

• 数据挖掘与循证医学 •

流感病毒性肺炎线粒体相关生物标志物识别及银翘败毒散潜在作用机制

吴贞琳¹, 吴煜佳¹, 张悦瑶¹, 冯文文¹, 刘金元², 徐培平^{1*}

1. 广州中医药大学 科技创新中心, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510405

摘要: **目的** 鉴定识别流感病毒性肺炎 (influenza virus pneumonia, IVP) 线粒体相关生物标志物及银翘败毒散 (Yinqiao Anti-infective Powder, YQAIP) 潜在治疗 IVP 的作用机制。**方法** 使用机器学习算法 [随机森林 (random forest, RF) 模型、支持向量机 (support vector machines, SVM)、分布式梯度增强模型 (eXtreme gradient boosting, XGBoost)、广义线性模型 (generalized linear model, GLM)] 分析 IVP 小鼠的 4 个基因表达数据集 (GSE63786、GSE37572、GSE43302 和 GSE97555), 以识别 IVP 和线粒体相关的生物标志物。从 TCMSP、PubMed、中国知网数据库获取银翘败毒散化学成分。通过分子对接研究 IVP 相关线粒体基因与 YQAIP 化学成分的相互作用。将 BALB/c 小鼠随机分为对照组, 模型组, YQAIP 低、中、高剂量 (相当于生药 15、30、60 g/kg) 组和奥司他韦组, 除对照组外, 流感病毒感染小鼠, 采用 HE 染色观察 IVP 小鼠病理的变化和生存情况, 检测各组小鼠的肺指数、炎症因子水平、病毒载量以及线粒体关键基因的 mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 7 个线粒体相关基因 (*Lactb*、*Cmpk2*、*Pnpt1*、*Mthfd2*、*Mrpl21*、*Mrpl45* 和 *Timm23*) 被鉴定为与流感病毒感染相关的生物标志物。YQAIP 的 1093 种生物活性成分对生物标志物 *Lactb*、*Pnpt1* 和 *Mthfd2* 表现出较强的结合亲和力 (≤ -5.0 kcal/mol)。YQAIP 能有效改善 IVP 小鼠肺组织的炎症病理变化, 延长存活时间, 降低肺指数、肺组织炎症因子水平及病毒载量, 抑制线粒体关键基因 *Pnpt1*、*Mthfd2*、*Lactb* 的表达。**结论** 7 个线粒体相关基因 *Lactb*、*Cmpk2*、*Pnpt1*、*Mthfd2*、*Mrpl21*、*Mrpl45* 和 *Timm23* 可作为治疗 IVP 的潜在靶点。通过靶向线粒体基因可能是 YQAIP 治疗 IVP 的潜在作用机制之一。

关键词: 银翘败毒散; 流感病毒性肺炎; 线粒体基因; 生物标志物; 机器学习

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)03-0882-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.03.019

Identification of mitochondria-related biomarkers in influenza viral pneumonia and potential mechanism of Yinqiao Anti-infective Powder

WU Zhenlin¹, WU Yujia¹, ZHANG Yueyao¹, FENG Wenwen¹, LIU Jinyuan², XU Peiping¹

1. Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Basic Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

Abstract: Objective To identify mitochondrial related biomarkers of influenza virus pneumonia and potential therapeutic mechanisms of Yinqiao Anti-infective Powder (银翘败毒散, YQAIP). **Methods** Four gene expression datasets from IVP mice (GSE63786, GSE37572, GSE43302, and GSE97555) were analyzed by using machine learning algorithms [random forest (RF) model, support vector machines (SVM), eXtreme gradient boosting (XGBoost), generalized linear model (GLM)] to identify IVP and mitochondria-related biomarkers. YQAIP active components were acquired from TCMSP database, PubMed, CNKI and other databases. Conducted molecular docking to study the interaction between IVP-related mitochondria genes and bioactive ingredients of YQAIP. The mice were randomly divided into control group, model group, YQAIP low, medium, and high doses (15, 30, 60 g raw medicinal herbs/kg) group, and oseltamivir group. The lung index and survival protection experiments were conducted on influenza virus infected mice, and the HE pathology, lung index, survival status, inflammatory factor levels, viral load, and the expression levels of key mitochondrial genes were examined in IVP

收稿日期: 2023-10-11

基金项目: 国家自然科学基金“中医药防治病毒性肺炎基础研究”专项 (No.82141208)

作者简介: 吴贞琳, 女, 硕士研究生, 研究方向为病毒性疾病中医药防治。E-mail: 1053619512@qq.com

*通信作者: 徐培平, 男, 研究员, 研究方向为病毒性疾病中医药防治研究。E-mail: xupeiping@gzucm.edu.cn

mice. **Results** Seven mitochondria-related genes (*Lactb*, *Cmpk2*, *Pnpt1*, *Mthfd2*, *Mrpl21*, *Mrpl45*, and *Timm23*) were identified as biomarkers associated with IVP infection. A total of 1 093 bioactive ingredients of YQAIP showed strong binding affinity (≤ -5.0 kcal/mol) to biomarkers *Lactb*, *Pnpt1*, and *Mthfd2*. YQAIP can effectively improve the inflammatory and pathological changes in the lung tissue of IVP mice, prolong survival time, inhibit lung index and pneumonia factor levels, reduce lung viral load, and inhibit the expression of key mitochondrial genes *Pnpt1*, *Mthfd2*, and *Lactb*. **Conclusion** Seven mitochondria-related genes (*Lactb*, *Cmpk2*, *Pnpt1*, *Mthfd2*, *Mrpl21*, *Mrpl45*, and *Timm23*) can be used as therapeutic potential targets for IVP. YQAIP may be effective treatments for IVP by targeting mitochondrial genes.

Key words: Yingqiao Anti-infective Powder; influenza viral pneumonia; mitochondrial gene; biomarker; machine learning

流感病毒性肺炎 (influenza viral pneumonia, IVP) 是一种由甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 感染引起的肺部炎症, 会导致肺部通气功能障碍, 并具有较高的感染率和死亡率^[1]。IVP 的治疗策略侧重于症状的缓解 (如使用糖皮质激素) 和抗病毒治疗 (如使用奥司他韦)^[2]。由于 IAV 表现出抗原漂移和抗原转化病毒的持续变异, 导致对抗病毒药物的耐药性和严重的药物不良反应^[3]。而中医药已被广泛用于治疗 IVP^[4]。

银翘败毒散 (Yingqiao Anti-infective Powder, YQAIP) 是一种中药复方, 由银翘散、麻杏石甘汤、荆防败毒散、柴葛解毒汤、白虎汤 5 个经典方加减而成, 组成中药有 19 种: 白芍、薄荷、苍术、柴胡、川芎、防风、茯苓、葛根、广藿香、金银花、荆芥、桔梗、连翘、麻黄、羌活、升麻、前胡、知母、生石膏。银翘败毒散在临床上用于治疗上呼吸道感染和病毒性肺炎^[5-8], 其组方已获得国家发明专利 (专利号: ZL2019111180871), 但其治疗 IVP 的作用机制尚未阐明。

线粒体是细胞有氧呼吸的部位^[9]。线粒体不仅为细胞提供能量, 还参与细胞分化、细胞信号传导、细胞凋亡以及细胞生长和细胞周期的控制^[10]。特别是, 线粒体在控制炎症中发挥着重要作用, 是炎症的关键调节因子, 线粒体 DNA 在触发先天免疫反应中作用显著^[11]。研究表明, 线粒体功能障碍与流感病毒相关疾病密切相关。IAV 聚合酶碱性蛋白 2 (polymerase basic protein 2, PB2) 蛋白位于线粒体中, 通过与线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondrial antiviral-signalling protein, MAVS) 的相互作用参与先天免疫途径的调节^[12-13]。IAV PB1 编码的辅助蛋白 F2 (PB1-F2) 可以通过线粒体外膜易位酶 40 (translocase of outer mitochondrial membrane 40, Tom40) 通道转运到线粒体中, 以抑制视黄酸 (维甲酸) 诱导基因蛋白 I (retinoic acid induces gene protein I, RIG-I) 信号通路和核苷酸

结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体的激活^[14]。然而, 该领域仍存在一些悬而未决的问题, 如线粒体相关基因在 IVP 病理中的关键作用, 以及线粒体触发复杂和破坏性炎症反应过程的成分和功能的鉴定。

