

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.10.1102

· 论 著 ·

粒状头样蛋白 2 下调诱导上皮间质转化促进肿瘤细胞对吉非替尼耐药

洪永刚¹, 郝立强¹, 毕峰瑞², 颜宏利^{2*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院肛肠外科, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院生殖医学中心, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨粒状头样蛋白 2 (GRHL2) 在肿瘤靶向治疗药物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和可能机制。**方法** 利用吉非替尼浓度逐步递增的体外诱导方法培养人结肠癌细胞 DiFi 和人肺癌细胞 HCC4006, 获得吉非替尼耐药细胞株。通过 RNA 测序方法筛选在耐药细胞株与其亲代细胞中差异表达的基因并进行实时荧光定量 PCR 验证。使用 pcDNA3.1-GRHL2 质粒转染耐药细胞株使 GRHL2 过表达, 用 CCK-8 法检测细胞对吉非替尼的敏感性。采用蛋白质印迹法检测耐药细胞株中上皮标志物 E-cadherin 和间质标志物 Vimentin 的表达变化, 并通过 CellMiner™ 数据库分析 60 株人肿瘤细胞系中 GRHL2 表达与 E-cadherin 和 Vimentin 表达的关系。**结果** 成功获得 DiFi 和 HCC4006 的耐药细胞株。通过 RNA 测序和实时荧光定量 PCR 验证发现 GRHL2 在耐药细胞株中表达下调, 而在耐药细胞株中过表达 GRHL2 后细胞恢复了对吉非替尼的敏感性。蛋白质印迹分析表明耐药细胞株中上皮标志物 E-cadherin 表达下调, 而间质标志物 Vimentin 表达上调; CellMiner™ 数据库分析表明 GRHL2 的表达与 E-cadherin/Vimentin 比值高度一致。**结论** GRHL2 表达下调通过诱导上皮间质转化介导肿瘤细胞对吉非替尼的耐药。

[关键词] 靶向治疗; 继发性耐药; 吉非替尼; 粒状头样蛋白 2; 上皮间质转化**[中图分类号]** R 730.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)10-1102-07

Down-regulation of grainyhead-like protein 2 promotes drug resistance of tumor cell to gefitinib by inducing epithelial-mesenchymal transformation

HONG Yong-gang¹, HAO Li-qiang¹, BI Feng-rui², YAN Hong-li^{2*}

1. Department of Colorectal Surgery, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Reproductive Medicine, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the role and possible mechanism of grainyhead-like protein 2 (GRHL2) down-regulation in acquired drug resistance to tumor-targeted therapeutic drug gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI). **Methods** Human colon cancer cell line DiFi and human lung adenocarcinoma cell line HCC4006 were cultured in a stepwise increasing concentration of gefitinib to obtain gefitinib-resistant cell lines. The differentially expressed genes between gefitinib-resistant cell lines and parent cells were selected by RNA sequencing and verified by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). The pcDNA3.1-GRHL2 plasmid was transfected into the gefitinib-resistant cell lines to overexpress GRHL2, and the sensitivity of the cells to gefitinib was detected by CCK-8 method. The expression of epithelial marker (E-cadherin) and mesenchymal marker (Vimentin) in the gefitinib-resistant cells was detected by Western blotting. The relationship between GRHL2 expression and expression of E-cadherin and Vimentin in 60 human tumor cell lines was analyzed by CellMiner™ database. **Results** We successfully obtained two gefitinib-resistant cell lines. RNA sequencing and qRT-PCR confirmed that the expression of GRHL2 in the gefitinib-resistant cells was decreased, while the sensitivity of the cells to gefitinib was restored after overexpressing GRHL2 in the gefitinib-resistant cells. Western blotting analysis showed that the E-cadherin expression was decreased and the Vimentin expression was increased in the gefitinib-resistant cell line. CellMiner™ database analysis showed that the expression of GRHL2 was highly consistent with

[收稿日期] 2018-07-17 **[接受日期]** 2018-09-25**[基金项目]** 国家自然科学基金(81472770). Supported by National Natural Science Foundation of China (81472770).**[作者简介]** 洪永刚, 硕士, 主治医师. E-mail: hyg810@126.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162056, E-mail: hongliyan@smmu.edu.cn

the ratio of E-cadherin to Vimentin. **Conclusion** Down-regulation of GRHL2 mediates drug resistance of tumor cell to gefitinib by inducing epithelial-mesenchymal transition.

