

本文引用: 张婷婷, 安丽娟, 阿孜古丽·古拉木江, 等. 急性心肌梗死中 N6-甲基腺苷与铁死亡的相关分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(2): 135-143. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.02.006.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-02-0135-09

· 临床研究 ·

急性心肌梗死中 N6-甲基腺苷与铁死亡的相关分析

张婷婷¹, 安丽娟¹, 阿孜古丽·古拉木江¹, 再米然·努尔塔¹, 张雅玲¹, 刘刚², 罗梅¹

新疆医科大学第五附属医院 1. 心血管内科, 2. 导管室, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830001

[摘要] **[目的]** 分析急性心肌梗死(AMI)中 N6-甲基腺苷(m^6A)与铁死亡的相关性。**[方法]** 从 GEO 数据库下载两个微阵列数据集 GSE34198 和 GSE59867。对 AMI 组和对照组进行差异表达基因分析。使用 R 语言对所筛选出的差异表达基因进行 GO、KEGG 和 GSVA 分析。通过机器学习算法对铁死亡相关基因进行 DRA、GBM、LASSO、randomForest 特征基因筛选。对筛选出的铁死亡核心基因和 m^6A 相关基因的表达数据进行 Pearson 相关分析, 筛选出相关性强的 m^6A 修饰基因和铁死亡相关基因。从新疆医科大学第五附属医院收集 AMI 和对照全血样本各 10 例, 通过 RT-qPCR 和 Western blot 验证相关基因的表达。**[结果]** 从两个数据集中提取出 431 个共同差异表达基因, GO 和 KEGG 分析显示, 其主要富集在 TNF 信号通路、FoxO 信号通路、B 细胞受体信号通路等。差异表达基因通过 GSVA 得到富集通路有铜死亡、网状细胞死亡、内吞细胞死亡、细胞内碱化死亡和铁死亡。通过机器学习算法进行铁死亡相关基因特征基因筛选, 从中筛选出 19 个核心铁死亡相关基因。将筛选出的铁死亡相关基因和 m^6A 相关基因表达数据进行 Pearson 相关分析, 其中 LRPPRC-IREB2、LRPPRC-ATG5、YTHDC2-IREB2、HNRNPA2B1-IREB2、YTHDC2-ATG5 为相关性最高的 5 组基因。RT-qPCR 和 Western blot 结果显示, 与对照组相比, AMI 患者 LRPPRC、YTHDC2、HNRNPA2B1、IREB2、ATG5 基因的表达均显著降低($P < 0.001$), 与数据库中基因表达情况一致。**[结论]** 在 AMI 中 m^6A 甲基化和铁死亡存在相关性。通过调节 m^6A 甲基化相关基因可以调控 AMI 中的铁死亡, 为进一步研究该病的发生机制提供了新的思路。

[关键词] 急性心肌梗死; 铁死亡; N6-甲基腺苷; 生物信息学

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Correlation between N6-methyladenosine and ferroptosis in acute myocardial infarction

ZHANG Tingting¹, AN Lijuan¹, AZIGULI · Gulamujiang¹, ZAIMIRAN · Nuerta¹, ZHANG Yaling¹, LIU Gang², LUO Mei¹

1. Department of Cardiology, 2. Catheter Laboratory, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830001, China

[ABSTRACT] **Aim** To analyze the correlation between N6-methyladenosine (m^6A) and ferroptosis in acute myocardial infarction (AMI). **Methods** Two microarray datasets GSE34198 and GSE59867 was explored from GEO database. Both AMI and control samples were analyzed for differentially expressed genes. GO, KEGG, and GSVA analysis of the screened differential genes was performed using R. Machine learning was used to screen ferroptosis associated genes for DRA, GBM, LASSO and randomForest characteristic genes. The expression data of the core ferroptosis gene and m^6A -related genes were analyzed by Pearson correlation analysis, and the m^6A modified genes and ferroptosis associated genes with strong correlation were screened. Finally, 10 cases of AMI and 10 control whole blood samples from the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University were collected, and the expression of related genes was verified by RT-qPCR and Western blot. **Results** 431 common differentially expressed genes were extracted from two datasets, GO and KEGG analysis showed that these genes were mainly enriched in TNF signaling pathway, FoxO signaling pathway and B cell receptor signaling pathway. The enrichment pathways of differentially expressed genes by GSVA were cuproptosis,

[收稿日期] 2024-05-17

[修回日期] 2024-09-07

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2022D01C323)

[作者简介] 张婷婷, 硕士研究生, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail: 1651735421@qq.com。通信作者罗梅, 博士, 主任医师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail: lm_mary_2006@126.com。

netotic cell death, entotic cell death, alkaliptosis and ferroptosis. The characteristic genes of ferroptosis associated genes were screened by machine learning, and 19 core ferroptosis associated genes were screened from them. The expression data of ferroptosis associated genes and m⁶A-related genes were analyzed by Pearson correlation analysis. LRPPRC-IREB2, LRPPRC-ATG5, YTHDC2-IREB2, HNRNPA2B1-IREB2 and YTHDC2-ATG5 were the most correlated top five genes. The results of RT-qPCR and Western blot showed that the gene expression levels of LRPPRC, YTHDC2, HNRNPA2B1, IREB2 and ATG5 were significantly lower than those of the control group ($P < 0.001$), which was consistent with the gene expression in the database. **Conclusion** m⁶A methylation is associated with ferroptosis in AMI. By regulating m⁶A methylation-related genes, ferroptosis in AMI can be regulated. It provides a new idea for the further study of the pathogenesis of the disease.

