

·论著·

# 尼古丁影响糖尿病心肌病进展的机制研究

赵 静<sup>1</sup>, 郭 蕊<sup>1</sup>, 孟芝君<sup>2</sup>, 刘彩虹<sup>1</sup>, 谢耀丽<sup>1</sup>, 刘 晶<sup>3</sup>, 曹济民<sup>1</sup>, 王亚静<sup>1</sup>

(1.山西医科大学基础医学院, 山西 太原 030001;

2.山西医科大学附属人民医院/山西省人民医院检验科, 山西 太原 030001;

3.山西医科大学第二医院内分泌科, 山西 太原 030001)

**摘要:**目的 基于生物信息学技术深度挖掘人糖尿病心肌病相关数据库,揭示尼古丁对糖尿病心肌病(DCM)的作用靶点进而阐明其相关机制。方法 通过 3 大数据库(GEO 数据库、Drug bank 数据库、STRING 数据库)和 WGCNA 分析对 DCM 和尼古丁的相关基因进行筛选,揭示尼古丁影响 DCM 的潜在的 hub 基因,基于 hub 基因本体(GO)分析和基因组百科全书(KEGG)分析,通过 Cytoscape 软件构建影响 DCM 的 hub 基因网络以及关键靶点相关通路的交互图,进一步对 hub 基因和疾病调控基因进行相关性分析,鉴定 hub 基因与免疫浸润的关系,最后构建 hub 基因参与的 miRNA-mRNA 共表达网络,预测 hub 基因的转录因子,同时 ROC 曲线探讨靶点与 DCM 发生发展的关系。结果 共筛选出 630 个差异基因,共 2 个 hub 基因:神经元乙酰胆碱受体  $\beta 4$  亚基(Chrb4)、细胞色素酶 P4501A1(Cyp1a1),其主要参与  $\text{Fe}^{3+}$  反应、维甲酸生物合成过程和影响色氨酸代谢、卵巢类固醇生成;尼古丁通过 hub 基因加重 DCM 心肌病进程主要与免疫细胞含量显著相关,此调节过程涉及 35 个 miRNA,2 个 mRNA,Cyp1a1 转录因子;ROC 曲线显示 Chrb4 (AUC:0.707)、Cyp1a1(AUC:0.769)可作为 DCM 心肌病的诊断指标。结论 尼古丁可加重 DCM 心肌病的进程,其与 Chrb4、Cyp1a1 相关并通过 miRNA-RNA 交互调节免疫细胞含量,从而可为治疗吸烟人群中 DCM 患者心脏的损伤情况提供新的思路。

**关键词:** 生物信息学;糖尿病心肌病;尼古丁;分子机制**中图分类号:** R541.4;R363.2**文献标识码:** A**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-1959.2022.23.006**文章编号:** 1006-1959(2022)23-0032-10

## The Mechanism of Nicotine Influence on Diabetic Cardiomyopathy

ZHAO Jing<sup>1</sup>, GUO Rui<sup>1</sup>, MENG Zhi-jun<sup>2</sup>, LIU Cai-hong<sup>1</sup>, XIE Yao-li<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>3</sup>, CAO Ji-min<sup>1</sup>, WANG Ya-jing<sup>1</sup>

(1.College of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China;

2.Department of Clinical Laboratory, Affiliated People's Hospital of Shanxi Medical University/

Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan 030001, Shanxi, China;

3.Department of Endocrinology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China)

**Abstract: Objective** To explore the related database of human diabetic cardiomyopathy based on bioinformatics technology, reveal the target of nicotine on diabetic cardiomyopathy (DCM) and elucidate its related mechanism. **Methods** The related genes of DCM and nicotine were screened by three major databases (GEO database, Drug bank database, STRING database) and WGCNA analysis, and the potential hub genes of nicotine affecting DCM were revealed. Based on hub gene ontology (GO) analysis and genome encyclopedia (KEGG) analysis, the interaction diagram of hub gene network and key target related pathways affecting DCM was constructed by Cytoscape software, and the correlation between hub genes and disease regulatory genes was further analyzed to identify the relationship between hub genes and immune infiltration. Finally, a miRNA-mRNA co-expression network involving hub genes was constructed to predict the transcription factors of hub genes, and the ROC curve was used to explore the relationship between the target and the occurrence and development of DCM. **Results** A total of 630 differential genes were screened out, including two hub genes: neuronal acetylcholine receptor  $\beta 4$  subunit (Chrb4) and cytochrome P4501A1 (Cyp1a1), which were mainly involved in  $\text{Fe}^{3+}$  reaction, retinoic acid biosynthesis, tryptophan metabolism and ovarian steroid production. The process of nicotine aggravating DCM cardiomyopathy through hub gene was mainly related to the content of immune cells, which was involved 35 miRNAs, 2 mRNAs, Cyp1a1 transcription factor; ROC curve showed that Chrb4 (AUC: 0.707) and Cyp1a1 (AUC: 0.769) could be used as diagnostic indicators for DCM cardiomyopathy. **Conclusion** Nicotine can aggravate the process of DCM cardiomyopathy, which is related to Chrb4 and Cyp1a1 and regulates the content of immune cells through miRNA-RNA interaction, thus providing a new idea for the treatment of cardiac injury in DCM patients in smoking population.

**Key words:** Bioinformatics; Diabetic cardiomyopathy; Nicotine; Molecular mechanisms

糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 是糖尿病患者的主要并发症之一,是由糖代谢紊乱引起以心脏结构和功能障碍为主要病理改变的一

种特异性心肌病变<sup>[1]</sup>,早期表现为左心室僵硬,舒张功能和顺应性降低。随着时间延长及病变加重,患者逐渐出现心脏收缩功能受损,及其引起的呼吸困难等症状,最终发展为充血性心力衰竭。糖尿病患者数量的逐年增加导致 DCM 的发病率和病死率持续攀升<sup>[2]</sup>。但是,目前 DCM 诱发心脏重构和功能障碍的机制尚不清楚。吸烟是心血管疾病和 2 型糖尿病的独立危险因素<sup>[3]</sup>。有研究指出<sup>[4]</sup>,吸烟者糖尿病患病风险增加 26%。尼古丁是香烟烟雾的主要活性化合物之一<sup>[5]</sup>。长期暴露于高水平尼古丁是诱发和促发包括心肌病和周围血管疾病在内的心血管疾病

基金项目:1.国家自然科学基金资助项目(编号:81670278);2.国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:82000799);3.山西省应用基础研究项目青年科技研究基金资助项目(编号:201801D221397)

作者简介:赵静(1996.11-),女,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事循环生理研究

通讯作者:王亚静(1974.3-),女,河北石家庄人,博士,教授,主要从事循环生理研究

的致病因素<sup>[6]</sup>。目前尼古丁促进 DCM 的机制还有待明确。本研究通过 3 大数据库 (GEO 数据库、Drug bank 数据库、STRING 数据库) 和 WGCNA 分析对 DCM 和尼古丁的相关基因进行筛选,旨在运用生物信息学技术分析探讨尼古丁对 DCM 的影响及其作用机制,为吸烟人群中 DCM 患者的治疗提供新的思路。

