

· 论 著 ·

抗雌激素治疗对耐酪氨酸激酶抑制剂非小细胞肺癌细胞株抗增殖作用的机制探讨

徐瑞彤¹, 孙康俊², 戴冠群¹, 徐 静³

[摘要] **目的** 探讨氟维司群逆转吉非替尼耐药非小细胞肺癌细胞株耐药性的可能性及其机制。 **方法** 分别用不同浓度的氟维司群和吉非替尼, 单药以及联合对非小细胞肺癌细胞株 H1975[含表皮生长因子受体(EGFR) L858R & T790m 突变]、H1650(含 EGFR Del E746-A750 & PTEN De 突变)、PC-9(含 EGFR Del E746-A750 突变)细胞进行干预后, 采用 MTT 法检测细胞增殖变化, Western blot 法检测 EGFR、雌激素受体(ER)、磷酸化表皮生长因子受体(p-EGFR)的蛋白表达。 **结果** ①H1975、H1650、PC-9 肺癌细胞中均有 EGFR 及 ER 表达; ②吉非替尼及氟维司群联合用药较单药可明显抑制 H1975、H1650、PC-9 肺癌细胞的增殖($P < 0.001$); ③H1975 耐药细胞株内 T790m 突变型 EGFR 的磷酸化水平可以快速地雌激素升高或被氟维司群抑制; ④在酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)获得性耐药的肺癌细胞株中雌激素、表皮生长因子(EGF)分别下调 EGFR、ER 的水平, 氟维司群、吉非替尼分别上调 EGFR、ER 的水平。 **结论** 采用 EGFR 的靶向治疗与抗雌激素治疗相结合的治疗方案提高 EGFR 和 ER 阳性的 EGFR-TKI 获得性耐药的 NSCLC 的治疗效果在理论上是可行的。

[关键词] 氟维司群; 吉非替尼; 非小细胞肺癌; 表皮生长因子受体; 耐药

[中图分类号] R365; R735.37

[文献标志码] A

[文章编号] 1672-271X(2017)06-0581-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1672-271X.2017.06.006

The antitumor effect of anti-estrogen therapy on non-small cell lung cancer cell lines with acquired resistance to EGFR-TKI

XU Rui-tong¹, SUN Kang-jun², DAI Guan-qun¹, XU Jing³

(1. Department of General Practice, Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 2. School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, Jiangsu, China; 3. Department of Oncology, Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the antitumor effects of combination of gefitinib and fulvestrant on NSCLC cell lines with acquired resistance to gefitinib. **Methods** The antitumor effect of gefitinib and fulvestrant on the growth of NSCLC cell lines was observed at different concentrations by MTT assay. The expression levels of EGFR, ER and p-EGFR were determined by Western blot.

Results ① All three lung cancer cell lines expressed both EGFR and ERs although to different extents. ② Compared with treatment of either fulvestrant or gefitinib alone, drug combination obviously decreased proliferation of H1976, H1650 and PC-9 cells lines ($P < 0.001$). ③ Rapid activations of EGFR pathway by estrogen were observed in H1975 cells with T790M mutation. ④ EGFR and ERs expression were down-regulated respectively in response to estrogen and EGF but up-regulated in response to fulvestrant and gefitinib in vitro. **Conclusion** These results suggest that there is a functional crosssignaling between the EGFR/ER pathways in NSCLC with acquired resistance to gefitinib, possibly providing rationale for combining gefitinib with anti-estrogen therapy for advanced NSCLC treatment.

[Key words] Gefitinib; Fulvestrant; Non-small cell lung cancer; Epidermal growth factor receptor; Acquired resistance

基金项目: 江苏省六大人才高峰资助项目(2015-WSW-022)

作者单位: 1. 210029 南京, 江苏省人民医院全科医学科;
2. 211166 南京, 南京医科大学公共卫生学院; 3.
210029 南京, 江苏省人民医院肿瘤科

通信作者: 徐 静, E-mail: 517068680@qq.com

引用格式: 徐瑞彤, 孙康俊, 戴冠群, 等. 抗雌激素治疗对耐酪氨酸激酶抑制剂非小细胞肺癌细胞株抗增殖作用的机制探讨[J]. 东南国防医药, 2017, 19(6): 581-586.

