

EGFR-T790M突变所致吉非替尼耐药肺腺癌细胞化疗药物敏感性变化的研究

李学真, 邹文, 马进安, 张星南

中南大学湘雅二医院肿瘤科, 湖南长沙 410011

[摘要] **背景与目的:** EGFR-TKI治疗NSCLC失败后, 化疗仍可取得一定的治疗效果, 是可选择的治疗方案之一。核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase, RR)、胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS)、核苷酸切除修复交叉互补基因1(excision repair cross complementation group 1, ERCC1)、3型β微管蛋白(β -tubulin-III, TUBB3)分别与吉西他滨、培美曲塞、铂类药物及微管类药物的化疗药物敏感性存在相关性, 可以通过这些分子标志物的表达水平来预测化疗药物的敏感性。RRMI、TS、ERCC1和TUBB3高表达患者化疗药物的敏感性降低, 低表达患者化疗药物敏感性增高。本研究拟探讨EGFR-T790M突变所致吉非替尼耐药肺腺癌细胞对顺铂、吉西他滨、长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛和培美曲塞化疗药物敏感性的变化。**方法:** 通过MTT法检测PC9及PC9/GR细胞对顺铂、吉西他滨、长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛和培美曲塞的IC₅₀, 探讨其对上述药物的化疗敏感性。采用液相芯片法, 检测PC9及PC9/GR细胞ERCC1 mRNA、RRM1 mRNA、TUBB3 mRNA和TS mRNA的表达水平。通过蛋白质印迹法(Western blot)检测PC9及PC9/GR细胞ERCC1、RRM1、TUBB3和TS蛋白的表达水平。**结果:** 与PC9细胞株相比较, PC9/GR细胞株对吉非替尼、顺铂、吉西他滨和培美曲塞的IC₅₀明显增高($P < 0.05$); 对长春瑞滨、紫杉醇和多西他赛的IC₅₀明显降低($P < 0.05$)。PC9/GR细胞对吉非替尼、顺铂、吉西他滨、长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛和培美曲塞的耐药指数分别为70、1.56、1.61、0.34、0.39、0.14和1.71。与PC9细胞株mRNA的表达量相比较, PC9/GR细胞株ERCC1 mRNA、RRM1 mRNA和TS mRNA的表达量明显增高($P < 0.05$), TUBB3的mRNA的表达量明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与PC9细胞株蛋白的表达量相比较, PC9/GR细胞株ERCC1、RRM1和TS的蛋白表达量明显增高, TUBB3蛋白的表达量明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:** 肺腺癌细胞株发生EGFR-T790M突变后对化疗药物敏感性发生变化, 对顺铂、吉西他滨和培美曲塞的敏感性降低, 对长春瑞滨、紫杉醇和多西他赛的敏感性增高; 其化疗药物敏感性发生变化的原因可能与肺腺癌细胞株发生EGFR-T790M突变后ERCC1 mRNA、RRM1 mRNA、TS mRNA及其蛋白表达量发生变化相关。

[关键词] 肺腺癌; T790M突变; 耐药; ERCC1; TUBB3; TS; RRM1; 化疗;

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.02.008

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)02-0129-06

The research on the change of chemosensitivity of gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cell caused by EGFR-T790M mutation LI Xuezhen, ZOU Wen, MA Jin'an, ZHANG Xingnan (Department of Oncology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha Hunan 410011, China)

Correspondence to: ZOU Wen E-mail: zouwen29w@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Chemotherapy is an alternative treatment option, which could still get a therapeutic effect, when the EGFR-TKI treatment of non-small cell lung cancer failed. Studies have shown that RR, TYMS, ERCC1 and TUBB3 have respectively relationship with chemosensitivity of gemcitabine, pemetrexed, platinum-based drugs and microtubule-based chemotherapy drugs. The expression levels of these molecular markers can predict the sensitivity of these chemotherapy drugs. The patients with RRMI, TS, ERCC1 and TUBB3 higher expression have reduced chemosensitivity, and lower expression have increased sensitivity. The purpose of this study was to explore the sensitivity of tumor cell lines with acquired resistance to gefitinib caused by EGFR-T790M mutation

