

· 基础研究 ·

非小细胞肺癌奥希替尼耐药细胞株的建立与鉴定及耐药后对化疗的敏感性

陈君, 黄佳丽, 陈臻瑶, 王朝霞, 程志祥*

南京医科大学第二附属医院肿瘤医学中心, 江苏 南京 210011

[摘要] **目的:**建立非小细胞肺癌奥希替尼耐药细胞株H1975AR,对亲本和耐药细胞株进行鉴定,探讨耐药机制。**方法:**在体外采用浓度递增的方法予奥希替尼处理诱导H1975细胞建立奥希替尼耐药细胞株H1975AR;光镜及Giemsa染色比较2种细胞形态学差异;第二代测序(next generation sequencing, NGS)检测表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因突变;磺酰罗丹明B(sulforhodamine B, SRB)法检测细胞增殖,评估细胞对EGFR-酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)和化疗药的敏感性;分别予0、10、100、1 000 nmol/L奥希替尼处理6 h, Western blot法检测EGFR及下游增殖信号的变化。**结果:**①SRB法测得H1975AR的耐药指数为3 634.75,显示H1975AR是奥希替尼耐药细胞株;②耐药细胞株形态发生改变且核浆比增大;③与H1975相比,给予奥希替尼处理对H1975AR的p-EGFR和p-ERK抑制作用不明显,且相同的给药浓度对H1975AR的p-AKT抑制作用较弱,同时下调c-Met的表达;④H1975和H1975AR对第一代EGFR-TKI耐药,对顺铂和紫杉醇敏感。**结论:**H1975AR细胞EGFR C797S顺式突变的产生是奥希替尼主要耐药机制,并对顺铂和紫杉醇敏感。

[关键词] 奥希替尼;非小细胞肺癌;耐药;表皮生长因子受体;化疗

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)08-1091-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20200803

Establishment and identification of an osimertinib-resistant non-small cell lung cancer cell line and sensitivity to chemotherapy after drug resistance

CHEN Jun, HUANG Jiali, CHEN Zhenyao, WANG Zhaoxia, CHENG Zhixiang*

Cancer Center, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China

[Abstract] **Objective:** To establish an osimertinib-resistant non-small cell lung cancer cell line H1975AR, identify parental and drug-resistant cells, and explore the mechanism of drug resistance. **Methods:** Induction of H1975 by increasing the concentration of osimertinib *in vitro* was performed to establish osimertinib-resistant cell line H1975AR. The morphological differences between the two cells were compared by light microscopy and Giemsa staining. Next generation sequencing (NGS) was used to detect epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations. Cell proliferation was determined by SRB assay to access sensitivity to EGFR-tyrosine kinase inhibitor (TKI) and chemotherapeutic drugs. Western blot detected the changes of EGFR and downstream proliferation signaling pathway after treating with 0, 10, 100, 1 000 nmol/L osimertinib for 6 h. **Results:** ①The resistance index of H1975AR measured by SRB assay was 3 634.75, which indicated that H1975AR was an osimertinib-resistant cell line. ②The morphology of drug-resistant cell line changed and the nuclear-to-cytoplasmic ratio increased. ③Compared with H1975, the inhibitory effected on p-EGFR and p-ERK in H1975AR were not obvious, and the same dose concentration had a weak inhibitory effect on p-AKT in H1975AR, and the expression of c-Met was down-regulated. ④H1975 and H1975AR were resistant to the first-generation EGFR-TKI and sensitive to cisplatin and paclitaxel. **Conclusion:** The EGFR mutation of cis-C797S in H1975AR cells is the main mechanism of osimertinib resistance and H1975AR is sensitive to cisplatin and paclitaxel.

