· 内分泌专栏 ·

糖尿病铜死亡生物标志物的鉴定与药物筛选

张楠楠[1]，田思思[2]，林登梅[3]，李 军[4*]

（1.贵州中医药大学基础医学院药理学教研室，贵州 贵阳 550025；2.贵州中医药大学基础医学院 2021 级医学实验技术班，贵州 贵阳 550025；3.贵州中医药大学药学院 2020 级中药学班，贵州 贵阳 550025；4.贵州中医药大学基础医学院，贵州 贵阳 550025）

［摘要］ **目的** 探索糖尿病（diabetes mellitus，DM）铜死亡（Cuproptosis）生物标志物以及进行药物筛选。**方法** 利用 GEO 数据库获取糖尿病 GSE25724 数据集作为训练集并筛选其差异表达基因，从文献获取 19 个铜死亡相关基因，两者取交集得到糖尿病铜死亡相关基因，对此基因进行验证（GSE23343 与 GSE20966 作为测试集）。对 DM 铜死亡基因进行基因相关性分析和富集分析。使用 DS BIOVIA Discovery Studio 2016 软件对关键基因与所预测的化合物进行分子对接。**结果** 共获得 6 个糖尿病相关的铜死亡基因（DBT、DLD、GLS、PDHB、NFE2L2 和 LIPT1），他们主要通过调控三羧酸循环的脂化、丙酮酸代谢、糖酵解糖质新生、HIF-1 等信号通路而参与有机酸代谢分解、丙酮酸乙酰辅酶 A 的合成和氨基酸代谢等生物学过程。这 6 个基因中 DLD、DBT、NFE2L2 在测试集样本中差异表达显著，且有较好的诊断价值，分子对接显示 DLD、DBT 可以与叶酸，NFE2L2 可与紫铆素，NFE2L2 可与木犀草素有较高的结合能力。**结论** 铜死亡相关基因 DLD、DBT、NFE2L2 在糖尿病的发生发展中起重要作用，本研究为糖尿病的发病机制及治疗研究提供数据支撑。

［关键词］ 糖尿病；铜死亡；计算生物学 doi：10.3969/j.issn.1007-3205.2024.05.014

［中图分类号］ R587.1 ［文献标志码］ A ［文章编号］ 1007-3205（2024）05-0573-07

Identification of cuproptosis biomarkers and drug screening in diabetes mellitus

ZHANG Nan-nan[1], TIAN Si-si[2], LIN Deng-mei[3], LI Jun[4*]

（1.*Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guizhou Province, Guiyang* 550025, *China*; 2.*Grade* 2021, *Class of Medical Experimental Technology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guizhou Province, Guiyang* 550025, *China*; 3.*Grade* 2020, *Class of Chinese Pharmacy, School of Basic Medical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guizhou Province, Guiyang* 550025, *China*; 4.*Department of Medical Laboratory Technology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guizhou Province, Guiyang* 550025, *China*）

［**Abstract**］ **Objective** To explore the biomarkers of cuproptosis in diabetes mellitus (DM) for drug screening. **Methods** The GEO database was used to obtain GSE25724 dataset of DM as a training set and screen its differentially expressed genes, and 19 cuproptosis-related genes were obtained from the literature. The intersection of the two was used to obtain cuproptosis-related genes in DM, which were then validated (GSE23343 and GSE20966 were used as a test set). Gene

［收稿日期］2023－02－03

［基金项目］贵州省卫生健康委科学技术基金（gzwkj2023-266）；贵州省科技厅自然科学项目（黔科合基础 ZK-［2023］一般 428）

［作者简介］张楠楠（1989－），女，河南沁阳人，贵州中医药大学基础医学院讲师，医学博士，从事糖尿病肾病药理学研究。

* 通信作者。E-mail：971339248@qq.com

correlation and enrichment analyses were performed on cuproptosis-related genes in DM. Molecular docking of key genes with predicted compounds was performed using DS BIOVIA Discovery Studio 2016 software. **Results** A total of six diabetes-associated cuproptosis-related genes (DBT, DLD, GLS, PDHB, NFE2L2, and LIPT1) were obtained, and they were involved in biological processes such as metabolic catabolism of organic acids, synthesis of pyruvate-acetyl-coenzyme A and amino acid metabolism, mainly through the regulation of the signaling pathways of the tricarboxylic acid (TCA) cycle of lipidation, pyruvate metabolism, glycolytic glucose de novo, and HIF-1. Among these six genes, DLD, DBT and NFE2L2 were significantly differentially expressed in the test set samples and had good diagnostic value. Molecular docking showed that DLD and DBT could have a high binding capacity with folic acid, NFE2L2 with Butin, and NFE2L2 with Luteolin. **Conclusion** Cuproptosis-related genes DLD, DBT, and NFE2L2 play an important role in the occurrence and development of DM, and this study provides data support for the studies of the pathogenesis and treatment of DM.

