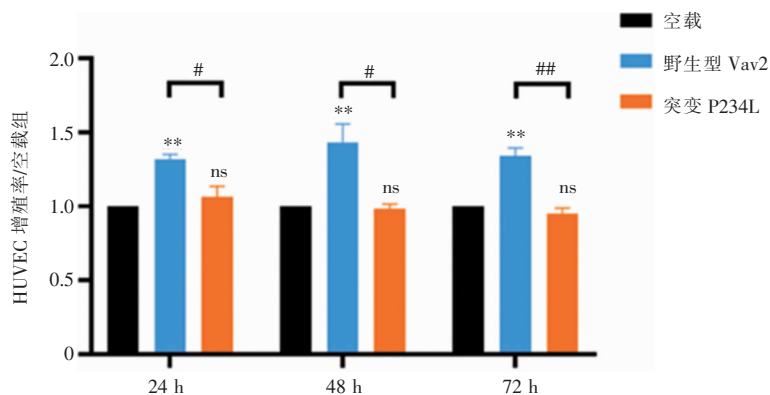
表 2 P234L 突变的具体信息

性别	年龄	疾病类型	突变位置	核苷酸变化	氨基酸变化	致病性预测	SIFT	LRT	PROVEAN	ExAC	gnomAD
女性	6 岁	PDA	exon8	701 C > T	P234L	致病	0.037	0.000;D	-4.42;D	0.000 1	0.000 064 59



注:图 A 为 HUVEC 质粒转染后 Vav2 的 mRNA 表达,ACTB 作为内参;图 B 为 HUVEC 质粒转染后标签蛋白表达,GAPDH 作为内参;图 C 为 HUVEC 质粒转染后 Vav2 蛋白表达。* 表示和空载组相比, $P < 0.05$; ** 表示和空载组相比, $P < 0.01$;# 表示和野生型 Vav2 组相比, $P < 0.05$;## 表示和野生型 Vav2 组相比, $P < 0.01$;ns 表示无显著性差异。 $n = 4$ 。

图 2 质粒转染 HUVEC 后 Vav2 的 mRNA 和蛋白表达



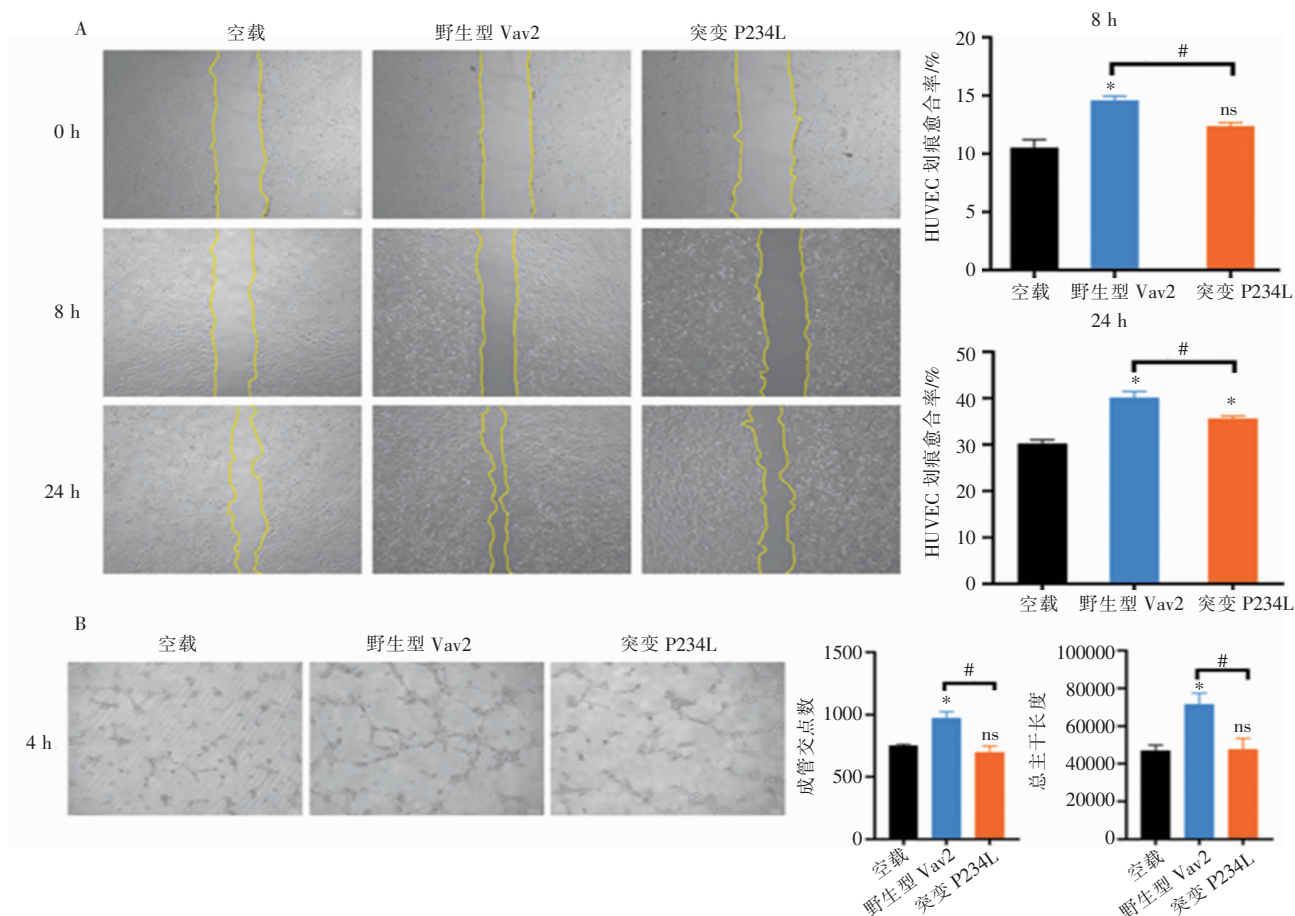
注: **表示和空载组相比, $P < 0.01$; #表示和野生型 Vav2 组相比, $P < 0.05$; ##表示和野生型 Vav2 组相比, $P < 0.01$; ns 表示无显著性差异。 $n = 3$ 。

