

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.07.011

文章编号: 1005-8982 (2019) 07-0053-08

通过转录组测序分析识别糖尿病患者 冠状动脉粥样硬化的新途径

陈丁源

(青海省心脑血管病专科医院 急诊科, 青海 西宁 810012)

摘要: **目的** 探究冠状动脉疾病 (CAD) 和 2 型糖尿病 (T2DM) 患者心外膜脂肪组织 (EAT) 的转录组变化。**方法** 选取青海省心脑血管病专科医院 8 例 CAD 患者, 并根据有无 T2DM 将患者分为糖尿病组 (D 组, $n=5$) 和非糖尿病组 (ND 组, $n=3$)。对 8 例患者 EAT 样本进行 RNA 测序分析。基因富集分析以鉴定受差异表达基因影响的途径。通过逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 及 Western blotting 检测验证靶基因的变化。**结果** 有 592 个基因在 D 组 EAT 中差异表达。在 D 组 EAT 中差异表达基因主要富集于炎症相关反应, 例如 CSF3、IL-1 β 、IL-6。KEGG 通路分析证实, 上调的基因参与炎症途径, 如肿瘤坏死因子 (TNF), NF- κ B 及 AGE-RAGE。在氧化应激途径中通过实验验证两个差异有统计学意义的基因 (*FRA1* 和 *PTX3*)。**结论** 糖尿病 EAT 的转录组变化与高血糖引起的氧化应激密切相关, 其基因的差异表达可能激活了氧化应激反应并促进糖尿病患者的动脉粥样硬化。

关键词: 冠状动脉疾病; 糖尿病, 2 型; 心外膜脂肪组织; 序列分析

中图分类号: R543.3

文献标识码: A

Transcriptome sequencing analysis in patients with diabetes to identify coronary heart disease

Ding-yuan Chen

(Department of Emergency, Qinghai Province Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Specialist Hospital, Xining, Qinghai 810012, China)

Abstract: Objective To evaluate the epicardial adipose tissue (EAT) transcriptome analysis in coronary artery disease (CAD) complicated with type 2 diabetes (T2DM). **Methods** EAT samples were obtained from subjects with CAD patients and they were divided into diabetes group (D group, $n=5$) and non-T2DM (ND group, $n=3$). RNA-sequencing analysis was performed in EAT. Gene enrichment analysis was conducted to identify differentially expressed signal pathways which were verified by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and western blotting. **Results** A total of 592 genes were differentially expressed in diabetic EAT, which were mainly inflammatory genes including Colony Stimulating Factor 3 (CSF3), Interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6. KEGG pathway analysis confirmed that upregulated genes were involved in inflammatory pathways including Tumor Necrosis Factor (TNF), Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) and advanced glycation end-products-receptor advanced glycation end products (AGE-RAGE). *FRA1* and *PTX3* were experimentally validated in an oxidative stress pathway. **Conclusions** The transcriptome changes of diabetic EAT are closely related to the hyperglycemia-induced oxidative stress, which may activate oxidative stress and promote atherosclerosis in diabetic patients.

Keywords: coronary artery disease; diabetes, type 2; epicardial adipose tissue; sequence analysis

收稿日期: 2018-09-13

心外膜脂肪组织 (epicardial adipose tissue, EAT) 是一种内脏脂肪组织, 与冠状动脉和心肌紧密相邻, 可分泌大量脂肪因子。EAT 被认为在冠状动脉疾病 (coronary artery disease, CAD) 的发生、发展中发挥作用^[1]。EAT 可通过巨噬细胞活化、氧化应激, 以及先天性炎症反应等参与 CAD^[2]。有研究表明, 在脂肪细胞功能异常、内脏肥胖症以及糖尿病相关的冠状动脉粥样硬化间存在相互作用^[3-4]。尽管如此, 糖尿病对 CAD 患者 EAT 转录组的影响尚未得到很好的阐释。此外, 之前的研究大多使用微阵列技术, 而 EAT 的转录组测序 (RNA-seq) 分析在该研究为首次应用。本研究对 8 例 CAD 和 2 型糖尿病 (type 2 diabetes, T2DM) 的受试者的 EAT 进行 RNA-Seq 分析, 鉴定有差异表达基因, 并通过实验验证氧化应激途径下有差异表达的基因。

1 资料与方法

1.1 样本收集

选取 2015 年 6 月—2016 年 1 月青海省心脑血管病专科医院 8 例接受心胸外科手术 (冠状动脉旁路移植术或心脏瓣膜置换术) CAD 患者。冠状动脉粥样硬化性心脏病 (以下简称冠心病) 患者纳入标准^[5]: ①经冠状动脉造影检查确诊, 符合 WHO 制订的冠心病诊断指标; ②血清 TC>5.2 mmol/L 或 LDL-C>3.1 mmol/L; ③按 NYHA 心功能分级 II、IV 级; ④常见症状有胸闷、胸痛、心悸、乏力等。该 8 例 CAD 患者根据有无 T2DM 将患者分为糖尿病组 (D 组, $n=5$) 和非糖尿病组 (ND 组, $n=3$)。T2DM 患者纳入标准根据 1999 年世界卫生组织 (WHO) 诊断标准^[6]: ①糖尿病症状, 空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L 或餐后 2 h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L; ②无糖尿病症状, 空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L 或餐后

