

DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0128

文章编号 1671-8852(2026)01-0001-07

缺血性心肌病中关键 m6A RNA 修饰调控因子的表达模式及其自噬调控作用

鲁乙^{1,2} 雷哲^{1,2} 吴嘉贺^{1,2} 倪利华³ 胡笑容^{1,2}

¹武汉大学中南医院心内科 湖北 武汉 430071;

²武汉大学心肌损伤与修复研究所 湖北 武汉 430071;

³武汉大学中南医院肾内科 湖北 武汉 430071

摘要 目的:探究 m6A 修饰在缺血性心肌病(ICM)中的表达模式、调控机制及其与自噬的关联。方法:下载基因表达综合数据库(GEO)中 GSE57338 数据集,筛选差异表达的 m6A RNA 修饰调控因子(m6A-RMRs),并采用 ROC 曲线评估其诊断效能。利用加权基因共表达网络分析(WGCNA)鉴定与 m6A-RMRs 显著相关的模块。从 HAMdb、HMDB 和 GSEA 数据库获取候选自噬相关基因(Candidate-ARGs),进一步鉴定 m6A RNA 修饰相关自噬基因(m6A-RMARGs)。通过基因交集分析、富集分析和蛋白质互作(PPI)网络筛选关键基因,并构建心肌缺氧模型验证其表达。结果:共筛选出 15 个差异表达的 m6A-RMRs,其中 7 个(METTL14、FMR1、VIRMA、WTAP、YTHDC1、ZC3H13、FTO)的受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC) > 0.7。WGCNA 分析显示,MEturquoise 模块与 m6A RNA 修饰显著相关,其自噬相关基因富集于“自噬”“mTOR 信号通路”“细胞凋亡”等通路。进一步验证表明,CCL2、DIRAS3、NAMPT 和 STAT3 被鉴定为 ICM 的潜在生物标志物。结论:CCL2、DIRAS3、NAMPT 和 STAT3 可能参与 ICM 的自噬及 m6A 修饰机制,干扰这些基因或为潜在的治疗策略。

关键词 缺血性心肌病;m6A;自噬;WGCNA

中图分类号 R542.2

文献标志码 A

Expression patterns of key m6A RNA modification regulators and associated autophagy regulation in ischemic cardiomyopathy

LU Yi^{1,2}, LEI Zhe^{1,2}, WU Jiahe^{1,2}, NI Lihua³, HU Xiaorong^{1,2}

¹Department of Cardiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China;

²Institute of Myocardial Injury and Repair, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China;

³Department of Nephrology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the regulatory mechanisms of m6A modification and its association with autophagy in ischemic cardiomyopathy (ICM). **Methods:** The mRNA microarray dataset GSE57338 was downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. Differentially expressed m6A RNA modification regulators (m6A-RMRs) were screened, and their diagnostic efficacy was evaluated using receiver operating characteristic (ROC) curves. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was employed to identify modules significantly associated with

课题来源:国家自然科学基金资助项目(编号:82370696);武汉大学中南医院转化医学及交叉学科研究联合基金(编号:ZNJC202308)。
作者简介:鲁乙,女,1996—,医学硕士生,主要从事急性心肌梗死及心肌缺血再灌注损伤的基础及临床研究,E-mail:luyiyilu651@163.com。
通信作者:胡笑容,E-mail:huxrzn@whu.edu.cn。

m6A-RMRs. Candidate autophagy-related genes (Candidate-ARGs) were obtained from the HAMdb, HMDB, and GSEA databases, and m6A modification-related autophagy genes (m6A-RMARGs) were further identified. Key genes were screened through gene intersection analysis, enrichment analysis, and protein-protein interaction (PPI) network analysis. A myocardial hypoxia model was constructed to validate the expression of key genes. **Results:** A total of 15 differentially expressed m6A-RMRs were identified, among which 7 genes (METTL14, FMR1, VIRMA, WTAP, YTHDC1, ZC3H13, and FTO) exhibited an area under the curve (AUC) > 0.7 . WGCNA analysis revealed that the MEturquoise module was significantly associated with m6A RNA modification, and its autophagy-related genes were enriched in pathways such as "autophagy", "mTOR signaling pathway", and "apoptosis". Further validation identified CCL2, DIRAS3, NAMPT, and STAT3 as potential biomarkers for ICM. **Conclusion:** CCL2, DIRAS3, NAMPT, and STAT3 may participate in autophagy and m6A modification mechanisms in ICM, and targeting these genes could represent a potential therapeutic strategy.

