

# 基于三羧酸循环相关代谢物的靶向代谢组学探究 HER2 阳性乳腺癌曲妥珠单抗耐药生物标志物

魏棒棒<sup>1</sup>, 曹怿玮<sup>1</sup>, 董春涛<sup>1</sup>, 李德邦<sup>1</sup>, 许飞飞<sup>2</sup>, 司鑫鑫<sup>1\*</sup>, 陈芸<sup>2</sup> (1. 江苏海洋大学药学院, 江苏 连云港 222005; 2. 南京医科大学药学院, 南京 211100)

**摘要:**目的 探究三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)相关代谢物在人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)阳性乳腺癌曲妥珠单抗耐药和敏感细胞中的水平变化,并筛选出与曲妥珠单抗耐药性相关的潜在生物标志物。方法 本研究采用基于超高效液相色谱串联质谱(ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS/MS)的靶向代谢组学方法检测曲妥珠单抗耐药细胞和敏感细胞中 TCA 相关代谢物(枸橼酸、顺式-乌头酸、异构柠檬酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、琥珀酸、富马酸、苹果酸和草酰乙酸)含量水平,并对该检测方法的线性、准确度和精密度进行考察。使用正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)法比较耐药和敏感细胞中 TCA 相关代谢物的表达差异,以  $P < 0.05$  和差异倍数(fold change, FC)  $> 1.5$  或  $< 0.67$  为标准筛选出差异代谢物,并基于支持向量机(support vector machine, SVM)算法建立多变量耐药分类模型,利用受试者工作曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)对差异代谢物和 SVM 模型进行分类精度进行评估。结果 三羧酸循环相关代谢物的标准曲线相关系数  $r$  均大于 0.994,所建立的方法准确度为 94% ~ 105%,精密度变异系数(coefficient of variation, CV)均小于 15%。OPLS-DA 模型中,敏感组和耐药组细胞分离趋势明显。在曲妥珠单抗耐药细胞中,苹果酸、琥珀酸、富马酸的含量较曲妥珠单抗敏感细胞显著升高( $P < 0.05$ )。ROC 分析显示琥珀酸、富马酸和苹果酸的曲线下面积(area under curve, AUC)均大于 0.9,联合 3 种差异代谢物建立 SVM 耐药诊断模型的 AUC 为 1.000。结论 TCA 相关代谢物在曲妥珠单抗耐药和敏感细胞中呈现不同的表达水平,琥珀酸、富马酸和苹果酸可作为生物标志物对 HER2 阳性乳腺癌曲妥珠单抗耐药的诊断具有潜在价值。

**关键词:** HER2 阳性乳腺癌;曲妥珠单抗耐药;三羧酸循环相关代谢物;靶向代谢组学;生物标志物

doi:10.11669/cpj.2024.04.003 中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)04-0302-09

## Exploring Trastuzumab Resistance Biomarkers for HER2-positive Breast Cancer Based on Targeted Metabolomics of TCA-Related Metabolites

WEI Bangbang<sup>1</sup>, CAO Yiwei<sup>1</sup>, DONG Chuntao<sup>1</sup>, LI Debang<sup>1</sup>, XU Feifei<sup>2</sup>, SI Xinxin<sup>1\*</sup>, CHEN Yun<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211100, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the levels of tricarboxylic acid cycle (TCA)-related metabolites in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer trastuzumab-resistant and trastuzumab-sensitive cells, as well as to screen potential biomarkers of trastuzumab resistance. **METHODS** Targeted metabolomics was adopted to detect TCA-related metabolite levels including citrate, *cis*-aconitate, isocitrate,  $\alpha$ -ketoglutarate, succinic acid, fumaric acid, malic acid and oxaloacetic acid based on ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS) in trastuzumab-resistant and trastuzumab-sensitive cells. The linearity, accuracy and precision of the method were validated. Then, orthogonal partial least-squares discrimination analysis (OPLS-DA) was used to compare the relative differential expression in trastuzumab-resistant and trastuzumab-sensitive cells. Differentially expressed metabolites were screened according to  $P < 0.05$ , fold change (FC)  $> 1.5$  or  $FC < 0.67$ . Finally, a multivariable model based on SVM and receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to assess the classification accuracy of each metabolite. **RESULTS** For all TCA-related metabolites, the standard curves were linear, the correlation coefficients ( $r$ ) were greater than 0.994, the established method accuracy was 94% - 105% and the precision coefficient of variation (CV, %) was less than 15%. Trastuzumab-resistant and trastuzumab-sensitive cells were clearly separated from each other in the OPLS-DA model. Malic acid, succinic acid and fumaric acid were significantly upregulated in trastuzumab-resistant cells ( $P < 0.05$ ) compared to trastuzumab-

**基金项目:**国家自然科学基金青年基金项目资助(81703557)

**作者简介:**魏棒棒,男,硕士研究生 研究方向:靶向代谢组学质谱分析 \* **通讯作者:**司鑫鑫,女,副教授,硕士生导师 研究方向:肿瘤细胞耐药的机制 Tel:(0518)85895791

sensitive cells. The areas under the curves (AUCs) of malic acid, succinic acid and fumaric acid were greater than 0.9 and the SVM model yielded the highest AUC of 1.000. **CONCLUSION** TCA-related metabolites are differentially expressed in trastuzumab-resistant and trastuzumab-sensitive cells. Succinic acid, fumaric acid and malic acid can serve as biomarkers that may provide potential value for the diagnosis of trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer.

