

DDR1 抑制剂与 IGF-1R 抑制剂联合应用及机制

陆秋平¹, 关 中^{1*}, 许耀东¹, 张嘉良¹, 蔡 谦¹, 彭解人¹, 冯公侃¹

(1. 中山大学孙逸仙纪念医院耳鼻咽喉科, 广东广州 510120; 2. 华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心, 广东广州 510060)

摘要: 【目的】研究盘状结构域受体(DDR1)的抑制剂 3-(2-(吡唑并[1,5-a]嘧啶-6-基)乙炔基)苯甲酰胺 7RH 对鼻咽癌细胞的体外抗肿瘤作用及相关机制,为该药用于鼻咽癌的临床治疗提供实验依据。【方法】采用 MTT 法绘制细胞生长曲线,计算 7RH 对鼻咽癌细胞的半数抑制浓度(IC₅₀值);Western Blot 检测 7RH 引起鼻咽癌细胞中信号通路的改变,并检测 SiRNA 瞬时转染方法干扰 DDR1 后 phospho-IGF-1R 的改变。【结果】7RH 在体外明显抑制鼻咽癌细胞的增殖并且呈浓度依赖性;7RH 作用鼻咽癌细胞株 CNE2 和 HK1 的 IC₅₀ 值分别为 2.60 μmol/L 与 6.33 μmol/L;应用 7RH 处理或者使用 SiRNA 瞬时转染方法干扰 DDR1 后,CNE2 的 IGF-1R 的磷酸化水平明显增强;联用 DDR1 抑制剂和 IGF-1R 抑制剂能更有效地抑制肿瘤细胞的增殖,两者联用能更显著地抑制 AKT 活性。【结论】DDR1 的抑制剂 3-(2-(吡唑并[1,5-a]嘧啶-6-基)乙炔基)苯甲酰胺 7RH 能在体外有效地抑制鼻咽癌细胞的增殖。联用 7RH 和 IGF-1R 抑制剂能通过抑制 PI3K/AKT 通路更有效抑制鼻咽癌细胞的增殖。

关键词: 鼻咽癌;DDR1 抑制剂;CNE2;IGF-1R;PI3K/AKT

中图分类号: R73 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2015)06-0827-06

Effects of DDR1 Inhibitor on Nasopharyngeal Carcinoma Cells and Its Possible Mechanism

LU Qiu-ping¹, GUAN Zhong^{1*}, XU Yao-dong¹, ZHANG Jia-liang¹, CAI Qian¹, PENG Jie-ren¹, FENG Gong-kan²

(1. Department of Otolaryngology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510020, China;

2. State Key Laboratory of Oncology in South China, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou, China, 510060)

Corresponding to: GUAN Zhong; E-mail: gzhong@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of DDR1 inhibitor (3-(2-(Pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-6-yl)-ethynyl)-benzamide) compounds 7RH on nasopharyngeal carcinoma in vitro and its possible mechanism to determine whether 7RH can be a candidate for target therapy in human NPC. 【Methods】The cell growth rate and 50% inhibitory concentration (IC₅₀) were determined by MTT assay. Influence on protein expression of cell signal pathway through application of 7RH or DDR1-specific siRNA were detected via Western Blot. 【Results】7RH with different concentration showed significant inhibitory effect on NPC cell line CNE2 in vitro and there was increased in a concentration dependent manner. The half maximal inhibitory concentration IC₅₀ of CNE2 and HK1 were 2.60 μmol/L and 6.33 μmol/L, respectively. Besides, 7RH significantly up-regulated the expression of phospho-IGF-1R, and combined 7RH with IGF-1R inhibitor evidently attenuated PI3K/AKT pathway activity as well as cell proliferation in vitro. 【Conclusion】DDR1 inhibitor 7RH shows anticancer effect on human NPC cells in vitro. This study suggested dual inhibition of DDR1 and IGF-1R may be a rational therapeutic approach in NPC cells by blocking PI3K/AKT pathway.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; DDR1 inhibitor; CNE2; IGF-1R; PI3K/AKT

