

·临床研究·

NLRP3水平与冠心病风险关联的孟德尔随机化研究

杨珺玥¹, 范思宇¹, 谭颖超¹, 智宏², 王莉娜¹

(1. 东南大学公共卫生学院, 江苏 南京 210009; 2. 东南大学附属中大医院, 江苏 南京 210009)

摘要:【目的】采用孟德尔随机化法(MR)推断炎症小体NLRP3水平与冠心病发生风险之间的关联。【方法】依托东南大学中大医院心血管内科,对经冠状动脉造影确诊的321个冠心病病例和293个正常对照的人群,进行流行病学调查与血样标本采集。采用ELISA方法测定血清NLRP3水平;采用RFLP-PCR的基因分型方法,检测研究对象的NLRP3基因rs10754558(C/G)的多态性;以NLRP3基因rs10754558(C/G)作为工具变量,结合血清学相关表型NLRP3水平,采用线性回归分析和Logistic回归分析的方法分别构建基因型-表型、基因型-疾病结局之间的关联,进而使用MR方法推断相关细胞因子(表型)与CAD发生之间的因果关联。【结果】NLRP3基因变异rs10754558(C/G)与冠心病风险间以及NLRP3水平之间的关联均具有统计学意义,回归系数 $\beta_{zy}=0.45$, $\beta_{zx}=2.34$,进而通过孟德尔随机化法推断出的NLRP3水平与冠心病风险的关联回归系数 $\beta_{xy}=\beta_{zy}/\beta_{zx}=0.45/2.34=0.19$,表明NLRP3水平每增加1 ng/mL水平,冠心病的风险增加20.9%(OR= $e^{0.19}=1.209$)。通过传统病例对照研究设计直接获得的NLRP3水平与冠心病风险的关联回归系数 $\beta_{xy}=0.03$,表明NLRP3每升高1 ng/mL,个体发生CAD的风险增加了3.1%(OR= $e^{0.03}=1.031$, 95%CI=1.003-1.058),相比MR方法推断的关联强度较小。【结论】通过孟德尔随机化法验证了炎症小体NLRP3水平与冠心病风险之间的关联,比传统关联研究更接近真实因果关联。

关键词: NLRP3基因;冠心病;孟德尔随机化;单核苷酸多态性

中图分类号:R54

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2022)01-0133-07

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0116

Associations between NLRP3 Levels and Coronary Artery Disease Risk: Mendelian Randomized Study

YANG Jun-yue¹, FAN Si-yu¹, TAN Ying-chao¹, ZHI Hong², WANG Li-na¹

(1. School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China; 2. ZhongDa Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China)

Correspondence to: WANG Li-na; E-mail: lnwang@seu.edu.cn.

Abstract: 【Objective】 Using the Mendelian randomization (MR) study design to infer the causal relationship between NLRP3 levels and the risk of CAD. 【Methods】 Totally 321 CAD cases confirmed by coronary angiography (CAG) and 293 normal controls were included in this MR study. Serum NLRP3 levels of all the subjects were determined by ELISA. The polymorphism of NLRP3 gene rs10754558 (C/G) was detected by RFLP-PCR and it was considered as the instrumental variable (IV) to evaluate the causal relationship between NLRP3 levels and CAD risks. Logistic regression analysis and Linear regression analysis were used to test the association between genotype-phenotype, genotype-disease outcome, and then MR method was used to infer the causal relationship between NLRP3 and CAD risks. 【Results】 The association between the NLRP3 gene rs10754558 (C/G) variant and the risk of CAD and the level of NLRP3 were statistically significant.

收稿日期:2021-08-06

基金项目:国家自然科学基金(81673259);江苏省自然科学基金(BK20161435)

作者简介:杨珺玥,硕士生,研究方向:心血管流行病学,E-mail: 220193550@seu.edu.cn;王莉娜,通信作者,副教授,硕士生导师,
E-mail: lnwang@seu.edu.cn

The regression coefficients $\beta_{ZY} = 0.45$ and $\beta_{ZX} = 2.34$ respectively. The regression coefficient $\beta_{YX} = \beta_{ZY}/\beta_{ZX} = 0.45/2.34 = 0.19$, and then it was transformed into OR value ($OR=e^{0.19}=1.209$), which meant subjects with the 1 ng/mL increased of NLRP3 level had the 20.9% increased risk of CAD. And also, the traditional case-control study of the NLRP3 levels and CAD risks showed that the subjects with the 1 ng/mL increased of NLRP3 levels were associated with 3.1% increased CAD risk ($\beta_{YX}=0.03$, $OR=e^{0.03}=1.031$, $95\%CI=1.003-1.058$), which was a little bit lower than that of MR result.【Conclusions】The inflammasome NLRP3 levels were associated with the increased risk of CAD in a mendelian randomization study and it might be a robust evidence than that of the traditional association study.