**KEY WORDS:** HER2-positive breast cancer; trastuzumab-resistance; TCA-related metabolites; targeted metabolomics; biomarker

全球乳腺癌的负担日益上升,乳腺癌因其高死亡率和发病率而成为女性的主要健康问题<sup>[1]</sup>。大约 15%~20% 乳腺癌患者的人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 过表达<sup>[2]</sup>。HER2 阳性乳腺癌作为一种复发性高、侵袭强的恶性肿瘤,相对于管腔 A 型、管腔 B 型和三阴性乳腺癌,HER2 阳性乳腺癌患者预后较差,生存期较短<sup>[3]</sup>。曲妥珠单抗作为 HER2 阳性乳腺癌患者的一线治疗标准<sup>[4]</sup>,通过特异性结合 HER2 胞外结构域,抑制胞内域磷酸化阻滞下游促癌通路<sup>[5]</sup>,从而改善患者的总生存期<sup>[6-7]</sup>。然而,以曲妥珠单抗为治疗方案的 HER2 阳性乳腺癌患者中有 30% 的患者在治疗一年内就出现了耐药性<sup>[8-9]</sup>,并且由于 HER2 蛋白表达的区域异质性,HER2 状态的临床评估存在不准确<sup>[10]</sup>,往往诊断时病灶已出现转移,导致患者错过最佳治疗窗和医疗资源浪费<sup>[11-12]</sup>。因此,临床上亟需 HER2 阳性乳腺癌曲妥珠单抗耐药的诊断生物标志物。尽管基因组学、转录组学和蛋白组学揭示了耐药发生的生物分子机制和干预靶点,然而难以应用于临床耐药性早期诊断和逆转耐药性的治疗<sup>[13-15]</sup>。因而从代谢层面挖掘潜在的生物标志物对于曲妥珠单抗耐药性的发生机制和诊断提供了新思路<sup>[16]</sup>。

HER2 阳性乳腺癌作为一种代谢性疾病,其自身可以发生代谢重编程。肿瘤细胞可通过加快能量代谢为自身的增殖提供动力和物质基础<sup>[17]</sup>。三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)作为能量代谢的核心通路,葡萄糖初步氧化所产生的丙酮酸进入线粒体实现葡萄糖的完全有氧氧化,循环过程产生 ATP 和多种中间代谢产物,见图 1。研究指出,TCA 相关代谢物通过诱导缺氧诱导因子的产生和稳定、表观遗传改变和活性氧水平改变等方式促进肿瘤疾病进展和耐药性的发生<sup>[18]</sup>。琥珀酸的蓄积引起的代谢重编程使得肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 上调,导致琥珀酸脱氢酶的抑制和核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-E2-related factor 2, NRF2) 通路激活<sup>[19]</sup>。最近的研究表明,琥珀酸通过抑制环 GMP-AMP 合酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)-

干扰素- $\beta$  (interferon- $\beta$ , IFN- $\beta$ ) 通路限制 CD8 T 细胞转运到肿瘤微环境,结直肠癌患者表现出抗程序性死亡受-1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 免疫治疗<sup>[20]</sup>。富马酸通过靶向第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, PTEN) 的第 211 位半胱氨酸残基琥珀酸化从而激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶 (serine/threonine kinase, AKT) 信号传导并促进 2 型乳头状肾细胞癌增殖和对舒尼替尼治疗的耐药性<sup>[21]</sup>。在多柔比星耐药的乳腺癌细胞中,药物外排蛋白的高表达引起苹果酸和柠檬酸的在水平上差异,苹果酸被认为是化疗耐药的独特生物标志物<sup>[22]</sup>,然而在曲妥珠单抗耐药细胞和敏感细胞中很少进行有关于 TCA 相关代谢物的系统研究。

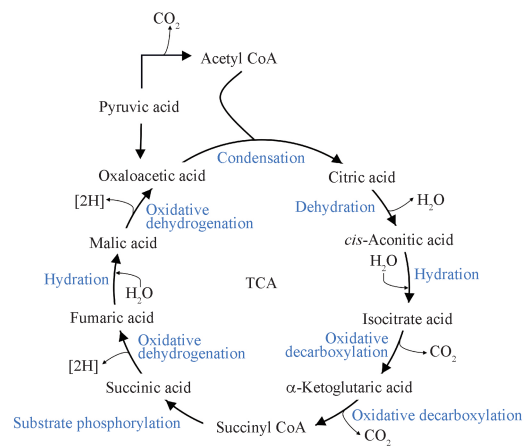


图 1 三羧酸循环(TCA)通路

Fig. 1 TCA pathway

基于液相色谱串联质谱的靶向代谢组学技术已经成为寻找潜在的小分子生物标志物强有力的分析工具,本研究通过超高效液相色谱-质谱联用 (ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 检测 TCA 相关代谢物在曲妥珠单抗耐药细胞 (HCC195、JIMT-1) 和敏感细胞 (BT474、SK-BR-3) 中的表达水平<sup>[23-24]</sup>,基于差异代谢物建立支持向量机 (support vector machine, SVM)

耐药分类模型,并通过受试者工作曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析其作为曲妥珠单抗耐药诊断生物标志物的诊断效能,以期曲妥珠单抗耐药性的诊断提供潜在的生物标志物。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞与试剂

人 HER2 阳性乳腺癌曲妥珠单抗敏感细胞(SK-BR-3、BT-474)和耐药细胞(HCC1954、JIMT-1)(美国细胞培养物收藏中心);Dulbecco's 改良 Eagle 培养基(货号:11960044)、RPMI 1640 培养基(货号:11875093)、McCoy's 5A 培养基(货号:16600082)、胎牛血清(货号:10099141C)(美国 Gibco 公司);色谱级甲醇、甲酸;内标对乙酰氨基苯酚对照品(货号:A105807, 98.0%)、枸橼酸(货号:C434173, 99.5%)、顺式-乌头酸(货号:A111231, 99.0%)、异枸橼酸(货号:II06830, 93.0%)、 $\alpha$ -酮戊二酸(货号:K105570, 99.0%)、琥珀酸(货号:B299883, 95.0%)、富马酸(货号:D154295, 98.0%)、苹果酸(货号:M101126, 99.0%)和草酰乙酸(货号:O107187, 98.0%)(中国阿拉丁生化科技股份有限公司)。

