

生脉注射液干预 LUAD/COVID-19 的生物信息学与网络药理学研究

陶添明¹ 周小玲²

1 南昌医学院 2 江西中医药大学

DOI:10.12238/bmtr.v7i5.16543

[摘要] 目的: 基于生物信息学分析与网络药理学,探索生脉注射液(SMI)抗LUAD/COVID-19的潜在作用机制。方法: 首先通过生物信息学分析发现LUAD/COVID-19患者的临床特征,包括差异表达基因(DEGs)、生存率及预后情况; 随后筛选出与SMI相关基因存在差异表达交集的基因; 最终运用网络药理学和分子对接技术,深入探究SMI对抗LUAD/COVID-19的主要治疗靶点及其潜在作用机制。结果: 共鉴定出905个LUAD/COVID-19差异表达基因,其中包含40个具有预后意义的基因和86个与SMI存在交集的基因。富集分析显示,这86个基因与新型冠状病毒肺炎(COVID-19)、HIF-1信号通路及脂质与动脉粥样硬化等疾病存在显著相关性。通过蛋白质相互作用网络分析,我们确定了8个核心基因(GAPDH、ALB、IL6、TLR4、FOS、ACE、ERBB2和CDK4)。分子对接实验表明,排名前三的GAPDH、ALB和IL6及其对应的SMI活性成分——腺苷、3,4-二羟基苯甲酸、水杨酸、(Z,S)-茉莉酮和茉莉酮——均展现出良好的结合活性。结论: 基于生物信息学和网络药理学的研究表明,SMI的GAPDH、ALB和IL6是抗LUAD/COVID-19的潜在靶点。

[关键词] 生物信息学; 网络药理学; 生脉注射液; LUAD/COVID-19

中图分类号: R96 文献标识码: A

Bioinformatics and Network Pharmacology Study of Shengmai Injection Intervention on LUAD/COVID-19

Tianming Tao¹ Xiaoling Zhou²

1 Nanchang Medical College 2 Jiangxi University of Chinese Medicine

[Abstract] Objective To explore the potential mechanism of action of Shengmai Injection (SMI) against LUAD/COVID-19 based on bioinformatics analysis and network pharmacology. The method first identified the clinical characteristics of LUAD/COVID-19 patients through bioinformatics analysis, including differentially expressed genes (DEGs), survival rate, and prognosis; Subsequently, genes with differential expression intersection with SMI related genes were screened; Ultimately, network pharmacology and molecular docking techniques were utilized to investigate the main therapeutic targets and potential mechanisms of SMI against LUAD/COVID-19. As a result, a total of 905 LUAD/COVID-19 differentially expressed genes were identified, including 40 genes with prognostic significance and 86 genes intersecting with SMI. Enrichment analysis showed that these 86 genes were significantly associated with COVID-19, HIF-1 signaling pathway, lipid and atherosclerosis and other diseases. Through protein interaction network analysis, we identified 8 core genes (GAPDH, ALB, IL6, TLR4, FOS, ACE, ERBB2, and CDK4). Molecular docking experiments showed that the top three GAPDH, ALB, and IL6, as well as their corresponding SMI active ingredients - adenosine, 3,4-dihydroxybenzoic acid, salicylic acid, (Z, S) - jasmonic acid, and jasmonic acid - all exhibited good binding activity. Conclusion: Research based on bioinformatics and network pharmacology suggests that GAPDH, ALB, and IL6 of SMI are potential targets for anti-LUAD/COVID-19 therapy.

[Key words] Bioinformatics; Network pharmacology; Shengmai Injection; LUAD/COVID-19

1 引言

截止到2025年6月,根据中国疾病预防控制中心数据,国内仍然存在许多感染新型冠状病毒患者,而肺癌患者感染新冠肺炎的发病率、严重程度和死亡率都远高于健康人群。肺癌患者发病人群多为中老年人,受年龄,手术,放化疗等因素的影响普遍存在机体免疫功能下降,正气不足从而导致其对病毒感染的反应能力减弱。生脉注射液(SMI)由西洋参、麦冬和五味子三种药材配制而成,SMI是新冠肺炎重症患者推荐的中药方剂之一,也用于治疗肺癌,但SMI对LUAD/COVID-19患者的药理靶点和作用机制仍需进一步研究。本文将运用网络药理学、生物信息学和大分子对接技术,深入探究SMI抗LUAD/COVID-19的主要治疗靶点及其潜在作用机制。

