

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00585

整合素 β_1 信号通路参与非小细胞肺癌吉非替尼获得性耐药

邓沁芳, 徐建芳, 粟波, 赵印敏, 周彩存*

同济大学医学院附属上海市肺科医院肿瘤科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨整合素 β_1 及其下游信号转导通路在非小细胞肺癌表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)吉非替尼获得性耐药中的作用。**方法** 以人肺腺癌细胞株 PC-9 和吉非替尼耐药株 PC-9/G 作为研究对象, 免疫印迹分析检测整合素 β_1 、Akt、磷酸化 Akt 蛋白的表达; 用 MTT 法检测吉非替尼和(或)磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)抑制剂 LY294002、细胞外调节蛋白激酶(ERK)抑制剂 PD98059 对细胞增殖的影响; 用 Annexin V/PI 试剂盒和 TUNEL 试剂盒检测细胞凋亡。**结果** 吉非替尼耐药株 PC-9/G 高表达整合素 β_1 , RNA 干扰抑制整合素 β_1 表达能够抑制 PC-9/G 细胞的生长和促进凋亡。PC-9/G 细胞中吉非替尼对 Akt 磷酸化的抑制作用弱于 PC-9 细胞, RNA 干扰抑制整合素 β_1 表达后 Akt 的磷酸化水平降低。ERK 抑制剂 PD98059 不能恢复 PC-9/G 细胞对吉非替尼的敏感性, PI3K 抑制剂 LY294002 能恢复 PC-9/G 细胞对吉非替尼的敏感性。**结论** 整合素 β_1 过表达可以通过 PI3K 途径激活下游信号分子, 这可能是一种重要的 EGFR-TKI 耐药机制。

[关键词] 肿瘤抗药性; 表皮生长因子受体; 酪氨酸激酶抑制剂; 整合素

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)06-0585-05

Integrin β_1 participates in acquired resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer

DENG Qin-fang, XU Jian-fang, SU Bo, ZHAO Yin-min, ZHOU Cai-cun*

Department of Oncology, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the role of integrin β_1 and relevant signaling pathway in acquired resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor (TKI) gefitinib in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Human lung adenocarcinoma cell line PC-9 and gefitinib-resistant PC-9/G cell lines were used in the present study. Western blotting analysis was used to examine the expression of integrin β_1 , Akt and phospho-Akt protein. The inhibitory effects of gefitinib and/or phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002 and extracellular regulated protein kinases (ERK) inhibitor PD98059 on cellular proliferation were tested by MTT assay. Cell apoptosis was analyzed by Annexin V/PI and TUNEL method. **Results** Overexpression of integrin β_1 was observed in PC-9/G cell line. Silencing integrin β_1 by RNAi method inhibited the proliferation and promoted apoptosis of PC-9/G cells. The inhibitory effect of gefitinib against Akt phosphorylation in PC-9/G cells was weaker than that in PC-9 cells. Knockdown of integrin β_1 with RNAi decreased the phosphorylation level of Akt. ERK inhibitor PD98059 failed to restore the sensitivity of PC-9/G cells to gefitinib. PI3K inhibitor LY294002 could restore the sensitivity of PC-9/G cells to gefitinib. **Conclusion** It is suggested that overexpressed integrin β_1 can activate the downstream signaling pathways through PI3K, which may be an important mechanism for resistance to EGFR-TKIs.

[Key words] neoplasm drug resistance; epidermal growth factor receptor; tyrosine kinase inhibitor; integrin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(6): 585-589]

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)已广泛用于非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的临床治疗, 并显示出良好的疗效^[1-2]。然而, NSCLC 患者易对

EGFR-TKI 产生获得性耐药, 因此克服 EGFR-TKI 耐药是临床上有待解决的问题。

近年来, 细胞黏附介导的耐药(cell adhesion-mediated drug resistance, CAM-DR)日益受到人们的关注。肿瘤生长的微环境尤其是肿瘤细胞黏附分

[收稿日期] 2011-12-27 **[接受日期]** 2012-04-05

[基金项目] 国家自然科学基金(30873023)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30873023)。

[作者简介] 邓沁芳, 硕士, 主治医师。E-mail: dengqinfang@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-65115006-3050, E-mail: caicunzhou@yahoo.com.cn

