

厄洛替尼与西妥昔单抗联合应用治疗吉非替尼耐药NSCLC的疗效

王 勐 赵晓亮 张连民 刘 俊 朱建权 王长利

摘要 目的:本研究通过EGFR-TKI和EGFR单克隆抗体联合应用探讨治疗EGFR突变阴性和EGFR T790M突变继发性耐药的NSCLC的疗效。**方法:**应用EGFR突变阴性和EGFR T790M突变继发性耐药的NSCLC细胞原代培养及药敏技术检验EGFR-TKI和EGFR单克隆抗体联合应用的疗效。**结果:**检测厄洛替尼和西妥昔单抗联合处理对于15例EGFR突变阴性和8例T790M突变阳性的继发性耐药的NSCLC患者原代细胞的影响,应用浓度分别为50 $\mu\text{g/mL}$ 西妥昔单抗和1 μM 厄洛替尼作用于EGFR突变阴性的NSCLC患者原代细胞,结果显示这三组间T/C值无显著性差异($P>0.05$),对于T790M突变阳性的继发性耐药的NSCLC原代细胞这三组间T/C值有显著性差异($P<0.05$),联合用药组疗效明显高于单药组。**结论:**进一步验证了厄洛替尼和西妥昔单抗联合应用对于EGFR突变阴性的NSCLC患者无效,但对于T790M突变阳性的继发性耐药的NSCLC患者有效。

关键词 非小细胞肺癌 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 西妥昔单抗 表皮生长因子受体
胶原凝胶体包埋药敏检测

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2011.24.007

Combined Erlotinib and Cetuximab Overcome the Acquired Resistance to Gefitinib NSCLC

Meng WANG, Xiaoliang ZHAO, Lianmin ZHANG, Jun LIU, Jianquan ZHU, Changli WANG

Correspondence to: Changli WANG, E-mail: wangchangli@medmail.com.cn

Department of Lung cancer, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin, Tianjin 300060, China

Abstract Objective: To investigate if the combination of erlotinib and cetuximab can overcome drug resistance in NSCLC with the T790M mutation and enhance the effects in NSCLC without somatic mutations in their epidermal growth factor receptors (EGFR). **Methods:** The effects of the combination of erlotinib and cetuximab in the primary NSCLC cells with the T790M and L858R mutations and without somatic mutations in their EGFR were investigated. **Results:** The effects of the combination of cetuximab and erlotinib on the growth of EGFR TKI-resistant primary NSCLC cells with T790M mutation and without EGFR mutation suspension *in vitro* were investigated. The combination had a more pronounced growth inhibition than the single-agent treatment in the primary NSCLC cells with T790M mutation ($P < 0.05$), but not in the primary NSCLC cells without EGFR mutation. **Conclusion:** The current data suggest that the combination of erlotinib and cetuximab is an effective strategy for the treatment of patients with EGFR TKI-resistant NSCLC and indicate combined EGFR targeting as a clinically exploitable strategy.

Keywords NSCLC; Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors; Cetuximab; EGFR;
Collagen gel droplet embedded culture-drug sensitivity test

随着肺癌的分子靶向治疗研究的不断深入,以吉非替尼和厄洛替尼为代表的表皮生长因子酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)已应用于NSCLC的二、三线治疗,且给部分NSCLC患者带来了显著的疗效^[1-4],同时以西妥昔(cetuximab)为代表的EGFR单克隆抗体在NSCLC中的Ⅲ期临床试验正在进行中。但是单独应用EGFR-TKI仅使NSCLC中的少部分患者受益,而EGFR单克隆抗体在NSCLC中的疗效目前仍然不肯定。

目前多数文献报道EGFR突变患者TKI治疗的缓解率为77%(30%~100%,多数报道>60%),而无

突变者仅10%(0~33%)^[5-9]。EGFR-TK区域突变使EGFR配体依赖性激活效应增强,同时增加了对TKI治疗的敏感性,文献报道这种有效的EGFR突变多集中在19和21号外显子上^[10],该类突变增加了EGFR与EGFR-TKI的亲合性^[11-13]。

但是在有EGFR突变的患者中应用吉非替尼1年后大部分NSCLC患者产生耐药^[14-15],病情发生明显进展,随后研究发现耐药的主要原因是由于这部分患者产生了T790M突变,因此产生了继发性耐药,从而使病情进展^[16-21],目前针对这类继发性耐药的患者无有效的治疗方案,各种方法均处于实验阶段。

