DOI:10.16016/j.1000-5404.201510148

Rab25 在非小细胞肺癌厄洛替尼获得性耐药中的作用

王旭东,王 江,赵凤仪,韩 静,孙建国,陈正堂 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所)

[摘要] **目的** 探讨 Rab25 在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)厄洛替尼获得性耐药中的作用。**方法** 传代培养 PC9 及其厄洛替尼耐药 PC9/ER 细胞,采用 CCK-8 法检测 PC9/ER 细胞的耐药指数。应用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time,qPCR)及 Western blot 检测对比同等厄洛替尼浓度(0.1、0.2、0.3 μmol/L)处理条件下,Rab25 在两种细胞中的 mRNA 及蛋白表达差异,并以免疫荧光法定位 Rab25 在细胞中的分布。用小干扰 RNA(siRab25)转染 PC9/ER 细胞,并以流式细胞仪及 CCK-8 法分别检测 Rab25 敲减后 PC9/ER 细胞的增殖指数(proliferation index,PI)及厄洛替尼 IC_{50} 值的变化。**结果** PC9/ER 细胞的耐药指数是 68.82±21.42。相同厄洛替尼浓度处理 48 h 后,PC9/ER 细胞 Rab25 mRNA 及蛋白水平均高于 PC9 细胞($P<0.05$),增高的 Rab25 蛋白主要表达于细胞膜。而且 PC9/ER 细胞 Rab25 蛋白水平随厄洛替尼处理浓度(0.1、0.2、0.3 μmol/L)递增而增高。siRab25 在 PC9/ER 细胞中成功转染后,转染组的厄洛替尼 IC_{50} 值及 PI 均明显低于对照组($P<0.05$)。**结论** Rab25 在 NSCLC 厄洛替尼获得性耐药细胞中高表达,起着促进耐药的作用。

[关键词] Rab25;非小细胞肺癌;厄洛替尼;抗药性,肿瘤
[中图法分类号] R345; R734.2; R979.12 [文献标志码] A

Role of Rab25 in acquired resistance of non-small cell lung cancer against erlotinib *in vitro*

Wang Xudong, Wang Jiang, Zhao Fengyi, Han Jing, Sun Jianguo, Chen Zhengtang (Institution of Cancer, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of Rab25 to erlotinib (ER) in acquired resistance of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** PC9 cells and the erlotinib acquired resistance cells (PC9/ER) were subcultured to evaluate erlotinib resistance index using CCK-8 assay. After treated with series concentrations of erlotinib (0.1, 0.2 and 0.3 μmol/L), the mRNA and protein levels of Rab25 were detected in the PC9 and PC9/ER cells by quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blotting, respectively. Immunofluorescence assay was used to observe the subcellular localization of Rab25 in the cells. After knocking-down Rab25 in PC9/ER with siRab25, the changes of proliferation index (PI) and erlotinib IC_{50} were detected by flow cytometry and CCK-8 assay respectively. **Results** The resistance index of PC9/ER to erlotinib was 68.82±21.42. The mRNA and protein levels of Rab25 were significantly higher in the PC9/ER cells than the PC9 cells after ER treatment for 48 h. In addition, the heaped Rab25 protein was mainly located in the cell membrane. Interestingly, the Rab25 protein level was progressively increased in a dose-dependent manner in PC9/ER cells, but not in PC9 cells. Erlotinib IC_{50} and PI were much lower in the PC9/ER cells with Rab25 knockdown than the control cells ($P<0.05$). **Conclusion** Rab25 is strongly expressed in acquired resistant NSCLC cells against ER, and it contributes to ER acquired resistance in the cells.

[**Key words**] Rab25; non-small cell lung cancer; erlotinib; drug resistance, neoplasm

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81172070, 81071786). Corresponding author: Chen Zhengtang, E-mail: czt05@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81172070,81071786)
[通信作者] 陈正堂,E-mail:czt05@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151230.1141.023.html(2015-12-30)

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)因绝大部分患者诊断时已处于中晚期而预后不佳[1],传统化疗的5年生存率低于14%[2]。厄洛替尼(Erlotinib)作为表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)的代表,自2004年获批应用于NSCLC靶向治疗后在优势人群中带来了巨大获益,其一线治疗无进展生存期(progression free survival, PFS)显著优于化疗[3]。然而,在治疗9~12个月后多数患者会产生耐药[4],探讨其产生耐药的机制已成为近年来研究的热点。