子及其受体、细胞因子和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分如纤连蛋白(fibronectin, FN)、I型胶原蛋白(collagen I, C I)等的改变均可能参与EGFR-TKI耐药^[3-4]。整合素(integrin)是参与CAM-DR最重要的黏附分子,诸多证据表明,整合素 β_1 信号通路在血液系统恶性肿瘤、乳腺癌和肺癌的化疗耐药中起着重要的作用^[5-8]。本课题组前期实验发现EGFR-TKI吉非替尼获得性耐药细胞株中整合素 β_1 的表达水平明显升高,整合素 β_1 表达上调可降低肿瘤细胞对吉非替尼的敏感性^[9-10]。本研究在前期实验的基础上进一步探讨整合素 β_1 及其下游信号转导通路在吉非替尼获得性耐药中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 PC-9肺腺癌细胞株由上海市肺科医院肺癌免疫室保存,吉非替尼获得性耐药细胞株PC-9/G由本研究室建立^[11],给予0.05 $\mu\text{mol/L}$ 吉非替尼维持PC-9/G细胞的耐药性。吉非替尼购自阿斯利康公司;磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)抑制剂LY294002、细胞外调节蛋白激酶(ERK)抑制剂PD98059均购自Sigma公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自上海华美生物试剂公司;Annexin V/PI试剂盒购自上海杰美基因医药有限公司;TUNEL试剂盒购自Promega公司;整合素 β_1 单抗购自Chemicon公司;Akt、p-Akt(Ser473)单抗均购自Cell Signaling公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)内参购自上海康成生物工程有限公司;DMEM培养液购自Gibco公司。整合素 β_1 shRNA载体(pRNAT-U6.1/Neo)由上海康成生物工程有限公司构建。以目标shRNA序列(5'-GGA TTC TGA CAG CTT TAA A-3')构建载体plasmid 1;以错配序列(5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG T-3')构建载体plasmid 0,并作为对照载体。转染按照Lipofectamine 2000说明书的步骤进行。Wellscan MK-3酶标仪购自芬兰Labsystems公司。

1.2 免疫印迹分析检测整合素 β_1 、Akt、p-Akt蛋白的表达 用RIPA裂解液裂解PC-9和PC-9/G细胞,采用Bradford法检测总蛋白浓度,每个样品调节浓度至1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。按免疫印迹操作说明进行蛋白电泳操作,检测整合素 β_1 、Akt、p-Akt的表达。用200 mA恒流湿转NC膜2~2.5 h,5%脱脂牛奶封闭1 h,0.2% TBST洗膜3次,每次10 min,分别加入1:100稀释的一抗(整合素 β_1 、Akt、p-Akt)4℃过夜,0.2% TBST洗膜3次,每次10 min。加入对应的二抗及GAPDH内参37℃孵育30 min,洗膜后采用化学发光法检测目的蛋白及内参的表达。

1.3 MTT法检测细胞增殖抑制率 实验分为未转染组、转染对照载体组(plasmid 0)和转染整合素干扰载体组(plasmid 1)。将未转染的细胞按每孔 3×10^3 个细胞、转染对照载体(plasmid 0)和整合素干扰载体(plasmid 1)的细胞按每孔 1×10^4 个细胞接种于96孔板中,培养2 h后分别加入不同浓度(0、0.001、0.005、0.01、0.05、0.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)吉非替尼、吉非替尼(浓度同上)+LY294002(25 $\mu\text{mol/L}$)、吉非替尼(浓度同上)+PD98059(20 $\mu\text{mol/L}$)。继续培养72 h,实验终止前4 h加入20 μl MTT溶液(5 mg/ml)。弃去每孔培养液,加200 μl DMSO,振荡至结晶溶解,用Wellscan MK3酶标仪测定530 nm波长处各孔光密度(D)值。设药物处理孔、细胞对照孔和空白对照孔,各3个复孔,实验重复3次。细胞增殖抑制率(%)=[1-(药物处理孔D值-空白对照孔D值)/(细胞对照孔D值-空白对照孔D值)] $\times 100\%$ 。按Bliss法计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.4 细胞凋亡检测 (1)未转染细胞用Annexin V/PI试剂盒进行凋亡检测。用EPICS-XL型流式细胞仪(Bechman Coulter公司)检测凋亡细胞并计算凋亡细胞比例(%)。(2)转染细胞用TUNEL试剂盒进行凋亡检测。凋亡结果判定标准:凋亡细胞核呈棕黄色,并出现凋亡形态学特征。在400倍光镜下,随机选择10个视野并计数1 000个肿瘤细胞,记录凋亡细胞数,并计算细胞凋亡指数(AI)。AI(%)=(凋亡细胞数/1 000) $\times 100\%$ 。

