

• 论 著 •

基于生物信息学筛选与铁死亡有关的非小细胞肺癌 EGFR-TKIs 耐药 DEGs^{*}

冯 英^{1,2}, 郑 瑶³, 仇成凤^{3,4}, 谭力铭^{1,2△}

1. 徐州医科大学药学院, 江苏徐州 221000; 2. 怀化市第二人民医院肿瘤防治怀化市重点实验室, 湖南怀化 418000; 3. 吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南吉首 416000; 4. 湖南医药学院总医院循证医学与临床研究中心, 湖南怀化 418000

摘要:目的 基于生物信息学筛选与铁死亡有关的非小细胞肺癌(NSCLC)表皮生长因子受体(EGFR)-酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)耐药差异表达基因(DEGs)。方法 从基因表达综合数据库(GEO)中选取 NSCLC EGFR-TKIs 耐药的细胞测序基因集 GSE117846, 从中筛选 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 1$ (FC 表示变化倍数) 的 DEGs。利用 FerrDb 数据库获取铁死亡相关基因。采用 jvenn 对从 GSE117846 数据集中筛选得到的 DEGs 与从 FerrDb 数据库中获取的铁死亡相关基因取交集。对交集基因进行基因本体论(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析, 并绘制蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络。采用 Cytoscape 软件中的 Cytohubba 插件计算交集基因的评分, 取评分前 10 的基因用于 Hub 基因的筛选。利用 ULCAN 和 GEPIA2 数据库分析 Hub 基因在 NSCLC 中的表达及对患者生存预后的影响。通过实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 Hub 基因 mRNA 在 NSCLC 患者癌组织和癌旁组织及体外细胞中的相对表达水平, 验证生物信息学的分析结果。结果 共筛选获得 60 个与铁死亡有关的 NSCLC EGFR-TKIs 耐药 DEGs, 包括 30 个上调基因和 30 个下调基因。这 60 个基因主要富集在 P53 信号通路、铁死亡通路、FoxO 信号通路。PPI 网络中有 57 个节点和 99 条边, 平均聚类系数为 0.377, PPI 富集 $P < 0.01$ 。Cytohubba 插件筛选得到的 Hub 基因为肿瘤蛋白 P63(TP63)。ULCAN 和 GEPIA2 数据库分析显示, 肺腺癌组织中的 TP63 表达水平低于正常组织, 而肺鳞癌组织中的 TP63 表达水平高于正常组织, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 在肺腺癌患者中, TP63 高、低表达组的生存预后比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 而在肺鳞癌患者中, TP63 低表达组的生存预后较好, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。qPCR 检测显示, 与癌旁组织相比, TP63 mRNA 在肺鳞癌组织中高表达, 在肺腺癌组织中低表达, 差异均有统计性意义($P < 0.05$); 在体外细胞中检测到 TP63 mRNA 在对吉非替尼耐药的 PC9/GR 细胞中表达下调($P < 0.05$), 与生物信息学的分析结果一致。结论 TP63 可能为连接 NSCLC EGFR-TKIs 耐药与铁死亡的重要基因。

关键词: 铁死亡; 非小细胞肺癌; 表皮生长因子受体; 酪氨酸激酶抑制剂; 耐药; 生物信息学分析
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.06.020 **中图法分类号:** R734.2
文章编号: 1673-4130(2024)06-0744-07 **文献标志码:** A

Bioinformatics-based screening for ferroptosis-related DEGs of EGFR-TKIs resistance in non-small cell lung cancer^{*}

FENG Ying^{1,2}, ZHENG Yao³, QIU Chengfeng^{3,4}, TAN Liming^{1,2△}

1. School of Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China; 2. Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment of Huaihua, Second People's Hospital of Huaihua City, Huaihua, Hunan 418000, China; 3. College of Biology and Environmental Science, Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China; 4. Evidence-based Medicine and Clinical Research Center, General Hospital of Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan 418000, China

Abstract: **Objective** To screen for ferroptosis-related differentially expressed genes (DEGs) of epidermal growth factor receptor (EGFR)-tyrosine kinase inhibitors (TKIs) resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The gene sequencing dataset GSE117846 of NSCLC EGFR-TKIs resistant cells was selected from the Gene Expression Omnibus data base (GEO) and screened for DEGs with $P < 0.05$ and $|\log_2 FC| \geq 1$. Ferroptosis-related genes were collected using the FerrDb database and jvenn was used to intersected the

^{*} 基金项目: 湖南省卫健委科技计划项目(202104081730); 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30462); 怀化市科技创新平台项目(2021R2206)。
作者简介: 冯英, 女, 在读硕士研究生, 主要从事肺癌的相关研究。△ 通信作者, E-mail: tanliming1973@126.com。