Key words: *NLRP3*; coronary artery disease; mendelian randomization; single nucleotide polymorphism

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(1): 133-139]

冠状动脉疾病(coronary artery disease, CAD)主要由动脉粥样硬化引起,是动脉壁增厚的进行性慢性炎症过程^[1]。在全球范围内,心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)已经造成了巨大的健康和经济负担,其中最常见的心血管死亡原因就是冠心病^[2]。根据《中国心血管健康与疾病报告2020》显示,心血管疾病死亡仍占城乡居民总死亡原因的首位^[3]。研究表明,炎症反应在斑块形成、促进斑块破裂过程中发挥着重要作用^[4]。Nod样受体蛋白3(nod like receptor protein 3, NLRP3)炎性小体是固有免疫的重要组分,在机体免疫反应和疾病发生过程中具有重要作用。NLRP3作为炎症-免疫的关键,在心血管疾病以及冠心病的作用是当前研究的热点^[5-6]。传统的流行病学研究表明,炎症因子NLRP3在心血管疾病尤其是在冠状动脉粥样硬化疾病的发生发展过程中具有十分重要的作用^[7-8]。然而由于炎症因子水平的精确测量难以实现,以及观察性研究存在的混杂因素使得二者间的关联可能并非为因果关联。为了验证这一关联,利用孟德尔随机化法(Mendelian randomization, MR)避开混杂因素的影响,借助与炎症因子相关的基因变异间接推断炎症因子与疾病之间的因果关联更为可靠。孟德尔随机化法与验证因果关联的金标准随机对照试验相比更具实用性和便捷性,且在可靠性方面与RCT相似。与NLRP3水平相关的突变位点位于*NLRP3*基因启动子区域,存在高度多态性。经阅读相关文献,拟采用*NLRP3*基因 rs10754558(C/G)位点作为工具变量,结合血清NLRP3水平的检测,验证基因型-表型、基因型-疾病结局之间的关联,进而推断NLRP3与CAD发生风险之间的因果关联。

1 材料与方法

1.1 研究对象

研究对象均为2010年09月至2019年03月在东南大学附属中大医院就诊,经(Coronary angiography, CAG)确诊的CAD患者321例,对照组人群(经CAG诊断排除CAD的人群)293例。根据美国心脏协会(American Heart Association, AHA)和美国心脏病学会(American College of Cardiology, ACC)对冠心病诊断的定义^[9],所有研究对象住院期间采用Judkins法行CAG,并须经两位心血管介入专业医师共同诊断。研究对象的纳入标准:①病例组:经临床CAG确诊的冠心病病例;②对照组:来源于医院的对照组人群经冠脉造影(CAG)检查排除患有冠心病。排除标准:①临床资料不齐;②患有威胁生命的心律失常;③合并严重感染、心脏瓣膜性疾病、恶性肿瘤等疾病。病例和对照组研究对象按照性别、年龄(± 3 岁)匹配。本研究遵守赫尔辛基宣言,已获得东南大学伦理委员会的批准(2015ZD-KYSB051)。所有参与者在参与研究前均已签署知情同意书。

1.2 一般资料及标本采集

所有研究对象均按以下几个方面收集信息:①一般情况:性别、年龄、身高、体质量、家族史等;②临床信息:入院血常规检查、生化血脂水平等;③生活行为习惯:吸烟、饮酒史等。每个研究对象分别用真空抗凝采血管和非抗凝采血管采集静脉血5~10 mL,非抗凝管收集血清标本用于血清NLRP3水平的测定,抗凝管4 h内离心,取白细胞留作提取基因组DNA。具体步骤为:未抗凝标本垂直放置30~60 min后离心。标本配平,放入离心机离心7 min,离心力为 $800\times g$,待离心转速降至0时,轻轻取出标本,立即将标本转移至不含抗凝剂和防腐剂的试管。