Key Words Ischemic Cardiomyopathy; m6A; Autophagy; WGCNA

缺血性心肌病(ischemic cardiomyopathy, ICM)以左心室扩张和收缩功能障碍为特征,由长期心肌缺血或梗死后纤维化引发,是全球心血管疾病的主要死因之一^[1-2]。尽管目前已有多种治疗手段,如药物治疗、介入治疗等,但其疗效仍然有限,因此,探索 ICM 的分子机制和潜在靶点,寻找改善 ICM 患者预后的治疗策略尤为迫切。

N6-甲基腺苷((N6-methyladenosine, m6A)修饰作为关键表观遗传调控机制,发挥基因表达、RNA 剪接、RNA 稳定性等作用^[3-4]。研究^[5-7]表明,m6A 修饰通过调控特定基因的表达,参与心肌细胞的增殖、凋亡以及重塑过程。自噬作为细胞内一种重要的降解机制,能够维持细胞稳态、清除损伤细胞器并调节能量平衡^[8]。近年来的研究^[9-10]发现,自噬既能保护心肌细胞免受压力损伤,也可能通过调节心肌细胞的生存状态影响 ICM 的进程。此外,研究^[11]表明,m6A 修饰可能调控自噬,但二者在 ICM 中的相互作用尚未阐明,本研究旨在通过生物信息学方法,探索 m6A 修饰与自噬在 ICM 中的关系,识别出潜在的关键基因,为 ICM 机制研究和靶向治疗提供新依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂 AC16 细胞购自北纳生物(河南信阳);胰酶、DMEM 培养基、胎牛血清均购自 Gibco 公司;RNA 提取试剂盒购自南京诺唯赞公司;逆转录试剂盒及 qPCR 试剂盒均购自上海翌圣公司。

1.2 数据收集与获取 从基因表达综合数据库

(Gene Expression Omnibus, GEO)下载 ICM 数据集 GSE57338(含 95 例患者及 136 例对照心肌组织)。采用 R 语言“Limma”包筛选 ICM 组与对照组的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),设定阈值 $|\log_2 FC| > 0.5$ 且 $P < 0.05$,其中 FC 为差异倍数(fold change)。

1.3 m6A RNA 修饰调控因子鉴定 检索文献共纳入 21 个 m6A RNA 修饰调控因子(RNA modification regulators, m6A-RMRs)。根据其在数据集中的表达水平,筛选出 15 个显著差异表达的 m6A-RMRs。

1.4 预测价值评估 采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评估 m6A-RMRs 对 ICM 患者的预测效能,绘制 ROC 曲线并计算曲线下面积(area under the curve, AUC)。 $AUC > 0.7$ 提示模型具有良好预测能力。

1.5 共表达网络构建 利用 R 语言“WGCNA”包构建共表达网络,剔除离群样本后选择 $\beta = 6$ 作为无标度拓扑模型的软阈值;将邻接矩阵转换为拓扑重叠矩阵(TOM),基于 TOM 相异性度量将 mRNA 划分为不同模块(最小模块基因数 = 30,合并高度 = 0.25);采用 Pearson 相关分析模块特征值与 m6A-RMRs 的相关性,筛选相关性最强的模块作为 ICM 关键基因模块,并进行功能富集。

1.6 功能富集分析 利用 DAVID 6.8(<http://david.ncifcrf.gov/>)对关键模块基因进行 GO/KEGG 富集分析,显著性阈值设为 $P < 0.05$ 。

1.7 蛋白相互作用分析 将 m6A-RMRs 导入 STRING 数据库,构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-

protein interaction, PPI) 网络, 设定节点连接度 ≥ 7 为筛选阈值, 通过 Cytoscape 3.9.0 可视化。

1.8 细胞培养和处理 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的培养基中, 为了模拟缺氧条件, 细胞在无血清的培养基中培养 24 h, 培养条件为 5% CO_2 、1% O_2 和 94% N_2 , 以常氧状态的细胞作为对照组。

1.9 qRT-PCR 检测 采用 RNA 提取试剂盒提取心肌细胞 RNA, 然后根据试剂盒说明书合成 cDNA, 逆转录产物 cDNA 则按照荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行 qPCR 扩增。以 GAPDH 为内对照, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因表达量。引物信息见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因名	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
GAPDH	AGAAGGCTGGGGCTCATTTG	AGGGGCCATCCACAGTCTTC
BNP	TCCCACAGGTGTCTGGAAGT	GCAGGGTGTAGAGGACCATTTT
DIRAS3	CATCACCGACAGCAAGAGT	TGAGTAGACCAGGACGAAGG
NAMPT	ACAGTATTTTATGGGTTGC	TTTCTATTGGAAGATGCC
STAT3	GAGGCATTCGGAAGTAT	TTGGTCTTCAGGTATGGG
METTL14	TCCCATGTACTTACAAGCC	ATTAGCAGTGATGCCAGTT
FMR1	GAGCCTTGCTGTTGGTGGT	TTTGTGGCAGGTTTGTGGG
WTAP	CTGGAAGTTTACGCCTGAT	AGTTGTGCAATACGTCCCT
ZC3H13	CCATGTTGTAAGGCGTTGT	TTGGAGCACTCGTGTAAAGC

