·基础医学·

帕博西尼和厄洛替尼联合治疗结直肠癌的协同作用及其机制

周小晖,贡叶清,刘晓蓉,林 凡*

南京医科大学细胞生物学系,江苏 南京 211166

[摘 要] **目的**:评估帕博西尼(Palbociclib)单独或联合表皮生长因子缀体抑制剂厄洛替尼(Erlotinib)治疗结直肠癌(colorectal cancer,CRC)的有效性。**方法**:采用Alamar blue法和克隆形成实验检测帕博西尼单独或联合厄洛替尼对CRC细胞系增殖的影响;采用DNA含量定量法检测细胞周期分布变化;分别通过β-半乳糖苷酶和DCFH-DA染色检测细胞衰老和活性氧积累的情况;通过Western blot分析相关蛋白表达水平;在CRC患者来源异种移植模型中检测联合治疗的效果。**结果**:帕博西尼单独治疗有效抑制CRC细胞增殖,诱导细胞G1期阻滞、细胞衰老和胞内活性氧积累。帕博西尼和厄洛替尼联合治疗CRC具有协同作用,厄洛替尼进一步增强帕博西尼对CRC的多种抑制效应和多信号通路抑制,在CRC患者来源的异种移植模型中显示出了良好的协同抑制作用。**结论**:帕博西尼联合厄洛替尼在体外和体内能够协同抑制结直肠癌的生长。

[关键词] 结直肠癌;帕博西尼;厄洛替尼;异种移植模型

[中图分类号] R735.37 [文献标志码] A [文章编号] 1007-4368(2021)08-1121-07

doi:10.7655/NYDXBNS20210803

Combination of palbociclib and erlotinib exhibits synergistic antitumor effect in colorectal cancer

ZHOU Xiaohui, GONG Yeqing, LIU Xiaorong, LIN Fan*

Department of Cell Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166

[**Abstract**] **Objective**: This stndy aims to evaluate the efficacy of palbociclib alone or in combination with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in the treatment of colorectal cancer(CRC). **Methods**: Alamar bule method and clone formation assay were used to detect the effects of palbociclib alone or in combination with erlotinib on the proliferation of CRC cell lines. Cell cycle distribution was determined by DNA content. Cell senescence and reactive oxygen species (ROS) accumulation were detected by β-galactosidase and DCFH-DA staining. The expression levels of related proteins were analyzed by Western blot and their clinical efficacies were evaluated in CRC patient-derived xenograft models. **Results**: Palbociclib inhibits CRC cell proliferation, induce G1 cell arrest, cell senescence and intracellular ROS accumulation effectively. Combination of palbociclib and erlotinib exhibits synergistic effects on CRC, and erlotinib further enhances the multiple inhibitory effects and multi-signaling pathway inhibition of palbociclib on CRC. Synergistic inhibition was also shown in CRC patient-derived xenograft models. **Conclusion**: Palbociclib combined with erlotinib synergistically inhibits the growth activity of colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*.

[**Key words**] colorectal cancer; palbociclib; erlotinib; patient-derived xenograft

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(08): 1121-1127]

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)是世界上癌症死亡的主要原因,每年确诊的结直肠癌新发病例约184万例,且大部分确诊病例发现于晚期,姑息治疗是晚期转移性结直肠癌的主要治疗方法,总体疗效有限,5年生存率仅为12%[1]。结直肠癌是一种高度异质性的癌症类型,这意味着基因突变、表观遗传调控和肿瘤微环境复杂性的增加,对结直肠癌的靶向治疗构成了严峻挑战[2-3]。因此,有效且多功能的结直肠癌靶向治疗亟待开发。

近年来,CDK4/6抑制剂为细胞周期靶向治疗开

[基金项目] 国家自然科学基金(81672962)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:linfan@njmu.edu.cn

辟了新途径，在多种类型的肿瘤血脑屏障治疗中显示出了良好的疗效。虽然cyclin/CDK复合物基因突变很少见[4]，但cyclin D1[5-6]在结直肠癌中常过表达，且受到上游表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）、KRAS、PTEN等基因异常突变的影响导致细胞周期失调。进一步研究发现，帕博西尼（Palbociclib，商品名爱博新）作为首个批准上市的CDK4/6抑制剂，可诱导细胞衰老[7]、凋亡[8]、增强放疗[9]和靶向治疗[10]的敏感性。由于研究有限，目前尚不清楚帕博西尼治疗结直肠癌是否有效，因此，本研究的首要目标是评估帕博西尼在结直肠癌模型中的有效性。

EGFR作为致癌驱动因子，在60%~80%的CRC中过表达，为结直肠癌的治疗提供了重要靶点[11]。厄洛替尼（Erlotinib，商品名特罗凯）是一种有效的小分子EGFR酪氨酸激酶抑制剂，已被批准用于晚期胰腺癌和非小细胞肺癌的治疗[12]。之前在CRC的临床试验评估中显示毒性可耐受[13]。在食管鳞状细胞癌中，厄洛替尼联合帕博西尼在体内表现出良好的效果[14]。因此，本研究的第二个目标是评估帕博西尼联合厄洛替尼治疗结直肠癌是否存在协同作用，并相互增强抗肿瘤活性。