### 1.2 对照品储备液、标准曲线和质控的配制

精密称取 8 种 TCA 相关代谢物,使用体积分数为 20% 甲醇的水溶液(含  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的对乙酰氨基酚)配制成  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的单一标准品储备液,保存在  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱备用。精密量取各标准储备液适量混合以制备混合标准溶液,混合标准溶液中枸橼酸、顺式乌头酸、异枸橼酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、琥珀酸、富马酸、苹果酸和草酰乙酸的浓度分别为 250、500、500、300、250、300、300、500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过逐级稀释配制成系列浓度的混合标准溶液用于建立标准曲线。7 种 TCA 相关代谢物分别配置定量下限浓度(lower limit of quantitation, LLOQ)、低浓度质控(lower of quality control, LQC)、中浓度质控(medium of quality control, MQC)和高浓度质控(high of quality control, HQC)共 4 种浓度的质控(quality control, QC),枸橼酸、顺式乌头酸、异枸橼酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、琥珀酸、富马酸和苹果酸的 LLOQ 分别为 0.5、0.5、5、1、0.1、0.5、0.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , LQC 分别为 1.5、1.5、15、3、0.3、1.5、1.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , MQC 分别为 50、100、100、50、30、50、50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , HQC 分别为 100、200、200、120、60、120、120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 1.3 细胞培养

HCC1954 和 BT-474 细胞分别在含 10% 的胎牛

血清的 RPMI-1640 培养基中培养,SK-BR-3 和 JIMT-1 细胞分别在含 15% 的胎牛血清的 McCoy's 5A 和 DMEM 培养基中培养,各培养基中均加入 1% 的青霉素和链霉素。上述 4 种细胞均于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。每隔 2 d 更换新的培养基,生长融合度到 90% 时,使用 0.25% 胰蛋白酶消化至细胞悬浮后加入到含有新培养基的培养皿中完成传代。

### 1.4 细胞代谢物样本制备

使用预冷的 0.9% NaCl 溶液迅速清洗细胞两次,随后每皿中加入 1.5 mL 的超纯水,于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中放置 2 h 后使用刮刀刮取细胞并采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法进行蛋白浓度测定;通过加入 3 倍体积的  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  预冷甲醇(含  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的对乙酰氨基酚)进行代谢物提取,充分涡旋和高速离心后转移上清液于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  旋转蒸发,用 100  $\mu\text{L}$  体积分数 20% 甲醇的水溶液复溶样品后高速离心吸取上清,装质谱瓶。

### 1.5 UPLC-MS/MS 分析

使用 Agilent 1260 高效液相色谱串联 G6460 三重四级杆质谱,色谱柱采用 Phenomenex Gemini-NX  $\text{C}_{18}$  110 A ( $2 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$ ,  $3 \mu\text{m}$ ),流动相 A 为体积分数 0.2% 甲酸的甲醇溶液,流动相 B 是体积分数 0.2% 甲酸的水溶液。采用线性梯度洗脱实现目的代谢物有效分离,线性梯度设置为:  $0 \sim 1 \text{ min}$ , 1% A;  $1 \sim 2.5 \text{ min}$ , 1% ~ 90% A;  $2.5 \sim 3 \text{ min}$ , 90% A;  $3 \sim 3.5 \text{ min}$ , 90% ~ 1% A;  $3.5 \sim 4 \text{ min}$ , 1% A。色谱柱柱温为  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,流速为  $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,进样量 5  $\mu\text{L}$ 。质谱分析采集模式为多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM),离子源选择电喷雾离子源,扫描方式设置为负离子模式扫描,离子通道驻留时间为 35 ms,干燥气温度为  $330 \text{ }^\circ\text{C}$ ,干燥气流速为  $12 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,雾化气压力为 241 kPa,电喷雾毛细管电压设置为 4 000 V。

### 1.6 数据处理和分析

利用 Agilent MassHunter Qualitative Analysis (version B.06.00) 软件对 TCA 相关代谢物的保留时间、峰面积、峰高和信噪比(signal-to-noise ratio, S/N)进行提取分析。通过 SIMCA-P (version 14.1) 软件实现正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA),使用 GraphPad Prism (version 8.3) 进行线性回归分析、绘制含量表达图和 ROC 分析,使用 R studio (version 4.3.0) 中 pheatmap 和 ggplot2 包进行热图分析和火山图分析,SVM 包构建 SVM 耐药分类模

型。组间比较采用独立样本  $t$  检验以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,以差异倍数 (fold change, FC)  $> 1.5$  和  $< 0.67$  为标准筛选出 TCA 相关差异代谢物。

## 2 结果

### 2.1 TCA 相关代谢物质谱条件优化

利用 UPLC-MS/MS 确定 8 种 TCA 相关代谢物和

内标化合物的相关质谱信息,确定各代谢物以及内标化合物的一级母离子(Q1)和二级子离子(Q3)信息,优化离子对的碎裂电压和碰撞能量,建立 MRM 方法,见图 2。通过 TCA 中间体混合标准溶液确定各自保留时间,在 0~4 min 之内线性洗脱有效分离出 8 种代谢物,出峰时间主要集中在 0.5~2.5 min,8 种 TCA 相关代谢物和内标化合物的质谱优化信息见表 1。