## 1 资料与方法

1.1 资料来源 从 GEO 公共数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载 GSE4745 的 Series Matrix File 数据文件,注释平台为 GPL85,共 24 组转录组数据,正常组 12 例,疾病组 12 例;下载 GSE99203 的 Series Matrix File 数据文件,注释平台为 GPL14745,共 6 组转录组数据,包含正常组 3 例,疾病组 3 例;用 SVA 算法进行芯片之间的数据矫正,探讨疾病相关分子机制的差异。

### 1.2 方法

1.2.1 WGCNA 分析 根据患者的表达谱数据构建 WGCNA 网络,探讨 DCM 中相关的共表达网络。通过构建加权基因共表达网络,寻找协同表达的基因模块,并探索基因网络与表型之间的关联关系以及网络中的关键基因。利用“WGCNA-R”包构建数据集中基因的共表达网络,筛选方差前 10 000 的基因用该算法进行筛选,以便进一步分析,其中软阈值设置为 9。将加权邻接矩阵转化为拓扑重叠度矩阵 (TOM) 来估计网络连接度,运用层次聚类的方法来构建 TOM 矩阵的聚类树结构。聚类树的不同分支代表不同的基因模块,不同颜色代表不同的模块。基于基因的加权相关系数,将基因按照表达模式进行分类,模式相似的基因归为一个模块,最后,几万个基因通过基因表达模式被分成了多个模块。

1.2.2 尼古丁作用靶点分析 通过 DrugBank 数据库 (<https://www.drugbank.ca/>) 检索尼古丁相关的靶基因。

1.2.3 hub 基因的确定 通过 string 数据库 (<https://string-db.org/>) 查找药物相关的基因,并将置信度得分 > 0.4 作为截点标准,得到 113 个靶点相关的基因。将 113 个靶点基因与 WGCNA 中 turquoise 模块的基因取交集,确定 hub 基因。

1.2.4 免疫基因相关性 通过分析 DCM 数据集中 hub 基因与免疫浸润的关系,进一步探讨 hub 基因影响 DCM 进展的潜在分子机制。使用 CIBERSORT 算法对正常组和糖尿病组的患者 RNA-seq 数据进行分析,用来推断样本免疫浸润细胞的相对比例。使用“corrplot”包分析免疫细胞之间的相互作用关系,进一步分析免疫细胞的作用关系的影响。采用“vioplot”包绘制免疫细胞的相对含量高低,评价基因对免疫浸润的影响,并对基因表达量以及免疫细

胞含量进行 Spearman 相关性分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。从 TISIDB 数据库 (<http://cis.hku.hk/TISIDB/>) 获得 chemokine、Immunoinhibitor、Immunostimulator、MHC、receptor 的相关基因,将核心基因与免疫相关基因进行 pearson 相关性分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

1.2.5 GO 和 KEGG 功能分析 利用 R 包“clusterprofiler”对 WGCNA 基因模块分析中的特定基因和 2 个 hub 基因进行 GO 富集和 KEGG 通路分析,使用 Metascape 数据库 (<http://metascape.org/>) 进行注释和可视化,  $\text{Minoverlap} \geq 3$  且  $P \leq 0.01$  为统计学意义显著。

1.2.6 受试者工作特性曲线 (ROC) 评价核心靶点 通过使用 R 语言 (version 3.6) pROC 包绘制 ROC 曲线,探讨靶点与 DCM 发生发展的诊断效能关系,评价 hub 基因与 DCM 的关联程度。

1.2.7 hub 基因参与的 miRNA-mRNA 调控网络和转录因子调控网络分析 通过 Targetscan 数据库 ([http://www.targetscan.org/mamm\\_31/](http://www.targetscan.org/mamm_31/)) 分析 hub 基因参与的 miRNA-mRNA 调控网络,通过 TRRUST 数据库 (<http://www.grnpedia.org/trrust/>) 将模块基因映射到转录因子 (TF) 调控网络中,得到模块基因-TF 调控关系,并用 cytoscape 进行可视化。

1.3 统计学方法 采用 R 语言 (version 3.6) 进行统计学分析,使用 limma 软件包计算有关 DCM 的两个数据集间的差异基因,应用 WGCNA-R 软件包构建数据集中基因的共表达网络,利用 clusterprofiler 软件包对 WGCNA 基因模块分析中的特定基因和 hub 基因进行 GO 富集和 KEGG 通路分析,应用 pheatmap 包分别分析和绘制免疫细胞表达热图,采用 vioplot 包绘制小提琴图,使用 corrplot 包绘制不同免疫细胞间的占比相关图。免疫细胞含量差异分析采用 Wilcoxon 检验、关键基因与免疫细胞的相关性用的是 Spearman 检验,关键基因与免疫相关基因的相关性用的是 Pearson 检验。运用 pROC 软件包绘制 ROC 曲线,探讨 hub 基因与 DCM 发生发展的诊断效能关系。所有统计检验均为双侧,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 DCM 数据集差异基因的筛选 从 GEO 数据库下载 GSE4745 以及 GSE99203 相关的数据集,共纳入 30 例患者的表达谱数据,其中正常组 15 例,疾病组 15 例。使用 SVA 算法对芯片进行矫正,用 PCA 图展示矫正前后的差异情况。结果显示,SVA 算法矫正后芯片间批次效应消除 (图 1、图 2)。进一步使用“limma”包计算两组患者之间的差异基因,随后提取出 630 个差异基因绘制火山图,并用于后续构建 WGCNA 网络 (图 3)。

