

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)02-0148-05

吉非替尼耐药人结肠癌细胞系 HT-29/ZD 的建立及其耐药机制探讨

祝艳华,张 阳,韩秀敏,董丽萍,赖邻宁,李苏霞(大连医科大学附属第二临床医院肿瘤内科,辽宁大连 116027)

[摘 要] **目的:** 建立吉非替尼耐药的人结肠癌细胞系 HT-29/ZD,并初步探讨其耐药机制。**方法:** 采用逐步增加剂量法诱导人结肠癌细胞 HT-29 形成耐药细胞 HT-29/ZD;MTT 法检测吉非替尼对细胞的半数抑制浓度 IC_{50} , 计算耐药指数(RI);计数法描绘生长曲线,计算倍增时间 TD;FCM 检测细胞周期;MTT 法检测 HT-29/ZD 对氟尿嘧啶(fluorouracil, 5-Fu)、顺铂(cisplatin, DDP)、奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)、伊立替康(irinotecan, CPT-11)的交叉耐药谱;免疫细胞化学方法检测细胞 P-gp、IGF-1Ra、P-IGF-1R 的表达。**结果:** 建立了吉非替尼耐药的人结肠癌细胞系 HT-29/ZD,其耐药指数 RI 为 26.67, HT-29/ZD 和 HT-29 的 TD 分别为 33.25 h 和 37.7 h。FCM 显示 HT-29/ZD 的 S 期、 G_2/M 期比例增加, G_0/G_1 期减少。交叉耐药实验显示, HT-29/ZD 对 5-Fu、DDP、L-OHP 敏感性增加,以 L-OHP 敏感性增加最显著;对 CPT-11 呈现一定程度的耐药。HT-29 和 HT-29/ZD 均有 P-gp 表达,但无差异, ($P > 0.05$); HT-29/ZD IGF-1Ra 表达明显低于 HT-29 ($P < 0.01$), 而 P-IGF-1R 表达则明显增强 ($P < 0.01$)。**结论:** 吉非替尼耐药细胞 HT-29/ZD 不存在与传统化疗药物相似的多药耐药性;磷酸化 IGF-1R(P-IGF-1R) 活性增强可能是 HT-29/ZD 的耐药机制之一, P-gp 与其耐药性无关。

[关键词] 吉非替尼; 耐药性; 结肠癌细胞; P-gp; IGF-1R; P-IGF-1R

[中图分类号] R730.5 [文献标志码] A

Establishment of gefitinib-resistant human colon carcinoma cell line HT-29/ZD and its drug resistant mechanism

ZHU Yan-hua, ZHANG Yan, HAN Xiu-min, DONG Li-ping, LAI Lin-ning, LI Su-xia (Department of Medical Oncology, the Second Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning province, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a gefitinib-resistant human colon carcinoma HT-29/ZD cell line and to preliminarily study its drug resistance mechanisms. **Methods:** Gefitinib-resistant HT-29/ZD was induced by stepwise selection after exposure to increasing doses of gefitinib. IC_{50} were determined by MTT assay and the resistance index (RI) was calculated. Cell growth curves were plotted and the double times were calculated by cell counting assay. Distribution of cell cycles were detected by flow cytometry. Cross-resistance profiles of HT-29/ZD to 5-Fu, DDP, L-OHP, and CPT-11 were tested by MTT assay. Expression levels of IGF-Ra, P-IGF-R and P-gp were determined by immunocytochemistry method. **Results:** A gefitinib-resistant human colon carcinoma cell line HT-29/ZD has been established successfully, with the RI being 26.67. The doubling times of HT-29/ZD and HT-29 cells were 33.25 and 37.7 h, respectively. Flow cytometry demonstrated that HT-29/ZD cells of phase S and G_2-M were increased, but those of G_0/G_1 phase were reduced. We also found that, compared to HT-29 cells, HT-29/ZD cells had an increased sensitivity to 5-Fu, DDP ($P > 0.05$), and showed certain resistance to CPT-11 ($P > 0.05$), but had a significantly increased sensitivity to L-OHP. Immunocytochemical analysis demonstrated that HT-29 and HT-29/ZD cells had a similar expression of P-gp ($P > 0.05$). HT-29/ZD cells had a lower expression of IGF-1Ra ($P < 0.01$) than HT-29 cells but a higher expression of phospho-IGF-1R ($P < 0.01$). **Conclusion:** HT-29/ZD has no multi-drug resistance like traditional anticancer drugs. Phospho-IGF-1R of HT-29/ZD has an increased activity, which might be one of the mechanisms for the acquired resistance of HT-29/ZD. P-gp has no relationship with acquired resistance to gefitinib.