1　材料和方法

1.1　材料

人结直肠癌细胞系HT29购自于中国科学院细胞库，p-EGFR、p-AKT、AKT、p-ERK1/2、p-MEK1/2、p-RB、RB、GSK3β、p-GSK3β、FoxM1、p-4EBP1和GAPDH等抗体购自美国CST公司，帕博西尼和厄洛替尼（MCE公司，上海），L-乳酸钠和Captisol（阿拉丁，上海），DMEM培养基、胎牛血清、胰酶、青/链霉素双抗和PBS缓冲液（Gibco公司，美国），细胞裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、Alamar blue（上海翊圣生物），吉姆萨染色液（南京凯基生物），20,70-二氯荧光素二乙酸酯（DCFH-DA）活性氧荧光探针（北京索莱宝），20只4周龄雌性SPF级NCG（NOD-Prkdcem26Il2rgem26/Gpt）购于江苏集萃药康生物科技公司。结直肠癌组织通过江苏省肿瘤医院获得，来自于1例因原发肿瘤而接受化疗后复发的患者，命名为P328。动物实验全程将按照南京医科大学动物伦理委员会批准的实验方案进行饲养和维护。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养和药物配制

人结直肠癌细胞系HT29的培养基为DMEM加10%胎牛血清和100 μg/mL青霉素/链霉素。所有细胞置于含5% CO_2培养箱，37 ℃培养。细胞培养液每2 d更换1次，常规PCR检测支原体。所有实验都采用对数生长期细胞进行。

帕博西尼和厄洛替尼细胞用药以200 μmol/L和10 mmol/L的浓度溶解于DMSO中，并在-80 ℃下储存。体内用药前现配现用，帕博西尼和厄洛替尼以2 mg/mL的浓度分别溶于pH=4的50 mmol/L L-乳酸钠溶液和6% Captisol溶液。

1.2.2　细胞活力测定

取状态良好并处于对数生长期的细胞，消化后细胞计数，以每孔2 000个细胞的密度、100 μL的体积接种于96孔板中。每个实验组设置3~6个重复孔。细胞铺板24 h后使用完全培养基将药物储存液梯度稀释成不同的工作浓度，每孔加入100 μL的含药培养基处理3 d。每孔加入10 μL Alamar blue溶液，同时设置3~6个阴性对照。继续培养4 h后使用化学发光仪检测每孔的吸光度值，激发光波长为534 nm，发射光波长为584 nm。细胞相对增殖率=（加药3 d实验组吸光度值-阴性对照吸光度值）/（未处理组吸光度值-阴性对照吸光度值）×100%。

1.2.3　克隆形成实验

取对数生长期的细胞，以每孔400~800个细胞的密度、1 mL的体积接种于12孔板中。细胞铺板24 h后加入1 mL的含药培养基，每3 d换药，直至对照组细胞密度达到80%~90%。每孔加入4%多聚甲醛固定30 min，后加入吉姆萨染色液，避光染色60 min。染色结束后每孔用去离子水洗去残留的染色液，晾干后拍照。图像使用Image J软件进行细胞密度分析。

1.2.4　细胞内活性氧（reactive oxygen species，ROS）测定

采用荧光探针DCFH-DA检测细胞内ROS水平。细胞铺板后用不同浓度药物处理3 d，细胞经PBS清洗后，使用活性氧反应试剂盒检测细胞内ROS累积水平，反应结束后，将细胞消化收集使用流式细胞分析仪检测染色阳性的细胞发光值。氧化后的激发波长为488 nm，发射波长为525 nm。

1.2.5　细胞周期分布测定

采用DNA含量定量法测定细胞周期分布。细胞铺板后第2天更换无血清培养基处理24 h进行周期同步化，不同浓度的药物处理3 d后，将细胞消化收集至离心管中，1 000 r/min离心3 min去除上清液，用预冷的PBS清洗细胞后再次离心，将预冷的

75%酒精逐滴添加至离心管中，放置-20 ℃固定2 h后将样品离心用1%牛血清白蛋白重悬于PBS中。将细胞用碘化丙啶(PI)和RNaseA以终浓度0.1 mg/mL，在37 ℃下避光染色15 min后流式细胞仪检测。

1.2.6 蛋白免疫印迹实验

总细胞蛋白通过标准流程提取和定量。细胞经过PBS清洗后加入蛋白裂解液置于冰上裂解30 min，13 000 *g* 4 ℃离心15 min后收集上清。采用BCA试剂盒测定蛋白浓度。取等浓度的蛋白样品经SDS-PAGE胶分离后转膜至PVDF膜上。用3%BSA室温封闭2 h，随后4 ℃孵育一抗过夜。TBST洗膜后室温孵育二抗2 h，TBST洗膜后，化学发光仪检测蛋白表达情况。

