

# 利巴韦林和干扰素- $\alpha$ 联合应用治疗中东呼吸综合征冠状病毒感染的生物信息学分析

郑阳 王全意

100013 北京市疾病预防控制中心传染病地方病控制所

通信作者:王全意, Email:bjdcxm@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.02.028

**【摘要】** **目的** 通过生物信息学分析探讨联合应用利巴韦林和干扰素- $\alpha$ 防治中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)感染的分子机制。**方法** 在 Array Express 数据库中查找 MERS-CoV 相关的基因芯片数据,利用 Agilent GeneSpring GX 软件对芯片数据进行处理分析。在比较毒理基因组学数据库(CTD)中查找利巴韦林和干扰素- $\alpha$ 作用于人体的靶基因位点,利用 PANTHER TOOL 和 DAVID 平台分别对基因芯片数据和药物靶基因进行 GO 功能注释和信号通路分析。**结果** 检索数据库得到 MERS-CoV 感染相关的 mRNA 表达谱芯片数据,以及 27 个利巴韦林和干扰素- $\alpha$  作用的靶基因。对 MERS-CoV 感染相关 mRNA 表达谱数据进行聚类分析可分为两组基因群,即基因表达随病毒感染时间逐渐上升或下降。GO 分析显示,药物靶基因与基因芯片数据共同涉及 10 个生物学过程,主要包括细胞生理、代谢、免疫、生物调节、应激反应等。药物靶基因、基因芯片第一组基因群(随病毒感染时间表达上升)和第二组基因群(随病毒感染时间表达下降)参与的信号通路分别为 9、3 和 23 个,其中仅前二者有共同参与的信号通路共 7 个,主要与识别病原体、促进细胞因子释放、生成自身免疫应答等有关。**结论** 利巴韦林和干扰素- $\alpha$  联合应用可通过干预多个信号通路中的位点起到治疗 MERS-CoV 感染的作用,MERS-CoV 感染相关基因芯片数据中随感染时间表达水平下降的基因可作为药物靶基因为筛选治疗 MERS 感染的新型药物提供参考信息。

**【关键字】** 中东呼吸综合征; 利巴韦林; 干扰素- $\alpha$ ; 信号通路

**基金项目:**北京市科技计划(D141100003114002)

## Bioinformatics analysis on molecular mechanism of ribavirin and interferon- $\alpha$ in treating MERS-CoV

Zheng Yang, Wang Quanyi

Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China

Corresponding author: Wang Quanyi, Email:bjdcxm@126.com

**【Abstract】** **Objective** To study the molecular mechanism of ribavirin and interferon- $\alpha$  in the treatment of Middle East Respiratory Syndrome (MERS) by bio-informatic methods. **Methods** MERS-CoV-related microarray data was searched from Array Express database and analyzed by Agilent GeneSpring GX software. Target genes of ribavirin and interferon- $\alpha$  were acquired from Comparative Toxicogenomics Database (CTD). PANTHER TOOL and DAVID platform were used for the analysis of GO and Pathway. **Results** One set of MERS-CoV related microarray data and 27 target genes of ribavirin and interferon- $\alpha$  were acquired from the online databases. Data on Genes from microarray were divided into two time-related gene clusters by using the Unsupervised Hierarchical Clustering. Data from the GO analysis indicated that the target genes of ribavirin and interferon- $\alpha$  as well as the genes from the microarray were mainly enriched in 10 biological processes, including cellular process, metabolic process, immune system process and biological regulation, et al. Data on drug target genes, first and second cluster of microarray would involve 9, 3 and 23 signaling pathways respectively, and only the former two showed 7 common pathways, which were related to pathogen recognition, cytokine release and autoimmune response. **Conclusion** Ribavirin in combination with interferon- $\alpha$  might have therapeutic effects on MERS patients through several signaling pathways. Genes in the second cluster might serve as target genes to be used for screening of new drugs in treating the MERS-CoV infection.

