



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2025.05.011

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2025.05.011

· 论著 ·

# 基于生物信息学对重度急性呼吸综合征冠状病毒 2 型感染与急性肾损伤关系的研究

虎亚男 孙中毅 曲嘉琛 高涵 彭志勇

**【摘要】 目的** 探讨重度急性呼吸综合征冠状病毒 2 型(SARS-CoV-2)感染引发的新型冠状病毒感染(COVID-19)急性肾损伤(AKI)的生物学关联。**方法** 从基因表达综合数据库(GEO)获取 COVID-19 和 AKI 的数据集(GSE171110 和 GSE139061),通过两者差异表达基因的交集获取枢纽基因。通过基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析研究枢纽基因在功能通路方面与疾病的关联,采用受试者工作特征(ROC)曲线验证其诊断价值,并通过免疫细胞浸润分析评估枢纽基因与免疫反应的相关性。**结果** 获取 COVID-19 和 AKI 数据集,初步鉴定出差异常表达基因,通过二者交集确定 *MTRNR2L8*、*GSTA1*、*COL7A1*、*RAB13*、*ESM1*、*MEIS2*、*EGFL7* 和 *CCDC88B* 8 种枢纽基因。GO 富集分析结果显示枢纽基因主要富集于肌细胞增殖的正调控、肝细胞生长因子受体信号通路、包被囊泡、分子内氧化还原酶活性。KEGG 富集分析结果显示枢纽基因主要富集于谷胱甘肽代谢和细胞色素 P450 通路等。基因表达水平差异分析结果显示, *GSTA1*、*COL7A1*、*RAB13*、*ESM1*、*MEIS2*、*EGFL7*、*CCDC88B* 在 COVID-19 和 AKI 数据集中表达趋势相同,即在疾病组的表达水平均显著高于健康对照组( $P < 0.01$ ),而 *MTRNR2L8* 在 COVID-19 数据集疾病组的表达水平高于健康组,在 AKI 数据集的表现与之相反( $P < 0.01$ )。这些基因不仅在 COVID-19 和 AKI 中表现出优越的诊断价值,还与疾病发生机制相关的功能通路和免疫微环境变化有密切关系。**结论** 在 COVID-19 和 AKI 数据集中筛选出的 8 种枢纽基因在疾病模型中与多种分子功能、信号通路、免疫反应存在生物学关联,可为日后的临床诊断和治疗提供新见解。

**【关键词】** 重度急性呼吸综合征冠状病毒 2 型感染; 新型冠状病毒感染; 急性肾损伤; 基因表达综合数据库; 免疫浸润

**【中图分类号】** R692.6**【文献标识码】** A

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81971816)

作者单位:430071 武汉,武汉大学中南医院重症医学科

通讯作者:彭志勇, E-mail:zn001590@whu.edu.cn

- [14] Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E, et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases[J]. Eur Heart J, 2013, 34(33): 2636-2648, 2648a-2648d.
- [15] Wu MH, Wu ET, Wang CC, et al. Contemporary Postnatal Incidence of Acquiring Acute Myocarditis by Age 15 Years and the Outcomes From a Nationwide Birth Cohort[J]. Pediatr Crit Care Med, 2017, 18(12): 1153-1158.
- [16] Putschoegl A, Auerbach S. Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Myocarditis in Children[J]. Pediatr Clin North Am, 2020, 67(5): 855-874.
- [17] Wong BT W, Christiansen JP. Clinical Characteristics and Prognostic Factors of Myocarditis in New Zealand Patients[J]. Heart Lung Circ, 2020, 29(8): 1139-1145.
- [18] Xu D, Zhao RC, Gao WH, et al. A Risk Prediction Model for In-hospital Mortality in Patients with Suspected Myocarditis[J]. Chin Med J (Engl), 2017, 130(7): 782-790.
- [19] Wei S, Fu J, Chen L, et al. Performance of Cardiac Magnetic Resonance

Imaging for Diagnosis of Myocarditis Compared with Endomyocardial Biopsy: A Meta-Analysis[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 3687-3696.

