

# Osimertinib 联合二甲双胍 对非小细胞肺癌 PC 9/GR 细胞的协同效应

彭佳<sup>1</sup>, 袁媛<sup>2</sup>, 潘跃银<sup>3</sup>, 张颖<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究 Osimertinib 联合二甲双胍对吉非替尼获得性耐药的 PC 9/GR 细胞的生长抑制效应及其可能机制。方法 Osimertinib 和二甲双胍单药或联合作用于 PC 9/GR 细胞后,应用 MTT 法检测不同药物处理组处理后对 PC 9/GR 细胞的抑制率影响;荧光染色法观察和流式细胞术检测 Osimertinib 和二甲双胍单药或联合诱导细胞凋亡的变化;Western blot 法检测各药物处理组细胞磷酸化及非磷酸化的 AMP 依赖的蛋白激酶 (AMPK) 和 70 ku 核糖体蛋白 S6 激酶 (P70S6K) 蛋白的表达水平。结果 Osimertinib 和二甲双胍双药联合作用可显著抑制 PC 9/GR 细胞的增殖,作用强于各单药 ( $P < 0.05$ ),表现为协同作用 (联合指数  $< 1$ );双药联合时相较于单药表现出更强的诱导细胞凋亡的作用;二甲双胍可上调细胞内 p-AMPK 蛋白的表达,Osimertinib 和二甲双胍均可下调 p-P70S6K 蛋白,且双药联合较单药下调 p-P70S6K 蛋白水平更为显著。结论 Osimertinib 和二甲双胍联合用药对 PC 9/GR 细胞的增殖有显著抑制作用并可以促进其凋亡的发生,具有协同作用。

**关键词** 非小细胞肺癌;Osimertinib;二甲双胍;联合

**中图分类号** R 734.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2017)07-0957-06

**doi**: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.004

随着基因测序技术的成熟和癌症相关的分子靶点的不断发现,靶向治疗在非小细胞肺癌的治疗中的重要作用日益凸显。在非小细胞肺癌患者中表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 阳性突变者可占患者总数 40% 左右<sup>[1]</sup>。第三代

EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI) 于 2015 年 11 月在美国批准注册,命名为 Osimertinib。虽然获得了一定的疗效,但随着治疗时间的延长仍然会出现获得性耐药。二甲双胍作为一种双胍类降糖药,近年来被发现具有抑制肿瘤细胞增殖,改善肿瘤对于化疗药物及小分子靶向抗癌药物敏感性作用<sup>[2]</sup>。侯涛等<sup>[3]</sup>发现,二甲双胍在体外具有增强 PC 9/GR 细胞对吉非替尼敏感性的作用。该研究通过探讨 Osimertinib 联合二甲双胍对吉非替尼获得性耐药的 PC 9/GR 细胞的增殖及凋亡的影响及可能机制,为二甲双胍增敏三代 EGFR-TKI 提供理论和实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** DMEM (高糖) 培养基、胎牛血清均购自美国 HyClone 公司;DMSO 和 MTT 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;p-AMPK 和 AMPK 抗体、p-P70S6K 和 P70S6K 抗体均购自美国 CST 公司; $\beta$ -actin 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;化学发光剂购自美国 Millipore 公司;二甲双胍购自美国 Sigma-Aldrich 公司;PC 9/GR 细胞由广东省肺癌研究所惠赠;Osimertinib 由英国 AstraZeneca 公司惠赠。

**1.2 细胞培养** PC 9/GR 细胞用高糖 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素) 置于恒温培养箱中培养,实验取用对数生长期细胞。

**1.3 MTT 法** 将 PC 9/GR 细胞悬液调整密度至 2 000 个/孔,接种于 96 孔板中,温箱培养。24 h 后分 5 组分别进行处理:Osimertinib 处理组加入 6 种不同浓度的 Osimertinib (1.95、3.91、7.81、15.63、31.25、62.50 nmol/L);二甲双胍处理组分别加入二甲双胍 (0.78、1.56、3.13、6.25、12.50、25.00 mmol/L);Osimertinib 联合二甲双胍处理组以 6 种不同浓度 Osimertinib 和二甲双胍处理组联合给药 (两药浓度比例为 1 :  $2 \times 10^5$ );对照组加培养基;空白组为纯培养基不含细胞,每组 5 个复孔。温箱培养 72 h