[**Key words**] diabetes mellitus; cuproptosis; computational biology

糖尿病(diabetes mellitus,DM)的典型特征是葡萄糖、蛋白质和脂肪代谢紊乱[1]。DM的发生、发展及其并发症会造成很多器官和组织损伤,致死致残的危险性非常大[2]。铜死亡即铜离子积累引起活性氧积累、蛋白酶体抑制和抗血管生成[3],进而导致细胞死亡,铜离子参与了人体细胞中的许多氧化还原反应[4]。铜可以促进胰岛素样生长激素、生长素释放肽的分泌,降低血糖水平[5]。铜水平的升高与DM的风险增加有着很大的关系[6]。本研究运用生物信息学以及分子对接筛选DM铜死亡潜在生物标志物及活性化合物,希望能为DM机制研究以及药物发现提供新思路。

1 材料与方法

1.1 DM差异基因的筛选 从GEO数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)获取DM的GSE25724数据集作为训练集(正常组,$n=7$;DM,$n=6$)。使用SangerBox数据库(http://vip.sangerbox.com/)中的limma快速差异分析对数据集GSE25724进行预处理(疾病组 *vs*. 对照组),以$P<0.050$、$|\log_2 FC|\geq 1$为条件筛选差异表达基因(DEGs)。筛选DM的数据集GSE23343与GSE20966作为测试集进行验证。

1.2 铜死亡相关基因与GSE25724交集基因的筛选 从文献[7]中收集铜死亡相关基因,并使用Venny2.1.1在线工具(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)获取GSE25724数据集的DEGs和铜死亡相关基因的交集基因。

1.3 交集基因的相关性分析使 用GeneMANIA数据库(http://genemania.org/)预测交集基因及邻近基因之间的关联后进行基因功能分析,并构建了基因-基因交互网络图。

1.4 GO功能以及KEGG通路富集分析 GO(Gene Ontology,基因本体论)是基因本体论联合会建立的一个数据库,主要包括生物过程、细胞成分和分子功能,旨在建立一个适用于各种物种的对基因和蛋白功能进行限定和描述,是将基因、基因产物和序列注释为潜在生物现象的常用方法。KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,京都基因与基因组百科全书)一个整合了基因组、化学和系统功能信息的综合数据库,专门存储不同物种中基因通路的信息。因此,将交集基因导入SangerBox数据库进行富集分析。

1.5 交集基因的验证与ROC分析 从GEO数据库寻找相关DM的数据集GSE20966与GSE23343作为测试集来验证交集基因的表达差异值,以及进行特异性敏感度分析即ROC曲线。通过GraphPad Prism 9以及微生信(http://www.bioinformatics.com.cn/)进行数据分析和ROC曲线绘制。

1.6 关键交集基因的潜在药物预测与分子对接 CTD数据库整合了大量化学物质、基因、功能表型和疾病之间相互作用数据,为药物潜在作用机制研究提供极大便利。将关键交集基因导入CTD数据库(http://ctdbase.org/)搜寻关键交集靶点的潜在药物。利用TCMSP数据库(https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php)搜索化合物的结构式,以OB(口服利用度)≥30,DL(drug-likeliss,类药性)>0.18为

筛选条件。从 UniProt（https://www.uniprot.org/）数据库中检索关键基因蛋白质结构，并从 RCSB PDB（https://www.rcsb.org/）数据库中下载相关蛋白结构。将关键交集靶点的蛋白结构和对应的化合物结构导入 DS BIOVIA Discovery Studio 2016 软件进行分子对接。