随着全球社会经济的快速发展, 环境污染愈加严重, 加上人口老龄化、不健康的生活方式等等, 使得恶性肿瘤的发病率连年增长^[1]。根据最新的统计数据, 肺癌是影响我国居民健康的排名第一的恶性肿瘤, 发病和死亡呈现逐年上升趋势^[2]。目前对于肺癌的治疗有很多新的进展, 其中针对肺癌发生发展的信号通路中各个靶点的分子靶向药物进一步提高了肿瘤的缓解率, 降低了复发率, 带来了可喜的疗效。而表皮生长因子受体(epidermal growth

factor receptor, EGFR) 是现阶段研究最多的治疗靶点。EGFR 是 erbB/HER 家族的成员之一, 多在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 肿瘤组织中过表达 (40% ~ 80%), 并与预后不良相关^[3]。EGFR 信号通路激活后可启动下游多个与肿瘤细胞相关的信号级联反应, 包括抑制细胞凋亡, 促进细胞增殖、增强细胞侵袭性以及诱导血管生成等^[4]。

吉非替尼和厄洛替尼作为酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR-TKI) 的代表药物, 结构类似 ATP, 可与 EGFR-TK 催化区域位点竞争性结合, 从而阻断胞内外的信号传递, 抑制肿瘤细胞的增殖和转移, 目前已在全球范围内用于治疗晚期 NSCLC^[5]。前瞻性和回顾性研究结果显示, EGFR-TKI 临床受益的预测因素包括女性、无吸烟史、腺癌、亚裔、治疗相关皮疹的严重程度、存在 EGFR 突变等^[6-9]。约 90% 的 NSCLC 组织中存在基因突变, 多表现为 EGFR 外显子 19 的缺失以及外显子 21 的替代突变, 这两种突变都可以增加 NSCLC 对 EGFR-EKI 的敏感性^[6, 10-11]。虽然在这类患者中, 使用吉非替尼或厄洛替尼后疾病可获得缓解, 但是部分患者经过一段时间后, 疾病可能会出现再次进展, 中位时间为 3~8 个月, 称为获得性耐药现象^[12-14]。目前已知最常见的获得性耐药的分子机制为 EGFR T790m 二次突变^[15] 以及 MET 原癌基因扩增^[16]。T790 位于 EGFR 与 ATP 结合的关键区域, 也称为“gatekeeper”残基。从临床获得的耐药患者的组织标本以及耐药的 NSCLC 细胞株的分子研究显示, T790m 突变就是除一次活化性突变外, T790 位点上出现以大量甲硫氨酸残基替代苏氨酸的二次替代突变, 这种替代突变不影响 EGFR 的催化活性, 因此有研究猜想大量的甲硫氨酸残基对 EGFR-TKI 的结合形成了位阻, 影响其与 EFR 激酶区的结合, 从而产生获得性耐药^[17]。

Stabile 等^[18] 曾报道联合吉非替尼及抗雌激素药物氟维司群同时作用于 NSCLC 细胞的 EGFR 及雌激素受体 (estrogen receptor ER) 2 个靶点, 可较单药明显增强其抗肿瘤细胞增殖的作用; 并证明吉非替尼可持续上调肺癌细胞内 ER 的表达。这提示我们在体内可能存在 EGFR 信号转导途径和雌激素信号通路的交叉, 共同影响吉非替尼的活性和疗效。考虑 EGFR-TKI 使用的优势人群包括女性、腺癌^[6-9], 并且用药治疗一段时间后经常会出现耐药现象^[12-13, 19], 我们推测这可能也是由于吉非替尼持