生物信息学是一门利用生物学、计算机科学和信息技术来分析生物测序数据集以帮助解决生物问题的学科。测序技术的显著进步使生物信息学在许多领域应用于药物靶点的识别和验证成为可能^[15]。通过生物信息学技术识别疾病中潜在的生物标志物可以帮助医生预测疾病预后和对治疗的反应^[16-17]。例如, 差异基因表达分析^[15]和机器学习算法 [如随机森林 (random forest, RF) 模型、支持向量机 (support vector machines, SVM) 模型和拉索回归 (least absolute shrinkage and selection operator, LASSO) 分析] 用于分析病理过程和相关特征基因, 以识别潜在的生物标志物^[18]。

本研究使用 4 个 IVP 相关的基因表达数据集 (GSE63786、GSE37572、GSE43302、GSE97555), 并使用机器学习算法分析线粒体基因表达数据, 鉴定识别与 IVP 和线粒体相关的关键基因。通过计算机分子对接模拟分析银翘败毒散中 1 831 种活性成分与关键基因的结合作用, 并进行银翘败毒散体内抗 IVP 作用及对相关线粒体关键基因的影响研究, 探讨银翘败毒散治疗 IVP 可能的线粒体相关机制。

1 材料与仪器

1.1 药物

银翘败毒散由 19 味中药组成: 白芍 10 g、薄荷 5 g、苍术 10 g、柴胡 10 g、川芎 10 g、防风 10 g、茯苓 15 g、葛根 15 g、广藿香 10 g、金银花 15 g、荆芥 10 g、桔梗 10 g、连翘 15 g、麻黄 10 g、前胡 10 g、羌活 10 g、升麻 10 g、知母 10 g, 生石膏 30 g, 所有药材饮片均购自广州中医药大学附属第一医

院中药房，由药学室胡英杰研究员鉴定，见表 1。将银翘败毒散的组成中药饮片放入 1 000 mL 烧杯中，加入纯水至药物表面上方约 5 cm 处，在水中浸泡 30 min，用大火（240 ℃左右）煮沸，并在小火（60 ℃左右）下保持沸腾 30 min。收集药液，继续

加入适量纯水煮沸 15 min，合并 2 次煮沸的溶液，过滤浓缩至 300 mL（药物质量浓度 0.7 g/mL），4 ℃保存备用。利巴韦林购自浙江瑞新药业股份有限公司（批号 20230206）；奥司他韦胶囊购自罗氏制药有限公司（批号 M1050）。

表 1 银翘败毒散组成中药的基原及其活性成分数量
Table 1 Origin and active ingredients quantity of traditional Chinese medicine composed of YQAIP

中药	基原	活性成分数量	中药	基原	活性成分数量
白芍	芍药 <i>Paeonia lactiflora</i> Pall. 的根	173	荆芥	荆芥 <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq. 的地上部分	145
薄荷	薄荷 <i>Mentha haplocalyx</i> Briq. 的茎叶部分	164	桔梗	桔梗 <i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC. 的根	102
苍术	茅苍术 <i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC. 的根茎	48	连翘	连翘 <i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl 的果实	149
柴胡	柴胡 <i>Bupleurum chinense</i> DC. 的根	346	麻黄	麻黄 <i>Ephedra sinica</i> Stapf 草质茎	321
川芎	川芎 <i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort. 的根茎	171	前胡	白花前胡 <i>Peucedanum praeruptorum</i> Dunn 的根	100
防风	防风 <i>Saposhnikovia divaricate</i> (Turcz.) Schischk. 的根	151	羌活	羌活 <i>Notopterygium incisum</i> Ting ex H. T. Chang 的根茎	180
茯苓	真菌茯苓 <i>Poria cocos</i> (Schw.) Wolf 的菌核	33	升麻	升麻 <i>Cimicifuga foetida</i> L. 的根茎	179
葛根	野葛 <i>Pueraria lobate</i> (Willd.) Ohwid 的根	18	知母	知母 <i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bge. 的根茎	79
广藿香	广藿香 <i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth. 的地上部分	89	生石膏	硫酸盐类矿物质，硫酸钙（CaSO ₄ ·2H ₂ O）含量 96.0%	1
金银花	忍冬 <i>Lonicera japonica</i> Thunb. 的花蕾	236			

1.2 试剂、病毒和动物

放射免疫沉淀缓冲液（RIPA，中国 Exon 生物技术公司）；抗 Pnpt1（批号 37838）、抗 Mthfd2（批号 27411-1）抗体均购自美国 Signalway Antibody LLC.；抗 Lactb 抗体（批号 A13145-1）购自中国博斯特生物科技有限公司；抗磷酸甘油醛脱氢酶（reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（批号 KC-5G4，中国康辰生物技术公司）。聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜（美国 Millipore Corporation）。甲型流感病毒（A/FM/1/47H1N1，FM1）由中国疾病预防控制中心捐赠，通过在 9 d 大的鸡胚中传代 48 h，用 Reed-Muench 法测定小鼠 FM1 半数致死剂量（LD₅₀）=1×10^{-3.6}。病毒在使用前储存于-80 ℃冰箱中。雌性 BALB/c 小鼠，SPF 级，体质量 13~15 g，购自广东省医学实验中心（质量合格证号 440072000122745）。动物实验符合《广东省实验动物管理条例》，并经广州中医药大学动物福利委员会批准（批准文号 20230328002）。

1.3 仪器

ELx800 酶联检测仪（美国 Bio-Tek 公司）；肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）和γ干扰素

（interferon-γ，IFN-γ）检测试剂盒（上海酶联生物技术有限公司）；PrimeScriptTM 第 1 链 cDNA 合成试剂盒（日本 Takara 公司）；化学发光检测试剂盒（天津冠桥医疗器械有限公司）。

1.4 生物信息学研究材料

芯片数据集从基因表达综合数据库（Gene Expression Omnibus，GEO）数据库（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>）下载。机器学习算法采用相关 R 包（R=4.03）。银翘败毒散药物成分及结构来自中医药整合药理学网络计算研究平台（TCMIP，<http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/home/login/login.html>）和 PubChem 数据库（<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>）；Pymol 2.3 软件；Autodock vina 1.1 软件。线粒体基因数据库（MitoCarta 3.0 database，<https://www.broadinstitute.org/mitocarta/mitocarta30-inventory-mammalian-mitochondrial-proteins-and-pathways>）。蛋白配体相互作用分析软件 Ligplot+v2.2。蛋白质结构数据库（PDB，<https://www.rcsb.org/>）。分子对接软件 AutoDock Vina 1.0。

2 方法

2.1 线粒体基因集下载

从 MitoCarta 3.0 数据库中收集了 1 140 只小鼠的线粒体相关基因^[19]。该数据库包括 149 个线粒体

功能术语,如线粒体凋亡、线粒体自噬、线粒体免疫、线粒体氧化应激、线粒体电子转移、线粒体铜代谢等。

2.2 通过机器学习算法筛选 IVP 潜在的线粒体相关标志物

从 GEO 数据库中获得 4 个 IVP 相关基因表达谱数据集 (GSE63786、GSE37572、GSE43302、GSE97555)。GSE63786 作为分析的测试集, GSE37572、GSE43302 和 GSE97555 作为验证集。数据集使用 R 包“sva”和“limma”进行标准化。使用 R 软件包“limma”分析组间差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) [$|\log_2\text{fold change (FC)}| = 0.5, P < 0.05$]。

4 种机器学习算法 [RF、支持向量机 (support vector machines, SVM)、分布式梯度增强模型 (eXtreme gradient boosting, XGBoost)、广义线性模型 (generalize linear model, GLM)] 基于 GSE63786 数据集进行分析。使用“DALEX”R 包的解释函数来分析上述 4 个模型,绘制残差的分布图,并基于测试集提取最佳模型。分析每个变量的显著性,并选择每个模型的前 10 个最重要的解释变量进行进一步研究^[20]。使用“root-mean-square”方法建立预测 IVP 发生的列线图模型。通过决策曲线分析评价模型的诊断价值。在外部芯片验证集 (GSE37572、GSE43302 和 GSE97555) 中验证。同时,使用“pROC”R 软件包对 top 10 基因进行评估。

2.3 分子对接分析

从 TCMSP (<https://www.tcmsp-e.com/>)、PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)、中国知网 (<https://www.cnki.net/>) 数据库搜索银翘败毒散组成药物的活性成分^[21]。3 种主要的线粒体晶体结构蛋白已被确定为潜在的药物靶点,从 PDB 数据库下载其蛋白质的 3D 结构 (PDB 格式)。利用 AutoDock Vina 软件进行分子对接模拟^[22]。蛋白质晶体结构包括 β -内酰胺酶状丝氨酸蛋白酶 (serine beta-lactamase-like protein, Lactb, PDB: 7V1Y; 以 13.91、10.98、15.60 nm 为中心的对接盒子)、多核苷酸磷酸化酶 1 (polynucleotide phosphorylase 1, Pnpt1; PDB: 3U1K; 以 0.526 1、-2.225 5、-0.401 0 nm 为中心的对接盒子) 和亚甲基四氢叶酸脱氢酶 2 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2, Mthfd2, PDB: 6S4E; 以 9.857 5、1.939 9、0.186 0 nm 为中心的对接盒子)。使用 AutoDockTools (v1.5.6) 制备

