



Polimorfismo -374T/A nel promotore del gene RAGE e longevità: confronto tra popolazioni con differente età

Rossana Totaro¹, Sara Bozzini², Marialisa Bondesan¹, Chiara Boiocchi²,
Rossana Falcone², Margherita Calcagnino², Sandra Schirinzi¹, Colomba Falcone¹

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

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

Polimorfismo -374 T/A nel promotore del gene RAGE e longevità: confronto tra popolazioni con differente età

Il recettore per prodotti finali della glicazione avanzata (RAGE) è una molecola di superficie cellulare, membro della superfamiglia delle immunoglobuline, che interagisce con differenti ligandi. Un crescente numero di evidenze suggerisce che RAGE possa promuovere l'infiammazione vascolare attraverso meccanismi diversi. L'obiettivo di questo studio è identificare la possibile relazione tra il polimorfismo -374 T/A del gene RAGE, l'infarto miocardico (IM) e la sua età di insorgenza. Sono stati reclutati un totale di 691 pazienti con infarto miocardico e 234 controlli sani. In questo studio, la frequenza dell'allele A e del genotipo AA del polimorfismo -374 T/A del promotore è significativamente più bassa nei pazienti con infarto miocardico rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.01$). I nostri risultati hanno mostrato un ruolo significativo del genotipo AA nel determinare l'età di insorgenza di infarto miocardico. In particolare, l'età media del primo infarto miocardico era più alta nei pazienti con genotipo AA rispetto a quelli portatori del genotipo AT o TT ($p = 0.002$). Il rapporto tra il polimorfismo -374 T/A del promotore del gene RAGE e l'età della comparsa di infarto miocardico è risultato indipendentemente correlato ai comuni fattori di rischio di malattia ($p < 0.01$). Le curve di Kaplan-Meier hanno confermato che i soggetti con genotipo AA sviluppano infarto miocardico più tardivamente ($p = 0.0022$). Questo studio è il primo a valutare il ruolo dei polimorfismi di RAGE sulla suscettibilità a sviluppare gli eventi coronarici acuti nella popolazione italiana e ad identificare questo polimorfismo come un fattore legato all'età dello sviluppo di infarto miocardico. Il genotipo omozigote AA potrebbe dunque esercitare un ruolo protettivo nello sviluppo precoce di infarto miocardico.

Age of Onset of Myocardial Infarction: Is Promoter Polymorphism of the RAGE Gene Implicated?

Receptor for advanced Glycation end products (RAGE) is a cell-surface molecule member of the immunoglobulin superfamily and engages differing ligands relevant to distinct processes. A growing body of evidence has suggested that RAGE may promote vascular inflammation through several mechanisms. The objective of this study was to identify the possible relationship between the 374 T/A polymorphism of the RAGE gene, myocardial infarction (MI), and its age of onset. A total of 691 MI patients and 234 matched controls were. In this study, the frequency of the A allele and AA genotype of the 374 T/A promoter polymorphism is significantly lower in patients with MI respect to the control group ($p < 0.01$). Our results showed a significant role of the AA genotype on age of onset of MI. In particular, the mean age of the first MI was higher in patients with the AA genotype as compared to those that were AT or TT genotype carriers ($p = 0.002$). The relationship between 374 T/A RAGE polymorphism and age

for the appearance of MI was independently related to common risk factors of disease ($p < 0.01$). Kaplan-Meier curves confirmed that subjects with the AA genotype have a later development of MI ($p = 0.0022$). This study is the first to investigate the role of RAGE polymorphisms on the susceptibility to develop the acute coronary events in the Italian population and identified this polymorphism as an age-related factor for MI development. The homozygous AA genotype may exert a protective role against the early development of MI.