1.10 统计学分析 采用 R 4.1.0 和 Graphpad Prism 9 软件分析数据并绘图。非正态数据采用 Mann-Whitney U 检验, 相关性分析用 Pearson 法, ROC 曲线评估诊断效能, 显著性标准为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 m6A-RMRs 在 ICM 中的表达 本研究分析了 GSE57338 数据集中 ICM 与正常样本的

m6A-RMRs 表达。结果显示, 15 个 m6A-RMRs (METTL3、METTL14、METTL16、WTAP、VIRMA、ZC3H13、RBM15B、YTHDC1、YTHDC2、YTHDF1、YTHDF3、FMR1、LRPPRC、FTO 和 ALKBH5) 存在差异表达(图 1A、1B)。其中, FMR1 和 ZC3H13 正相关性最高($r=0.64$)(图 1C)。然后以 $|\log_2 FC| > 0.5$ 和 $P < 0.05$ 为阈值, 筛选出 436 个 DEGs(图 1D)。

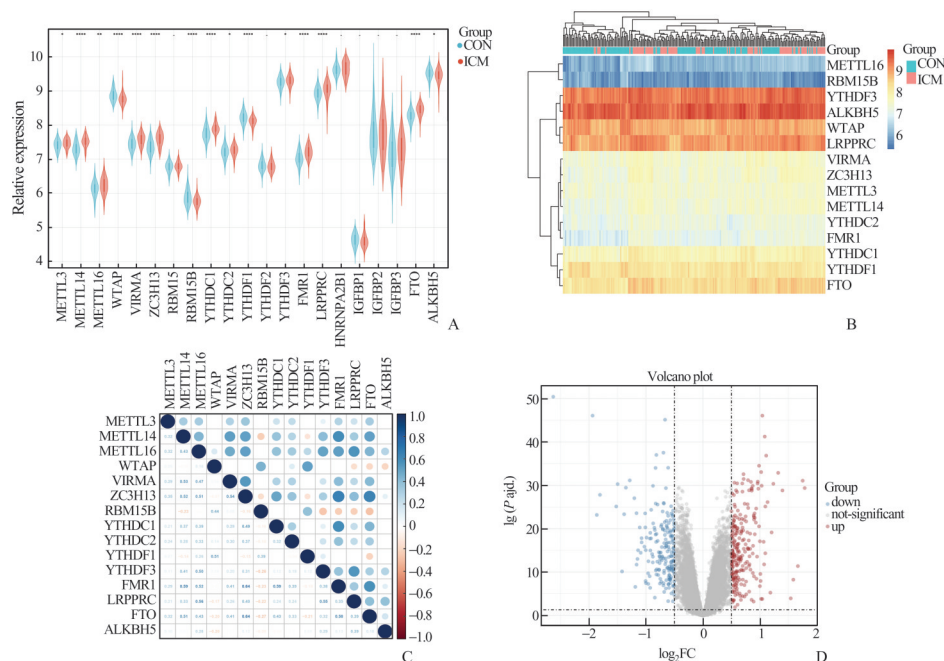


图 1 ICM 中差异表达的 m6A-RMRs

注: A 为 21 个 m6A-RMRs 的相对表达量 ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.0001$); B 为 m6A-RMRs 差异表达热图; C 为 15 个 m6A-RMRs 的 Pearson 相关性分析; D 为 DEGs 火山图。

