

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01203

· 论 著 ·

# 胰岛素样生长因子 1 在非小细胞肺癌 EGFR-TKIs 耐药机制中的作用

倪健<sup>1△</sup>, 徐瑛<sup>1△</sup>, 陈斌<sup>1</sup>, 苏春霞<sup>1</sup>, 唐亮<sup>2</sup>, 赵印敏<sup>2</sup>, 徐建芳<sup>1\*</sup>

1. 同济大学附属上海市肺科医院肿瘤科, 上海 200433

2. 同济大学附属上海市肺科医院中心实验室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 探讨胰岛素样生长因子 1(IGF-1)在表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKIs)耐药的肺非小细胞肺癌(NSCLC)细胞株和患者中的表达和临床意义。**方法** ELISA 法检测 PC9、A549、H1975 细胞和患者血清 IGF-1 水平, 蛋白质印迹和免疫细胞化学法检测细胞中胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)的表达; MTT 法检测吉非替尼和 IGF-1 受体拮抗剂 BMS536924 处理后的细胞增殖; 收集 84 例接受 EGFR-TKIs 治疗患者的临床资料, 分析 IGF-1 表达与临床病理特征和生存期的相关性。**结果** 同吉非替尼敏感细胞株 PC9 相比, 耐药细胞株 H1975 和 A549 中 IGF-1 表达增加( $P < 0.05$ ), IGFBP 表达降低; 加入不同浓度的 BMS536924 可促进吉非替尼对耐药细胞株的增殖抑制( $P < 0.05$ )。在接受 EGFR-TKIs 治疗的患者中, 疾病进展者的 IGF-1 水平较疾病控制者有所增高( $P = 0.052$ ); 原发性耐药者较获得性耐药者的 IGF-1 水平升高( $P = 0.02$ )。IGF-1 表达阴性患者的生存期高于阳性患者( $P = 0.002$ )。**结论** IGF-1 在耐药 NSCLC 细胞株及患者血清中均有高表达, 使用 IGF-1R 拮抗剂可逆转耐药细胞对 EGFR-TKIs 的反应; IGF-1 表达与患者预后相关。

**[关键词]** 胰岛素样生长因子 1; 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂; 肿瘤抗药性; 非小细胞肺癌

**[中图分类号]** R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)11-1203-06

## Role of insulin-like growth factor 1 in drug resistance to EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer

NI Jian<sup>1△</sup>, XU Ying<sup>1△</sup>, CHEN Bin<sup>1</sup>, SU Chun-xia<sup>1</sup>, TANG Liang<sup>2</sup>, ZHAO Yin-min<sup>2</sup>, XU Jian-fang<sup>1\*</sup>

1. Department of Oncology, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China

2. Central Lab, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) resistant non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines and patients, and to discuss the relevant clinical significance. **Methods** Levels of IGF-1 were measured by ELISA kit in PC9, A549, H1975 cells and sera of EGFR-TKIs treated NSCLC patients; insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) expression was examined by Western blotting analysis and immunocytochemical method. Cell growth of NSCLC cells treated with gefitinib and BMS536924 (antagonist of IGF-1 receptor) was determined by MTT. The clinicopathological characteristics and survival period of 84 patients receiving EGFR-TKIs treatment were collected and their relationship with IGF-1 expression was analyzed. **Results**

It was found that IGF-1 level in sensitive cell line PC9 was significantly higher than those in EGFR-TKIs resistant cell lines A549 and H1975 ( $P < 0.05$ ), while IGFBP expression was lower than those in A549 and H1975 cells. Addition of BMS536924 of different concentrations significantly promoted the inhibitory effect of gefitinib against growth of A549 and H1975 cells ( $P < 0.05$ ). The patients with disease progression showed higher IGF-1 expression than those without disease progression ( $P = 0.052$ ), while the patients with intrinsic resistance to EGFR-TKIs had significantly higher IGF-1 level than those with acquired resistance ( $P = 0.02$ ). The patients with IGF-1 negative expression had significantly longer survival than those with positive expression ( $P = 0.002$ ). **Conclusion** IGF-1 expression is detected in EGFR-TKIs resistant NSCLC cell lines and patients, and antagonist of IGF-1 receptor can restore the sensitivity to EGFR-TKIs. The expression of IGF-1 is also a prognostic factor of NSCLC patients.