1.3 血清 NLRP3 水平测定

为获取冠心病患者与对照组人群血清 NLRP3 水平,采取 ELISA 进行测定。试剂盒采用上海酶研生物公司 NLRP3 血清 ELISA 试剂盒。将标本、标准品、检测抗体(经 HRP 标记)依次加入到预先包被隐热蛋白(NLRP3/C1orf7/NALP3)抗体的包被微孔中进行温育并彻底洗涤。TMB 作为显色剂,依次在过氧化氢酶和终止液作用下首先转化成蓝色,继而变为黄色。使用酶标仪(波长 450 nm)测定 OD(吸光度)值标准曲线的直线回归方程,获取样品真实浓度。

1.4 PCR-RFLP 检测 NLRP3 基因位点

采用 QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen 公司)从白细胞中提取 DNA,并测定其浓度和纯度。通过文献阅读查询,并与人类基因库进行核查对比,确定本实验所需 NLRP3 基因 rs10754558(C/G)引物序列。上海生工生物工程技术有限公司负责本研究的引物的合成工作。引物如下:上游引物 5'-CAGGACAATGACAGCATCGGGTGTGAT-3';下游引物 5'-GCTGCCATAAAATTTCAACATAA-3'。以提取完成的核酸为模板,在 PCR 核酸扩增仪进行 PCR 扩增。用 NEB 公司限制性内切酶 MboI 对 rs107544558(C/G)位点的 PCR 产物进行酶切。三种酶切产物片段分别是:GG:261bp; GC:261 bp, 236 bp, 25 bp; CC:和 236 bp, 25 bp。

1.5 统计和分析方法

MR 通过引入工具变量 Z(基因变异)来控制混杂因素的影响,工具变量需满足以下 3 个条件:①基因型必须与待研究的暴露因素(表型 X)存在关联;②基因型必须独立于混杂因素;③基因型只能通过影响待研究的暴露因素(表型 X)与结局 Y 相关。则:关联 ZY=关联 ZX×关联 XY。通过引入 NLRP3 基因 rs10784558(C/G)这一遗传变异位点作为工具变量 Z,采用 Logistic 回归模型,获得这一位点与冠心病风险的关联大小 β_{zx} ;采用线性回归模型,获得这一个位点与 NLRP3 水平的关联大小 β_{zy} 。由此间接获得 NLRP3 水平与冠心病风险的关联大小 $\beta_{xy}=\beta_{zy}/\beta_{zx}$ 。同时与采用病例对照方法直接获得的 NLRP3 水平与 CAD 发生风险之间的关联大小,推断 NLRP3 水平与冠心病发生风险之间的关联。

采用 EpiData3.2 软件对数据进行双录入,采用统计软件 Stata(16.0)和 SPSS(25.0)进行分析。Levene 方差齐性检验判断方差齐性,计量资料以均数±标准差($\bar{X} \pm S$)表示并采用 t 检验,采用 χ^2 检验对计数资料和哈迪-温伯格平衡进行分析。采用非条件

Logistic 回归、广义线性模型等分别构建回归模型,提取 NLRP3 rs10784558 位点突变(Z)与 CAD(Y)、NLRP3 rs10784558 位点突变(Z)与 NLRP3 水平(X)的关联回归系数 β_{zy} 和 β_{zx} ,计算获得 X-Y 回归模型系数 $\beta_{xy}=\beta_{zy}/\beta_{zx}$ 。同时采用传统关联研究的方法,非条件 Logistic 回归直接计算 NLRP3 水平与 CAD 之间的关联系数 β_{xy} ,比较两种方法获得的 NLRP3 水平与 CAD 的关联大小的差异。 $P<0.05$ 定义为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CAD 组和非 CAD 组一般情况比较

本研究共纳入冠心病病例 321 例,对照组 293 例。两组年龄、性别差异无统计学意义($P>0.05$)。收缩压、舒张压、空腹血糖、甘油三酯、胆红素及肌钙蛋白等因素的平均水平在两组差别有统计学意义($P<0.05$),其中病例组的收缩压、舒张压、空腹血糖、甘油三酯及肌钙蛋白平均水平均显著高于对照组,冠心病组的胆红素平均水平低于对照组。而两组间的总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、载脂蛋白 A、载脂蛋白 B、脂蛋白 a、肌酐等临床指标的分布差异未见统计学意义(表 1; $P>0.05$)。