Rab25是Ras超家族的一种小GTP酶,被认为是调控受体蛋白及黏附蛋白膜定位的分子开关[5],在肿瘤中发挥促癌或抑癌作用[6]。高通量基因芯片检测结果提示Rab25在多种TKIs耐药细胞中异常表达[7],而其与NSCLC厄洛替尼获得性耐药的关系有待实验进一步证实。本研究以课题组前期工作中诱导的厄洛替尼获得性耐药细胞(PC9/ER)与其亲本细胞(PC9)为研究对象[8],对比在同等厄洛替尼浓度处理条件下Rab25的表达差异,利用小干扰RNA(siRNA)技术敲减Rab25在PC9/ER细胞中的表达,检测敲减后增殖指数(proliferation index, PI)及厄洛替尼IC_{50}值的变化,以期探讨Rab25在NSCLC厄洛替尼获得性耐药中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌PC9细胞株购于上海生物研究所;获得性耐药细胞株(PC9/ER)由PC9细胞利用大剂量厄洛替尼(1~5 μmol/L)冲击诱导8个月,并以低剂量厄洛替尼(0.1 μmol/L)维持培养获得,该细胞由本实验室韩静博士诱导并馈赠。

RPMI1640培养基购于上海拜力生物科技公司;TBD标准胎牛血清购于天津灏洋公司;盐酸厄洛替尼购于上海安格化工;RNA提取、反转录及荧光实时定量PCR试剂盒购于大连宝生物(TaKaRa);蛋白提取、BCA蛋白浓度测定、SDS-PAGE凝胶电泳试剂盒购于江苏碧云天公司;CCK-8细胞毒性检测试剂盒购于东仁化工;h-RAB25_单基因siRNA套装B购于广州锐博生物;一抗:GAPDH、Rab25分别购于武汉三鹰公司、美国Cell Signaling Technology(CST)公司;二抗:山羊抗兔及山羊抗鼠辣根过氧化物酶均购于武汉博士德生物。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养液利用RPMI1640培养基加经过过滤后的10%标准胎牛血清和1%的青霉素-链霉素溶液制成,PC9/ER的培养液始终添加0.1 μmol/L的厄洛替尼溶液维持培养。各细胞均在5% CO_2、37 ℃恒温孵箱中培养,取对数生长期细胞为实验对象。

1.2.2 CCK-8法检测药物毒性 分实验孔、对照孔、空白孔。实验孔、对照孔以5×10^3/孔的细胞量均匀铺种于96孔板,细胞贴壁后吸尽培养液。实验孔分别加入含厄洛替尼终浓度为10^{-3}、10^{-2}、10^{-1}、10^0、10^1、10^2 μmol/L的培养液,对照孔加入含二甲基亚砜(DMSO)终浓度为0.1 μmol/L的培养液,空白孔只加培养液。以上各孔培养液均为100 μL,且各设有3个复孔。孵育48 h后更换标准胎牛血清加CCK-8液配制成的混合液(体积比9:1),每孔100 μL,室温孵育30 min后在酶标仪中450 nm波长处的光密度值[$D(450)$],利用GraphPad Prism 6.0计算IC_{50}值。生存分数=[$D(450)_{实验孔}-D(450)_{空白孔}$]/[$D(450)_{对照孔}-D(450)_{空白孔}$]×100%,耐药指数=$IC_{50}$(PC9/ER细胞)/$IC_{50}$(PC9细胞)。

1.2.3 实时荧光定量PCR(qPCR) 各处理细胞以PBS溶液洗涤细胞2遍后,吸干。每瓶加入RNAiso Plus溶液1 mL,按说明书抽提总RNA,分光光度计测定浓度和纯度后,以1 000 ng RNA量计算并配制反转录体系,并按TaKaRa反转试剂盒说明书反转录。反转录获得的cDNA用Real-time PCR仪(ABI7500)进行扩增检测。扩增引物:β-actin(上游:5′-GCGAGCACAGAGCCTCGCCTT-3′;下游:5′-CATCATCCATGGTGAGCTGGCGG-3′,产物大小:71 bp);Rab25(上游:5′-GTCGTCATGCTCGTGGGTA′-3;下游:5′-GACAGTCTCAAAGGCTAGCTCA-3′,产物大小:153 bp)。扩增条件:95 ℃ 30 s(95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,共40个循环)。以$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算样品中RNA相对量。