[Key word] gefitinib; drug-resistance; colon carcinoma cell; P-gp; IGF-1Ra; P-IGF-1R

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(2): 148-152]

吉非替尼(Gefitinib; 商品名为易瑞沙, Iressa) 为口服的可逆性小分子酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinases inhibitors, TKIs), 竞争性结合于表皮生长因

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(No. 20022123)

[作者简介] 祝艳华(1979-) 女, 山东济宁人, 硕士, 主要从事肿瘤内科治疗方面的研究

[通讯作者] 张 阳, E-mail: zydl@medmail.com

子受体酪氨酸激酶(EGFR-TK)催化区域上 Mg-ATP 结合位点,抑制 EGFR 自身磷酸化,阻断其信号传导,起到抗肿瘤作用。该药于 2005 年 3 月在中国上市,用于化疗失败的或不适于化疗的局部晚期或远处转移的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者。临床数据显示,吉非替尼对东方人 NSCLC 的有效率在 25%~35%之间,对西方人的有效率仅为 8%~15%;初始有效的患者经一段缓解期后部分出现疾病进展,即出现对吉非替尼的获得性耐药。本研究首次建立吉非替尼耐药的人结肠癌耐药细胞系 HT-29/ZD,分析其耐药特征,并初步探讨其耐药机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12 培养液购自 Hyclone 公司,标准胎牛血清购自杭州四季青生物公司,胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司,鼠抗人 P-gp 单克隆抗体购自武汉博士德公司,兔抗人 IGF-1Ra 多克隆抗体、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京天来生物医学科技有限公司,兔抗人 Phospho-IGF-1R 多克隆抗体购 Cell Signaling Technology。吉非替尼由英国 Astrazeneca 公司提供,氟尿嘧啶(flourouracil, 5-Fu)由天津制药厂生产,顺铂(cisplatin, DDP)由江苏豪森药业公司生产,奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)和伊立替康(irinotecan, CPT-11)由江苏恒瑞医药公司生产。

1.2 HT-29 细胞培养

人结肠中分化腺癌 HT-29 细胞系来自 ATCC, DMEM/F12 培养液培养(含 10% 的胎牛血清、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 μ g/ml), 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度条件下的孵箱中培养。传代时用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)溶液消化。

1.3 HT-29/ZD 耐药细胞的诱导建立

传代细胞 HT-29 在培养箱中孵育 48 h,处于对数生长期时用 pH 约为 7.2 的 PBS 洗 2 次,去除死亡细胞,每瓶加入 4 ml 新鲜培养液,加入吉非替尼药液使其终浓度为 0.012 μ mol/ml,孵育 72 h, PBS 洗净药液及死亡的细胞,换用无药培养液继续培养;当细胞生长至融合状态,按上述方法再加药,直至细胞能在该浓度下稳定生长;增加药物浓度,重复上述加药过程,最终使细胞能在含药物浓度为 0.150 μ mol/ml 的培养液中稳定生长。实验选用停药 2 周后的 1 周内处于对数生长期的细胞。

1.4 MTT 法检测 HT-29/ZD 细胞的耐药指数(RI)及交叉耐药谱

取对数生长期细胞,常规消化制成单细胞悬液,以 2×10^4 /ml 密度接种于 96 孔培养板中,180 μ l/孔,孵育 24 h,加入不同浓度的各种药物各 20 μ l,设仅加培养液的空白孔和只接种细胞的正常对照孔,每一浓度均设 3 个复孔。培养 72 h,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μ l,培养 4 h,弃上清,加入 DMSO 200 μ l/孔,振荡溶解 5~10 min,自动酶标仪在 570 nm 波长处测光密度 D 值。按公式计算不同浓度药物作用下细胞存活率:细胞存活率 = (加药组 D 值 - 空白对照组 D 值) / (正常对照组 D 值 - 空白对照组 D 值) \times 100%。利用 Origin6.1 软件系统绘制浓度-细胞存活率曲线,求出 IC₅₀。RI = IC₅₀(HT-29/ZD) / IC₅₀(HT-29)。

1.5 细胞计数法描绘 HT-29/ZD、HT-29 生长曲线及测定倍增时间(TD)

