•专题研究:肿瘤•

LRRC31在EGFR突变型非小细胞肺癌中的表达及作用

沈诗逸,梁思勤,王 静*

南京医科大学基础医学院细胞生物学系,江苏 南京 211166

[摘 要] **目的:**识别表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)突变型非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)的关键分子靶点,并探索其在肿瘤发展及EGFR酪氨酸酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor,TKI)治疗反应中的潜在作用。**方法:**使用R软件的limma包对癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas,TCGA)数据库中的EGFR突变型和野生型肺腺癌(lung adenocarcinoma,LUAD)患者组织进行差异表达基因(differentially expressed gene,DEG)分析,并进行基因本体论(gene ontology,GO)与京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)富集分析。通过Western blot检测不同NSCLC细胞系中富含亮氨酸重复序列蛋白31(leucine-rich repeat-containing protein 31,LRRC31)蛋白表达水平,利用慢病毒介导shRNA敲低LRRC31,并通过CCK-8、克隆形成及划痕实验评估其对EGFR突变型细胞(PC9与H1975)增殖与迁移能力的影响。此外,结合公共数据库分析LRRC31表达与EGFR-TKI敏感性的相关性。进一步通过CCK-8和克隆形成实验,检测LRRC31敲低联合奥希替尼对H1975细胞增殖活性的影响,并在奥希替尼耐药细胞H1975/OR中敲低LRRC31,评估其对EGFR-TKI治疗反应的影响。**结果:**共鉴定出73个DEG(上调42个,下调31个)。LRRC31在EGFR突变型LUAD组织及PC9、H1975细胞系中均显著高表达。体外实验表明,敲低LRRC31显著抑制PC9与H1975细胞的活力、克隆形成能力及迁移能力。数据库分析提示,LRRC31表达水平与奥希替尼半数抑制浓度(half-maximal inhibitory concentration,IC_{50})值呈正相关,且在吉非替尼耐药细胞中表达上调。体外功能验证显示,与奥希替尼单药处理相比,LRRC31敲低联合奥希替尼处理进一步增强了对H1975细胞增殖和克隆形成能力的抑制作用。此外,H1975/OR细胞敲低LRRC31可显著提升细胞对奥希替尼的敏感性。**结论:**LRRC31在EGFR突变型NSCLC中显著高表达且介导肿瘤恶性表型。敲低LRRC31可增强肿瘤细胞对奥希替尼的敏感性,提示其在EGFR-TKI治疗反应及耐药状态中发挥调控作用,但其潜在治疗价值仍需进一步验证。

[关键词] 非小细胞肺癌;EGFR突变;LRRC31;奥希替尼;细胞增殖

[中图分类号] R734.2 [文献标志码] A [文章编号] 1007-4368(2026)11-1593-10

doi:10.7655/NYDXBNSN260022

Expression and functions of LRRC31 in EGFR-mutant non-small cell lung cancer

Shen Shiyi, Liang Siqin, Wang Jing*

Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[**Abstract**] **Objective:** To identify key molecular targets in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC) and to investigate their potential roles in tumor progression and response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) therapy. **Methods:** Differentially expressed genes (DEGs) between EGFR-mutant and EGFR-wild-type lung adenocarcinoma (LUAD) tissues in The Cancer Genome Atlas (TCGA) database were identified using the limma package in R software, followed by gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses. LRRC31 protein expression was examined by Western blotting in different NSCLC cell lines. LRRC31 was knocked down by lentivirus-mediated short hairpin RNA (shRNA), and its effects on the proliferation and migration of EGFR-mutant PC9 and H1975 cells were evaluated using CCK-8, colony formation, and wound-healing assays. Publicly available datasets were further analyzed to assess the association between LRRC31 expression and sensitivity to EGFR-TKIs. The effects of LRRC31 knockdown combined with osimertinib on H1975 cell proliferation were evaluated by CCK-8 and colony formation assays. In addition, LRRC31 was knocked down in osimertinib-resistant H1975/OR cells to assess its association with the response to EGFR-TKI treatment. **Results:** A total of 73 DEGs were

[基金项目] 国家自然科学基金(82303894);南京医科大学-齐鲁临床研究基金(2024KF0248)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:wangjing1124321@njmu.edu.cn(ORCID:0009-0003-8838-7982)

identified, including 42 upregulated and 31 downregulated genes. LRRC31 was significantly upregulated in EGFR-mutant LUAD tissues and in the EGFR-mutant PC9 and H1975 cell lines. *In vitro* experiments showed that LRRC31 knockdown significantly inhibited cell viability, colony formation, and migration in PC9 and H1975 cells. Database analyses indicated that LRRC31 expression was positively correlated with the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of osimertinib and was upregulated in gefitinib-resistant cells. Functional experiments further showed that, compared with osimertinib treatment alone, LRRC31 knockdown combined with osimertinib exerted a greater inhibitory effect on the proliferation and colony-forming ability of H1975 cells. Moreover, LRRC31 knockdown markedly increased the sensitivity of H1975/OR cells to osimertinib. **Conclusion:** LRRC31 is highly expressed in EGFR-mutant NSCLC and is associated with malignant tumor phenotypes. LRRC31 knockdown enhances the sensitivity of tumor cells to osimertinib, suggesting that LRRC31 may play a potential regulatory role in the response to EGFR-TKI therapy and in the maintenance of drug-resistant phenotypes. Its potential value as a therapeutic target requires further investigation.

[**Key words**] non-small cell lung cancer; EGFR mutation; LRRC31; osimertinib; cell proliferation

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(11): 1593-1602]

肺癌是全球发病率最高的恶性肿瘤之一，也是癌症相关死亡的首要原因，每年新增约250万例新发病例，并造成约180万例死亡[1]。近几十年来，靶向治疗与免疫检查点抑制剂的临床应用显著改变了占肺癌病例85%的非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）的治疗格局[2-5]。其中，以小分子为基础的靶向治疗已成为重要且前景广阔的治疗策略，显著改善了存在可靶向驱动基因突变的NSCLC患者的临床结局[6]。

表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）突变是NSCLC中最常见的驱动基因突变之一[7-10]。EGFR酪氨酸激酶抑制剂（epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor，EGFR-TKI）的出现显著改善了这类患者的预后[11-12]。然而，EGFR-TKI单药治疗仍不可避免地面临耐药和疾病进展的挑战，尤其是对于携带不良预后因素的患者，临床治疗需求尚未得到满足[13]。当前，EGFR突变型NSCLC的治疗瓶颈在于耐药机制复杂且异质性强，常见机制包括靶内突变（如T790M、C797S等）、旁路通路激活[如间质-上皮转化因子（mesenchymal-epithelial transition factor，MET）扩增]以及EGFR下游信号通路异常激活[如磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B（phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B，PI3K/AKT）或丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）通路等）][14-18]。