1.2.4 Western blot检测 各处理细胞在贴壁生长48 h后,以PBS溶液洗涤细胞2遍后,吸干。按说明书提取细胞总蛋白。BAC法测定总蛋白浓度后,加入1/4体积的SDS-PAGE上样缓冲液,沸浴5 min充分变性。以15 μg蛋白计算各孔上样量后凝胶电泳(上层胶80 V,下层胶100 V),切胶后区分各分子量大小以150 mA恒流湿转到PVDF膜上。用5% BSA室温封闭1 h,一抗4 ℃孵育过夜,稀释比分别为Rab25(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)。翌日取出复温30 min后以TBST溶液洗膜3次,每次5 min。分别孵育对应种属二抗(稀释比1:5 000)1 h,再次以TBST溶液洗膜后滴加显影剂曝光。

1.2.5　细胞免疫荧光检测　　首先在24孔板中铺种细胞爬片,每孔 1×10^5 个细胞。细胞贴壁后用4%多聚甲醛固定30 min,用PBS溶液洗涤3次。以0.5% Triton打孔,PBS溶液洗涤3次后用BSA封闭1 h,吸干后孵育Rab25一抗(稀释比1∶50),在4 ℃湿盒过夜。翌日吸尽一抗并以PBS洗涤3次后,在湿盒避光下以山羊抗兔IgG® Alexa Fluor 488(稀释比1∶100)孵育二抗1 h,经DAPI复染、PBS洗涤、抗荧光淬灭封片后在激光共聚焦显微镜下成像。随机取3个不连续视野,并利用LAS AF Version2.3.0软件得到Rab25平均荧光密度值。

1.2.6　转染PC9/ER细胞　　分为各敲减组(siRab25-1、siRab25-2、siRab25-3)、阴性对照组(Ncontrol)。将PC9/ER细胞以 5×10^5/孔均匀接种6孔板,贴壁后按siRNA产品说明书,用1×ribo FECT™ CP Buffer分别稀释各组储存液,分别再加入ribo FECT™ CP Reagent轻轻吹打,室温孵育15 min后分别加入细胞培养液中。24 h后以qPCR检测RNA水平敲减效率,48 h后以Western blot检测蛋白水平的敲减效率。

1.2.7　细胞周期检测　　取对数生长期细胞经胰蛋白酶消化后悬浮于PBS溶液,4 ℃ 1 000 r/min离心5 min,弃上清,在沉淀中加入1 mL预冷处理的70%乙醇固定,边加边涡旋振荡。4 ℃过夜后离心、PBS洗涤乙醇,并加入碘化丙啶染液(50 μg/mL,含50 μg/mL RNase),4 ℃避光孵育30 min后上流式细胞仪检测。按公式计算细胞增殖指数(proliferation index,PI)。增殖指数=(S期百分比+G_2/M期百分比)/(G_0/G_1期百分比)×100%。

1.3　统计学分析

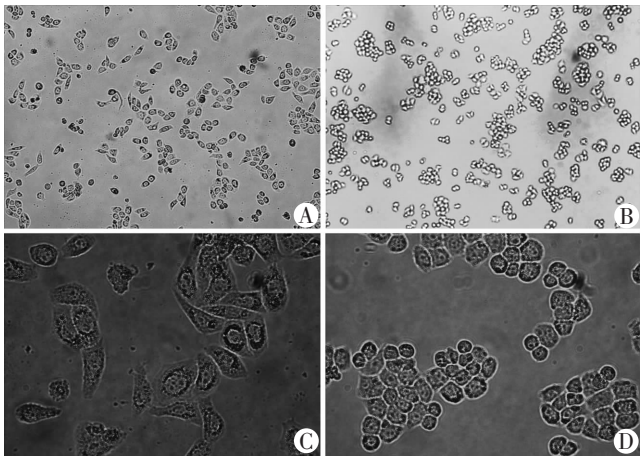
实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 18.0统计软件进行方差齐性分析,2组间均数比较采用成组 t 检验,检验水准:$\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　诱导获得性耐药PC9/ER细胞株的鉴定