蛋白质和分子。使用 PyMOL (v2.3) 软件构建分子图谱^[23]。使用 Ligplot+v2.2 分析蛋白质与配体的相互作用^[24]。

2.4 动物实验分组及给药

将小鼠随机分为对照组、模型组、银翘败毒散组、奥司他韦组 (10 mg/kg), 每组 10 只。经过急毒实验, 获得小鼠对银翘败毒散的最大耐受剂量为 120 g 生药/kg, 按银翘败毒散成人临床剂量为 3 g/(kg·d), 10 倍剂量 (30 g/kg) 设置为小鼠银翘败毒散中剂量, 设置 3 个剂量组即低剂量 (15 g/kg)、中剂量 (30 g/kg)、高剂量 (60 g/kg)。对照组和模型组小鼠 ig 蒸馏水, 给药体积 20 mL/kg。

2.5 肺指数的测定

除对照组外, 其他各组小鼠麻醉后滴鼻感染流感病毒 A/FM/1/47 (FM1, H1N1) 15LD₅₀ 的剂量。感染 4 h 后, 各组小鼠开始 ig 给药, 每天 1 次, 持续 4 d, 并在感染后第 5 天断颈处死小鼠, 并收集肺样本进行相关检测。测量小鼠体质量和肺质量, 计算肺指数。

肺指数 = 肺质量/体质量

2.6 生存保护实验

除对照组外, 其他各组小鼠麻醉后滴鼻感染流感病毒 A/FM/1/47 (FM1, H1N1) 5LD₅₀ 的剂量。感染 4 h 后, 各组小鼠开始 ig 给药, 每天 1 次, 持续 4 d。观察小鼠死亡情况, 15 d 内存活者以 15 d 计。

2.7 肺组织病理变化的检测

取“2.5”项各组小鼠肺组织, 将肺固定在 10% 福尔马林中, 包埋在石蜡中, 切成 5 μm 的切片, 并用苏木精和伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色。随机选择肺切片区域, 并分别用光学显微镜放大 100 倍。肺组织的病理评分以 0~3 的半定量方式进行分级^[4]。

2.8 肺组织炎症因子的测定

取“2.5”项各组小鼠肺组织按 1:10 比例加入 PBS 缓冲液, 进行无菌研磨。将组织匀浆液 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。通过 Bio-Tek ELx800 酶联检测仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 测定肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IFN- γ 的水平。操作步骤严格按照试剂盒说明书执行。

2.9 实时定量 PCR 测定肺组织相关基因的表达

取“2.5”项各组小鼠肺组织, 使用 Prime ScriptTM 第 1 链 cDNA 合成试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA。病毒载量检测 A/FM/1/47H1N1 的基质基因, 其引物参考 Liao 等^[25]报道。Pnpt1、Lactb、Mthfd2

引物通过 NCBI Primer-BLAST 设计。*Pnpt1* 引物, 正向: 5'-CACTATGGAGTAGCGCAGGG-3', 反向: 5'-CTGCAGTGTACCTGACTGTA-3'; *Lactb* 引物, 正向: 5'-TCCTATGTGAAAAGGAACTAAGAGA-3', 反向: 5'-GAACTCCTCAGTCATTCCTCCT-3'; *Mthfd2* 引物, 正向: 5'-TTATCATAGTGATGGAGAGCAGTT-3', 反向: 5'-GGCCTGTGATCTCTCAGTGT-3'; 内参 β -actin 正向: 5'-ACAGAGCCTCGCC-TTTC-3', 反向: 5'-GATATCATCATCCATGGTGAGCTGG-3'。根据标准化表达模式 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 分析 PCR 产物表达水平。基因相对表达量 (relative expression, RQ) 与对照组结果的标准化为 1。

2.10 Western blotting 分析肺组织线粒体相关蛋白的表达

取“2.5”项各组小鼠肺组织用放射免疫沉淀缓冲液 (RIPA) 均化, 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 样品缓冲液裂解, 煮沸, 离心并收集上清液。4 °C、12 000×g 离心匀浆 5 min。通过 10% SDS-PAGE 分离蛋白质样品 (50 μ g), 并将其转移至 PVDF 膜上。将膜浸泡在甲醇中 1~2 min, 分别加入抗 *Pnpt1* (1:200)、抗 *Lactb* (1:500)、抗 *Mthfd2* (1:300) 和抗 GAPDH (1:5 000) 抗体, 过夜。使用化学发光检测试剂盒进行免疫测定。将相对蛋白质水平标准化为 GAPDH。通过使用凝胶分析软件 (GelPro5.0, Media Cybernetics, Bethesda, 美国) 计算每个区域的平均光密度来进行量化。

2.11 统计分析

使用统计软件 PASW (版本 18.0: IBM SPSS, 美国) 进行统计分析。使用 Wilcoxon 检验对各组之间基因表达水平的差异进行统计分析。使用单因素方差分析 (ANOVA) 进行多组比较, 进行 LSD 检验以确定组间的差异。GraphPad Prism 软件 (版本 5.0) 用于绘图。

3 结果

3.1 基于机器学习算法的线粒体关键基因识别与验证

测试集 (GSE63786) 中包含 36 个 IVP 和 42 个对照小鼠肺组织的 mRNA 表达谱。按照 $P_{adj} < 0.05$ 和 $|\log_2 FC| > 0.5$ 标准筛选对照组和 IVP 组之间的 DEGs 与线粒体的相关基因。在对 IVP 的线粒体基因和 DEGs 进行联合分析后, 筛选出 190 个基因作

为 IVP 中的线粒体相关差异基因 (mitochondria-related differentially genes, MRDGs), 其中 125 个下调基因和 65 个上调基因 (图 1)。

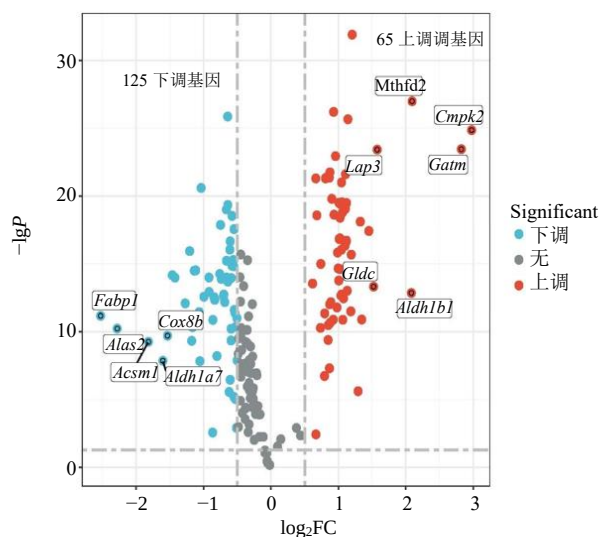
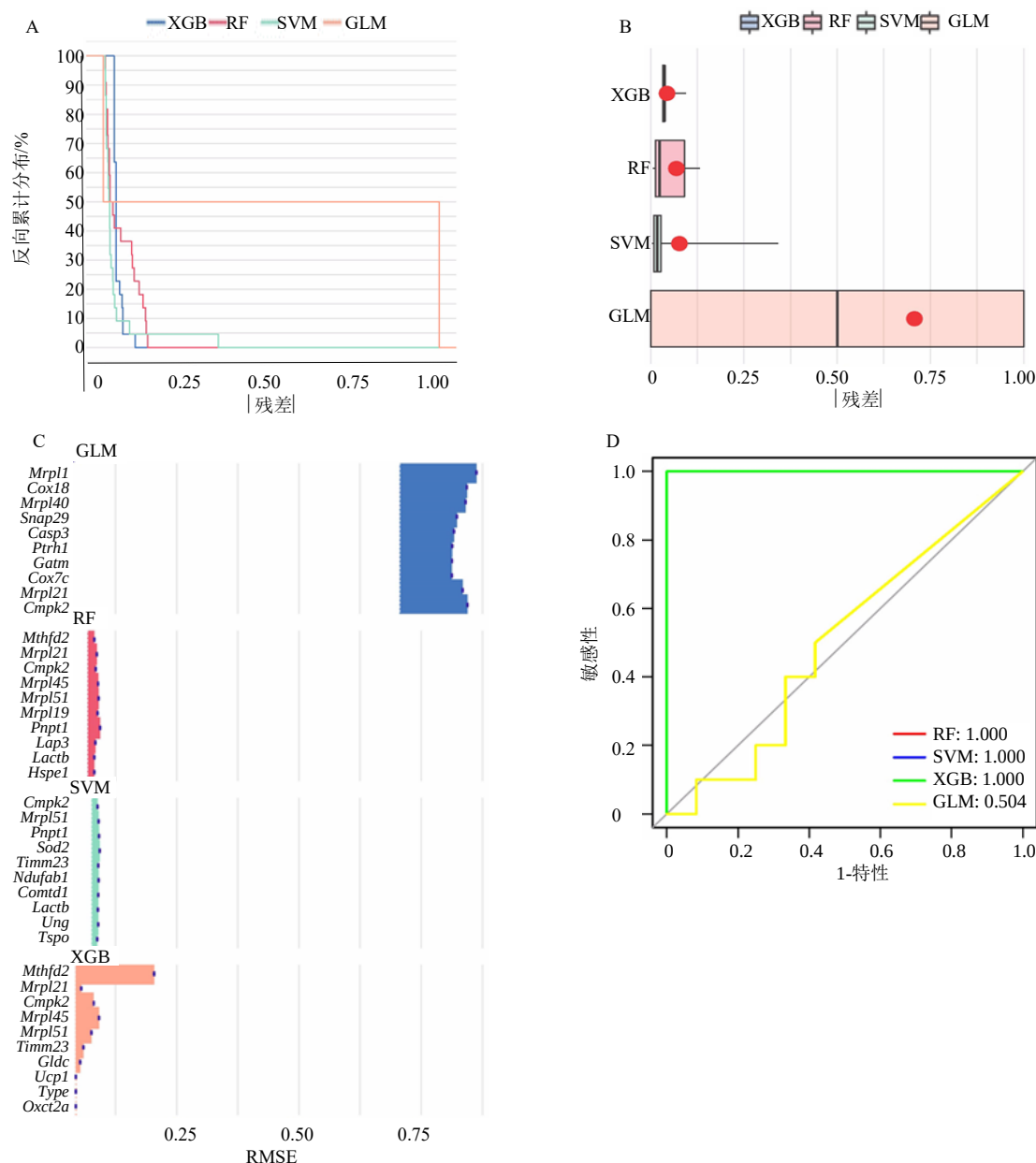


