·基础研究·

双靶点阻滞对肺腺癌细胞的协同抑制作用及其可能机制

王亚丽[1],吴 峰[1*],牟晓燕[2],胡 锋[1],陶玉坚[1],黄玉民[1],胡 涛[1],邵向荣[1]
([1] 扬州市第一人民医院呼吸科,扬州 225002;[2] 山东大学附属省立医院呼吸科,济南 250021)

【摘 要】 **目的** 探讨联合阻断表皮生长因子受体(EGFR)和环氧合酶-2(COX-2)对肺腺癌A549细胞株的协同抑制作用及其可能机制。**方法** 采用不同药物干预肺癌A549细胞株,分为4组:正常对照组、单药吉非替尼组、单药塞来昔布组、联合用药组。药物干预细胞48 h后台盼蓝(trypan blue)染色法检测药物对细胞生长的影响;以Hoechst33258染色法和流式细胞术观察用药前后细胞凋亡和细胞周期的变化。采用Western blot检测EGFR和COX-2蛋白的表达情况。**结果** 随着时间和剂量增加,单药吉非替尼与塞来昔布对A549细胞的抑制作用增强,加药48 h,联合用药组抑制率明显高于单药组($P<0.01$)。联合用药组细胞凋亡率明显高于单独用药组(32.40% *vs* 7.12%和8.43%;$P<0.01$)。联合用药组S期细胞比例为(3.2±0.9)%,较单药吉非替尼组[(37.4±1.6)%]和单药塞来昔布组[(21.0±3.1)%]明显减少($P<0.01$);联合用药组G_0/G_1期细胞比例为(87.2±6.4)%,较单药吉非替尼组[(61.4±5.2)%]和单药塞来昔布组[(51.8±4.7)%]明显增加($P<0.01$)。与单独用药组比较,联合用药组EGFR和COX-2蛋白的表达明显减弱($P<0.05$)。**结论** 联合用药通过EGFR和COX-2双靶点阻滞发挥作用,有望为肺癌的化学预防和治疗提供新的策略。

【关键词】 塞来昔布;吉非替尼;细胞周期;细胞凋亡;表皮生长因子受体;环氧合酶-2
【中图分类号】 R734.2 【文献标识码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.12.222

Synergistic inhibitory effect of blocking both EGFR-and COX-2-related pathways on lung cancer A549 cells and its underlying mechanism

WANG Ya-Li[1], WU Feng[1*], MOU Xiao-Yan[2], HU Feng[1], TAO Yu-Jian[1], HUANG Yu-Min[1], HU Tao[1], SHAO Xiang-Rong[1]
([1]Department of Respiratory Diseases, The First People's Hospital of Yangzhou, Yangzhou 225002, China; [2]Department of Respiratory Diseases, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the synergic effect of simultaneously blocking epidermal growth factor receptor (EGFR) and cyclooxygenase-2 on the growth inhibition of human lung cancer A549 cells. **Methods** The A549 cells were treated by gefitinib (5 μmol/L), celecoxib (25 μmol/L), or a combination of them at the same dosages respectively for 48 h, and the cells without treatment served as control. Cell growth was detected by trypan-blue exclusion assay, apoptosis rate and cell cycle were measured by flow cytometry and Hoechst33258 staining, expression of EGFR and COX-2 proteins was determined by Western blotting. **Results** With time and dose increase, both gefitinib and celecoxib showed stronger inhibitory effect on the growth of A549 cells, and the combination of them had more significant inhibitory effect than the gefitinib and celecoxib groups ($P<0.01$). The combination group also had obvious higher apoptosis rate than the monotherapy groups (32.40% *vs* 7.12% and 8.43%, $P<0.01$). The proportion of the cells at S stage was (3.2±0.9)% in the combination group, significantly decreased when compared with those in the gefitinib and celecoxib groups [(37.4±1.6)%, (21.0±3.1)%, $P<0.01$]. The combination group had obviously more cells arrested at G_0/G_1 stage than the monotherapy groups [(87.2±6.4)% *vs* (61.4±5.2)% and (51.8±4.7)%, $P<0.01$]. The protein levels of EGFR and COX-2 were significantly lower in the combination group than the other 2 groups ($P<0.05$). **Conclusion** The combination treatment of gefitinib and celecoxib exerts inhibitory effect through blocking both EGFR- and COX-2-related pathways, and the regimen might provide a promising strategy for cancer therapy and chemoprevention in lung cancer.