2　结　果

2.1　DM 差异基因分析　从 GEO 数据库获取 GSE25724 数据集（正常组 $n=7$，DM 组 $n=6$），使用 GEO2R 对其进行预处理（疾病组 *vs*. 对照组），以 $P<0.050$、$|\log_2 FC|\geq 1$ 为条件筛选差异表达基因。通过 R 语言（3.6.3 版本）绘制均一化小提琴图、PCA 图、火山图和热图。图 1A 所示为经均一化处理的 GSE25724 数据集结果，小提琴图中横坐标表示样本名，纵坐标表示基因在每一个样本中的表达值，箱体中横线为各样本的中位数。图 1B 所示 PCA 图显示了不同样本的差异性。图 1C 所示火山图，选定的阈值为 $|\log_2 FC|\geq 1$、$P<0.050$，满足这一阈值的个数有 1 526 个，其中，红色点代表上调基因 1 448 个，蓝色点代表下调基因 78 个。图 1D 所示热图，展示了多个基因在数据集 GSE25724 不同样本中的表达水平。

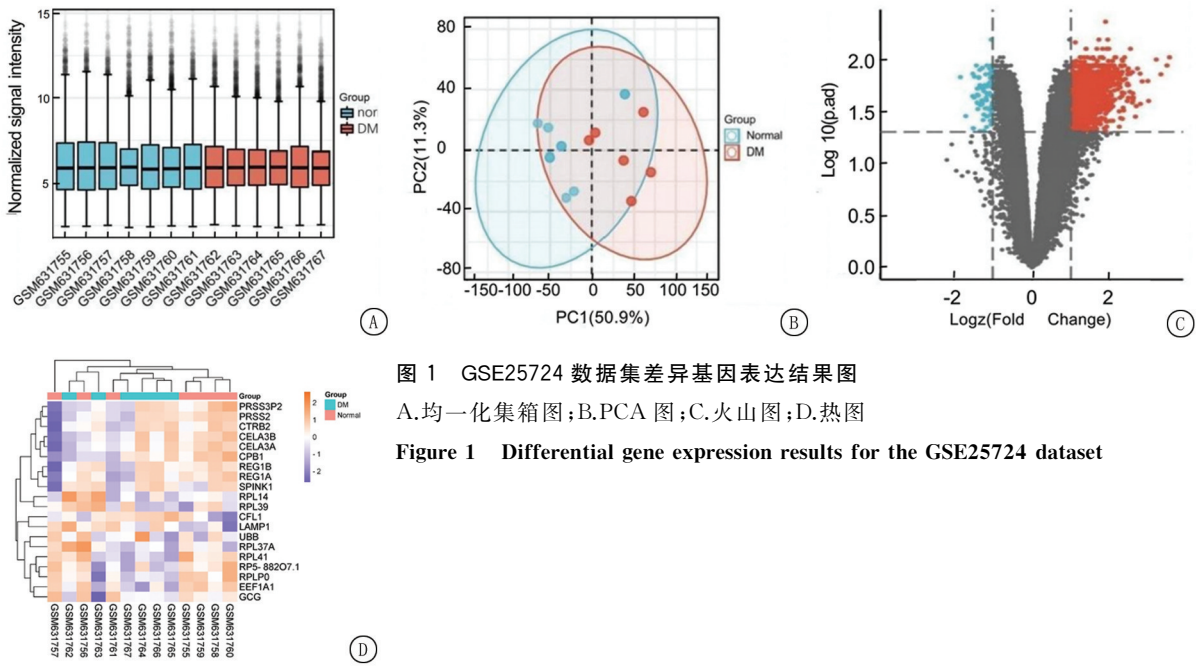


图 1　GSE25724 数据集差异基因表达结果图

A.均一化集箱图；B.PCA 图；C.火山图；D.热图

Figure 1　Differential gene expression results for the GSE25724 dataset

2.2　DM 铜死亡交集基因的获取　从文献中收集铜死亡基因 19 个，使用 Venny2.1.1 在线工具将从 GSE25724 数据集中获取的 1 266 个 DEGs 与从文献获取的 19 个铜死亡相关基因取交集，共获得 6 个交集基因，分别是 DBT、DLD、GLS、PDHB、NFE2L2 和 LIPT1（图 2）。

