

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.03.0224

论著

# 基于生物信息学方法筛选并验证心肌细胞增殖及心肌再生的相关枢纽基因

杜小宇<sup>1</sup>, 汪澈<sup>2</sup>, 郑汝杰<sup>1</sup>, 刘旨浩<sup>2</sup>, 卢成志<sup>3</sup>

(1.天津医科大学一中心临床学院, 天津 300192; 2.南开大学医学院临床医学系, 天津 300071; 3.天津市第一中心医院心内科, 天津 300192)

**摘要** 目的: 通过生物信息学筛选与心肌梗死(MI)后心肌细胞增殖与再生的相关枢纽基因。方法: 从 GEO 数据库下载并合并数据集 GSE123863、GSE184792 和 GSE198300, 通过对样本进行加权基因共表达网络分析(WGCNA)筛选枢纽基因。并采用 1 日龄(增殖组)和 7 日龄(非增殖组)C57BL/6J 乳鼠构建 MI 模型, 每组 6 只, 于术后 3 d 取 MI 区组织行实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)验证枢纽基因的表达情况。结果: 通过生物信息学分析共筛选出 7 个枢纽基因: *NDUFB2*、*CPEB4*、*TECR*、*HIC2*、*IFITM3*、*ACOT1* 和 *ACOT4*。动物实验结果显示, 与非增殖组相比, 在增殖组中 *NDUFB2*、*TECR* 表达显著下降, *CPEB4*、*HIC2*、*IFITM3* 和 *ACOT1* 表达显著上升(均  $P < 0.05$ ); *ACOT4* 表达呈上升趋势, 但无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论: *NDUFB2*、*CPEB4*、*TECR*、*HIC2*、*IFITM3* 和 *ACOT1* 可能在 MI 后心肌细胞增殖过程中发挥重要作用。

**关键词** 心肌细胞增殖; 心肌再生; 心肌梗死; 生物信息学

中图分类号 R541.4

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)03-0224-08

## Identificaton and validation of hub genes related to cardiomyocyte proliferation and myocardial regeneration based on bioinformatics approaches

DU Xiaoyu<sup>1</sup>, WANG Che<sup>2</sup>, ZHENG Rujie<sup>1</sup>, LIU Zhihao<sup>2</sup>, LU Chengzhi<sup>3</sup>

(1.The First Central Clinical School, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2.Department of Clinical Medicine, School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3.Department of Cardiology, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China)

**Abstract Objective:** To screen hub genes associated with cardiomyocyte proliferation after myocardial infarction(MI) by bioinformatics analysis. **Methods:** Datasets GSE123863, GSE184792, and GSE198300 were downloaded from the GEO database and merged. Weighted gene co-expression network analysis(WGCNA) was performed for samples to screen out the hub genes. Then MI model was constructed using 1-day-old (proliferating group) and 7-day-old (non-proliferating group) C57BL/6J neonatal mice, and 6 mice per group. The MI area was harvested at 3 days postoperatively for real-time quantitative PCR(RT-qPCR) to verify the expression of the hub gene. **Results:** A total of seven hub genes were screened by bioinformatics analysis: *NDUFB2*, *CPEB4*, *TECR*, *HIC2*, *IFITM3*, *ACOT1*, *ACOT4*. The results of animal experiments showed that compared with the non-proliferative group, the expression of *NDUFB2* and *TECR* decreased significantly in the proliferative group, while the expression of *CPEB4*, *HIC2*, *IFITM3*, and *ACOT1* increased significantly(all  $P < 0.05$ ). Meanwhile, the expression of *ACOT4* showed a tendency of increase, but the difference was not statistically significant( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** *NDUFB2*, *CPEB4*, *TECR*, *HIC2*, *IFITM3*, and *ACOT1* may play important roles in the proliferation of cardiomyocyte proliferation after MI.

**Key words** cardiomyocyte proliferation; myocardial regeneration; myocardial infarction; bioinformatics analysis

心血管疾病的高发病率、高死亡率使其成为重大的全球健康问题之一。心肌梗死(myocardial infarction, MI)是心血管疾病中导致心肌受损的主要病因,发病时常伴随着大量心肌细胞的迅速丢失。

基金项目 国家自然科学基金(81970303);天津市医学重点学科(专科)建设项目(TJYXZDXK-054B);天津市自然科学基金资助项目(21JCYBJC00250)

作者简介 杜小宇(1998-),女,硕士在读,研究方向:心肌细胞增殖与心肌再生;通信作者:卢成志,E-mail:5020200072@nankai.edu.cn。

由于心肌细胞是终末分化细胞的一种,其增殖能力十分有限,导致心肌在受损后难以自我修复<sup>[1-2]</sup>,取而代之的是形成纤维化瘢痕,并最终导致心律失常和心力衰竭(heart failure, HF)<sup>[3-4]</sup>。目前,MI 的治疗方法主要包括药物、介入和外科手术,尽管这些治疗策略日趋成熟,并极大地改善了患者的预后,但由于心肌细胞不可再生的特性,在发病多年后大多数患者仍不可避免地进展为 HF<sup>[5]</sup>。

一直以来,如何实现心肌再生都是学者关注的重点问题。近年来,诱导原有心肌细胞恢复增殖能力的再生方式被广泛研究。已有多项研究表明,通过这种途径可以减少MI后心肌纤维化面积,并改善心功能<sup>[6-8]</sup>。既往研究表明,新生小鼠的心肌细胞在出生后早期仍具备增殖能力<sup>[7]</sup>。1日龄小鼠MI术后早期可见Ki67和PH3等增殖标志物的表达显著升高,术后21d可观察到心脏完全再生<sup>[9]</sup>;而这种能力在出生后7d逐渐丧失,心肌细胞退出增殖周期<sup>[9-10]</sup>。目前已证明许多机制可以促进心肌细胞的增殖,例如代谢重编程、免疫调节和细胞周期调节等<sup>[10]</sup>,但仍有较多潜在的分子机制目前尚未明确,使其临床转化进程缓慢。

