

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.20.003
文章编号: 1005-8982(2019)20-0015-07

慢病毒介导 FGFR1 沉默对肺癌细胞增殖和凋亡的影响

诸葛雪朋, 王保收, 朱岩, 李耀杰, 张进闯

(开封市中心医院 心胸外科, 河南 开封 475000)

摘要: 目的 探讨慢病毒介导成纤维生长因子受体 1 (FGFR1) 沉默对肺癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 构建慢病毒表达载体 LV-shFGFR1, 对其进行包装和病毒颗粒制备。将 A549 肺癌细胞分为干扰组、空载体组及对照组。采用实时荧光定量聚合酶链反应和 Western blotting 检测各组细胞 FGFR1 mRNA 和蛋白相对表达量, MTT 比色法检测细胞增殖情况, 流式细胞术和 Hoechst 染色检测细胞凋亡情况。**结果** ① 3 株肺癌细胞中, A549 细胞的 FGFR1 mRNA 相对表达量高于 H3255 和 A-427 细胞 ($P < 0.05$)。② 3 组 A549 细胞中 FGFR1 mRNA 和蛋白的相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 空载体组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 干扰组低于对照组 ($P < 0.05$)。③ 干扰组、空载体组、对照组 0、12、24、48 和 72 h 的 A549 细胞增殖情况比较, 不同时间点、各组间、随时间变化趋势均有差异 ($P < 0.05$)。④ 3 组 A549 细胞凋亡率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 空载体组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 干扰组高于对照组 ($P < 0.05$)。**结论** 慢病毒介导 FGFR1 沉默抑制 A549 肺癌细胞增殖, 同时促进肺癌细胞凋亡, 提示 FGFR1 可能参与肺癌细胞的发生、发展过程。

关键词: 肺肿瘤; 慢病毒感染; 受体, 成纤维细胞生长因子, 1 型; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Effect of lentivirus mediated FGFR1 silence on proliferation and apoptosis of lung cancer cells

Xue-peng Zhuge, Bao-shou Wang, Yan Zhu, Yao-jie Li, Jin-chuang Zhang

(Department of Cardio-Thoracic Surgery, Kaifeng Central Hospital, Kaifeng, Henan 475000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of lentivirus mediated FGFR1 silence on proliferation and apoptosis of lung cancer cells. **Methods** Lentiviral vector LV-shFGFR1 was established, packaged, and virus particle was prepared. The experiment was divided into three groups, the interference group, empty load group, and control group. FGFR1 protein and mRNA expression levels in the three groups cells were detected by using western blot and real time fluorescence quantitative technique. Cell proliferation in each group was tested by using methyl thiazolyl tetrazolium and cell apoptosis was detected by using flow cytometry and Hoechst staining. **Results** ① The expression of FGFR1 mRNA in A549 was higher than that of H3255 and A-427 ($P < 0.05$). ② The relative expression of FGFR1 mRNA and protein in A549, H3255 and A-427 lung cancer cells was significantly different ($P < 0.05$); There was no significant difference in FGFR1 mRNA and

protein expression between empty vector group and control group ($P > 0.05$). The expression of FGFR1 mRNA and protein in the interference group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). ③ The proliferation of A549 cells in the interference group, the empty vector group and the control group at 0 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h were significantly different ($P < 0.05$). ④ The apoptosis rates of A549 cells in three groups were statistically different ($P < 0.05$); there was no significant difference in apoptosis rate between empty load group and control group ($P > 0.05$); the apoptosis rate of A549 cells in the interference group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Lentivirus mediated FGFR1 silence can inhibit the proliferation of lung cancer cell A549 and promote the apoptosis of lung cancer cells simultaneously. It is suggested that FGFR1 may be involved in the process of lung cancer cell development.