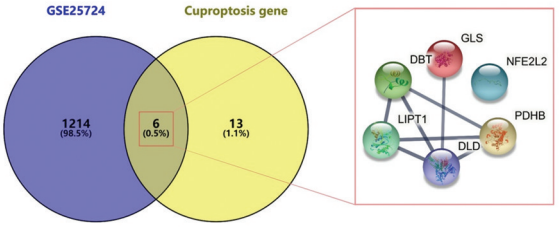


图 2　糖尿病铜死亡交集基因

Figure 2　Intersecting cuproptosis-related genes in diabetes mellitus

2.3　基因相关性分析　利用 GeneMANIA 数据库预测了 DBT、DLD、GLS、PDHB、NFE2L2 和 LIPT1 6 个基因以及邻近基因的相关性，构建基因与基因互作网络图（图 3）。并进行基因功能注释，发现其主要参与氧化还原酶复合物、三羧酸循环酶复合物的形成与细胞氨基酸分解代谢过程等。

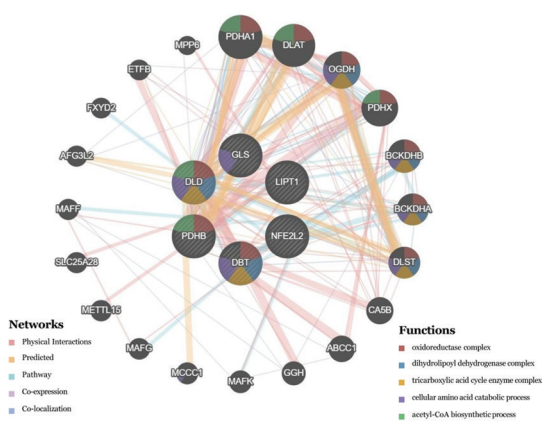


图 3　基因相关性分析

Figure 3　Genetic correlation analysis

2.4　GO功能以及KEGG通路富集分析　使用SangerBox进行分析，其结果如图4A所示，KEGG信号通路的分析结果显示6个基因主要参与的通路涉及于三羧酸循环的脂化、丙酸盐代谢、丙酮酸代谢、糖酵解和糖质新生和HIF-1信号通路，结果和图3契合。如图4B～D的GO功能富集分析显示，6个基因所参与的生物学过程主要涉及有机酸代谢、有机酸分解、丙酮酸乙酰辅酶A的合成和氨基酸代谢过程；在细胞组成方面主要涉及线粒体基质、氧化还原酶复合物、丙酮酸脱氢酶复合物和三羧酸循环酶复合物；在分子功能方面主要涉及丙酮酸脱氢酶活性、氧化还原酶活性、脂肪酸结合和有机酸结合。