[Key words] targeted therapy; secondary resistance; gefitinib; grainyhead-like protein 2; epithelial-mesenchymal transition

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(10): 1102-1108]

随着对肿瘤信号转导研究的不断深入, 针对细胞受体、细胞周期和血管生成等性状的靶向治疗已成为继手术、放射治疗和化学治疗后的重要治疗方式^[1]。迄今为止, 很多靶向药物已经在临床中起到了极其重要的作用, 有些已经按照循证医学原则被纳入国际肿瘤学界的标准治疗方案和规范^[2]。但是, 正是由于靶向治疗仅仅针对一个或几个信号转导通路, 只有少数患者适合接受靶向治疗并从中获益; 而且即便是靶向治疗初期效果明显的患者, 随着治疗时间的延长也可能会出现获得性耐药而最终治疗失败^[3]。

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) 被广泛应用于非小细胞肺癌等肿瘤的治疗, 但多数患者在用药半年到 2 年内会发生耐药^[4]。目前已发现表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) T790M 突变、MET 原癌基因扩增等耐药机制, 但这些机制仅能解释 60%~70% 的耐药突变, 仍有 30%~40% 的患者耐药机制不明^[4]。粒状头样蛋白 2 (grainyhead-like protein 2, GRHL2) 是粒状头样家族成员之一, 近年研究表明, GRHL2 下调可促进肿瘤细胞的上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 而 EMT 与肿瘤耐药密切相关^[5]。本研究利用浓度逐步递增的体外诱导方法^[6-7]获得了 EGFR-TKI 耐药的肿瘤细胞株, 分析 GRHL2 在耐药细胞株中的表达及其与 EMT 的关系, 为探讨 EGFR-TKI 耐药的关键基因和相关耐药机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 细胞株与主要试剂 人结直肠癌细胞 DiFi 和人肺腺癌细胞 HCC4006 购自南京科佰生物科技有限公司; DMEM、RPMI 1640 培养液和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Hyclone 公司; CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学公司;

E-cadherin、Vimentin、GRHL2 抗体购自 Sigma-Aldrich 公司; β -actin 抗体购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 免疫印迹化学发光试剂购自美国 Millipore 公司; 吉非替尼购自英国阿斯利康公司。脂质体转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。pcDNA3.1-GRHL2 由本实验室构建。

1.2 细胞培养 DiFi 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中, HCC4006 细胞培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液中, 培养条件均为 37 °C、5% CO₂。在倒置显微镜下观察细胞形态及生长状态, 每隔 1~2 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞进行实验。

1.3 耐药细胞株的建立 采用剂量逐步递增的方法^[6-7]体外诱导耐药细胞株。取对数生长期的 DiFi 细胞和 HCC4006 细胞, 加入含吉非替尼的培养液, 吉非替尼从低浓度 20 nmol/L 开始, 敏感细胞逐渐死亡, 弃去培养液, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 漂洗 3 次后, 换不含药物的新鲜培养液继续培养至对数期。逐渐提高吉非替尼的浓度, 通过反复诱导、换液传代, 经过 8 个月筛选, 直至细胞能够在 1.0 μ mol/L 吉非替尼中稳定生长, 最终得到耐药细胞株 DiFi-GR、HCC4006-GR1 和 HCC4006-GR2。

1.4 CCK-8 法检测细胞的耐药性 取对数生长期的细胞, 加入胰酶消化成单细胞悬液, 调整细胞密度至 4×10^4 /mL, 将细胞接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 培养 24 h 后吸弃培养液, 将含不同浓度吉非替尼的新鲜培养液加入培养孔。培养 48 h 后吸弃培养液并用 PBS 清洗, 每孔加入 100 μ L 含 10% CCK-8 的培养液并于 37 °C 孵箱中避光孵育 1.5 h。取出培养板, 用酶标仪测定 450 nm 波长处各孔光密度 (D) 值, 绘制细胞生长曲线, 计算药物作用后细胞的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

1.5 RNA 测序分析细胞转录组差异 取对数生长

期的 DiFi 细胞与耐药细胞株 DiFi-GR、HCC4006 细胞与耐药细胞株 HCC4006-GR1, 委托欧易生物技术有限公司进行 RNA 测序, 提取出差异表达基因 (标准为差异倍数 ≥ 1.3 且 $P < 0.05$) 并进行聚类分析。利用实时荧光定量 PCR 对差异表达基因进行验证。