2.2 CAD 组与对照组 NLRP3 基因型频率分布的比较

病例组与对照组各基因型如表 2 所示。在 321 例病例组人群中,CC 基因型 64 例,CG 型 106 例,GG 型 151 例,频率分别为 19.94%、33.02%、47.04%;C 等位基因频率 50.49%,G 等位基因频率 49.51%。293 例对照人群中,CC 基因型 82 例,CG 型 87 例,GG 型 127 例,频率分别为 27.99%、29.69%、42.32%;冠心病组 C 等位基因频率 36.45%,G 等位基因频率 63.55%,对照组 C 等位基因频率 42.83%,G 等位基因频率 57.17%。对对照组进行哈迪-温伯格遗传平衡检验,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 NLRP3 基因 rs10754558(C/G)与 CAD 风险之间的关联

在显性模型(GG+CGvsCC)的情况下,检验 NLRP3 基因变异 rs10754558(C/G)与 CAD 之间的关联。结果表明 NLRP3 基因 rs10754558 位点变异与 CAD 之间的关联具有显著性,与携带 CC 基因型的个体相比,只要有一个等位基因 G 突变的个体发生冠心病的风险增加了 56%(OR= 1.56,95% CI= 1.07-2.27)。Logistic 回归结果显示,NLRP3 基因 rs10754558 位点

表1 病例组与对照组临床资料比较

Variable	CAD cases	Controls	P value
Age/years	60.73±10.99	61.63±10.81	0.306
Sex (Male/Female)	163/158	144/149	0.686
BMI (kg/m ²) ¹⁾	25.13±3.50	24.70±3.81	0.213
SBP (mmHg) ²⁾	150.82±24.09	137.36±20.80	<0.001
DBP (mmHg) ³⁾	89.75±16.02	80.24±11.32	<0.001
FBG (mmol/L) ⁴⁾	6.96±2.83	6.04±1.98	<0.001
TG (mmol/L) ⁵⁾	1.95±1.56	1.60±1.33	<0.001
TC (mmol/L) ⁶⁾	4.64±1.25	4.63±1.22	0.957
HDL (mmol/L) ⁷⁾	1.28±0.65	1.29±0.54	0.759
LDL (mmol/L) ⁸⁾	2.84±1.53	2.85±0.91	0.867
ApoA (mmol/L) ⁹⁾	1.12±0.51	1.16±0.42	0.288
ApoB (mmol/L) ¹⁰⁾	0.89±0.89	0.87±0.66	0.754
Lp(a) (mmol/L) ¹¹⁾	245.31±207.19	247.62±243.08	0.903
CRE (mmol/L) ¹²⁾	94.99±94.74	86.75±73.04	0.236
TBIL (mmol/L) ¹³⁾	8.33±8.30	14.28±27.26	<0.001
Tn (mmol/L) ¹⁴⁾	1.30±8.87	0.12±0.64	0.046

BMI: Body mass index; SBP: Systolic blood pressure; DBP: Diastolic blood pressure; FBG: Fasting blood glucose; TG: Triglyceride; TC: Total cholesterol; HDL: High density lipoprotein; LDL: Low density lipoprotein; ApoA: Apolipoprotein A; ApoB: Apolipoprotein B; Lp(a): Lipoprotein a; CRE: Creatinine; TBIL: Total bilirubin; Tn: Troponin. The chi-square test was used for sex and the T test was used for others. Missing value: 1): 80 cases, 91 controls. 2): 94 cases, 206 controls. 3): 98 cases, 207 controls. 4): 83 cases, 160 controls. 5): 13 cases, 17 controls. 6): 13 cases, 18 controls. 7): 14 cases, 18 controls. 8): 13 cases, 18 controls. 9): 14 cases, 19 controls. 10): 14 cases, 19 controls. 11): 15 cases, 21 controls. 12): 10 cases, 18 controls. 13): 22 cases, 49 controls. 14): 36 cases, 64 controls.

