DOI:10.16016/j.2097-0927.202209006

# Mdm2 过表达诱导 ALK 阳性非小细胞肺癌克唑替尼耐药的实验研究

刘嘉欣,李姗姗,王 栋,吕镗烽,印 洁,宋 勇,叶明翔 210002 南京,东部战区总医院呼吸与危重症医学科

[摘要] **目的** 探究 Mdm2 过表达在间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)突变的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)H3122 细胞中对克唑替尼敏感性的影响。**方法** 通过转染 Mdm2 质粒构建过表达 Mdm2 蛋白的 H3122 Mdm2 过表达组细胞,对照组转染空载体构建 H3122 空载组细胞,给予不同浓度克唑替尼处理后进行 MTT、平板克隆、TUNEL 染色等实验评估 Mdm2 表达状态对 ALK 靶向药物克唑替尼敏感性的影响。通过 Western blot 实验探究过表达 Mdm2 后对 ALK 及其下游信号通路转导以及上皮间质转化过程(epithelial mesenchymal transition, EMT)标记物的影响。**结果** 与 H3122 空载组细胞相比,H3122 Mdm2 过表达组细胞出现克唑替尼耐药表型,对药物诱导的细胞凋亡耐受,且过表达 Mdm2 并不能维持 ALK 及其下游分子的磷酸化水平。过表达 Mdm2 后,细胞发生 EMT,获得间质细胞特征。**结论** 过表达 Mdm2 可能通过诱导 EMT 过程导致 H3122 细胞对克唑替尼耐药。

[关键词] ALK 靶向治疗;克唑替尼;耐药;Mdm2;EMT
[中图法分类号] R394.6; R734.2; R915 [文献标志码] A

# Overexpression of Mdm2 induces crizotinib resistance in targeted therapy for ALK-positive NSCLC

LIU Jiaxin, LI Shanshan, WANG Dong, LYU Tangfeng, YIN Jie, SONG Yong, YE Mingxiang Department of Respiratory and Critical Care Medicine, General Hospital of Eastern Theater Command, Nanjing, Jiangsu Province, 210002, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of overexpression of murine double minute 2 (Mdm2) on the sensitivity to crizotinib in the anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line H3122. **Methods** H3122 cells with Mdm2 overexpression were established by transfection of plasmid encoding Mdm2, and the H3122 cells transfected with empty vector (EV) served as control cells. After the Mdm2 overexpression cells and control cells were treated with different concentrations of crizotinib, an ALK inhibitor, MTT assay, colony formation assay and TUNEL assay were applied to evaluate the sensitivity to crizotinib. Western blotting was used to detect the expression of ALK, its downstream proteins and biomarkers in epithelial mesenchymal transition (EMT). **Results** Compared with the control cells, the H3122 cells with Mdm2 overexpression were resistant to crizotinib treatment, and were tolerant to crizotinib-induced apoptosis. Biochemical analysis of signaling transduction suggested that overexpression of Mdm2 failed to restore the phosphorylation of ALK and downstream molecules. Overexpression of Mdm2 also resulted in EMT and acquisition of mesenchymal phenotype in H3122 cells. **Conclusion** Overexpression of Mdm2 leads to resistance to crizotinib in H3122 cells probably through the induction of EMT process.

[**Key words**] ALK targeted therapy; crizotinib; resistance; murine double minute 2; epithelial mesenchymal transition

Supported by the Post-Doctoral Scientific Research Foundation of China (2020M670093ZX). Corresponding author: YE Mingxiang, E-mail: mingxiangye@gmail.com.

[基金项目] 中国博士后科学基金项目(2020M670093ZX)
[通信作者] 叶明翔,E-mail:mingxiangye@gmail.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议( )

2007年日本科学家Hiroyuki Mano从1例晚期肺腺癌患者肿瘤组织中克隆出EML4-ALK融合基因,该融合基因包含了间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase,ALK)结构域,可持续激活PI3K/Akt信号通路,具有使细胞恶变的能力[1]。除了EML4-ALK,从肺癌组织中还鉴定出KIF5B-ALK、TFG-ALK、NPM3-ALK等融合形式,但不论是何种融合类型,这些肺癌组织都高表达ALK且ALK蛋白发生自动磷酸化(auto-phosphorylation),使用特异性抗体可检出ALK融合蛋白[2-3]。3%~5%非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)发生ALK基因融合,称为ALK阳性NSCLC,这部分患者对ALK靶向治疗药物(例如克唑替尼,阿来替尼,布加替尼等)敏感。研究表明克唑替尼(Crizotinib)一线治疗ALK阳性NSCLC的有效率达74%,显著优于含铂两药方案静脉化疗(45%),疾病无进展期(progression-free survival,PFS)明显延长(10.9个月 *vs.* 7.0个月),克唑替尼组患者1年生存率高达84%[4]。因此ALK靶向药物推荐用于ALK阳性NSCLC标准一线治疗。