1.6 耐药细胞株中 GRHL2 拯救实验 培养耐药细胞株 DiFi-GR、HCC4006-GR1 至对数生长期, 经胰酶消化后传代至 6 孔板, 24 h 后利用 Lipofectamine™ 2000 转染 pcDNA3.1-GRHL2 质粒, 以 pcDNA3.1 空载体转染作为阴性对照。转染后 24 h 传代到 96 孔板, 加入含不同浓度吉非替尼的培养液。用蛋白质印迹法检测细胞中 GRHL2 的表达, CCK-8 法检测 DiFi-GR 和 HCC4006-GR1 细胞过表达 GRHL2 后的耐药情况。

1.7 蛋白质印迹法检测 EMT 标志物 E-cadherin、Vimentin 的表达 取对数生长的 HCC4006 细胞、DiFi 细胞及相应的耐药细胞株, 消化后计数并调整细胞密度, 以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 将培养板置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养 24 h 至其生长良好后, 收集细胞。先用预冷的 PBS 洗 2 次, 裂解细胞 1 h, 提取细胞总蛋白, 收集于离心管中, 沸水煮 10 min, -20°C 保存备用。以每个样品 30 μg 的蛋白量上样, 在 10% 分离胶、5% 浓缩胶的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, 转膜后室温封闭 2 h。TBST 洗 3 次, 加入一抗缓慢摇动并孵育过夜。洗膜后加入用 TBST 稀释的二抗, 化学发光显色。

1.8 CellMiner™ 数据库分析 GRHL2 在 60 种细胞系中的表达 利用 CellMiner™ 数据库^[8] (<https://discover.nci.nih.gov/cellminer>) 分析 GRHL2 在美国国立研究所 60 种人类肿瘤细胞系 (NCI-60) 中的表达, 并与 Park 等^[9]通过蛋白质印迹法检测的 NCI-60 中 EMT 标志蛋白 E-cadherin 与 Vimentin 的比值进行比较。Park 等^[9]根据 E-cadherin 与 Vimentin 的比值将 NCI-60 细胞系分为 3 类: 上皮细胞表型、间质细胞表型和不确定型。

1.9 统计学处理 应用 GraphPad Prism 19.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间的比较采用独立样本 t 检验, 多组间的比较采用单因素方差分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 吉非替尼耐药细胞株的筛选和建立 选择 2 株对吉非替尼敏感的细胞系 DiFi 和 HCC4006, 利用浓度逐步递增的体外诱导法, 获得了吉非替尼耐药 DiFi 克隆和耐药 HCC4006 克隆各 2 个, 其中在 DiFi 的一个耐药克隆中发现 K-Ras 的扩增, 未做进一步研究; 其余 3 个克隆均未发现 EGFR (T790M)、K-Ras、BRAF (V600E)、PIK3A 中常见的获得性耐药突变, 也没有发现 MET 原癌基因的扩增, 提示可能存在其他的耐药机制, 用于后续研究。将获得的 3 株耐药细胞株分别命名为 DiFi-GR、HCC4006-GR1 和 HCC4006-GR2。采用 CCK-8 法检测耐药细胞对吉非替尼的敏感性, 发现耐药细胞在吉非替尼作用下的活力与对照细胞相比明显增强。经计算, DiFi 细胞的 IC_{50} 为 52 nmol/L, 耐药细胞株 DiFi-GR 的 IC_{50} 为 1 600 nmol/L; HCC4006 细胞的 IC_{50} 为 112 nmol/L, 耐药细胞株 HCC4006-GR1 和 HCC4006-GR2 的 IC_{50} 分别为 19 000 和 18 000 nmol/L。

2.2 亲本细胞和耐药细胞差异表达基因的筛选 利用 RNA 测序的方法比较 DiFi 与 DiFi-GR、HCC4006 与 HCC4006-GR1 的基因表达谱差异, 共获得 51 个共同的差异表达基因。对差异表达基因进行聚类分析和实时荧光定量 PCR 验证, 发现癌基因 Ras 相关蛋白 Rab25、转录因子 GRHL2 以及上皮相关分子 Claudin4 和 E-cadherin 在吉非替尼耐药细胞株 DiFi-GR、HCC4006-GR1、HCC4006-GR2 中表达下调, 而间质标志蛋白 Vimentin 和调控因子 ZEB1 表达上调 (图 1)。