探索延缓耐药发生及增强EGFR-TKI敏感性的策略是当前研究的重点[19-20]。既往研究显示，针对肿瘤细胞不同适应性状态的干预，可通过影响不同细胞亚群提高治疗效果，从而应对肿瘤异质性并改善临床结局[21]。因此，深入探索调控EGFR突变型NSCLC治疗反应的关键分子，鉴定可能影响EGFR-TKI敏感性及耐药状态的潜在干预因子，对于优化现有靶向治疗策略具有重要的科学意义。基于此，本研究拟通过公共数据库筛选并结合体外功能实验，探索在EGFR-TKI治疗反应中发挥关键调控作用的潜在候选基因。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　样本

从癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）数据库（https://portal.gdc.cancer.gov）下载了肺腺癌（lung adenocarcinoma，LUAD）肿瘤样本的剪接转录本参考序列比对（spliced transcripts alignment to a reference，STAR）-counts转录组数据及相应的临床信息。将原始数据转换为每百万转录本数（transcripts per million，TPM）格式，并进行$\log_2$（TPM+1）转换。在同时具备RNA-seq数据和完整临床信息（包括性别、吸烟史及病理分期）的样本中，将携带EGFR激酶结构域经典激活突变（包括19号外显子缺失和L858R）的样本定义为突变组，其余未检测到EGFR致病性突变的样本定义为野生型组，最终纳入506例样本，其中EGFR突变组60例、野生型组446例。NSCLC细胞系PC9、H1975、H1299和H460均购自中国科学院上海细胞库。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养

PC9、H1975和H460细胞培养于RPMI-1640培养基（ThermoFisher公司，美国），H1299细胞培养于DMEM培养基（ThermoFisher公司，美国），均添加

10%胎牛血清（fetal bovin serum，FBS，北京全式金生物技术股份有限公司）和100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素（HyClone公司，美国），在5% CO_2、37 ℃条件下培养。

1.2.2　富含亮氨酸重复序列蛋白31（leucine-rich repeat-containing protein 31，LRRC31）敲低细胞株构建

使用pLKO.1-puro shRNA载体（Addgene共享平台，美国，货号8453）构建LRRC31 shRNA慢病毒系统。shRNA的序列如下：shNC：5′-GGAATCTCATTCGATGCATAC-3′；sh1：5′-AGCTAATCGAGCTGGAT-ATTA-3′；sh2：5′-GCTGTCAACAAGTGTCTAGAT-3′。慢病毒包装于HEK293T细胞中完成，随后感染PC9和H1975细胞，并使用嘌呤霉素筛选获得稳定敲低LRRC31细胞株。通过Western blot检测验证LRRC31的敲低效果。

1.2.3　Western blot实验

使用含0.1 mmol/L PMSF和蛋白酶抑制剂（Roche Diagnostics公司，美国）的RIPA裂解缓冲液（上海碧云天公司）从NSCLC细胞中提取总蛋白，采用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。随后取20 μg/孔蛋白经10% SDS-PAGE凝胶电泳分离后转膜至PVDF膜（Millipore公司，美国）。膜在室温下用3%牛血清白蛋白（Boster公司，美国）封闭2 h。随后分别加入一抗LRRC31抗体（CST公司，美国，1∶1 000稀释）和GAPDH抗体（CST公司，美国，1∶5 000稀释），于4 ℃孵育过夜。洗膜后，使用含0.3% Tween-20的TBST充分冲洗，再加入辣根过氧化物酶标记的二抗（CST公司，美国，1∶5 000稀释）室温下孵育2 h。采用ECL化学发光试剂盒（上海碧云天公司）进行显色，并使用Image J软件（1.8.0）对蛋白条带进行半定量分析。

1.2.4　细胞增殖实验

将PC9与H1975细胞以1 000个/孔的密度接种于96孔板中，并在37 ℃、5% CO_2的培养箱中分别培养24、72和120 h。对于奥希替尼联合用药实验，LRRC31敲低的H1975细胞贴壁后加入10 nmol/L奥希替尼，分别培养24、72、120 h。随后每孔加入10 μL CCK-8溶液（上海碧云天公司），并在培养箱中孵育2 h。使用Spectrafluor微孔板读数仪（Molecular Devices公司，美国）在450 nm波长下测量光密度。

1.2.5　克隆形成实验

将PC9、H1975和LRRC31敲低的H1975细胞以500个/孔的密度接种于12孔板中，LRRC31敲低的H1975细胞贴壁后加入10 nmol/L奥希替尼，之后在37 ℃、5% CO_2的湿润培养箱中培养12 d。培养结束后，弃去培养基并用PBS轻柔洗涤细胞。随后，采用4%多聚甲醛在室温下固定30 min，并使用1% Giemsa染液在室温下染色30 min。染色完成后，对细胞克隆进行拍照记录，并手动计数克隆数。

1.2.6　划痕实验

当PC9与H1975细胞的密度达到90%时，使用200 μL无菌枪头尖端在培养板上划出一条线。随后，使用无菌PBS轻柔地冲洗细胞3次，以确保所有脱落的细胞均被彻底去除，并拍照记录划痕的宽度。使用含1% FBS的培养基培养细胞48 h后，拍摄相同的视野进行记录。

1.2.7　H1975奥希替尼耐药细胞株构建和半数抑制浓度（half-maximal inhibitory concentration，IC_{50}）检测

以H1975细胞为亲本，通过逐步递增药物浓度法诱导耐药。初始浓度为10 nmol/L奥希替尼，每次增加10 nmol/L；当细胞适应后逐步提高至IC_{50}的10倍浓度范围，最终在2 μmol/L药物条件下稳定生长的细胞定义为耐药株（H1975/OR）。H1975/OR细胞在无药培养基中培养72 h以消除药物的急性作用。亲本及耐药细胞均使用不同浓度奥希替尼（1×10^{-3}~1×10^{4} nmol/L）处理72 h，随后加入CCK-8孵育2 h并检测吸光度值。抑制率按如下公式计算：抑制率=（对照组吸光度值−实验组吸光度值）/（对照组吸光度值−空白组吸光度值）×100%。采用非线性回归模型（log[inhibitor] *vs.* response-variable slope）拟合剂量-反应曲线并计算IC_{50}。IC_{50}检测采用独立生物学重复实验，并在相同实验条件下重复测定，以评价结果的重复性。耐药指数（resistance index，RI）按公式RI=IC_{50}（H1975/OR）/IC_{50}（H1975）计算。H1975/OR细胞经无药培养后再次进行药物敏感性检测，以评价耐药表型的稳定性。