图 1 线粒体相关差异基因火山图

Fig. 1 Volcano plot of mitochondrial related differentially expressed genes

为了进一步缩小线粒体关键基因的范围, 建立了 4 个基于机器学习算法的模型。选择 190 个 MRDGs 作为构建机器学习模型的候选基因。在 GSE63786 数据集上进行 RF、SVM、XGB 和 GLM 模型分析。如图 2 所示, GLM 模型被确定为最差的模型, 因为其具有很大的样本残差 (图 2-A、B), 并且曲线下面积 (area under curve, AUC) 值小于 0.7 (图 2-D)。SVM 模型被认为是最好的模型, 因为其具有最小的样本残差, AUC 值为 1.000 (图 2-D)。最后从 RF、SVM 和 XGB 模型中选择 30 个最重要基因在验证集中进一步分析 (图 2-C)。在验证集中, 发现 IVP 组中只有 *Lactb*、胞苷单磷酸激酶 2 (cytidine monophosphate kinase 2, *Cmpk2*)、*Pnpt1*、*Mthfd2*、线粒体核糖体蛋白 21 (mitochondrial ribosomal protein 21, *Mrpl21*)、*Mrpl45* 和线粒体内膜翻译酶 23 (translatase of inner mitochondrial membrane 23, *Timm23*) 表达水平增加, 与对照组相比差异具有统计学意义 (图 3-A~C)。随后进行接受者操作特性曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 分析, 以确认上述 7 个关键基因的诊断意义 (图 3-D~F)。ROC 值通常在 0.5~1.0。该值越接近 1, 模型估计越准确。在验证集中, 有 3 个关键基因的 AUC 值均大于 0.9, ROC 值范围为



A: 样本的累积残差分布图; B: 样本残差的箱形图 (红点代表残差的均方根); C: 在 RF、GLM 和 SVM 模型中, 根据排列后均方根误差 (RMSE) 损失的变量重要性; D: RF、GLM 和 SVM 模型的 ROC 曲线。

A: Cumulative residual distribution plot of the sample; B: Box plot of sample residuals (red dots represent the root mean square of residuals); C: In RF, GLM, and SVM models, the importance of variables lost based on the root mean square error (RMSE) after permutation; D: ROC curves of RF, GLM, and SVM models.

图 2 机器学习模型的构建和评估

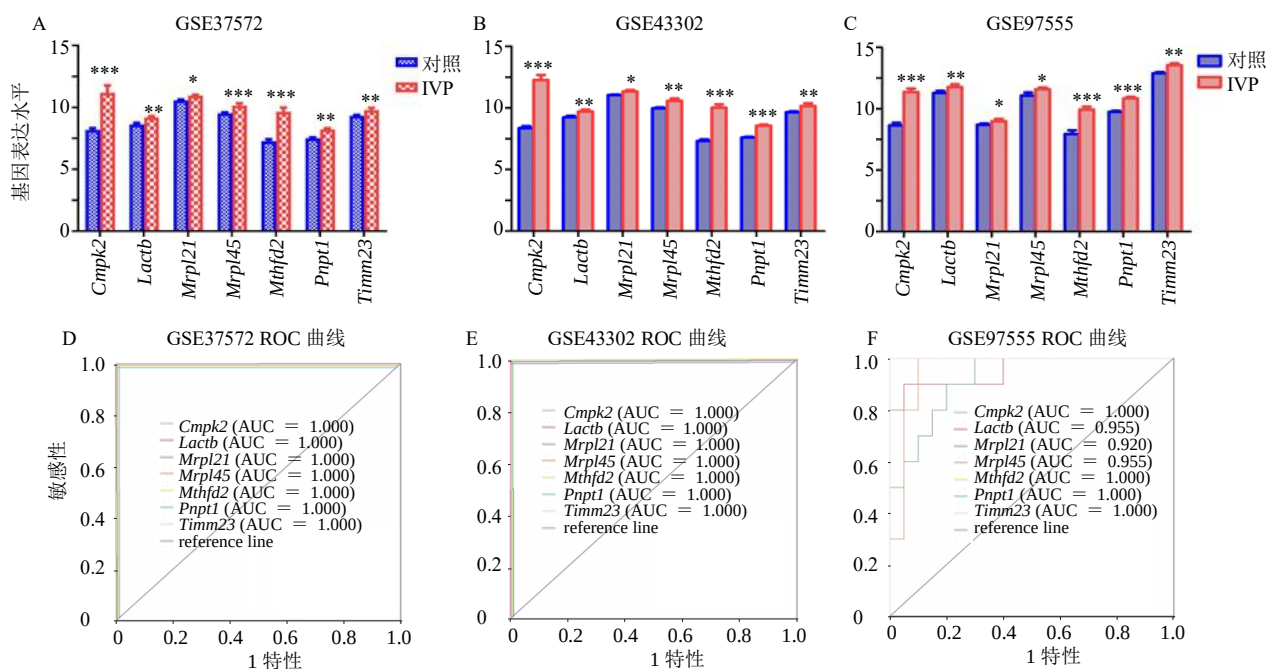
Fig. 2 Construction and evaluation of machine learning models

0.920~1.000 (图 3-D~F)。结果表明, 在 3 个验证数据集中, 这 7 个关键基因的预测精度非常高。

3.2 预测银翘败毒散治疗 IVP 可能的线粒体潜在机制

通过检索 TCMSP、PubMed、中国知网等数据库, 从银翘败毒散中共筛选出 1 831 种活性成分 (表 1)。利用分子对接分析, 基于 7 种 IVP 相关的线粒

体生物标志物来预测银翘败毒散治疗 IVP 潜在机制。选择了 3 种具有 3D 蛋白质晶体结构的蛋白质 (Lactb、Pnpt1 和 Mthfd2) 进行分子对接分析, 并计算银翘败毒散活性成分与 3 种潜在靶蛋白的结合能。1 093 个银翘败毒散生物活性成分对关键基因 *Lactb*、*Pnpt1* 和 *Mthfd2* 具有良好的结合亲和力 (<-5.0 kcal/mol, 1 kcal=4.2 kJ)。表 2 列举了具有