2.3 过表达 GRHL2 增强耐药细胞对吉非替尼的敏感性 在 DiFi-GR 和 HCC4006-GR1 细胞中转染 pcDNA3.1-GRHL2 质粒后, 蛋白质印迹分析结果表明细胞中 GRHL2 表达量明显升高, CCK-8 实验结果表明细胞对吉非替尼的敏感性明显增强 (图 2)。说明 GRHL2 是 DiFi-GR 和 HCC4006-GR1 耐药的关键因子之一。

2.4 耐药细胞发生 EMT 利用蛋白质印迹法检测 EMT 关键分子的表达, 结果显示耐药细胞 DiFi-GR、HCC4006-GR1、HCC4006-GR2 中上皮标志蛋白 E-cadherin 表达下调, 而间质标志蛋白 Vimentin 表达上调 (图 3)。证实耐药细胞发生了 EMT。

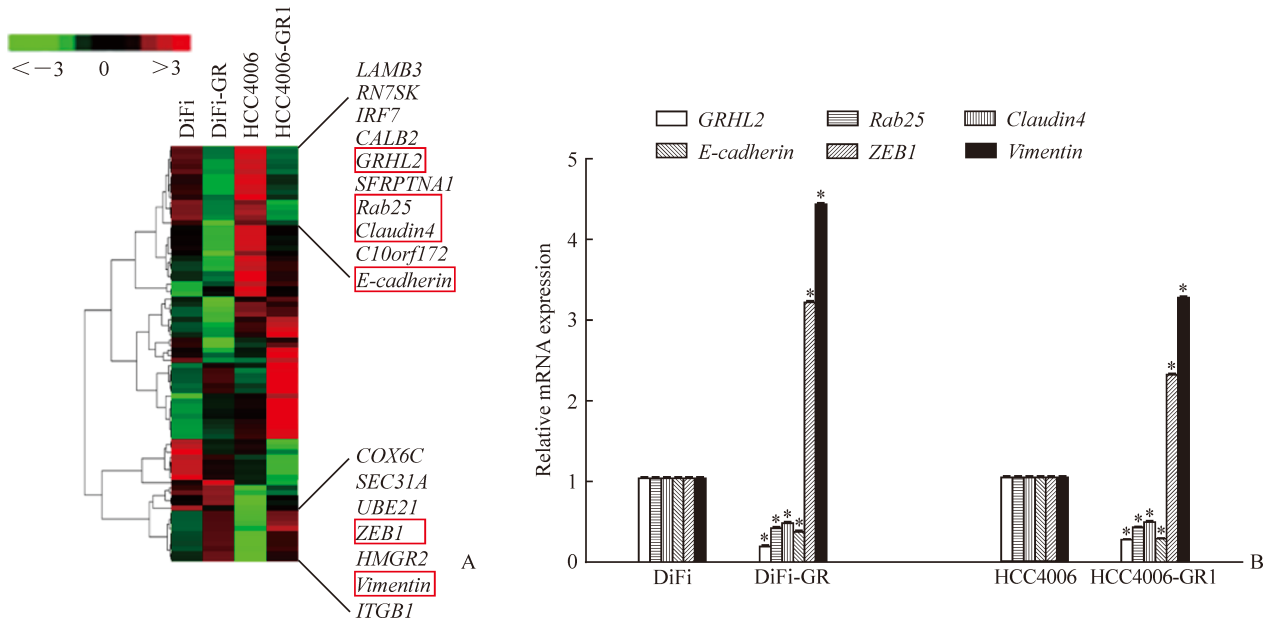


图 1 DiFi 和 HCC4006 细胞与相应的吉非替尼耐药细胞株差异表达基因的筛选

Fig 1 Differentially expressed gene screening in DiFi and HCC4006 cells and corresponding gefitinib-resistant cell lines

A: Clustering analysis; B: Quantitative real-time PCR. DiFi-GR and HCC4006-GR1 cells are the gefitinib-resistant cell lines. GRHL2: Grainyhead-like protein 2. * $P < 0.05$ vs DiFi cell or HCC4006 cell, respectively. $n = 3, \bar{x} \pm s$