[**KEY WORDS**] acute myocardial infarction; ferroptosis; N6-methyladenosine; bioinformatics

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 在全球的发病率和死亡率极高,是造成中老年人死亡和残疾的主要原因之一。AMI 是一种由于冠状动脉粥样硬化病变导致管腔变窄或阻塞,从而引起心肌缺血、缺氧、坏死的疾病^[1]。在心肌缺氧复氧过程中导致的心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 是 AMI 的重要病理过程。随着介入手术和药物研发的进步,AMI 的发生率有所减少,生存率也有了较大的提高^[2]。但是 AMI 的发病率造成的社会经济负担仍日益增加,其防治依然任重而道远。

铁死亡作为一种新型细胞死亡形式,主要与铁积累和脂质过氧化两个生物化学特征有关。研究发现,铁抑素 1 (ferrostatin-1, Fer-1) 可以改善氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导的铁死亡和内皮功能障碍,并可以延缓动脉粥样硬化的进展^[3]。在动脉粥样硬化的晚期阶段,前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 和酰基辅酶 A 合酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 的表达上调,而谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的表达下调,表明动脉粥样硬化的严重程度与 PTGS2 和 ACSL4 呈正相关,与 GPX4 呈负相关。其中 PTGS2、ACSL4 及 GPX4 主要参与铁死亡中脂质过氧化过程,被认为是铁死亡的生物标志物^[4]。因此,铁死亡可能与动脉粥样硬化的发生和进展相关^[5]。此外,有研究表明,铁死亡也参与到了 MIRI 的发生发展,铁死亡在 MIRI 中的作用主要集中在内质网应激和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生、GPX-4 和自噬依赖性铁死亡途径上,与心肌损伤的病理过程密切相关^[6]。铁死亡既参与调节动脉粥样硬化的发生和进展,又与 MIRI 密切相关,为 AMI 的治疗提供了抑制铁死亡的新策略。所以探讨 AMI 中的铁死

亡机制,对于制定有效的 AMI 治疗策略意义重大。

N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m⁶A) 是真核细胞 mRNA 转录后修饰的重要调控过程,其在调节 mRNA 剪切、定位、转录和稳定性方面起重要作用^[7]。m⁶A 甲基化的研究在揭示 AMI 的潜在机制及诊断治疗方面取得了巨大进展^[8]。在肿瘤模型中,已经证实 m⁶A 甲基化修饰可以介导铁死亡^[9]。然而,目前尚不清楚 m⁶A 甲基化是否参与 AMI 中的铁死亡。因此,本研究通过 GEO 数据库,采用生物信息学方法分析 m⁶A 甲基化与铁死亡相关基因的相关性,筛选出相关性强的 m⁶A 甲基化修饰基因及铁死亡相关基因。并收集新疆医科大学第五附属医院的临床标本,通过 RT-qPCR 和 Western blot 进一步验证该结果,为探索 AMI 的发病机制提供新的方向。

1 资料和方法

1.1 主要试剂

Trizol (Invitrogen); DEPC 处理水 (CTCC); SYBRGreen PCR 试剂盒 (成都福际); 反转录试剂盒 (Thermo); 全血蛋白提取试剂盒 (百奥莱博); BCA 蛋白定量试剂盒、5% BSA (Biosharp); 30% 丙烯酰胺、氯仿/异丙醇/无水乙醇、Tris-HCl 电泳缓冲液、10% SDS (上海国药); 10% 过硫酸铵、TEMED (Sigma); 5 × 蛋白上样缓冲液 (Beyotime); 蛋白预染 Marker (Thermo); PVDF 膜 (Millipore); PBS 磷酸盐缓冲液 (上海云浣); Tween-20 (Amresco); ECL 发光液 (北京鼎国); 一抗、二抗 (爱博泰克)。

1.2 数据来源

从 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中检索 AMI 获得 GSE34198 和 GSE59867 数据集,挑选 AMI 患者与对照全血基因表达数据, GSE34198 中包含 97 例人全血样本 (49 例 AMI 样本

和 48 例正常对照), GSE59867 中包含 157 例人全血样本(111 例 AMI 样本和 46 例正常对照)。

1.3 差异基因鉴别

使用 R 软件包 limma (version 3.40.6) 进行差异基因分析, 获得 AMI 组与正常对照组间的差异基因。对获取的表达谱数据集使用 lmFit 函数进行多元线性回归分析, 然后进一步使用 eBayes 函数对标准误差向共同值调节, 计算调节 t 统计量、 F 统计量和差分表达的对数几率, 最终获得每个基因的差异显著性情况, 其中 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义, 筛选出两组间的差异基因。继而对筛选出的差异基因进行聚类分析, 利用 R 软件中的 heatmap 和 ggplot2 包分别绘制热图和火山图, 对差异基因进行可视化。

1.4 差异基因功能和途径富集分析

使用 KEGG rest API (<https://www.kegg.jp/kegg/rest/keggapi.html>) 获取最新的 KEGG Pathway 的基因注释。以此作为背景, 将筛选出的基因映射到背景集合中, 使用 R 软件包 clusterProfiler (version 3.14.3) 进行富集分析, 从而获得基因集富集的结果。GO 注释包括生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cell composition, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 分析。设定最小基因集为 5, 最大基因集为 5 000, $P < 0.05$ 和错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.25 被认为有统计学意义。

1.5 基因集变异分析

利用 R 软件包 GSVA (version 1.40.1) 计算每个样本在基因集中的富集得分。首先利用基因表达谱, 使用 GSEA 方法, 并预定义基因集合, 用以评估不同基因集合的富集得分。设定最小基因集合为 5, 最大基因集合为 5 000, 计算每个样本在每个基因集中的富集得分, 最终获得富集得分矩阵。

1.6 机器学习算法筛选铁死亡核心基因

选择 GSE59867 数据集 42 个铁死亡基因表达数据进行聚类分析, 再使用 R (v4.1.3) 语言 GeneSelectR v1.0.1 和 glmnet v4.1 包对该数据分别进行 DRA、GBM、LASSO、randomForest 特征基因筛选, 得到铁死亡核心基因。

1.7 Pearson 相关分析

选取 GSE59867 数据集中 m^6A 调控因子与筛选出的铁死亡核心基因表达数据, 使用 corplot v0.92 包进行 Pearson 相关分析, 筛选出相关性最强的 5 组基因。

1.8 样本获取

为进一步验证相关基因在 AMI 中的作用, 从新疆医科大学第五附属医院收集 AMI 和对照全血样

本各 10 例。纳入标准: ①年龄 ≥ 18 岁; ②对照组: 选取同期住院且行冠状动脉造影检查显示结果正常的患者; ③AMI 组: AMI 的诊断标准符合美国心脏病学会 2018 年发布的“第四版全球心肌梗死定义”^[10], 心电图或血清心肌损伤标志物提示异常, 明确诊断为 AMI, 并行冠状动脉造影检查的患者。排除标准: ①存在严重瓣膜性心脏病、心肌病、肺源性心脏病、先天性心脏病、心源性休克等病史; ②既往或现有恶性肿瘤病史; ③存在血液系统疾病、风湿免疫系统疾病、严重肝肾功能不全; ④对造影剂过敏者。研究方案得到医院伦理委员会的确认 (伦理审批号: XYDWFYLSk-2024-17), 患者及家属均知情, 并签署知情同意书。