2 h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L, 重复再测 1 次, 仍达以上值者; ③无糖尿病症状, 空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L 或餐后 2 h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L, 糖耐量实验 2 h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L 者中, 符合任意 2 条标准或符合同一标准 2 次者诊断为糖尿病。此研究由青海省心脑血管病专科医院医学伦理委员会批准, 患者知情并签署知情同意书。本研究收治的 T2DM 患者有糖尿病史, 目前使用抗糖尿病药物 (口服或注射用药) 且血红蛋白 A1c (HbA1c) $\geq 6\%$ 。D 组 5 例患者。男性 2 例, 女性 3 例; 年龄 60 ~ 75 岁, 平均 (69.6 \pm 5.81) 岁, 符合 T2DM 条件; ND 组 3 例患者。男性 2 例, 女性 1 例; 年龄 51 ~ 66 岁, 平均 (58.0 \pm 7.55) 岁, 既往有糖尿病或糖尿病前期病史, 糖化血红蛋白 $\leq 5.7\%$ 且未服用抗糖尿病药物。心脏病专家根据临床病史, 术前冠状动脉造影和其他常规检查确定 CAD 是否存在。发现 60 ~ 75 岁的 6 例患者具有 CAD, 而 51 ~ 57 岁的 2 例患者无 CAD。基本资料见表 1。对每位受试患者进行术前空腹抽血, 检测其血糖、血红蛋白 A1c (HbA1c)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST)。ALT 被当作胰岛素抵抗的替代指标^[7]。在患者右冠状动脉近端部分附近获得 EAT 样本, 其深度至心包的脏层。获得组织样本储存于液氮中直至提取 RNA 进行测序处理。

1.2 脂肪 RNA 提取

对收集的脂肪组织提取 RNA。在 2 ml TRI 试剂缓冲液中分离大约 200 μ g 脂肪组织。将样品在室温下温育 5 min, 并在 4 $^{\circ}$ C 下 12 377 r/min 离心 10 min。除去脂肪单层, 并将上清液收集到 2 个 1.5 ml 微量离心管中, 每管中加入 200 μ l 氯仿 (CHCl₃)。通过涡旋混合后, 将样品在 4 $^{\circ}$ C 下 12 377 r/min 离心 30 min。收集上层液相并与 200 μ l 氯仿混合, 然后在 4 $^{\circ}$ C、12 377 r/min 离

表 1 患者基本信息

| 患者编号 | 性别 | 年龄 | BMI | 手术方式 | 糖尿病 | CAD | 高血压 | 胰岛素使用 | 口服降糖药 | A1c/% |
|------|----|----|-----|-------|-----|-----|-----|-------|-------|-------|
| 1 | 女 | 57 | 42 | Valve | 无 | 无 | 有 | 无 | 无 | 5.5 |
| 2 | 男 | 66 | 27 | CABG | 无 | 有 | 有 | 无 | 无 | 5.4 |
| 3 | 男 | 51 | 29 | Valve | 无 | 无 | 无 | 无 | 无 | 4.8 |
| 4 | 女 | 73 | 32 | CABG | 有 | 有 | 有 | 有 | 有 | 7.2 |
| 5 | 女 | 75 | 40 | CABG | 有 | 有 | 有 | 无 | 有 | 7.3 |
| 6 | 女 | 69 | 34 | CABG | 有 | 有 | 有 | 无 | 有 | 6.8 |
| 7 | 男 | 71 | 33 | CABG | 有 | 有 | 有 | 无 | 有 | 5.5 |
| 8 | 男 | 60 | 26 | CABG | 有 | 有 | 有 | 无 | 有 | 5.7 |

续表 1

| 患者编号 | FGB/ (mg/dl) | ALT/ (u/L) | BP/mmHg | LVM/ (g/m ²) | EF/% | E/e' | 颈动脉斑块 |
|------|--------------|------------|---------|--------------------------|------|------|-------|
| 1 | 108 | 49 | 99/59 | 55 | 50 | <10 | 无 |
| 2 | 96 | 58 | 150/80 | 73 | 55 | 9 | 有 |
| 3 | 85 | 40 | 142/81 | 71 | 55 | 9 | 无 |
| 4 | 157 | 44 | 128/73 | 72 | 55 | 13 | 有 |
| 5 | 205 | 91 | 133/59 | 102 | 50 | 17 | 有 |
| 6 | 203 | 42 | 157/109 | 108 | 47 | <10 | 无 |
| 7 | 91 | 19 | 134/55 | 167 | 55 | 12 | 无 |
| 8 | 116 | 46 | 104/59 | 90 | 55 | 12 | 无 |