Keywords: lung neoplasms; lentivirus infections; receptor, fibroblast growth factor, type 1; cell proliferation; apoptosis

肺癌是常见的恶性肿瘤，发病率居恶性肿瘤的第 2 位，病死率居首位，对人类健康造成严重威胁，因此探寻早期诊断的特异性指标成为目前肺癌的研究热点^[1]。成纤维生长因子受体 1 (fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1) 在乳腺癌、胃癌、肺癌等恶性肿瘤组织中呈高表达，且应用于临床鳞状细胞癌的筛查，在肺癌靶向治疗中具有广阔前景，但具体作用机制尚未完全阐明^[2-4]。本研究探讨慢病毒介导 FGFR1 沉默对肺癌细胞增殖、凋亡的影响，以期对肺癌靶向治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞系

肺癌细胞 A549、H3255、A-427 购自美国典型菌种保藏中心 (ATCC)，肾上皮细胞 293T 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

1.2 主要试剂与仪器

慢病毒载体 pLVTHM 购自武汉淼灵生物科技有限公司，MTT 试剂盒购自上海嵘崑达实业有限公司，Trizol、PrimeScript™ RT Reagent Kit 购自大连宝生生物工程有限公司，AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒购自杭州昊鑫生物科技股份有限公司，酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司，BCA 检测试剂盒购自北京天根生化科技有限公司，FBS、DMEM 购自美国 Gibco 公司，37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱购自中国赛默飞世尔科技有限公司 (上海)，FGFR1 单克隆抗体购自武汉艾美捷科技有限公司，β-actin 单克隆抗体购自上海西格玛奥德里奇贸易有限公司，IRDye 680RD Donkey Anti-mouse IgG 购自美国 LI-COR 公司，

FACScan 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 筛选高表达 FGFR1 mRNA 的肺癌细胞

采用含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基，在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 A549、H3255、A-427 肺癌细胞。用 Trizol 法分别提取细胞总 RNA，按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit 说明书将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA，用德国 Mastercycler® ep realplex 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪检测 FGFR1 mRNA 的相对表达量。每个反应体系 25 μl，包括总 cDNA 2 μl，正反向引物各 1 μl，SYBR 12.5 μl，无 RNA 酶水补足反应体系至 25 μl。反应程序采用两步法，退火温度设置为 60℃。所有实验重复 ≥ 2 次，每次设 3 个生物学重复。以 A549 做均一化处理，用 2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 相对表达量，筛选出 FGFR1 mRNA 表达较高的肺癌细胞。FGFR1 和内参基因 GAPDH 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物列表

基因	引物序列	长度 /bp
FGFR1	5' -GCTAGGTGCCGAGGTTGTT-3'	235
	5' -ACTGCAGGCTCCTCAGAAC-3'	
GAPDH	5' -GGAAGCTCAAGGGAGATAA-3'	196
	5' -AATGCAGCATCTCCTTACC-3'	

1.4 慢病毒表达载体 LV-shFGFR1 的构建、包装及病毒颗粒的制备

FGFR1 特异性 siRNA 引物: 5' -CGCAAGTAACGT ACCGTAATA-3'，位于 FGFR1 基因 96 ~ 116 bp 处，引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。限制

性内切酶 *Mlu* I、*Cla* I 双酶切 pLVTHM, 将目的片段经 DNA 连接酶插入到酶切过的慢病毒表达载体, 将构建好的慢病毒表达载体 (LV-shFGFR1) 转化至 TOP10, 筛选阳性克隆。将 LV-shFGFR1、空载体分别与辅助包装质粒 (pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G) 共转染 293T 细胞, 包装干扰病毒颗粒, 收毒, 滴定至 5×10^9 TU/ml。

1.5 实验分组

收集病毒上清, 加至 A549 细胞中, 感染复数为 10, 同时加入病毒感染增强剂和聚凝胺 ($5 \mu\text{g/ml}$), 感染 shFGFR1 病毒作为干扰组, 感染空载体病毒作为空载体组, 未进行感染的作为对照组。96 h 后用荧光显微镜检测重组慢病毒感染情况。

