doi:10.11659/jjssx.05E016070

下咽癌中基因功能模块及潜在抗癌药物的筛选

孙 娟,王 薇,胡文良,孙学威,李玲香,崔晓波 (内蒙古医科大学附属医院耳鼻咽喉科,内蒙古 呼和浩特 010050)

[摘 要] **目的** 筛选下咽癌中发挥重要作用的基因功能模块和调节这些模块的潜在抗癌药物,为下咽癌的分子治疗提供新靶点。**方法** 利用GEO数据库和MeV软件筛选下咽癌中差异表达的基因。利用STRING数据库,获得差异基因的蛋白质互作网络关系,然后利用Cystoscape软件的MCODE插件筛选网络中的基因模块。利用DAVID数据库获得基因模块的生物学功能。最后,利用DrugBank数据库筛选调控这些模块的药物以筛选潜在的抗下咽癌药物。**结果** 在鼻咽癌基因组中,我们共筛选出差异表达基因1 222个($P<0.05$),蛋白质互作关系219对,互作网络中的基因模块7个(MCODE分数大于1.5)。功能分析的结果显示5个基因模块参与了肿瘤发生发展相关的重要功能,如血管生成(regulation of angiogenesis)、细胞黏附(cell adhesion)、DNA代谢(DNA metabolic process)等($P<0.05$)。药物筛选的结果显示共有50个药物能够调控这5个基因模块。**结论** 共有5个基因模块调控下咽癌,并可能通过调控肿瘤血管生成、细胞黏附等生物学功能来发挥促下咽癌作用。它们的靶向药物可能有潜在的抗癌作用,为下咽癌的分子治疗提供新的靶点。

[关键词] 下咽癌;基因模块;生物信息学;抗癌药物
[中图分类号] R739.65 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-06-02

Screening of functional gene modules and the potential anti-cancer drugs in hypopharyngeal cancer

SUN Juan, WANG Wei, HU Wen-liang, SUN Xue-wei, LI Ling-xiang, CUI Xiao-bo (Department of Otolaryngology, Affiliated Hospitalof Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010050, China)

Abstract: Objective Screening the functional gene modules that can play important roles in hypopharyngeal cancer and the potential anti-cancer drugs. **Methods** GEO database and MeV software were employed to screen the differentially expressed genes in hypopharyngeal cancer. Using STRING database, the protein-protein interaction network was identified. MCODE plugin of Cytoscape was used to identify the functional gene modules in the network. Based on DAVID database, the functions of modules were identified. DrugBank was used to screen the potential drugs that regulate the target genes of modules. **Results** 1 222 differentially expressed genes including 219 interaction pairs were identified in whole genome profiling ($P<0.05$). Seven functional modules were identified in the network. The results of function analysis showed the module genes were enriched in cancer development related-function 'regulation of angiogenesis', 'cell adhesion', 'DNA metabolic process'. A total of 50 potential drugs that regulating the 5 modules were screened. **Conclusion** Five functional modules that regulate the progress of hypopharyngeal cancer were identified, and maybe they can promote hypopharyngeal cancer through some functions such as regulation of angiogenesis 18 up-regulated protein kinases were identified. Their kinase inhibitors may potential have a role in anti-cancer, which provides a new target point for molecular therapy of nasopharyngeal cancer.

Keywords: hypopharyngeal cancer; gene module; bioinformatics; anti-cancer drugs

下咽癌是一种对人类生命健康造成严重威胁的头颈部肿瘤,其发病率占下咽部恶性肿瘤的95%。由于下咽癌的恶性程度极高且发病位置隐蔽,约50%的患者在确诊时已是肿瘤发展的末期甚至已存在转移[1-3]。手术治疗会破坏下咽部解剖结构,从而影响患者发生功能障碍并造成心理创伤。因此,清楚下咽癌的发病机制和找寻有效的抗癌药物意义重大。近年来,随着大量基础实验数据的产生,生物信息学作为一种有效的大数据分析手段,广泛地应用于各类疾病的研究。作为一种常用的生物信息方法,基因模块化分析能够有效鉴定出蛋白质互作网络中的功能基因模块,从而帮助我们更好地理解隐藏在疾病背后的发病机制[4]。在此基础上,结合基因模块和药物预测数据库,我们能够获得潜在的抗癌药物。本研究利用模块化分析方法筛选下咽癌中具有重要作用的基因模块,并利用DrugBank药物数据库,预测能够调节这些基因模块的药物,以期为下咽癌的机制研究和治疗提供新的切入点。