续上调了肿瘤细胞内 ER 的表达水平, 通过 ER 介导的其他途径补偿了被抑制的 EGFR 介导的信号通路, 从而表现出耐药。本实验在细胞水平上比较了吉非替尼和氟维司群联合与单一用药对 EGFR-TKI 获得性耐药的 NSCLC 细胞生长的影响, 并初步探讨了与之相关的 ER/EGFR 信号通路相互作用的分子机制, 希望为 EGFR-TKI 获得性耐药的 NSCLC 的分子靶向治疗提供新的途径及理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料 非小细胞肺癌细胞株 H1975 (含 EGFR L858R & T790m 突变) 采购自 ATCC (United States), H1650 (含 EGFR Del E746-A750 & PTEN De 突变) 由本实验室保存, PC-9 (含 EGFR Del E746-A750 突变) 由上海肺科医院周彩存教授赠送。药品吉非替尼购自 Tocris 公司 (United Kingdom), 氟维司群及 17 β -雌二醇购自 Cayman Chemical 公司 (United States)。2 种药品粉剂溶于 DMSO (GIBCO 公司), 加入 RPMI1640 培养基稀释成所需浓度用于实验。重组人表皮生长因子 (EGF) 购自 Pep Rotech 公司 (United States), 溶于无菌去离子水, 加入 RPMI1640 培养基稀释成所需浓度用于实验。RPMI1640、胎牛血清 (Hyclone 公司), anti-EGFR 单克隆抗体 (Monoclonal Antibody, MAb), anti-ER α MAb、phospho-EGFR Y1068 MAb (Cell Signaling Technology), anti-ER β 多克隆抗体 (Polyclonal Antibody, PAb) (PanVera), 其余实验试剂为国产分析纯试剂。HERA cell 细胞培养箱 (德国 Heraers 公司), 低温高速离心机 (德国 Heraers 公司), 酶标仪 (美国 Clinibio 公司), Gel Doc 1000 凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司), 紫外分光光度计 (NanoDrop 公司), PCR 仪 (Applied Biosystems 公司)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测吉非替尼、氟维司群单药及联合用药作用后肺癌细胞的存活率 采用 MTT 法观察氟维司群和吉非替尼单药和联合用药对肺癌细胞增殖的影响。实验时, 取对数生长期细胞, 制备单细胞悬液, 以 4×10^4 /mL 的浓度, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 200 μ L (边缘孔用无菌 PBS 填充), 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 24 h 贴壁后, 加入浓度梯度的吉非替尼、氟维司群、吉非替尼+氟维司群, 每组浓度设 5 个复孔, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h (浓度梯度的确定方法为: 结合文献, 先采用 10 个浓度梯度, 根据所得

结果,采用细胞存活率分布于 20%~80%之间的药物浓度,再定 5 个浓度梯度)。实验结束后每个孔内加入 20 μL 的 MTT(5 mg/mL),37 °C 培养 4 h 后,终止培养,弃上清,每孔加入 150 μL 的 DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使蓝色结晶充分溶解。用自动酶标仪测定 490 nm 波长处每孔的吸光度 A,计算各实验组肿瘤细胞的存活率。细胞存活率(%) = [(As - Ab) / (Ac - Ab)] × 100%。其中 As: 试验孔(含有细胞的培养基、MTT、吉非替尼/氟维司群),Ac: 对照孔(含有细胞的培养基、MTT),Ab: 空白孔(不含细胞的培养基、MTT)。运用 SPSS10.0 软件根据药物浓度与细胞存活率求出不同时间的半数抑制浓度(IC50)。

1.2.2 Western blot 检测 ER、EGFR 在肺癌细胞株中的表达情况以及吉非替尼、氟维司群对 EGFR 信号通路的调控 取实验用细胞,以冰 PBS 洗涤 3 遍,加入 RIPA 细胞裂解液,镜下观察细胞充分裂解后,收集细胞总蛋白。经过 SDS-PAGE 电泳分离,转移至 PVDF 膜,将膜置入 5% 脱脂牛奶中封闭,4 °C 过夜。次日,将膜置于 37 °C 复温 30 min 后,加入一抗(一抗以 5% 脱脂牛奶 TBST 液稀释,一抗稀释浓度 1:1000,β-actin 为 1:500),与膜反应,37 °C 2 h, TBST 漂洗 3 遍后,加入二抗(二抗以 5% 脱脂牛奶 TBST 液稀释,均为 1:3000),37 °C 30 min。化学发光显影成像。所有实验均重复 3 次。EGFR 介导的信号通路的开启是需要通过 EGFR 的快速活化来实现的,其重要标志是 EGFR 磷酸化急剧上升。