[Key words] osimertinib; non-small cell lung cancer; drug resistance; epidermal growth factor receptor; chemotherapy

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(08): 1091-1097]

[基金项目] 国家自然科学基金(81372395)

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

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者占肺癌群体的83%,是全球最常见的癌症类型和主要的肿瘤相关致死原因之一。由于NSCLC患者早期症状不明显,确诊时大多已处于晚期,仅有18%的Ⅲ期NSCLC患者可以手术治疗,大多数患者接受化疗和/或放射治疗^[1]。鉴于近年来靶向治疗的飞速发展,尤其是在亚裔无吸烟史的女性患者中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)敏感突变的发生率较高,开发出了针对EGFR敏感突变的酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)。EGFR最常见的敏感突变主要包括19号外显子的缺失突变(19Del)和21号外显子的第858位氨基酸从亮氨酸变为精氨酸(L858R),占EGFR敏感突变的90%,而大部分患者在使用第一代或第二代EGFR-TKI一段时间后会产耐药,平均无进展生存期为9~14个月,EGFR 20号外显子第790位氨基酸由苏氨酸突变为甲硫氨酸即T790M突变,占有使用第一代或第二代EGFR-TKI产生耐药患者的60%^[2]。携带这些突变基因的患者使用EGFR-TKI与标准化疗相比具有显著的疗效和较低的不良反应发生率^[3]。代表药物包括第一代可逆性的EGFR-TKI(厄洛替尼、吉非替尼和埃克替尼),第二代不可逆的EGFR-TKI(阿法替尼和达克替尼)以及第三代的奥希替尼(AZD9291)和奥美替尼(HS-10296)等。

奥希替尼目前被最新版美国国立综合癌症网络NSCLC指南优先推荐为携带EGFR敏感突变的晚期或转移性NSCLC患者的一线治疗,或使用第一代或第二代EGFR-TKI产生T790M耐药突变患者的二线治疗。尽管作为EGFR-TKI中疗效最为出色的药物,奥希替尼在一线使用18.9个月后依然不可避免地遭遇耐药的难题^[4]。目前,对于奥希替尼耐药后的解决方案没有一个统一的共识,国内奥希替尼耐药的基础和临床研究较为缺乏,奥希替尼耐药后治疗方案的选择成为临床上迫切需要解决的问题。本研究选用NSCLC细胞系H1975通过浓度递增给药驯化的方式建立奥希替尼耐药细胞株H1975AR,观察其生物学特性并检测其对第一代EGFR-TKI及化疗药物的敏感性,为奥希替尼耐药机制的研究提供了临床前研究模型,也为奥希替尼耐药后治疗药物的选择提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

A549(人肺腺癌细胞系)、A549/DDP(A549顺铂

耐药细胞系)、PC9(EGFR 19Del突变肺腺癌细胞系)、PC9/GR(PC9吉非替尼耐药细胞系)、H1975(EGFR L858R-T790M突变肺腺癌细胞系)均由本实验室保存;RPMI1640培养基、DMEM培养基、澳洲胎牛血清(FBS, Gibco公司,美国);二甲基亚砜(DMSO, Sigma公司,美国);顺铂、吉非替尼、厄洛替尼、奥希替尼、紫杉醇(MCE公司,美国);三氯乙酸(TCA, 上海沪试国药集团);磺酰罗丹明B(sulforthodamine B, SRB, Sigma公司,美国);快速吉姆萨染液(Giemsa, 上海翊圣生物科技有限公司);Western及IP裂解液、磷酸酶抑制剂(上海碧云天公司);牛血清白蛋白(BSA, 常州恩莫阿赛公司);c-Met抗体(Proteintech公司,美国);EGFR抗体、AKT抗体、p-AKT(Ser473)抗体、ERK抗体、p-ERK(Thr202/Tyr204)抗体(Cell Signaling Technology公司,美国);p-EGFR抗体(Y1045)(武汉爱博泰克生物科技有限公司);GAPDH抗体(南京巴微得生物科技有限公司);羊抗兔IgG HRP(R&D Systems公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

A549、H1975于37℃、5% CO₂条件下用含10% FBS的RPMI1640培养液培养;A549/DDP于同等条件下在完全培养基中添加顺铂1.5 μg/mL;PC9于同等条件下用含10% FBS的DMEM培养液培养;PC9/GR于同等条件下在完全培养基中添加吉非替尼800 ng/mL。倒置显微镜下观察细胞形态,实验时收集生长状态良好的对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 耐药细胞株的建立

