



Studio dei polimorfismi nel gene del recettore dell'apelina in pazienti con e senza ipertensione arteriosa

Rossana Totaro¹, Sara Bozzini², Rossana Falcone², Marialisa Bondesan¹,
Sandra Schirinzi¹, Margherita Calcagnino², Anna Colonna¹,
Benedetta Matrone¹, Colomba Falcone¹

¹*U.O. di Cardiologia, Ospedale Universitario Istituto di Cura Città di Pavia, e*

²*Centro Interdipartimentale di Medicina Molecolare (CIRMC), Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italia*

Studio dei polimorfismi nel gene del recettore dell'apelina in pazienti con e senza ipertensione arteriosa

Apelina è un peptide endogeno che aumenta l'inotropismo cardiaco attraverso l'interazione con il suo recettore APJ. Alcuni risultati indicano che il sistema apelinergico possa avere un ruolo fisiopatologico nell'ambito delle malattie cardiovascolari e ci sono prove che mostrano il ruolo del sistema apelinergico nella regolazione della pressione sanguigna in vitro e in modelli animali. Il ruolo di apelina-APJ nella fisiologia del sistema cardiovascolare e la sua interazione con altri processi neuroendocrini non è stato completamente chiarito. Tuttavia, gli studi riportati indicano che la trasmissione del segnale mediata da apelina possa essere coinvolta nella regolazione della pressione arteriosa, funzione contrattile cardiaca, bilancio idrico, l'angiogenesi e l'inibizione dell'apoptosi. Abbiamo valutato la possibile relazione tra i polimorfismi G212A e A445C di APJ e la presenza di malattia coronarica (CAD) in pazienti italiani e nei controlli sani mediante RFLP-PCR. Abbiamo analizzato le frequenze alleliche e genotipiche dei polimorfismi APJ in 664 pazienti (378 con ipertensione) e 143 controlli. Non c'erano differenze tra le frequenze alleliche e genotipiche nei pazienti rispetto ai controlli per entrambi i polimorfismi analizzati. Nella popolazione CAD abbiamo osservato un aumento della frequenza dell'allele G212 nei pazienti con ipertensione rispetto ai pazienti senza ipertensione. Nessuna differenza è stata invece evidenziata nei due sottogruppi per il polimorfismo A445C. Anche se il ruolo funzionale del polimorfismo G212A non è stato ancora identificato, è possibile ipotizzare che la presenza dell'allele A sia in grado di causare un aumento nella funzione del sistema apelina/APJ associato ad un minor rischio di ipertensione arteriosa (IA).

APJ polymorphisms in coronary artery disease patients with and without hypertension

Apelin is an endogenous peptide that increases cardiac inotropism through its APJ receptor. Certain findings indicate that the apelinergic system may have a pathophysiological role in cardiovascular disease and there is evidence showing the role of the apelinergic system in blood pressure regulation in vitro and in animal models. The role of the apelin-APJ system in cardiovascular physiology and its interaction with other neuroendocrine pathways has not been fully elucidated. However, the small number of reported studies indicates that apelin signaling may be involved in the regulation of blood pressure, cardiac contractile function, fluid balance, angiogenesis and inhibition of apoptosis. We evaluated the possible relationship between the G212A and A445C APJ polymorphisms and coronary artery disease (CAD) in Italian patients and in healthy controls by RFLP-PCR. We

analyzed the allelic and genotypic frequencies of APJ polymorphisms in 664 patients (378 with hypertension) and 143 controls. There were no differences between allelic and genotypic frequencies in patients in respect to the controls for both polymorphisms analyzed. In the CAD population, there was an increased frequency of the G212 allele in patients with hypertension in respect to patients without hypertension. No differences were present in the two subgroups for the A445C polymorphism. Although the functional role of the G212A polymorphism has not yet been identified, it is possible to hypothesize that the presence of the A allele may cause a gain in function of the apelin/APJ system associated with a lower risk of hypertension.

