

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.08.0879

· 论 著 ·

## 基于药物重定位策略和网络药理学方法筛选肝细胞癌预防药物

李 英<sup>1</sup>, 崔修亮<sup>2</sup>, 张友磊<sup>3</sup>, 张国庆<sup>1\*</sup>

1. 海军军医大学(第二军医大学)东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

2. 海军军医大学(第二军医大学)国家肝癌科学中心, 上海 200438

3. 海军军医大学(第二军医大学)东方肝胆外科医院肝外二科, 上海 200438

**[摘要]** **目的** 基于药物重定位策略, 筛选可用于预防肝细胞癌(HCC)的药物。**方法** 收集包含肝硬化、低度不典型结节、高度不典型结节和早期 HCC 等肝脏疾病不同进展阶段的表达谱数据, 确定相邻疾病进展阶段的转录组变化, 同时收集作用于人肝癌细胞系 HepG2 的 3 927 种药物和小分子的基因表达谱, 利用基因集富集分析(GSEA)算法分别计算不同药物作用与疾病进展阶段转录组变化相似性, 筛选其中负相关药物作为 HCC 预防的候选药物, 并通过构建药物激活子网和通路富集分析等方法研究候选药物的作用机制。**结果** 分别筛选出对疾病不同进展阶段具有阻碍作用的药物 importazole、吡考他胺和紫杉醇, 这 3 种药物对肝硬化到早期 HCC 的多个疾病阶段均有一定阻断作用, 3 种药物与疾病进展的基因表达模式呈负相关, 通路富集分析结果提示这 3 种药物通过肿瘤相关通路、p53 信号通路、黏附斑、视黄醇代谢等发挥作用。**结论** 通过药物重定位策略筛选出了 HCC 预防药物, 且结果提示抗血小板治疗可能会预防 HCC 发生, 为后续研究提供了有用线索。

**[关键词]** 药物重定位; 肝肿瘤; 抗致癌药; 网络药理学

**[中图分类号]** R 735.7; R 979.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2019)08-0879-06

### Screening of drugs for hepatocellular carcinoma prevention based on drug repositioning and network pharmacology

LI Ying<sup>1</sup>, CUI Xiu-liang<sup>2</sup>, ZHANG You-lei<sup>3</sup>, ZHANG Guo-qing<sup>1\*</sup>

1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China

2. National Center for Liver Cancer, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China

3. Department of Hepatic Surgery (II), Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China

**[Abstract]** **Objective** To screen novel drugs for hepatocellular carcinoma (HCC) prevention based on drug repositioning strategy. **Methods** We collected the gene expression profiles of tissue samples representing the stepwise carcinogenic process covering 4 stages: cirrhosis, low-grade dysplastic nodule (LGDN), high-grade dysplastic nodule (HGDN) and early HCC, and identified the gene signatures between two consecutive stages. We also collected the gene expression data of human hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 treated by 3 927 drugs and small molecules. The similarity between disease expressions and the drug gene expressions was calculated using gene set enrichment analysis (GSEA) algorithm, and drugs negatively correlated with the disease signatures were selected. Finally, we constructed the activated sub-network and performed pathway enrichment analysis to explore the underlying mechanisms of these drugs. **Results** We screened out the drugs that could prevent HCC during different stages, and found that importazole, picotamide and paclitaxel exhibited preventive potentials at all stages from cirrhosis to early HCC. The genes affected by these 3 drugs showed inverse expression pattern during HCC development, and pathways such as cancer-related pathway, p53 signaling pathway, focal adhesion and retinol metabolism pathway were enriched. **Conclusion** Preventive drugs for HCC have been screened through drug

**[收稿日期]** 2019-05-25 **[接受日期]** 2019-07-26

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81602620), 海军军医大学(第二军医大学)精准医学转化应用研究专项(2017JZ52). Supported by National Natural Science Foundation of China (81602620) and Precision Medicine Transformation and Application Program of Naval Medical University (Second Military Medical University) (2017JZ52).