注：Valve：三尖瓣瓣膜置换术；CABG：冠状动脉旁路移植术；BMI：体重指数；A1c：糖化血红蛋白；FGB：空腹血糖；ALT：丙氨酸氨基转移酶；BP：血压；LVM：左心室质量；EF：射血分数；E/e'：二尖瓣早期流入速度与二尖瓣早期舒张速度之比

心 30 min。然后将富含 RNA 的上层相与 1.5 倍体积的 100% 乙醇混合。将混合物装载到 RNeasy 离心柱（德国凯杰公司）中。多次洗涤后，用 60 μ l H₂O 洗脱 RNA。使用生物分析仪测量 RNA 的质量和数量。所有样本的 RNA 完整性（RIN）都在 8 以上。

1.3 测序数据处理

本转录组测序由上海致禾生物公司实施，将提取的 RNA 在 HiSeq 2000 仪器进行测序，最终获得原始测序数据。利用 TopHat 软件，将序列比对到人类参考基因组中。采用百万外显子的碱基片段（fragments per kilo bases per million reads, FPKM）评估基因表达水平。应用 Cufflinks 对实验组以及对照组的组织的比对文件进行分析，挖掘出错误发现率 <0.05 有差异表达的基因。

1.4 逆转录聚合酶链反应

根据相同的纳入标准，经过数据挖掘后，将后选的基因在扩大样本量中进行表达验证，扩大样本为另外单独收集的 20 对，包括 20 个糖尿病患者和 20 个非糖尿病患者的 EAT 样本。并按照 qScript Flex cDNA 试剂盒（美国安诺伦公司）说明书的步骤进行逆转录。使用具有 10 μ l 反应物的 Perfe CTA SYBR Green Fast Mix ROX（美国安诺伦公司）在 ABI 7900（美国生命技术科技公司）进行 RT-PCR。使用 ABI 7900 HT 软件分析转录物扩增结果，并且使用 2^{- $\Delta\Delta$} 方法将所有值归一化为 SDHA 的水平。

1.5 基因富集分析

使用 EmrichR^[8] 对识别的差异表达基因进行富集分析。具体分析类型有基因本体论（GO）富集，信号通路（KEGG）分析。

1.6 Western blotting 检测 FRA1 和 PTX2 表达

BCA 蛋白定量试剂盒、Western 制胶试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。BCA 法测蛋白质浓度，取 50 μ g 蛋白质用 10% 的分离胶和浓缩胶进行电泳分离，电转移至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h，孵育 1 : 2 000 比例 FRA1 和 PTX3 一抗 4℃ 摇床过夜。次日，回收一抗，1 \times TBST 洗膜 8 min/次，3 次，室温孵育 1 : 5 000 比例二抗 1 h，再次用 1 \times TBST 洗膜 8 min/次，3 次，ECL 发光试剂曝光。

1.7 统计学方法

数据分析采用 R 语言 2.39 软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，比较采用 *t* 检验，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 D 与 ND 组患者 EAT 的 RNA-seq 分析

通过 D 组与 ND 组 EAT 的 RNA-Seq 数据识别到 592 个差异表达基因，其中 433 个基因在糖尿病 EAT 中表现为上调，159 个基因表现为下调。见图 1。

2.2 D 组 EAT 中上调的基因

在 D 组 EAT 中高表达基因是 *ARC*（Fold Change, FC=80），与调控细胞骨架相关蛋白有关。根据差异表达的分析结果，11 个高表达基因其参与的功能作用各不相同（见表 2）。随后，将识别到的所有上调基因进行富集分析，挖掘其潜在的功能，结果显示 D 组 EAT 中上调的基因与炎症反应密切相关，包括炎症反应途径、细胞因子产生及白细胞迁移途径。KEGG 通路分析进一步证实，上调基因主要参与炎症相关