1.5 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 13.0统计软件包进行数据处理。组间比较采用方差分析,检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 吉非替尼耐药株中整合素 β_1 表达水平增高 免疫印迹分析检测结果(图1)显示,未转染的PC-9/G细胞的整合素 β_1 表达水平高于未转染的PC-9细胞株,说明吉非替尼耐药株高表达整合素 β_1 。以整合素干扰载体(plasmid 1)转染后,PC-9和PC-9/G细胞中整合素 β_1 的表达与相应的脂质体载体以及转染对照载体组相比均受到抑制。

2.2 抑制整合素 β_1 表达恢复吉非替尼耐药株的敏感性 给予吉非替尼后,未转染组、转染对照载体组(plasmid 0)、整合素 β_1 干扰载体转染组(plasmid 1)的PC-9/G细胞的IC₅₀分别为(7.29 \pm 0.39)、(6.85 \pm 0.25)、(0.09 \pm 0.006) $\mu\text{mol/L}$,整合素 β_1 干扰载体转染组与其他两组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,PC-9/G细胞转染整合素 β_1 干扰载体后,以0.03 $\mu\text{mol/L}$ 的吉非替尼处理24 h,细胞

凋亡率增加,与未转染组和转染对照载体组比较差异有统计学意义($P < 0.05$,表1),说明PC-9/G细胞恢复了对吉非替尼的敏感性。

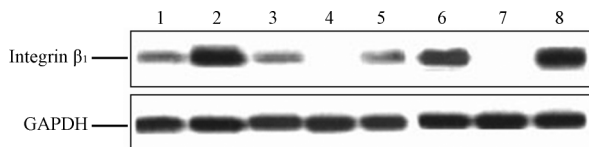


图1 PC-9和PC-9/G细胞株中整合素 β_1 的表达

Fig 1 Expression of integrin β_1 in PC-9 and PC-9/G cells

Lane 1 and 2: Untransfected PC-9 and PC-9/G cells, respectively; Lane 3-5: PC-9 cells transfected with lipofectamine 2000, plasmid 1 (siIntegrin β_1) and plasmid 0 (scramble sequence), respectively; Lane 6-8: PC-9/G cells transfected with lipofectamine 2000, plasmid 1 and plasmid 0, respectively

表1 吉非替尼 (0.03 $\mu\text{mol/L}$) 对PC-9和PC-9/G细胞株凋亡的影响

Tab 1 Effect of gefitinib (0.03 $\mu\text{mol/L}$) on apoptosis of PC-9 and PC-9/G cells

Group	n=3, $\bar{x} \pm s, \%$	
	PC-9	PC-9/G
Untransfected	23.2 \pm 0.92	6.5 \pm 0.40*
Plasmid 0 (scramble sequence)	21.0 \pm 0.87	7.6 \pm 0.25*
Plasmid 1 (siIntegrin β_1)	38.0 \pm 1.61	21.4 \pm 0.76

* $P < 0.05$ vs plasmid 1 group

2.3 吉非替尼耐药株中Akt呈持续激活状态 PC-9细胞中不同浓度(0.02、0.2、2 $\mu\text{mol/L}$)吉非替尼对p-Akt的抑制作用呈剂量依赖性,表明在敏感株中Akt的活化依赖EGFR信号;不同浓度吉非替尼对未转染PC-9/G细胞p-Akt的抑制作用弱于PC-9细胞(图2),说明吉非替尼耐药株中Akt处于非EGFR依赖性的持续激活状态。对PC-9/G细胞转染整合素 β_1 干扰载体后,干扰载体转染组的p-Akt表达水平降低(图3)。

2.4 PI3K抑制剂能恢复吉非替尼耐药株的敏感性 用不同浓度(0、0.001、0.005、0.01、0.05、0.5、5、10、20和40 $\mu\text{mol/L}$)的吉非替尼联合PI3K抑制剂LY294002(25 $\mu\text{mol/L}$)分别处理PC-9和PC-9/G细胞。吉非替尼联合LY294002后,PC-9细胞的未转染组、转染对照载体组(plasmid 0)、整合素 β_1 干扰载体转染组(plasmid 1)的IC₅₀均下降,细胞凋亡率增加,较吉非替尼单独处理组差异有统计学意义($P < 0.05$,表2)。PC-9细胞的整合素 β_1 干扰载体转染组(plasmid 1)的IC₅₀下降幅度更大,表明在PC-9细胞中存在PI3K上调,PI3K活化主要由EGFR信号通路介导。

