

AZD9291 与 STAT3 抑制剂对肺癌细胞 H1975 的协同效应及机制

汤继春¹, 袁媛², 金伟¹, 杜瀛瀛¹, 潘跃银¹

摘要 目的 探讨 AZD9291 作用于 H1975 肺癌细胞后细胞内细胞外调节蛋白激酶(ERK)、蛋白激酶 B(AKT)和信号传导及转录激活因子 3(STAT3)信号通路变化,联合 STAT3 抑制剂后效应及其可能机制。方法 同浓度单药 AZD9291 作用于 H1975 后,Western blot 检测磷酸化及非磷酸化 STAT3、ERK、AKT 蛋白的表达。MTT 法检测 AZD9291 与 STAT3 抑制剂单药及联合对细胞增殖的影响。流式细胞术检测单药及联合对细胞凋亡的影响。Western blot 检测 AZD9291 联合 STAT3 抑制剂后磷酸化及非磷酸化 STAT3 蛋白变化情况。结果 单药 AZD9291 作用细胞后,p-ERK、p-AKT 表达降低,p-STAT3 增高。两药联合可显著抑制 H1975 细胞的增殖,强于单药组($P < 0.05$),表现为协同作用(联合指数 < 1)。双药联合显示出更强的诱导凋亡的作用。联合组与单药组相比下调 p-STAT3 蛋白作用。结论 AZD9291 和 STAT3 抑制剂联合用药对 H1975 的增殖有明显抑制作用并可以促进其凋亡的发生,具有协同作用,主要机制为下调 p-STAT3 蛋白表达。

关键词 非小细胞肺癌; AZD9291; STAT3 抑制剂; 联合

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)03-0368-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.008

目前 80% 肺癌患者为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),5 年生存率约 15%,预后不佳^[1]。分子靶向治疗在肺癌治疗中占有重要地位,第一、二代表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKI)前期治疗效果显著,但半年至一年后出现耐药^[2]。现已发现多种耐药机制,包括表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)扩增、遗传损伤、并行旁路的激活

等^[3]。第三代 EGFR-TKI 中 AZD9291(osimertinib, 奥斯替尼)已被批准用于 T790M 阳性 NSCLC 患者,但耐药仍不可避免^[4]。信号传导及转录激活因子 3(signal transducers and activators of transcription, STAT3)在多种肿瘤,如头颈、肺和乳腺癌中被激活。STAT3 的持久活化具有致癌性,有报道^[5-6]封阻 STAT3 信号通路可抑制癌细胞生长,增强抗癌药物的敏感性。该研究主要检测 AZD9291 作用 H1975 后胞内信号通路变化,以及抑制 STAT3 通路是否增强 AZD9291 的抑瘤作用,为以 STAT3 为靶点的 NSCLC 治疗提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 RPMI-1640、FBS 购自美国 Hyclone 公司; MTT 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; Western blot 化学发光剂购自美国 Millipore 公司; H1975 细胞由广东省肺癌研究所惠赠; AZD9291 由英国 Astra Zeneca 公司惠赠; STAT3 抑制剂(商品名 S31-201)购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自长沙贝博生物科技公司; 磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-AKT)和蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)抗体、磷酸化细胞外信号调节激酶(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, p-ERK)和细胞外信号调节激酶抗体(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、p-STAT3 和 STAT3 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 H1975 细胞培养于含 10% FBS、青霉素各 100 U/ml 的 10 ml RPMI-1640 培养液中,常规培养在恒温培养箱,传代时间为 2~3 d,取对数生长期细胞用于研究。

1.2.2 MTT 法 取 96 孔板,将 H1975 细胞接种入内,每孔数量为 2 000 个,培养箱培养 24 h。分为 AZD9291 单药组(AZD9291)、STAT3 抑制剂 S31-201 单药组(S31-201)。单药实验组浓度梯度设定为 6 组,每组 6 个复孔,使用 AZD9291 单药的处理组将浓度设定为 2.625、5.25、10.5、21、42、84

2017-11-21 接收

基金项目:安徽省科技攻关项目(编号:1704a0802163);安徽省科技攻关项目(编号:1301042214);安徽省卫生计生委中医药科研课题(编号:2016zy29)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院肿瘤科,合肥 230022