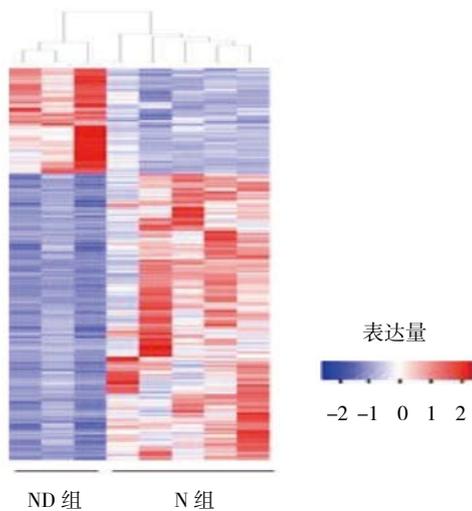


图 1 ND 组和 N 组差异表达基因聚类图

通路，如 cytokine-cytokine 相互作用、TNF、NF- κ B、JAK-STAT。值得注意的是，在 D 组 EAT 中发现有 20 个上调基因富集于 AGE-RAGE 信号途径，该途径的重要配体包括 S100A8 和 S100A9，其 FC 分别为 4.79 和 4.90。此外，本研究结果识别 26 个脂肪因子和脂肪因子受体（如 TNF 家族成员 TNFRSF12A、TNFRSF13C 和趋化因子受体 CXCR1 和 CXCR2 等）在 D 组 EAT 中表现为高表达（见表 3）。大部分脂肪因子如 CSF3、IL-1 β 、IL-6 及 CCL2 均表现为促炎性。使用 qRT-PCR 进一步验证由 RNA-Seq 识别一些具有差异表达的基因，该基因包括 CSF3、EMP1、

FOSL1、GOS2、IL-6、MT2A 和 THSB1。qRT-PCR 的结果证实该基因在 D 组 EAT 中为高表达。见图 2。

2.3 D 组 EAT 中下调的基因

在 D 组 EAT 中下调的基因包括 KRT19、RSP01、PTX3、KLK11 和 DNAJC22 等。该基因可能参与 CAD 和糖尿病性心脏病的发生、发展。

2.4 在 D 组 EAT 中氧化应激标志物的应用

为探究 EAT 中的 RNA 表达变化是否由高血糖引起的氧化应激增加所致，本研究分析以前研究报道过的在氧化应激作用下表达有改变的基因。结果发现，15 个基因在 D 组和 ND 组的 EAT 中均有表达，且其中 8 个基因（FRA1、PTX3、CDKN1A、GDF15、TIRAPP、RGS16、PLK3 和 ETS2）的差异有统计学意义。

2.5 蛋白表达

根据基因表达的 FDR 显著性，选择与氧化应激途径有关并且有差异表达的 2 个基因（FRA1 和 PTX3）（见图 3），通过免疫印迹在 EAT 中证实相关基因编码蛋白的表达情况。结果表明，在另外的 20 对 D 组和 ND 组的 EAT 中 FRA1（FOSL1 蛋白）的 Western blotting 结果为增加；PTX3 的 Western blotting 结果为降低（见图 4）。该蛋白表达结果与 RNA-Seq 结果一致。

表 2 各基因的表达变化 ($\bar{x} \pm s$)

| 基因名称 | 参与的功能 | 表达量 | | 两组基因表达值的 倍数变化 | t 值 | P 值 |
|-----------|---------|-------------------|----------------------|---------------------|--------|-------|
| | | ND 组 | D 组 | | | |
| ARC | 骨架信号 | 0.291 \pm 0.002 | 25.242 \pm 3.021 | 87.312 \pm 23.123 | 34.211 | 0.000 |
| LINC01348 | 未富集 | 0.262 \pm 0.001 | 15.991 \pm 2.232 | 60.711 \pm 18.342 | 45.212 | 0.000 |
| LIPG | 脂蛋白代谢 | 0.263 \pm 0.002 | 10.591 \pm 7.521 | 40.573 \pm 14.231 | 23.233 | 0.000 |
| PTX3 | 免疫信号 | 2.562 \pm 0.013 | 97.712 \pm 14.321 | 38.231 \pm 13.234 | 24.232 | 0.000 |
| CSF3 | 免疫信号 | 1.053 \pm 0.023 | 28.171 \pm 5.342 | 26.792 \pm 12.123 | 24.112 | 0.000 |
| LBP | 免疫信号 | 1.362 \pm 0.021 | 35.241 \pm 6.342 | 25.884 \pm 13.245 | 23.783 | 0.000 |
| FOSL1 | 细胞增殖 | 1.562 \pm 0.032 | 37.191 \pm 6.311 | 23.912 \pm 13.245 | 22.324 | 0.000 |
| SLC7A5 | 新陈代谢 | 1.212 \pm 0.012 | 22.432 \pm 8.234 | 18.543 \pm 9.234 | 21.231 | 0.000 |
| MMP-19 | 细胞外基质重塑 | 8.923 \pm 2.043 | 162.072 \pm 34.321 | 18.171 \pm 9.073 | 20.123 | 0.000 |
| SLC16A10 | 营养运输 | 0.682 \pm 0.022 | 11.251 \pm 3.211 | 16.472 \pm 8.421 | 18.231 | 0.000 |
| TNFRSF12A | 内皮细胞 | 6.253 \pm 2.021 | 100.471 \pm 23.251 | 16.083 \pm 7.782 | 17.234 | 0.000 |