1.6 细胞检测

1.6.1 qRT-PCR 检测 FGFR1 mRNA 提取各组细胞的总 RNA, 参照 PrimeScript™ RT Reagent Kit 说明书逆转录总 RNA 为 cDNA, 用 Mastercycler® ep realplex qRT-PCR 仪检测 FGFR1 mRNA 相对表达量。每个反应体系 $20 \mu\text{l}$, 包括总 cDNA $2 \mu\text{l}$, 正反向引物各 $1 \mu\text{l}$, SYBR $10 \mu\text{l}$, 无 RNA 酶水 $6 \mu\text{l}$ 。反应程序采用两步法, 退火温度设置为 60°C 。所有实验重复 ≥ 2 次, 每次设 3 个生物学重复。以对照组做均一化处理, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

1.6.2 Western blotting 检测 FGFR1 蛋白 采用细胞裂解液 (含 PMSF) 裂解各组细胞, 8000 r/min 离心 15 min , 收集上清, 放置 4°C 条件下备用。利用 BCA 检测试剂盒检测蛋白浓度, 具体实验步骤参考说明书。根据检测的蛋白浓度进行半定量, 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 采用全湿法 350 mA 转膜 90 min , 5% 脱脂乳室温封闭 2 h , PBS 缓冲液洗涤 5 次, 3 min/次 。一抗即 FGFR1 单克隆抗体 ($1:1000$ 稀释) 或 β -actin 单克隆抗体 ($1:1000$ 稀释) 室温孵育 2.5 h , PBST 洗膜 3 次, PBS 洗膜 2 次, 5 min/次 。室温条件下避光, 荧光二抗 (IRDye 680RD Donkey Anti-mouse IgG, $1:20000$ 稀释) 孵育 1.5 h , PBST 洗膜 3 次, PBS 洗膜 2 次, 高压 ddH₂O 洗涤 2 次, 3 min/次 。采用 Odyssey® 红外成像系统分析蛋白相对表达量。

1.6.3 MTT 比色法检测细胞增殖 使用 MTT 测定各组细胞的增殖活力。将细胞按 1.0×10^5 个 / 孔接种至

96 孔培养板, 细胞贴壁后将其分为对照组、空载体组及感染组。对各组细胞采用不同方式处理后继续培养, 分别于干扰 0、12、24、48 和 72 h 后, 加入 $20 \mu\text{l/孔}$ MTT 继续培养, 4 h 后弃上层溶液, 加入 $1300 \mu\text{l/孔}$ DMSO, 振荡溶解 12 min 。采用酶标仪测定 470 nm 处光密度 (optical density, OD) 值。

1.6.4 流式细胞术检测细胞凋亡 将细胞按 1.0×10^5 个 / 孔接种至 96 孔培养板中, 对各组细胞采用不同方式处理后继续培养 48 h, 收集细胞, 适量 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 75% 预冷乙醇保存, 4°C 过夜。PBS 洗涤 3 次, 37°C 条件下 $20 \mu\text{l}$ RNA 酶孵育细胞 20 min , 避光条件下 $20 \mu\text{l}$ 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色, 4°C 孵育 30 min 。采用 FACScan 流式细胞仪对细胞进行分析, 利用 ModFit LT 细胞周期分析软件对凋亡细胞进行统计。

1.6.5 Hoechst 染色检测细胞凋亡 将细胞按 1.0×10^5 个 / 孔接种于含有飞片的 24 孔板中, 培养 48 h, 弃上清, PBS 缓慢洗涤 3 次, 每孔加入 2 ml 4% 多聚甲醛固定液室温固定 30 min , 弃固定液, PBS 缓慢洗涤 3 次, 6 min/次 , 超净台中风干。避光条件下于飞片中央滴加 $200 \mu\text{l}$ Hoechst 33258 工作液, 室温染色 20 min , PBS 轻柔洗去染色液, 洗涤 3 次, 6 min/次 , 用镊子小心取出飞片, 滤纸小心吸去飞片多余液体, 自然风干飞片, 于干净载玻片上滴加抗荧光猝灭剂 1 滴, 于飞片细胞一侧小心放置于滴加有抗荧光猝灭剂的位置上进行封片, 封片后利用荧光显微镜进行观察。