1.2.8　差异表达分析

差异表达分析采用Benjamini-Hochberg（BH）方法进行多重假设检验校正，并以调整后的$P<0.05$且$|\log_2FC|>1$作为筛选差异表达mRNA的阈值。进一步利用R语言中的ClusterProfiler包对差异表达基因（differentiall expressed gene，DEG）进行基因本体论（gene ontology，GO）功能注释分析，并开展京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路富集分析。

1.3　统计学方法

采用R软件中的limma包进行差异表达分析。以EGFR突变状态作为主要解释变量，并将性别、吸烟状态及病理分期作为协变量纳入线性模型进行

校正。上述协变量基于既往研究及临床生物学意义预先确定，而非依据单因素分析结果进行筛选，以尽可能降低潜在混杂因素对差异表达结果的影响。考虑到EGFR突变组与野生型组样本量存在不平衡（60例和446例），进一步进行了模型设定敏感性分析。分别采用仅包含EGFR突变状态的未校正模型，以及同时纳入性别、吸烟状态和病理分期的多变量校正模型进行分析，并比较核心候选基因在不同模型中的效应方向、效应量及统计学显著性，以评价主要研究结果对模型设定变化的稳定性。

使用GraphPad Prism 9.0进行数据统计分析。所有实验数据均来自3次生物学重复，并设置3个及以上的技术复孔。所有统计推断均基于3次独立生物学重复进行。首先采用Shapiro-Wilk检验进行正态性分布测试，并使用F检验评估方差齐性。符合正态分布的数据均采用均值±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。两组间比较采用双尾t检验；对于单一因素下3组及以上样本的比较，采用单因素方差分析（one-way ANOVA），并采用Tukey's multiple comparisons test进行事后多重比较分析。对于同时包含多个时间点及不同处理组的CCK-8细胞增殖实验，采用双因素方差分析（two-way ANOVA），以时间和处理作为2个因素，分别评价时间主效应、处理主效应及时间×处理交互作用，并根据预设的组间比较采用相应的事后多重比较校正。剂量-反应曲线及IC_{50}值通过非线性回归模型进行拟合计算。所有检验均为双侧检验，$P < 0.05$为差异有统计学意义。

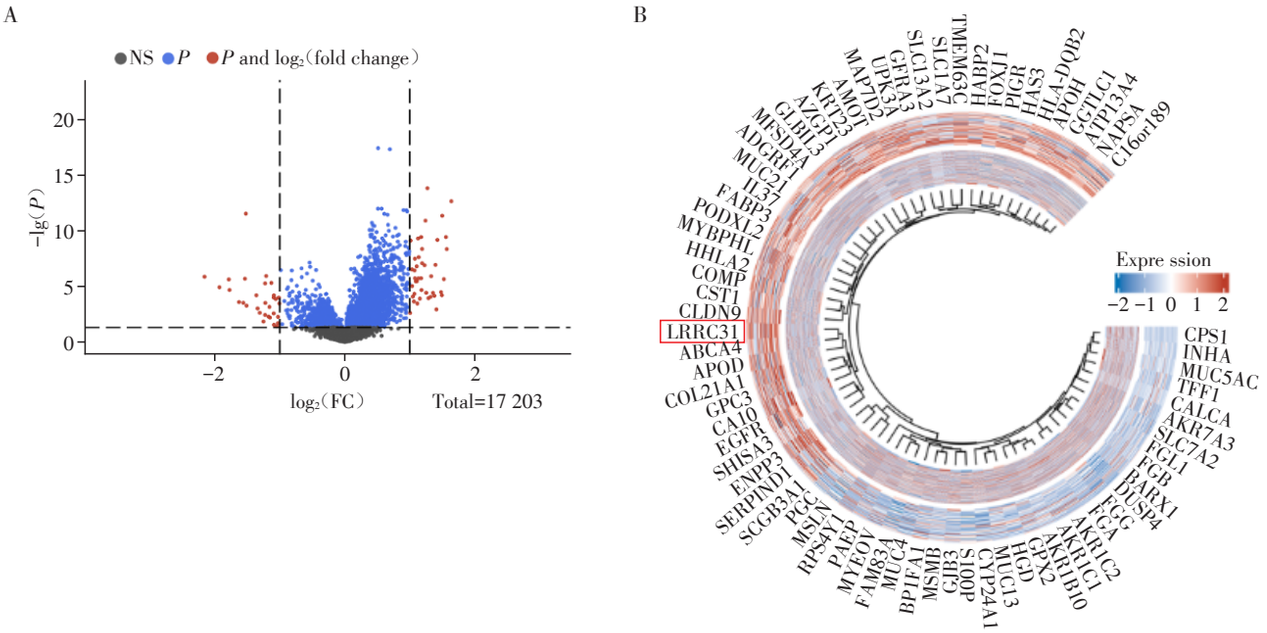
2　结　果

2.1　DEG筛选及富集分析

使用R软件的limma包对TCGA数据库中收录的EGFR突变型LUAD患者（n=60）和EGFR野生型LUAD患者（n=446）组织的测序数据进行DEG分析，筛选标准设定为调整后$P < 0.05$且$|\log_2 FC| > 1$。通过该分析，共鉴定出73个DEG，其中42个基因表达上调，31个基因表达下调（图1A）。上调基因包括LRRC31、C16orf89、NAPSA等，下调基因包括CPS1、INHA、MUC5AC等（图1B）。进一步对这些DEG进行KEGG和GO富集分析，结果显示，上调基因主要与细胞黏附、紧密连接以及细胞分化等生物过程密切相关（图2A、C），而下调基因则与炎症反应、激素合成及中间纤维细胞骨架组织等相关（图2B、D）。