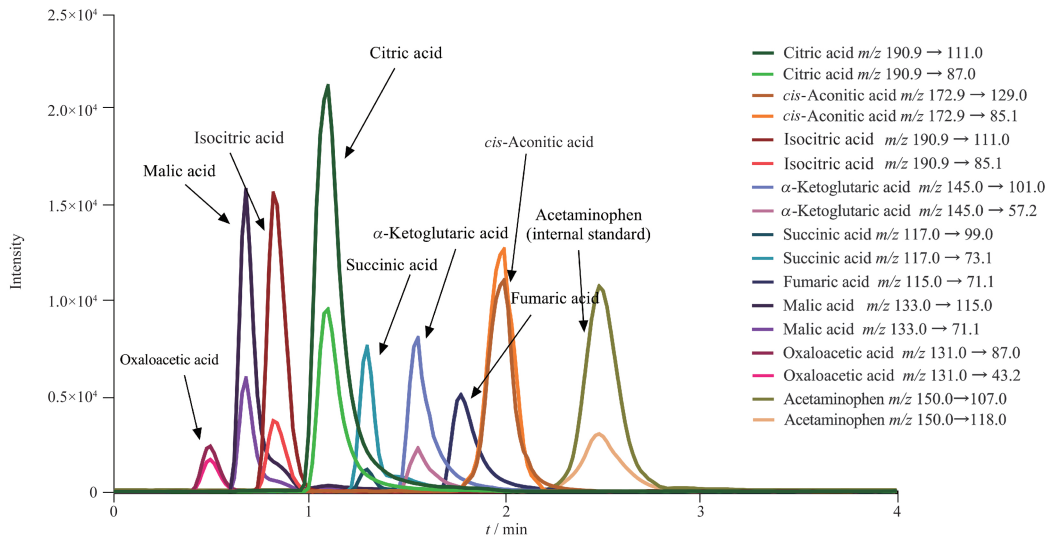


图 2 TCA 相关代谢物的多反应监测通道色谱图

Fig. 2 Multiple reaction monitoring channel chromatogram of TCA-related metabolites

表 1 TCA 相关代谢物的质谱参数优化

Tab. 1 Optimization of mass spectrometry parameters for TCA-related metabolites

Component	$t_R$ /min	$m/z$ (Q1)	Optimization of MS parameters				
			Fragmentation/V	$m/z$ (Q3 <sup>1</sup> )	CE <sup>1</sup> /eV	$m/z$ (Q3 <sup>2</sup> )	CE <sup>2</sup> /eV
Citric acid	1.098	190.9	70	111.0 <sup>1)</sup>	15	87.0	15
cis-Aconitic acid	1.996	172.9	70	129.0 <sup>1)</sup>	2	85.1	5
Isocitric acid	0.819	190.9	70	111.0	10	85.1 <sup>1)</sup>	10
α-Ketoglutaric acid	1.557	145.0	60	101.0 <sup>1)</sup>	2	57.2	5
Succinic acid	1.298	117.0	70	99 <sup>1)</sup>	5	73.1	5
Fumaric acid	1.777	115.0	60	71.1 <sup>1)</sup>	2		
Malic acid	0.680	133.0	70	115.0 <sup>1)</sup>	5	71.1	10
Oxaloacetic acid	0.498	131.0	60	87.0 <sup>1)</sup>	2	43.2	10
Acetaminophen (internal standard)	2.482	150.0	110	107.0	30	118.0	15

注: $t_R$  - 保留时间;CE - 碰撞能量;<sup>1)</sup>定量的子离子;Q1 - 一级母离子;Q3 - 二级子离子。

Note: $t_R$  - retention time; CE - collision of energy; <sup>1)</sup>quantitative Q3; Q1 - primary parent ion; Q3 - secondary daughter ion.

### 2.2 标准曲线、线性范围、准确度和精密度考察

通过使用加入对乙酰氨基酚作为内标的混合标准溶液,以代谢物与内标峰面积的比值为纵坐标,对应浓度为横坐标进行线性回归分析,草酰乙酸由于其本身具有脱羧的不稳定性<sup>[25]</sup>,未进行线性验证,其余 7 种相关代谢物标准曲线的相关性系数  $r$  均大

于 0.994,以 S/N 等于 3 计算出检出限(limit of detection, LOD),S/N 大于 10 计算出 LLOQ。通过对 7 种代谢物的 LLOQ、LQC、MQC 和 HQC 各平行进样 5 次,连续进样分析 3 d,分别计算准确度、日内以及日间精密度。标准曲线、线性范围、准确度和精密度等信息如表 2 所示。7 种代谢物的准确度在 94% ~

105% ,LLOQ 的日间和日内精密度变异系数 (coefficient of variation, CV) 均小于 20% ,低、中、高浓度质

控样品 CV 小于 15% ,该方法的准确度和精密度良好。

表 2 TCA 相关代谢物的回归方程、线性范围、准确度和精密度

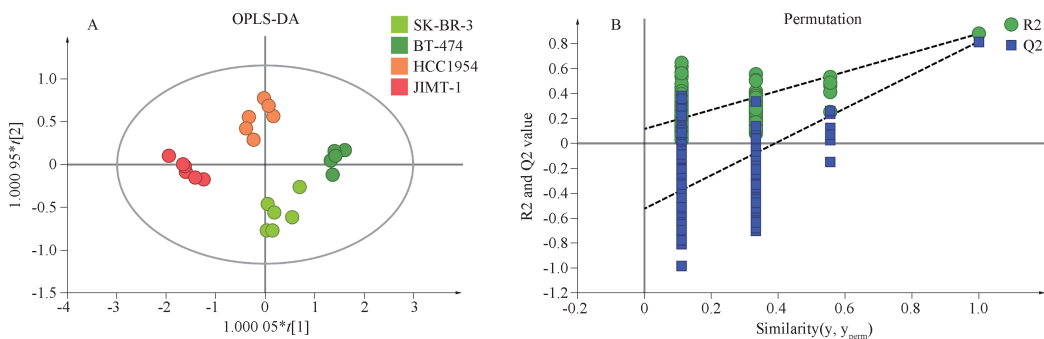
Tab. 2 Regression equations, linear ranges, accuracy and precision of the assays for TCA-related metabolites