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(6): 827-832]

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种常见的头颈部肿瘤,主要分布在东南亚、中国南

部,年发病率可高达 54.7/10 万^[1]。目前鼻咽癌的治疗主要包括放疗、化疗、手术、分子靶向治疗等

收稿日期:2015-03-24

基金项目:国家自然科学基金(30873009)

作者简介:陆秋平,硕士研究生,E-mail: luqp@mail2.sysu.edu.cn; * 关中,通信作者,副主任医师,E-mail: gzhong@mail.sysu.edu.cn

几个方面^[2]。对于无远处转移鼻咽癌而言,首选和主要的治疗方法是放疗。然而,单一放疗对晚期患者的治疗效果未如理想,需要探索新的治疗方法以改善晚期患者的预后。分子靶向治疗近十年来逐渐成为临床肿瘤治疗中不可或缺的一部分。该方法以肿瘤细胞中过度表达或者特异性表达的分子为靶点,选择针对性的阻滞剂,通过有效地调控靶分子的表达以及与肿瘤发生发展密切相关的信号通路,最终达到抑制肿瘤增殖、扩散以及转移的目的^[3-4]。根据作用的部位或者目标的靶点,分子靶向药物主要分为两个类别:一类为作用于细胞表面的分子,即单克隆抗体,如贝伐单抗、曲妥珠单抗等。另一类主要为小分子化合物,如格列卫、易瑞沙、舒尼替尼、索拉菲尼等。近年来,分子靶向治疗以其特异性高、毒副作用少、联合标准放疗化疗效果佳等优势逐渐成为晚期 NPC 治疗的研究热点。尽管由于其进入临床时间相对较短,分子靶向药物联合放疗化疗在鼻咽癌的治疗尚处在 I、II 临床试验阶段,但已证明其对头颈肿瘤有效,这为今后鼻咽癌的综合治疗模式提供了更多的选择^[5]。盘状结构域受体酪氨酸激酶(discoidin domain receptor tyrosine kinases, DDR)是一种新型的亚家族受体酪氨酸激酶^[6-7],它在多种肿瘤中均有表达,如鼻咽癌、肺癌、乳腺癌、脑瘤、卵巢癌、食管癌、头颈部肿瘤、肝癌、睾丸癌等。根据 C-末端区域的同源性,将其分为 DDR1 和 DDR2 两大类。研究表明 DDR1 和 DDR2 与细胞的许多功能相关,如促进肿瘤细胞的增殖、分化、黏附或迁移^[8];它们在肿瘤细胞的侵袭与转移中也发挥了一定的作用^[9]。研究显示 DDR1 的蛋白水平在头颈部肿瘤中存在高表达^[10],且在鼻咽癌及头颈部肿瘤组织中 DDR1 在转录水平也是高表达状态^[11],故我们假设 DDR1 在鼻咽癌的发生、发展中起着重要的作用,DDR1 能成为鼻咽癌治疗的新型靶点。Gao 等^[12]已发现了一系列 3-(2-(吡啶并[1,5-a]嘧啶-6-基)乙炔基)苯甲酰胺能够选择性抑制 DDR1,其中两种化合物 7RH 和 7RJ 抑制 DDR1 酶活性的效果最为显著。目前尚无文献报道 DDR 抑制剂在鼻咽癌中所起的作用。本文作者在鼻咽癌细胞株中应用 DDR1 抑制剂 7RH,探索其在体外对鼻咽癌细胞的抗肿瘤作用及相关机制,为该药用于鼻咽癌的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

小分子 DDR1 抑制剂 7RH 由合作单位中国科学院广州市生物医药和健康研究院丁克教授课题组合成,溶于 100% DMSO 中,贮存浓度为 50 mmol/L,于 -20 ℃ 保存备用。anti-DDR1、anti-AKT、anti-phospho-AKT (ser473)、anti-IGF-1R、anti-phospho-IGF-1R 均购自 cell signal technology 公司,anti-GAPDH 购自博士德生物工程有限公司。