获取患者的一般资料, 包括性别、年龄、体质指数 (body mass index, BMI)、高血压、糖尿病、高胆固醇血症、吸烟史。其中, $BMI = \text{体质量 (kg)} / \text{身高 (m)}^2$, 高血压为收缩压 ≥ 140 mmHg 和 (或) 舒张压 ≥ 90 mmHg, 糖尿病为糖尿病症状加随机血糖 ≥ 11.1 mmol/L 或空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L 或口服糖耐量实验 2 h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L, 高胆固醇血症为血清总胆固醇水平 ≥ 6.2 mmol/L, 吸烟史为吸烟 ≥ 1 支/天, 连续吸烟 ≥ 6 个月或以前达到吸烟标准, 戒烟小于半年。

1.9 RT-qPCR 和 Western blot 检测

用 Trizol 法从外周血单个核细胞中提取总 RNA, 将总 RNA 反转录成 cDNA, 使用实时定量 PCR 仪与 RT-PCR 试剂盒测定所选基因表达量, β -actin 为内参基因。引物序列见表 1。

使用全血蛋白提取试剂盒制备蛋白样品。使用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度, 行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 并转移到 PVDF 膜上, 在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 按照相应抗体说明书稀释一抗, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, 孵育结束后用 TBST 缓冲液清洗, 然后将膜与稀释的二抗在室温下孵育 1 h, 孵育结束后用 TBST 缓冲液清洗 PVDF 膜, 再将显色剂混合液滴加到 PVDF 膜上, 暗室曝光并拍照留存, 使用 Image J 软件进行图像分析。

1.10 统计学分析

用 SPSS 26.0 统计软件进行统计分析。患者基本信息比较时, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验; 计数资料以例数 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1. 引物序列
Table 1. Primer sequences

基因名称	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')	扩增产物长度/bp
β-actin	CTTCGCGGGCGACGAT	CCACATAGGAATCCTTCTGACC	104
LRPPRC	TGGCCGGAGGACTACTGAG	CTTTGGAATGCGGCCAGTTC	164
YTHDC2	CATTCGCATTGATGAGGAGGTG	CATTTCCCGGTTTTCCTTTACTT	179
HNRNPA2B1	CAGTTCTCACTACAGCGCCA	TTCCTCTCCAAAGGAACAGTTT	144
IREB2	AGGTGGTGACCTGCAGAAAG	GAAGTCCATCAGGCACTGGTT	200
ATG5	GAGTAGTTGCCTGGAGGAGC	CATGTACCCCAAGAGGGACC	146

2 结 果

2.1 差异基因筛选情况

从 GSE34198 数据集中筛选出 899 个差异表达基因(图 1A),从 GSE59867 数据集中筛选出 11 955

个差异表达基因(图 1B)。据火山图结果可知, GSE59867 数据集差异性更为明显。两个数据集筛选出的差异基因中,共同差异基因有 431 个(图 1C)。聚类分析两个数据集的共同差异基因,使用热图展示 431 个差异基因的表达情况(图 1D)。

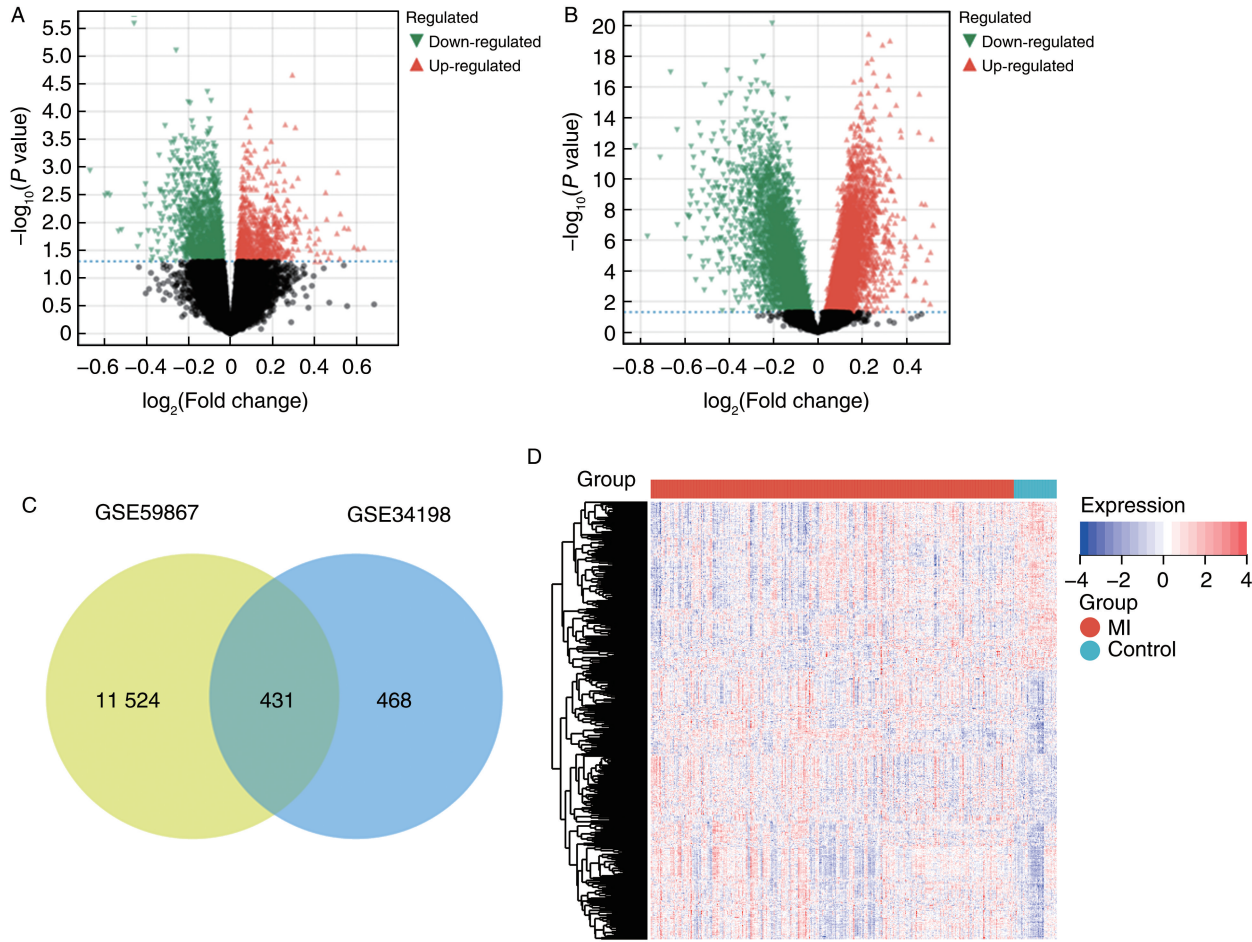


图 1. 差异表达基因筛选

A 为 GSE34198 火山图,B 为 GSE59867 火山图,绿色三角代表下调基因,红色三角代表上调基因,灰色圆点代表非显著基因;
C 为 GSE59867 和 GSE34198 维恩图,显示有 431 个共同差异基因;D 为 431 个共同差异基因的集群热图。

