

## Hsp90 抑制剂 Ganetespib 联合培美曲塞对肺腺癌细胞的影响

杨晟强, 王 平

(昆明医科大学第二附属医院胸外科, 云南 昆明 650032)

**[摘要]** 目的 探索 Ganetespib 和培美曲塞体外对人肺腺癌细胞增殖、凋亡和相关信号通路的影响。方法 人肺腺癌细胞 HCC827、H1975、A549 分组(Ganetespib 组、培美曲塞组、2 药联用组), 同时设置对照组(DMSO 0.2%), 培养 48 h 后, Cell Titer-Glo(CTG)法体外检测抑制细胞增殖能力, Western blot 检测细胞中 Akt、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达水平, 细胞凋亡实验检测细胞凋亡率, RNA-seq 检测 2 药物对于 HCC827 细胞转录组水平的影响。结果 抑制细胞增殖效果 Ganetespib>培美曲塞( $P < 0.001$ ), 2 药联用时抑制效果较单药增强( $P < 0.0001$ ); 细胞凋亡率 Ganetespib>培美曲塞( $P < 0.05$ ), 2 药联用时 HCC827 细胞凋亡率较单药升高; Ganetespib 组 Akt 蛋白磷酸化水平降低( $P < 0.05$ ), 培美曲塞组 Akt 蛋白磷酸化水平升高( $P < 0.05$ ), 2 药联用组结果与 Ganetespib 组无明显差别, Bcl-2 蛋白仅在 A549 细胞中下调( $P < 0.01$ ); 2 药物对 HCC827 细胞株的基因转录水平有影响, Ganetespib 组上调的差异表达基因为 102 个, 下调有 27 个, 培美曲塞组的上调差异表达基因为 53 个, 下调有 8 个。结论 Ganetespib 联用培美曲塞可明显抑制肺腺癌细胞 HCC827、H1975 和 A549 的增殖, 诱导细胞凋亡, 其分子机制可能是通过 PI3K/AKT 信号通路的蛋白质磷酸化来抑制肺腺癌细胞增殖。联合用药可一定程度增强抑制肺腺癌细胞增殖作用, 具体机制需进一步研究。

**[关键词]** 肺腺癌; Ganetespib; 培美曲塞

**[中图分类号]** R734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)07-0030-12

## Effect of Hsp90 Inhibitor Ganetespib Combined with Pemetrexed on Lung Adenocarcinoma Cells

YANG Shengqiang, WANG Ping

(Dept. of Thoracic Surgery, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

**[ Abstract ]** **Objective** To investigate the effects of Ganetespib and Pemetrexed on the proliferation, apoptosis and related signaling pathways of human lung adenocarcinoma cells in vitro. **Methods** Human lung adenocarcinoma cells HCC827, H1975, and A549 were divided into groups (Ganetespib group, pemetrexed group, combined treatment group), and a control group (DMSO 0.2%) was set up. After culturing for 48 hours, the Cell Titer-Glo (CTG) method was used to detect the inhibitory effects of cell proliferation in vitro, and Western blot was used to detect the expression levels of Akt, p-Akt, and Bcl-2 proteins in cells. The apoptosis experiment was used to detect the apoptosis rate, and RNA-seq was used to detect the effects of the two drugs on the transcription level of the HCC827 cell line. **Results** The inhibitory effects of cell proliferation were as follows: Ganetespib > pemetrexed ( $P < 0.001$ ), and the inhibitory effect was enhanced when the two drugs were combined ( $P < 0.0001$ ); the apoptosis rate was as follows: Ganetespib > pemetrexed ( $P < 0.05$ ), and the apoptosis rate of HCC827 cells increased when the two drugs were combined; the phosphorylation level of Akt protein was lower in the Ganetespib group ( $P < 0.05$ ), and the phosphorylation level of Akt protein was higher in the pemetrexed group ( $P < 0.05$ ), and

**[收稿日期]** 2024-03-12

**[基金项目]** 云南省科技厅科技计划基金资助项目(202201AY070001-120)。

**[作者简介]** 杨晟强(1997~), 男, 浙江金华人, 在读硕士研究生, 主要从事肺癌研究工作。

**[通信作者]** 王平, E-mail: wangping2467@126.com

the results of the combined treatment group were similar to those of the Ganetespib group, and Bcl-2 protein was only downregulated in A549 cells ( $P < 0.01$ ); the two drugs had an effect on the gene transcription level of the HCC827 cell line, with 102 upregulated differentially expressed genes and 27 downregulated genes in the Ganetespib group, 53 upregulated differentially expressed genes and 8 downregulated genes in the pemetrexed group. **Conclusion** The combination of Ganetespib and pemetrexed can significantly inhibit the proliferation of lung adenocarcinoma cells HCC827, H1975, and A549, induce cell apoptosis. The molecular mechanism may be through the inhibition of lung adenocarcinoma cell proliferation by protein phosphorylation in the PI3K/AKT signaling pathway. The transcriptome of HCC827 cells was affected by the combination therapy. The combined treatment can enhance the inhibition of lung adenocarcinoma cell proliferation to some extent, and the specific mechanism needs further research.

[**Key words**] Lung adenocarcinoma; Ganetespib; Pemetrexed

目前在全世界范围内,肺癌发生率和死亡率逐年增长已经成为癌症死亡的主要原因,每年在世界各地导致超过176万死亡<sup>[1]</sup>。吸烟占有肺癌病因诊断的80%以上,是肺癌罹患的主要危险因素,仍有许多其他危险因素如饮食习惯和环境污染等被确定为肺癌相关因素<sup>[2]</sup>。根据调查显示,2020年约有220万例肺癌新增病例和近180万例肺癌死亡病例<sup>[3]</sup>。国内的肺癌的发病率快速增长,造成了巨大的社会和经济负担。造成这种现状有很多原因,包括肺癌早期诊断和发现的缺乏<sup>[4]</sup>。非小细胞肺癌是肺癌的主要病理类型,占有肺癌的80%以上,肺腺癌是非小细胞肺癌中占比最大的亚群<sup>[5]</sup>。目前以手术为主导,化学治疗、分子靶向治疗辅助的综合治疗已成为NSCLC的首选方案<sup>[6]</sup>。大多数患者初次诊断肺癌时已处于晚期阶段,错过了外科手术切除肿瘤的最佳时机<sup>[7]</sup>。新的抗肿瘤治疗方式的出现极大地改善了晚期肺癌患者的生存及预后。

热休克蛋白(heat-shock proteins, Hsp)是细胞内部一种关键的蛋白质伴侣。它们促进细胞增殖,减少细胞凋亡,促进肿瘤的发生和转移。激活了某些信号通路,如PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B及Raf/MEK/ERK等通路<sup>[8]</sup>。热休克蛋白90(heat-shockprotein-90, Hsp90)是热休克蛋白家族中的成员,在癌症细胞中高度表达,是维持多种关键信号蛋白(包括激酶和转录因子)的稳定性和活性的重要性组成部分<sup>[9]</sup>。HSP90还参与了各种细胞过程,并与癌症中涉及的几种受体和信号通路相互作用,包括EGFR、VEGFR和IGF-1R,通过结合这些受体并调节其活性。HSP90可以促进血管生成,导致癌症细胞的生长<sup>[10]</sup>。

Ganetespib(间苯二酚三唑酮)是1种新的Hsp90抑制剂。体内外实验表明,Ganetespib在

几种血液学和实体瘤细胞系中展现出强大的细胞毒性<sup>[11]</sup>。Ganetespib可抑制EGFR,进一步抑制PI3k/Akt/MAPK信号通路的信号传导,具有减缓增殖的作用<sup>[12]</sup>。因此,Ganetespib可能被广泛用于各种恶性肿瘤的治疗过程,在临床前试验中对于多种癌症的治疗具有显著效果,包括乳腺癌、肠癌、肺癌、前列腺癌等。

