

· 基础研究 ·

长链非编码RNA BANCR与非小细胞肺癌EGFR-TKI耐药的相关性研究

刘佩^{1,2}, 陈臻瑶¹, 于山珣³, 王朝霞^{1*}

¹南京医科大学第二附属医院肿瘤科, 江苏 南京 210011; ²南京医科大学第四附属医院肿瘤科, 江苏 南京 210031; ³泰州市人民医院肿瘤科, 江苏 泰州 225300

[摘要] 目的:探讨长链非编码RNA BANCR与非小细胞肺癌表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)耐药之间的相关性。方法:选择EGFR 19外显子缺失突变的细胞株PC9以及EGFR-TKI吉非替尼诱导的耐药细胞株PC9/GR进行研究。应用实时荧光定量PCR法(qRT-PCR)检测PC9/GR及PC9细胞中BANCR的表达差异。在PC9/GR细胞中过表达BANCR,应用CCK-8法检测细胞对吉非替尼药物敏感性,克隆形成试验检测细胞增殖能力,流式细胞术检测细胞凋亡情况,Western blot检测上皮间质转化相关蛋白的表达。结果:①BANCR在PC9/GR细胞中显著低表达($P < 0.05$)。②在PC9/GR细胞中过表达BANCR后,相对于对照组,吉非替尼对PC9/GR细胞的半数抑制浓度(half inhibition concentration, IC_{50})降低($P < 0.05$)。过表达BANCR后PC9/GR细胞增殖能力减弱,经吉非替尼处理后细胞凋亡增多($P < 0.05$)。③Western blot结果显示过表达BANCR的PC9/GR细胞E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达水平明显升高,N-钙黏蛋白(N-cadherin)表达水平明显降低($P < 0.05$)。结论:长链非编码RNA BANCR可诱导细胞凋亡,抑制细胞增殖;过表达BANCR可以增加PC9/GR细胞对吉非替尼的敏感性,逆转其耐药性,其机制可能与调控上皮间质转化有关。

[关键词] 长链非编码RNA; BANCR; 非小细胞肺癌; 耐药性; EGFR-TKI; 吉非替尼

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)07-975-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20200708

Correlation of long chain non-coding RNA BANCR and EGFR-TKI drug resistance of non-small cell lung cancer

LIU Pei^{1,2}, CHEN Zhenyao¹, YU Shanxun³, WANG Zhaoxia^{1*}

¹Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011;

²Department of Oncology, the Fourth Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210031;

³Department of Oncology, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, China

[Abstract] **Objective:** To explore correlation between long chain non-coding RNA (lncRNA) BANCR and epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) drug resistance of non-small cell lung cancer. **Methods:** Mutated cell strain PC9 with EGFR exon 19 deletion and drug resistant cell strain PC9/GR induced by EGFR-TKI gefitinib were selected for research. Real time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) was applied to examine expression difference of BANCR in PC9/GR and PC9. BANCR was over expressed in PC9/GR cells and then CCK-8 method was used to examine drug susceptibility of the cells to gefitinib and clone formation assay to examine cell reproductive capacity. Meanwhile, flow cytometry was adopted to examine cell apoptosis and Western blot to check expression of epithelial-mesenchymal transition related proteins. **Results:** ① BANCR was significantly low expressed in PC9/GR cells ($P < 0.05$). ② When BANCR was over-expressed in PC9/GR cells, compared with control group, half inhibition concentration (IC_{50}) of gefitinib was reduced ($P < 0.05$), cell reproductive capacity was lowered, and cell apoptosis increased after being handled with gefitinib ($P < 0.05$). ③ Compared with control group, Western blot showed that expression level of E-cadherin in the PC9/GR cells over-expressed BANCR was significantly elevated and expression level of N-cadherin was remarkably lowered ($P < 0.05$).

[基金项目] 国家自然科学基金(81672307);江苏省医学创新团队基金(CXTDA2017021)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangzhaoxia@njmu.edu.cn

Conclusion: Long chain non-coding RNA BANCR can induce cell apoptosis and inhibit cell reproduction. Over expressed BANCR can increase sensitivity of PC9/GR cells to gefitinib and thus reverse drug resistance. This mechanism might work through regulating EMT process.