吉非替尼联合LY294002后,PC-9/G细胞的未转染组、转染对照载体组(plasmid 0)的IC₅₀均下降,细胞凋亡率增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);吉非替尼联合LY294002与单独吉非替尼处理整合素 β_1 干扰载体转染组(plasmid 1)的IC₅₀及凋亡率相似,差异无统计学意义(表2),表明细胞恢复了对吉非替尼的敏感性。

ERK抑制剂PD98059(20 $\mu\text{mol/L}$)联合吉非替尼(0、0.001、0.005、0.01、0.05、0.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)或单用吉非替尼后,PC-9和PC-9/G的各组细胞的IC₅₀无明显降低,细胞的凋亡率无明显增加(表2)。

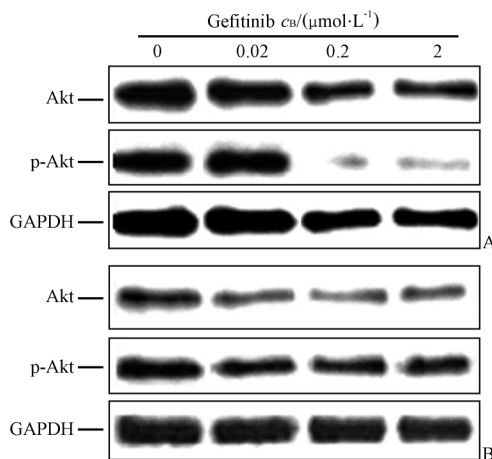


图2 吉非替尼对PC-9(A)和PC-9/G(B)细胞株Akt信号通路的影响

Fig 2 Effect of gefitinib on Akt signaling pathway in PC-9(A) and PC-9/G(B) cells

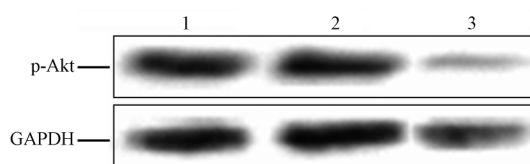


图3 转染整合素 β_1 干扰载体对PC-9/G细胞株中p-Akt表达的影响

Fig 3 Effect of integrin β_1 depleted by RNAi on phospho-Akt (p-Akt) expression in PC-9/G cells

Lane 1: Untransfected PC-9/G cells; Lane 2: PC-9/G cells transfected with plasmid 0 (scramble sequence); Lane 3: PC-9/G cells transfected with plasmid 1 (siIntegrin β_1)

3 讨论

EGFR-TKI靶向治疗NSCLC在临床上显示出较好的疗效和较低的毒副反应^[1-2],与传统的化疗相比具有显著的优越性。然而,多数EGFR-TKI治疗有效的NSCLC患者易复发,中位疾病进展时间仅有6~12个月^[12]。目前EGFR-TKI耐药机制研究主

要集中在以下方面:EGFR 基因 20 外显子获得性突变、下游效应分子的结构性活化、EMT 现象与原发耐药相关;c-MET 基因扩增、血管生成增加及肿

瘤微环境参与耐药等^[13-15]。但这些机制尚不能完全解释 NSCLC 对 EGFR-TKI 的耐药。

表 2 吉非替尼联合 LY294002/PD98059 或单用吉非替尼对 PC-9 和 PC-9/G 细胞增殖和凋亡的影响

Tab 2 Effect of gefitinib with or without LY294002 or PD98059 on proliferation and apoptosis of PC-9 and PC-9/G cells