2017-03-17 接收

**基金项目**: 安徽省科技攻关项目 (编号: 1301042214); 安徽高校省级自然科学研究重点项目 (编号: KJ2012A157); 安徽省卫生计生委中医药科研课题 (编号: 2016zy29)

**作者单位**: <sup>1</sup>安徽医科大学第三附属医院干部病房,合肥 230061

<sup>2</sup>合肥市滨湖医院中心实验室,合肥 230061

<sup>3</sup>安徽医科大学附属省立医院肿瘤科,合肥 230001

**作者简介**: 彭佳,女,硕士研究生;

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

张颖,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: zhangying19650108@163.com

后,每孔加入 MTT 溶液 20  $\mu$ l 4 h 后弃上清液,各孔加入 200  $\mu$ l DMSO,震荡后在酶标仪(双波长 490/655 nm 模式)上吸光度(optical density, OD)值。细胞的增殖抑制率(%) = [1 - (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)]  $\times$  100%。统计数据后分别计算 Osimertinib 和二甲双胍的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)值与联合指数(combination index, CI)。

**1.4 荧光染色法** 将接种于 6 孔板的 PC 9/GR 细胞,分为 4 组,密度约 70%时分别加入 Osimertinib 12 nmol/L、二甲双胍 5 mmol/L、Osimertinib 联合二甲双胍终浓度分别为 12 nmol/L 和 5 mmol/L,对照组仅加入培养基。培养 24 h 后冷 PBS 洗涤 2 次,参照说明书依次加入凋亡检测试剂盒中 Annexin V-FITC 与 PI 试剂 4  $^{\circ}$ C 下孵育 10 min,于荧光显微镜下观察、拍照。

**1.5 流式细胞术** PC 9/GR 细胞以 1.4 方法进行药物处理,温箱培育 24 h。用胰酶消化细胞(上清液终止消化),离心并用冷 PBS 洗涤 2 次。参照说明书依次加入凋亡检测试剂盒中 Annexin V-FITC 与 PI 试剂试剂,避光孵育 15 min, PBS 再次洗涤后加入鞘液吹打混匀,置流式细胞仪检测 PC 9/GR 的凋亡率。

**1.6 Western blot 法** 收集按 1.4 方法进行药物处理后的细胞,裂解液提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,沸水煮 15 min 后 12 000 r/min 离心 10 min。将蛋白质加入 8 ~ 10% (按蛋白分子量调整) SDS-PAGE 中电泳 4  $^{\circ}$ C 条件下转膜,转好的膜置于 5% 脱脂奶粉中室温条件下封闭 1 ~ 4 h。加入以 1 : 1 000 比例稀释的抗 p-AMPK 和 AMPK 抗体、抗 p-P70S6K 和 p70S6K 抗体以及抗  $\beta$ -actin 抗体 4  $^{\circ}$ C 冰箱过夜。TBST 涮洗 3 遍后,加入二抗(1 : 5 000),室温孵育约 1 h,再次 TBST 涮洗 3 遍。沥去多余水分后加入发光剂,暗室中进行显影。各蛋白的灰度值采用 Image J 软件分析。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,各实验重复 3 次,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间均数的比较采用析因设计的两因素方差分析与 One-Way ANOVA(单因素方差分析), $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 Osimertinib 和二甲双胍对 PC 9/GR 细胞的增殖抑制作用** MTT 结果显示,作用 72 h 后,Osim-

ertinib 和二甲双胍对 PC 9/GR 细胞的 IC<sub>50</sub> 值分别为 (12.00  $\pm$  5.53) nmol/L 和 (4.57  $\pm$  1.28) mmol/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(图 1)。计算 CI 值显示,各浓度的 Osimertinib 联合二甲双胍处理组 CI 值的均值  $< 1$ ,表现出协同效应(图 2)。