to cisplatin, gemcitabine, pemetrexed, vinorelbine, paclitaxel and docetaxel. **Methods:** MTT assay was used to detect the IC_{50} values of cisplatin, gemcitabine, vinorelbine, paclitaxel and docetaxel, pemetrexed to PC9 and PC9/GR cells, and to explore the chemosensitivity of lung adenocarcinoma cells to these chemotherapy drugs; Luminex method was used respectively to detect the expression levels of ERCC1 mRNA, TUBB3 mRNA, TS mRNA, and RRM1 mRNA in PC9 and PC9/GR cells. Western blot was used to detect the protein expression levels of ERCC1, TUBB3, TS and RRM1 in PC9 and PC9/GR cells. **Results:** The IC_{50} values of cisplatin, gemcitabine and pemetrexed to PC9/GR cells were significantly higher than those to PC9 cells ($P<0.05$), while the IC_{50} values of vinorelbine, paclitaxel and docetaxel to PC9/GR cells were significantly decreased ($P<0.05$). Luminex method showed the expressions of ERCC1 mRNA, TS mRNA and RRM1 mRNA in PC9/GR cells were significantly increased than those in PC9 cells ($P<0.05$), while the expression of TUBB3 mRNA was significantly decreased ($P<0.05$). Western blot method showed the expressions of TUBB3, TS and RRM1 protein in PC9/GR cells were significantly increased than those in PC9 cells ($P<0.05$), while TUBB3 protein expression in PC9/GR cells was significantly decreased ($P<0.05$). Western blot method analysis result showed that the expressions of TUBB3, TS and RRM1 protein in PC9/GR cells were significantly increased than those in PC9 cells ($P<0.05$), while TUBB3 protein expression in PC9/GR cells was significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** The chemosensitivity of lung adenocarcinoma with EGFR-T790M mutation is changed. It has decreased sensitivity to cisplatin, gemcitabine, pemetrexed and increased sensitivity to vinorelbine, paclitaxel and docetaxel. The reason of the change of chemosensitivity of gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cell maybe related to the changes of ERCC1 mRNA, RRM1 mRNA and TS mRNA and their protein expressions.

[Key words] Adenocarcinoma; EGFR-T790M mutation; Gefitinib-resistant; ERCC1; TUBB3; TS; RRM1; Chemotherapy

肺癌是世界上发病率最高的恶性肿瘤之一,在我国,肺癌的发病率及死亡率亦居各种恶性肿瘤的首位。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)作为肺癌的主要类型,占肺癌患者的85%以上,并且多数患者确诊时已处于晚期,丧失了手术治疗的机会,需要进行化疗或分子靶向治疗。对于大多数晚期NSCLC患者,以铂类为基础的一线化疗有效率仅为20%~30%^[1],疗效已达到平台期。近年来,随着肺癌基因分型及分子靶向药物的发展,以吉非替尼、厄洛替尼为代表的靶向治疗已成为晚期NSCLC内科治疗的主要手段,并取得惊人效果^[2]。但是,即使EGFR-TKI初始治疗非常有效的患者,治疗一段时间后,最终还是会出现继发性耐药而导致疾病的进展^[3]。对于发生EGFR-TKI治疗耐药的患者该如何优化治疗方案,是当前肺癌临床治疗亟待解决的难题。晚期NSCLC应用EGFR-TKI继发性耐药后,其对化疗药物的敏感性是否有变化,如何选择对EGFR-TKI耐药的肺腺癌高效且相对低毒的化疗药物具有重要的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料

PC9为吉非替尼敏感肺腺癌细胞株,PC9/GR为采用大剂量吉非替尼冲击结合逐步递增浓度体外诱导获得的吉非替尼继发性耐药肺腺癌细胞株,由广州呼吸研究所赠予。RPMI-1640培养液为中南大学湘雅二医院医药技术开发公司分装;吉非替尼购自英国AstraZeneca公司;顺铂、吉西他滨、长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛和培美曲塞均购自山东齐鲁制药有限公司;四甲基偶氮唑蓝和二甲亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司;兔抗人ERCC1、RRM1、TYMS和TUBB3抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;鼠抗人 β -actin抗体、HRP山羊抗鼠IgG抗体亦购自武汉三鹰生物技术有限公司;Proteintech液相芯片试剂盒由益善生物技术股份有限公司提供;液相基因芯片系统和Luminex阅读仪购自美国Luminex公司。