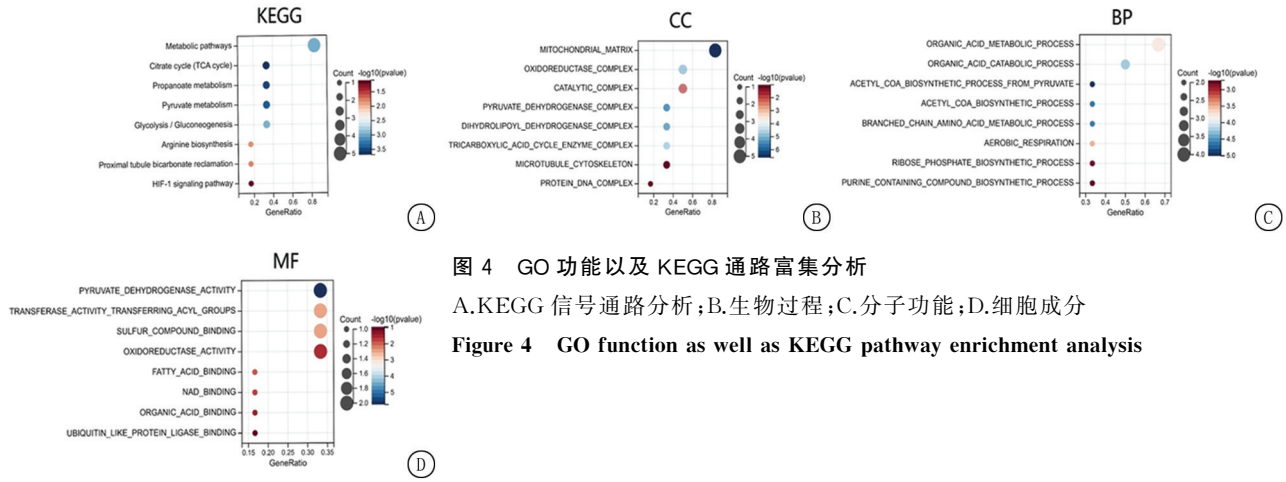


图4　GO功能以及KEGG通路富集分析

A.KEGG信号通路分析；B.生物过程；C.分子功能；D.细胞成分

Figure 4　GO function as well as KEGG pathway enrichment analysis

2.5　交集基因的验证与ROC分析　我们使用两个数据集GSE20966和GSE23343作为测试集，对交基因进行进一步验证以确保DM铜死亡基因筛选的准确性，有利于下一步药物筛选。该表达谱分别出自于GPL1352和GPL570两个平台。将这两个数据集里的6个基因表达值导入GraphPad Prism 9软件进行分析，根据独立样本t检验显示DLD、NFE2L2在数据集GSE23343中差异有统计学意义（$P<0.05$），DBT在数据集GSE20966中差异有统计学意义（$P<0.05$）。GLS、LIPT1、PDHB三个基因在数据集GSE20966和GSE23343各样本中差异值不明显（图5）。利用微生信在线工具将基因DLD、NFE2L2、DBT在各样本中的表达值进行ROC曲线的绘制，ROC曲线将敏感度和特异度以图示的方法结合在一起，可准确地反映两者的关系，纵坐标的值代表的是敏感度，该值越高代表诊断的准确率越高；横坐标的值代表的是特异度，该值越低就代表误判率越低。AUC越大代表准确率越高，结果如图5显示，DLD、DBT、NFE2L2在DM中有较好的诊断价值。

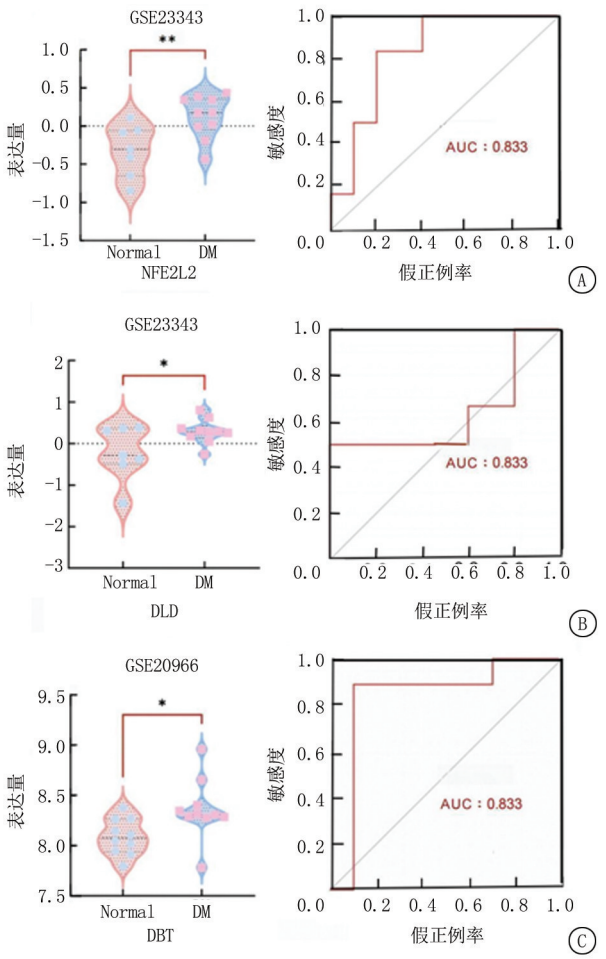


图5　交集基因DLD、DBT、NFE2L2的验证与ROC分析

Figure 5　Validation and ROC analysis of the intersecting genes DLD, DBT, NFE2L2

2.6　关键交集基因的潜在药物预测与分子对接　上步我们确定了影响DM的关键铜死亡基因，接着对关键铜死亡基因进行化合物筛选。将关键基因导入CTD数据库预测相关基因的潜在药物。在TCMSP数据库中以口服生物利用度≥30，类药性>0.180筛选出4种候选化合物，即叶酸(Folic Acid)、紫铆素(Butin)和木犀草素(Luteolin)。将筛选的蛋白结构和对应的化合物结构导入DS BIOVIA Discovery Studio 2016软件进行分子对接。结果表1和图6所示，DLD与叶酸结合，对接分数为157.760；DBT与叶酸结合，对接分数为134.540；NFE2L2与紫铆素结合，对接分数为105.350；NFE2L2与木犀草素结合，对接分数为99.909。