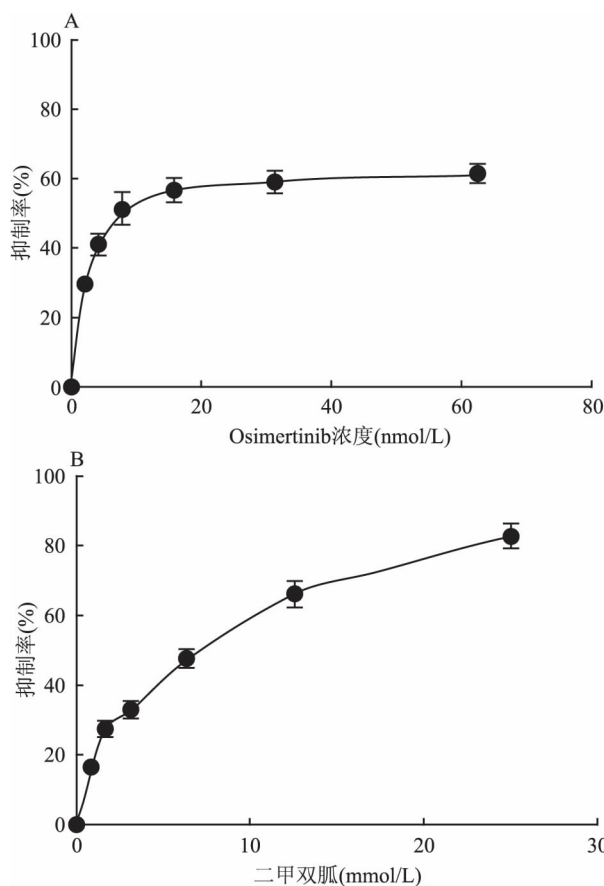


图 1 MTT 法检测 Osimertinib 和二甲双胍对 PC 9/GR 细胞的增殖抑制效应  
A: Osimertinib 处理组; B: 二甲双胍处理组