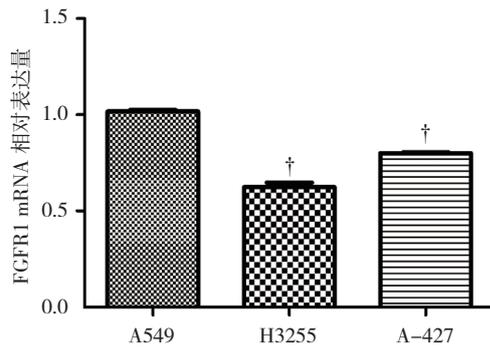
1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A549 细胞中 FGFR1 mRNA 呈高表达

A549、H3255、A-427 细胞中 FGFR1 mRNA 的相对表达量分别为 (1.11 ± 0.06)、(0.62 ± 0.04) 和 (0.71 ± 0.02), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=109.339$, $P=0.000$); A549 细胞高于 H3255 和 A-427 细胞 ($P < 0.05$)。见图 1。



† 与 549 肺癌细胞比较, $P < 0.05$ 。

图 1 3 种肺癌细胞中 FGFR1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 慢病毒稳定感染 A549 细胞

感染 96 h 后, 荧光显微镜检测病毒感染 A549 细胞情况显示, 空载体组和干扰组细胞绿色荧光蛋白阳性率均 $>90\%$, 表明重组慢病毒对 A549 细胞有较好的亲嗜性。见图 2。

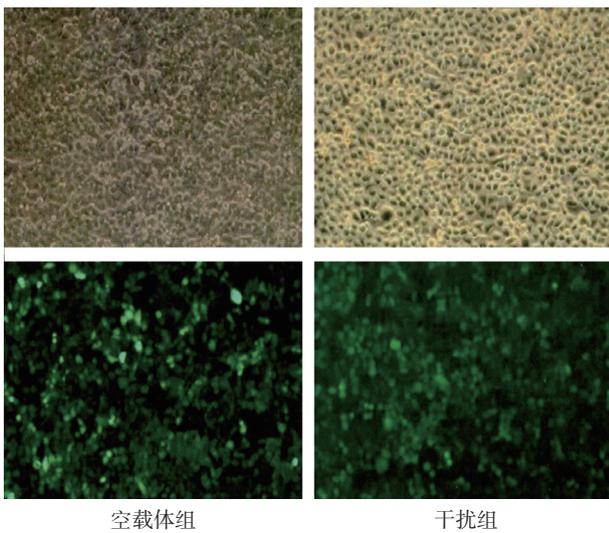


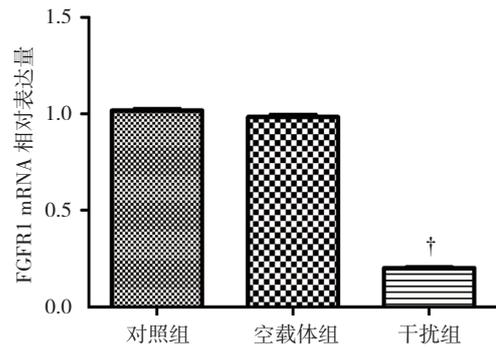
图 2 A549 细胞病毒感染情况 ($\times 100$)

2.3 干扰组 A549 细胞中 FGFR1 mRNA 表达下调

以 β -actin 为内参基因, 对照组、空载体组、干扰组 A549 细胞中 FGFR1 mRNA 相对表达量分别为 (1.09 ± 0.12) 、 (1.07 ± 0.10) 和 (0.21 ± 0.03) , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 89.787$, $P = 0.000$); 空载体组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 干扰组低于对照组 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 干扰组细胞中 FGFR1 蛋白表达下降