**[作者简介]** 李 英, 硕士, 药师. E-mail: cnxxr@126.com

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: gqzhang@smmu.edu.cn

repositioning strategy, and our results indicated that antiplatelet therapy may play a role in the prevention of HCC, which provides information for further study.

**[Key words]** drug repositioning; liver neoplasms; anticarcinogenic agents; network pharmacology

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(8): 879-884]

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的恶性肿瘤之一, 位列世界肿瘤死因的第 3 位<sup>[1]</sup>。目前抗 HCC 药物研究多集中于晚期 HCC 的化学治疗药物, 包括索拉非尼、乐伐替尼、瑞戈非尼、卡博替尼等多激酶抑制剂。这些药物先后被批准用于 HCC 的临床靶向治疗, 但治疗效果仍有待提高。HCC 的发生往往是从肝炎、肝硬化到 HCC 的多步骤、多阶段逐级演变的复杂过程, 利用药物阻断该过程, 有望成为有效的 HCC 防治手段。然而, 目前 HCC 预防性药物研究少有报道。

药物重定位即发现药物的新适应证, 是新药研发的一种重要策略<sup>[2]</sup>。利用该策略发现二甲双胍可激活 HCC 细胞中的蛋白激酶, 从而抑制细胞增殖, 降低其体内成瘤能力<sup>[3]</sup>; 维生素 C 也被证明具有较好的抗 HCC 效果, 并能特异性杀伤 HCC 干细胞<sup>[4]</sup>。表达谱比较分析已被广泛用于药物重定位研究, 并取得较大成功, 例如将抗溃疡药西咪替丁重定位于 HCC 治疗, 肿瘤缩小程度几乎与化学治疗药物多柔比星相当<sup>[5]</sup>。该方法也被用于筛选抗 HCC 药物, 研究发现杀螺胺乙醇胺盐通过抑制细胞分裂周期蛋白 37 (cell division cycle 37, CDC37) 信号通路杀伤肿瘤细胞<sup>[6]</sup>。目前尚无应用药物重定位策略筛选 HCC 预防性药物的研究。

网络集成式细胞内特征公共数据库 (Library of Integrated Network-based Cellular Signatures, LINCS; <http://www.lincsproject.org/LINCS/>) 计划<sup>[7]</sup>是在细胞水平上开发药物特征生物学标签, 通过细胞表型的动态变化反映药物作用机制, 目前已在多种细胞系上完成超过万种小分子化合物作用的基因表达谱。本研究通过比较肝硬化到早期 HCC 的不同进展阶段和药物作用的表达谱, 从化合物库中筛选具有预防 HCC 活性的药物, 并对其作用机制进行探索。

## 1 材料和方法

1.1 癌前不同疾病阶段肝组织基因表达谱收集与分析 分别用“cirrhosis”和“hepatocellular

carcinoma”作为关键词, 从 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中搜索 HCC 相关表达谱数据, 并在结果中选取包含肝硬化到早期 HCC 不同进展阶段的表达谱 (accession number: GSE6764)。该数据集包含正常肝、肝硬化、低度不典型结节 (low-grade dysplastic nodule, LGDN)、高度不典型结节 (high-grade dysplastic nodule, HGDN)、早期 HCC 和晚期 HCC 等不同进展阶段的 75 例肝组织样本。下载其原始数据 (cel 文件), 并用 R 语言 affy 软件包的 Robust Multi-Array Average (RMA) 算法进行预处理。本研究重点关注肝硬化、LGDN、HGDN 和早期 HCC 阶段, 用贝叶斯算法计算这 4 个相邻阶段的差异表达基因, 并按计算出的  $P$  值各选取上调和下调的前 300 个基因作为疾病阶段的特征基因。

1.2 作用于人肝癌细胞系 HepG2 的药物与小分子作用基因表达谱分析 下载 LINCS 计划中 level4 数据, 用 R 语言 cmapR-master 软件包解析 gctx 文件, 提取其中作用于 HepG2 细胞的表达谱 18 239 个, 涉及 3 927 种药物和小分子化合物, 将同种化合物表达谱合并, 计算药物作用后基因的表达变化。