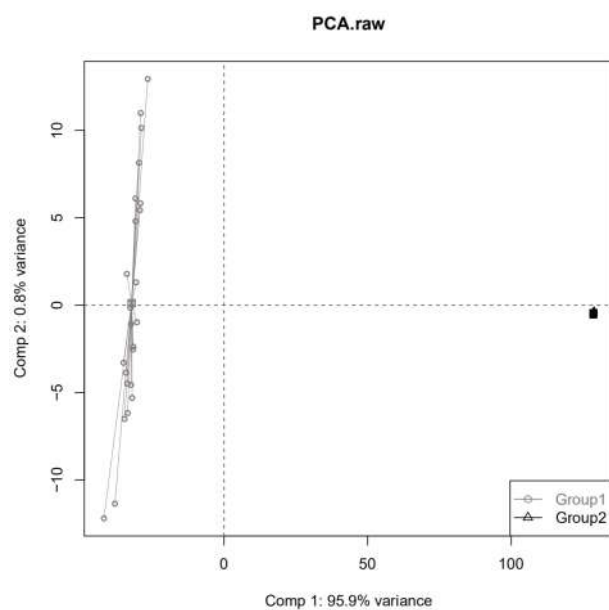


图 1 基因表达数据矫正前的 PCA 图

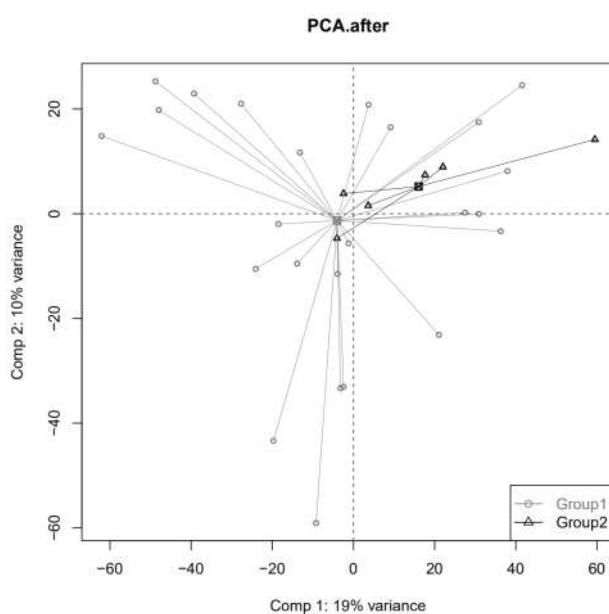
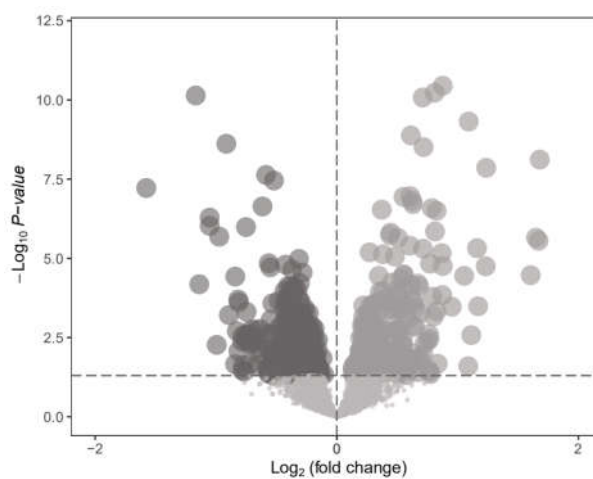


图 2 基因表达数据矫正后的 PCA 图



注:左侧代表下调的差异基因,右侧代表上调的差异基因

图 3 差异基因火山图

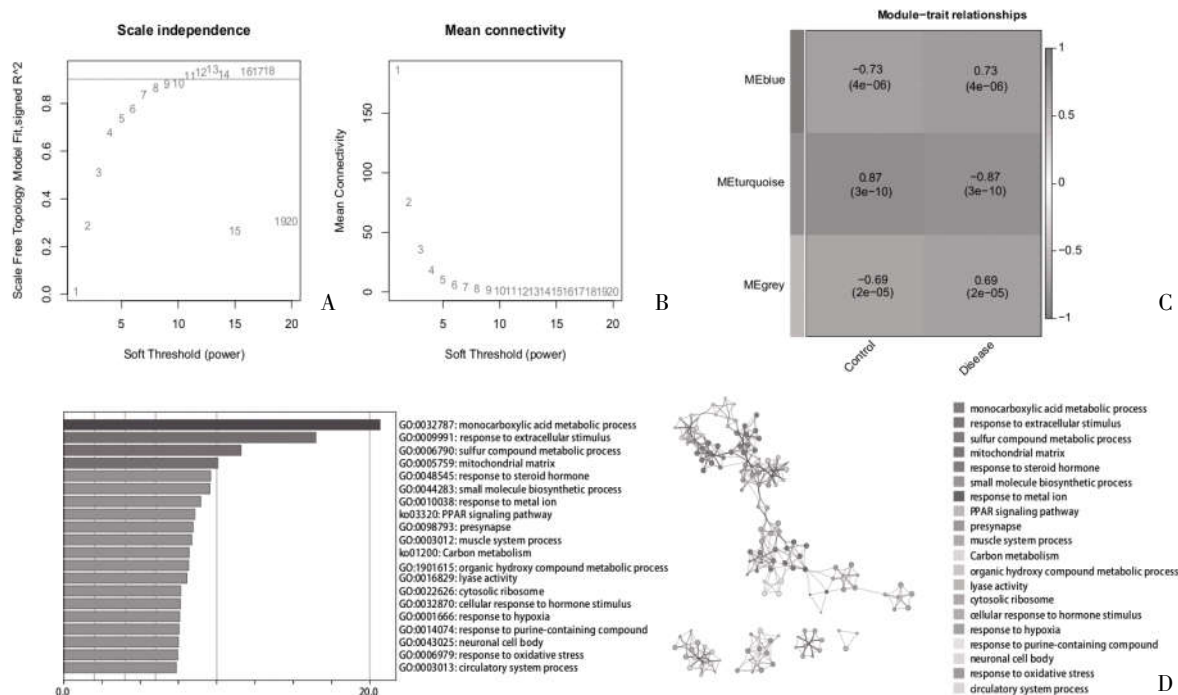
**2.2 WGCNA 分析** 首先,软阈值  $\beta$  由函数“`sft$powerEstimate`”确定(图 4A,4B),然后基于 TOM 矩阵检测基因模块,在本次分析中共检测到 3 个基因模块,分别为 blue 模块(202)、grey 模块(31)、turquoise 模块(397)。进一步通过模块与性状之间的分析,发现 turquoise 模块与表型相关性最高( $\text{cor}=0.87, P=3\text{e}-10$ )(图 4C)。对 turquoise 模块的基因进行 Metascape 通路分析,结果显示,基因主要富集在一元羧酸的代谢过程(monocarboxylic acid metabolic process)、对细胞外刺激的反应(response to extracellular stimulus)、硫化物代谢过程(sulfur compound metabolic process)等通路(图 4D)。

**2.3 尼古丁相关靶点预测和 hub 基因筛选** Drug bank 数据库检索出尼古丁作用靶点 13 个,分别是 CHAT、CYP19A1、CHRNA4、CHRNA3、CHRNA2、CHRNA9、CHRNA6、CHRNA5、CHRNA7、CHRNA4;然后再通过 STRING 数据库查找靶点相关的基因,拓展不少于 100 个数的基因调控网络,得到 113 个靶点相关的基因网络(图 5)。将 113 个靶点基因与 WGCNA 中 turquoise 模块的基因取交集,共得到 2 个 hub 基因 Chrb4、Cyp1a1(图 6)。

**2.4 尼古丁影响 DCM 的 hub 基因网络构建** GO 富集结果显示,2 个 hub 基因主要涉及的通路为  $\text{Fe}^{3+}$  反应[response to iron(III)ion]、维甲酸生物合成过程(retinoic acid biosynthetic process)(图 7A);KEGG 富集结果显示,2 个 hub 基因主要涉及的通路为色氨酸代谢(Tryptophan metabolism)、卵巢类固醇发