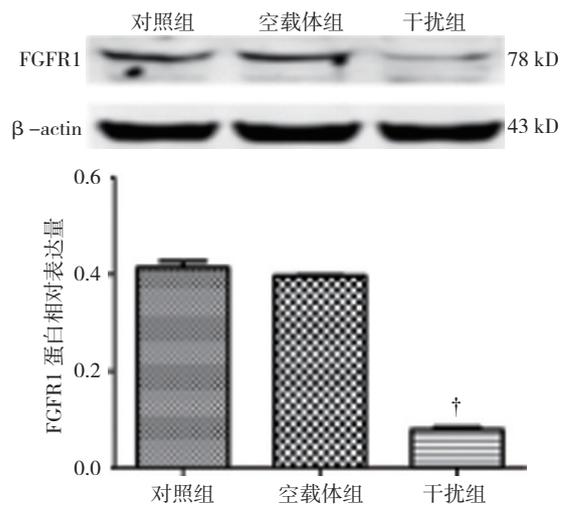
以 GAPDH 作为内参, 对照组、空载体组、干



† 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 各组 FGFR1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

扰组 A549 细胞中 FGFR1 蛋白相对表达量分别为 (0.42 ± 0.09) 、 (0.39 ± 0.07) 和 (0.08 ± 0.01) , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 24.344$, $P = 0.001$); 空载体组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 干扰组低于对照组 ($P < 0.05$)。见图 4。



† 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 各组 FGFR1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.5 各组细胞增殖情况

干扰组、空载体组、对照组 0、12、24、48 和 72 h 的细胞增殖情况比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点细胞增殖情况比较, 差异有统计学意义 ($F = 75.321$, $P = 0.000$); ②3 组细胞增殖情况比较, 差异有统计学意义 ($F = 68.364$, $P = 0.000$); ③3 组细胞增殖情况随时间变化趋势有差异 ($F = 91.637$, $P = 0.000$)。见表 2 和图 5。

表 2 各组细胞不同时间点的 OD 值比较

组别	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.62 ± 0.13	0.76 ± 0.08	0.78 ± 0.10	0.89 ± 12	0.90 ± 0.11
空载体组	0.62 ± 0.12	0.76 ± 0.06	0.77 ± 0.08	0.87 ± 0.10	0.88 ± 0.09
干扰组	0.62 ± 0.13	0.61 ± 0.03 [†]	0.63 ± 0.05 [†]	0.34 ± 0.04 [†]	0.23 ± 0.02 [†]
F 值	0.000	6.193	6.048	33.681	63.481
P 值	1.000	0.035	0.036	0.001	0.000

注: † 与对照组和空载体组比较, $P < 0.05$ 。

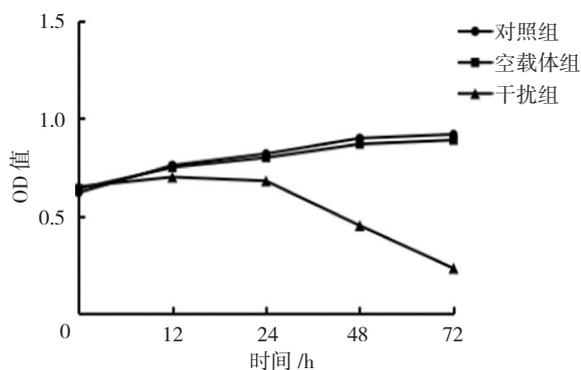


图 5 各组细胞 OD 值变化趋势 ($\bar{x} \pm s$)

2.6 干扰组细胞凋亡率上升

经 Hoechst 染色显示, 对照组细胞凋亡率为 (17.2 ± 1.32)%, 空载体组为 (17.3 ± 1.24)%, 干扰组为 (25.32 ± 2.14)%, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 66.296, P = 0.000$); 空载体组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 干扰组高于对照组和空载体组 ($P < 0.05$)。Hoechst 染色检测细胞凋亡结果与流式细胞术检测结果一致。见图 6 ~ 8。