²合肥市滨湖医院中心实验室,合肥 230061

作者简介:汤继春,男,硕士研究生;

潘跃银,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: yueyinpan1965@126.com

nmol/L; STAT3 抑制剂 S31-201 单药组实验浓度分别设计为 11.25、22.5、45、90、180、360 $\mu\text{mol/L}$ 。后以 6 种不同浓度 AZD9291 和 STAT3 抑制剂联合给药培养 72 h 后,各孔加 MTT 溶液 20 μl ,反应 4 h 后弃去上清液,每孔 150 μl DMSO,酶标仪震荡后在 490 nm 波长下测量吸光度(optical density, OD) 值。细胞的增殖抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})] \times 100\%$ 。分别计算 AZD9291 和 STAT3 抑制剂的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC_{50}) 和联合指数(combination index, CI)。对于后续的细胞凋亡实验、Western blot 实验均采用 AZD9291 浓度 20 nmol/L, STAT3 抑制剂 S31-201 浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 作为实验组用药浓度。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 将 H1975 接种在 6 孔板中,密度为 1×10^8 个/L,实验分组为对照组, AZD9291 单药组, STAT3 抑制剂单药组,以及 AZD 9291 和 STAT3 抑制剂联合用药组。加入预定浓度的药物,使其在新培养基中培养 72 h。PBS 冲洗 2 遍,胰酶消化收集。离心机离心 5 min,弃上清液,保留细胞。分别每管加入 Annexin-V 结合液 400 μl , 5 μl 的 Annexin-V 染色, 10 μl 的 PI 染色,避光孵育 5 min。1 h 内置流式机检测。

1.2.4 Western blot 法 按 1.2.3 方法进行分组及药物处理 72 h,消化收集细胞,蛋白裂解液提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,沸水水浴 15 min,离心机调为 12 000 r/min,高速离心 10 min。将样品加入 10% SDS-PAGE 中电泳,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 80 V 转膜 30 min,后调为 120 V 转膜 70 min,完成后 5% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h。加入以 1:1 000 比例稀释的抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。TBST 洗涤 3 遍后,加入二抗(1:5 000),室温孵育 1 h, TBST 再洗涤 3 遍。后加入 ECL 发光剂,暗室中进行显影结果。各蛋白的灰度值采用 Image J 软件分析。

1.3 统计学处理 各实验重复 3 次。实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数的比较采用 one-way ANOVA(单因素方差分析)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AZD 9291 和 STAT3 抑制剂对 H1975 细胞的增殖抑制作用 根据前期预实验结果,选择药物作用 72 h, MTT 结果显示, AZD 9291 和 STAT3 抑制剂对 H1975 细胞的 IC_{50} 值分别为 (20.00 ± 3.65) nmol/L

和 (96.00 ± 15.30) $\mu\text{mol/L}$,并且随着药物浓度的递增,增殖抑制作用也随之增强,具有浓度依赖性($F = 113.89, 138.68, P < 0.05$)。见图 1。

不同浓度的 AZD 9291 联合 STAT3 抑制剂处理 H1975 细胞 72 h,相对于单药组,两药联合后增殖抑制作用明显增强($F = 36.39, P < 0.05$),各联合药物剂量组的 CI 均 < 1 ,表现出协同效应(图 2)。