Introduzione

L'ipertensione arteriosa essenziale (IA) è una malattia complessa poiché deriva dall'interazione tra fattori genetici e ambientali. Studi di associazione sul genoma hanno identificato geni che determinano la suscettibilità all'IA, mentre il contributo dato dalla predisposizione genetica non è stato completamente chiarito. I geni più studiati sono implicati nelle tappe relative al sistema renina-angiotensina, come la sua attivazione e la produzione di angiotensina II che svolgono un ruolo importante nella progressione della malattia cardiaca e renale [1-2]. L'apelina è un peptide di recente identificazione che agisce attraverso il recettore di membrana accoppiato a proteina G chiamato APJ. Apelina e APJ sono entrambi espressi ampiamente nei tessuti corporei [3-10]. In particolare, elevate concentrazioni di APJ sono presenti nel sistema cardiovascolare in cui questo recettore è espresso su un elevato numero di tipi cellulari, tra cui l'endotelio, il muscolo liscio e i miociti [11]. Il ruolo del sistema apelina-APJ nella fisiologia cardiovascolare e la sua interazione con altri sistemi neuroendocrini non è stato completamente chiarito. Tuttavia, studi recenti indicano che i segnali mediati dall'apelina possono essere coinvolti nella regolazione della pressione arteriosa [12-14], della funzione contrattile cardiaca [15], del bilancio idrico [16], dell'angiogenesi [17] e dell'inibizione dell'apoptosi [18]. Tatemoto et al [12] hanno suggerito che apelina potrebbe essere un nuovo membro della famiglia di sostanze vasoattive che includono la bradichinina, l'acetilcolina e la serotonina, un gruppo di agenti che stimolano la produzione di NO mediante l'attivazione di eNOS nelle cellule endoteliali. Inoltre, Ishida et al [13] hanno dimostrato che APJ ha un effetto ipotensivo in vivo e svolge un ruolo di regolamentazione contro l'azione vasocostrittrice dell'angiotensina II. Recentemente, Li et al [14] hanno identificato apelina e APJ come elementi di un sistema nuovo con un ruolo nella regolazione del sistema renina-angiotensina che è implicato nella regolazione della pressione sanguigna.

Scopo del lavoro

Il nostro studio mira a identificare i polimorfismi G212A (rs11544374) e A445C (rs948847) del gene del recettore APJ come fattori predisponenti in una popolazione con malattia coronarica (CAD) con e senza IA.

Materiali e metodi

Popolazione dello studio

Un totale di 664 pazienti italiani (530 maschi, 134 femmine, età media 63.2±8 anni) sono stati conse-

cutivamente reclutati tra i soggetti stabili che presentavano un evento precedente di CAD afferiti presso la Clinica Cardiologica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. La presenza di precedente CAD era stata definita come l'evidenza all'angiografia coronarica di una stenosi del lume >75% in almeno un vaso coronarico maggiore. Gli individui con malattie valvolari, cardiomiopatia, malattia renale cronica e malattie infiammatorie sono stati esclusi. All'inizio dello studio, tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un esame clinico completo e valutazione biochimica. I dati clinici includevano età, sesso, BMI, ipertensione arteriosa, iperlipidemia, diabete mellito, abitudine al fumo e storia familiare di CAD. I soggetti di controllo sono giunti presso i nostri ospedali o cliniche affiliate per un check-up fisico. I controlli erano soggetti senza alcuna storia di angina e altre malattie cardiache, con un normale ECG a riposo e normale ECG da sforzo. Essi sono stati abbinati con i pazienti CAD per età, sesso ed etnia. Il protocollo dello studio è stato approvato dal comitato etico universitario e il consenso informato scritto a partecipare è stato ottenuto da tutti i partecipanti.