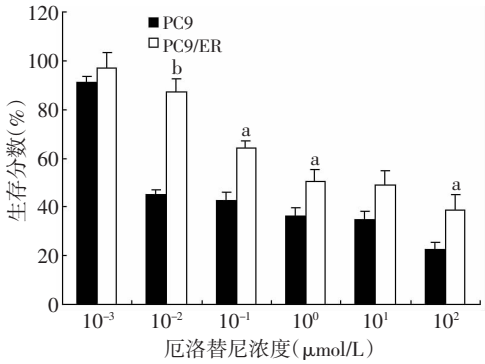
传代培养本实验室前期诱导的获得性耐药PC9/ER及亲本PC9细胞株,低倍镜下可观察到PC9细胞为梭形,而PC9/ER细胞为类圆形;高倍镜下可观察到前者呈散在生长,而后者呈连续片状生长(图1)。

CCK-8检测结果显示:随着厄洛替尼加药浓度的递增,两种细胞的生存分数均有不同程度的下降(图2)。计算两者的 IC_{50} 值,PC9/ER细胞的 IC_{50} 值远高于PC9细胞[(7.85±1.53) *vs* (0.12±0.04) μmol/L,$P<0.01$)],PC9/ER细胞的耐药指数为68.82±21.42,提示PC9/ER细胞建株成功,可用于后续实验。



A、C:PC9细胞;B、D:PC9/ER细胞;A、B:×100;C、D:×400

图1　光学显微镜下观察PC9细胞及PC9/ER细胞形态



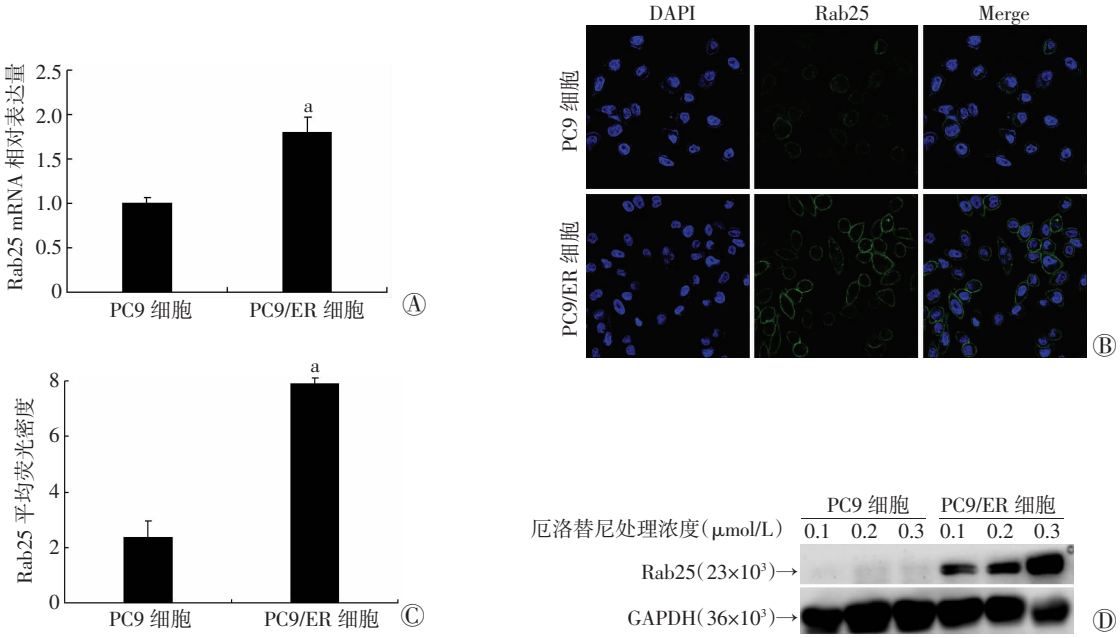
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与PC9细胞比较

图2　厄洛替尼处理PC9及PC9/ER细胞48 h后的生存分数

2.2　Rab25在PC9及PC9/ER中的差异表达

由于检测厄洛替尼对PC9细胞的 IC_{50} 均值为0.12 μmol/L,故我们以同等浓度厄洛替尼(0.1 μmol/L)处理PC9及PC9/ER细胞,观察Rab25的表达差异。qPCR检测mRNA表达结果可见:处理48 h后,Rab25的mRNA表达在PC9/ER细胞中明显高于PC9细胞($P<0.05$,图3A)。激光共聚焦显微镜观察显示:Rab25绿色荧光主要分布在细胞膜(图3B),而且其荧光强度在PC9/ER细胞中明显高于PC9细胞($P<0.01$,图3C)。