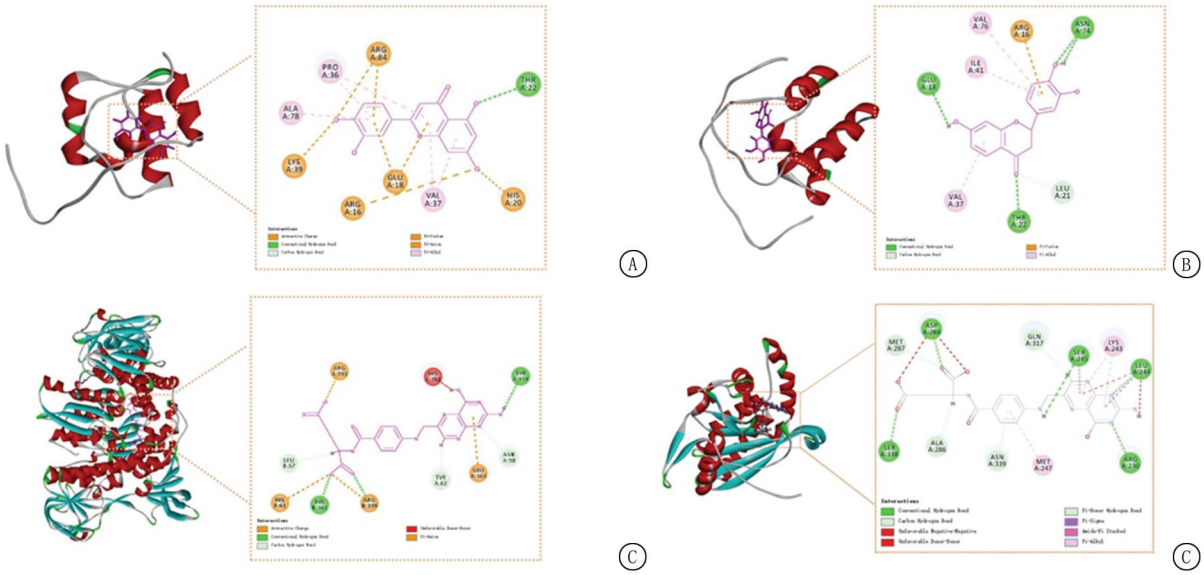


图6　分子对接结果

A.DLD-叶酸；B.DBT-叶酸；C.NFE2L2-紫铆素；D. NFE2L2-木犀草素

Figure 6　Molecular docking results

表1　分子对接结果

Table 1　Molecular docking results

蛋白	成分	OB值	DL值	对接分数
DLD	叶酸	68.960	0.710	157.760
DBT	叶酸	68.960	0.710	134.540
NFE2L2	紫铆素	69.939	0.210	105.350
NFE2L2	木犀草素	36.163	0.250	99.909

3　讨　论

DM不但会让患者的心智和身体受到相当严重的伤害，甚至也会给国家和社会造成沉重的经济负担。按照现今的医疗水平来看，DM依然是一种难以攻克的疾病[8]。如果没有有效的方法来控制其发生和发展，它的发病率仍将会持续增长。本研究通过生物信息学及分子对接技术发现铜死亡相关基因DLD、DBT、NFE2L2与DM关系密切，并发现DLD、DBT可以与叶酸，NFE2L2可与紫铆素，NFE2L2可与木犀草素有较高的结合能力。此研究为DM机制研究以及药物发现提供新方法。

本研究使用DM数据集GSE25724与19个铜死亡基因取交集获得6个交集基因，分别是NFE2L2、DBT、DLD、GLS、LIPT1和PDHB，GO分析结果发现他们主要参与细胞氨基酸分解代谢过程、线粒体活性、三羧酸循环的脂化、丙酸盐代谢、丙酮酸代谢、糖酵解和糖质新生和HIF-1信号通路等。