[Key words] lncRNA; BANCR; NSCLC; drug resistance; EGFR-TKI; gefitinib

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(07):975-980]

目前,肺癌是全球发生率和死亡率最高的恶性肿瘤^[1],也是我国人群发病率和死亡率最高的癌症。国家癌症中心数据显示,我国2015年新增癌症患者392.9万并有233.8万人因癌死亡,其中肺癌发病人数和死亡人数均居恶性肿瘤第1位^[2]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌的主要类型,约占肺癌总数的80%以上。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变是NSCLC中最常见的驱动基因之一^[3-4]。大量临床研究证明,对于EGFR突变的NSCLC患者,与传统含铂类双药化疗方案相比表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)可以明显延长患者的疾病无进展生存时间(progression free survival, PFS),提高患者的客观反应率(objective responserate, ORR),对患者生活质量以及耐受性方面都具有显著优势^[5-7]。最新指南及专家共识一致推荐EGFR-TKI作为EGFR突变晚期NSCLC患者的一线标准治疗。但是接受EGFR-TKI治疗的晚期NSCLC患者会不可避免地出现耐药情况,EGFR-TKI耐药成为治疗NSCLC的最大障碍之一。

最近研究表明,长链非编码RNA(long-chain non-coding RNA, lncRNA)在细胞分化、增殖和转移等过程中起着重要的调控作用,为肿瘤治疗靶点的研究带来了希望。多项研究指出,在肺癌的肿瘤组织中,lncRNA BANCR水平下调,转染过表达载体pcDNA-BANCR后,BANCR表达升高,肿瘤生长受到抑制。本课题组前期研究表明,NSCLC肿瘤组织中BANCR显著低表达;且与NSCLC患者肿瘤大小、病理分期及生存期缩短有关,BANCR低表示提示预后不良;同时BANCR在吉非替尼耐药的NSCLC细胞株PC9/GR中的表达较其亲本细胞株PC9显著降低^[8]。目前BANCR在肺癌耐药中的作用机制尚不明确,本研究在吉非替尼耐药的人肺癌细胞株PC9/GR中过表达BANCR,观察BANCR表达的改变及其在吉非替尼耐药中的作用,初步探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人肺癌细胞系PC9购自中国科学院肿瘤研究所,吉非替尼耐药细胞系PC9/GR由本实验室诱导;胎牛血清和DMEM培养基(Gibco公司,美国);吉非替尼(Astra Zeneca公司,美国);青链霉素、总RNA抽提试剂、pcDNA-BANCR、空载体质粒(Invitrogen公司,美国);TRIzol、反转录和实时荧光定量PCR试剂盒(大连TaKaRa公司);二甲基亚砜(DMSO)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐、PBS、结晶紫溶液(Hycone公司,美国);Fugene转染试剂(罗氏公司,德国);辣根过氧化物酶偶联的抗兔二抗(武汉博士德公司);E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体、N-钙黏蛋白(N-cadherin)抗体(Cell Signaling Technology公司,美国);CCK-8活细胞计数试剂盒、GAPDH抗体(Sigma Aldrich公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 培养细胞和细胞转染

PC9、PC9/GR细胞在含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的DMEM培养基中,置于37℃、5% CO₂的恒温培养箱中常规培养。选取对数生长期细胞进行操作,参照Fugene转染试剂说明书,将pcDNA-BANCR以及对照空载体质粒分别转染至PC9/GR细胞中,分别为过表达组和空载组,48 h后进行相关检测。

1.2.2 实时荧光定量PCR

参照RNA提取试剂盒说明书,使用TRIzol试剂提取细胞总RNA,并使用Smart-Spec™ plus分光光度计测定RNA纯度及浓度,采用TaKaRa反转录试剂盒合成cDNA,参照PCR试剂盒说明书采用SYBR Green荧光染料法进行PCR扩增。根据PCR变性-退火-延伸3个基本反应步骤,设置PCR反应条件为:预变性(95℃,30 s);变性(95℃,5 s),退火(60℃,30 s),延伸(72℃,60 s),共40个循环;内参参照为GAPDH。最终实验数据采用2^{-ΔΔCt}法进行相对