1.2 MTT法检测PC9及PC9/GR细胞对顺铂、吉西他滨、长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛和培美曲塞的 IC_{50}

收集对数期生长的肺腺癌细胞PC9及PC9/

GR, 分别制成细胞悬液后调整浓度, 取3 000个/孔细胞接种于96孔板, 每孔加入100 μL RPMI-1640完全培养基, 每组设6个复孔。培养24 h后, 分别加入不同浓度的吉非替尼溶液: 0、0.001、0.005、0.01、0.05、0.5、1、5、10和20 $\mu\text{mol/L}$; 顺铂浓度分别为: 0、1、2.5、5、10、15、30、60和120 $\mu\text{mol/L}$; 紫杉醇、多西他赛、长春瑞滨、吉西他滨、培美曲塞药物浓度均为0、0.0001、0.001、0.01、0.005、0.1、1、5和20 $\mu\text{mol/L}$ 继续培养72 h。在加药第72 h的前4 h, 每孔加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL, 即0.5%MTT), 继续培养4 h后终止培养, 小心吸去孔内培养液, 每孔加入150 μL 二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡5~10 min, 使结晶充分溶解。在酶联免疫检测仪上选用490 nm波长测量各孔的吸光度(A)值。实验结束后, 计算细胞存活率, 再根据半数抑制浓度(IC₅₀)值计算耐药指数, 其中细胞存活率= $(A_{\text{药物处理组}} - A_{\text{空白对照组}}) / (A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$, 耐药指数=耐药细胞IC₅₀/敏感细胞IC₅₀。

1.3 液相芯片法检测PC9及PC9/GR细胞ERCC1 mRNA、RRM1 mRNA、TUBB3 mRNA和TS mRNA的表达水平

将细胞离心收集于1.5 mL EP管中, 加入裂解液, 56 $^{\circ}\text{C}$ 下裂解反应2 h。采用美国NanoDrop公司超微量核酸蛋白分析仪检测裂解液中总mRNA纯度。将样本裂解液转移至温育板上, 加入支持探针-微球、支持延伸探针、缓冲液, 55 $^{\circ}\text{C}$ 震荡温育过夜。次日将温育板放在磁力架上1 min, 此时磁性微球聚集在底部, 弃去上清液。加入洗涤液, 震荡洗涤1 min, 温育板放在磁力架上1 min, 弃去上清液, 重复洗3次。加入扩增延伸探针和标记探针, 50 $^{\circ}\text{C}$ 震荡反应1 h。温育板放在磁力架上1 min, 弃去上清液; 用洗涤液洗2次。加入链霉亲和素-藻红蛋白, 50 $^{\circ}\text{C}$ 震荡反应30 min。温育板放在磁力架上1 min, 弃去上清液; 用洗涤液洗2次。加入洗涤液, 震荡5 min, 于Luminex 阅读仪上读取数据 [Events: 100 Sample Size: 50 μL Bead ; Set: 20 # ; 29 # ; 34 # ; 36 # ; 43 # ; 44 # ; 45 # ; 46 # Set: 20 # ; 29 # ; 34 # ; 36 # ; 43

; 44 # ; 45 # ; 46 # ; SET后的编号为微球编号, 不同的微球上包埋有不同的探针, 探针和目标分子特异的杂交结合, 在液相芯片仪上读取荧光值, 进行检测结果判定。Gate: 8 000 ~ 13 500]。数据分析, 得出检测结果; 软件读取原始结果显示为微球中位荧光读数, 经益善生物科技股份有限公司提供数据处理软件产生最终结果。

1.4 蛋白质印迹法(Western blot)检测PC9及PC9/GR细胞ERCC1、RRM1、TUBB3和TS蛋白的表达水平

PC9和PC9/GR细胞用RIPA裂解液裂解, 按照BCA蛋白定量试剂盒(Wellbio)使用说明操作, 测定蛋白浓度。完全溶解蛋白标准品, 浓度为2 mg/mL, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 5%脱脂奶粉封闭1 h, 0.2% TBST洗膜3次, 每次10 min, 分别加入兔抗人ERCC1、RRM1、TS和TUBB3抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 0.2% TBST洗膜3次, 每次10 min, 加相应的二抗及GAPDH内参温育45~60 min。温育结束, TBS-T洗3次, 每次15 min。洗膜后采用化学发光法检测目的基因和内参基因蛋白的表达。