为进一步观察Rab25的表达与厄洛替尼浓度的剂量关系,以不同浓度厄洛替尼(0.1、0.2、0.3 μmol/L)处理PC9及PC9/ER细胞。48 h后Western blot结果可观察到相同厄洛替尼浓度处理下PC9/ER细胞Rab25蛋白表达较PC9细胞高;而且随厄洛替尼浓度递增,Rab25在PC9/ER细胞中表达呈正相关变化,而PC9中的Rab25表达无明显变化(图3D)。

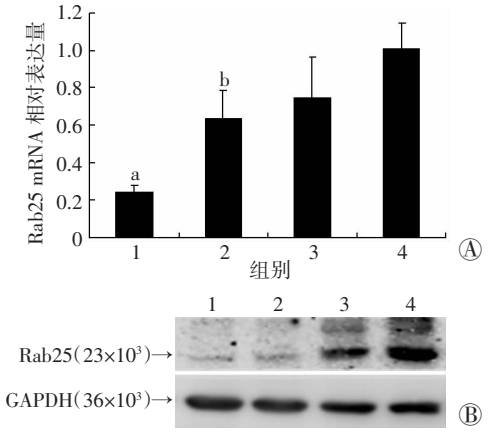


A:qPCR 检测 0.1 μmol/L 厄洛替尼处理后 PC9 及 PC9/ER 细胞中 Rab25 的 mRNA 表达 a:$P<0.05$,与 PC9 细胞比较;B:激光共聚焦显微镜下观察 PC9 及 PC9/ER 细胞中 Rab25 的蛋白定位(×400);C:0.1 μmol/L 厄洛替尼处理后 PC9 及 PC9/ER 细胞中 Rab25 的蛋白表达 a:$P<0.05$,与 PC9 细胞比较;D:Western blot 检测不同浓度厄洛替尼处理细胞后 Rab25 蛋白的表达

图 3 Rab25 在 PC9 及 PC9/ER 细胞中的差异表达

2.3 Rab25 在 PC9/ER 细胞中的敲减效率

为筛选高效率的 Rab25 敲减工具,qPCR 检测各组转染 PC9/ER 细胞 24 h 后发现:与阴性对照组比较,3 个敲减组(siRab25-1、siRab25-2、siRab25-3)转染后,Rab25 的 mRNA 相对表达量均有不同程度下降,其中 siRab25-1 组敲减效率更强($P<0.01$,图 4A)。Western blot 结果显示:siRab25-1 能在蛋白水平能较好地敲低 Rab25 的表达(图 4B)。故后续实验均选取 siRab25-1 作为基因敲减工具。

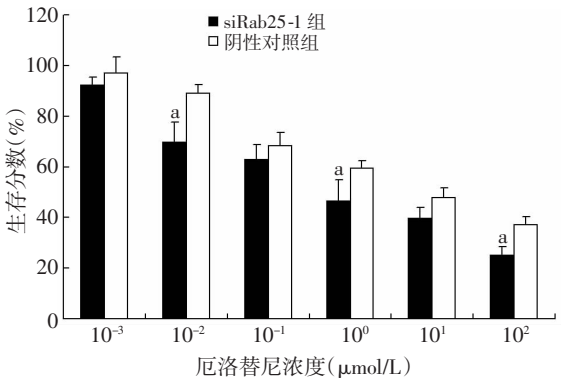


A:qPCR 检测基因水平敲减 a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与阴性对照组比较;B:Western blot 检测蛋白水平敲减 1~4 分别为 siRab25-1 组、siRab25-2 组、siRab25-3 组、阴性对照组

图 4 筛选并检测 Rab25 敲减效率

2.4 敲低 Rab25 可改善 PC9/ER 细胞对厄洛替尼耐药

采用 CCK-8 法检测药物毒性,结果显示:Rab25 敲减组(siRab25-1)、阴性对照组细胞生存分数随着厄洛替尼加药浓度的增加均有不同程度的下降(图 5)。计算 Rab25 敲减组 IC_{50} 值远小于阴性对照组[(0.59±0.33) *vs* (6.14±0.92) μmol/L,$P<0.05$],提示在 PC9/ER 细胞中敲减 Rab25 能部分改善其对厄洛替尼的耐药。



a:$P<0.05$,与阴性对照组比较

图 5 厄洛替尼处理 48 h 后各组细胞的生存分数

为检测各转染组细胞在厄洛替尼处理后增殖指数(PI)的差异,在各组转染时同时加入厄洛替尼 6 μmol/L 处理 48 h,根据流式细胞仪读取细胞周期数据计算 PI