1.3 利用基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) 算法筛选预防 HCC 候选药物 用 GSEA 算法加权模式计算 3 组特征基因与药物作用表达谱的富集分数 (enrichment score, ES)。首先计算上调特征基因的富集分数 ( $ES_{up}$ ), 然后计算下调特征基因的富集分数 ( $ES_{dn}$ ), 最终 ES 计算公式为  $ES = (ES_{up} - ES_{dn}) / 2$ 。为了计算 ES 显著性, 随机打乱药物作用表达谱顺序并计算特征基因与随机顺序的  $ES'$ , 该过程重复 1 000 次, 统计随机过程中  $ES'$  高于 ES 的次数 (记为  $N$ ), 则 ES 对应的  $P$  值为  $N/1\ 000$ , 选择其中与疾病进展阶段表达谱呈负相关的药物 ( $ES < -0.15, P < 0.05$ )。

1.4 预防 HCC 候选药物作用基因相互作用网络与通路富集分析 以 1.5 倍变化作为阈值筛选 HCC 候选预防药物影响基因, 并取其交集, 整合 KEGG

(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 基因调控网络和蛋白相互作用网络<sup>[8]</sup>, 以计算出的候选药物显著影响基因作为“种子”基因构建候选药物的作用网络, 确定其中的关键节点。使用 R 语言 clusterProfiler 软件包<sup>[9]</sup>进行通路富集分析。

## 2 结果

**2.1 数据预处理** 首先确定肝硬化到早期 HCC 不同进展阶段的特征基因, 分析过程如图 1 所示。C-L、L-H 和 H-E 分别代表肝硬化到 LGDN、LGDN 到 HGDN、HGDN 到早期 HCC 进展阶段, 各提取显著上调和下调的前 300 个基因作为特征基因。提取 LINCS 中 3 927 种药物的表达谱, 用 GSEA 算法计算其与疾病进展特征的相似性。

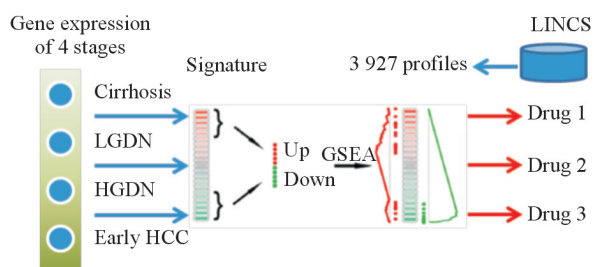


图 1 数据分析过程示意图

Fig 1 Scheme of data analysis

LGDN: Low-grade dysplastic nodule; HGDN: High-grade dysplastic nodule; HCC: Hepatocellular carcinoma; GSEA: Gene set enrichment analysis; LINCS: Library of Integrated Network-based Cellular Signatures. Drug 1, drug 2 and drug 3 represent the predicted drugs

**2.2 预防 HCC 候选药物筛选** 我们发现 4 种、5 种和 7 种药物可分别用于 C-L、L-H 和 H-E 阶段的治疗 (表 1), 进一步从 DrugBank 数据库 (<http://www.drugbank.ca/>) 中确定这些药物作用的靶标有 44 个, 包括表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, *EGFR*)、Jun 原癌基因 (Jun proto-oncogene, *JUN*; AP-1 transcription factor subunit) 和 SRC 原癌基因 (SRC proto-oncogene, *SRC*; non-receptor tyrosine kinase) 等重要癌基因。3 个进展阶段、预测药物和作用靶标关联网络如图 2 所示。其中部分药物已被报道具有抗 HCC 和其他肿瘤活性作用, 如姜黄素可以通过抗 HCC 病毒、抗氧自由基和其他有毒物质, 在 HCC 癌前阶段发挥肝脏保护作用<sup>[10]</sup>, 同时姜黄素还可调节细胞自噬, 在 HCC 的发展过程中达到抗 HCC 效果<sup>[11]</sup>, 美国国立肿瘤研究所已将其列为第 3 代癌症化学预防药。葱贝素是一种 X 连锁凋亡抑制蛋白 (X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP) 的小分子抑制剂, 研究发现葱贝素可通过阻断核因子  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路抑制 HCC 细胞增殖<sup>[12]</sup>。这些结果表明本研究所用方法的有效性。本研究发现入核受体抑制剂 importazole、吡考他胺和紫杉醇这 3 种药物除了阻断本阶段疾病外 ( $ES < -0.15$ ), 对另外 2 个阶段也有一定的阻断作用 ( $ES < -0.1$ )。