培美曲塞是1种叶酸拮抗剂和抗肿瘤药,对参与叶酸依赖性合成途径的酶起拮抗作用,干扰DNA合成并导致快速分裂细胞中的凋亡细胞死亡。被推荐用于治疗非小细胞肺癌的一线治疗。癌症晚期的临床试验表明,培美曲塞通常与其他抗肿瘤药物(如顺铂)双联治疗,能够有效改善治疗对象的总生存时间<sup>[13]</sup>。

RNA测序(RNA-seq),具有速度快、准确度高、成本低等特点,不仅使笔者能够在核苷酸水平上检测细胞间转录的异质性,而且还能识别细胞间基因表达的差异性,这项技术可以在细胞水平上对不同种类基质细胞的基因表达谱进行精确的定量分析,从而揭示分子组成的复杂性和它们之间的差异<sup>[14]</sup>。

本实验旨在探索新型小分子靶向药物联合常规化疗药物对肺腺癌细胞增殖、凋亡的影响,测定相关信号通路中Akt等关键因子的表达水平。同时检测2种药物对人肺腺癌HCC827细胞转录组学的影响,筛选出药物作用后的差异表达基因,对其功能进行分析。为肺腺癌的临床治疗提供新的方向和思考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞株

中国科学院昆明动物所的细胞库中购买的

HCC827、H1975、A549 等人肺腺癌细胞株。

## 1.2 主要实验试剂

RPMI-1640 培养基、DPBS、青霉素-链霉素混合液(P/S)、细胞凋亡检测试剂盒、RNA 提取液(Trizol)均购于美国Invitrogen 公司; CellCounting-Lite2.0、BCA 蛋白定量试剂盒均购于南京诺唯赞生物科技有限公司; 培美曲塞二钠盐购于美国 MedChemExpress 公司; Pan-Akt 抗体、Phospho-AKT1-S129 抗体、Bcl-2 抗体、山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG 均购于武汉爱博泰克生物科技有限公司。

## 1.3 细胞培养及分组

取出液氮罐里冻存的 HCC827、H1975、A549 细胞放入 37 °C 水浴锅中解冻, 转入 15 mL 离心管, 加入 1 mL 配置好的 RPMI1640 培养基充分混匀, 1000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 加入 1 mL 完全培养基后均匀铺至 10 cm 培养皿中, 在培养皿上标注细胞名称和时间, 转移至 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜, 细胞贴壁后显微镜下观察细胞密度达到 80%~90% 时, 按适当比例传代, 待细胞培养至第 3 代时进行实验。预实验中 10 cm 皿种 3 × 10<sup>6</sup> 数量细胞后达到预期实验效果, 本实验分组为加入 DMSO(浓度 0.2%) 的对照组, Ganetespib(100 nmol/L) 组, 培美曲塞组(100 μmol/L) 和 2 药联用组, 每组设置 3 组重复, 10 cm 皿接种 3 × 10<sup>6</sup> 数量的细胞后待镜下细胞密度达 60% 时加入药物, 48 h 后观察细胞生长状况并开始实验。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 CTG 实验检测 48 h 细胞增殖抑制水平

通过 CTG 实验, 分别检测对照组(DMSO)、Ganetespib 单药组、培美曲塞单药组及 2 药联用组人肺腺癌 HCC827、H1975、A549 细胞株增殖能力的变化。不同药物组分别作用于 HCC827、H1975、A549 细胞 48 h 后, 根据测量的 ATP 含量可以间接得到细胞数量, 进而得到细胞的增殖情况。取对数生长期的肺腺癌细胞株 HCC827、H1975 和 A549, 取 1.5 mL EP 管加入细胞悬液与 AO/PI 染色液混匀, 转移至细胞计数板中用细胞计数仪进行细胞计数。细胞计数后按每孔 3 × 10<sup>3</sup> 个/mL 接种于 96 孔培养板中。待细胞贴壁, 按实验分组加入药物, 每孔设 3 个平行孔, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h。提前从 4 °C 冰箱取出 Cell Counting-Lite 2.0 放至室温, 显微镜下观察细胞生长状态, 待培养板温度恢复至室温每孔加入 100 μL Cell Counting-Lite 2.0, 轻轻吹打混匀, 室温下静

置 10 min 后置入多功能酶标仪中根据 ATP 浓度间接测定细胞数量, 进行统计学分析。

### 1.4.2 Western blot 测定细胞中 Akt、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达水平

取培养 48 h 的细胞加入细胞裂解液(RIPA 裂解液:蛋白酶抑制剂 cocktail=100:1), 间歇震荡 5 min。将细胞转移到 EP 管中在冰上裂解 25 min, 期间震荡 4~5 次。随后放入离心机中, 4 °C、12000 r/min 离心 10 min, 吸上清于新 EP 管。取少量蛋白样品用 BCA 蛋白检测试剂盒进行蛋白定量, 全过程于冰上操作。定量后在蛋白样品中加入等体积 2 × SDS Loading buffer, 在 95 °C 金属浴煮沸 5 min。取变性蛋白样品 20 μL(蛋白含量约 20~60 μg)、Marker 2.5 μL 加入上样孔, 90 V 恒压跑过浓缩胶, 120 V 恒压跑完分离胶。电泳结束后进行转膜, 300 mA、90 min。转膜完成后按抗体分子量大小裁剪 NC 膜, 加入 5% 脱脂牛奶, 室温下摇床封闭 0.5~1 h。封闭结束后, 一抗(1:500 稀释)4 °C 孵育过夜。二抗(1:2000 稀释)室温孵育 1 h 后滴加显影液, 按发光成像仪说明书进行曝光, 分析得到蛋白目的条带。

### 1.4.3 流式细胞术测定细胞凋亡率

通过对不同药物处理 48 h 后的肺腺癌 HCC827、H1975、A549 细胞进行细胞凋亡实验。应用流式细胞术以此检测各组的细胞凋亡率。取药物处理 48 h 细胞, 收集所有细胞, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。按照 Cell Event™Caspase-3/7GreenReadyFlow™凋亡试剂盒说明书进行操作, 每管加入 100 μL 凋亡试剂后轻轻摇匀, 避光反应约 5 min。通过流式细胞仪依次检测各组细胞的凋亡情况, 用 FlowJo 10.7.2 软件进行统计学分析。

### 1.4.4 RNA-seq 分析基因转录组学影响

取药物作用 48 h 后的细胞, 收集细胞每管加入 1 mL Trizol 试剂, EP 管标记好样品名称。按要求将细胞样品于液氮中保存, 寄送到南京诺唯赞生物科技有限公司完成转录组测序分析。测序返送结果后进行分析, 使用 Bowtie2 将 clean reads 比对到参考序列, 之后在再使用 RSEM 计算基因和转录本的表达水平。使用 R 软件里的 cor 函数进行相关性分析, 使用 hclust 函数进行层次聚类分析、使用 princomp 函数进行 PCA 分析。根据 GO、KEGG 等数据库注释结果以及官方分类将差异基因进行功能分类和生物通路分类, 同时使用 R 软件中的 phyper 函数进行富集分析, 对 value P 进行 FDR 校正, 通常 FDR ≤ 0.01 的通路视为显著富集。蛋白之间通常通过相互作用结合成复合物之后行使

相应的功能。笔者主要应用 STRING 蛋白质互作数据库中的互作关系进行差异基因蛋白互作网络的分析 (protein-protein interaction networks, PPI)。通过 PPI 分析, 具有相互作用的 DEG 通常具有相似的功能。使用 R 的 bioconductor 里面的 stringDB 包来做 PPI 分析。提供差异基因蛋白互作网络数据文件, 此文件可以直接导入 Cytoscape 软件进行可视化编辑。