2.2　LRRC31基因在EGFR突变型NSCLC中显著上调

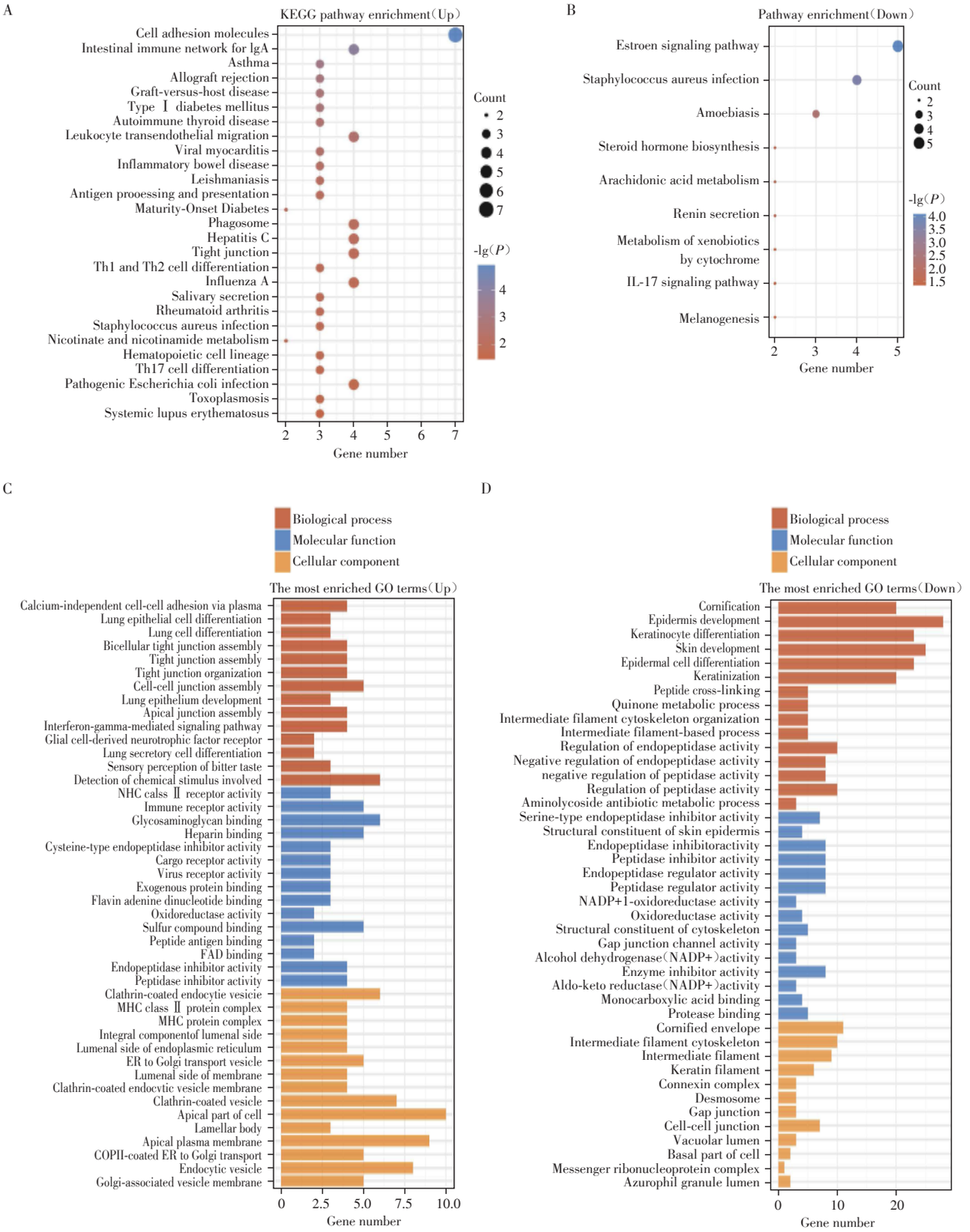
分析TCGA数据库EGFR突变型和野生型NSCLC患者组中LRRC31基因表达量，结果显示LRRC31在EGFR突变型NSCLC患者组织中显著高于野生型患者（图3A）。使用Western blot检测EGFR



A: A volcano plot of DEG between EGFR mutant（n=60）and EGFR wild-type（n=446）LUAD tissues（adjusted $P < 0.05$, $|\log_2 FC| > 1$）. B: Comparison of gene expression between the EGFR mutant and EGFR wild-type LUAD tissues for DEG.

图1　EGFR突变型和EGFR野生型LUAD组织中的DEG

Figure 1　DEG between EGFR mutant and EGFR wild-type LUAD tissues



A，B：KEGG pathway enrichment of upregulated（A）and downregulated（B）DEG between EGFR mutant（n=60）and EGFR wild-type（n=446）LUAD tissues（adjusted $P < 0.05$，$|\log_2 FC| > 1$）. C，D：GO enrichment map of upregulated（C）and downregulated（D）DEG between EGFR mutant and EGFR wild-type LUAD tissues.

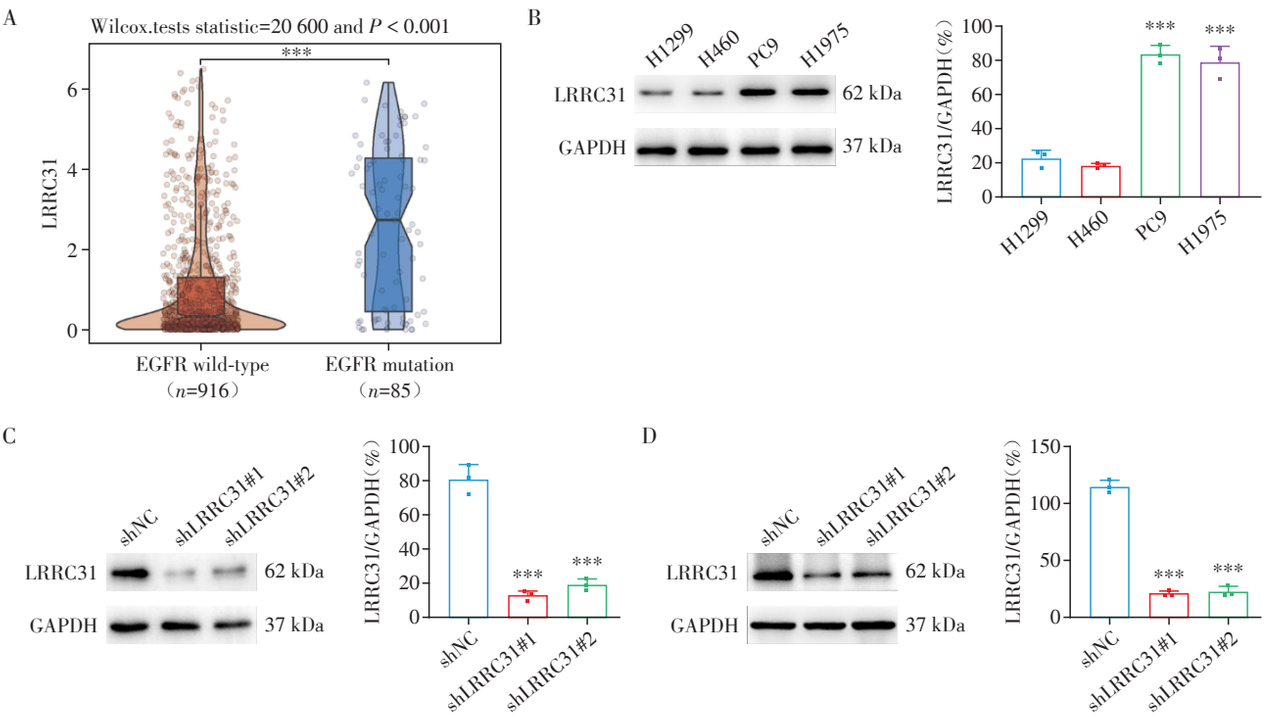
图2　EGFR突变型和EGFR野生型LUAD组织DEG的GO和KEGG分析

Figure 2　GO and KEGG analysis of DEG between EGFR mutant and EGFR wild-type LUAD tissues