Introduzione

L'aterosclerosi svolge un ruolo chiave nella patogenesi di malattia coronarica e dell'ictus, che rappresentano la principale causa di morte e di invalidità nei paesi sviluppati. Tra le manifestazioni cliniche della malattia coronarica riconosciamo condizioni croniche come l'angina stabile, e le sindromi coronariche acute (angina instabile e infarto del miocardio IM), derivanti dalle interazioni tra genetica e fattori ambientali [1]. Prove da studi clinici, epidemiologici e sperimentali suggeriscono che i fattori genetici contribuiscono in modo significativo allo sviluppo di IM [2-4]. In particolare, le varianti genetiche che sono in grado di modificare la coagulazione e la fibrinolisi, l'attività delle piastrine, la funzione vascolare, il metabolismo lipidico e l'infiammazione sono operative attraverso l'intera vita di un individuo, e quindi possono essere indipendentemente associati ad una più precoce età di insorgenza della malattia [5]. Abbiamo focalizzato la nostra attenzione su polimorfismi del gene del recettore per i prodotti finali di glicazione avanzata (RAGE) recettore di superficie appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline e in grado di interagire con ligandi diversi, coinvolti in numerose patologie [6-8]. Tra i ligandi di RAGE riconosciamo i prodotti finali della glicazione (AGE), la cui presenza in elevate concentrazioni è stata dimostrata in condizioni come il diabete e in siti tissutali di stress ossidativo [9]. Un crescente numero di evidenze suggerisce che RAGE possa promuovere o accelerare l'infiammazione vascolare attraverso diversi distinti meccanismi [10-12]. In primo luogo, l'attivazione cellulare dipendente dall'interazione RAGE-ligando ha dimostrato di promuovere e migliorare la risposta infiammatoria dei leucociti attraverso stimolazione della loro migrazione e proliferazione [13]. Inoltre, l'interazione ligando-RAGE porta all'attivazione del fattore nucleare NF κ B e di conseguenza una maggiore espressione di citochine, chemochine, e molecole di adesione con l'induzione di stress ossidativo che può contribuire in modo significativo all'insorgenza e progressione dell'aterosclerosi [14-17].

Il gene che codifica per il recettore RAGE è localizzato sul cromosoma 6p21.3 nel locus HLA (Human Leukocyte Antigen), all'interno di tale gene sono stati identificati diversi polimorfismi [18-20], la maggior parte dei quali sono situati in regioni regolatorie e non codificanti. In particolare, due polimorfismi funzionali (-374 T/A, -429 T/C) nella regione promotore del gene RAGE sembrano esercitare effetti significativi sull'attività trascrizionale [20-21]. È stato suggerito che l'omozigosi per l'allele minore A possa rappresentare un marcatore genetico di protezione nei confronti dell'aterosclerosi nei pazienti con diabete mellito di tipo 1 e di tipo 2 [22-23]. Inoltre, studi condotti in soggetti non diabetici hanno recentemente dimostrato che il genotipo omozigote AA è collegato a una riduzione del grado di aterosclerosi coronarica, un miglioramento della sopravvivenza nei pazienti con malattia coronarica e un minor tasso di restenosi in quelli sottoposti a rivascularizzazione miocardica percutanea [24, 26].

Scopo del lavoro

Lo scopo dello studio è stato quello di identificare una possibile relazione tra il polimorfismo -374 T/A del gene RAGE e l'infarto miocardico e la sua età di insorgenza in una coorte consecutiva di pazienti caucasici.

Metodi

Sono stati reclutati un totale di 691 pazienti caucasici italiani con pregresso infarto miocardico (575 maschi, 116 femmine, età media 59 ± 10 anni). La diagnosi di infarto miocardico è stata confermata secondo i criteri della Società Europea di Cardiologia. Tali criteri comprendono un aumento e una diminuzione secondo un'andatura tipica della creatin-chinasi MB (CK MB) con almeno uno dei seguenti criteri: sintomi di ischemia, lo sviluppo di onde Q patologiche sull'elettrocardiogramma (ECG) ed ECG indicativo di ischemia (sopraslivellamento del tratto ST o depressione) [27]. Il gruppo di controllo includeva 234 pazienti (174 maschi e 60 femmine, età media di 62 ± 13 anni), selezionati per età e sesso, senza storia di angina pectoris o infarto miocardico. Questo studio è stato approvato dal nostro Comitato Etico ed i pazienti hanno firmato un consenso informato. Dati sui fattori di rischio sono stati ottenuti da ciascun paziente, inclusi età, sesso, indice di massa corporea (BMI), ipertensione, ipercolesterolemia, diabete mellito, abitudine al fumo e storia familiare di malattia coronarica.