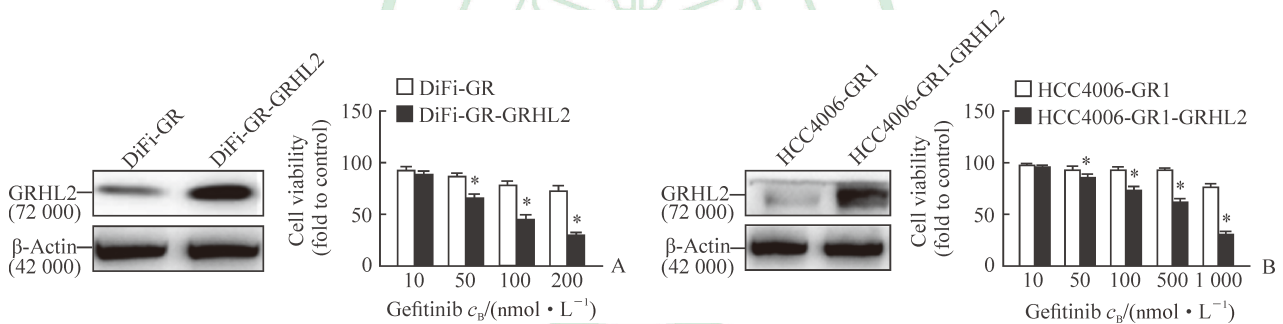


图 2 过表达 GRHL2 增强 DiFi-GR 和 HCC4006-GR1 细胞对吉非替尼的敏感性

Fig 2 Overexpression of GRHL2 enhances sensitivity of DiFi-GR and HCC4006-GR1 cells to gefitinib

A: Gefitinib-resistant cell line DiFi-GR; B: Gefitinib-resistant cell line HCC4006-GR1. GRHL2: Grainyhead-like protein 2. * $P < 0.05$ vs DiFi-GR cell or HCC4006-GR1 cell, respectively. $n = 3, \bar{x} \pm s$

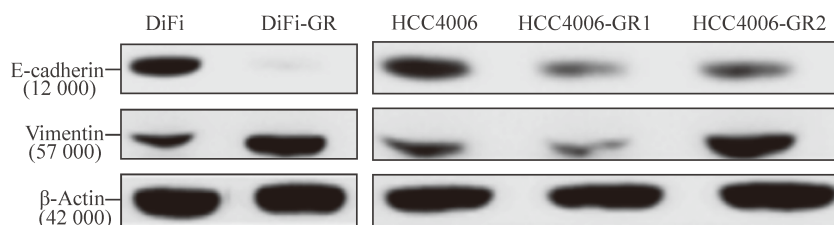


图 3 蛋白质印迹法检测 E-cadherin 和 Vimentin 在 DiFi-GR、HCC4006-GR1 和 HCC4006-GR2 细胞中的表达

Fig 3 Expression of E-cadherin and Vimentin in DiFi-GR, HCC4006-GR1 and HCC4006-GR2 cells by Western blotting

DiFi-GR, HCC4006-GR1 and HCC4006-GR2 cells are the gefitinib-resistant cell lines

2.5 GRHL2 表达下调与 EMT 表型密切相关 利用 CellMiner™ 数据库分析 GRHL2 在 NCI-60 细胞系中的表达, 结果显示 GRHL2 的表达与 Park

等^[9]检测的 NCI-60 中 E-cadherin/Vimentin 的比值高度一致(图 4)。表明 GRHL2 表达下调可能是耐药细胞发生 EMT 进而耐药的原因。