近年来,生物信息学的发展促进了对生物生长发育过程、疾病进展中关键基因的筛选。加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)可以通过基因聚类形成基因模块<sup>[9]</sup>。通过分析模块与临床特征之间的关联程度可辨别关键的模块并筛选出枢纽基因,以进一步研究。本研究通过WGCNA等生物信息学技术结合动物实验,旨在筛选出与MI后心肌细胞增殖相关的枢纽基因,并为后续心肌细胞增殖的深入研究提供新的思路与靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 数据收集和预处理** RNA高通量测序(RNA-sequencing, RNA-seq)数据集GSE123863、GSE-184792和GSE198300均来自GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)数据库。3个数据集共包含48例样本,分3组:1日龄MI小鼠(D1-MI,  $n=14$ )、7~8日龄MI小鼠(D7/8-MI,  $n=10$ )、假手术组(SH)( $n=24$ )。由于新生小鼠的心肌细胞在出生后第7天丧失了增殖能力,D1-MI组的小鼠被归类为增殖组,而D7/8-MI组的小鼠被归为非增殖组。将3个GEO数据集合并,并使用sva包<sup>[11]</sup>消除批次效应以提高数据可靠性。

**1.2 差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的鉴定** 将原始数据进行对数转换后使用limma包<sup>[12]</sup>对两组样本(D1-MI与D7/8-MI)进行差异基因分析,  $|\log_2 \text{Fold change}|(|\log_2 \text{FC}|) > 1.5$ 且校正后 $P(P.adj) < 0.05$ 为有统计学差异。

**1.3 通路富集分析** 使用ClusterProfiler包<sup>[13]</sup>分别对差异基因和后续关键模块进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因和基因组百科(Kyoto Encyclopedia of genes and genomes, KEGG)功能富集分

析,以探究差异基因与模块的潜在功能和信号通路。两项分析均以 $P.adj < 0.05$ 作为统计学差异的标准。

**1.4 WGCNA 鉴定与心肌再生和心肌细胞增殖高度相关的基因** 首先原始数据被归一化为每百万计数(CPM)格式,随后使用EdgeR包中的cpm函数<sup>[14]</sup>将数据进行对数转换。数据预处理后得到基因表达矩阵共21 570个基因,筛选绝对中位差(MAD)前10 000的基因进行WGCNA分析。按照 $R^2=0.85$ 确定软阈值为 $\beta=12$ ,并将加权邻接矩阵转化为拓扑重叠矩阵(TOM),然后利用分层聚类方法构建TOM的聚类树状图。基于TOM的分层聚类将相似表达模式的基因划分为同一模块,不同模块之间用颜色区分,每个模块至少包含30个基因(minModuleSize=30)。与心肌细胞增殖相关模块的显著性通过Pearson检验确定。

**1.5 转录因子(TFs)-枢纽基因相互作用的预测** 小鼠的TFs信息库下载于transcriptional regulatory relationships unraveled by sentence-based text mining (TRRUST: [www.grnpedia.org/trust/](http://www.grnpedia.org/trust/)),并通过R软件分析与枢纽基因相关的TFs。并通过Cytoscape对TFs与枢纽基因的互作网络进行可视化。

**1.6 新生小鼠MI模型的构建** C57BL/6J野生型孕鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,所有小鼠饲养环境为室温( $20 \pm 2$ )℃,光照时间12 h,相对湿度40%~50%。动物实验方案已获得南开大学实验动物伦理委员会批准(伦理号:2022-SYDWLL-000273)。孕母独笼饲养,每日多次观察并及时记录生产日期,乳鼠出生当天记为第0天,24 h后记为D1。新生小鼠被分为两组:(1)1日龄MI手术组(D1-MI,  $n=6$ )。(2)7日龄MI手术组(D7-MI,  $n=6$ )。将新生小鼠置于冰上诱导低温麻醉,1 min左右待呼吸及四肢活动减慢视为已麻醉,将其放于冰台维持术间麻醉状态,手术操作全程在体式显微镜下进行。沿胸廓左侧第四肋位置垂直于身体长轴做横向皮肤切口,钝性解剖胸大肌与胸小肌后于第四肋间隙进入胸腔,显微镜下可见“人”字形血管即为冠脉,用8-0带线缝合针结扎冠脉左前降支(left anterior descending coronary artery, LAD)诱发MI。随后用8-0带线缝合针关闭胸腔并缝合皮肤。手术后将小鼠置于加热毯上快速复温并在一笼乳鼠全部完成手术后统一送回母鼠笼中。MI术后3d再次低温麻醉后固定于冰台,开胸取梗死区心肌组织于预冷PBS中清洗后保存于-80℃冰箱。

**1.7 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)** 取冻存组织

0~20 mg 加入 1 mL Trizol(GLPBio),使用研磨机研磨 1 min 并进行超声破碎,静置 10 min 后,将离心机离心条件设置为 4℃, 12 000 r/min (以下离心均采用同样条件), 离心 10 min 并吸上清至新的离心管。加入 1/5 体积的氯仿剧烈震荡 30 下后静置 10 min,离心 15 min 后吸上清至新的离心管。加入等体积异丙醇沉淀 RNA,上下颠倒震荡 30 下后静置 10 min,离心 20 min 后可见白色沉淀即为 RNA。弃上清,加入 1 mL 75%乙醇(DEPC 水配制)上下震荡并静置 5 min,离心 5 min 后弃上清,重复 3 次得到纯度更高的 RNA。RNA 干燥 5 min 后用 DEPC 水溶解并定量,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值在 1.8~2.2 视为纯度较高可以使用。使用 SPARK Script RT plus Kit (SPA-RKjade, AG0304)两步法进行逆转录合成 cDNA。随后使用 2×SYBR Green qPCR Mix (Spark Jade, AH0104-B)配置 10 μL PCR 体系(2×SYBR Green Mix 5 μL; 前引物 0.2 μL; 后引物 0.2 μL; DEPC 水 3.6 μL; cDNA 1 μL)。按照 94℃ 3 min 预变性;94℃ 10 s,55℃ 20 s,72℃ 20 s,45 个循环条件进行反应。以 7 日龄 MI 乳鼠为对照组,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法计算相对基因表达的倍数变化,并以 β-肌动蛋白(β-actin)为参照基因。引物序列及产物大小见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