**[Key words]** insulin-like growth factor 1; epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors; neoplasm drug resistance; non-small cell lung cancer

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(11):1203-1208]

**[收稿日期]** 2014-04-13 **[接受日期]** 2014-09-25

**[基金项目]** 上海市卫生局科研课题(2010045). Supported by Project of Shanghai Municipal Health Bureau (2010045).

**[作者简介]** 倪健, 博士, 主任医师, 硕士生导师. E-mail: drnijian@189.cn; 徐瑛, 副主任医师. E-mail: xuying2186@hotmail.com

△共同第一作者(Co-first authors).

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-65115006-3063, E-mail: xujianfang63@aliyun.com

支气管肺癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其中80%为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。因临床表现无特异性,大多数患者在诊断时已处于疾病晚期,从而失去了根治的机会。针对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的靶向药物延长了晚期 NSCLC 患者的生存期,EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(EGFR tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs)治疗有效患者的生存期可达到30个月以上<sup>[1]</sup>,但不可避免的耐药性的发生限制了患者的更多获益。

目前 EGFR-TKIs 的耐药机制尚未完全明确,推测为多种因素参与的复杂过程,包括 EGFR 基因的正常表达<sup>[2]</sup>,治疗后第二突变的激发;EGFR 信号转导旁路上的其他激酶受体如胰岛素样生长因子1受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R)的激活<sup>[3]</sup>等。胰岛素样生长因子1(IGF-1)通过激活细胞膜外受体 IGF-1R 参与多种恶性肿瘤的发生和发展,两者的相互作用由 IGF 结合蛋白(insulin growth factor binding protein, IGFBP)调控<sup>[4]</sup>。IGF-1R 可与 EGFR-TKIs 形成二聚体,从而启动 PI3K/AKT 通路,促进癌细胞增殖,形成耐药性<sup>[4-5]</sup>。目前已在多种实体瘤的耐 EGFR-TKIs 细胞株中发现了 IGFBP 表达下调和 IGF-1R 表达增加<sup>[6-8]</sup>,因此增加抗 IGF-1R 靶体的药物比单用 EGFR-TKIs 可能对某些肿瘤患者更为有效。

本研究拟通过检测 EGFR-TKIs 吉非替尼(gefitinib)敏感细胞株(PC9)及耐药人 NSCLC 细胞株(A549、H1975)中 IGF-1 和 IGFBP 表达,明确 IGF-1 在 NSCLC 耐 EGFR-TKIs 中的可能作用,通过细胞增殖实验观察 IGF-1R 拮抗剂 BMS536924 和吉非替尼的联合效应;并通过检测 EGFR-TKIs 治疗患者的血清 IGF-1 水平,明确 IGF-1 与患者临床病理学的关系,探索 IGF-1R 拮抗剂临床应用的指征。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞实验

1.1.1 细胞株及试剂 人 NSCLC 细胞株 PC9 (EGFR-TKIs 敏感细胞株), A549、H1975 (EGFR-TKIs 耐药细胞株)来自于我院肺癌免疫室,培养于含5% FCS 的 RPMI 1640 培养液中,在5% CO<sub>2</sub>、

