基于GEO数据库筛选非小细胞肺癌对吉非替尼耐药的关键基因及其细胞学实验验证

李一青，赵春楠，陈向华，丁 萌，张竹青，耿学丽（承德医学院附属医院检验科，河北承德 067000）

摘 要：目的 基于基因表达综合（GEO）数据库筛选非小细胞肺癌（NSCLC）吉非替尼耐药中差异表达的关键基因，并进行细胞学验证。**方法** GEO数据库中下载吉非替尼敏感和耐药样本的数据集：GSE122005、GSE34228，使用R软件分析数据的差异表达基因（DEGs）。利用基因本体论（GO）和京都基因与基因组百科全书（KEGG）富集分析，探讨DEGs在NSCLC吉非替尼耐药中的生物学功能。建立蛋白质-蛋白质相互作用（PPI）网络可视化DEGs并筛选枢纽基因。实时荧光定量PCR（qRT-PCR）检测关键基因在NSCLC吉非替尼耐药细胞株（PC9/GR）和敏感细胞株（PC9）中的表达水平。**结果** GSE122005数据集共筛选到1 240个DEGs，GSE34228数据集共筛选到2 062个DEGs，主要富集在鞘脂、TNF、NF-Kappa B信号通路。两个数据库得到的差异基因取交集构建PPI网络，筛选得到三个枢纽基因：FOXA1、H4C6、KAT2B。qRT-PCR结果显示：与PC9细胞相比，PC9/GR细胞中FOXA1的mRNA表达水平升高，H4C6和KAT2B的mRNA表达水平降低，差异有统计学意义（t=11.55、23.44、25.12，均$P<0.05$）。**结论** 通过生物信息学分析，筛选非小细胞肺癌吉非替尼耐药的关键基因FOXA1、H4C6、KAT2B，其调控机制可能与TNF、NF-Kappa B通路相关，为临床诊疗提供了新的治疗思路。

关键词：非小细胞肺癌；吉非替尼耐药；差异表达基因
中图分类号：R734.2；R730.53 **文献标志码：**A **文章编号：**1671-7414（2026）05-130-05
doi:10.3969/**j.issn.**1671-7414.2026.05.022

Identification of Key Differentially Expressed Genes Associated with Gefitinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Based on GEO Database and Cytological Validation

LI Yiqing, ZHAO Chunnan, CHEN Xianghua, DING Meng, ZHANG Zhuqing, GENG Xueli (*Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Hebei Chengde* 067000, *China*)

Abstract: Objective To identify key differentially expressed genes (DEGs) associated with gefitinib resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC) using the Gene Expression Omnibus (GEO) database, and to perform cytological validation. **Methods** Gene expression datasets related to gefitinib-sensitive and resistant samples, GSE122005 and GSE34228, were downloaded from the GEO database. DEGs were identified using R software. The biological functions of DEGs in gefitinib-resistant NSCLC were investigated by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. A protein-protein interaction (PPI) network was established to visualize DEGs and screen hub genes. The expression levels of hub genes in gefitinib-resistant (PC9/GR) and sensitive (PC9) NSCLC cell lines were assessed using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Results** A total of 1 240 DEGs were identified from the GSE122005 dataset, and 2 062 DEGs were screened from the GSE34228 dataset. The DEGs were primarily enriched in sphingolipid, TNF, and NF-Kappa B signaling pathways. After intersecting the DEGs obtained from both datasets and constructing a PPI network, three hub genes—FOXA1, H4C6, and KAT2B—were identified. qRT-PCR results demonstrated that, compared with PC9 cells, the mRNA expression level of FOXA1 was significantly increased in PC9/GR cells, while the mRNA expression levels of H4C6 and KAT2B were significantly decreased, with statistically significant differences (t=11.55, 23.44, 25.12, all $P<0.05$). **Conclusions** Through bioinformatics analysis, the key genes FOXA1, H4C6, and KAT2B were identified potentially involved in gefitinib resistance in NSCLC. Their regulatory mechanisms may be related to TNF and NF-Kappa B signaling pathways, providing new insights for clinical diagnosis and treatment.

