

# 曲妥珠单抗原发耐药与继发耐药的研究进展

100071 北京 军事医学科学院附属医院乳腺肿瘤科 边 莉 综述, 江泽飞<sup>1</sup> 审校

**【摘要】**“曲妥珠单抗耐药”概念于 2001 年基于细胞系和动物模型的实验研究被首次提出,此后众多研究从不同的角度探索曲妥珠单抗耐药的分子机制。目前若干曲妥珠单抗耐药机制的研究已经单独针对原发耐药或继发耐药机制进行,本文对其研究结果进行综述。原发耐药与继发耐药机制的差异提示我们,在曲妥珠单抗治疗中应该根据不同的临床耐药患者亚群给予相应的临床治疗策略。

**【关键词】** 曲妥珠单抗; 原发耐药; 继发耐药

中图分类号:R730.5 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2012)06-0564-04

## Advances in research on the primary resistance and acquired resistance of trastuzumab

BIAN Li, JIANG Ze-fei. Department of Breast Cancer, Affiliated Hospital, Military Medical Science Academy, Beijing, 100071, China

Corresponding author: JIANG Ze-fei, E-mail: jiangzefei@medmail.com.cn

**【Abstract】** The conception of trastuzumab resistance is firstly presented in 2001, which is based on the laboratory investigation of cell lines and animal model. After that, numerous studies investigate molecular mechanism of trastuzumab resistance from different angles. The results of several trastuzumab resistance mechanism researches which have directed at primary resistance or acquired resistance exclusively are reviewed here. The different mechanisms of primary resistance and acquired resistance of trastuzumab suggest that we should give different clinical therapy strategies to different subgroups of clinical resistance patients.

**【Key Words】** Trastuzumab; Primary resistance; Acquired resistance

在 HER-2 阳性乳腺癌的临床治疗中,曲妥珠单抗(赫赛汀)疗效显著,改善了患者生存。然而,曲妥珠单抗单药治疗 HER-2 阳性晚期乳腺癌有效率仅为 20%~30%<sup>[1]</sup>。尽管曲妥珠单抗联合化疗与单用化疗比较显示出生存获益,但曲妥珠单抗联合紫杉类药物治疗的有效率最高仅 60%,中位疾病进展时间(TTP)最长为 10.6 个月<sup>[2-3]</sup>,提示仍有 40% 患者初始治疗无效以及初始治疗有效的患者也在应用一段时间后出现疾病进展,这些现象激发了研究者深入探索曲妥珠单抗的体内作用以及耐药机制,争取进一步提高药物疗效,延长患者生存。

## 1 曲妥珠单抗耐药机制的主要研究

2001 年 Albanell 等<sup>[4]</sup>首次提出“曲妥珠单抗耐药”概念,表明 IGF-IR 信号通路抑制 p27<sup>Kip1</sup>,导致曲妥珠单抗对肿瘤生长抑制作用减弱,参与形成曲妥珠单抗耐药。此后,关于曲妥珠单抗耐药机制的研究很多,涉及的主要结果具体如下:(1) PI3K/Akt 信号通路过度活化,主要因素包括肿瘤抑制因子 PTEN 表达缺失或 PI3K 突变表达增高<sup>[5-6]</sup>,以及 HER-2 空

