

基于生物信息学分析急性心肌梗死基因表达差异及中药干预

杨显娟,王立映,王建,王佳俊,付尹,李金秀,肖琳莹

摘要 目的 通过 GEO 基因表达数据库分析比较正常人和急性心肌梗死患者的基因芯片数据,筛选出差异常表达基因(DEGs),进而预测治疗心肌梗死的潜在中药。方法 下载 GSE66360 基因芯片,通过分析获得差异表达的基因信息,对 DEGs 进行基因本体论(GO)及京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析,通过 String 数据库和 Cytoscape 软件进一步分析得到关键基因,通过关键基因与医学本体信息检索平台(Coremine Medical)相互映射,筛选出治疗急性心肌梗死的潜在中药。结果 筛选出 943 个差异表达基因。生物过程主要富集在髓样白细胞活化、细胞因子产生的调节、白细胞趋化性等方面,细胞组成主要集中在分泌颗粒腔、膜面、膜的外在成分等,分子功能主要表现在趋化因子受体结合、模式识别受体活性、细胞因子结合等;KEGG 分析显示主要参与的信号通路有肿瘤坏死因子(TNF)、缺氧诱导因子-1(HIF-1)和 JAK-STAT 信号通路等。筛选的关键基因有 *FPR2*、*STAT3*、*CXCL1*、*CXCL8*、*UBR4*、*JUN*、*PTAFR*、*FCER1G*、*GPR84*、*PLAU*,预测出干预急性心肌梗死的潜在中药有蜈蚣($P = 0.00330$)、黄丝郁金($P = 0.00239$)、姜黄($P = 0.00240$)、重楼($P = 0.00248$)、丹参($P = 0.00272$)、平贝母($P = 0.00371$)、人参($P = 0.00159$)等。结论 活血化瘀药郁金、补气药人参、止咳平喘药贝母等有明显干预急性心肌梗死作用,其作用机制可能与调节免疫、抗炎通路相关。

关键词 急性心肌梗死;生物信息学;差异表达基因;中药预测

中图分类号 R 285

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0015-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.004

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是心肌急性缺血性坏死,致死率极高的一种冠心病类型,具有发病急、并发症多的特点^[1]。据流行病学调查研究^[2],35 岁以下临床 AMI 患者数量逐年增多。临床对 AMI 采用早期再灌注治疗、优化药物和干细胞治疗干预心室重构(ventricular remode-

ling, VR),虽有一定治疗效果,但也存在不良反应^[3]。中药防治疾病具有多靶点、多途径的特点。现有研究^[4]也证实中药可改善心肌梗死后 VR。因此,深入探究 AMI 的发生发展机制,中药干预潜在机制和药物新发现具有重要意义。该研究利用 GEO 数据库,通过生物信息学手段和分析方法,深入挖掘 AMI 的关键基因,将关键基因与中药进行映射,得到潜在的基因治疗靶点和药物,为 AMI 的分子机制和治疗药物实验研究提供新思路 and 理论依据。

1 材料与方法

1.1 微阵列数据来源 以“Acute myocardial infarction”为关键词,在基因表达数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中搜索,共检索到 435 篇关于人类 AMI 系列的文章,选择下载 GSE66360 基因表达谱。GSE66360 基因表达数据集是基于 GPL570 平台([HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array),所有数据均可在线获得。

1.2 数据预处理和差异基因的筛选 GEO2R(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>)是 GEO 数据库提供的一个基于 R 语言的在线分析程序,检测正常人与 AMI 患者之间的 DEGs。为保证数据集的完整性与可比性,对芯片数据进行背景校正、标准化和 \log_2 转换处理,使用 GraphPad Prism 8.0 绘制火山图对质量控制后的数据进行可视化。以校正的 $P(\text{adj. } P) < 0.05$ 及 $|\log_2 \text{FC}| \geq 1$ 为标准筛选出差异常基因,其中 $\log_2 \text{FC} \geq 1$ 代表基因表达上调, $\log_2 \text{FC} \leq -1$ 代表基因表达下调。

1.3 DEGs 功能分析及通路富集分析 GO 是一个重要的生物信息数据库,可分别从细胞组分、生物过程和分子功能 3 个层面进行功能注释。KEGG 是公认的信号通路系统性分析数据库。本研究中 DEGs 的 GO 分析和 KEGG 通路富集分析是基于 Metascape 平台(<http://metascape.org/gp/index.html>)在线可视化基因注释系统数据库进行的, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2021-09-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81873023)