Component	Regression equation	Linear range / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$r$	LOD / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	LLOQ / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	QC / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Accuracy /%	Precision	
								Intra-day CV/%	Inter-day CV/%
Citric acid	$y = 0.1004x - 0.02563$	0.5-125	0.9973	0.1	0.5	0.5	94.57	12.72	12.32
						1.5	103.53	8.23	8.41
						50	97.37	5.08	5.15
						100	101.03	4.72	4.77
cis-Aconitic acid	$y = 0.1002x - 0.04986$	0.5-250	0.9942	0.1	0.5	0.5	95.19	10.76	11.85
						1.5	96.98	9.74	10.42
						100	103.55	9.03	9.11
						200	98.42	7.56	8.44
Isocitric acid	$y = 0.001615x - 0.004234$	5-250	0.9947	0.5	5	5	104.85	9.41	11.47
						15	103.9	7.42	7.31
						100	102.69	6.06	6.15
						200	98.52	5.10	5.77
$\alpha$ -Ketoglutaric acid	$y = 0.005797x - 0.0001954$	1-150	0.9991	0.2	1	1	94.18	10.73	11.55
						3	95.81	9.09	10.67
						50	102.27	7.79	8.71
						120	97.17	5.78	6.12
Succinic acid	$y = 0.009153x - 0.0004524$	0.1-75	0.9988	0.02	0.1	0.1	98.64	9.25	9.76
						0.3	99.70	8.06	8.62
						30	102.41	6.71	7.02
						60	100.82	4.07	5.14
Fumaric acid	$y = 0.002386x + 0.002617$	0.5-150	0.9995	0.1	0.5	0.5	94.10	6.98	7.49
						1.5	98.24	6.77	7.11
						50	101.30	5.92	6.35
						120	102.92	4.49	5.22
Malic acid	$y = 0.08506x + 0.004496$	0.5-150	0.9969	0.05	0.5	0.5	97.23	8.05	8.19
						1.5	101.82	6.17	6.26
						50	99.38	5.41	5.97
						120	99.09	4.15	4.97

### 2.3 OPLS-DA 整体差异分析

依据 TCA 相关代谢物的定量水平构建 OPLS-DA 模型,四株细胞组内聚集程度高,组间分离趋势明显。其中  $R^2 X = 0.999$ ,  $R^2 Y = 0.810$ ,  $Q^2 = 0.611$ , 模型具有较好的预测能力,见图 3A。通过 200 次置

换检验分析结果表明,  $R^2$  和  $Q^2$  在 Y 轴上的截距分别小于 0.4 和 0.05, 证明 OPLS-DA 模型没有过拟合, 见图 3B。以上结果表明, TCA 相关代谢物在曲妥珠单抗耐药细胞和敏感细胞中存在差异表达模式, 可用于进一步差异分析。



SK-BR-3, BT-474 - 曲妥珠单抗敏感细胞; HCC1954, JIMT-1 - 曲妥珠单抗耐药细胞; R2 - 解释率; Q2 - 预测能力。

SK-BR-3, BT-474 - trastuzumab-sensitive cells; HCC1954, JIMT-1 - trastuzumab-resistant cells; R2 - explanation rate; Q2 - prediction ability.

图 3 曲妥珠单抗敏感细胞和耐药细胞的正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 得分图 (A) 和 OPLS-DA 模型的置换检验图 (B)

Fig. 3 OPLS-DA score of trastuzumab-sensitive and trastuzumab-resistant cells (A) and permutation test of the OPLS-DA model (B)

## 2.4 细胞样本中 TCA 相关代谢物的检测结果

8 种待测 TCA 相关代谢物中有 6 种代谢物含量在线性范围内,浓度范围在  $0.9101 \sim 104.4174 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经过  $t$  检验后,琥珀酸、富马酸和苹果酸具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),其余相关代谢物均

差异无统计学意义,6 种代谢物在耐药组和敏感组中的含量见图 4A。通过层次聚类分析各样本之间的关联性,四种细胞的不同生物学重复样本之间聚集为两类,表明组内样本的同质性和组间样本的差异性,见图 4B。

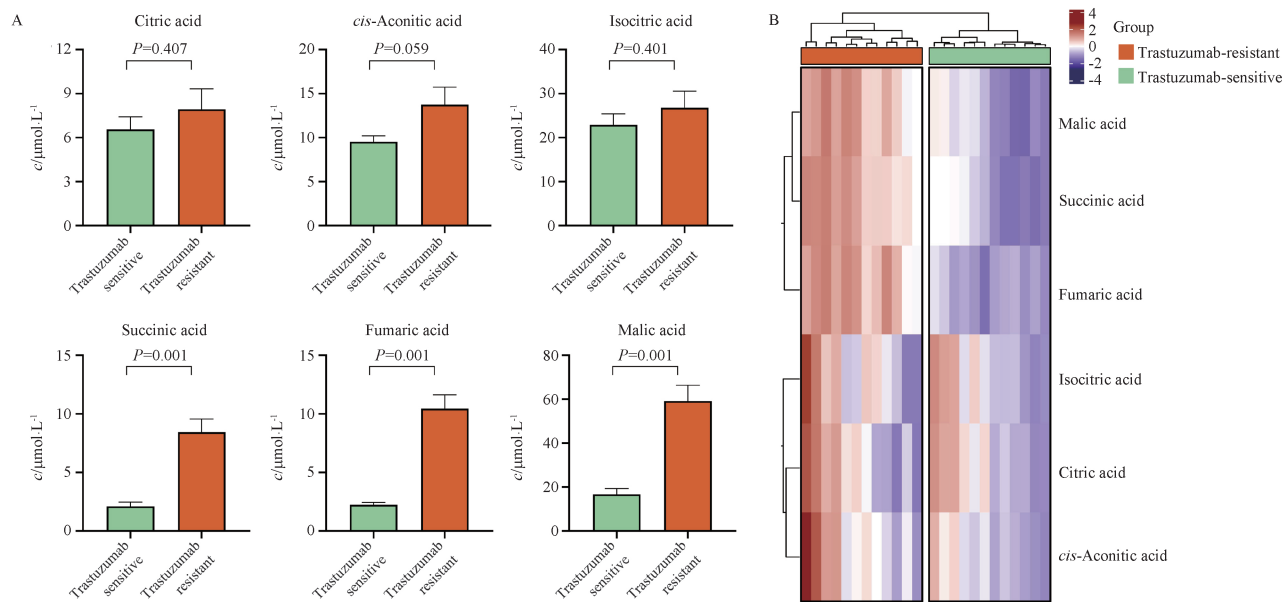


图 4 耐药细胞和敏感细胞中的 TCA 相关代谢物含量 (A) 和热图 (B).  $n = 12, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Expression of TCA-related metabolites (A) and heatmap (B) in resistant and sensitive cells.  $n = 12, \bar{x} \pm s$