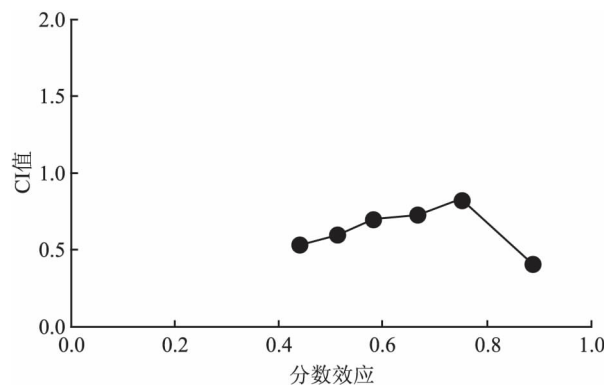


图 2 Osimertinib 联合二甲双胍作用于 PC 9/GR 细胞的 CI 值

**2.2 荧光显微镜下观察 PC 9/GR 细胞的凋亡情况**

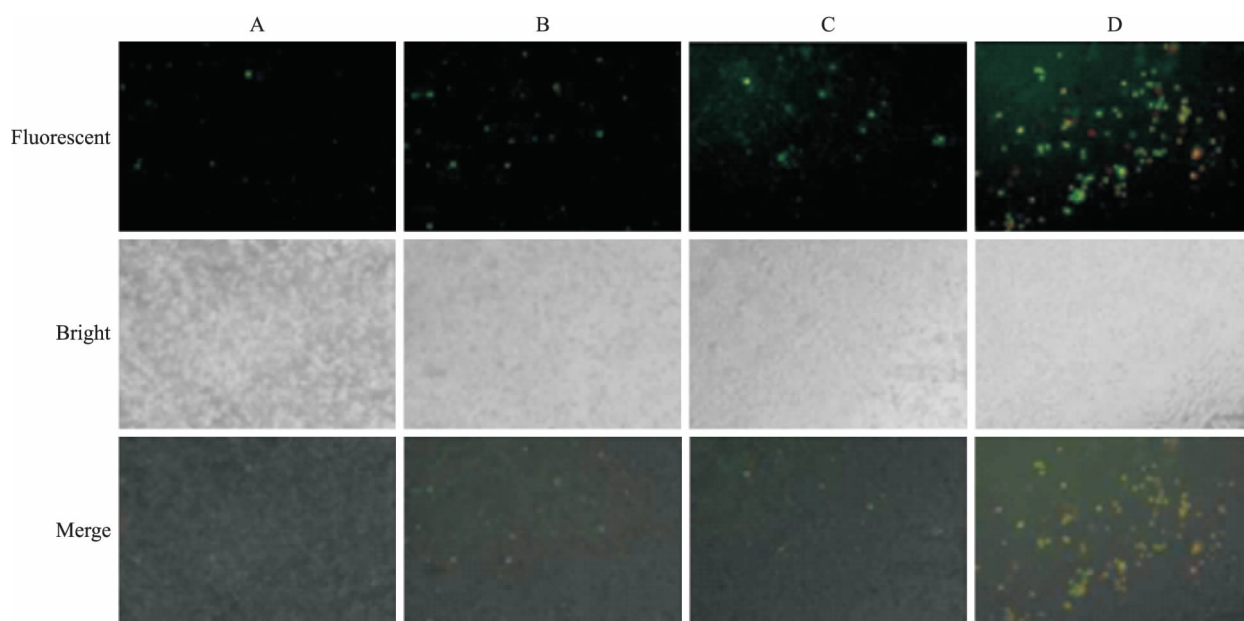


图3 PC 9/GR 细胞凋亡的变化 ×400

A: 对照组; B: Osimertinib 处理组; C: 二甲双胍处理组; D: Osimertinib 联合二甲双胍处理组

经药物处理 24 h 后,与对照组比较,Osimertinib 及二甲双胍处理组均可见处于凋亡状态的细胞增多;Osimertinib 联合二甲双胍处理组与上述两单药处理组相比,凋亡细胞增加更为明显(图 3)。

**2.3 流式细胞术检测 PC 9/GR 细胞凋亡率** 经检测,药物作用 24 h 后,Osimertinib 处理组和二甲双胍处理组 PC 9/GR 细胞的凋亡率分别为  $(7.88 \pm 1.21)\%$  和  $(8.38 \pm 1.23)\%$ ,Osimertinib 联合二甲双胍处理组 PC 9/GR 细胞的凋亡率为  $(22.72 \pm 3.44)\%$ 。两药联合后细胞的凋亡率明显高于单药,差异有统计学意义 ( $F=8.46$ ,  $P<0.05$ ) (图 4)。

**2.4 Osimertinib 和二甲双胍处理后 PC 9/GR 细胞中 p-AMPK 和 AMPK、p-P70S6K 和 P70S6K 蛋白的表达** Western blot 法检测结果显示,与对照组比较,二甲双胍处理组及 Osimertinib 联合二甲双胍处理组 PC 9/GR 细胞中 p-AMPK 的表达水平明显上调;Osimertinib 及二甲双胍处理组细胞中 p-P70S6K 的表达水平下调,相较于单药,两药联合中 p-P70S6K 下调水平更加明显,差异均有统计学意义 ( $F=583.84$ 、 $46.14$ ,  $P<0.05$ ) (图 5)。

### 3 讨论

EGFR 参与了包括非小细胞肺癌在内的几种人类癌症的发生和进展。突变型 EGFR 的发现与一代 EGFR-TKI 的应用为非小细胞肺癌的治疗提供了有效的新方法,迎来肺癌个性化治疗的新时代<sup>[4]</sup>。第