间结构改变导致曲妥珠单抗与 HER-2 结合受阻,包括 p95 HER-2 表达增高或粘蛋白 4(MUC4)位阻<sup>[7-8]</sup>。(2) 细胞周期中增殖启动。Akt 信号通路活化,增强 p27 磷酸化,导致其从细胞核易位至细胞质,从而阻断其与 CDK2/cyclin E1 的相互作用,造成 CDK2/cyclin E1 释放,诱导细胞周期中增殖启动。2011 年 Scaltriti 等<sup>[9]</sup>通过全基因组分析的研究方法发现曲妥珠单抗耐药细胞中 cyclin E 基因扩增,临床检测 cyclin E 基因扩增患者与无扩增患者相比,曲妥珠单抗治疗获益率低。通过基因敲除或应用 CDK2 抑制剂抑制耐药细胞克隆 cyclin E 活性,导致细胞增殖显著降低,细胞凋亡增强,说明曲妥珠单抗耐药形成过程中 cyclin E 过表达导致 CDK2 活化,在 HER-2 和 cyclin E 过表达乳腺癌中应用 CDK2 抑制剂可能是一个有效策略。(3) 免疫机制改变,主要包括:① 免疫细胞 Fcγ 受体的多态性影响曲妥珠单抗 Fc 区域与之结合<sup>[10]</sup>。② NK 细胞的杀伤抑制受体(KIR)表达增强,抑制了 NK 活性<sup>[11]</sup>。③ 肿瘤细胞释放的细胞因子发挥免疫抑制作用<sup>[12]</sup>。④ 肿瘤表达抗凋亡蛋白 Bcl-2 家族从而对抗细胞毒淋巴细胞或 NK 细胞介导的凋亡<sup>[13]</sup>。(4) 乳腺癌干细胞

1 通讯作者, E-mail: jiangzefei@medmail.com.cn

导致耐药。肿瘤干细胞被认为是造成肿瘤复发的原因之一。研究表明乳腺癌干细胞的某些改变,如 PTEN 缺失、PI3K 突变、NF- $\kappa$ B 通路活化以及 Notch 或 Wnt 信号通路的作用造成曲妥珠单抗治疗敏感性降低<sup>[14]</sup>。

此外,2008 年 Shattuck 等<sup>[15]</sup>研究发现部分 HER-2 过表达的乳腺癌细胞表达肝细胞生长因子受体 Met,并且在曲妥珠单抗治疗后迅速上调 Met 受体表达,Met 受体活化后通过抑制 p27 功能,导致曲妥珠单抗治疗无效。Met 受体活化遏制了乳腺癌细胞对曲妥珠单抗治疗的原发敏感性,促进耐药形成,提示 HER-2 阳性患者某个亚群可能从联合抑制 HER-2 和 Met 治疗中获益。2010 年 Huang 等<sup>[16]</sup>发现曲妥珠单抗耐药细胞中出现 IGF-IR 与 HER-2 或 HER-3 的异源二聚体,同时亦存在 HER-2 与 HER-3 异源二聚体以及这 3 个受体形成的异源三聚体复合物,导致下游信号通路活化增强。反之,通过短发夹 RNA 方法敲除 HER-3 或 IGF-IR 基因表达后,p27<sup>kip1</sup>表达上调,下游信号通路活性下降,恢复耐药细胞对曲妥珠单抗的敏感性。因此,联合抑制 HER-3、HER-2 和 IGF-1R 可能成为克服曲妥珠单抗耐药的治疗策略。

## 2 曲妥珠单抗原发与继发耐药的临床定义

回顾既往文献,曲妥珠单抗原发与继发耐药的概念主要来自于细胞系或动物模型的研究结果,而在临床治疗中并无统一、明确的定义。2011 年 Wong 等<sup>[17]</sup>提出曲妥珠单抗耐药的临床定义为:在复发转移性乳腺癌中一线曲妥珠单抗治疗 8~12 周,或治疗后 3 个月内疾病进展以及辅助曲妥珠单抗治疗过程中,或治疗结束后 12 个月内,出现复发。我们对本院 HER-2 阳性复发转移性乳腺癌患者接受曲妥珠单抗治疗的临床数据资料进行总结分析<sup>[18]</sup>,在此基础上从临床角度分别定义如下:原发耐药定义为患者接受曲妥珠单抗初始治疗( $\leq 12$  周)出现疾病进展;继发耐药定义为患者接受曲妥珠单抗初始治疗疾病得到控制(CR、PR、SD),在治疗过程中( $> 12$  周)出现疾病进展。