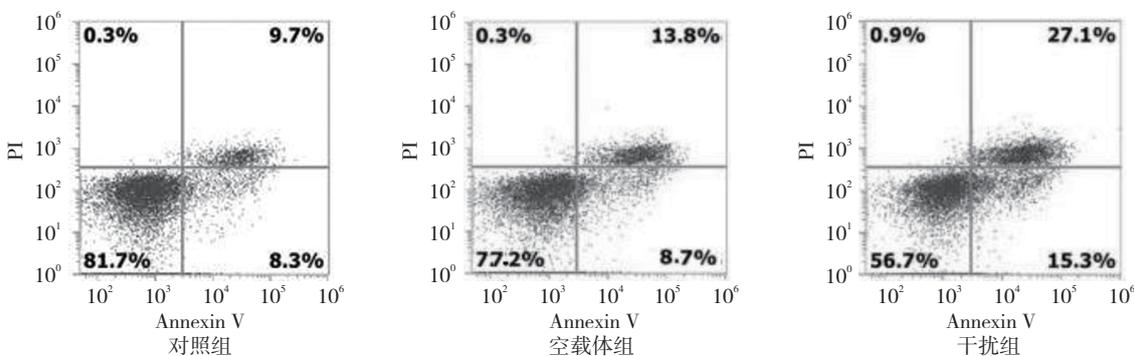


图 6 流式细胞凋亡图

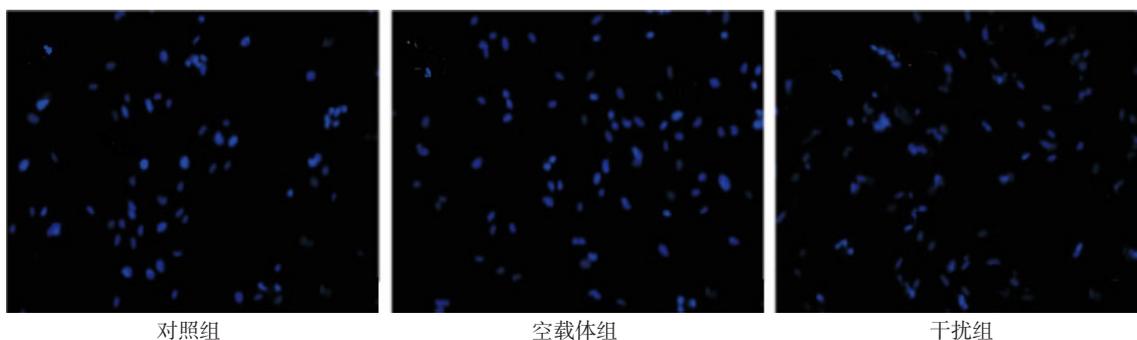


图 7 各组细胞凋亡情况 (Hoechst 染色 × 400)

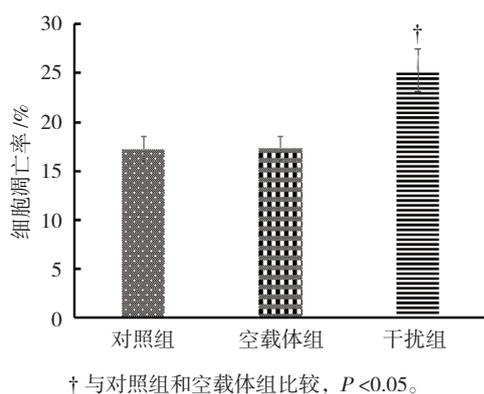


图 8 各组细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

肺癌是目前世界范围内病死率最高的疾病^[5]。肺癌分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌,其中非小细胞肺癌所占比例较大^[6]。小细胞肺癌具有发展迅速、转移较快和侵袭力强等特点,小细胞肺癌初治时较易获得良好的疗效,但后期治疗极易对药物产生耐药性,出现癌症复发和转移^[7]。非小细胞肺癌具有癌细胞增长缓慢,且转移、扩散较晚等特点^[8]。通常非小细胞肺癌患者不易被察觉,经常发现时已处于中、晚期,也因此导致非小细胞肺癌患者病死率居高不下^[9]。肺癌受许多因素调控,机制极其复杂,其中包括一些基因结构及表达发生变化等^[10-13]。