2 结果与讨论

2.1 LUAD/COVID-19差异表达基因的鉴定

首先,我们从TCGA数据库获取了59429个基因的LUAD转录组数据,并从KEGG、GeneCards、OMIM和NCBI数据库中收集了5007个与COVID-19相关的基因(图1A)。随后,通过R语言中的“limma”包筛选出平均表达量大于0的4594个LUAD与COVID-19共表达基因。最终利用该软件对这些交集基因进行分析,共鉴定出905个LUAD/COVID-19差异表达基因,其中657个基因在LUAD中呈现上调趋势,248个基因则出现下调现象(图1B)。

2.2 LUAD/COVID-19差异表达基因的临床预后分析

为开展临床病理分析,我们从肿瘤基因组图谱(TCGA)中收集了522例LUAD患者的临床数据。经筛选剔除14例生存时间不足30天的病例及9例未记录生存时间的病例后,最终保留499例LUAD患者的临床数据。随后对这905个LUAD/COVID-19差异表达基因进行单因素和多因素Cox回归分析,深入探究这些基因与LUAD患者临床预后的关联性。首先,单变量Cox分析发现132个基因与LUAD/COVID-19显著相关($P < 0.05$),包括OAS1、FURIN、OAS3等。在这些基因中,多变量Cox分析进一步筛选出40个靶向基因,包括FURIN、OAS3、ERG等。此外,我们根据反映患者风险的多变量Cox比例风险回归分析系数值,将患者分为高危组和低危组。在总生存期研究中,研究人员发现高风险组与低风险组之间存在显著差异(图2A)。通过分析40个基因的表达模式及风险评分,研究结果表明:患者风险值越高,其风险评分也越大(图2B);而生存时间越短的患者,其风险评分则相对更高(图2C)。

我们使用R语言中的“survivalROC”工具绘制了包含年龄、性别、分期、T分期、M分期、N分期及风险评分等特征的预后受试者工作特征(ROC)曲线。单变量Cox分析显示,分期、T分期、M分期、N分期和风险评分这五个临床特征与LUAD/COVID-19存在显著相关性($P < 0.05$)(图2D)。而多变量Cox分析发现,风险评分是唯一具有统计学意义的临床特征(图2E)。该风险评分在ROC曲线上获得0.792的AUC值,可作为评估患者预后的基准指标(图2F)。

为比较风险评分中40个预后相关基因与不同临床特征(年龄、性别、分期、T分期、M分期和N分期)的关联性,我们对522

例患者的原始临床数据进行预处理:首先提取ID、年龄、性别、分期、T分期、M分期和N分期等信息,随后依次剔除了19条年龄未知的记录、8条分期未知的记录、3条T分期标记为TX的记录、3条M分期标记为MX的记录、138条M分期标记为MX的记录以及5条N分期标记为NX的记录。对40个基因的临床预后分析显示,包括ASPH、C11orf24、ELOVL6、CDCA3、ENO1、FURIN、GOLM1、GTSE1、H2AX、SLC7A5、HAVCR1、KIF23、KPNA2、LINC02785、MAD2L1、PCDH7和PPP2R2C在内的17个基因,其表达模式与淋巴结转移的数量及范围存在显著相关性。此外,LINC02785、ERG和RTN1的表达水平与疾病远处转移密切相关。值得注意的是,相较于I期和II期疾病,LUAD III期和IV期疾病中BUB1B、CDCA3、ELOVL6、GPX8、HAVCR1、H2AX、GTSE1、KIF23、SLC7A5和KPNA2的表达水平更高,而I期和II期疾病则表现出LINC02785和RTN1的高表达特征。FURIN、GOLM1、MAD2L1、KIF14、ERG、RTN1、STK32A和SERPINH1的表达水平与性别相关,其中前四个基因在男性中的表达量明显高于女性。此外,老年患者中KIF14、PCDH7和SLC7A5的表达水平高于年轻患者,而年轻患者的RTN1和TIMP1表达水平较高(图3A-I)。