DEGs screened from GSE117846 dataset with the ferroptosis-related genes obtained from FerrDb database. GO function and KEGG pathway enrichment analysis of intersection genes were performed, and protein-protein interaction (PPI) network was drawn. The score of intersection genes was calculated by using Cytohubba plug-in in Cytoscape software, and the top 10 genes were used for Hub genes screening. ULCAN and GEPIA2 databases were used to analyze the expression of Hub genes in NSCLC and its effect on the survival prognosis of patients. Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was used to detect the relative expression levels of Hub gene mRNA in NSCLC patients' cancer tissues, adjacent tissues and in vitro cells to verify the results of bioinformatics analysis. **Results** A total of 60 ferroptosis-related DEGs of EGFR-TKIs resistance in NSCLC were screened out, including 30 up-regulated genes and 30 down-regulated genes. The 60 genes were mainly enriched in P53 signaling pathway, ferroptosis pathway and FoxO signaling pathway. There were 57 nodes and 99 edges in the PPI network, with an average clustering coefficient of 0.377 and PPI enrichment $P < 0.01$. The Hub gene screened out by Cytohubba plug-in was tumor protein P63 (TP63). ULCAN and GEPIA2 database analysis showed that the expression of TP63 in lung adenocarcinoma tissue was significantly lower than that in normal tissue, while the expression of TP63 in lung squamous cell carcinoma tissue was significantly higher than that in normal tissue, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). In patients with lung adenocarcinoma, there was no significant difference in the survival prognosis between TP63 high and low expression groups ($P > 0.05$), while in patients with lung squamous cell carcinoma, the survival prognosis of TP63 low expression group was better, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). QPCR showed that TP63 mRNA highly expressed in lung squamous cell carcinoma tissue and lowly expressed in lung adenocarcinoma tissue compared with adjacent tissues ($P < 0.05$). The expression of TP63 mRNA was down-regulated in gefitinib-resistant PC9/GR cells ($P < 0.05$), which was consistent with the results of bioinformatics analysis. **Conclusion** TP63 may be an important gene linking NSCLC EGFR-TKIs resistance to ferroptosis.

Key words: ferroptosis; non-small cell lung cancer; epidermal growth factor receptor; tyrosine kinase inhibitors; resistance to drugs; bioinformatic analysis

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤,从癌细胞形态及病理角度将肺癌分为小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),其中 NSCLC 占 80%~85%^[1]。表皮生长因子受体(EGFR)是 NSCLC 中最常见的驱动基因之一。酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)是治疗携带 EGFR 突变的局部晚期或转移性 NSCLC 患者的标准一线疗法^[2]。本研究使用的 GSE117846 数据集主要聚焦第一代 EGFR-TKIs。第一代 EGFR-TKIs 包括厄洛替尼和吉非替尼等,大多数 EGFR 突变的 NSCLC 患者在接受第一代 EGFR-TKIs 治疗 9~13 月后出现获得性耐药与疾病进展^[3]。有研究表明,EGFR-TKIs 耐药机制主要包括原发性耐药和获得性耐药,获得性耐药机制主要包括 EGFR T790M 突变、间质表皮转化因子(MET)扩增、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)突变等,其中 EGFR T790M 突变约占第一代 EGFR-TKIs 获得性耐药机制的 50%~60%^[4]。EGFR-TKIs 获得性耐药是一个复杂的过程,目前其确切分子机制尚不清楚。铁死亡是一种铁依赖非凋亡性细胞死亡,本质上是膜脂质修复酶活性衰竭、细胞内脂质过氧化物代谢紊乱、铁依赖的脂质活性氧自由基积累导致的细胞死亡,与细胞凋亡、坏死、自噬在形态学、遗传学和生化特性上有明显区别,同时与癌症的发生、发展密切相关^[5]。KUKULJ 等^[6]研究发现铁蛋白在 NSCLC 患者组织中普遍高表达,与肿瘤患者不良预后有关。相关研究表明,铁死亡还参与某些癌

症耐药性的发生和逆转^[7-8],调节铁死亡可以影响抗癌药物的疗效^[9]。本研究通过生物信息学分析筛选出与 EGFR-TKIs 耐药相关的铁死亡基因,旨在寻找 NSCLC 潜在的干预靶点及生物标志物,为 NSCLC EGFR-TKIs 耐药基因表达综合数据库患者的治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 数据来源 在基因表达综合数据库(GEO)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中下载基因表达谱数据集 GSE117846。该数据集是在对耐药细胞进行不同处理后,获取的耐药细胞 RNA-seq 基因表达谱,技术平台为 GPL21290;Illumina HiSeq 3000 (Homo sapiens)。通过 FerrDb 数据库(<http://www.zhounan.org/ferrdb>)获取铁死亡相关基因,包括驱动基因(370 个)、抑制基因(349 个)及标记基因(12 个),去除非人类基因和重复基因,最后得到 382 个基因。NSCLC 患者的肿瘤组织与正常组织的基因表达数据均来自 TCGA 公共数据集(<https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>),包括肺鳞癌(LUSC)患者肿瘤组织数据 503 例及正常组织数据 52 例、肺腺癌(LUAD)患者肿瘤组织数据 515 例及正常组织数据 59 例。

1.2 方法

1.2.1 DEGs 筛选 通过 GEO 自带的基因差异分析工具(GEO2R)分析 GSE117846 数据集中的

DEGs,以 $P<0.05$ 且 $|\log_2FC|\geq 1$ 为筛选条件,FC 表示变化倍数。利用在线工具 jvenn(<https://www.bioinformatics.com.cn>) 将从 GSE117846 数据集筛选出的 DEGs 及从 FerrDb 数据库获取的铁死亡相关基因构建 Venn 图,得到与铁死亡相关的 NSCLC EGFR-TKIs 耐药 DEGs。

1.2.2 DEGs 的功能和通路分析 使用在线工具 DAVID 2021 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行 DEGs 的功能和通路分析,导入并查看 DEGs 的基因本体论 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路富集分析结果。