- [20] Grun S, Schumm J, Greulich S, et al. Long-term follow-up of biopsy-proven viral myocarditis: predictors of mortality and incomplete recovery[J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 59(18): 1604-1615.
- [21] Liu L, Yang X, Gu Y, et al. Predictive Value of the Age, Creatinine, and Ejection Fraction(ACEF) Score in Patients With Acute Fulminant Myocarditis[J]. Front Physiol, 2021, 12: 596548.
- [22] Arola A, Pikkariainen E, Sipila JO, et al. Occurrence and Features of Childhood Myocarditis: A Nationwide Study in Finland[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(11): e005306.
- [23] Moady G, Perlmutter S, Atar S. The Prognostic Value of Natriuretic Peptides in Stable Patients with Suspected Acute Myocarditis: A Retrospective Study[J]. J Clin Med, 2022, 11(9): 2472.

(收稿日期:2024-06-21)

(本文编辑:高婷)

新型冠状病毒感染(COVID-19)是由重度急性呼吸综合征冠状病毒2型(SARS-CoV-2)感染引起的,是一场全球性的流行病,在爆发半年内造成六百多万人死亡<sup>[1]</sup>。目前,COVID-19 发病率和死亡率显著降低,但棘手的问题是 COVID-19 相关的并发症,尤其是肾脏损害。自 COVID-19 爆发开始,本研究团队已注意到其广泛的肾脏累及,如蛋白尿、血尿和急性肾损伤(AKI),且 AKI 是 COVID-19 患者后期发展为慢性肾脏病的关键过渡阶段<sup>[2]</sup>。2020 年的一项研究表明,在 3 993 例因 COVID-19 而住院治疗的患者中,有 46% 发展为 AKI,19% 的患者需要进行透析治疗<sup>[3]</sup>。近几年,SARS-CoV-2 毒株因多重突变逐渐降低毒性,疫苗接种增强了集体免疫,以及在治疗 COVID-19 重度患者中较早使用皮质类固醇,这些影响因素都使得 AKI 的发生率和严重程度显著降低。尽管如此,对 2022 ~ 2023 年相关文章进行 Meta 分析,结果发现 COVID-19 住院患者 AKI 的发病率为 10% ~ 17%<sup>[4]</sup>,依然是患者健康管理的巨大威胁。对于 COVID-19 患者发生 AKI 的病理生理机制,主要推测为 SARS-CoV-2 病毒的细胞锚点为血管紧张素转化酶 2(ACE2)受体,其广泛存在于肾小管细胞、肾小球细胞和内皮细胞中,从而使病毒直接感染细胞,最终导致急性肾小管坏死。此外,病毒可诱导机体过度的免疫反应,导致促炎因子募集、补体系统失调以及肾脏血流动力学改变,累及肾实质,影响肾脏功能<sup>[5-6]</sup>。因此,早期识别 COVID-19 患者的肾脏损伤,尽快采取有效的治疗措施,可阻止 AKI 的发展,改善患者预后。本研究利用生物信息学方法筛选出 COVID-19 和 AKI 之间的差异表达基因,对其生物学功能和免疫影响进行探索,探讨 COVID-19 和 AKI 之间潜在的生物学联系。

## 材料与方法

1. 数据收集:在基因表达综合数据库(GEO)提取 COVID-19 和 AKI 的数据集。GSE171110 是 COVID-19 患者外周全血样本的转录组学数据集,包含 44 例 COVID-19 患者和 10 例健康志愿者,年龄 18 ~ 80 岁,无性别限制。获取全血后,使用 Tempus<sup>TM</sup> Spin RNA Isolation Kit 试剂盒提取总 RNA,并用 GLOBINclear<sup>TM</sup> Kit 试剂盒清除球蛋白 mRNA。随后通过 Illumina TruSeq<sup>®</sup> Stranded mRNA kit 试剂盒制备 mRNA 库,在 GPL16791 Illumina HiSeq 2500 完成测序。GSE139061 是 AKI 患者肾活检标本的转录组学数据集,包含 39 例 AKI 患者和 9 例健康志愿者,年龄 18 ~ 80 岁,无性别限制。参考肾切除术行临床活检,获取未受肿瘤等因素影响的肾脏组织,放置于 Michels 溶液并于 OCT 冷冻 24 h。

然后将冷冻组织切割为 20  $\mu\text{m}$  厚度的切片,放置于缓冲液中,使用 Thermo Fisher<sup>TM</sup> Arcturus Picopure extraction kit 试剂盒提取总 RNA,使用 Takara SMARTer<sup>®</sup> Stranded Total RNA-Seq Kit 试剂盒制备文库,在 GPL20301 Illumina HiSeq 4000 进行测序。