1.5 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件对数据进行分析, 各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 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。

2 结 果

2.1 MTT实验结果

根据各浓度抑制率分别计算出吉非替尼、顺铂、吉西他滨、长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛和培美曲塞对肺腺癌细胞株PC9、PC9/GR的IC₅₀以表示上述各化疗药对两个细胞株的敏感性。结果显示肺腺癌PC9细胞对吉非替尼、顺铂、吉西他滨、长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛和培美曲塞的IC₅₀分别为(0.031 \pm 0.007)、(2.657 \pm 0.039)、(0.293 \pm 0.051)、(0.067 \pm 0.005)、(0.018 \pm 0.004)、(0.021 \pm 0.001)和(0.258 \pm 0.013) $\mu\text{mol/L}$; 肺腺癌PC9/

GR细胞对吉非替尼、顺铂、吉西他滨、长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛、培美曲塞的 IC_{50} 分别为(2.170±0.101)、(4.135±0.177)、(0.471±0.035)、(0.023±0.005)、(0.007±0.001)、(0.003±0.001)和(0.440±0.027) $\mu\text{mol/L}$ 。与PC9细胞株相比较, PC9/GR细胞株对吉非替尼、顺铂、吉西他滨和培美曲塞的 IC_{50} 明显增高($P<0.05$); 对长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛的 IC_{50} 明显降低($P<0.05$)。PC9/GR细胞对吉非替尼、顺铂、吉西他滨、长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛、培美曲塞的耐药指数分别为70.00、1.56、1.61、0.34、0.39、0.14和1.71(表1)。

表1 肺腺癌PC9、PC9/GR细胞对化疗药物的 IC_{50}

Tab. 1 The IC_{50} values of cisplatin, gemcitabine, vinorelbine, paclitaxel, docetaxel, pemetrexed to PC9 and PC9/GR cells

Drug	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Resistance index
	PC9	PC9/GR	
Gefitinib	0.031±0.007	2.170±0.101	70.00
Cisplatin	2.657±0.039	4.135±0.177	1.56
Gemcitabine	0.293±0.051	0.471±0.035	1.61
Vinorelbine	0.067±0.005	0.023±0.005	0.34
Paclitaxel	0.018±0.004	0.007±0.001	0.39
Docetaxel	0.021±0.001	0.003±0.001	0.14
Pemetrexed	0.258±0.013	0.440±0.027	1.71

2.2 液相芯片检测结果

Luminex阅读器读取微球中位荧光值的数据, 检测各基因微球中位荧光值与相应对照组微球中位荧光值比值代表mRNA的相对表达量。结果显示, PC9细胞株检测ERCC1 mRNA、RRM1 mRNA、TUBB3 mRNA和TS mRNA的相对表达量分别为0.425±0.000、0.884±0.000、0.413±0.000和0.527±0.000; PC9/GR细胞株检测ERCC1 mRNA、RRM1 mRNA、TUBB3 mRNA和TS mRNA的相对表达量分别为0.486±0.002、1.426±0.002、0.284±0.000和0.743±0.000。与PC9细胞株mRNA的表达量相比较, PC9/GR细胞株ERCC1 mRNA、RRM1 mRNA和TS mRNA表达量明显增高($P<0.05$), TUBB3 mRNA的表达量明显降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$, 表2, 图1)。

表2 肺腺癌PC9、PC9/GR细胞株相关基因的mRNA表达

Tab. 2 The expressions of ERCC1 mRNA, RRM1 mRNA, TUBB3 mRNA, TS mRNA in PC9 and PC9/GR cells

Gene	mRNA expression		P value
	PC9	PC9/GR	
ERCC1	0.425±0.000	0.486±0.002	<0.05
RRM1	0.884±0.000	1.426±0.002	<0.05
TUBB3	0.413±0.000	0.284±0.000	<0.05
TS	0.527±0.000	0.743±0.000	<0.05