Figure 1. Differential expression gene screening

2.2 差异基因 GO 和 KEGG 分析

GO 富集分析显示,在 BP 方面,差异基因主要在白细胞活化、免疫系统过程等富集;在 CC 方面,差异基因主要在枝晶细胞质、胞质等富集;在 MF 方面,差异基因主要在酶结合、Ras GTP 酶结合等富集(图 2)。KEGG 通路分析显示,差异基因主要集中在 TNF 信号通路、FoxO 信号通路、B 细胞受体信号通路等(图 3)。提示这些差异基因主要作用于免疫反应及细胞生长代谢方面。FoxO 信号通路主要参与细胞周期调节、氧化还原平衡、细胞凋亡等方面^[11]。

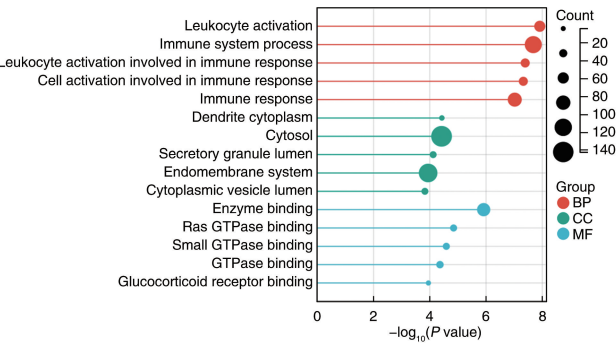


图 2. GO 富集分析

Figure 2. GO enrichment analysis

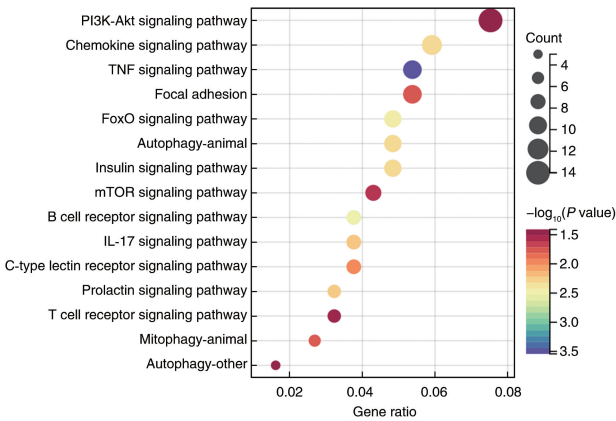


图 3. KEGG 通路分析

Figure 3. KEGG pathway analysis

2.3 程序性细胞死亡 GSVA 分析

选择细胞凋亡、细胞焦亡、铁死亡、自噬、坏死性凋亡、铜死亡、内吞细胞死亡、网状细胞死亡、溶酶体依赖性细胞死亡、细胞内碱化死亡 10 种常见程序性细胞死亡通路进行 GSVA 分析,得出各通路的富集分数。其中铜死亡、网状细胞死亡、内吞细胞死亡、细胞内碱化死亡和铁死亡富集明显且有统计学意义(图 4)。

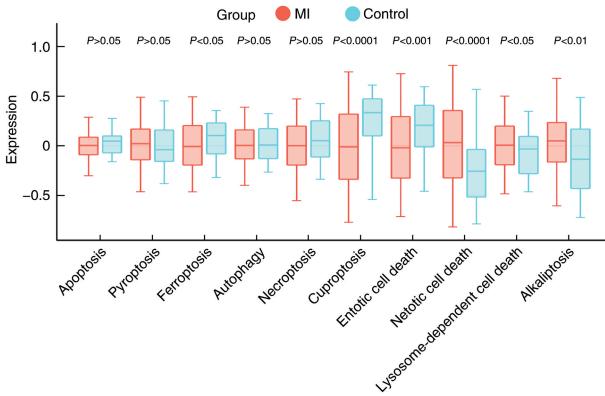


图 4. GSVA 分析

Figure 4. GSVA analysis

2.4 铁死亡关键基因筛选情况

依据文献^[12],筛选出 42 个铁死亡相关基因,将 GSE59867 数据集中 42 个铁死亡相关基因的表达数据进行聚类分析,使用热图展示基因在不同样本中的表达情况(图 5)。然后进行 DRA、GBM、LASSO、randomForest 特征基因筛选,得到 SLC3A2、OTUB1、PCBP2、MAP1LC3B、PEBP1、IREB2、PHKG2、TP53、GPX4、VDAC2、GSS、NFS1、CBS、FANCD2、TFRC、SLC7A11、ATG5、RPL8、FTH1 共 19 个铁死亡核心基因(图 6 和图 7)。