1.3 统计学分析 运用 SPSS20.0 软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和相关分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H1975、H1650 及 PC-9 肺癌细胞中 ER 和 EGFR 的表达情况 WB 结果显示 EGFR 和 ER 在 3 株肺癌细胞株中均有表达,EGFR 的表达量 PC-9 细胞要明显高于 H1975 细胞,在 H1650 细胞中仅微弱表达。ERα 在 H1650 细胞及 PC-9 细胞中表达量近似,均略高于 H1975,而 ERβH1650 细胞及 H1975 中表达量相近,在 PC-9 细胞中表达量较少。见图 1。

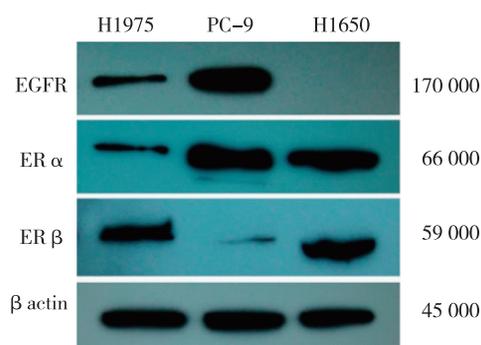
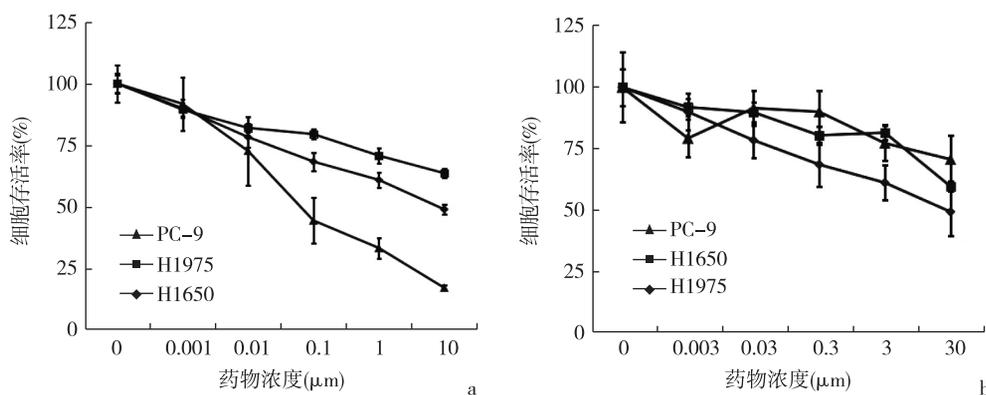


图 1 EGFR、ERα、ERβ 在 H1975、H1650 及 PC-9 肺癌细胞株的基础表达量

2.2 吉非替尼和氟维司群单药对 H1975、H1650 及 PC-9 细胞增殖的影响 不同浓度吉非替尼/氟维司群作用下,H1975、H1650 及 PC-9 细胞的细胞存活率见图 2。随着药物浓度增加,细胞存活率减少。实验中所用 H1975、H1650 及 PC-9 肺癌细胞株的 EGFR 均含有不同位点的突变,在单药实验中也体现出了这些突变对吉非替尼敏感性的影响:H1975 及 H1650 因分别含有二次突变 T790m 及 PTEN Del 表现出耐药(IC50>10 μmol/L),PC-9 细胞株仅含有位于 exon19 的一次突变而表现出对药物的敏感(IC50≈0.03 μmol/L)。



a: 吉非替尼;b: 氟维司群

图 2 MTT 法检测不同浓度的吉非替尼或氟维司群对 H1975、H1650 及 PC-9 的抗增殖效应

2.3 吉非替尼和氟维司群联合用药对比单药对 H1975、H1650 及 PC-9 细胞抗增殖的影响 采用 MTT 比色法检测的结果显示,1 $\mu\text{mol/L}$ 的吉非替尼和 3 $\mu\text{mol/L}$ 的氟维司群联合或单药处理细胞 48 h 后,PC-9 细胞的增殖率明显低于单独使用吉非替尼或氟维司群的实验组 ($P < 0.001$),处理 H1650 细胞得到的结果一致 ($P < 0.001$),而这种差异在含有 EGFR T790m 突变的 H1975 细胞株中体现得更加突出 ($P < 0.0001$)。见图 3。