Determinazione del polimorfismo -374T/A nel gene RAGE

Il DNA genomico è stato estratto da sangue intero utilizzando il kit di purificazione GFXdi Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). Il polimorfismo del promotore di RAGE è stato analizzato mediante PCR- RFLP. Il frammento di interesse è stato amplificato utilizzando i primers 5'-CCTGGGTTTAGTTGAGATTTTTT-3' e 5'-GAAGGCACTTCCTCGGGTTCT-3' e con le seguenti condizioni di amplificazione: 94 °C per 2 min, 30 cicli a 94 °C per 30 sec, 58 °C per 30 sec, 72 °C per 1 min e infine 10 min a 72 °C. Il prodotto di PCR (671 bp) è stato poi sottoposto a digestione enzimatica con l'enzima di restrizione Tsp509 I (New England Biolabs, Beverly, MA) per 16 ore a 65 °C, e i risultati della digestione sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3%. Genotipi sono stati valutati secondo i modelli di bande di DNA. In presenza dell'allele T si ottengono cinque frammenti di 284 bp, 217 bp, 110 bp, 44 bp e 16 bp. Nel caso l'allele A, la digestione ha portato in quattro frammenti di 327 bp, 284 bp, 44 bp e 16 bp.

Analisi dei dati

Per ogni polimorfismo preso in esame è stata verificata la presenza di equilibrio di Hardy-Weinberg tramite il test χ^2 per i marker biallelici. Il test Kolmogorov-Smirnov di normalità è stato eseguito per verificare la distribuzione delle variabili continue. Le frequenze genotipiche ed alleliche, dei pazienti e dei controlli sani, sono confrontate con il test χ^2 e con la distribuzione di χ^2 , con adeguati gradi di libertà; le differenze si considerano statisticamente significative quando il valore di $p < 0.05$. Il valore di Odds Ratio (OR) indica il fattore di rischio di sviluppare la patologia; quando il valore OR è < 1 esiste un basso rischio di sviluppare la malattia. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata eseguita per confrontare l'età di insorgenza dell'infarto del miocardio ed i genotipi del gene RAGE. È stata inoltre condotta un'analisi di covarianza (ANCOVA) in modo da aggiustare l'analisi sulla base dei principali fattori confondenti età, sesso, BMI, ipertensione, ipercolesterolemia, diabete mellito, fumo, e familiarità. Curve di Kaplan-Meier sono state utilizzate per comparare l'età all'esordio della malattia dei pazienti con IM rispetto al genotipo

RAGE (Prisma GraphPad 4.0, GraphPad Inc., San Diego, CA). Il linkage disequilibrium è stato calcolato utilizzando il software JLIN 1.6.0 (www.genepi.org.au/jlin/). La potenza di studio è stata calcolata utilizzando il software StatMate, versione 2.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Risultati