本研究根据EGFR的突变状态,将NSCLC分为三类:第一类是具有EGFR 19号或21号外显子突变的NSCLC患者,这部分患者对EGFR-TKI高度敏感,单纯给予吉非替尼治疗明显有效;第二类是EGFR 19号或21号外显子突变阴性的NSCLC患者,对于这类患者目前单独应用吉非替尼多数无效,即吉非替尼的原发性耐药;第三类是具有EGFR 19号或21号外显子突变的NSCLC患者,但应用吉非替尼一段时间后产生继发性耐药即EGFR T790M突变的继发性耐药,这类NSCLC患者再继续单独应用吉非替尼已经无效。目前对于上述第二、三类NSCLC患者临床无有效的治疗手段。由于厄洛替尼和西妥昔单抗这两类药物作用机制的不同,而且有研究认为这两种药物联合应用可以提高疗效,增强吉非替尼对原发及继发性耐药的NSCLC的疗效,本研究分别对上述两类突变类型NSCLC进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

厄洛替尼购于罗士公司,西妥昔单抗购于默克公司。

1.2 方法

1.2.1 EGFR测序 2008年2月至2009年10月天津医科大学附属肿瘤医院肺癌中心留取吉非替尼原发及继发耐药的肺非小细胞肺癌患者新鲜组织标本,从中提取DNA后送大连保生物和上海天昊遗传分析中心,应用测序法进行EGFR突变检测,留取15例EGFR突变阴性(吉非替尼原发耐药)及EGFR 19号或21号外显子突变阳性、且应用吉非替尼6~13个月治疗有效后出现继发耐药病情进展的患者的非小细胞肺癌新鲜组织标本进行原代细胞培养。本研究符合医学伦理相关规定。

1.2.2 肺癌肿瘤细胞的原代培养 原代细胞的提取及培养:1)标本的选取及处理,无菌条件下由经验丰富的病理科医师从新鲜手术标本中选取肿瘤组织。弃去肿瘤组织中的脂肪、坏死组织及血污后,将标本浸泡在无菌0.9%生理盐水中(含青霉素10 μg/mL、链霉素100 μg/mL)备用;2)将肿瘤组织经无菌生理盐水清洗后,在无菌条件下剪碎并用刀片细切成糊状,并加入Hank's液;3)将组织悬液移入15 mL离心管中,1 000 r/min离心3 min;4)弃去上清,加入15 mL Hank's液,并加入细胞分散素(10倍稀释),37℃下作用1~2 h;5)显微镜下观察组织细胞团,待细胞分散后,加入含10%胎牛血清(FBS)的细胞培养液,终止反应;6)弃去组织悬液中的脂肪、纤维组织后,1 000 r/min离心3 min;7)弃去上清,加入Hank's液及含10% FBS的细胞培养液各15 mL,308目滤网过滤,收

集细胞悬液;8)1 000 r/min离心5 min得到细胞沉淀,将回收的细胞重悬浮在预培养液PCM-1中,植入I型胶原凝胶涂布的细胞培养瓶中,并按1 mL培养液配置培养基加入1 μL抗生素比例,5% CO₂,37℃细胞培养箱内培养;9)24 h后更换培养液,取出血细胞及未贴壁细胞,继续培养,备用。

肿瘤原代细胞胶原凝胶体包埋(CD-DST)法检测药物敏感性。本试验中拟采用三维立体组织培养法,将单层细胞培养改为多细胞球体培养。

肿瘤原代细胞胶原凝胶体包埋药物敏感性检测是先经过胶原酶消化从新鲜肿瘤组织中提取细胞,再将细胞包埋于人工细胞外基质I型胶原凝胶体中,构成与体内相似的细胞生长微环境,之后进行三维立体培养,适宜浓度(根据药物血浆浓度时间曲线下面积计算出)的药物接触,最后经过细胞染色及利用图像分析对药物的敏感性做出准确的评价。其结果是用药物处理组的肿瘤细胞克隆量(T)与空白对照组中肿瘤细胞克隆量(C)的比值来表示。