## 3 曲妥珠单抗原发耐药的分子机制研究

新近,若干曲妥珠单抗耐药机制研究已经单独针对原发耐药或继发耐药机制进行。2009 年 Narayan 等<sup>[19]</sup>报道对曲妥珠单抗不敏感的 5 种 HER-2 阳性乳腺癌细胞系 MDA-MB-361、MDA-MB-453、T47D、UACC812 以及 UACC893 作为原发耐药的细胞模型,在含有 100  $\mu$ g/ml 曲妥珠单抗的培养基中培养 12 周后发现原发耐药细胞中 3 种表皮生长因子受体(EGFR)表达增高,5 种 HER-3 表达均增高,表明曲妥珠单抗原发耐药并不等同于曲妥珠单抗无作用,原发耐药细胞继续暴露于曲妥珠单抗将诱发 HER 受体酪氨酸激酶表达重排。EGFR 表达增高的 3 种耐药细胞中的 2 种表现出对 EGFR 抑制剂吉非替尼或西妥昔单抗的原发敏感性,表明曲妥珠单抗原发耐药乳腺癌细胞长期暴露于曲妥珠单抗将诱发 HER 受体重排,随之发生 HER 受体轴功能改变,而且暴露出新的治

疗靶点如 EGFR。从另一方面理解,在曲妥珠单抗敏感的 HER-2 阳性乳腺癌细胞系中 HER-2 功能类似于癌基因,而曲妥珠单抗原发耐药细胞 HER-2 表型可能与其他基因突变共分离,如果能够识别这种突变模式,可以预测曲妥珠单抗治疗后哪些患者对 HER 靶向治疗敏感。上述研究提示部分 HER-2 阳性患者其疾病呈现原发非 HER-2 依赖性,这可能是曲妥珠单抗治疗原发耐药发生的主要机制。

## 4 曲妥珠单抗继发耐药的分子机制研究

关于曲妥珠单抗继发耐药机制有一些研究结果,其中重要的一项是 2007 年 Ritter 等<sup>[20]</sup>报道的,他们将 BT-474 乳腺癌细胞接种裸鼠形成肿瘤,经曲妥珠单抗治疗后肿瘤消失,之后持续给予曲妥珠单抗治疗,直至肿瘤复发后成为继发耐药细胞,这些耐药细胞保持 HER-2 基因过表达以及曲妥珠单抗结合位点。耐药细胞中磷酸化 EGFR 和 EGFR/HER-2 异二聚体表达水平增高,并且过表达 EGFR、TGF- $\alpha$ 、肝素结合的表皮生长因子(heparin-binding EGF)以及神经生长因子 RNA(herregulin RNA),表明 EGFR 介导的 HER-2 活化增强。因此,研究者推测该过程中 HER-2 仍是 EGFR 信号通路的放大器,因此直接抑制 HER-2 仍然有效。进一步研究表明,耐药细胞 HER-2 磷酸化可以被 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂厄洛替尼和吉非替尼抑制,吉非替尼能够抑制耐药细胞 p85 与磷酸化 HER-3 结合,厄洛替尼能够体内抑制第 5 代耐药细胞异体接种形成的肿瘤,吉非替尼、厄洛替尼以及 EGFR/HER-2 抑制剂拉帕替尼均能够诱导耐药细胞凋亡。上述结果表明:(1) 耐药细胞仍然依赖 HER 受体作用通路;(2) 配体介导的 HER 受体活化、扩增可能是曲妥珠单抗继发耐药形成机制;(3) 联合抑制 EGFR 和 HER-2 对于治疗 HER-2 过表达的乳腺癌或延迟继发耐药出现可能具有协同作用。

2010 年发表的另一项研究结果也认为曲妥珠单抗继发耐药与 HER 配体导致的信号通路活化相关。Gijzen 等<sup>[21]</sup>评估了曲妥珠单抗对多种信号通路的作用,探索其在不同的 HER-2 阳性乳腺癌细胞系以及 BT474 接种动物肿瘤模型中发生继发耐药的机制。结果显示,尽管曲妥珠单抗下调 HER-2 受体表达,但并不降低 HER-2 磷酸化水平;EGFR、HER-3 和 HER-4 通过与 HER-2 形成二聚体而活化以维持 HER-2 磷酸化水平,EGFR、HER-3 和 HER-4 的活化由 HER 配体(包括神经生长因子和 B 细胞生长因子)释放引发,HER 配体释放由 ADAM 蛋白酶(ADAM17/TACE)介导。进一步发现,曲妥珠单抗治疗介导的 PKB 磷酸化水平降低导致 HER 配体与 ADAM 蛋白酶之间的反馈通路活化,同时还发现曲妥珠单抗导致这个反馈通路激活 HER 受体并维持 HER-2 磷酸化。研究证实,曲妥珠单抗治疗后 ADAM 蛋白酶与 HER 配体之间的反馈通路上调,导致曲妥珠单抗单药治疗疗效低,这可能是曲妥珠单抗继发耐药机制的新发现。因此该研究者提出,曲妥珠单抗联合另外一种 HER 抑制剂对肿瘤抑制作用可能比单独使用曲妥珠单抗更显著。

