

西妥昔单抗体外协同增加顺铂对人鼻咽癌细胞株的抗肿瘤作用

顾佳佳, 尹丽, 吴婧, 张楠, 黄腾, 丁凯, 何侠
(南京医科大学附属肿瘤医院, 江苏 南京 210009)

摘要: [目的] 研究西妥昔单抗(Cetuximab, C225)联合顺铂(Cisplatin, DDP)对人鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC) 细胞增殖和凋亡的影响及其分子机制。[方法] 采用人鼻咽癌 HNE1 和 CNE2 细胞株, RT-qPCR 检测表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)mRNA 的差异性表达。实验分为对照组、西妥昔单抗组、顺铂组、两药联合组, 采用 CCK-8 法、平板克隆形成实验检测细胞增殖能力, 并评价药物的协同效应。流式细胞术检测各组细胞的凋亡情况。Western Blot 检测 AKT、p-AKT 以及凋亡相关蛋白 Bax、caspase-3、cleaved caspase-3 的表达水平。[结果] 药物持续作用 48h 后, 两株细胞中两药联合组与单药组相比, 均不同程度地提高对细胞的抑制率。在 HNE1 和 CNE2 细胞株中, 两药协同指数分别为 0.6 和 0.9。HNE1 和 CNE2 细胞中 EGFR mRNA 分别呈现相对高表达和相对低表达状态。流式细胞术结果显示: HNE1 细胞中, 联合组的凋亡细胞比率显著性高于单药组, 另外, 两药联合作用更有效地下调了 HNE1 中凋亡蛋白 Bax、caspase-3、cleaved caspase-3 的表达, 同时下调了 EGFR/AKT 信号通路关键蛋白 AKT 磷酸化表达。[结论] 西妥昔单抗可能通过抑制顺铂介导的 EGFR/AKT 通路的磷酸化活化, 产生协同抑制 HNE1 细胞增殖效应。两药联合在 HNE1 和 CNE2 细胞中的差异性效应为鼻咽癌的临床个体化治疗研究提供依据。

关键词: 鼻咽癌; 表皮生长因子受体; 西妥昔单抗; 顺铂

中图分类号: R739.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2016)04-0303-06

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.04.A012

Inhibitory Effect of Cetuximab Combined with Cisplatin on Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines and its Molecular Mechanism

GU Jia-jia, YIN Li, WU Jing, et al.

(Nanjing Medical University Affiliated Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China)

Abstract: [Purpose] To study the effect of cetuximab combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma(NPC) cell lines CNE-2 and HNE-1 and its molecular mechanism. [Methods] Nasopharyngeal carcinoma cell lines CNE-2 and HNE-1 were divided into contrast group, cetuximab group, cisplatin group and combination group. The levels of epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA were detected by RT-qPCR. Cell counting Kits-8 (CCK-8) assay and colony formation assay were used to detect the proliferation viability and evaluate combination effect. Flow cytometry was used to determine apoptosis rate, and Western Blot was used to detect the protein expression level changes of Bax, caspase-3, cleaved caspase-3, AKT and p-AKT when cells were given different treatments. [Results] After treatment of 48h, the inhibitory rate of combination group were significantly higher than the monotherapy group in both cell lines. The combination index of HNE1 and CNE2 cells is 0.6 and 0.9, respectively. EGFR mRNA in HNE1 showed a relative high level, but a relative low level in CNE2 cells. Flow cytometry results showed that the apoptosis rate of combination group was significantly higher than the monotherapy group in HNE1 cells. Moreover, in HNE1 cells, the levels of Bax, caspase-3, cleaved caspase-3 protein of combination group were up-regulated more effectively than the monotherapy group. The level of p-AKT protein was significantly down-regulated in the combination group simultaneously. [Conclusion] Cetuximab and cisplatin show a synergism effect in HNE1 cells via inhibitory of EGFR/AKT signaling pathway phosphorylation activation. The different effect of the combination strategy on both HNE1 and CNE2 cell lines provides an evidence for individual treatment of NPC.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; epidermal growth factor receptor; cetuximab; cisplatin

