doi:10.11659/jjssx.04E016024

鼻咽癌中高表达蛋白激酶及其抑制剂的生物信息学筛选

张 姝,崔晓波,孙 娟 (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** 筛选鼻咽癌中高表达的激酶基因以及调控这些激酶的激酶抑制剂,为鼻咽癌的分子治疗提供新的切入点。**方法** 利用 GEO 数据库和 SAM 软件筛选鼻咽癌中高表达的激酶基因;利用 DAVID 数据库获得激酶调控的生物学功能;利用 Selleckchem 数据库筛选调控这些高表达激酶的激酶抑制剂,再通过文献挖掘技术筛选潜在的抗鼻咽癌新药。**结果** 在鼻咽癌基因组中,我们共筛选出差异表达基因 2 360 个,其中高表达激酶基因 21 个,分别为 CHEK1、CHEK2、PRKDC、AURKA、VRK2、STK17A、MELK、NUAK1、TRPM7、MASTL、AXL、BUB1、BUB1B、CDK4、TTK、CDC7、CASK、AKT3、TBK1 和 PBK(Fold Change≥2 且 $P<0.05$)。功能分析的结果显示 21 个高表达激酶主要参与 10 个功能 term 中,包括调节细胞活动相关功能,如"protein amino acid phosphorylation""phosphorylation""phosphate metabolic process"和调控细胞周期相关功能,如"mitotic cell cycle""cell cycle phase""regulation of cell cycle"等。通过 Selleckchem 数据库,我们发现 9 个高表达激酶具有已被证实的激酶抑制剂 51 个。文献挖掘的结果显示在这 51 个激酶抑制剂中,有 18 个在癌症方面的研究较少,文献小于 10 篇,具有成为抗鼻咽癌潜力的新药物。**结论** 鼻咽癌中共有 21 个激酶高表达,并可能通过调控肿瘤细胞周期等生物学功能来发挥促鼻咽癌作用;它们的抑制剂可能有潜在的抗癌作用,为鼻咽癌的分子治疗提供新的靶点。

[关键词] 鼻咽癌;蛋白激酶;激酶抑制剂

[中图分类号] R739.65 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-04-13

Bioinformatics screening of up-regulated protein kinases and their inhibitors in nasopharyngeal cancer

ZHANG Shu, CUI Xiao-bo, SUN Juan (Department of Otolaryngology, Inner Mongolia Medical University Affiliated Hospital, Hohhot Inner Mongolia 010050, China)

Abstract: Objective To screening up-regulated protein kinases and their inhibitors in order to provide new targets for molecular therapy of nasopharyngeal cancer. **Methods** GEO database and SAM software were employed to screen the up-regulated protein kinase gene in nasopharyngeal cancer. Based on DAVID database, the regulating functions of kinases were identified. The inhibitors of up-regulated kinase genes were identified by Selleckchem database. Literature mining was used to screen the potential anti-cancer drugs. **Results** Totally 2360 differentially expressed genes including 21 up-regulated protein kinases (CHEK1, CHEK2, PRKDC, AURKA, VRK2, STK17A, MELK, NUAK1, TRPM7, MASTL, AXL, BUB1, BUB1B, CDK4, TTK, CDC7, CASK, AKT3, TBK1 and PBK) were identified in the whole genome profiling (Fold Change≥2, $P<0.05$). The results of function analysis showed the up-regulated genes were enriched in 10 function terms such as 'protein amino acid phosphorylation' 'phosphorylation' 'phosphate metabolic process' 'mitotic cell cycle' 'cell cycle phase' 'regulation of cell cycle', and so on. The Selleckchem database analysis showed there were 9 up-regulated protein kinases equipped with 51 inhibitors which were proved already. The results of literature mining showed that 18 inhibitors of them had a few studies (less than 10 literatures) in cancer terms, and there was a potential to become new drugs to treat nasopharyngeal cancer. **Conclusion** A total of 21 up-regulated protein kinases were identified, and they might promote the nasopharyngeal carcinoma by regulating functions such as the cell-cycle control pathway. Their kinase inhibitors may have a potential role in anti-cancer treatment, which provided a new target point for molecular therapy of nasopharyngeal cancer.