定量分析。实验中使用的相关引物见表1,实验重复3次。

表1 qRT-PCR引物序列

Table 4 Primer sequences of qRT-PCR

基因名称	引物序列(5'→3')
BANCR	上游:ACAGGACTCCATGGCAAACG
	下游:ATGAAGAAAGCCTGGTGCAGT
GAPDH	上游:GGGAGCCAAAAGGGTCAT
	下游:GAGTCCTCCACGATACCAA

1.2.3 CCK-8法检测细胞活性

选取对数生长期的过表达组和空载组细胞,按 3×10^3 个/孔接种到96孔板中,每孔200 μL ,且每组5个复孔。培养24 h待细胞贴壁完成后,弃上清液,加入0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00、32.00 $\mu\text{mol/L}$ 的吉非替尼。72 h后,丢弃含药物的培养基,然后分别加入含10% CCK-8的DMEM培养基,培养箱中孵育2 h,在450 nm处用多孔板酶标仪检测光密度,并计算半数抑制浓度(IC_{50}),实验重复3次。

1.2.4 克隆形成试验检测细胞增殖能力

选取对数生长期的过表达组和空载组细胞,用0.25%的胰蛋白酶进行消化,接种在6孔板中,2 000个/孔,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养5~7 d。出现肉眼可见的克隆后终止培养,加甲醇1 mL/孔,固定20 min,去固定液,加结晶紫1 mL/孔,静置20 min,然后用流水洗净,室温晾干,将培养板倒置拍照,计算克隆数及形成率,实验重复3次。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率。

将对数生长期的过表达组和空载组细胞调整浓度至 3×10^5 个/mL,2 mL/孔接种于6孔板,贴壁培养24 h后加入终浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 吉非替尼,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下的培养箱中继续培养48 h,胰酶消化收集各组细胞,预冷的PBS洗涤2次,制备单细胞悬液,参照操作说明使用AV/PI双染,避光条件下放置10 min,流式细胞仪检测各组细胞凋亡率,实验重复3次。

1.2.6 Western blot检测蛋白表达

收集转染后48 h的细胞,加入RIPA蛋白裂解液,冰上裂解细胞,离心提取总蛋白,BCA法定量,进行SDS-PAGE电泳,蛋白分离后电转移至PVDF膜,添加5%牛血清白蛋白封闭1 h,分别添加E-cadherin抗体、N-cadherin抗体(1:1 000稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST缓冲液洗膜,5 min/次,共计3次。添加辣根过氧化物酶偶联的抗兔二抗(1:10 000稀释),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,TBST缓冲液洗膜,10 min/次,总计3次,

ECL显色。GAPDH为内参,分析各蛋白与内参的灰度值比值,计算蛋白的相对表达量,实验重复3次。

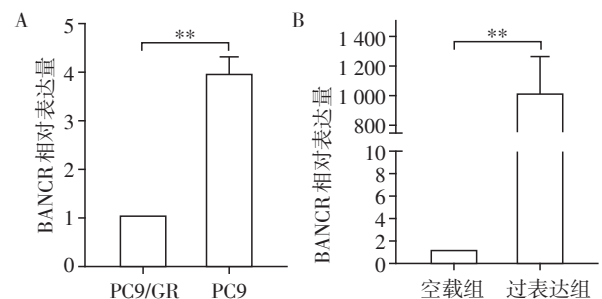
1.3 统计学方法

采用SPSS19.0软件进行统计分析,计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BANCR在细胞中的表达变化

通过qRT-PCR检测PC9细胞与PC9/GR细胞中BANCR的表达量,结果表明,BANCR在PC9细胞中的相对表达量高于PC9/GR细胞($P < 0.01$,图1A)。pcDNA-BANCR转染PC9/GR细胞48 h后,qRT-PCR检测细胞中BANCR的表达水平。结果显示,与空载组比较,过表达组细胞中BANCR的表达量明显升高($P < 0.01$,图1B),表明瞬时转染成功。