表3 各脂肪因子及其受体的差异表达 ($\bar{x} \pm s$)

| 基因名称 | 参与的功能 | 表达量 | | 两组基因表达值的倍数变化 | t 值 | P 值 |
|--------|-------|-----------------|------------------|-----------------|--------|-------|
| | | ND 组 | D 组 | | | |
| CSF3 | 免疫信号 | 1.051 ± 0.021 | 28.172 ± 9.241 | 26.792 ± 13.123 | 20.123 | 0.000 |
| LBP | 免疫信号 | 1.361 ± 0.021 | 35.241 ± 13.244 | 25.882 ± 12.345 | 21.244 | 0.000 |
| CXCL8 | 免疫信号 | 6.471 ± 1.213 | 104.112 ± 23.133 | 16.112 ± 9.282 | 18.342 | 0.000 |
| IL1RN | 免疫信号 | 1.481 ± 0.011 | 21.623 ± 5.213 | 14.592 ± 8.081 | 16.231 | 0.000 |
| INHBA | 免疫信号 | 0.711 ± 0.002 | 11.332 ± 2.234 | 15.982 ± 7.625 | 15.232 | 0.000 |
| IL-6 | 免疫信号 | 25.811 ± 5.114 | 301.742 ± 33.123 | 11.692 ± 6.861 | 13.232 | 0.000 |
| FGF9 | 免疫信号 | 3.432 ± 0.123 | 0.453 ± 0.002 | 0.132 ± 0.023 | 3.234 | 0.000 |
| LIF | 免疫信号 | 4.692 ± 0.421 | 69.062 ± 23.12 | 12.593 ± 5.982 | 11.234 | 0.000 |
| STC1 | 免疫信号 | 3.292 ± 0.231 | 35.423 ± 7.234 | 10.772 ± 5.982 | 10.232 | 0.000 |
| PROK2 | 免疫信号 | 0.792 ± 0.001 | 7.512 ± 2.121 | 9.532 ± 5.091 | 8.232 | 0.000 |
| CXCL3 | 免疫信号 | 1.432 ± 0.012 | 17.282 ± 6.234 | 12.131 ± 6.012 | 9.234 | 0.000 |
| OSM | 免疫信号 | 2.092 ± 0.012 | 17.682 ± 5.829 | 8.483 ± 5.051 | 8.234 | 0.000 |
| OPN | 免疫信号 | 6.522 ± 1.231 | 60.762 ± 20.231 | 9.722 ± 4.811 | 8.234 | 0.000 |
| CHI3L1 | 免疫信号 | 5.751 ± 1.012 | 42.921 ± 13.232 | 7.462 ± 4.013 | 7.231 | 0.000 |
| IL-1β | 免疫信号 | 4.141 ± 0.781 | 30.123 ± 10.234 | 7.283 ± 3.872 | 6.232 | 0.000 |
| CCL2 | 免疫信号 | 85.812 ± 18.122 | 671.532 ± 78.231 | 7.832 ± 3.641 | 6.231 | 0.000 |
| AREG | 免疫信号 | 4.321 ± 0.781 | 31.741 ± 10.232 | 7.392 ± 3.342 | 5.811 | 0.000 |
| TNC | 免疫信号 | 7.292 ± 1.231 | 43.812 ± 15.232 | 6.012 ± 3.021 | 5.552 | 0.000 |
| CXCL2 | 免疫信号 | 26.253 ± 8.213 | 152.232 ± 34.234 | 5.821 ± 2.671 | 5.134 | 0.000 |
| PLAU | 免疫信号 | 9.813 ± 1.245 | 53.182 ± 16.232 | 5.422 ± 2.512 | 5.012 | 0.000 |
| SEMA4A | 免疫信号 | 18.935 ± 6.431 | 94.612 ± 20.121 | 5.012 ± 2.341 | 4.812 | 0.000 |
| ALPL | 免疫信号 | 6.462 ± 2.123 | 32.672 ± 15.231 | 5.053 ± 2.221 | 4.712 | 0.000 |
| CCL19 | 免疫信号 | 18.161 ± 6.123 | 79.332 ± 17.231 | 4.373 ± 2.123 | 4.521 | 0.000 |
| SEMA7A | 免疫信号 | 1.152 ± 0.123 | 5.212 ± 1.263 | 4.552 ± 2.412 | 4.411 | 0.000 |
| BMP-4 | 免疫信号 | 15.792 ± 6.331 | 4.633 ± 1.234 | 0.293 ± 0.003 | 2.123 | 0.000 |
| VEGFA | 免疫信号 | 31.112 ± 9.123 | 112.711 ± 34.234 | 3.623 ± 1.341 | 4.012 | 0.000 |
| SEMA6B | 免疫信号 | 6.273 ± 1.248 | 22.132 ± 6.21 | 3.534 ± 1.347 | 3.712 | 0.000 |
| ECGF1 | 免疫信号 | 24.892 ± 9.193 | 77.943 ± 23.112 | 3.133 ± 1.623 | 3.012 | 0.000 |
| FSTL3 | 免疫信号 | 21.543 ± 9.124 | 48.943 ± 32.344 | 2.274 ± 1.221 | 2.813 | 0.000 |
| SLIT2 | 免疫信号 | 18.262 ± 6.731 | 10.142 ± 2.124 | 0.563 ± 0.032 | 1.123 | 0.000 |