基因名称	引物序列	产物大小
NDUFB2	F 5'-TGGAGACAGTGGAGTCCGTCAC-3'	22
	R 5'-CCAGCACAGCATCCGAGTCATG-3'	22
CPEB4	F 5'-ACAGCCACTTGACCCACGGAAA-3'	22
	R 5'-CCAGCATAGCAGACGCCTCCAT-3'	22
TECR	F 5'-GCACCACAGCCACACTCTACTT-3'	22
	R 5'-ACTCCGTCAGGAAGACCGTCAC-3'	22
HIC2	F 5'-GCCGCAACACGAGAAGACACA-3'	21
	R 5'-AGCGGCTACTGCGGACTGAA-3'	20
IFITM3	F 5'-TACCTAGCCCATGCCTCGGATG-3'	22
	R 5'-ACCACAGCCCAGAGAACTTCGT-3'	22
ACOT1	F 5'-GCCTTTTGGCGATTGGTCA-3'	20
	R 5'-TCAGGATAGTCACAGGGGTAT-3'	22
ACOT4	F 5'-TGCGGTACATGCTTCGACATCC-3'	22
	R 5'-GGCGGAATCATGCTCTGCTTGT-3'	22
β-actin	F 5'-ATGGAGCCGGACAGAAAAGC-3'	20
	R 5'-TGGGAGGTGTCAACATCTTCTT-3'	22

1.8 统计学处理 动物实验数据使用 GraphPad Prism6 进行统计分析及可视化,两组间比较采用非配对 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 GO 和 KEGG 富集分析证实 DEGs 与细胞增殖相关 合并 3 个数据集并去除批次效应(图 1A、B)。

按照前述标准共筛选出 612 个差异基因,其中上调基因为 332 个,下调基因为 280 个。选择 Top40 差异表达基因绘制热图(图 1C),并以火山图对全部差异基因进行可视化(图 1D)。

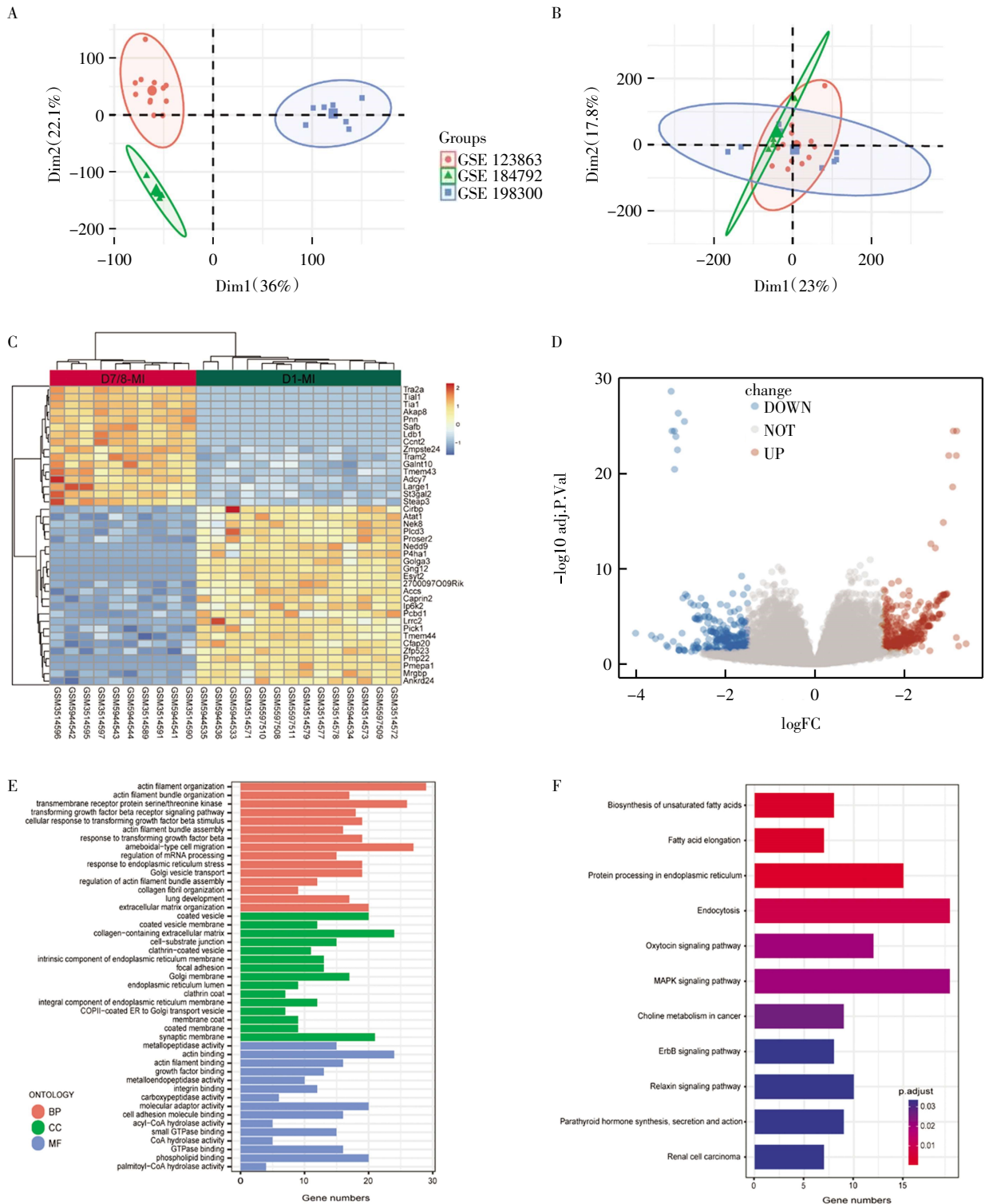
针对 DEGs 初步进行 GO(图 1E)和 KEGG 分析(图 1F)。GO 分析结果表明,DEGs 参与肌动蛋白的组装相关通路(如 GO:0007015;GO:0061572 等)、细胞间信号转导通路(如 GO:0007178;GO:0007179 等)以及与肽酶活性相关通路(如 GO:0008237;GO:0004222)。KEGG 分析显示,DEGs 共参与了 11 条信号通路,其中脂肪酸代谢相关通路(如 Biosynthesis of unsaturated fatty acids, *P*.*adj*<0.001; Fatty acid elongation, *P*.*adj*<0.001),MAPK 通路(*P*.*adj*=0.02)等均已被证实与细胞增殖相关。