A~C: 通过 Wilcoxon 试验方法, 3 个验证集中 IVP 组和对照组之间 7 个关键基因的差异表达; D~F: 验证集中 *Lactb*、*Cmpk2*、*Pnpt1*、*Mthfd2*、*Mrpl21*、*Mrpl45* 和 *Timm23* 基因的 ROC 曲线; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A~C: Using the Wilcoxon test method, differential expression of seven key genes was observed between the IVP group and the control group in three validation sets; D~F: Verify the ROC curves of *Lactb*, *Cmpk2*, *Pnpt1*, *Mthfd2*, *Mrpl21*, *Mrpl45*, and *Timm23* genes in the validation set; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 3 验证集 GSE37572、GSE43302 和 GSE97555 中关键基因诊断价值的鉴定和验证

Fig. 3 Identification and validation of diagnostic value of key genes in validation sets GSE37572, GSE43302 and GSE97555

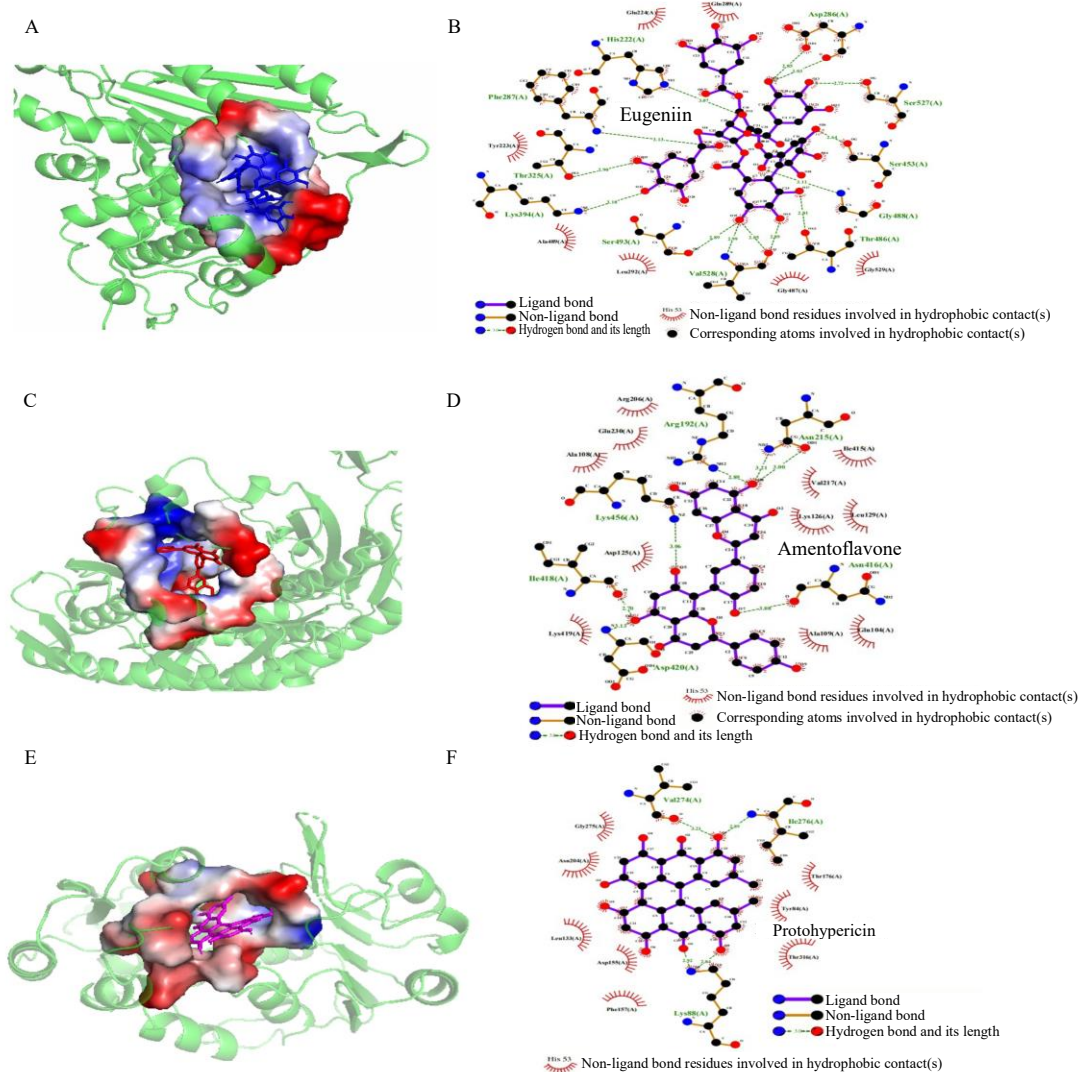
表 2 银翘败毒散活性成分与 3 种线粒体关键基因分子对接情况 (结合能 $\leq -9.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Table 2 Docking status of active ingredients in YQAIP with three key genes of mitochondria (binding energy $\leq -9.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)

活性成分	来源	分子式	基因	结合能/ ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)	活性成分	来源	分子式	基因	结合能/ ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)
原金丝桃素 (protophyerpericin)	连翘	C ₃₀ H ₁₈ O ₈	<i>Mthfd2</i>	-10.4	丁子芽鞣素	白芍	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₆	<i>Lactb</i>	-9.8
没食子鞣质 (gallotannin)	白芍	C ₁₀₁ H ₆₀ O ₅₀		-10.3	黄桔梗苷 (flavoplatycoside)	桔梗	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆		-9.7
长梗马铃素 (pedunculagin)	白芍	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂		-10.2	桔梗皂苷 D2 (polygalacin D2)	桔梗	C ₆₃ H ₁₀₂ O ₃₂		-9.5
丁子芽鞣素 (eugeniin)	白芍	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₆		-10.1	穗花杉双黄酮 (amentoflavone)	金银花	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	<i>Pnpt1</i>	-11.4
鞣酸 (glycerite)	白芍	C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆		-10.0	没食子鞣质	白芍	C ₁₀₁ H ₆₀ O ₅₀		-10.6
新西米苷 (neocimisine)	升麻	C ₃₂ H ₄₈ O ₉		-9.9	丁子芽鞣素	白芍	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₆		-10.5
马尔可皂苷元 (markogenin)	知母	C ₂₇ H ₄₄ O ₄		-9.8	金银花双黄酮 (ochnaflavone)	金银花	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀		-10.5
荷包牡丹碱 (bicuculline)	白芍	C ₂₀ H ₁₇ NO ₆		-9.8	连翘种苷 A	连翘	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅		-10.5
原花青素 (procyanidin)	白芍	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃		-9.7	桔梗皂苷 D	桔梗	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₇		-10.4
蒙花苷 (linarin)	广藿香	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄		-9.7	金丝桃素 (hypericin)	连翘	C ₃₀ H ₁₆ O ₈		-9.9
隐黄质 (kryptoxanthin)	金银花	C ₄₀ H ₅₆ O		-9.7	柴胡皂苷 E (saikosaponin E)	柴胡	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₂		-9.8
升麻醇 (acerinol)	升麻	C ₃₀ H ₄₆ O ₅		-9.7	没食子酰白芍苷 (galloylpaconiflorone)	白芍	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅		-9.7
连翘种苷 A (suspensaside A)	连翘	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅		-9.5	连翘酯苷 F (forsythoside F)	连翘	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉		-9.6
丝兰皂苷元酮 (smilagenone)	知母	C ₂₇ H ₄₂ O ₃		-9.5	连翘酯苷 B	连翘	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉		-9.5

最高结合能 (≤ -9.0 kcal/mol) 的小分子化合物, 它们对 *Lactb*、*Pnpt1* 和 *Mthfd2* 表现出较高的结合亲和力, 这些可能是潜在的 IVP 抑制剂。根据文献报道, 化合物的结合自由能大于 -5.5 kcal/mol, 表明该化合物处于非活性状态^[26]。*Lactb*-eugenin、*Pnpt1*-穗花杉双黄酮和 *Mthfd2*-原金丝桃素复合物的结合能分别是 -9.8 、 -11.4 和 -10.4 kcal/mol。3 个关键靶标和药物的最佳结合模式 (最佳结合能) 如图 4 所示。Eugenin 和 *Lactb* 催化结合位点的结合模式分析结

果表明, 其残基 Asp286、Thr486、Gly488、Phe287、Ser527、Lys394、Val528、Ser493、Thr325、His222 和 Ser453 参与了氢键相互作用并贡献了 14 个氢键 (图 4-A、B)。穗花杉双黄酮与 *Pnpt1* 的结合模式表明, Ile418、Lys456、Arg192、Asn215、Asn416 和 Asp420 6 个氨基酸残基参与了 7 个氢键的形成 (图 4-C、D)。原金丝桃素和 *Mthfd2* 之间的相互作用表明, 残基 Lys88、Val274 和 Ile276 与原金丝桃碱处于氢键接触, 并且它们共享 4 个氢键 (图 4-E、F)。



A: eugenin 与 *Lactb* 的结合模式 (PDB ID: 7v1y); B: *Lactb* 与 eugenin 的相互作用; C: amentoflavone 与 *Pnpt1* (PDB ID: 3u1k) 的结合模式; D: *Pnpt1* 与 amentoflavone 的相互作用; E: 原金丝桃素与 *Mthfd2* 的结合模式 (PDB ID: 6s4e); F: *Mthfd2* 与原金丝桃素的相互作用; 氢键显示为虚线 (绿色)。

A: Binding mode of eugenin and *Lactb* (PDB ID: 7v1y); B: Interaction between *Lactb* and eugenin; C: Binding mode of amentoflavone with *Pnpt1* (PDB ID: 3u1k); D: Interaction between *Pnpt1* and amentoflavone; E: Binding mode of original hypericin with *Mthfd2* (PDB ID: 6s4e); F: Interaction between *Mthfd2* and proto hypericin; The hydrogen bond is displayed as a dashed line (green).