Bowtie2 网址: <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>

R 软件网址: <http://deweylab.biostat.wisc.edu/rsem>

GO、KEGG 数据库: <https://www.genome.jp/kegg/>

STRING 蛋白质互作数据库 <http://string-db.org/>

## 1.5 统计学处理

采用 GraphPadPrism9、Image J、FlowJo 软件进行画图 and 统计处理, 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 数据用组间两者比较采用析因设计方差分析 (ANOVA),  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CTG 实验检测 48 h 细胞增殖抑制水平

与实验对照组 (DMSO) 相比, HCC827、H1975、A549 3 组细胞的用药组均有不同程度的抑制效果, Ganetespib 比培美曲塞抑制效果更好 ( $P < 0.05$ ), 但联用结果与 Ganetespib 没有明显差异 ( $P > 0.05$ ), 见图 1。

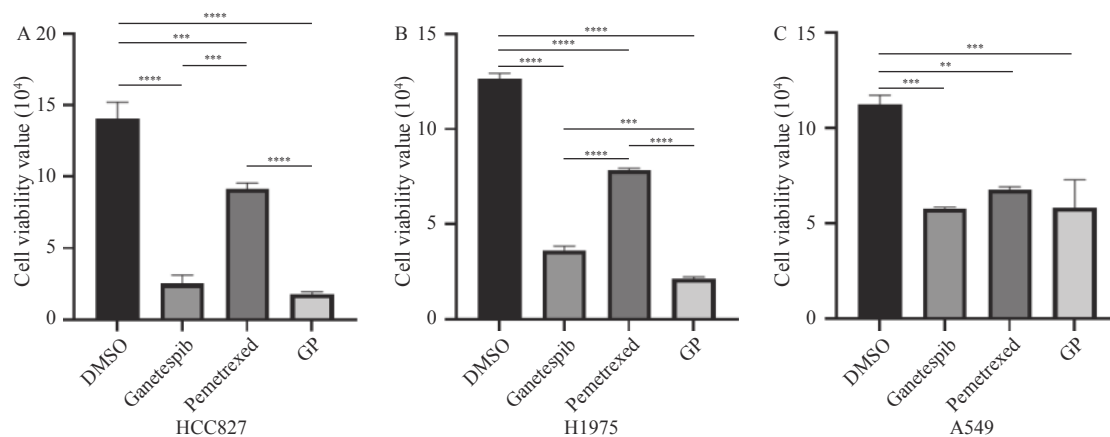


图 1 Ganetespib、培美曲塞及联用对肺腺癌细胞增殖能力的影响

Fig. 1 Effects of Ganetespib, pemetrexed and combined treatment on the proliferation of lung adenocarcinoma cells

A: HCC827 细胞增殖情况; B: H1975 细胞增殖情况; C: A549 细胞增殖情况。\*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

### 2.2 细胞中 Akt、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达水平

按实验分组药物处理人肺腺癌 HCC827、H1975、A549 细胞 48 h, 提取蛋白后。Western blot 结果显示, 培美曲塞处理后, HCC827 细胞的磷酸化水平升高 ( $P < 0.05$ ), 而 H1975 和 A549 细胞仅有少量升高或降低 ( $P < 0.05$ )。Ganetespib 处理后, 3 种细胞株的磷酸化均有不同程度的降低 ( $P < 0.05$ )。而 2 种药物同时作用时, 蛋白表达水平与 Ganetespib 无明显差异 ( $P > 0.05$ )。抗凋亡蛋白 Bcl-2 在 HCC827 和 H1975 细胞的 2 种药物处理后的表达无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 仅在 A549 细胞中差异较为明显 ( $P < 0.05$ ), 且 2 药联用效果比单药作用时更强 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

### 2.3 细胞凋亡情况

与对照组相比, 培美曲塞组细胞凋亡率升高

( $P < 0.0001$ ), Ganetespib 组肺腺癌细胞凋亡率高于培美曲塞组, 而 HCC827 2 药联用组的凋亡率有提高 ( $P < 0.0001$ ), 其余 2 组较 Ganetespib 降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

### 2.4 转录组测序分析

**2.4.1 新基因表达的差异性检测** 基因差异分析, 与对照组 (A) 比较, Ganetespib 组 (B) 的上调差异表达基因为 102 个, 下调有 27 个; 培美曲塞组 (C) 的上调差异表达基因为 53 个, 下调有 8 个, 见图 4。

**2.4.2 参考基因比对及基因表达个数统计** 转录本的丰度情况是 1 个基因表达水平的直接体现。在 RNA-seq 分析中, 通过定位到基因组区域或基因外显子区的测序序列的计数来估计基因的表达水平, 见表 1。

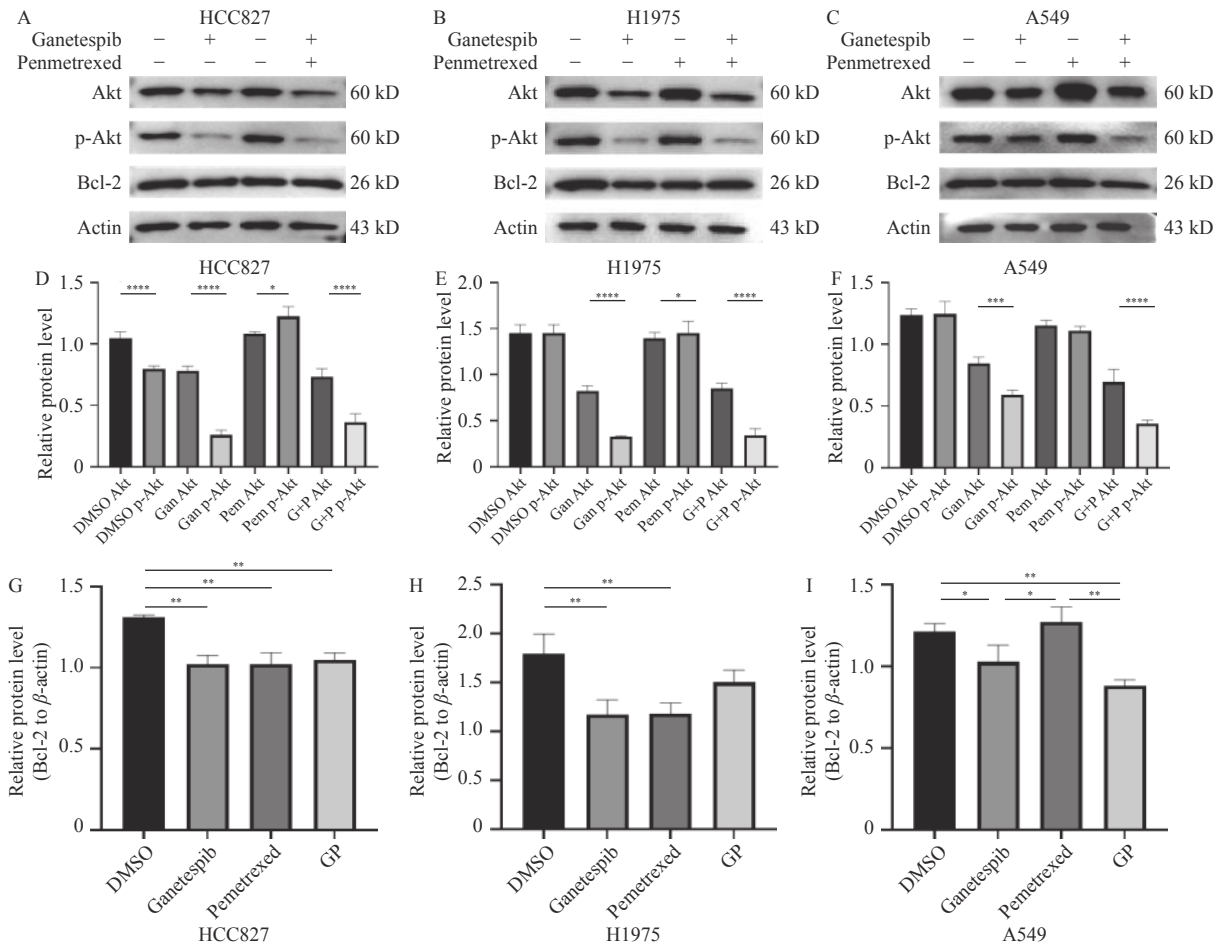


图 2 Western blot 检测细胞中 Akt、p-Akt 和 Bcl-2 的表达情况

Fig. 2 The expression levels of Akt, p-Akt and Bcl-2 in the cells were detected by Western blot