A:qRT-PCR检测PC9细胞与PC9/GR细胞中BANCR的表达量; B;qRT-PCR检测空载组与过表达组PC9/GR细胞中BANCR的表达量;两组比较, $P < 0.01$, $n=3$ 。

图1 qRT-PCR检测PC9和PC9/GR细胞中BANCR的表达
Figure 1 qRT-PCR was used to detect the expression of BANCR in PC9 and PC9/GR cells

2.2 BANCR对PC9/GR细胞吉非替尼耐药的影响

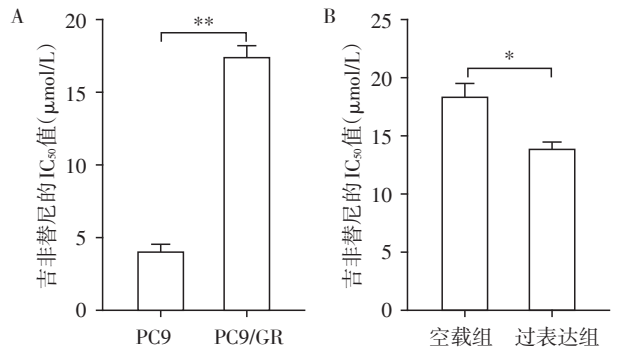
CCK-8法检测不同浓度吉非替尼对PC9细胞和PC9/GR细胞活性的影响,计算 IC_{50} ,发现吉非替尼对PC9细胞的 IC_{50} 值显著低于PC9/GR细胞($P < 0.01$,图2A),而过表达组 IC_{50} 值明显低于空载组($P < 0.05$,图2B)。

2.3 BANCR对PC9/GR细胞增殖的影响

克隆形成试验结果表明,过表达组细胞的克隆数目明显减少,增殖能力受到抑制,与空载组间差异有统计学意义($P < 0.05$,图3)。说明BANCR可以直接抑制PC9/GR细胞的增殖速度,对其克隆形成能力起到一定抑制作用。

2.4 BANCR对PC9/GR细胞凋亡的影响

PC9/GR细胞给予吉非替尼处理后,通过流式细



A: CCK-8法检测PC9细胞和PC9/GR细胞的IC₅₀值; B: CCK-8法检测空载组和pcDNA-BANCR组PC9/GR细胞的IC₅₀值; 两组比较, **P*<0.05, ***P*<0.01, *n*=3。

图2 采用CCK-8方法检测吉非替尼敏感性变化

Figure 2 The sensitivity of gefitinib was detected by CCK-8

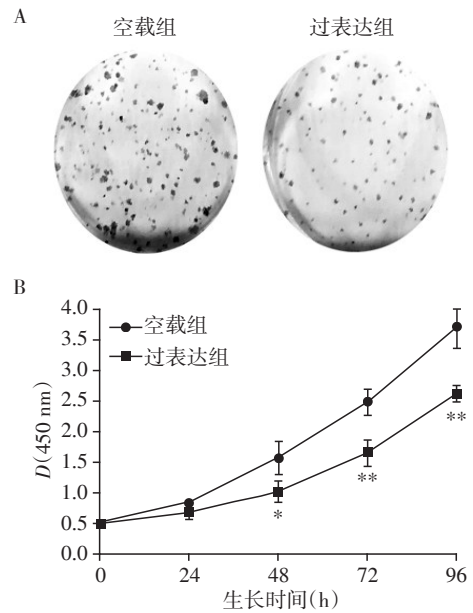
胞术分析细胞凋亡情况。结果显示,空载组PC9/GR细胞的早期凋亡率为(11.59±0.43)%,而晚期凋亡率为(4.39±0.44)%。转染pcDNA-BANCR的PC9/GR过表达组细胞的早期凋亡率为(18.40±0.43)%,晚期凋亡率为(7.40±0.43)%,差异均有统计学意义(*P*<0.01,图4)。提示过表达BANCR可能通过促进细胞凋亡而增加PC9/GR细胞对吉非替尼的敏感性。