药物按临床等值剂量进行接触处理,药物作用浓度及作用时间见表1。

表1 不同药物的作用浓度及作用时间

Table 1 Treatment duration and concentration of the two drugs

药物名称	药物浓度	药物作用时间/h
厄洛替尼	1 μM	72
西妥昔单抗	50 μg/mL	72

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件包进行分析处理。统计学处理数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 西妥昔单抗与厄洛替尼联合应用对吉非替尼原发耐药的NSCLC原代细胞的影响

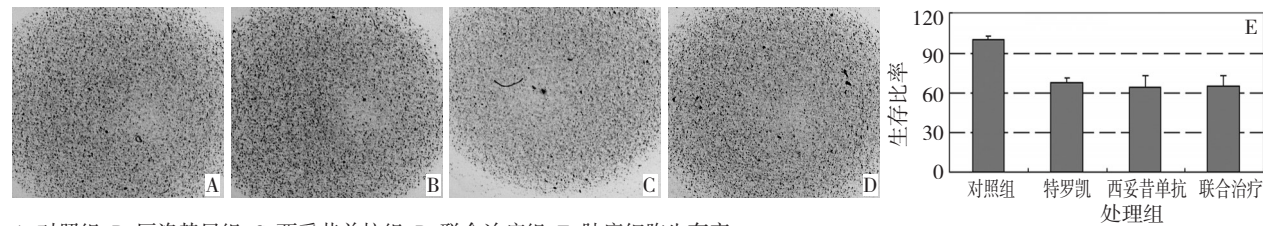
检测厄洛替尼和西妥昔单抗联合应用对于15例EGFR突变阴性的NSCLC患者体外原代细胞的影响,应用浓度为50 μg/mL西妥昔单抗和1 μM厄洛替尼,作用于EGFR突变阴性的NSCLC患者原代细胞。结果显示:厄洛替尼组T/C值为(67.60±3.45)%,西妥昔单抗组T/C值为(64.60±8.30)%,联合治疗组T/C值为(65.60±7.20)%,三组间无显著性差异($P > 0.05$)。结果进一步验证了厄洛替尼和西妥昔单抗联合应用对于EGFR突变阴性的NSCLC患者无效(图1)。

2.2 西妥昔单抗与厄洛替尼联合应用对吉非替尼继发耐药的NSCLC原代细胞的影响

检测厄洛替尼和西妥昔单抗联合应用对于8例

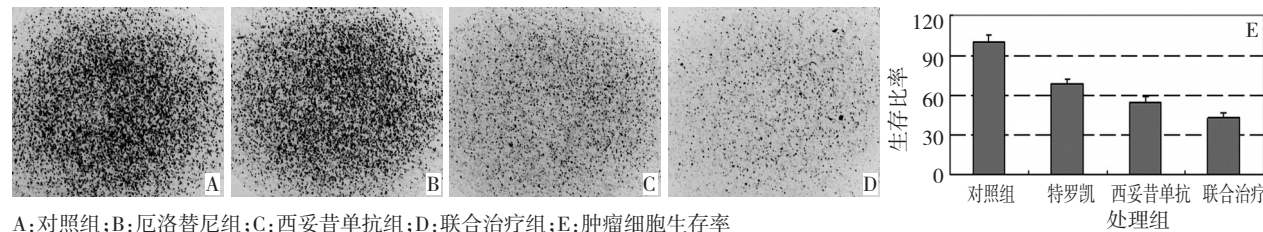
T790M 突变阳性的吉非替尼继发性耐药的 NSCLC 原代细胞的影响,应用浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 西妥昔单抗和 1 μM 厄洛替尼作用于 T790M 突变阳性的继发性耐药的 NSCLC 原代细胞。结果显示:厄洛替尼组 T/C 为 $(68.50\pm4.10)\%$;西妥昔单抗组 T/C 为 $(54.70\pm4.46)\%$;

联合组 T/C 为 $(42.40\pm3.85)\%$,三组间 T/C 值有显著性差异($P<0.05$),联合用药组疗效明显好于单药组。结果进一步验证了厄洛替尼和西妥昔单抗联合应用对于 T790M 突变阳性的继发性耐药的 NSCLC 患者有效(图 2~3,表 1,2)。