1.2.7 结直肠癌患者来源的异种移植(PDX)模型的建立与药效实验

4周龄雌性NCG小鼠在4%水合氯醛麻醉后，用75%酒精消毒小鼠左侧腋下。做1个切口形成皮下口袋，将约3 mm^3大小的患者肿瘤组织植入，用手术缝线缝合切口。当肿瘤体积达到80~120 mm^3时，将小鼠随机分为4组，每组5只。分别为对照组、帕博西尼治疗组(25 mg/kg)、厄洛替尼治疗组(50 mg/kg)和联合治疗组。治疗方式为口服灌胃，每周5 d，治疗至少4周。小鼠每隔1 d称重1次，用游标卡尺测量肿瘤体积，肿瘤体积=长×宽^2× 0.5。治疗期间监测肿瘤生长情况，直到肿瘤达到2 000 mm^3的伦理范围最大体积后，对小鼠行安乐死并收集肿瘤组织和器官。

1.3 统计学方法

对于帕博西尼和厄洛替尼药物联用效应的评价，使用Compusyn软件计算协同分数(combination index)，使用Combenefit软件绘制量-效曲线并计算HAS分数。体外数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，体内数据以均数±标准误($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)表示。使用GraphPad Prism 8.0对数据进行双尾Student-*t*检验或方差分析。实验中至少有3个重复孔，并在2个以上的独立实验中重复。$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 帕博西尼抑制结直肠癌HT29细胞增殖、诱导HT29细胞周期阻滞和胞内ROS累积

采用Alamar blue法检测的0~2 μmol/L的帕博西尼作用于结直肠癌细胞HT29后的增殖情况(图1A)；通过克隆形成实验，检测HT29在0.1、0.5和1.0 μmol/L的帕博西尼处理下细胞克隆形成的情况(图1B)，结果显示帕博西尼呈现出剂量依赖性抗增殖和克隆形成抑制作用。

为了探讨帕博西尼在短期增殖实验和长期克隆形成实验中发生药效的机制，检测了帕博西尼治疗后对HT29细胞周期和胞内ROS累积的影响。基于CDK4/6抑制剂的作用机制，帕博西尼能够诱导细胞发生G1期阻滞。低浓度(0.1 μmol/L)的药物处理使得HT29细胞G1期阻滞将近80%，随着浓度增加，阻滞率甚至高达90%(图1C、D)。同时发现，帕博西尼处理导致HT29细胞内ROS水平显著提高，这表明活性氧在细胞内积累可能是帕博西尼发挥作用的重要原因(图1E、F)。

2.2 帕博西尼联合厄洛替尼的协同抗肿瘤作用和对多条致癌信号通路的抑制

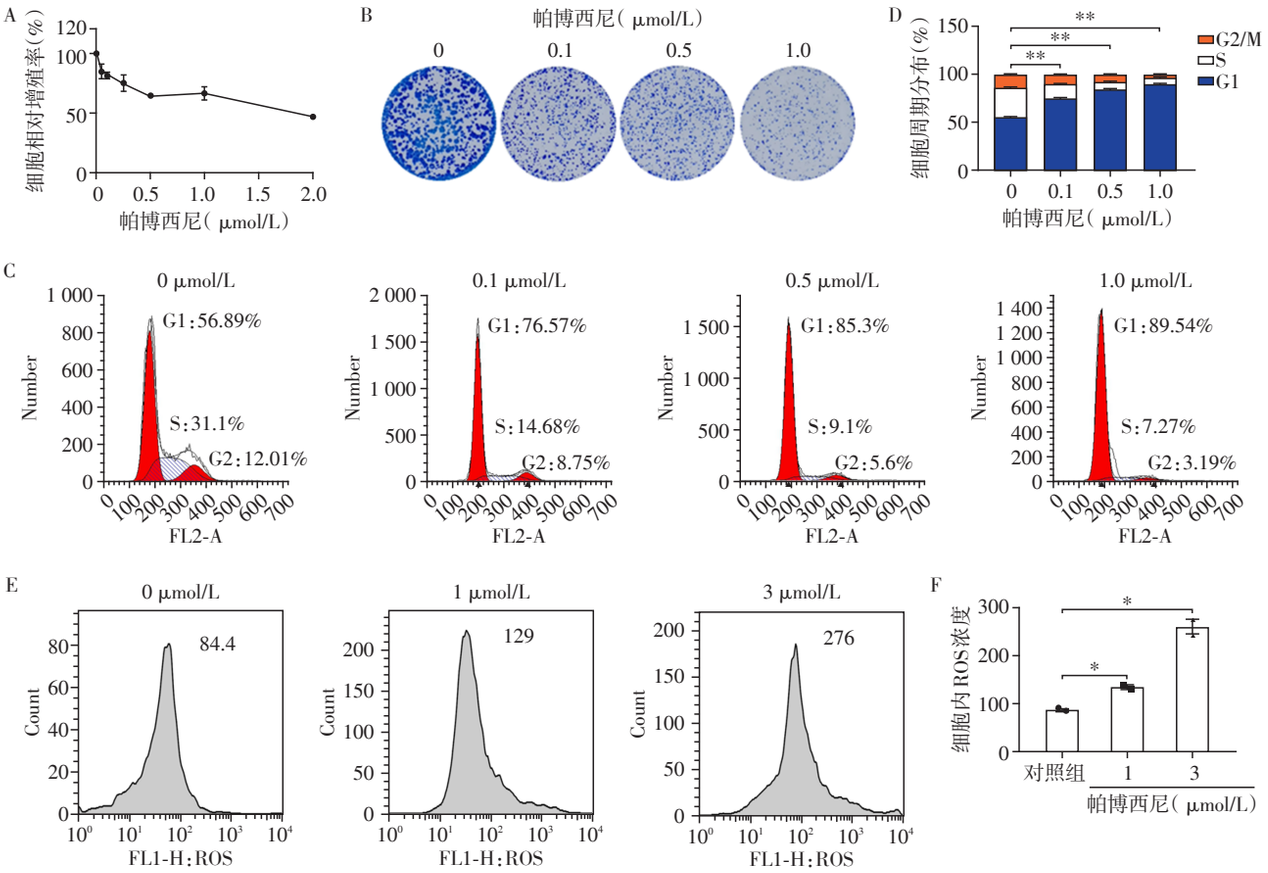
如图2A和2B所示，厄洛替尼的加入显著增强了帕博西尼对HT29细胞的抗增殖活性。等效应图和联合指数CI值计算结果表明两药组合之间的相互作用为协同作用(CI值 < 1表示协同作用，图2C)。此外，使用Combenefit软件[15]生成的HSA协同矩阵显示，大部分两药组合的协同分数都在0以上，表明帕博西尼和厄洛替尼存在协同作用(图2D)。