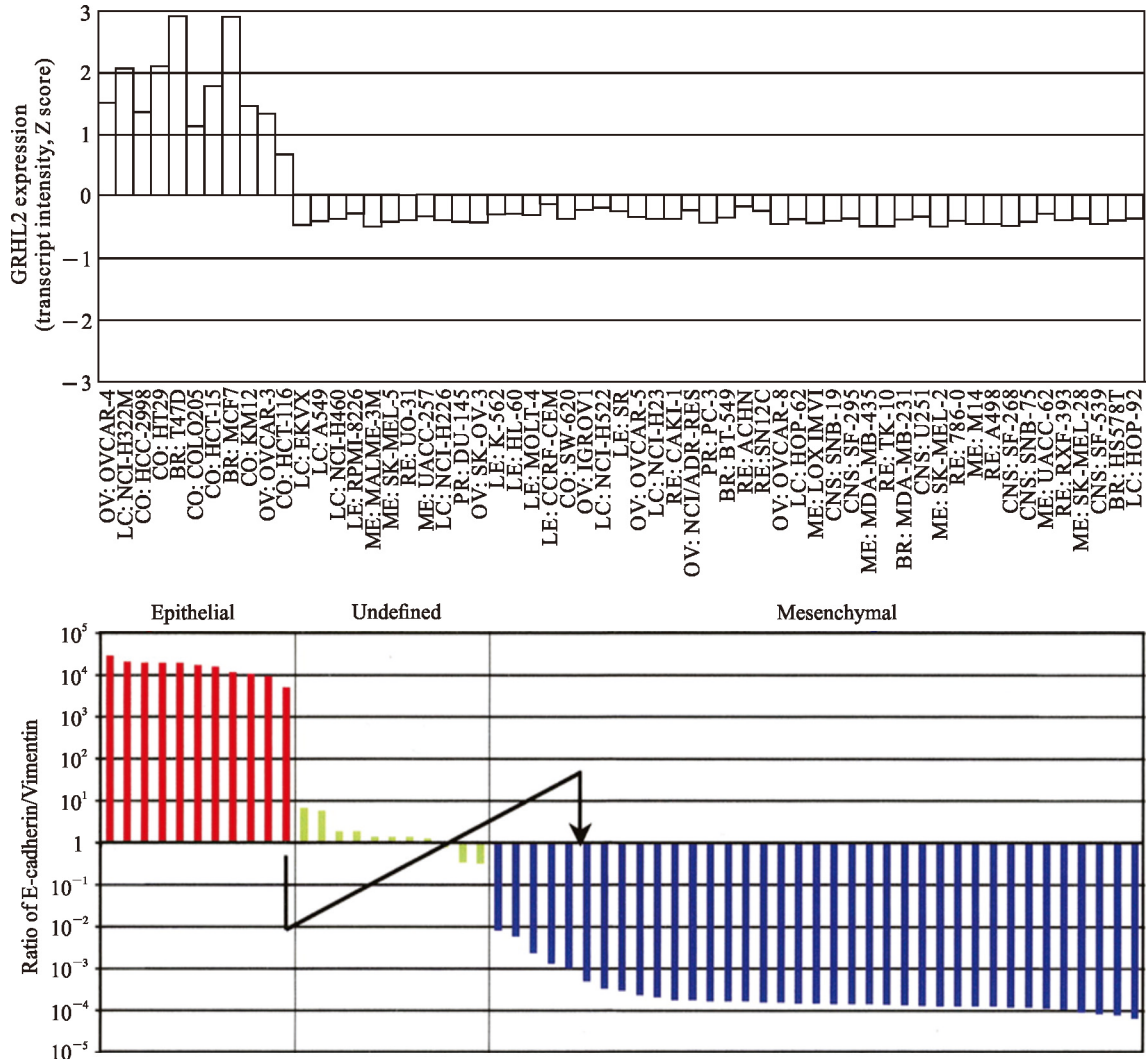


图4 GRHL2 表达与 NCI-60 细胞系的 EMT 表型相一致

Fig 4 GRHL2 expression is consistent with EMT phenotype of NCI-60 cell lines

The ratio of E-cadherin to Vimentin was examined by Park, et al^[9], and the GRHL2 expression was available at CellMinerTM database (<https://discover.nci.nih.gov/cellminer/CellMiner>). GRHL2: Grainyhead-like protein 2; EMT: Epithelial-mesenchymal transition

3 讨论

目前比较明确的 EGFR-TKI 耐药机制主要有 2 种: 50% 的获得性耐药与 EGFR 的 T790M 突变有关^[10], 15%~20% 与 MET 的扩增有关^[11]。另外有研究发现, EGFR 相关信号通路中 K-Ras 突变、PTEN 表达缺失、AKT 和 MAPK 的异常活化等也与吉非替尼的反应性有关^[7]。EGFR 家族的其他成员(如 HER-2 和 HER-3)和其他生长因子受体(如 IGFR-1 和 PDGFR)的突变和(或)活性增强在耐受机制中也发挥了重要作用^[12], 但这些突变所占的比例较小, 目前仍有 30%~40% 的患者耐药机制不明^[4]。