表 1 HCC 不同进展阶段的预测药物

Tab 1 Drugs predicted for HCC with different stages

C-L		L-H		H-E	
Drug	ES	Drug	ES	Drug	ES
Imatinib	-0.22	Embelin	-0.21	Curcumin	-0.24
Methylergometrine	-0.20	Alverine	-0.19	Importazole	-0.20
Podophyllotoxin	-0.19	Paclitaxel	-0.18	Erlotinib	-0.19
Auranofin	-0.16	Dasatinib	-0.17	Moxonidine	-0.18
		Picotamide	-0.16	Vinblastine	-0.17
				Palitaxel	-0.16
				Picotamide	-0.16

HCC: Hepatocellular carcinoma; C: Cirrhosis; L: Low-grade dysplastic nodule; H: High-grade dysplastic nodule; E: Early hepatocellular carcinoma; ES: Enrichment score

**2.3 3 种预防 HCC 候选药物作用机制探索** 共得到 120 个显著差异表达基因, 其中 62 个上调、58 个

下调, 其热图如图 3 所示。从图中可以看出 3 种药物 (importazole、吡考他胺、紫杉醇) 作用模式相

似,且与肝硬化到早期 HCC 的不同进展阶段基因表达模式呈负相关,从转录水平证明了这 3 种药物对肝硬化到早期 HCC 的进展有阻碍作用。

细胞因子-受体相互作用,提示这 3 种药物可能通过这些通路发挥预防 HCC 的作用。

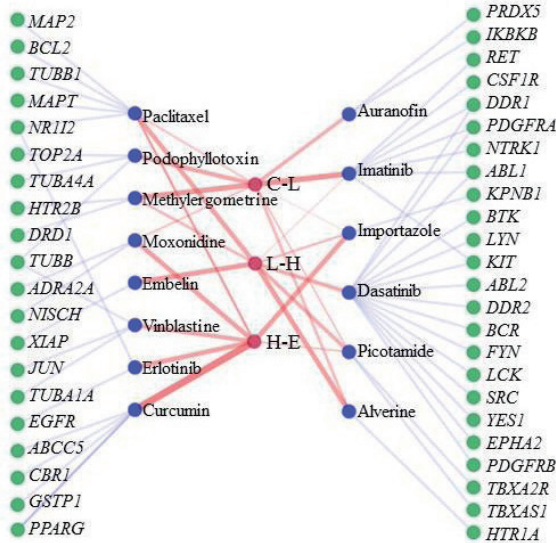


图2 疾病阶段(红色节点)、预测药物(蓝色节点)和靶标(绿色节点)关联网络

Fig 2 Association network of disease stages (red nodes), predicted drugs (blue nodes) and their targets (green nodes)

Different disease stages and the drugs were connected by red lines, and the width represents the degree of negative correlation. C: Cirrhosis; L: Low-grade dysplastic nodule; H: High-grade dysplastic nodule; E: Early hepatocellular carcinoma

2.4 药物作用网络与功能富集分析 将 KEGG 基因调控网络和蛋白相互作用网络整合,最终得到包含 12 906 个基因、49 584 个相互作用关系的背景网络。以 120 个显著差异表达的基因作为“种子”构建药物激活子网,如图 4A 所示。为了确定网络中的核心分子,本研究计算了网络中基因的连接度,筛选了连接度 >10 的枢纽基因,分别是肿瘤蛋白 P53 (tumor protein P53, TP53)、EGFR、信号转导和转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、胰岛素样生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R) 和 BCL-2,提示这些基因在药物作用中发挥重要作用。对 3 种药物 (importazole、吡考他胺、紫杉醇)影响的基因进行通路富集分析,发现 10 条通路显著富集 (P<0.01),其中最显著的 5 条通路分别是肿瘤相关通路、p53 信号通路、黏附斑、视黄醇代谢及