作者单位:成都中医药大学西南特色中药资源重点实验室,成都 611137

作者简介:杨显娟,女,硕士;

王建,女,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: jianwang08@163.com

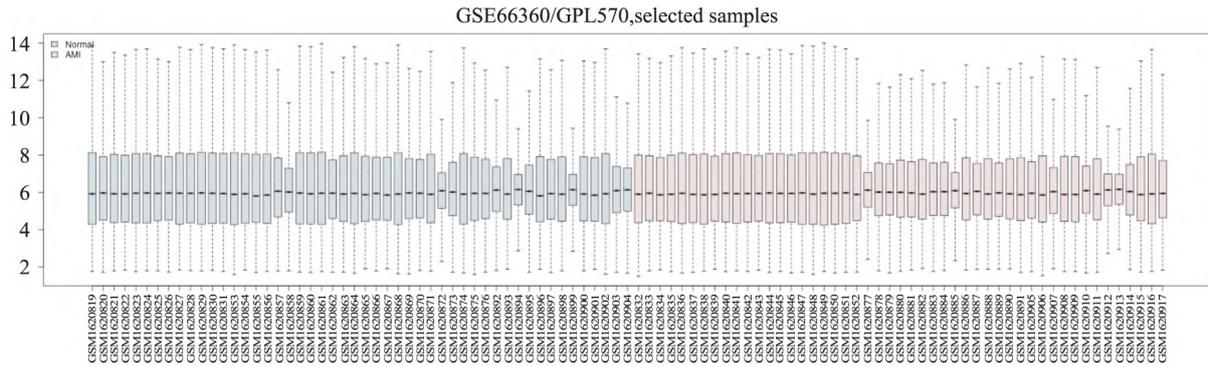


图1 样本芯片数据均一化处理箱线图

蓝色盒子:正常样本;红色盒子:心肌梗死样本

1.4 DEGs 蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络构建及关键基因分析

将 DEGs 输入 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库进行蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析, 选取得分大于 0.9 的基因输入 Cytoscape 软件进行可视化。应用软件中的 CytoHubba 插件计算每个蛋白质节点的程度, 节点 degree 越高, 在网络中的生物学功能越多。根据 degree 算出排名前 10 的基因被鉴定为关键基因。

1.5 靶点对接与中药预测 利用 Coremine Medical (<https://coremine.com/medical/#search>) 与筛选出的关键基因进行相互映射, 筛选出关键基因相关的治疗中药, 以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEGs 芯片数据质量控制 使用 GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) 对 GSE66360 芯片数据进行预处理, GSE66360 数据预处理后中位数位于同一水平线, 表明芯片数据质量较好, 平行实验的均一性良好, 可用于正常和心肌梗死患者差异表达基因的后续分析。见图 1。

2.2 差异基因 GSE66360 包括 50 例正常样本和 49 例心肌梗死样本。根据 $P(\text{adj. } P) < 0.05$ 及 $|\log_2 \text{FC}| \geq 1$ 标准筛选, GSE66360 筛选出 943 个差异基因, 包括 711 个上调基因和 232 个下调基因。进一步采用火山图和热图对该数据进行可视化处理。见图 2、3。

2.3 DEGs GO 富集分析和 KEGG 信号通路分析 使用 Metascape 对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 信号通路富集分析。GO 分析显示其 BP 主要集中在髓样白细胞活化、细胞因子产生的调节、白细胞趋化性等