2.5 BANCR对PC9/GR细胞E-cadherin和N-cadherin表达的影响

Western blot结果显示,对比转染空质粒的细胞,转染pcDNA-BANCR质粒的PC9/GR细胞中E-cadherin表达水平明显升高,N-cadherin水平明显降低(*P*<0.05,图5)。所以,过表达BANCR可能是通过调控上皮-间质转化(EMT)过程增加PC9/GR细胞对吉非替尼的敏感性,逆转其耐药性。

3 讨论

lncRNA是一组长度在200~100 000 nt之间,不编码蛋白却参与细胞内多种过程调控的RNA,在总

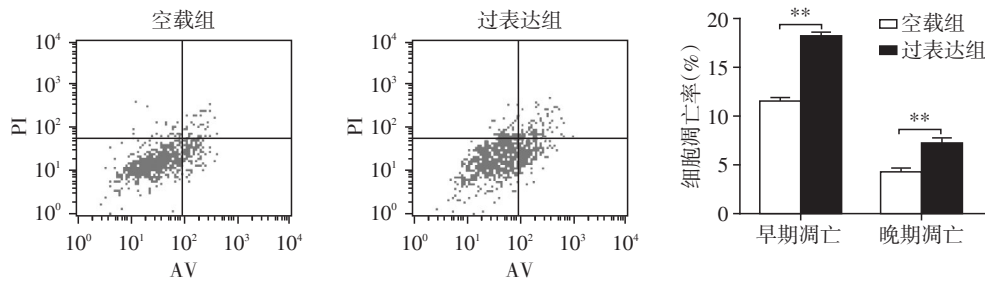


A: 克隆形成实验; B: 细胞增殖实验(CCK-8); 与空载组比较, **P*<0.05, ***P*<0.01, *n*=3。

图3 BANCR对PC9/GR细胞增殖的影响

Figure 3 The effect of BANCR on the proliferation of PC9/GR cells

非编码RNA中占有非常大的比例,在表观遗传学的调控中扮演了越来越重要的角色。BANCR是最早由Flockhart等^[9]在黑色素瘤中首次被发现的lncRNA,定位于9号染色体60 kb处,包含有693个碱基的转录本,因BARF600E突变导致显著高表达,在黑色素瘤细胞侵袭、迁移中起着重要作用,引起了很多学者的重视。随着对lncRNA BANCR的深入研究,发现其在食管鳞癌、胃癌、肝癌、肺癌、结直肠癌、膀胱癌、甲状腺乳头状癌、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤等多种恶性肿瘤的发生、发展中扮演着重要角色,通过MAPK^[10]、MEK/ERK^[11]等多种不同的信号通路调控肿瘤细胞的迁徙、转移、增殖、凋亡及耐药等,对肿瘤的进展及预后起着重要的影响。



两组比较, ***P*<0.01, *n*=3。

图4 流式细胞术检测转染pcDNA-BANCR的PC9/GR细胞给予吉非替尼处理后细胞凋亡的影响

Figure 4 Flow cytometry was used to detect the effect of gefitinib on the apoptosis of PC9/GR cells transfected with pcDNA-BANCR

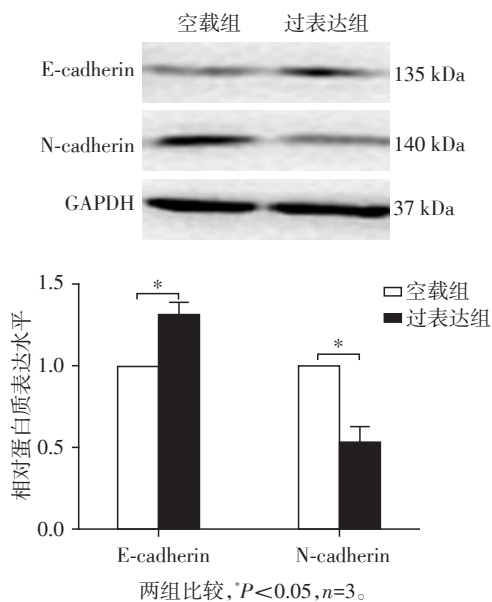


图5 Western blot检测转染后PC9/GR细胞E-钙黏蛋白和N-钙黏蛋白表达

Figure 5 Western blot was used to detect the expression of E-cadherin and N-cadherin in PC9/GR cells after transfection