一代 EGFR-TKI 针对 EGFR 阳性突变患者取得很好疗效,但出现了继发性耐药<sup>[5]</sup>。在 60% 的患者中,这种获得性耐药的发生机制是额外发生的 T790M 突变<sup>[6]</sup>。以 Osimertinib 为代表的第三代 EGFR-TKI 针对一代药物的耐药而研发,其机制是与 T790 突变 EGFR 催化域 ATP 结合位点共价结合,不可逆性作用于苏氨酸关键突变位点从而抑制 EGFR 磷酸化的发生,从而下调下游通路中 ERK、AKT 等关键蛋白磷酸化水平<sup>[7]</sup>。Osimertinib 是一种高度选择性的靶向药物,可在选择性抑制 T790 突变的 EGFR,同时又能兼顾适当保留野生型 EGFR 活性<sup>[8]</sup>。Jänne et al<sup>[9]</sup> 发现在 127 例具有 EGFR-T790M 突变的患者中,对 Osimertinib 的反应率为 61%,中位无进展生存期为 9.6 个月;在 61 例未检测到 EGFR 突变的患者中,反应率约为 21%。中位无进展生存期为 2.8 个月。由此可看出 Osimertinib 虽然在治疗期间取得了较高的反应率,但仍会产生耐药。

二甲双胍是一种被广泛应用的双胍类降糖药,临床研究<sup>[10]</sup>显示其可以减少糖尿病患者肿瘤的发生率并改善预后。Chen et al<sup>[11]</sup>发现在晚期肺癌患者中二甲双胍与 EGFR-TKI 联合用药可产生协同抗肿瘤效应。同时二甲双胍也在体外实验中表现出对肿瘤细胞的抑制作用。研究<sup>[12-13]</sup>显示,在非小细胞肺癌及乳腺癌细胞株中二甲双胍联合一代 EGFR-TKI 均可产生显著抑制增殖与促凋亡效应。提示二甲双胍也许能成为肺癌辅助治疗的一个新的选择。