变异与CAD之间的关联的回归系数为 $\beta_{Z1}=0.45$,即每增加一个等位基因变异,个体发生CAD的风险增加56.8%(OR= $e^{0.45}=1.568$, 95%CI=1.073-2.271)。

2.4 NLRP3 基因 rs10754558(C/G) 与 NLRP3 水平之间的关联

采用一般线性回归分析计算 rs10754558(C/G) 位点突变和 NLRP3 水平之间的关联。对于 NLRP3 基因变异 rs10754558(C/G) 位点, GG/GC 基因型与 CC 基因型携带者相比,每增加一个突变等位基因, NLRP3 水平增加 2.34 ng/mL ($\beta_{Z1}=2.34$, 95%CI = 0.28-4.30)。

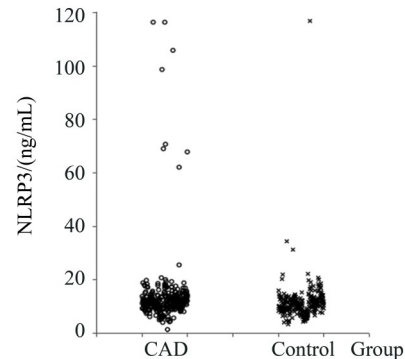
表2 病例组与对照组 NLRP3 基因型频率分布

	CC	CG	GG	GG+CG	C	G
CAD	64(19.9)	106(33.02)	151(47.04)	257(80.06)	(36.45)	(63.55)
Controls	82(27.90)	87(29.60)	124(42.50)	211(72.01)	(42.83)	(57.17)

CC: wild type genotype; CG/GG: mutant type genotype. The Hardy - Weinberg equilibrium test of control groups: $P<0.05$.

2.5 NLRP3 水平与 CAD 之间的关联

冠心病组 NLRP3 的水平为 13.61 ng/mL, 高于对照组 NLRP3 水平 11.36 ng/mL, 且两组间的差异具有统计学意义 ($P=0.009$; 图 1)。NLRP3 水平与 CAD 之间的关联系数采用 logistic 回归计算。结果表明, NLRP3 水平每升高 1 ng/mL, 个体发生 CAD 的风险增加了 3.1% (OR= $e^{0.03}=1.031$, 95%CI=1.003-1.058)。



The mean level of NLRP3 in CAD group (13.61 ng/mL) was higher than control group (11.36 ng/mL), and the difference between the two groups was statistically significant ($P=0.009$).

图1 冠心病组与对照组 NLRP3 水平的散点图

Fig.1 Scatter plot of NLRP3 levels between CAD group and control group

2.6 NLRP3 水平与 CAD 风险关联的孟德尔随机化研究

由病例对照研究设计,通过检测病例组与对照组的 NLRP3 水平,直接获得的 NLRP3 水平与冠心病风险的关联大小 $\beta_{XY}=0.03$,表明 NLRP3 水平每增加 1 ng/mL,个体发生冠心病的风险增加 3.1% (OR= $e^{0.03}=1.031$, 95%CI=1.003-1.058);采用 NLRP3 基因 rs10754558(C/G)作为工具变量,由孟德尔随机化间接获得的 NLRP3 水平与冠心病风险的关联大小 $\beta_{XY}=\beta_{Z1}/\beta_{Z2}=0.19$,进行对数转换后显示, NLRP3