突变型细胞（PC9与H1975细胞）和野生型细胞（H1299和H460细胞）中LRRC31的蛋白表达水平，结果显示PC9和H1975细胞中LRRC31蛋白表达量显著高于H1299和H460细胞（图3B）。使用慢病毒包装shRNA敲低LRRC31基因，Western blot检测显示在PC9和H1975细胞中成功降低LRRC31的蛋白表达（图3C、D）。

2.3　LRRC31敲低抑制EGFR突变型NSCLC细胞生长、增殖和迁移能力

为了进一步探究LRRC31基因在EGFR突变型NSCLC细胞中的作用，评估了敲低LRRC31对PC9与H1975细胞增殖和迁移的影响。CCK-8检测结果表明，LRRC31敲低显著抑制PC9与H1975细胞的活力（图4A）。克隆形成实验进一步验证，LRRC31敲低



A: Violin, dot, and box plots showing the expression distribution of LRRC31 in EGFR mutant versus EGFR wild-type NSCLC tissues. B: LRRC31 protein levels in PC9, H1975, H1299, and H460 cells, compared with the combined control group (H1299 and H460 cells). C: LRRC31 protein levels in PC9 cells following LRRC31 knockdown, compared with the shNC group, $^{***}P < 0.001$. D: LRRC31 protein levels in H1975 cells following LRRC31 knockdown. Compared with the shNC group, $^{***}P < 0.001$ (n=3).