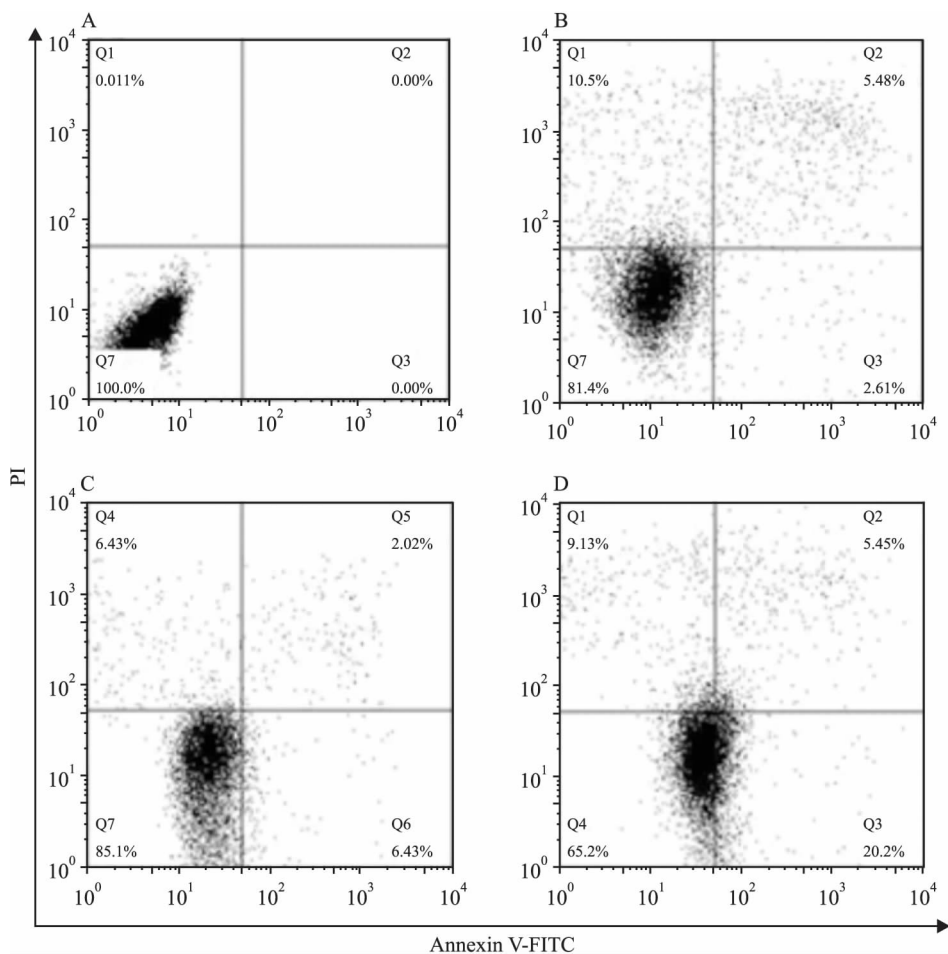


图 4 流式细胞术法检测对 PC 9/GR 细胞凋亡率的影响

A: 对照组; B: Osimertinib 处理组; C: 二甲双胍处理组; D: Osimertinib 联合二甲双胍处理组

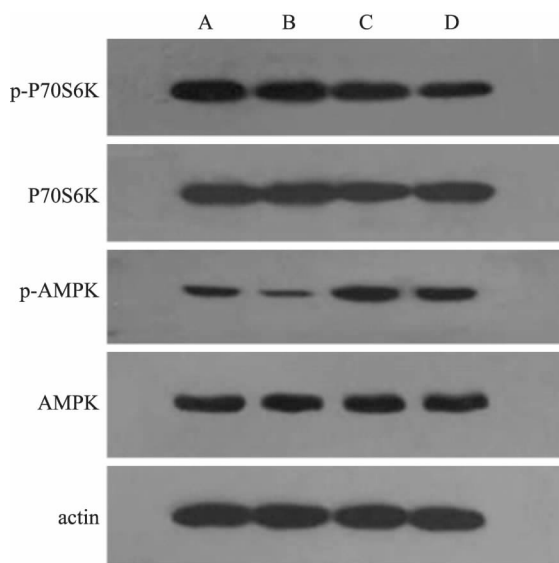


图 5 对 PC 9/GR 细胞信号通路的影响

A: 对照组; B: Osimertinib 处理组; C: 二甲双胍处理组; D: Osimertinib 联合二甲双胍处理组

本实验结果显示,在 PC 9/GR 细胞中, Osimertinib 联合二甲双胍相较于单药作用可产生更为显著的抑制增殖效应, 荧光显微镜下观察与流式细胞术的结果也提示两药均可产生促进细胞凋亡的作用, 联合作用效果优于单药, 在体外表现出协同抗肿瘤作用。

二甲双胍的抗肿瘤效应机制可能与 AMPK/mTOR 通路的激活有关<sup>[14]</sup>。Guo et al<sup>[15]</sup>发现, 二甲双胍能够激活非小细胞肺癌细胞株 H1299 与 H460 中的 AMPK 蛋白的表达, 抑制 mTOR 及其下游 P70S6K 蛋白磷酸化水平。P70S6K 是 mTOR 最重要的下游蛋白之一, mTOR 可通过对下游蛋白的磷酸化来行使生理作用, 故通过检测 P70S6K 的活化水平也可间接反映出 mTOR 的活化水平。PI3K/Akt/mTOR 信号通路是 EGFR 下游经典信号通路之一, 该通路在调节细胞生长、增殖、调控细胞周期等多个方面扮演着重要角色, EGFR-TKI 可通过对 EG-

FR 的封阻来抑制 mTOR 及下游 P70S6K 蛋白的磷酸化产生抗肿瘤效应。Morgillo et al<sup>[12]</sup> 发现二甲双胍与吉非替尼联合作用后可检测到 P70S6K 蛋白的磷酸化水平降低,表明 mTOR 信号通路被抑制。本实验研究显示,与对照组相比,二甲双胍可降低 AMPK 磷酸化水平;Osimertinib 与二甲双胍作用后 p-P70S6K 水平均出现下调,两药联合下调水平较单药更加明显,与 Morgillo et al<sup>[12]</sup> 研究结果相符。由此推测 Osimertinib 与二甲双胍的协同抗肿瘤作用可能通过共同下调 mTOR 下游白蛋白 P70S6K 的磷酸化水平达到。