## 2. 方法

(1)差异表达基因分析:从 GEO 数据集获取数据进行归一化处理后,使用 R 语言中的“limma”包分别在 GSE171110 和 GSE139061 数据集中筛选出差异表达基因(DEGs);使用“pheatmap”包绘制 DEGs 表达热图,使用“ggplot2”包绘制 DEGs 火山图。

(2)功能富集分析:使用 R 语言中“clusterProfiler”、“Enrichment plot”和“org. hss. eg . db”包对 DEGs 进行基因本体(GO)富集分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析,设定  $P < 0.05$  具有统计学意义。

(3)基因调控网络:通过 STRING 数据库分析 DEGs 之间的交互作用,并由 Cytoscape 软件量化分析并绘制图谱。基于 TarBase 和 miRTarBase 数据库探索 DEGs 与微小 RNA(miRNA)的相互作用,基于 JASPAR 数据库探索 DEGs 与转录因子(TFs)的相互作用,由 NetworkAnalyst 平台构建相应图谱。

(4)受试者工作特征(ROC)曲线:ROC 曲线是评估模型性能的常用指标<sup>[7]</sup>。通过 R 语言中的“pROC”包绘制 ROC 曲线,计算曲线下面积(AUC)判断关键基因的诊断价值。

(5)免疫细胞浸润分析:使用 R 语言中“ssGSEA”包分析数据集中 28 种免疫细胞在健康样本和疾病样本之间的浸润比例差异,并采用 spearman 相关分析评估免疫细胞水平与关键基因的相关性。

3. 统计学处理:应用 SPSS 25.0 和 Graphpad 9.0 软件进行统计分析和图表绘制。符合正态分布的计量资料采用独立样本  $t$  检验,不符合正态分布的计量资料采用 Mann-Whitney  $U$  检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 结 果

1. 差异表达基因的鉴定:通过 GEO 数据库获取所需数据集,在 COVID-19 数据集即 GSE171110 中筛选出 3 442 个差异表达基因,其中 1 834 个基因表达水平上调,1 608 个表达水平下调,所有差异表达基因的火山图如图 1A 所示。在 AKI 数据集即 GSE139061 中筛选出 183 个差异表达基因,其中 157 个基因表达水平上调,26 个下调,所有差异表达基因的火山图如图 1B 所示。

2. GO、KEGG 功能分析:对筛选出的差异表达基

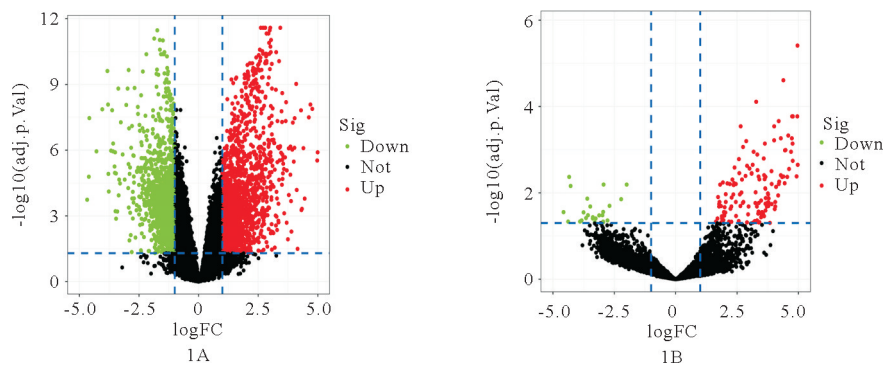


图1 差异表达基因的火山图(A:COVID-19 数据集;B:AKI 数据集)