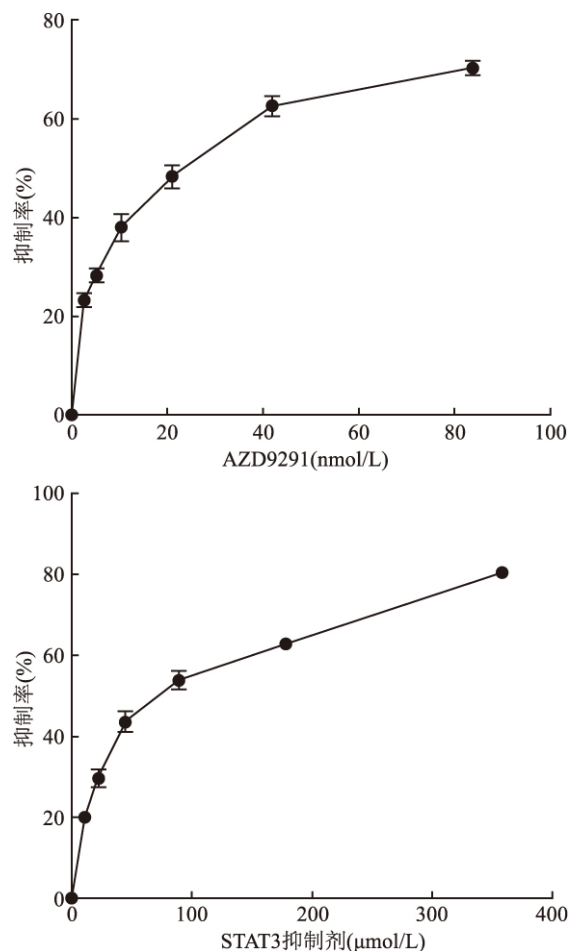


图1 MTT 法检测 AZD 9291 或 STAT3 抑制剂对 H1975 细胞的增殖抑制效应

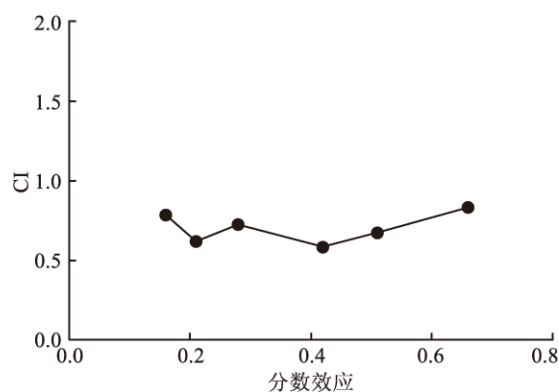


图2 AZD 9291 联合 STAT3 抑制剂作用于 H1975 细胞的 CI

2.2 AZD9291 和 STAT3 抑制剂联合促进 H1975 的凋亡 流式细胞仪检测结果显示对照组中细胞凋亡率为 $(3.59 \pm 0.62)\%$, AZD9291 和 STAT3 抑制剂单药处理组的细胞凋亡率分别为 $(6.09 \pm 0.76)\%$ 和 $(10.13 \pm 1.57)\%$, 两药联合后凋亡率上升为 $(22.18 \pm 3.24)\%$ 。联合用药组的细胞凋亡率较单独用药组均明显增高, 差异有统计学意义 ($F = 84.043, P < 0.05$)。见图 3。

2.3 AZD9291 和 STAT3 抑制剂单药及联合用药对 H1975 细胞 AKT、p-AKT、ERK、p-ERK、STAT3、p-STAT3 蛋白表达的影响 如图 4 示, 检测显示与对照组相比较, AZD9291 可明显上调 p-STAT3 蛋白的水平, 而 p-AKT 和 p-ERK 蛋白的表达水平明显下降, 差异有统计学意义 ($F = 45.80, 20.66, 232.02, P < 0.05$); 两药联合组 p-STAT3 蛋白水平与 AZD9291 单药组相比明显下降, 差异有统计学意义 ($F = 29.80, P < 0.05$), 见图 5。

3 讨论

STAT 蛋白家族可以被多种细胞因子受体激活, 其中最受关注的为 STAT3, 多种促炎因子和生长因子可以使其活化, 在多种人类恶性肿瘤中 STAT3 出现明显异常激活, 其参与了多种肿瘤的致癌信号通路的传递及胞内信号转导通路的信号传递^[7]。在正常情况下, 胞内 STAT3 信号的激活迅速但持续时间短暂, 受多种负性调控因子的调节。近年多种研究^[8-10]证实, 在白血病、肺癌、肝癌、乳腺癌及前列腺癌等中 STAT3 均有异常而持续的激活。STAT3 参与了肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭、转移、血管生成