A: HCC827 蛋白表达; B: H1975 蛋白表达; C: A549 蛋白表达; D: HCC827 磷酸化 Akt 统计学分析; E: H1975 磷酸化 Akt 统计学分析; F: A549 磷酸化 Akt 统计学分析; G: HCC827 Bcl-2 统计学分析; H: H1975 Bcl-2 统计学分析; I: A549 Bcl-2 统计学分析。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

**2.4.3 样品相关性分析** 高通量测序技术需要生物学重复,其目的是为了证明实验操作课重复且变化不大,保证了差异基因分析的结果更可靠。基因表达水平相关性是检验实验结果可靠性重要指标。

通过 PCA 方法对数据集进行解析与精简。利用了 Component1 和 Component2 来构建 x 轴和 y 轴,从而生成散点图。每 1 个点的位置都表示了一个样本的数据情况。从这个 PCA 图上看,若两者的样本之间的距离较大,那么就意味着这两个样本中的基因表达方式存在较大的差别;相反地,这表明这 2 种样本具有相似的总体表达特征,见图 5。

通过火山图(volcano plot),能够清晰地观察到在各种差异比较样本中相同基因表达水平的不同程度以及这些差异的统计学显著性。图中靠近左上方和右上方的点,其统计学意义更重要。通过比较差异基因的数量得出了结论:共有 2498

种不同于对照组的基因被识别出来。与对照组相比, Ganetespiib 表达上调基因 471 个,前 5 个分别为 GOLGA8G、FRMPD2、ACRBP、TFEC、GDF15;表达下调基因 630 个,前 5 个分别为 ADRA1A、CCL20、CCL2、JMJD7-PLA2G4B、MAGEA9B。Pemetrexed 表达上调基因 1240 个,前 5 个分别为 CGA、ROS1、CILP、GPR87、HBA1;表达下调基因 157 个,前 5 个分别为 MAGED4B、UTP14C、DGCR6、HBA2、SLC7A11,见图 6。

利用 MA 图,能够清晰地观察到不同的比较组在相同样本基因表达水平和差异倍数的总体分布上的差异,见图 7。

**2.4.4 不同表达基因进行聚类分析** 聚类分析用于表示不同实验条件下差异基因的表达模式。表达类似的基因可能功能相近,或是在相同的细胞通路。因此,将表达模式相近的基因聚集成类,可以推测已知基因的新功能或未知基因的功能,

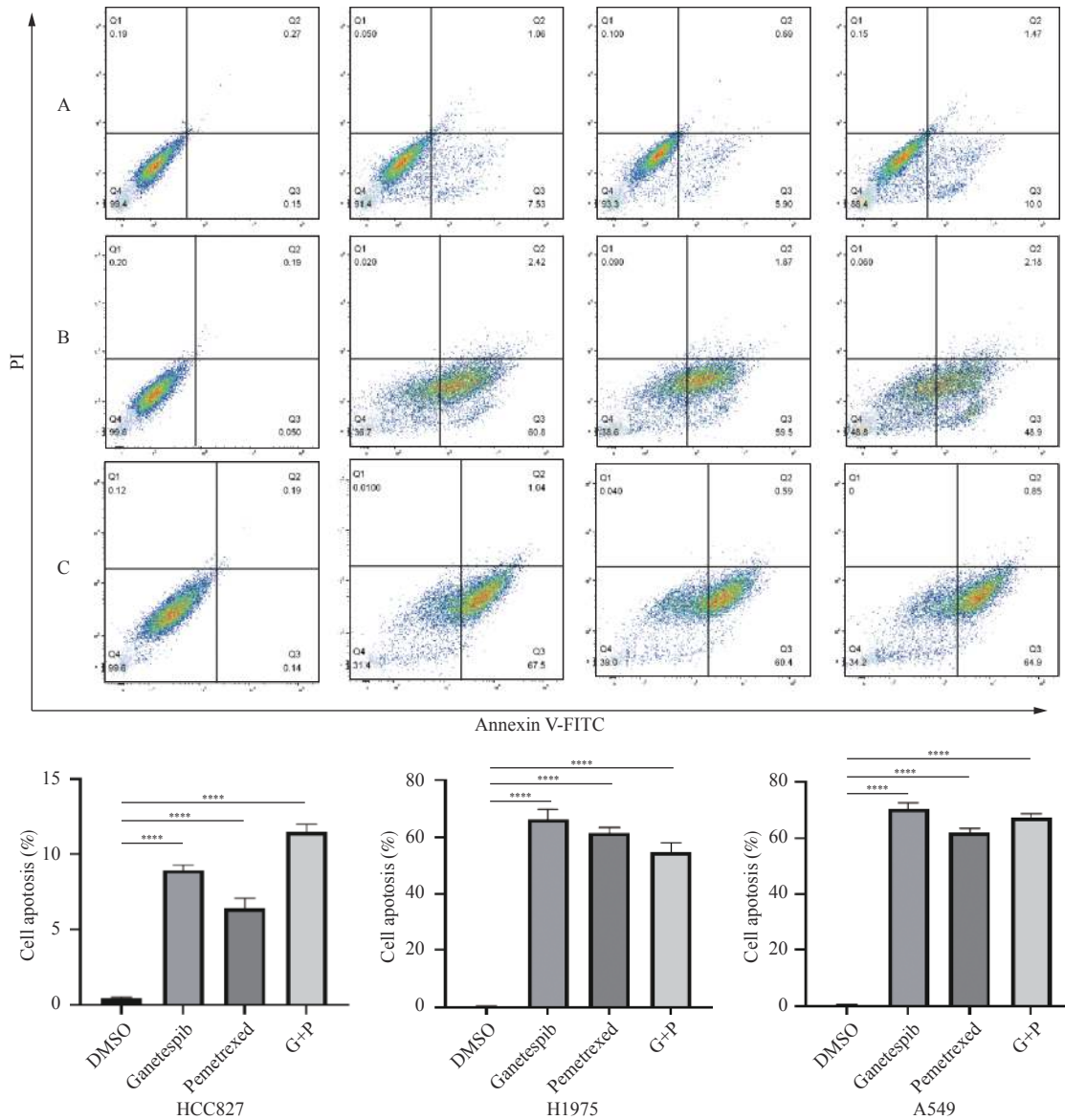


图 3 Ganetespib 和 pemetrexed 对细胞凋亡率的影响  
Fig. 3 Effect of Ganetespib and pemetrexed on apoptosis rate

A: HCC827; B: H1975; C: A549. \*\*\*\*P < 0.0001.