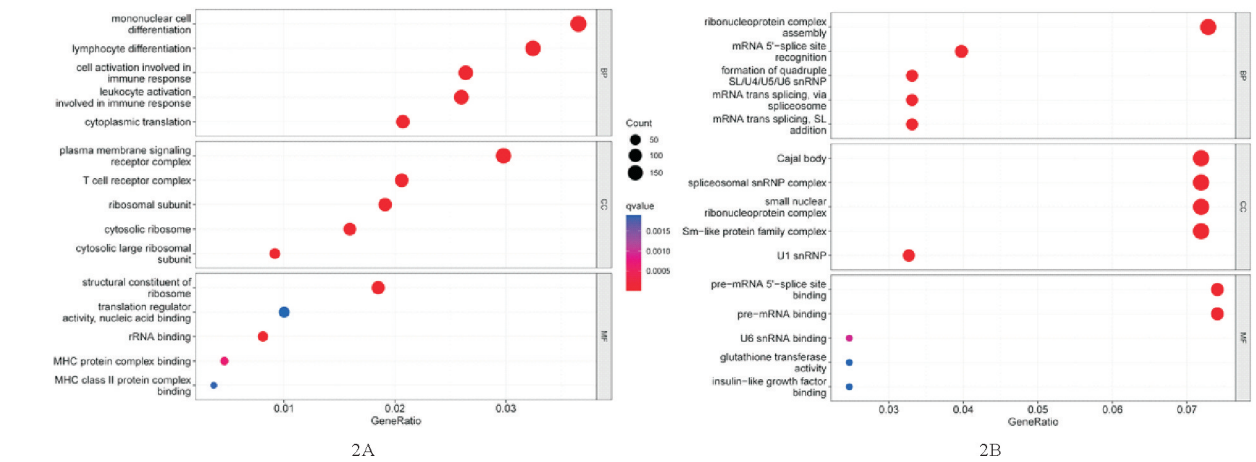


图2 差异表达基因的 GO 分析 (A:COVID-19 数据集;B:AKI 数据集)

因进行了功能分析。在 GO 分析中,COVID-19 数据集最显著富集的条目如图 2A 所示,可知 DEGs 主要富集于单核细胞分化、T 细胞受体复合物、核糖体结构组成等。AKI 数据集最显著富集的 GO 条目如图 2B 所示,可知 DEGs 主要富集于核糖核蛋白复合物组装、Cajal 小体等。KEGG 通路分析表明 COVID-19 中 DEGs 主要富集于冠状病毒感染、单纯疱疹病毒感染通路等,AKI 中 DEGs 主要富集于剪接体、细胞色素 P450、核糖体通路等。因此,COVID-19 和 AKI 数据集所筛选的 DEGs 在功能富集上有显著差异。

3. 差异表达基因的相互作用分析:使用 STRING 数据库对差异表达基因之间的相互作用进行分析,Cytoscape软件量化相互作用的强度。在 COVID-19 数据集中,*CDK1*、*BUB1*、*KIF11* 和 *KIF20A* 间相互作用分数最高,互作关系最强;在 AKI 数据集中,*UBTF*、*KLHDC4*、*FBL*、*BYSL* 和 *PELP1* 间互作关系最强。

4. 枢纽基因的获取及分析:基于 COVID-19 和 AKI 数据集鉴定出的 DEGs,二者取交集,筛选出 8 种交叉的枢纽基因:*MTRNR2L8*、*GSTA1*、*COL7A1*、*RAB13*、*ESM1*、*ME1S2*、*EGFL7* 和 *CCDC88B*(图 3)。对枢纽基因进行 GO 分析,结果显示其主要富集于肌细胞增殖的正调控、肝细胞生长因子受体信号通路、包被囊泡、

分子内氧化还原酶活性(图 4A)。KEGG 通路分析显示枢纽基因主要富集于谷胱甘肽代谢和细胞色素 P450 通路等(图 4B)。此外,利用 Networkanalyst 数据库建立枢纽基因与 miRNA 和 TFs 的相互作用网络,结果表明 *MEIS2*、*ESM1*、*COL7A1*、*EGFL7* 和 *MTRNR2L8* 与 99 种 miRNA 相互作用,8 种枢纽基因可与 36 种 TFs 相互作用。

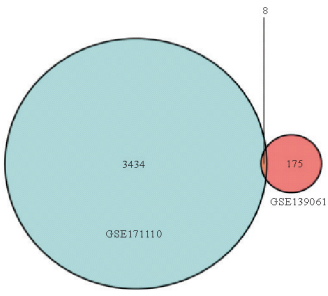


图3 通过韦恩图获取枢纽基因

5. 枢纽基因的诊断价值鉴定:基因表达水平差异分析结果显示,*GSTA1*、*COL7A1*、*RAB13*、*ESM1*、*MEIS2*、*EGFL7*、*CCDC88B* 在 COVID-19 和 AKI 数据集中表达趋势相同,即在疾病组的表达水平均显著高于健康对照组( $P < 0.01$ ),而 *MTRNR2L8* 在 COVID-19 数据集疾病组的表达水平高于健康组,在 AKI 数据集的表现