1 材料与方法

1.1 下咽癌样本中差异基因筛选和蛋白质网络的建立

从GEO数据库获得34例下咽癌样本的全基因组

[基金项目] 内蒙古自治区自然科学基金(2014MS0856);内蒙古医科大学科技百万工程项目(KJbw2013014)

[通信作者] 孙 娟,E-mail:immu_sunjuan@163.com

数据(GSE2379)。利用 MultiExperiment Viewer(MeV)软件筛选样本中的差异基因,$P<0.05$ 的基因为差异基因。基于获得的差异基因,利用 STRING 数据库(http://string-db.org/)中的蛋白质互作信息,筛选差异基因之间的互作关系网络[5]。

1.2 下咽癌中基因功能模块的筛选及其功能分析

基于得到的蛋白质互作网络,利用 Cytoscape 软件的 MCODE 插件(http://apps.cytoscape.org/apps/mcode)筛选网络中的基因功能模块,本次只选取 MCODE 分数大于 1.5 的模块。基于 DAVID 软件(https://david.ncifcrf.gov/home.jsp)对各个功能模块进行功能分析[6],$P<0.05$ 的模块功能(GO term)被认为有差异。

1.3 潜在抗下咽癌药物的筛选

DrugBank 数据库(http://www.drugbank.ca/)是唯一将药物与生物信息学、化学信息学资源相结合的大型药物预测数据库[7]。该数据库收录了 8 206 种药物,其中包括 1991 FDA 批准的小分子药物,207 FDA 批准的生物制剂,93 种神经药物和超过 6 000 种实验药物。本次实验,我们利用 DrugBank 数据库筛选以功能模块基因为靶点的抗下咽癌候选药物。

1.4 统计学分析

差异基因包括激酶基因的筛选采用多重检验,GO 分析采用精确 Fisher 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 下咽癌中差异基因及蛋白互作网络

对 GEO 数据库中 34 例下咽癌样本进行分析后,共筛选出 1 222 个差异基因。基于 STRING 数据库建立蛋白质互作网络,如图 1。然后,利用 MCODE 插件筛选出下咽癌蛋白互作网络中的 5 个基因模块,分别为模块 A~E,MCODE 分数大于 1.5,如图 2。

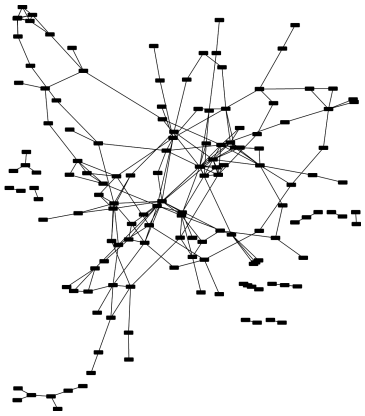
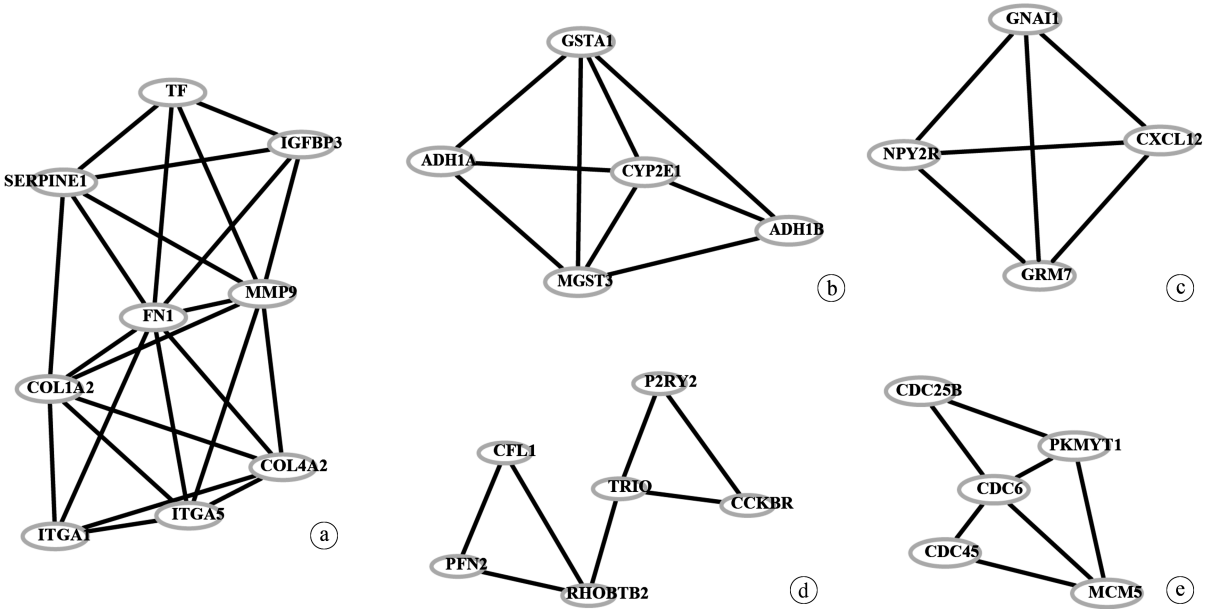


