

曲妥珠单抗耐药机制的最新研究进展

张艳 综述 张锦生 审核

复旦大学医学院病理学系, 上海 200032

[摘要] 人类表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, Her-2) 在20%~25%的侵袭性乳腺癌中有过度表达, 且其过度表达与乳腺癌的侵袭性和生存率相关。曲妥珠单抗 (商品名: 赫赛汀, herceptin) 是一种已广泛应用于临床治疗的抗Her-2的单克隆抗体, 其与化疗药物联用可以明显延长患者的无病生存期, 但Her-2表达阳性的乳腺癌细胞易对曲妥珠单抗产生耐药性。本文系统总结了曲妥珠单抗的耐药机制及相关最新研究进展, 包括PI3K/AKT信号通路过度激活、表皮生长因子受体家族 (epidermal growth factor receptor family, EGFR family) 及其配体的异常表达、Her-2或曲妥珠单抗封闭、胰岛素样生长因子1受体 (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R) 旁路活化PI3K/AKT通路、Darpp-32和t-Darpp过度表达、肿瘤细胞自体吞噬、热休克蛋白27 (heat shock protein 27, HSP27) 过度表达等。

[关键词] 人表皮生长因子受体2; 曲妥珠单抗; PI3K/AKT; Darpp-32; t-Darpp; 自体吞噬; HSP27

中图分类号: R730.53 文献标识码: A 文章编号: 1007-3639(2010)03-0232-05

An updated review of the research on Her-2-targeted antibody resistance mechanisms

ZHANG Yan, ZHANG Jin-sheng (Department of Pathology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: ZHANG Jin-sheng E-mail: jszhang44@shmu.edu.cn

[Abstract] Human epidermal growth factor receptor 2 (Her-2), which is often over-expressed in 20%-25% of invasive breast cancer patients, is associated with an aggressive tumor phenotype and therefore, a reduced survival rate. As a widely clinically applied Her-2-targeted monoclonal antibody, herceptin, when combined with chemotherapy, significantly increases the survival time of patients without tumors. However, the majority of the cancers that initially respond positively to herceptin begin to counteract against the treatment within just 1 year. This study described several important and well-known mechanisms as well as the updates and advancement in this field. These mechanisms include over-activation of the PI3K/AKT pathway, abnormal expression in the EGFR family and their ligands, the masking of the Her-2 receptor, herceptin, activation of PI3K/AKT via an alternative pathway, over-expression of Darpp-32 and t-Darpp, autophagy of tumor cells and over-expression of HSP27, and more.

[Key words] Her-2; herceptin; PI3K/AKT; Darpp-32; t-Darpp; autophagy; HSP27

人类表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, Her-2) 属于表皮生长因子受体家族, 是一个由原癌基因CerbB2 (Her-2/neu) 编码的具有受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 活性的跨膜糖蛋白。研究表明, Her-2在20%~30%的原发性乳腺浸润性导管癌中有基因的扩增和蛋白的过度表达。研究表明Her-2阳性的乳腺癌浸润性强, 无病生存期短, 预后差。

曲妥珠单抗 (商品名: 赫赛汀, herceptin) 是一种针对Her-2/neu原癌基因产物的人源化单

克隆抗体, 能特异地作用于Her-2过度表达的乳腺癌细胞。1998年, 曲妥珠单抗获得美国食品及药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准上市, 用于Her-2表达阳性的乳腺癌治疗。曲妥珠单抗对Her-2阳性乳腺癌的疗效好, 患者的无病生存期明显延长, 但另有将近50%的Her-2阳性患者对曲妥珠单抗治疗不敏感^[1], 并且大部分Her-2阳性患者在经过1年的曲妥珠单抗治疗后, 即会对其产生耐药性。