收稿日期: 2015-10-16; 修回日期: 2015-12-28

基金项目: 江苏省科技厅临床医学重点专项(BL2014091)

通讯作者: 何侠, E-mail: hexia206@sina.com

鼻咽癌是我国南部地区的一种高发恶性肿瘤,尤其是未分化型,发病率约为 30/10 万^[1]。在过去的 30 年,随着放疗技术的进步、化疗的应用以及更精确的肿瘤分期,鼻咽癌患者的总体预后得到了明显改善。适形调强放疗治疗鼻咽癌 T₃ 期患者 5 年局控率可达 90% 以上, T₄ 期可达 74%~80%, 且毒副反应小, 患者生存质量高^[2]。放化疗联合是局部晚期鼻咽癌治疗的另一重大进展^[3-6], 其中以顺铂为基础的化疗方案应用最为广泛。局部晚期鼻咽癌接受放化疗综合治疗后, 仍有 5%~15% 患者出现局部复发, 15%~30% 出现远处转移^[1,7], 亟待新的药物或是更系统的治疗手段突破治疗瓶颈。

目前, 靶向治疗是鼻咽癌的研究热点之一。在鼻咽癌中, 超过 85% 存在 EGFR 过表达, 与其发生发展、治疗抵抗和不良预后相关。西妥昔单抗(cetuximab, C225)是一种人鼠嵌合型单克隆抗体, 通过细胞周期阻滞、增加促凋亡分子的表达及抑制促血管生成因子, 从而起到抑制肿瘤侵袭转移及抗肿瘤作用。2006 年, 西妥昔单抗被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗头颈部肿瘤, 是第一个被批准用于治疗头颈部肿瘤的靶向药物。临床证实西妥昔单抗与放化疗联合用于鼻咽癌治疗, 毒性可耐受, 近期疗效显著。

目前西妥昔单抗与放疗或化疗联合是否具有协同增敏效应, 以及其具体分子机制尚不明确。本研究将在鼻咽癌 HNE1 和 CNE2 细胞株中联合使用西妥昔单抗和顺铂, 观察其对细胞的抑制增殖和促进凋亡的情况, 探讨两药联合在鼻咽癌细胞株中是否具有协同效应, 并进一步研究其相关分子机制, 为鼻咽癌的个体化治疗提供可靠的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及试剂

鼻咽癌细胞株 HNE1、CNE1、CNE2、5-8F、6-10B 均来自江苏省肿瘤医院临床肿瘤研究中心。RPMI 1640 培养基和胰酶购自美国 Corning 公司, 胎牛血清购自美国 Gibco 公司, CCK-8 试剂盒购自日本东仁化学研究所, 西妥昔单抗购自德国 Merck 公司, 顺铂购自美国 Sigma 公司, 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司, 所有抗体均购自美国

Cell Signaling Technology 公司。所有细胞均于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中, 置于 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养。

1.2 CCK-8 法检测西妥昔单抗、顺铂单药及两药对联用 HNE1、CNE2 细胞的体外增殖抑制效率

实验分为对照组、西妥昔单抗组、顺铂组、两药联合组。取对数生长期的细胞用胰蛋白酶消化, 培养基重悬调整细胞浓度为 5×10^4 /ml, 接种于 96 孔板, 每孔细胞数为 5000 个。置于 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养 24h, 按上述分组加药处理细胞, 其中西妥昔单抗浓度梯度为 62.5、125、250、500、1000、2000 μg/ml, 顺铂为 0.25、0.5、1、2、4、8 μg/ml, 联合组两种药物按照恒定比例 250:1 依次加入, 对照组加入等体积的完全培养基。加药后继续孵育 48h 后, 每孔加入 10 μl CCK-8 试剂和 100 μl 不完全培养基, 37℃、5%CO₂ 温箱孵育 2h 后, 酶标仪检测 540nm 波长处的吸光度(OD)值。计算细胞增殖抑制率 = $1 - [(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$, 用 GraphPad Prism 6.0 软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)。实验每次设 3 个复孔, 重复 3 次。