Keywords: nasopharyngeal cancer; protein kinase; kinase inhibitor

鼻咽癌是一种发生于鼻咽上皮的恶性肿瘤,具有发病位置解剖结构复杂,病理分化程度低,易发生转移等特点。70% 的鼻咽癌患者在确诊时已达终末期(Ⅲ、Ⅳ期)。鼻咽癌的主要治疗手段是放射治疗,但疗效欠佳,单纯放疗只能维持 50% 左右的患者 5 年生存率,晚期则更低[1-2]。因此寻找疗效确切且创伤小、副作用少等优点的治疗新手段或新的辅助放疗手段迫在眉睫。蛋白激酶在肿瘤的发生发展中发挥重要的促进作用,且以蛋白激酶为靶点的抗癌治疗也逐渐成为热点,并取得良好的治疗效果[3]。本研究利用生物信息学方法筛选鼻咽癌中高表达的激酶基因,并利用数据库和文献挖掘方法获得这些高表达激酶的激酶抑制

[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] 张 姝,E-mail:immu_zhangshu@163.com

剂,为鼻咽癌的分子机制研究和分子靶向治疗提供新的切入点。

1 材料与方法

1.1 鼻咽癌样本中高表达蛋白激酶的筛选

从 GEO 数据库中获取包含 41 例鼻咽癌样本的全基因组芯片数据,具体信息见表 1。利用 SAM(Significance Analysis of Microarrays)软件(http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/)对全部基因进行差异表达分析,差异表达倍数(Fold Change)达到 2 倍或以上且 P 值控制在 0.05 以下。根据蛋白激酶库信息,在差异表达的基因中筛选出高表达的激酶基因。

表 1 全基因组芯片数据信息

GEO 编号	芯片平台信息	样本信息
GSE12452	GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	GSM312896-GSM312905 Normal nasopharyngeal tissue GSM312906-GSM312936 Nasopharyngeal carcinoma

1.2 高表达蛋白激酶的功能分析

本次实验,我们利用 DAVID(Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, https://david.ncifcrf.gov/)数据库筛选鼻咽癌样本中差异表达蛋白激酶的功能(GO term)。DAVID 数据库是生物信息学中常用的基因功能富集分类数据库,GEO 数据库检索的文献中,超过 21 000 篇应用此数据库作为分析方法之一。

1.3 激酶抑制剂的筛选

Selleckchem 数据库收录了 3 000 余种被相关信号通路实验证实的激酶抑制剂,是激酶靶向药物研究中的常用数据库之一。本次实验,我们利用激酶抑制剂数据库 Selleckchem(http://www.selleckchem.com/),对鼻咽癌样本中高表达激酶的抑制剂进行筛选。

1.4 潜在抗鼻咽癌药物的筛选

利用生物信息学文献挖掘技术(Thomson Data Analyzer 软件,http://thomsonreuters.com/thomson-data-analyzer/),在 GEO 数据库中以“cancer”和“激酶抑制剂”为关键词,检索目的激酶抑制在癌症研究中的应用情况,以筛选及预测潜在的鼻咽癌治疗新药物。检索出相关文献数量少于 10 的激酶被认为在癌症研究中并不深入,具有成为抗鼻咽癌新药的潜力。

1.5 统计学分析

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

2 结果

2.1 高表达的蛋白激酶

对 GEO 数据库中 41 例鼻咽癌样本的全基因组芯片进行分析后,共筛选出 2 360 个差异表达的 mRNA。其中,高表达基因 786 个,低表达基因 1 574 个。然后,将高表达的基因与激酶数据库收录的激酶基因进行比对,筛选出高表达的激酶基因,结果显示在这 786 个高表达基因中有 21 个蛋白激酶基因,分别为 CHEK1, CHEK2, PRKDC, AURKA, VRK2, STK17A, MELK, NUAK1, TRPM7, MASTL, AXL, BUB1, BUB1B, CDK4, TTK, CDC7, CASK, AKT3, TBK1 和 PBK(Fold Change≥2 且 $P<0.05$)。