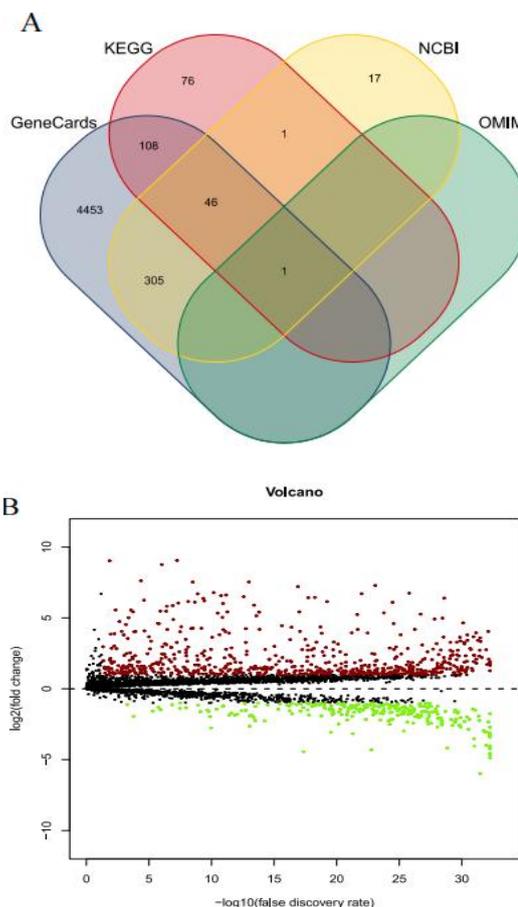


图1 LUAD/COVID-19相关基因

A: 描绘COVID-19中基因交集的维恩图; B: 差异表达基因的火山图。红色圆点表示上调基因,绿色圆点表示下调基因,黑色圆点表示无显著差异基因。

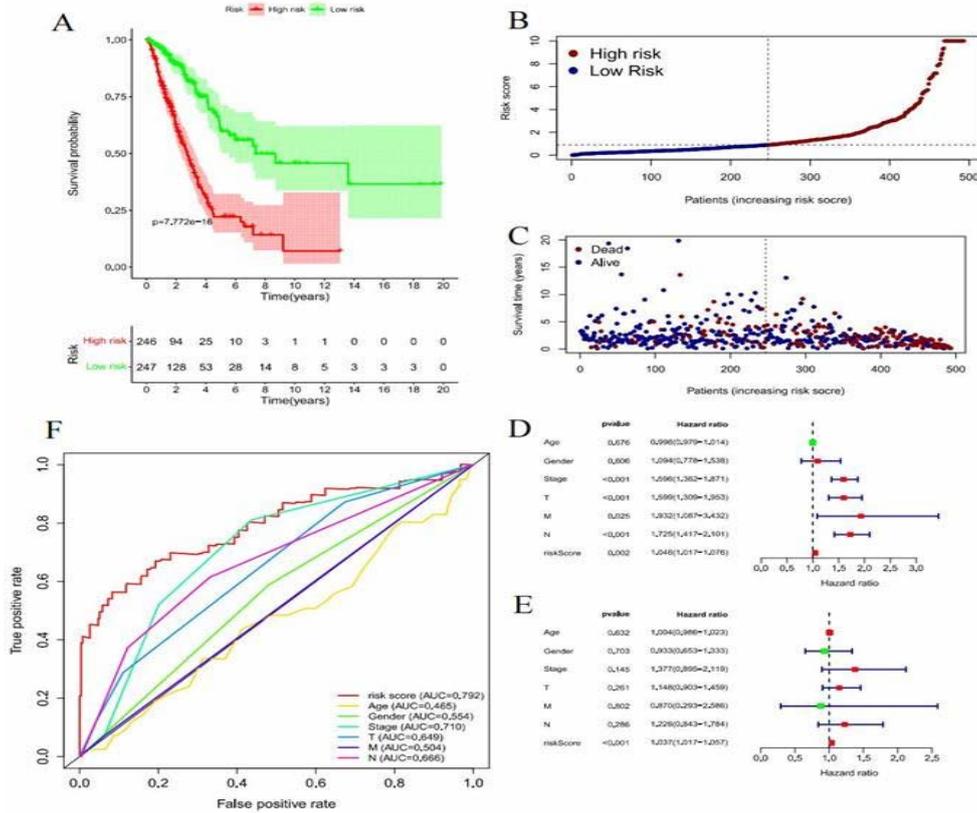


图2 LUAD/COVID-19相关基因的临床病理分析

A: 生存分析显示高危组与低危组的总生存期存在显著差异; B: 采用Cox比例风险回归分析患者风险评分; C: 高危组与低危组基因表达水平对比; D: 临床特征单因素Cox分析; E: 临床特征多因素Cox分析; F: 不同特征的预后受试者工作特征(ROC)曲线。