2.2 构建 WGCNA 共表达网络并筛选关键模块 使用 Pearson 相关系数对样本进行聚类,并生成样本聚类树(图 2A)。通过“powerEstimate”函数选取 *R*<sup>2</sup>=0.85 时的软阈值 β=12 为最佳软阈值(图 2B)。随后,将邻接矩阵转换为 TOM 矩阵(图 2C),并基于平均分层聚类和动态树裁剪共识别到 16 个模块(图 2D)。其中蓝色(blue:*R*=-0.67, *P*.*adj*<0.05)和浅橙色(salmon: *R*=0.68, *P*.*adj*<0.05)模块与心肌再生高度相关,针对两个关键模块做基因显著性-模块成员图(GS-MM 图)发现 MM 和 GS 呈正相关,提示模块内基因增殖性状高度相关(图 3A、B)。

此外,对 16 个模块再次进行了 GO 和 KEGG 富集分析,进一步判定关键模块是否富集在与细胞增殖和心肌再生相关通路上。GO 分析(图 3C)显示,蓝色模块基因显著富集在与肌肉发育相关的多条通路。浅橙色模块基因则富集在血管生成调节和脉管发育调节通路。此外,KEGG 结果(图 3D)显示:蓝色模块基因在代谢相关通路与细胞增殖相关的途径上显著富集(如 Fatty acid metabolism, *P*.*adj*=0.01; PI3K-Akt signaling pathway, *P*.*adj*=0.01; MAPK signaling pathway, *P*.*adj*=0.047 等)。

2.3 枢纽基因的鉴定 将两个关键模块基因与差异基因取交集,所得基因被鉴定为枢纽基因,分别是 *NDUFB2*、*CPEB4*、*TECR*、*HIC2*、*IFITM3*、*ACOT1* 及 *ACOT4*(表 2)。

2.4 多个增殖相关 TFs 调节枢纽基因表达 通过 TRRUST 数据库进一步预测枢纽基因的 TFs。共 79 个 TFs 被预测与 7 个枢纽基因,即 *NDUFB2*、*CPEB4*、*TECR*、*HIC2*、*IFITM3*、*ACOT1*、*ACOT4* 相关(图 4)。



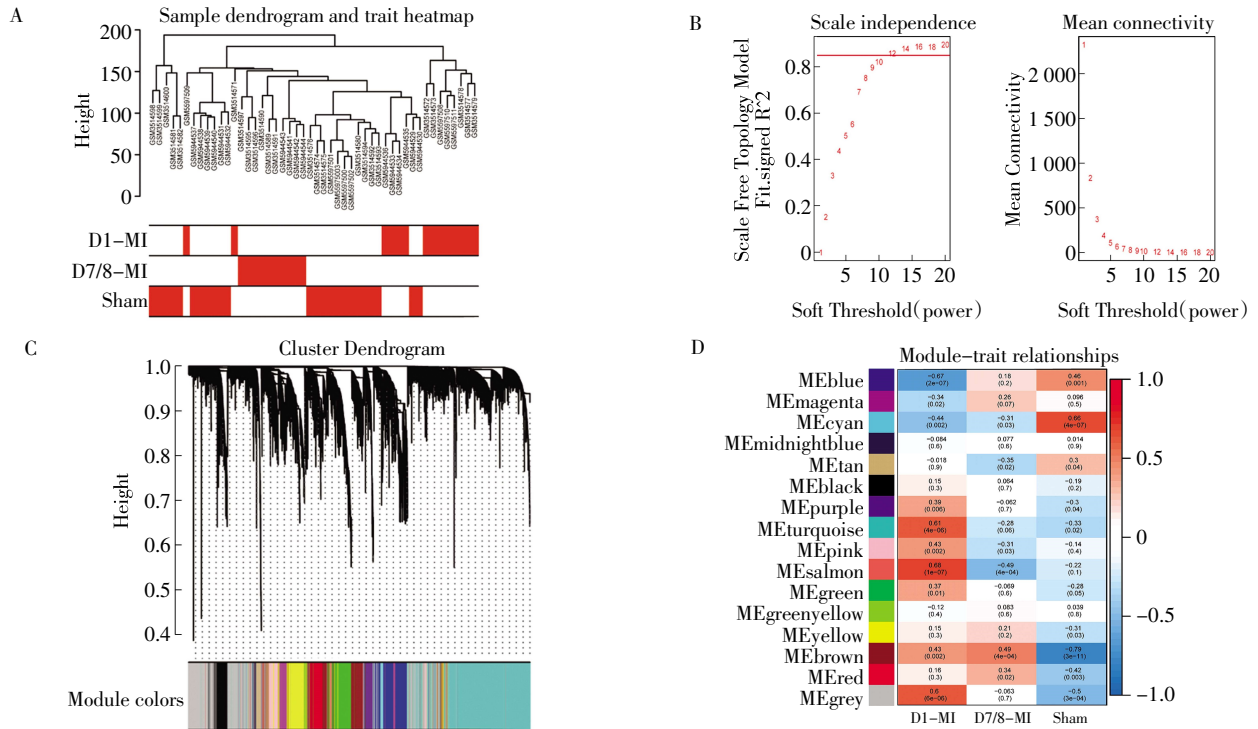
注:A:样本去批次效应前主成分分析图;B:样本去批次效应后主成分分析图;C:Top40 差异基因热图;D:全部差异基因火山图;E:全部差异基因 GO 富集分析条图(各部分的前 15 条通路);F:全部差异基因 KEGG 富集分析条图