通过药物浓度递增的方法诱导NSCLC细胞株H1975,取5×10⁵个对数期的细胞于培养瓶中,贴壁24 h后,予以1 nmol/L奥希替尼为初始浓度作用细胞,在给药24 h后观察细胞状态,初期会有大量漂浮的死细胞,当细胞密度低于30%时,撤去含药培养基,更换无药培养基,待细胞汇合到80%~90%进行传代扩大培养,当细胞汇合至70%~80%时再次加入1 nmol/L奥希替尼,及时观察细胞状态,如出现大量细胞死亡漂浮(贴壁密度低于30%)时做撤药处理,给药若干次后细胞逐渐适应可在含药培养基中稳定增殖,以此为1个培养循环。继续提高药物浓度,初筛时按每5 nmol/L的浓度差提升,处理24 h后,更换无药培养基培养24~48 h,依细胞状态而定,细胞状态好(能稳定增殖)培养24 h,细胞状态不好(出现大量细胞死亡)培养48 h或者72 h,以此为1个循环直至当前浓度下细胞可稳定生长,每天观察细

胞状态,24 h 更换1次无药培养基或含药培养基。当药物筛选浓度至其半数抑制浓度(half inhibition concentration, IC_{50})的50倍时,按每20 nmol/L的浓度差提升,处理24 h后观察细胞状态,如果细胞状态好,则以含当前浓度药物的培养基筛选1周,继续增加药物浓度,如果细胞状态不好,则更换无药培养基培养24~48 h,接着继续加入药物,不断调整直至细胞在此药物浓度下正常生长。当药物筛选浓度达到 IC_{50} 的500倍时,按每50 nmol/L的浓度差提升,处理24 h后观察细胞状态,如果细胞状态不好,则更换无药培养基培养24~48 h,接着继续加入药物,不断调整直至细胞在此药物浓度下正常生长,如果细胞状态好,则以含当前浓度药物的培养基筛选1周,接着继续增加药物浓度,直至H1975能够在1 500 nmol/L的奥希替尼含药培养基中维持存活和增殖。实验总计历时7个月,建立的耐药细胞株被命名为H1975AR。

1.2.3 细胞光镜下形态和Giemsa染色

取对数生长期的细胞,制成细胞悬液接种至6孔板,待细胞密度汇合至60%~70%,PBS洗2遍,于倒置显微镜下放大100倍对比观察H1975细胞与H1975AR细胞的形态,并拍照记录。弃去PBS,按照Giemsa染色试剂盒说明书,加入A液0.5 mL,染色1 min,再加入B液1 mL,水平摇床振荡6 min,弃染液,水洗30 s,37 °C烘干后放大200倍拍照。

1.2.4 细胞EGFR基因突变检测

细胞消化离心后,弃上清,用PBS洗涤2次,然后用1 mL PBS重悬细胞,置于4 °C冰箱,送南京世和基因生物技术有限公司行第二代测序(next generation sequencing, NGS)技术检测肺癌基因突变情况。

1.2.5 SRB法检测细胞增殖

取对数生长期H1975、H1975AR、A549、A549/DDP、PC9和PC9/GR制成单细胞悬液接种于96孔板, 5×10^3 个/孔, 100 μ L/孔;培养18~24 h后,加入含相应浓度药物的培养液100 μ L/孔,每个药物浓度设6个复孔,同时设空白组和无药对照组;继续培养72 h,弃上清,加预冷的10% (W/V) TCA 100 μ L/孔4 °C固定1 h,弃去10% TCA用蒸馏水洗5遍,37 °C烘干,加0.4% (W/V) SRB染液70 μ L/孔,水平摇床上振荡10 min,1% (V/V) 乙酸洗5遍,37 °C烘干,100 μ L/孔 Tris-base (10 mmol/L, pH=10.5),水平摇床上振荡10 min,采用酶标仪于490 nm波长测定吸光度值,采用Graphpad Prism 7.0软件计算各组细胞的 IC_{50} ,并计算耐药指数(resistance index, RI)。 $RI=IC_{50}$

(耐药细胞株)/ IC_{50} (亲本细胞株)。

1.2.6 细胞生长曲线的绘制和倍增时间计算

取对数生长期H1975和H1975AR制成单细胞悬液接种于96孔板, 2×10^3 个/孔, 200 μ L/孔,设6个复孔;孵育1、2、3、4和5 d后进行细胞增殖检测,Graphpad Prism 7.0绘制细胞生长曲线,计算细胞倍增时间: $TD = \frac{t \times \lg 2}{\lg N_t - \lg N_0}$ (TD为细胞倍增时间, t 为培养时间, N_t 为培养 t 小时吸光度值, N_0 为接种后吸光度值)。