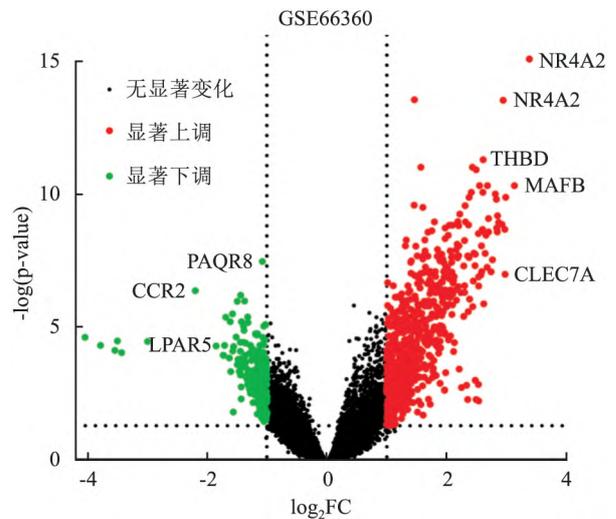


图2 差异表达基因的火山图

绿色点: 表达量下调的基因; 红色点: 表达量上调的基因; 黑色的点: 正常表达的基因

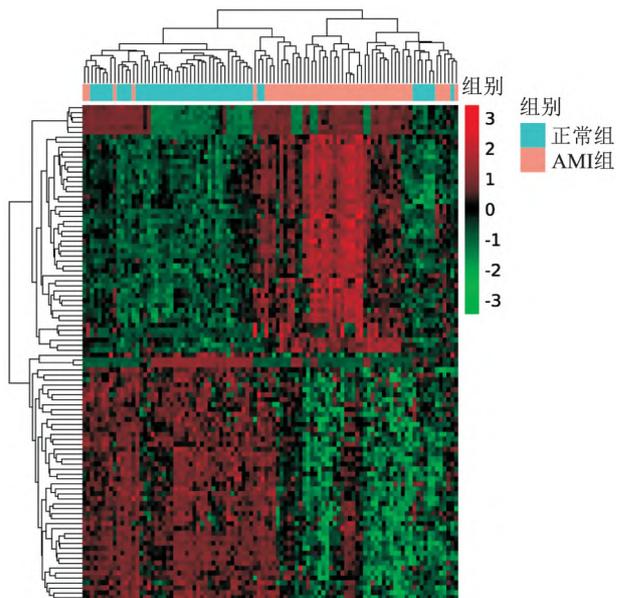


图3 GSE66360 差异基因聚类热图

方面;细胞组成主要集中在分泌颗粒腔、膜面、膜的外在成分等;分子功能主要表现在趋化因子受体结合、模式识别受体活性、细胞因子结合等。KEGG 信号通路富集分析显示主要参与的信号通路有肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、缺氧诱导因子 1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 和 JAK-STAT 信号通路等,见图 4~7。

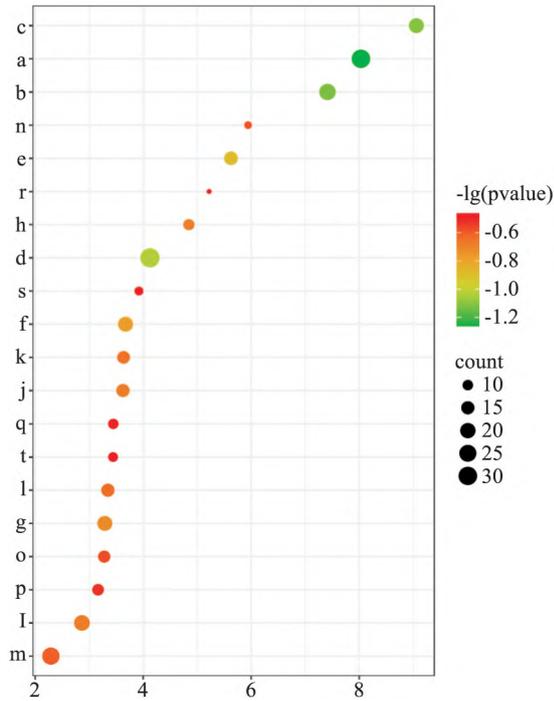


图 4 DEGs 基因 KEGG 分析

a: Osteoclast differentiation; b: TNF signaling pathway; c: Leishmaniasis; d: Cytokine-cytokine receptor interaction; e: AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications; f: Transcriptional misregulation in cancer; g: Viral carcinogenesis; h: Complement and coagulation cascades; i: MAPK signaling pathway; j: Hepatitis B; k: Measles; l: Jak-STAT signaling pathway; m: Pathways in cancer; n: Bladder cancer; o: Apoptosis; p: FoxO signaling pathway; q: HIF-1 signaling pathway; r: Ferroptosis; s: B cell receptor signaling pathway; t: Fc gamma R-mediated phagocytosis

2.4 PPI 网络的构建及关键基因分析 利用 Cytoscape 软件对差异基因进行 PPI 网络分析(图 8), 并通过插件 CytoHubba 筛选 degree 排名前 10 的基因, 定义其为关键基因 (*FPR2*、*STAT3*、*CXCL1*、*CXCL8*、*UBR4*、*JUN*、*PTAFR*、*FCER1G*、*GPR84*、*PLAU*), 结果如图 9、表 1 所示。