37℃ 细胞培养箱中常规培养传代。吉非替尼(ZD1839)及 BMS536924(IGF-1R 拮抗剂)购自 Selleck 公司。

1.1.2 细胞增殖测定 将 A549、PC9 和 H1975 细胞以  $6 \times 10^3$  个/孔密度接种到 96 孔板中,培养 24 h 待细胞贴壁后,加入不同浓度 BMS536924(0、1、10、100、1 000、5 000 nmol/L)和(或)吉非替尼(5 μmol/L),72 h 后以四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定药物对肿瘤细胞的增殖抑制作用,每个药物浓度重复 8 孔,使用 ELISA 计数仪确定细胞在 490 nm 处的光密度值(D),以每孔所测得的 D 值占对照孔的 D 值的百分数来表示细胞增殖水平。

1.1.3 ELISA 法测定细胞中 IGF-1 表达 ELISA 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司,细胞提取参照说明书进行;按说明书进行检测。

1.1.4 蛋白质印迹法检测 IGFBP 表达 采用 RITTA 裂解液提取培养细胞的蛋白并使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定浓度。30 μg 总蛋白经变性后上样到 SDS-PAGE 胶,半干法转至 PVDF 膜。加入抗人 IGFBP 一抗(1:50)4℃ 过夜振荡孵育后洗膜,然后加二抗室温振荡孵育 2 h 后洗膜,使用电化学发光试剂盒检测,摄片,洗片。以 β-actin 为对照。

1.1.5 免疫细胞化学染色检测 IGFBP 表达 培养、固定细胞于 6 孔板,漂洗后,室温下血清封闭 20 min,加入抗人 IGFBP(1:200)4℃ 孵育过夜,漂洗后二抗室温孵育 20 min,漂洗,DAB 显色,苏木精复染,自来水冲洗后显微镜下观察。免疫细胞化学结果综合阳性率和阳性细胞的染色强度评分共同决定。阳性率评分:0 分,阳性细胞数 < 5%;1 分,阳性细胞数占 5%~25%;2 分,阳性细胞占 25%~75%;3 分,阳性细胞占 75%~100%;阳性细胞染色强度评分:0 分,无染色;1 分,弱染色(淡黄色);2 分,中等强度染色(黄色);3 分,强染色(棕黄色)。阳性细胞数 < 5% 者无论染色强度评分如何,均判为阴性;阳性细胞数 ≥ 5% 者判为阳性,其中 2 种评分之和为 2~4 分者判为弱阳性(+);2 种评分之和为 5~6 分者判为强阳性(++)。

### 1.2 临床研究

1.2.1 资料采集 2010 年 10 月至 2012 年 10 月在我院接受 EGFR-TKIs(吉非替尼或厄洛替尼)靶向

治疗的 NSCLC 患者共 84 例。患者中男性 38 例, 女性 46 例; 中位年龄 58 (39~80) 岁; 参照国际肺癌研究协会 (IASLC) 2009 年第 7 版 TNM 分期, III B、IV 期患者分别为 14、70 例, 病理类型腺癌、鳞癌、其他 (腺鳞混合癌、大细胞癌) 分别为 71、7、6 例, 不吸烟、轻度吸烟 (吸烟指数  $< 20$  包年)、重度吸烟 (吸烟指数  $\geq 20$  包年) 患者分别为 53、2、29 例。所有患者在病程中均接受过一线和 (或) 二线化疗。收集所有患者的病例资料并进行电话随访, 末次随访时间为 2013 年 12 月, 失访 6 例, 生存期的计算从确诊时开始到患者死亡或末次随访时间为止。

1.2.2 血清 IGF-1 水平测定 所有患者在接受靶向治疗前取空腹外周静脉血 3 mL, 室温静置 0.5 h, 离心 10 min 后吸取血清分装, 于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存待测。采用 ELISA 法测定血清中 IGF-1 表达, 方法同前。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。多组间均数的比较采用方差分析 (ANOVA), 率的比较采用  $\chi^2$  检验; 采用 Kaplan-Meier 生存曲线法进行生存分析, 应用 log-rank 检验比较生存率的差异。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 细胞实验结果