【**Key words**】 celecoxib; gefitinib; cell cycle; cell apoptosis; epidermal growth factor receptor; cyclooxygenase-2
This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2009CM1250).
Corresponding author: *WU Feng*, *E-mail*: *yzwufeng888@163.com*

收稿日期: 2016-05-20; **修回日期**: 2016-08-03
基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2009CM1250)
通信作者: 吴 峰, E-mail: yzwufeng888@163.com

肺腺癌起病隐匿,进展迅速,病死率高,化疗疗效欠佳,且不良反应严重[1],分子靶向治疗是目前肺癌研究的热点,取得了迅速的进展。分子靶向治疗的靶点是指具有重要生理或病理功能,能够与药物相结合并产生药理作用的生物大分子及其特定的结构位点。其中,针对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和环氧合酶-2(cyclooxygenase, COX-2)的靶向治疗是临床研究较为成熟的类型。

越来越多证据表明[2],EGFR和COX-2信号途径共同导致肿瘤的发生发展。活化EGFR信号途径或增强COX-2来源的前列腺素表达,与肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭、转移密切相关。COX-2可诱导花生四烯酸合成前列腺素,是预防和治疗癌症的靶点之一,在许多恶性病变中过表达,参与恶性肿瘤的增殖和浸润转移,选择性COX-2抑制剂塞来昔布(celecoxib)对多种恶性肿瘤的发生和发展都有明显的抑制作用[3]。而EGFR是一个跨膜糖蛋白,具有内在酪氨酸激酶活性,与配体结合调节细胞的生长,其在肺腺癌中过度表达,并与肺癌的发生、发展、侵袭、转移关系密切[4]。临床应用于非小细胞肺癌靶向治疗的表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKI)主要有吉非替尼(gefitinib)和厄洛替尼(erlotinib),是目前最有前途的特异性肿瘤靶向治疗分子之一,适用于化疗失败或不能耐受的非小细胞肺癌患者[5,6]。但单药疗效有限,部分患者对单药存在原发性或继发性耐药。

肺癌的发生、发展涉及多个发病环节,治疗的靶点可以是生长因子受体、癌基因和抑癌基因、肿瘤转移关键分子和途径、血管形成关键分子和途径、耐药基因及其产物等。肺癌的治疗需要同时调控多个分子靶点。在肺癌治疗中同时针对两个不同的靶点治疗是一种有效的缩小肿瘤、阻断侵袭、预防远处转移的手段。目前国外在头颈部肿瘤等研究中[7,8]显示EGFR信号传导通路能增强有丝分裂原激活的蛋白激酶活化,导致激活蛋白-1介导的COX-2的转录和前列腺素E2的合成增强,而COX-2衍生的前列腺素E2可以刺激EGFR信号的传导。因此,EGFR和COX-2信号途径协同作用、交叉对话,共同促进肿瘤的发生、发展,包括细胞增殖、凋亡,血管生成和侵袭。本文研究双靶点阻滞EGFR和COX-2信号途径对肺腺癌细胞的抑制作用,并探讨联合作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料及分组

兔抗人EGFR多克隆抗体和兔抗人COX-2多克隆抗体(武汉博士德公司产品),4℃保存备用。蛋白提取试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒(上海申能博彩公司)。人肺腺癌细胞株A549由山东大学附属省立医院中心实验室惠赠。实验用药物在无菌状态下研磨,用适量二甲基亚砜(DMSO)配成母液,所有实验中的DMSO终浓度均<0.1%[9]。前期预实验阶段通过MTT研究发现,吉非替尼(5 μmol/L)联合塞来昔布(25 μmol/L)组抑制率较高,且细胞大片死亡率少,更有利于研究凋亡、细胞周期以及靶蛋白的表达;增加联合药物剂量,联合用药组细胞大片死亡。根据Chen等[10]研究结果,故联合用药组剂量分别选用吉非替尼5 μmol/L和塞来昔布25 μmol/L。本研究分为4组,A组:正常对照组;B组:单药吉非替尼(5 μmol/L);C组:单药塞来昔布(25 μmol/L);D组:吉非替尼(5 μmol/L)+塞来昔布(25 μmol/L)联合用药组,均以RPMI 1640培养液配置浓度。