生(Ovarian steroidogenesis)(图 7B)。进一步使用 Cytoscape 软件,生成了 hub 基因影响 DCM 的网络以及核心靶点相关通路的交互图,图表清晰显示 2 个 hub 基因 Chrb4、Cyp1a1 的分子机制以及其对 DCM 的调控作用(图 7C)。

**2.5 DCM 数据集及 hub 基因的免疫浸润分析** 通过分析在糖尿病心肌病数据集中核心基因与免疫浸润的关系,进一步探讨核心基因影响糖尿病心肌病进展的潜在分子机制。22 种免疫细胞热图显示一些免疫细胞,如 M1 型巨噬细胞、中性粒细胞的细胞、B 细胞、滤泡辅助性  $\text{CD4}^+$  T 细胞、 $\text{CD4}^+$  记忆性 T 细胞、 $\text{CD4}^+$  初始 T 细胞、 $\text{CD8}^+$  初始 T 细胞、调节性 T 细胞、Th17 细胞、未成熟的 DC 细胞、活化的 DC 细胞在正常组和疾病组中的细胞免疫浸润情况有较为明显的差异(图 8A)。22 种免疫细胞相关性热图显示记忆 B 细胞和初始 B 细胞、 $\text{CD8}^+$  初始 T 细胞和  $\text{CD4}^+$  初始 T 细胞、 $\text{CD4}^+$  记忆性 T 细胞和 Th17 细胞呈正相关,而调节性 T 细胞和未成熟的 DC 细胞、嗜酸性细胞和肥大细胞、滤泡辅助性  $\text{CD4}^+$  T 细胞和活化的 DC 细胞呈负相关(图 8B)。小提琴图结果显示静息的 NK 细胞、 $\text{CD8}^+$  初始 T 细胞、初始 B 细胞参与免疫浸润过程多。与正常对照组相比浆细胞、调节性 T 细胞、静息的 NK 细胞、中性粒细胞、未成熟的 DC 细胞参与细胞免疫浸润过程较多,而嗜酸性细胞、肥大细胞、M1 巨噬细胞、活化的 DC 细胞参与细胞免疫浸润过程较少(图 8C)。2 个 hub 基因均与免疫细胞含量有较强的相关性(图 8D),结果符合预期。



注:A:不同软阈值(权重)下的无标度匹配指数;B:不同软阈值(权重)下的平均连通性分析;C:模块-表型相关性热图;D:对 turquoise 模块的基因进行 Metascape 通路分析

图4 WGCNA 表达谱数据中临床特征相关的关键模块及 Metascape 通路分析

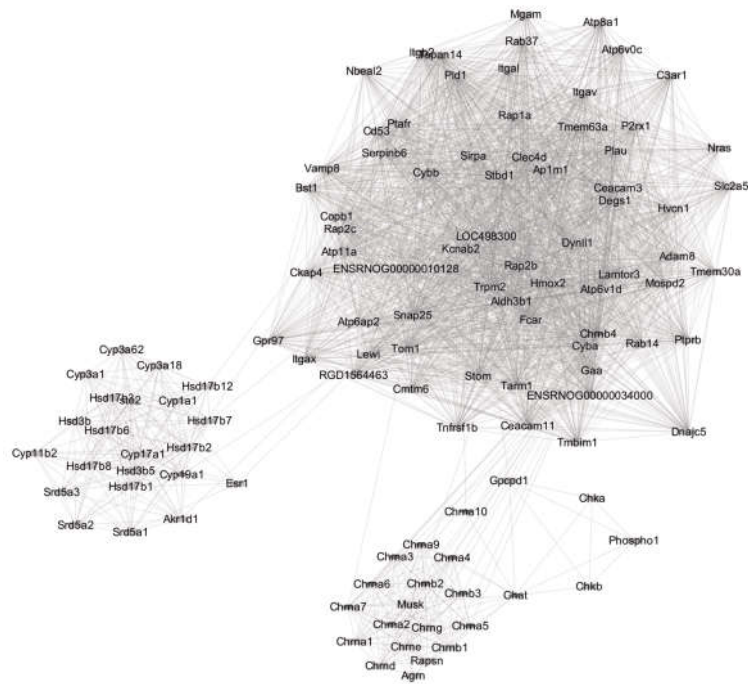


图 5 113 个尼古丁靶点相关基因调控网络

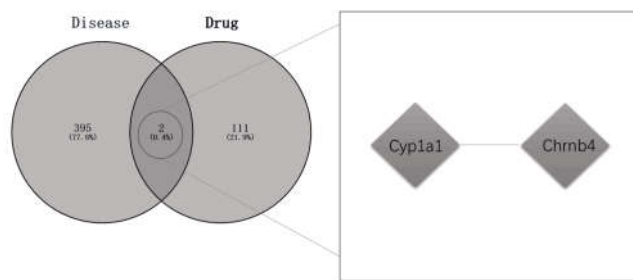
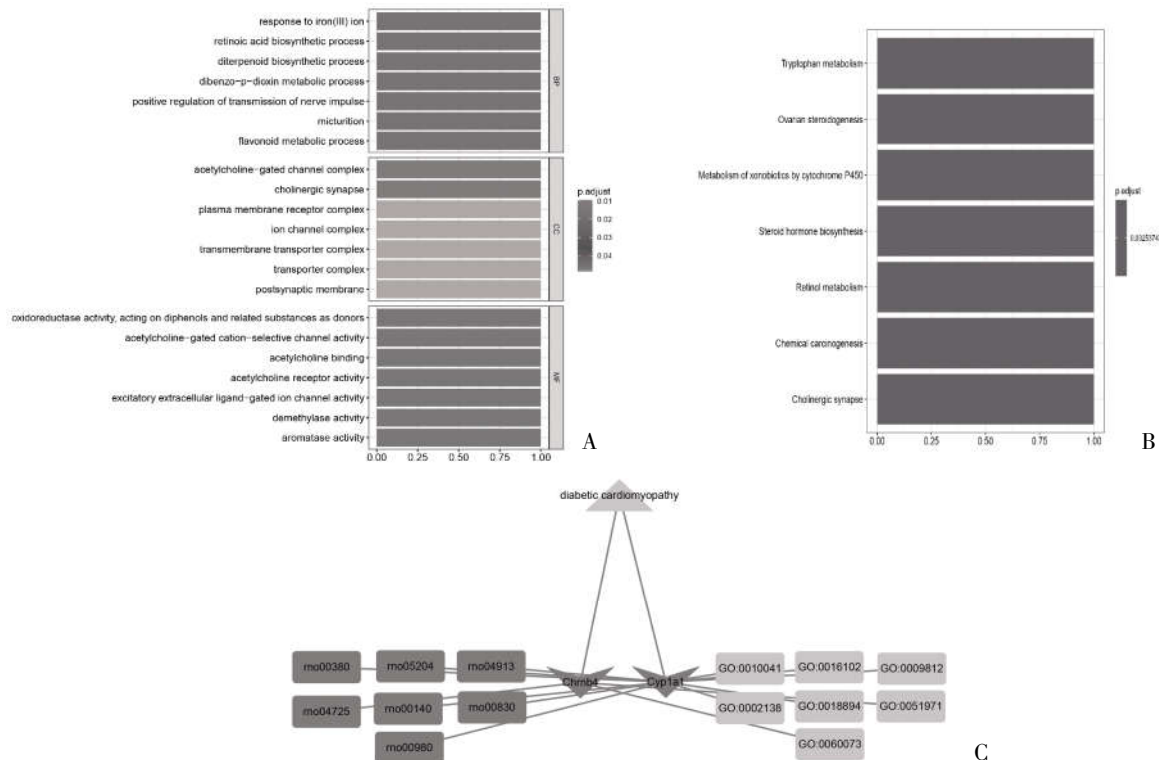