1.3 两药联合作用评价

采用联合作用指数(combined index, CI)判断两种药物的协同效应。计算公式为: $CI = DA/ICX_A + DB/ICX_B$, 其中 A、B 代表两种不同药物, ICX_A 和 ICX_B 是两种药物单独使用使生长抑制率达 X 时的药物浓度, DA 和 DB 是两药联用使生长抑制率达 X 时两种药物的浓度^[8]。根据 Soriano 等的判断方法, $0.9 \leq CI \leq 1.1$ 为叠加作用, $0.8 \leq CI < 0.9$ 为低度协同作用, $0.6 \leq CI < 0.8$ 为中度协同作用, $0.4 \leq CI < 0.6$ 为高度协同作用, $0.2 \leq CI < 0.4$ 为强协同作用^[9]。

1.4 各组细胞凋亡检测

采用流式细胞术检测各组细胞凋亡的情况。实验分组同上, 取胰酶消化、收集对数生长期的 HNE1 和 CNE2 细胞, 调整细胞密度为 5×10^4 /ml, 以每孔 2ml 接种于 6 孔培养板, 细胞贴壁后换含不同浓度药物的培养基继续培养 48h。根据 CCK-8 结果, 西妥昔单抗浓度选 250 μg/ml, 顺铂浓度选 1 μg/ml。37℃、5%CO₂ 孵育 48h 后胰酶消化、收集细胞, 按说明书用 Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒进行细胞固定、染色, 上机, 流式细胞仪检测分析。

1.5 RT-qPCR 法检测鼻咽癌细胞株中 EGFR mRNA 表达水平

HNE1、CNE1、CNE2、5-8F 和 6-10B 细胞株用 Trizol 提取细胞总 RNA,取 1 μ g RNA 为模板逆转录合成 cDNA,用特异引物进行 PCR。EGFR(上游引物:5'-GCCCCCACTGCGTCAAGACC-3';下游引物:5'-ACCTGGCCCACTGCATCCGT-3')和 β -actin (上游引物:5'-TTCTACAATGAGCTGCGTCTG-3';下游引物:5'-CAGCC TGGATAGCAACGTATC-3')。循环参数为:95 $^{\circ}$ C,30s;95 $^{\circ}$ C,5s,60 $^{\circ}$ C,31s,95 $^{\circ}$ C,15s,60 $^{\circ}$ C,60s,95 $^{\circ}$ C,15s,循环 40 个周期。解离曲线分析 EGFR mRNA 表达,并用 CT 值进行数据分析。

1.6 Western Blot 检测 Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、EGFR、p-EGFR、AKT 和 p-AKT 蛋白质表达水平

实验分组同上。胰酶消化、收集对数生长期的 HNE1 和 CNE2 细胞,调整细胞密度为 5×10^4 /ml,以每孔 2ml 接种于 6 孔培养板,细胞贴壁后换含不同浓度药物的培养基继续培养 48h 后提取蛋白,检测各组细胞中 Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、AKT 和 p-AKT 蛋白质表达水平的变化。

1.7 统计学处理

实验数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,进行独立样本 t 检验或单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 西妥昔单抗和顺铂单药及联合应用对鼻咽癌细胞 HNE1 和 CNE2 增殖的影响

西妥昔单抗对两株细胞的生长抑制作用较弱,在 HNE1 和 CNE2 细胞中的 IC_{50} 值分别为 1213 μ g/ml 和 1183 μ g/ml。顺铂具有