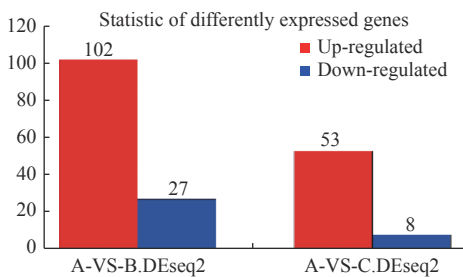


图 4 差异基因表达数目

Fig. 4 Number of differential gene expression

图中红色表示上调基因数量, 蓝色表示下调基因数量。

见图 8。

2.4.5 基因差异表达的 GO 分析 差异基因的富集分析表明, 与对照组相比, Ganetespib 和 pemet-

rexed 处理组在差异基因中, 有意义的常见功能注释有 58 个, 包括 28 个生物过程、17 个细胞组成和 13 个分子功能, 涉及的生物过程主要包括生物调节、细胞过程、刺激反应、代谢过程和生物过程调控等; 涉及的基因组成主要有细胞器部分、细胞部分、膜部分、细胞外区域和含蛋白复合物等; 涉及的分子功能主要有分子换能器活性、分子功能调节剂、转录调节活性、抗氧化活性、催化活性等, 见图 9。

2.4.6 差异表达基因的 KEGG 分析 KEGG PATHWAY 是 1 个代谢通路的集合, 包含几个方面的分子间相互作用和反应网络, 每 1 大类又分为多个子类, 每个子类下是具体的代谢通路, 见表 2。

表 1 参考基因比对结果及基因表达个数

Tab. 1 Reference gene comparison results and gene expression numbers

样品名	测序序列	基因占比(%)	总基因数(个)	已知基因数(个)	新基因数(个)
HCC827-1	60 599 120	60.12	15 432	15 432	0
HCC827-2	84 059 840	63.87	15 899	15 899	0
HCC827-3	64 289 534	58.25	16 287	16 287	0
HCC827-4	65 960 004	62.49	15 423	15 423	0
HCC827-5	66 589 904	62.06	15 786	15 786	0
HCC827-6	62 855 002	59.33	16 303	16 303	0
HCC827-7	61 549 178	61.29	15 467	15 467	0
HCC827-8	60 140 870	60.83	15 614	15 614	0
HCC827-9	66 496 334	56.70	16 318	16 318	0

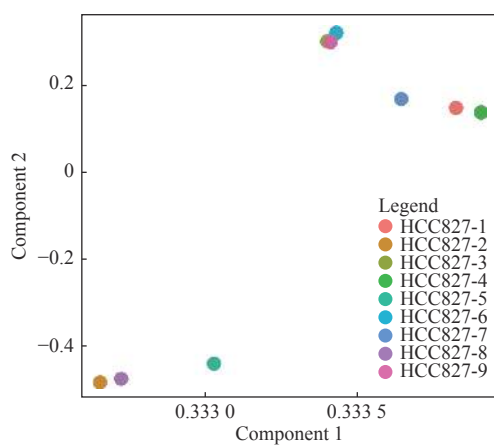


图 5 PCA 分析结果

Fig. 5 PCA analysis results

X 轴表示第 1 主成份贡献率, Y 轴表示第 2 主成份贡献率。不同的点代表不同的样品, 相同的颜色表示为同 1 个样品组。

KEGG 富集分析结果以散点图表示, KEGG 富集程度通过 Rich factor、Qvalue 和富集到此通

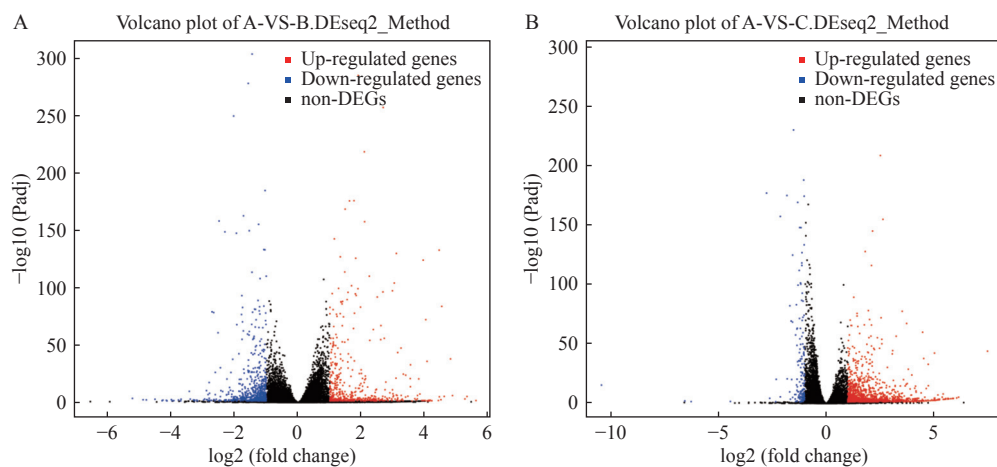


图 6 差异基因表达情况火山图

Fig. 6 Volcano map of differential gene expression

A: Ganetespib-VS-对照组; B: 培美曲塞-VS-对照组。

x 轴是某个具体基因因子数量上的差额( $\log_2$ ), y 轴是该种生物因素的变化程度和其相应的负向逻辑指数计算结果。红点代表上调的基因, 蓝点代表下调的基因。

路上的基因个数来衡量, 见图 10。

差异基因的 KEGG 信号通路富集分析表明, 与对照组相比, Ganetespib 单药组的差异基因共富集了 9 条重要信号通路(校正后  $P < 0.05$ ), 包括 p53 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路、TNF 信号通路、胰岛素抵抗、甲型流感、IL-17 信号通路、人乳头瘤病毒感染、乙型肝炎和细胞因子-受体相互作用。Pemetrexed 单药组的差异基因共富集了 20 条重要信号通路(校正后  $P < 0.05$ ), 包括 PI3K-Akt 信号通路、肺结核、TNF 信号通路、金黄色葡萄球菌感染、MAPK 信号通路、p53 信号通路等。

### 3 讨论

#### 3.1 肺腺癌研究现状

肺癌是全世界范围内癌症相关死亡的最常见

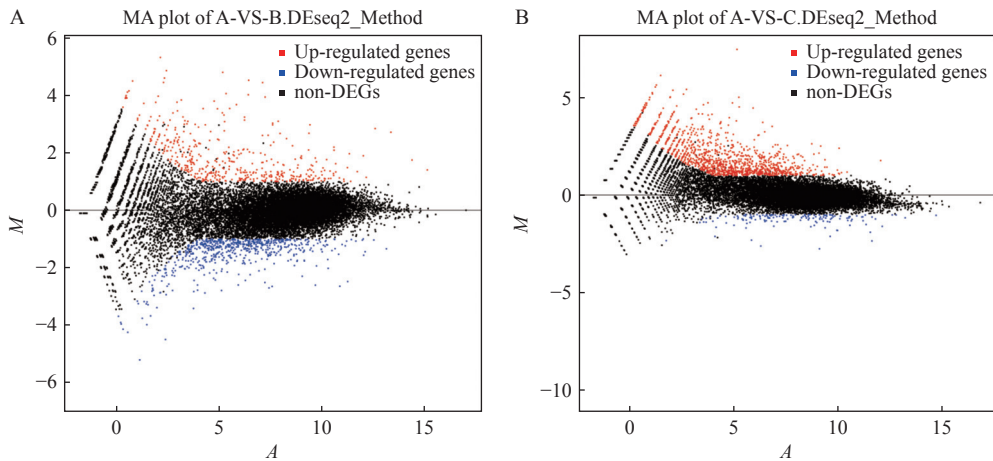


图 7 基因差异表达的 MA 图

Fig. 7 MA map of gene differential expression

A: Ganetespib-VS-对照组; B: 培美曲塞-VS-对照组。

观察到的是 MA 图像上的显著区别标志着各种生物体内的独特蛋白质序列的存在。该轴是 A 参数, 它反映了 FPKM 的均方根变化率的变化情况。而 M 是另一个重要指标, 用于衡量  $\log_2(FC)$  对样本间蛋白水平差别的度量标准, 这被用来评估这些数据是否存在统计学意义和实际效应的大小。红色圆圈标识出那些呈现上升趋势的关键变种, 蓝色则是下降模式的表现形式, 黑色符号显示没有明显的差别现象发生的情况。