本研究结果显示,Osimertinib 联合二甲双胍可对 PC 9/GR 细胞产生协同抑制增殖与促进凋亡作用,为临床上 EGFR-TKI 获得性耐药的肺非小细胞肺癌患者的下一步治疗方案提供了一定的理论依据。然而,本实验为细胞实验,尚缺乏在动物模型上的复制,有待后续研究的跟进。

#### 参考文献

- [1] Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(11):760-74.
- [2] Rizos C V, Elisaf M S. Metformin and cancer [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 705 (1-3):96-108.
- [3] 侯涛.二甲双胍对肺癌细胞系 PC 9、PC 9/GR 增殖抑制、凋亡诱导及吉非替尼增敏作用的研究[D].长沙:中南大学, 2013.
- [4] Antonicelli A, Cafarotti S, Indini A, et al. EGFR-targeted therapy for non-small cell lung cancer: focus on EGFR oncogenic mutation [J]. Int J Med Sci, 2013, 10(3): 320-30.
- [5] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EUR-TAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2012, 13(3):239-46.
- [6] Yu H A, Arcila M E, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(8):2240-7.
- [7] Ku B M, Bae Y H, Koh J, et al. AZD9291 overcomes T790M-mediated resistance through degradation of EGFR (L858R/T790M) in non-small cell lung cancer cells [J]. Invest New Drugs, 2016, 34(4):407-15.
- [8] Cross D A, Ashton S E, Ghiorghiu S, et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer [J]. Cancer Discov, 2014, 4(9):1046-61.
- [9] Jänne P A, Yang J C, Kim D W, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2015, 372(18):1689-99.
- [10] Currie C J, Poole C D, Jenkins-Jones S, et al. Mortality after incident cancer in people with and without type 2 diabetes: impact of metformin on survival [J]. Diabetes Care, 2012, 35(2):299-304.
- [11] Chen H, Yao W, Chu Q, et al. Synergistic effects of metformin in combination with EGFR-TKI in the treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer and type 2 diabetes [J]. Cancer Lett, 2015, 369(1):97-102.
- [12] Morgillo F, Sasso F C, Della Corte C M, et al. Synergistic effects of metformin treatment in combination with gefitinib, a selective EGFR tyrosine kinase inhibitor, in LKB1 wild-type NSCLC cell lines [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(13):3508-19.
- [13] Lau Y K, Du X, Rayannavar V, et al. Metformin and erlotinib synergize to inhibit basal breast cancer [J]. Oncotarget, 2014, 5(21):10503-17.
- [14] Yue W, Yang C S, DiPaola R S, et al. Repurposing of metformin and aspirin by targeting AMPK-mTOR and inflammation for pancreatic cancer prevention and treatment [J]. Cancer Prev Res, 2014, 7(4):388-97.
- [15] Guo Q, Liu Z, Jiang L, et al. Metformin inhibits growth of human non-small cell lung cancer cells via liver kinase B-1-independent activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(3):2590-6.

## Synergistic effect of Osimertinib combined with metformin on non-small cell lung cancer PC 9/GR cells

Peng Jia<sup>1</sup>, Yuan Yuan<sup>2</sup>, Pan Yueyin<sup>3</sup>, et al

<sup>1</sup>Dept of Cadres Ward, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061;

<sup>2</sup>The Central Laboratory of Binhu Hospital, Hefei 230601; <sup>3</sup>Dept of Oncology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To explore the efficacy of Osimertinib combined with metformin on the growth inhibition of human non-small cell lung cancer PC 9/GR cells and its possible mechanism. **Methods** After using Osimertinib and metformin alone or in combination to treat PC 9/GR cells, the half inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) as