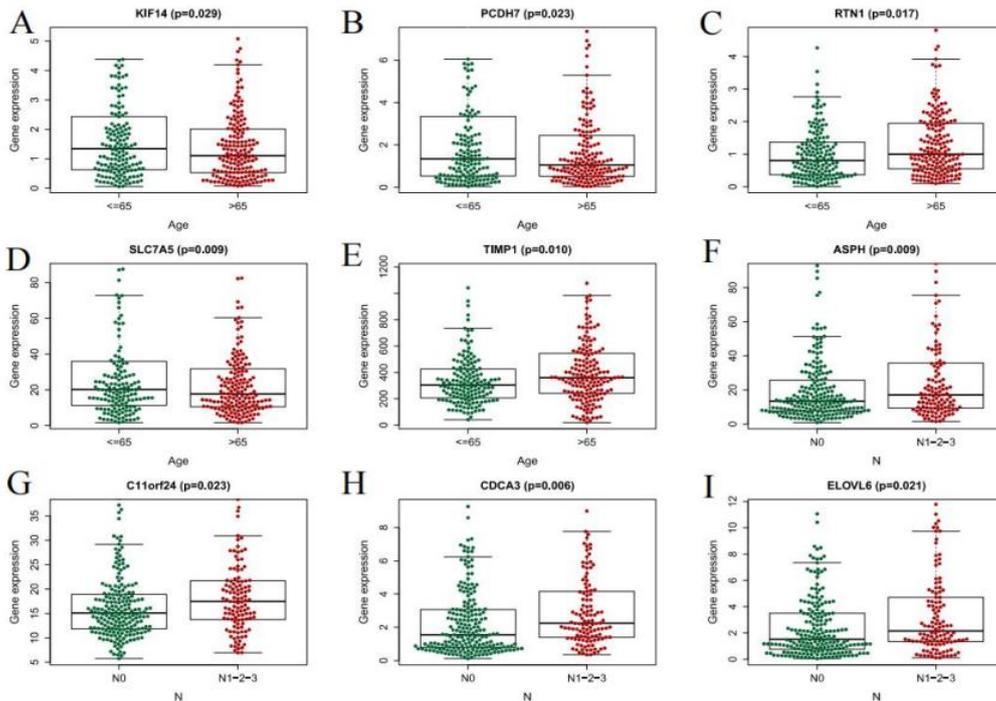


图3 部分基因的临床预后分析

A-E: 肺腺癌(LUAD)患者中KIF14、PCDH7、RTN1、SLC7A5和TIMP1基因表达与年龄的关联性; F-I: ASPH、C11orf24、CDCA3和ELOVL6表达与淋巴结转移数量的关联性。

2.3有效成分的采集与筛选

我们通过检索中药信息平台 (TCMIP) 和健康信息平台 (HIT), 对人参 (C. A. Mey, 简称红参HS)、麦冬 (Ophiopogon japonicus Thunb. Ker Gawl, 简称麦冬MD)、五味子 (Schisandra chinensis Baill, 简称五味子WWZ) 这三种中草药中的活性成分进行了筛选。在剔除两个数据库中各中药活性成分的重复项后, 最终获得121种有效成分: 其中人参类22种、麦冬类20种、五味子类79种。随后通过PubChem平台对这些活性成分进行定位验证, 并获取其二维结构及标准SMILES分子式。

2.4交叉靶基因筛选

将获得的活性成分二维结构或标准分子式导入SwissTargetPrediction软件后, 通过概率值>0筛选出所有潜在靶基因, 共从121种活性成分中获得4814个靶基因 (图4)。考虑到这些基因可能在多种活性化合物中重复出现, 我们通过删除重复项后筛选出827个靶基因。对LUAD/COVID-19相关差异基因与827个活性成分靶基因进行维恩图分析及对比 (图4)。最终确定86个交集靶基因可作为SMI的潜在治疗靶点, 用于急性期LUAD/COVID-19的治疗 (表1)。

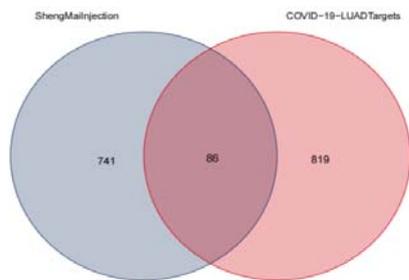


图4 LUAD/COVID-19中交叉基因的维恩图

表1 潜在靶基因

Gene Official Symbol						
PSEN2	HMOX1	TNNT2	MMP1	MELK	IL6	ERBB2
CDK1	ACHE	TNNI3	ALDH2	SORD	NOS1	NTRK3
ALOX5	CFTR	DPP4	MMP3	ITGAL	PRKCG	TRPA1
PABPC1	AKR1B10	HSPA5	MMP8	MET	ENPP2	LDHA
SLOC6A4	PTGES	ADA	PDK1	MTNR1A	MMP12	LDHB
RBP4	AGTR1	GAPDH	EPHB2	PLK1	TUBB3	ALB
CNR1	TOP2A	SRM	EPHB3	CYP24A1	FOS	HPRT1
AGTR2	SCN5A	EZH2	TRAP1	ALPL	MMP15	PLAU
TRPV1	PARP1	CDK4	HSP90B1	CBR1	F2RL3	CXCR2
G6PD	TNNC1	F2	CFD	BTX	XDH	TLR4
TK1	ACE	TEK	FPR1	IKBKE	PDE8B	S1PR5
SLC37A4	F10	CCR3	CX3CR1	SELE	TLR8	PRKDC
PKM	F12					