上述两项研究提示,部分 HER-2 阳性患者在曲妥珠单抗治疗过程中由 HER-2 依赖性向不完全依赖性转变,可能参与了曲妥珠单抗继发耐药形成。此外,下述几项研究也分别从不同角度对曲妥珠单抗继发耐药机制进行揭示。

自体吞噬 (Autophagy) 是一种细胞保护机制,在代谢性应激和缺氧条件下促进肿瘤细胞生存。2009 年 Vazquez-Martin 等<sup>[22]</sup>评估了曲妥珠单抗继发耐药乳腺癌细胞的自体吞噬作用,首先应用荧光显微镜发现曲妥珠单抗耐药 SKBR3 细胞中自体吞噬标记物 LC3 较敏感细胞显著增高。免疫印迹方法证实耐药细胞中 LC3 脂质产物累积至高水平,并伴随着 p62/sequestosome-1 蛋白表达降低。反之,通过 siRNA 方法敲除 LC3 基因表达导致耐药细胞增殖能力下降,对曲妥珠单抗敏感性增加。表明 HER-2 过表达乳腺癌细胞长期暴露于曲妥珠单抗后出现自体吞噬活性上调,从而有效保护乳腺癌细胞逃避曲妥珠单抗的生长抑制作用,形成曲妥珠单抗耐药。因此,抑制自体吞噬形成和功能可能成为减少曲妥珠单抗耐药出现的新途径。

t-Darpp 是磷酸酶抑制子 Darpp-32 截断后的一种形式,其过度表达使肿瘤细胞抗凋亡能力增强。2009 年 Gu 等<sup>[23]</sup>发现曲妥珠单抗耐药细胞中 Darpp-32 表达并没有增强,只是 t-Darpp 过度表达。反之,将 t-Darpp 和 Darpp-32 基因转入 HER-2 阳性的 SKBR3 细胞中,发现转染 t-Darpp 基因的细胞获得耐药性,而与 Darpp-32 共转染能够抑制 t-Darpp 介导的耐药性。2010 年 Hamel 等<sup>[24]</sup>对 HER-2 阳性曲妥珠单抗继发耐药乳腺癌细胞系 BT474 亚克隆进行基因表达检测,发现 PPP1R1B 基因过表达,编码 Darpp-32,而 Western blotting 检测仪显示 Darpp-32 蛋白截断亚型 t-Darpp 过表达。基因沉默方法证实 t-Darpp 过表达的确与曲妥珠单抗耐药相关,并且,在 BT-474 非耐药细胞中转染 t-Darpp 形成曲妥珠单抗耐药。进一步研究发现 t-Darpp 过表达与 Akt 活化相关,t-Darpp 中的 T75 残基是造成 Akt 活化和曲妥珠单抗继发耐药形成的原因。

尽管上述研究均试图从某一个角度对曲妥珠单抗原发耐药或继发耐药的机制进行揭示,然而其发生机制绝非来自于单一因素,可能是多因素复合的结果,需要我们进一步探索。目前在曲妥珠单抗治疗中,我们应该根据不同的临床耐药患者亚群给予不同临床治疗策略<sup>[25]</sup>,对于曲妥珠单抗初始治疗无效的患者应早期给予更换药物治疗,可以换用 EGFR/HER-2 双靶点酪氨酸激酶抑制剂拉帕替尼,并可以按照文献研究结果试用抗 EGFR 单抗西妥昔单抗或 EGFR 抑制剂厄洛替尼/吉非替尼<sup>[20]</sup>。对于在治疗过程中出现疾病进展患者可以换用其他化疗药物继续联合曲妥珠单抗,使患者最大限度从曲妥珠单抗治疗中获益;或者在曲妥珠单抗治疗的基础上联合拉帕替尼进行双重靶向治疗。