图 1 差异基因的鉴定以及 GO 和 KEGG 富集分析

Fig.1 Identification of DEGs and enrichment analysis of GO and KEGG

2.5 枢纽基因的 RT-qPCR 验证 以 D7-MI 小鼠为对照组(非增殖组,  $n=6$ ), D7-MI 小鼠为实验组(增殖组,  $n=6$ )。RT-qPCR 结果显示,与非增殖组相比, *CPEB4*、*HIC2*、*IFITM3*、*ACOT1* 在增殖组表

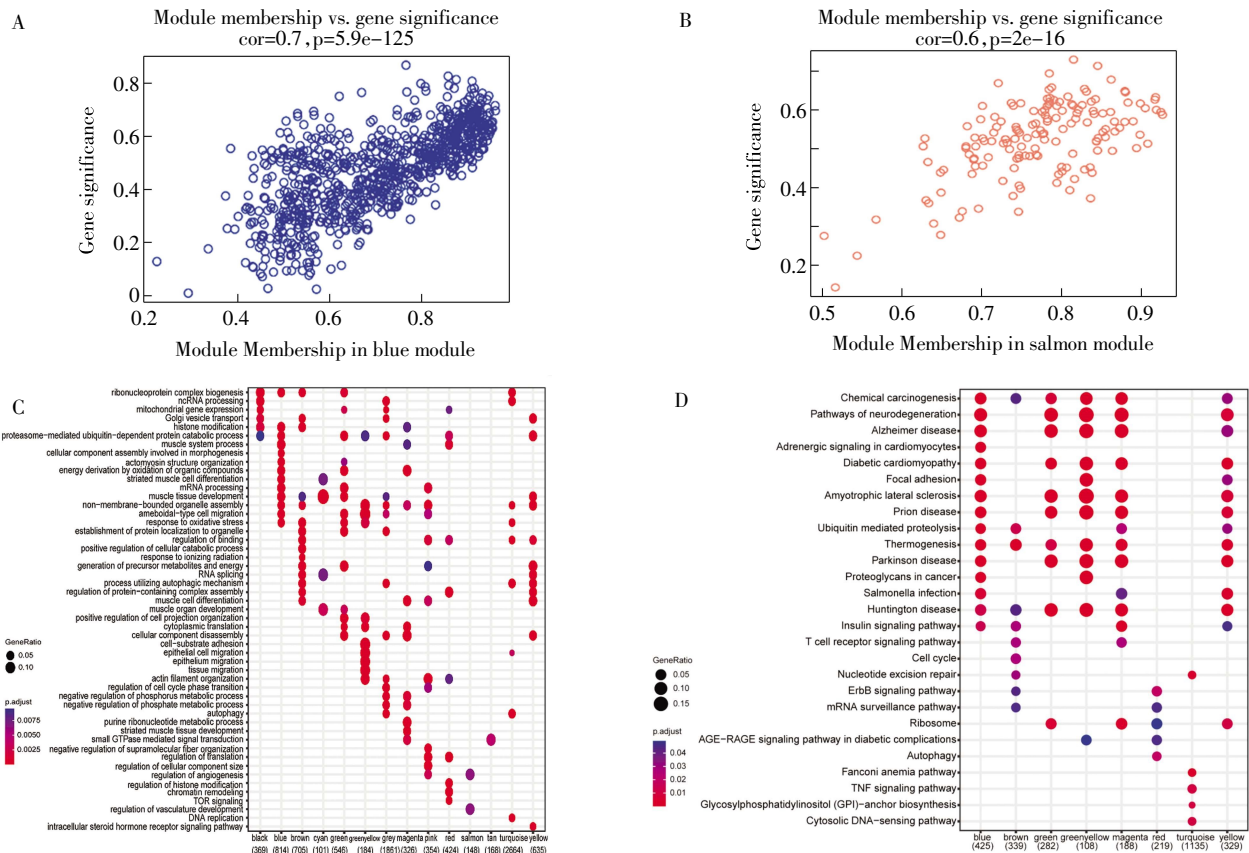
达显著升高(均  $P<0.05$ )。 *ACOT4* 在增殖组表达上升但无统计学意义( $P>0.05$ )。此外, *NDUFB2* 和 *TECR* 在增殖组表达显著低于对照组( $P<0.05$ , 图 5)。



注:A:临床特征热图和分层聚类树状图;B:选择最佳软阈值构建以无标度共表达网络;C:共表达模块的簇状树状图;D:模块基因与增殖特性的 Pearson 相关性热图,D1-MI 为可增殖组,D7/8-MI 和 Sham 组为不可增殖组

图2 共表达网络的构建以及模块与临床特征的关联

Fig.2 Construction of co-expression network and association between modules and clinical characteristics