同时，使用克隆形成实验来评估两药联合使用的长期效果。结果显示，两药联用后与单一药物治疗相比能够显著降低HT29细胞的克隆形成能力(图2E、F)。这些结果表明，在结直肠癌中帕博西尼和厄洛替尼具有联合效应，是一种有潜力的治疗组合方式。

为了解释两药联用的协同效应，通过免疫印迹实验来揭示其作用机制。使用相对较低的浓度(帕博西尼20 nmol/L，厄洛替尼2 μmol/L)处理HT29细胞24 h后提取蛋白，通过蛋白免疫印迹实验检测多条相关的关键信号通路是否发生改变。结果显示，两药联合后能够强有力地抑制多条关键信号通路的活性。首先，相对于单药处理的细胞，两药联合组显著抑制了总RB、p-RB和FoxM1水平；其次，有效抑制了EGFR及其在PI3K和RAS信号通路中的下游分子p-ERK、p-AKT、p-GSK3β和p-4EBP1。两药联用成功地减弱了RB、PI3K和RAS信号通路的强度，而这些信号通路的活性正是影响细胞增殖和生长的重要通路，从而揭示二药联用产生协同效应的原因(图2G)。

2.3 厄洛替尼增强了帕博西尼诱导的细胞周期阻滞和胞内ROS累积

在HT29细胞中观察到帕博西尼和厄洛替尼显



A：Alamar blue实验检测HT29细胞对梯度浓度的帕博西尼处理的短期增殖效应(n=6)；B：克隆实验检测HT29细胞对不同浓度的帕博西尼处理后细胞的克隆形成能力(n=3)，选取代表性图像。C：流式细胞术检测不同浓度帕博西尼处理HT29后的细胞周期分析；D：对细胞周期中各时期占比的统计图；E：HT29细胞在帕博西尼处理后，使用胞内ROS荧光探针DCFH-DA标记细胞内ROS，进行流式细胞术分析；F：对HT29胞内ROS含量进行定量统计。两组比较，$^{*}P<0.01$，$^{**}P<0.001$。