FGFR1 基因编码的蛋白为酪氨酸激酶受体,是一个跨膜蛋白,成纤维生长因子受体可与 *FGFR1* 蛋白细胞外区域结合,导致 *FGFR1* 蛋白结构改变和细胞内区域发生磷酸化,从而活化 STAT、Rap1、MAPK 和 PI3K-Akt 等信号通路^[14]。随着对 *FGFR1* 研究的不断深入,其在肿瘤发生、发展过程中的作用也越来越不容忽视。相关研究发现,在肿瘤组织中 *FGFR1* 相对表达量显著高于癌旁正常组织,由此说明 *FGFR1* 为癌症相关基因^[15]。由于常用的放化疗在肺癌治疗上有生存率低和预后效果不理想等缺点,人们迫切需要一种新的治疗方法来弥补放化疗的不足,因此分子靶向治疗走进了人们的视线,并随着研究的不断深入,目前分子靶向治疗药物已进入临床应用,例如以 EGFR 为靶点的易瑞沙和特罗凯便属于该类物质^[16-17]。本研究利用肺癌细胞系,阐明慢病毒介导 *FGFR1* 沉默对肺癌细胞增殖和凋亡的影响,为肺癌分子靶向治疗的研究提供实验基础。

本实验采用 qRT-PCR 检测各组 *FGFR1* mRNA 相

对表达量,结果显示, A549 细胞中 *FGFR1* mRNA 相对表达量高于 H3255 和 A-427 细胞,因此本研究通过慢病毒介导抑制 *FGFR1* 表达来探讨 *FGFR1* 对 A549 肺癌细胞增殖和凋亡的影响。siRNA 是一种短片段 dsRNA,能够利用慢病毒载体对 siRNA 进行介导,在核酸内切酶作用下,降解同源互补的 mRNA,从而导致目的基因无法变大,呈现抑制状态^[18]。本研究结果显示,干扰组 *FGFR1* mRNA 相对表达量较对照组下调,表明慢病毒表达质粒能够干扰 *FGFR1* 基因的转录。采用 Western blotting 检测各组 *FGFR1* 蛋白相对表达量,结果显示,干扰组 *FGFR1* 蛋白相对表达量较对照组下调,进一步验证慢病毒表达质粒能够干扰 *FGFR1* 蛋白的表达。Western blotting 检测结果与实时荧光定量检测结果一致,表明无论是在转录水平还是在翻译水平上,干扰组 *FGFR1* mRNA 和蛋白相对表达量均表现为下调。过往研究表明,当 *FGFR1* 表达受到抑制时可有效抑制胃癌细胞增殖^[19]。本研究通过 MTT 比色法发现,与对照组相比,干扰组中细胞增殖率下降,说明慢病毒介导的 *FGFR1* 基因沉默能够抑制肺癌细胞的增殖,与过往相关研究一致^[19],表明在肺癌细胞中 *FGFR1* 相对表达量下调也能有效抑制癌细胞增殖。相关研究表明,在卵巢癌中 *FGFR1* 相对表达量下调可促进细胞凋亡,增加对药物的敏感性^[20]。本研究中 *FGFR1* 细胞凋亡结果显示,干扰组细胞凋亡率高于对照组,表明慢病毒介导的 *FGFR1* 基因沉默能够促进肺癌细胞的凋亡,与过往其他癌症研究结果一致^[20]。本研究通过对照组与空载体组的对比,可以排除慢病毒载体本身对 *FGFR1* 表达产生影响的干扰。

综上所述,慢病毒介导的 *FGFR1* 沉默,显著抑制 *FGFR1* 表达,从而抑制肺癌细胞增殖,同时促进肺癌细胞的凋亡。提示 *FGFR1* 可能参与肺癌细胞的发生、发展过程,同时也说明 *FGFR1* 有潜力成为新的药物分子靶标,但还需对其进一步验证,本研究结果为肺癌基因治疗提供新的实验基础。