不幸的是大部分ALK阳性NSCLC患者在克唑替尼靶向治疗10个月后产生获得性耐药(acquired resistance),相关耐药机制包括ALK激酶结构域点突变(C1156Y,L1196M),ALK扩增,EGFR和c-kit旁路活化等[5-6],前者可以通过升级ALK靶向药物(色瑞替尼,阿来替尼,劳拉替尼)进而克服耐药,联合EGFR和c-kit靶向药物则可逆转旁路途径引起的耐药。然而,仍有30%患者耐药机制尚未明确,这些患者缺少有效的治疗方案,生活质量迅速恶化,预后较差。故探究未知的ALK靶向耐药机制一直是基础研究和临床实践的热点和难点。

鼠双微体基因2(murine double minute 2,Mdm2)定位于12q13-14,编码分子量90kD的Mdm2蛋白。Mdm2蛋白主要在胞浆和细胞核内表达,通过降解p53等细胞周期蛋白促进细胞增殖[7]。骨肉瘤、软组织肉瘤、卵巢癌、淋巴瘤、胃癌、NSCLC等实体瘤中通常可以检出Mdm2高表达,并且Mdm2表达水平和肿瘤侵袭转移能力正相关,Mdm2高表达的肿瘤患者生存期短,提示Mdm2是驱动肿瘤细胞恶性表型的重要因子,目前亦开发出处于临床研究阶段的Mdm2抑制剂Nutlin-3,与化疗联合用于治疗晚期恶性肿瘤患者[8-9]。然而Mdm2对ALK靶向治疗敏感性的调控作用仍不甚清楚,Mdm2过表达能否导致耐药表型亟待明确。因此,本研究拟使用MTT、平板克隆、TUNEL染色等多种实验方法,探究Mdm2过表达在H3122细胞中对ALK靶向治疗敏感性的影响,采用Western blot实验初步探究其导致耐药的分子机制,以期为ALK靶向治疗耐药后药物的研发提供新的靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

RPMI 1640、胎牛血清购自Gibco公司,Lipofectamine 3000转染试剂购自Invitrogen公司,克唑替尼购自Selleck公司,MTT、DMSO购自Sigma公司,吉姆萨染液购自碧云天公司,TUNEL试剂盒购自诺唯赞公司,p-ALK、ALK、p-Akt、Akt、pErk、Erk、E-cadherin、Vimentin、Snail、Slug抗体购自Cell Signaling Technology公司,Mdm2抗体购自Santa Cruz公司,GAPDH抗体购自Proteintech公司。

### 1.2 细胞培养和转染

ALK阳性NSCLC H3122细胞由麻省总医院胸部肿瘤中心Jeffrey Engelman教授惠赠,用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基置于37℃、5% $CO_2$培养箱中常规培养。

转染前1天,将H3122细胞接种到6 cm培养皿中,次日使用Lipofectamine 3000转染空载体(empty vector,EV)或Mdm2过表达质粒,转染48 h后用于功能学实验。