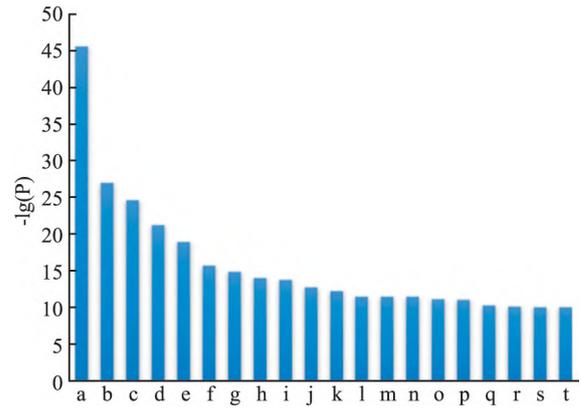


图 5 DEGs 基因 BP 分析

a: myeloid leukocyte activation; b: response to bacterium; c: regulation of cytokine production; d: cytokine-mediated signaling pathway; e: leukocyte chemotaxis; f: lymphocyte activation; g: positive regulation of cell death; h: positive regulation of cell migration; i: immune response-regulating signaling pathway; j: fat cell differentiation; k: regulation of inflammatory response; l: regulation of DNA-binding transcription factor activity; m: macrophage activation; n: blood vessel morphogenesis; o: lipopolysaccharide-mediated signaling pathway; p: apoptotic signaling pathway; q: response to steroid hormone; r: negative regulation of immune system process; s: cellular response to interleukin-1; t: positive regulation of cytokine biosynthetic process

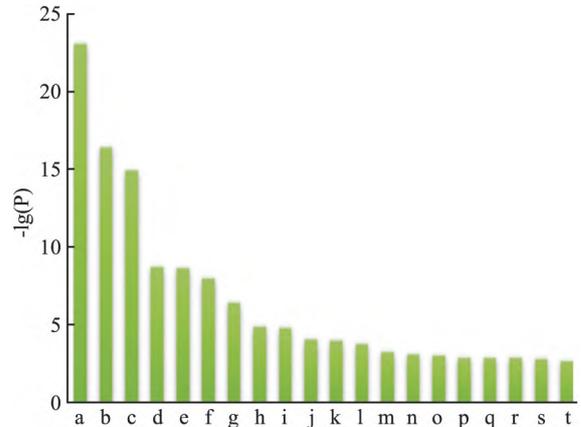


图 6 DEGs 基因 CC 分析

a: tertiary granule; b: ficolin-1-rich granule; c: secretory granule lumen; d: side of membrane; e: vacuole; f: endocytic vesicle membrane; g: extracellular matrix; h: platelet alpha granule; i: clathrin-coated endocytic vesicle membrane; j: membrane microdomain; k: anchored component of membrane; l: cell body; m: early endosome; n: I-kappaB/NF-kappaB complex; o: extrinsic component of membrane; p: fibrinogen complex; q: nuclear pore; r: Golgi membrane; s: endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment; t: transcription factor complex

表 1 关键基因

数量	基因名简称	基因名全称	度值
1	<i>FPR2</i>	formyl peptide receptor 2	43
2	<i>STAT3</i>	signal transducer and activator of transcription 3	39
3	<i>CXCL1</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	37
4	<i>CXCL8</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 8	32
4	<i>UBR4</i>	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 4	32
6	<i>JUN</i>	jun proto-oncogene	28
6	<i>PTAFR</i>	platelet-activating factor receptor	28
8	<i>FCER1G</i>	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide	27
8	<i>GPR84</i>	G protein-coupled receptor 84	27
10	<i>PLAU</i>	plasminogen activator, urokinase	26



图 7 DEGs 基因 MF 分析

a: chemokine receptor binding; b: pattern recognition receptor activity; c: immunoglobulin binding; d: cytokine binding; e: carbohydrate binding; f: RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding; g: RAGE receptor binding; h: CCR5 chemokine receptor binding; i: SMAD binding; j: pantetheine hydrolase activity; k: 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase activity; l: peptide binding; m: glucocorticoid receptor binding; n: nucleoside binding; o: extracellular matrix structural constituent; p: CXCR chemokine receptor binding; q: growth factor receptor binding; r: phosphatidylinositol 3-kinase regulator activity; s: lipid binding; t: protein tyrosine phosphatase activity