A:对照组;B:厄洛替尼组;C:西妥昔单抗组;D:联合治疗组;E:肿瘤细胞生存率
图1 EGFR 突变阴性非小细胞肺癌 CD-DST 药敏检测,中性红染色

Fiuger 1 Drug sensitivity experiment of NSCLC cells without EGFR mutation



A:对照组;B:厄洛替尼组;C:西妥昔单抗组;D:联合治疗组;E:肿瘤细胞生存率
图2 T790M 突变阳性非小细胞肺癌 CD-DST 药敏检测,中性红染色

Figure 2 Drug sensitivity experiment of primary NSCLC cells with T790M mutation

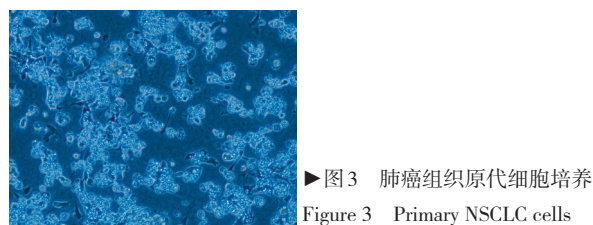


表2 不同EGFR突变的非小细胞肺癌CD-DST药敏检测(T/C) %
Table 2 CD-DST test of primary NSCLC cells with or without EGFR mutation

组别	EGFR 突变阴性	T790M 突变阳性
对照组	100 ± 6.49	100 ± 5.30
厄洛替尼组	67.6 ± 3.45	68.5 ± 4.11
西妥昔单抗组	64.6 ± 8.30	54.7 ± 4.46
联合治疗组	65.6 ± 7.23	42.3 ± 3.85

3 讨论

研究表明应用 Gefitinib 治疗有效的 EGFR 基因突变型 NSCLC 患者,维持治疗 2 年后病情出现进展,对瘤组织检测结果显示 EGFR 基因发生了二次突变,突变点位于第 20 外显子,酪氨酸激酶活化域第 790 位苏氨酸残基被蛋氨酸取代,而且突变发生于治疗开始和发生耐药之间的时间段,提示第 20 外显子 T790M 突变与该患者抵抗 EGFR-TKI 治疗有关^[17]。研究证明了 T790M 突变不会消除野生型 EGFR 的催

化活性,可能影响了激酶的活性或改变了突变型 EGFR 底物的专一性,从而使带有突变的肿瘤细胞更具增殖活性。同时研究还发现,EGFR-TKI 耐药机制除与 EGFR 基因二次突变有关外,还与下游信号分子的结构性活化、血管生成、EGFR 旁路 TK 信号的激活以及上皮-间质型转化等因素相关。EGFR 通过下游效应分子发挥生理作用,当下游效应分子发生结构性活化会越过上游 EGFR 信号通路,从而降低 EGFR-TKIs 的疗效。Ras 突变引起 Raf/MAPK 的上调,通过多种通路信号,从而抵抗 EGFR-TKIs 的作用。通过对 60 例肺腺癌接受 EGFR-TKIs 治疗的患者肿瘤组织中 K-ras 和 EGFR 基因突变分析^[22-23],发现 38 例耐受 EGFR-TKI 的患者中 9 例存在 K-ras 的突变(24%),提示 K-ras 突变与 NSCLC 耐受 EGFR-TKIs 相关。蛋白酪氨酸激酶基因(PTEN)是一种脂质磷酸酶,调节 PI-3K/AKT 信号通路的活性,功能性 PTEN 的失活普遍存在于一些肿瘤组织中,研究发现^[24-25],缺乏 PTEN 蛋白的人 NSCLC 细胞株 H157 对 EGFR-TKIs 耐药,而野生型人 NSCLC 细胞株 H1355 则对 EGFR-TKIs 敏感,提示 PTEN 失活参与了 EGFR-TKIs 的耐药形成。AKT 信号通路在 EGFR-TKIs 耐药机制中起主要作用,如磷酸化的 AKT 具有抑制凋亡促进分子的功能,研究发现^[26],对 EGFR-TKIs 耐