1.2.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建 将交集基因导入 STRING 11.5 (<https://string-db.org/>) 数据库分析 PPI,并利用 CytoScape3.9.1 中 cytoHubba 插件的最大邻域分量 (MNC)、最大团中心性 (MCC)、边缘渗透分量 (EPC) 和最大邻域分量的密度 (DMNC) 4 种算法筛选出交集基因中的关键基因 (Hub 基因)。

1.2.4 表达差异和生存分析 利用 ULCAN 数据库对 Hub 基因在 NSCLC 肿瘤组织和正常组织中的表达水平进行差异分析。同时,利用 GEPIA2 数据库比较 Hub 基因表达水平在 NSCLC 不同分期间的差异,并绘制不同 Hub 基因表达水平 NSCLC 患者的生存曲线 (以 Hub 基因的中位表达水平作为判断表达水平高低的临界值,以累积生存率作为统计指标)。

1.2.5 NSCLC 组织来源和实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测 5 对 NSCLC 组织及癌旁组织取自 2021 年怀化市第二人民医院经病理学检查确诊的 NSCLC 患者手术切除组织。所有标本置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存。本研究得到了怀化市第二人民医院伦理审查委员会的批准。使用 TRI 试剂 (Sigma 公司) 分别从组织样品中提取总 RNA,用 Maxima H Minus 第一链 cDNA 合成试剂盒 (Thermo Fisher Scientific 公司) 合成 cDNA,最终反应体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。根据试剂盒

说明,进行 qPCR 检测。肿瘤蛋白 P63 (TP63) 和内参基因 GAPDH 的引物序列均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。qPCR 扩增条件为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}\ 2\text{ min}$, $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 2\text{ min}$, $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 15\text{ s}$, $55\text{ }^{\circ}\text{C}\ 15\text{ s}$, $72\text{ }^{\circ}\text{C}\ 1\text{ min}$ 共 40 次循环,实验重复 3 次。TP63 的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行计算。引物序列见表 1。

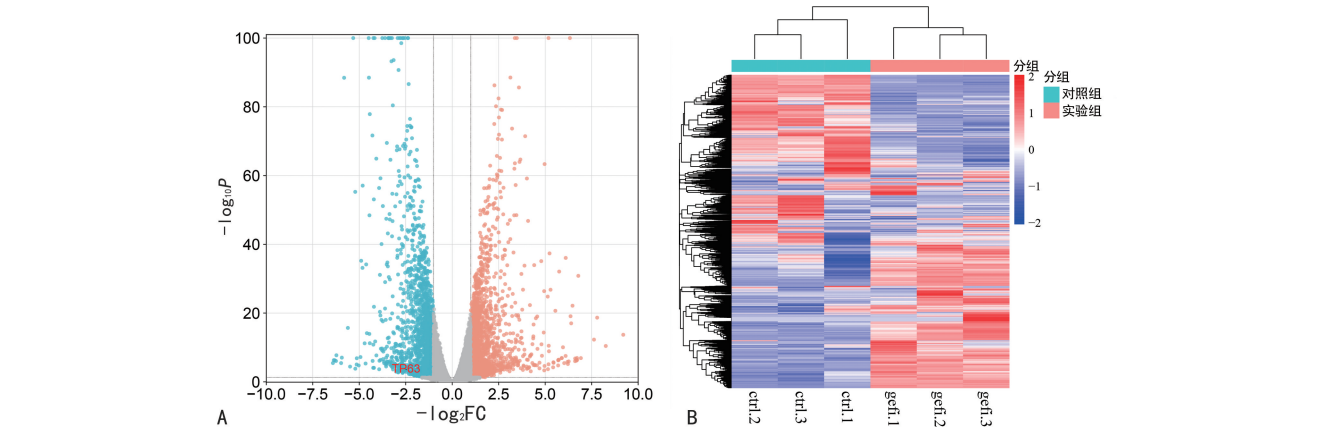
表 1 qPCR 检测的引物序列	
基因	引物序列 (5'-3')
GAPDH	正向:GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	反向:GGCTGTTGTCTACTTCTCATGG
TP63	正向:TCGACAGTACAAAGAACGGTGGTGCG
	反向:TCATAAGTCTCACGGCCCTCACTGG

1.2.6 体外细胞实验 将人肺癌细胞 PC-9 和对吉非替尼耐药的 PC-9/GR 细胞用于体外细胞实验,实验分组处理情况如下。PC-9 组:作为对照,PC-9 细胞培养基中加入 DMSO;PC-9+吉非替尼组:PC-9 细胞培养基中加入终浓度为 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的吉非替尼处理 24 h;PC-9/GR 组:PC-9/GR 细胞培养基中加入终浓度为 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的吉非替尼处理 48 h。细胞分组处理完成后,去除细胞培养基,用 PBS 洗 2 遍。参考 1.2.5 中的方法检测细胞中 TP63 的相对表达水平,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9 和 SPSS23.0 软件对实验数据进行统计分析。所有实验重复 3 次,符合正态分布且方差齐的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK- q 检验。生存曲线分析中,累积生存率的比较采用 Log-rank χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NSCLC EGFR-TKIs 耐药的 DEGs 筛选 对 GSE117846 数据集中的 6 例样本表达数据进行差异分析,筛选符合 $P<0.05$ 且 $|\log_2FC|\geq 1$ 的 DEGs,最终得到 3 716 个差异基因,其中有 1 744 个上调基因和 1 972 个下调基因,见图 1。