### 1.3 MTT实验

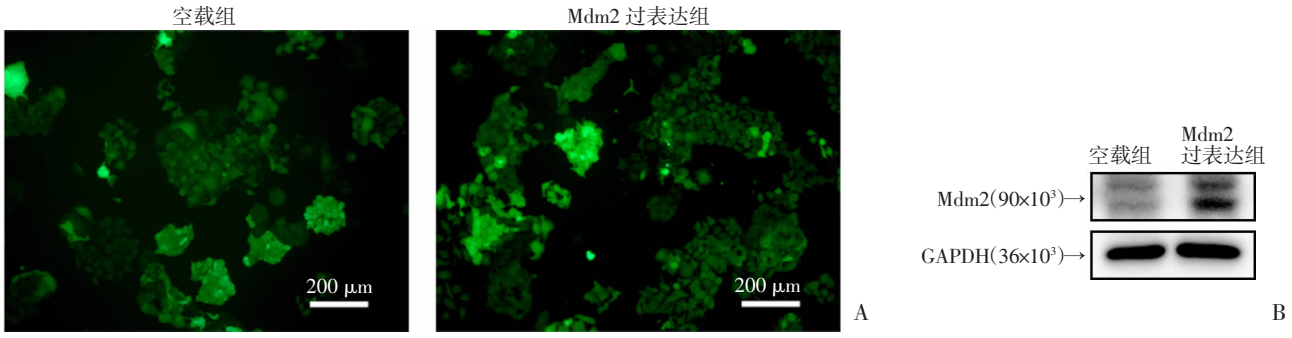
转染后,将空载或Mdm2过表达的H3122细胞以3 000/孔密度接种到96孔板中,次日加入梯度克唑替尼(0、1、10、100、1 000 nmol/L),继续培养48 h。培养结束后向各孔加入5 mg/mL MTT溶液,孵育4 h后吸弃上清,DMSO溶解甲瓒结晶,酶标仪读取各孔490 nm处吸光度值[$D(490)$]。

### 1.4 平板克隆实验

转染后,将空载或Mdm2过表达的H3122细胞以1 000/孔密度接种到3.5 cm培养皿中,次日待细胞贴壁后加入终浓度为20 nmol/L克唑替尼,每3天换液一次,置于37 ℃、5% $CO_2$培养箱中培养。培养约2周有肉眼可见细胞克隆时停止培养,甲醇—冰醋酸固定细胞克隆,1%吉姆萨染液对细胞克隆进行染色。

### 1.5 TUNEL细胞凋亡检测

常规制备细胞爬片,4%多聚甲醛室温固定30 min,Proteinase K溶液室温孵育5 min,每个样本滴加100 μL 1×Equilibration Buffer室温孵育30 min,50 μL TdT孵育缓冲液室温孵育1 h,PBS漂洗后DAPI室温染色5 min。在荧光显微镜下分析各组细胞爬片,620 nm波长下检测Alexa Fluor 640红色荧光,460 nm波长下检测DAPI蓝色荧光。




A:荧光显微镜下检测质粒转染效率;B:Western blot 检测转染后 Mdm2 蛋白表达情况

**图 1 H3122 细胞转染 pEGFP-N3-EV 或 pEGFP-N3-Mdm2 质粒后 Mdm2 表达验证**

### 1.6 Western blot 实验

细胞经过药物处理后使用 RIPA 裂解液冰上裂解,BCA 法检测细胞蛋白样品浓度,SDS-PAGE 凝胶电泳后湿法转膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。一抗 4 ℃冰箱过夜孵育后 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h,TBST 漂洗后进行 ECL 化学发光显像。

### 1.7 统计学分析

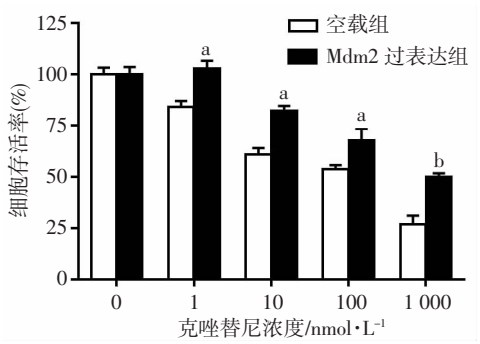
每组实验至少重复 3 次,结果采用 SPSS 25.0 进行统计分析,GraphPad Prism 8.0 绘制统计图。两组比较采用 Student's $t$ 检验,以 $P<0.05$ 视为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 过表达 Mdm2 诱导 H3122 细胞克唑替尼耐药

H3122 细胞为 EML4-ALK 阳性 NSCLC,该细胞对 ALK 靶向治疗敏感,故本研究主要在 H3122 细胞中评估 Mdm2 表达状态与克唑替尼敏感性的关系。在 pEGFP-N3 表达载体中插入 Mdm2 cDNA 序列,构建了 Mdm2 表达载体,该载体在 N 端有 EGFP 序列,可在荧光显微镜下观察目的基因表达情况。H3122 细胞转染 pEGFP-N3-Mdm2 编码质粒或 pEGFP-N3 空载体(EV)质粒后,荧光显微镜下可见明亮的绿色荧光,提示质粒转染成功(图 1A),将空载组或 Mdm2 过表达组的细胞提取蛋白后,经 Western blot 验证,发现 Mdm2 过表达组 H3122 细胞 Mdm2 蛋白表达量明显增加,说明转染质粒在细胞内表达(图 1B)。