图3 HUVEC 质粒转染后 CCK-8 活力检测结果

2.4 野生型 Vav2 和 P234L 突变对 HUVEC 迁移和成管能力的影响

质粒转染 HUVEC 后, 划痕试验结果提示, 野生型 Vav2 转染后能促进 HUVEC 在 24 h 内的划痕愈合(上调约 40%, $P < 0.05$), 而 P234L 突变转染组不影响

HUVEC 迁移能力(图 4A)。一致的是, 与空载组相比, 野生型 Vav2 转染 HUVEC 48 h 后, 可促进 HUVEC 成管能力(上调约 30%, $P < 0.05$); 与野生型 Vav2 转染组相比, P234L 突变转染 HUVEC 减弱了 Vav2 诱导的 HUVEC 成管能力(图 4B)。



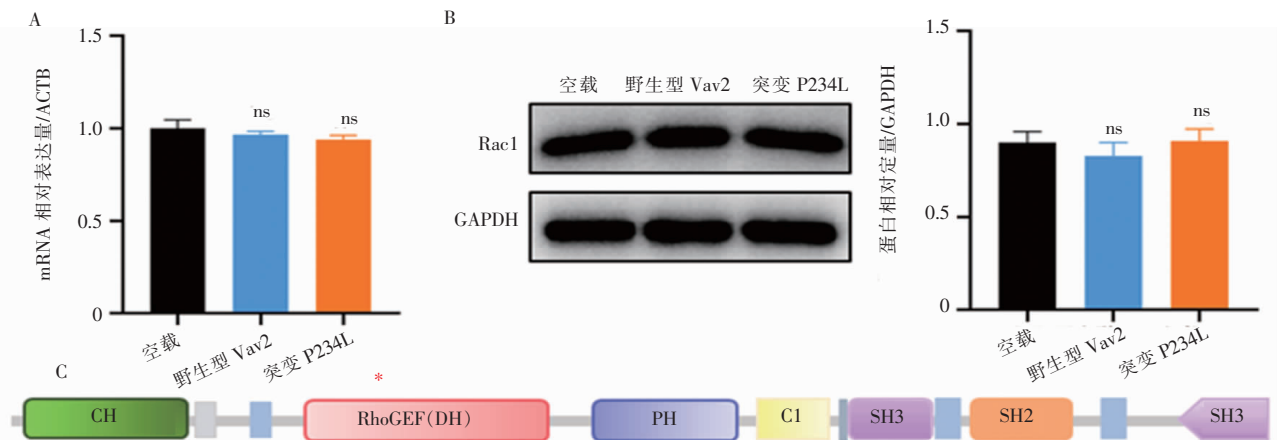
注: 图 A 为 HUVEC 划痕试验 0、8 和 24 h 代表性图片; 图 B 为 HUVEC 成管实验 4 h 代表性图片。* 表示和空载组相比, $P < 0.05$; #表示和野生型 Vav2 组相比, $P < 0.05$; ns 表示无显著性差异。刻度尺 = 200 μm ; $n = 3$ 。

图4 HUVEC 质粒转染后划痕愈合和成管实验

2.5 Vav2 过表达对下游 Rac1 mRNA 和蛋白表达的影响

qRT-PCR 和 Western blot 结果提示野生型 Vav2、突变 P234L 转染 HUVEC 后并不影响 Rac1 本底表达(图 5A、图 5B),与文献报道一致,提示 Vav2 可能调控下游 Rac1 结合 GTP 激活而非本底表达。通过对 Vav2

蛋白结构进一步分析,P234L 突变位于 Vav2 催化 DH 结构域,这决定了 Vav2 催化下游 Rho GTP 酶家族激活(图 5C),提示 P234L 突变可能是通过影响 Vav2 催化下游 Rac1 激活进而影响 Vav2 在 HUVEC 发挥功能,需进一步检测 Rac1-GTP 活性形式揭示该突变对下游的影响。



注:图 A 为质粒转染 HUVEC 后 Rac1 的 mRNA 表达;图 B 为质粒转染 HUVEC 后 Rac1 的蛋白表达;图 C 为 Vav2 蛋白结构域。* 表示突变位点,ns 表示无显著性差异。 $n=3$ 。

图 5 HUVEC 质粒转染后下游 Rac1 mRNA 和蛋白表达

3 讨论

CHD 作为一类严重的先天畸形,妊娠期会导致流产、死产和新生儿死亡等,对于存活患儿,身高、体重及智力发育会滞后于同龄健康儿童,是影响儿童身心健康的重大公共卫生事件。大血管结构异常的 CHD 进展快速、临床症状严重,例如,TAPVC 和 TGA 缺乏足够的氧合血液的供应,患儿出生后如不给予及时治疗将无法存活。但新生儿血管解剖结构复杂,不易辨认,误诊或漏诊率高,延误治疗时机。由于此类疾病低发病率和致死率,样本收集困难,动物模型少,目前关于大血管结构异常 CHD 发生的分子机制仍不清楚。CHD 是由环境和遗传因素共同作用,具有不完全外显率和可变的表达特性,遗传学相关研究能帮助探究此类 CHD 发病的分子机制且有助于临床对此类疾病的产前诊断和早期发现。前期研究中 117 例血管结构发育异常患者的 WES 结果提示 Vav2 与此类血管结构异常的 CHD 高度相关^[9-10]。在本研究中,通过生物信息学手段处理前述 WES 的数据,筛选出 Vav2 未曾报道的新发罕见突变 c. 701C > T; p. P234L,拟从遗传变异角度进一步厘清 Vav2 在血管发育中的重要功能。Mutation Taster 在线预测提示这个突变位点为高度“致病性”位点,且该位点在人类、猕猴、褐家鼠等脊椎动物上高度保守,提示这个突变可能引起重要的功能改变。qRT-PCR 和 Western blot 实验结果表明,P234L 突变不影响 Vav2 mRNA 表达,但蛋白的表达量