2.5网络可视化和富集分析

在对多种药物中的相同活性成分进行标准化处理后, 我们使用Cytoscape软件构建了包含183个节点和741条边的“药物-成分-靶点-疾病” (D-C-T-D) 网络 (图5)。

此外, 研究人员对86个交叉基因进行了GO和KEGG富集分析。结果显示, SMI影响了包括细胞氧化应激反应、化学应激响应、对外界刺激的正向调控、氧化应激反应、活性氧代谢过程调控、炎症反应调节、细胞外基质解聚、脂多糖应答、急性炎症反应、细菌来源分子应答等在内的多种生物过程。其中, 细胞组成的主要术语为质膜外侧、膜筏和膜微区, 分子功能的主要术语则涉及内肽酶活性、丝氨酸水解酶活性及丝氨酸-型肽酶活性 (图6A)。

此外, 在KEGG通路分析中, 我们发现了16条与86个交叉靶点相关的通路 (P校正值<0.05, Q校正值<0.05)。这些通路包括: HIF-1信号通路、癌症中心碳代谢、新型冠状病毒肺炎 (COVID-19)、类风湿性关节炎、疟疾、补体与凝血级联反应、脂质与动脉粥样硬化、IL-17信号通路、糖酵解/糖异生、丙酮酸代谢、肾素-血管紧张素系统、肥厚型心肌病、叶酸生物合成、Toll样受体信号通路、糖尿病心肌病以及心肌细胞肾上腺素能信号传导 (图6B)。

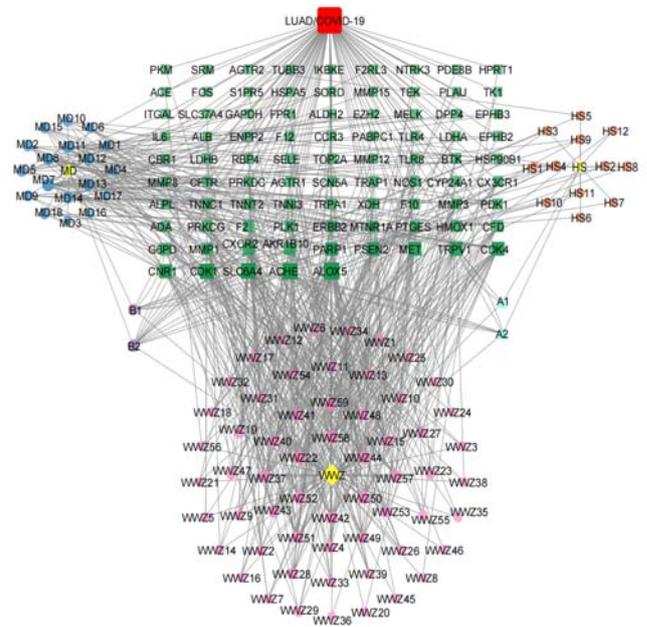


图5 “药物-成分-靶点-疾病”网络示意图。

黄色节点代表药物 (HS、MD和WWZ), 橙色节点为西洋参成分 (HS1至HS12), 天蓝色节点为麦冬成分 (MD1至MD18), 亮粉色节点为银杏成分 (WWZ1至WWZ59), 蓝色节点为西洋参与银杏的共有成分 (A1、A2), 紫色节点为麦冬与银杏的共有成分 (B1、B2), 红色节点表示疾病, 绿色节点代表药物靶点及疾病靶点。图中节点尺寸越大, 其度值越高。