及抗凋亡作用。抗凋亡蛋白、细胞周期蛋白、基质金属蛋白酶和血管内皮生长因子等的表达增高均与 STAT3 表达存在密切关系^[7]。因此, 深入研究 STAT3 在肿瘤中机制, 从而设计针对 STAT3 靶向治疗药物, 可能为肿瘤治疗的提供一个有效途径。

以表皮生长因子受体为靶点的分子靶向治疗在 NSCLC 的治疗中日益占据重要位置, 然而患者对靶向药物有耐药现象, 其中大约一半耐药机制是 EGFR 的 T790M 位点突变或 c-MET 扩增^[11-12], 但是余下耐药机制尚未完全阐明, 部分研究^[8-10]表明与 STAT3 的异常活化有关。研究^[13-14]表明 STAT3 可以增加肿瘤细胞在治疗药物中的适应能力, 导致肿瘤产生耐药。Chiu et al^[13]研究发现 p53 的稳定剂 RITA 与吉非替尼联合增加对 H1650 的敏感性, 主要机制为抑制 STAT3 的活性。同样的, STAT3 抑制剂 WP1066 或小干扰 RNA 可以导致 H1650 的增殖减低; 以上证实 STAT3 对维持 H1650 在吉非替尼中的耐药有至关重要的作用。Kim et al^[14]研究表明, 选择 H1975 和 PC9/GR 这两种携带 T790M 突变的 NSCLC 细胞株进行检测, 发现阿法替尼可以激活 IL-6R/JAK1/STAT3 信号通路, 主要通过自分泌 IL-6 因子。使用信号通路阻断剂如 JAK 抑制剂或是 IL-6 中和抗体可以显著增强了阿法替尼的抗肿瘤的敏感性。以上结果同样在小鼠体内移植瘤实验中证实。

有研究^[15]显示通过一些药物提前处理后能够直接或是间接激活 STAT3, 使得肿瘤出现耐药。Li et al^[15]报道称在 NSCLC 中, 厄洛替尼抑制 PTPMeg2 表达, 使得 STAT3 中 Y705 磷酸化并上调 bcl-2/bcl-xl

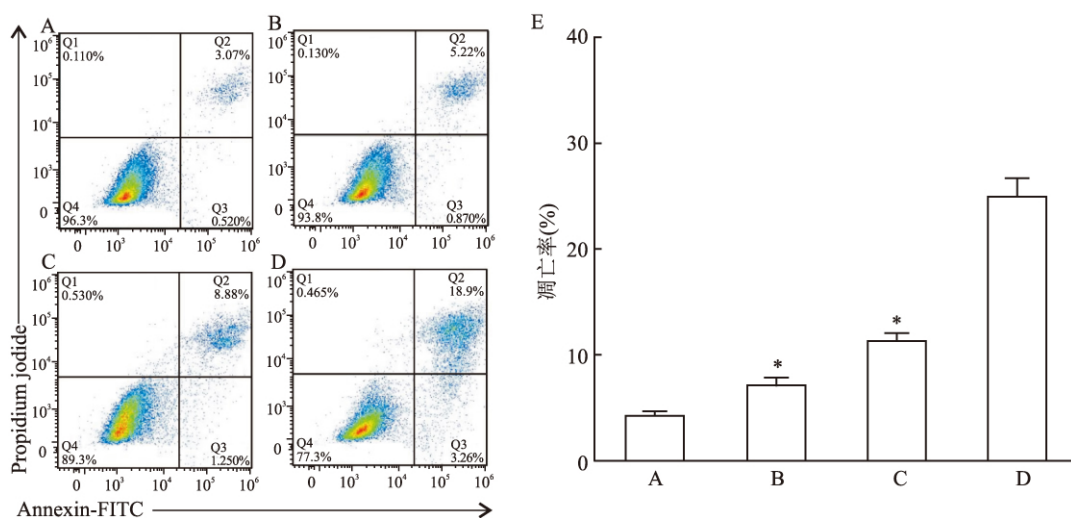


图3 流式细胞术法检测 AZD 9291 和 STAT3 抑制剂单药及联合作用对 H1975 细胞凋亡率的影响

A: 对照组; B: AZD9291 单药组; C: STAT3 抑制剂单药组; D: AZD9291 + STAT3 抑制剂联合用药组; E: AZD9291 与 STAT3 抑制剂单药及联合作用对 H1975 细胞凋亡率影响的比值; 与 AZD9291 + STAT3 抑制剂联合用药比较: * $P < 0.05$