## 2.5 曲妥珠单抗耐药和敏感细胞中的差异代谢物筛选

以  $P < 0.05$ 、 $\text{FC} > 1.5$  和  $< 0.67$  为标准筛选差异代谢物,结果表明苹果酸、琥珀酸和富马酸在曲妥珠单抗耐药细胞中显著上调,其余代谢物均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。其中富马酸最显著且差异倍数最大,见图 5。这些差异代谢物共同揭示曲妥珠单抗耐药细胞 TCA 通量水平的改变。

## 2.6 差异代谢物的分类效能分析

对琥珀酸、富马酸和苹果酸进行 ROC 曲线分析,探索其作为生物标志物的诊断效能。结果显示,琥珀酸、富马酸和苹果酸在区分曲妥珠单抗耐药和敏感细胞的 AUC 均大于 0.9,其中富马酸的  $\text{AUC} = 1.000$ ,见图 6A。联合 3 种差异代谢物建立多变量 SVM 诊断模型,以 70% 为训练集,30% 为测试集,结果显示,多变量诊断模型在训练集和测试集的  $\text{AUC} = 1.000$ 。联合指标的诊断性能优于琥珀酸和苹果酸的单变量,能够明显区分耐药组和敏感组细胞,见图 6B。

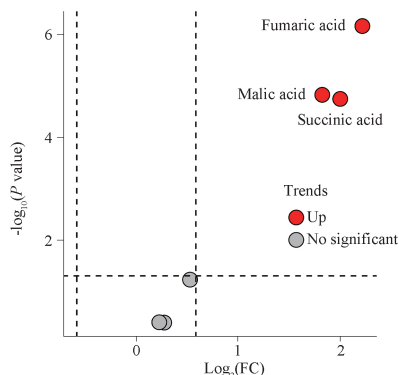


图 5 TCA 相关代谢物火山图

Fig. 5 Volcano plot of TCA-related metabolite

## 3 讨论

本研究通过基于质谱的靶向代谢组学技术探究 8 种 TCA 中间体代谢物在曲妥珠单抗耐药和敏感细胞中的表达情况,所建立的方法具有较好的线性、准确度和精密度,根据差异筛选标准发现苹果酸、富马酸和琥珀酸存在显著差异。基于所筛选到的差异代谢物通过 ROC 分析和构建多变量 SVM 诊断模型可以有效地区分曲妥珠单抗耐药和敏感细胞, AUC

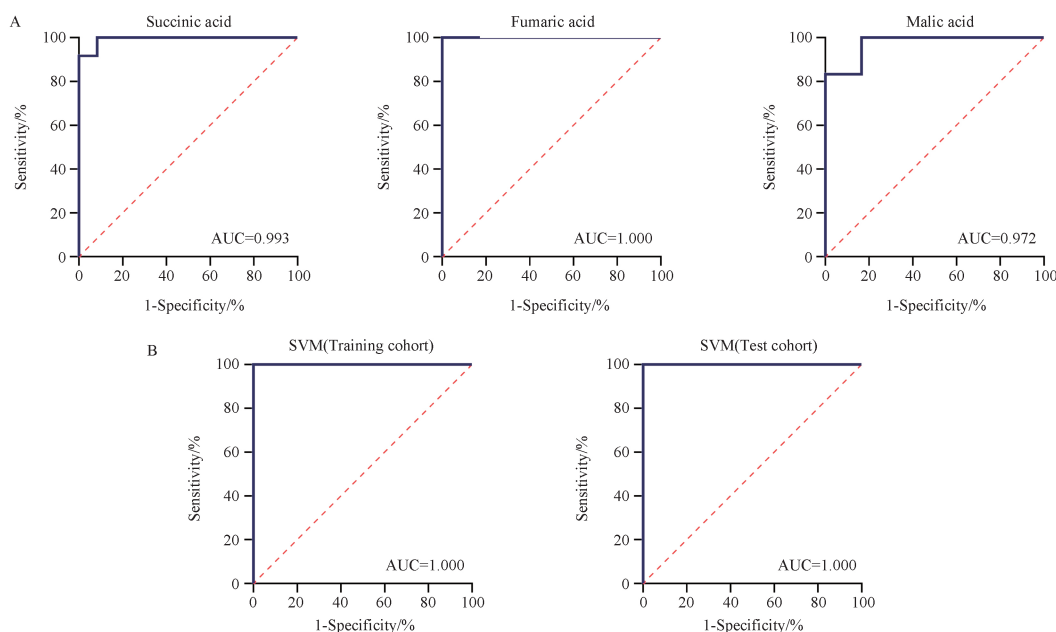


图6 受试者工作特征(ROC)曲线(A)和支持向量机(SVM)多因素诊断模型训练集和测试集的ROC曲线(B)

Fig. 6 ROC curve (A) and SVM multifactor diagnosis model training and test ROC curve (B)

均大于0.9。TCA中间体可能是曲妥珠单抗耐药的潜在生物标志物,研究结果对曲妥珠单抗耐药性的诊断具有潜在价值。

既往的研究指出,TCA周期失调被认为是癌细胞转化的适应机制,TCA相关代谢物为癌症的增殖和转移提供生物合成中间体原料和动力<sup>[26]</sup>。本研究中,富马酸差异倍数最显著,ROC分析显示其AUC=1.000,表明其在诊断曲妥珠单抗耐药具有良好的性能。研究指出,富马酸的蓄积可促进缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)基因的表达实现表观遗传调控,并维持HIF-1的稳定<sup>[27]</sup>,这使得高丰度的富马酸有利于癌细胞上皮间充质的转化,子宫肌瘤、皮肤平滑肌瘤和肾细胞癌的患病风险大大增加<sup>[28]</sup>。在一项对吉西他滨化疗耐药的胰腺导管癌组织的研究中显示,富马酸在预后不良和预后较好的患者中差异倍数最大,并表现出上调趋势,富马酸对PLS-DA模型具有较大的贡献值<sup>[29]</sup>。此外,Liu等<sup>[30]</sup>指出在曲妥珠单抗耐药胃癌细胞中富马酸和苹果酸显著上调,其中富马酸通过增加ATP产生和非必需氨基酸的合成有助于细胞增殖和耐药性产生。