2.2 高表达蛋白激酶的功能

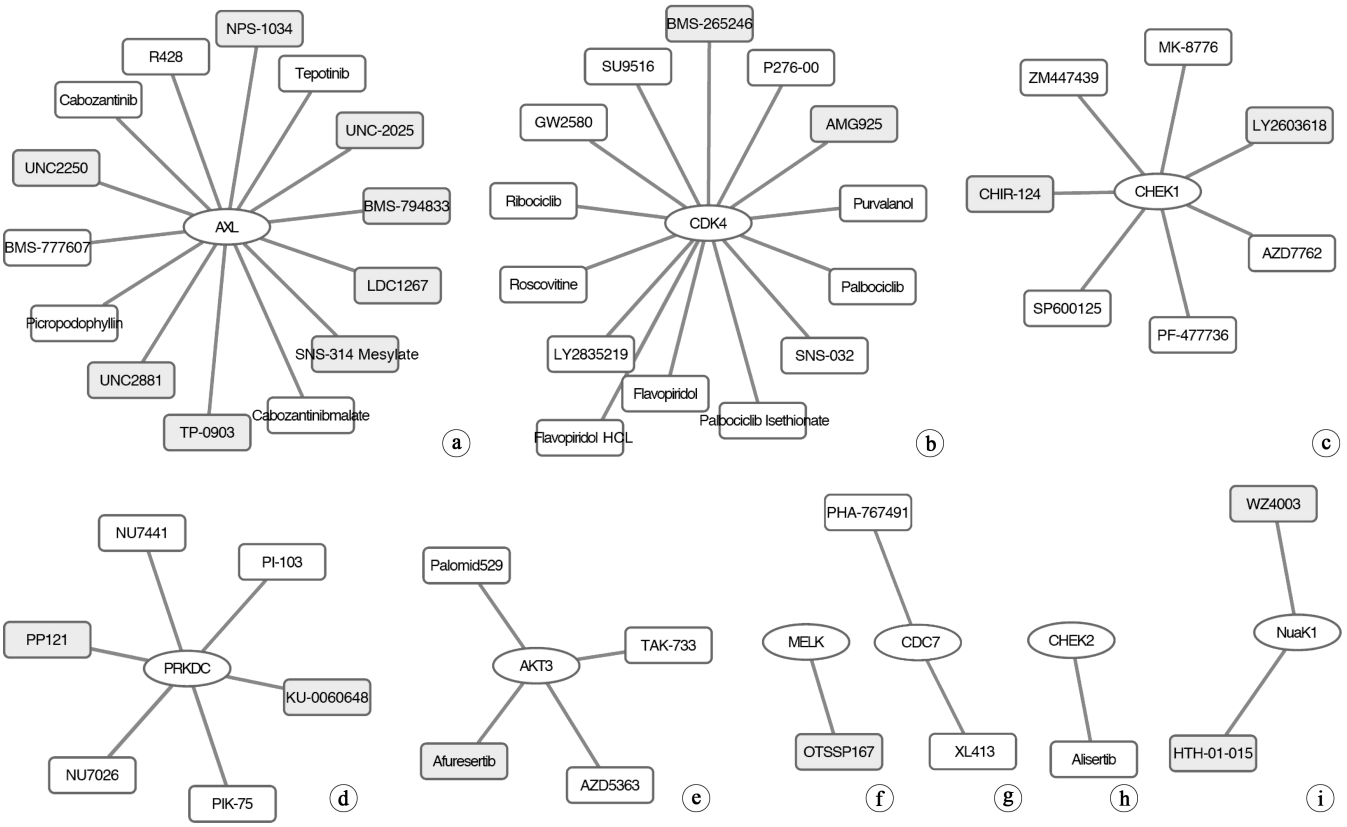
利用 DAVID 数据库对高表达激酶基因进行功能分析,结果显示 21 个差异激酶主要富集在 10 个生物学功能组(GO term)中,包括调节细胞活动相关功能,如“protein amino acid phosphorylation”“phosphorylation”“phosphate metabolic process”和调控细胞周期相关功能,如“mitotic cell cycle”“cell cycle phase”“regulation of cell cycle”等,见表 2。