注:A 为 EGFR-TKIs 耐药 DEGs 火山图,蓝色圆点代表表达下调的 DEGs,粉色圆点代表表达上调的 DEGs,灰色圆点代表表达无明显差异的基因;B 为 EGFR-TKIs 耐药 DEGs 热图,对照组加入 DMSO,实验组加入吉非替尼,红色表示上调,蓝色表示下调,ctrl. 1~3 表示对照组 1~3 号样本,gefi. 1~3 表示实验组 1~3 号样本。

图 1 EGFR-TKIs 耐药 DEGs 的筛选

2.2 筛选与 NSCLC EGFR-TKIs 耐药及铁死亡相关的 DEGs 通过 FerrDb 数据库获得铁死亡相关的基因共 382 个,与 GSE117846 数据集筛选所得的耐药相关的 DEGs 取交集,得到 60 个与铁死亡相关的 NSCLC EGFR-TKIs 耐药 DEGs,包括 30 个下调基因和 30 个上调基因。见图 2。

2.3 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 对 60 个交集基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,结果显示与铁死亡相关的 NSCLC EGFR-TKIs 耐药 DEGs 主要富集的生物过程(BP)包括蛋白质 ADP-核糖基化、p53 类介质对 DNA 损伤的内在凋亡信号通路、细胞对氧化应激的反应等,主要富集的细胞成分(CC)为细胞质基质、细胞核、核小体、线粒体、细胞质等,主要富集的分子功能(MF)为蛋白 ADP-核糖转移酶活性、NAD⁺ ADP-核糖基转移酶活性和核苷酸转移酶活性等。GO 功能富集分析主要显示了 BP、CC 和 MF 中 10 种富集最明显的途径(根据调整后的 P 值排名),见图 3A。KEGG 通路富集分析显示,与铁死亡相关的 NSCLC EGFR-TKIs 耐药 DEGs 主要参与铁死亡、P53 信号通

路、FoxO 信号通路等,同时也在肝细胞癌及癌症中微小核糖核酸(miRNA)的相关调控中发挥作用,见图 3B。**2.4 PPI 网络构建** 利用 STRING 数据库构建与铁死亡相关的 NSCLC EGFR-TKIs 耐药 DEGs 的 PPI 网络,选择综合得分 ≥ 0.4 的基因进行 PPI 构建。隐藏没有相互作用的节点,最终得到共有 57 个节点和 99 条边的 PPI 网络,平均局部聚类系数 0.377, PPI 富集 $P<0.01$,见图 4A。将 STRING 结果导入 Cytoscape 软件,通过 cytoHubba 插件中的“MNC”“MCC”“EPC”和“DMNC”4 种算法计算评分位于前 10 的基因,再利用 jvenn 筛选交集得到 TP63 基因,见图 4B。

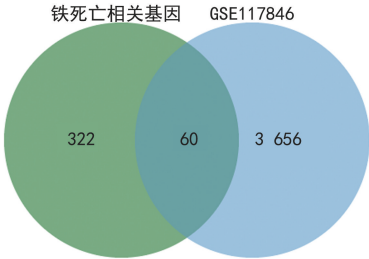
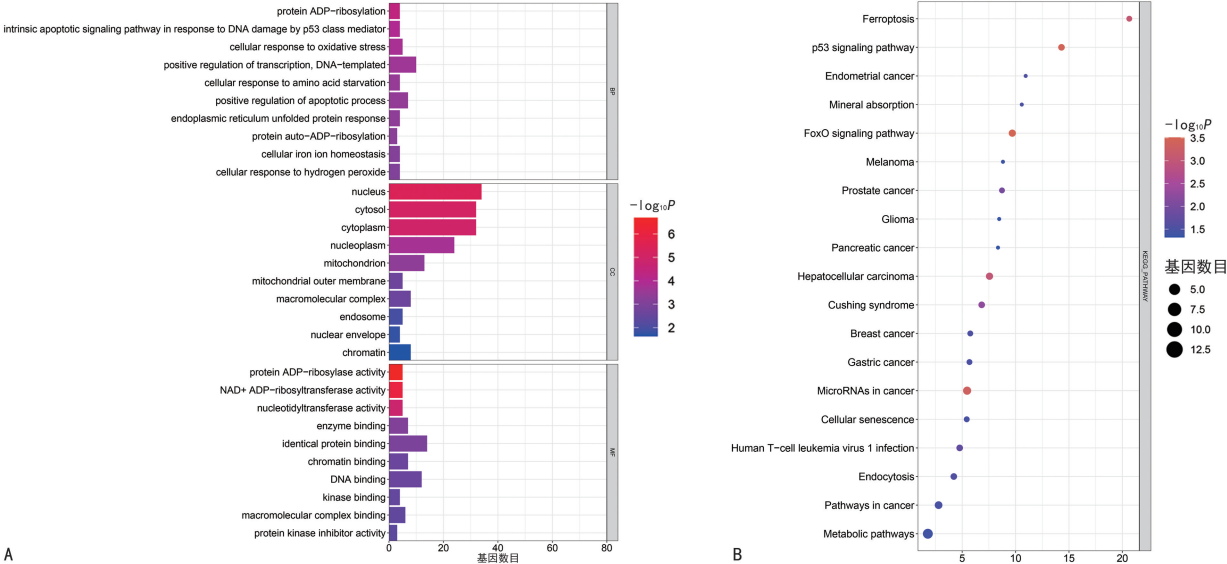
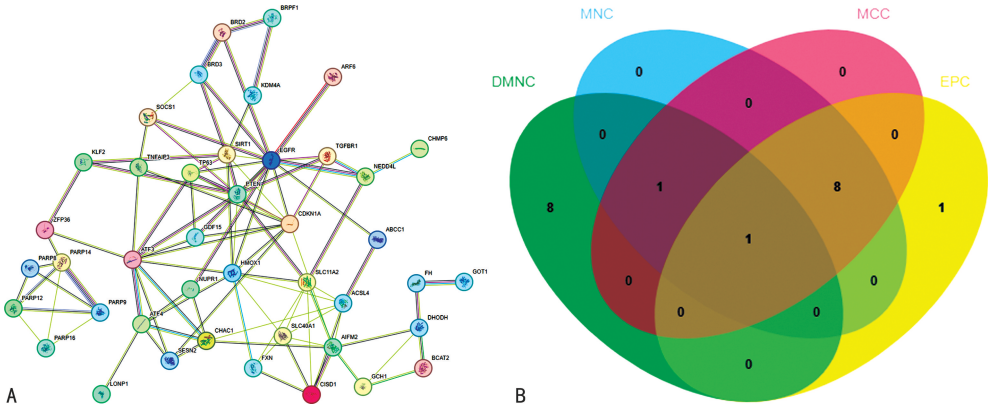