1.2 Hoechst33258染色法检测细胞凋亡率

贴壁A549细胞以5×10^5/ml密度接种于含玻片的12孔培养板,设正常对照组、吉非替尼组、塞来昔布组、联合用药组。37℃、5% CO_2孵箱中培养至细胞贴壁,实验药物干预后继续培养48 h,4%多聚甲醛固定20 min,PBS洗2遍,每次3 min,加入10 mg/L Hoechst 33258的染液,37℃孵育30 min,荧光显微镜观察、照像。同一处理方法随机选择至少10个观察视野,计算细胞凋亡率。凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数×100%。通过金正均法计算联合用药在促进细胞凋亡方面是否具有协同作用。$q=Ea+b/(Ea+Eb-Ea\times Eb)$,Ea+b为联合处理组细胞凋亡率,Ea、Eb分别为应用a药和b药单纯处理的细胞凋亡率。q值在0.85~1.15间时为两药单纯相加,$q>1.15$为两药合用有协同作用,$q<0.85$为两药合用有拮抗作用。

1.3 流式细胞术检测细胞周期的变化

取对数生长期A549细胞培养24 h,设正常对照组、吉非替尼组、塞来昔布组、联合用药组。药物干预48 h,收集细胞,制成1×10^6/ml的单细胞悬液,冷PBS洗涤2次,制成单细胞悬液,快速加入预冷的70%乙醇,4℃固定,1000转/min离心5 min,弃上清液,RNA消化30 min,加1 ml碘化丙啶(0.05 g/L)调整细胞密度为1×10^6/L,4℃避光染色

30 min，上样。流式细胞仪检测（激发光波长为 488 nm）、实验重复 3 次。用 Multicycle for windows 软件分析细胞周期分布的变化。计算出各周期细胞的百分率。

1.4 台盼蓝（Trypan Blue）染色法检测细胞抑制率

取对数生长期细胞，每孔 100 μl 接种于 96 孔培养板中，37℃、5% CO_2 条件下培养，分别加入不同终浓度的吉非替尼（0.5，1，10，25，50，100，150 μmol/L）、塞来昔布（15，20，25，50，100，150，200 μmol/L）、吉非替尼（5 μmol/L）+ 塞来昔布（25 μmol/L）、RPMI 1640 全培养液的空白对照，另设溶剂 DMSO 对照组，每组设置 5 个平行复孔。置培养箱中继续培养 24，48 和 72 h 后，胰酶消化贴壁细胞，制备单细胞悬液，并作适当稀释，台盼蓝（Trypan Blue）法染色。在 3 min 内，分别计数活细胞和死细胞。镜下观察，死细胞被染成明显的蓝色，而活细胞拒染呈无色透明状。统计细胞活力：活细胞率（%）= 活细胞总数/（活细胞总数 + 死细胞总数）× 100%

1.5 Western blot 检测 EGFR 和 COX-2 蛋白的表达

细胞培养及处理方法同上，收集 1×10^6 个细胞，PBS 洗 2 次，超声裂解细胞液于 EP 管，用 BCA 法，紫外分光光度计在 562nm 处检测吸光度值，用标准蛋白拟合曲线，计算蛋白浓度，确定上样量。提取蛋白并上样后进行 15% SDS-PAGE 电泳分离，然后电转移至硝酸纤维素膜上。放入培养皿中，用含 5% 脱脂奶粉 TBST 封闭 1 h 后，洗膜后加入 1∶100 兔抗人 EGFR 的多克隆抗体 4℃过夜。再次洗膜，用辣根过氧化物酶偶联羊抗兔 Ig G 孵育 1 h，充分洗膜后进行显色、曝光、显影、定影。应用 LAS-4000 凝胶成像显影（FUJI Gauge Ver. 3.0 凝胶图像分析系统），以电泳图中各目的条带分别与 β-actin 条带的光密度比值作为目的蛋白的相对表达量。相对系数 = 目的条带表达强度/β-actin 表达强度，以此进行半定量分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。两组间数据比较采用 t 检验；多组间数据比较采用方差分析。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 双靶点阻滞对细胞凋亡的影响

Hoechst33258 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染色剂。荧光显微镜下，活细胞核呈弥散均匀荧光，出现细胞凋亡时，细胞核或细胞质内见浓染致密的颗粒状荧光，并可见凋亡小体。与正常对照组相比，吉非替尼、塞来昔布单药均可引起 A549 细胞凋亡（$P < 0.05$），48 h 后联合用药组凋亡率高达 32.40%，与吉非替尼组（7.12%）和塞来昔布组（8.43%）相比，差异均具有统计学意义（$P < 0.01$；图 1）。通过金正均法计算得 $q = 1.89$，说明吉非替尼与塞来昔布联用具有协同促进 A549 细胞凋亡作用。