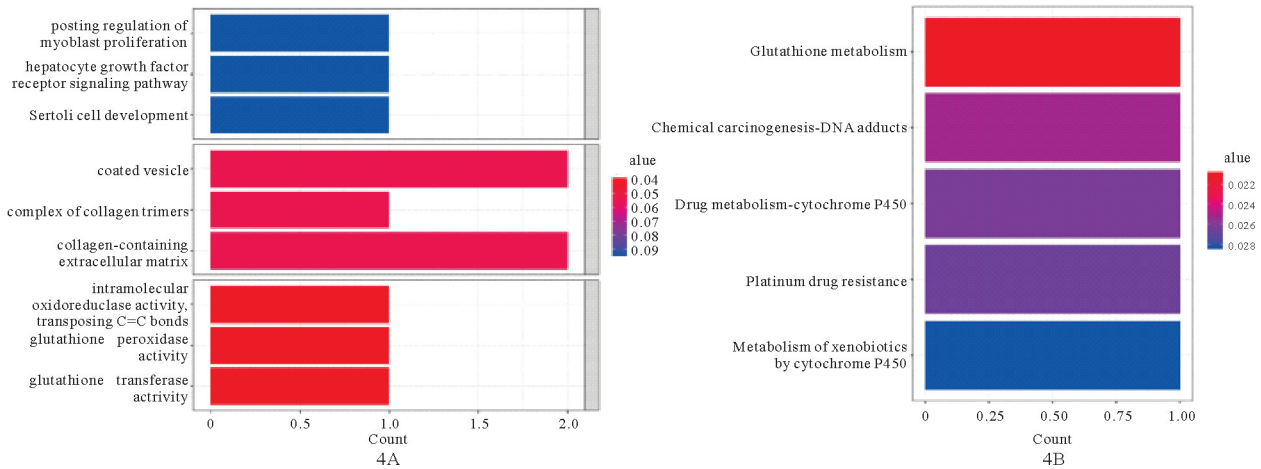


图 4 枢纽基因功能分析 (A:枢纽基因的 GO 分析;B:枢纽基因的 KEGG 通路富集分析)

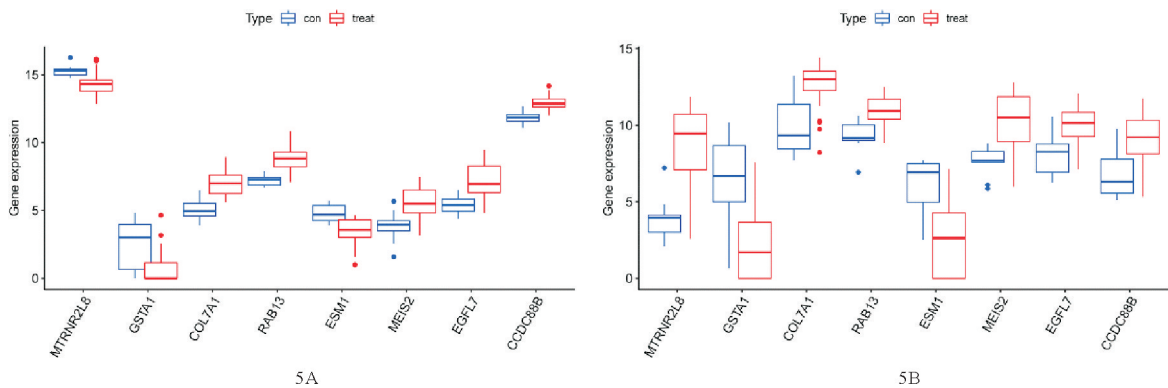


图 5 枢纽基因的表达差异 (A:COVID-19 数据集 ;B:AKI 数据集)

与之相反( $P < 0.01$ )。见图 5。基于 COVID-19 数据集建立诊断 ROC 曲线,8 种枢纽基因的 AUC 值均  $> 0.75$ ,其中 6 种的 AUC 值  $> 0.85$ 。在 AKI 数据集中,8 种枢纽基因的 AUC 值均  $> 0.85$ 。以上结果表明枢纽基因对两种疾病模型具有优越的诊断价值。