图 4 *Lactb*、*Mthfd2*、*Pnpt1* 和活性成分之间的相互作用

Fig. 4 Interactions between *Lactb*, *Mthfd2*, *Pnpt1* and active ingredients

3.3 银翘败毒散对 IVP 小鼠肺部损伤的影响

为了评估银翘败毒散对 IVP 小鼠的治疗作用,本研究进行了肺指数和生存保护作用研究。模型组小鼠肺部出现炎症,细支气管和肺间质有中性粒细胞浸润,支气管积液,大面积出血(图 5,红色箭头所示)。相比之下,3 个剂量银翘败毒散给药后,这些病变得到了不同程度的改善(图 5-A、B)。与模型组相比,银翘败毒散中、高剂量组和奥司他韦组小鼠的肺指数及病毒载量显著下降($P < 0.01$ 、 0.001)(图 5-C、D)。生存保护实验表明,银翘败毒散高剂量组小鼠存活率为 50%,中、高剂量组能延长小鼠生存时间,与模型组相比差异显著($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)(图 5-E、F)。结果表明,银翘败毒散可以有效改善 IAV 引起的肺损伤。

3.4 银翘败毒散对 IVP 小鼠肺组织细胞因子产生的影响

流感病毒引起的肺部炎症和随后的急性肺损伤与多种促炎细胞因子的过度分泌密切相关。IL-1 β 、IFN- γ 和 TNF- α 是炎症过程中的关键促炎细胞因子。如图 6 所示,模型组小鼠肺组织 IL-1 β 、IFN- γ 和 TNF- α 水平显著增加;银翘败毒散中、高剂量能显著抑制促炎细胞因子 IL-1 β 、IFN- γ 和 TNF- α 的过度分泌。

3.5 银翘败毒散对 IVP 小鼠肺组织线粒体相关基因表达水平的影响

如图 7 所示,模型组小鼠肺组织 *Lactb*、*Pnpt1* 和 *Mthfd2* mRNA 和蛋白表达水平显著增加,而银翘败毒散高剂量(60 g/kg)可显著抑制 *Lactb*、*Pnpt1* 和 *Mthfd2* mRNA 和蛋白的表达(图 7-A~C)($P < 0.01$ 、 0.001)。

4 讨论

本研究使用 4 种机器学习方法(RF、SVM、GLM 和 XGB)对 GEO 数据库的 4 个小鼠 IVP 数据集鉴定识别了与 IVP 发病相关的线粒体关键基因。共识别出 *Lactb*、*Cmpk2*、*Pnpt1*、*Mthfd2*、*Mrpl21*、*Mrpl45* 和 *Timm23* 7 个关键基因,它们可能在 IVP 的进展中发挥关键作用,并被确定为 IVP 的潜在治疗靶点。

Lactb 是一种参与肽聚糖合成的线粒体膜蛋白^[27]。*Lactb* 可在膜间空间形成纤维状线粒体膜,影响磷脂酰丝氨酸向磷脂酰乙醇胺的转化,并直接或间接调节线粒体磷脂代谢^[28]。*Lactb* 可诱导线粒体 ROS 的产生、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水平增加和线粒体膜电位的降低,导致 DNA

损伤、线粒体功能障碍和/或内质网应激、细胞周期停滞和细胞凋亡^[29]。同时, *Lactb* 诱导核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路促进 NF- κ B 介导的促炎反应^[30]。

Cmpk2 是一种线粒体核苷酸激酶^[31]。*Cmpk2* 依赖性 mtDNA 合成对于暴露于 NLRP3 激活剂后产生氧化的 mtDNA 片段是必要的^[32]。作为一种线粒体蛋白, *Cmpk2* 在登革热病毒(dengue virus, DENV)诱导的线粒体操作中至关重要^[33]。在病毒感染细胞的细胞器中,线粒体是触发抗病毒免疫的关键细胞器,有时可能成为病毒逃避免疫监视的目标^[34]。

Mrp 由 1 个小的 28S 亚基和 1 个大的 39S 亚基组成。部分 *Mrp* 参与多种细胞过程,包括细胞增殖、体外核糖体循环调节和细胞凋亡^[35]。*Mrp* 通过线粒体翻译和有丝分裂核糖体蛋白诱导癌症细胞凋亡和增殖^[36]。病毒是一种特殊的细胞内“寄生虫”,其生存取决于它们在体内复制的能力,病毒与真核细胞周期的所有阶段都相互作用。许多病毒通过与调节细胞周期过程的宿主因子相互作用来促进复制^[37]。

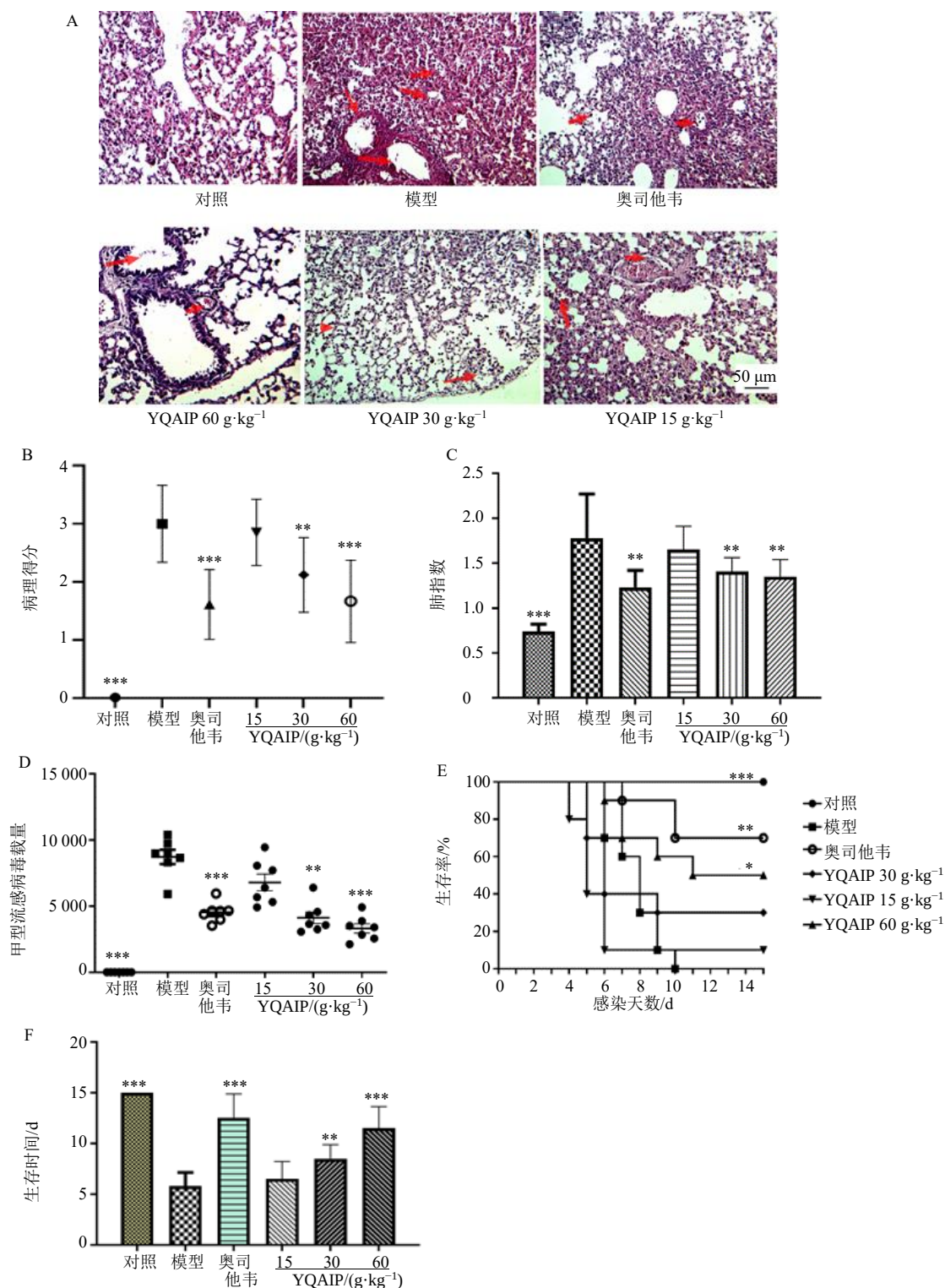
Mthfd2 是一种与叶酸偶联的线粒体代谢酶^[38]。*Mthfd2* 参与叶酸单碳代谢和四氢叶酸辅因子循环,为维持细胞活力和增殖提供重要的前体,可诱导磷脂酰肌醇-3-羟激酶(phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)信号通路的激活,该通路在细胞代谢中起着至关重要的作用^[39]。*Mthfd2* 介导的 Akt 信号转导可以有效调节细胞代谢和信号转导,支持病毒感染细胞的自我更新和增殖。