Definizione dei fattori di rischio cardiovascolare

La pressione sanguigna è stata misurata per tre volte dopo 10 minuti di riposo, in posizione seduta e con uno sfigmomanometro a mercurio. L'IA è stata diagnosticata quando la media di tre letture della pressione sanguigna sistolica era di almeno 140 mmHg o quella diastolica di 90 mmHg, o nel caso in cui gli individui stavano assumendo farmaci antipertensivi. Il diabete mellito è stato definito come una precedente diagnosi di malattia, un'anamnesi positiva per farmaci antidiabetici o livelli di glucosio plasmatico a digiuno ≥ 126 mg/dl in due o più occasioni. In questo studio, tutti i pazienti diabetici erano affetti da diabete di tipo 2. I fumatori di tabacco sono stati classificati come mai stati fumatori (tra cui i fumatori correnti ed ex fumatori che smettono di fumare per almeno 6 mesi prima dell'entrata studio) e non fumatori. Una storia familiare positiva di malattia coronarica è stata definita come CAD documentata nei genitori o fratelli prima dell'età di 60 anni negli uomini e 70 anni nelle donne. Ognuno di questi fattori di rischio è stato codificato come variabile categorica presente o assente.

Polimorfismi APJ

Il DNA genomico è stato estratto da sangue trattato con EDTA usando il DNA del sangue QIAamp Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania). Entrambi i polimorfismi del gene APJ sono stati analizzati mediante RFLP-PCR. In breve, una sezione del gene APJ che contiene il polimorfismo G212A e A445C è stato amplificato mediante PCR utilizzando i primer 5'-GGAGGTGGGAGGAGGAG-3' e 5'-CCGTTGCCCGTGGTGGCC-3' e 5'-CAGCATGGA GGAAGGTGG-3' e 5'-GACCCGCAGCCTCAGCCG-3', rispettivamente. Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti: 94 °C per 2 minuti, 30 cicli a 94 °C per 30 sec, 58 °C per 30 sec, 72 °C per 1 minuto e, infine, a 10 min a 72 °C. I prodotti della PCR sono stati poi sottoposti a digestione DdeI e MwoI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) per 16 ore a 37 °C ed analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3%. Un secondo studio randomizzato genotipizzazione è stata effettuata per garantire la qualità e 100 (15%) pazienti sono stati inclusi.

L'analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state condotte con l'utilizzo del pacchetto statistico SPSS, versione 11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Il test di normalità di Kolmogorov-Smirnov è stato eseguito per verificare la distribuzione delle variabili continue. Dati normalmente distribuiti nei gruppi sono stati espressi come valori medi \pm DS. Per variabili continue, le differenze tra i gruppi sono state valutate con un t-test. Un test χ^2 è stato utilizzato per verificare se le frequenze alleliche osservate fossero in accordo con quelle previste dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. Distribuzioni alleliche e genotipiche sono state stimate dal conteggio allelico e dal confronto tra gruppo CAD e gruppo di controllo con il test χ^2 .

Le odds ratio (OR) sono riportate con i loro intervalli di confidenza al 95% (IC). Il potere studio è stato calcolato utilizzando il software StatMate, versione 2.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Due code valori di $p < 0.05$ sono stati considerati significativi.