n=3, $\bar{x} \pm s$

Group	IC ₅₀ c _B /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)			Apoptosis rate ^a (%)		
	Gefitinib	Gefitinib+ LY294002	Gefitinib+ PD98059	Gefitinib	Gefitinib+ LY294002	Gefitinib+ PD98059
PC-9						
Untransfected	0.04±0.01	0.002 0±0.000 8*	0.043±0.007 6	4.5±0.22	21.0±0.85*	5.2±0.43
Plasmid 0(scramble sequence)	0.04±0.02	0.002 4±0.000 7*	0.047±0.007 5	4.8±0.30	21.4±0.76*	5.8±0.50
Plasmid 1(siIntegrin β_1)	0.07±0.014	0.001 4±0.000 6*	0.009±0.000 4	8.5±0.41	23.2±0.79*	8.8±0.66
PC-9/G						
Untransfected	7.29±0.39	0.092±0.005*	6.43±0.31	6.7±0.36	21.0±0.81*	6.4±0.53
Plasmid 0(scramble sequence)	6.85±0.25	0.098±0.009*	6.37±0.21	6.6±0.51	22.4±1.10*	6.2±0.42
Plasmid 1(siIntegrin β_1)	0.09±0.006	0.087±0.004	0.085±0.008	24.0±1.12	26.0±0.91	23.2±1.41

^a: PC-9 cells were treated with 0.001 $\mu\text{mol/L}$ gefitinib for 24 h and PC-9/G cells were treated with 0.01 $\mu\text{mol/L}$ gefitinib for 24 h. Concentrations of LY294002 and PD98059 were 25 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$, respectively. * $P < 0.05$ vs gefitinib group

整合素是由 α 和 β 亚基组成的异源双体跨膜蛋白,介导细胞-细胞外基质的黏附。此外,整合素在信号转导中也发挥关键作用,包括由整合素直接介导的细胞内信号成分的级联激活以及由整合素调控的生长因子触发的信号转导过程,而且后一种方式可能更加重要^[16]。除了直接激活胞内信号分子,整合素还通过与酪氨酸激酶受体联合的方式介导信号传递^[17]。本课题组前期研究结果显示,整合素 β_1 信号通路不仅与化疗耐药有关,也与 NSCLC 对 EGFR 靶向药物的耐药有关^[9-10]。在本研究中,我们发现 RNA 干扰抑制整合素 β_1 表达后能恢复 PC-9/G 对吉非替尼的敏感性,进一步证实了整合素 β_1 参与 NSCLC 对 EGFR-TKI 耐药。

整合素直接介导的信号转导是通过整合素与酪氨酸磷酸化的局灶黏附激酶(focal adhesion kinase, FAK)的结合激活胞内信号通路^[18]。在这一信号转导过程中,最关键的是 PI3K/Akt 和促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)途径,两者均在肿瘤发生以及肿瘤耐药中起关键作用^[19]。近来有研究报道,整合素 β_1 能在不依赖 FAK 和 EGFR 的情况下激活 Akt^[20-21]。本研究发现,吉非替尼耐药株 PC-9/G 的 p-Akt 水平高于 PC-9 细胞,提示 PC-9/G 细胞株存在非 EGFR 依赖性的 Akt 激活。RNA 干扰抑制整合素 β_1 表达后 Akt 的磷酸化水平显著降低,提示耐药株中 Akt 的持续激活与整合素 β_1 有关。本研究进一步发现吉非替尼联合 PI3K 抑制剂 LY294002 处理耐药株,细胞增殖率下降伴随凋亡率增加,其程度与单独使用吉

非替尼处理 RNA 干扰抑制整合素表达细胞株的结果类似。结果提示 PC-9/G 中整合素 β_1 主要通过 PI3K 持续激活补偿降低的 EGFR 信号,从而介导 EGFR-TKI 耐药。而 ERK 抑制剂 PD98059 单独使用或联合吉非替尼后,各组细胞的增殖率无明显降低,细胞凋亡率无明显增加。结果提示整合素 β_1 介导的吉非替尼耐药与 PI3K 信号途径有关,而与 ERK 途径无关。

Akt 磷酸化能够正向调节 NF- κ B,反向调节如 Bad、caspase9 和 forkhead 转录因子等数个凋亡前体,所以上述的任何一种下游分子均可能参与了整合素 β_1 介导的肿瘤耐药^[22]。我们的前期研究中,基因芯片分析结果提示在 PC-9/G 细胞株中存在 NF- κ B 的高表达^[11],而 NF- κ B 的主要生理功能之一是通过诱导凋亡抑制基因的转录而发挥抗凋亡作用,这或许提示了一种可能:PC-9/G 细胞中 Akt 持续激活正向调节 NF- κ B 的高表达赋予吉非替尼耐药株更大的生存优势。