通过 MTT 实验评估 Mdm2 表达状态对克唑替尼敏感性的影响。结果显示:克唑替尼能有效抑制 H3122 空载组细胞增殖,药物处理 48 h 估算 $IC_{50}$ 值约 189.5 nmol/L;相反,H3122 Mdm2 过表达组细胞对克唑替尼处理不敏感,细胞可以在低浓度克唑替尼条件下继续增殖,估算克唑替尼 $IC_{50}$ 值约 674.3 nmol/L。加入不同浓度的克唑替尼后,Mdm2 过表达组的细胞存活率均高于空载组细胞,差异均具有统计学意义($P<0.05$,图 2)。因此,过表达 Mdm2 可以诱导 H3122 细胞对克唑替尼的耐药性。




a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空载组比较

**图 2 MTT 实验测定克唑替尼对 H3122 空载组细胞和 H3122 Mdm2 过表达组细胞的抑制作用** ($n=5,\bar{x}\pm s$)

### 2.2 Mdm2 促进 H3122 细胞克隆性增殖

MTT 实验仅能反应药物对肿瘤细胞的短期杀伤作用,为了评估 Mdm2 诱导克唑替尼耐药性的作用是否持久稳定,将 H3122 空载组细胞和 H3122 Mdm2 过表达组细胞接种培养皿后在低浓度克唑替尼(20 nmol/L)刺激下长时间培养,进行平板克隆实验。本研究发现 DMSO 溶剂组 H3122 空载组细胞和 H3122 Mdm2 过表达组细胞均出现克隆性增殖,培养皿中可见大量细胞克隆(图 3);经克唑替尼处理后 H3122 空载组细胞的增殖被显著抑制,培养皿中很少形成细胞克隆,而 H3122 Mdm2 过表达组细胞在克唑替尼存在条件下仍能继续生长,培养 2 周后仍有较多细胞克隆形成,说明 Mdm2 过表达可以稳定持久地诱导 H3122 细胞 ALK 靶向治疗耐药表型。

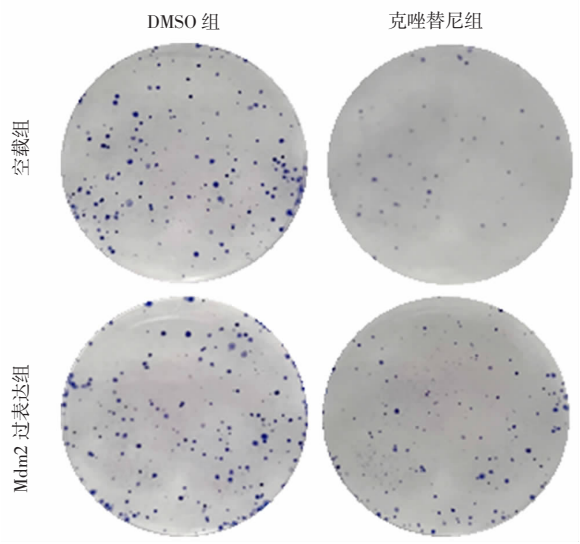



**图 3　平板克隆实验评估 Mdm2 过表达对 H3122 细胞克隆生长的影响**

### 2.3　过表达 Mdm2 导致 H3122 细胞凋亡抵抗

本研究探究了 Mdm2 诱导的 H3122 细胞克唑替尼耐药是否与凋亡减少有关。细胞凋亡过程通常伴随 DNA 断裂,使用荧光素标记的 dUTP 在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)催化下可连接到凋亡细胞断裂 DNA 的 3'-OH 末端,原位显示发生凋亡的细胞。本研究发现溶剂 DMSO 处理组 H3122 空载组和 H3122 Mdm2 过表达组细胞几乎不发生凋亡,视野下几乎看不到提示凋亡的红色荧光(图 4);1 μmol/L 克唑替尼处理 6 h 后 H3122 空载组细胞视野下可见大片红色荧光,说明克唑替尼诱导了细胞凋亡,而 H3122 Mdm2 过表达组细胞经克唑替尼处理后并未发生凋亡。故过表达 Mdm2 可以导致 H3122 细胞对克唑替尼耐受,并且对抗克唑替尼诱导的细胞凋亡。