参考文献:

- [1] ISLAMI F, TORRE L A, JEMAL A. Global trends of lung cancer mortality and smoking prevalence[J]. *Translational Lung Cancer Research*, 2015, 4(4): 327-338.
- [2] TOMIGUCHI M, YAMAMOTO Y, YAMAMOTO-IBUSUKI M, et al. *FGFR1* protein expression is associated with prognosis in ER-positive/HER2-negative primary breast cancer[J]. *Cancer Science*, 2016, 107(4): 491-498.
- [3] XU C, LI W, QIU P, et al. The therapeutic potential of a novel non-

- ATP-competitive fibroblast growth factor receptor 1 inhibitor on gastric cancer[J]. *Anticancer Drugs*, 2015, 26(4): 379-387.
- [4] 潘天宇, 张华伟. 成纤维细胞生长因子受体 1 和血管内皮生长因子在肺鳞癌中的表达及与预后的关系 [J]. *癌症进展*, 2017, 15(3): 315-317.
- [5] FAN Z, JI T, WAN S, et al. Smoking and risk of meningioma: a meta-analysis[J]. *Cancer Epidemiology*, 2013, 37(1): 39-45.
- [6] GEORGE J, JING S L, JANG S J, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer[J]. *Nature*, 2015, 524(7563): 47-53.
- [7] SIEGEL R, DESANTIS C, VIRGO K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012[J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2014, 64(4): 252-271.
- [8] KALEMKERIAN G P. Chemotherapy for small-cell lung cancer[J]. *Lancet Oncology*, 2014, 15(1): 13-14.
- [9] RUSCH V W, CROWLEY J, GIROUX D J, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for the revision of the N descriptors in the forthcoming seventh edition of the TNM Classification for lung cancer[J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2007, 33(3): 472-479.
- [10] PAEZ J G, JÄNNE 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.
- [11] ABRAMS T J, LEE L B, MURRAY L J, et al. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2003, 2(5): 471.
- [12] D'INCECCO A, ANDREOZZI M, LUDOVINI V, et al. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients[J]. *British Journal of Cancer*, 2015, 112(1): 95-102.
- [13] ZHANG B, LIU T, WU T, et al. microRNA-137 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting SLC22A18[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 74: 111-118.
- [14] TAYLOR M D, LAPAR D J, DAVIS J P, et al. Induction chemoradiotherapy and surgery for esophageal cancer: survival benefit with downstaging[J]. *Annals of Thoracic Surgery*, 2013, 96(1): 225-231.
- [15] ACEVEDO V, GANGULA R K, LI R, et al. Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Urologic Oncology Seminars Original Investigations*, 2007, 12(6): 559-571.
- [16] PLANT R, CHETIYAWARDANA S, THOMPSON J, et al. 17 use of gefitinib (Iressa) in patients with EGFR positive NSCLC in the pan birmingham cancer network[J]. *Lung Cancer*, 2012, 75(21): S6.
- [17] LI X, QIN N, WANG J, et al. Clinical observation of icotinib hydrochloride for advanced non-small cell lung cancer patients with EGFR status identified[J]. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 2015, 18(12): 734-739.
- [18] 杨馨, 胡应和. 慢病毒载体介导的 RNA 干扰 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2006, 28(4): 497-500.
- [19] WU J, DU X, LI W, et al. A novel non-ATP competitive FGFR1 inhibitor with therapeutic potential on gastric cancer through inhibition of cell proliferation, survival and migration[J]. *Apoptosis*, 2017: 1-13.
- [20] COLE C, LAU S, BACKEN A, et al. Inhibition of FGFR2 and FGFR1 increases cisplatin sensitivity in ovarian cancer[J]. *Cancer Biology Therapy*, 2010, 10(5): 495-504.

(童颖丹 编辑)