1.2.7 Western blot法检测蛋白的表达

H1975和H1975AR细胞分别接种于直径6 cm培养皿,分为奥希替尼0、10、100、1 000 nmol/L组,作用6 h。用预冷的PBS洗2遍,提取总蛋白,在聚丙烯酰胺凝胶中电泳,将蛋白转膜至PVDF膜上,5% BSA溶液封闭后,加入一抗(EGFR、p-EGFR、AKT、p-AKT、ERK、p-ERK、c-Met、GAPDH)4 °C孵育过夜;PBST漂洗后与二抗反应,室温孵育1 h;PBST漂洗,加入发光液后显影拍照,实验重复3次。

1.3 统计学方法

用SPSS17.0统计软件对数据进行分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

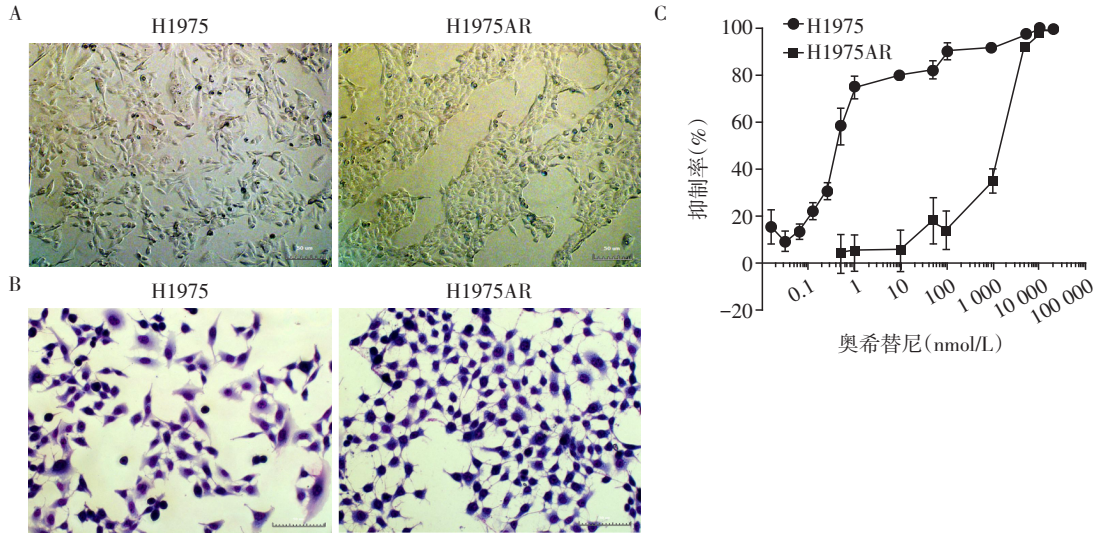
2 结果

2.1 奥希替尼耐药细胞株H1975AR的建立及形态学变化

7个月后成功将H1975体外诱导成奥希替尼获得性耐药细胞株,命名为H1975AR。镜下观察并通过Giemsa染色比较H1975和H1975AR的形态学差异。在光镜和Giemsa染色下H1975、H1975AR细胞均为贴壁生长;H1975细胞以长梭形为主,排列无规则;而H1975AR细胞相互镶嵌,呈团簇样生长,体积稍变小(图1A),核浆比增大(图1B)。H1975和H1975AR对奥希替尼的 IC_{50} 分别为(0.453 ± 0.011) nmol/L和($1\ 648.000 \pm 12.014$) nmol/L, H1975AR对奥希替尼明显耐受,RI为3 634.75 ($P < 0.01$,图1C)。

2.2 耐药细胞株EGFR基因的变化

采用NGS技术检测H1975和H1975AR细胞,结果显示H1975具有c.2573T>G(p.L858R)和c.2369C>T(p.T790M)突变,H1975AR同时具有c.2573T>G(p.L858R)、c.2369C>T(p.T790M)和c.2390_2391delG-CinsCG(p.C797S),即C797S顺式突变。



A: 光镜下观察形态学差异($\times 100$); B: Giemsa染色后核浆比差异($\times 200$); C: 奥希替尼药物浓度-抑制率曲线(72 h)。

图1 H1975和H1975AR的形态学差异以及奥希替尼药物浓度-抑制率曲线

Figure 1 The morphological difference between H1975 and H1975AR and inhibitions of osimertinib in H1975 and H1975AR cells