2.2 m6A-RMRs在 ICM 中的诊断价值 ROC 曲线确定 METTL14、VIRMA、ZC3H13、YTHDC1、

FMR1、FTO 和 WTAP 在 ICM 中具有较高的诊断价值,其 $AUC > 0.7$ (图 2)。

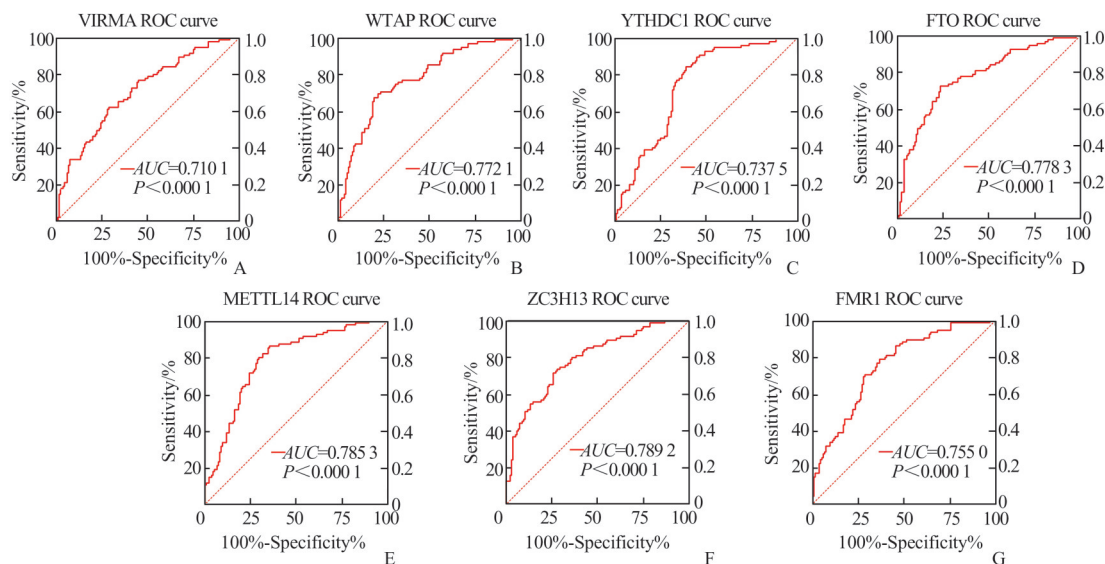


图 2 m6A-RMRs在 ICM 中预测价值的 ROC 曲线

注: A~G 分别为 VIRMA ($AUC=0.7101$)、WTAP ($AUC=0.7721$)、YTHDC1 ($AUC=0.7375$)、FTO ($AUC=0.7783$)、METTL14 ($AUC=0.7853$)、ZC3H13 ($AUC=0.7892$)、FMR1 ($AUC=0.7550$) 的 ROC 曲线,均为 $P < 0.0001$ 。

2.3 WGCNA 鉴定 m6A-RMRs 相关基因 WGCNA 识别了 30 个共表达模块,且其与 7 个 m6A-RMRs 的相关性被评估(图 3A、3B)。MEturquoise 模块与 m6A 调控因子(ZC3H13、FTO)显著相关(图 3C、3D),共包含 2 468 个 mRNA。这些与 m6A-RMRs 相关的 mRNA 被定义为 m6A-RMRs 相关基因(m6A-RMRGs)。

2.4 m6A-RMRGs 功能富集分析与 PPI 网络构建 从 HAMdb (<http://hamdb.scbdd.com/>)、HMD (<https://hmd.ca/>) 及 GSEA (<http://www.gsea-msigdb.org/>) 共获取 681 个候选自噬相关基因(candidate autophagy-related genes, Candidate-ARGs),与 m6A-RMRGs 交集筛选出 m6A 修饰相关自噬基因(m6A modification-related autophagy genes, m6A-RMARGs) (图 4A)。GO 分析显示: m6A-RMARGs 的生物过程主要集中于分解代谢过程及自噬调控等(图 4B);细胞组分主要集中在细胞器膜等(图 4C);分子功能主要集中在催化活性及酶结合等(图 4D);KEGG 分析中, m6A-RMARGs 主要富集于自噬-动物及 mTOR 信号通路等通路(图 4E)。将 m6A-RMARGs 导入在线数据库 String,构建 PPI 网络(41 节点, 307 边)(图 4F)。

2.5 预测在 ICM 中关键的 m6A-RMARGs 为探索与 ICM 中 m6A-RMARGs 的关键作用,通过把 m6A-RMARGs 与 ICM 中 DEGs 相交,筛选出核心基