取对数生长期细胞,制备单细胞悬液,接种于 24 孔板,1 ml/孔,第 1、3、5、7 天收集细胞,2% 锥虫蓝染色,镜下计数活细胞数,每种细胞每次取 3 孔,求其平均值,绘制生长曲线, Patterson 公式计算细胞在对数生长期的群体 TD。TD = T lg2 / lg(N/N₀), T 表示细胞处于对数生长期的培养时间, N 及 N₀ 分别表示终止和初始的细胞数。

1.6 FCM 检测 HT-29/ZD 和 HT-29 细胞周期

取 10×10^5 /ml 对数生长期细胞,消化离心,70% 的乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定过夜,离心后收集细胞,冷 PBS 洗 2 次,将等体积的细胞悬液和碘化丙啶(PI)染液混合,染色 30 min, FCM 检测波长 488 nm 的红色荧光,采用细胞周期拟合软件分析细胞周期。

1.7 免疫细胞化学检测 HT-29/ZD 和 HT-29 细胞 IGF-1Ra、P-IGF-1R、P-gp 的表达

取对数生长期的细胞制成单细胞悬液,滴片,丙酮固定, HT-29/ZD 和 HT-29 滴片中加一抗,4 $^{\circ}$ C 湿盒过夜,加生物素标记二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,加 SABC 复合物, DAB 显色,苏木精复染,流水返蓝。

1.8 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件包,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用成组 t 检验。

2 结果

2.1 吉非替尼耐药人结肠癌细胞系 HT-29/ZD 的建立

采用在培养液中递增药物浓度的方法,以 0.012 μ mol/ml 为耐药浓度的起点,0.012 μ mol/ml

至 0.03 $\mu\text{mol/ml}$ 药物浓度递增较缓慢, 0.030 $\mu\text{mol/ml}$ 至 0.150 $\mu\text{mol/ml}$ 递增幅度增大, 速度加快, 历时 40 周建立耐药细胞系 HT-29/ZD。

吉非替尼对 HT-29/ZD 和 HT-29 的 IC_{50} 分别为 0.018 $\mu\text{mol/ml}$ 及 0.480 $\mu\text{mol/ml}$, HT-29/ZD 细胞的耐药指数 RI 为 26.67。

2.2 吉非替尼耐药细胞 HT-29/ZD 及 HT-29 的生长曲线及倍增时间

由图 1 可见, HT-29/ZD 及 HT-29 第 1、3、5、7 天细胞数分别为 2.14×10^5 、 5.35×10^5 、 16.90×10^5 、 42.60×10^5 及 1.50×10^5 、 3.07×10^5 、 8.90×10^5 、 21.40×10^5 , 耐药细胞 HT-29/ZD 直线部分的斜率比亲代细胞大, HT-29/ZD 和 HT-29 的 TD 分别为 33.25 h 和 37.7 h, 耐药细胞 TD 缩短, 增殖速度较亲代加快。

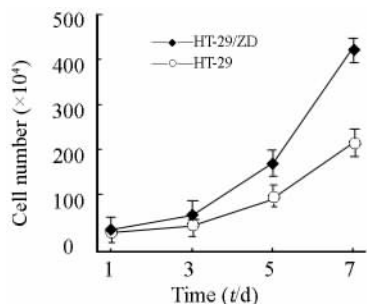


图 1 HT-29/ZD 和 HT-29 细胞的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of HT-29/ZD and HT-29 cells

2.3 HT-29/ZD、HT-29 的细胞周期

FCM 检测 HT-29/ZD、HT-29 的细胞周期, 结果如图 2 所示, HT-29/ZD 和 HT-29 的 G_0/G_1 、S、 G_2/M 分布分别为 60.2%、31.1%、8.7% 及 71.3%、22.4%、6.3%。结果显示, 耐药细胞的 S 期、 G_2/M 期细胞比例均高于亲代细胞, 尤以 S 期明显, G_0/G_1 期降低, 耐药细胞处于增殖阶段的比例 (S + G_2) 增加, 提示耐药细胞 DNA 合成增加, 有丝分裂增强, 静止期细胞减少, 细胞获得了更强的增殖活性。

2.4 HT-29/ZD 的交叉耐药谱

MTT 法检测 HT-29/ZD、HT-29 两种细胞对 5-Fu、DDP、L-OHP、CPT-11 等 4 种药物的敏感性。表 1 显示, 耐药细胞 HT-29/ZD 对 5-Fu、DDP、L-OHP 敏感性增加, 对 CPT-11 呈现一定程度的耐药。尤以对 L-OHP 增加显著, 为亲代的 10.7 倍。