水平每增加 1ng/mL 水平,个体发生冠心病的风险增加 20.9% ($e^{0.19}=1.209$;图 2)。两种方法所得关联系数方向一致。

3 讨论

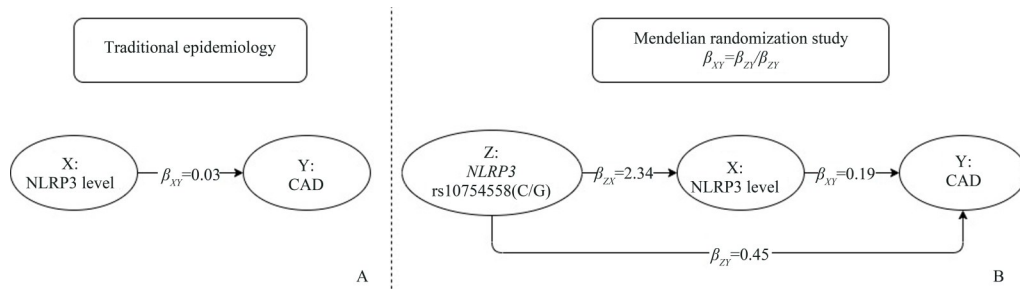
3.1 主要发现

本研究采用病例对照研究设计,冠心病组与对照组两组之间性别构成、年龄等一般情况相匹配,具有可比性。结果发现,病例组的空腹血糖、甘油三酯、收缩压、舒张压及肌钙蛋白均显著高于对照组,病例组的胆红素低于对照组。与国内外研究一致^[10-13]。同时,通过孟德尔随机化法推断出 NLRP3 水平与冠心病风险的关联具有统计学意义,NLRP3 水平每增加 1 ng/mL,个体发生冠心病的风险增加 20.9%。通过传统病例对照研究设计直接获得的 NLRP3 水平与冠心病风险的关联同样具有统计学意义,NLRP3 水平每增加 1 ng/mL,冠心病的风险增加 3.1%。两种方法得到的回归系数方向一致,说

明结果具有一定的可靠性。但通过病例对照研究设计得到的关联大小远小于孟德尔随机化法,说明观察性流行病学中潜在的混杂因素的干扰可能导致低估关联效应。

3.2 相关机制与研究证据

动脉粥样硬化被认为是动脉壁的一种慢性炎症性疾病,而炎症是动脉粥样硬化斑块发生、发展和血栓破裂等发病机制的核心,促进冠心病和急性冠脉综合征的发生和发展^[14-15]。2010年,Duewll等^[16]首次发现在骨髓来源的炎症细胞中缺少 NLRP3, IL-1 α/β 等与炎症小体相关的分子可降低动脉粥样硬化病变的发展。由于胆固醇晶体的形成存在于早期阶段,并且可以在动脉粥样硬化的所有阶段中检测到,Duewll等^[16]研究发现晶体对巨噬细胞中的 NLRP3 炎性小体有很强的激活作用,而具有高动脉粥样硬化特性的氧化低密度脂蛋白(LDL)的存在会导致胆固醇结晶和引发信号的激活,从而诱导 NLRP3 和 IL-1 β 前体的表达。根据 Sheedy 等^[17]的后续研究,NLRP3 炎性小体驱动的 IL-1 β 释放导致了动脉粥样硬化进展的加速。



Representative results of MR. A showed that the traditional association between NLRP3 levels and the risk of CAD ($\beta_{XY}=0.03$); B showed that the association between NLRP3 levels and the risk of CAD using MR study design ($\beta_{XY}=0.19$).

图2 NLRP3水平与冠心病关联大小的孟德尔随机化研究设计

Fig. 2 MR study design of an association between NLRP3 levels and CAD

MR设计是使用遗传变异作为工具变量,来指代相应表型与疾病的关联,已被广泛应用于暴露标志物与疾病结局的因果推断中。如BMI与食管腺癌^[18]、子宫内膜癌^[19]、胰腺癌^[20]、卵巢癌^[21]、肺癌(鳞癌和小细胞癌)^[21]、胃癌^[22]和结直肠癌^[21]的多个MR关联研究中,均显示出BMI与肿瘤的发生风险之间存在正向关联。在暴露因素与心血管疾病关联的研究中,Emdin^[23]使用4个GWAS研究和UK Biobank的数据,选择腰臀比(WHR)相关的遗传变异作为工具变量,推断出腰围与糖尿病、冠心病存在因果关联。本研究中NLRP3基因定位于1q44,NLRP3基因多态性与多种炎症性疾病相关,如1型

糖尿病^[24]、原发性高血压^[25]、银屑病患者幼年特发性关节炎^[26]及克罗恩病^[27]等。rs10754558(C/G)位点位于NLRP3基因3'非编码区,该突变可能通过影响相应mRNA的稳定性,从而进一步参与IL-1 β 分泌以及炎症小体的表达^[28]。因此本研究使用该变异位点作为工具变量,用以指代NLRP3表型与冠心病之间的因果关联。

多个临床研究提示炎症小体NLRP3水平增加与冠心病风险有关。郑飞^[29]发现CAD患者主动脉壁组织中NLRP3表达量较对照组显著高表达。Sandanger等^[30]在急性心肌梗死患者心肌成纤维细胞中发现NLRP3高表达。武榕^[31]发现急性心肌梗