## 参考文献

- [1] Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(3):719-726.
- [2] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2[J]. N Eng J Med, 2001, 344(11):783-792.
- [3] Marty M, Coguetti F, Maraninchi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(19):4265-4274.
- [4] Albanell J, Baselga J. Unraveling resistance to trastuzumab (Herceptin): insulin-like growth factor-I receptor, a new suspect[J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(24):1830-1832.
- [5] Esteva FJ, Guo H, Zhang S, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer[J]. Am J Pathol, 2010, 177(4):1647-1656.
- [6] Razis E, Bobos M, Kotoula V, et al. Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 128(2):447-456.
- [7] Arribas J, Baselga J, Pedersen K, et al. p95HER2 and breast cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(5):1515-1519.
- [8] Mukohara T. Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer[J]. Cancer Sci, 2011, 102(1):1-8.
- [9] Scaltriti M, Eichhorn PJ, Cortés J, et al. Cyclin E amplification/over expression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(9):3761-3766.
- [10] Musolino A, Naldi N, Bortesi B, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(11):1789-1796.
- [11] Stein MN, Shin J, Gudzwat O, et al. Antibody-dependent cell cytotoxicity to breast cancer targets despite inhibitory KIR signaling[J]. Anticancer Res, 2006, 26(3):1759-1763.
- [12] Trotta R, Col JD, Yu J, et al. TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells[J]. J Immunol, 2008, 181(6):3784-3792.
- [13] Kawaguchi Y, Kono K, Mizukami Y, et al. Mechanisms of escape from trastuzumab-mediated ADCC in esophageal squamous cell carcinoma: Relation to susceptibility to perforin-granzyme[J]. Anticancer Res, 2009, 29(6):2137-2146.
- [14] Hill R, Wu H. PTEN, stem cells, and cancer stem cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(18):11755-11759.
- [15] Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL 3rd, et al. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast

- cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008,68(5):1471-1477.
- [16] Huang X, Gao L, Wang S, et al. Heterotrimerization of the growth factor receptors erbB2, erbB3, and insulin-like growth factor-I receptor in breast cancer cells resistant to herceptin[J]. *Cancer Res*, 2010,70(3):1204-1214.
- [17] Wong H, Leung R, Kwong A, et al. Integrating molecular mechanisms and clinical evidence in the management of trastuzumab resistant or refractory HER-2 + metastatic breast cancer[J]. *Oncologist*, 2011,16(11):1535-1546.
- [18] 江泽飞,边莉. 乳腺癌表皮生长因子受体-2 分子靶向治疗临床应用策略[J/OL]. *中华普外科手术学杂志(电子版)*, 2011,5(4):10-14.
- [19] Narayan M, Wilken JA, Harris LN, et al. Trastuzumab-induced HER reprogramming in "resistant" breast carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2009,69(6):2191-2194.
- [20] 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.
- [21] Gijzen M, King P, Perera T, et al. Upregulation of ADAM proteases and HER ligands through a feedback loop mediates acquired resistance to trastuzumab in HER2-amplified breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2010,12(Suppl 1):2.
- [22] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreros C, Menendez JA. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab[J]. *PLoS One*, 2009,4(7):6251.
- [23] Gu L, Waliany S, Kane SE, et al. 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.
- [24] Hamel S, Bouchard A, Ferrario C, et al. Both t-Darpp and DARPP-32 can cause resistance to trastuzumab in breast cancer cells and are frequently expressed in primary breast cancers[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010,120(1):47-57.
- [25] 江泽飞,邵志敏,徐兵河. 人表皮生长因子受体 2 阳性乳腺癌临床诊疗专家共识[J]. *中华肿瘤杂志*, 2010,32(2):158-160.

收稿日期:2012-01-14; 修回日期:2012-03-07