1 曲妥珠单抗作用机制 曲妥珠单抗虽已广泛用于Her-2表达阳性乳腺癌的临床治疗, 但其作用机制至今仍未明了。目前研究认为曲妥

珠单抗可能通过多种机制发挥作用：(1)曲妥珠单抗上的Fc段可结合自然杀伤细胞膜上的Fc- γ 受体，从而激活抗体介导的细胞毒作用（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC），协助机体免疫系统杀伤Her-2阳性肿瘤细胞^[2]；(2)可能作用于配体不依赖性的ErbB2/ErbB3二聚体，使之解聚，从而抑制ErbB2受体下游信号的激活^[3]；(3)通过抑制金属蛋白酶活性，抑制Her-2细胞外段（extracellular domain, ECD）被裂解，阻止其释放到血液中^[4]，有报道提示在曲妥珠单抗治疗过程中，Her-2 ECD释放到外周血液中越少，治疗效果及预后就越好^[5]。PI3K/Akt信号通路是Her-2主要的下游信号通路，Nagata等^[6]研究发现曲妥珠单抗可通过加强抑癌基因PTEN（phosphatase and tensin homolog）定位到细胞膜上和增强其磷酸酶活性，抑制PI3K信号通路的传导。曲妥珠单抗对血管生成和异常生成有抑制作用^[7]；通过用其治疗能够调节多种细胞周期相关蛋白的数量和存在形式，减少细胞周期蛋白D1的表达，促使p27^{kip1}蛋白与cyclin D1分离，而与cyclin E/cdk2复合体结合，从而使细胞停留于G₁期^[8]。

2 曲妥珠单抗的耐药机制

2.1 PI3K/AKT信号通路过度激活 PI3K/AKT信号通路是ErbB受体激活的主要下游信号通路，所以该通路的状态在决定曲妥珠单抗疗效方面有着举足轻重的作用，PI3K、PTEN和AKT是该信号通路上被研究最多的信号分子。

PI3K由调节亚基p85和催化亚基p110组成，p85与磷酸化的表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）接合，而p110亚基能催化磷脂酰肌醇二磷酸（phosphatidylinositol biphosphate, PIP₂）磷酸化形成PIP₃。25%的原发性乳腺癌病例中有p110亚基p110 a基因的突变^[9]。p110a的突变多发生于外显子9和20上，这2个突变热点的突变可导致PI3K催化活性增强^[10]。Berns等^[11]的研究发现，PIK3CA突变的乳腺癌患者在曲妥珠单抗治疗中预后不及PIK3CA未突变的患者。

PTEN是一种作用正好与PI3K相拮抗的磷酸酶。PTEN催化PIP₃脱去一个磷酸基团，形成无信号传递活性的PIP₂。Berns等^[11]应用大规模RNA干扰的方法筛选乳腺癌曲妥珠单抗耐药相关的基因，发现PTEN对乳腺癌细胞的曲

妥珠单抗耐药性调节较明显。Kortlever等^[12]利用基因敲除技术，抑制细胞内PTEN蛋白的表达，结果证实了PTEN表达下调能够引起乳腺癌细胞对曲妥珠单抗耐药性增强。

蛋白激酶B（protein kinase B, PKB），又称AKT，在PI3K/AKT信号通路中起着枢纽性的作用，AKT接受PIP₃分子的调节，而AKT则调控下游一系列的转录分子，抑制P21/Waf1/Cip1和P27/kip1蛋白的抑癌功能，激活mTOR（mammalian target of rapamycin）蛋白。在多项研究中，未发现乳腺癌细胞内有AKT基因的突变，但有报道发现AKT基因扩增^[13]。AKT活性的增强则较常见，它可由上游信号增强引起。She等^[14]发现Her-2扩增或PI3K突变的乳腺癌细胞内，AKT活性上升，而AKT抑制物AKTi-1/2能够明显抑制AKT的活性，导致乳腺癌细胞凋亡或者细胞周期滞留于G₁期。Chan等^[15]通过对曲妥珠单抗耐药和非耐药乳腺癌细胞的比较研究，结果发现曲妥珠单抗作用于非耐药乳腺癌细胞后，AKT磷酸化水平和蛋白表达水平降低，而耐药细胞则没有变化。