图 2 NSCLC EGFR-TKIs 耐药相关基因与铁死亡相关基因交集图



注:A 为 GO 功能分析;B 为 KEGG 通路富集分析。

图 3 交集基因富集分析的可视化结果



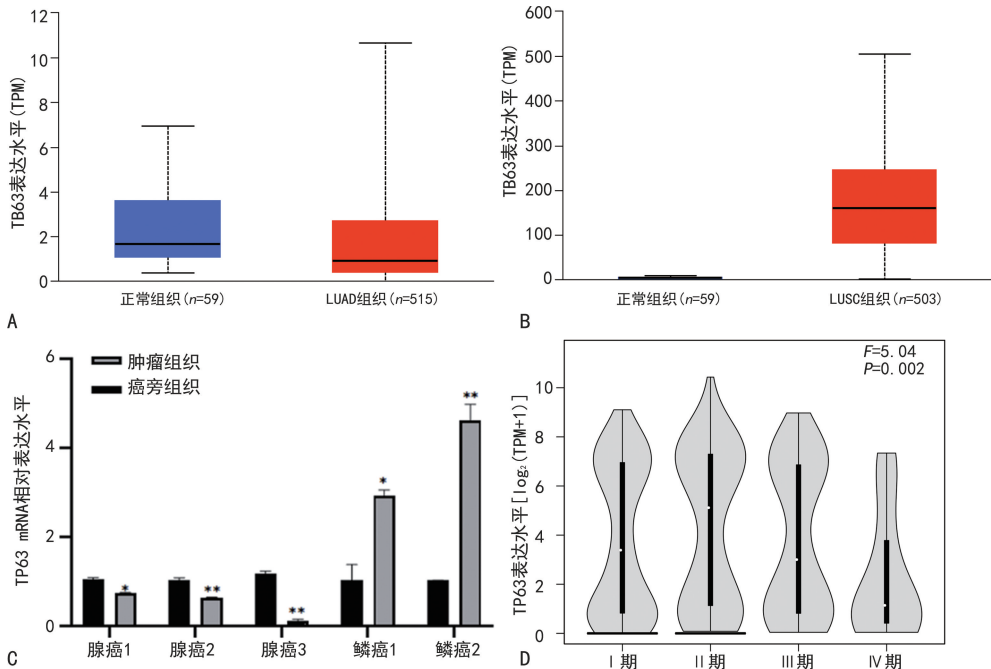
注:A 为交集基因的 PPI 网络分析;B 为 Hub 基因的筛选。

图 4 交集基因的 PPI 网络分析及 Hub 基因的筛选

2.5 Hub 基因 TP63 的表达分析 ULCAN 数据库分析显示,在 LUAD 组织中 TP63 表达水平明显低于正常组织 ($P<0.01$),见图 5A;在 LUSC 组织中 TP63 表达水平明显高于正常组织 ($P<0.01$),见图 5B。组织 qPCR 检测显示,与癌旁组织相比,TP63 mRNA 在 LUAD 中低表达,在 LUSC 中高表达,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),与 ULCAN 数据库分析得到的结果一致,见图 5C。GEPIA2 数据库分析显

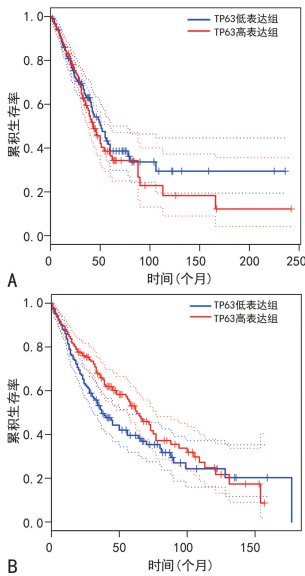
示,TP63 表达水平在不同分期 NSCLC 间比较,差异有统计学意义 ($F=5.04, P<0.01$),见图 5D。