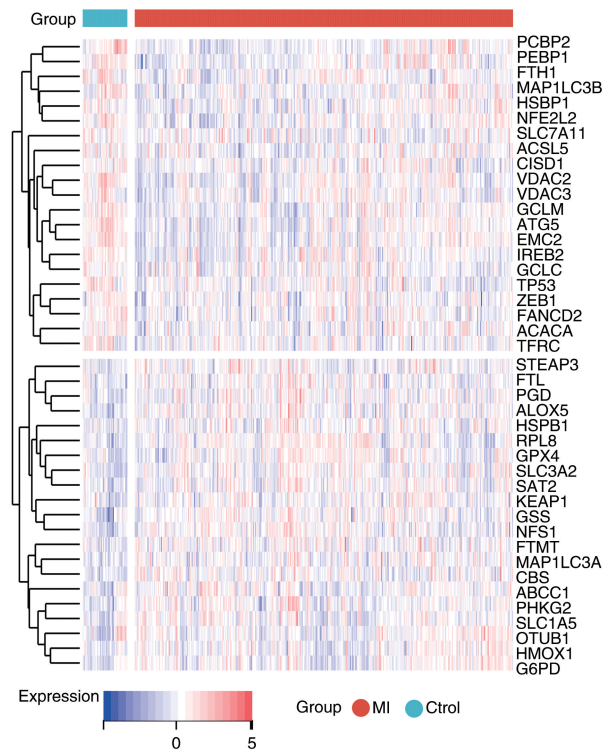


图 5. 铁死亡相关基因聚类分析

Figure 5. Cluster analysis of ferroptosis related genes

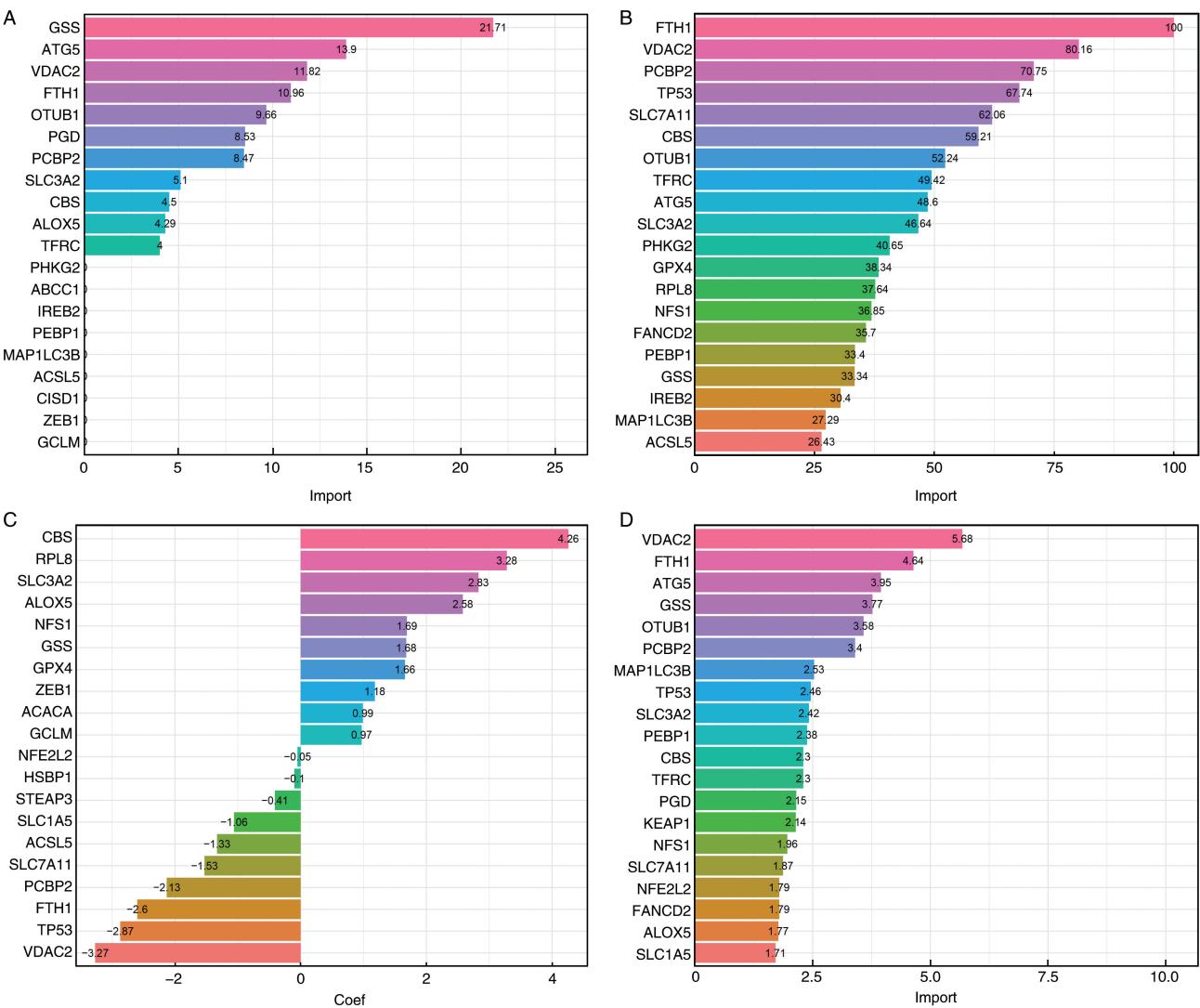


图 6. 机器学习算法筛选特征基因

A 为使用 DRA 算法获得的铁死亡相关基因,B 为使用 GBM 算法获得的铁死亡相关基因,C 为使用 LASSO 算法获得的铁死亡相关基因, D 为使用 randomForest 算法获得的铁死亡相关基因。