2.2 双靶点阻滞对细胞周期的影响

单药吉非替尼和塞来昔布组 S% 分别为（37.4 ± 1.6）% 和（21.0 ± 3.1）%，G_0/G_1% 分别为（61.4 ± 5.2）% 和（51.8 ± 4.7）%，提示吉非替尼、塞来昔布均引起 $G_0 \sim G_1$ 期阻滞。与单药组相比，联合用药组 S 期细胞比例明显减少（$P < 0.01$），G_0/G_1 期细胞比例明显增加（$P < 0.01$），由此可见联合用药 $G_0 \sim G_1$ 期阻滞作用增强（表 1）。

2.3 双靶点阻滞对细胞生长抑制作用

台盼蓝是细胞活性染料，活细胞不会被染成蓝色，而死细胞会被染成淡蓝色。检测结果显示，药物

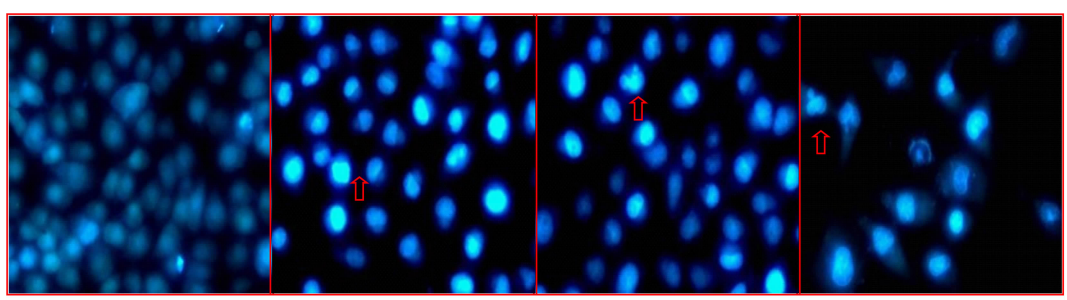


图 1 Hoechst33258 染色法检测 A549 细胞凋亡率

Figure 1 The apoptosis rate of A549 cell measured by Hoechst33258 staining（×200）

A：normal control group for 48 h；B：5 μmol/L gefitinib for 48 h；C：25 μmol/L celecoxib for 48 h；D：5 μmol/L Gefitinib +25 μmol/L Celecoxib for 48 h. The arrows show apoptotic body

表1 吉非替尼和塞来昔布单独或联合作用后A549细胞周期的变化

Table 1 Changes of cell cycle distribution treated with gefitinib, celecoxib alone or in combination (%)

Group	G_0/G_1	S	G_2
Control	11.2±2.2	58.9±5.2	29.9±2.9
Gefitinib(5 μmol/L)	61.4±5.2**##	37.4±1.6**##	1.2±0.3**#
Celecoxib(25 μmol/L)	51.8±4.7**##	21.0±3.1**##	27.2±2.4#
Gefitinib(5 μmol/L) + Celecoxib (25 μmol/L)	87.2±6.4**	3.2±0.9**	9.6±1.4*

Compared with control group, *$P<0.05$, **$P<0.01$; compared with gefitinib (5 μmol/L) + celecoxib (25 μmol/L) group, #$P<0.05$, ##$P<0.01$

作用48 h后,单药吉非替尼和塞来昔布对细胞的抑制作用具有剂量依赖性,同种药物各剂量间细胞抑制率差异具有统计学意义($P<0.01$),在浓度1~150 μmol/L间,相同剂量吉非替尼和塞来昔布作用48 h后细胞抑制率之间差异具有统计学意义($P<0.05$;图2)。5 μmol/L吉非替尼和25 μmol/L塞来昔布单独或联合作用不同时间,相同剂量同种药物不同作用时间组细胞抑制率差异亦具有统计学意义($P<0.01$;图3),但联合用药组24 h和48 h组间无明显差异($P>0.05$)。加药48 h,单药吉非替尼(5 μmol/L)和塞来昔布(25 μmol/L)细胞抑制率分别为(24.8±2.1)%和(21.5±1.7)%,吉非替尼(5 μmol/L)联合塞来昔布(25 μmol/L)组抑制率为(58.2±4.6)%,明显高于单药组($P<0.01$;图3)。

