

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.001

· 专家论坛 ·

曲妥珠单抗的耐药机制及其逆转策略

刘丹^{1,3}, 刘彦君^{2Δ}, 施明^{1,3} (1. 军事医学科学院 基础医学研究所, 北京 100850; 2. 河南大学 河南省抗体药物工程实验室, 河南 开封 475004; 3. 徐州医科大学 江苏省肿瘤生物治疗研究所, 江苏 徐州 221002)



刘丹 中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所免疫学博士后, 徐州医科大学副教授。主要研究方向为肿瘤免疫学和肿瘤病理生理学。近年来围绕肿瘤靶向治疗耐药的分子机制开展了一系列研究工作, 已发表 SCI 收录论文 13 篇, 其中以第一或共同第一作者身份发表论文 9 篇, 单篇影响因子最高为 8.56 分, 作为其他作者身份发表论文 4 篇, 影响因子合计 79.21 分。参编国外学术专著 1 部。2012 年获得“河北省优秀硕士学位论文”, 2015 年获得中国病理生理学会第十届全国代表大会暨学术会议青年优秀论文二等奖。作为负责人主持国家自然科学基金青年基金 1 项、中国博士后科学基金特别资助课题 1 项, 作为主要成员参与国家自然科学基金面上项目 2 项、北京市自然科学基金面上项目 2 项、国家 863 计划项目分题 1 项、国家重大新药创制项目分题 1 项。E-mail: liudan_bd@sina.com



施明 病理生理学副研究员、硕士研究生导师, 就职于中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所, 主要研究方向为肿瘤免疫学。以第一或通信作者身份发表 SCI 收录论文 19 篇, 影响因子合计 106 分, 其中单篇影响因子 >5 分的论文 12 篇。参编国外学术专著 2 部, 参编译著 1 部。获得国家发明专利 2 项。曾获军队科技进步一等奖(2014 年, 署名第二)、军队科技进步三等奖(2006 年, 署名第一)、中国抗癌协会科技奖三等奖(2014 年, 署名第二), 获军事医学科学院优秀青年科技工作者的荣誉称号等, 并荣立个人三等功。先后承担国家自然科学基金面上项目 2 项和青年项目 1 项, 北京市自然科学基金面上项目 3 项, 国家 863 计划项目分题 1 项, 国家重大新药创制项目分题 1 项等多项课题。兼任中国病理生理学会免疫学专业委员会委员, 北京市乳腺病防治学会转化医学专业委员会委员, *BMC Cancer* 杂志审稿人。E-mail: sm200@sohu.com

[摘要] 曲妥珠单抗(trastuzumab; 商品名为 Herceptin, 赫赛汀)是靶向人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)的人源化单克隆抗体, 与化疗药物联用可显著提高患者的无进展生存期。然而, 曲妥珠单抗的原发性和获得性耐药严重制约了其临床疗效及应用。PI3K/AKT/mTOR 信号通路的异常活化、HER 家族成员间的相互作用、药物压力下代偿性生存信号的激活、肿瘤干细胞表型形成等均可能成为曲妥珠单抗耐药的重要机制。随着曲妥珠单抗耐药机制研究的不断深入, 克服耐药的治疗手段也越来越丰富。有研究表明, 曲妥珠单抗与其他靶向 HER2 胞外域的单克隆抗体或靶向其他 HER 家族成员的抗体类药物联用可增强曲妥珠单抗的疗效。应用 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的小分子抑制剂或耐药相关促生存信号通路的特异性抑制剂可有效逆转耐药发生, 延长患者的疾病无进展生存期。深入研究曲妥珠单抗耐药的机制, 不断探索逆转耐药的治疗策略, 可为乳腺癌个性化治疗方案的建立提供依据。本文将对曲妥珠单抗耐药机制及克服耐药的研究进展做一介绍。

[关键词] 曲妥珠单抗; 耐药; 乳腺癌; 人表皮生长因子受体 2; 磷脂酰肌醇-3 激酶

[中图分类号] R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2016)04-0453-15

[基金项目] 国家重大新药创制资助项目(No. 2013ZX09102056); 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(No. 2014AA020604); 国家自然科学基金资助项目(No. 31370825, 81272232, 81402562, 81572845, 81401311, 31500702); 国家博士后基金资助项目(No. 2015T81095); 北京市自然科学基金资助项目(No. 7122124, 7132163)。Project supported by the National Key Technologies R&D Program for New Drugs (No. 2013ZX09102056), the National High-Tech R&D Program of China (863 Program) (No. 2014AA020604), the National Natural Science Foundation of China (No. 31370825, 81272232, 81402562, 81572845, 81401311, 31500702), the National Postdoctoral Science Foundation of China (No. 2015T81095), and the Beijing Natural Science Foundation of China (No. 7122124, 7132163)