药的 NSCLC 细胞中存在 AKT 的结构性活化,因此对于 AKT 结构性活化的肺癌患者单用 EGFR-TKIs 是不够的。肿瘤细胞中存在 TK 受体,通过 EGFR 旁路 TK 信号传导可以直接活化 EGFR 下游信号通路,将细胞外信号传递到细胞内,调节细胞的生存及增殖;当 TK 受体明显上调,活性超过 EGFR 时,其下游信号通路的活化就不依赖于 EGFR,从而引起肿瘤细胞对 EGFR-TKIs 的抵抗。此外,研究显示上皮细胞-间质转化(EMT)^[27]现象参与了 EGFR-TKIs 的原发性耐药,而关于其是否参与了 NSCLC 对 EGFR-TKI 的获得性耐药有待于进一步研究。总之,由于肺癌组织不易获得,而且肺癌患者的二次活检也不是常规,因此,随着肺癌靶向治疗的日益普遍以及获得性耐药现象的日益明显,对于 EGFR-TKIs 获得性耐药机制及新的治疗策略的研究具有非常重要的作用。

本研究应用非小细胞肺癌原代细胞培养药敏实验的方法验证了联合应用作用于 EGFR 不同靶点的靶向药物厄洛替尼和西妥昔单抗后,增强了药物的抗肿瘤活性,同时对于 EGFR T790M 继发性突变造成获得性耐药的 NSCLC 有明显的疗效。由于这两种靶向药物作用于 EGFR 不同的位点(厄洛替尼作用于 EGFR 胞内部分抑制了酪氨酸激酶的活化,西妥昔单抗作用于 EGFR 的胞外部分抑制了 EGF 与 EGFR 的结合),因此本研究显示:对于吉非替尼原发耐药的 NSCLC 西妥昔单抗与厄洛替尼联合应用不能提高疗效,而对于吉非替尼继发耐药的 NSCLC 联合应用却可以克服这种耐药而使疗效提高。

本研究认为这种协调作用可以从以下几个方面得到解释:第一种可能是厄洛替尼增加了西妥昔单抗对于细胞表面 EGFR 的亲合力,因此进一步拮抗了 EGF 与受体的结合阻断了信号的传递。第二种可能是目前没有一种靶向药物可以 100% 的作用于其目的靶点,因此厄洛替尼和西妥昔单抗分别作用于 EGFR 的不同位点,这样可以克服各自单药的固有的局限性,同时西妥昔单抗单独应用仅仅诱导总 EGFR 的下调,而不能影响磷酸化 EGFR 的水平,而厄洛替尼下调了 EGFR 磷酸化水平但不能诱导受体的下调,这种联合用药则增强了厄洛替尼更加高效的抑制任何残留的激酶的活性。第三种可能是 EGFR 下游信号通路不是线性的。RAS/RAF/MAPK、PI3-K/AKT、STAT 三条通路各自受不同的靶向药物的抑制作用,从而抑制了下游信号的传递。第四种可能是由于 EGFR 抑制剂不仅作用于 EGFR 酪氨酸激酶,EGFR-TKI 还可以作用于其他受体激酶,联合 EGFR 单克隆抗体后可以增强 EGFR-TKI 作用于 EGFR 的专一性^[28-29]。这种酪氨酸激酶抑制剂对于 EGFR 的不完美的选择可

能导致其邻近的 ErbB 家族或其他酪氨酸激酶被部分抑制,可以调整 EGFR 下游信号的传递和细胞的增殖,而且 T790M 突变可能诱导 EGFR 的构象发生改变产生耐药。第五种可能是由于在体内西妥昔单抗导致了 ADCC 效应,增强了对肿瘤的杀伤性^[30-31]。

目前有一项研究显示,厄洛替尼可以直接阻断 HER-2 的活性,且与 HER-2 的同种二聚体或与 HER-3 形成的异种二聚体状态无关。在缺乏 EGFR 的情况下厄洛替尼也可以通过抑制 HER-2 来抑制下游信号的传递和细胞的增殖^[32]。厄洛替尼可以同时可逆的抑制 EGFR 和 HER-2,使 EGFR 构象改变失活^[33]。

最近有报道认为,在 T790M 突变的细胞中,EGF 的增加可以减少酪氨酸激酶抑制剂的抗增殖效应^[34],表明在 T790M 突变的细胞中仍然部分保持着配体依赖性的生长,因此在联合治疗中西妥昔单抗与 EGF 竞争抑制了 EGFR 下游信号的传递,抑制了细胞的增殖。最近也有研究显示西妥昔单抗通过下调 EGFR,抑制了 L858R/T790M 突变的非小细胞肺癌细胞系 H1975 增殖^[35-36]。本研究中发现西妥昔单抗和厄洛替尼联合治疗明显的抑制了 L858R/T790M 突变的非小细胞肺癌细胞的生长。