Keywords: non-small cell lung cancer; gefitinib resistance; differential expressed genes

在中国，肺癌是最常见的恶性疾病之一[1]，其中非小细胞肺癌（NSCLC）约占80%~85%且五年生存率普遍低于15%[2-3]；约60%的NSCLC患者存在EGFR（表皮生长因子受体）高表达，针对EGFR突变开发的受体酪氨酸激酶抑制剂（TKIs）已经展示了很大的临床应用前景[4]。EGFR-TKIs的代表性药物是

基金项目：河北省承德市科技计划自筹经费项目（202204A158）。
作者简介：李一青（2000−），女，硕士在读，研究方向：非小细胞肺癌吉非替尼耐药机制研究，E-mail：17835855295@163.com。
通讯作者：耿学丽（1978−），女，硕士，主任技师，研究方向：非小细胞肺癌相关疾病机制研究，E-mail：gengxueli1127@163.com。

吉非替尼[5]，它可以直接抑制EGFR信号通路的激活，抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和转移；在晚期非小细胞肺癌患者中，吉非替尼与常规治疗结合可提升疗效改善预后[6]，但许多患者在口服吉非替尼约12个月后出现耐药现象[7]。目前，EGFR-TKIs耐药机制的不可预测性和多样性仍是NSCLC靶向治疗的关键挑战。鉴于此，本研究基于基因表达综合(GEO)数据库分析筛选NSCLC吉非替尼耐药的关键基因，通过PCR检测关键基因在耐药细胞株与敏感株中的表达，为进一步阐明吉非替尼耐药发病机制和治疗靶点提供方向，期望能对NSCLC吉非替尼耐药的治疗预后开辟全新的思路，挖掘出具有潜力的治疗方案。

1 材料与方法

1.1 *研究对象* 从GEO数据库中下载GSE122005(含3对吉非替尼敏感与耐药样本)和GSE34228(含26对耐药与敏感样本)两个数据集的表达谱。NSCLC吉非替尼耐药细胞系(PC9/GR)和NSCLC吉非替尼敏感细胞系(PC9)均购自上海美轩生物有限公司。

1.2 *仪器与试剂* 胎牛血清(美国Vivacrll公司，C04001-050)；Trizol试剂(美国Invitrogen公司，15596-026)；SYBR Green荧光定量PCR试剂盒(北京天根生化科技有限公司，FP205-02)；全自动荧光定量PCR分析仪(美国Thermo Fisher公司，LightCycler 480)。

1.3 *方法*

1.3.1 筛选差异表达基因(DEGs)：R软件分析从GSE122005和GSE34228数据集中获取的数据，以阈值P<0.05，$|\log_2(FC)| \geq 1$为筛选条件，符合此条件的被认为是差异表达基因。

1.3.2 差异基因进行基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析：运用DAVID(Version 6.8, http://david. ncifcrf. gov)在线工具进行GO的功能分析及KEGG通路富集分析。通过GO功能分析将DEGs功能注释分为生物过程(biological process，BP)、细胞组分(cellular component，CC)及分子功能(molecular function，MF)；KEGG通路富集分析对DEGs信号通路进行总结，结果以气泡图展示。过滤条件设置为校正P值<0.05且错误发现率q值<0.05，P<0.05为差异具有统计学意义。

1.3.3 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI)：GSE122005和GSE34228两个数据集筛选的差异表达基因取交集，通过STRING数据库(https://cn.string-db.org/)构建PPI网络。综合运用Cytoscape软件中的MCODE模块和Cytohubba插件进行关键基因挖掘，取两者的交集作为核心候选基因。

1.3.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测相关基因：qRT-PCR实验验证筛选出的关键基因在PC9/GR和PC9细胞中的mRNA表达水平。实验组为PC9/GR细胞，对照组为PC9细胞。PC9与PC9/GR细胞使用含10%(v/v)胎牛血清的1640培养基进行常规培养。TRIZOL试剂提取PC9与PC9/GR细胞的总RNA。反转录试剂盒将单链RNA合成双链cDNA，转录条件：65℃ 5min，25℃ 5min，42℃ 30min，85℃ 5min。反应完成后放置在−20℃保存。SYBR Green荧光定量PCR试剂盒将上述合成的cDNA进行RT-PCR扩增。扩增条件：95℃ 5min，95℃ 40s，40℃ 40s，72℃ 1min，共40个循环，以GAPDH为内参，采用荧光定量PCR仪检测，通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因的相对表达水平，引物序列见表1。