较野生型有下调,转录和翻译的差异提示这个位点引起的单个氨基酸改变可能会影响 Vav2 蛋白结构的稳定性。

在哺乳动物胚胎发育过程中,内皮细胞在构建组织化的血管网络中起着至关重要的作用。因此,笔者在 HUVEC 中进一步探究 Vav2 罕见新发突变 P234L 的功能。实验结果提示,Vav2 能促进 HUVEC 增殖、迁移以及成管,具有促进血管生成的作用;而 P234L 突变能改变 Vav2 在内皮细胞中促进 HUVEC 增殖、迁移和成管的积极功能,笔者的研究结果提示 Vav2 可能是胚胎发育过程中参与血管发育的重要分子,该突变可能是血管结构异常的 CHD 发病的分子机制之一。

Vav2 作为一类鸟嘌呤核苷酸交换因子,通过结合 GTP 激活 Rho GTP 酶家族(主要包括 Rac1、Cdc42 和 RhoA),这些成员在 GTP 结合的活性形式下能参与调节细胞内重要生物学功能,包括细胞生长和蛋白激酶激活等^[21]。Rac1 作为 Vav2 广泛报道的下游,Vav2 往往与 Rac1 相互作用后,通过促进 Rac1 结合 GTP 形成 Rac1-GTP 活性形式发挥功能,进而调控内皮细胞、肿瘤细胞的迁移^[22]。但是,Vav2 是否通过激活 Rac1 影响内皮细胞功能进而调节 CHD 发生尚不清楚。qRT-PCR 以及 Western blot 实验结果提示,野生型 Vav2 以及突变 P234L 过表达均不会影响 Rac1 的本底表达,结合之前的研究结果,Vav2 更可能是通过催化 GTP 与 Rac1 结合发挥作用。通过对 Vav2 蛋白结构进一步分

析,P234L 突变位于 Vav2 催化下游 Rho GTP 酶家族与 GTP 结合的 DH 结构域,P234L 突变极有可能是通过影响 Vav2 催化下游 Rac1 激活进而影响 Vav2 在 HUVEC 发挥功能,需进一步检测下游 Rac1-GTP 活性形式来研究该突变对下游的影响。

综上所述,本研究发现 Vav2 错义突变 c. 701C > T;p. P234L 能改变 Vav2 蛋白序列,影响 Vav2 蛋白表达,改变 Vav2 促进 HUVEC 增殖、迁移和成管的能力,此突变可能是通过改变 Vav2 蛋白结构进而影响下游 Rac1 激活而非本底表达导致 Vav2 的功能改变。Vav2 在 HUVEC 中的功能提示 Vav2 对血管发育可能至关重要,P234L 突变对 Vav2 功能的影响可能会导致心血管发育的异常,进而导致血管结构异常的 CHD 发生,但其具体机制有待进一步研究。本研究为血管结构异常的 CHD 发生机制以及临床早期诊断提供进一步理论依据。

参 考 文 献

- [1] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics-2012 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2012, 125(1): e2-e220.
- [2] Bouma BJ, Mulder BJ. Changing landscape of congenital heart disease [J]. *Circ Res*, 2017, 120(6): 908-922.
- [3] Zhao QM, Liu F, Wu L, et al. Prevalence of congenital heart disease at live birth in China [J]. *J Pediatr*, 2019, 204: 53-58.
- [4] Zhao QM, Ma XJ, Ge XL, et al. Pulse oximetry with clinical assessment to screen for congenital heart disease in neonates in China: a prospective study [J]. *Lancet*, 2014, 384(9945): 747-754.
- [5] Liu Y, Chen S, Zühlke L, et al. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970-2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies [J]. *Int J Epidemiol*, 2019, 48(2): 455-463.
- [6] Shi X, Lu Y, Sun K. Research progress in pathogenesis of total anomalous pulmonary venous connection [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2204: 173-178.
- [7] Bleyl SB, Botto LD, Carey JC, et al. Analysis of a Scottish founder effect narrows the TAPVR-I gene interval to chromosome 4q12 [J]. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(21): 2368-2373.
- [8] Tabib A, Talebi T, Ghasemi S, et al. A novel stop-gain pathogenic variant in FLT4 and a nonsynonymous pathogenic variant in PTPN11 associated with congenital heart defects [J]. *Eur J Med Res*, 2022, 27(1): 286.
- [9] Shi X, Huang T, Wang J, et al. Next-generation sequencing identifies novel genes with rare variants in total anomalous pulmonary venous connection [J]. *EBioMedicine*, 2018, 38: 217-227.
- [10] Chen B, Hou A, Zhao L, et al. Next generation sequencing identify rare copy number variants in non-syndromic patent ductus arteriosus [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 600787.
- [11] Schuebel KE, Bustelo XR, Nielsen DA, et al. Isolation and characterization of murine Vav2, a member of the Vav family of proto-oncogenes [J]. *Oncogene*, 1996, 13(2): 363-371.
- [12] Hawkins MB, Henke K, Harris MP. Latent developmental potential to form limb-like skeletal structures in zebrafish [J]. *Cell*, 2021, 184(4): 899-911. e13.
- [13] Moon MS, Gomez TM. Balanced Vav2 GEF activity regulates neurite outgrowth and branching in vitro and in vivo [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 44(2): 118-128.
- [14] Hunter SG, Zhuang G, Brantley-Sieders D, et al. Essential role of Vav family guanine nucleotide exchange factors in EphA receptor-mediated angiogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(13): 4830-4842.
- [15] Liu B, Chen J, Shang F, et al. Tumor-derived exosome FGD5-AS1 promotes angiogenesis, vascular permeability, and metastasis in thyroid cancer by targeting the miR-6838-5p/VAV2 axis [J]. *J Oncol*, 2022, 2022: 4702855.
- [16] Wang R, Zhao N, Li S, et al. MicroRNA-195 suppresses angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of VEGF, VAV2, and CDC42 [J]. *Hepatology*, 2013, 58(2): 642-653.
- [17] Douglas YL, Jongbloed MR, Deruiter MC, et al. Normal and abnormal development of pulmonary veins: state of the art and correlation with clinical entities [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 147(1): 13-24.
- [18] Ontoria-Oviedo I, Földes G, Tejedor S, et al. Modeling transposition of the great arteries with patient-specific induced pluripotent stem cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13270.
- [19] Garrett TA, van Buul JD, Burridge K. VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2 [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(15): 3285-3297.
- [20] Mohammad G, Duraisamy AJ, Kowluru A, et al. Functional regulation of an oxidative stress mediator, Rac1, in diabetic retinopathy [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(12): 8643-8655.
- [21] Wu W, Du S, Shi W, et al. Inhibition of Rac1-dependent forgetting alleviates memory deficits in animal models of Alzheimer's disease [J]. *Protein Cell*, 2019, 10(10): 745-759.
- [22] Li Z, Yang A, Yin X, et al. Mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell migration, vascularization, and bone repair in tissue-engineered constructs via activating CXCR2-Src-PKL/Vav2-Rac1 [J]. *FASEB J*, 2018, 32(4): 2197-2211.