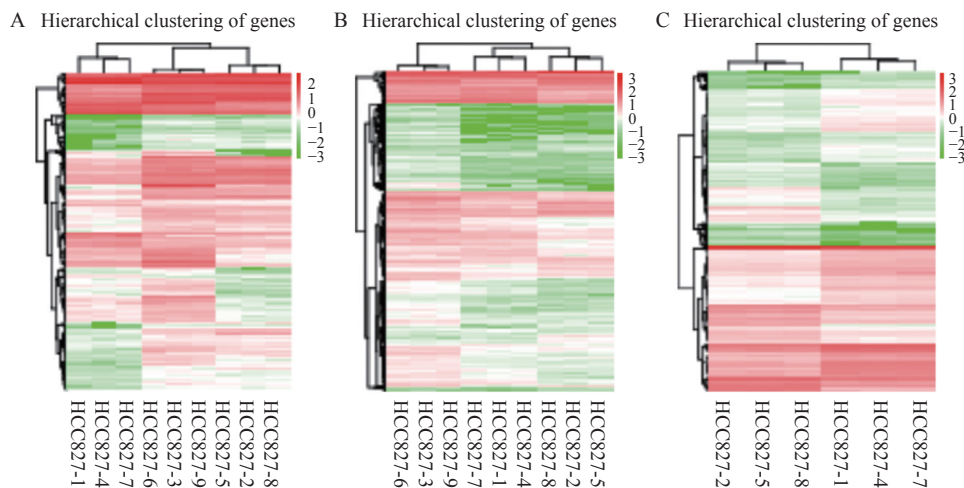


图 8 差异表达基因的聚类热图结果

Fig. 8 Cluster heat map results of differentially expressed genes

A: Ganetespib、培美曲塞和对照组组间交集差异基因分析; B: Ganetespib、培美曲塞和对照组组间并集差异基因分析; C: Ganetespib 和对照组组间差异基因分析。

横轴展示了每个样本和它对应的分类结果, 而纵轴则是每 1 个有显著差别的基因及它们各自的分类成果。

原因。每年有约 180 万人被诊断为肺癌, 其中 160 万人死于这种疾病<sup>[15]</sup>。非小细胞肺癌是肺癌病理类型中最常见的亚型, 约占所有肺癌的 80%~85%<sup>[16]</sup>。NSCLC 的标准治疗包括以铂为基础的双重化疗, 这增加了晚期疾病患者的生存时间和生活质量<sup>[17]</sup>。

近年来, EGFR 突变已成为晚期肺腺癌患者治疗的重要靶点。在一些 NSCLC 病例中发现表皮生长因子受体发生基因突变, 这推动了肺癌向新的靶向治疗方向的发展。目前, EGFR-酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR-TKIs) 是 EGFR 激活突变晚期非

小细胞肺癌患者的临床治疗一线方案。尽管 EGFR-TKIs 与 EGFR 突变的非小细胞肺癌密切相关, 但对 TKIs 的耐药是不可避免的<sup>[18]</sup>。

### 3.2 培美曲塞治疗肺腺癌的研究成果

培美曲塞是 1 种抗肿瘤药物, 其拮抗叶酸生成, 适用于晚期肺腺癌患者的一线、维持和二线治疗, 具有较好的疗效和安全性<sup>[19]</sup>。此外, 研究发现培美曲塞对 EGFR-TKIs 失败的肺腺癌患者有效, 在众多化疗药物中, 培美曲塞因其毒性低、疗效好, 是 EGFR 突变肺腺癌患者的首选药物<sup>[20]</sup>。培美曲塞作为甘氨酸酰胺核糖核苷酸甲酰转移酶

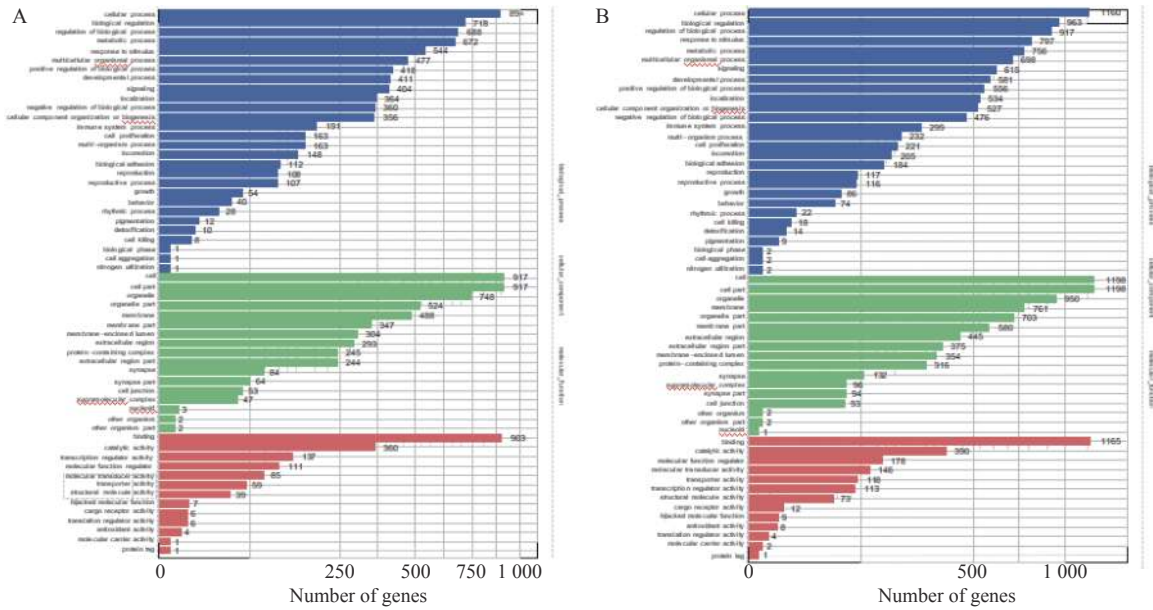


图 9 差异基因 GO 功能分类图

Fig. 9 GO functional classification map of differential genes

A: Ganetespib 处理后 GO 功能分类; B: 培美曲塞处理后 GO 功能分类。

X 轴: 差异表达基因的数量, Y 轴: 不同的大类用不同的颜色表示; 每个大类中单独的柱子表示其中的 1 个子类。

表 2 KEGG PATHWAY 数据库信息分类

Tab. 2 Information classification of KEGG pathway database

Metabolism	新陈代谢	12个子类
Genetic Information processing	遗传信息加工	4个子类
Environmental Information processing	环境信息加工	3个子类
Cellular processes	细胞过程	5个子类
Organismal Systems	生物体系统	10个子类
Human diseases	人类疾病	12个子类
Drug development	药物开发	11个子类