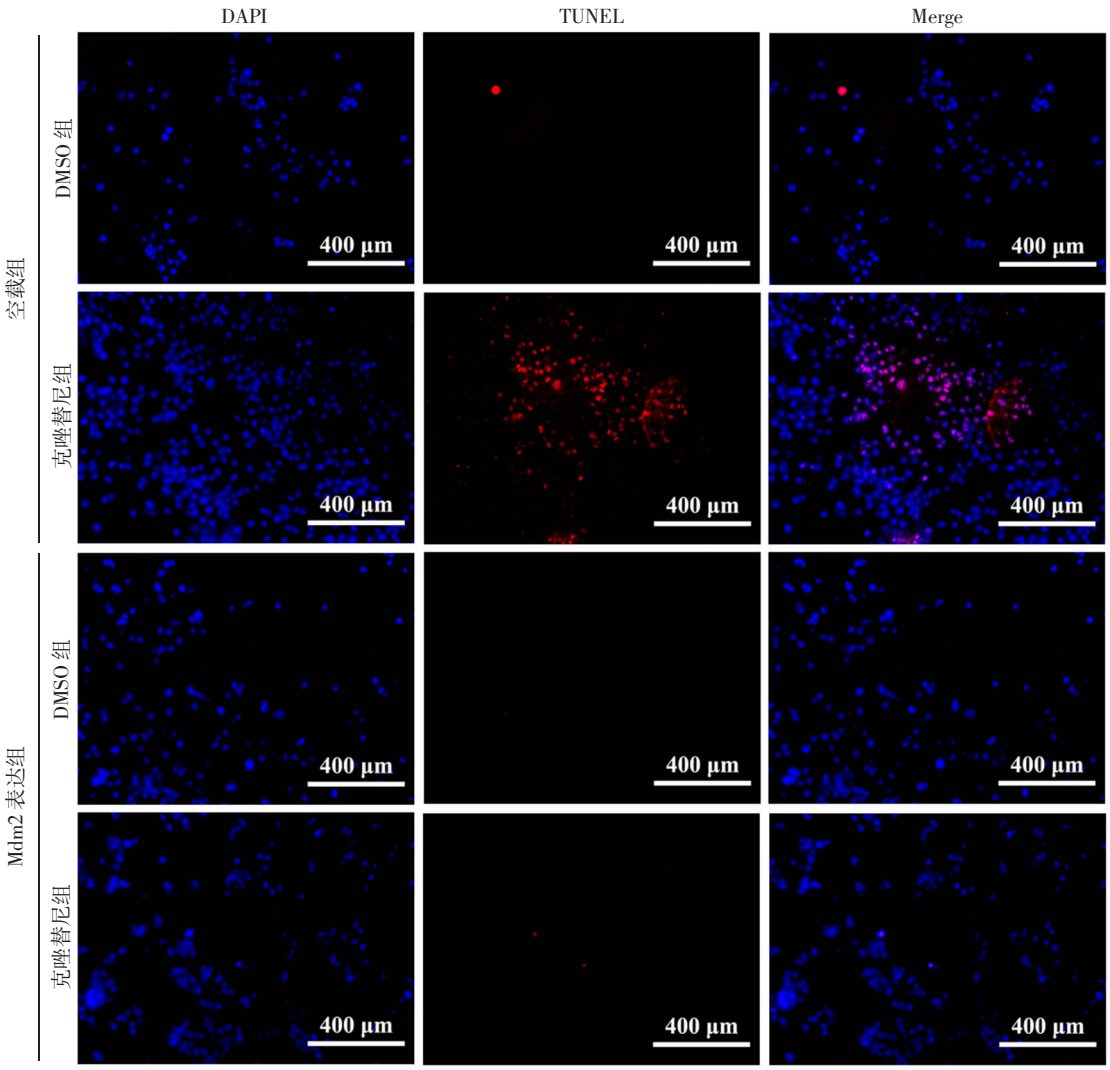



**图 4　TUNEL 染色实验检测克唑替尼诱导 H3122 空载组细胞和 H3122 Mdm2 过表达组细胞凋亡情况**

### 2.4 过表达 Mdm2 诱导 H3122 细胞克唑替尼耐药的机制探究

上述结果证实过表达 Mdm2 可以诱导 ALK 靶向治疗耐药,那么导致耐药的具体机制如何? 本研究首先探究了过表达 Mdm2 是否对 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号活化状态造成影响。本研究发现克唑替尼可以有效抑制对照组 H3122 空载细胞 ALK 磷酸化,随着 pALK 表达量减少,PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路也被阻断,Akt 和 Erk 磷酸化水平被完全抑制(图 5A);Mdm2 过表达后 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号仍然能被克唑替尼抑制,如图 5A 所示,克唑替尼能够完全抑制 H3122 Mdm2 过表达组细胞 ALK、Akt 和 Erk 磷酸化水平,说明 Mdm2 并不是通过激活 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号导致 H3122 细胞对克唑替尼耐药。

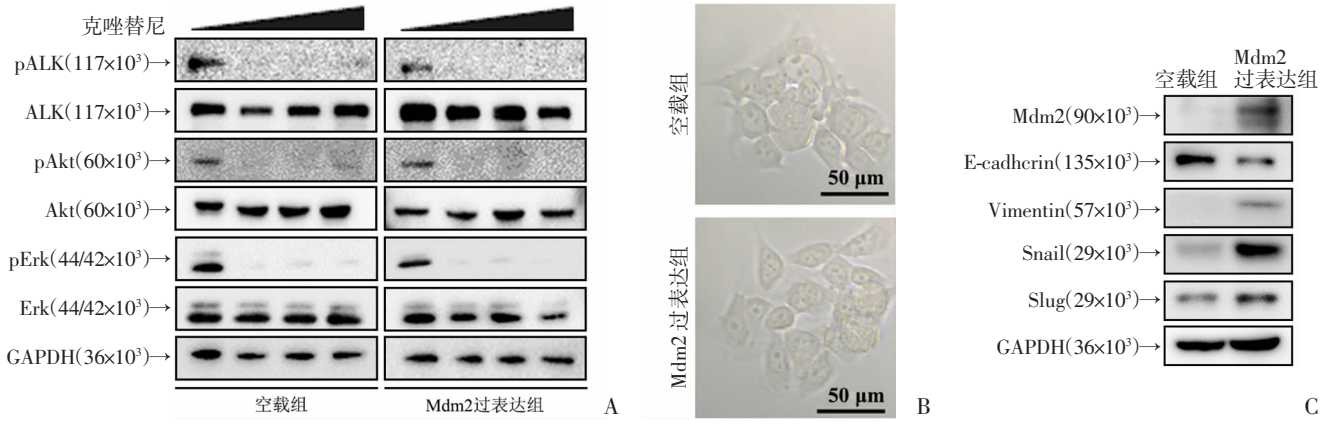