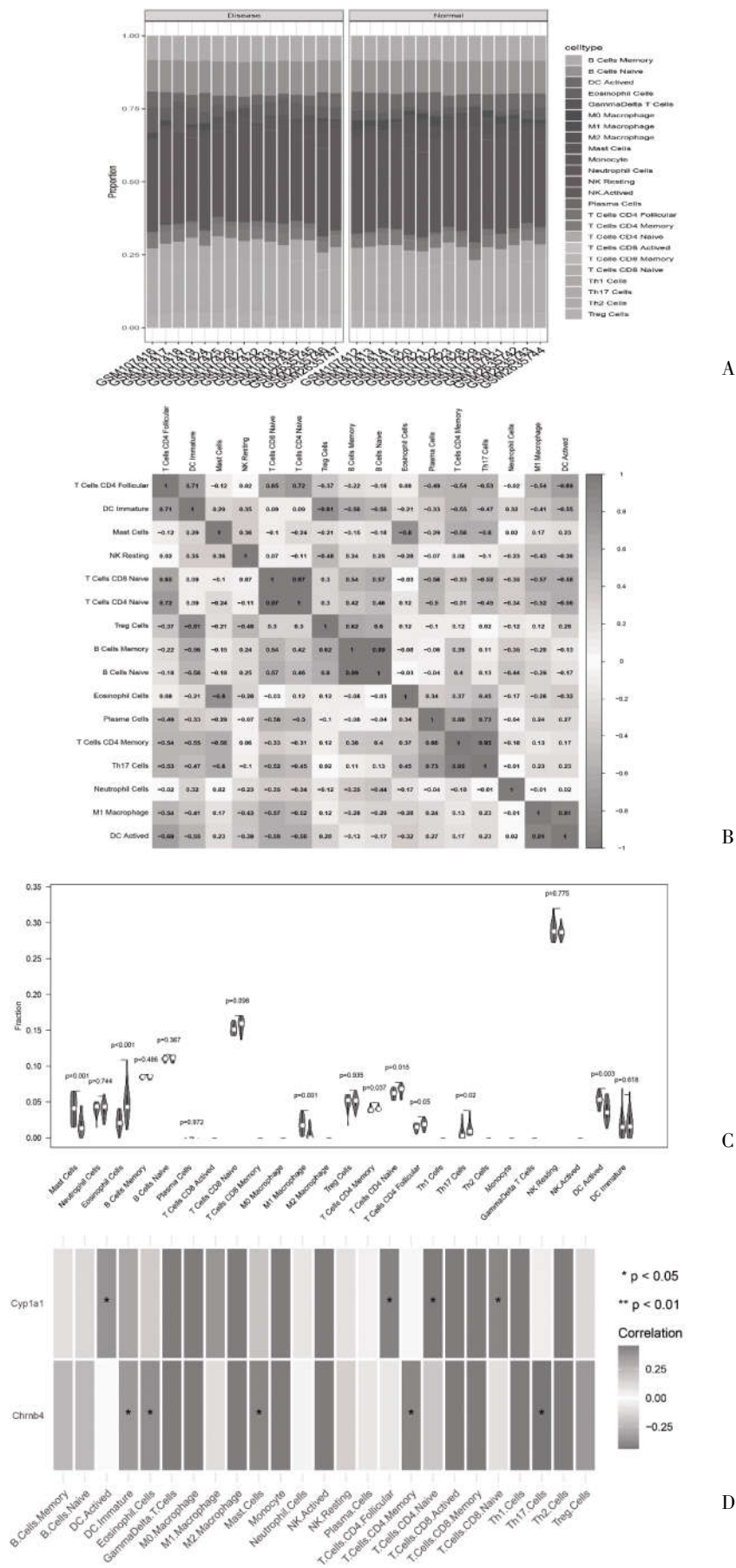
图 6 确定 hub 基因



注: A: GO 富集结果; B: KEGG 富集结果; C: hub 基因影响 DCM 的网络以及核心靶点相关通路的交互图

图 7 hub 基因网络构建





注:A:免疫浸润热图;B:免疫浸润分析相关性热图;C:免疫浸润分析小提琴图;D:hub 基因与细胞含量相关性图

图 8 免疫浸润分析

2.6 hub 基因的免疫调控 hub 基因与免疫基因的相关性分析结果表明,Chrb4 与 Ccl20、Ccl11、Cxcl10、Il10、Cd28、Tap1、Cxc5、Ccr3 呈正相关;Cyp1a1 与 Ccl5、Cd48、Ccr5 呈负相关,见图 9。

2.7 hub 基因的 ROC 分析 2 个 hub 基因的 AUC 值分别是 Chrb4 (AUC:0.707;95% CI:0.511~0.902)、Cyp1a1 (AUC:0.769;95% CI:0.580~0.958),提示 2 个

hub 基因均能较好的预测疾病的发生发展(图 10A、10B)。

2.8 hub 基因的 miRNA-mRNA 网络和 TF 调控网络 本研究共预测 40 个 miRNA-mRNA 作用关系对,其中 35 个 miRNA,2 个 mRNA,见图 11;hub 基因 Cyp1a1 的转录调控网络见图 12。