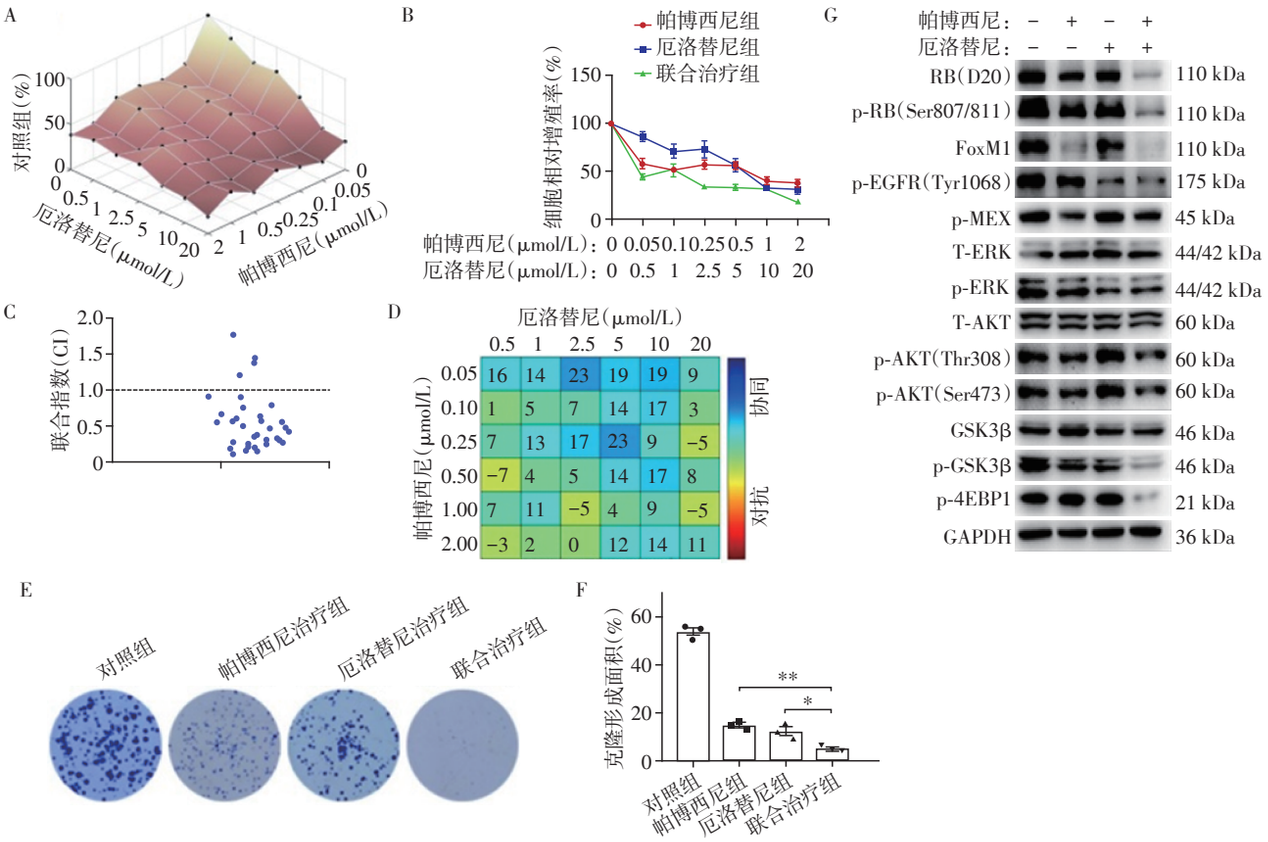
图1　帕博西尼抑制HT29细胞增殖抑制、诱导细胞周期阻滞和胞内ROS积累

Figure 1　Palbociclib inhibited HT29 cell proliferation, induced cell cycle arrest and intracellular ROS accumulation

著的协同效应后，研究了两药联合对细胞周期和胞内ROS累积的影响。同样，帕博西尼单独处理后导致细胞周期发生G1期阻滞，尽管厄洛替尼单独处理对于细胞周期的影响有限，但是厄洛替尼的加入进一步加剧了帕博西尼诱导的G1期阻滞（图3A、B）。随后我们在HT29细胞中检测了联合处理后胞内ROS水平的变化。HT29细胞经单药或联合用药处理后，使用ROS探针DCFH-DA与细胞内的ROS进行氧化水解反应形成带有荧光的DCF，流式细胞仪定量细胞的荧光强度（图3C、D），结果显示，与单药治疗相比，联合治疗显著增强了细胞内ROS的积累。

2.4　在结直肠癌PDX模型中验证两药联用的体内疗效

体外实验已经证明帕博西尼和厄洛替尼对结直肠癌细胞具有显著的联合抑制效应，为了进一步评估这种治疗组合对结直肠癌患者的适用性和潜力，接下来利用患者来源的肿瘤组织构建PDX模型，在小鼠体内对这种治疗方案进行评估，包括治疗效果以及不良反应。P328 PDX源自1例54岁女性结直肠癌患者，她被诊断为Ⅳ期低分化黏液性结直肠腺癌。在P328 PDX模型中，使用帕博西尼（25 mg/kg）联合厄洛替尼（50 mg/kg）灌胃治疗后，在实验终止日即给药后26 d，对照组的肿瘤体积是联合治疗组的2.9倍（图4A），帕博西尼单药治疗和厄洛替尼单药治疗组则分别是联合治疗组的1.6倍和1.4倍。与此同时，接受联合治疗的小鼠体重下降了9%~26%（图4B），提示厄洛替尼在高剂量下存在一定的不良反应。图4C显示了药物处理后PDX328的肿瘤大小（因联合治疗组和厄洛替尼治疗组分别有1只小鼠死亡，最后每组各收集了4个肿瘤），联合治疗组的肿瘤体积呈现出明显小于对照组和单药治疗组肿瘤的趋势。