2.3 细胞生长曲线及肿瘤倍增时间

从细胞生长曲线上看, H1975细胞倍增时间为(33.96 ± 5.52)h, H1975AR细胞倍增时间为(29.60 ± 5.59)h, 细胞增殖速度无明显差异($P > 0.05$, 图2)。

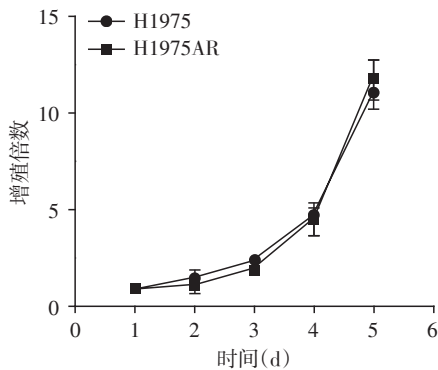


图2 H1975和H1975AR细胞的生长曲线

Figure 2 The growth curves of H1975 and H1975AR cells

2.4 耐药细胞株p-EGFR、p-ERK、p-AKT及c-Met蛋白表达变化

在奥希替尼不同给药浓度下, H1975中p-EGFR和p-AKT均下调并呈现量效关系; 而在H1975AR中10 nmol/L组的p-EGFR和p-AKT水平高于不给药组, 但继续增加给药浓度后p-EGFR和p-AKT水平明显下降(图3)。在同一给药浓度下, 奥希替尼在H1975AR上对p-EGFR、p-ERK、p-AKT的下调作用均弱于H1975, 表明在H1975AR细胞EGFR及下游的AKT和ERK呈现持续激活状态, 且被奥希替尼抑制的程度与H1975相比较弱。有趣的是, 本实验在

H1975AR上虽然未观察到既往文献报道的c-Met过表达^[5], 但是发现奥希替尼能够下调c-Met的表达(图3)。因为在H1975上p-c-Met不表达^[6], 所以本研究未进行p-c-Met的检测。

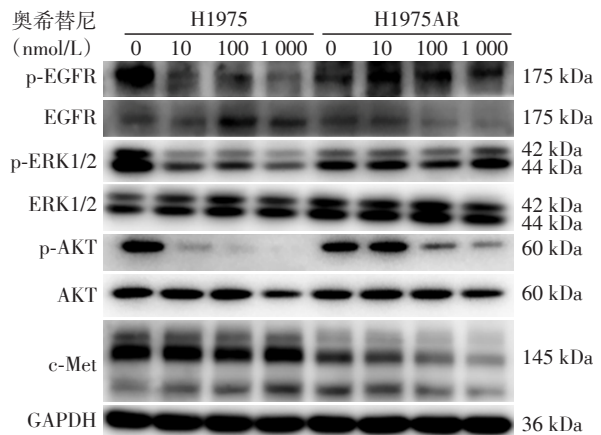


图3 Western blot 检测H1975和H1975AR细胞的相关蛋白表达

Figure 3 The expressions of related proteins in H1975 and H1975AR cells by Western blot

2.5 细胞耐药后对不同靶向药和化疗药物敏感性

本研究选择PC9和PC9/GR细胞分别作为吉非替尼耐药的阴性和阳性对照(图4A), 选择A549和A549/DDP分别作为顺铂耐药的阴性及阳性对照(图4B)。在已有文献中, PC9和PC9/GR中对厄洛替尼的IC₅₀分别为0.05 $\mu\text{mol/L}$ 和25 $\mu\text{mol/L}$ ^[7], A549和A549/DDP对紫杉醇的IC₅₀分别为0.08 $\mu\text{g/mL}$ 和16 $\mu\text{g/mL}$ ^[8]。本研究结果显示, H1975AR细胞对第

一代EGFR-TKI吉非替尼和厄洛替尼均耐药(图4C、D),而对化疗药顺铂和紫杉醇均敏感(图4E、F)。各细胞对不同药物的IC₅₀见表1。

3 讨论

本研究选取的H1975细胞株通过NGS证实是具有L858R和T790M突变的NSCLC细胞株,通过药物浓度递增法体外诱导奥希替尼获得性耐药细胞株,其RI为3 634.75,进一步对其进行NGS测序分析EGFR基因突变并通过Western blot检测耐药株EGFR蛋白的表达情况,结果显示与H1975细胞相比,在维持原有的c.2573T>G(p.L858R)和c.2369C>T(p.T790M)突变的基础上产生了c.2390_2391delG-CinsCG(p.C797S),即C797S顺式突变,H1975AR细胞的EGFR蛋白水平无明显改变,未出现EGFR过表达及下调等已有报道的耐药改变^[9-10]。奥希替尼抑制H1975AR细胞株EGFR磷酸化水平弱于