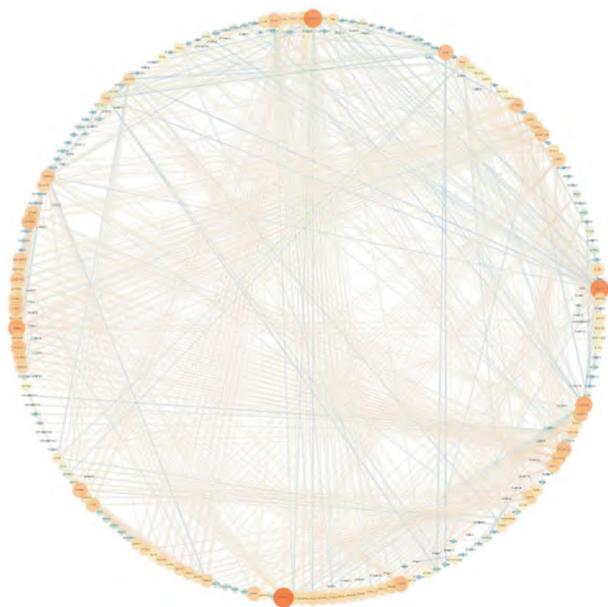


图 8 差异基因蛋白质-蛋白质互作网络

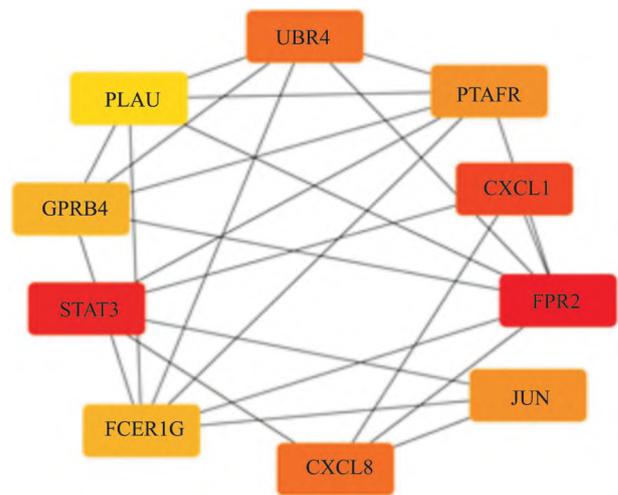


图 9 关键基因的蛋白互作网络

2.5 靶点对接筛选预测中药 将 10 个关键基因映射到 Coremine Medical 数据库,筛选出干预 AMI 的潜在中药, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,由于 Coremine Medical 数据库缺少 UBR4 信息。因此,未预测该基因映射的潜在治疗中药。结果显示, FPR2 映射出中药蜈蚣 ($P = 0.00330$); STAT3 映射出中药百花蛇舌草 ($P = 0.00200$)、黄丝郁金 ($P = 0.00239$)、姜黄 ($P = 0.00240$)、重楼 ($P = 0.00248$)、丹参 ($P = 0.00272$)、茵陈 ($P = 0.00492$) 等; CXCL1 映射出中药虻蜚菊 ($P = 0.00354$); CXCL8 映射出中药平贝母 ($P = 0.00371$)、山慈姑 ($P = 0.00395$)、黄丝郁金 ($P = 0.00531$)、姜黄 ($P = 0.00535$)、安息香 ($P = 0.02190$) 等; JUN 映射出中药人参 ($P = 0.00159$)、川木通 ($P = 0.00220$)、五味子 ($P = 0.00242$)、三七 ($P = 0.02440$) 等; PTAFR 映射出中药白果 ($P = 0.00287$)、银杏叶 ($P = 0.00289$); PLAU 映射出中药灵芝 ($P = 0.00302$)、地胆草 ($P = 0.00515$)、穿山龙 ($P = 0.00615$)、益智 ($P = 0.00784$)、地龙

($P=0.00858$);FCER1G 和 GPR84 无满足条件中药,其中出现频次最高的是黄丝郁金和姜黄两味中药,这些中药可能通过调控其相互映射的靶点发挥对 AMI 干预作用的潜在药物来源。

3 讨论

AMI 患者与健康人基因表达存在差异,利用生物信息学方法,从 GEO 数据库下载 AMI 基因芯片分析表明,与正常健康人相比,AMI 患者中共有 DEGs 943 个。对其进行 KEGG 信号通路和功能富集分析发现,参与的信号通路主要有 TNF、HIF-1 和 JAK-STAT 信号通路等,这些信号通路都与心梗后病程的发生发展密不可分。如 TNF 信号通路,既对促进细胞凋亡、细胞骨架重构、产生血栓等方面产生影响,又对促进细胞存活和分化以及免疫和炎症反应发挥作用。