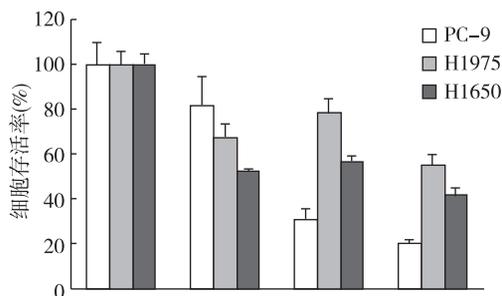


图 3 MTT 法检测吉非替尼与氟维司群联合与单一用药对 H1975、H1650 及 PC-9 细胞的抗增殖作用的比较

2.4 雌激素及其拮抗剂对 T790m 突变型 EGFR 信号通路的调控 以 10 nmol/L 17 β -雌二醇处理 H1975 细胞 10 min 发现 EGFR 磷酸化水平明显增高,以 1 $\mu\text{mol/L}$ 的吉非替尼和 3 $\mu\text{mol/L}$ 的氟维司群分别处理 H1975 细胞 10 min 可以下调 EGFR 的磷酸化水平,当叠加这 2 种处理时这种变化更加显著。表明 EGFR 及雌激素信号通路间存在交叉现象。见图 4。

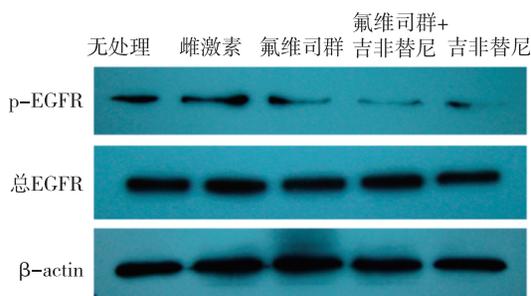


图 4 吉非替尼与氟维司群联合与单一用药以及雌激素对 H1975 细胞株中 EGFR 磷酸化水平的影响

2.5 在 EGFR-TKI 获得性耐药的肺癌细胞株中雌激素、EGF 分别下调 EGFR、ER 的水平,氟维司群、吉非替尼分别上调 EGFR、ER 的水平 以 10 nmol/L 17 β -E2 的处理 H1975 细胞 7 d 发现细胞内 EGFR 的蛋白量与对照组相比均明显减少,加入 3 $\mu\text{mol/L}$ 氟

维司群处理的细胞 EGFR 则呈现相反的表达趋势。表明雌激素除了可以激活 EGFR 信号通路,也能抑制 EGFR 的表达。H1975 细胞分别给予 10 ng/mL 表皮生长因子(EGF),1 $\mu\text{mol/L}$ 吉非替尼培养 7 d,检测发现与未经处理的细胞相比,EGF 下调 ERs 的表达,而吉非替尼则上调 ER 的表达。见图 5。