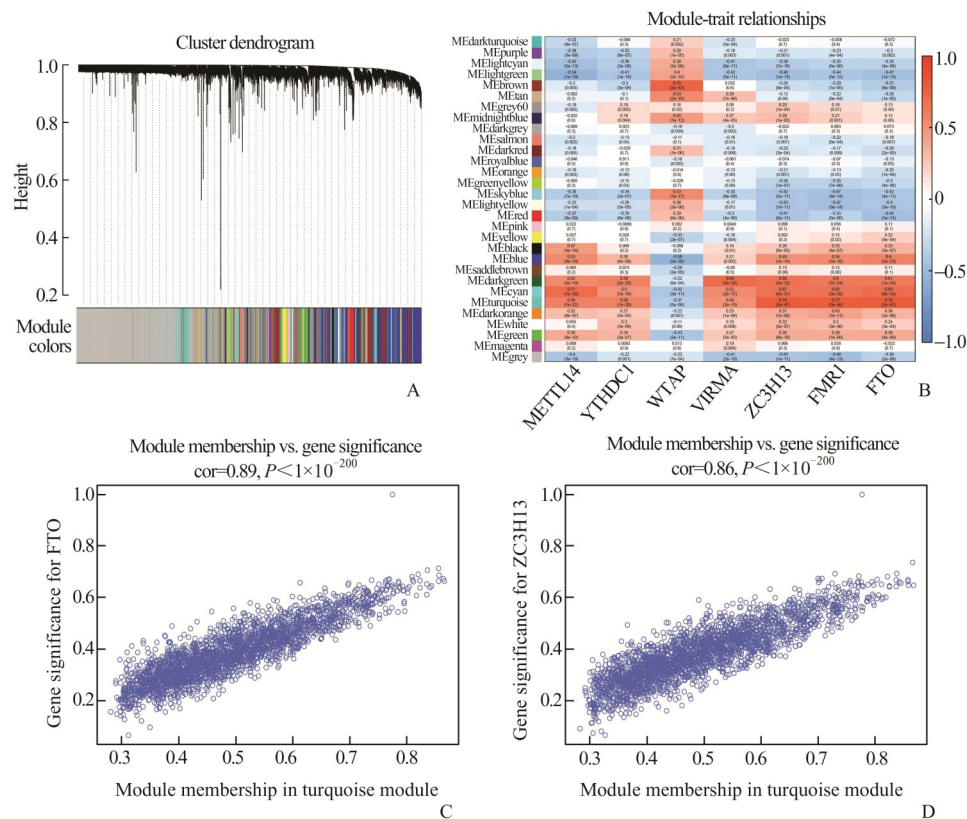
因 CCL2、DIRAS3、NAMPT 及 STAT3(图 5A)。基于 GSE57338 数据集验证显示,上述基因在 ICM 中差异表达显著(图 5B~5E),且 ROC 曲线分析证实其对 ICM 具有显著预测价值($AUC > 0.75$, 图 5F~5I)。

2.6 qRT-PCR 验证关键基因的表达 为探究缺氧对 ARGs 的影响,我们检测了 AC16 细胞缺氧模型与正常心肌细胞的 BNP 水平(图 6A),并验证 CCL2、DIRAS3、NAMPT、STAT3 的表达。结果显示,这 4 个基因在缺氧条件下均呈现显著差异表达(图 6B~6E)。同时,验证的 7 个 m6A-RMRs 中, METTL14、FMR1、WTAP 及 ZC3H13 表达有显著差异(图 6F~6I)。

3 讨论

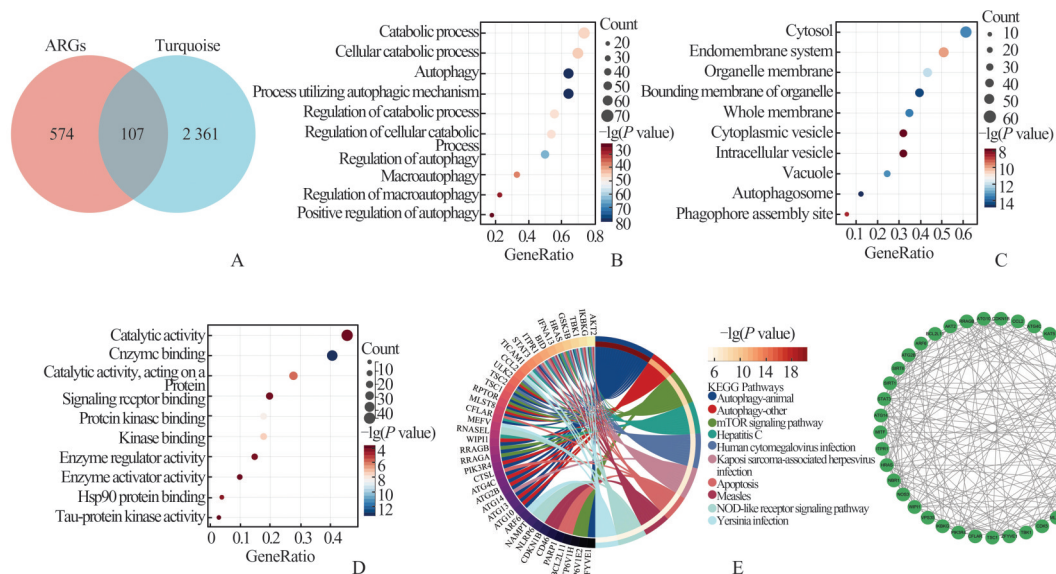
随着冠心病发病率上升,ICM 对人类健康的威胁加剧^[12]。然而,ICM 的机制尚未完全阐明,自噬和 m6A 修饰可能也参与了其发病过程。研究^[13-14]发现,缺氧/复氧心肌细胞中 m6A 修饰上调伴随自噬抑制,提示 m6A 修饰与自噬可能存在关联。因此,本研究进一步探索了 ICM 中 m6A 修饰与自噬的相互作用。