综上所述,本研究的结果显示耐药株中高表达的整合素 β_1 是通过下游的 PI3K/Akt 信号通路持续激活参与了 NSCLC 获得性吉非替尼耐药。从而可以预测,在将来联合靶向整合素 β_1 以及 EGFR 的治疗药物是克服此类耐药的可选策略。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Laskin J J, Sandler A B. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours[J]. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30:1-17.
- [2] Zhou C, Wu Y L, Chen G, Feng J, Liu X Q, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study [J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12: 735-742.
- [3] Thomson S, Buck E, Petti F, Griffin G, Brown E, Ramnarine N, et al. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition[J]. *Cancer Res*, 2005, 65:9455-9462.
- [4] Shintani Y, Maeda M, Chaika N, Johnson K R, Wheelock M J. Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor-beta signaling [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 38:95-104.
- [5] Aoudjit F, Vuori K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 4995-5004.
- [6] Damiano J S, Cress A E, Hazlehurst L A, Shtil A A, Dalton W S. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines[J]. *Blood*, 1999, 93:1658-1667.
- [7] Emmons M F, Gebhard A W, Nair R R, Baz R, McLaughlin M L, Cress A E, et al. Acquisition of resistance toward HYD1 correlates with a reduction in cleaved α_4 integrin expression and a compromised CAM-DR phenotype[J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10:2257-2266.
- [8] Sethi T, Rintoul R C, Moore S M, MacKinnon A C, Salter D, Choo C, et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance *in vivo* [J]. *Nat Med*, 1999, 5:662-668.
- [9] 鞠立霞, 周彩存, 唐亮, 赵印敏, 杨晓君, 粟波, 等. 吉非替尼获得性耐药的肺非小细胞肺癌细胞株 PC9/AB2 相关耐药机制研究[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2010, 33:354-358.
- [10] 张学兰, 周彩存, 鞠立霞. 整合素 β_1 表达上调对非小细胞肺癌吉非替尼耐药的影响[J]. *肿瘤*, 2011, 31:483-488.
- [11] 粟波, 苏春霞, 张海平, 邓沁芳, 赵印敏, 周彩存. 吉非替尼耐药细胞株的筛选和基因谱表达研究[J]. *肿瘤*, 2008, 28: 552-557.
- [12] Nguyen K S, Kobayashi S, Costa D B. 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: 281-289.
- [13] Pao W, Miller V A, Politi K A, Riely G J, Somwar R, Zakowski M F, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain[J]. *PLoS Med*, 2005, 2: e73.
- [14] Onitsuka T, Uramoto H, Nose N, Takenoyama M, Hanagiri T, Sugio K, et al. Acquired resistance to gefitinib: the contribution of mechanisms other than the T790M, MET, and HGF status [J]. *Lung Cancer*, 2010, 68:198-203.
- [15] Nakamura Y, Matsubara D, Goto A, Ota S, Sachiko O, Ishikawa S, et al. Constitutive activation of c-Met is correlated with c-Met overexpression and dependent on cell-matrix adhesion in lung adenocarcinoma cell lines[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99:14-22.
- [16] Parise L V, Lee J, Juliano R L. New aspects of integrin signaling in cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2000, 10:407-414.
- [17] Cabodi S, Morello V, Masi A, Cicchi R, Broggio C, Distefano P, et al. Convergence of integrins and EGF receptor signaling via PI3K/Akt/FoxO pathway in early gene Egr-1 expression[J]. *J Cell Physiol*, 2009, 218:294-303.
- [18] Plopper G E, McNamee H P, Dike L E, Bojanowski K, Ingber D E. Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex[J]. *Mol Biol Cell*, 1995, 6:1349-1365.
- [19] Lee H Y, Srinivas H, Xia D, Lu Y, Superty R, LaPushin R, et al. Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase kinase-4/c-Jun NH₂-terminal kinase-dependent pathways cooperate to maintain lung cancer cell survival[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:23630-23638.
- [20] Velling T, Stefansson A, Johansson S. EGFR and beta1 integrins utilize different signaling pathways to activate Akt [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314:309-316.
- [21] Zeller K S, Idevall-Hagren O, Stefansson A, Velling T, Jackson S P, Downward J, et al. PI3-kinase p110 α mediates β_1 integrin-induced Akt activation and membrane protrusion during cell attachment and initial spreading[J]. *Cell Signal*, 2010, 22: 1838-1848.
- [22] Gilmore A P, Metcalfe A D, Romer L H, Streuli C H. Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization[J]. *J Cell Biol*, 2000, 149:431-446.