2.2 EerbB及其配体异常表达 EGFR家族，又称EerbB，共有4个成员，各个成员之间可以相互聚合形成二聚体，Her-2与HER3聚合形成的异二聚体能够强烈激活PI3K/AKT信号通路。虽然有学者推测Her-2阳性乳腺癌细胞对曲妥珠单抗耐药性的产生与Her-2表达下调有关，但多项实验均未发现Her-2减少，而是发现EGFR表达上调进一步研究发现，曲妥珠单抗和EGFR的酪氨酸激酶抑制剂，如埃罗替尼（erlotinib）或吉非替尼（gefitinib），共同使用能够抑制对曲妥珠单抗耐药的细胞生长^[16]，EGFR/Her-2酪氨酸激酶双重抑制剂拉帕替尼（lapatinib）单独使用也能抑制曲妥珠单抗耐药细胞株的增殖^[17]。

曲妥珠单抗耐药株细胞表达生长因子的水平比非耐药性细胞高。Ritter等^[18]发现EGFR磷酸化水平增高，其配体TGF- α 过表达，若使用EGFR抗体西妥昔单抗（cetuximab），即能在一定程度上克服曲妥珠单抗的耐药性。此外，还能检测到曲妥珠单抗耐药株细胞中heregulin表达升高，heregulin与HER3结合，可促进Her-2/HER3二聚体的形成，且heregulin诱导形成的Her-2/HER3二聚体不受曲妥珠单抗的解聚作用影响^[19]。

2.3 Her-2或曲妥珠单抗被封闭 有文献报道称^[20],曲妥珠单抗耐药性与膜相关糖蛋白黏蛋白4(mucin4, MUC4)表达升高有相关性,MUC4能与Her-2结合,并阻止曲妥珠单抗作用于Her-2。Nagy等^[21]将曲妥珠单抗耐药细胞株JIMT-1的MUC4基因敲除后,即可增强该细胞株对曲妥珠单抗的敏感性。

Her-2蛋白的相对分子质量为 185×10^3 ,能被基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)水解成相对分子质量为 110×10^3 的胞外段(ECD)和 95×10^3 的膜相连段。ECD如被释放到血液中,即可以与曲妥珠单抗结合,从而阻止曲妥珠单抗与细胞膜上Her-2的结合,降低曲妥珠单抗的抗肿瘤效果。另一部分与膜相连的Her-2蛋白仍然具有信号传导功能,且其酪氨酸激酶活性被增强^[22]。一项针对临床实验的荟萃分析(meta-analysis)发现,在曲妥珠单抗治疗早期,若血液中Her-2 ECD的含量降低20%以上,则患者的预后比不降低的要好^[23]。

2.4 IGF-1R旁路活化PI3K/AKT信号通路 IGF-1R是一个跨膜的酪氨酸激酶受体,它激活的下游信号通路能够促进细胞增殖。由于IGF-1R与Her-2及其他ErbB有共同的下游信号通路,所以IGF-1R可能通过旁路活化PI3K/AKT和RAS/MAPK信号通路,模拟Her-2激活信号通路,产生曲妥珠单抗耐药性。已有研究证明^[24],IGF-1R介导的信号传导增强与EGFR过表达的乳腺癌细胞产生拮抗吉非替尼耐药性相关。Lu等^[25]将IGF-1R基因转入SKBR3细胞中,使之过度表达IGF-1R蛋白,结果发现IGF-1R过度表达的SKBR3细胞对曲妥珠单抗产生耐药性,而当加入IGF结合蛋白3之后,SKBR3细胞对曲妥珠单抗的敏感性又恢复。但Kostler等^[26]通过对72例临床病例的分析,发现IGF-1R的表达与临床上对曲妥珠单抗治疗的敏感度没有相关性。

2.5 曲妥珠单抗耐药机制研究的最新进展 Darpp-32是蛋白磷酸酶1(protein phosphatase 1, PP1)的抑制物^[15],主要存在在中枢神经中,受到多巴胺受体D1的激活。Chan等^[15]发现具有曲妥珠单抗耐药性的BT/Her(R)细胞内Darpp-32 mRNA和蛋白表达水平上都有上调,因此,推测可能是Darpp-32的上调抑制了PP1的活性,从而使PP1的底物Akt持续磷酸化,