本研究发现过表达 Mdm2 后 H3122 细胞形态上出现改变:H3122 空载组细胞大多呈圆形,细胞间缝隙小,细胞黏附力强,细胞聚集成团、成片生长;H3122 Mdm2 过表达组细胞形态上呈扁圆形或梭形,细胞表面有伪足突起样结构,细胞间粘附不再紧密,细胞间有缝隙(图 5B)。上述形态学特征让我们联想到与肿瘤侵袭转移密切相关的上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition,EMT)。

因此,通过 Western blot 检测了 H3122 空载组细胞和 H3122 Mdm2 过表达组细胞 EMT 标记物的表达情况,发现 H3122 空载组细胞主要表达上皮细胞标记物 E-钙粘素(E-cadherin),而转录因子 Snail 和 Slug 处于低表达状态,H3122 Mdm2 过表达组细胞主要表达间质细胞标记物波形蛋白(Vimentin),Snail 和 Slug 表达量明显增加(图 5C)。因此,过表达 Mdm2 可以诱导 H3122 细胞 EMT 过程的产生,后者可能促进克唑替尼耐药和凋亡抵抗。

## 3 讨论

越来越多的 ALK 阳性 NSCLC 患者从靶向治疗中获益,患者的生活质量和生存时间得到了极大提高,且随着二代和三代 ALK 靶向药物的问世,患者的获益得到进一步提高,实现长时间带瘤生存已成为现实[10-11]。但是 ALK 靶向治疗的获得性耐药不可避免,耐药机制尚未完全解析。本研究发现 Mdm2 过表达可以诱导 H3122 细胞克唑替尼耐药表型,并且 H3122 Mdm2 过表达组细胞抵抗克唑替尼诱导的凋亡,过表达 Mdm2 后细胞发生 EMT,因此认为 Mdm2 有可能通过改变细胞上皮细胞表型促进克唑替尼耐药。