Timm 基因编码一种伴侣蛋白,属于进化上保守的 *Timm* 家族,其有助于蛋白质从细胞质运输到线粒体^[40]。*Timm23* 可以阻止疏水性前体的聚集,并引导蛋白质通过线粒体膜,这与过氧化物酶体脂质代谢途径有关^[41]。

Pnpt1 是一种 I 型干扰素诱导的核糖核酸外切酶,可介导 mRNA 降解^[42]。*Pnpt1* 的过表达增强了细胞凋亡^[43]。

这 7 个线粒体关键基因均参与了细胞的生长、代谢、增殖、细胞凋亡等环节,与病毒复制与感染等进展密切相关,因此,这 7 个线粒体相关基因可能是 IVP 的关键基因和潜在的治疗靶点。

本研究在体内评估了银翘败毒散对 IVP 的治疗作用及对线粒体关键基因的影响,并使用分子对接技术来筛选和鉴定银翘败毒散作用于线粒体关键基

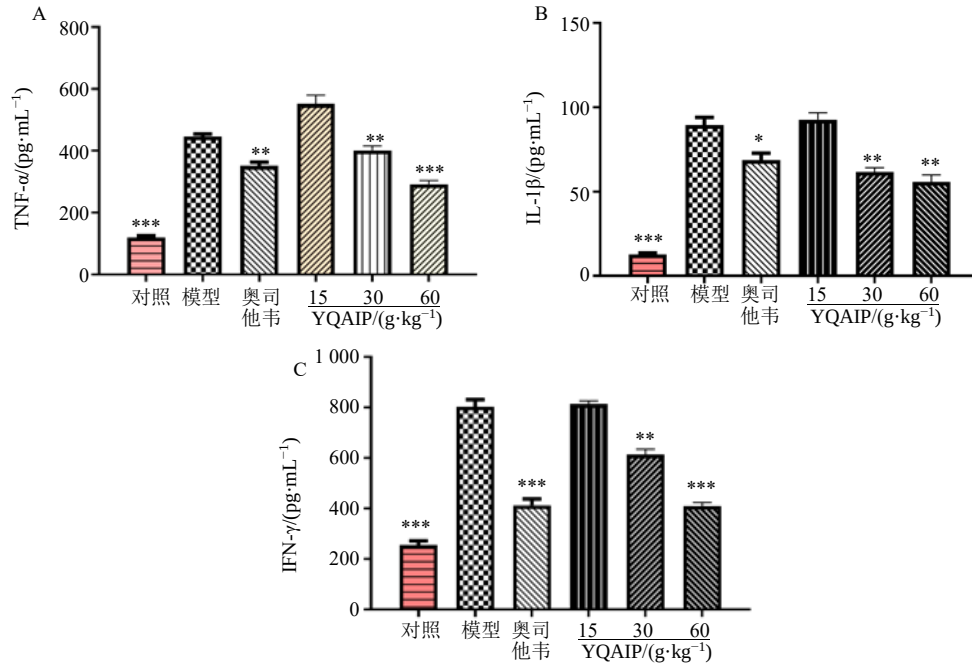


A: HE 染色观察小鼠肺组织的病理变化 ($\times 100$); B: 病理评分; C: 肺指数; D: 病毒载量; E: 存活率; F: 生存时间; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A: HE staining observation of pathological changes in mouse lung tissue ($\times 100$); B: Pathological score; C: Lung index; D: Virus load; E: Survival rate; F: Survival time; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 5 银翘败毒散对 IVP 小鼠肺部损伤的影响 ($n = 10$)

Fig. 5 Effect of Yinqiao Xidu Powder on lung injury of IVP mice ($n = 10$)



与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below.

图 6 银翘败毒散对 IVP 小鼠肺组织 TNF-α (A)、IL-1β (B)、IFN-γ (C) 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 6 Effect of YQAIP on levels of TNF-α (A), IL-1β (B) and IFN-γ (C) in lung tissue of IVP mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

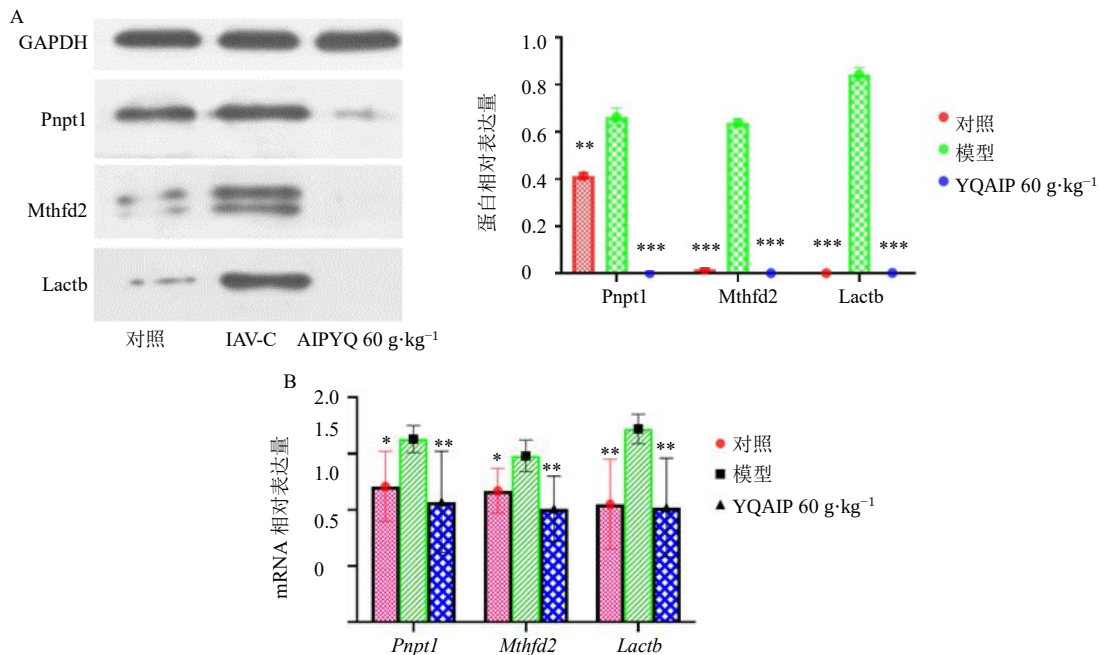


图 7 银翘败毒散对 IVP 小鼠肺组织线粒体相关基因 mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effect of YQAIP on mRNA (A) and protein (B) expression levels of mitochondria-related genes in lung tissue of IVP mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

因的活性成分。结果表明,银翘败毒散对 IAV 引起的病毒性肺炎具有一定的保护作用,能改善 IVP 小

鼠肺组织的炎症反应,降低炎症因子水平。分子对接结果表明,银翘败毒散的活性成分对 3 个线粒体

关键基因 *Lactb*、*Pnpt1* 和 *Mthfd2* 具有中等至较强的结合亲和力 ($-9.5 \sim -10.9$ kcal/mol)。银翘败毒散中的 1 093 种活性成分可以下调这 3 个线粒体关键基因的表达。IVP 小鼠肺组织中 3 个线粒体基因 *Lactb*、*Pnpt1* 和 *Mthfd2* mRNA 和蛋白水平明显上调, 而银翘败毒散能有效降低 3 个线粒体基因表达水平。