Le caratteristiche cliniche dei pazienti con precedente IM e del gruppo di controllo sono riportati nella tabella 1. Ci sono state differenze significative nella frequenza di diabete, ipercolesterolemia ($p<0.01$), storia familiare di coronaropatia ($p<0.01$), e fumo di sigaretta ($p<0.01$) tra il gruppo con IM e il gruppo di controllo. I livelli di colesterolo totale e dei trigliceridi erano significativamente più alti e le HDL-C erano significativamente più basse nel gruppo IM rispetto al gruppo di controllo ($p<0.01$). Le distribuzioni alleliche e genotipiche del polimorfismo -374 T/A sono riportate in Tabella 2. Le distribuzioni delle frequenze di ciascun genotipo di entrambi i polimorfismi sono in accordo con quelle previste dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. Nel nostro studio, la frequenza del genotipo AA del polimorfismo -374 T/A è risultato significativamente più basso nei pazienti con infarto miocardico rispetto al gruppo di controllo (13% vs 21%, $p=0.0031$). Una differenza significativa tra i due gruppi è stata osservata anche in merito alla frequenza dell'allele A del polimorfismo -374 T/A (37% nel gruppo di IM contro il 44% nel gruppo di controllo, $p=0.00113$). Dopo la correzione per altri fattori di rischio, il genotipo AA del polimorfismo -374 T/A è rimasto significativamente correlato con infarto miocardico ($p<0.01$). Per analizzare ogni possibile influenza del polimorfismo -374 T/A nell'età di insorgenza dell'infarto miocardico, sono stati effettuate le analisi ANOVA, t-test, e Kaplan-Meier. In particolare, l'età media del primo infarto miocardico era più alta nei pazienti con genotipo AA rispetto a quelli con genotipo TT e AT (63 ± 13 anni vs 58 ± 11 anni, rispettivamente, $p=0.002$) (Figura 1). Per valutare l'influenza indipendente del genotipo AA sulla insorgenza di infarto miocardico, è stata eseguita un'analisi ANCOVA in cui il genotipo del gene RAGE è stato inserito come un fattore ed età, sesso, BMI, ipertensione, ipercolesterolemia, diabete mellito, abitudine al fumo, e una storia familiare di malattia coronarica malattie delle arterie come covarianti. I nostri risultati mostrano che il rapporto tra il polimorfismo -374 T/A del gene RAGE e l'età della comparsa di infarto miocardico era indipendentemente legato ai fattori di rischio comuni di malattia ($p<0.01$). Le curve di Kaplan-Meier (Figura 2) hanno confermato che soggetti con genotipo AA sviluppano più tardivamente IM rispetto a quelli con genotipo AT o TT con una differenza statisticamente significativa ($p=0.0022$). Infine abbiamo preso in considerazione la potenziale influenza di diversi fenotipi TT+AT e AA del polimorfismo -374 T/A di RAGE nell'età di insorgenza IM. Non abbiamo trovato differenze statisticamente significative nell'età di insorgenza della malattia, infatti, per quanto riguarda il fenotipo -374 T/A e abbiamo osservato che non vi erano differenze tra le frequenze del fenotipo TT+AT e AA ed età di insorgenza dell'infarto miocardico ($p=0.16$) (Figura 3).

Discussione

Il presente studio rappresenta un'indagine caso-controllo che esamina le associazioni possibili tra un polimorfismo della regione del promotore del gene RAGE e il rischio di infarto miocardico. Per quanto noto, questo studio è il primo a indagare il ruolo del polimorfismo 374 T/A del gene RAGE sulla suscettibilità allo sviluppo degli eventi coronarici acuti nella popolazione italiana. Abbiamo trovato un'associazione tra il genotipo AA e un allele del polimorfismo 374 T/A con un diminuito rischio di in-