收稿日期: 2023-03-02

欢迎投稿 · 欢迎订阅

孟德尔随机化探讨三甲胺 N-氧化物及其前体与 静脉血栓栓塞的因果关系

李梦依 刘英杰 齐灵焱 秦地茂

(西南交通大学附属医院 成都市第三人民医院心电血压研究室 成都市心血管病研究所, 四川 成都 610031)

【摘要】目的 越来越多的研究关注三甲胺 N-氧化物(TMAO)及其前体与静脉血栓栓塞(VTE)的关系,但在已发表的研究中,二者之间的联系尚不清楚。因此,现采用两样本孟德尔随机化(MR)来探讨 TMAO 及其前体与 VTE[包括深静脉血栓(DVT)和肺栓塞]风险的因果关系。**方法** TMAO 及其前体、DVT 和肺栓塞的汇总统计数据来自多个全基因组关联研究。主要分析采用逆方差加权法,其他四种敏感性分析方法作为补充(MR-Egger、MR 多效性残差和异常值检验、最大似然比法和加权中值法)。最后,使用 Bonferroni 进行校正,其校正标准为 $P=0.012\ 5(0.05/4=0.012\ 5)$,当 P 值在 0.012 5 和 0.05 之间时,考虑 TMAO 和 VTE 存在潜在的相关性。**结果** 基因预测显示:TMAO 浓度每增加 1 个单位,DVT 的相对风险就会增加 0.08% ($OR=1.000\ 8, 95\% CI\ 1.000\ 4 \sim 1.001\ 2, P=0.001\ 3$),胆碱浓度每增加 1 个单位,则 DVT 的相对风险可能会增加 0.06% ($OR=1.000\ 6, 95\% CI\ 1.000\ 1 \sim 1.001\ 2, P=0.042\ 0$)。**结论** 该 MR 研究支持 TMAO 和胆碱对 DVT 的潜在因果效应,表明降低 TMAO 和胆碱的水平可能降低 DVT 风险。

【关键词】 三甲胺 N-氧化物;胆碱;静脉血栓栓塞;深静脉血栓;肺栓塞;孟德尔随机化

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2023.08.020

Mendelian Randomization Exploring the Causality of Trimethylamine N-oxide and Its Precursors with Venous Thromboembolism

LI Mengyi, LIU Yingjie, QI Lingyao, QIN Dimao

(Electrocardiogram and Blood Pressure Research Laboratory, The Affiliated Hospital of Southwest Jiaotong University, School of Medicine, The Third People's Hospital of Chengdu, Cardiovascular Diseases Research Institute of Chengdu, Chengdu 610031, Sichuan, China)

【Abstract】Objective Recently, although more and more researchers have focused on the relationship of trimethylamine N-oxide (TMAO) and its precursors with venous thromboembolism (VTE), the association between them in previous studies remains unclear. Therefore, a two-sample Mendelian randomization (MR) was used to explore a causal association of TMAO and its precursors with VTE risk, including deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism. **Methods** In this study, summary statistics of TMAO and its precursors, DVT, and pulmonary embolism were obtained from several extensive genome-wide association studies. Our primary analyses were conducted by inverse-variance weighting method, complementary with the other four sensitivity analysis (MR-Egger, MR pleiotropy residual sum and outlier test, Maximum likelihood, and weighted median). Finally, the Bonferroni corrected significance level with $P=0.012\ 5(0.05\ divided\ by\ 4\ risk\ factors)$ was used, and a potential association was considered when the P -value was between 0.012 5 and 0.05. **Results** Gene prediction reported that for every 1 unit increase in TMAO concentrations, the relative risk of DVT increased by 0.08% ($OR=1.000\ 8, 95\% CI\ 1.000\ 4 \sim 1.001\ 2, P=0.001\ 3$) and for every 1 unit increase in choline concentrations, the relative risk of DVT may increase by 0.06% ($OR=1.000\ 6, 95\% CI\ 1.000\ 1 \sim 1.001\ 2, P=0.042\ 0$). **Conclusion** This MR analysis supports a potential causal effect of TMAO and choline on DVT, suggesting lowering their levels may reduce DVT risk.

【Key words】 Trimethylamine N-oxide; Choline; Venous thromboembolism; Deep vein thrombosis; Pulmonary embolism; Mendelian randomization

静脉血栓栓塞(venous thromboembolism, VTE)包 (pulmonary embolism, PE),是继心肌梗死和卒中之后
括深静脉血栓(deep vein thrombosis, DVT)和肺栓塞 第三常见的血管疾病^[1]。流行病学研究^[2-3]表明,随

基金项目:四川省科技厅面上项目(2019YJ0634);四川省中医药管理局(2020JC0010);成都市卫健委医学科研课题(2021206)

通信作者:秦地茂, E-mail:1732249856@qq.com

着增龄,全世界 VTE 发病率为(1~2)%。几项研究也证实了 VTE 患者的高死亡率。例如,一项纳入了 7 万余人的荟萃分析^[4]回顾了 86 项随机对照试验,结果表明,即使经过治疗,VTE 仍然可导致 9.8% 的受试者死亡。尽管存在系统的治疗和管理,VTE 患者的预后仍然很差,其 10 年复发率为 30%^[5-8]。考虑到 VTE 预后不佳,其治疗方面一直是当前的研究热点。