较强的增殖抑制作用,在 HNE1 和 CNE2 细胞中的 IC_{50} 值分别为 1.83 μ g/ml 和 1.715 μ g/ml。当两种药物联合作用时,与顺铂单药相比,对细胞的增殖抑制作用有不同程度的增强,HNE1 中差异均有统计学意义,CNE2 中仅在高浓度时具有统计学意义(Table 1、2)。

2.2 西妥昔单抗与顺铂联合作用评价

根据公式计算出 HNE1 和 CNE2 细胞中西妥昔单抗与顺铂联用的协同指数分别为 0.6 和 0.9,分别代表了协同作用和叠加作用(Table 3)。

2.3 两药联合对细胞凋亡的影响

HNE1 细胞中,两药联合组与顺铂组对细胞凋亡的影响比较差异具有统计学意义($P<0.001$),两药联合与单药相比明显增加了 HNE1 细胞的凋亡比率,即促进了细胞凋亡;但 CNE2 细胞中两组之间差异无统计学意义($P=0.33$)(Figure 1)。

2.4 RT-qPCR 法检测鼻咽癌细胞株中 EGFR mRNA 表达水平

将 CNE1 设置为对照组,对 CT 值进行数据分析后,计算出 $2^{-\Delta\Delta T}$,表示各种细胞的相对表达量。结果显示,HNE1 细胞中 EGFR mRNA 表达水平相对最高,而 CNE2 则相对较低(Table 4)。

Table 1 The inhibition of HNE1 cells induced by cetuximab and/or cisplatin($\bar{x}\pm s$)

Group	Concentration (Cetuximab/Cisplatin, μ g/ml)					
	62.5/0.25	125/0.5	250/1	500/2	1000/4	2000/8
Cetuximab	0.98 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.02	0.85 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.02	0.61 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.06
Cisplatin	0.88 $\pm$ 0.01	0.74 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.01
Combination	0.75 $\pm$ 0.01*	0.62 $\pm$ 0.01*	0.47 $\pm$ 0.01*	0.36 $\pm$ 0.00*	0.20 $\pm$ 0.00*	0.16 $\pm$ 0.00*

* $P<0.05$ vs Cisplatin, respectively

Table 2 The inhibition of CNE2 cells induced by cetuximab and/or cisplatin($\bar{x}\pm s$)