既往对 Mdm2 的研究主要关注它在细胞周期调控方面的作用:Mdm2 通过降解 p53,减少 p21、$p16^{INK4a}$、$p14^{ARF}$ 等下游细胞周期相关蛋白的表达,增加细胞周期蛋白 cyclin E 活性,最终加速细胞周期转化,促进细胞分裂[12]。真实世界研究中 *Mdm2* 基因扩增在 NSCLC 发生率约 21%,与年龄、性别、疾病分期和组织学分级等临床病理特征无明确相关性,*Mdm2* 扩增组患者中位无进展生存期(progression-free survival,PFS)3 个月,中位总生存期(overall survival,OS)9 个月,而非扩增组中位 PFS 长达 31 个月,中位 OS 33 个月,说明 Mdm2 表达水平越高,患者预后越差[13]。体外研究




A:H3122 空载组细胞和 H3122 Mdm2 过表达组细胞经梯度克唑替尼(0、200、500、1 000 nmol/L)处理 6 h,Western blot 检测 ALK 及下游信号通路;B:H3122 空载组细胞和 H3122 Mdm2 过表达组细胞形态学特点;C:Western blot 检测 H3122 空载组细胞和 H3122 Mdm2 过表达组细胞 EMT 标记物和转录因子表达情况

**图 5 Mdm2 过表达后下游信号通路及 EMT 的检测**

还发现 Mdm2 高表达影响肿瘤细胞对烷化剂、拓扑异构酶抑制剂等化疗药物的敏感性,可能机制为 Mdm2 与胞内 Topo Ⅱ相结合下调其含量,使肿瘤细胞对化疗药敏感性下降,使用 RNAi 降低胞内 Mdm2 表达可稳定 Topo Ⅱ表达,缓解化疗药物耐受[14]。上述结果均提示 Mdm2 参与了肿瘤细胞分裂、增殖、耐药等恶性生物学过程,因此靶向 Mdm2 可能作为肿瘤治疗的新思路。目前在研的 Mdm2 抑制剂有 Nutlin-3、RG7112、MI-77301、MI-888 等,这些小分子抑制剂阻断 Mdm2-p53 相互作用从而阻滞细胞周期,诱导细胞凋亡,在肿瘤动物模型中甚至实现了肿瘤的完全消退,在人体内初步药代动力学和药理活性研究亦显示较好的抗肿瘤活性,主要不良反应包括中性粒细胞减少和腹泻,后续可能通过优化药物剂量来缓解[15-16]。本研究重点关注了 Mdm2 表达状态与 ALK 靶向治疗敏感性之间的联系,发现 Mdm2 过表达可导致 H3122 细胞克唑替尼耐药,这与目前已知的 ALK 靶向治疗耐药机制不尽相同:①Mdm2 不直接引起 ALK 磷酸化和 ALK 总蛋白表达水平变化,且 H3122 Mdm2 过表达组细胞的 ALK 磷酸化水平能够有效地被克唑替尼抑制,说明 Mdm2 并不通过影响 ALK 信号通路诱导耐药;②Mdm2 没有激酶活性,不能够像 EGFR、c-kit 等激酶那样旁路激活下游 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路,在 Western blot 实验中也发现 Mdm2 过表达不能维持 Akt 和 Erk 磷酸化。因此,Mdm2 过表达是诱导克唑替尼耐药的新机制。

因此,本研究对 Mdm2 诱导的耐药机制进行了初步探究,特别是 H3122 Mdm2 过表达组细胞在形态学上的改变引起了我们的注意,通过形态学对比和 Western blot,本研究认为 Mdm2 过表达的 Crizotinib 耐药细胞发生了 EMT。EMT 不仅是细胞形态学上的改变,还伴有细胞骨架重塑、细胞运动能力增强、细胞极性改变等,细胞发生 EMT 后细胞间粘附减弱,细胞运动能力增强,且表现出肿瘤干细胞特征,对抗肿瘤治疗敏感性下降。而在分子水平,其发生过程是上皮细胞标记 E-cadherin 表达减少,而间质细胞标记 Vimentin 表达增加,细胞间粘附变弱,运动能力增强,逐步浸润周围组织,并导致远处转移。在这个过程中 Snail、Slug 等转录因子活性增强,与 E-cadherin 上游启动子结合后抑制其转录[17-18]。在研究中,H3122 Mdm2 过表达组细胞 Snail 和 Slug 等调控 EMT 的转录因子表达水平增加,使 E-cadherin 转录受到抑制,细胞获得间质表型,进而对克唑替尼敏感性下降,出现凋亡抵抗,最终导致克唑替尼耐药。因此,在靶向治疗前评估 Mdm2 表达水平有可能预测患者靶向治疗效果。