**【Key words】** Middle East Respiratory Syndrome; Ribavirin; Interferon- $\alpha$ ; Signaling pathway

**Fund program:** Beijing Municipal Science and Technology Commission (D141100003114002)

2015 年 5 月 20 日韩国确诊了一名中东呼吸综合征冠状病毒 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV) 感染病例, 随后由该病例引发的病例数量迅速上升, 造成自 2012 年 MERS-CoV 发现以来中东以外地区的最大暴发疫情<sup>[1]</sup>, 并且其中有一例病例输入到我国境内。截至 2015 年 6 月 30 日, 全球共确诊 MERS-CoV 感染病例 1 357 例, 死亡 486 例, 该病确诊病例数量仍然在不断增加。由于缺乏有效治疗手段, 对于 MERS 病例的管理和救治仅限于支持治疗和抗微生物治疗。有科研人员认为联合使用利巴韦林和干扰素- $\alpha$  可能对治疗 MERS-CoV 感染病例有效, 本研究拟通过生物信息学的方法, 从基因层面探讨利巴韦林和干扰素- $\alpha$  联合应用与 MERS-CoV 感染之间的联系, 从而为临床治疗提供一定的参考信息。

## 资料与方法

1. 药物靶基因和 MERS-CoV 相关基因芯片数据检索: 在比较毒理基因组学数据库 (Comparative Toxicogenomics Database, CTD) 中分别以干扰素- $\alpha$  和利巴韦林为关键词, 搜索其靶基因。2 种药物对应靶基因的总和, 即代表干扰素- $\alpha$  和利巴韦林联合治疗的生物学靶点。在 Array Express 数据库里搜索与 MERS-CoV 有关的基因芯片数据库。

2. 基因芯片数据分析: 利用 Agilent GeneSpring GX 软件对基因芯片数据进行分析, 计算芯片上每一个探针的荧光值在不同时间点变化的标准差, 按照数值大小排序, 确定表达水平出现显著变化的基因。然后利用这些显著变化的基因进行非监督层次聚类分析 (unsupervised hierarchical clustering)。

3. 生物信息学分析: 利用 PANTHER TOOL 对药物靶基因和芯片数据进行 GO (gene ontology, GO) 富集分析, 分析基因主要参与的生物学过程 (biological process, BP) 及所占百分比。利用 DAVID 平台, 获取基因群显著富集的 KEGG 通路 ( $P < 0.05$ )。

## 结果

1. 数据搜索: 截至 2015 年 6 月 10 日, 在 CTD 中检索到干扰素- $\alpha$  和利巴韦林的靶基因分别为 7 个和 26 个, 其中有 6 个相同基因, 因此, 利巴韦林和干扰素- $\alpha$  的靶基因共计 27 个。在 ArrayExpress 数据库中搜索到 MERS-CoV 感染相关的 mRNA 表达谱基因芯片数据集 1 个 (编号: E-GEOD-56677), 该芯片

数据是比较 MERS-CoV 感染人类呼吸道上皮细胞后 0、3、7、12、18 和 24 h 基因表达的变化情况。按照同一芯片探针表达量在不同时间点的标准差由大到小排序, 取前 500 个基因进行后续分析, 其中与上述药物靶基因相同的基因共 3 个, 分别是 OAS1, IL6, ICAM1。

2. MERS-CoV 感染人类呼吸道上皮细胞的基因表达谱的非监督层次聚类分析: 为了解基因芯片数据中所有基因按照时间序列的表达模式, 以及这些基因的群组划分, 对芯片数据进行聚类分析 (图 1), 按照病毒刺激后基因表达随时间发生的变化, 将基因主要分为两组, 第一组基因在病毒感染后随时间的变化表达水平逐渐升高, 包含药物靶基因 OAS1, IL6; 第二组则随时间变化而表达水平逐渐降低, 包含药物靶基因 ICAM1。