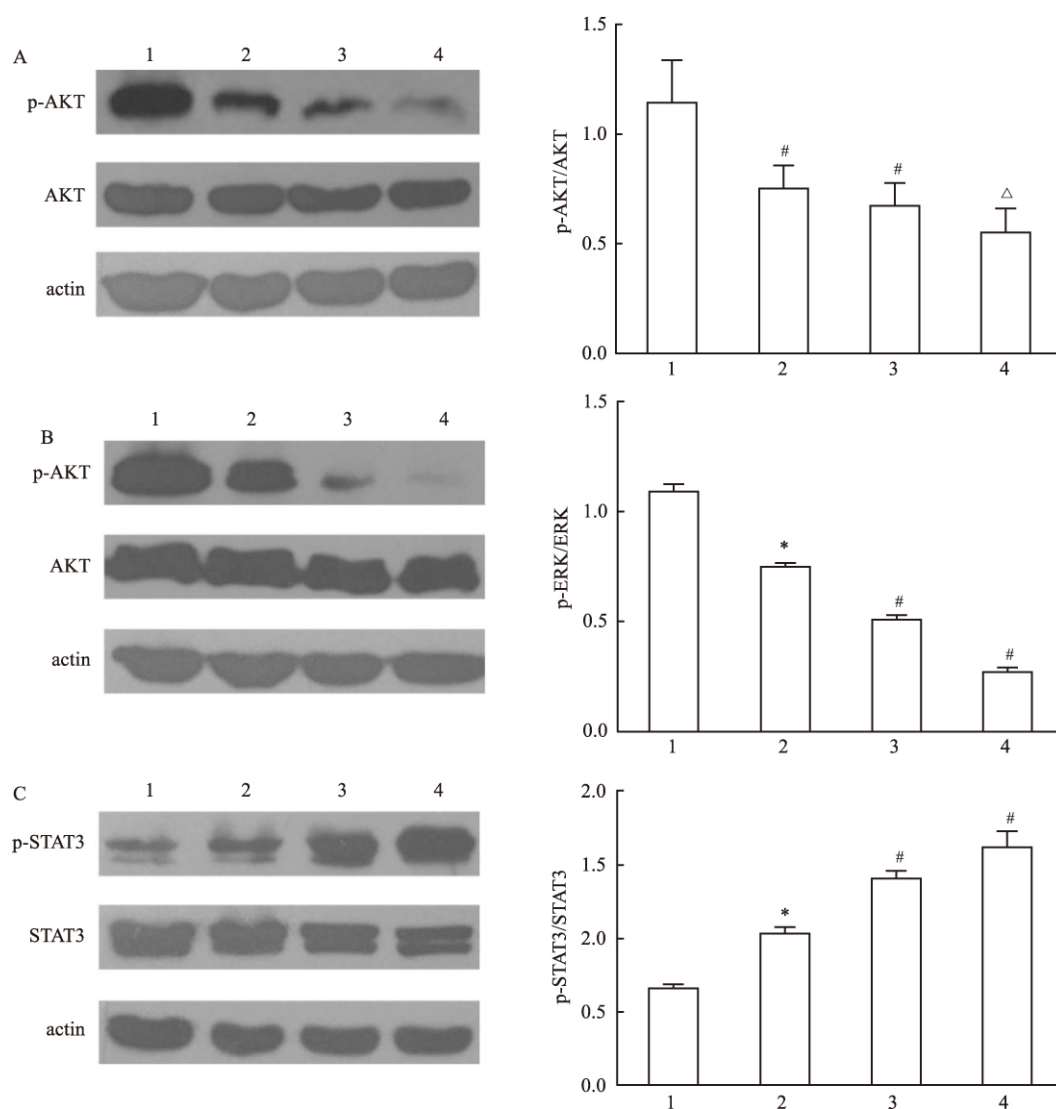


图4 AZD9291 作用于 H1975 细胞后信号通路蛋白的变化

A: AZD9291 单药作用细胞后 p-AKT 及 AKT 蛋白变化; B: AZD9291 单药作用细胞后 p-ERK 及 ERK 蛋白变化; C: AZD9291 单药作用细胞后 p-STAT3 及 STAT3 蛋白变化; 1: 对照组; 2: 10 nmol/L; 3: 20 nmol/L; 4: 40 nmol/L; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 10 nmol/L 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 20 nmol/L 组比较: [△] $P < 0.05$