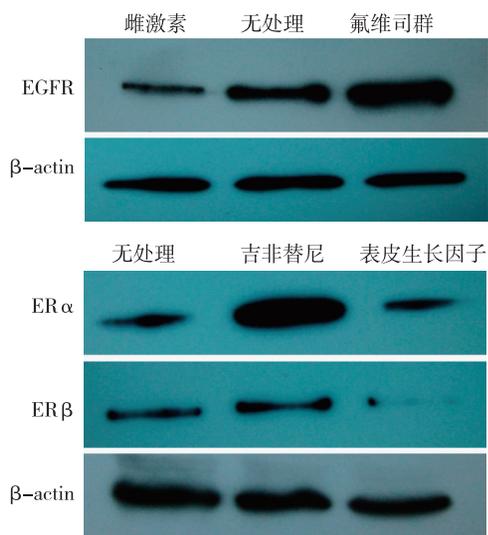


图 5 吉非替尼、氟维司群、雌激素、表皮生长因子长时间作用后(7 d)对 H1975 细胞 EGFR 及 ER 表达量的影响

3 讨论

近年来有越来越多的证据表明,类固醇激素(包括雌激素)在肺癌的发生发展中起到了重要的作用^[20-21]。雌激素可以刺激 NSCLC 细胞的增殖,并且可以促使细胞中的 EGFR 发生快速磷酸化,从而激活其下游信号通路^[22]。此外,一些研究也表明雌激素受体(estrogen receptor, ER α & β),尤其是 ER β 在肺肿瘤的发生和存活中扮演着重要的角色^[23-24]。无论从男性还是女性患者肺癌组织中分离所得的肺癌细胞株均可检测出 ERs,并受到雌激素的调控^[25]。ER 一方面可通过形成雌激素-受体复合物,与细胞核内染色质的特定部位结合,刺激 mRNA 转录,产生多种影响细胞生长及代谢的蛋白质^[22];另一方面,通过蛋白与蛋白间的作用与其他转录因子信号通路产生交叉,对细胞的增殖和分化产生重要调控。比如生长因子 EGF 可以替代雌激素,通过 ERK 通路激活 ER 的促转录活性^[26];另外,最近有研究也表明存在非核的 ER 可以激活 PI3K 和 EGFR 家族受体^[27]。这些研究揭示在 ER 和 EGFR 共表达的肿瘤细胞中,ER 和 EGFR 均可能通过这些相互

交叉的信号通路促进细胞增殖,同时增强雌激素和表皮生长因子的生物学效应。因此有科学家猜想结合 EGFR-TKI 与抗雌激素同时靶向两个信号通路对于治疗肺癌可能是可行的方案,2013 年 Garon 等^[20]就曾在一个 II 期临床试验中应用厄洛替尼联合氟维司群治疗晚期 NSCLC 患者,并获得了一定的疗效。

考虑到雌激素及 ER 在肺癌发生发展中的作用,以及 EGFR-TKI 的使用优势人群和获得性耐药现象,我们推测 EGFR-EKI 可能持续上调了肿瘤细胞内 ER 的表达,通过 ER 介导的其他途径补偿了被抑制的 EGFR 介导的信号通路,从而表现出耐药。因此,我们猜想联合 EGFR-TKI 和抗雌激素治疗能有利于阻断 EGFR-TKI 耐药肺癌细胞株中交叉的生长途径间的信号传导,有助于推迟吉非替尼耐药性的出现。为此,我们选取了 3 株 NSCLC 细胞株: H1975(T790m 耐药)、H1650(PTEN 耐药)和 PC-9(Del E746-A750 敏感),联合或单独使用 EGFR-TKI 吉非替尼与雌激素受体拮抗剂氟维司群分别处理 3 株细胞,在细胞水平上比较两药联合对肿瘤细胞增殖的抑制效果,希望为两药联合治疗对 EGFR-TKI 获得性耐药的 NSCLC 提供一些理论上的依据。我们首先从分子学水平检测了 3 株 NSCLC 细胞株中 EGFR 及 ER 的表达,Western Blot 显示 H1975、H1650 和 PC-9 细胞中均有 EGFR 和 ER 表达,但两种蛋白在不同细胞株中的表达量有所差异。随后的细胞增殖的检测结果表明,两药联合与单独一种药物处理比,3 株细胞的增殖率明显降低。以上这些实验结果从细胞水平上表明:吉非替尼联合氟维司群可放大对 ER 阳性 T790m 突变型 EGFR 的 NSCLC 的抗增殖效应。

为了从分子水平上研究 ER 与 T790m 突变型 EGFR 信号通路的交叉关联,我们用表皮生长因子(EGF)和雌激素分别处理 H1975 细胞,观察到处理后的 H1975 细胞中 ER 和 EGFR 的表达量下调,以吉非替尼和氟维司群分别处理后,上述受体的表达量则明显上调,这提示我们耐药细胞株内 ER 和 T790m 突变型 EGFR 交叉的信号通路存在不同的时间效应:一方面,雌激素可通过与 ER 结合快速激活 T790m 突变型 EGFR 下游的信号通路;另一方面,两者在较长时间相互作用后,可通过互逆的表达调控相互影响。这揭示了吉非替尼联合氟维司群逆转 EGFR-TKI 耐药肺癌细胞增殖的分子机制:氟维司群阻断吉非替尼上调 ER 表达量进而导致的 ER 信号通路的增强,抑制 ER 介导的 EGFR 信号通路的