1.2 细胞培养

人鼻咽癌细胞系 CNE2、HK1 由中山大学肿瘤防治中心保种培养,培养条件:应用含体积分数为 5% 的胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,培养在 37 ℃,5% 的 CO₂ 温室环境中。

1.3 MTT 法绘制细胞生长曲线

取对数生长期的细胞消化离心后制成细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔 195 μL,1000 个细胞。24 h 后加入药物,每组设 3 个复孔,置 CO₂ 培养箱培养 72 h,试验中止前 4 h 加入 10 μL 5 mg/mL MTT 液,再培养 4 h,弃去培养液加入 100 μL DMSO,震荡 10 min,待结晶溶解后再酶联检测仪上以 570 nm 波长测光密度值(D)。按照以下公式计算生长抑制率。生长抑制率=(1-D_{用药组}/D_{对照组})×100%。用 CalcuSyn 软件计算 IC₅₀ 值。

1.4 SiRNA 瞬时转染

在转染前 1 d,用不含抗生素的培养基以每孔 1.5 × 10⁵ 个细胞的密度把细胞接种在 6 孔板中,并培养过夜。转染当天细胞生长至约 50% 融合即可进行转染,用 Lipofectimin2000 的 Opti-MEM (GIBCO®) 和 SiRNA 根据制造商的操作步骤进行。转染后 4 ~ 6 h,将培养基更换为新鲜正常培养基,继续培养在 37 ℃,5% CO₂ 温室环境中。

1.5 Western blot 分析蛋白及磷酸化蛋白表达水平

3 × 10⁵ 对数生长期细胞种植于 6 孔板中,加药处理 24 h 后收集蛋白,PBS 洗涤,加入 120 μL 冰冻的 cell lysis 裂解液(购自 cell signal technology)冰上裂解 30 min,4 ℃、12 000 r/min (r = 6 cm) 离心 15 min,取上清。用 Bio-rad 蛋白定量液在紫外分光光度计上测定蛋白浓度,加入 1/5 体积的 6× 蛋白加样缓冲液。取 20 μg 变性蛋白样本在 10% 的

SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳,然后 80 V 冰室转印 2 h,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 1:1 000 相应的抗体(溶于 TBST 溶液中)4℃过夜,TBST 洗 3 遍,二抗反应室温 2 h,TBST 再洗 3 遍,显色,暗室压片及冲洗胶片。

1.6 统计学方法

数据采用 SPSS17.0 统计软件分析数据,两组间比较采用两组独立样本的 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DDR1 抑制剂在体外抑制鼻咽癌细胞的增殖能力

为了研究 DDR1 抑制剂 7RH 对鼻咽癌细胞增殖的影响,我们选用鼻咽癌细胞株 CNE2 和 HK1,应用不同浓度(0.3125 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$)的 7RH 处理细胞,作用 3 d,MTT 法检测细胞存活率。如图 1 显示,随着药物浓度的增高,7RH 对鼻咽癌细胞增殖的抑制作用逐渐增强。CNE2 的 IC_{50} 值为 2.60 $\mu\text{mol/L}$ 。HK1 的 IC_{50} 值为 6.33 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 DDR1 抑制剂激活鼻咽癌细胞中 IGF-1R 的活性

胰岛素样生长因子受体 (Type I insulin-like growth factor receptor, IGF-1R)为酪氨酸蛋白激酶类受体家族的主要成员之一,在许多肿瘤的发生发展中起着重要作用。我们发现使用 7RH 处理 CNE2 后能明显提高磷酸化 IGF-1R 的表达水平,而对其总蛋白影响不大,并且呈浓度和时间依赖