表1 基因引物序列

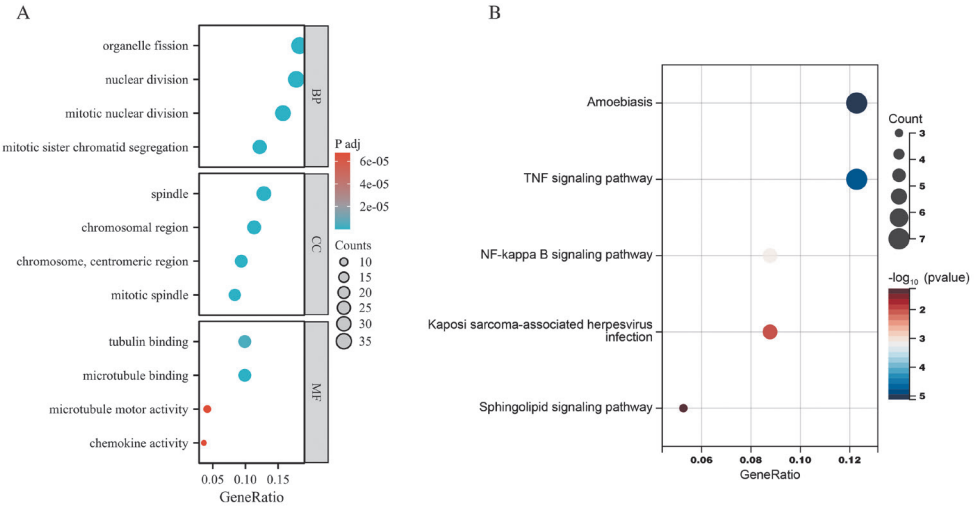
基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
H4C6	GGATTATTGAAGTTAGGAGTTC	TCTCATACCTCAACCTCACG
FOXA1	CCATGGAGAAGGCTGGGG	CAAAGTTGTCATGGATGACC
KAT2B	GAAGAGAACAGAAGCTCCAGG	GCAATTGGTAAAGACTCGCTG
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA

1.4 *统计学分析* 本研究通过R软件筛选DEGs并分析其生物学功能和信号通路。所有数据用Graphpad Prism 9.0进行统计分析，两组间比较采用独立样本t检验，以P＜0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *数据集DEGs的筛选* GSE122005数据集共鉴定到1 240个DEGs，其中上调基因580个，下调基因660个；GSE34228数据集共鉴定到2 062个DEGs，其中上调基因991个，下调基因1 071个。两个数据集筛选出来的差异基因取交集，共获得228个DEGs。

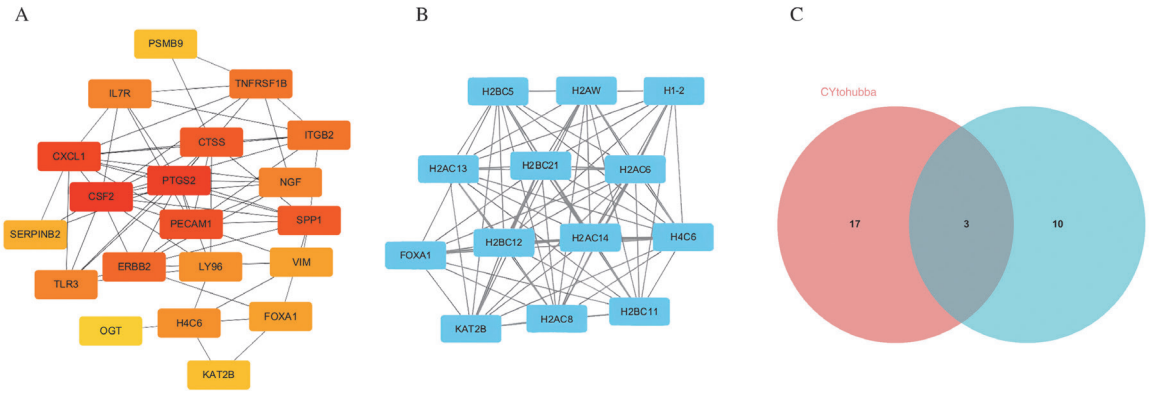
2.2 *DEGs的GO和KEGG富集分析* 通过DAVID在线工具对228个DEGs进行功能富集。BP主要富集在细胞器分裂、核分裂等；CC主要富集在纺锤体、染色体等；MF主要为微管蛋白结合、微管肌动活性等，见图1A。进一步的KEGG富集分析显示，DEGs主要参与TNF、NF-Kappa B等信号通路上，见图1B。



A. GO 富集分析；B. KEGG 富集分析。

图 1 GO 和 KEGG 富集分析

2.3 关键基因的筛选 综合运用Cytoscape(3.9.0)软件中CytoHubba插件得到20个hub基因，见图2A，使用MCODE插件得到13个hub基因，见图2B。为筛选新的NSCLC吉非替尼耐药的生物标志物，取交集得到三个关键基因：FOXA1、H4C6、KAT2B，见图2C。