表 2 鼻咽癌样本中高表达激酶的功能分析

功能(GO term)	*P*	*FDR*
GO:0006468~protein amino acid phosphorylation	2.18E-24	2.87E-21
GO:0016310~phosphorylation	7.12E-23	9.39E-20
GO:0006796~phosphate metabolic process	3.01E-21	3.97E-18
GO:0006793~phosphorus metabolic process	3.01E-21	3.97E-18
GO:0000278~mitotic cell cycle	6.17E-07V	8.13E-04
GO:0022403~cell cycle phase	1.31E-06	1.73E-03
GO:0051726~regulation of cell cycle	5.95E-06	7.84E-03
GO:0007049~cell cycle	7.68E-06	1.01E-02
GO:0000075~cell cycle checkpoint	8.55E-06	1.13E-02
GO:0022402~cell cycle process	1.03E-05	1.36E-02

2.3 高表达激酶的激酶抑制剂以及在癌症中的应用

文献挖掘结果显示,共有 9 个激酶为已被实验证实的激酶抑制剂。在这 51 个激酶抑制剂中,有 8 个激酶抑制剂调控 CHEK1,6 个激酶抑制剂调控 PRKDC,1 个激酶抑制剂调控 MELK,2 个激酶抑制剂调控 NUAK1,14 个激酶抑制剂调控 AXL 和 CDK4,2 个调控 CDC7,4 个调控 AKT3 和 1 个调控 CHEK2。通过对这 50 个激酶抑制剂进行与癌症相关的文献挖掘后,我们发现 18 个激酶抑制剂在癌症方面的研究较少,文献少于 10 篇;共有 33 个激酶抑制剂在癌症方面已有较多研究,文献多于 10 篇,见图 1。



注:筛选出的激酶抑制剂与癌症相关文献多于 10 篇者用白色方框表示;少于 10 篇者用灰色方框表示;椭圆形代表高表达激酶;图中 a-i 分别为高表达激酶 AXL,CDK4,CHEK1,PRKDC,AKT3,MELK,CDC7,CHEK2,NUAK1 和调控它们的抑制剂

图 1 利用 GEO 数据库和文献挖掘筛选出的调控高表达激酶的激酶抑制剂在癌症中的应用情况

3 讨论

蛋白激酶能够使靶蛋白磷酸化,从而使信号逐级传递并放大,调节正常上皮细胞、炎性细胞、肿瘤细胞等各种细胞活动,如细胞增殖、移行、凋亡、转移等[4]。迄今为止,蛋白激酶在细胞活动中的重要作用已经得到越来越多的关注,以蛋白激酶为靶点的研究和药物研发也越来越广泛地应用于癌症、炎症、糖尿病等疾病[5-8]。

本实验中,我们发现共有 21 个激酶在鼻咽癌中发生高表达,并且具有重要的促癌作用,如:调控细胞周期和蛋白磷酸化等过程。细胞周期是基本的细胞生命活动过程,细胞周期紊乱是肿瘤发生的主要机制之一。蛋白激酶,尤其是 CDK 激酶家族对于细胞周期的调控具有重要作用。大量研究表明,CDK4 与肿瘤的发生发展关系密切。Hagen 等[9]发现沉默 CDK4 能够促进乳腺癌细胞凋亡。Rivadeneira 等[10]发现应用 CDK4 抑制剂可以抑制肝癌细胞增殖。本实验中,我们也发现肿瘤周期相关蛋白 CDK4 在鼻咽癌中表达增加。这一结果提示鼻咽癌的细胞周期紊乱可能与 CDK4 的过度表达有关。此外,CDC7 也是调控肿瘤周期的重要蛋白之一。Huggett 等[11]发现 CDC7 是一个潜在的抗胰腺癌发生发展的重要分子靶点。Natoni 等[12]利用 CDC7 的激酶抑制剂治疗慢性粒细胞白血病,发现肿瘤细胞的增殖能力明显受抑制。我们发现 CDC7 在鼻咽癌中发生高表达,提示 CDC7 可能参与了鼻咽癌的周期紊乱。以上这些科学家的成果不仅证明了激酶的促肿瘤作用,同时也证明激酶抑制剂具有强力的抗癌效果。