VTE 的危险因素较多,如静坐、吸烟以及外科手术后。最近,据报道^[9-10],作为肠道微生态系统中最关键的活性成分,三甲胺 N-氧化物(trimethylamine N-oxide, TMAO)及其前体与 VTE 风险密切相关。当肠道菌群的平衡被破坏时,各种致病微生物增殖并产生过量的 TMAO,导致血管内皮细胞、血小板和先天免疫细胞中的炎症途径活化,这将升高 VTE 风险^[11-16]。目前,一些研究人员试图通过各种途径解释 TMAO 及其前体与 VTE 的关系。然而,这些研究的样本量较为有限,而且,多为回顾性研究,存在反向因果关系以及不能评估的混杂因素^[17]。

孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)是探索暴露与结果之间因果关系的一种流行方法。MR 分析主要使用基因变异作为暴露的工具变量,以评估暴露对结果的因果影响。此外,MR 研究还可以克服观察性研究的典型缺点,如反向因果关系和潜在混杂因素,使结果更令人信赖^[18]。

在本研究中,进行了双样本 MR 分析,以探讨 TMAO 及其前体与 VTE 的主要组成部分 DVT 和 PE 之间的因果关系。

1 方法

1.1 研究设计

本研究采用了双样本 MR 方法^[19]。双样本 MR 必须满足 3 个假设,即:(1)工具变量与 TMAO 及其前体密切相关;(2)工具变量不能与 DVT 和 PE 相关;(3)工具变量不与影响 DVT 和 PE 的混杂因素相关。

1.2 数据来源

TMAO 及其前体:为了探讨 TMAO 及其前体(肉碱、胆碱和甜菜碱)是否与 DVT 和 PE 的发病风险增加相关,笔者从全基因组关联研究的荟萃分析^[20]中获得了与上述肠道代谢产物相关的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)作为工具变量($n=2\ 076$)。然而,该全基因组关联研究识别的位点很少达到全基因组显著性水平,因此本研究提取了具有全基因组显著阈值($P<5\times 10^{-5}$)的 SNP 作为工具变量。

DVT 和 PE: DVT 和 PE 的汇总数据来自英国生物银行。英国生物银行是一项包括 50 多万英国公民的

队列研究。通过 MR Base 平台(ukb-b-12040、ukb-b-18366)访问了英国生物库的数据,其中,DVT 数据包括 92 441 例患者以及 453 692 例对照人群,计有 9 851 867 个 SNP 位点;而 PE 的数据则包含 1 846 例患者和 461 164 例对照人群,计有 9 851 867 个 SNP 位点^[21]。

1.3 遗传工具变量

为了满足第一个 MR 假设,即 SNP 与暴露密切相关,在全基因组水平上选择了与 TMAO 及其前体显著相关的工具变量($P<5\times 10^{-5}$, $r^2<0.001$,遗传距离=10 000 kb)。此外,由于纳入的 SNP 易受弱工具变量的影响,还计算了 F 统计量。如果 F 统计量显著大于 10,则表明弱工具变量不太可能影响结果^[22]。最后,为了满足第二个 MR 假设,即遗传变异与任何潜在混杂因素无关,在 PhenoScanner 数据库中进行了查询,以确定所包含的 SNP 是否与已知混杂因素(血脂异常和肥胖)相关。如果是,它们则被排除在外。

1.4 MR 分析

在本研究中,使用了五种 MR 分析方法,包括逆方差加权法(inverse-variance weighting, IVW)、MR-Egger、MR 多效性残差和异常值检验(Mendelian Randomization Pleiotropy RESidual Sum and Outlier, MR-PRESSO)、最大似然比法和加权中值法^[23-27]。首先,使用了 IVW 来估计 TMAO 及其前体与 DVT 和 PE 的关系。其次,使用 MR-PRESSO、MR-Egger、最大似然比法和加权中值法进一步对 IVW 结果进行敏感性分析,以验证肠道代谢物对 DVT 和 PE 的影响。最大似然比法是一种具有低标准误差的传统方法,通过最大似然来测量潜在分布参数^[24]。MR-Egger 基于 InSIDE 的假设,对暴露结果进行加权线性回归,但其易受工具变量的影响^[25]。加权中值法可以显著提高因果效应的检测能力,并减少 I 型错误^[26]。MR-PRESSO 类似于 IVW,其因果估计与其他工具变量显著不同^[27]。如果少于 50% 的工具变量存在水平多效性,MR-PRESSO 可以提供较为准确的分析。最后,为了有效地解释该 MR 的结果,进一步计算了相应的 OR 值以及 95% CI。

1.5 水平多效性及异质性

本研究使用了不同的方法来评估潜在的影响。Cochran Q 统计和 MR-Egger 回归用于解释研究中的异质性和水平多效性^[28]。如果 $P<0.05$,则表明纳入的工具变量中没有偏差和异质性。MR-PRESSO 也被用作全局、离群值和失真测试的附加多重性控制。最后,“留一法”敏感性分析和漏斗图法用于评估每个工具变量和结果之间的关系。

所有统计分析均采用 R4.1.1 软件进行。显著性水平设置为 0.012 5(0.05 除以 4 个风险因素)。

2 结果

2.1 肠道微生物群和代谢产物的遗传工具变量

在本研究中发现, rs488419 (TMAO)、rs17418675 (TMAO)、rs2074755 (甜菜碱)、rs16840689 (甜菜碱) 和 rs10883712 (甜菜碱) 基因座与血脂异常和肥胖密切相关, 因此删除了这些 SNP。最后, 纳入了 132 个与肠道代谢产物相关的连锁不平衡、非独立的 SNP (37 个与甜菜碱相关, 26 个与肉碱相关, 23 个与胆碱相关, 46 个与 TMAO 相关)。工具变量解释的 DVT 和 PE 的方差范围为 37.14% ~ 87.70%。此外, 所有工具变量的 F 统计值显著大于 18.77, 有效地消除了本研究中的弱工具变量的影响。

2.2 MR 分析

基于 IVW, 发现 TMAO 每增加 1 个单位, DVT 的相对风险增加 0.08% ($OR = 1.000\ 8, 95\% CI\ 1.000\ 4 \sim 1.001\ 2, P = 0.001\ 3$); 胆碱浓度每增加 1 个单位, DVT 的相对风险提高 0.06% ($OR = 1.000\ 6, 95\% CI\ 1.000\ 1 \sim 1.001\ 2, P = 0.042\ 0$), 另外, 最大似然法也证实了上述关系。然而, 笔者观察到 TMAO 及其前体与 PE 风险无关 (表 1)。