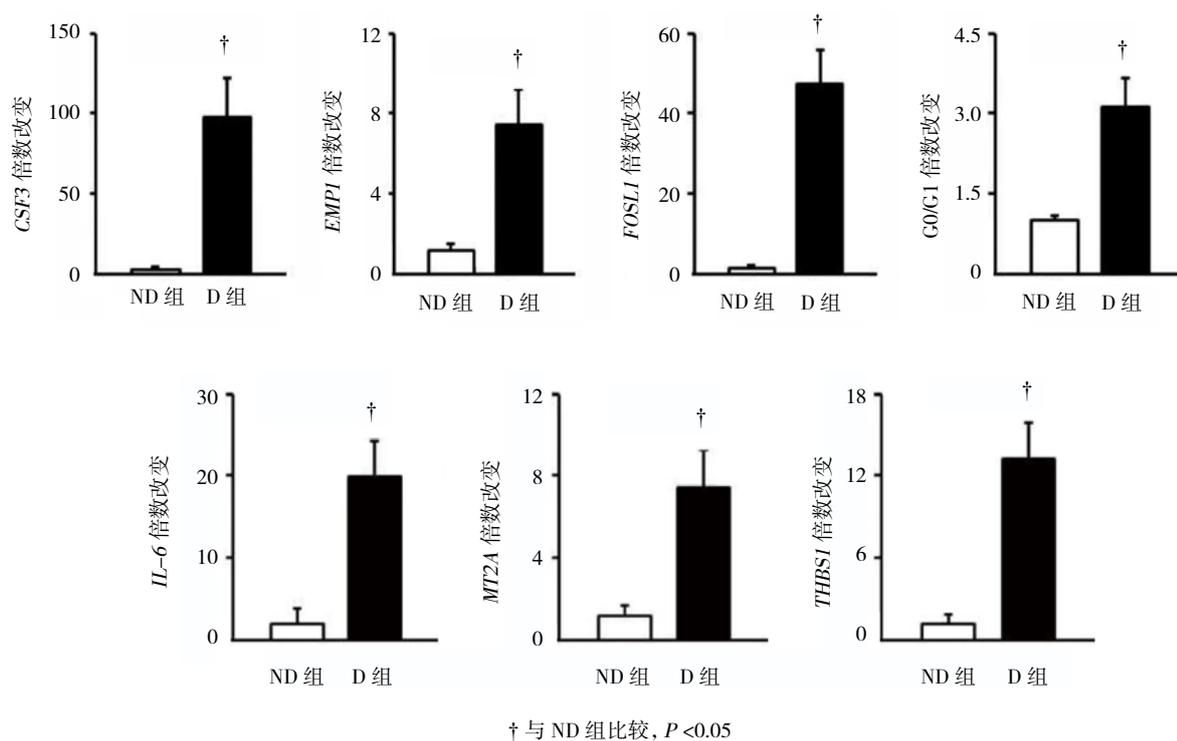


图 2 qRT-PCR 验证基因表达结果 ($\bar{x} \pm s$)

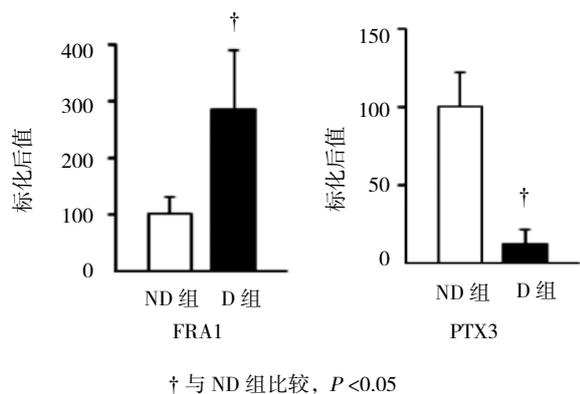
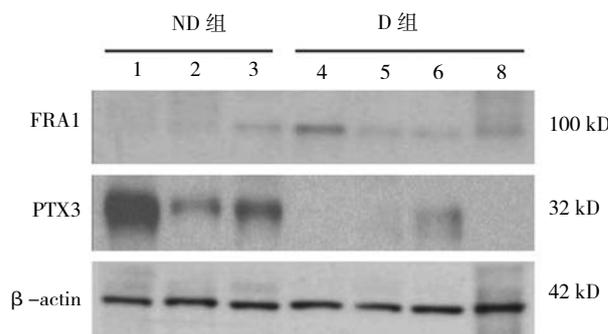