A.CytoHubba 软件确认关键基因结点图；B.MCODE 软件确认关键基因结点图；C.CytoHubba 与 MCODE 得到的 hub 基因交集。

图 2 Cytoscape 软件筛选枢纽基因

2.4 关键基因的细胞学验证 见表2。qRT-PCR检测了实验组(PC9/GR)与对照组(PC9)中三个枢纽基因FOXA1、H4C6、KAT2B的mRNA表达水平，结果显示：与敏感株PC9比较，FOXA1的mRNA表达水平在耐药株中显著升高；H4C6和KAT2B则在敏感株PC9中表达增高，差异均具有统计学意义(均P<0.05)。

表 2 FOXA1、H4C6、KAT2B 在 PC9 与 PC9/GR 细胞中的表达

项目	PC9	PC9/GR	t 值	P 值
FOXA1 mRNA	0.90±0.02	2.50±0.02	23.44	＜0.000 1
H4C6 mRNA	1.00±0.02	0.25±0.02	25.12	＜0.000 1
KAT2B mRNA	0.90±0.02	0.17±0.02	11.55	0.000 3

3 讨论

吉非替尼作为第一代EGFR-TKI，在治疗非小细胞肺癌患者中取得了显著的临床治愈效果[8]，但患者在接受一段时间治疗后常出现获得性耐药，这已成为当前临床治疗的主要挑战之一[9]。NF-κB信号通路的异常激活已被证实与乳腺癌等多种肿瘤的发生发展相关[10-12]，WANG等[13]的研究进一步提示TNF/NF-κB信号通路与EGFR-TKI耐药有关。本研究基于GEO数据库筛选与qRT-PCR实验验证，鉴定出三个差异表达基因：FOXA1、H4C6、KAT2B。富集分析表明TNF、NF-Kappa B信号通路可能参与NSCLC吉非替尼耐药的发生。

FOXA1最初在肝脏中发现，后在多种器官和组织中呈现差异性表达，在细胞增殖、分化及肿瘤发生中起关键作用，其表达异常与肺癌等多种癌症的发展密切相关[14]。FOXA1是NSCLC的核心调控因子[15]。ZHU等[16]研究显示，FOXA1在NSCLC细胞和组织中表达上调，敲低FOXA1可显著抑制细胞增殖与迁移。NTZIFA等[17]进一步指出，FOXA1的DNA甲基化状态可能作为预测耐药机制的潜在标志。与上述研究一致，本研究发现FOXA1在吉非替尼耐药细胞株中高表达。结合通路富集分析，FOXA1可能通过调控TNF/NF-Kappa B信号通路参与吉非替尼耐药，这些结果进一步验证了FOXA1具有成为NSCLC吉非替尼耐药诊断标志物的潜能并为诊疗提供了新的思路，未来可以深入研究吉非替尼耐药中FOXA1的调控机制，深入理解其机理进而为治疗耐药提供一定的理论支撑。

以往的研究表明H4C6在多种肿瘤的发生发展过程中发挥重要的作用，在多种癌组织中甲基化程度升高[18-19]。此外，H4C6的高甲基化对肺癌诊断也具有较高的敏感性和特异性，能够有效区分肺癌患者与良性肺病患者[20]。KAT2B作为一种组蛋白乙酰转移酶，参与基因表达调控及多种生物学过程[21]。研究显示，其在肺腺癌中呈低表达状态，可作为预测NSCLC患者预后的潜在指标[22]。目前，H4C6、KAT2B在NSCLC吉非替尼耐药中的作用尚不明确。本研究证实，H4C6、KAT2B在吉非替尼耐药细胞中表达下调，提示其可能是一个保护性因子，需要在后续研究中进一步深入探究其在吉非替尼耐药中的生物学意义，为NSCLC吉非替尼耐药生物标志物的筛选、靶点药物的开发提供理论依据。

综上所述，本研究通过分析NSCLC吉非替尼敏感和耐药样本的基因表达谱，系统筛选并验证吉非替尼耐药相关的关键基因FOXA1、H4C6、KAT2B，有助于我们更好地了解NSCLC吉非替尼耐药的发生和发展机制。然而本研究仍存在一定局限，本实验中仅验证了三个关键基因在肺腺癌中的表达情况，未验证在肺鳞癌的表达，后续需进一步结合实验与临床数据开展深入研究。

参考文献：

[1] 何杰，李静，尹昕然，等.1990-2021年中国肺癌发病趋势及未来预测分析[J].实用心脑肺血管病杂志，2025，33(8)：1-5.
HE J, LI J, YIN X R, et al. Incidence trend and future prediction of lung cancer in China from 1990 to 2021[J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2025, 33(8): 1-5.