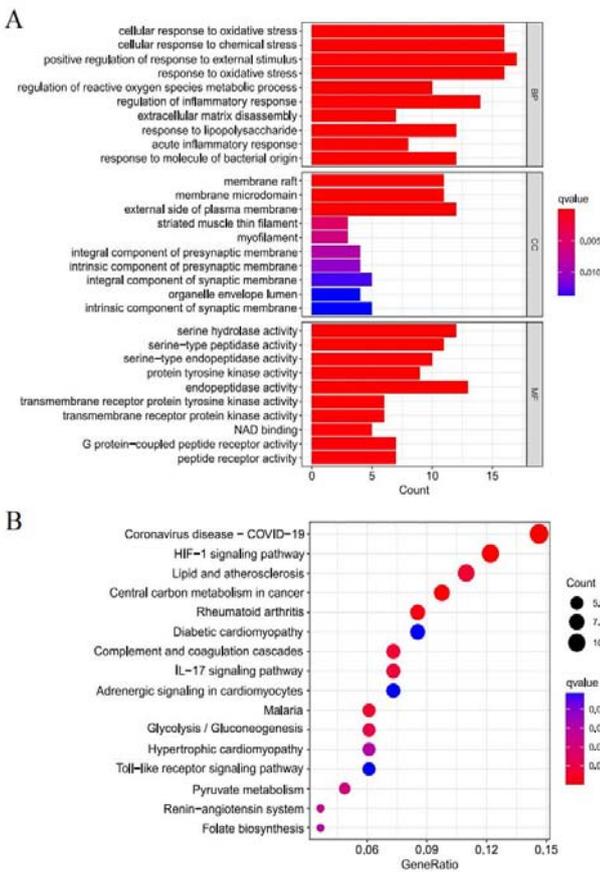


图6 SMI和LUAD/COVID-19交叉基因的富集分析

A: SMI和LUAD/COVID-19交叉基因的基因本体分析; B: SMI和LUAD/COVID-19交叉基因的京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路。

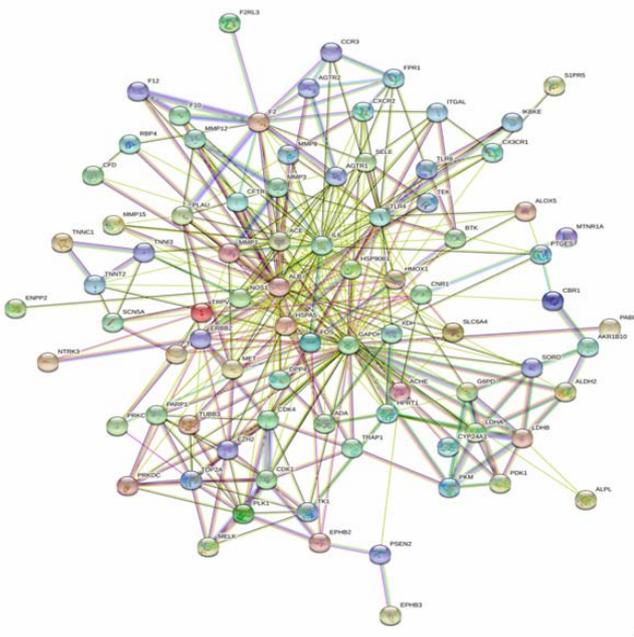
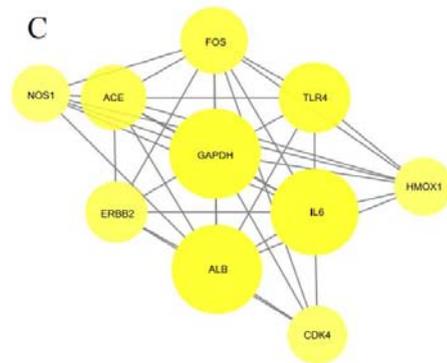
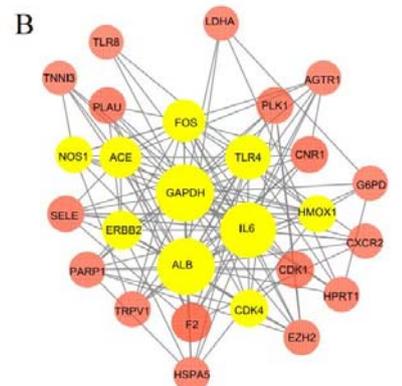
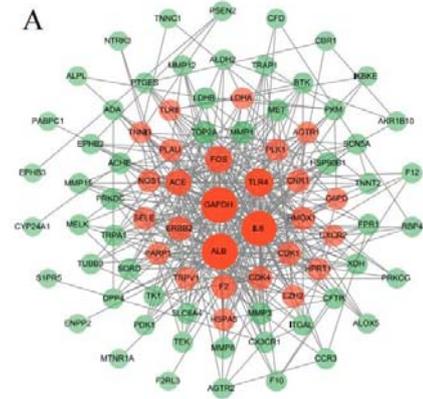


图7 STRING中组件和疾病相关靶点的PPI

2.6 确定针对LUAD/COVID-19的SMI核心目标

我们将SMI和LUAD/COVID-19的86个交叉靶基因导入STRING数据库, 最终获得包含83个靶点和378条连接边的蛋白质相互作用网络(PPI网络), 置信度设为0.400并隐藏了不连通节点(图7)。为进一步研究, 我们将该PPI网络导入Cytoscape软件进行分析。通过CytoNCA和CytoHubba算法分别筛选, 发现了两个由10个靶基因构成的显著子网络(图8A-D)。图中节点颜色越深、尺寸越大, 表示该节点的连接度越高。我们选取这两个关键子网络的交集, 并根据显著性排序确定了8个基因(图9)。其中GAPDH、ALB和IL6三个基因具有最高显著性。