随着转化医学概念的兴起,实验室成果向临床转化逐渐成为如今的科研热点。蛋白激酶抑制剂作为有效的抗癌药物也被越来越多地研发和应用于临床[13-15]。本实验针对鼻咽癌中高表达的激酶,我们共筛选出 51 个激酶抑制剂。Giles 等[16]发现 AXL 激酶是一种介导头颈部肿瘤发生发展的重要激酶,使用 R428 抑制剂能明显抑制肿瘤的发展。Holland 等[17]发现 AXL 激酶抑制剂 R428 能够通过抑制 AXL 的活性,抑制乳腺癌的增殖和转移。Ema 等[18]发现 CDK4 抑制剂 flavopiridol 能够通过抑制 CDK4 来抑制淋巴肿瘤细胞的增殖。Krajewska 等[19]发现 Chek1 对肿瘤的

发展有促进作用,应用激酶抑制剂 AZD7762 后,这种促进作用被明显抑制。以上结果证实了我们激酶抑制剂筛选的准确性,这些激酶抑制剂均能通过抑制靶激酶的活性来抑制肿瘤的生长。除了这些已被证实具有抗癌作用的激酶抑制剂之外,我们还发现了 18 个抗癌作用还不明确,但却又明确抑制其靶激酶作用的抑制剂,如:AXL 激酶的抑制剂(NPS-1034 和 UNC-2025 等)、CDK4 激酶的抑制剂(AMG925 和 BMS-265246)、MELK 激酶的抑制剂(OTSSP167)、AKT3 的激酶抑制剂(Afuresertib)等。这些高表达激酶均具有促进肿瘤发展的作用,但是这些激酶的抑制剂还没有应用在抗癌研究中。因此,他们和那些已被证实有抗癌作用的抑制剂一样,均具有成为抗鼻咽癌新药的潜力,但是这些抑制剂的具体作用还需进一步的实验证实。

鼻咽癌治疗手段单一,具有损伤小,副作用少等特点的激酶抑制剂治疗不但能够成为鼻咽癌治疗的新手段之一,而且还能够成为辅助放射治疗的新手段,以提高放疗后患者的 5 年生存率。我们的研究不但为鼻咽癌的分子治疗提供了新的切入点,而且将生物信息学方法与药物数据库相结合,为转化医学相关研究提供了新的方法学参考。

[参考文献]

[1] 蔡光先,曹建雄,宁泽璞,等. 鼻咽癌[J]. 湖南中医杂志,2011,27(1):82 - 84. doi:10.3969/j. issn. 1003 - 7705. 2011. 01. 050.

[2] 张 力. 鼻咽癌治疗的新进展[J]. 临床肿瘤学杂志,2008,13(3):193 - 196. doi:10.3969/j. issn. 1009 - 0460. 2008. 03. 001.

[3] Piirsoo A,Kasak L,Kauts ML,et al. Protein kinase inhibitor SU6668 attenuates positive regulation of Gli proteins in cancer and multipotent progenitor cells[J]. Biochim Biophys Acta,2014,1843(4):703 - 714. doi:10.1016/j. bbamcr. 2014. 01. 003.

[4] Lavoie H,Li JJ,Thevakumaran N,et al. Dimerization-induced allostery in protein kinase regulation[J]. Trends Biochem Sci,2014,39(10):475 - 486. doi:10.1016/j. tibs. 2014. 08. 004.