Figure 6. Machine learning screening feature genes

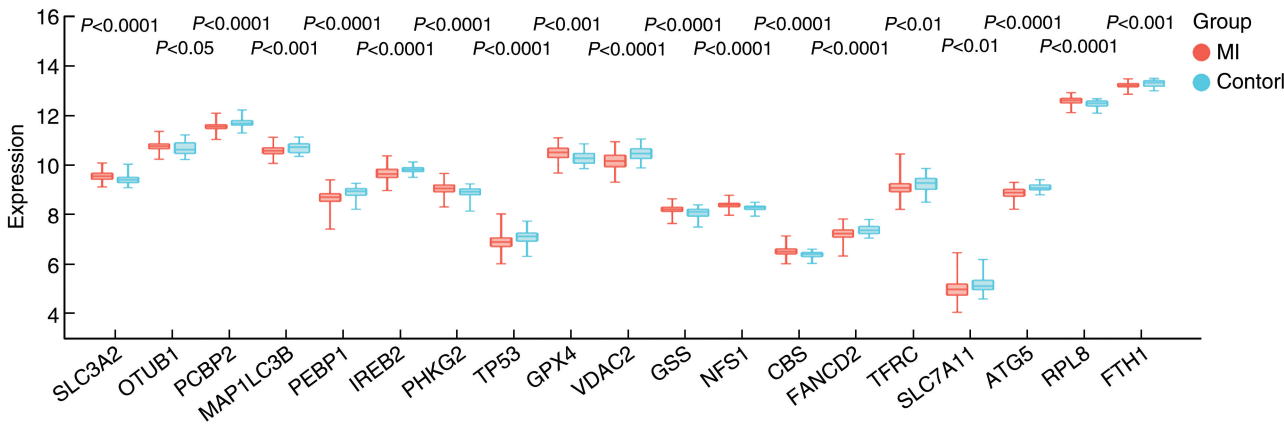


图 7. 铁死亡特征基因数据

Figure 7. Ferroptosis characteristic gene data

2.5 Pearson 相关分析

在 GSE59867 数据集差异基因中收集常见的 15 个 m⁶A 调控因子的表达数据进行分析(图 8)。将 15 个 m⁶A 调控因子的表达数据与筛选出的 19 个铁死亡核心基因表达数据进行 Pearson 相关分析,其中与 m⁶A 相关性最高的铁死亡基因为 IREB2 和 ATG5, m⁶A 修饰基因与铁死亡核心基因相关性最强的 5 组基因为 LRPPRC-IREB2、LRPPRC-ATG5、YTHDC2-IREB2、HNRNPA2B1-IREB2、YTHDC2-ATG5(图 9)。

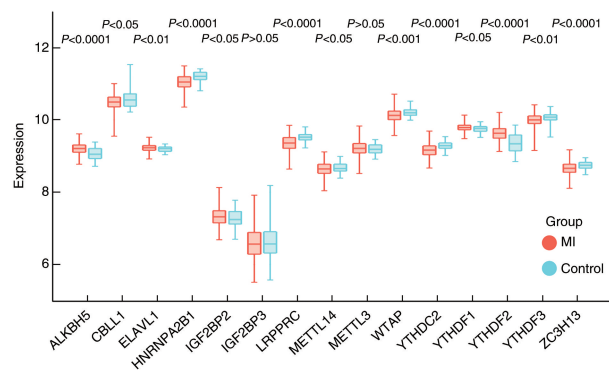


图 8. m⁶A 相关基因数据

Figure 8. m⁶A-related gene data

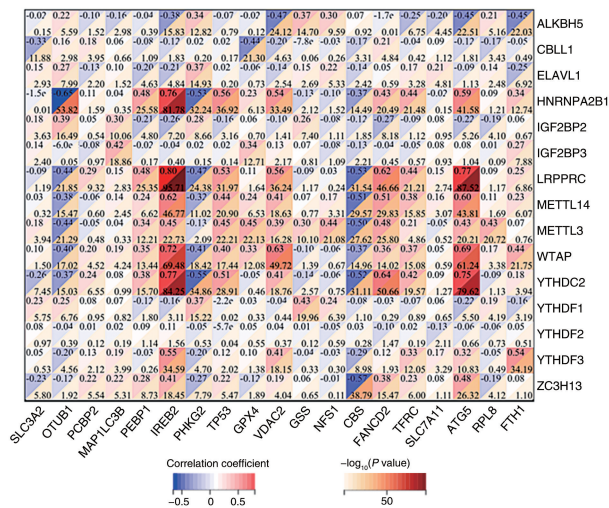


图 9. Pearson 相关分析

Figure 9. Pearson correlation analysis

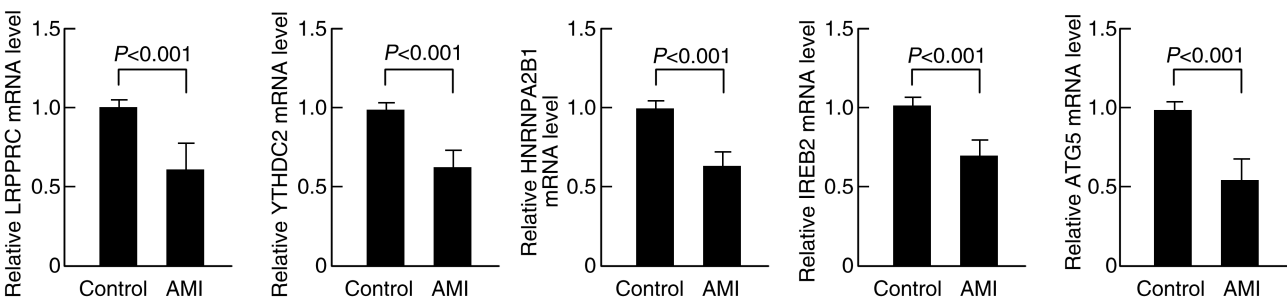


图 10. RT-qPCR 结果

Figure 10. RT-qPCR results

2.6 相关基因的验证

AMI 患者和对照者的一般临床资料与数据集中一般临床资料具有可比性(表 2 和表 3)。RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示, AMI 患者 LRPPRC、YTHDC2、HNRNPA2B1、IREB2、ATG5 的表达均显著降低($P<0.001$;图 10 和图 11)。

表 2. 验证集中 AMI 组和对照组一般临床资料比较

Table 2. Comparison of general clinical data between the AMI group and the control group in the validation set

项目	AMI 组 (n = 10)	对照组 (n = 10)	P
男/[例(%)]	7(70)	7(70)	1.000
女/[例(%)]	3(30)	3(30)	1.000
年龄/岁	61.1±8.5	63.4±7.5	0.549
BMI/(kg/m ²)	26.1±4.9	28.3±5.1	0.366
高血压/[例(%)]	6(60)	8(80)	0.329
糖尿病/[例(%)]	3(30)	1(10)	0.264
高胆固醇血症/[例(%)]	0(0)	4(40)	0.025
吸烟史/[例(%)]	7(70)	6(60)	0.639

表 3. 数据集中 AMI 组和对照组一般临床资料比较

Table 3. Comparison of general clinical data between the AMI group and the control group in data set

项目	AMI 组 (n = 111)	对照组 (n = 41)	P
男/[例(%)]	86(77.5)	31(75.6)	0.830
女/[例(%)]	25(22.5)	10(24.4)	0.830
年龄/岁	58.8±10.4	61±10.6	0.277
BMI/(kg/m ²)	28.1±4.7	28.9±5.1	0.517
高血压/[例(%)]	62(55.9)	28(71.8)	0.090
糖尿病/[例(%)]	26(23.4)	6(15.4)	0.367
高胆固醇血症/[例(%)]	60(54.1)	34(87.2)	<0.001
吸烟史/[例(%)]	54(48.6)	20(51.3)	0.853