表 1 TMAO 及其前体与 VTE 的因果关系

结局	暴露	OR(95% CI)	P 值
DVT	TMAO	1.000 8(1.000 4 ~ 1.001 2)	0.001 3
	甜菜碱	1.000 0(0.999 4 ~ 1.000 6)	0.905 0
	肉毒碱	1.000 2(0.999 8 ~ 1.000 6)	0.324 0
	胆碱	1.000 6(1.000 1 ~ 1.001 2)	0.042 0
PE	TMAO	0.999 7(0.999 3 ~ 1.000 1)	0.269 0
	甜菜碱	1.000 0(0.999 8 ~ 1.000 2)	0.837 0
	肉毒碱	1.000 1(0.999 9 ~ 1.000 2)	0.757 0
	胆碱	1.000 1(0.999 7 ~ 1.000 5)	0.536 0

2.3 水平多效性和异质性分析

在 MR 分析中, 较多的工具变量通常会带来更准确的结果, 并为 MR 提供更好的效能, 但它也会导致水平的多效性和异质性。因此, 使用了一系列方法来评估研究中是否存在显著的水平多效性和异质性。MR-Egger 截距和 Cochran Q 检验表明, 本研究中不存在水平多效性和异质性的易感性 (P 值均 > 0.05)。“留一法”敏感性分析表明, 纳入的 SNP 对结果没有显著影响, 表明结果具有显著的可靠性, 漏斗图显示不对称分布的 SNP, 这表明因果关联不太可能受到潜在偏差的影响。MR-PRESSO 分析的结果表明, 纳入的 SNP 位点没有任何异常值, 与 IVW 的结果保持一致 (图 1 ~ 图 4)。

3 讨论

本研究首次采用 MR 法探讨 TMAO 及其前体对 DVT 及 PE 的影响。基因预测的结果表明 TMAO 和胆

碱可能会增加 DVT 的风险, 但可能与 PE 风险无关。这些发现表明降低 TMAO 和胆碱水平可能降低 DVT 的风险。

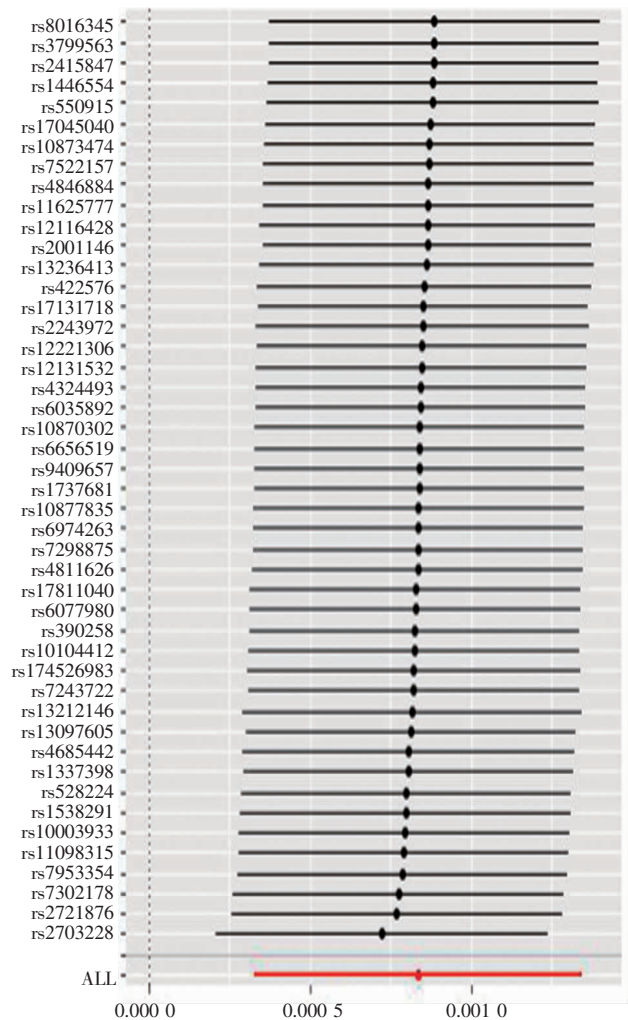


图 1 “留一法”提示 TMAO 与 DVT 的敏感性分析

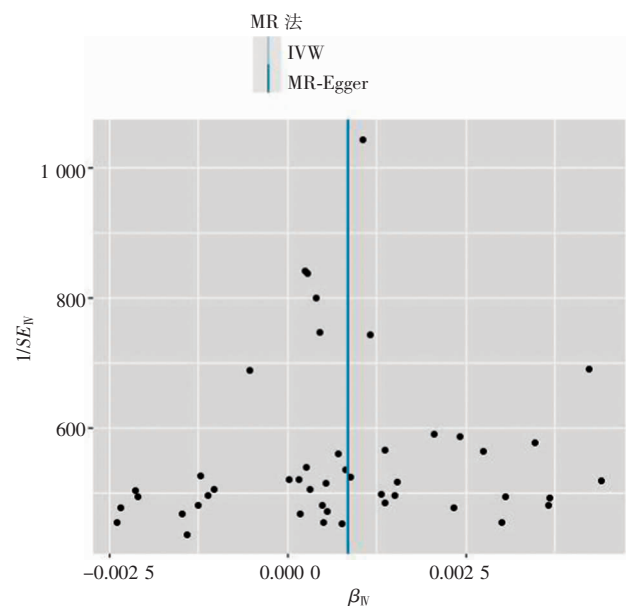


图 2 漏斗图提示不对称分布 SNP (TMAO 与 DVT)