注:A:蓝色模块的基因显著性(GS)-模块成员(MM)图;B:浅橙色模块 GS-MM 图;C:各模块的 GO 富集分析;D:各模块的 KEGG 富集分析

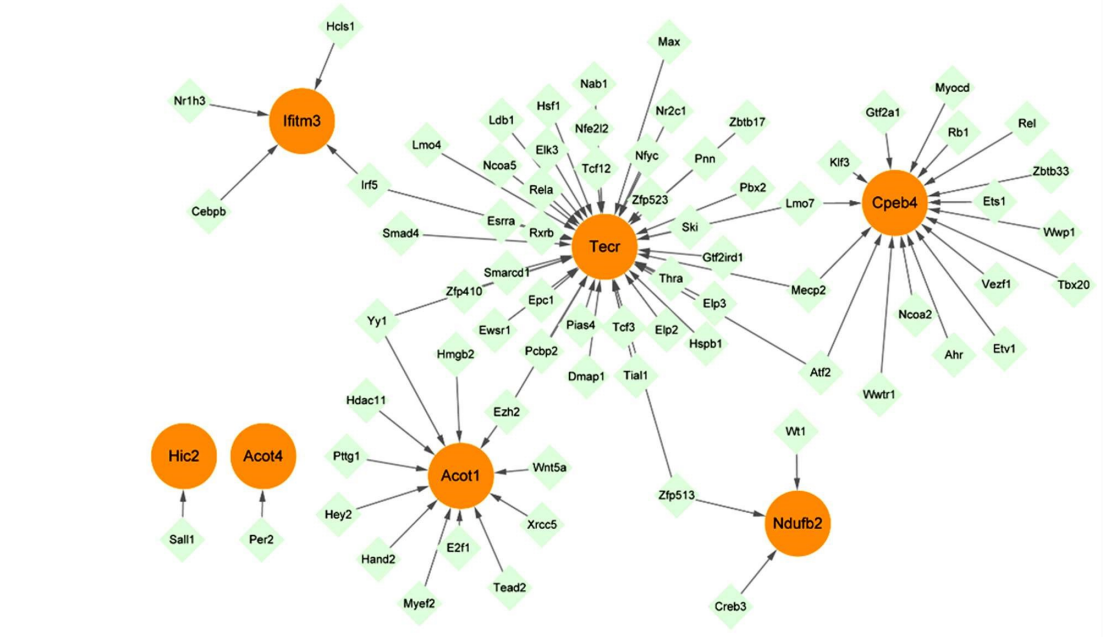
图3 关键模块分析

Fig.3 Analyses of key modules



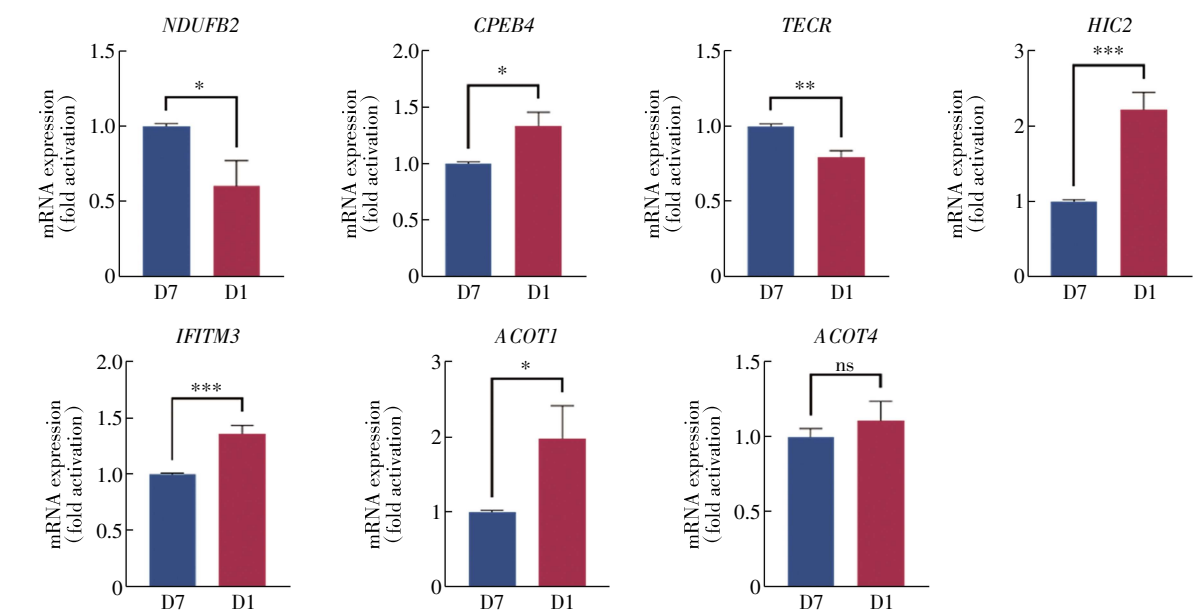
表 2 关键基因的差异表达  
Tab.2 Differential expression of hub genes in DEGs

基因名称	logFC	t	P.Value	P. adj	B	Change
<i>NDUFB2</i>	-2.080 053 98	-4.344 870 998	0.000 246 542	0.001 817 548	-0.277 412 500	DOWN
<i>CPEB4</i>	1.888 353 31	3.330 155 444	0.002 959 322	0.013 367 621	-2.716 761 870	UP
<i>TECR</i>	-2.034 523 49	-4.444 987 685	0.000 192 445	0.001 499 761	-0.031 326 020	DOWN
<i>HIC2</i>	1.570 197 17	11.441 258 200	7.07E-11	2.20E-08	14.955 402 640	UP
<i>IFITM3</i>	1.634 829 47	3.121 096 767	0.004 867 729	0.019 888 074	-3.196 329 100	UP
<i>ACOT1</i>	1.596 772 03	7.765 527 799	8.02E-08	3.39E-06	7.816 921 503	UP
<i>ACOT4</i>	1.943 131 18	5.433 940 383	1.70E-05	0.000 214 354	2.399 380 482	UP