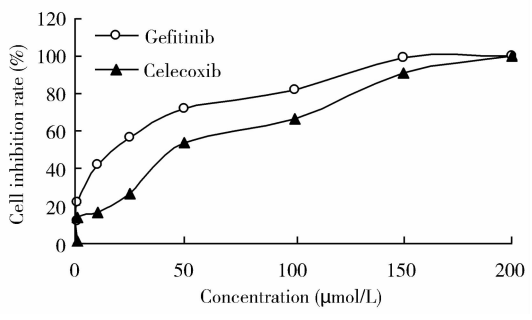


图2 不同剂量药物作用48 h后细胞生长抑制曲线

Figure 2 Cell growth inhibition curve in different doses of drug

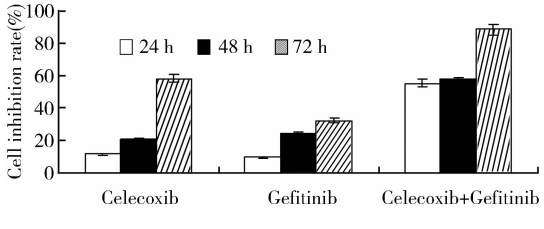


图3 5 μmol/L吉非替尼和25 μmol/L塞来昔布单独或联合作用不同时间对细胞生长的抑制作用

Figure 3 Cell growth inhibition induced by 5 μmol/L gefitinib and 25 μmol/L celecoxib alone or in combination in different time

2.4 Western blot检测联合作用对EGFR和COX-2蛋白的影响

药物处理后将各组细胞裂解并进行免疫印迹测定蛋白表达情况(图4),用FUJI Gauge Ver. 3.0凝胶图像分析系统进行蛋白条带灰度分析。在正常A549细胞中两者EGFR和COX-2均高表达。联合用药D组(5 μmol/L吉非替尼+25 μmol/L塞来昔布)EGFR和COX-2的表达明显降低,与B组(5 μmol/L吉非替尼)和C组(25 μmol/L塞来昔布)相比差异均具有统计学意义($P<0.05$;图4)。

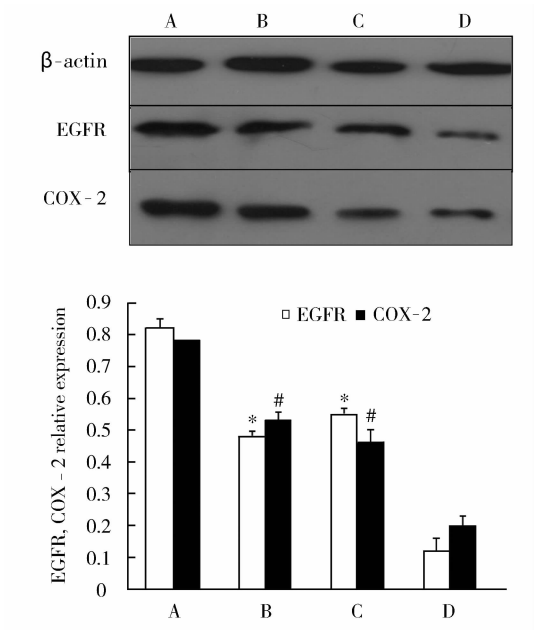


图4 Western blot检测吉非替尼和塞来昔布单独或联合作用后EGFR和COX-2蛋白的表达

Figure 4 The expression of EGFR and COX-2 determined by Western blot treated with gefitinib, celecoxib alone or in combination

EGFR: epidermal growth factor receptor; COX-2: cyclooxygenase. A: normal control group for 48 h; B: 5 μmol/L gefitinib for 48 h; C: 25 μmol/L celecoxib for 48 h; D: 5 μmol/L gefitinib + 25 μmol/L celecoxib for 48 h. Compared with 5 μmol/L gefitinib + 25 μmol/L celecoxib(D), *$P<0.05$(EGFR), #$P<0.05$(COX-2)

3 讨 论

肺腺癌是最常见的恶性肿瘤之一,除传统手术和放、化疗外,针对 EGFR 的靶向药物是目前全球研究热点之一,在发挥更强的抗肿瘤活性的同时,减少对正常细胞的毒副作用,在临床实践中取得了显著的疗效[11-13]。吉非替尼是靶向 EGFR 的成熟的抗肿瘤药物,国内外研究表明,吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌的肿瘤缓解率 9% ~37%,症状缓解率 35% ~42%[14,15]。而美国 Emory 大学研究显示,另一个临床抗肿瘤药物环氧合酶 2 抑制剂塞来昔布,可能通过激活外源性死亡受体通路诱导肺癌细胞的凋亡。