本研究对关键模块 m6A-RMARGs 进行 KEGG/GO 分析,这些基因富集于自噬调控、分解代谢及 mTOR 通路等方面。通过 Cytoscape 构建



A. 基因聚类树状图; B. 模块与 m6A 调控因子相关性热图; C、D. 模块特征基因散点图。

图 3 GSE57338 数据集中与 m6A 相关基因的鉴定



A. 基因交集韦恩图; B. 关键模块基因的 GO 生物过程; C. 同源差异基因的 GO 细胞组分; D. 关键模块基因的 GO 分子功能; E. KEGG 通路富集分析; F. PPI 网络。

图 4 GO 注释、KEGG 通路富集分析与 PPI 网络

PPI 网络, 将 DEGs、模块基因和自噬基因取交集筛选出关键基因 (CCL2、DIRAS3、NAMPT、STAT3)。AC16 缺氧模型证实, 上述基因及 m6A 调控因子 (FMR1、METTL14、WTAP、ZC3H13) 均差异表达, 提示这些基因有作为 ICM 机制研究与治

疗靶点的潜力。

在 ICM 中与自噬相关的关键基因中, 趋化因子 2 (CCL2) 通过与其受体 CCR2 结合, 在心血管疾病中也发挥重要作用, 研究^[15]表明巨噬细胞通过冠状动脉疾病巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)/