(表 1)。结果显示:Rab25 敲减组 PI 明显低于阴性对照组($P<0.05$)。

表 1 厄洛替尼处理后各组 PC9/ER 细胞的细胞周期及增殖指数($n=3,\bar{x}\pm s$)

组别	G_1(%)	G_2(%)	S(%)	PI
阴性对照组	52.71±3.11	11.18±2.87	36.11±2.49	0.89±0.06
siRab25-1 组	65.32±2.41	8.40±3.75	26.28±2.82	0.53±0.10[a]

a:$P<0.05$,与阴性对照组比较

3 讨论

2004 年 6 月哈佛学者提出,EGFR 酪氨酸激酶编码区的基因突变是应用 EGFR-TKI 治疗 NSCLC 的前提[9],肺癌的靶向治疗越来越依赖于病人基因型的个体化。EGFR-TKIs 通过与 ATP 竞争性结合在 EGFR 胞内段激酶区,抑制其与 ATP 的相互作用,继而抑制 EGFR 的酪氨酸磷酸化及下游信号通路的激活,从而发挥抑制肿瘤作用。但究竟是何种机制导致的多数患者产生耐药仍不完全清楚,目前发现的继发性耐药机制有 T790M 点突变、MET 基因扩增、IGF-1 旁路激活、上皮间质转化等,但仍有约 30% 的患者发生获得性耐药的原因不明[10]。

Rab25 属于 Ras 超家族 GTPase,仅分布在上皮细胞,主要功能有细胞间信息传递、胞膜再循环、小 GTPase 介导的信号转导等[5]。有研究表明 Rab25 还能通过调控整合素(integrin)来控制肠细胞的极性[11],而其异常表达被证实与直肠癌、卵巢癌的增殖、转移等相关[6,12]。本研究观察到 PC9/ER 细胞与亲本 PC9 细胞形态差异大,机制、原因尚不清楚,这是否与 Rab25 表达差异有关联还需要进一步实验证实。

课题组前期基因芯片比对结果发现 Rab25 在肺腺癌干细胞中的表达比普通肺腺癌细胞上调 18.1 倍[13],总结临床病理资料时也发现 Rab25 在 NSCLC 中高表达,而且分期越晚表达越高[14],说明 Rab25 在肺癌中也是促癌因子。最新研究发现:在 EGFR 野生型的肺癌细胞株中,EGFR 内吞作用的状态是吉非替尼治疗敏感性的靶标[15],而 Rab25 的表达在 EGFR 内吞作用中发挥着促进作用,提示 Rab25 可能与 EGFR 野生型肺癌吉非替尼原发性耐药相关。为研究 Rab25 在 EGFR 敏感型的肺癌细胞株中是否也参与 EGFR-TKIs 的获得性耐药,我们设计并实施了本研究。

本研究选取了 EGFR 敏感型的肺腺癌细胞株 PC9,并在前期的实验中诱导出了其厄洛替尼获得性耐药株细胞模型(PC9/ER)。在利用 CCK-8 法验证耐药细胞株后,我们在 RNA 及蛋白水平检测了相同条件下 Rab25 在两者之间的表达差异,发现 PC9 细胞发生获得性耐药后 Rab25 在 mRNA 和蛋白表达上均不同程度升高。为了证实 Rab25 在 PC9 细胞发生厄洛替尼获得性耐药中发挥了作用,我们利用 siRNA 技术敲减其在 PC9/ER 细胞株中的表达,CCK-8 法检测和流式细胞周期检测结果明确 Rab25 的敲减能使耐药的 PC9/ER 细胞株部分改善药物耐药性,进一步证实 Rab25 在 PC9 细胞发生厄洛替尼获得性耐药中发挥了促进作用。

有报道在膀胱癌 T24 和 EJ 细胞中过表达 Rab25 能够激活 Akt 通路,促进其上皮间质转化[16],而发生上皮间质转化的 NSCLC 被认为是引起厄洛替尼敏感性下降的重要原因[17-18];也有报道称 Rab25 在上皮性卵巢癌中通过激活 PI3K/Akt 通路调控了顺铂的耐药[19]。后续我们将应用基因芯片比对 PC9/ER 及亲本 PC9 细胞,发现差异表达的信号通路蛋白;利用慢病毒包裹 siRab25 稳定转染 PC9/ER 细胞检测通路改变情况;并在动物实验中阐明 Rab25 与厄洛替尼获得性耐药的关系。