2.1.1 吉非替尼耐药细胞株中 IGF-1 和 IGFBP 的表达 如图 1 和 2 所示, 同吉非替尼敏感细胞株 PC9 相比, 吉非替尼耐药细胞株 H1975 和 A549 中 IGF-1 表达分别增加 47% 和 107% ( $P=0.04$ ,  $P=0.001$ ), 细胞蛋白中 IGFBP 表达则降低。免疫细胞化学显示 PC9 细胞株的胞质或细胞膜出现棕黄色强染色, 阳性细胞数  $> 75\%$ , 评分 6 分, 为强阳性 (++) ; 而 A549 和 H1975 表现为淡黄色至黄色染色, 染色范围  $< 50\%$ , 评分 2~4 分, 为弱阳性 (+), 见图 3。

2.1.2 IGF-1 受体拮抗剂对吉非替尼耐药细胞株增殖的影响 如图 4 所示,  $0.05 \mu\text{mol/L}$  吉非替尼可明显抑制肿瘤 PC9 细胞生长, 加入 BMS536924 后对细胞增殖无明显影响; 而 A549 和 H1975 细胞株显示了对吉非替尼的耐药性,  $5 \mu\text{mol/L}$  的吉非替尼分别抑制了 4% 和 14.5% 的细胞生长, 加入 BMS536924 后, 细胞生长明显受抑, 且随着 BMS536924 浓度的增加而加强。

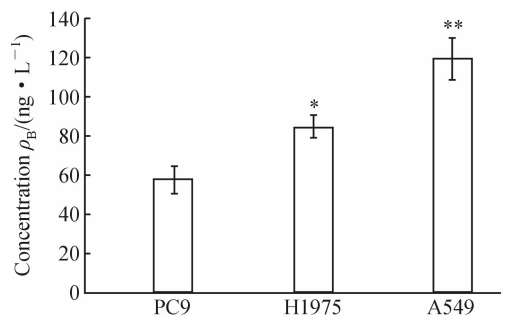


图 1 人肺癌细胞株中 IGF-1 表达

Fig 1 Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression in human lung cancer cell lines

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs PC9 cell lines,  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$

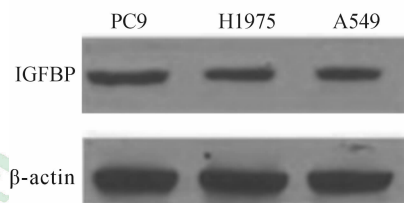


图 2 人肺癌细胞株中 IGFBP 表达 (蛋白质印迹分析)

Fig 2 Insulin growth factor binding protein (IGFBP) expression levels in human lung cancer cell lines (Western blotting analysis)

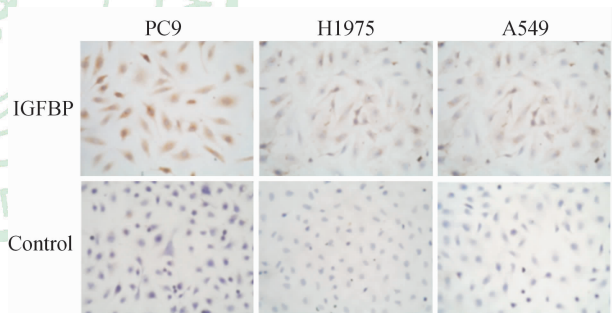


图 3 人肺癌细胞株中 IGFBP 表达的免疫细胞化学检测

Fig 3 Immunocytochemistry detection of insulin growth factor binding protein (IGFBP) in human lung cancer cell lines

IGFBP staining showed cytoplasmic light yellow to brown staining. Original magnification:  $\times 200$