激活。这样一种两个通路之间相互调控的机制为尝试联合两种药物进行治疗提供了有力的理论依据。

总之,我们的研究初步证明了针对 ER 和 EGFR 的信号交叉,采用 EGFR 的靶向治疗与抗雌激素治疗相结合的治疗方案提高 EGFR 和 ER 阳性的 EGFR-TKI 获得性耐药的 NSCLC 的治疗效果在理论上是可行的。

[参考文献]

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386.
- [2] 段纪俊, 严亚琼, 杨念念, 等. 中国恶性肿瘤发病与死亡的国际比较分析[J]. *中国医学前沿杂志*, 2016, 8(7): 17-23.
- [3] Castañón E, Rolfo C, Viñal D, *et al.* Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) activating mutations and their targeted treatment in the prognosis of stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC) patients harboring liver metastasis[J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 257. doi: 10.1186/s12967-015-0622-x.
- [4] 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.
- [5] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(2): 127-137.
- [6] Tracy S, Mukohara T, Hansen M, *et al.* Gefitinib induces apoptosis in the EGFR^{L858R} non-small-cell lung cancer line H3255[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(20): 7241-7244.
- [7] 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.
- [8] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, *et al.* MET amplification leads to Gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling [J]. *Science*, 2007, 316(5827): 1039-1043.
- [9] 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.
- [10] Gazdar AF, Shigematsu H, Herz J, *et al.* Mutations and addiction to EGFR; the Achilles 'heal' of lung cancers? [J] *Trends Mol Med*, 2004, 10(10): 481-486.
- [11] 李小优, 冯继锋. 表皮生长因子受体基因与非小细胞肺癌的分子靶向治疗研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2012, 25(12): 1311-1315.
- [12] 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.
- [13] Giaccone G. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the

- treatment of non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(14):3235-3242.
- [14] 李 静, 武新虎. 非小细胞肺癌 EGFR-TKI 耐药机制及耐药后治疗策略[J]. *医学研究生学报*, 2013, 26(8):859-863.
- [15] Giaccone G, Rodriguez JA. EGFR inhibitors: what have we learned from the treatment of lung cancer? [J] *Nat Clin Pract Oncol*, 2005, 2(11):554-561.
- [16] Riely GJ, Politi KA, Miller VA, *et al.* Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(24):7232-7241.
- [17] Johnson BE, Janne PA. Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(17):7525-7529.
- [18] Stabile LP, Lyker JS, Gubish CT, *et al.* Combined targeting of the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer shows enhanced antiproliferative effects [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(4):1459-1470.
- [19] 陈芳芳, 李晓军. 细胞凋亡在介导非小细胞肺癌耐药调节中的作用[J]. *东南国防医药*, 2015, 17(3):286-289.
- [20] Garon EB, Siegfried JM, Dubinett SM, *et al.* Result of TORI L-03, a randomized, multicenter Phase II clinical trial of erlotinib (E) or E + fulvestrant (F) in previously treated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(8):4664-4664.
- [21] Traynor AM, Schiller JH, Stabile LP, *et al.* Pilot study of gefitinib and fulvestrant in the treatment of post-menopausal women with advanced non-small cell lung cancer. [J] *Lung Cancer*, 2009, 64(1):51-59.
- [22] Daub H, Specht K, Ullrich A. Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors [J]. *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3(12):1001-1010.
- [23] Bogush TA, Dudko EA, Beme AA, *et al.* Estrogen receptors, antiestrogens, and non-small cell lung cancer [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2010, 75(12):1421-1427.
- [24] Navaratnam S, Skliris G, Qing G, *et al.* Differential role of estrogen receptor beta in early versus metastatic non-small cell lung cancer[J]. *Horm Cancer*, 2012, 3(3):93-100.
- [25] Stabile LP, Dacic S, Land SR, *et al.* Combined analysis of estrogen receptor β -1 and progesterone receptor expression identifies lung cancer patients with poor outcome[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(1):154-164.
- [26] Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, *et al.* The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6):2070-2075.
- [27] Engelman JA, Mukohara T, Zejnullahu K, *et al.* Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(10):2695-2706.

(收稿日期:2017-05-15; 修回日期:2017-07-14)

(本文编辑:叶华珍; 英文编辑:王建东)