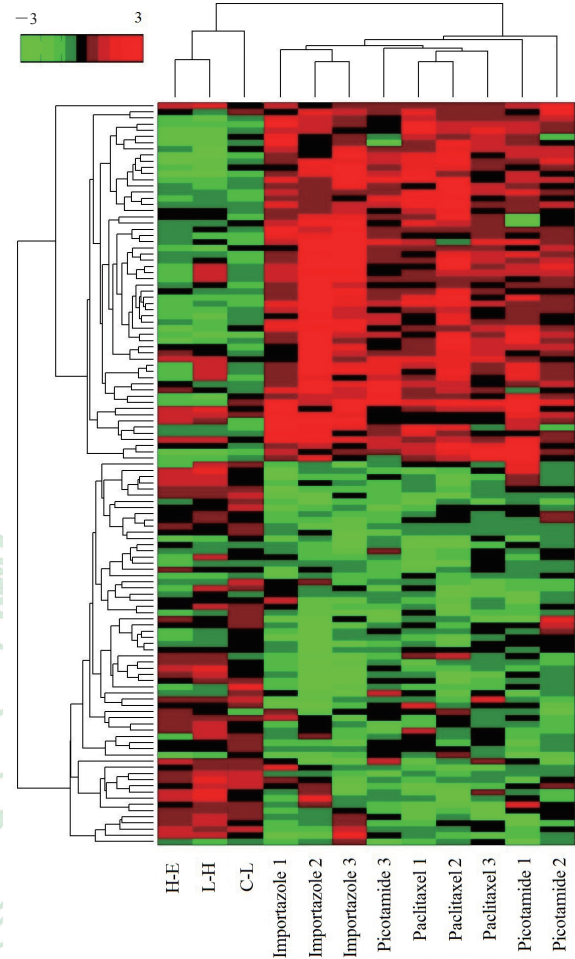


图3 HCC 不同进展阶段和 3 种药物表达谱热图

Fig 3 Heatmap of gene expression profiles of HCC with different stages and 3 drugs

There are 3 samples for each of the 3 drugs including importazole, picotamide and paclitaxel, which are labeled as 1, 2 and 3. HCC: Hepatocellular carcinoma; C: Cirrhosis; L: Low-grade dysplastic nodule; H: High-grade dysplastic nodule; E: Early hepatocellular carcinoma

### 3 讨论

与传统的药物研发策略相比,药物重定位具有成本低、研究周期短、风险小等优势,目前成功进行重定位的药物已超过 100 种,近年重定位类药物占美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 所有新批准药物的 30%<sup>[13]</sup>。目前抗 HCC 药物的研发多针对晚期 HCC,以期延长患者的生存时间;临床和基础研究的数据表明 HCC 预防和早期干预同样重要,并有望获得更好的临床和经济效益<sup>[14]</sup>。本研究关注肝硬化到早

期 HCC 的不同进展阶段, 首次利用药物重定位策略, 通过转录组比较方法从 3 927 种化合物中筛选出阻断 HCC 癌前不同进展阶段的药物, 部分药物

已被证明具有抗 HCC 或抗其他肿瘤的作用, 如紫杉醇<sup>[15]</sup>、姜黄素<sup>[11]</sup>、葱贝素<sup>[12]</sup>、达沙替尼<sup>[16]</sup>和厄洛替尼<sup>[17]</sup>等。