2.2 临床资料分析 至随访结束, 共有 65 例患者死亡, 生存 13 例, 失访 6 例。IGF-1 表达与患者的性别、病理类型、疾病分期、吸烟状况均无关 (表 1)。在接受 EGFR-TKIs (吉非替尼或厄洛替尼) 治疗的 84 例患者中, 2 例患者仍在用 EGFR-TKIs, 疾病进展者 24 例, 疾病控制者 60 例, 其中控制时间  $< 6$  个月 11 例 (7 例疾病稳定, 4 例部分缓解),  $\geq 6$  个月 49 例 (均为部分缓解)。同疾病控制者  $[(67.16 \pm 18.05)$

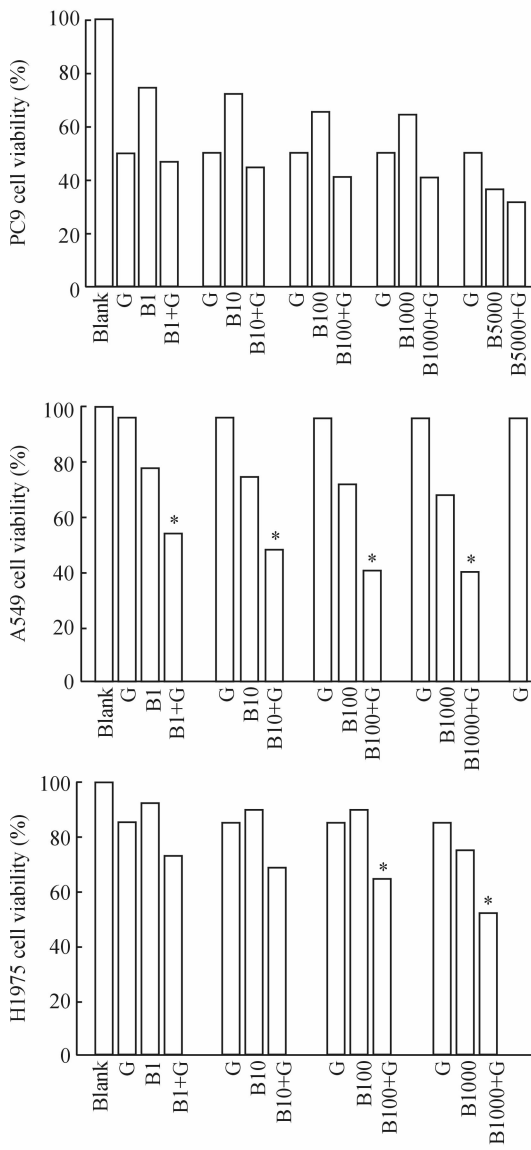


图4 吉非替尼和 IGF-1 受体拮抗剂 BMS536924 对各组细胞株增殖的影响

Fig 4 Effect of gefitinib and BMS536924

(antagonist of IGF-1 receptor) on cell growth in each group

IGF-1; Insulin-like growth factor 1; B; BMS536924; G; Gefitinib (5 μmol/L); B1, B10, B100, B1000, and B5000 corresponds the concentrations of 1, 10, 100, 1 000, and 5 000 nmol/L. \* P<0.05 vs blank or gefitinib alone or the corresponding BMS536924 groups of different concentrations. n=4,  $\bar{x} \pm s$

ng/mL] 相比, 疾病进展者血清 IGF-1 表达 [(98.68±26.17)ng/mL]增高,但未达到统计学意义(P=0.052);除2例仍在用 EGFR-TKIs 的患者外,其余患者均出现耐药性,将 EGFR-TKIs 疾病控制大于6个月定义为获得性耐药<sup>[9]</sup>,其余归为原发性耐药,后者的 IGF-1 水平[(76.69±20.68)ng/

mL,n=35]明显高于前者[(65.52±15.85)ng/mL,n=49],差异有统计学意义(P=0.02)。所有患者从确诊开始计算的中位生存期为14.1(2.2~59)个月。参照 Masago 等<sup>[10]</sup>的方法,以 ROC 曲线确定 IGF 的临界值为 92.4 ng/mL(敏感度 60%,特异度 89%),≥该值为阳性,<该值为阴性,则疾病控制者和疾病进展者中分别有 88%(53/60)和 50%(12/24)为阴性表达者,表达阴性者的生存期明显高于阳性患者(P=0.002),见图5。