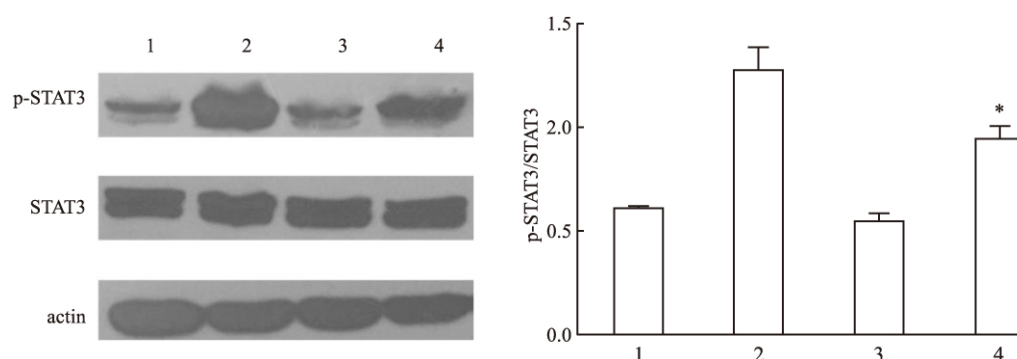


图5 AZD9291 和 STAT3 抑制剂单药及联合后对 H1975 信号通路中 p-STAT3 蛋白表达的影响

1: 对照组; 2: AZD9291 单药组; 3: STAT3 抑制剂单药组; 4: AZD9291 + STAT3 抑制剂联合用药组; 与 AZD9291 单药组比较: * $P < 0.05$

的基因和蛋白表达, 存活信号通路的激活使得细胞对厄洛替尼耐药。厄洛替尼联合 STAT3 抑制剂

Nidostamid 或是小干扰 RNA 可以逆转 HCC827 的耐药, 以上结果同样在移植瘤中证实, 厄洛替尼联合

STAT3 抑制剂增强瘤组织的缩小和凋亡。这些发现揭示了新的 EGFR-TKI 可能的耐药机制,为克服肺癌靶向药物耐药提供了一个新的治疗策略。

为了解使用 AZD9291 后细胞内主要细胞通路变化情况,本实验主要检测了细胞内 EGFR 下游主要三条信号通路的变化。其中 AKT 及 ERK 通路在低剂量组即出现明显抑制,但 STAT3 信号通路却异常激活,且磷酸化 STAT3 随剂量增高而增高。虽然 AZD9291 治疗效果显著,但不可避免地会出现耐药,STAT3 的异常激活可能为 AZD9291 的治疗效果欠佳的一个因素,所以予以 AZD9291 联合 STAT3 抑制剂应用了解其对 H1975 细胞系增殖情况影响。通过体外实验,在 H1975 细胞株中显示 AZD 9291 和 STAT3 抑制剂联合应用对 H1975 细胞的抗增殖作用明显强于各单药组,经过计算其差异有统计学意义,同时,计算 CI 显示,AZD9291 和 STAT3 抑制剂联合的 $CI < 1$,表明两者联合具有明显的协同作用。同时,通过流式细胞仪法对凋亡进行检测,本研究显示 AZD9291 和 STAT3 抑制剂联合可明显促进 H1975 细胞凋亡的作用。AZD9291 在作用 H1975 后出现 STAT3 活性明显增高,其可能进一步激活了下游信号通路抗凋亡蛋白,导致细胞对抑制剂敏感性降低,所以联合应用 STAT3 抑制剂后 AZD9291 其抑制细胞增殖作用增强。