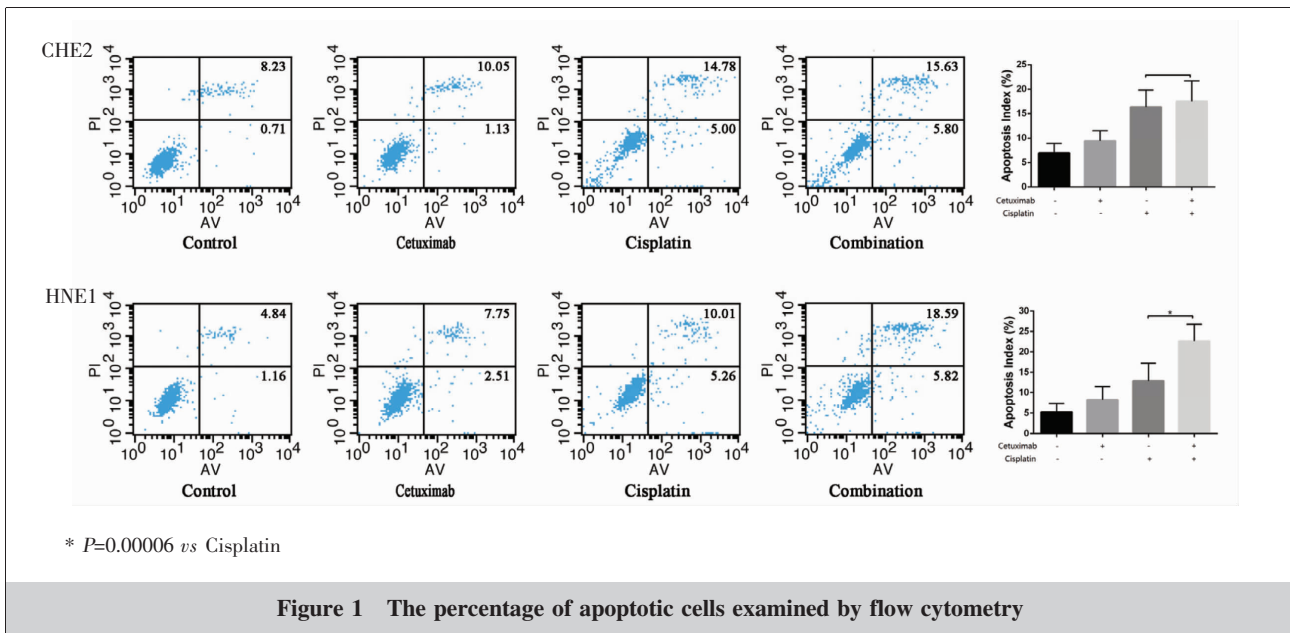
Group	Concentration (Cetuximab/Cisplatin, μ g/ml)					
	62.5/0.25	125/0.5	250/1	500/2	1000/4	2000/8
Cetuximab	0.95 $\pm$ 0.02	0.85 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.08	0.83 $\pm$ 0.14	0.79 $\pm$ 0.06	0.19 $\pm$ 0.04
Cisplatin	0.95 $\pm$ 0.06	0.79 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.00
Combination	0.82 $\pm$ 0.04	0.67 $\pm$ 0.01*	0.59 $\pm$ 0.00	0.36 $\pm$ 0.01*	0.14 $\pm$ 0.00*	0.10 $\pm$ 0.00*

* P value is 0.08, 0.04, 0.10, 0.00, 0.00, 0.00 vs Cisplatin, respectively

Table 3 The combination indexes (CIs) of cetuximab and cisplatin in CNE2 and HNE1 cells

Cell line	IC_{50} (Single/Double)		CI
	Cetuximab(μ g/ml)	Cisplatin(μ g/ml)	
CNE2	1183/281.9	1.715/1.128	0.9
HNE1	1213/231.4	1.83/0.926	0.6

IC_{50} : half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values.



2.5 各组处理后细胞中凋亡及 EGFR/AKT 通路相关蛋白表达水平变化

在 HNE1 细胞中, 西妥昔单抗联合顺铂与顺铂单药作用相比, 凋亡相关蛋白 Bax、caspase-3、cleaved caspase-3 表达明显增加, 同时下调了 p-AKT 蛋白的表达; 提示两药联合通过下调 EGFR/AKT 通路关键蛋白磷酸化表达协同促进了 HNE1 细胞的凋亡。同样, 类似结果在 CNE2 细胞中不明显 (Figure 2)。

3 讨论

顺铂应用于癌症治疗历史悠久, 是目前中晚期鼻咽癌治疗的经典基础药物, 局部晚期鼻咽癌 2015 年 NCCN 指南推荐标准治疗为以顺铂为基础的同步放化疗, 但仍有约 30% 的患者治疗失败, 且治疗过程中的毒副反应及耐药问题是临床不容忽视的问

Table 4 The relative expression of EGFR mRNA in NPC cells examined by qRT-PCR ($\bar{x} \pm s$)

Index	Cell lines				
	6-10B	5-8F	HNE1	CNE2	CNE1*
2 ^{-ΔΔT}	0.19±0.06	0.23±0.05	1.39±0.28	0.14±0.02	1.00±0.00

CNE1 is used as a loading control.