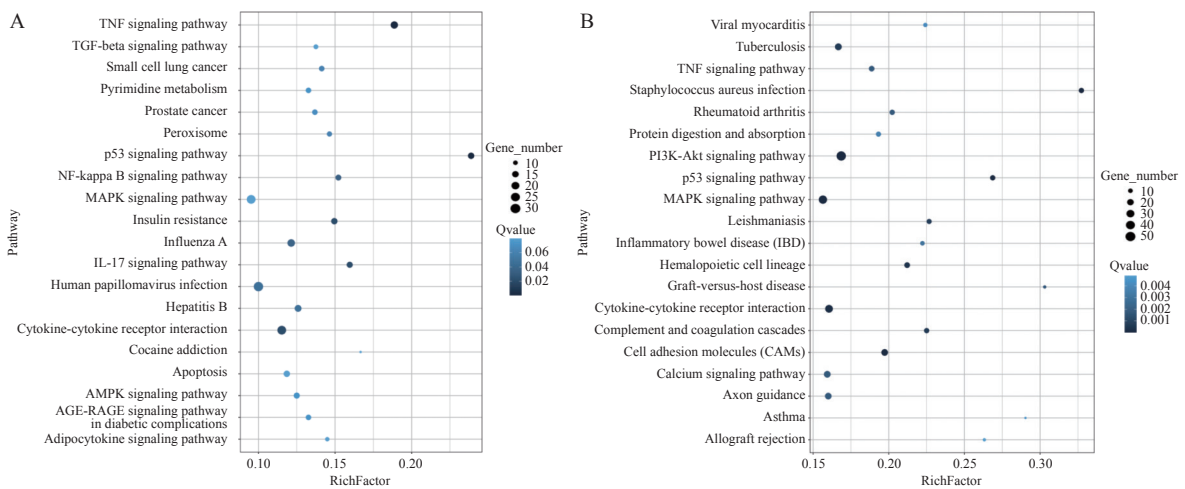


图 10 差异基因的 KEGG 富集散点图

Fig. 10 KEGG distribution point diagram of differential genes

A: Ganetespib 处理后 KEGG 功能分类; B: 培美曲塞处理后 KEGG 功能分类。

横轴代表 Richfactor, 其值越大, 富集程度越高; 纵轴则是 Pathway 的名称。在这个 pathway 中, 差异性基因的数量由相应点的大小来标识, 而 qvalue 范围则与对应点的颜色深浅进行匹配。

(GARFT)、二氢叶酸还原酶(DHFR)和胸苷酸合成酶(TS)的抑制剂,在包括肺腺癌在内的多种癌症中,主要在S期抑制肿瘤细胞并诱导细胞凋亡<sup>[21]</sup>。Noronha等<sup>[22]</sup>学者的1项体外实验表明,对EGFR突变型肺腺癌细胞的协同作用仅在培美曲塞与伊可替尼/厄洛替尼序贯给药的情况下才能观察到,Chen等<sup>[23]</sup>报道,与单独使用吉非替尼相比,培美曲塞联合吉非替尼可改善EGFR突变的晚期肺腺癌患者的无进展生存时间。尽管这些结果表明培美曲塞和EGFR-TKIs联合治疗EGFR突变的肺腺癌具有潜在的优点,但最佳给药方案仍有待阐明。

### 3.3 小分子靶向药物的研究

热休克蛋白90(HSP90)在癌症中增强,抑制了许多客户蛋白的分解。HSP90在调节许多关键信号蛋白功能中起着至关重要的作用,促进细胞增殖,降低肿瘤细胞死亡率,从而促进癌变和癌细胞转移<sup>[8, 24]</sup>。许多Hsp90客户与肺腺癌的发病机制有关,其中包括了EGFR。

EGFR是肺腺癌治疗的有效靶点,EGFR突变型癌蛋白的构象稳定和功能依赖于Hsp90的伴侣活性<sup>[25]</sup>。因此,寻找药物阻断Hsp90,导致EGFR突变型蛋白的降解和丢失,是1种可行的替代TKI抑制策略。Ganetespib是1种有效的小分子Hsp90抑制剂,对包括肺腺癌在内的多种癌症展现出强大的抑制癌细胞活性<sup>[26]</sup>。然而,Ganetespib和其他选择性Hsp90抑制剂的临床经验显示,在EGFR野生型和突变型非小细胞肺癌患者中,单药作用活性较低<sup>[8, 27]</sup>。这就引出1个新的设想,当Hsp90小分子抑制剂与外科手术及化疗药物一起作为组合疗法时,可能会开发出其全部治疗效益<sup>[28]</sup>。在这方面,肺腺癌的临床前和临床环境中,Ganetespib与紫杉烷联合使用时显示出优于其单独应用的协同效应<sup>[29]</sup>。

有研究使用EGFR突变型肺腺癌细胞系HCC827、H1975的异种移植肿瘤进行了分析。针对厄洛替尼耐药,Ganetespib单独作用时仅显示适度的抗肿瘤活性,然而,与厄洛替尼联合治疗时,Ganetespib的治疗效果明显增强。Ganetespib与厄洛替尼双重治疗可能作为克服厄洛替尼耐药的手段。其疗效背后的分子机制仍有待研究,但是有可能因为其协同效应促进了EGFR致癌基因的失效,进而导致肿瘤的缩小。在一些实验和临床研究中,Ganetespib抑制肿瘤细胞生长并减少癌症转移。此外,抑制Hsp90的多效性也有望

影响EGFR的信号通路,这种更广泛的生物活性谱也可能有助于改善治疗指标<sup>[30]</sup>。

### 3.4 药物联合应用

先前有研究观察了静脉注射Ganetespib联合培美曲塞和铂治疗恶性胸膜间皮瘤患者的安全性、耐受性和有效性。表明了Ganetespib-培美曲塞-铂联合治疗可能有较好的疗效,并支持Hsp90抑制剂与铂类药物的协同作用<sup>[31-32]</sup>。此外,胸苷酸合成酶已被证明与培美曲塞活性具有相关性,被认为是抗叶酸耐药的介质,并在Hsp90被抑制后下调<sup>[33-34]</sup>。

联合治疗已成为克服TKI耐药性的关键方法。一些研究人员对EGFR-TKI联合抗血管生成药物的RCTs进行了荟萃分析,发现联合治疗可显著改善患者的无进展生存时间<sup>[35]</sup>。培美曲塞和卡铂的效果比单独培美曲塞更强,与大分子抗血管生成药物(如贝伐单抗)联合使用可能更为理想。大多数比较之间的异质性较低,但在TKI与TKI联合培美曲塞和卡铂治疗OS中仍然存在异质性<sup>[36]</sup>。因此本研究从转录组学方面进行研究,对HCC827细胞在小分子靶向药和化疗药的作用下与无干预的细胞进行比较,从转录能力、基因表达水平等方面进行研究,分析其相关机制。

### 3.5 Ganetespib 和培美曲塞对肺腺癌的影响

在本实验中,笔者针对3种不同的肺腺癌细胞系:HCC827、H1975及A549进行了药物使用分析,并将其分为4种不同组合:分组为加了安全浓度的DMSO组、Ganetespib单药组、培美曲塞单药组和两药联合应用组。抑制肿瘤增殖效果最好的是培美曲塞和Ganetespib联合用药组,其次是Ganetespib组,这2组均优于培美曲塞单药作用( $P < 0.05$ )。然而,2种药物联合作用时未发现其协同作用,仅能证明2种药物作用于肿瘤细胞时,Ganetespib的抑制效果更强。而蛋白质印迹实验的结果表明,Ganetespib能有效下调肺腺癌细胞的磷酸化水平,可能说明药物通过PI3K/AKT信号通路的磷酸化来抑制肺腺癌细胞的增值。而培美曲塞对HCC827的磷酸化水平与凋亡情况呈负相关,两者同时处理细胞时,仅在A549细胞中表现出较好的抑制作用,可能因为两药联用时对细胞有拮抗作用,需要进一步实验证明。细胞凋亡实验结果显示Ganetespib和pemetrexed均促进了肺腺癌细胞的凋亡,2种药物联用时效果不明显。基因转录组测序结果说明两种药物对于基因转录能力、基因表达水平、基因差异