性(图 2A、B);DDR1 SiRNA 瞬时转染实验也证实干扰 CNE2 中 DDR1 的表达后能明显增强 IGF-1R 的磷酸化水平(图 2C)。

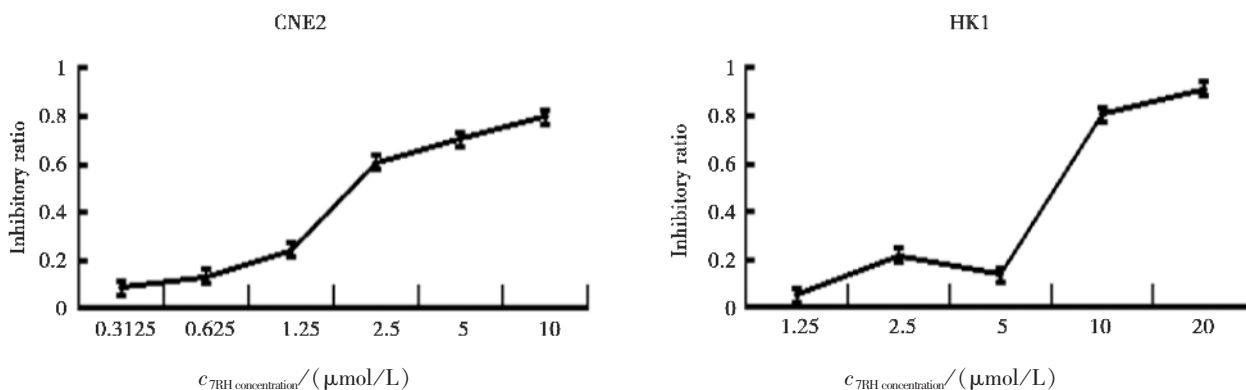
2.3 DDR1 抑制剂联用 IGF-1R 抑制剂 (AG1024) 抑制鼻咽癌细胞的增殖和 PI3K/AKT 信号通路

IGF-1R 在肿瘤细胞中能激活 AKT,进而激活 PI3K/AKT 信号通路。我们猜想 IGF-1R 的活化可能影响 7RH 的抗癌效果。于是我们进一步探究抑制 IGF-1R 对 7RH 作用效果的影响及其对 PI3K/AKT 信号通路的影响。我们发现与对照组(NC)相比,SiRNA IGF-1R 处理干扰 IGF-1R 后增强 7RH 对 CNE2 细胞增殖的抑制作用(图 3A),而 7RH 与 IGF-1R 抑制剂(AG1024)联用能更有效抑制 AKT 活性(图 3B)。

3 讨论

在本研究中,我们发现 DDR1 小分子抑制剂 3-(2-(吡唑并[1,5-a]嘧啶-6-基)乙炔基)苯甲酰胺 7RH 能够有效地抑制鼻咽癌细胞的增殖、生长。DDR1 下调后能使 IGF-1R 的磷酸化水平明显增强。此外,联用 7RH 和 IGF-1R 抑制剂能通过抑制 PI3K/AKT 通路更有效抑制鼻咽癌细胞的增殖。