图 1 下咽癌中蛋白质互作网络



a~e:模块 A~E

图 2 下咽癌中基因功能模块

2.2 基因模块的功能

利用 DAVID 数据库对筛选出的模块进行功能分析,结果显示模块 A 的主要功能为血管生成和细胞黏附;模块 B 为谷胱甘肽转移酶的激活;模块 C 为 G 蛋白偶联受体信号通路;模块 D 为 DNA 代谢过程;模块 F 为上皮细胞分化,见表 1。

2.3 潜在的抗下咽癌药物

利用 DrugBank 数据库中已知的药物及其作用靶

点的信息,我们共筛选出调节 5 个模块的 50 个药物,其中 11 个调节模块 A,19 个调节模块 B,7 个调节模块 C,7 个调节模块 D,6 个调节模块 E。此外,这些药物可能通过调节模块基因来调节模块的功能,TF、MMP9、GSTA1 及 CYP2E1 等基因是多个药物的作用靶点,见表 2。

表 1 模块功能

模块	模块功能(GO term)	*P*
模块 A	GO:0045765 ~ regulation of angiogenesis	2.07E-02
	GO:0007155 ~ cell adhesion	2.95E-02
	GO:0022610 ~ biological adhesion	2.95E-02
模块 B	GO:0004364 ~ glutathione transferase activity	4.61E-03
模块 C	GO:0007186 ~ G-protein coupled receptor protein signaling pathway	4.78E-02
模块 D	GO:0006260 ~ DNA replication	1.94E-07
	GO:0006259 ~ DNA metabolic process	1.30E-04
模块 E	GO:0030216 ~ keratinocyte differentiation	1.60E-03
	GO:0009913 ~ epidermal cell differentiation	1.94E-03
	GO:0030855 ~ epithelial cell differentiation	5.01E-03

表 2 调控下咽癌基因模块的药物筛选

模块	药物名称	作用靶点
模块 A(11)	Iron Dextran, Bismuth Subsalicylate, Aluminium, Gallium nitrate	TF
	Ocriplasmin	FN1
	Mecasermin	IGFBP3
	Marimastat, Minocycline, Captopril, Glucosamine, AE-941	MMP9
模块 B(19)	Glutathione, Azathioprine, Busulfan, S-Hydroxycysteine, 2-Hydroxyethyl Disulfide	GSTA1
	NADH, Ethanol, Fomepizole	ADH1B, ADH1A
	N-Benzylformamide, Cyclohexanol	ADH1B
	4-Iodopyrazole, N-Cyclopentyl-N-Cyclobutylformamide	ADH1A
	Aldesleukin, Enfuvirtide, S-Adenosylmethionine, Folic Acid, Menadione	CYP2E1
	Glutathione	MGST3
模块 C(7)	Framycetin, AMD-070, Plerixafor	CXCL12
	L-Glutamic Acid	GRM7
	Cysteamine, AC162352, TM30338	NPY2R
模块 D(7)	Adenosine triphosphate, Debromohymenialdisine	CDC45
	Olomoucine, Hymenialdisine, SU9516, Flavopiridol, Alsterpaullone	PKMYT1
模块 E(6)	Dabrafenib	CFL1
	Suramin, Denufosol, INS 316	P2RY2
	Pentagastrin	CCKBR
	Botulinum Toxin Type A	RHOBTB2