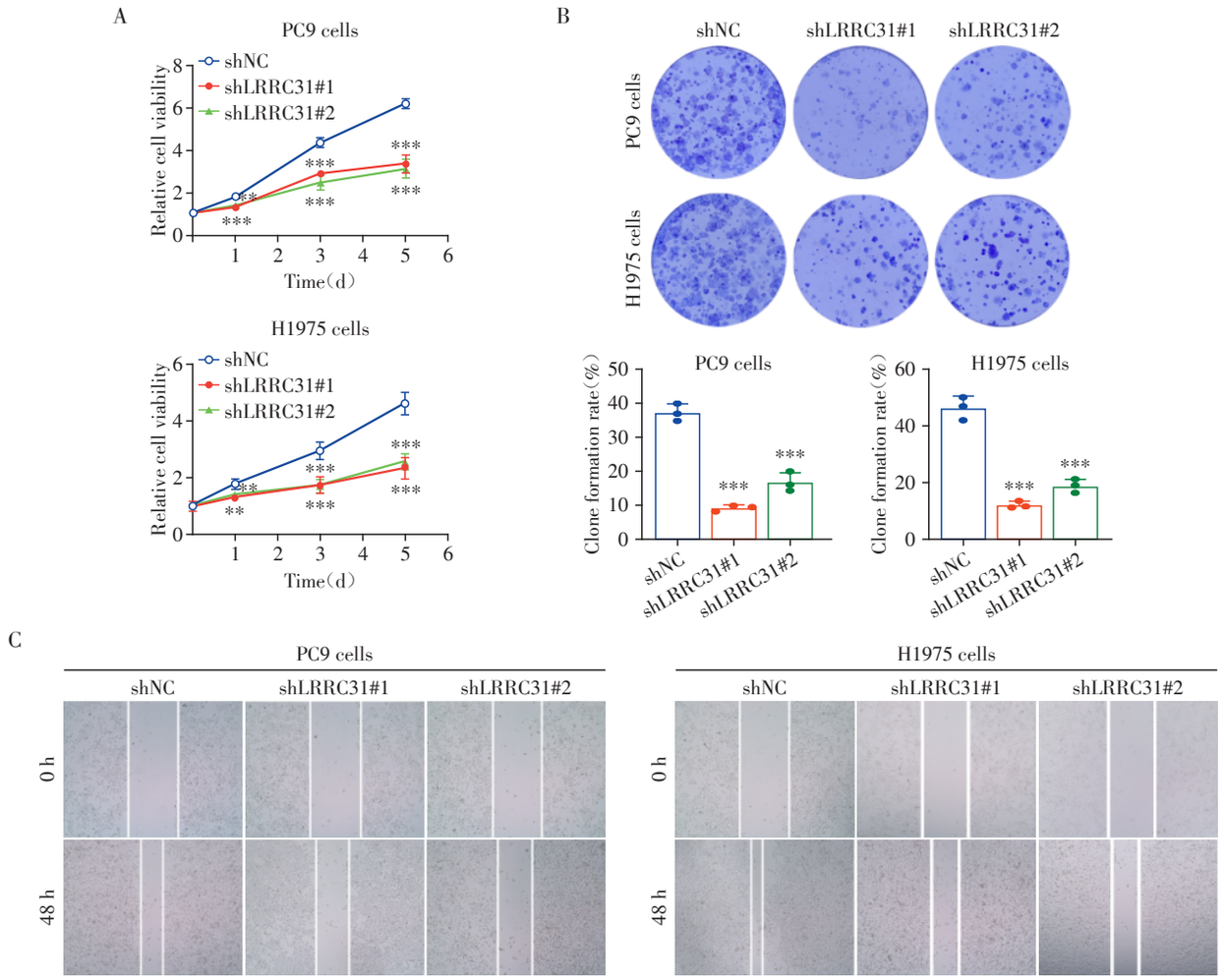
图3　LRRC31在EGFR突变型NSCLC组织和细胞中高表达

Figure 3　LRRC31 was highly expressed in EGFR-mutant NSCLC tissues and cells

显著降低PC9与H1975细胞的长期增殖能力（图4B）。此外，划痕实验结果显示，LRRC31敲低有效抑制PC9与H1975细胞的迁移能力（图4C）。

2.4　LRRC31敲低提高EGFR突变NSCLC细胞对奥希替尼的敏感性

鉴于LRRC31在EGFR突变型NSCLC细胞增殖和迁移中的作用，进一步评估了其在EGFR-TKI耐药中的潜在意义。基因表达综合数据库（Gene Expression Omnibus，GEO）中的GSE103350数据集分析显示，与亲本HCC827细胞相比，LRRC31在获得性吉非替尼耐药的HCC827细胞中表达显著上调（$P < 0.001$，图5A）。结合Expression Atlas与GDSC数据库的多维数据分析发现，LRRC31的mRNA表达水平与细胞的奥希替尼IC_{50}值呈显著正相关（r=0.722，P=0.012，图5B）。相比奥希替尼单药处理，LRRC31敲低联合奥希替尼处理可显著降低H1975细胞的增殖活性（图5C）。克隆形成实验进一步证实，LRRC31敲低或奥希替尼单独处理均可降低H1975细胞克隆形成能力，而联合处理组表现出更强的增殖抑制作用（图5D、E），提示LRRC31敲低可能增强肿瘤细胞对奥希替尼治疗的响应。在耐药模型中，LRRC31敲低明显增强H1975/OR细胞对奥希替尼的敏感性。非线性回归分析显示，H1975/OR细胞的IC_{50}为501.5 nmol/L（95% CI：171.6~1 333.3 nmol/L），而敲低LRRC31后IC_{50}降至3.016 nmol/L（95% CI：1.482~5.779 nmol/L）（图5G），剂量-反应曲线明显左



A：CCK-8 assay was conducted to evaluate the proliferation capacity of PC9 and H1975 cells following LRRC31 knockdown. B：Colony formation assay was performed to assess the colony-forming ability of PC9 and H1975 cells after LRRC31 knockdown. C：Wound healing assay was utilized to investigate the migratory potential of PC9 and H1975 cells subsequent to LRRC31 knockdown（×40）. Compared with the shNC group $^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（n=3）.

图4　敲低LRRC31抑制EGFR突变型NSCLC细胞的增殖与迁移

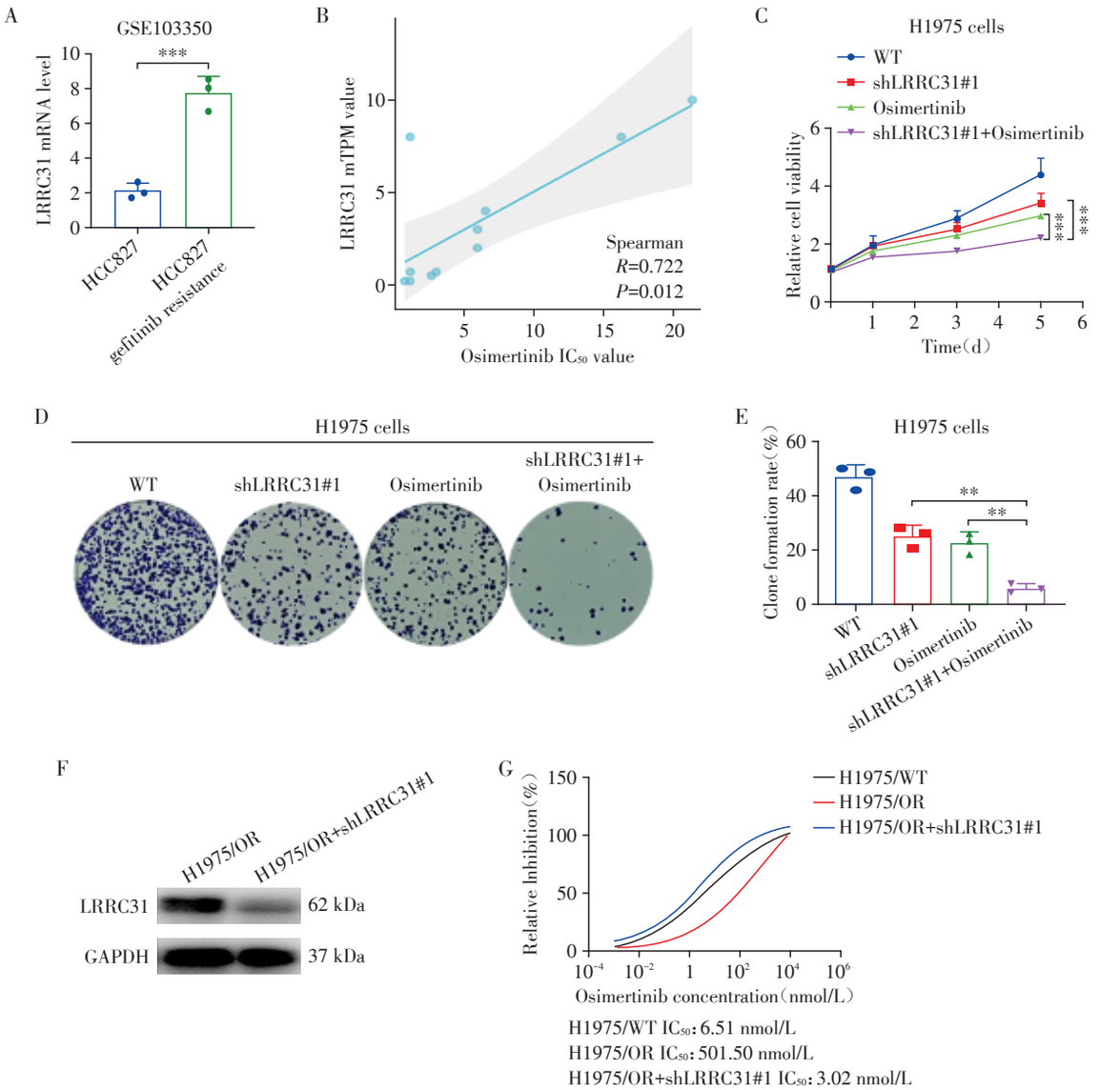
Figure 4　Knockdown of LRRC31 suppressed the proliferation and migration of EGFR-mutant NSCLC cells

移（图5G）。上述结果表明，LRRC31表达水平变化与奥希替尼敏感性改变具有一致的关联趋势，提示LRRC31可能参与EGFR-TKI获得性耐药相关细胞表型的调节，但其具体作用机制仍需进一步验证。

3　讨　论

本研究揭示LRRC31在EGFR突变型LUAD中异常高表达并发挥促癌功能。尽管前期有研究显示LRRC31在部分LUAD中低表达，且在EGFR野生型NSCLC细胞A549中过表达会抑制细胞的增殖、克隆形成和迁移能力[22]，但本研究发现，在EGFR驱动突变的遗传背景下，LRRC31可能呈现背景依赖性的表达与功能差异，表现为LRRC31在EGFR突变肿瘤和细胞中高表达，且下调其表达能有效抑制PC9和H1975细胞的增殖与迁移。这种“功能背景依赖性”强烈提示，LRRC31的生物学角色并非固定不变，而是依赖于肿瘤的驱动基因图谱。我们推测，持续激活的EGFR信号可能通过改变相关上游或下游调控网络，使LRRC31在EGFR突变背景下参与癌细胞恶性表型的维持，但这一假设仍需进一步的机制研究加以验证。