H1975,其下游信号p-ERK和p-AKT蛋白表达水平随着奥希替尼给药浓度的增加,下调的程度要弱于H1975,表明在耐药株中EGFR信号通路持续激活,并且在给药情况下,下游增殖的信号与亲本细胞相比抑制程度较小。

已经报道的奥希替尼耐药的机制包括EGFR 20号外显子C797S/G和L792H突变的产生、T790M突变的减少或消失、c-Met扩增、HER2的扩增、BRAF突变和上皮间质转化等^[5,11-17]。本研究将PC9和PC9/GR细胞分别作为吉非替尼耐药的阴性和阳性对照,并结合PC9厄洛替尼耐药细胞株的研究报道^[7]发现,H1975AR细胞对第一代EGFR-TKI耐药,通过NGS测序证实H1975和H1975AR具有T790M突变,因此H1975AR对第一代EGFR-TKI耐药的原因是T790M突变的存在。C797S突变作为奥希替尼耐药的主要机制,根据其是否与T790M是否在同一等位基因上,分为顺式(在同一等位基因)和反式(不在同一

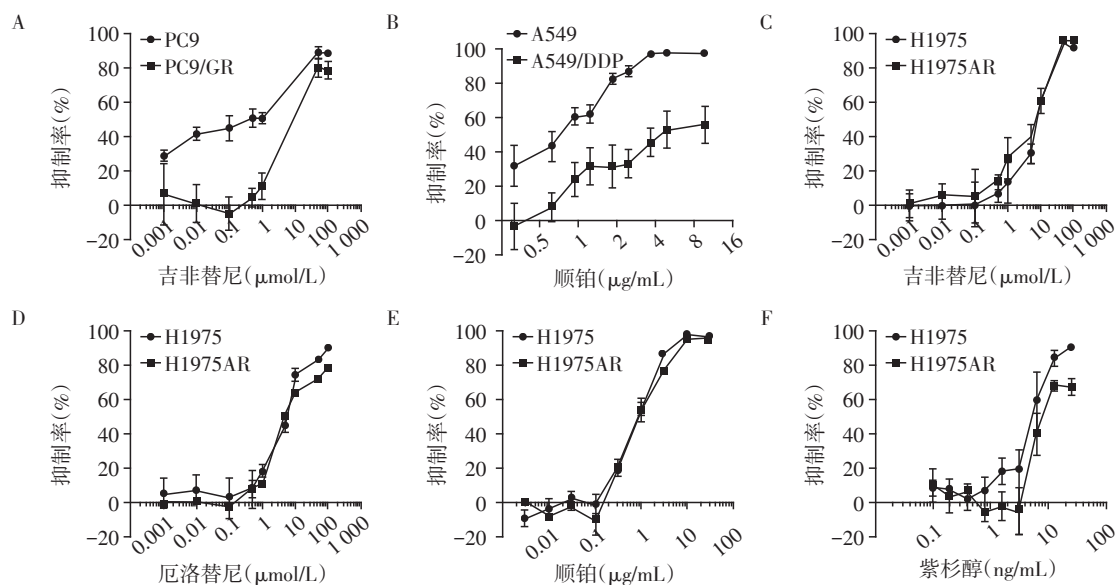


图4 第一代EGFR-TKI和化疗药物对H1975和H1975AR细胞的药物浓度-抑制率曲线

Figure 4 The inhibitions of first generation EGFR-TKIs and chemotherapy drugs in H1975 and H1975AR cells

表1 第一代EGFR-TKI和化疗药物作用于H1975和H1975AR细胞的IC₅₀

Table 1 The half inhibitory concentrations of first generation EGFR-TKIs and chemotherapy drugs in H1975 and H1975AR cells (n=3)