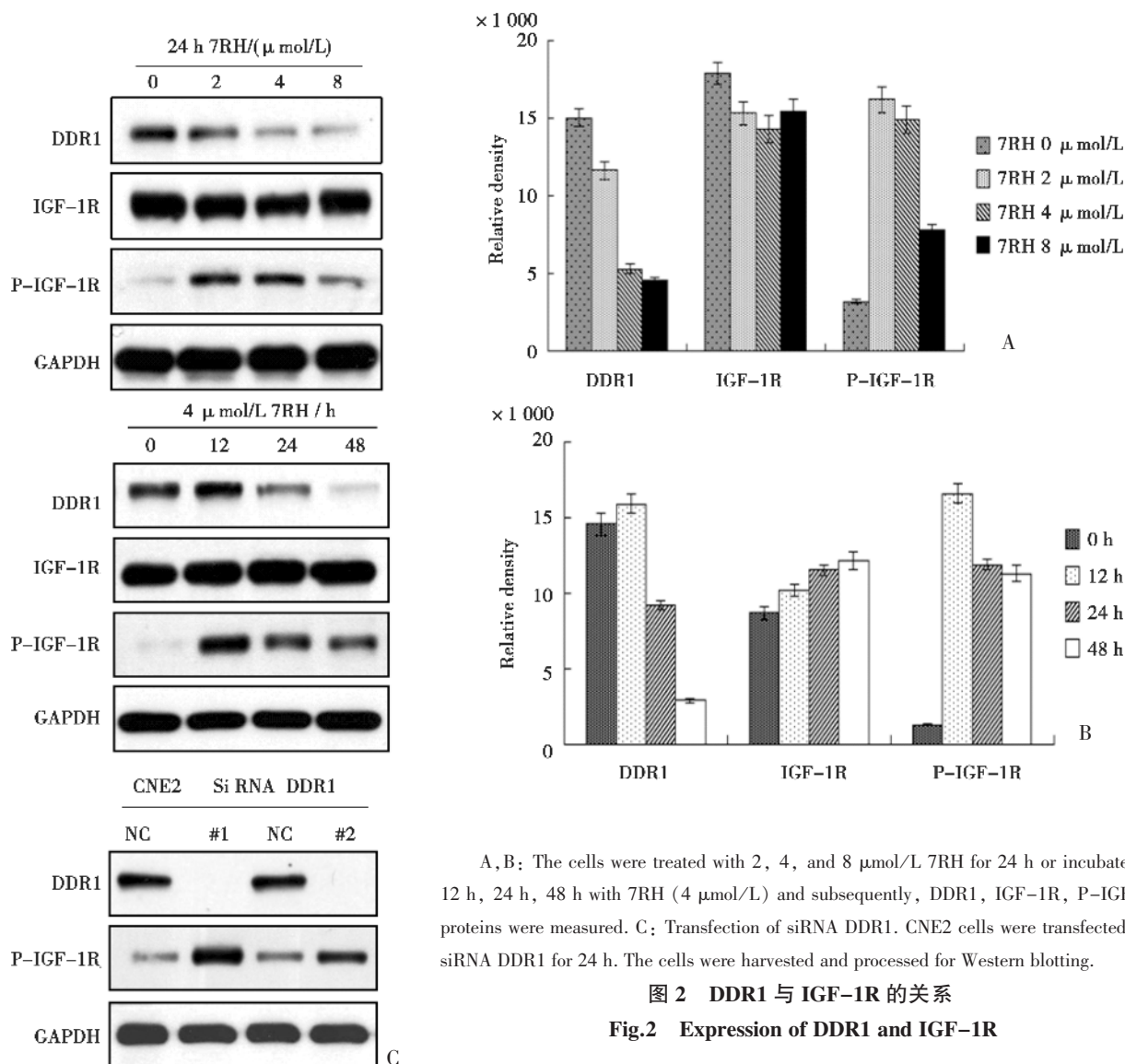
在过去的 30 年研究里,盘状结构域受体作为一种新型的亚家族受体酪氨酸激酶,其异常活化已被证实与肿瘤的发生发展密切相关^[8]。盘状结构域受体不同于其他酪氨酸激酶家族成员,它是



CNE2 and HK1 cells were treated with increasing concentration of 7RH(0.3125–20 $\mu\text{mol/L}$) for 72 h. The antiproliferation of 7RH was measured by MTT assay.

图 1 7RH 抑制鼻咽癌细胞 CNE2、HK1 的增殖

Fig.1 7RH impairs cell proliferation of NPC cell lines (CNE2 and HK1)



A, B: The cells were treated with 2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$ 7RH for 24 h or incubated for 12 h, 24 h, 48 h with 7RH (4 $\mu\text{mol/L}$) and subsequently, DDR1, IGF-1R, P-IGF-1R proteins were measured. C: Transfection of siRNA DDR1. CNE2 cells were transfected with siRNA DDR1 for 24 h. The cells were harvested and processed for Western blotting.