综上所述,AZD9291 和 STAT3 抑制剂联合对携带 T790M 突变的 H1975 细胞株具有良好的协同作用,可增强细胞对 AZD9291 的敏感性,为临床 EGFR-TKIs 获得性耐药患者的治疗提供新的实验室依据及治疗策略。但本实验仅为体外细胞研究,尚需进一步的动物实验及临床试验来验证其在体内的有效性及安全性。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics,2015 [J]. CA Cancer J Clin,2015,65(1):5-29.
- [2] 万宜涛,袁媛,潘跃银,等.酪氨酸激酶抑制剂高剂量脉冲式给药克服非小细胞肺癌获得性耐药的体外观察研究[J].安徽医科大学学报,2016,51(4):516-20.
- [3] Niu F Y, Wu Y L. Novel agents and strategies for overcoming EGFR TKIs resistance [J]. Exp Hematol Oncol, 2014, 3(1):2.
- [4] Govindan R. Overcoming resistance to targeted therapy for lung cancer [J]. N Engl J Med,2015,372(18):1760-1.
- [5] Geiger J L, Grandis J R, Bauman J E. The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations [J]. Oral Oncol, 2016, 56:84-92.
- [6] Zhao C, Li H, Lin H J, et al. Feedback activation of STAT3 as a cancer drug-resistance mechanism [J]. Trends Pharmacol Sci, 2016, 37(1):47-61.
- [7] Siveen K S, Sikka S, Surana R, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors [J]. Biochim Biophys Acta,2014,1845(2):136-54.
- [8] Crescenzo R, Abate F, Lasorsa E, et al. Convergent mutations and kinase fusions lead to oncogenic STAT3 activation in anaplastic large cell lymphoma [J]. Cancer Cell, 2015,27(4):516-32.
- [9] Wen W, Wu J, Liu L, et al. Synergistic anti-tumor effect of combined inhibition of EGFR and JAK/STAT3 pathways in human ovarian cancer [J]. Mol Cancer, 2015, 14:100.
- [10] Deshmukh S K, Srivastava S K, Bhardwaj A, et al. Resistin and interleukin-6 exhibit racially-disparate expression in breast cancer patients, display molecular association and promote growth and aggressiveness of tumor cells through STAT3 activation [J]. Oncotarget, 2015, 6(13):11231-41.
- [11] Wu S G, Liu Y N, Tsai M F, et al. The mechanism of acquired resistance to irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor-afatinib in lung adenocarcinoma patients [J]. Oncotarget, 2016, 7(11):12404-13.
- [12] Chabon J J, Simmons A D, Lovejoy A F, et al. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients [J]. Nat Commun, 2016,7:11815.
- [13] Chiu H C, Chou D L, Huang C T, et al. Suppression of Stat3 activity sensitizes gefitinib-resistant non small cell lung cancer cells [J]. Biochem Pharmacol,2011,81(11):1263-70.
- [14] Kim S M, Kwon O J, Hong Y K, et al. Activation of IL-6R/JAK1/STAT3 signaling induces de novo resistance to irreversible EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer with T790M resistance mutation [J]. Mol Cancer Ther,2012,11(10):2254-64.
- [15] Li R, Hu Z, Sun S Y, et al. Niclosamide overcomes acquired resistance to erlotinib through suppression of STAT3 in non-small cell lung cancer [J]. Mol Cancer Ther,2013,12(10):2200-12.

Synergistic effect and mechanisms of AZD9291 combined with STAT3 inhibitors on H1975 lung cancer cells

Tang Jichun¹, Yuan Yuan², Jin Wei¹, et al

(¹Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Central Laboratory of Binhu Hospital, Hefei 230061)

Abstract Objective To investigate the changes of extracellular regulated protein kinases(ERK), protein kinase B(AKT) and signal transducers and activators of transcription(STAT3) signaling pathways in H1975 lung cancer

网络出版时间: 2018-3-16 9:32 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180315.1708.009.html>