2.6 不同 TP63 表达水平 NSCLC 患者的生存分析 GEPIA2 数据库分析显示,TP63 高表达组 (235 例)、低表达组 (239 例)LUAD 患者生存预后比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),见图 6A;TP63 低表达组 (241 例)的 LUSC 患者生存预后较高表达组 (241 例)差,Log-rank χ^2 检验 $P<0.05$,见图 6B。



注:TPM 表示每百万个转录片段;A、B 分别为 TP63 基因在 NSCLC、LUAD、LUSC 组织和癌旁组织中的表达水平,红色为 LUAD 或 LUSC 组织,蓝色为癌旁组织;C 为 TP63 在不同 NSCLC 组织中的相对表达水平,与癌旁组织比较, * $P<0.01$, * $P<0.05$;D 为 TP63 在 NSCLC 不同分期中的表达情况。

图 5 TP63 在 NSCLC 中的表达水平

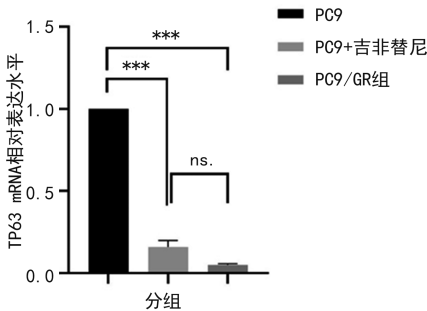


注:A 为 TP63 高/低表达的 LUAD 患者的生存曲线;B 为 TP63 高/低表达的 LUSC 患者的生存曲线。

图 6 不同 TP63 表达水平 LUAD、LUSC 患者的生存曲线

2.7 体外细胞实验 PC-9 组 TP63 mRNA 相对表达水平 (1.01 ± 0.01) 高于 PC-9/GR 组 (0.05 ± 0.01)

和 PC-9+吉非替尼组 (0.16 ± 0.05),差异均有统计学意义 ($P<0.001$),与 GSE117846 数据库分析的结果具有一致性。见图 7。



注:与 PC-9 组比较, * $P<0.001$;ns. 表示两组间比较差异无统计学意义。

图 7 各组细胞中 TP63 mRNA 的相对表达水平比较

3 讨论

目前,EGFR-TKIs 是治疗携带 EGFR 突变的局部晚期或转移性 NSCLC 患者的标准一线疗法^[2]。然而,大多数 EGFR 突变的 NSCLC 患者在接受第一代 EGFR-TKIs 治疗 9~13 个月后,会出现获得性耐药,促进疾病进展^[3]。有研究表明,铁死亡参与 NSCLC

EGFR-TKIs 耐药^[10-11],但铁死亡在 EGFR-TKIs 耐药中的具体机制尚不清楚,靶向铁死亡或许能为 NSCLC EGFR-TKIs 耐药干预提供新的思路。因此,本研究主要通过生物信息学分析挖掘 NSCLC EGFR-TKIs 耐药有关 DEGs 中与铁死亡相关的潜在靶基因,为 EGFR-TKIs 获得性耐药的干预提供新的思路。

本研究从 NSCLC EGFR-TKI 耐药数据集 GSE117846 和 FerrDb 数据库中筛选得到 TP63,而且在体外细胞实验中发现 TP63 mRNA 表达在 PC9/GR 细胞中下调,与生物信息学分析结果一致。初步推断 TP63 为 NSCLC EGFR-TKIs 耐药相关 DEGs 中与铁死亡相关的基因,但 TP63 在 NSCLC EGFR-TKIs 耐药与铁死亡中的作用需要进一步进行细胞功能实验确定。TP63 是 P53 转录因子家族的成员,其结构与序列与 P53 高度同源^[12]。TP63 因为启动子的不同和 3'端剪切方式的不同,可选择性剪接产生具有不同活性的亚型,根据 TP63 N 端转录来源的不同,可分为两种类型:较长 TA 异构体和较短 DN 异构体(DNp63 和 TAp63)。有研究表明,TP63 在肿瘤中的作用比较复杂,主要是由于 TP63 的两种异构体 TAp63 和 Δ Np63 亚型在癌症中起相反的作用^[13]。相关研究发现,TP63 在食管鳞癌、膀胱癌、宫颈癌、头颈部鳞状细胞癌等癌症中发挥抑癌或促癌作用^[14-15]。TIOFACK 等^[16]研究表明,TP63 基因多态性可增加乳腺癌发生的风险。TP63 与上皮恶性肿瘤高度相关,尤其是鳞状细胞癌^[12,17]。同时,有研究表明, Δ Np63 的异常表达与药物的耐药性有关, Δ Np63 的异常表达会影响食道鳞状细胞癌、乳腺癌等的化疗效果^[18-20]。此外,GALOZZOVA 等^[12]发现 EGFR 信号通路可能具有调控 Δ Np63 激活和表达的作用。目前,TP63 在 NSCLC EGFR-TKIs 耐药领域的研究较少,大部分是吉非替尼与 TP63 相关性的研究^[21-22],而且吉非替尼耐药与 TP63 表达之间相关性的研究结果不完全相同。杨颖等^[23]的研究报道,TP63 可能与 PC9 细胞耐药有关,而且在 PC9/GR 细胞中高表达并发挥 Δ Np63 的促癌特性。本研究结果显示,TP63 的表达与 PC9 细胞耐药有关,但 TP63 在 PC9/GR 细胞中 mRNA 表达下调。造成研究结果冲突的原因可能与 TP63 的多种亚型结构相关,具体机制需要进一步探究。