表达、GO 功能、KEGG 生物通路都有影响。实验结果表明, Ganetespib 联合培美曲塞能在一定程度上抑制肺腺癌细胞的增殖, 促进其凋亡, 且 Ganetespib 效果优于培美曲塞。但在本实验中未发现 2 种药物的协同作用。由于目前 Ganetespib 与培美曲塞联合作用的研究较少, 根据先前的研究结果, 序贯给药可能产生与同时给药不同的实验结果, Ganetespib 和培美曲塞的序贯治疗效果及具体机制有待进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Lee E, Kazerooni E A. Lung cancer screening[J]. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2022, 43(6): 839–850.
- [2] Schabath M B, Cote M L. Cancer progress and priorities: Lung cancer [J]. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2019, 28(10): 1563–1579.
- [3] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209–249.
- [4] Goss P E, Strasser-weippl K, Lee-bychkovsky B L, et al. Challenges to effective cancer control in China, India, and Russia[J]. *Lancet Oncology*, 2014, 15(5): 489–538.
- [5] Ruiz-cordero R, Devine W P. Targeted therapy and checkpoint immunotherapy in lung cancer[J]. *Surgical Pathology Clinics*, 2020, 13(1): 17–33.
- [6] Chaft J E, Shyr Y, Sepesi B, et al. Preoperative and post-operative systemic therapy for operable non-small-cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2022, 40(6): 546–555.
- [7] Yousefi M, Bahrami T, Salmaninejad A, et al. Lung cancer-associated brain metastasis: Molecular mechanisms and therapeutic options[J]. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 2017, 40(5): 419–441.
- [8] Yousefi M E, Cavalu S, Hasan A M, et al. Role of ganetespib, An HSP90 inhibitor, in cancer therapy: From molecular mechanisms to clinical practice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(5): .5014
- [9] Birbo B, Madu E E, Madu C O, et al. Role of HSP90 in cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19): .10317
- [10] Stivarou T, Patsavoudi E. Extracellular molecules involved in cancer cell invasion[J]. *Cancers*, 2015, 7(1): 238–265.
- [11] Proia D A, Foley K P, Korbut T, et al. Multifaceted intervention by the Hsp90 inhibitor ganetespib (STA-9090) in cancer cells with activated JAK/STAT signaling[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18552.
- [12] Xiang L, Gilkes D M, Chaturvesi P, et al. Ganetespib blocks HIF-1 activity and inhibits tumor growth, vascularization, stem cell maintenance, invasion, and metastasis in orthotopic mouse models of triple-negative breast cancer[J]. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 2014, 92(2): 151–164.
- [13] Gadgeel S, Rodriguez-abreu D, Speranza G, et al. Updated analysis from KEYNOTE-189: Pembrolizumab or placebo plus pemetrexed and platinum for previously untreated metastatic nonsquamous non-small-cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2020, 38(14): 1505–1517.
- [14] Zhang J, Song C, Tian Y, et al. Single-cell RNA sequencing in lung cancer: Revealing phenotype shaping of stromal cells in the microenvironment[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 802080.
- [15] Hirsch F R, Scagliotti G V, Mulshine J L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments[J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 299–311.
- [16] Park S, Keam B, Kim S H, et al. Pemetrexed singlet versus nonpemetrexed-based platinum doublet as second-line chemotherapy after first-line epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor failure in non-small cell lung cancer patients with EGFR mutations[J]. *Cancer Research and Treatment*, 2015, 47(4): 630–637.
- [17] Jones G S, Baldwin D R. Recent advances in the management of lung cancer[J]. *Clinical Medicine (London, England)*, 2018, 18(Suppl 2): s41–s46.
- [18] Yoshimura N, Okishio K, Mitsuoka S, et al. Prospective assessment of continuation of erlotinib or gefitinib in patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib followed by the addition of pemetrexed[J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2013, 8(1): 96–101.
- [19] Fuld A D, Dragnev K H, Rigas J R. Pemetrexed in advanced non-small-cell lung cancer[J]. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2010, 11(8): 1387–1402.

- [20] Wu S G, Yang C H, Yu C J, et al. Good response to pemetrexed in patients of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations[J]. *Lung Cancer*, 2011, 72(3): 333–339.
- [21] Cui J, Zhang Y, Su D, et al. Efficacy of combined icotinib and pemetrexed in EGFR mutant lung adenocarcinoma cell line xenografts[J]. *Thoracic Cancer*, 2018, 9(9): 1156–1165.
- [22] Feng X, Zhang Y, Li T, et al. Sequentially administrated of pemetrexed with icotinib/erlotinib in lung adenocarcinoma cell lines in vitro[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(69): 114292–114299.
- [23] Noronha V, Patil V M, Joshi A, et al. Gefitinib versus gefitinib plus pemetrexed and carboplatin chemotherapy in EGFR-mutated lung cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2020, 38(2): 124–136.
- [24] Taipale M, Jarosz D F, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: Emerging mechanistic insights[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11(7): 515–528.
- [25] Shimamura T, Li D, Ji H, et al. Hsp90 inhibition suppresses mutant EGFR-T790M signaling and overcomes kinase inhibitor resistance[J]. *Cancer Research*, 2008, 68(14): 5827–5838.
- [26] Acquaviva J, Smith D L, Sang J, et al. Targeting KRAS-mutant non-small cell lung cancer with the Hsp90 inhibitor ganetespiib[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2012, 11(12): 2633–2643.
- [27] Sequist L V, Gettinger S, Senzer N N, et al. Activity of IPI-504, a novel heat-shock protein 90 inhibitor, in patients with molecularly defined non-small-cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, 28(33): 4953–4960.
- [28] Neckers L, Workman P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet?[J]. *Clinical Cancer Research*, 2012, 18(1): 64–76.
- [29] Proia D A, Sang J, He S, et al. Synergistic activity of the Hsp90 inhibitor ganetespiib with taxanes in non-small cell lung cancer models[J]. *Investigational New Drugs*, 2012, 30(6): 2201–2209.
- [30] Smith D L, Acquaviva J, Sequeira M, et al. The HSP90 inhibitor ganetespiib potentiates the antitumor activity of EGFR tyrosine kinase inhibition in mutant and wild-type non-small cell lung cancer[J]. *Targeted Oncology*, 2015, 10(2): 235–245.
- [31] Fennell D A, Danson S, Woll P J, et al. Ganetespiib in combination with pemetrexed-platinum chemotherapy in patients with pleural mesothelioma (MESO-02): A phase Ib trial[J]. *Clinical Cancer Research*, 2020, 26(18): 4748–4755.
- [32] Stecklein S R, Kumaraswamy E, Behbod F, et al. BRCA1 and HSP90 cooperate in homologous and non-homologous DNA double-strand-break repair and G2/M checkpoint activation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(34): 13650–13655.
- [33] Abu Lila A S, Kato C, Fukushima M, et al. Downregulation of thymidylate synthase by RNAi molecules enhances the antitumor effect of pemetrexed in an orthotopic malignant mesothelioma xenograft mouse model[J]. *International Journal of Oncology*, 2016, 48(4): 1399–1407.
- [34] Zucali P A, Giovannetti E, Destro A, et al. Thymidylate synthase and excision repair cross-complementing group-1 as predictors of responsiveness in mesothelioma patients treated with pemetrexed/carboplatin[J]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17(8): 2581–2590.
- [35] Deng Z, Qin Y, Liu Y, et al. Role of antiangiogenic agents combined with EGFR tyrosine kinase inhibitors in treatment-naive lung cancer: A meta-analysis[J]. *Clinical Lung Cancer*, 2021, 22(1): e70–e83.
- [36] Xue J, Li B, Wang Y, et al. Efficacy and safety of epidermal growth factor receptor (EGFR)-tyrosine kinase inhibitor combination therapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR-mutated, non-small cell lung cancer: A systematic review and bayesian network meta-analysis[J]. *Cancers*, 2022, 14(19): 4894.