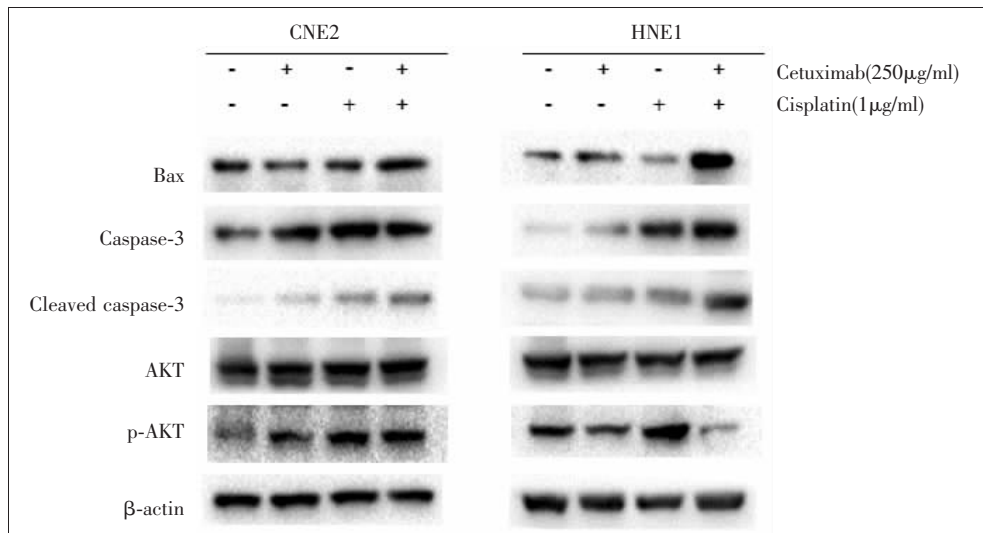


Figure 2 The expression of Bax, caspase-3, cleaved caspase-3, AKT and p-AKT protein

题, 因此需要更有效的综合治疗手段, 建立个体化的高效、低毒的治疗模式。

近年来, 靶向药物因其低毒、高效等特点成为肿瘤治疗的研究热点, 其中表皮生长因子受体和血管生长因子最受人们关注。EGFR 在约三分之一的上皮来源肿瘤中高表达, 活化的 EGFR 能启动下游

ERK/MAPK 和 PI3K/AKT 等信号转导通路,参与肿瘤的发生发展、侵袭、血管生成和治疗抵抗等过程。早期研究报道,在体外细胞实验中抑制 EGFR 活性可激活促凋亡通路,同时使抗凋亡通路失活。但各细胞株间最终的凋亡却存在着差异,这一有趣的现象提示,EGFR 抑制剂诱导的促凋亡通路活化水平有限,可能不足以诱导程序性细胞死亡。后续的研究显示,当 EGFR 拮抗剂和放化疗联用时,可明显促进细胞凋亡。早在 1988 年 Aboud-Pirak 等就研究报道了顺铂与另一种抗 EGFR 单克隆抗体在甲状腺癌的动物模型中的联合增强效应^[10],类似的结果也在乳腺癌和卵巢癌中有报道^[11],但协同效应的机制仍在探索当中。随着分子靶向治疗的发展,西妥昔单抗在鼻咽癌中得到应用,并取得了一定的临床疗效。一系列临床研究显示,西妥昔单抗联合顺铂治疗头颈部肿瘤是有效、可耐受的^[12]。