注:浅绿色为 TFs,橙色为枢纽基因

图 4 TFs 与关键基因的交互网络  
Fig.4 TFs-hub genes interaction network



注: D7: 7 日龄 MI 小鼠(非增殖组); D1: 1 日龄 MI 小鼠(增殖组); \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; ns:  $P > 0.05$

图 5 枢纽基因的 RT-qPCR 验证结果  
Fig.5 The results of RT-qPCR validation of hub genes

### 3 讨论

心肌细胞的增殖能力自出生后迅速下降,其年增殖率从20岁到75岁由1%下降至0.3%,这使得心肌一旦受损,就极难修复<sup>[15]</sup>。在过去的几十年里,尽管心血管疾病的治疗方式日益精进,但其患病率仍居高不下<sup>[16]</sup>。因此如何诱导原有心肌细胞恢复增殖能力,来补充丢失的细胞,并延缓HF进展是亟待解决的问题。

本研究整合了GSE123863、GSE184792和GSE1983003个新生小鼠MI相关数据集,通过WGCNA分析筛选7个枢纽基因,分别是*NDUFB2*、*CPEB4*、*TECR*、*HIC2*、*IFITM3*、*ACOT1*、*ACOT4*。考虑到转录组测序可能存在不同测序平台以及检测过程中带来的误差,于是进行了动物实验以验证枢纽基因的表达趋势。动物实验结果显示基因变化的趋势与生物信息学分析变化的趋势基本一致,提示分析结果可靠。而*ACOT4*尽管表达趋势一致,但缺乏统计学意义,这可能与MI术后梗死区细胞发生多种不同形式的死亡,如凋亡、焦亡和铁死亡等有关,所以部分相关基因表达不稳定,需要进一步探究。

在多种诱导心肌细胞增殖的途径中,代谢重编程被广泛研究。既往研究证实,心肌细胞在出生后会短暂保持可增殖能力,随后由于暴露在含氧环境中,其供能方式由厌氧糖酵解转换为基于线粒体的脂肪酸代谢,这一过程中的氧化磷酸化往往伴随大量活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的累积,造成细胞DNA损伤,从而退出增殖周期<sup>[10]</sup>。所谓代谢重编程是指在心肌受损后短暂诱导细胞恢复糖酵解的代谢模式,来诱导心肌细胞增殖,包括抑制脂肪酸代谢<sup>[17]</sup>、抑制三羧酸循环<sup>[18]</sup>以及促进糖酵解等多种途径。

在本研究筛选出的关键基因中,有多个基因与代谢、氧化应激相关。*NDUFB2*是泛醌氧化还原酶的亚基,参与线粒体复合物I的组装<sup>[19]</sup>,该基因的增多会促进线粒体氧化磷酸化<sup>[20]</sup>以及内质网自噬<sup>[21]</sup>。根据生信分析和qPCR验证结果,该基因在不可增殖组明显升高,可能是通过促进氧化应激进而抑制细胞增殖。*CPEB4*是一种RNA结合蛋白,通过与靶向转录本的细胞质多聚腺苷酸元件(cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein, CPE)结合调节其翻译,进而影响细胞的生物过程<sup>[22]</sup>。有研究表明*CPEB4*的上调会促进细胞的糖酵解,并促进肝星状细胞增殖<sup>[23]</sup>,这与本研究发现*CPEB4*在增殖组小鼠样本中显著上调相符;此外,有研究表明*CPEB4*与

*CPEB1*的协调作用会调节细胞分裂周期<sup>[24]</sup>并影响血管生成<sup>[25]</sup>,侧面证实该基因可能与心肌细胞增殖相关。*ACOT1*、*ACOT4*以及*TECR*则均与脂肪酸代谢相关。首先,*ACOT1*与*ACOT4*均属于酰基辅酶A硫酯酶(acyl-CoA thioesterase, ACOT) I型家族,通过平衡细胞内脂酰辅酶A、游离脂肪酸和乙酰辅酶A的动态平衡来参与脂肪酸代谢。*ACOT1*的过表达会抑制心肌细胞中的脂质过氧化,并提高体内谷胱甘肽比值,通过清除氧自由基降低细胞氧化应激,来发挥保护作用<sup>[26]</sup>;*ACOT4*除了影响脂肪酸代谢外还可以通过水解琥珀酰辅酶A抑制三羧酸循环<sup>[27]</sup>,并有研究表明*ACOT4*可以通过Akt通路促进胰腺肿瘤细胞增殖<sup>[28]</sup>。在本研究中,*ACOT1*在可增殖组显著升高并受到增殖相关转录因子如Hand2、Wnt5a等调控,这提示其可能在心肌细胞增殖中发挥了促进作用;*ACOT4*也在可增殖组水平上升但无统计学意义,可能需要进一步蛋白相关的实验验证。*TECR*又称为2,3-反式烯酰辅酶A还原酶,参与脂肪酸在内质网的合成<sup>[29]</sup>,其在增殖组表达下调,可能通过抑制脂肪酸氧化促进心肌细胞增殖。

此外,*HIC2*与*IFITM3*是与心肌发育相关的关键基因。*HIC2*是正常心脏发育所必需的基因,调节心肌细胞在成熟过程中的亚型转化。有研究表明*HIC2*的基因变异或缺失会导致早期胚胎致死<sup>[30]</sup>。*IFITM3*可增加心脏分化标志物肌球蛋白轻链心室亚型2的水平<sup>[31]</sup>,褪黑素可以通过PI3K/Akt通路下调*IFITM3*的表达,进而抑制大鼠胚胎心肌细胞的增殖<sup>[32]</sup>。但目前MI中未见该基因与心肌细胞增殖的相关研究。

由于MI术后新生小鼠数据集样本相对较少,使本研究存在一定的局限性,关键基因的具体作用以及机制仍需要进一步精细的实验验证。

综上所述,本研究通过生物信息学筛选并最终通过实验鉴定了*NDUFB2*、*CPEB4*、*TECR*、*HIC2*、*IFITM3*、*ACOT1*可能是与MI后心肌细胞增殖相关的关键基因,为进一步明确心肌细胞增殖相关分子机制提供了理论和实验基础,并促进其在心肌再生领域的研究。

#### 参考文献:

- [1] WANG Y, YAO F, WANG L, et al. Single-cell analysis of murine fibroblasts identifies neonatal to adult switching that regulates cardiomyocyte maturation[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2585.
- [2] TIAN Y, LIU Y, WANG T, et al. A microRNA-hippo pathway that promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration in mice[J]. Sci Transl Med, 2015, 7(279): 279ra38.