2.5 HT-29/ZD 和 HT-29 细胞 IGF-1Ra、P-IFR-1R、P-gp 的表达

排除边缘细胞, 10×10 低倍镜下随机选取 10

个视野, 每个视野在 10×20 中倍镜下计数 50 个细胞; 根据细胞着色强弱分为 4 个等级, 无着色 0 分, 淡黄色 1 分, 棕黄色 2 分, 棕褐色 3 分。HT-29/ZD 和 HT-29 细胞 IGF-1Ra、P-IFR-1R、P-gp 的表达分别见图 3。按公式 $\text{Score} = \sum P_i (I + 1)$ ($i = 0, 1, 2, 3 \dots$; P_i 表示评分为 I 的比例) 计算得分。结果显示, IGF-1Ra、P-gp 表达在两细胞膜上, P-IFR-1R 在两细胞膜及胞质内均有表达, HT-29/ZD 中 IGF-1Ra 的表达明显低于 HT-29 ($P < 0.01$), P-IFR-1R 较亲代表达明显增强 ($P < 0.01$), P-gp 的表达与 HT-29 无明显差别 ($P > 0.05$, 表 2)。

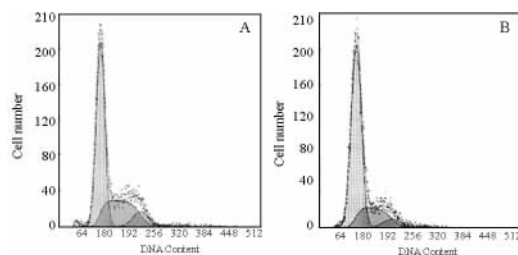


图 2 HT-29/ZD (A) 和 HT-29 (B) 的细胞周期

Fig. 2 Cell cycle of HT-29/ZD (A) and HT-29 (B) cells

表 1 HT-29/ZD、HT-29 细胞对不同化疗药物的敏感性及交叉耐药性

Tab. 1 Sensitivity and cross resistance of HT-29/ZD and HT-29 cells to various cytotoxic drugs

Drugs	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)		RI	1/RI
	HT-29/ZD	HT-29		
5-Fu	24.10	43.65	0.55	1.81
DDP	5.13	8.75	0.59	1.71
L-OHP	0.23	2.46	0.09	10.07
CPT-11	17.67	12.15	1.45	0.69

3 讨论

肿瘤的耐药, 分为原发性耐药和继发性耐药。原发性耐药指肿瘤细胞在治疗的初期阶段或未接触药物时就对多种化疗药物无明显反应; 继发性耐药指在用药的初期效果很好, 经过几个疗程后, 肿瘤细胞对所用药物甚至其他药物也产生耐药性。建立耐药细胞系是研究耐药的主要方法。耐药细胞系建立的方法很多, 目前常用的有 3 种, 即逐步增加剂量法、间隙大剂量冲击法、间隙大剂量冲击和逐步增加剂量相结合。逐步增加剂量法, 建立的耐药细胞系耐药性较稳定, 需要时间短, 常被采用, 但增加剂量

的大小需要摸索^[1]。体外实验证实,吉非替尼对人结肠癌细胞系 HT-29 有生长抑制作用^[2-3]。本实验选用 HT-29 为诱导耐药的亲代细胞,依据预实验摸索出吉非替尼对其的抑制率曲线,以低于 IC_{50} 为耐药浓度的起点,采用逐步加剂量法成功建立了吉非替尼耐药细胞 HT-29/ZD。不同的细胞系、诱导药

物、诱导方法及其他条件等均可能影响耐药细胞系的建成。Jones 等^[4]用恒定剂量 $1 \mu\text{mol/L}$ 吉非替尼作用建立起耐药人乳腺癌细胞 TAM/TKI-R 和前列腺癌细胞 DU145/TKI-R; 而人肺癌 PC-9/ZD 耐药细胞系的建立则是通过克隆筛选的方法^[5]。