为了探讨 EGFR-TKI 耐药的关键基因和耐药机制, 本研究选择了 2 种对吉非替尼敏感的细胞系: 结直肠癌细胞系 DiFi (高表达 EGFR, 野生型, K-Ras、BRAF 和 PIK3CA 均为野生型) 和 HCC4006 肺癌细胞系 [高表达 EGFR, 敏感型突变 (exon19del L747~E749), K-Ras 为野生型]^[13], 利用低剂量递增的体外诱导法^[6-7]获得吉非替尼耐药的 DiFi 克隆和 HCC4006 克隆各 2 个, 其中 DiFi 的一个耐药克隆中发现 K-Ras 扩增, 其余 3 个克隆均未发现 EGFR (T790M)、K-Ras、BRAF (V600E)、PIK3CA 中常见的获得性耐药突变, 也没有发现 MET 原癌基因的扩增, 提示可能存在其他的耐药机制。

利用 RNA 测序的方法对 DiFi 与 DiFi-GR、HCC4006 与 HCC4006-GR1 的基因表达谱进行研究, 共获得了 51 个共同的差异表达基因。进一步对差异表达基因的功能进行聚类分析, 发现了一个重要的转录因子 GRHL2, 经实时荧光定量 PCR 验证, 该分子在耐药细胞株 DiFi-GR、HCC4006-GR1 和 HCC4006-GR2 中均表达下调; 而 GRHL2 拯救实验发现在耐药细胞中过表达 GRHL2 后细胞恢复了对吉非替尼的敏感性。说明 GRHL2 是 DiFi-GR、HCC4006-GR1 和 HCC4006-GR2 耐药的关键因子之一。

近年来研究发现, EMT 是西妥昔单抗耐药的机制之一^[14]。Fuchs 等^[15]将 12 种人肝癌细胞系根据上皮细胞标志分子 E-cadherin 和间质细胞标志分子 Vimentin 的表达分为上皮和间质样细胞系, 发现上皮细胞系对 EGFR 抑制剂西妥昔单抗、吉非替尼敏感, 而间质细胞系对上述药物不敏感, 进一步研究发现间质细胞系能够不依赖于 EGFR 而激活下游 AKT 和 STAT3 信号转导途径。类似的, Basu 等^[16]发现, 间质样头颈癌细胞系中 EGFR 的表达降低, 激活 AKT 和 ERK 信号转导途径产生耐药。Frederick 等^[17]的研究也表明, 检测头颈癌和非小细胞肺癌细胞系 EMT 标志分子 E-cadherin、claudin-4 和 claudin-7 的表达能够预测细胞对吉非替尼的敏感性。

GRHL2 是粒状头样蛋白 3 个家族成员之一, 参与调控胚胎发育、上皮细胞分化、表皮屏障形成以及表皮损伤修复等一系列重要生命过程^[18], 并可通过靶向上皮表型基因 *E-cadherin* 和 *Cludin-4* 调控上皮顶端连接复合体的形成^[19]。由于细胞损伤修复与 EMT 具有很多类似的特性^[20], 而 Cieply 等^[21]也报道了 GRHL2 在乳腺癌间质样上皮细胞中表达降低。本研究利用 CellMinerTM 数据库^[8] (<http://discover.nci.nih.gov/cellminer/>) 分析了 GRHL2 的表达, 结果发现 GRHL2 的表达与 NCI-60 细胞系的上皮和间质表型高度^[9]一致。因此, GRHL2 表达下调促进细胞的 EMT 可能是其耐药机制之一。

总之, 本研究结果提示, GRHL2 可能是 DiFi-GR、HCC4006-GR1 和 HCC4006-GR2 对吉非替尼耐药的关键因子。GRHL2 表达下调可能通过诱导