图 3 FRA1 和 PTX3 凝胶图像处理系统定量检测结果 ($\bar{x} \pm s$)



1、2、3 与 4、5、6、8 分别代表 ND 组和 D 组样本中的检测

图 4 FRA1 和 PTX2 Western blotting 结果

3 讨论

本研究发现,糖尿病 EAT 的差异表达基因高度富集于炎症反应。这支持以前研究的数据,证实 EAT 中炎症反应引起的转录组水平差异^[9-11]。在糖尿病 EAT 中上调的基因包括不同的炎症反应途径,例如细胞因子产生、白细胞迁移、细胞因子-细胞因子相互作用,以及 TNF、NF- κ B、JAK-STAT 和 AGE-RAGE 信号传导等。值得注意的是,在糖尿病 EAT 中,20 个上调基因属于 AGE-RAGE 信号传导,目前该信号途径在加速糖尿病患者冠状动脉粥样硬化过程中的促炎和促纤维化通路的激活中发挥关键作用^[12]。RAGE 是

结合 AGE 和其他炎症细胞因子的多配体受体。激活的 AGE-RAGE 途径可能引起会糖尿病 EAT 患者的局部和慢性炎症反应。在 EAT 中 RAGE 的表达增加与炎症、脂肪细胞肥大、脂联素降低以及胰岛素信号受损相关^[13]。有人提出 CAD 患者中 EAT 代谢紊乱可能与 RAGE 过度表达有关^[13]。高血糖激活的 AGE-RAGE 途径可以上调转录因子的表达。该转录因子的失衡和上调导致许多基因的差异转录。在糖尿病 EAT 中显著上调的转录因子为 NF- κ B 家族和 FOS 家族成员。值得注意的是,本研究发现, NF- κ B 途径中的 14 个基因在糖尿病 EAT 中表现为上调,表明 NF- κ B 信号通路在糖尿病 EAT 中被激活。糖尿病中的 AGE-

RAGE 通路可首先激活 NF- κ B 信号。因此, NF- κ B 家族转录因子可进一步调节 EAT 中靶向基因的表达。总之, 本研究发现, NF- κ B 信号的激活可能是引起糖尿病 EAT 中基因表达变化的原因, 从而进一步促进 CAD 的发病。

促炎脂肪因子 TNF、ILs 和趋化因子受体 (如 CXCR1 和 CXCR2) 在糖尿病 EAT 中表现为高表达, 这与以前的研究结果一致^[2, 14]。心外膜炎症分子的旁分泌可能引起代谢和炎症环境的改变从而促进动脉粥样硬化形成。细胞增殖和斑块形成增加了动脉壁厚度, 动脉粥样硬化形成过程中使旁分泌扩散更困难。本研究结果表明许多基因在糖尿病 EAT 的炎症反应中被激活。

糖尿病 EAT 的转录组变化可能与高血糖引起的氧化应激有关。本研究发现, *FRA1*、*PTX3*、*CDKN1A*、*GDF15*、*TIRAPP*、*RGS16*、*PLK3* 和 *ETS2* 的差异表达表明氧化应激对糖尿病 EAT 样本的影响。特别是 *CDKN1A* 和 *GDF15* 是 p53 信号通路的成员, 该信号通路先前已被证明与氧化应激和心血管疾病有关^[15]。后续研究根据是否有差异表达, 筛选出 2 个基因 (*FRA1* 和 *PTX3*) 进行实验验证, 与测序结果一致。

本研究首次发现, 在糖尿病 EAT 中高度富集的 *FOSL1* 蛋白编码基因, 是一种参与细胞增殖、分化和转化的调节因子。*FOSL1* 与 Toll 样受体 (TLRs) 信号通路有关。该发现可能具有重要意义, 因为 EAT 内导致动脉粥样硬化的炎症过程也可能涉及先天免疫炎症反应。Toll 样受体 TLR 刺激炎症介质的转录从而引起先天性免疫反应。TLRs 的激活将 NF- κ B 易位至胞核内, 从而启动 IL-1 β , IL-6, TNF- α 和抵抗素的转录、释放^[16]。

另一个新的糖尿病 EAT 下调基因为 *PTX3*, 它是先天性和适应性免疫应答的关键组成部分。该发现与 EAT 在参与动脉粥样硬化发展和进展的先天性炎症反应中的作用一致。*PTX3* 在动脉粥样硬化中的作用存在争议, 因为最近的观察表明, *PTX3* 实际上可能具有心血管保护功能^[17]。*PTX3* 在糖尿病 EAT 中的下调可能反映对严重 CAD 的保护性反应。适应性或者不适应性免疫应答的机制可能导致 EAT 心脏保护基因的上调或下调^[9]。