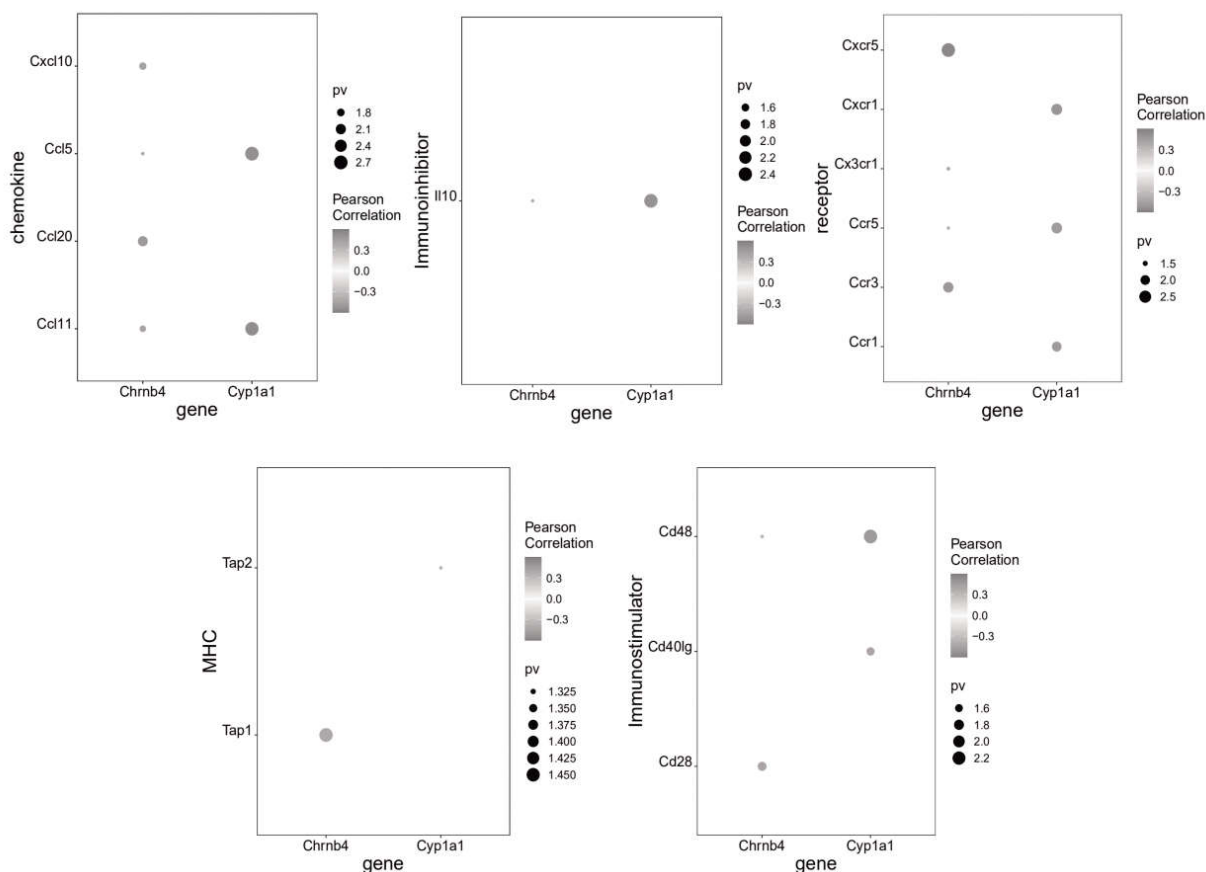
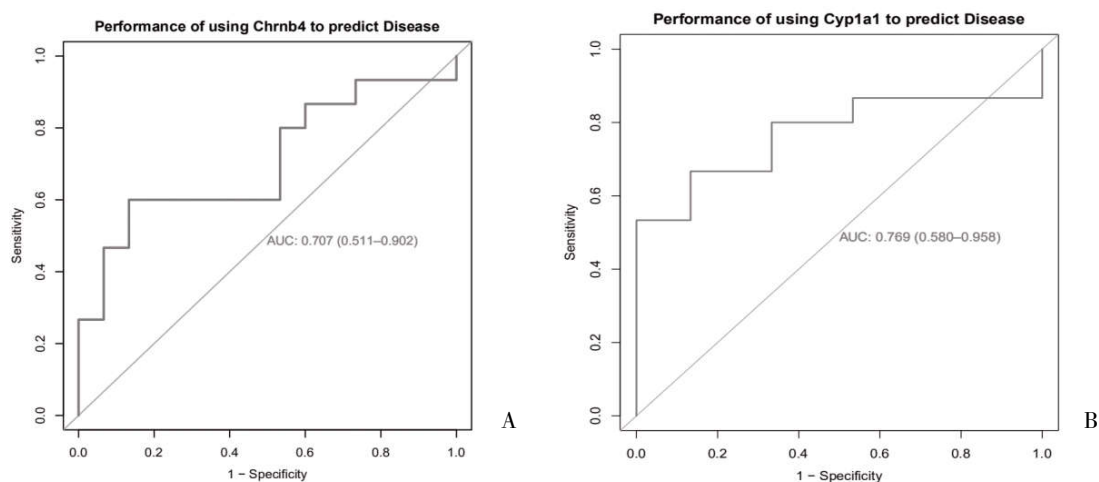


图 9 hub 基因免疫调控结果



注:A:Chrb4 的预测效能;B:Cyp1a1 预测效能

图 10 ROC 分析结果

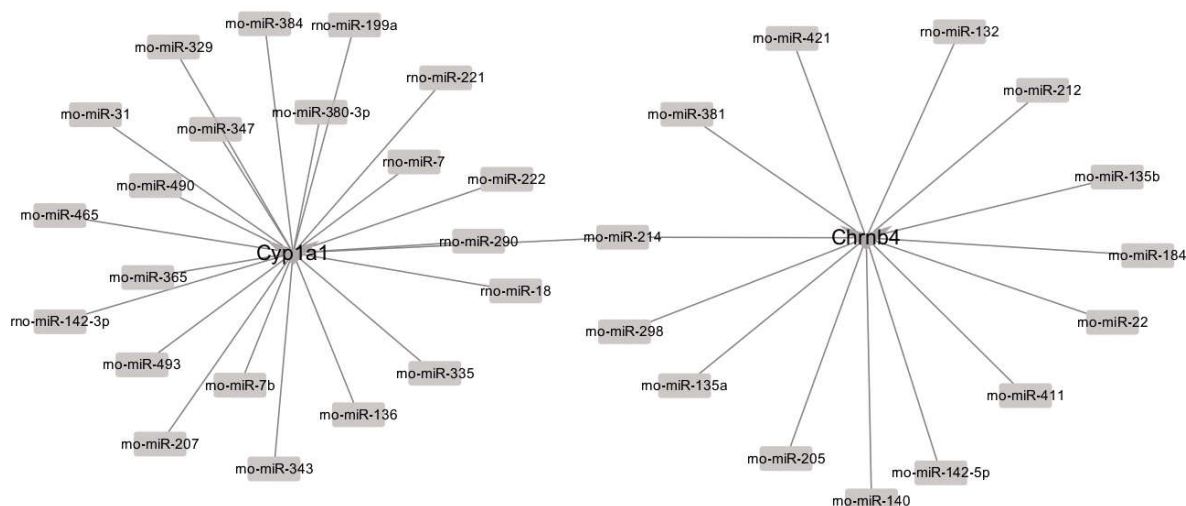


图 11 hub 基因 miRNA-RNA 共表达网络图

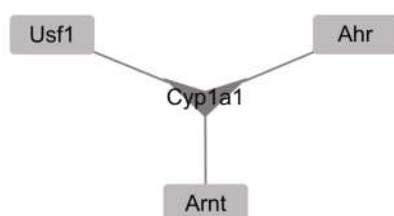


图 12 Cyp1a1 转录调控网络

### 3 讨论

DCM 是糖尿病严重的心血管并发症,是目前临床实践中导致心力衰竭的主要原因之一,发病率和死亡率较高<sup>[7]</sup>。吸烟是糖尿病心肌病的主要危险因素,显著增加心脏病患病风险<sup>[8]</sup>。尼古丁是香烟烟雾的主要活性化合物之一,已被证明对心血管系统有不利影响。本研究通过 3 大数据库(GEO 数据库、Drug bank 数据库、STRING 数据库)和 WGCNA 分析对 DCM 和尼古丁的相关基因进行分析筛选,分析尼古丁加重 DCM 的潜在诊断生物标志物。