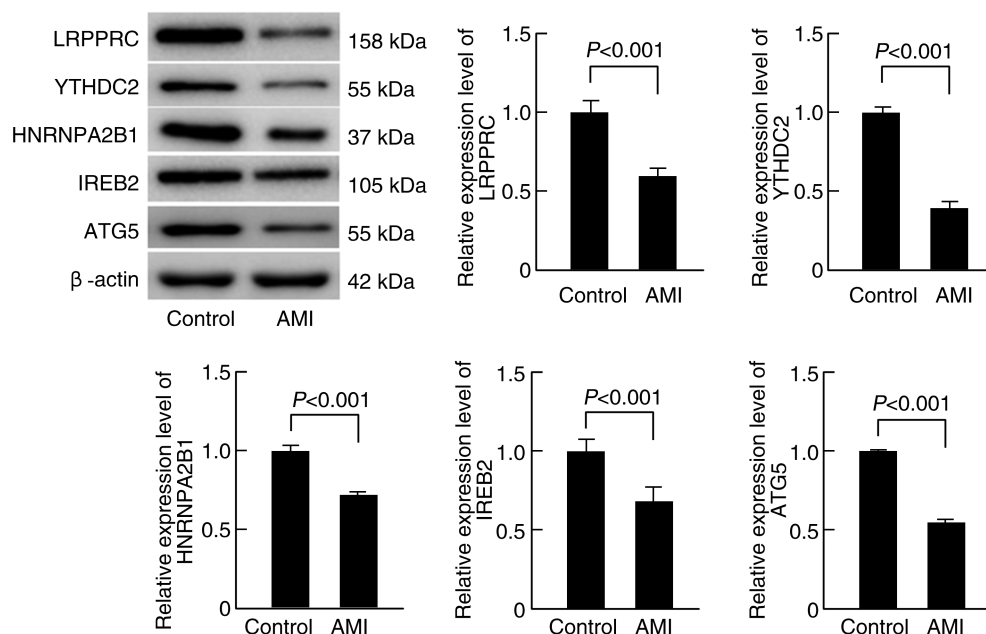


图 11. Western blot 检测结果

Figure 11. Western blot detection results

3 讨论

m⁶A 甲基化作为真核生物中最常见的转录后修饰之一,可以通过调节 mRNA 代谢过程介导细胞功能,包括核输出、稳定性、剪接、定位和翻译等内容^[13]。铁死亡是心肌细胞死亡的一种重要方式^[14]。铁死亡相关基因在 AMI 中是一种很有希望的诊断和治疗靶点^[15]。然而,在 AMI 中 m⁶A 甲基化与铁死亡之间的关系尚未见报道。因此,本研究选择基因芯片数据、通过基因表达数据分析、基因集富集分析、生物信息学富集等方法分析 m⁶A 甲基化与铁死亡在 AMI 中是否具有相关性,找出 AMI 中 m⁶A 甲基化与铁死亡之间相关性最高的 5 组基因,并通过 RT-qPCR 和 Western blot 对其表达情况进行验证。对于探索 AMI 中铁死亡的发生机制具有重要意义。本研究利用多个基因样本和大量基因芯片数据,使实验结果更加可靠,对 AMI 的诊治具有参考意义。

本研究整合了 GEO 数据库中 GSE34198 和 GSE59867 两个数据集的数据,运用生物学信息分析的方法,经过差异分析、聚类分析和富集分析,筛选出差异基因及其主要的富集通路,结果显示差异基因的主要富集通路为免疫反应和细胞生长代谢方面。因主要富集的信号通路中 FoxO 信号通路主要参与细胞周期调节、氧化还原平衡、细胞凋亡等方面^[11],故选择 10 种常见的程序性细胞死亡通路进行 GSEA 分析。得到不同通路的富集分数后,对不同组的富集分数进行分析,得到有统计意义的 5 种

细胞死亡通路。经查阅文献后,选择铁死亡通路进行进一步分析。通过机器学习 4 种不同算法筛选出 19 个铁死亡核心基因,将筛选出的铁死亡相关基因与 m⁶A 修饰基因表达数据进行 Pearson 相关分析,筛选出 AMI 患者中 m⁶A 甲基化与铁死亡相关性最高的 5 组基因。收集 AMI 组和对照组各 10 例全血样本,利用这些样本对筛选出的基因进行 RT-qPCR 和 Western blot 验证,结果发现,AMI 患者中 LRPPRC、YTHDC2、HNRNPA2B1、IREB2、ATG5 的表达显著下调,与文献及生物信息学分析结果一致。

LRPPRC、YTHDC2 及 HNRNPA2B1 均为 m⁶A 的读取器。LRPPRC 缺陷会改变线粒体电子传递链、线粒体通透性和跨膜 ROS 扩散,从而参与到铁死亡过程^[16]。LRPPRC 是协调多聚腺苷酸化和线粒体 mRNA 翻译所必需的,已有研究表明该基因与动脉粥样硬化及心肌梗死有关^[17]。YTHDC2 作为 m⁶A 甲基化读取器也参与到铁死亡的调控之中。有研究表明,YTHDC2 被认为是一种强大的内源性铁死亡诱导剂,可以通过靶向 System Xc⁻ 的 SLC3A2 亚基促进肺腺癌细胞铁死亡,促进 YTHDC2 的表达是通过靶向铁死亡来治疗肺腺癌的一种疗法^[18]。同时,YTHDC2 作为 AMI 中重要的 m⁶A 调节因子,也参与到 AMI 的发生发展之中^[19]。HNRNPA2B1 被证实可以通过介导 FOXM1 的 m⁶A 修饰调节脂质运载蛋白 2 (lipocalin 2, LCN2) 来促进耐药性并抑制子宫内膜癌的铁死亡^[20]。而 HNRNPA2B1 同样在 AMI 的诊断中起着重要作用^[19]。