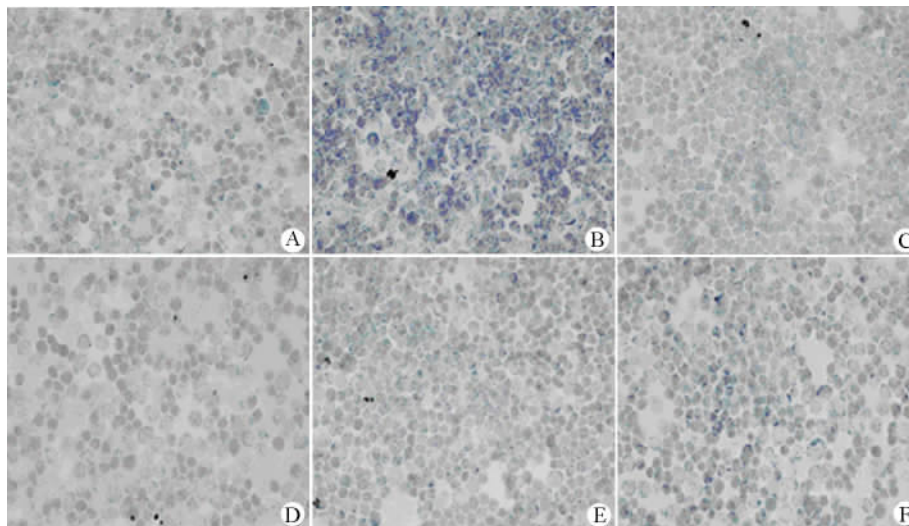


图3 HT-29/ZD 和 HT-29 细胞 IGF-1Ra、P-IGF-1R、P-gp 的表达(×400)

Fig. 3 Expression of IGF-1Ra, P-IGF-1R and P-gp in HT-29/ZD and HT-29 cells(×400)

A, B: IGF-1Ra; C, D: P-IGF-1R; E, F: P-gp; A, C, E: HT-29/ZD; B, D, F: HT-29

表2 HT-29/ZD 和 HT-29 细胞 IGF-1Ra、P-IGF-1R、P-gp 的表达

Tab. 2 Expression of IGF-1Ra, P-IGF-1R and P-gp in HT-29/ZD and HT-29 cells

Cells	IGF-1Ra	P-IGF-1R	P-gp
HT-29	$3.858 \pm 0.212^{**}$	$1.908 \pm 0.254^{**}$	3.208 ± 0.194
HT-29/ZD	2.279 ± 0.174	2.718 ± 0.182	3.245 ± 0.229

** $P < 0.01$ vs HT-29/ZD cells

由细胞的生长曲线、流式检测结果可见耐药细胞 HT-29/ZD 的生物学特征与其亲代细胞 HT-29 不同,耐药细胞增殖快,具有更强的增殖活性。

为探讨吉非替尼耐药细胞系 HT-29/ZD 是否存在对其他化疗药物的交叉耐药,本实验对 5-Fu、DDP、L-OHP、CPT-11 的敏感性进行了测定。结果显示,耐药细胞 HT-29/ZD 对 5-Fu、DDP、L-OHP 敏感性增加,尤以对 L-OHP 敏感性增加显著;对 CPT-11 呈现一定程度的耐药;说明在吉非替尼作用下,吉非替尼耐药细胞可能不存在与传统化疗药物相关的多药耐药性(MDR)。对 L-OHP 敏感性增高,与耐药

细胞增殖速度加快和增殖活性提高可能有关,也可能与 L-OHP 独特的抗癌作用有关;同时也说明吉非替尼耐药后化学药物治疗的可行性。该结果与 Koi-zumi 等^[5]建立的肺癌耐药细胞系 PC-9/ZD 不同:PC-9/ZD 对 DDP、L-OHP、CPT-11、ADM、PTX 均不存在交叉耐药。分析以上结果主要与不同肿瘤细胞具有不同基因谱有关,但需要更多更深的研究。因此,临床用药既要考虑具有不同遗传状态的个体,又要考虑不同基因谱的肿瘤细胞,实现对每一个患者量体裁衣制定治疗方案,即达到真正意义上个体化用药的原则。

信号传导是一个多因素、多环节、交叉对话的网络调控系统,靶向药物耐药因素是多方面的。对该类药物耐药机制研究的兴趣始于格列卫(甲磺酸伊马替尼, STI571)——BCR/ABL 酪氨酸激酶抑制剂^[6-7]。目前推测吉非替尼获得性耐药可能与以下几点有关:(1)EGFR 靶基因的突变,特异性 EGFR20 外显子的二次突变,导致 790 位上密码子发生错义改变(T790M),催化区域中苏氨酸被体积较大的甲硫氨酸取代,阻止吉非替尼与 ATP 结合位点的结合^[8-9];而该药的原发敏感性与 EGFR-TK 区域