药物	H1975	H1975AR	RI
奥希替尼(nmol/L)	0.453 ± 0.011	1 648.000 ± 12.014	3 634.75
吉非替尼(μmol/L)	7.893 ± 0.128	11.040 ± 0.315	1.40
厄洛替尼(μmol/L)	4.588 ± 0.229	3.058 ± 0.256	0.67
顺铂(μg/mL)	0.773 ± 0.013	0.813 ± 0.016	1.05
紫杉醇(ng/mL)	5.384 ± 0.098	6.159 ± 0.192	1.14

吉非替尼对于PC9、PC9/GR的IC₅₀分别为(0.094 ± 0.001) μmol/L和(2.405 ± 0.127) μmol/L, RI=25.53; 顺铂对于A549和A549/DDP的IC₅₀分别为(0.680 ± 0.020) μg/mL和(5.190 ± 0.099) μg/mL, RI=7.63。

等位基因)突变。Zhou等^[18]的研究显示,联用第一代和第三代EGFR-TKI对出现C797S反式突变的奥希替尼耐药患者有效。Wang等^[19]的研究显示布加替尼和西妥昔单抗联用对出现C797S顺式突变的患者有效。由于缺乏大样本的临床研究,对于出现三突变(19Del-T790M-C797S或L858R-T790M-C797S)的奥希替尼耐药患者的后续治疗,目前还没有共识。

化疗是目前奥希替尼耐药后的主要应对策略之一,使用靶向药治疗对肿瘤细胞而言是一种筛选的过程,有奥希替尼作用靶点的肿瘤细胞被杀死,存活下来的大多是药物作用靶点进一步突变、丢失,或者发生旁路激活的肿瘤细胞群,化疗能够全面杀伤肿瘤细胞,可以抑制对靶向药耐药的肿瘤细胞群。有临床病例报道,在发生了奥希替尼耐药的NSCLC患者,接受依托泊苷和卡铂治疗后肿瘤明显缩小,并且呼吸道症状也得到了改善^[20]。有体外研究发现H1975奥希替尼耐药细胞株对紫杉醇敏感性增高^[21],另一篇研究通过分离奥希替尼耐药患者肺癌组织的原代细胞,发现该细胞对紫杉醇表现出较高的敏感性^[14]。王蓉等^[22]的研究表明使用第一代EGFR-TKI耐药的患者,单用培美曲塞铂类二联化疗组与维持靶向治疗并联合化疗组比较,中位无进展生存期无统计学差异;而单用化疗组的皮疹和腹泻的不良反应发生率显著低于联合组($P < 0.05$),提示靶向药耐药后单用铂类二联化疗即可达到临床获益,无需继续靶向治疗。本研究将A549和A549/DDP分别作为顺铂耐药的阴性及阳性对照,并结合A549紫杉醇耐药细胞株的研究报道^[7]发现,H1975AR细胞对顺铂和紫杉醇都敏感,与既往报道一致,为临床上接受奥希替尼治疗后疾病进展的NSCLC患者后续治疗方案的选择提供依据。

在最新版美国国立综合癌症网络NSCLC指南推荐奥希替尼作为具有EGFR敏感突变的晚期或转移性NSCLC患者的一线治疗,或使用第一代或第二代EGFR-TKI产生T790M耐药突变患者的二线治疗。而在FLAURA研究结果^[3]公布之前,奥希替尼作为接受第一代或第二代EGFR-TKI产生T790M耐药突变的晚期或转移性NSCLC患者的补救治疗方案,国内外有很多一线接受第一代或第二代EGFR-TKI产生T790M突变疾病进展的患者,二线使用奥希替尼治疗达到临床获益,然而在争取了9.6个月的无进展生存期之后耐药的问题再次出现^[23]。因此,尽管奥希替尼目前被作为具有EGFR敏感突变的一线治疗,还有很大一部分人群因二线使用奥希

替尼产生耐药。本研究建立的H1975AR细胞模拟此类患者的耐药机制,在同时携带EGFR敏感突变及T790M突变使用奥希替尼后产生耐药,从而为探寻二线使用奥希替尼耐药的机制提供体外研究模型,解决临床上二线使用奥希替尼耐药患者后续用药的问题。

[参考文献]