表1 NSCLC 患者的临床病理特征和 IGF-1 表达

Tab 1 Clinicopathological characteristics and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients

Index	n	IGF-1 $\rho_B$ /(ng · mL <sup>-1</sup> )	P
Gender			0.836
Male	38	77.27±30.83	
Female	46	75.14±20.82	
Pathology			0.44
Adenocarcinoma	71	77.26±21.6	
Squamous cell carcinoma	7	88.18±34.4	
Others	6	52.21±6.57	
Smoking history			0.79
Never	53	76.74±22.08	
Light(<20 pack-years)	2	74.23±11.08	
Heavy(≥20 pack-years)	29	79.85±27.47	
Stage			0.40
III B	14	89.17±36.44	
IV	70	72.97±20.30	

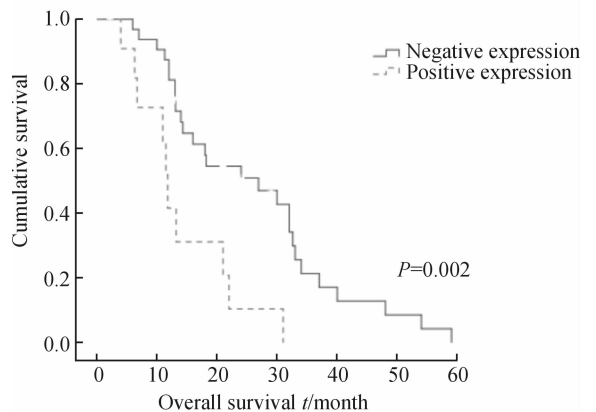


图5 IGF-1 表达阴性和阳性 NSCLC 患者的生存曲线  
Fig 5 Survival curves of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with negative or positive expression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1)

### 3 讨论

EGFR-TKIs 的耐药机制包括原发性耐药和获得性耐药。既往研究表明 EGFR 酪氨酸激酶结构域的突变是 EGFR-TKIs 治疗敏感的重要原因。EGFR 19 外显子的缺失突变和 21 外显子的 L858 替换突变是最常见的基因突变<sup>[11]</sup>, 不存在这些突变的患者的 EGFR-TKIs 治疗有效率和疾病进展时间明显低于化疗<sup>[12]</sup>; EGFR 酪氨酸激酶区的 T790M 突变是获得性耐药的常见原因之一, 存在于约 50% 的耐药患者中<sup>[3]</sup>; 此外, 基因不稳定性肿瘤细胞在药物诱导的选择性压力下, 也可能会启动其他生存机制, 从而产生耐药<sup>[3]</sup>。

Cortot 等<sup>[13]</sup> 的研究表明, 对 EGFR-TKIs 敏感的人肺癌细胞株 PC9 在经过药物诱导处理形成耐药株后, 可发现 T790M 突变以及激活的 IGF-1R 信号, 使用 IGF-1R 拮抗剂可以恢复细胞对 EGFR-TKIs 的敏感性。IGF-1R 同样参与表达野生型 EGFR 的肺癌细胞对厄洛替尼的获得性耐药<sup>[14]</sup>; 我们的研究发现同敏感细胞株 PC9 相比, 耐 EGFR-TKIs 的 A549 和 H1975 细胞中 IGF-1 表达增加, IGF1BP 表达下降; 当联合 IGF-1R 拮抗剂 BMS536924 时, A549 和 H1975 细胞株对吉非替尼处理的敏感性增加, 且随着 BMS536924 浓度的增加而加强。提示 IGF-1/IGF-1R 参与了这些细胞对吉非替尼的耐药性。IGF-1R 的结构和 EGFR 有同源性, 两者享有相同的信号通路, 这一点可以在理论上解释 IGF-1R 在 EGFR-TKIs 耐药中的重要作用<sup>[15]</sup>。