3 讨论

随着越来越多的基因组学和蛋白组学数据的产生,生物大数据在挖掘疾病发生机制与寻找有效药物方面也发挥越来越重要的作用。MCODE 软件作为常用的生物信息学方法能够有效帮助我们在基因、蛋白互作网络中,挖掘出与疾病发生发展密切相关的功能基因簇,即基因模块[8]。本次研究,我们就利用 MCODE 软件鉴定在下咽癌的蛋白质互作网络中发挥重要作用的基因模块,为下咽癌的治疗提供新的基因靶点。

本次研究中,我们共发掘出下咽癌中的 5 个重要的基因模块。通过功能分析,我们发现模块 A 发挥着与肿瘤发生发展关系极为密切的功能,尤其是促进肿瘤侵袭转移的作用,如调节血管生成和细胞黏附。众所周知,在肿瘤的发生和发展过程中,离不开新生血管提供的能量和营养[9]。这些结果提示模块 A 可能通过调节肿瘤的血管生成来促进下咽癌的形成和发展。此外,模块 A 还能调节肿瘤细胞的黏附功能。研究表明,肿瘤细胞的黏附能力与其侵袭和转移能力密切相关,肿瘤细胞能够通过上皮细胞间质化,降低自身的黏附分子表达,促使其获得移行能力并容易发生远处转移[10]。因此,模块 A 可能参与了下咽癌细胞的黏附调节,从而促进其发生侵袭和转移。GO 分析结果显示,模块 B 的功能主要为调控谷胱甘肽转移酶的活性。研究表明,谷胱甘肽转移酶与肿瘤的耐药机制关系密切,其在多种肿瘤耐药细胞株中高表达从而保护肿瘤细胞免受化疗药物损伤,给肿瘤的治疗带来很大困难[11]。模块 C 的功能主要与 G 蛋白偶联受体信号有关。G 蛋白偶联受体与肿瘤转移的关系十分密切。Raghuwanshi 等[12]发现 G 蛋白偶联受体 116 能够促进乳腺癌的转移。Yan 等[13]发现 G 蛋白偶联受体 87 能够促进 CD133 + 的肝癌干细胞生长和转移。G 蛋白偶联受体不仅能够通过激活 Rho GTPases 和细胞骨架改变来促进肿瘤的转移还能够为肿瘤的血管生成补充营养进而提供肿瘤转移的路径。由此可以推测,模块 C 可能通过影响 G 蛋白偶联受体信号来调节下咽癌的发生发展。模块 D 的功能与 DNA 代谢相关。DNA 代谢的增加提示肿瘤在发生转移时,细胞分裂和细胞周期等细胞活动更加频繁,模块 D 可能与肿瘤相关的生物学活动关系密切。模块 E 的功能主要为上皮细胞分化的调节。肿瘤实际是上皮细胞分化异常而产生的疾病,肿瘤的恶性程度与其上皮的分化程度呈显著负相关[14]。此外,上皮细胞向间质细胞转化是肿瘤细胞移行和转

移的重要过程,由此可见,模块 E 的功能可能与下咽癌的恶性进程关系密切。

综上,我们发现 5 个模块可能具有重要的调节下咽癌发生发展的作用。那么,这些重要的模块基因就可能成为重要的治疗下咽癌的分子靶点。因此,我们利用 DrugBank 数据库,以模块基因为靶点预测了潜在的抗下咽癌药物。在预测出的 50 个潜在抗癌药物中,我们发现这些药物多数与肿瘤关系密切,例如:marimastat 能够通过抑制 mmp9 从而抑制肝癌细胞的生长和转移[15],AE-941 已被发现能够有效抑制肺癌进展[16],Menadione 能够诱导口腔肿瘤细胞凋亡并降低其侵袭和转移能力[17]。尽管这些药物具有抗肿瘤作用,但它们在对下咽癌的治疗还未见相关报道。根据本研究结果,我们可以合理推测这些药物很可能通过调节基因靶点来调节这些重要模块的功能,最终抑制下咽癌的发展。

与传统的下咽癌治疗方法相比,分子靶向治疗具有损伤小、副作用少、特异性强等特点,不仅可以作为治疗下咽癌的新方法还可以作为手术治疗的辅助手段。我们的研究为下咽癌的分子靶向治疗提供了新的基因靶点和潜在抗癌药物。我们采用的将基因组数据与药物数据库相结合的研究策略为肿瘤的机制研究和治疗提供了新的方法学参考。

[参考文献]

[1] Gourin CG, Terris DJ. Carcinoma of the hypopharynx[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2004, 13(1): 81 - 98. doi: 10.1016/S1055 - 3207(03)00122 - 4.