总之,本研究数据对于 EGFR-TKI 继发性耐药的 NSCLC 联合应用西妥昔单抗和厄洛替尼可以增强抗肿瘤活性,为进一步的临床研究提供了依据。

参考文献

- 1 Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy[J]. *Oncogene*, 2000, 19(56): 6550-6565.
- 2 Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial[J]. *JAMA*, 2003, 290(16): 2149-2158.
- 3 Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(12): 2237-2246.
- 4 Perez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, et al. Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(16): 3238-3247.
- 5 Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1497-1500.
- 6 Lynch TJ, Bell DW, 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.
- 7 Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(36): 13306-13311.
- 8 Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, et al. Mutations of the epider-

- mal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(11): 2513–2520.
- 9 Han SW, Kim TY, Hwang PG, et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(11): 2493–2501.
- 10 Pao W, Miller VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(11): 2556–2568.
- 11 Carey KD, Garton AJ, Romero MS, et al. Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(16): 8163–8171.
- 12 Yun C.H, Boggon TJ, Li Y, et al. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(3): 217–227.
- 13 Zhang X, Gureasko J, Shen K, et al. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor[J]. *Cell*, 2006, 125(6): 1137–1149.
- 14 Jackman D.M, Yeap BY, Sequist LV, et al. Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(13): 3908–3914.
- 15 Riely G.J, Pao W, Pham DK, et al. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(3 Pt 1): 839–844.
- 16 Balak M.N, Gong Y, Riely G.J, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in EGFR-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(21): 6494–6501.
- 17 Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(8): 786–792.
- 18 Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(19): 5764–5769.
- 19 Kwak E.L, Sordella R, Bell DW, et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2005, 102(21): 7665–7670.
- 20 Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain[J]. *PLoS Med*, 2005, 2(3): e73.
- 21 Bean J, Riely GJ, Balak M, et al. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(22): 7519–7525.
- 22 Hoshi S, Yamaguchi T, Kono C, et al. Recurrence of non-small cell lung cancer after successful treatment with Gefitinib receptor of three cases[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2004, 31(8): 1209–1213.
- 23 Pao W, Wang TY, Reily GD, et al. KRAS mutation and primary resistance of lung adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib[J]. *PLoS Med*, 2005, 2(1): e17.
- 24 Forgacs E, Biesterveld EJ, Sekido Y, et al. Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer[J]. *Oncogene*, 1998, 17(12): 1557–1565.
- 25 Bianco R, Shin I, Ritter CA, et al. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors[J]. *Oncogene*, 2003, 22(18): 2812–2822.
- 26 Kokubo Y, Gemma A, Noro R, et al. Reduction of PTEN protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib (IRESSA) [J]. *Br Cancer*, 2005, 92(9): 1711–1719.
- 27 Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, et al. Epidermal 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.
- 28 Traxler P, Bold G, Buchdunger E, et al. Tyrosine kinase inhibitors: from rational design to clinical trials[J]. *Med Res Rev*, 2001, 21(6): 499–512.
- 29 Barker AJ, Gibson KH, Grundy W, et al. Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11(14): 1911–1914.
- 30 Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(5): 1552–1561.
- 31 Kwak EL, Sordella R, Bell DW, et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(21): 7665–7670.
- 32 Schaefer G, Shao L, Totpal K, et al. Erlotinib directly inhibits HER2 kinase activation and downstream signaling events in intact cells lacking epidermal growth factor receptor expression[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1228–1238.
- 33 Wood ER, Truesdale AT, McDonald OB, et al. A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(18): 6652–6659.
- 34 Kim H.P, Han SW, Kim SH, et al. Combined lapatinib and cetuximab enhance cytotoxicity against gefitinib-resistant lung cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(3): 607–615.
- 35 Perez-Torres M, Guix M, Gonzalez A, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody down-regulates mutant receptors and inhibits tumors expressing EGFR mutations[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(52): 40183–40192.
- 36 Steiner P, Joynes C, Bassi R, et al. Tumor growth inhibition with cetuximab and chemotherapy in non-small cell lung cancer xenografts expressing wild-type and mutated epidermal growth factor receptor[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(5): 1540–1551.

(2011-09-21 收稿)

(2011-10-23 修回)

(张俊校对)