低剂量阿司匹林诱导产生的自噬减弱 其对肝癌 HepG2 细胞系的抑制作用

朱思雅, 王梦琳, 金娟

摘要 目的 研究一定浓度的阿司匹林对肝癌 HepG2 细胞系的增殖抑制作用及产生抑制作用可能的原因。方法 采用 MTT 法和平板克隆实验研究阿司匹林对肝癌 HepG2 细胞增殖活力的影响。吖啶橙荧光染色法观察阿司匹林对肝癌 HepG2 细胞内自噬小体的影响。Western blot 法检测腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 在肝癌 HepG2 细胞中的表达。结果 10 mmol/L 浓度的阿司匹林能抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖活力, 但增加 HepG2 细胞中自噬小体的数量, 增加 AMPK 表达, 降低 mTOR 的表达, 且和 40 μ m 自噬抑制剂氯喹 (CQ) 联合使用时, CQ 能够增强 10 mmol/L 浓度阿司匹林对肝癌 HepG2 细胞的增殖抑制作用。结论 联合自噬抑制剂 CQ 减弱浓度为 10 mmol/L 的阿司匹林诱导产生的自噬从而明显增强其抗 HepG2 作用。

关键词 阿司匹林; 肝癌 HepG2 细胞; 自噬; 自噬抑制剂
中图分类号 R 963

2017-11-17 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2017A179)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院药理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 朱思雅, 女, 硕士研究生;

金娟, 女, 研究生导师, 责任作者, E-mail: juanjin163@163.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)03-0373-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.009

肝细胞癌是现如今社会最为常见的恶性肿瘤之一, 又因其恶性程度高, 且发生发展速度较快, 治疗困难, 而一直是临床研究的重点和热点之一^[1]。阿司匹林是应用最早, 最广泛和最常用的非甾体类解热镇痛抗炎风湿药, 具有解热、镇痛、抗炎、抗风湿和抗血小板聚集等的众多的药理作用, 阿司匹林发挥药效较快且药效稳定, 超剂量易于被发现和解决, 很少发生变态反应。长期规律使用阿司匹林者和未服用阿司匹林者相比, 可有效降低癌症的发生、增殖和转移^[2-3]。细胞自噬是细胞在自噬相关基因的调控下利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程, 发生应激时, 细胞自噬可以阻止致癌的损伤蛋白质和细胞器的累积, 阻止细胞的癌变; 但是如果肿瘤形成, 细胞自噬为癌细胞提供丰富的营养, 促进肿瘤生长。因此, 在肿瘤进展的过程中, 细胞自噬的作用表现出了两面性, 细胞自噬与肿瘤的关系十分复杂且目前尚未完全阐明。该研究旨在研究一定浓

cells after AZD9291 treatment. To explore the efficacy of AZD9291 combined with STAT3 inhibitor on the growth inhibition of H1975 cells and its possible mechanism. **Methods** The expression of phosphorylated and nonphosphorylated STAT3, ERK and AKT protein were detected by Western blot after treatment with different concentrations of AZD9291 to H1975 cells. After using AZD9291 and STAT3 inhibitor alone or in combination to treat H1975 cells, the antiproliferative effects were detected by the MTT method. The changes of apoptosis induced by AZD9291 and STAT3 inhibitor alone or in combination were detected by the flow cytometry. Western blot was used to detect the change of phosphorylation and nonphosphorylation of STAT3 protein in AZD9291 combined with STAT3 inhibitor. **Results** The expression of p-ERK and p-AKT was decreased and p-STAT3 was increased after treatment with AZD9291. The combination therapy with AZD9291 and STAT3 inhibitor showed a synergic effect on proliferative inhibition compared to AZD9291 or STAT3 inhibitor alone therapy ($P < 0.05$), which showed a synergic effect (combination index < 1). In addition, apoptotic rates were significantly increased in combination treatment compared to the single drug. Moreover, the combination of AZD9291 and STAT3 inhibitor produced a stronger inhibitory effects on p-STAT3 expression than single drug treatment. **Conclusion** The combination of AZD9291 and STAT3 inhibitors significantly inhibited the proliferation of H1975 and promoted the occurrence of apoptosis. The main mechanism may contribute to the down-regulation of p-STAT3 protein expression.

Key words non-small-cell lung cancer; AZD9291; STAT3 inhibitor; combination