[2] Buckley JG, MacLennan K. Cervical node metastases in laryngeal and hypopharyngeal cancer: a prospective analysis of prevalence and distribution[J]. Head Neck, 2000, 22(4): 380 - 385. doi: 10.1002/1097 - 0347(200007)22:4<380::aid - hed11>3.0.co;2 - e.

[3] American Society of Clinical Oncology, Pfister DG, Laurie SA, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(22): 3693 - 3704. doi: 10.1200/JCO.2006.07.4559.

[4] Gao B, Wang Y, Qiu Y, et al. Bioinformatics screening regarding herbal components that targetedly regulate the function of tumour-associated macrophages[J]. Oncol Rep, 2014, 32(1): 309 - 317. doi: 10.3892/or.2014.3217.

[5] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(Database issue): D447 - D452. doi: 10.1093/nar/gku1003.

[6] SIB Swiss Institute of Bioinformatics Members. The SIB Swiss Institute of Bioinformatics' resources: focus on curated databases[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(D1): D27 - D37. doi: 10.1093/nar/gkv1310.

[7] Law V, Knox C, Djoumbou Y, et al. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Database issue): D1091 - D1097. doi: 10.1093/nar/gkt1068.

[8] Bandettini WP, Kellman P, Mancini C, et al. MultiContrast Delayed Enhancement (MCODE) improves detection of subendocardial myocardial infarction by late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance: a clinical validation study[J]. J Cardiovasc Magn Reson, 2012, 14: 83. doi: 10.1186/1532 - 429X - 14 - 83.

[9] Mao G, Liu Y, Fang X, et al. Tumor-derived microRNA-494 promotes angiogenesis in non-small cell lung cancer[J]. Angiogenesis, 2015, 18(3): 373 - 382. doi: 10.1007/s10456 - 015 - 9474 - 5.

[10] Islam SS, Mokhtari RB, Noman AS, et al. Sonic hedgehog (Shh) signaling promotes tumorigenicity and stemness via activation of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in bladder cancer[J]. Mol Carcinog, 2016, 55(5): 537 - 551. doi: 10.1002/mc.22300.

[11] 聂立红,王声湧,胡毅玲. 谷胱甘肽硫 - 转移酶研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(11): 89 - 92.

[12] Raghuwanshi SK, Smith N, Rivers EJ, et al. G protein-coupled receptor kinase 6 deficiency promotes angiogenesis, tumor progression, and metastasis[J]. J Immunol, 2013, 190(10): 5329 - 5336. doi: 10.4049/jimmunol.1202058.

[13] Yan M, Li H, Zhu M, et al. G protein-coupled receptor 87 (GPR87) promotes the growth and metastasis of CD133 + cancer stem-like cells in hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61056. doi: 10.1371/journal.pone.0061056.

[14] Shin J, Carr A, Corner GA, et al. The intestinal epithelial cell differentiation marker intestinal alkaline phosphatase (ALPi) is selectively induced by histone deacetylase inhibitors (HDACi) in colon cancer cells in a Kruppel-like factor 5 (KLF5)-dependent manner[J]. J Biol Chem, 2014, 289(36): 25306 - 25316. doi: 10.1074/jbc.M114.557546.

[15] Wang Y, Yuan L, Yang XM, et al. A chimeric antibody targeting CD147 inhibits hepatocellular carcinoma cell motility via FAK-PI3K-Akt-Girdin signaling pathway[J]. Clin Exp Metastasis, 2015, 32(1): 39 - 53. doi: 10.1007/s10585 - 014 - 9689 - 7.

[16] Latreille J, Batist G, Laberge F, et al. Phase I/II trial of the safety and efficacy of AE-941 (Neovastat) in the treatment of non-small-cell lung cancer[J]. Clin Lung Cancer, 2003, 4(4): 231 - 236. doi: 10.3816/clc.2003.n.003.

[17] Suresh S, Raghu D, Karunagaran D. Menadione (Vitamin K3) induces apoptosis of human oral cancer cells and reduces their metastatic potential by modulating the expression of epithelial to mesenchymal transition markers and inhibiting migration[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(9): 5461 - 5465.

(编辑:杨 颖)