farto miocardico, e, in una popolazione di grandi dimensioni con precedente IM, la presenza del genotipo AA correlata con una più tardiva età di insorgenza di questa condizione. I nostri risultati hanno mostrato un ruolo significativo del genotipo AA sull'età di insorgenza dell'infarto miocardico nella nostra popolazione. Infatti la prevalenza del genotipo AA è stata del 13% nei pazienti con precedente infarto miocardico. Questa scoperta può essere considerata in linea con i nostri precedenti risultati che indicano un ruolo protettivo del genotipo omozigote AA nello sviluppo di lesioni aterosclerotiche avanzate. In precedenza, abbiamo infatti riportato che il genotipo AA è indipendentemente associato ad una minore gravità della malattia coronarica in soggetti diabetici [24]. Anche in uno studio finlandese su 996 pazienti con diabete mellito di tipo 1, Petterson-Fernholm et al. [22] hanno riscontrato che le malattie cardiovascolari, coronaropatie ed infarto miocardico acuto, così come le malattie vascolari periferiche, erano meno comuni nel sottogruppo di pazienti con genotipo AA rispetto a quelli con genotipo TT e TA del polimorfismo -374 T/A. Allo stesso modo Zee et al. [21] hanno dimostrato che specifiche varianti del gene RAGE sono associate con un rischio ridotto di infarto miocardico e di ictus ischemico in una popolazione di soggetti di sesso maschile prevalentemente di razza bianca all'interno del Physicians Health Study. Al contrario, Poon et al. [28] nel loro studio affermano che entrambe le varianti del polimorfismo -374 T/A non sono associate ad eventi cardiovascolari. Recentemente, Peng et al. [29] hanno dimostrato che i polimorfismi del promotore non sono associati con malattia coronarica angiograficamente documentata nei soggetti cinesi con diabete mellito di tipo 2. Queste discrepanze possono essere correlate ai diversi profili clinici e biologici della popolazione inclusa nei diversi studi. In realtà gli studi che non sono riusciti a mostrare un ruolo del polimorfismo -374 T/A nella patologia cardiovascolare sono stati condotti principalmente su popolazioni di etnia orientale. Con il presente studio, abbiamo ulteriormente esplorato il ruolo dei polimorfismi di RAGE nelle manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi analizzando il loro ruolo nell'età di insorgenza dell'infarto miocardico. I nostri dati sembrano indicare una correlazione tra il genotipo AA del polimorfismo -374 T/A del gene RAGE e l'età di insorgenza di infarto miocardico. In particolare, i pazienti con genotipo AA hanno un'età media di insorgenza di infarto miocardico di quasi 5 anni superiore rispetto ai pazienti con almeno un allele T, indicando che omozigosi per l'allele A svolge un ruolo protettivo nella patogenesi dell'IM, influenzando l'età di insorgenza della malattia. Sebbene i meccanismi alla base di questa associazione non possano essere direttamente desunti da questo studio, è possibile che questo risultato sia attribuibile alla ridotta attività trascrizionale del promotore del gene RAGE contenenti la variante allelica A [30] generando una riduzione dell'espressione cellulare di RAGE, con una conseguente riduzione dell'effetto pro-infiammatorio esercitato dalla trasduzione del segnale mediata dal legame di RAGE con i suoi ligandi (AGE, amphoterin, S100 calgranulin, peptide b-amiloide). L'attivazione dell'asse RAGE-ligando si traduce quindi in un fenotipo cellulare disfunzionale caratterizzato da un aumento nella produzione di ossido nitrico, l'attivazione di NF-kB, un migliore assorbimento di LDL ossidate, e sovra-regolazione delle molecole di adesione proinfiammatorie e trombotiche [31]. In conclusione, questo studio ha individuato una correlazione tra il polimorfismo -374 T/A nella regione promotore del gene RAGE e l'età di insorgenza di IM. Nell'interpretare i nostri risultati, importanti limitazioni devono essere considerate. In primo luogo, si tratta di uno studio caso-controllo di un singolo centro e indagini supplementari con un numero maggiore di pazienti sarebbero utili per confermare l'importanza di questo polimorfismo nell'influenzare il rischio di infarto miocardico. Tuttavia, le dimensioni del nostro campione sono state opportunamente valutate sulla base dell'osservato genotipo AA nella popolazione di controllo. In secondo luogo, il collegamento tra il polimorfismo di RAGE e IM è stata osservata in un gruppo di soggetti caucasici bianchi italiani. Pertanto, sono necessari ulteriori studi per chiarire la sua associazione con infarto miocardico in popolazioni di origine diversa. È anche importante riconoscere che gli studi di associazione come quello attuale possono solamente esaminare la possibile associazione tra fenotipo e i polimorfismi effettivamente testati.

Tabelle e figure

Tabella 1. Caratteristiche generali della popolazione oggetto dello studio.

Fattori di rischio	Pazienti (n=691)	Controlli (n=234)	P
Età, anni	59±10	62±12	N.S.
Sesso maschile	83%	64%	N.S.
BMI	26.1±3.2	25.6±4.4	N.S.
Iperensione arteriosa	58%	19%	<0.01
Ipercolesterolemia	76.6%	15%	<0.01
Tabagismo	40%	22%	<0.01
Familiarità per CAD	56%	15%	<0.01
Diabete mellito tipo II	27%	12%	<0.01

Tabella 2. Frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo -374T/A in pazienti e controlli.

	Pazienti (n=695)	Controlli (n=213)	P value
Genotipo -374 T/A, %			
TT	274 (40%)	67 (31%)	Ns
AT	328 (47%)	97 (45%)	Ns
AA	93 (13%)	49 (23%)	p<0.001
Allele			
A	514 (37%)	195 (46%)	p<0.001
T	876 (63%)	231 (54%)	p<0.001