[2] XIE S M, WU Z G, QI Y, et al. The metastasizing mechanisms of lung cancer: recent advances and therapeutic challenges[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 138: 111450.

[3] 杜娟，陈京，冯晓琳，等.非小细胞肺癌组织中10种驱动基因突变检测与临床病理特征及多基因联合模型诊断价值的关系研究[J].现代检验医学杂志，2025，40(6)：68-73.
DU J, CHEN J, FENG X L, et al. Study on the relationship between detection of 10 driver gene mutations in non-small cell lung cancer tissues and clinical pathological characteristics, as well as the diagnostic value of multi gene combined models[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2025, 40(6): 68-73.

[4] 杨洪，刘怡文，孔金玉.有氧运动对非小细胞肺癌吉非替尼耐药的延缓作用[J].郑州大学学报：医学版，2022，57(5)：670-676.
YANG H, LIU Y W, KONG J Y. Delayed effects of aerobic exercise on gefitinib resistance in non-small cell lung cancer[J]. Journal of Zhengzhou University: Medical Sciences, 2022, 57(5): 670-676.

[5] WU S J, LIU Y, WANG X, et al. PSIP1 promotes gefitinib resistance in lung adenocarcinoma by inducing the expression of WASF3 and its downstream ITGB3/AKT signaling[J]. Clinical and Translational Oncology, 2025, 27(2): 507-517.

[6] 尹林玉，徐威，李俊红.吉非替尼靶向治疗老年晚期非小细胞肺癌患者的效果[J].中国民康医学，2024，36(14)：50-52，56.
YIN L Y, XU W, LI J H. Effects of gefitinib targeted therapy in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. Medical Journal of Chinese People's Health, 2024, 36(14): 50-52, 56.

[7] 徐佳欢，王新年，黄新，等.晚期非小细胞肺癌一线吉非替尼治疗后的耐药时间分析[J].实用药物与临床，2020，23(3)：224-229.
XU J H, WANG X N, HUANG X, et al. Analysis of drug resistance time of advanced non-small cell lung cancer treated with first-line gefitinib[J]. Practical Pharmacy and Clinical Remedies, 2020, 23(3): 224-229.

[8] LI L, XIE J X, LIANG J X, et al. CEMIP promotes gefitinib resistance in lung cancer with EGFR-mutation possibly through forming a stable complex CEMIP/c-MYC[J]. BBA Adv, 2026, 9: 100176.

[9] DELA CRUZ M C, YAO X, ROBERTS N, et al. TLE1 drives EGFR-TKI resistance in EGFR-mutant lung adenocarcinoma through epithelial to mesenchymal transition[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2025, 775: 152146.

[10] YANG Q, TIAN S, LIU Z R, et al. Knockdown of RIPK2 inhibits proliferation and migration, and induces apoptosis via the NF-κB signaling pathway in gastric cancer[J]. Frontiers in Genetics, 2021, 12: 627464.

[11] SUN J Q, LI J, KONG X, et al. Peimine inhibits MCF-7 breast cancer cell growth by modulating inflammasome activation: critical roles of MAPK and NF-κB signaling[J].

（下转第142页）

integrated TCGA pan-cancer clinical data resource to drive high-quality survival outcome analytics[J]. Cell, 2018, 173(2): 400-416, e11.

[18] ELYADA E, BOLISETTY M, LAISE P, et al. Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts[J]. Cancer Discovery, 2019, 9(8): 1102-1123.

[19] GENG X L, CHEN H Z, ZHAO L, et al. Cancer-associated fibroblast (CAF) heterogeneity and targeting therapy of CAFs in pancreatic cancer[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 655152.

[20] DING D, HUANG H, JIANG W, et al. Reticulocalbin-2 enhances hepatocellular carcinoma proliferation via modulating the EGFR-ERK pathway[J]. Oncogene, 2017, 36(48): 6747-6748.

[21] 刘雪,卢静静,宋娟丽.STX4通过PI3K/AKT/mTOR信号通路参与调控卵巢癌细胞内质网-线粒体接触及促进迁移、侵袭的实验研究[J].现代检验医学杂志, 2025, 40(6): 18-21.
LIU X, LU J J, SONG J L. Experimental study on STX4 participates in regulating endoplasmic Reticulum-Mitochondria contact on promoting migration and invasion in ovarian cancer cells through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2025, 40(6): 18-21.