IREB2 易受铁水平的影响,当细胞铁供应不足时,IREB2 会被激活,铁输出和储存减少并增强铁摄取来维持细胞内铁稳态。此外,IREB2 和自噬相关铁死亡表达之间也存在显著相关性^[21]。m⁶A 甲基化可以通过促进 IREB2 的翻译来触发慢性阻塞性肺疾病中的铁死亡^[22]。ATG5 是重要的自噬基因,敲除或敲低 ATG5 会抑制 erastin 诱导的铁死亡,降低细胞内亚铁水平和脂质过氧化水平^[23]。同时,在心肌细胞中影响 ATG5 基因启动子的活性也会改变 ATG5 水平,引起心肌细胞死亡,从而导致 AMI 的发生^[24]。另有研究指出,在肝细胞癌中 YTHDC2 降低后 ATG5 蛋白的表达降低,而在 YTHDC2 重新表达后,ATG5 的表达恢复,表明 ATG5 是 YTHDC2 的下游靶点,YTHDC2 可以通过促进 ATG5 翻译启动自噬铁死亡^[25]。而在心肌细胞中这一过程尚未被阐明。

本研究初步筛选出 AMI 患者 m⁶A 甲基化与铁死亡相关性高的基因,为 AMI 中 m⁶A 甲基化与铁死亡的相关性提供了证据,为 AMI 发病机制和诊疗的研究提供了方向。然而,本研究仍存在一些局限性:首先,生物信息学分析方法基于统计结果,有可能出现假阴性或假阳性;其次,本研究基于表达水平讨论了 m⁶A 甲基化与铁死亡之间的相关性,但无法确定筛选出的相关基因之间的具体调节方式。后续仍需通过细胞和动物实验来进行进一步研究验证。

[参考文献]

- [1] RALAPANAWA U, SIVAKANESAN R. Epidemiology and the magnitude of coronary artery disease and acute coronary syndrome: a narrative review[J]. J Epidemiol Glob Health, 2021, 11(2): 169-177.
- [2] WANG J, LI L, MA N, et al. Clinical investigation of acute myocardial infarction according to age subsets[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(5): 120.
- [3] LI W, FENG G, GAUTHIER J M, et al. Ferroptotic cell death and TLR4/Trif signaling initiate neutrophil recruitment after heart transplantation[J]. J Clin Invest, 2019, 129(6): 2293-2304.
- [4] ZHOU Y, ZHOU H, HUA L, et al. Verification of ferroptosis and pyroptosis and identification of PTGS2 as the hub gene in human coronary artery atherosclerosis[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 171: 55-68.
- [5] 王丽雯, 刘惠美, 李兰芳, 等. 铁死亡与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(2): 155-163.
WANG L W, LIU H M, LI L F, et al. Ferroptosis and atherosclerosis[J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(2): 155-163.
- [6] 郝艺芳, 李 婷, 牛枫楠, 等. 铁死亡在心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(12): 1097-1104.
HAO Y F, LI T, NIU F N, et al. Role of ferroptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(12): 1097-1104.
- [7] LAN Q, LIU P Y, HAASE J, et al. The critical role of RNA m⁶A methylation in cancer[J]. Cancer Res, 2019, 79(7): 1285-1292.
- [8] LIANG C, WANG S, ZHANG M, et al. Diagnosis, clustering, and immune cell infiltration analysis of m⁶A-related genes in patients with acute myocardial infarction; a bioinformatics analysis[J]. J Thorac Dis, 2022, 14(5): 1607-1619.
- [9] LIU L, LI H, HU D, et al. Insights into N6-methyladenosine and programmed cell death in cancer[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 32.
- [10] THYGESEN K, ALPERT J S, JAFFE A S, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018)[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(18): 2231-2264.
- [11] BROWN A K, WEBB A E. Regulation of FOXO factors in mammalian cells[J]. Curr Top Dev Biol, 2018, 127: 165-192.
- [12] TANG D, KANG R, BERGHE T V, et al. The molecular machinery of regulated cell death[J]. Cell Res, 2019, 29(5): 347-364.
- [13] CHAO Y, LI H B, ZHOU J. Multiple functions of RNA methylation in T cells: a review[J]. Front Immunol, 2021, 12: 627455.
- [14] BABA Y, HIGA J K, SHIMADA B K, et al. Protective effects of the mechanistic target of rapamycin against excess iron and ferroptosis in cardiomyocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018, 314(3): H659-H668.
- [15] WU J, CAI H, LEI Z, et al. Expression pattern and diagnostic value of ferroptosis-related genes in acute myocardial infarction[J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 993592.
- [16] HU S, SECHI M, SINGH P K, et al. A novel redox modulator induces a GPX4-mediated cell death that is dependent on iron and reactive oxygen species[J]. J Med Chem, 2020, 63(17): 9838-9855.
- [17] ZHU S, BAI L, PAN Y, et al. Integrative analysis of N6-methyladenosine RNA modifications related genes and their influences on immunoreaction or fibrosis in myocardial infarction[J]. Int J Med Sci, 2024, 21(2): 219-233.
- [18] MA L, ZHANG X, YU K, et al. Targeting SLC3A2 subunit of system XC⁻ is essential for m⁶A reader YTHDC2 to be an endogenous ferroptosis inducer in lung adenocarcinoma[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 168: 25-43.
- [19] WANG X, WU Y, GUO R, et al. Comprehensive analysis of N6-methyladenosine RNA methylation regulators in the diagnosis and subtype classification of acute myocardial infarction[J]. J Immunol Res, 2022, 2022: 5173761.
- [20] JIANG J, ZHU J, QIU P, et al. HNRNPA2B1-mediated m⁶A modification of FOXM1 promotes drug resistance and inhibits ferroptosis in endometrial cancer via regulation of LCN2[J]. Funct Integr Genomics, 2023, 24(1): 3.
- [21] ZHU T, XIAO Z, YUAN H, et al. ACO1 and IREB2 downregulation confer poor prognosis and correlate with autophagy-related ferroptosis and immune infiltration in KIRC[J]. Front Oncol, 2022, 12: 929838.
- [22] XIA H, WU Y, ZHAO J, et al. N6-methyladenosine-modified circSAV1 triggers ferroptosis in COPD through recruiting YTHDF1 to facilitate the translation of IREB2[J]. Cell Death Differ, 2023, 30(5): 1293-1304.
- [23] HOU W, XIE Y, SONG X, et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin[J]. Autophagy, 2016, 12(8): 1425-1428.
- [24] ZHANG Y, HE X, LI J, et al. Functional genetic variant in ATG5 gene promoter in acute myocardial infarction[J]. Cardiol Res Pract, 2020, 2020: 9898301.
- [25] LI Y, GUO M, QIU Y, et al. Autophagy activation is required for N6-methyladenosine modification to regulate ferroptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Redox Biol, 2024, 69: 102971.

(此文编辑 文玉珊)