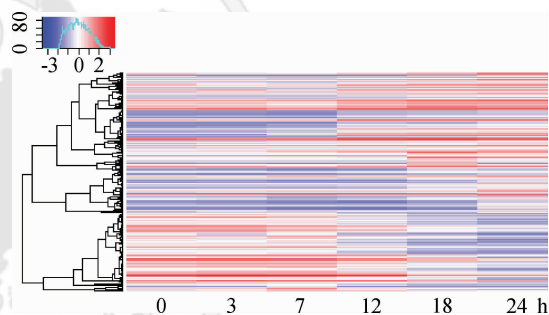


图 1 MERS-CoV 感染细胞后 6 个时间点 mRNA 非监督层次聚类分析

3. 生物信息学分析:

(1) 差异表达基因的功能注释: 利用 PANTHER TOOL 对 27 个药物靶基因和基因芯片筛选得到的 500 个基因分别进行 GO 注释。结果显示, 药物靶基因和基因芯片数据涉及的生物学过程分别为 10 个和 13 个, 见图 2。

(2) 信号通路分析与比较: 利用 DAVID 平台进行信号通路分析, 基因芯片第一组和第二组基因富集的信号通路分别为 9 个和 3 个 ( $P < 0.05$ ); 27 个药物靶基因富集的信号通路共有 23 个 ( $P < 0.05$ )。药物靶基因与第一组基因群共同作用的信号通路有 7 条, 主要与识别病原体, 促进细胞因子释放, 生成自身免疫反应等有关; 药物靶基因与第二组基因群无共同作用的信号通路。

## 讨论

MERS-CoV 感染病例的疾病谱较为广泛, 病死率高, 且目前尚无特异性治疗方法。由于 MERS 与 SARS 病毒高度同源, 因此认为在治疗 MERS-CoV