铁在决定细胞命运的内稳态调节和疾病中起着重要作用,当铁代谢失调时,会增加患者患癌的风险^[24]。相关研究表明,EGFR 可以通过铁蛋白的再分配破坏铁的稳态,促进肺癌的发展^[25]。本研究中与铁死亡相关的 NSCLC EGFR-TKIs 耐药的 GO 功能和 KEGG 通路富集多在氧化应激反应、P53 类介质对 DNA 损伤的内在凋亡信号通路、铁死亡和肝细胞癌等方面。已有研究表明, Δ Np63 α 可通过调节谷胱甘肽的合成、利用和再生,增加细胞对氧化应激和铁死亡的抵抗力^[26]。同时,WANG^[26]等证明了 Δ Np63 α 过表达可保护细胞免受氧化剂、DNA 损伤、失巢凋亡

或铁死亡诱导剂诱导的氧化应激损伤。WANG 等^[18]研究发现,在耐铂卵巢癌细胞中卷曲类受体 7(FZD7)的过表达可以激活致癌因子 TP63,驱动谷胱甘肽代谢途径的上调,保护细胞免受化疗诱导的氧化应激,促进卵巢癌发展。GUO 等^[27]研究发现,在胃癌中下调 FZD7 可进一步抑制由 TP63 表达下调介导的 GPX4 诱导的铁死亡。以上研究显示,TP63 可能是连接氧化应激-铁死亡的主要基因,其可能影响 NSCLC 的发生、发展以及第一代 EGFR-TKIs 疗效。但 TP63 的相关功能与分子机制仍需要大量基础实验进行研究和验证。

综上所述,本研究基于生物信息学分析筛选得到与铁死亡相关的 NSCLC EGFR-TKIs 耐药 DEG 基因为 TP63,并且对这一结果进行了初步的实验验证,发现 TP63 对 NSCLC 的预后评估具有一定的价值,可作为 EGFR-TKIs 耐药相关铁死亡的治疗靶点和 LUSC 预后生物标志物。然而,本研究仍存在一些局限性:一方面,GSE117846 数据集中的 EGFR-TKIs 耐药病例和人体组织样本较少,本研究筛选的 Hub 基因还需在后续研究中通过扩大样本量进一步验证。另一方面,本研究仅筛选到 TP63 基因,并富集了一些可能的信号通路。但 TP63 具有多种亚型结构,本研究推测 TP63 参与了 NSCLC 中与 EGFR-TKIs 耐药相关的铁死亡,其具体的分子机制和信号通路尚不清楚,有待后续研究中进一步探索。

参考文献

- [1] SUSTER D I,MINO-KENUDSON M. Molecular pathology of primary non-small cell lung cancer[J]. Arch Med Res,2020,51(8):784-798.
- [2] ETTINGER D S,WOOD D E,AISNER D L,et al. NCCN Guidelines insights:non-small cell lung cancer,version 2. 2021[J]. J Natl Compr Canc Netw,19(3):254-266.
- [3] WESTOVER D,ZUGAZAGOITIA J,CHO B C,et al. Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors[J]. Ann Oncol,2018,29(suppl 1):S10-S9.
- [4] DONG R F,ZHU M L,LIU M M,et al. EGFR mutation mediates resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in NSCLC:From molecular mechanisms to clinical research [J]. Pharmacol Res,2021,167:105583.
- [5] CHEN X,KANG R,KROEMER G,et al. Broadening horizons:the role of ferroptosis in cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol,2021,18(5):280-296.
- [6] KUKULJ S,JAGANJAC M,BORANIC M,et al. Altered iron metabolism, inflammation, transferrin receptors, and ferritin expression in non-small-cell lung cancer[J]. Med Oncol,2010,27(2):268-277.
- [7] FRIEDMANN ANGELI J P,KRYSKO D V,CONRAD M. Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion[J]. Nat Rev Cancer,2019,19(7):405-414.

[8] NI J, CHEN K, ZHANG J, et al. Inhibition of GPX4 or mTOR overcomes resistance to Lapatinib via promoting ferroptosis in NSCLC cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021 Aug 27; 567: 154-160.

[9] LI B, YANG L, PENG X, et al. Emerging mechanisms and applications of ferroptosis in the treatment of resistant cancers [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110710.

[10] XU C, JIANG Z B, SHAO L, et al. β -Elemene enhances erlotinib sensitivity through induction of ferroptosis by upregulating lncRNA H19 in EGFR-mutant non-small cell lung cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2023, 191: 106739.

[11] LAI X Y, SHI Y M, ZHOU M M. Dihydroartemisinin enhances gefitinib cytotoxicity against lung adenocarcinoma cells by inducing ROS-dependent apoptosis and ferroptosis[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2023, 39(7): 699-709.