对 84 例患者的临床资料分析显示, 根据 ROC 曲线设定 IGF-1 的临界值, EGFR-TKIs 治疗后疾病进展者中有更高的 IGF-1 阳性表达率; 从定量数值看, 疾病控制患者的 IGF-1 表达低于疾病进展患者。而根据目前对 EGFR-TKIs 获得性耐药的临床定义, 我们将治疗后疾病控制达 6 个月以上者记为获得性耐药组, 剩余为原发性耐药, 可发现前者的 IGF-1 表达明显低于后者。以上结果提示 IGF-1 至少参与了部分 NSCLC 患者对 EGFR-TKIs 的耐药, 特别是原发性耐药患者, 在既往研究中未见相关报道。Peled 等<sup>[16]</sup> 采用免疫组化法分析了 98 例接受吉非替尼治疗的 NSCLC 患者的肿瘤组织标本中 IGF-1R 的表达并进行定量分析, 结果发现在野生型或无 19 外显

子缺失及 21 外显子突变的患者中, IGF-1R 表达与患者的无病生存期无关; 在有 19 外显子缺失或 21 外显子突变的患者中, IGF-1R 低表达患者的无病生存期有延长趋势 ( $P=0.0856$ ), 因此认为 IGF-1R 表达在对 EGFR-TKIs 的原发性耐药中意义不大。两个研究结果的差异可能由多种因素造成: (1) 检测方法不同。我们的研究检测了患者血清的 IGF-1 表达, Peled 等检测了 IGF-1R 的表达, 有研究发现治疗前血清 IGF-1 的表达可以作为抗 IGF-1R 治疗的分子标记物<sup>[17]</sup>。(2) 根据 ROC 曲线设定的临界值不同。我们研究中临界值的敏感度为 60%, 特异度为 89%, 而 Peled 等研究中敏感度及特异度均为 70%, 因此后者可能有更高的阳性率。(3) 对原发性和继发性耐药的定义不同。我们的研究结合了临床疗效评价, 而 Peled 等的研究中仅以分子生物学标记为指标。由于两个研究样本量均偏少, 而且无检测指标动态观察结果, 因此最终结论尚需大样本的临床资料 and 更完善的试验设计来验证。

我们未发现 IGF-1 表达与患者的临床病理特征的相关性, 但患者血清中 IGF-1 阴性表达者的生存期高于阳性表达者, 这同 Gately 等<sup>[18]</sup> 及 Kim 等<sup>[19]</sup> 的研究结果相似, 上述研究者采用免疫组化的方法发现 IGF-1 高表达与 NSCLC 患者的预后不良有关。

如上所述, IGF-1 在 EGFR-TKIs 耐药的 NSCLC 中扮演了重要角色, 联合 IGF-1R 激酶抑制剂或单克隆抗体有可能逆转部分患者对 EGFR-TKIs 的耐药性。Gong 等<sup>[20]</sup> 检测了多种 NSCLC 细胞株, 发现有 IGF-1R 高表达的细胞株对其单克隆抗体 R1507 治疗敏感。但 IGF-1/IGF-1R 表达增高的诱导机制尚未完全明确, 其在临床应用中正常值的界定以及 IGF-1 在疾病不同时期是否会有动态变化也需大样本的临床研究进一步确定。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Zhou C, Wu Y L, Chen G, Feng J, Liu X Q, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3