A：不同浓度组合的帕博西尼和厄洛替尼处理HT29后的剂量-效应曲面图；B：固定组合浓度下帕博西尼和厄洛替尼联合治疗HT29的相对增殖率曲线图；C：使用CompuSyn软件计算帕博西尼和厄洛替尼相互作用的联合指数CI值，CI值点图显示两药联合的强大协同作用(CI＜1表示协同效应)；D：HSA协同矩阵显示两药的相互作用(HAS＞0表示协同效应)；E：1 μmol/L帕博西尼和10 μmol/L厄洛替尼处理HT29检测克隆形成能力(n=3)；F：通过Image J软件将细胞克隆形成中染色阳性细胞进行定量统计，两组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.001$；G：联合治疗抑制HT29细胞多种致癌信号通路。

图2　帕博西尼和厄洛替尼联合治疗对HT29细胞的联合抑制作用

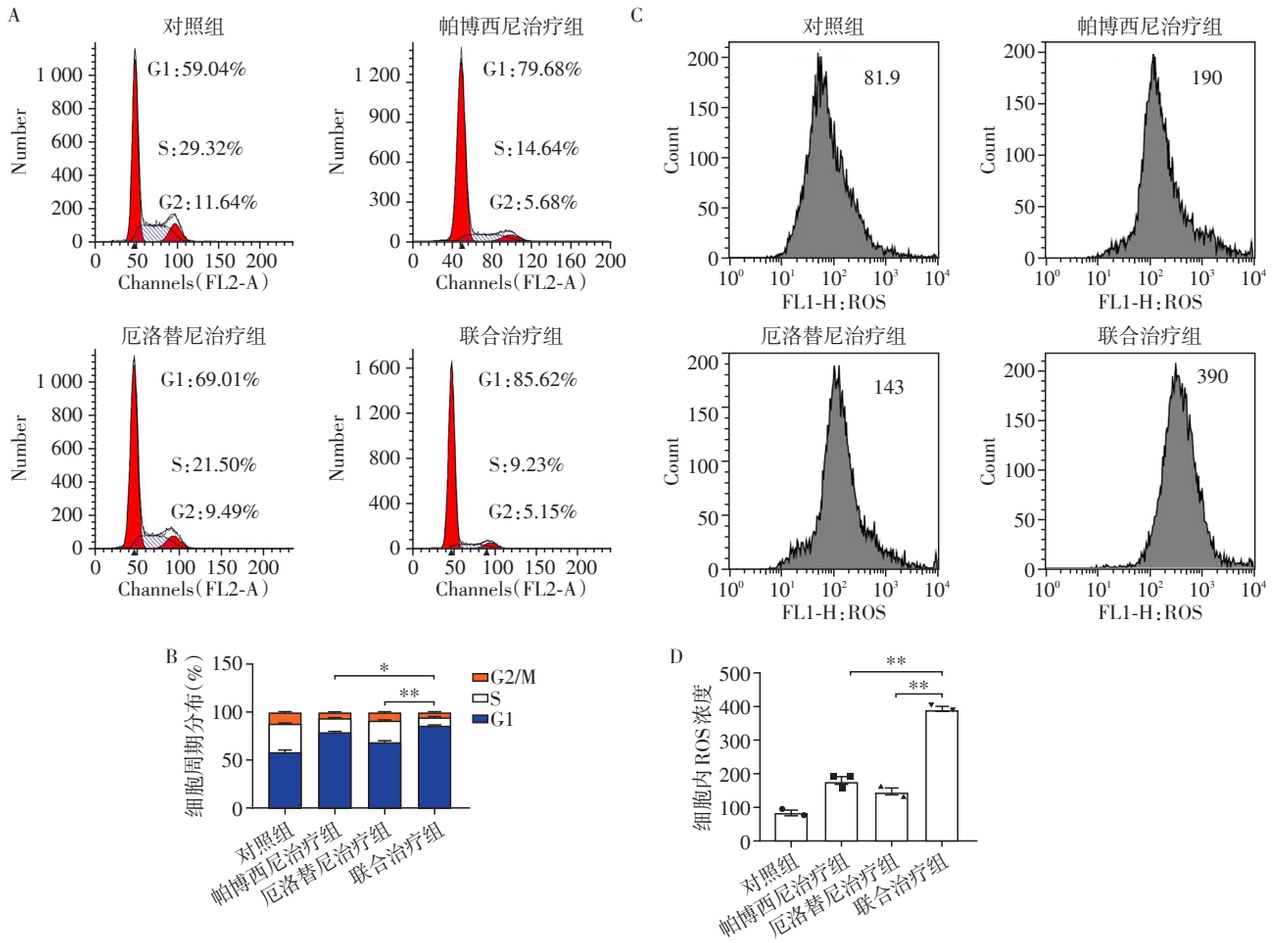
Figure 2　Combined inhibitory effect of palbociclib and erlotinib on HT29 cells