本研究使用2个数据集对以上6个交集基因进行验证，发现只有NFE2L2、DLD、DBT在正常组与实验组表达具有显著差异，且ROC曲线结果显示了这3个基因在DM中均具有较高的诊断价值。DLD、DBT主要涉及三羧酸循环的脂化，代谢组学分析发现Ⅱ型DM患者的三羧酸循环周期代谢底物水平紊乱[9]。DBT涉及丙酮酸脱氢酶复合物和三羧酸循环酶复合物的形成。脂肪组织分解快速时血循环中的游离脂肪酸增多就会引起细胞内乙酰CoA堆积而抑制了丙酮酸脱氢酶活性，导致三羧酸循环减弱最终使葡萄糖氧化速度降低，乙酰CoA也可以增加ATP的产生，并促使丙酮酸羧化酶的产生，从而使糖异生反应活跃达到能使肝糖原输出增加的效果[10]。因此，三羧酸循环通路的增加可减缓DM的症状，使肝糖原输出减少。DLD和DBT还

涉及丙酮酸代谢。丙酮酸激酶在调节糖酵解和糖质新生之间的平衡方面起着关键作用[11]。

DLD 和 NFE2L2 两个基因涉及 HIF-1 信号通路。DM 通常与缺氧和氧化应激有关，高血糖是其驱动力[12]。缺氧诱导因子 HIF-1 在缺氧条件下参与调节细胞稳态是调节细胞内氧代谢的关键因子，HIF-1α 可以利用糖代谢关键酶的表达来启动糖酵解的途径，促进能量代谢和稳定线粒体功能[13-14]。对 DM 及其并发症的发生、发展起促进作用[15]。DM 患者糖化终产物升高，与受体结合后促使活性氧(reactive oxygen species，ROS)的生成并产生氧自由基，细胞膜发生超氧化，使膜蛋白功能受损，最终导致细胞结构和功能代谢异常，进而诱发氧化应激反应[16]。

分子对接结果显示，关键基因都能与所预测的化合物叶酸、紫铆素和木犀草素很好的对接。DM 患者可能会出现氨基酸代谢异常[17]，补充叶酸与循环胰岛素和 CRP 水平的显着降低有关。此外，发现补充叶酸可以减少氧化应激，改善内皮功能障碍，并调节与胰岛素信号传导相关的基因的 DNA 甲基化[18]，因此叶酸会降低 DM 的发生并预防其并发症的发生。影响 DM 发生和发展的危险因素还包括氧化应激和蛋白质晚期糖化终产物。叶酸具有抗糖化潜力，也可通过减少氧化应激进一步改善 β 细胞功能来减缓 DM 并发症进程[19]。紫铆素使通过增加氧化酶活性进而提高抗氧化的屏障从而抑制脂质的过氧化反应，促进抗氧化进程，进一步抑制线粒体氧化应激，进而控制 DM 的发展[20]。木犀草素摄入可能对糖脂代谢紊乱有益，特别是胰岛素抵抗、DM 和肥胖症[21]。类黄酮还可以改变葡萄糖稳态的代谢途径，它们可以促进糖酵解和糖生成，抑制糖异生和糖原分解[22]。类黄酮可以通过抑制碳水化合物水解酶，葡萄糖苷酶和双糖酶的作用而表现出低血糖活性。木犀草素可以通过抑制产生 ROS 的酶来防止 ROS 的产生，可以清除 ROS 并且可以保护其他抗氧化系统的成分[23]，木犀草素的抗氧化活性与其低血糖潜力相结合，保护胰腺并促进胰岛素分泌进而控制 DM 的发生与发展。综上所述 NFE2L2、DLD、DBT 或许可以为 DM 治疗的进步提供潜在的治疗靶点。

综上所述，本研究初步鉴定了 DM 相关的三个铜死亡基因 DLD、DBT、NFE2L2，并预测了其化合物叶酸、紫铆素和木犀草素。此研究为 DM 机制研究以及药物发现提供新方法。

[参考文献]

[1] 赵燕，刘剑丽，刘玫，等.糖尿病患者泌尿系感染的病原菌分布及耐药性分析[J].中国药物与临床，2021，21(20)：3457-3458.