Akt活性增强。t-Darpp是Darpp-32被截短后的一种形式,t-Darpp在结肠癌、食管癌、乳腺癌和前列腺癌等上皮细胞肿瘤中均有过度表达。t-Darpp过度表达使肿瘤细胞产生抗凋亡特性,但其具体机制尚待研究。而Gu等^[27]检测BT/Her(R)细胞,发现Darpp-32的表达并没有增强,只是t-Darpp过度表达。之后,Gu等将t-Darpp和Darpp-32基因转入Her-2表达阳性的SK-Br-3细胞中,结果发现只转入t-Darpp基因的细胞获得耐药性,而与Darpp-32共转染的细胞能够抑制t-Darpp介导的耐药性。

细胞自体吞噬(autophagy)曾被认为是细胞凋亡的一种机制,但在最近的研究中,发现自体吞噬也是细胞在缺氧、化疗损伤等一系列外界压力下的保护机制。不少研究发现自体吞噬促进肿瘤的形成和肿瘤细胞的生存。Vazquez-Martin等^[28]通过在Tzb-naive SKBR3细胞和经过长期用曲妥珠单抗处理的Tzb-refractory SKBR细胞中检测自噬体标记蛋白LC3的表达,发现脂化的LC3在Tzb-R细胞中高表达。之后,Vazquez-Martin等^[28]又用小RNA干扰法敲除LC3基因,结果发现细胞中在LC3表达下降的同时,肿瘤细胞的增殖能力也下降,对曲妥珠单抗的敏感度上升。

HSP27主要在细胞内起蛋白分子折叠、定位和降解的作用。最近的研究发现HSP27在胃癌、肝癌和前列腺癌的预后中均有重要作用,HSP27在细胞中的表达水平的升高则预后差。Kang等^[29]在对Her-2表达阳性的乳腺癌细胞SK-BR-3的研究中发现,具有曲妥珠单抗耐药性的SK-BR-3 HR细胞内HSP27表达高于对曲妥珠单抗敏感的SK-BR-3细胞。若用siRNA法抑制前者细胞内HSP27的表达,则SK-BR-3 HR细胞恢复对曲妥珠单抗的敏感性。Kang等^[29]又通过免疫共沉淀的方法,检测到HSP27在细胞内与Her-2相结合。HSP27结合于Her-2受体,稳定Her-2,阻止曲妥珠单抗下调细胞膜上的Her-2。

3 结语 自从1998年曲妥珠单抗上市后,近10年的随机临床试验研究发现,在转移性乳腺癌及早期乳腺癌治疗中,化疗联合曲妥珠单抗与单用化疗相比,在提高生存率方面效果明显。但仍有50%的Her-2阳性的乳腺癌患者对曲妥珠单抗不敏感,而且大部分曲妥珠单抗治疗有效的乳腺癌在1年内仍能产生耐药性,所以

探讨曲妥珠单抗的耐药机制,以及寻找能预测曲妥珠单抗疗效的生物学指标,对于预防耐药和个体化治疗是十分重要的。

对曲妥珠单抗耐药机制的研究在不断地发展,传统的耐药机制研究主要着眼于PI3K/AKT信号通路上的蛋白,如PI3K、PTEN、AKT、ERGF家族及其配体和IGF-1R等,而最新研究则发现PI3K/AKT信号通路之外的蛋白也能引发肿瘤细胞的耐药性,如t-Darpp、LC3和HSP27等。纵观这些研究,可见曲妥珠单抗的耐药机制是复杂的,不能归因于某一个蛋白或某一条信号传导通路,而是由多种蛋白或信号通路综合产生的结果,并且具有个体差异性。

对曲妥珠单抗耐药机制研究的历程已有十几年,虽然仍然有许多问题悬而未决,但从这些研究中也找到了一些能预测曲妥珠单抗疗效的生物学指标。除了Her-2以外,前述的一些如PTEN水平、PI3K突变、AKT活化和ErbB家族成员是否共表达以及是否存在ErbB配体和IGF-1R表达水平的高低等,均有希望成为预测肿瘤细胞对妥珠单抗敏感度的生物学指标。

[参 考 文 献]