肺癌的增殖与转移是多基因共同参与、协同作用的结果,单一阻断一个信号通路不能完全阻滞肺癌的发生、发展,且常常因肿瘤耐药而使靶向作用消失。双靶点阻滞可通过干扰多个信号激酶的活性而发挥协同作用抑制肿瘤细胞的生长和转移,从而提高药物疗效。因此,多靶点治疗的疗效明显优于单靶点药物的治疗效果。2016 年 Reckamp 等[16]研究显示,厄洛替尼联合塞来昔布组较单独用药组能显著延长 EGFR 野生型肺腺癌患者无进展生存期(3.2 *vs* 1.8 个月,$P=0.03$),在 EGFR 野生型人群中的有效性得到显著改善,需要进一步的研究来探讨具有 COX-2 依赖性的 EGFR-TKI 疗法的机制。目前国内外研究多选用 EGFR 高突变型细胞株 HCC827,对 EGFR 野生型细胞株研究相对较少,因此本研究通过探讨双靶点阻滞 EGFR 和 COX-2 信号途径对肺腺癌 EGFR 野生型 A549 细胞的杀伤和促凋亡作用,旨在为 EGFR 抑制剂与环氧合酶 -2 抑制剂联合应用于肺癌治疗提供一些新思路与新方法。

尽管 EGFR 和 COX-2 在肺腺癌细胞的发生、发展过程中发挥不同的生物学效应,但是越来越多证据表明 EGFR 和 COX-2 两种信号途径相互促进、共同激活,EGFR 和 COX-2 的协同高表达往往预示着肿瘤的不良预后和高复发[17]。本实验研究结果显示肺腺癌细胞中有环氧合酶 -2 和表皮生长因子受体协同高表达,EGFR 和 COX-2 信号通路共同参与调控肿瘤细胞的增生,作用 48h 后吉非替尼和塞来昔布对肺腺癌细胞的增殖有明显抑制作用,且呈剂量依赖性,两者联用抑制作用明显高于单药组。同时,我们通过 Hoechst33258 染色法和流式细胞术发现,双靶点阻断 EGFR 和 COX-2 信号途径能协同抑制肺腺癌 A549 细胞的增殖,主要机制为协同诱导凋亡和共同的 G_0/G_1 周期阻滞。各种抗凋亡基因和促凋亡基因的表达异常是各种肿瘤发生的重要原因。许多抗肿瘤药物对细胞周期有特异的阻断作用,并可诱发细胞凋亡,而凋亡也常伴有生长抑制。

国外最新研究表明[1,2,10,18],前列腺素 E2 通过诱导 EGFR 和 ERK 磷酸化共同活化 EGFR 和 COX-2。另外,在直肠癌细胞中发现 COX-2 的高表达通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)途径的激活诱导 EGFR 的表达,而 EGFR配体转化生长因子 α 可以通过 MAPK 途径诱导 COX-2 表达。因此,针对 EGFR 和 COX-2 双靶点治疗,可以协同阻滞 EGFR 和 COX-2 双信号途径及其下游靶分子。EGFR 和 COX-2 信号通路协同参与调控肿瘤基因转录,肿瘤细胞增殖、凋亡抑制以及远处转移等。本试验采用 Western blot 研究发现,联合用药组 EGFR 和 COX-2 蛋白的表达与单药组相比均明显降低。提示两药联用同时增强了对两个信号途径的抑制作用。Zhang 等[18]在头颈部肿瘤裸鼠模型中研究发现,联合阻断 EGFR 和 COX-2 信号途径能明显抑制肿瘤细胞生长,具体机制如下:下调磷酸化的 EGFR,降低前列腺素 E 生成,下调血管内皮生长因子和 ki67 表达,而在小干扰 RNA 介导的 EGFR 和 COX-2 双重基因的沉默中进一步证实双靶点阻滞的协同作用。因此,EGFR 和 COX-2 信号途径交叉对话,在肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移以及上皮间质化等途径中具有重要意义。联合阻滞 EGFR 和 COX-2 信号途径对肺癌 A549 细胞具有协同抑制作用,这为肺腺癌的预防和治疗提供了新思路和新策略,但是这种协同作用需要进一步的体内试验和临床研究证实。

【参考文献】

[1] Li HH, Su F, Li J, *et al*. Effects of celecoxib and gefitinib on apoptosis of HCC827 cells and their action mechanism[J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2015, 22(6): 21-27. [李焕焕, 苏 帆, 李 晶, 等. 塞来昔布联合吉非替尼对 HCC827 细胞凋亡影响机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(6): 21-27.]