- [1] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5):363-385
- [2] YU H A, ARCILA M E, REKHTMAN N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(8):2240-2247
- [3] MOK T S, WU Y L, AHN M J, et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer [J]. N Engl J Med, 2017, 376(7):629-640
- [4] SORIA J C, OHE Y, VANSTEENKISTE J, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 378(2):113-125
- [5] SHI P Y, OH Y T, ZHANG G J, et al. Met gene amplification and protein hyperactivation is a mechanism of resistance to both first and third generation EGFR inhibitors in lung cancer treatment [J]. Cancer Lett, 2016, 380(2):494-504
- [6] XU W H, TANG W, LI T T, et al. Overcoming resistance to AC0010, a third generation of EGFR inhibitor, by targeting c-MET and BCL-2 [J]. Neoplasia, 2019, 21(1):41-51
- [7] DONG J K, LEI H M, LIANG Q, et al. Overcoming erlotinib resistance in EGFR mutation-positive lung adenocarcinomas through repression of phosphoglycerate dehydrogenase [J]. Theranostics, 2018, 8(7):1808-1823
- [8] HAN M L, ZHAO Y F, TAN C H, et al. Cathepsin L up-regulation-induced EMT phenotype is associated with the acquisition of cisplatin or paclitaxel resistance in A549 cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(12):1606-1622
- [9] NUKAGA S, YASUDA H, TSUCHIHARA K, et al. Amplification of EGFR wild-type alleles in non-small cell lung cancer cells confers acquired resistance to mutation-selective EGFR tyrosine kinase inhibitors [J]. Cancer Res, 2017, 77(8):2078-2089
- [10] XU J, ZHAO X T, HE D F, et al. Loss of EGFR confers acquired resistance to AZD9291 in an EGFR-mutant non-small cell lung cancer cell line with an epithelial-mesen-

- chymal transition phenotype [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(8): 1413-1422
- [11] THRESS K S, PAWELETZ C P, FELIP E, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M [J]. *Nat Med*, 2015, 21(6): 560-562
- [12] LE X, PURI S, NEGRAO M V, et al. Landscape of EGFR-dependent and -independent resistance mechanisms to osimertinib and continuation therapy beyond progression in EGFR-mutant NSCLC [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(24): 6195-6203
- [13] OXNARD G R, HU Y, MILEHAM K F, et al. Assessment of resistance mechanisms and clinical implications in patients with EGFR T790M-positive lung cancer and acquired resistance to osimertinib [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(11): 1527-1534
- [14] KIM T M, SONG A, KIM D W, et al. Mechanisms of acquired resistance to AZD9291 a mutation-selective, irreversible EGFR inhibitor [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(12): 1736-1744
- [15] PLANCHARD D, LORIOT Y, ANDRE F, et al. EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(10): 2073-2078
- [16] HO C C, LIAO W Y, LIN C A, et al. Acquired BRAF V600E mutation as resistant mechanism after treatment with osimertinib [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(3): 567-572
- [17] WENG C H, CHEN L Y, LIN Y C, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI [J]. *Oncogene*, 2019, 38(4): 455-468
- [18] ZHOU Z, ZHAO Y, SHEN S, et al. Durable clinical response of lung adenocarcinoma harboring EGFR 19Del/T790M/in trans-C797S to combination therapy of first- and third-generation EGFR Tyrosine kinase inhibitors [J]. *J Thorac Oncol*, 2019, 14(8): e157-e159
- [19] WANG Z, YANG J J, HUANG J, et al. Lung adenocarcinoma harboring EGFR T790M and in trans C797S responds to combination therapy of first- and third-generation EGFR TKIs and shifts allelic configuration at resistance [J]. *J Thoracic Oncol*, 2017, 12(11): 1723-1727
- [20] HAM J S, KIM S, KIM H K, et al. Two cases of small cell lung cancer transformation from egfr mutant adenocarcinoma during AZD9291 treatment [J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(1): e1-e4
- [21] TANG Z H, JIANG X M, GUO X, et al. Characterization of osimertinib (AZD9291)-resistant non-small cell lung cancer NCI-H1975/OSIR cell line [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49): 81598-81610
- [22] 王蓉, 郭人花, 卢凯华, 等. 肺腺癌EGFR-TKI耐药后继续靶向药联合化疗的临床疗效 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(12): 41-45
- [23] JÄNNE P A, YANG J C H, KIM D W, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(18): 1689-1699
- [收稿日期] 2019-11-20

欢迎投稿 欢迎订阅