由于临床使用西妥昔单抗与放/化疗联合治疗鼻咽癌取得了令人鼓舞的疗效,推测鼻咽癌中西妥昔单抗和顺铂可产生协同抑制肿瘤细胞生长的作用,我们实验结果发现西妥昔单抗单药对两种细胞的抑制作用均较小,而与顺铂联合作用时较顺铂单药更能有效抑制细胞生长,但作用效果存在着差异。根据 Chou-Talalay 原理^[13,14]计算出 HNE1 和 CNE2 细胞株中两药协同指数分别为 0.6 和 0.9,提示在 HNE1 细胞株中,西妥昔单抗和顺铂联用显示出了协同效应(CI=0.6),但在 CNE2 细胞中仅观察到了微弱的协同效应或仅仅是一个药物叠加效应(CI=0.9)。两种细胞株的凋亡情况也存在着明显的差异,两药联合与单药作用相比,HNE1 细胞中凋亡相关蛋白 Bax、Caspase-3 和 Cleaved Caspase-3 表达均明显增加。这与上述一些临床研究结论也是相一致的,在鼻咽癌的临床治疗中,也存在患者对药物治疗反应的差异,为了探索这一差异是如何产生的,对临床个体化治疗提供有效的理论依据,我们综合预实验的结果进行了分析。预实验中,我们通过检测不同鼻咽癌细胞株(CNE1、HNE1、CNE2、5-8F、6-10B)中 EGFR mRNA 的表达情况,筛选出相对高表达的 HNE1 和相对低表达的 CNE2 两株细胞,开展了我们后续的研究。因此,EGFR mRNA 的表达差异可能影响了西妥昔单抗和顺铂的联合作用;进一步的分子机制研究显示,两药联合更有效地下调了 HNE1

细胞株中 AKT 的磷酸化表达,提示 EGFR/AKT 通路受到抑制,细胞凋亡明显增加。另外,活化的 Caspase-3 也可能诱导细胞内 EGFR 的降解^[15],类似的现象在 CNE2 细胞中并不明显。值得关注的是,在 HNE1 细胞株中,顺铂单药作用后引起了 AKT 表达上调,而两药联合作用后明显抑制了这一反应,2002 年 Benhar 等在转化型脑胶质细胞瘤细胞和乳腺癌细胞中发现顺铂可诱导 EGFR 的活化,而 AKT 作为 EGFR 信号转导中的主要下游通路之一,可能参与了这一过程,与肿瘤的顺铂耐药密切相关^[16,17]。

总之,本研究发现西妥昔单抗联合顺铂对不同 EGFR 表达水平的鼻咽癌 HNE1 和 CNE2 细胞株具有不同程度的协同抑制和促进凋亡作用,其差异性可能与 EGFR/AKT 通路活化程度相关。西妥昔单抗很可能在一定程度上抑制了顺铂介导的 EGFR/AKT 通路的磷酸化活化,达到了协同抑制肿瘤细胞的效应。两药联合在 HNE1 细胞和 CNE2 细胞中的差异性效应为鼻咽癌的临床个体化治疗以及顺铂耐药机制的研究提供了新的依据,仍需要进一步的临床研究,明确西妥昔单抗与顺铂及放疗联合的最佳模式,提高临床疗效以及患者的预后、生存质量。

参考文献:

- [1] Lee AW, Ma BB, Ng WT, et al. Management of nasopharyngeal carcinoma: current practice and future perspective [J]. J Clin Oncol, 2015, 33(29): 3356-3364.
- [2] Chua ML, Wee JT, Hui EP, et al. Nasopharyngeal carcinoma [J]. Lancet, 2015, Aug 27; [Epub ahead of print]
- [3] Al-Sarraf M, LeBlanc M, Giri PG, et al. Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized intergroup study 0099 [J]. J Clin Oncol, 1998, 16(4): 1310-1317.
- [4] Liang JH. The advance of concurrent chemo-radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma [J]. Guangxi Medical Journal, 2013, 35(12): 1695-1698. [梁锦辉. 局部晚期鼻咽癌同期放化疗的研究进展 [J]. 广西医学, 2013, 35(12): 1695-1698.]
- [5] Chen Y, Sun Y, Liang SB, et al. Progress report of a randomized trial comparing long-term survival and late toxicity of concurrent chemoradiotherapy with adjuvant chemotherapy versus radiotherapy alone in patients with stage III to IVB nasopharyngeal carcinoma from endemic regions of China [J]. Cancer, 2013, 119(12): 2230-2238.