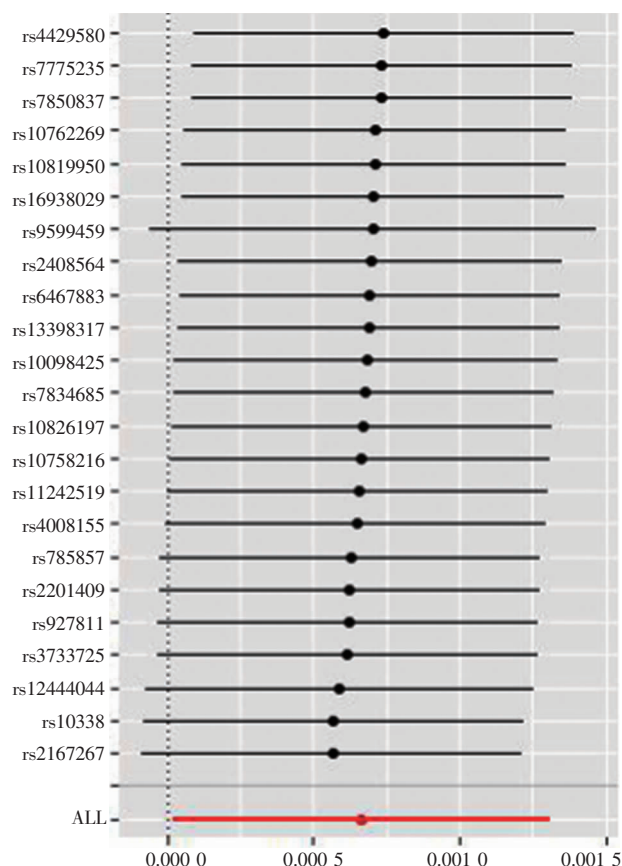


图3 “留一法”提示胆碱与 DVT 的敏感性分析

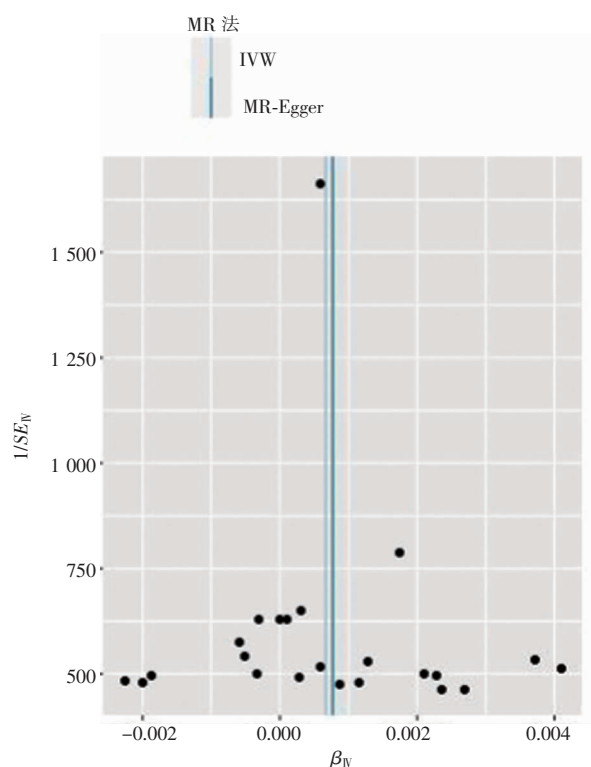


图4 漏斗图提示不对称分布 SNP(胆碱与 DVT)

作为日常食物的主要来源,胆碱可以在肠道中转化为三甲胺,然后通过门静脉的血液循环被人体肠道吸收,最后由肝脏代谢为 TMAO,从而参与人体的各种

代谢途径^[29]。之前的一些研究^[30]中发现,在该过程中,TMAO 及其前体(胆碱)与血栓性疾病密切相关。例如,在 2011 年,一项纳入了 1 876 例受试者的观察性研究^[31]表明,TMAO 与急性心肌梗死和外周动脉疾病等血栓性疾病密切相关。随后,Zhu 等^[14]发现 TMAO 与血栓事件累积负担增加呈剂量依赖性关系,在调整心血管疾病史、传统心血管疾病危险因素、肾功能和药物使用后,这种关系仍然保持一致。同样,在本研究中,DVT 的相对风险随着 TMAO 浓度的增加而增加。然而,TMAO 促进血栓形成的机制尚不清楚。一些研究人员推测,这一机制可能是多种因素共同作用的结果。例如,TMAO 可以通过改变 1,4,5-三磷酸肌醇信号通路来促进血小板高反应性,增强细胞内 Ca^{2+} 储备的释放,此外,TMAO 还可以激活血小板激动剂如腺苷二磷酸、凝血酶和胶原,并间接增强血小板反应性,从而直接或间接促进血栓形成^[32]。最近也有报道^[33-34]称,TMAO 可以通过激活血管中的炎症反应来介导血栓形成,导致血管内皮细胞损伤。

在本研究中,基因预测还表明,DVT 的相对风险随着胆碱浓度的增加而增加,这也与先前的研究一致。一项 2017 年的前瞻性队列研究显示,补充胆碱后血栓形成的风险增加,即使受试者服用抗血小板药和其他相关药物,血栓形成的潜在风险也并不降低。令人遗憾的是,胆碱促进血栓形成的机制目前尚不清楚,一些研究人员推测其可能与血小板活化有关。例如,胆碱可通过 Slc44a2 受体介导的线粒体转运代谢为腺苷三磷酸和活性氧^[32]。腺苷三磷酸为血小板活化提供能量,其代谢产物腺苷二磷酸可作用于血小板嘌呤能受体,进一步驱动血小板活化并促进血栓形成^[35]。此外,活性氧作为另一种代谢产物,也可能通过调节血小板对胶原蛋白的亲合力参与血栓形成^[32]。

值得注意的是,本研究使用了大型全基因组关联研究的数据,并进行了双样本 MR 分析,因此可有效地避免观察性研究相关的偏倚,这为确定肠道代谢产物与 DVT 之间的关系提供了可靠的证据。此外,使用其他方法进一步验证了本研究的结果,这也使得结果更为可靠。然而,本研究也有一些局限性。第一,研究仅限于欧洲血统的人群,目前尚不清楚这些结果是否可以应用于其他人群;第二,不能完全排除可能的饮食基因或基因环境相互作用的影响;第三,由于本研究中 OR 值接近 1,因此更多的研究将有助于探索这一机制。