# TGF- $\beta$ III型受体在小鼠肝纤维化中的作用研究

厉歆然 孙妩弋 谷元婧 彭文婷 魏 伟

**摘要** 目的 建立四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )诱导的肝纤维化小鼠模型,观察转化生长因子 $\beta$  III型受体(T $\beta$ R III)在肝纤维化中的作用。方法 C57BL/6J小鼠随机分为正常对照组和 $\text{CCl}_4$ 模型组,模型组腹腔注射10%  $\text{CCl}_4$ 油溶液(5 ml/kg)每周2次,分别在造模第2、4、6、8周处死小鼠,HE染色观察小鼠肝脏的病理学变化,检测模型进展过程中血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性,Western blot法检测肝组织中I型胶原、T $\beta$ R III、p-Smad3、Smad3、p-Akt、Akt的表达情况。结果 HE染色结果显示随着造模时间的延长,小鼠肝纤维化程度逐渐加重,血清ALT、AST活性逐渐增加,Western blot结果显示I型胶原的表达逐渐增加,T $\beta$ R III的表达逐步降低,p-Smad3和p-Akt的表达逐渐升高。结论 T $\beta$ R III的降低可能与小鼠肝纤维化的发生发展有关。

**关键词** 肝纤维化;四氯化碳;T $\beta$ R III;Akt

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-0962-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.005

肝纤维化是各种因素所致肝脏受损,导致细胞

外基质(extracellular matrix, ECM)合成与降解不平衡,引起肝内结缔组织异常增生的病理过程,肝纤维化可进一步发展为肝硬化甚至肝癌,严重威胁人类健康。目前,肝纤维化的发病机制仍不清楚,因此探究其发病机制,为研发抗肝纤维化药物奠定理论基础具有意义。转化生长因子 $\beta$  III型受体(type III TGF- $\beta$  receptor, T $\beta$ R III)一直以来被认为是TGF- $\beta$ 超家族的辅助受体,近年来的研究<sup>[1-4]</sup>表明,其既可以参与调控经典的Smad信号通路,又可以调控其他信号通路。研究<sup>[5-7]</sup>表明,在肺纤维化和心肌纤维化中,T $\beta$ R III的表达降低。在肝纤维化小鼠中,T $\beta$ R III的表达是否发生变化,且相关信号通路是否受到影响尚未见报道。该研究通过建立四氯化碳(carbon tetrachloride,  $\text{CCl}_4$ )诱导的肝纤维化小鼠模型,观察肝纤维化进程中T $\beta$ R III的表达及Smad3、Akt的信号变化。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 6~8周龄雄性C57BL/6J小鼠,重(20 $\pm$ 2)g,由安徽医科大学实验动物中心提供。动物自由饮食饮水,动物房室温约25 $^{\circ}\text{C}$ ,光照时间随昼夜变化。50只实验动物随机分为正常对照组、 $\text{CCl}_4$ 模型组。

**1.2 主要试剂与仪器**  $\text{CCl}_4$ (上海凌峰化学试剂有限公司);玉米油(市售);抗Collagen I抗体、抗T $\beta$ R III抗体(美国Santa Cruz公司);抗p-Smad3抗

2017-02-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81300332、81330081)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥230032

作者简介:厉歆然,女,硕士研究生;

孙妩弋,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: sun-wuyi51@aliyun.com;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

well as the combination index(CI) values were detected by the MTT method. The changes of apoptosis induced by Osimertinib and metformin alone or in combination were detected by the fluorescent microscope and flow cytometry. The change of the p-AMPK and the p-p70S6K protein level were detected by Western blot. **Results** The combination therapy with Osimertinib and metformin showed a synergistic effect on proliferative inhibition compared to Osimertinib or metformin alone therapy ( $P < 0.05$ ), which showed a synergistic effect ( $CI < 1$ ). In addition, apoptotic rates were significantly increased in combination treatment compared to the single drug. The result of the Western blot showed that metformin may upregulate the expression of p-AMPK protein; in addition, both Osimertinib and metformin could reduce the level of p-p70S6K, the expression levels of p-p70S6K was decreased in the combination therapy compared to Osimertinib or metformin alone therapy. **Conclusion** The combination of Osimertinib and metformin could significantly inhibit cell proliferation and promote cell apoptosis, and has synergistic effect.

**Key words** non-small cell lung cancer; Osimertinib; metformin; combination