Risultati

Le caratteristiche generali dei partecipanti allo studio sono illustrate nella tabella 1. La prevalenza dei comuni fattori di rischio cardiaco era significativamente maggiore nei pazienti con CAD rispetto ai controlli. La distribuzione dei polimorfismi A445C e G212A è mostrato nella Tabella 2. I genotipi erano in equilibrio secondo la legge di Hardy-Weinberg sia nei pazienti sia nei controlli. Non ci sono state differenze significative nelle frequenze alleliche e genotipiche dei due polimorfismi valutati tra i pazienti ed i controlli. Considerando l'interazione del sistema apelina con il sistema renina-angiotensina, che è implicato nella regolazione della pressione sanguigna, i nostri pazienti CAD sono stati analizzati anche sulla base della presenza di IA, come riportato nella tabella 3. Dividendo i pazienti CAD in due sottogruppi sulla base della presenza di alta pressione sanguigna, sono state riscontrate differenze statisticamente significative nella distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo G212A del recettore APJ. È stata riscontrata una maggiore frequenza del genotipo omozigote GG nei pazienti con IA ($p=0.0005$), mentre nei pazienti normotesi è emerso un aumento significativo nella frequenza del genotipo omozigote AA ($p=0.0121$). Inoltre, la distribuzione degli alleli è risultata significativamente diversa nei due sottogruppi: nei pazienti con IA è stata riscontrata una più alta frequenza allelica G e una frequenza più bassa dell'allele A ($p=0.0001$). L'odds ratio per la presenza di ipertensione nei soggetti portatori del genotipo omozigote GG era 2.00 (IC 95% 1.45-2.76). Nel gruppo di controllo, il polimorfismo G212A non era associato con la presenza/assenza di ipertensione. Nessuna differenza è stata riscontrata per il polimorfismo A445C in pazienti con e senza IA.

Discussione

Il presente studio ha esaminato per la prima volta, in un'ampia popolazione, il ruolo del gene del recettore APJ nella predisposizione alla CAD valutando anche le frequenze alleliche e genotipiche dei polimorfismi G212A e A445C in pazienti CAD con e senza IA. Il gene umano APJ è situato sul braccio lungo del cromosoma 11 e codifica per un recettore di 377 aminoacidi accoppiato a proteina G con sette domini transmembrana [19] per i quali apelina è il solo ligando conosciuto. Il recettore dell'apelina condivide alcune proprietà strutturali con i recettori delle chemochine e quindi può essere preferenzialmente accoppiato alla proteina G e di conseguenza inibire la ciclasi extracellulare e attivare processi regolatori chinasi mediati. D'altra parte, la sua omologia con i sottotipi del recettore dell'angiotensina suggerisce che potrebbe trasdurre i suoi effetti attraverso una proteina Gq [20]. Nella nostra popolazione CAD, le frequenze alleliche e genotipiche erano simili al gruppo di controllo per entrambi i polimorfismi analizzati. La trasmissione del segnale che coinvolge il recettore dell'apelina APJ sembra essere un mediatore importante nel controllo della omeostasi cardiovascolare e della pressione arteriosa [13, 21]. Il sistema cardiovascolare è riccamente dotato di recettori accoppiati a proteine G (GPCR), che rappresentano il più grande gruppo di proteine transmembrana responsabile della trasduzione di una gamma diversificata di segnali extracellulari [15, 22]. Una trasduzione del segnale GPCR disfunzionale a livello del sistema cardiovascolare potrebbe rappresentare un importante contributo all'inizio, e/o al mantenimento dell'ipertensione [22-24]. Variazioni genetiche nell'apelina e