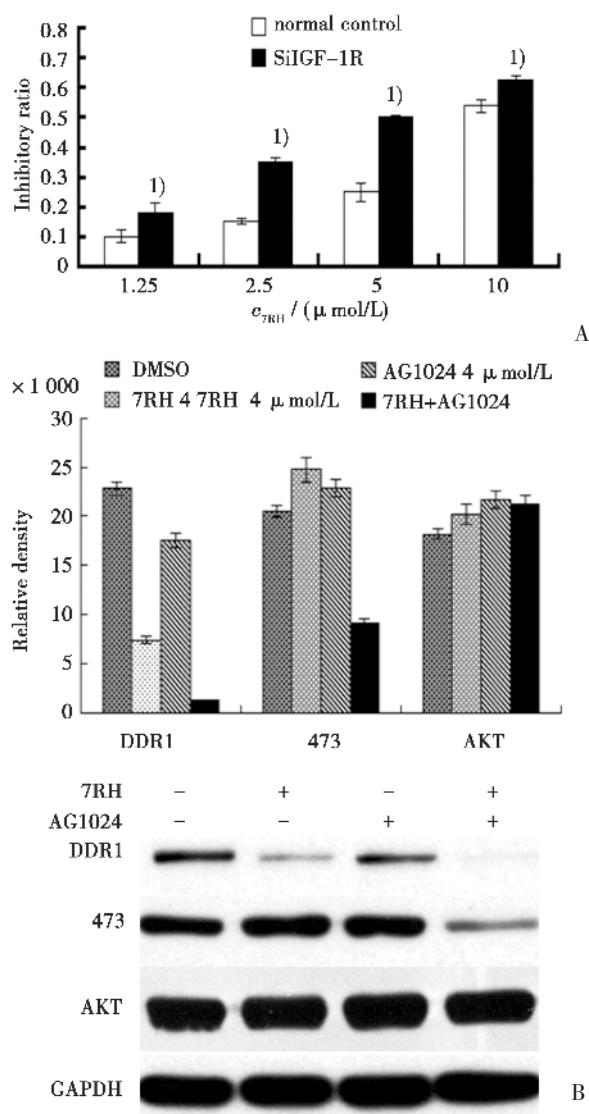
图 2 DDR1 与 IGF-1R 的关系

Fig.2 Expression of DDR1 and IGF-1R

以胶原蛋白作为其配体的受体酪氨酸激酶，其具有独特的结构特征和活化动力学。胶原蛋白与盘状结构域受体的结合最终导致酪氨酸激酶的缓慢而持续的激活，而异常的酪氨酸激酶的活化与肿瘤的发生发展相关。研究表明，在头颈部肿瘤中 DDR1 在转录水平及蛋白水平均存在高表达状态^[10-11]。鉴于 DDR 功能的改变和肿瘤的发展之间的联系，盘状结构域受体能成为肿瘤治疗的新靶点。Valencia 等^[13]在肺癌细胞中使用 DDR1 的小干扰 RNA (siRNA) 处理后观察到其能抑制肺癌细胞的增殖生长、显著抑制肺癌细胞的骨转移及增强肺癌细胞的化学药物敏感性。此外，Kim 等^[14]研究发现了一个选择性较强的 DDR1 抑制剂——DDR1-IN-1，DDR1-IN-1 在微摩尔级浓度就能

结合于 DDR1 非活性激酶构象抑制 DDR1 自身磷酸化细胞。该药与激酶抑制剂如 PI3K 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抑制剂 GSK2126458 联用，可增强 DDR1-IN-1 在大肠癌细胞株中的抗增殖活性。本研究使用的 DDR1 小分子抑制剂 3-(2-(吡唑并[1,5-a]嘧啶-6-基)乙炔基)苯甲酰胺 7RH 不仅能抑制 DDR1 酶活性，也能有效抑制 DDR1 的表达。本研究也表明使用 DDR1 的抑制剂 3-(2-(吡唑并[1,5-a]嘧啶-6-基)乙炔基)苯甲酰胺 7RH 能在体外显著地抑制鼻咽癌细胞的增殖。因此，DDR1 能成为抗肿瘤治疗中具有发展前景的新型靶点。