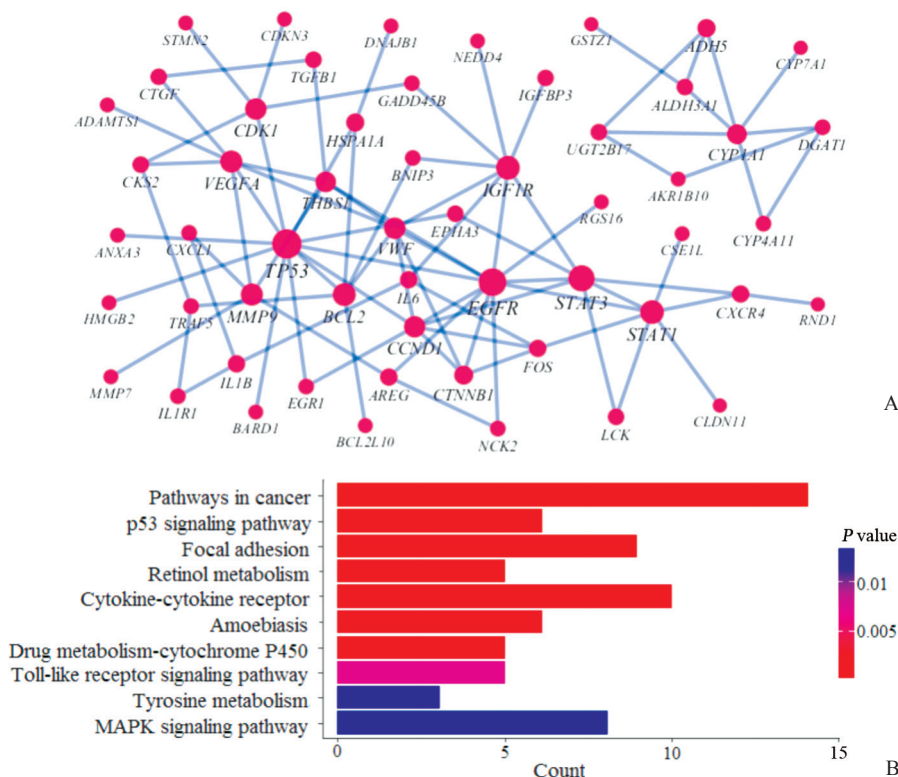


图 4 差异表达基因的相互作用网络 (A) 和通路富集分析 (B)

Fig 4 Interaction network (A) and pathway enrichment analysis (B) of the differentially expressed genes

本研究发现 importazole、吡考他胺和紫杉醇对 HCC 癌前不同进展阶段均有一定阻断作用, 其中 importazole 和紫杉醇已被证明具有抑制 HCC 细胞增殖的作用<sup>[18-19]</sup>。吡考他胺是一种新型的血小板抑制剂, 用于预防和治疗血栓栓塞性疾病, 其抗癌活性尚未见报道。血小板是血管稳态的重要效应因子, 有研究表明阿司匹林和氯吡格雷在乙型肝炎病毒相关急、慢性肝病中发挥重要作用, 可改善 HCC 患者预后<sup>[20]</sup>, 本研究结果提示吡考他胺对 HCC 有预防作用。本研究用网络药理学方法构建了药物作用网络, 发现 importazole、吡考他胺和紫杉醇可以影响多个在 HCC 发生、发展过程中发挥重要功能的基因, 包括 TP53、EGFR、STAT3、IGF1R 和 BCL-2 等, 并通过 p53 信号通路、黏附斑、视黄醇代谢及细胞因子-受体相互作用等通路发挥作用。

综上所述, 本研究整合了 LINCS、DrugBank

数据库及基因相互作用网络等多个数据库, 综合运用药物重定位和网络药理学的方法, 确定了 3 种 HCC 预防性药物 (importazole、吡考他胺和紫杉醇), 特别提示抗血小板治疗在预防 HCC 发生中的可能作用, 为后续研究提供了线索。

#### [参 考 文 献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, ZHANG S, ZENG H, BRAY F, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66: 115-132.
- [2] JIN G, WONG S T. Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines[J]. Drug Discov Today, 2014, 19: 637-644.
- [3] ZHENG L, YANG W, WU F, WANG C, YU L, TANG L, et al. Prognostic significance of AMPK activation and therapeutic effects of metformin in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19: 5372-5380.
- [4] LV H, WANG C, FANG T, LI T, LV G, HAN Q, et al. Vitamin C preferentially kills cancer stem cells in