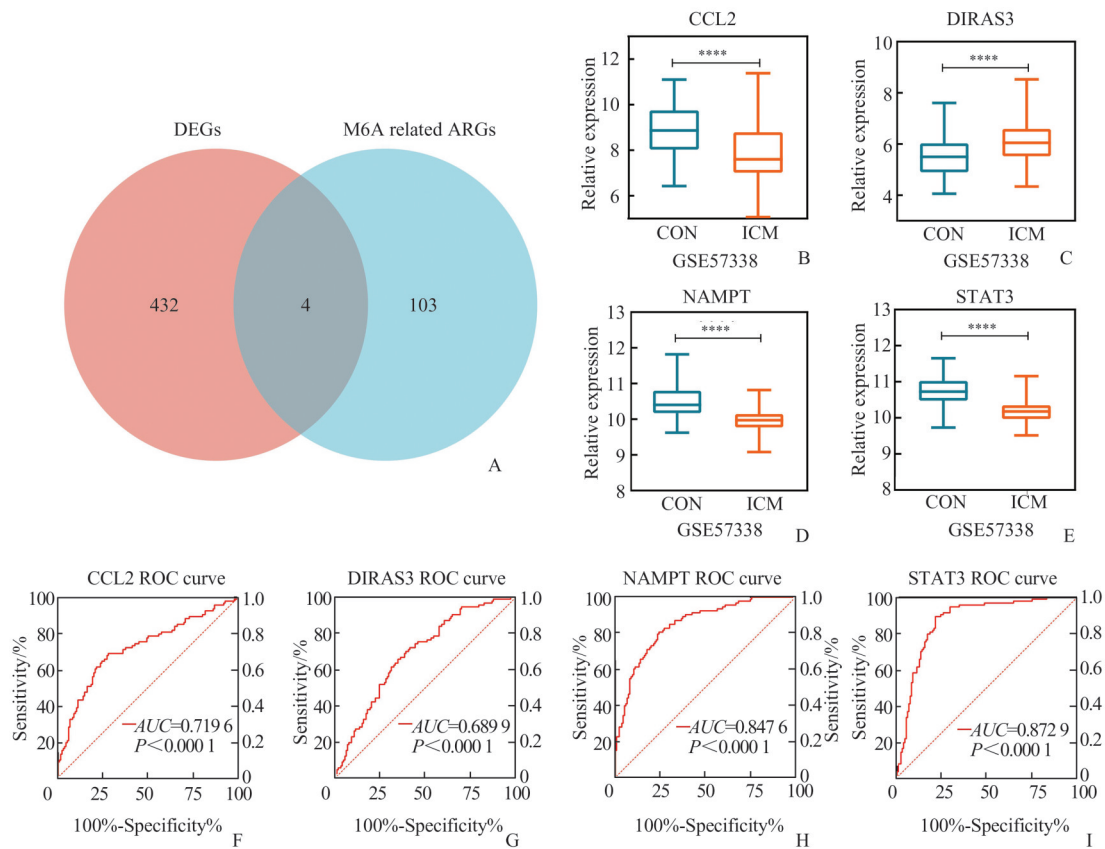


图5 关键基因在 ICM 中的差异表达

注:A 为关键基因筛选(DEGs、ARGs 及模块交集);B~E 为 GSE57338 数据集中 CCL2、DIRAS3、NAMPT、STAT3 差异表达;F~I 为 CCL2($AUC=0.7196$)、DIRAS3($AUC=0.6899$)、NAMPT($AUC=0.8476$)、STAT3($AUC=0.8729$)的 ROC 曲线。**** $P<0.0001$ 。

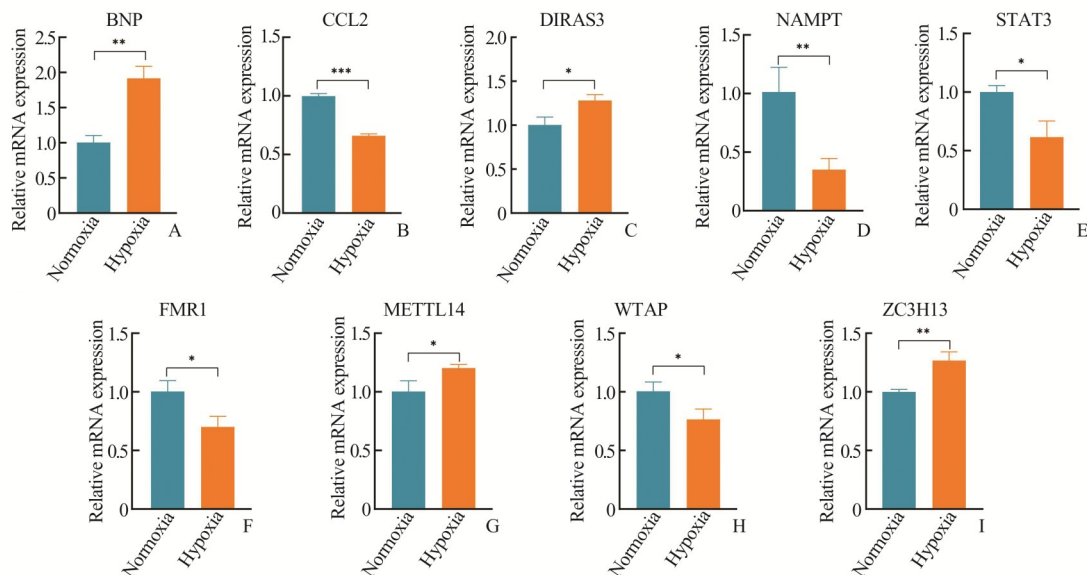


图6 ICM 中关键基因及 m6A-RMRs 的鉴定

注:A 为 AC16 细胞缺氧模型中 BNP 的 mRNA 水平;B~I 为 AC16 细胞缺氧模型中关键基因及 m6A-RMRs 表达。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

CCL2/CCR2 促进小鼠从再灌注损伤到心脏纤维化的转变。DIRAS3 是一种母源印记的肿瘤抑制基

因,能够诱导自噬基因的表达,其对自噬的调控作用被广泛研究^[16-17]。NAMPT 是哺乳动物 NAD 补

救途径中的一种胞质限速酶。研究^[18]表明, NAMPT 的下调会导致主动脉缩窄模型中线粒体功能障碍和心脏功能障碍。STAT3 是 STAT 蛋白家族的成员,当 STAT3 过表达时,心肌缺血/再灌注后的梗死面积显著减少,对缺血心肌具有一定的保护作用^[19]。上述基因的差异表达为 ICM 机制研究提供了潜在靶点。