然而，DDR1 在肿瘤细胞信号转导通路中的相关机制尚未明确。有研究表明在人乳腺癌和结肠



A: CNE2 cells transiently transfected with SiRNA for IGF-1R followed by treatment with 7RH were plated for antiproliferation assays for 72 h. Control cells were transiently transfected with scrambled SiRNA. 1) $P < 0.05$ vs normal control. B: CNE2 cells were cultured for 24 h with and without 7RH (4 $\mu\text{mol/L}$) and AG1024 (4 $\mu\text{mol/L}$) alone and in combination, IGF-1R, phospho-AKT(Ser473), AKT protein were measured.

图3 7RH与AG1024联用对细胞和AKT的作用

Fig.3 A combination of 7RH and IGF-1R inhibitor (SiRNA transfection or AG1024)

癌中,DDR1主要是通过激活Ras/Raf/ERK和PI3K/AKT通路,上调抗凋亡蛋白Bcl-xL,从而使细胞在基因毒性应激状态下存活下来^[15]。本研究发现DDR1被抑制后,IGF-1R的磷酸化水平显著增强。胰岛素样生长因子受体(IGF-1R)是酪氨酸蛋白激酶类受体家族的主要成员之一,它是由

两个 α 亚基和两个 β 亚基通过二硫键连接组成的四聚体跨膜受体酪氨酸激酶。当配体与 α 亚基结合,内在的酪氨酸激酶活性使得 β 亚基上的酪氨酸残基发生自身磷酸化,从而启动下游信号传导的级联反应,激活IRS-1/PI-3K和PKB/Grb2/sos/Ras/MAPK途径^[16-17]。它通过改变肿瘤细胞周期、细胞凋亡以及其与周围环境的相互作用,在恶性肿瘤的持续生长中起着重要作用,在参与肿瘤细胞抗癌治疗耐药性的产生及恶性肿瘤细胞的转化、增殖方面也起着非常关键的作用^[18]。已有研究表明,IGF-1R的活化及其后续引起的AKT的激活与头颈部肿瘤的靶向治疗中耐药性的获得相关^[19]。同样的,在乳腺癌和前列腺癌实验模型中,IGF-1R的表达与EGFR或HER2的耐药性亦相关^[20-21]。因此,我们推测使用DDR1抑制剂7RH后所引起的IGF-1R磷酸化水平升高,可能与激活了PI3K/AKT信号通路,并导致鼻咽癌细胞产生耐药性,从而影响7RH抗鼻咽癌的作用相关,所以联用DDR1抑制剂和IGF-1R抑制剂能更有效地抑制肿瘤细胞的生长。本研究中我们发现使用SiRNA IGF-1R处理干扰IGF-1R后能增强7RH对CNE2细胞增殖的抑制作用;与对照组及单药组(7RH或AG1024)相比,联用两者组中AKT的磷酸化结构473显著下调,即AKT的活性受到更有效的抑制,从而更有效地抑制肿瘤细胞的增殖与生长,这与我们预测的结果是相符的。

综上所述,DDR1的抑制剂3-(2-(吡唑并[1,5-a]嘧啶-6-基)乙炔基)苯甲酰胺7RH能在体外有效地抑制鼻咽癌细胞的增殖。联用7RH和IGF-1R抑制剂通过抑制PI3K/AKT通路能更有效抑制鼻咽癌细胞的增殖。本研究为DDR1成为临床上鼻咽癌分子靶向治疗的新靶点提供了可能性。