LRRC31的经典功能是作为非同源末端连接（non-homologous end joining，NHEJ）途径的抑制剂，通过与Ku70/Ku80蛋白竞争性结合，有效抑制DNA依赖性蛋白激酶催化亚基（DNA-dependent protein kinase catalytic subunit，DNA-PKcs）的招募与活化，从而干扰DNA双链修复[23]。然而，在EGFR突变背景下，其促癌机制可能涉及更为复杂的信号交互。



A: LRRC31 mRNA expression in HCC827 parental and gefitinib-resistant cells (GSE103350). B: Correlation between LRRC31 expression and osimertinib IC_{50} values in H1975 cells. C: Cell viability of H1975 cells following LRRC31 knockdown, osimertinib treatment, or combination treatment. D, E: Colony formation assay showing the effects of LRRC31 knockdown with osimertinib in H1975 cells. F: Western blot analysis of LRRC31 expression in H1975/OR cells with or without shLRRC31. G: Restoration of osimertinib sensitivity in H1975/OR cells after LRRC31 knockdown. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ (n=3).

图5　敲低LRRC31基因增强H1975细胞对奥希替尼的敏感性

Figure 5　Knockdown of LRRC31 enhanced the sensitivity of H1975 cells to osimertinib

EGFR基因属于受体酪氨酸激酶家族，在细胞增殖、分化和存活等多种生物过程中发挥着关键作用[24]。其突变激活可导致受体酪氨酸激酶持续活化，并进一步激活下游信号通路，包括大鼠肉瘤相关蛋白（rat sarcoma，RAS）/快速加速纤维肉瘤蛋白（rapidly accelerated fibrosarcoma，RAF）/丝裂原活化蛋白激酶激酶（mitogen-activated protein kinase kinase，MEK）/细胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase，ERK）和PI3K/AKT通路，从而促进细胞的增殖和存活[25-27]。EGFR信号通路已被证实可进入细胞核并调节DNA-PKcs的活性，从而促进DNA修复并促成肿瘤放射抗性[28-29]。而EGFR的激活突变（19外显子缺失、L858R等）特异性地消除了DNA-PKcs T2609位点的磷酸化，从而阻断EGFR与DNA-PKcs的结合，使肿瘤细胞对电离辐射高度敏感[30-31]。基于此提出假设：在EGFR突变的NSCLC细胞中，高表达的LRRC31可能作为一种“支架蛋白”，利用其LRR结构域，在空间上辅助突变型EGFR蛋白与其下

游的关键激酶（如Akt或ERK）形成复合体，进而放大促增殖信号。抑制LRRC31后，这一“支架”结构的受损可能导致Akt/MAPK信号转导效率下降，从而抑制增殖。上述推测目前尚缺乏直接的分子互作证据，仍需进一步实验验证。

本研究进一步发现，LRRC31在吉非替尼耐药细胞中显著上调，且表达水平与奥希替尼的IC_{50}值升高显著正相关。功能实验显示，LRRC31敲低可增强EGFR突变型NSCLC细胞对奥希替尼的应答，并改善耐药细胞的药物敏感性。这些结果提示，LRRC31可能通过影响EGFR下游效应网络，调节肿瘤细胞对EGFR-TKI的依赖性与应答能力。然而，该作用的具体机制，特别是其是否依赖作为“信号支架”调控EGFR/PI3K/Akt或MAPK通路的组织形式，仍需深入研究。综上所述，尽管本研究通过多维度分析与功能实验探索了LRRC31在EGFR突变型NSCLC中的潜在调控作用，但仍存在局限性。首先，TCGA-LUAD队列中EGFR突变组与野生型组样本量存在明显不平衡（60例和446例），可能对效应估计的精确性及统计效能产生一定影响。尽管本研究在差异表达分析中将性别、吸烟状态及病理分期纳入多变量模型进行校正，并通过比较未校正模型与多变量校正模型开展了模型设定敏感性分析，主要候选基因的效应方向及效应量总体保持一致，但上述分析仍不能完全排除样本量不均衡及未测量混杂因素对结果的潜在影响。其次，虽然LRRC31在不同EGFR基因型NSCLC细胞系中的蛋白表达变化方向与TCGA转录组分析结果一致，为生物信息学结果提供了进一步的实验支持，但目前尚缺乏独立且样本分布更加均衡的临床队列进行外部验证。此外，本研究尚未从分子互作层面直接证实LRRC31与突变型EGFR或其下游信号分子之间的作用关系，也缺乏体内模型对其功能及治疗价值的进一步验证。未来研究将重点通过免疫共沉淀、质谱分析及分子对接等手段，验证LRRC31与突变型EGFR及其下游关键激酶的物理相互作用。此外，还需要在体内动物模型及临床队列中进一步评价靶向LRRC31联合EGFR-TKI治疗的潜在治疗效果及其作为辅助生物标志物的临床意义。本研究提示LRRC31是EGFR突变型NSCLC进展过程中的潜在调控因子，但其作为治疗干预靶点的有效性、安全性以及与EGFR-TKI联合应用的潜在价值，仍需通过进一步系统研究进行验证。

利益冲突声明：

所有作者声明无利益冲突。

Conflict of Interests:

All authors declare no conflict of interests.

作者贡献声明：

沈诗逸和梁思勤负责实验内容和文章初稿撰写；王静负责课题设计和文章修改。

Author's Contributions:

Shen Shiyi and Liang Siqin were responsible for the experimental content and the initial draft of the article; Wang Jing designed the project design and revised the article.