死组、不稳定型心绞痛组、稳定型心绞痛组的NLRP3水平均高于对照组,冠心病患者血浆NLRP3水平升高可能与冠脉斑块稳定性及冠脉病变严重程度密切相关。但上述观察性研究均不能排除多种混杂因素的影响而凸显表型与疾病结局的因果关联。本研究采用孟德尔随机化研究发现的关联系数($\beta_{xy}=\beta_{zx}/\beta_{zx}=0.45/2.34=0.19$)显著增加,进一步验证了炎症小体NLRP3水平增加与CAD的关联,同时因为使用遗传变异作为工具变量来指代NLRP3表型,较大程度地减少了混杂因素的干扰,并且暴露(NLRP3水平)不会反向影响人类的遗传信息,符合因果推断的正向关联。

3.3 研究意义及结论

本研究使用了MR法推断炎症小体NLRP3与冠心病风险之间的关联,较传统病例对照研究的结果关联强度要大。MR设计利用与待研究暴露因素具有强相关的遗传变异作为工具变量,基因与结局的关联不会受到出生后的环境、社会经济、行为习

惯等常见混杂因素的干扰,且符合因果时序,因此能够避免混杂因素和反向因果联系对关联效应的干扰。但本研究也存在以下局限性:①对照组人群可能是由于疑似冠心病或者其他血管的问题而选择就诊,这可能会低估了冠心病发病的危险因素;②在进行MR分析时,仅选择了NLRP3 rs10754558(C/G)这一位点变异作为工具变量,未来可参考大型GWAS研究结果筛选出多个工具变量或者遗传风险评估来进行MR分析。③工具变量的选择是MR推断的关键,需排除其与潜在混杂因素的关联,本研究基于文献排除了该位点变异与潜在混杂因素的关联,后续研究需进行统计学分析排除。

综上所述,本研究通过MR法推断了炎症小体NLRP3水平与冠心病风险之间的关联,与传统关联研究方向一致,但相比传统关联研究更接近真实因果关联。两者之间确切的风险关系仍需要进一步扩大临床样本验证。虽然本研究存在一些局限性,但仍然为相关研究提供了新的思路。

参考文献

- [1] Malakar AK, Choudhury D, Halder B, et al. A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 16812-16823.
- [2] Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-2019: update from the GBD 2019 study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 76(25): 2982-3021.
- [3] 《中国心血管健康与疾病报告2020》概述[J]. *中国心血管病研究*, 2021, 19(07): 582-590.
Key points of report on cardiovascular health and diseases in China 2020 [J]. *Chin J Cardiovasc Res*, 2021, 19(07): 582-590.
- [4] Liberale L, Montecucco F, Tardif JC, et al. Inflammageing: the role of inflammation in age-dependent cardiovascular disease [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(31): 2974-2982.
- [5] Silvis MJM, Demkes EJ, Fiolet ATL, et al. Immunomodulation of the NLRP3 inflammasome in atherosclerosis, coronary artery disease, and acute myocardial infarction [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2021, 14(1): 23-34.
- [6] Abbate A, Toldo S, Marchetti C, et al. Interleukin-1 and the inflammasome as therapeutic targets in cardiovascular disease [J]. *Circ Res*. 2020 Apr 24; 126(9): 1260-1280.
- [7] Zhou W, Chen C, Chen Z, et al. NLRP3: a novel mediator in cardiovascular disease [J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 5702103.
- [8] Toldo S, Abbate A. The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(4): 203-214.
- [9] Levine GN, Bates ER, Bittl JA, et al. 2016 ACC/AHA guideline focused update on duration of dual antiplatelet therapy in patients with coronary artery disease: a report of the american college of cardiology/american heart association task force on clinical practice guidelines: An update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI guideline for percutaneous coronary intervention, 2011 ACCF/AHA guideline for coronary artery bypass graft surgery, 2012 ACC/AHA/ACP/AATS/PCNA/SCAI/STS guideline for the diagnosis and management of patients with stable ischemic heart disease, 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction, 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes, and 2014 ACC/AHA guideline on perioperative cardiovascular evaluation and management of patients undergoing noncardiac surgery [J]. *Circulation*, 2016, 134(10): e123-155.
- [10] Nordestgaard BG. Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease: new insights from epidemiology, genetics, and biology [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 547-563.