参考文献

- [1] Chen C, Yi W, Gao J, et al. Alternative endpoints to the 5-year overall survival and locoregional control for nasopharyngeal carcinoma: A retrospective analysis of 2,450 patients[J]. Mol Clin Oncol, 2014, 2(3): 385-392.
- [2] Zhang L, Chen QY, Liu H, et al. Emerging treatment options for nasopharyngeal carcinoma [J]. Drug Des Devel Ther, 2013, 7(9): 37-52.
- [3] Klener P Jr, Klener P. Molecularly-targeted and

- biological anti-cancer therapy [J]. *Folia Biologica*, 2012, 58(1): 1-6.
- [4] Guan Z, Wang XR, Zhu XF, et al. Aurora-a, a negative prognostic marker, increases migration and decreases radiosensitivity in cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(21): 10436-10444.
- [5] 马骏. 鼻咽癌治疗的研究进展[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2010, 31(2): 179-185.
MA J. Research on treatment for nasopharyngeal carcinoma[J]. *J SunYat-Sen Univ (Med Sci)*, 2010, 31(2): 179-185.
- [6] Valiathan RR, Marco M, Leitinger B, et al. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2012, 31(1-2): 295-321.
- [7] 陆秋平, 关中. 盘状结构域受体酪氨酸激酶与肿瘤关系的研究进展[J]. *实用肿瘤杂志*, 2014, 29(6): 585-590.
Lu QP, Guan Z. Research progress in discoidin domain receptor tyrosine kinase and tumor [J]. *J Pract Oncol*, 2014, 29(6): 585-590.
- [8] Walsh LA, Nawshad A, Medici D. Discoidin domain receptor 2 is a critical regulator of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Matrix Biol*, 2011, 30(4): 243-247.
- [9] Castro-Sanchez L, Soto-Guzman A, Guaderrama-Diaz M, et al. Role of DDR1 in the gelatinases secretion induced by native type IV collagen in MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28(5): 463-477.
- [10] Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2003, 22(4): 337-358.
- [11] Hidalgo-Carcedo C, Hooper S, Chaudhry SI, et al. Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6 [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(1): 49-58.
- [12] Gao M, Duan L, Luo J, et al. Discovery and optimization of 3-(2-(Pyrazolo [1,5-a]pyrimidin-6-yl) ethynyl)benzamides as novel selective and orally bioavailable discoidin domain receptor 1 (DDR1) inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2013, 56(8): 3281-3295.
- [13] Valencia K, Ormazabal C, Zandueta C, et al. Inhibition of collagen receptor discoidin domain receptor-1 (DDR1) reduces cell survival, homing, and colonization in lung cancer bone metastasis [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(4): 969-980.
- [14] Kim HG, Tan L, Weisberg EL, et al. Discovery of a Potent and Selective DDR1 Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor[J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(10): 2145-2150.
- [15] Ongusaha PP, Kim JI, Fang L, et al. p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop[J]. *EMBO J* 2003, 22(6): 1289-1301.
- [16] Levine AJ, Feng Z, Mak TW, et al. Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(3): 267-275.
- [17] Toyofuku A, Hara T, Taguchi T, et al. Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro[J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(5): 1122-1128.
- [18] Chen HX, Sharon E. IGF-1R as an anti-cancer target--trials and tribulations[J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(5): 242-252.
- [19] Oh SH, Jin Q, Kim ES, et al. Insulin-like growth factor-I receptor signaling pathway induces resistance to the apoptotic activities of SCH66336 (lonafarnib) through Akt/mammalian target of rapamycin-mediated increases in survivin expression [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(5): 1581-1589.
- [20] Camirand A, Zakikhani M, Young F, et al. Inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor signaling enhances growth-inhibitory and proapoptotic effects of gefitinib (Iressa) in human breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(4): R570-R579.
- [21] Jones HE, Goddard L, Gee JM, et al. Insulin-like growth factor -I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2004, 11(4): 793-814.

(编辑 刘清海)