本研究从 GEO 数据库下载 DCM 的表达谱数据集,通过 WGCNA 分析,构建加权基因共表达网络,基于 TOM 矩阵检测基因模块,在本次分析中共检测到 3 个基因模块,分别为 blue(202)、grey(31)、turquoise (397)。进一步通过模块与性状之间的分析,发现 turquoise 模块与表型相关性最高。对 turquoise 模块的基因进行 Metascape 通路分析,结果显示,基因主要富集在一元羧酸的代谢过程、对细胞外刺激的反应、硫化物代谢过程等。表明这些生物学过程调控 DCM 的发生与发展。

本研究根据 WGCNA 分析、Drug bank 数据库和 STRING 数据库, 共得到 2 个 hub 基因 Chnrb4、Cyp1a1, 提示其可能为尼古丁影响 DCM 的潜在靶点。使用 Cytoscape 软件生成了 hub 基因影响 DCM 的网络以及核心靶点相关通路的交互图, 该图表清

晰显示 2 个 hub 基因 *Chrn4*、*Cyp11a1* 的分子机制以及其对 DCM 的调控作用。编码 nAChR $\beta 4$  亚基的 *Chrn4* 基因广泛存在于气道上皮细胞,并形成异质 nAChR 来调节尼古丁受体的亲和力。有研究证明激动剂 1,1-二甲基-4-苯基哌嗪碘化(DMPP)选择性靶向  $\alpha 3\beta 4$  nAChR,通过增加棕色脂肪、心脏和骨骼肌中的葡萄糖摄取,显著改善了糖耐量<sup>[9]</sup>。此外,人类 *Chrn4* 基因中跨越 *MafA* 结合区域的多态性与 2 型糖尿病相关<sup>[10]</sup>。*Cyp11a1* 参与了大量的外源性和内源性底物代谢,在药物和环境化学物质的代谢中起着关键作用。有研究表明在健康人心中,*Cyp11a1* mRNA 的表达量极低,它对内源性底物代谢具有重要作用<sup>[11]</sup>。这些底物参与了氨基酸(AA)和色胺的代谢。慢性克山病和 DCM 患者血液中 *Cyp11a1* 和 *Cyp2c19* 的 mRNA 水平均高于健康人,说明心脏结构和功能损伤与 AA 依赖的 CYP 代谢途径之间可能存在因果关系<sup>[12]</sup>。有证据表明 *Cyp450* 通过 AA 的代谢调节心肌细胞的收缩性<sup>[13]</sup>。也有研究指出 *Cyp11a1* 的上调会加重心肌损伤<sup>[12]</sup>。

微环境主要由免疫细胞、细胞外基质、多种生长因子、炎症因子及特殊的理化特征等共同组成,显著影响着疾病的诊断和临床治疗敏感性。越来越多的证据表明,多种免疫细胞与 DCM 的发生和进展密切相关。因此,本研究在前面分析结果的基础上采用 CIBER-SORT 对 DCM 及 DCM 数据集中核心基因进行免疫细胞浸润分析,初步探讨免疫细胞浸润在 DCM 中的作用并进一步探讨 hub 基因影响 DCM 进展的潜在分子机制。结果显示 M1 型巨噬细胞、中性粒细胞的细胞、B 细胞、滤泡辅助性 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup>记忆性 T 细胞、CD4<sup>+</sup>初始 T 细胞、CD8<sup>+</sup>初始 T 细胞、调节性 T 细胞、Th17 细胞、未成熟的 DC 细胞、活化的 DC 细胞在正常组和疾病组中的细胞免



疫浸润情况有差异。说明这些免疫细胞在 DCM 的发生和发展过程中起到了重要作用。同时,本研究结果显示,2 个 hub 基因与免疫细胞含量有较强的相关性,说明 2 个 hub 基因是影响 DCM 免疫浸润的候选基因。而控制炎症的始发因素,调控特定的细胞亚群或者相关的炎症通路可能预防或改善 DCM 的进程和病理过程。有研究表明<sup>[14]</sup>,在胰岛素抵抗或肥胖状态下,M1 型巨噬细胞分泌炎症细胞因子,降低心脏和全身胰岛素信号,促进 DCM 的发展。此外,与健康人群相比,糖尿病患者中性粒细胞对细胞因子和生长因子如 IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-1ra 表现出更高的反应和分泌水平,进一步促进中性粒细胞向炎症部位迁移、吞噬、溶解蛋白酶的释放、ROS 的产生和凋亡<sup>[15]</sup>。大量的实验和临床研究表明,适应性免疫,特别是 T 淋巴细胞介导的免疫,在糖尿病和 DCM 的发病机制中可能起着重要的作用。有研究报道<sup>[16]</sup>,T 细胞浸润与 DCM 的风险增加有关,而在体外诱导 DCM 实验中 T 细胞的减少发挥心脏保护作用。在 DCM 中 T 细胞亚型异常改变,导致促炎和抗炎免疫失衡,从而调节炎症反应和胰岛素抵抗。据报道 Th1 和 Th17 亚群的增加促进 DCM 发展<sup>[17]</sup>。辅助性 T 细胞分泌趋化因子、生长因子和促炎细胞因子的增加导致心脏功能受损和心脏纤维化增加,而调节性 T 细胞(Treg)通常会减弱心脏辅助性 T 细胞的促炎作用<sup>[18]</sup>。另一项研究报道<sup>[19]</sup>,Treg 细胞可通过抑多种途径抑制 Th1 和 Th17 反应,从而改善糖尿病患者的胰岛素抵抗。B 细胞介导的免疫可以促进自身免疫性糖尿病小鼠的心功能障碍<sup>[20]</sup>。本研究结果与上述研究相似,均表明 DCM 发展过程中的免疫细胞活化的改变与心脏炎症增强有关。