6. 免疫浸润分析:枢纽基因与免疫细胞浸润的关联性分析结果显示,在 COVID-19 样本中,MEIS2 和 MTRNR2L8 与中性粒细胞呈正相关,ESM1 与记忆  $CD4^+T$  细和  $CD8^+T$  细胞呈正相关,COL7A1、MEIS2 和 RAB13 与记忆  $CD4^+T$  细胞、记忆  $CD8^+T$  细胞和 CD56 自然杀伤细胞均呈负相关。在 AKI 样本中,CCDC88B、COL7A1、MEIS2 和 RAB13 与肥大细胞均呈正相关,EGFL7、MEIS2 和 MTRNR2L8 与 CD56 自然杀伤细胞和记忆  $CD8^+T$  细胞均呈负相关。这些结果表明枢纽基因与 COVID-19 和 AKI 的免疫微环境变化关系密切。

讨 论

本研究旨在探索 SRAS-CoV-2 感染所致 COVID-19 与 AKI 之间的生物学关联。针对二者的公共数据集,筛选出差异表达基因,通过功能分析揭示了差异表

达基因与病理生理机制的联系。已有研究表明 SRAS-CoV-2 感染可影响单核细胞组分,导致非经典单核细胞中的  $CD14^{lo}CD16^{hi}$  丢失,且单核细胞的激活与感染的严重程度相关<sup>[8]</sup>。Georg 等<sup>[9]</sup> 研究结果表明,在 COVID-19 样本中,中性粒细胞和单核细胞的浸润增加可作用于 T 细胞诱导的趋化因子 CXCL8 和 CCL2 的释放。本研究通过 GO 和 KEGG 分析,发现 COVID-19 中的 DEGs 富集于 T 细胞受体复合物、单核细胞分化、细胞质翻译等过程。有研究表明,小鼠 AKI 模型和急性肾小管坏死患者中,受损的小管细胞释放细胞质剪接体相关蛋白 130,通过 miRNA-219c-Minclel 触发巨噬细胞的激活<sup>[10]</sup>。本研究发现 AKI 中的 DEGs 富集于 miRNA 反式剪接和剪接体 snRNP 复合物通路。

通过对两种模型中的 DEGs 交叉,鉴定出 8 种枢纽基因: MTRNR2L8、GSTA1、COL7A1、RAB13、ESM1、MEIS2、EGFL7 和 CCDC88B。功能分析结果表明其与生长因子受体通路、氧化还原酶活性和谷胱甘肽代谢通路有关。转录因子作用于基因转录和表达,miRNA 在转录后水平发挥基因调控和 RNA 沉默的关键作用,因此 miRNA 和转录因子对疾病的发生发展至关重要<sup>[11-12]</sup>。在本研究中,我们建立 miRNA 和转录因子的

作用网络,结果表明 hsa-miR-146a-5p、has-miR-1-3p 和 has-miR-16-5p 是与枢纽基因相关的 3 种最高表达的 miRNA。

有研究发现 miR-146a-5p 是尿液来源于干细胞中外泌体的关键因子,可作用于 IRAKI/NF- $\kappa$ B 通路发挥细胞保护效应<sup>[13]</sup>,且血清 miR-146a-5p 水平与 COVID-19 患者对托珠单抗治疗效果高度相关<sup>[14]</sup>。在 AKI 的相关研究中,血清 miR-146a-5p 水平有助于脓毒症所致 AKI 患者的风险评估,也有益于治疗过程中肾功能的动态变化监测<sup>[15]</sup>。此外,与枢纽基因相关的转录因子(如 *FOXC1*、*TFAP2A*、*TP53*、*ELK1*、*GATA2*、*SRF*、*NFKB1* 和 *POU2F2*)均与不同类型的肾脏疾病有关。

免疫浸润分析表明了 COVID-19 和 AKI 与免疫细胞浸润的密切关联。SARS-CoV-2 感染后,免疫系统紊乱的显著特征之一即淋巴细胞大量减少,从而可将淋巴细胞可作为 COVID-19 患者的潜在治疗靶点<sup>[16]</sup>。本研究证实 COVID-19 中活化 CD8<sup>+</sup>T 细胞、记忆 CD4<sup>+</sup>T 细胞和记忆 B 细胞的比例低于健康组。肾脏中的巨噬细胞是病毒感染中主要的通信细胞,在免疫防御、激活吞噬细胞和趋化因子信号通路发挥重要作用<sup>[17]</sup>,本研究也揭示了巨噬细胞在两组疾病模型中的浸润差异。进一步分析证实 8 种枢纽基因与多种免疫细胞呈不同程度的关联性,如 *CCDC88B* 与 COVID-19 中的中性粒细胞和活化树突细胞呈正相关,与 AKI 样本中的记忆 CD8<sup>+</sup>T 细胞和浆细胞样树突细胞均呈负相关。相关研究结果表明,*CCDC88B* 在肾脏中呈特异性表达,在骨髓、淋巴结和胸腺等免疫器官中也有所表达,*CCDC88B* 基因缺失对 T 细胞功能具有多方面影响,如体内成熟受损和细胞因子产生受抑制等<sup>[18]</sup>。因此,枢纽基因对 COVID-19 和 AKI 中免疫微环境的作用仍需深入研究。