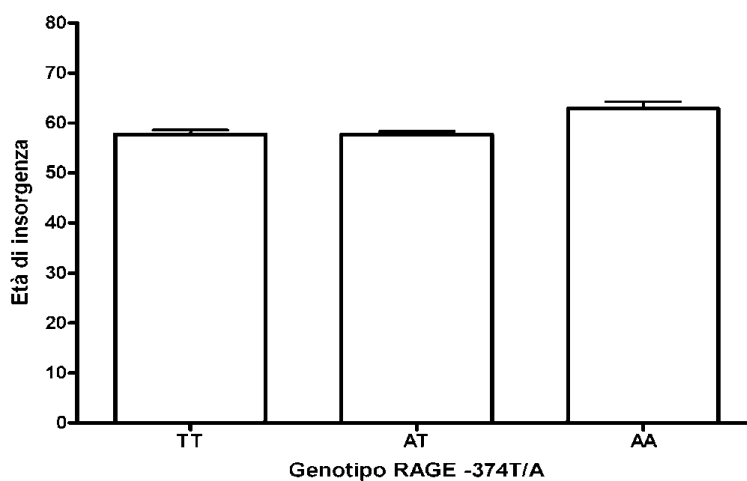


Figura 1. L'età di insorgenza di infarto del miocardio in relazione ai genotipi del polimorfismo RAGE -374T/A: gli omozigoti AA mostrano un'età di insorgenza superiore di 5 anni rispetto ai pazienti che presentano almeno un allele T.

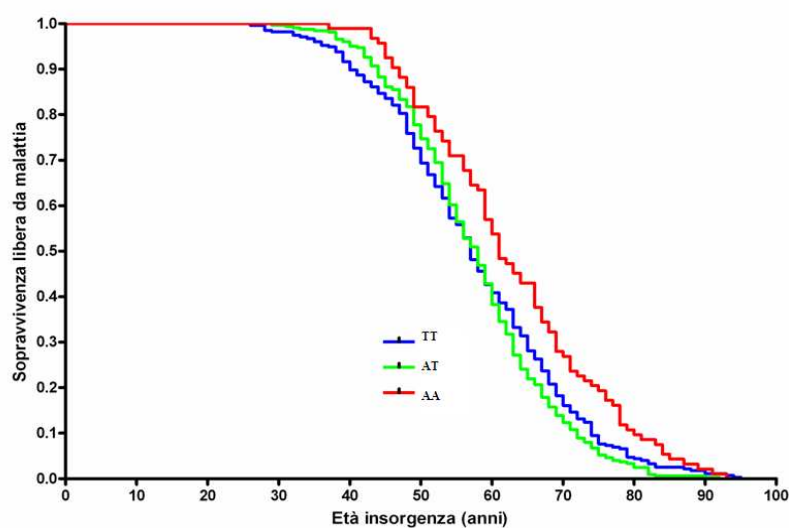


Figura 2. Le curve di Kaplan-Meier che mostrano l'età di insorgenza di infarto del miocardio in relazione ai al polimorfismo -374T/A del gene RAGE. Gli omozigoti AA mostrano un'età di insorgenza superiore a 5 anni rispetto ai pazienti che hanno almeno un allele T.

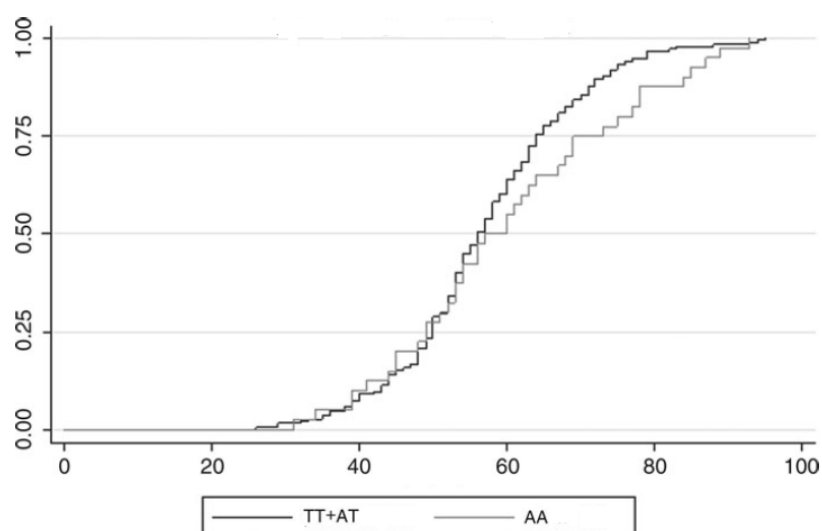


Figura 3. Curva di Kaplan-Meier che mostra l'età di insorgenza di infarto del miocardio in relazione a fenotipi del polimorfismo -374 T/A del gene RAGE.