[2] Bai XY, Mu XY, Jiang SJ, *et al*. Erlotinib combined with celecoxib inhibits the growth of lung cancer A549 ce11s by simultaneously blocking EGFR and COX-2[J]. Basic Clin Med, 2011, 31(1): 19-24. [白小燕, 牟晓燕, 姜淑娟, 等. 厄洛替尼联合塞来昔布阻断 EGFR 和 COX-2 抑制肺癌 A549 细胞增殖[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(1): 19-24.]

[3] Setiawati A, Setiawati A. Celecoxib, a COX-2 selective inhibitor, induces cell cycle arrest at the G2/M phase in HeLa cervical cancer cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(4): 1655-1660.

[4] Guan J, Chen M, Xiao N, *et al*. EGFR mutations are associated with higher incidence of distant metastases and smaller tumor size in patients with non-small-cell lung cancer based on PET/CT scan[J]. Med Oncol, 2016, 33(1): 1.

[5] Hong D, Zhang G, Zhang X, *et al*. Pulmonary toxicities of gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(9): e3008.

[6] Sculier JP, Berghmans T, Meert AP, *et al*. Advance in target therapy in lung cancer[J]. Eur Respir Rev, 2015, 24(135): 23-29.

[7] Zhang YZ, Chen X, Fan XX, *et al*. Compound library screening identified cardiac glycoside digitoxin as an effective growth inhibitor of gefitinib-resistant non-small cell lung cancer *via* downregulation of α-tubulin and inhibition of microtubule formation [J]. Molecules, 2016, 21(3): 374.

[8] Damaraju VL, Scriver T, Mowles D, *et al*. Erlotinib, gefitinib, and vandetanib inhibit human nucleoside transporters and protect cancer cells from gemcitabine cytotoxicity[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(1): 176-186.

[9] Augustine-Rauch KA, Zhang Q, Kleinman M, *et al*. A study of vehicles for dosing rodent whole embryo culture with non aqueous soluble compounds [J]. Reprod Toxicol, 2004, 18(3): 391-398.

[10] Chen Z, Zhang X, Li M, *et al*. Simultaneously targeting epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and cyclooxygenase-2, an efficient approach to inhibition of squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(17): 5930-5939.

[11] Ghosh N, Chaki R, Mandal V, *et al*. COX-2 as a target for cancer chemotherapy[J]. Pharmacol Rep, 2010, 62(2): 233-244.

[12] Kazandjian D, Blumenthal GM, Yuan W, *et al*. FDA approval of gefitinib for the treatment of patients with metastatic EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(6): 1307-1312.

[13] Patil V, Karpe A, Noronha V, *et al*. Efficacy of second-line erlotinib in patients postprogression of first-line chemotherapy in head and neck cancers [J]. Indian J Cancer, 2015, 52(4): 629-631.

[14] Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, *et al*. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-Ⅳ, open-label, single-arm study[J]. Br J Cancer, 2014, 110(1): 55-62.

[15] Yosmadja Y, Silva S, Dickson JM, *et al*. Binding mode of the breakthrough inhibitor AZD9291 to epidermal growth factor receptor revealed[J]. J Struct Biol, 2015, 192(3): 539-544.

[16] Reckamp KL, Koczywas M, Cristea MC, *et al*. Randomized phase 2 trial of erlotinib in combination with high-dose celecoxib or placebo in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. Cancer, 2015, 121(18): 3298-3306.

[17] Gagliano T, Gentilin E, Tagliati F, *et al*. Inhibition of epithelial growth factor receptor can play an important role in reducing cell growth and survival in adrenocortical tumors [J]. Biochem Pharmacol, 2015, 98(4): 639-648.

[18] Zhang X, Chen ZG, Choe MS, *et al*. Tumor growth inhibition by simultaneously blocking EGFR and cyclooxygenase-2 in a xenograft model[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(17): 6261-6269.

(编辑: 周宇红)