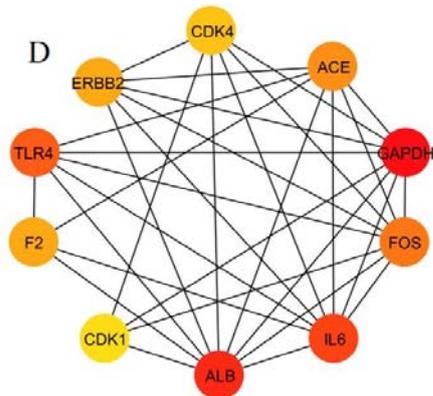


图8 使用Cytoscape识别关键子网络

A: PPI网络经CytoNCA首次过滤后,红色节点筛选标准为各评分均高于中位数; B: 通过CytoNCA二次过滤构建的子网络,黄色节点筛选标准为评分高于中位数; C: 经两次CytoNCA过滤后最终筛选的关键子网络; D: 通过cytoHubba分析的前十大节点构成的关键子网络。

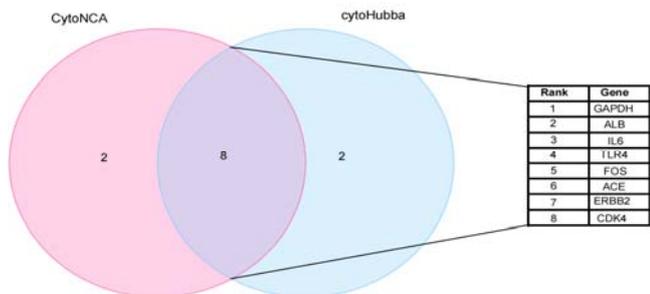
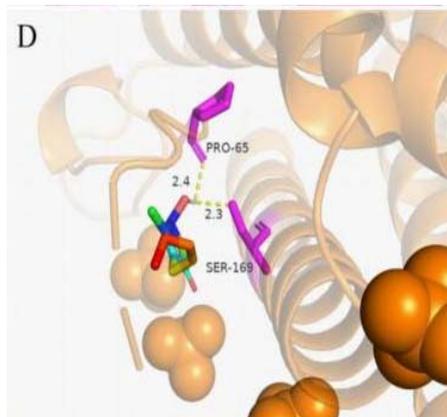
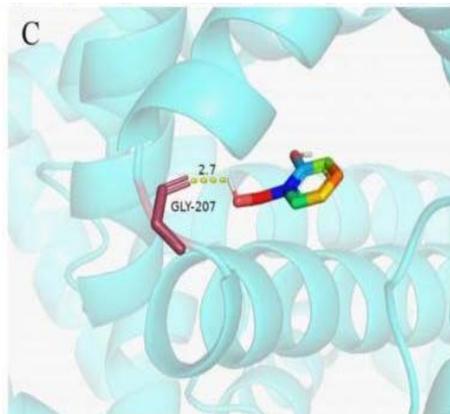
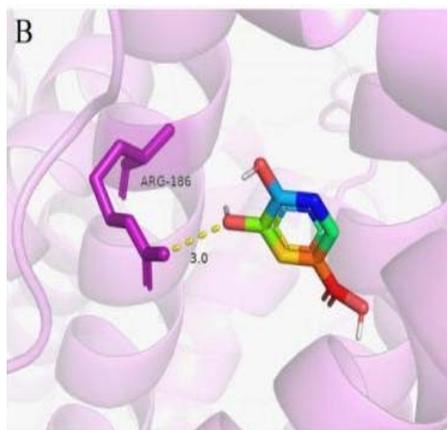
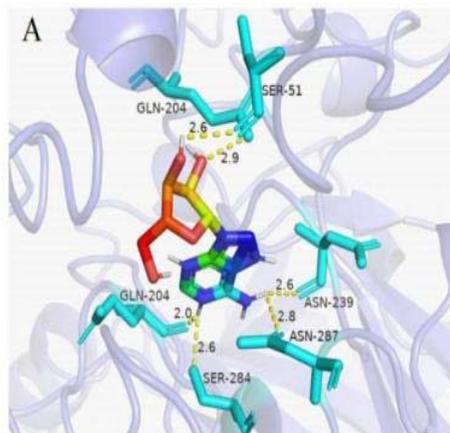