3　讨　　论

本研究首先评估了帕博西尼治疗CRC的潜在价值，以了解帕博西尼的单药作用和抑制CRC细胞增殖的机制。结果表明，帕博西尼确实能够有效抑制CRC细胞的增殖，且帕博西尼能够诱导细胞周期阻滞以及胞内ROS累积的多种效应，这些都有益于CRC的治疗。对于Ⅱ期和Ⅲ期的CRC患者，5年复发率较高(Ⅱ期9%~22%，Ⅲ期17%~44%)[16]，因此理想的靶向治疗不仅要能控制肿瘤进展，还要能降低CRC的复发率。

联合治疗是癌症治疗中提高单药治疗效果，逆转耐药，降低用药剂量，避免脱靶效应带来不良反应的常用方法[17]。尽管帕博西尼具有良好的治疗效果，但之前的临床试验表明，在治疗期间出现了原发和获得性耐药[18]。鉴于CRC的高度异质性，单药帕博西尼不太可能完全控制疾病进展，尽管它在本研究的临床前模型中显示出优秀的抗肿瘤作用。EGFR抑制剂厄洛替尼被广泛用于EGFR突变肿瘤的临床治疗，其不良反应相对可耐受。在本研究中，帕博西尼联合厄洛替尼在结直肠癌细胞HT29中展现出了良好的协同抑制效应，厄洛替尼的加入增强了帕博西尼诱导的细胞周期阻滞和胞内ROS累积效应。通过同时阻断EGFR和CDK4/6-RB信号，两药联用有效抑制了RB、PI3K和RAS信号通路的强度，这可能是两药协同作用的分子机制。

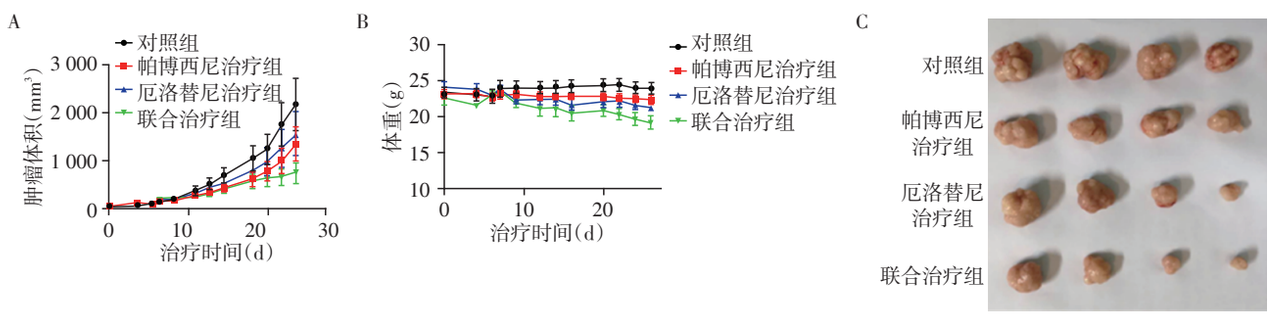
本研究的另一个优势是我们使用了临床相关的PDX模型进行药物疗效研究。传统的细胞源性异种移植模型虽然经常用于药物疗效研究，但这种方法并不能充分预测药物的临床反应[19]。PDX模型很好地保留了原发性结直肠癌的异质性和分子特征，与细胞来源的异种移植模型相比能更好地预



A:帕博西尼和厄洛替尼单独或联合处理后的HT29细胞周期分析;B:HT29细胞各个周期占比的结果统计图;C:流式细胞术分析HT29细胞被DCFH-DA标记的ROS阳性细胞;D:流式检测HT29胞内ROS结果的统计。两组比较,$^{*}P<0.01$,$^{**}P<0.001$。

图3　厄洛替尼增强了帕博西尼诱导的细胞周期阻滞和胞内ROS积累

Figure 3　Erlotinib enhanced palbociclib-induced cell cycle arrest and intracellular ROS accumulation



A:P328 PDX模型的NCG小鼠在帕博西尼和/或厄洛替尼治疗后的肿瘤体积变化;B:小鼠在治疗期间的体重变化曲线;C:P328 PDX模型治疗终止日每个治疗组的小鼠肿瘤图片。

图4　在结直肠癌PDX模型中验证帕博西尼和厄洛替尼联用治疗的体内疗效

Figure 4　*In vivo* efficacy of palbociclib combined with erlotinib in CRC PDX model

测药效[20-21]。与之前的临床研究[13]一致,单药厄洛替尼在结直肠癌中表现出一定的抗肿瘤活性,但这种效果在肿瘤体积或生存期的统计学上未显示出差异。然而,帕博西尼与厄洛替尼联合治疗在P328 PDX模型中也初步验证了两药的体内疗效。