此外,本研究发现 ZC3H13 与关键基因模块高度相关。ZC3H13 是一种编码锌指蛋白,它在 m6A RNA 甲基化调控中起重要作用。心肌缺血时 m6A 甲基化上调伴随自噬流抑制和细胞凋亡增强,提示 ZC3H13-WTAP 复合体可能通过促进 m6A 抑制心脏自噬^[20-21]。FMR1 由脆性 X 智力低下蛋白(fragile X mental retardation protein, FMRP)基因编码。研究^[22]表明, FMR1 敲除的小鼠铁积累,加重心脏负荷,可能作为心血管系统的保护因子。我们的研究中 AC16 缺氧模型中 FMR1 低表达与预测结果一致,因此 FMR1 也可能是潜在的生物标志物。

综上所述,本研究通过对 m6A 修饰因子及自噬相关基因的深入分析,揭示其在 ICM 中的潜在作用及其相互调控机制。此外 CCL2、DIRAS3、NAMPT、STAT3 等关键基因被筛选,这些基因不仅可能参与 ICM 的发生和发展,还具有作为潜在生物标志物的价值。未来的研究可以进一步验证这些基因在临床样本中的表达和功能,探索其作为 ICM 早期诊断和治疗靶点的可行性。



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

参考文献

- [1] PASTENA P, FRYE J T, HO C, et al. Ischemic cardiomyopathy: Epidemiology, pathophysiology, outcomes, and therapeutic options[J]. *Heart Fail Rev*, 2024, 29(1): 287-299.
- [2] PANZA J A, ELLIS A M, AL-KHALIDI H R, et al. Myocardial viability and long-term outcomes in ischemic cardiomyopathy[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(8): 739-748.
- [3] SHI J X, ZHANG Z C, YIN H Z, et al. RNA m6A modification in ferroptosis: Implications for advancing tumor immunotherapy[J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 213.
- [4] BU F T, WANG H Y, XU C, et al. The role of m6A-associated membraneless organelles in the RNA metabolism processes and human diseases[J]. *Ther-*

agnostics, 2024, 14(12): 4683-4700.

- [5] GAO X Q, ZHANG Y H, LIU F, et al. The PiRNA CHAPIR regulates cardiac hypertrophy by controlling METTL3-dependent N6-methyladenosine methylation of Parp10 mRNA[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(11): 1319-1331.
- [6] YANG Y F, REN J J, ZHANG J F, et al. FTO ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting ferroptosis *via* P53 - P21/Nrf2 activation in a HuR-dependent m6A manner[J]. *Redox Biol*, 2024, 70: 103067.
- [7] LI J, CHEN J, ZHAO M, et al. Downregulated ALKBH5 contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by increasing m6A modification of Trio mRNA[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(7): 417.
- [8] DEBNATH J, GAMMOH N, RYAN K M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(8): 560-575.
- [9] MADONNA R, MOSCATO S, CUFARO M C, et al. Empagliflozin inhibits excessive autophagy through the AMPK/GSK3 β signalling pathway in diabetic cardiomyopathy[J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 119(5): 1175-1189.
- [10] XING Y H, SUI Z H, LIU Y C, et al. Blunting TRPML1 channels protects myocardial ischemia/reperfusion injury by restoring impaired cardiomyocyte autophagy[J]. *Basic Res Cardiol*, 2022, 117(1): 20.
- [11] WANG X, WU R, LIU Y, et al. m6A mRNA methylation controls autophagy and adipogenesis by targeting *Atg5* and *Atg7*[J]. *Autophagy*, 2020, 16(7): 1221-1235.
- [12] PONTONE G, GUARICCI A I, FUSINI L, et al. Cardiac magnetic resonance for prophylactic implantable-cardioverter defibrillator therapy in ischemic cardiomyopathy: The DERIVATE-ICM International Registry [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2023, 16(11): 1387-1400.
- [13] PENG Z, GONG Y, WANG X, et al. METTL3-m6A-Rubicon axis inhibits autophagy in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(2): 932-946.
- [14] CHEN X, GONG W, SHAO X Y, et al. METTL3-mediated m6A modification of ATG7 regulates autophagy-GATA4 axis to promote cellular senescence and osteoarthritis progression[J]. *Ann Rheum Dis*, 2022, 81(1): 87-99.
- [15] SHEN S C, XU J, CHENG C, et al. Macrophages promote the transition from myocardial ischemia reperfusion injury to cardiac fibrosis in mice through GMCSF/CCL2/CCR2 and phenotype switching[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, 45(5): 959-974.
- [16] BILDIK G, GRAY J P, MAO W, et al. DIRAS3 induces autophagy and enhances sensitivity to anti-autophagic therapy in KRAS-driven pancreatic and ovarian carcinomas[J]. *Autophagy*, 2024, 20(3): 675-691.

(下转第 14 页)