- hepatocellular carcinoma via SVCT-2[J/OL]. NPJ Precis Oncol, 2018, 2: 1. doi: 10.1038/s41698-017-0044-8.
- [5] SIROTA M, DUDLEY J T, KIM J, CHIANG A P, MORGAN A A, SWEET-CORDERO A, et al. Discovery and preclinical validation of drug indications using compendia of public gene expression data[J/OL]. Sci Transl Med, 2011, 3: 96ra77. doi: 10.1126/scitranslmed.3001318.
- [6] CHEN B, WEI W, MA L, YANG B, GILL R M, CHUA M S, et al. Computational discovery of niclosamide ethanolamine, a repurposed drug candidate that reduces growth of hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and in mice by inhibiting cell division cycle 37 signaling[J]. Gastroenterology, 2017, 152: 2022-2036.
- [7] CORSELLO S M, BITTKER J A, LIU Z, GOULD J, MCCARREN P, HIRSCHMAN J E, et al. The Drug Repurposing Hub: a next-generation drug library and information resource[J]. Nat Med, 2017, 23: 405-408.
- [8] KESHAVA PRASAD T S, GOEL R, KANDASAMY K, KEERTHIKUMAR S, KUMAR S, MATHIVANAN S, et al. Human Protein Reference Database—2009 update[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(Database issue): D767-D772.
- [9] YU G, WANG L G, HAN Y, HE Q Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. OMICS, 2012, 16: 284-287.
- [10] AFRIN R, ARUMUGAM S, RAHMAN A, WAHED M I, KARUPPAGOUNDER V, HARIMA M, et al. Curcumin ameliorates liver damage and progression of NASH in NASH-HCC mouse model possibly by modulating HMGB1-NF- $\kappa$ B translocation[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 44: 174-182.
- [11] 尹煜鹏,孙树汉. 姜黄素诱导人肝癌细胞系 Huh7 自噬和凋亡[J]. 第二军医大学学报, 2019, 40: 38-42.
- YIN Y P, SUN S H. Curcumin inducing autophagy and apoptosis of human hepatocarcinoma cell line Huh7[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40: 38-42.
- [12] 王世兵,雷文,徐燕华,郭科妮,王毅刚. 葱贝素(Embelin)通过阻断 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制肝癌细胞 Bel-7404 生长的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 12: 161-167.
- [13] MULLARD A. 2014 FDA drug approvals[J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14: 77-81.
- [14] NAKAGAWA S, WEI L, SONG W M, HIGASHI T, GHOSHAL S, KIM R S, et al. Molecular liver cancer prevention in cirrhosis by organ transcriptome analysis and lysophosphatidic acid pathway inhibition[J]. Cancer Cell, 2016, 30: 879-890.
- [15] JIN C, BAI L, LIN L, WANG S, YIN X. Paclitaxel-loaded nanoparticles decorated with bivalent fragment HAb18 F(ab')<sub>2</sub> and cell penetrating peptide for improved therapeutic effect on hepatocellular carcinoma[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46: 1076-1084.
- [16] HEKIM C, ILANDER M, YAN J, MICHAUD E, SMYKLA R, VÄHÄ-KOSKELA M, et al. Dasatinib changes immune cell profiles concomitant with reduced tumor growth in several murine solid tumor models[J]. Cancer Immunol Res, 2017, 5: 157-169.
- [17] TANI T, NAOKI K, YASUDA H, ARAI D, ISHIOKA K, OHGINO K, et al. A phase II trial of induction of erlotinib followed by cytotoxic chemotherapy for EGFR mutation-positive non-squamous non-small cell lung cancer patients[J/OL]. Cancer Chemother Pharmacol, 2019. doi: 10.1007/s00280-019-03934-y.
- [18] SODERHOLM J F, BIRD S L, KALAB P, SAMPATHKUMAR Y, HASEGAWA K, UEHARA-BINGEN M, et al. Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin- $\beta$ [J]. ACS Chem Biol, 2011, 6: 700-708.
- [19] WANG T H, WANG H S, SOONG Y K. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together[J]. Cancer, 2000, 88: 2619-2628.
- [20] AIOLFI R, SITIA G. Emerging role of dual antiplatelet therapy in the prevention of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatocell Carcinoma, 2014, 1: 183-186.

[本文编辑] 尹 茶