nel suo recettore contribuiscono probabilmente alla genesi dell'ipertensione essenziale e a determinare il BMI e l'età insorgenza dell'ipertensione [14]. APJ e il recettore dell'angiotensina 1 nonché apelina e angiotensinogeno mostrano significative similarità nella distribuzione tissutale, suggerendo che apelina e angiotensina II possano essere coinvolti nello stesso processo biologico. È noto che l'angiotensina sia un importante agente vasocostrittore, mentre apelina riduce la pressione sanguigna. Inoltre, è dimostrato che l'apelina non agisca solamente sulla pressione arteriosa, ma presenti anche proprietà vasodilatatrici endotelio-dipendenti e un'azione inotropica positiva in vivo nel cuore isolato [25]. Sulla base di queste considerazioni, il nostro studio presenta dati significativi con potenziali implicazioni cliniche. Abbiamo dimostrato un aumento significativo nella frequenza dell'allele G in una sottopopolazione di pazienti con IA rispetto ai pazienti normotesi. Inoltre, un aumento significativo della frequenza del genotipo omozigote AA è stata osservata in pazienti con CAD senza ipertensione, rispetto ai pazienti con ipertensione. Il gene del recettore APJ è stato recentemente scoperto e la caratterizzazione funzionale del sistema apelinergico è iniziata appena dopo l'identificazione dei suoi ligandi endogeni. Inoltre, la regolazione trascrizionale del gene APJ sembra essere complessa ed è attualmente poco conosciuta [26-27]. Tuttavia, sebbene il suo ruolo funzionale dell'allele A non sia stato ancora identificato, esso potrebbe rappresentare un allele funzionale recessivo. Questo polimorfismo pertanto pur non marker di CAD potrebbe causare un aumento di funzione del sistema apelina/ PJ ed essere un fattore genetico predisponente per l'insorgenza di IA. Parrebbe poco probabile tuttavia che il gene del recettore APJ sia un gene che causa l'ipertensione, ma potrebbe essere un gene modificatore coinvolto nella valutazione del rischio di ipertensione. Un recente studio ha anche mostrato che i pazienti portatori di almeno una copia di 212A avevano un rischio significativamente minore di eventi correlati allo scompenso cardiaco (HF) rispetto a quelli che erano omozigoti per la variante G212 [28]. I nostri dati confermano questi risultati, infatti il rischio relativo di insufficienza cardiaca tra i pazienti con ipertensione, rispetto a quella della popolazione generale, è stato stimato a 1,4 in un'analisi del Ministero della Sanità e della First National Nutrition Examination Survey [29].

In conclusione, i nostri risultati rivelano una innovativa linea di ricerca sul sistema apelina/APJ e sul suo ruolo nello sviluppo dell'IA in paziente con e senza CAD documentata. È indispensabile tuttavia una maggiore comprensione circa i meccanismi molecolari che regolano l'espressione genica di apelina e APJ, così come i processi coinvolti nell'elaborazione post-traslazionale e nel metabolismo del peptide apelina. Ulteriori indagini in merito a questa via di trasmissione del segnale potrebbero migliorare ulteriormente la comprensione della fisiopatologia dell'IA anche in funzione di nuovi approcci terapeutici mirati ad una patologia in aumento anche per l'invecchiamento della popolazione.

Tabelle e figure

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei 664 pazienti CAD e dei 143 controlli sani.

	Pazienti CAD (n=664)	Controlli (n=143)	P
Età	63.2±8.0	63.8±11.6	0.52
Maschi	530 (80%)	121 (85%)	0.20
Diabete Mellito	175 (26%)	13 (9%)	<0.01
Ipertensione arteriosa	378 (57%)	27 (19%)	<0.01
Tabagismo	252 (38%)	22 (15%)	<0.001
Dislipidemia	251 (39%)	18 (13%)	<0.001
Familiarità	143 (21%)	15 (10%)	<0.001

Tabella 2. Frequenze alleliche e genotipiche dei polimorfismi analizzati nell'intera popolazione.

	Pazienti CAD (n=664)	Controlli (n=143)	p
G212A genotipo, n (%)			
GG	291 (44%)	76 (53%)	0.053
GA	306 (46%)	56 (39%)	0.156
AA	67 (10%)	11 (8%)	0.469
G212A allele, n (%)			
G	888 (67%)	208 (73%)	0.063
A	440 (33%)	78 (28%)	
A445C genotipo, n (%)			
AA	232 (35%)	51 (36%)	0.065
AC	319 (48%)	70 (49%)	0.807
CC	113 (17%)	22 (15%)	0.803
A445C allele, n (%)			
A	783 (59%)	172 (60%)	0.663
C	545 (41%)	114 (40%)	

Tabella 3. Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo G212A nei pazienti CAD con e senza IA.