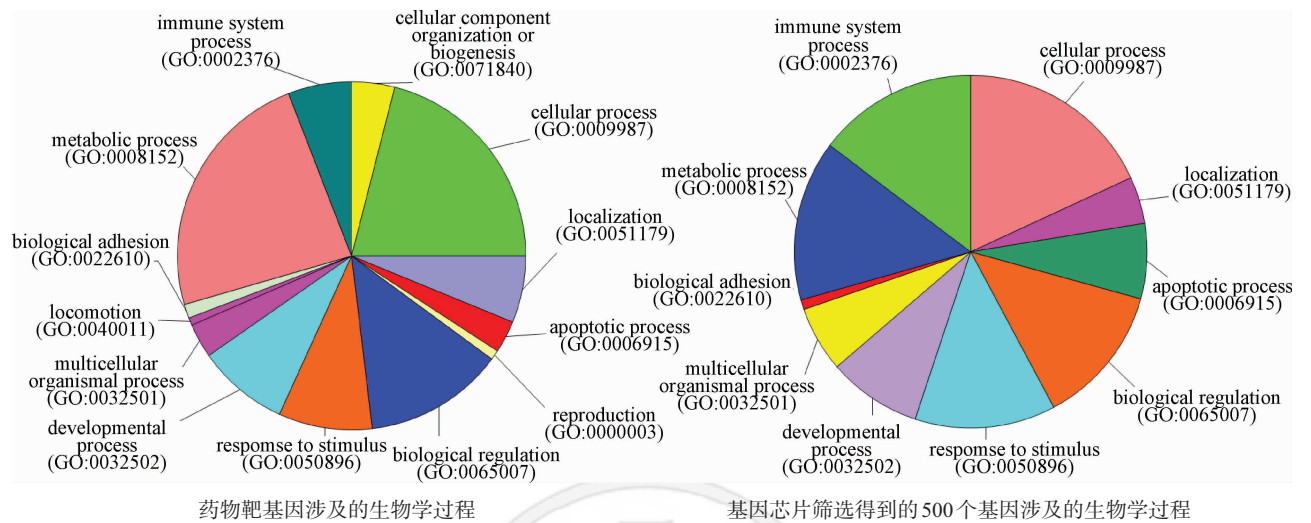


图 2 MERS-CoV 感染相关基因的 GO 注释

感染时可借鉴 SARS 的治疗经验,其中包括利巴韦林和干扰素- $\alpha$ 的联合使用<sup>[2]</sup>。有研究者将这两种药物加入感染 MERS-CoV 的恒河猴肾细胞系中,证实联合应用这两种药物比单独使用能够更为有效的抑制 MERS-CoV 的生长,并且在恒河猴动物模型中也证实了其对预后的促进作用<sup>[3-4]</sup>,提示联合应用利巴韦林和干扰素- $\alpha$ 确实有助于机体对抗 MERS-CoV 的感染。为了解这两种药联合使用与人体感染 MERS-CoV 后基因表达变化的关联性,本研究通过生物信息学方法对公共数据平台的数据进行了分析。

利用公共数据,方便快捷,能够节省资源及成本,并能充分利用已知的科研结果,得到对疾病研究有价值的信息。本研究利用 CTD 和 ArrayExpress 平台,分别发现 27 个利巴韦林和干扰素- $\alpha$ 在人体中作用的靶基因,1 个与 MERS-CoV 感染相关的 mRNA 表达谱芯片数据。通过对基因芯片数据进行层次聚类分析,发现与病毒感染相关的基因主要有两大类,即基因表达在病毒感染细胞后随时间逐渐增高或逐渐降低。GO 功能注释显示,芯片数据中显著变化的基因与药物靶基因涉及的生物学过程基本一致,且通过信号通路分析发现,芯片数据中的第一组基因与药物靶基因参与的信号通路有 7 条相同。综合这两个分析结果,提示利巴韦林和干扰素- $\alpha$ 联合应用可能与 MERS-CoV 感染有关的基因相互作用,通过激活或抑制芯片数据中表达水平显著变化的基因,来改变病毒感染相关的信号通路的作用,从而达到抵抗病毒,抑制疾病发展的目的。一项关于 MERS 重症病例的研究显示,使用利巴韦林和干扰素- $\alpha$ 联合治疗的患者与不使用该治疗的对照组相比,用药 14 d 时治疗组的生存率明显高于对照组,但

是截止到用药 28 d 时,却未观察到显著差异<sup>[5]</sup>,提示这两种药物组合对于治疗 MERS 的效果有限。本研究中第二组基因参与的信号通路与药物靶基因完全不同,也说明利巴韦林和干扰素- $\alpha$ 在对抗病毒感染过程的局限性,与上述的抗病毒作用有限性相对应。同时,这一结果也提示后续研究中可以将这些通路涉及的基因作为药物作用靶基因,反向推导与其相互作用的化合物,为探索的新的治疗药物提供线索。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Petersen E, Hui DS, Perlman S, et al. Middle East Respiratory Syndrome-advancing the public health and research agenda on MERS-lessons from the South Korea outbreak [J]. Int J Infect Dis, 2015, 36: 54-55. DOI: 10.1016/j.ijid.2015.06.004.
- [2] 郑阳, 杨鹏. 中东呼吸综合征冠状病毒研究现状 [J]. 国际病毒学杂志, 2013, 20 (3): 97-99. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2013.03.001. Zheng Y, Yang P. Current research on Middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. Inter J Virol, 2013, 20 (3): 97-99. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2013.03.001.
- [3] Falzarano D, de Wit E, Martellaro C, et al. Inhibition of novel  $\beta$  coronavirus replication by a combination of interferon- $\alpha$ 2b and ribavirin [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1686. DOI: 10.1038/srep01686.
- [4] Falzarano D, de Wit E, Rasmussen AL, et al. Treatment with interferon- $\alpha$  2b and ribavirin improves outcome in MERS-CoV-infected rhesus macaques [J]. Nat Med, 2013, 19 (10): 1313- 1317. DOI: 10.1038/nm.3362.
- [5] Omrani AS, Saad MM, Baig K, et al. Ribavirin and interferon alfa-2a for severe Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a retrospective cohort study [J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(11): 1090-1095. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70920-X.

(收稿日期: 2015-07-31)

(本文编辑: 万玉立)