研究表明,肿瘤细胞的生长、增殖、分化及凋亡与EGFR基因的异常表达密切相关^[12],通过抑制EGFR活性,可以达到抗肿瘤的目的。因此随着精准医疗的发展,大量针对EGFR的靶向药物已进入临床应用。其中EGFR-TKI应用广泛,主要包括第一代药物吉非替尼(gefitinib)、埃克替尼(icotinib)以及厄洛替尼(erlotinib)等,第二代药物包括阿法替尼(afatinib)、达克替尼(dacomitinib)等,第三代药物奥希替尼(osimertinib)等。但绝大多数患者在EGFR-TKI的治疗过程中逐渐出现耐药,导致病情进展,治疗失败。大量研究表明,基因突变是EGFR-TKI耐药的主要机制,60%的耐药患者存在第20外显子的错义突变,即T790M突变^[13],20%的耐药患者发现MET的扩增^[14]。此外,一些研究表明HER2扩增^[15]、PIK3CA突变^[16]、PTEN缺失^[17]也是EGFR-TKI在NSCLC中获得性耐药的机制。但EGFR-TKI的耐药机制尚不完全明确,研究表明,多种lncRNA如HOTAIR^[18]、UCA1^[19]、CUDR^[20]以及MALAT1^[21]都与化疗或EGFR-TKI耐药性有关。近年来,Heeny等^[22]研究表明lncRNA通过调控EMT调节肿瘤进展、转移和耐药。因此,进一步深入探索lncRNA与EGFR-TKI的耐药作用机制具有重要的作用和意义。

本课题组已发现lncRNA BANCR在A549/DDP细胞中显著低表达,过表达BANCR后,A549/DDP细

胞的增殖能力明显减弱,顺铂对A549/DDP/BANCR细胞的IC₅₀值减低,且过表达BANCR的A549/DDP/BANCR细胞凋亡增多。BANCR逆转A549/DDP细胞对DDP的耐药性可能是通过抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,上调p53蛋白表达而实现的^[23]。同时,本课题组发现在NSCLC细胞中lncRNA BANCR显著低表达,过表达BANCR可能通过调控EMT过程影响肿瘤细胞的侵袭和转移^[8],因此,进一步探索lncRNA BANCR调控NSCLC靶向药物耐药的生物学功能和分子机制将有助于NSCLC的临床治疗。

本研究通过qRT-PCR法检测耐吉非替尼细胞株PC9/GR及其亲本细胞株PC9中BANCR的表达差异,发现BANCR在PC9/GR细胞中显著低表达,提示BANCR有可能在NSCLC吉非替尼耐药过程中起着重要作用。在PC9/GR细胞中过表达BANCR后,吉非替尼对细胞的IC₅₀值明显降低,提示BANCR能够增加PC9/GR细胞对吉非替尼的敏感性,逆转PC9/GR细胞对吉非替尼的耐药性;同时过表达BANCR抑制PC9/GR细胞增殖及克隆形成,促进细胞凋亡。Western blot结果显示,PC9/GR细胞中E-cadherin表达水平明显升高,N-cadherin平明显降低。E-cadherin和N-cadherin是EMT的重要分子表型,Dongre等^[24]研究发现E-cadherin表达降低而N-cadherin表达升高,肿瘤细胞基底膜降解及细胞外基质重构,最终使细胞获得迁移和侵袭能力。以上研究表明,长非编码RNA BANCR可以增加PC9/GR细胞对吉非替尼的敏感性,逆转其耐药性,这一机制可能是通过抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,调控EMT途径来实现的。因此,lncRNA BANCR在临床疗效及预后评估中可以作为NSCLC的潜在分子标志物。本研究进一步探索了NSCLC耐药表型的形成,为NSCLC患者临床治疗提供新的理论依据。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424
- [2] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1):19-28
- [3] GAHR S, STOEHR R, GEISSINGER E, et al. EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC patients: data from daily practice [J]. Br J Cancer, 2013, 109(7):1821-1828
- [4] MIDHA A, DEARDEN S, MCCORMACK R. EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocar-

- cinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII) [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(9): 2892-2911
- [5] MOK T S, WU Y L, AHN M J, et al. Osimertinib or platinumpemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(7): 629-640
- [6] SHI Y K, WANG L, HAN B H, et al. First-line icotinib versus cisplatin/pemetrexed plus pemetrexed maintenance therapy for patients with advanced EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (CONVINCE): a phase 3, open-label, randomized study [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(10): 2443-2450
- [7] WU Y L, YING C, ZHOU X D, et al. Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(11): 1454-1466
- [8] SUN M, LIU X H, WANG K M, et al. Downregulation of BRAF activated non-coding RNA is associated with poor prognosis for non-small cell lung cancer and promotes metastasis by affecting epithelial-mesenchymal transition [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 68
- [9] FLOCKHART R J, WEBSTER D E, QU K, et al. BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANCER to regulate melanoma cell migration [J]. *Genome Res*, 2012, 22(6): 1006-1014
- [10] LI R, ZHANG L, JIA L, et al. Long non-coding RNA BANCER promotes proliferation in malignant melanoma by regulating MAPK pathway activation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100893
- [11] GUO Q, ZHAO Y, CHEN J, et al. BRAF-activated long non-coding RNA contributes to colorectal cancer migration by inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2): 869-875
- [12] DE MELO MAIA B, FONTES A M, LAVORATO-ROCHA M A, et al. EGFR expression in vulvar cancer: clinical implications and tumor heterogeneity [J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(5): 917-925
- [13] LI Y X, SONG Z D, YUE J, et al. Novel selective and potent EGFR inhibitor that overcomes T790M-mediated resistance in non-small cell lung cancer [J]. *Molecules*, 2016, 21(11): 1462
- [14] BEAU-FALLER M, ANNE-MARIE R, ANNE-CLAIRE V, et al. Met gene copy number in non-small cell lung cancer: molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naïve cohort [J]. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(4): 331-339
- [15] TAKEZAWA K, PIRAZZOLI V, ARCILA M E, et al. HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation [J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(10): 922-933
- [16] CORTINOVIS D, ABBATE M, BIDOLI P, et al. Targeted therapies and immunotherapy in non-small-cell lung cancer [J]. *Ecancermedalscience*, 2016, 10: 648
- [17] 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
- [18] FENG G, CAO Z L, GUO H, et al. The action mechanism of lncRNA-HOTAIR on the drug resistance of non-small cell lung cancer by regulating Wnt signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6): 4885-4889
- [19] ZHANG B Y, WANG H J, QI W, et al. Knockout of lncRNA UCA1 inhibits drug resistance to gefitinib via targeting STAT3 signaling in NSCLC [J]. *Minerva Med*, 2019, 110(3): 273-275
- [20] XING L, QI M Y, RUI W, et al. Long non-coding RNA CUDR promotes malignant phenotypes in pancreatic ductal adenocarcinoma via activating AKT and ERK signaling pathways [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(6): 2671-2682
- [21] GUTSCHNER T, HÄMMERLE M, DIEDERICH S. MALAT1-a paradigm for long noncoding RNA function in cancer [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(7): 791-801
- [22] HEERY R, FINN S P, CUFFE S, et al. Long non-coding RNAs: key regulators of epithelial-mesenchymal transition, tumour drug resistance and cancer stem cells [J]. *Cancers (Basel)*, 2017, 9(4): 38
- [23] 姜黎黎, 魏晨晨, 陈沁楠, 等. 长非编码RNA BANCER逆转非小细胞肺癌细胞株顺铂耐药的研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(2): 189-193
- [24] DONGRE A, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2): 69-84

[收稿日期] 2020-03-11