本研究中琥珀酸的ROC分析显示其AUC=0.993,可以显著区分耐药组和敏感组细胞,琥珀酸的上调趋势在卵巢癌、胃癌、胰腺癌和乳腺癌等多种癌症中得到证实<sup>[31-34]</sup>。过量的琥珀酸使得

HIF-1升高,同时还阻止HIF-1脯氨酸残基羟基化降解<sup>[35]</sup>。相比较于癌旁组织,在胃癌组织中琥珀酸可通过G蛋白偶联受体-91介导STAT3和ERK1/2活化并上调血管内皮生长因子促进癌细胞增值和转移<sup>[36]</sup>。最近的一项研究指出,索拉非尼耐药的肝癌细胞的非靶向代谢组学结果揭示琥珀酸在耐药肝癌细胞中的表达显著上调,通过对凋亡信号通路产生抗性,这使得琥珀酸可能成为耐药生物标志物<sup>[37]</sup>。此外,新辅助治疗预后不良的乳腺癌患者血浆外泌体的通路富集分析显示线粒体电子传递链和TCA显著富集,琥珀酸作为电子传递链的电子供体,在预后不良患者中显著上调,作者指出琥珀酸的上调不仅促进和稳定HIF-1,同时还会诱导多种药物外排转运蛋白的表达包括P糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白1(multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)和乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP),引发多重耐药性<sup>[38-39]</sup>。

本研究发现在耐药细胞中苹果酸显著上调的,Gao等<sup>[40]</sup>指出在肝癌细胞中引起苹果酸的蓄积是由于癌细胞对糖酵解的代谢依赖而引起下游氧化磷酸化抑制,作者通过随机森林和多因素逻辑回归得到包括苹果酸在内的3种生物标志物组成的高特异性诊断模型,这在另一项对腔鳞状细胞癌患者唾液代谢谱研究中也得到证实,苹果酸在内的3种生

物标志物组成的诊断模型 AUC 可达 0.91, 具有临床应用价值<sup>[41]</sup>。Wang 等<sup>[42]</sup>利用非靶向代谢组学技术对高表达醛脱氢酶 1A1 耐药肺癌细胞代谢谱进行单因素和多因素差异分析发现, 苹果酸的异常高表达显示 TCA 通路的代谢重编程, 能量代谢增强。

#### 4 结论

本研究利用基于质谱的靶向代谢组学定量检测 HER2 阳性乳腺癌曲妥珠单抗耐药和敏感细胞中 TCA 相关代谢物的水平, 所建立的方法具有较好线性、准确度和精密度, 差异分析显示富马酸、苹果酸和琥珀酸在耐药细胞中显著上调, 并且单变量和 SVM 多变量模型可以有效区分耐药组和敏感组细胞, 靶向代谢组学技术为生物标志物的挖掘提供了新方向, 基于所筛选到的生物标志物在曲妥珠单抗耐药性的诊断具有良好的应用前景, 这对后续 HER2 阳性曲妥珠单抗耐药性机制和干预靶标的研究提供了新的见解。

#### REFERENCES

- [ 1 ] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, *et al.* Cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1):17-48.
- [ 2 ] SLAMON D J, CLARK G M, WONG S G, *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene [J]. *Science*, 1987, 235(4785):177-182.
- [ 3 ] CHEN W, XIA S J, LI H, *et al.* A cost-effectiveness analysis of adjuvant trastuzumab regimens in HER2-positive early breast cancer [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2017, 52(8):696-701.
- [ 4 ] ZENG X H, PENG L B. Progress of trastuzumab in early-stage human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2012, 47(20):1605-1608.
- [ 5 ] SPECTOR N L, BLACKWELL K L. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(34):5838-5847.
- [ 6 ] DERAKHSHANI A, REZAEI Z, SAFARPOUR H, *et al.* Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4):3142-3156.
- [ 7 ] GIANNI L, EIERMANN W, SEMIGLAZOV V, *et al.* Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer(the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort [J]. *Lancet*, 2010, 375(9712):377-384.
- [ 8 ] NAHTA R, ESTEVA F J. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance [J]. *Breast Cancer Res*, 2006, 8(6):215. DOI:10.1186/bcr1612.
- [ 9 ] NIE X Y, GAO J L, SUN Y Q, *et al.* Advances in preclinical research on drug resistance overcoming strategies of anti-HER2-positive breast cancer targeted therapy [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2023, 58(7):553-559.
- [ 10 ] SEOL H, LEE H J, CHOI Y, *et al.* Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance [J]. *Mod Pathol*, 2012, 25(7):938-948.
- [ 11 ] ABOUTORABI A, HADIAN M, GHADERI H, *et al.* Cost-effectiveness analysis of trastuzumab in the adjuvant treatment for early breast cancer [J]. *Glob J Health Sci*, 2014, 7(1):98-106.
- [ 12 ] OLSON E M, ABDEL-RASOUL M, MALY J, *et al.* Incidence and risk of central nervous system metastases as site of first recurrence in patients with HER2-positive breast cancer treated with adjuvant trastuzumab [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(6):1526-1533.
- [ 13 ] GUEST P C, GOTTSCHALK M G, BAHN S. Proteomics: improving biomarker translation to modern medicine? [J]. *Genome Med*, 2013, 5(2):17. DOI: 10.1186/gm421.
- [ 14 ] HRISTOVA V A, CHAN D W. Cancer biomarker discovery and translation: proteomics and beyond [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2019, 16(2):93-103.
- [ 15 ] YANG T, FU Z, ZHANG Y, *et al.* Serum proteomics analysis of candidate predictive biomarker panel for the diagnosis of trastuzumab-based therapy resistant breast cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129:110465. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110465.
- [ 16 ] MAO C, WANG M, LI L, *et al.* Circulating metabolites serve as diagnostic biomarkers for HER2-positive breast cancer and have predictive value for trastuzumab therapy outcomes [J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(2):e24212. DOI: 10.1002/jcla.24212.
- [ 17 ] YU Q Q, ZHOU S S, FANG G Y. The role of glutamine transporter in breast cancer [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2021, 56(5):341-345.
- [ 18 ] MARTÍNEZ-REYES I, CHANDEL NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):102. DOI: 10.1038/s41467-019-13668-3.
- [ 19 ] ZHAO T, MU X, YOU Q. Succinate: an initiator in tumorigenesis and progression [J]. *Oncotarget*, 2015, 8(32):53819-53828.
- [ 20 ] JIANG S S, XIE Y L, XIAO X Y, *et al.* Fusobacterium nucleatum-derived succinic acid induces tumor resistance to immunotherapy in colorectal cancer [J]. *Cell Host Microbe*, 2023, 31(5):781-797.
- [ 21 ] GE X, LI M, YIN J, *et al.* Fumarate inhibits PTEN to promote tumorigenesis and therapeutic resistance of type2 papillary renal cell carcinoma [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(7):1249-1260.
- [ 22 ] CAO B, LI M, ZHA W, *et al.* Metabolomic approach to evaluating adriamycin pharmacodynamics and resistance in breast cancer cells [J]. *Metabolomics*, 2013, 9(5):960-973.
- [ 23 ] BROCKHOFF G, HECKEL B, SCHMIDT-BRUECKEN E, *et al.* Differential impact of cetuximab, pertuzumab and trastuzumab on BT474 and SK-BR-3 breast cancer cell proliferation [J]. *Cell Prolif*, 2007, 40(4):488-507.
- [ 24 ] O'BRIEN N A, BROWNE B C, CHOW L, *et al.* Activated phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling confers resistance to trastuzumab but not lapatinib [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(6):1489-1502.