总之,在本研究中,发现了 TMAO 和胆碱可能促进 DVT。这提示对于有血栓风险的患者,应该注意 TMAO 的变化,避免高胆碱饮食。此外,二者之间的确

切机制尚不清楚,更多的研究将有助于探索这一机制。

参 考 文 献

- [1] van Schouwenburg IM, Gansevoort RT, Mahmoodi BK, et al. Increased risk of arterial thromboembolism after a prior episode of venous thromboembolism: results from the Prevention of REnal and Vascular ENd stage Disease PREVENT study[J]. *Br J Haematol*, 2012, 159(2):216-222.
- [2] Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, et al. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study[J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5(4):692-699.
- [3] Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, et al. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study[J]. *Arch Intern Med*, 1998, 158(6):585-593.
- [4] Klemen ND, Feingold PL, Hashimoto B, et al. Mortality risk associated with venous thromboembolism: a systematic review and Bayesian meta-analysis[J]. *Lancet Haematol*, 2020, 7(8):e583-e593.
- [5] Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, et al. Venous thromboembolism VTE, in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality[J]. *Thromb Haemost*, 2007, 98(4):756-764.
- [6] White RH. The epidemiology of venous thromboembolism[J]. *Circulation*, 2003, 107(1):14-18.
- [7] Spencer FA, Gore JM, Lessard D, et al. Patient outcomes after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: the Worcester Venous Thromboembolism Study[J]. *Arch Intern Med*, 2008, 168(4):425-430.
- [8] Mensah GA, Roth GA, Fuster V. The global burden of cardiovascular diseases and risk factors: 2020 and beyond[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74(20):2529-2532.
- [9] Floch MH. Intestinal microecology in health and wellness [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2011, 45(suppl):S108-S110.
- [10] Kiouptsi K, Reinhardt C. Contribution of the commensal microbiota to atherosclerosis and arterial thrombosis [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(24):4439-4449.
- [11] Dunzendorfer S, Lee HK, Tobias PS. Flow-dependent regulation of endothelial Toll-like receptor 2 expression through inhibition of SP1 activity[J]. *Circ Res*, 2004, 95(7):684-691.
- [12] Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, et al. Platelets express functional Toll-like receptor-4[J]. *Blood*, 2005, 106(7):2417-2423.
- [13] Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells[J]. *Lab Invest*, 2006, 86(1):9-22.
- [14] Zhu W, Gregory JC, Org E, et al. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk[J]. *Cell*, 2016, 165(1):111-124.
- [15] Komatsu S, Berg RD, Russell JM, et al. Enteric microflora contribute to constitutive ICAM-1 expression on vascular endothelial cells[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 279(1):G186-G191.
- [16] Jäckel S, Kiouptsi K, Lillich M, et al. Gut microbiota regulate hepatic von Willebrand factor synthesis and arterial thrombus formation via Toll-like receptor-2[J]. *Blood*, 2017, 130(4):542-553.
- [17] Burgess S, Butterworth A, Thompson SG. Mendelian randomization analysis with multiple genetic variants using summarized data[J]. *Genet Epidemiol*, 2013, 37(7):658-665.
- [18] Smith GD, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? [J]. *Int J Epidemiol*, 2003, 32(1):1-22.
- [19] Davies NM, Holmes MV, Davey Smith G. Reading Mendelian randomisation studies: a guide, glossary, and checklist for clinicians [J]. *BMJ*, 2018, 362:k601.
- [20] Rhee EP, Ho JE, Chen MH, et al. A genome-wide association study of the human metabolome in a community-based cohort [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(1):130-143.
- [21] Hemani G, Zheng J, Elsworth B, et al. The MR-Base platform supports systematic causal inference across the human phenome[J]. *Elife*, 2018, 7:e34408.
- [22] Palmer TM, Lawlor DA, Harbord RM, et al. Using multiple genetic variants as instrumental variables for modifiable risk factors[J]. *Stat Methods Med Res*, 2012, 21(3):223-242.
- [23] Yang J, Ferreira T, Morris AP, et al. Conditional and joint multiple-SNP analysis of GWAS summary statistics identifies additional variants influencing complex traits[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(4):S1-S3.
- [24] Ren W, Liang Z, He S, et al. Hybrid of restricted and penalized maximum likelihood method for efficient genome-wide association study [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(11):1286.
- [25] Bowden J, Davey Smith 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.
- [26] Bowden J, Davey Smith G, Haycock PC, et al. Consistent estimation in Mendelian randomization with some invalid instruments using a weighted median estimator[J]. *Genet Epidemiol*, 2016, 40(4):304-314.
- [27] Verbanck M, Chen CY, Neale B, et al. Detection of widespread horizontal pleiotropy in causal relationships inferred from Mendelian randomization between complex traits and diseases[J]. *Nat Genet*, 2018, 50(5):693-698.
- [28] Burgess S, Thompson SG. Erratum to: interpreting findings from Mendelian randomization using the MR-Egger method[J]. *Eur J Epidemiol*, 2017, 32(5):391-392.
- [29] Tripathi A, Debelius J, Brenner DA, et al. The gut-liver axis and the intersection with the microbiome[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(7):397-411.
- [30] Zhu W, Wang Z, Tang WHW, et al. Gut microbe-generated trimethylamine N-oxide from dietary choline is prothrombotic in subjects[J]. *Circulation*, 2017, 135(17):1671-1673.
- [31] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease [J]. *Nature*, 2011, 472(7376):57-63.
- [32] Qiao J, Arthur JF, Gardiner EE, et al. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species [J]. *Redox Biol*, 2018, 14:126-130.
- [33] Seldin MM, Meng Y, Qi H, et al. Trimethylamine N-oxide promotes vascular inflammation through signaling of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(2):e002767.
- [34] Chen ML, Zhu XH, Ran L, et al. Trimethylamine-N-oxide induces vascular inflammation by activating the NLRP3 inflammasome through the SIRT3-SOD2-mtROS signaling pathway[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(11):e006347.
- [35] Bennett JA, Mastrangelo MA, Ture SK, et al. The choline transporter Slc44a2 controls platelet activation and thrombosis by regulating mitochondrial function [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):3479.

收稿日期:2023-01-19