本研究存在一些局限性。首先, 用于 RNA-Seq 的样本数量较少, 需要大样本量来证明结果的可靠性。然而, 本研究通过独立队列对鉴定的重要基因进行

RT-PCR 和 Western blotting 的验证, 结果与本研究的 RNA-Seq 一致。其次, 尽管本研究分析一些脂肪细胞因子参与的分子/细胞功能和信号途径, 但仍可能存在被忽略的其他功能和信号途径。最后, 本研究缺少对鉴定基因的功能验证。

综上所述, 本研究为 T2DM 和 CAD 受试者的 EAT 转录组测序分析提供新的研究方向。糖尿病 EAT 转录组主要富集参与炎症, 免疫应答和内皮损伤的基因。本研究数据显示, *EAT* 炎症基因表达可能是由于上调的细胞因子, 主要是 NF- κ B 和 FOS 的作用, 主要由 AGE-RAGE 信号传导激活。此外, 发现糖尿病 EAT 的转录组变化与高血糖引起的氧化应激关系。本研究的数据结果可能描述糖尿病患者导致冠状动脉粥样硬化的新途径, 为理解糖尿病冠心病的病理生理学作用的新假说提供了理论依据。

参 考 文 献:

- [1] SENOO A, KITAGAWA T, TORIMAKI S, et al. Association between histological features of epicardial adipose tissue and coronary plaque characteristics on computed tomography angiography[J]. *Heart Vessels*, 2018, 91(23): 4620-4610.
- [2] MAZUREK T, ZHANG L, ZALEWSKI A, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*[J]. American Heart Association, 2003, 108(78): 2460-2466.
- [3] NONE. In this issue of diabetes care[J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(14): 385-386.
- [4] ALEXOPOULOS N, KATRITSIS D, RAGGI P. Visceral adipose tissue as a source of inflammation and promoter of atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 233(145): 104-112.
- [5] 郭玉琳, 张安, 哈力但. 心电图与冠状动脉造影诊断冠心病的临床价值 [J]. *医学信息*, 2011, 24(4): 2095-2095.
- [6] 殷明刚, 隆霞, 林爽. 糖化白蛋白, 糖化血红蛋白在 2 型糖尿病及并发症预测中的作用 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2016, 8(2): 174-176.
- [7] IACOBELLIS G, MOSCHETTA A, BUZZETTI R, et al. Aminotransferase activity in morbid and uncomplicated obesity: predictive role of fasting insulin[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2007, 17(5): 442-447.
- [8] SHI J, WALKER M. Gene set enrichment analysis (GSEA) for interpreting gene expression profiles[J]. *Current Bioinformatics*, 2007, 2(1): 133-137.
- [9] MCANINCH E A, FONSECA T L, POGGIOLI R, et al. Epicardial adipose tissue has a unique transcriptome modified in severe coronary artery disease[J]. *Obesity*, 2015, 23(8): 1267-1278.
- [10] DUTOUR A, ACHARD V, SELL H, et al. Secretory type II phospholipase A2 is produced and secreted by epicardial adipose tissue and overexpressed in patients with coronary artery

- disease[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(58): 963-967.
- [11] GUAUQUE-OLARTE S, GAUDREAU N, PICHÉ M È, et al. The transcriptome of human epicardial, mediastinal and subcutaneous adipose tissues in men with coronary artery disease[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e19908.
- [12] COOPER M E. Importance of advanced glycation end products in diabetes-associated cardiovascular and renal disease[J]. *Am J Hypertens*, 2004, 17(8): 31S-38S.
- [13] DOZIO E, VIANELLO E, BRIGANTI S, et al. Expression of the receptor for advanced glycation end products in epicardial fat: link with tissue thickness and local insulin resistance in coronary artery disease[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 116(87): 341-348.
- [14] KARASTERGIOU K, EVANS I, OGSTON N, et al. Epicardial adipokines in obesity and coronary artery disease induce atherogenic changes in monocytes and endothelial cells[J]. *American Heart Association*, 2010, 30(18): 1340-1346.
- [15] AGRA R M, TEIJEIRA-FERNÁNDEZ E, PASCUAL-FIGAL D, et al. Adiponectin and p53 mRNA in epicardial and subcutaneous fat from heart failure patients[J]. *Eur J Clin Invest*, 2014, 44(23): 29-37.
- [16] BAKER A R, HARTE A L, HOWELL N, et al. Epicardial adipose tissue as a source of nuclear factor-kappaB and c-Jun N-terminal kinase mediated inflammation in patients with coronary artery disease[J]. *J of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2009, 94(75): 261-267.
- [17] NORATA G D, GARLANDA C, CATAPANO A L. The long pentraxin PTX3: a modulator of the immunoinflammatory response in atherosclerosis and cardiovascular diseases[J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2010, 20(9): 35-40.
- (张西倩 编辑)