- [1] Singer CF, Köstler WJ, Hudelist G. Predicting the efficacy of trastuzumab-based therapy in breast cancer: Current standards and future strategies [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1786(2): 105-113.
- [2] Clynes RA, Towers TL, Presta LG et al. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets [J]. *Nat Med*, 2000, 6(4): 443-446.
- [3] Junttila TT, Akita RW, Parsons K, et al. Ligand-independent Her-2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941 [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(5): 429-440.
- [4] Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, et al. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her-2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her-2 ectodomain cleavage in breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(12): 4744-4749.
- [5] Kostler WJ, Schwab B, Singer CF, et al. Monitoring of serum Her-2/neu predicts response and progression-free survival to trastuzumab-based treatment in patients with metastatic breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(5): 1618-1624.
- [6] Nagata Y, Lan KH, Zhou X, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(2): 117-127.
- [7] Izumi Y, Xu L, Di TE, et al. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail [J]. *Nature*, 2002, 416(6878): 279-280.
- [8] Lane HA, Beuvink I, Motoyama AB, et al. ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(9): 3210-3223.
- [9] Saal LH, Holm K, Maurer M, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(7): 2554-2559.
- [10] Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY, et al. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10992-11000.
- [11] Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2007, 12(4): 395-402.
- [12] Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(8): 877-884.
- [13] Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, et al. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas [J]. *Int J Cancer*, 1995, 64(4): 280-285.
- [14] She QB, Chandrapaty S, Ye Q. Breast tumor cells with PI3K mutation or Her-2 amplification are selectively addicted to Akt signaling [J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): 1-10.
- [15] Chan CT, Metz MZ, Kane SE. Differential sensitivities of trastuzumab (Herceptin)-resistant human breast cancer cells to phosphoinositide-3 kinase (PI-3K) and epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase inhibitors [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 91(2): 187-201.
- [16] Narayan M, Wilken JA, Harris LN. Trastuzumab-induced HER reprogramming in "resistant" breast carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(6): 2191-2194.
- [17] Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(3): 1630-1639.
- [18] Ritter CA, Bianco R, Dugger T, et al. Mechanisms of resistance development against trastuzumab (Herceptin) in an in vivo breast cancer model [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2004, 42(11): 642-643.
- [19] Ritter CA, Perez-Torres M, Rinehart C, et al. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(16): 4909-4919.
- [20] Price-Schiavi SA, Jepson S, Li P, et al. Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance [J]. *Int J Cancer*, 2002, 99(6): 783-791.
- [21] Nagy P, Friedlander E, Tanner M, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(2): 473-482.
- [22] Christianson TA, Doherty JK, Lin YJ, et al. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(22): 5123-5129.

- [23] Ali SM, Esteva FJ, Fornier M, et al. Serum HER-2/neu change predicts clinical outcome to trastuzumab-based therapy [J] . Clin Oncol, 2006, 24(suppl 18): 500.
- [24] Jones HE, Goddard L, Gee JM et al. Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib [ZD1839; Iressa] in human breast and prostate cancer cells [J] . Endocr Relat Cancer, 11(4): 793-814.
- [25] Lu YH, Zi XL, Zhao YH, et al. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin) [J] . Natl Cancer Inst, 2001, 93(24): 1852-1857.
- [26] Kostler WJ, Hudelist G, Rabitsch W, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) expression does not predict for resistance to trastuzumab-based treatment in patients with Her-2/neu overexpressing metastatic breast cancer [J] . Cancer Res Clin Oncol, 2006, 132(1): 9-18.
- [27] Gu L, Waliany S, Kane SE. Darpp-32 and its truncated variant t-Darpp have antagonistic effects on breast cancer cell growth and Herceptin resistance [J] . PLoS One, 2009, 4(7): 6220.
- [28] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Menendez JA. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-Her-2 monoclonal antibody trastuzumab [J] . PLoS One, 2009, 4 (7): 6251.
- [29] Kang SH, Kang KW, Kim KH, et al. Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her-2 protein stability [J] . BMC Cancer, 2008, 8: 286.

(收稿日期: 2009-12-15 修回日期: 2010-02-08)