18、19、21 外显子的突变有关,近 90% 为 19 外显子缺失及 21 外显子点突变^[10]; (2) 丰富的 EGFR 旁路,如胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-1R)、血小板源性生长因子受体(PDGFR)等,其活性超过 EGFR 而直接活化其下游的信号通路^[4]; (3) EGFR 下游效应分子的结构性活化,如 Ras 活化引起 Raf-MEK/MAPK 的上调,与 EGFR 失去偶联^[11]; (4) 功能性 PTEN 抑癌基因的失活引起 AKT 通路的过度活化^[12]; (5) EGFR 同源二聚体与异源二聚体比例的改变,异源二聚体的增加^[5]; (6) VEGF 明显上调,血管生成增加^[13-14]等。国内外尚没有吉非替尼获得性耐药与多药耐药 P-gp 之间关系方面的报道。本研究就 IGF-1R、P-IGF-1R、P-gp 与该药获得性耐药性的关系作了初步探究。

胰岛素样生长因子-1 受体 IGF-1R 对正常细胞增殖、凋亡、机体生长发育、细胞恶性表型的形成和维持、肿瘤细胞的浸润和转移起着关键作用。IGF-1R 可活化 EGFR 的下游通路,PI-3K/Akt 是 EGFR 和 IGF-1R 共同的重要下游信号通路^[15]。本研究显示,IGF-1R 在 HT-29/ZD 中表达明显低于亲代细胞 HT-29,说明 IGF-1R 在 HT-29/ZD 中激活活化,引起 EGFR 下游通道再次激活,EGFR 通路依赖性减弱,表现其对吉非替尼的耐药。

P-gp 可利用 ATP 水解释放的能量主动将药物转运至细胞外,导致细胞内药物浓度低于杀伤浓度而产生 MDR。研究表明,许多肿瘤原发性或获得性耐药与 P-gp 过度表达有关^[16]。本实验显示 HT-29/ZD 与亲代细胞 HT-29 的 P-gp 表达无显著性差异,从而提示吉非替尼获得性耐药与传统化疗药物耐药密切相关的 P-gp 无关。

本研究成功建立了吉非替尼耐药的人结肠癌细胞系 HT-29/ZD,为进一步研究吉非替尼耐药机制和逆转耐药提供了细胞模型。

[参 考 文 献]

- [1] Urasaki Y, Laco GS, Pourquier P, *et al.* Characterization of a novel topoisomerase I mutation from a camptothecin-resistant human prostate cancer cell line [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 1964-1969.
- [2] Xu JM, Azzariti A, Colucci G, *et al.* The effect of gefitinib (Iressa, ZD1839) in combination with oxaliplatin is schedule-dependent in colon cancer cell lines [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003, 52(6): 442-448.
- [3] Toda D, Ota T, Tsukuda K, *et al.* Gefitinib decreases the synthesis of matrix metalloproteinase and the adhesion to extracellular

matrix proteins of colon cancer cells [J]. *Anticancer Res*. 2006, 26(1A): 129-134.

- [4] Jones HE, Goddard L, Gee JMW, *et al.* Insulin-like growth factor-1 receptor signaling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839, Iressa) in human breast and prostate cancer cells [J]. *Endocr Relat Cancer*. 2004, 11(4): 793-814.
- [5] Koizumi F, Shimoyama T, Taguchi F, *et al.* Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib [J]. *Int J Cancer*, 2005, 116(1): 36-44.
- [6] 高 磊,王健民,许小平,等. STI571 耐药白血病细胞系的建立及其生物学特性初步研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2004, 12(5): 584-589.
- [7] 齐 静,彭 晖,顾振纶,等. 伊马替尼耐药的 K562 细胞系的建立及其生物学特性研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2004, 25(6): 337-341.
- [8] 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.
- [9] 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*, 2005, 2(3): 73.
- [10] 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.
- [11] She OB, Solit D, Basso A, *et al.* Resistance to gefitinib in PTEN-null HER-overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of PTEN function or pharmacologic modulation of constitutive phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway signaling [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(12): 4340-4346.
- [12] 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 J Cancer*, 2005, 92(9): 1711-1719.
- [13] Vilorio-Petit A, Crombet T, Jothy S, *et al.* Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies *in vivo*: A role for altered tumor angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(13): 5090-5101.
- [14] Ciardiello F, Bianco R, Caputo R, *et al.* Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(2): 784-793.
- [15] Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signaling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* [J], 1997, 17(3): 1595-1606.
- [16] Vaalburg W, Hendrikse NH, Elsinga PH, *et al.* P-glycoprotein activity and biological response [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 207(2 Suppl): 257-260.

[收稿日期] 2006 - 11 - 27

[修回日期] 2007 - 02 - 10

[本文编辑] 王 莹