Bibliografia

1. Arnett DK, Baird AE, Barkley RA et al. Relevance of genetics and genomics for prevention and treatment of cardiovascular disease: A scientific statement from the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, the Stroke Council, and the Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 2007;115:2878-2901.
2. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 2009;27:165-197.
3. Novelli G, Borgiani P, Giardina E et al. Role of genetics in prevention of coronary atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol* 2003;18:368-371.
4. Scheuner MT. Genetic predisposition to coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 2001;16:251-260.
5. Incalcaterra E, Hoffmann E, Averna MR et al. Genetic risk factors in myocardial infarction at young age. *Minerva Cardioangiologica*. 2004;52:287-212.
6. Lin L, Park S, Lakatta EG. RAGE signaling in inflammation and arterial aging. *Front Biosci* 2009;14:1403-1413.

7. Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis* 2008;196:9-21.
8. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y et al. Glycation, inflammation, and RAGE: A scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res* 2003;93:1159-1169.
9. Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. The role of AGEs in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 2008;14:979-986.
10. Jandeleit-Dahm K, Watson A, Soro-Paavonen A. The AGE/ RAGE axis in diabetes-accelerated atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35:329-334.
11. Wendt T, Harja E, Bucciarelli L et al. RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2006;185:70-77.
12. Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* 2008;57:2461-2469.
13. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF et al. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;108:949-955.
14. Gao ZQ, Yang C, Wang YY et al. RAGE upregulation and nuclear factor-kappaB activation associated with ageing rat cardiomyocyte dysfunction. *Gen Physiol Biophys* 2008;27:152-158.
15. Guo ZJ, Niu HX, Hou FF et al. Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1699-1712.
16. Takahashi HK, Mori S, Wake H et al. Advanced glycation end products subspecies-selectively induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;330:89-98.
17. Haslbeck KM, Bierhaus A, Erwin S et al. Receptor for advanced glycation end product (RAGE)-mediated nuclear factor-kappaB activation in vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve* 2004;29:85-860.
18. Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K et al. Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: Gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics* 1994;23:408-419.
19. Hudson BI, Stickland MH, Grant PJ. Identification of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene: Prevalence in type 2 diabetes and ethnic groups. *Diabetes* 1998;47:1155-1157.
20. Hudson BI, Stickland MH, Futers TS et al. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes* 2001;50:1505-1511.
21. Zee RY, Romero JR, Gould JL et al. Polymorphisms in the advanced glycosylation end products-specific receptor gene and risk of incident myocardial infarction or ischemic stroke. *Stroke* 2006;37:1686-1690.
22. Pettersson-Fernholm K, Forsblom C, Hudson BI et al. The functional 374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 2003;52:891-894.
23. Picheth G, Costantini CO, Pedrosa FO et al. The 374A allele of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene promoter is a protective factor against cardiovascular lesions in type 2 diabetes mellitus patients. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1268-1272.
24. Falcone C, Campo I, Emanuele E et al. 374T/A polymorphism of the RAGE gene promoter in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2005;354:111-116.
25. Falcone C, Geroldi D, Buzzi MP et al. The 374T/A RAGE polymorphism protects against future cardiac events in nondiabetic patients with coronary artery disease. *Arch Med Res* 2008;39:320-325.
26. Falcone C, Emanuele E, Buzzi MP et al. The 374T/A variant of the rage gene promoter is associated with clinical restenosis after coronary stent placement. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007;20:771-777.
27. The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined—A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J* 2000;21:1502-1513.
28. Poon PY, Szeto CC, Chow KM et al. Relation between polymorphisms of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and cardiovascular diseases in Chinese patients with diabetic nephropathy. *Clin Nephrol* 2010;73:44-50.
29. Peng WH, Lu L, Wang LJ et al. RAGE gene polymorphisms are associated with circulating levels of endogenous secretory RAGE but not with coronary artery disease in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 2009;40: 393-398.
30. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL et al. Activation of receptor for advanced glycation end products: A mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999;84:489-497.
31. Ramasamy R, Yan SF, Herold K et al. Receptor for advanced glycation end products: fundamental roles in the inflammatory response: winding the way to the pathogenesis of endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 2008;1126:7-13.