- [6] Wu X, Huang PY, Peng PJ, et al. Long-term follow-up of a phase III study comparing radiotherapy with or without weekly oxaliplatin for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma [J]. *Ann Oncol*, 2014, 24(8): 2131–2136.
- [7] Lee AW, Ng WT, Chan LL, et al. Evolution of treatment for nasopharyngeal cancer: success and setback in the intensity-modulated radiotherapy era [J]. *Radiother Oncol*, 2014, 110(3): 377–384.
- [8] Li YP, Hu CP, Wu ES, et al. Growth inhibition of NS-398 combined with cisplatin on human lung adenocarcinoma cells and its mechanism [J]. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 2005, 15(8): 8–13. [李也鹏, 胡成平, 吴鄂生, 等. NS398 和顺铂联用对人肺腺癌增殖的影响及其机制初步探讨[J]. *中国肺癌杂志*, 2005, 15(8): 8–13.]
- [9] Soriano AF, Helfrich B, Chan DC, et al. Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(24): 6178–6184.
- [10] Aboud-Pirak E, Hurwitz E, Pirak ME, et al. Efficacy of antibodies to epidermal growth factor receptor against KB carcinoma in vitro and in nude mice [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1988, 80(20): 1605–1611.
- [11] Hancock MC, Langton BC, Chan T, et al. A monoclonal antibody against the c-erbB-2 protein enhances the cytotoxicity of cis-diamminedichloroplatinum against human breast and ovarian tumor cell lines [J]. *Cancer Res*, 1991, 51(17): 4575–4580.
- [12] Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2004, 11(4): 689–708.
- [13] Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 440–446.
- [14] Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method-letter [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(11): 2400.
- [15] He YY, Huang JL, Chignell CF, et al. Cleavage of epidermal growth factor receptor by caspase during apoptosis is independent of its internalization [J]. *Oncogene*, 2006, 25(10): 1521–1531.
- [16] Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. Cisplatin-induced activation of the EGF receptor [J]. *Oncogene*, 2002, 21(57): 8723–8731.
- [17] Wang XJ, Feng CW, Li M. ADAM17 mediates hypoxia-induced drug resistance in hepatocellular carcinoma cells through activation of EGFR/PI3K/Akt pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 380(1–2): 57–66.

《中国肿瘤》编辑部关于启用稿件远程处理系统的通知

本刊已启用稿件远程处理系统,该系统包括作者在线投稿/查询、主编办公、专家审稿、编辑办公等功能,通过网上投稿、网上查稿、网上审稿,实现作者、编辑、审稿专家的一体化在线协作处理,从而构建一个协作化、网络化、角色化的编辑稿件业务处理平台。对于广大作者而言,该系统最大的优点是支持在线投稿,方便作者及时了解稿件处理进程,缩短稿件处理时滞。

使用过程中具体注意事项如下:

(1)第1次使用本系统投稿的作者,必须先注册,才能投稿。注册时各项信息请填写完整。作者自己设定用户名和密码,该用户名密码长期有效。

(2)已注册过的作者,请不要重复注册,否则将导致查询稿件信息不完整。如果遗忘密码,可以致电编辑部查询。

(3)作者投稿请点击“作者登录”,登录后按照提示操作即可。投稿成功后,系统自动发送回执邮件,作者投稿后请随时关注邮箱提示,也可随时点击“作者登录”,获知该稿件的审理情况、处理进展、审稿意见等。

(4)网上投稿成功1周内,请将以下文件邮寄至编辑部:①单位介绍信;②文章若属于基金项目资助,附上基金项目批文的复印件。编辑部收到上述文件后,稿件将进入审稿程序。

稿件远程处理系统启用后,我刊只接受网上投稿,不再接收电子邮件投稿和纸质稿。

《中国肿瘤》网址: <http://www.chinaoncology.cn>

如有任何问题,请与编辑部联系! 联系电话: 0571-88122280。