- [25] AL KADHI O, MELCHINI A, MITHEN R, *et al.* Development of a LC-MS/MS method for the simultaneous detection of tricarboxylic acid cycle intermediates in a range of biological matrices [J]. *J Anal Methods Chem*, 2017, 2017: 5391832. DOI: 10.1155/2017/5391832.
- [26] BRIÈRE J J, FAVIER J, GIMENEZ-ROQUEPLO A. P, *et al.* Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291(6):1114-1120.
- [27] ISAACS J S, JUNG Y J, MOLE D R, *et al.* HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer; novel role of fumarate in regulation of HIF stability [J]. *Cancer Cell*, 2005, 8(2):143-153.
- [28] TOMLINSON I P, ALAM N A, ROWAN A J, *et al.* Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer [J]. *Nat Genet*, 2002, 30(4):406-410.
- [29] PHUA L C, GOH S, TAI D W M, *et al.* Metabolomic prediction of treatment outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma patients receiving gemcitabine [J]. *Cancer Chemother Pharm*, 2018, 81(2):277-289.
- [30] LIU W, WANG Q, CHANG J. Global metabolomic profiling of trastuzumab resistant gastric cancer cells reveals major metabolic pathways and metabolic signatures based on UHPLC-Q exactive-MS/MS [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(70):41192-41208.
- [31] XIA L, ZHANG H, WANG X, *et al.* The role of succinic acid metabolism in ovarian cancer [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 769196. DOI: 10.3389/fonc.2021.769196.
- [32] HUR H, PAIK M J, XUAN Y, *et al.* Quantitative measurement of organic acids in tissues from gastric cancer patients indicates increased glucose metabolism in gastric cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e98581. DOI: 10.1371/journal.pone.0098581.
- [33] LUO X, LIU J, WANG H, *et al.* Metabolomics identified new biomarkers for the precise diagnosis of pancreatic cancer and associated tissue metastasis [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 156: 104805. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104805.
- [34] KANAAN Y M, SAMPEY B P, BEYENE D, *et al.* Metabolic profile of triple-negative breast cancer in African-American women reveals potential biomarkers of aggressive disease [J]. *Cancer Genom Proteom*, 2014, 11(6):279-294.
- [35] SELAK M A, ARMOUR S M, MACKENZIE E D, *et al.* Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase [J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(1): 77-85.
- [36] MU X, ZHAO T, XU C, *et al.* Oncometabolite succinate promotes angiogenesis by upregulating VEGF expression through GPR91-mediated STAT3 and ERK activation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(8):13174-13185.
- [37] ABUSHAWISH K Y I, SOLIMAN S S M, GIDDEY A D, *et al.* Multi-omics analysis revealed a significant alteration of critical metabolic pathways due to sorafenib-resistance in Hep3B cell lines [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11975. DOI: 10.3390/ijms231911975.
- [38] CHEN S Y, CAI J X, ZHANG W P, *et al.* Proteomic analysis of proteins associated with the paclitaxel-induced drug-resistant human breast cancer cells [J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2014, 49(10):825-832.
- [39] JOSHI S, GARLAPATI C, BHATTARAI S, *et al.* Exosomal metabolic signatures are associated with differential response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5324. DOI: 10.3390/ijms23105324.
- [40] GAO R, CHENG J, FAN C, *et al.* Serum metabolomics to identify the liver disease-specific biomarkers for the progression of hepatitis to hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18175. DOI: 10.1038/srep18175.
- [41] DA COSTA N L, DE SÁALVES M, DE SÁRODRIGUES N, *et al.* Finding the combination of multiple biomarkers to diagnose oral squamous cell carcinoma-A data mining approach [J]. *Comput Biol Med*, 2022, 143: 105296. DOI: 10.1016/j.combiomed.2022.105296.
- [42] WANG Y, WANG C H, ZHANG Y F, *et al.* UPLC-MS-based metabolomics reveals metabolic dysregulation in ALDH1A1-overexpressed lung adenocarcinoma cells [J]. *Metabolomics*, 2019, 15(4):52. DOI: 10.1007/s11306-019-1514-5.

(收稿日期:2023-08-03)