综上所述,本研究发现 Mdm2 过表达有可能通过诱导细胞 EMT 促进克唑替尼耐药,这种全新的耐药机制提示临床上通过可以检测基线状态下 Mdm2 表达水平预测患者后续出现耐药的风险,联合 Mdm2 抑制剂有可能逆转 ALK 靶向治疗耐药。

**参考文献:**


[1] SODA M, CHOIY L, ENOMOTO M, *et al*. Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small-cell lung cancer[J]. Nature, 2007, 448(7153): 561-566. DOI: 10.1038/nature05945.

[2] TAKEUCHI K, CHOIY L, TOGASHI Y, *et al*. $KIF_5B$-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(9): 3143-3149. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3248.

[3] SASAKI T, RODIGS J, CHIRIEAC L R, *et al*. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(10): 1773-1780. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.04.002.

[4] SOLOMONB J, MOK T, KIM D W, *et al*. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer[J]. N Engl J Med, 2014, 371(23): 2167-2177. DOI: 10.1056/NEJMoa1408440.

[5] CHOIY L, SODA M, YAMASHITA Y, *et al*. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors[J]. N Engl J Med, 2010, 363(18): 1734-1739. DOI: 10.1056/NEJMoa1007478.

[6] SALIDO M, PIJUAN L, MARTÍNEZ-AVILÉS L, *et al*. Increased *ALK* gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(1): 21-27. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181fb7cd6.

[7] SHANGARY S, WANG S M. Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(17): 5318-5324. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5136.

[8] CHÈNE P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(2): 102-109. DOI: 10.1038/nrc991.

[9] MIYACHI M, KAKAZU N, YAGYU S, *et al*. Restoration of p53 pathway by nutlin-3 induces cell cycle arrest and apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(12): 4077-4084. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2955.

[10] PETERS S, CAMIDGE D R, SHAW A T, *et al*. Alectinib

versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2017, 377(9): 829-838. DOI: 10.1056/NEJMoa1704795.

[11] SHAWA T, BAUER T M, DE MARINIS F, *et al*. First-line lorlatinib or crizotinib in advanced ALK-positive lung cancer [J]. N Engl J Med, 2020, 383(21): 2018-2029. DOI: 10.1056/NEJMoa2027187.

[12] DEBS P. Cell cycle regulatory functions of the human oncoprotein MDM2[J]. Mol Cancer Res, 2003, 1(14): 1009-1016.

[13] DWORAKOWSKA D, JASSEM E, JASSEM J, *et al*. *MDM2* gene amplification: a new independent factor of adverse prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. Lung Cancer, 2004, 43(3): 285-295. DOI: 10.1016/j.lungcan.2003.09.010.

[14] SENTURKJ C, BOHLMAN S, MANFREDI J J. Mdm2 selectively suppresses DNA damage arising from inhibition of topoisomerase II independent of p53[J]. Oncogene, 2017, 36(44): 6085-6096. DOI: 10.1038/onc.2017.229.

[15] LAUL M S, NUGENT J K, ZHAO X, *et al*. HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-HDM2 binding and enhances p73 function[J]. Oncogene, 2008, 27(7): 997-1003. DOI: 10.1038/sj.onc.1210707.

[16] VAN MAERKEN T, FERDINANDE L, TAILDEMAN J, *et al*. Antitumor activity of the selective MDM2 antagonist nutlin-3 against chemoresistant neuroblastoma with wild-type p53[J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(22): 1562-1574. DOI: 10.1093/jnci/djp355.

[17] DONGRE A, WEINBERGR 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. DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4.

[18] YANG J, WEINBERGR A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis [J]. Dev Cell, 2008, 14(6): 818-829. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.05.009.

(**收稿**:2022-09-01;**修回**:2022-10-24)

(编辑 栾 嘉)