	Pazienti CAD con IA (n=378)	Pazienti CAD senza IA (n=286)	p
G212A genotipo, n (%)			
GG	188 (50%)	103 (36%)	0.0005
GA	162 (43%)	144 (50%)	0.066
AA	28 (7%)	39 (14%)	0.0121
G212A allele, n (%)			
G	538 (71%)	350 (61%)	0.0001
A	218 (29%)	222 (39%)	

Bibliografia

1. Hiura Y, Tabara Y, Kokubo Y et al. A genome-wide association study of hypertension-related phenotypes in a Japanese population. *Circ J* 2010;74:2353-2359.
2. Ehret GB. Genome-wide association studies. contribution of genomics to understanding blood pressure and essential hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2010;12:17-25.
3. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:471-476.
4. Lee DK, Cheng R, Nguyen T et al. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* 2000;74: 34-41.
5. Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S et al. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem* 2000;275:21061-21067.
6. Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S et al. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta* 2000;1538:162-171.
7. De Falco M, de Luca L, Onori N et al. Apelin expression in normal human tissues. *In Vivo* 2002;16:333-336.
8. Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ et al. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem* 2003;84:1162-1172.
9. O'Carroll AM, Selby TL, Palkovits M et al. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta* 2000;1492:72-80.
10. Reaux-Le Goazigo A, Alvear-Perez R, Zizzari P et al. Cellular localization of apelin and its receptor in the anterior pituitary: evidence for a direct stimulatory action of apelin on ACTH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E7-E15.

11. Kleinz MJ, Skepper JN, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul Pept* 2005;126:233-240.
12. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 2001;99:87-92.
13. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y et al. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem* 2004;279:26274-26279.
14. Li WW, Niu WQ, Zhang Y et al. Family-based analysis of apelin and AGTRL1 gene polymorphisms with hypertension in Han Chinese. *J Hypertens* 2009;27:1194-1201.
15. Szokodi I, Tavi P, Földes G et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002;91:434-440.
16. Taheri S, Murphy K, Cohen M et al. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:1208-1212.
17. Kasai A, Shintani N, Oda M et al. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:395-400.
18. Xie H, Yuan LQ, Luo XH et al. Apelin suppresses apoptosis of human osteoblasts. *Apoptosis* 2007;12:247-254.
19. O'Dowd BF, Heiber M, Chan A et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993;36:355-360.
20. Masri B, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cell Signal* 2005;17:415-426.
21. Chen MM, Ashley EA, Deng DX et al. Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation* 2003;108:1432-1439.
22. Heximer SP, Knutsen RH, Sun X et al. Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice. *J Clin Invest* 2003;111:445-452.
23. Hao L, Du M, Lopez-Campistrous A. Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway. *Circ Res* 2004;94:68-76.
24. Katugampola SD, Kuc RE, Maguire JJ et al. G-protein-coupled receptors in human atherosclerosis: comparison of vasoconstrictors (endothelin and thromboxane) with recently de-orphanized (urotensin-II, apelin and ghrelin) receptors. *Clin Sci* 2002;48:S171-S175.
25. Charles CJ. Putative role for apelin in pressure/volume homeostasis and cardiovascular disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2007;5:1-10.
26. Lee DK, George SR, O'Dowd B. Unravelling the roles of the apelin system: prospective therapeutic applications in heart failure and obesity. *Trends Pharmacol Sci* 2006;4:190-194.
27. O'Carroll AM, Lolait SJ, Howell GM. Transcriptional regulation of the rat apelin receptor gene: promoter cloning and identification of an Sp1 site necessary for promoter activity. *J Mol Endocrinol* 2006;36:221-235.
28. Sarzani R, Forleo C, Pietrucci F et al. The 212A variant of the APJ receptor gene for the endogenous inotrope apelin is associated with slower heart failure progression in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 2007;13:521-529.
29. He J, Ogden LG, Bazzano LA et al. Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch Intern Med* 2001;161:996.