- [11] Tokitsu T, Yamamoto E, Hirata Y, et al. Relationship between inter-arm blood pressure differences and future cardiovascular events in coronary artery disease [J]. *J Hypertens*, 2015, 33(9): 1780-1789; discussion 1790.
- [12] Shahim B, De Bacquer D, De Backer G, et al. The prognostic value of fasting plasma glucose, two-hour postload glucose, and HbA(1c) in patients with coronary artery disease: a report from EUROASPIRE IV: a survey from the European society of cardiology [J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(9): 1233-1240.
- [13] Samman Tahhan A, Sandesara P, Hayek SS, et al. High-sensitivity troponin I levels and coronary artery disease severity, progression, and long-term outcomes [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(5): e007914.
- [14] Pedicino D, Giglio AF, Ruggio A, et al. Inflammasome, T lymphocytes and innate-adaptive immunity crosstalk: role in cardiovascular disease and therapeutic perspectives [J]. *Thromb Haemost*, 2018, 118(8): 1352-1369.
- [15] Hoseini Z, Sepahvand F, Rashidi B, et al. NLRP3 inflammasome: Its regulation and involvement in atherosclerosis [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 2116-2132.
- [16] Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1357-1361.
- [17] Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(8): 812-820.
- [18] Thrift AP, Shaheen NJ, Gammon MD, et al. Obesity and risk of esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus: a mendelian randomization study [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(11): dju252.
- [19] Painter JN, O'Mara TA, Marquart L, et al. Genetic risk score mendelian randomization shows that obesity measured as body mass index, but not waist: hip ratio, is causal for endometrial cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2016, 25(11): 1503-1510.
- [20] Carreras-Torres R, Johansson M, Gaborieau V, et al. The role of obesity, type 2 diabetes, and metabolic factors in pancreatic cancer: a mendelian randomization study [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109(9): dx012.
- [21] Gao C, Patel CJ, Michailidou K, et al. Mendelian randomization study of adiposity-related traits and risk of breast, ovarian, prostate, lung and colorectal cancer [J]. *Int J Epidemiol*, 2016, 45(3): 896-908.
- [22] Mao Y, Yan C, Lu Q, et al. Genetically predicted high body mass index is associated with increased gastric cancer risk [J]. *Eur J Hum Genet*, 2017, 25(9): 1061-1066.
- [23] Emdin CA, Khera AV, Natarajan P, et al. Genetic association of waist-to-hip ratio with cardiometabolic traits, type 2 diabetes, and coronary heart disease [J]. *JAMA*, 2017, 317(6): 626-634.
- [24] Pontillo A, Brandao L, Guimaraes R, et al. Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil [J]. *Autoimmunity*, 2010, 43(8): 583-589.
- [25] Omi T, Kumada M, Kamesaki T, et al. An intronic variable number of tandem repeat polymorphisms of the cold-induced autoinflammatory syndrome 1 (CIAS1) gene modifies gene expression and is associated with essential hypertension [J]. *Eur J Hum Genet*, 2006, 14(12): 1295-1305.
- [26] Day TG, Ramanan AV, Hinks A, et al. Autoinflammatory genes and susceptibility to psoriatic juvenile idiopathic arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(7): 2142-2146.
- [27] Villani AC, Lemire M, Fortin G, et al. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(1): 71-76.
- [28] Xia M, Conley SM, Li G, et al. Inhibition of hyperhomocysteinemia-induced inflammasome activation and glomerular sclerosis by NLRP3 gene deletion [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(3): 829-841.
- [29] 郑飞. 动脉粥样硬化中NLRP3炎症体的组织学表达及基因干预研究 [D]. 山东大学, 2014, 25-26. Zheng F. Increased expression of NLRP3 inflammasomes in atherosclerosis and suppression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by gene silencing [D]. Shandong University, 2014, 25-26.
- [30] Sandanger Ø, Ranheim T, Vinge LE, et al. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99(1): 164-174.
- [31] 武榕. 冠心病患者血浆NLRP3及其下游因子IL-18水平与冠脉病变程度的相关性分析 [D]. 山西医科大学, 2018, 11. Wu R. Correlative analysis of plasma NLRP3 and its downstream factor IL-18 levels with coronary lesions in patients with coronary heart disease [D]. Shanxi Medical University, 2018, 11.

(编辑 祁方昉)