[参考文献]

[1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263

[2] Gang X Y, Yan J S, Li X, et al. Immune checkpoint inhibitors rechallenge in non-small cell lung cancer: current evidence and future directions[J]. Cancer Lett, 2024, 604: 217241

[3] Dong X, Li R Y, Yao X J, et al. Strategies to optimize duration of immunotherapy in advanced NSCLC: current evidence and future directions[J]. Cancer Lett, 2026, 639: 218203

[4] Meyer M L, Fitzgerald B G, Paz-Ares L, et al. New promises and challenges in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer[J]. Lancet, 2024, 404(10454): 803-822

[5] 许杨悦，马 佩，束永前. 抗体偶联药物在肺癌靶向治疗中的临床研究进展[J]. 南京医科大学学报（自然科学版），2025，45（1）：98-104
Xu Y Y, Ma P, Shu Y Q. Clinical research progress of antibody-drug conjugates in targeted therapy for lung cancer[J]. Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences), 2025, 45(1): 98-104

[6] Huang Q, Li Y X, Huang Y D, et al. Advances in molecular pathology and therapy of non-small cell lung cancer[J]. Sig Transduct Target Ther, 2025, 10(1): 186

[7] Wu Y L, Zhou Q. Combination therapy for EGFR-mutated lung cancer[J]. N Engl J Med, 2023, 389(21): 2005-2007

[8] Roberts S K, Galgadas I, Clarke D T, et al. Targeting mutant EGFR in non-small cell lung cancer in the context of cell adaptation and resistance[J]. Drug Discov Today, 2025, 30(7): 104407

[9] Digiacomo N, De Pas T, Rossi G, et al. Exon-18-EGFR mutated transformed small-cell lung cancer: a case report and literature review[J]. Curr Oncol, 2023, 30(3): 3494-3499

[10] 夏 鹏，唐立钧，丁重阳，等. ^{18}F-FDG PET/CT预测肺腺癌EGFR基因突变状态的研究进展[J]. 南京医科大学学报（自然科学版），2022，42（6）：875-879

Xia P, Tang L J, Ding C Y, et al. Research progress of ^{18}F-FDG PET/CT in predicting EGFR gene mutation status in lung adenocarcinoma [J]. Journal of Nanjing Medical University(Natural Sciences), 2022, 42(6): 875-879

[11] 崔久嵬, 段建春, 任胜祥, 等. 三代EGFR-TKI在EGFR突变NSCLC治疗中应用的专家共识(2022年版)[J]. 中国肺癌杂志, 2022, 25(9): 627-641
Cui J W, Duan J C, Ren S X, et al. Expert consensus on the application of third-generation EGFR-TKIs in the treatment of EGFR-mutant NSCLC(2022 Edition)[J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2022, 25(9): 627-641

[12] Corvaja C, Passaro A, Attili I, et al. Advancements in fourth-generation EGFR TKIs in EGFR-mutant NSCLC: Bridging biological insights and therapeutic development[J]. Cancer Treat Rev, 2024, 130: 102824

[13] Yao X Y, Gao C D, Sun C G, et al. Epigenetic code underlying EGFR-TKI resistance in non-small cell lung cancer: elucidation of mechanisms and perspectives on therapeutic strategies[J]. Drug Discov Today, 2025, 30(3): 104321

[14] Fu K, Xie F C, Wang F, et al. Therapeutic strategies for EGFR-mutated non-small cell lung cancer patients with osimertinib resistance[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 173

[15] Basse C, Chabanol H, Bonte P E, et al. Management of cutaneous toxicities under amivantamab(anti MET and anti EGFR bispecific antibody) in patients with metastatic non-small cell lung cancer harboring EGFR Exon20ins: towards a proactive, multidisciplinary approach[J]. Lung Cancer, 2022, 173: 116-123

[16] Xu X P, Liu Y, Gong Q, et al. PARP1 promotes EGFR-TKI drug-resistance *via* PI3K/AKT pathway in non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2024, 94(2): 209-221

[17] Liao J, Yao W X, Yu Y, et al. Targeting TROP2 in drug-tolerant persister cells delays EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance in non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Cell, 2026, 44(7): 1401-1417

[18] Moody T W, Ramos-Alvarez I, Iordanskaia T, et al. Gastrin-releasing peptide receptors stimulate MAPK-mediated growth of lung cancer cells by transactivating HER4 in a neuregulin-1, MAP kinase-dependent manner requiring activation of the ROS-system[J]. Biology, 2025, 14(9): 1225

[19] Kang K, Liu S H, Yao Z R, et al. Addressing clinical needs in NSCLC immunotherapy: mechanisms of resistance and promising combination strategies[J]. Cell Rep Med, 2025, 6(9): 102315

[20] Planchard D, Jänne P A, Cheng Y, et al. Osimertinib with or without chemotherapy in EGFR-mutated advanced NSCLC[J]. N Engl J Med, 2023, 389(21): 1935-1948

[21] Janne P, Planchard D, Cheng Y, et al. PL03.13 osimertinib with/without platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with EGFRm advanced NSCLC (FLAURA2)[J]. J Thorac Oncol, 2023, 18(11): S36-S37

[22] Huang J J, Liang L, Jiang S Y, et al. BDH1-mediated LRRC31 regulation dependent on histone lysine β-hydroxybutyrylation to promote lung adenocarcinoma progression[J]. Med Comm, 2023, 4(6): e449

[23] Chen Y K, Jiang T, Zhang H Y, et al. LRRC31 inhibits DNA repair and sensitizes breast cancer brain metastasis to radiation therapy[J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(10): 1276-1285

[24] Levantini E, Maroni G, del Re M, et al. EGFR signaling pathway as therapeutic target in human cancers [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 85: 253-275

[25] Jiang Q W, Zhang D Y, Liu J, et al. HPIP is an essential scaffolding protein running through the EGFR-RAS-ERK pathway and drives tumorigenesis[J]. Sci Adv, 2023, 9(23): eade1155

[26] Li X X, Guo Y D, Yang S Z. A pathway-dependency framework for acquired resistance to targeted therapy in EGFR-mutant, KRAS $G^{12}C$-mutant, and BRAF V600E-mutant NSCLC[J]. Pharmacol Res, 2026, 231: 108367

[27] Li J X, Li Y, Li Z Y, et al. *Ulva*-derived extracellular vesicles alleviate liver injury through a 7-hydroxycoumarin-associated EGFR-AKT regulatory axis[J]. Food Funct, 2026, 17(16): 7463-7477

[28] Fang T C, Zhang Y R, Chang V Y, et al. Epidermal growth factor receptor-dependent DNA repair promotes murine and human hematopoietic regeneration[J]. Blood, 2020, 136(4): 441-454

[29] Minjgee M, Toulany M, Kehlbach R, et al. K-RAS(V12) induces autocrine production of EGFR ligands and mediates radioresistance through EGFR-dependent Akt signaling and activation of DNA-PKcs[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011, 81(5): 1506-1514

[30] Javvadi P, Makino H, Das A K, et al. Threonine 2609 phosphorylation of the DNA-dependent protein kinase is a critical prerequisite for epidermal growth factor receptor-mediated radiation resistance[J]. Mol Cancer Res, 2012, 10(10): 1359-1368

[31] Das A K, Sato M, Story M D, et al. Non-small-cell lung cancers with kinase domain mutations in the epidermal growth factor receptor are sensitive to ionizing radiation[J]. Cancer Res, 2006, 66(19): 9601-9608

(收稿: 2026-01-06; 修回: 2026-08-20; 录用: 2026-08-24)
(本文编辑: 戴王娟)