[5] Ul-Haq Z,Gul S,Usmani S,et al. Binding site identification and role of permanent water molecule of PIM-3 kinase:A molecular dynamics study[J]. J Mol Graph Model,2015,62:276 - 282. doi:10.1016/j. jmgm. 2015. 07. 004.

[6] Okkenhaug K. Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells[J]. Annu Rev Immunol,2013,31:675 - 704. doi:10.1146/annurev - immunol - 032712 - 095946.

[7] Kizub IV,Klymenko KI,Soloviev AI. Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus[J]. Int J Cardiol,2014,174(2):230 - 242. doi:10.1016/j. ijcard. 2014. 04. 117.

[8] 雷 艳,杨新征,董昭君. Rho 激酶和 PKC 在环孢素 A 改善休克血管反应性中的作用及与 MPTP 的关系[J]. 局解手术学杂志,2015,24(4):355 - 358. doi:10.11659/jjssx. 03E015007.

[9] Hagen KR,Zeng X,Lee MY,et al. Silencing CDK4 radiosensitizes breast cancer cells by promoting apoptosis[J]. Cell Div,2013,8(1):10. doi:10.1186/1747 - 1028 - 8 - 10.

[10] Rivadeneira DB,Mayhew CN,Thangavel C,et al. Proliferative suppression by CDK4/6 inhibition:complex function of the retinoblastoma pathway in liver tissue and hepatoma cells[J]. Gastroenterology,2010,138(5):1920 - 1930. doi:10.1053/j. gastro. 2010. 01. 007.

[11] Huggett MT,Tudzarova S,Proctor I,et al. Cdc7 is a potent anti - cancer target in pancreatic cancer due to abrogation of the DNA origin activation checkpoint[J]. Oncotarget,2016. doi:10.18632/oncotarget. 7611.

[12] Natoni A,Murillo LS,Kliszczak AE,et al. Mechanisms of action of a dual Cdc7/Cdk9 kinase inhibitor against quiescent and proliferating CLL cells[J]. Mol Cancer Ther,2011,10(9):1624 - 1634. doi:10.1158/1535 - 7163. MCT - 10 - 1119.

[13] Roskoski R Jr. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors[J]. Pharmacol Res,2015,100:1 - 23. doi:10.1016/j. phrs. 2015. 07. 010.

[14] Durand N,Borges S,Storz P. Functional and therapeutic significance of protein kinase D enzymes in invasive breast cancer[J]. Cell Mol Life Sci,2015,72(22):4369 - 4382. doi:10.1007/s00018 - 015 - 2011 - 2.

[15] Tsai CJ,Nussinov R. The molecular basis of targeting protein kinases in cancer therapeutics[J]. Semin Cancer Biol,2013,23(4):235 - 242. doi:10.1016/j. semcancer. 2013. 04. 001.

[16] Giles KM,Kalinowski FC,Candy PA,et al. Axl mediates acquired resistance of head and neck cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib[J]. Mol Cancer Ther,2013,12(11):2541 - 2558. doi:10.1158/1535 - 7163. MCT - 13 - 0170.

[17] Holland SJ,Pan A,Franci C,et al. R428,a selective small molecule inhibitor of Axl kinase,blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer[J]. Cancer Res,2010,70(4):1544 - 1554. doi:10.1158/0008 - 5472. CAN - 09 - 2997.

[18] Ema Y,Igase M,Takeda Y,et al. Investigation of the cytotoxic effect of flavopiridol in canine lymphoma cell lines[J]. Vet Comp Oncol,2015. doi:10.1111/vco. 12130.

[19] Krajewska M,Fehrmann RS,Schoonen PM,et al. ATR inhibition preferentially targets homologous recombination-deficient tumor cells[J]. Oncogene,2015,34(26):3474 - 3481. doi:10.1038/onc. 2014. 276.

(编辑:左艳芳)