5 结论

本研究使用生物信息学和机器学习算法鉴定了 7 种与 IVP 和线粒体相关的生物标志物。通过体内抗病毒实验和分子对接技术研究表明银翘败毒散可能通过丁子芽鞣素、原金丝桃素和穗花杉黄酮等活性成分作用于 *Lactb*、*Pnpt1* 和 *Mthfd2*, 调节炎症反应、细胞凋亡、氧化应激等生物学过程, 并在介导抗 IVP 作用中发挥作用。3 个线粒体关键基因 *Lactb*、*Pnpt1* 和 *Mthfd2* 在 IVP 小鼠肺组织中高表达, 而银翘败毒散则能抑制这种高表达, 这可能是银翘败毒散治疗 IVP 的潜在机制之一。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yang M R, Wang Y, Yue Y M, *et al.* Traditional Chinese medicines as effective agents against influenza virus-induced pneumonia [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113523.
- [2] Wang J N, Wang X, Yu S L, *et al.* A retrospective analysis of three antiviral regimens of peramivir in the treatment of severe influenza A with primary viral pneumonia [J]. *Can Respir J*, 2019, 2019: 3859230.
- [3] Agut H, Fillet A M, Huraux J M. Antiviral chemotherapy: Mechanisms of action, evaluation of activity, resistance and future developments [J]. *Pathologie Biologie*, 1993, 41(8 Pt 2): 770-776.
- [4] Guo R, Zhao M F, Liu H, *et al.* Uncovering the pharmacological mechanisms of Xijiao Dihuang Decoction combined with Yinqiao Powder in treating influenza viral pneumonia by an integrative pharmacology strategy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111676.
- [5] Tao Z G, Yang Y X, Shi W N, *et al.* Complementary and alternative medicine is expected to make greater contribution in controlling the prevalence of influenza [J]. *Biosci Trends*, 2013, 7(5): 253-256.
- [6] 葛资宇, 童骄, 那婧婧, 等. 不同煎煮方法的麻杏石甘汤及其含药血清对 A 型流感病毒神经氨酸酶活性的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(9): 1119-1123.
- [7] Nabeshima S, Kashiwagi K, Ajisaka K, *et al.* A randomized, controlled trial comparing traditional herbal medicine and neuraminidase inhibitors in the treatment of seasonal influenza [J]. *J Infect Chemother*, 2012, 18(4): 534-543.
- [8] Li J J, Zhang K, Bao J M, *et al.* Potential mechanism of action of Jing Fang Bai Du San in the treatment of COVID-19 using docking and network pharmacology [J]. *Int J Med Sci*, 2022, 19(2): 213-224.
- [9] Dong T, Chen X Y, Xu H C, *et al.* Mitochondrial metabolism mediated macrophage polarization in chronic lung diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 239: 108208.
- [10] Grochowska J, Czerwinska J, Borowski L S, *et al.* Mitochondrial RNA, a new trigger of the innate immune system [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2022, 13(3): e1690.
- [11] Marchi S, Guilbaud E, Tait S W G, *et al.* Mitochondrial control of inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(3): 159-173.
- [12] Graef K M, Vreede F T, Lau Y F, *et al.* The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon [J]. *J Virol*, 2010, 84(17): 8433-8445.
- [13] Hour M J, Huang S H, Chang C Y, *et al.* Baicalarin, ethyl acetate, and chloroform extracts of *Scutellaria baicalensis* inhibit the neuraminidase activity of pandemic 2009 H1N1 and seasonal influenza A viruses [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 750803.
- [14] Yoshizumi T, Ichinohe T, Sasaki O, *et al.* Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4713.
- [15] Whittaker P A. What is the relevance of bioinformatics to pharmacology? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24(8): 434-439.
- [16] Terkelsen T, Krogh A, Papaleo E. Cancer bioMarker Prediction Pipeline (CAMPP)—A standardized framework for the analysis of quantitative biological data [J]. *PLoS Comput Biol*, 2020, 16(3): e1007665.
- [17] 符珊珊, 封杰妮, 黎祖鸣, 等. 基于生物信息学探讨胃癌相关基底膜基因及中药预测 [J]. *中草药*, 2023, 54(15): 4948-4957.
- [18] Zhang J, Huang C, Liu Z H, *et al.* Screening of potential biomarkers in the peripheral serum for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head based on WGCNA and machine learning algorithms [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 2639470.
- [19] Rath S, Sharma R, Gupta R, *et al.* MitoCarta3.0: An updated mitochondrial proteome now with sub-organellar localization and pathway annotations [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1541-D1547.

- [20] Pan X, Jin X, Wang J, *et al.* Placenta inflammation is closely associated with gestational diabetes mellitus [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(5): 4068-4079.
- [21] Ru J L, Li P, Wang J N, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [22] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [23] Sanner M F. Python: A programming language for software integration and development [J]. *J Mol Graph Model*, 1999, 17(1): 57-61.
- [24] Wallace A C, Laskowski R A, Thornton J M. LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions [J]. *Protein Eng*, 1995, 8(2): 127-134.
- [25] Liao S H, Li Y, Lai Y N, *et al.* Ribavirin attenuates the respiratory immune responses to influenza viral infection in mice [J]. *Arch Virol*, 2017, 162(6): 1661-1669.
- [26] Eleftheriou P, Amanatidou D, Petrou A, *et al.* In silico evaluation of the effectivity of approved protease inhibitors against the main protease of the novel SARS-CoV-2 virus [J]. *Molecules*, 2020, 25(11): 2529.
- [27] Li H T, Dong D Y, Liu Q, *et al.* Overexpression of LACTB, a mitochondrial protein that inhibits proliferation and invasion in glioma cells [J]. *Oncol Res*, 2019, 27(4): 423-429.
- [28] Zeng K X, Chen X X, Hu X X, *et al.* LACTB, a novel epigenetic silenced tumor suppressor, inhibits colorectal cancer progression by attenuating MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation [J]. *Oncogene*, 2018, 37(41): 5534-5551.
- [29] Keckesova Z, Donaher J L, De Cock J, *et al.* LACTB is a tumour suppressor that modulates lipid metabolism and cell state [J]. *Nature*, 2017, 543(7647): 681-686.
- [30] Giampazolias E, Zunino B, Dhayade S, *et al.* Mitochondrial permeabilization engages NF- κ B-dependent anti-tumour activity under caspase deficiency [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(9): 1116-1129.
- [31] Xu Y J, Johansson M, Karlsson A. Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(3): 1563-1571.
- [32] Zhong Z Y, Liang S, Sanchez-Lopez E, *et al.* New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2018, 560(7717): 198-203.
- [33] Lai J H, Lin Y L, Hsieh S L. Pharmacological intervention for dengue virus infection [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 129: 14-25.
- [34] Chatel-Chaix L, Cortese M, Romero-Brey I, *et al.* Dengue virus perturbs mitochondrial morphodynamics to dampen innate immune responses [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 20(3): 342-356.
- [35] Ye H S, Zhang N. Identification of the upregulation of MRPL13 as a novel prognostic marker associated with overall survival time and immunotherapy response in breast cancer [J]. *Comput Math Methods Med*, 2021, 2021: 1498924.
- [36] Yu D D, Liu C, Guo L. Mitochondrial metabolism and cancer metastasis [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(14): 904.
- [37] Fan Y, Sanyal S, Bruzzone R. Breaking bad: How viruses subvert the cell cycle [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 396.
- [38] Shin M, Momb J, Appling D R. Human mitochondrial MTHFD2 is a dual redox cofactor-specific methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase [J]. *Cancer Metab*, 2017, 5: 11.
- [39] Huang J, Qin Y Y, Lin C F, *et al.* MTHFD2 facilitates breast cancer cell proliferation via the AKT signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(1): 703.
- [40] Roesch K, Hynds P J, Varga R, *et al.* The calcium-binding aspartate/glutamate carriers, citrin and aralar1, are new substrates for the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex [J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(18): 2101-2111.
- [41] Zhou S T, Han Y Y, Yang R H, *et al.* TIMM13 as a prognostic biomarker and associated with immune infiltration in skin cutaneous melanoma (SKCM) [J]. *Front Surg*, 2022, 9: 990749.
- [42] Sarkar D, Park E S, Barber G N, *et al.* Activation of double-stranded RNA dependent protein kinase, a new pathway by which human polynucleotide phosphorylase (hPNPase(old-35)) induces apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(17): 7948-7953.
- [43] Dani C, Mechti N, Piechaczyk M, *et al.* Increased rate of degradation of c-myc mRNA in interferon-treated Daudi cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 4896-4899.

[责任编辑 潘明佳]