本研究结果也存在一定局限性。首先,本研究基于单一的公共数据集进行分析,未在细胞或动物模型进行验证;其次,对于新发现的分子,需进行临床样本验证以增强结果的可靠性;最后,所筛选出的关键基因对疾病分子机制的具体影响尚需深入探讨。

综上所述,本研究中通过生物信息学方法对 SARS-CoV-2 感染所致 COVID-19 患者和 AKI 患者的基因表达数据进行分析,筛选出 8 种共有的枢纽基因。这些基因对于 COVID-19 和 AKI 具有优越的诊断价

值,且与多种功能通路和免疫反应密切相关,提示其可能是 COVID-19 患者并发 AKI 的关键基因。

## 参 考 文 献

- [1] Shereen MA, Khan S, Kazmi A, et al. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses [J]. J Adv Res, 2020, 24: 91-98.
- [2] Davis He, Mccorkell l, vogel JM, et al. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations [J]. Nat Rev Microbiol, 2023, 21 (3): 133-146.
- [3] Chan L, Chaudhary K, Saha A, et al. AKI in Hospitalized Patients with COVID-19 [J]. J Am Soc Nephrol, 2021, 32 (1): 151-160.
- [4] Nlandu Y, Tannor EK, Bafemika T, et al. Kidney damage associated with COVID-19: from the acute to the chronic phase [J]. Ren Fail, 2024, 46 (1): 2316885.
- [5] Silva AVBD, Campanati JAG, Barcelos IS, et al. COVID and acute kidney injury-direct and indirect pathophysiological mechanisms underlying lesion development [J]. An Acad Bras Cienc, 2022, 94 ( suppl 3 ): e20211501.
- [6] Armaly Z, Kinaneh S, Skorecki K. Renal manifestations of covid-19: physiology and pathophysiology [J]. J Clin Med, 2021, 10 (6): 1216.
- [7] Huang TC, Liang KH, Chang TJ, et al. Structure-based approaches against COVID-19 [J]. J Chin Med Assoc, 2024, 87 (2): 139-141.
- [8] Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, et al. Severe COVID-19 is marked by a dysregulated myeloid cell compartment [J]. Cell, 2020, 182 (6): 1419-1440, e23.
- [9] Georg P, Astaburuaga-García R, Bonaguro L, et al. Complement activation induces excessive T cell cytotoxicity in severe COVID-19 [J]. Cell, 2022, 185 (3): 493-512, e25.
- [10] Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15 (2): 108-121.
- [11] Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, et al. The Human Transcription Factors [J]. Cell, 2018, 172 (4): 650-665.
- [12] Cui Y, Qi Y, Ding L, et al. miRNA dosage control in development and human disease [J]. Trends Cell Biol, 2024, 34 (1): 31-47.
- [13] Śliwińska-Mossoń M, Wadowska K, Trembecki L, et al. Markers Useful in Monitoring Radiation-Induced Lung Injury in Lung Cancer Patients: A Review [J]. J Pers Med, 2020, 10 (3): 72.
- [14] Sabbatinelli J, Giuliani A, Maticchione G, et al. Decreased serum levels of the inflammaging marker miR-146a are associated with clinical non-response to tocilizumab in COVID-19 patients [J]. Mech Ageing Dev, 2021, 193, 111413.
- [15] Pan W, Zhang J, Hu L, et al. Evaluation Value of Serum miR-4299 and miR-16-5p in Risk Stratification of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury [J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 5165892.
- [16] Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019 [J]. J Clin Invest, 2020, 130 (5): 2620-2629.
- [17] Qi F, Qian S, Zhang S, et al. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 526 (1): 135-140.
- [18] Kennedy JM, Fodil N, Torre S, et al. CCDC88B is a novel regulator of maturation and effector functions of T cells during pathological inflammation [J]. J Exp Med, 2014, 211 (13): 2519-2535.

(收稿日期: 2024-03-12)

(本文编辑: 余晓曼)