预测出的中药大多分布在活血化瘀药、补虚药、清热药、利水渗湿药、化痰药、息风止痉药、祛风湿止痛药和开窍药。因一药具有多种功效,故分类是相对的,其间亦有交叉,如郁金、川木通等亦能清心除烦;地龙、蜈蚣长于通经活络。

活血化瘀药丹参主治胸痹心痛、脘腹胁痛等。研究^[5]表明丹参具有改善心肌缺血,促进心肌损伤恢复,缩小心肌梗死范围等的药理保护作用。实验研究^[6]显示丹参注射液能够显著减轻 AMI 患者经皮冠状动脉介入治疗术后血管内皮细胞氧化应激损伤,保护缺血再灌注心肌功能,改善预后。郁金可治心气瘀阻之胸痹心痛,常与丹参、瓜蒌等配伍使用。郁金的主要化学成分姜黄素通过抑制细胞凋亡和自噬发挥对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用^[7]。姜黄可用治气滞血瘀之胸痹心痛证。姜黄的主要化学成分姜黄素能明显降低大鼠心肌梗死心肌内活性氧、丙二醛的表达量;增高大鼠心肌梗死心肌内 p-AKT/AKT 表达,发挥心肌梗死后减慢心肌损伤的保护作用^[8]。

清热药白花蛇舌草灌注离体蟾蜍心脏时心率明显减慢,心肌收缩力明显减弱,说明白花蛇舌草具有负性心肌作用^[9],重楼所含的重楼皂苷 I 可减轻大鼠心肌 I/R 损伤^[10],但对于心肌梗死缺血/再灌注的研究与应用仍相对薄弱。黄芩的主要活性成分黄芩素可通过调节 JAK/STAT 信号通路发挥对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用^[11]。止咳平喘药白果的主要成分白果内酯经血小板活化因子受体发挥对大鼠心脏的抗缺血效应^[12]。平贝母、山慈姑、茵陈、蜈

蚣等中药在心肌疾病中则鲜见报道。补虚药如人参具有抗休克、强心、抗缺氧、保护心肌和改善血液流变学等药理作用。息风止痉药地龙具有抗心律失常、改善微循环的药理作用。刘静^[13]研究发现在西药规范治疗的基础上联合复方地龙片可以有效改善气虚血瘀型不稳定性心绞痛患者的临床心绞痛发作及相关中医症状,且安全性良好。开窍药安息香可用于中风痰厥、中恶昏迷、心腹疼痛。安息香可与其他辛香走窜类药物配伍使用,宣通心窍,散瘀消结,利气止痛^[14]。陈铎葆等^[15]研究表明神香苏合丸可对抗垂体后叶素引起的心肌缺血动物 ST-T 抬高,明显缓解实验性大鼠心肌缺血。

传统中药具有多功效、多成分、多靶点、多途径的特点,应用范围广,且不良反应小。在治疗 AMI 疾病中得到广泛的应用与研究。本研究表现出对以上药物的深化与佐证。预测的中药类型较为丰富,部分中药已广泛运用于临床或实验性研究,某些中药却鲜见报道、临床运用也较少,其对 AMI 干预作用的药用价值究竟如何还需进一步探索,为寻找新药提供了新思路。