- study[J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12: 735-742.
- [2] Tamura K, Okamoto I, Kashii T, Negoro S, Hirashima T, Kudoh S, et al. Multicentre prospective phase II trial of gefitinib for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations; results of the West Japan Thoracic Oncology Group trial (WJTOG0403)[J]. *Br J Cancer*, 2008, 98: 907-914.
- [3] Nguyen K S, Kobayashi S, Costa D B. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway[J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10: 281-289.
- [4] Casa A J, Dearth R K, Litzenburger B C, Lee A V, Cui X. The type I insulin-like growth factor receptor pathway: a key player in cancer therapeutic resistance[J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 3273-3287.
- [5] Adams T E, Epa V C, Garrett T P, Ward C W. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57: 1050-1093.
- [6] Camirand A, Zakikhani M, Young F, Pollak M. 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: R570-R579.
- [7] Guix M, Faber A C, Wang S E, Olivares M G, Song Y, Qu S, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118: 2609-2619.
- [8] Jones H E, Goddard L, Gee J M, Hiscox S, Rubini M, Barrow D, et al. Insulin-like growth factor- I receptor signaling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells[J]. *Endocrine Related Cancer*, 2004, 11: 793-814.
- [9] Jackman D, Pao W, Riely G J, Engelman J A, Kris M G, Jänne P A, et al. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28: 357-360.
- [10] Masago K, Fujita S, Togashi Y, Kim Y H, Hatachi Y, Fukuhara A, et al. Clinical significance of epidermal growth factor receptor mutations and insulin-like growth factor 1 and its binding protein 3 in advanced non-squamous non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26: 795-803.
- [11] Tamura K, Okamoto I, Kashii T, Negoro S, Hirashima T, Kudoh S, et al. Multicentre prospective phase II trial of gefitinib for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations; results of the West Japan Thoracic Oncology Group trial (WJTOG0403) [J]. *Br J Cancer*, 2008, 98: 907-914.
- [12] Garassino M C, Martelli O, Brogginini M, Farina G, Veronese S, Rulli E, et al. Erlotinib versus docetaxel as second-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer and wild-type EGFR tumours (TAILOR): a randomised controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14: 981-988.
- [13] Cortot A B, Repellin C E, Shimamura T, Capelletti M, Zejnullahu K, Ercan D, et al. Resistance to irreversible EGF receptor tyrosine kinase inhibitors through a multistep mechanism involving the IGF1R pathway [J]. *Cancer Res*, 2013, 73: 834-843.
- [14] Suda K, Mizuuchi H, Sato K, Takemoto T, Iwasaki T, Mitsudomi T. The insulin-like growth factor 1 receptor causes acquired resistance to erlotinib in lung cancer cells with the wild-type epidermal growth factor receptor[J]. *Int J Cancer*, 2014, 135: 1002-1006.
- [15] Singh I, Amin H, Rah B, Goswami A. Targeting EGFR and IGF 1R: a promising combination therapy for metastatic cancer[J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2013, 5: 231-246.
- [16] Peled N, Wynes M W, Ikeda N, Ohira T, Yoshida K, Qian J, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) as a biomarker for resistance to the tyrosine kinase inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer[J]. *Cell Oncol*, 2013, 36: 277-288.
- [17] Gualberto A, Hixon M L, Karp D D, Li D, Green S, Dolled-Filhart M, et al. Pre-treatment levels of circulating free IGF-1 identify NSCLC patients who derive clinical benefit from figitumumab[J]. *Br J Cancer*, 2011, 104: 68-74.
- [18] Gately K, Forde L, Cuffe S, Cummins R, Kay E W, Feuerhake F, et al. High coexpression of both EGFR and IGF1R correlates with poor patient prognosis in resected non-small-cell lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2014, 15: 58-66.
- [19] Kim J S, Kim E S, Liu D, Lee J J, Solis L, Behrens C, et al. Prognostic impact of insulin receptor expression on survival of patients with nonsmall cell lung cancer[J]. *Cancer*, 2012, 118: 2454-2465.
- [20] Gong Y, Yao E, Shen R, Goel A, Arcila M, Teruya-Feldstein J, et al. High expression levels of total IGF-1R and sensitivity of NSCLC cells *in vitro* to an anti-IGF-1R antibody (R1507) [J]. *PLOS One*, 2009, 4: e7273.