[22] PING Q R, YAN R P, CHENG X, et al. Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions[J]. Cancer Gene Therapy, 2021, 28(9): 984-999.

[23] MURRAY E R, MENEZES S, HENRY J C, et al. Disruption of pancreatic stellate cell myofibroblast phenotype promotes pancreatic tumor invasion[J]. Cell Reports, 2022, 38(4): 110227.

[24] PENG Z W, REN Z H, TONG Z W, et al. Interactions between MFAP5^{+} fibroblasts and tumor-infiltrating myeloid cells shape the malignant microenvironment of colorectal cancer[J]. Journal of Translational Medicine, 2023, 21(1): 405.

[25] DUAN Y, ZHANG X Z, YING H G, et al. Targeting MFAP5 in cancer-associated fibroblasts sensitizes pancreatic cancer to PD-L1-based immunochemotherapy via remodeling the matrix[J]. Oncogene, 2023, 42(25): 2061-2073.

[26] CHEN X, CUBILLOS-RUIZ J R. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment[J]. Nature Reviews Cancer, 2021, 21(2): 71-88.

[27] ISAAC S T, TAN T C, POLLY P. Endoplasmic reticulum stress, calcium dysregulation and altered protein translation: intersection of processes that contribute to cancer cachexia induced skeletal muscle wasting[J]. Current Drug Targets, 2016, 17(10): 1140-1146.

收稿日期：2026-01-27
修回日期：2026-03-02

(上接第133页)

Anticancer Agents Med Chem, 2023, 23(3): 317-327.

[12] XU X S, WANG A A, LUO Z Q, et al. M1-like tumor-associated macrophages promote colorectal cancer progression through feedback activation of the IL1β/NF-κB signaling activity[J]. International Immunopharmacology, 2026, 168: 115845.

[13] WANG H W, XIONG A W, CHEN A A, et al. CXCR1^{+} neutrophil infiltration orchestrates response to third-generation EGFR-TKI in EGFR mutant non-small-cell lung cancer[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024, 9(1): 342.

[14] ZHU J, WEI Y J, DENG F N, et al. The role of FOXA1 in human normal development and its functions in sex hormone-related cancers[J]. Frontiers in Bioscience, 2024, 29(6): 225.

[15] QIAO Z X, LV Z P, SONG X Y, et al. SPDEF-mediated BIRC5 transcriptional activation enhances non-small cell lung cancer progression[J]. Mutat Res, 2026, 832: 111926.

[16] ZHU A Q, ZHOU C, DONG J, et al. FOXA1-NAT10 positive feedback pathway promotes non-small cell lung cancer cell progression[J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2025, 39(11): e70597.

[17] NTZIFA A, MARRAS T, KALLERGI G, et al. Comprehensive liquid biopsy analysis for monitoring NSCLC patients under second-line osimertinib treatment[J]. Front Oncol, 2024, 14: 1435537.

[18] 胡玉莲,齐健,王姝洁,等.基于H4C6甲基化水平和cfDNA浓度构建多癌种癌症风险预测模型[J].安徽医科大学学报, 2023, 58(4): 597-603.
HU Y L, QI J, WANG S J, et al. A multi-cancer risk prediction model which constructed based on H4C6 methylation level and cfDNA concentration[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2023, 58(4): 597-603.

[19] QIAN T, ZHOU Z W, ZHANG Q X, et al. SEPT9, H4C6, and RASSF1A methylation in nasopharyngeal swabs: a reflection of potential minimally invasive biomarkers for early screening of nasopharyngeal cancer[J]. Medicine, 2023, 102(50): e36583.

[20] KE L, HUANG X, LIU W T, et al. A prediction model based on cfDNA concentration and cfDNA methylation biomarkers for lung cancer detection[J]. Scientific Reports, 2025, 15(1): 30969.

[21] LI Y Q, WANG L C, WANGA W, et al. Acetylation modification of AIM2 by KAT2B suppresses the AKT/Wnt/β-catenin signaling pathway activation and inhibits breast cancer progression[J]. Epigenetics & Chromatin, 2025, 18(1): 27.

[22] HE Y J, ZHANG Y X, ZHANG J S, et al. Tanshinone IIA targets RNF123 to inhibit non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion via KAT2B-mediated H3K18ac modification[J]. Oncology Letters, 2025, 31(2): 69.

收稿日期：2025-12-22
修回日期：2026-01-19