[2] 罗丹. AGEs 对 BMSCs 自噬能力的影响及其机制初探[D].重庆：重庆医科大学，2020.

[3] Jiang Y，Huo Z，Qi X，et al. Copper-induced tumor cell death mechanisms and antitumor theragnostic applications of copper complexes[J]. Nanomedicine (London，England)，2022，17(5)：303-324.

[4] Chen CH，Chou YT，Yang YW，et al. High-dose copper activates p53-independent apoptosis through the induction of nucleolar stress in human cell lines[J]. Apoptosis，2021，26(11-12)：612-627.

[5] Bjørklund G，Dadar M，Pivina L，et al. The role of zinc and copper in insulin resistance and diabetes mellitus[J]. Curr Med Chem，2020，27(39)：6643-6657.

[6] Zhou J，Liu C，Francis M，et al. The causal effects of blood iron and copper on lipid metabolism diseases：evidence from phenome-wide mendelian randomization study[J]. Nutrients，2020，12(10)：3174.

[7] Han J，Hu Y，Liu S，et al. A newly established cuproptosis-associated long non-coding rna signature for predicting prognosis and indicating immune microenvironment features in soft tissue sarcoma[J]. J Oncol，2022，2022：8489387.

[8] Lin Y，Li J，Wu D，et al. Identification of Hub genes in type 2 diabetes mellitus using bioinformatics analysis[J]. Diabetes Metab Syndr Obes，2020，13：1793-1801.

[9] Liu R，Chen L，Wang Z，et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids prevent obesity by improving tricarboxylic acid cycle homeostasis[J]. J Nutr Biochem，2021，88：108503.

[10] 乐小婧，陈婕，张帆，等. 代谢综合征与 2 型糖尿病的相关研究进展[J]. 昆明医科大学学报，2020，41(5)：145-149.

[11] Varma A，Storey KB. Freeze-induced suppression of pyruvate kinase in liver of the wood frog (Rana sylvatica)[J]. Adv Biol Regul，2023，88：100944.

[12] Xue W，Liu Y，Zhao J，et al. Activation of HIF-1 by metallothionein contributes to cardiac protection in the diabetic heart[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2012，302(12)：H2528-2535.

[13] Kierans SJ，Taylor CT. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF)：implications for cellular physiology[J]. J Physiol，2021，599(1)：23-37.

[14] Ortega A，Fernández A，Arenas MI，et al. Outcome of acute renal injury in diabetic mice with experimental endotoxemia：role of hypoxia-inducible factor-1α-PubMed[J]. J Diabetes Res，2013，2013：254529.

[15] 刘慧玲，谭定英，黄敏，等.基于网络药理学及分子对接探讨黄连治疗 2 型糖尿病的作用机制[J].康复学报，2021，31(6)：485-494.

[16] Lind MV，Lauriten L，Kristensen M，et al. Effect of folate

supplementation on insulin sensitivity and type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Am J Clin Nutr, 2019, 109(1): 29－42.

[17] Zhu J, Chen C, Lu LP, et al. Intakes of folate, vitamin B6, and vitamin B12 in relation to diabetes incidence among American young adults: a 30-year follow-up study[J]. Diabetes Care, 2020, 43 (10): 2426－2434.

[18] 靳根权.叶酸、维生素 B12 和维生素 B6 摄入与糖尿病的关系研究[D].青岛:青岛大学,2021.

[19] AL Jaseem MAJ, Abduliah KM, Qais FA, et al. Mechanistic insight into glycation inhibition of human serum albumin by vitamin B9: Multispectroscopic and molecular docking approach[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 181: 426－434.

[19] 刘珂娣,段佳林,苏晶,等.紫铆花素对 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用及对线粒体功能的影响研究[J].中国药房, 2020, 31(24): 2974－2981.

[21] Wang Z, Zeng M, Wang Z, et al. Dietary luteolin: anarrative review focusing on its pharmacokinetic properties and effects on glycolipid metabolism[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69 (5): 1441－1454.

[22] Hussain Y. Chapter 2-Effects of phytonutrients in various metabolic pathways[M]//Khan H, Akkol EK, Daglia M. The role of phytonutrients in metabolic disorders. Academic Press, 2022: 35－66.

[23] Slika H, Mansour H, Wehbe N, et al. Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 146: 112442.

（本文编辑：刘斯静）