[12] GALOCZOVA M, COATES P, VOJTESEK B. STAT3, stem cells, cancer stem cells and p63[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2018, 23: 12.

[13] CANDI E, DINSDALE D, RUFINI A, et al. TAp63 and Δ Np63 in cancer and epidermal development[J]. *Cell cycle*, 2007, 6(3): 274-285.

[14] BANKHEAD A, MCMASTER T, WANG Y, et al. TP63 isoform expression is linked with distinct clinical outcomes in cancer[J]. *EBioMedicine*, 2020, 51: 102561.

[15] LIU Y, ZHANG P, WU Q, et al. Long non-coding RNA NR2F1-AS1 induces breast cancer lung metastatic dormancy by regulating NR2F1 and Δ Np63[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5232.

[16] TIOFACK A T Z, SIMO G, OFON E, et al. The TP63 gene polymorphism rs17506395 is associated with early breast cancer in cameroon[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2020, 21(8): 2199-2208.

[17] KRIEGSMANN K, CREMER M, ZGORZELSKI C, et al. Agreement of CK5/6, p40, and p63 immunoreactivity in non-small cell lung cancer [J]. *Pathology*, 2019, 51(3): 240-245.

[18] WANG Y, ZHAO G, CONDELLO S, et al. Frizzled-7 identifies platinum-tolerant ovarian cancer cells susceptible to ferroptosis[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(2): 384-399.

[19] LI M Y, FAN L N, HAN D H, et al. Ribosomal S6 protein kinase 4 promotes radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(8): 4301-4319.

[20] PATEL A, GARCIA L F, MANNELLA V, et al. Targeting p63 Upregulation Abrogates Resistance to MAPK Inhibitors in Melanoma[J]. *Cancer res*, 2020, 80(12): 2676-2688.

[21] MATHENY K E, BARBIERI C E, SNIEZEK J C, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling decreases p63 expression in head and neck squamous carcinoma cells[J]. *Laryngoscope*, 2003, 113(6): 936-939.

[22] CITRO S, BELLINI A, MICCOLO C, et al. Synergistic antitumor activity of HDAC inhibitor SAHA and EGFR inhibitor gefitinib in head and neck cancer: a key role for Δ Np63 α [J]. *Br J Cancer*, 2019, 120(6): 658-667.

[23] 杨颖, 成薇婷, 何肇晴, 等. TP63 对非小细胞肺癌细胞吉非替尼耐药性及 DSC3/DSG3 基因表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(5): 1207-1211.

[24] BYSTROM L M, RIVELLA S. Cancer cells with irons in the fire[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 79: 337-342.

[25] 俞华林, 李鹏飞, 汪丽, 等. 铁及铁死亡在肺癌方面的研究近况[J]. *医学综述*, 2020, 26(18): 3612-2619.

[26] WANG G X, TU H C, DONG Y, et al. Δ Np63 inhibits oxidative stress-induced cell death, including ferroptosis, and cooperates with the bcl-2 family to promote clonogenic survival[J]. *Cell reports*, 2017, 21(10): 2926-2939.

[27] GUO S, DENG J, WANG P, et al. The malignancy suppression and ferroptosis facilitation of BCL6 in gastric cancer mediated by FZD7 repression are strengthened by RNF180/RhoC pathway[J]. *Cell Biosci*, 2023, 13(1): 73.

(收稿日期: 2023-09-18 修回日期: 2023-12-31)

(上接第 743 页)

子 TNF- α 、IL-4、sIL-2R 和 IFN- γ 对预测抗结核治疗价值的价值[J]. *中国防痨杂志*, 2022, 44(10): 1022-1027.

[18] MAHABALA C, KOUSHIK V K, MANJREKAR P A, et al. Serum soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) is an accurate biomarker for dengue-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis syndrome diagnosed by Hscore[J]. *Infection*, 2023, 51(2): 433-438.

[19] 白峰, 张小雷, 杨剑飞, 等. 结核、肺癌性胸膜炎患者胸腔积液内 IL-27、TNF- α 、CA15-3 及 VEGF 水平比较[J]. *临床和实验医学杂志*, 2022, 21(14): 1516-1519.

[20] 刘曦, 罗晓松, 孙涛, 等. 肺结核患者 BALF 病原菌分布及 mIL-2R、sIL-2R、IL-4 和 TNF- α 水平[J]. *中华医院感染学杂志*, 2023, 33(1): 13-17.

[21] 刘会. 不同年龄活动性肺结核患者 T 细胞亚群分析及 sIL-2R、TNF- α 动态观察[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.

[22] WEN Y, LI L, DENG Z. Calcitriol supplementation accelerates the recovery of patients with tuberculosis who have vitamin D deficiency: a randomized, single-blind, controlled clinical trial[J]. *BMC Infect Dis*, 2022, 22(1): 436.

[23] DOAN T N, FOX G J, MEEHAN M T, et al. Cost-effectiveness of 3 months of weekly rifapentine and isoniazid compared with other standard treatment regimens for latent tuberculosis infection: a decision analysis study[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2019, 74(1): 218-227.

[24] 杜光明, 熊晓琪, 杨忠诚. 注射用重组人白介素-2 联合 2HRZE/4HR 方案对肺结核患者病灶吸收率和免疫功能的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2022, 21(8): 811-814.

(收稿日期: 2023-09-11 修回日期: 2023-12-30)