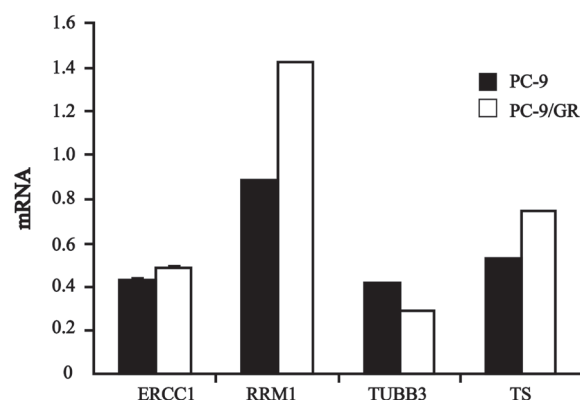


图1 液相芯片检测ERCC1 mRNA、RRM1 mRNA、TUBB3 mRNA和TS mRNA表达情况

Fig. 1 The expression levels of ERCC1 mRNA, RRM1 mRNA, TUBB3 mRNA and TS mRNA in PC9 and PC9/GR cells

2.3 Western blot检测结果

利用凝胶成像系统分析, 以 β -actin作为内参蛋白, 以各组待测蛋白条带灰度值/ β -actin条带灰度值表示各组待测蛋白的表达量。PC9细胞株ERCC1、RRM1、TUBB3和TS蛋白相对表达量分别为54.237±11.724、45.713±0.770、62.164±1.743和44.146±13.025; PC9/GR细胞株ERCC1、RRM1、TUBB3和TS蛋白表达量分别为72.463±4.045、65.843±8.265、35.654±2.731和65.531±5.266; 与PC9细胞株蛋白的表达量相比较, PC9/GR细胞株ERCC1、RRM1和TS的蛋白表达量明显增高, TUBB3的蛋白表达量明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$, 表3、图2)。

表3 肺腺癌PC9、PC9/GR细胞株相关基因的表达情况

Tab. 3 The expressions of TUBB3, TS and RRM1 protein in

Gene	PC9 and PC9/GR cells		P value
	Protein expression		
	PC9	PC9/GR	
ERCC1	54.237±11.724	72.463±4.045	<0.05
RRM1	45.713±0.770	65.843±8.265	<0.05
TUBB3	62.164±1.743	35.654±2.731	<0.05
TS	44.146±13.025	65.531±5.266	<0.05

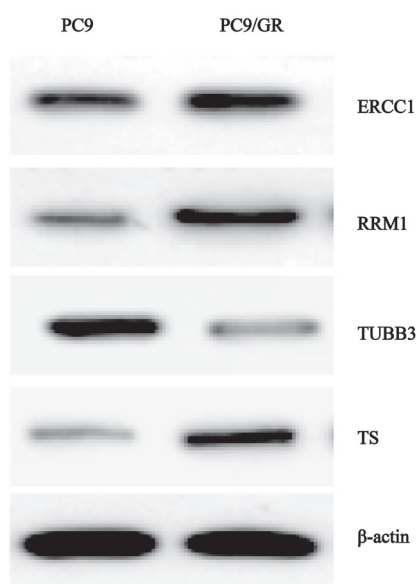


图2 Western blot检测ERCC1、RRM1、TUBB3和TS蛋白的表达

Fig. 2 The expressions of ERCC1, RRM1, TUBB3 and TS protein in PC9 and PC9/GR cells by Western blot

3 讨论

近年来,分子靶向治疗已成为NSCLC的标准治疗,具有低毒高效的优势。实验证实,应用靶向治疗出现继发性耐药后改用化疗仍然可取得较好的临床疗效。导致NSCLC靶向治疗过程中产生继发性耐药的机制多种多样,如EGFR二次突变(T790M突变)^[3]、MET基因扩增^[4]、IGF-IR下调^[5]、向小细胞肺癌转化^[6-7]、PTEN缺失^[8]等。不同机制导致产生继发性耐药的NSCLC改用化疗时应该如何选择高效的化疗方案,值得深入研究。

本研究中,液相芯片检测显示PC9细胞株EGFR19外显子缺失突变(delE746-A750);