EMT 促进肿瘤细胞对吉非替尼耐药, 但 GRHL2 调控 EMT 的分子机制及相关信号通路尚需进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] PÉREZ-HERRERO E, FERNÁNDEZ-MEDARDE A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 93: 52-79.
- [2] HABER D A, GRAY N S, BASELGA J. The evolving war on cancer[J]. *Cell*, 2011, 145: 19-24.
- [3] REDMOND K L, PAPAFILE A, LAWLER M, VAN SCHAEYBROECK S. Overcoming resistance to targeted therapies in cancer[J]. *Semin Oncol*, 2015, 42: 896-908.
- [4] OHASHI K, SEQUIST L V, ARCILA M E, MORAN T, CHMIELECKI J, LIN Y L, et al. Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor *BRAF* gene mutations but lack mutations in *KRAS*, *NRAS*, or *MEK1*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E2127-E2133.
- [5] FADDAOUI A, SHETA R, BACHVAROVA M, PLANTE M, GREGOIRE J, RENAUD M C, et al. Suppression of the grainyhead transcription factor 2 gene (*GRHL2*) inhibits the proliferation, migration, invasion and mediates cell cycle arrest of ovarian cancer cells[J]. *Cell Cycle*, 2017, 16: 693-706.
- [6] MISALE S, YAEGER R, HOBOR S, SCALA E, JANAKIRAMAN M, LISKA D, et al. Emergence of *KRAS* mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer[J]. *Nature*, 2012, 486: 532-536.
- [7] CHMIELECKI J, FOO J, OXNARD G R, HUTCHINSON K, OHASHI K, SOMWAR R, et al. Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2011, 3: 90ra59. doi: 10.1126/scitranslmed.3002356.
- [8] REINHOLD W C, SUNSHINE M, LIU H, VARMA S, KOHN K W, MORRIS J, et al. CellMiner: a web-based suite of genomic and pharmacologic tools to explore transcript and drug patterns in the NCI-60 cell line set[J]. *Cancer Res*, 2012, 72: 3499-3511.
- [9] PARK S M, GAUR A B, LENGUEL E, PETER M E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2[J]. *Genes Dev*, 2008, 22: 894-907.
- [10] HATA A, KATAKAMI N, YOSHIOKA H, KAJI R, MASAGO K, FUJITA S, et al. Spatiotemporal T790M

- heterogeneity in individual patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer after acquired resistance to EGFR-TKI[J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10: 1553-1559.
- [11] PRESUTTI D, SANTINI S, CARDINALI B, PAPOFF G, LALLI C, SAMPERNA S, et al. *MET* gene amplification and MET receptor activation are not sufficient to predict efficacy of combined MET and EGFR inhibitors in EGFR TKI-resistant NSCLC cells[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10: e0143333. doi: 10.1371/journal.pone.0143333.
- [12] LI X, XU Y, DING Y, LI C, ZHAO H, WANG J, et al. Posttranscriptional upregulation of HER3 by HER2 mRNA induces trastuzumab resistance in breast cancer[J/OL]. *Mol Cancer*, 2018, 17: 113. doi: 10.1186/s12943-018-0862-5.
- [13] WARE K E, HINZ T K, KLECZKO E, SINGLETON K R, MAREK L A, HELFRICH B A, et al. A mechanism of resistance to gefitinib mediated by cellular reprogramming and the acquisition of an FGF2-FGFR1 autocrine growth loop[J/OL]. *Oncogenesis*, 2013, 2: e39. doi: 10.1038/oncis.2013.4.
- [14] MITRA A, MISHRA L, LI S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance[J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 10697-10711.
- [15] FUCHS B C, FUJII T, DORFMAN J D, GOODWIN J M, ZHU A X, LANUTI M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 2391-2399.
- [16] BASU D, NGUYEN T T, MONTONE K T, ZHANG G, WANG L P, DIEHL J A, et al. Evidence for mesenchymal-like sub-populations within squamous cell carcinomas possessing chemoresistance and phenotypic plasticity[J]. *Oncogene*, 2010, 29: 4170-4182.
- [17] FREDERICK B A, HELFRICH B A, COLDREN C D, ZHENG D, CHAN D, BUNN P A Jr, et al. Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 1683-1691.
- [18] 唐冠楠,颜宏利,王玉招,孙树汉. 粒状头样 2(GRHL2)与肿瘤[J]. *第二军医大学学报*, 2013, 34: 1243-1247.
- TANG G N, YAN H L, WANG Y Z, SUN S H. Grainyhead-like-2 (GRHL2) and carcinogenesis: an advance[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2013, 34: 1243-1247.
- [19] WERTH M, WALENTIN K, AUE A, SCHÖNHEIT J, WUEBKEN A, PODE-SHAKKED N, et al. The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex[J]. *Development*, 2010, 137: 3835-3845.
- [20] KALLURI R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119: 1417-1419.
- [21] CIEPLY B, RILEY P 4th, PIFER P M, WIDMEYER J, ADDISON J B, IVANOV A V, et al. Suppression of the epithelial-mesenchymal transition by grainyhead-like-2[J]. *Cancer Res*, 2012, 72: 2440-2453.

[本文编辑] 孙岩