参考文献:

[1] Provencio M, Isla D, Sanchez A, *et al*. Inoperable stage Ⅲ non-small cell lung cancer: Current treatment and role of vinorelbine[J]. J Thorac Dis, 2011, 3(3): 197-204. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2011.01.02

[2] Wang T, Nelson R A, Bogardus A, *et al*. Five-year lung cancer survival: which advanced stage nonsmall cell lung cancer patients attain long-term survival? [J]. Cancer, 2010, 116(6): 1518-1525. DOI: 10.1002/cncr.24871

[3] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, *et al*. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(3): 239-246. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70393-X

[4] Paez J G, Janne P A, Lee J C, *et al*. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science, 2004, 304(5676): 1497-1500. DOI: 10.1126/science.1099314

[5] Welz T, Wellbourne-Wood J, Kerkhoff E. Orchestration of cell surface proteins by Rab11[J]. Trends Cell Biol, 2014, 24(7): 407-415. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.02.004

[6] Mitra S, Cheng K W, Mills G B. Rab25 in cancer: a brief update[J]. Biochem Soc Trans, 2012, 40(6): 1404-

1408. DOI: 10.1042/BST20120249

[7] Penzvalto Z, Tegze B, Szasz A M, *et al*. Identifying resistance mechanisms against five tyrosine kinase inhibitors targeting the ERBB/RAS pathway in 45 cancer cell lines[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59503. DOI: 10.1371/journal.pone.0059503

[8] 江飞龙, 韩静, 朱海振, 等. 人肺腺癌厄洛替尼耐药细胞PC9/ER的建立及奥曲肽改善耐药机制研究[J]. 中华肺部疾病杂志: 电子版, 2015, 8(2): 149-153. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2015.02.003

[9] Lynch T J, Bell D W, Sordella R, *et al*. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. N Engl J Med, 2004, 350(21): 2129-2139. DOI: 10.1056/NEJMoa040938

[10] Lin Y, Wang X, Jin H. EGFR-TKI resistance in NSCLC patients: mechanisms and strategies[J]. Am J Cancer Res, 2014, 4(5): 411-435.

[11] Krishnan M, Lapierre L A, Knowles B C, *et al*. Rab25 regulates integrin expression in polarized colonic epithelial cells[J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(6): 818-831. DOI: 10.1091/mbc.E12-10-0745

[12] Cao C, Lu C, Xu J, *et al*. Expression of Rab25 correlates with the invasion and metastasis of gastric cancer[J]. Chin J Cancer Res, 2013, 25(2): 192-199. DOI: 10.3978/j.issn.1000-9604.2013.03.01

[13] 罗福康, 赵振国, 赵伟鹏, 等. 基因表达谱芯片分析人肺腺癌干细胞与肺正常干细胞的差异基因表达[J]. 中国输血杂志, 2009, 22(4): 269-274.

[14] 周璞, 刁鑫伟, 汤金梁, 等. Rab25蛋白在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 解放军医学杂志, 2014, 39(2): 157-160. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2014.02.16

[15] Jo U, Park K H, Whang Y M, *et al*. EGFR endocytosis is a novel therapeutic target in lung cancer with wild-type EGFR[J]. Oncotarget, 2014, 5(5): 1265-1278.

[16] Zhang J, Wei J, Lu J, *et al*. Overexpression of Rab25 contributes to metastasis of bladder cancer through induction of epithelial-mesenchymal transition and activation of Akt/GSK-3beta/Snail signaling[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(10): 2401-2408. DOI: 10.1093/carcin/bgt187

[17] Thomson S, Buck E, Petti F, *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(20): 9455-9462. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1058

[18] Yauch R L, Januario T, Eberhard D A, *et al*. Epithelial versus mesenchymal phenotype determines *in vitro* sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(24 Pt 1): 8686-8698. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1492

[19] Fan Y, Wang L, Han X, *et al*. Rab25 is responsible for phosphoinositide 3-kinase/AKT-mediated cisplatin resistance in human epithelial ovarian cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(3): 2173-2178. DOI: 10.3892/mmr.2014.2963

(**收稿**:2015-10-26;**修回**:2015-11-18)

(编辑 汪勤俭)