- [3] LUCZAK E D, WU Y, GRANGER J M, et al. Mitochondrial camkii causes adverse metabolic reprogramming and dilated cardiomyopathy[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4416.
- [4] LOFRUMENTO F, IRRERA N, LICORDARI R, et al. Off-target effects of p2y12 receptor inhibitors: focus on early myocardial fibrosis modulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(24): 17546.
- [5] NOWBAR A N, GITTO M, HOWARD J P, et al. Mortality from ischemic heart disease[J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2019, 12(6): e005375.
- [6] LANGFELDER P, HORVATH S. Wgcna: an R package for weighted correlation network analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 559.
- [7] LAM N T, SADEK H A. Neonatal heart regeneration: comprehensive literature review[J]. *Circulation*, 2018, 138(4): 412–423.
- [8] WANG W, CHEN X K, ZHOU L, et al. Chemokine ccl2 promotes cardiac regeneration and repair in myocardial infarction mice via activation of the JNK/STAT3 axis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, 45(4): 728–737.
- [9] PORRELLO E R, MAHMOUD A I, SIMPSON E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart[J]. *Science*, 2011, 331(6020): 1078–1080.
- [10] GONG R, JIANG Z, ZAGIDULLIN N, et al. Regulation of cardiomyocyte fate plasticity: a key strategy for cardiac regeneration[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 31.
- [11] LEEK J T, JOHNSON W E, PARKER H S, et al. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(6): 882–883.
- [12] RITCHIE M E, Phipson B, WU D, et al. Limma powers differential expression analyses for rna-sequencing and microarray studies[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47.
- [13] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284–287.
- [14] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. EdgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139–140.
- [15] BERGMANN O, BHARDWAJ R D, BERNARD S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans[J]. *Science*, 2009, 324(5923): 98–102.
- [16] TSAO C W, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. Heart disease and stroke statistics –2023 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2023, 147(8): e93–e621.
- [17] LI X, WU F, GÜNTHER S, et al. Inhibition of fatty acid oxidation enables heart regeneration in adult mice[J]. *Nature*, 2023, 622(7983): 619–626.
- [18] BAE J, SALAMON R J, BRANDT E B, et al. Malonate promotes adult cardiomyocyte proliferation and heart regeneration[J]. *Circulation*, 2021, 143(20): 1973–1986.
- [19] SIGNES A, FERNANDEZ-VIZARRA E. Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes i–v and supercomplexes [J]. *Essays Biochem*, 2018, 62(3): 255–270.
- [20] ZHUANG X, ZHANG G, BAO M, et al. Development of a novel immune infiltration-related diagnostic model for Alzheimer’s disease using bioinformatic strategies[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1147501.
- [21] LIANG J R, LINGEMAN E, LUONG T, et al. A genome-wide erphagy screen highlights key roles of mitochondrial metabolism and er-resident ufmylation[J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1160–1177.e1120.
- [22] CAO G, CHEN D, LIU G, et al. Cpeb4 promotes growth and metastasis of gastric cancer cells via zeb1-mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 6153–6165.
- [23] MEJIAS M, GALLEGO J, NARANJO-SUAREZ S, et al. Cpeb4 increases expression of pfkfb3 to induce glycolysis and activate mouse and human hepatic stellate cells, promoting liver fibrosis[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(1): 273–288.
- [24] GUILLÉN-BOIXET J, BUZON V, SALVATELLA X, et al. Cpeb4 is regulated during cell cycle by erk2/cdk1-mediated phosphorylation and its assembly into liquid-like droplets [J]. *Elife*, 2016, 5: e19298.
- [25] CALDERONE V, GALLEGO J, FERNANDEZ-MIRANDA G, et al. Sequential functions of cpeb1 and cpeb4 regulate pathologic expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in chronic liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(4): 982–997.
- [26] LIU Y, ZENG L, YANG Y, et al. Acyl-coa thioesterase 1 prevents cardiomyocytes from doxorubicin-induced ferroptosis via shaping the lipid composition[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9): 756.
- [27] WESTIN M A, HUNT M C, ALEXSON S E. The identification of a succinyl-coa thioesterase suggests a novel pathway for succinate production in peroxisomes [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(46): 38125–38132.
- [28] NI C, ZHENG K, GAO Y, et al. Acot4 accumulation via akt-mediated phosphorylation promotes pancreatic tumorigenesis[J]. *Cancer Lett*, 2021, 498: 19–30.
- [29] HONDA A, NOZUMI M, ITO Y, et al. Very-long-chain fatty acids are crucial to neuronal polarity by providing sphingolipids to lipid rafts[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(10): 113195.
- [30] DYKES I M, VAN BUEREN K L, SCAMBLER P J. Hic2 regulates isoform switching during maturation of the cardiovascular system[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 114: 29–37.
- [31] LAU S L, YUEN M L, KOU C Y, et al. Interferons induce the expression of ifitm1 and ifitm3 and suppress the proliferation of rat neonatal cardiomyocytes[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(3): 841–847.
- [32] ZHAO A, ZHAO K, XIA Y, et al. Melatonin inhibits embryonic rat h9c2 cells growth through induction of apoptosis and cell cycle arrest via PI3K-Akt signaling pathway[J]. *Birth Defects Res*, 2021, 113(16): 1171–1181.

(2023-12-03 收稿)