总的来说,本研究数据为帕博西尼靶向治疗CRC提供了实验和理论依据,并且与厄洛替尼联合可以进一步增强其抗肿瘤活性。考虑到帕博西尼和厄洛替尼都是美国食品药品监督管理局批准的药物,在临床中进一步评估这种联合用药方案应有

较大可行性。本研究首次报道了帕博西尼和厄洛替尼联合治疗结直肠癌的效果，如能确定其潜在受益人群、不良反应，并进一步阐明其协同作用的机制，未来有望为晚期结直肠癌治疗提供一种新的治疗方案。

[参考文献]

[1] WOLF A M D, FONTHAM E T H, CHURCH T R, et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the american cancer society [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(4): 250-281

[2] MOLINARI C, MARISI G, PASSARDI A. Heterogeneity in colorectal cancer: a challenge for personalized medicine?[J]. Int J Mil Sci, 2018, 19(12): 3733

[3] SAGAERT X, VANSTAPEL A, VERBEEK S. Tumor heterogeneity in colorectal cancer: what do we know so far? [J]. Pathobiology, 2018, 85(1-2): 72-84

[4] KATO S, SCHWAEDERLE M, DANIELS G A, et al. Cyclin-dependent kinase pathway aberrations in diverse malignancies: clinical and molecular characteristics [J]. Cell Cycle, 2015, 14(8): 1252-1259

[5] ARBER N, HIBSHOOSH H, MOSS S F, et al. Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis [J]. Gastroenterology, 1996, 110(3): 669-674

[6] BARTKOVA J, LUKAS J, STRAUSS M, et al. The prad-1/cyclin D1 oncogene product accumulates aberrantly in a subset of colorectal carcinomas [J]. Int J Cancer, 1994, 58(4): 568-573

[7] MIETTINEN T P, PELTIER J, HÄRTLOVA A, et al. Thermal proteome profiling of breast cancer cells reveals proteasomal activation by cdk4/6 inhibitor palbociclib [J]. EMBO J, 2018, 37(10): e98359

[8] THOMS H C, DUNLOP M G, STARK L A. Cdk4 inhibitors and apoptosis: a novel mechanism requiring nucleolar targeting of rela [J]. Cell Cycle, 2007, 6(11): 1293-1297

[9] HUANG C Y, HSIEH F S, WANG C Y, et al. Palbociclib enhances radiosensitivity of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma via inhibiting ataxia telangiectasia-mutated kinase-mediated DNA damage response [J]. Eur J Cancer, 2018, 102: 10-22

[10] GOEL S, WANG Q, WATT A C, et al. Overcoming therapeutic resistance in HER2-positive breast cancers with cdk4/6 inhibitors [J]. Cancer Cell, 2016, 29(3): 255-269

[11] PABLA B, BISSONNETTE M, KONDA V J. Colon cancer and the epidermal growth factor receptor: current treatment paradigms, the importance of diet, and the role of chemoprevention [J]. World J Clin Oncol, 2015, 6(5): 133-141

[12] 杜紫燕，王浙凤，李凌云，等. 厄洛替尼对非小细胞肺癌增殖和自噬的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版)，2015，35(5)：662-665

[13] TOWNSLEY C A, MAJOR P, SIU L L, et al. Phase ii study of erlotinib (osi-774) in patients with metastatic colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2006, 94(8): 1136-1143

[14] ZHOU J, WU Z, WONG G, et al. Cdk4/6 or mapk blockade enhances efficacy of EGFR inhibition in oesophageal squamous cell carcinoma [J]. Nat Commun, 2017, 8: 13897

[15] DI VEROLI G Y, FORNARI C, WANG D, et al. Combenefit: An interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations [J]. Bioinformatics, 2016, 32(18): 2866-2868

[16] OSTERMAN E, GLIMELIUS B. Recurrence risk after up-to-date colon cancer staging, surgery, and pathology: analysis of the entire swedish population [J]. Dis Colon Rectum, 2018, 61(9): 1016-1025

[17] LEHÁR J, KRUEGER A S, AVERY W, et al. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity [J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(7): 659-666

[18] GUARDUCCI C, BONECHI M, BOCCALINI G, et al. Mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer and potential biomarkers of response [J]. Breast Care(Basel), 2017, 12(5): 304-308

[19] VOSKOGLOU-NOMIKOS T, PATER J L, SEYMOUR L. Clinical predictive value of the *in vitro* cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(11): 4227-4239

[20] BERTOTTI A, MIGLIARDI G, GALIMI F, et al. A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer [J]. Cancer Discov, 2011, 1(6): 508-523

[21] SEOL H S, KANG H J, LEE S I, et al. Development and characterization of a colon PDX model that reproduces drug responsiveness and the mutation profiles of its original tumor [J]. Cancer Lett, 2014, 345(1): 56-64

[收稿日期] 2021-03-03