PC9/GR细胞株不仅存在EGFR19外显子缺失突变(delE746-A750),同时存在EGFR20外显子T790M突变。本研究应用MTT法检测PC9及PC9/GR细胞株对顺铂、吉西他滨、长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛和培美曲塞的IC₅₀,分别应用液相芯片法和Western blot法检测上述药物化疗敏感性相关基因ERCC1 mRNA、RRM1 mRNA、TUBB3 mRNA和TS mRNA,及其蛋白的表达情况。MTT实验结果显示,PC9/GR细胞株对顺铂、吉西他滨和培美曲塞的IC₅₀较PC9细胞株明显增高,其对长春瑞滨、紫杉醇和多西他赛IC₅₀较PC9细胞株明显降低。同时,与PC9细胞株相比,PC9/GR细胞株ERCC1 mRNA、RRM1 mRNA和TS mRNA及蛋白表达量明显升高,其TUBB3 mRNA及蛋白含量明显降低。说明PC9/GR细胞株较PC9细胞株对顺铂、吉西他滨和培美曲塞的药物敏感性明显降低,产生了不同程度的耐药;而对抗微管类药物长春瑞滨、紫杉醇和多西他赛的敏感性增高。Wu等^[9]回顾性分析了195例肺癌患者,这部分患者一线应用吉非替尼耐药后,改用化疗,其有效率为27%,其中以铂类为基础或者以紫杉类为基础的联合化疗,其有效率明显高于单药或者其他化疗方案的有效率,其中紫杉类联合铂类药物的有效率最高,达50.0%。另外,邓沁芳等^[10]进行基础研究发现,吉非替尼获得性耐药的肺腺癌细胞株与亲代非耐药细胞株相比,其对顺铂敏感性明显减弱,对多西他赛敏感性增强,这与本研究的结果一致。此外,邓沁芳等^[10]的研究中,耐吉非替尼细胞株与非耐药细胞株对培美曲塞的敏感性无明显变化,其原因可能是由于该研究中应用的细胞株是致突变剂及吉非替尼短时间内诱导突变导致的吉非替尼耐药细胞株,并未对其进行耐药机制的检测,其产生耐药的机制并不明确,而本研究的PC9/GR细胞株对吉非替尼耐药是由EGFR-T90M突变导致的,两者可能存在耐药机制及其它方面的不同。本研究中经吉非替尼治疗发生耐药后,对顺铂、吉西他滨和培美曲塞敏感性降低可能分别与ERCC1、RRM1及TS表达量

明显升高有关。TUBB3 mRNA及蛋白表达量明显降低, 可能是紫杉类药物化疗敏感性增高的原因。而对以微管蛋白III为基础的紫杉类化疗药物敏感性提高, 原因可能与PC9细胞株产生继发性耐药后, 细胞株P-170蛋白表达水平降低相关。

本研究结果提示, 使用吉非替尼导致EGFR-T790M突变发生继发性耐药后, 改行化疗时, 建议应用以紫杉类为基础的化疗方案, 避免使用吉西他滨及铂类为基础的化疗方案。

[参 考 文 献]

- [1] Non-Small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials [J] . BMJ, 1995, 311(7010): 899-909.
- [2] MITSUDOMI T, MORITA S, YATABE Y, et al. West Japan Oncology Group: Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial [J] . Lancet Oncol, 2010, 11(2): 121-128.
- [3] OXNARD G R, ARCILA M E, SIMA C S, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation [J] . Clin Cancer Res, 2011, 17(6): 1616-1622.
- [4] SUDA K, MURAKAMI I, KATAYAMA T, et al. Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer [J] . Clin Cancer Res, 2010, 16(22): 5489-5498.
- [5] NGUYEN K S, KOBAYASHI S, COSTA D B, et al. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway [J] . Clin Lung Cancer, 2009, 10(4): 281-289.
- [6] MORINAGA R, OKAMOTO I, FURUTA K, et al. Sequential occurrence of non-small cell and small cell lung cancer with the same EGFR mutation [J] . Lung Cancer J Iaslc, 2007, 58(3): 411-413.
- [7] SEQUIST L V, WALTMAN B A, DIAS-SANTAGATA D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors [J] . Sci Transl Med, 2011, 3(75): 26.
- [8] SOS M L, KOKER M, WEIR B A, et al. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR [J] . Cancer Res, 2009, 69(8): 3256-3261.
- [9] WU J Y, SHIH J Y, YANG C H, et al. Second-line treatments after first-line gefitinib therapy in advanced non-small cell lung cancer [J] . Int J Cancer, 2010, 126(1): 247-255.
- [10] 邓沁芳, 栗波, 赵印敏, 等. 吉非替尼获得性耐药细胞株对不同化疗药物的敏感性分析 [J] . 中华肿瘤杂志, 2008, 30(11): 813-816.

(收稿日期: 2014-02-01 修回日期: 2014-12-20)