参考文献

- [1] 叶青,马礼坤,张杰.急性心肌梗死患者冠脉介入术后1年死亡风险列线图预测模型的构建[J].安徽医科大学学报,2020,55(12):1959-63.
- [2] 刘欣,罗瑛.35岁以下急性心肌梗死危险因素的研究进展[J].中南大学学报(医学版),2020,45(7):856-61.
- [3] 杨琦,吕海涛,吴国水,等.中药对心肌梗死后心室重构保护作用的研究进展[J].心电与循环,2020,39(4):401-4.
- [4] 李彬,王永霞,谢世阳,等.心肌梗死后心室重构的中医药治疗实验研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2014,12(7):876-8.
- [5] 万新焕,王瑜亮,周长征,等.丹参化学成分及其药理作用研究进展[J].中草药,2020,51(3):788-98.
- [6] 魏媛娇,荣阳,曾辰华.丹参注射液降低血管内皮细胞氧化应激损伤,对心肌梗死患者心肌功能的保护效果[J].心血管康复医学杂志,2020,29(1):114-8.
- [7] Huang Z, Ye B, Dai Z, et al. Curcumin inhibits autophagy and apoptosis in hypoxia/reoxygenation-induced myocytes [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(6): 4678-84.
- [8] 刘聪辉,贺兆发,李奕红,等.姜黄素对心肌梗死大鼠心肌 ROS、MDA 及 P-AKT/AKT 的影响[J].中华临床医师杂志(电子版),2015,9(7):1134-8.
- [9] 杜芳清,邓爱露,向泽礼,等.白花蛇舌草溶液对离体灌注蛙心收缩力和心率的影响[J].临床医药文献电子杂志,2017,4(55):10703-4.
- [10] 杨柳,苑亚静,吴越.重楼皂苷 I 通过抑制 NF- κ B 信号通路减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤[J].中华危重病急救医

- 学, 2019, 31(6): 746-9.
- [11] 王家伟, 易登良, 王涛, 等. 黄芩素对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的保护作用及对 Janus 激酶-信号转导与转录激活分子信号通路的影响[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(11): 2410-4.
- [12] 米娜. 白果内酯经血小板活化因子受体实现对大鼠心脏的抗缺血效应[D]. 上海: 复旦大学, 2011.
- [13] 刘静. 复方地龙片治疗气虚血瘀型不稳定性心绞痛的临床疗效观察[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [14] 刘元. 冠心病中医治疗十法[J]. 医药世界, 2005, 7(8): 68.
- [15] 陈铎葆, 刘建国, 陈红, 等. 神香苏合丸对大鼠心肌缺血的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(2): 86-8, 126.

Analysis of gene expression difference in acute myocardial infarction based on bioinformatics and prediction of traditional Chinese medicine

Yang Xianjuan, Wang Liying, Wang Jian, Wang Jiajun, Fu Yin, Li Jinxiu, Xiao Linxuan
(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory of Systematic Research
of Distinctive Chinese Medicine Resources in Southwest China, Chengdu 611137)

Abstract Objective To analyze and compare the gene chip data of normal people and patients with acute myocardial infarction through GEO gene expression database, to screen out differentially expressed genes (DEGs), and to predict potential Chinese medicines for the treatment of acute myocardial infarction. **Methods** GSE66360 gene microarray was downloaded, DEGs information was obtained by analysis, gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis of differential genes were performed, key genes were further analyzed by String database and Cytoscape software, and key genes were mapped to the medical ontology information retrieval platform (Coremine Medical) to screen potential Chinese medicines for the treatment of acute myocardial infarction. **Results** A total of 943 differentially expressed genes were screened. The biological process was mainly enriched in myeloid leukocyte activation, regulation of cytokine production, leukocyte chemotaxis, etc. The cellular component was mainly focused on secretory granule lumen, membrane surface, and extrinsic components of the membrane, etc. Molecular function was mainly in chemokine receptor binding, pattern recognition receptor activity, cytokine binding, etc. KEGG analysis showed that the main signaling pathways involved were tumor necrosis factor (TNF), hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), and JAK-STAT signaling pathways, etc. The key genes to be screened are formyl peptide receptor 2 (FPR2), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), chemokine (C-X-C motif) ligand 8 (CXCL8), ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 4 (UBR4), jun proto-oncogene (JUN), platelet-activating factor receptor (PTAFR), Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide (FCER1G), G protein-coupled receptor 84 (GPR84), plasminogen activator, urokinase (PLAU). The potential herbs predicted for the treatment of acute myocardial infarction were Centipede ($P=0.00330$), Rithoma Curcuma ($P=0.00239$), Curcuma ($P=0.00240$), Paris polyphylla Smith ($P=0.00248$), Salviae miltiorrhizae ($P=0.00272$), Fritillary bulb ($P=0.00371$), and Panax ginseng ($P=0.00159$). **Conclusion** Traditional Chinese medicines such as Rithoma curcuma in activating blood and removing blood stasis medicine, Panax ginseng in nourishing Qi, and Fritillary bulb in medicine for the treatment of cough and asthma have protective effects on acute myocardial infarction. The mechanism of action may be related to the regulation of immune and anti-inflammatory signaling pathways.

Key words acute myocardial infarction; bioinformatics; differentially expressed gene; Chinese medicine prediction