图9 通过取两个关键子网络的交集筛选关键基因

2.7分子对接

我们从PDB数据库中收集了包括GAPDH、ALB和IL6在内的三个关键靶点的晶体结构。通过分析“D-C-T-D”网络图谱,我们鉴定出与MD5、MD12、MD18、WWZ5和WWZ7三个基因相关的五种活性化合物,具体名称分别为腺苷、(Z,S)-茉莉酮、茉莉酮、3,4-二羟基苯甲酸和水杨酸。这些化合物的三维结构数据均来自PubChem数据库。如图10所示,分子对接实验表明这五种活性分子都能轻松抵达并结合到GAPDH、ALB和IL6蛋白的活性口袋区域,其对接得分详见表2。

表2 分子对接评分

Target	compound	affinity (kcal/mol)	Hydrogen bonds	Interacting residues
GAPDH	Adenosine	-8.1	6	SER-51, GLN-204, ASN-239, SER-284, ASN-287
ALB	3,4-Dihydroxybenzoic acid	-6.7	1	ARG-186
ALB	Salicylic acid	-6.2	1	GLY-207
IL6	(Z,S)-jasmolone	-5.3	2	PRO-65, SER-169
IL6	Jasmolone	-5.1	1	LEU-64

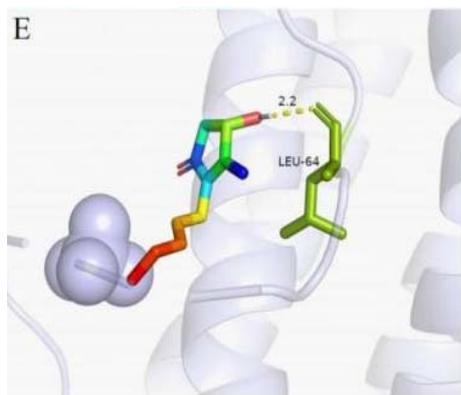


图10分子对接结果

A: GAPDH与腺苷的对接示意图; B: ALB与3, 4-二羟基苯甲酸的对接示意图; C: ALB与水杨酸的对接示意图; D: IL6与(Z, S)-茉莉酮的对接示意图; E: IL6与茉莉酮的对接示意图。

3 讨论

在本研究中,我们首先对905个LUAD/COVID-19差异基因进行筛选,其中657个基因表达上调,248个基因表达下调。随后对这些差异基因进行了临床预后分析,结果显示:LUAD患者风险值越高、风险评分越大,其生存时间越短,风险评分也越高。我们还发现,风险评分可作为LUAD患者预后的评估指标。SMI作为中国推荐用于治疗COVID-19的中药制剂之一,具有调和阴阳、维持人体阴阳平衡的作用。研究表明,SMI能有效改善COVID-19患者的休克症状、免疫功能及临床症状与预后^[1,2],同时在肺癌治疗中也显示出良好疗效^[3]。本研究系统收集了SMI中三种药物的有效成分及其对应靶基因,构建了包含86个靶基因的SMI靶向LUAD/COVID-19相关网络。通过“D-C-T-D”网络图谱清晰呈现了治疗靶点与药物之间的分子作用关系。GO和KEGG分析表

明,SMI可有效调控氧化应激和炎症反应等生理过程。通过对靶点蛋白质相互作用网络分析,我们确定了八个关键作用靶点。采用分子对接技术验证了SMI活性成分与病毒的相互作用,重点聚焦GAPDH、ALB和IL6这三个关键基因。分子对接结果显示,SMI活性成分对GAPDH、ALB和IL6的靶向作用显著提升了其治疗LUAD/COVID-19的效率,这一发现不仅揭示了SMI的作用机制,为后续采用SMI联合治疗LUAD/COVID-19提供了重要科学依据,更为后续临床试验奠定了基础。

[基金项目]

基于数据挖掘技术的中医药治疗新冠肺炎辨证与用药规律研究,江西省教育厅科技项目,GJJ218929。

[参考文献]

[1]H.S.Chun,S.H.Choi,H.S.Song.A Meta-Analysis of Treatment Effects on Viral Pneumonia Using TCM Injections Specified in the Clinical Guideline for COVID-19 in China[J].Journal of pharmacopuncture,2021,24(3):107-121.

[2]W. Zhuang, Z. Fan,Y.Chu, et al. Chinese Patent Medicines in the Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China[J].Frontiers in pharmacology,2020,11:1066.

[3]B. Duan,J.Xie,Q. Rui,et al.Effects of Shengmai injection add-on therapy to chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis[J].Supportive care in cancer: official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer,2018,26(7):2103-2111.

作者简介:

陶添明(1991--),男,汉族,江西南昌人,博士,研究方向: 中药防治肿瘤。