免疫检查点是在免疫细胞上表达、能调节免疫激活程度的一系列分子,它们对防止自身免疫(免疫功能发生异常,对正常细胞发动攻击)作用的发生,起着重要作用。本研究免疫调控分析结果表明,Chrb4 与 Ccl20、Ccl11、Cxcl10、Il10、Cd28、Tap1、Cxcr5、Ccr3 呈正相关;Cyp1a1 与 Ccl5、Cd48、Ccr5 呈负相关。表明这些免疫分子在 DCM 病进展的过程中对 hub 基因起到重要调控作用,这些分子的表达和功能异常是 DCM 发生的重要原因之一,如果能针对这些免疫检查点分子进行调节,比如用靶向检查点分子的抑制剂就可以增强机体的免疫功能。ROC 分析显示,2 个 hub 基因的 AUC 值分别是 Chrb4 (AUC:0.707;95% CI:0.511~0.902)、Cyp1a1 (AUC:0.769;95% CI:0.580~0.958),提示 2 个 hub 基因均能较好的预测疾病的发生发展。由此推测 Chrb4 和 Cyp1a1 可能参与 DCM 的发生及进展,有望成为 DCM 的潜在新型诊断生物学标志物。但仍

需进一步实验验证。

随着分子生物学技术的发展,越来越多的证据表明,非编码 RNA 参与糖尿病心肌病的分子机制<sup>[21]</sup>。基因表达受多个调控因子在不同水平上的调控,其中包括染色体修饰、DNA 甲基化、转录调控、mRNA 的可变剪接及降解、转录后调控以及蛋白质修饰等。TF 和 miRNA 作为 2 种关键的调控因子在转录和转录后水平调控中发挥着至关重要的作用。以 TF 和 miRNA 为核心形成的调控网络已经被证实是一种有效的分析与研究生物调控复杂性的方法。研究 TF 与 miRNA 组成的调控网络将对疾病的发生、发病机理在系统层次上提供重要的线索。因此,本研究在进一步通过 Targetscan 数据库探讨 2 个 hub 基因参与的 miRNA-mRNA 调控网络,结果共预测 40 个 miRNA-mRNA 作用关系对,其中 35 个 miRNA,2 个 mRNA,这可能为今后转录因子与 miRNA 调控通路的研究提供一定的理论基础。

综上所述,尼古丁可加重 DCM 心肌病的进程,其与 Chrb4、Cyp1a1 相关并通过 miRNA-RNA 互作调节免疫细胞含量,从而可为治疗吸烟人群中 DCM 患者心脏的损伤情况提供新的思路。

#### 参考文献:

- [1]Dillmann WH.Diabetic Cardiomyopathy[J].Circ Res,2019,124(8):1160-1162.
- [2]Murtaza G,Virk HUH,Khalid M,et al.Diabetic cardiomyopathy - A comprehensive updated review[J].Prog Cardiovasc Dis,2019,62(4):315-326.
- [3]Maddatu J,Anderson-Baucum E,Evans-Molina C.Smoking and the risk of type 2 diabetes[J].Transl Res,2017,184:101-107.
- [4]Cai X,Chen Y,Yang W,et al.The association of smoking and risk of diabetic retinopathy in patients with type 1 and type 2 diabetes: a meta-analysis[J].Endocrine,2018,62(2):299-306.
- [5]Sun L,Wang X,Gu T,et al.Nicotine triggers islet  $\beta$  cell senescence to facilitate the progression of type 2 diabetes[J].Toxicology,2020,441:152502.
- [6]Keith RJ,Riggs DW,Conklin DJ,et al.Nicotine Metabolism in Adults With Type 2 Diabetes [J].Nicotine Tob Res,2019,21(6):846-849.
- [7]Ritchie RH,Abel ED.Basic Mechanisms of Diabetic Heart Disease[J].Circ Res,2020,126(11):1501-1525.
- [8]Kezerle L,Yohanan E,Cohen A,et al.The impact of Heart Team discussion on decision making for coronary revascularization in patients with complex coronary artery disease [J].J Card Surg,2020,35(10):2719-2724.
- [9]Jall S,De Angelis M,Lundsgaard AM,et al.Pharmacological targeting of  $\alpha 3 \beta 4$  nicotinic receptors improves peripheral insulin sensitivity in mice with diet-induced obesity [J].Diabetologia,2020,63(6):1236-1247.

(下转第 49 页)

(上接第 40 页)

- [10]Ganic E,Singh T,Luan C,et al.MafA-Controlled Nicotinic Receptor Expression Is Essential for Insulin Secretion and Is Impaired in Patients with Type 2 Diabetes[J].Cell Rep,2016,14(8):1991-2002.
- [11]Michaud V,Frappier M,Dumas MC,et al.Metabolic activity and mRNA levels of human cardiac CYP450s involved in drug metabolism[J].PLoS One,2010,5(12):e15666.
- [12]Zhou B,Wang X,Li F,et al.Mitochondrial activity and oxidative stress functions are influenced by the activation of AhR-induced CYP1A1 overexpression in cardiomyocytes[J].Mol Med Rep,2017,16(1):174-180.
- [13]Alsaad AMS.Dasatinib induces gene expression of CYP1A1, CYP1B1, and cardiac hypertrophy markers (BNP,  $\beta$ -MHC) in rat cardiomyocyte H9c2 cells[J].Toxicol Mech Methods,2018,28(9):678-684.
- [14]Widiapradja A,Kasparian AO,McCaffrey SL,et al.Replace-ment of Lost Substance P Reduces Fibrosis in the Diabetic Heart by Preventing Adverse Fibroblast and Macrophage Phenotype Changes[J].Cells,2021,10(10):2659.
- [15]Ge T,Yu Y,Cui J,et al.The adaptive immune role of metallothioneins in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: good or bad[J].Am J Physiol Heart Circ Physiol,2019,317(2):H264-H275.
- [16]Tian CJ,Zhang JH,Liu J,et al.Ryanodine receptor and immune-related molecules in diabetic cardiomyopathy [J].ESC Heart Fail,2021,8(4):2637-2646.
- [17]Mishra PK,Ying W,Nandi SS,et al.Diabetic Cardiomyopathy: An Immunometabolic Perspective[J].Front Endocrinol(Lausanne),2017,8:72.
- [18]Frisancho-Kiss S,Coronado MJ,Frisancho JA,et al.Gonadectomy of male BALB/c mice increases Tim-3 (+) alternatively activated M2 macrophages, Tim-3 (+) T cells, Th2 cells and Treg in the heart during acute coxsackievirus-induced myocarditis[J].Brain Behav Immun,2009,23(5):649-657.
- [19]Bajpai A,Tilley DG.The Role of Leukocytes in Diabetic Cardiomyopathy[J].Front Physiol,2018,9:1547.
- [20]García-Rivas G,Castillo EC,Gonzalez-Gil AM,et al.The role of B cells in heart failure and implications for future immunomodulatory treatment strategies [J].ESC Heart Fail,2020,7(4):1387-1399.
- [21]Zhang W,Xu W,Feng Y,et al.Non-coding RNA involvement in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy [J].J Cell Mol Med,2019,23(9):5859-5867.

收稿日期:2022-03-07;修回日期:2022-04-20

编辑/成森