[作者简介] 刘彦君(1990 -), 男, 山西省忻州市人, 硕士生, 主要从事脂肪细胞调控乳腺癌免疫逃逸的分子机制研究, E-mail: 15210417498@163.com。Δ为共同第一作者

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.r.20160711.1014.002.html>

Mechanism of trastuzumab resistance and strategies to overcome the resistance

LIU Dan^{1,3}, LIU Yanjun^{2Δ}, SHI Ming^{1,3}(1. Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. Antibody Drug Engineering Laboratory of Henan Province, Henan University, Kaifeng 475004, Henan, China; 3. Institute of Cancer Biotherapy of Jiangsu Province, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, Jiangsu, China)

[**Abstract**] Trastuzumab is a humanized monoclonal antibody targeting human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), which combined with chemotherapy drugs could significantly improve progression-free survival of patients. However, primary and acquired resistances of trastuzumab severely limit its curative effect and clinical application. Aberrant activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, interaction of HER family members, activation of compensatory survival signals under drug pressure and formation of phenotypes of cancer stem cells could be important mechanisms of the trastuzumab resistance. With deepening of research on mechanisms of trastuzumab resistance, treatments for overcoming trastuzumab resistance is also increasing. Some studies have shown that combination of trastuzumab with another monoclonal antibodies targeting HER2 extracellular domain or other HER family members could increase curative effect of trastuzumab. Application of small-molecule inhibitor of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway or specific inhibitors of pro-survival signaling pathway that related to trastuzumab resistance could effectively reverse the resistance and prolong progression-free survival of patients. In - depth researches on mechanisms of trastuzumab resistance and constant exploration on treatment strategies to reverse the resistance could provide the basis for establishment of individualized treatment plan of breast carcinoma.

[**Key words**] trastuzumab; drug resistance; breast carcinoma; human epidermal growth factor receptor 2(HER2); phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(4): 453-467. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.001]

人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)是一个具有酪氨酸激酶活性的穿膜受体,属 EGFR 家族。该家族成员(EGFR/HER1、HER2、HER3、HER4)介导 PI3K/AKT 和 Ras/Raf/MEK/MAPK 等信号通路,参与调控细胞增殖、存活及分化。*HER2* 基因扩增及蛋白过表达发生于多种腺上皮来源的恶性肿瘤(包括乳腺癌和胃癌),过表达的 *HER2* 分子可自发形成同源二聚体,或在配体作用下,作为共受体与该家族其他成员(EGFR、HER3 及 HER4)发生异二聚化,触发受体胞内域酪氨酸激酶自身磷酸化及交互磷酸化,导致众多下游分子级联反应,产生增强的增殖信号。*HER2* 过表达与肿瘤进展和不良预后密切相关^[1]。

曲妥珠单抗(trastuzumab; 商品名为 Herceptin, 赫赛汀)可特异性地靶向 *HER2* 过表达的肿瘤细胞。1998 年,美国 FDA 批准曲妥珠单抗用于转移性乳腺癌的临床治疗。目前,该药在化疗后单独应用或与化疗药物联用已成为早期及转移性乳腺癌临床治疗的一线用药方案。2010 年,欧盟和美国又相继批准曲妥珠单抗用于 *HER2* 阳性晚期转移性胃癌

的临床治疗。曲妥珠单抗的抗肿瘤机制目前尚未完全阐明,已知的效应包括:与 *HER2* 受体胞外域结合,触发抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC);抑制配体非依赖的 *HER2* 受体二聚化及其介导的下游信号通路;抑制 *HER2* 受体裂解形成缺失胞外域的组成性活化形式;诱导细胞周期阻滞;抑制 VEGF 表达,从而抑制肿瘤细胞增殖及肿瘤血管新生。其他可能的作用机制亦已有报道,包括诱导受体内化、促进受体降解,清除肿瘤特异性 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞等,但临床前与转化医学研究数据尚存在争议。临床研究结果表明,曲妥珠单抗与化疗联用可延长晚期转移性乳腺癌和晚期胃癌患者的总生存期及无进展生存期。然而,在乳腺癌治疗中,曲妥珠单抗单独应用的反应率较低(12% ~ 25%),多数患者(66% ~ 88%)在用药 1 年内即产生耐药,单独应用时病情进展的中位时间约 4.9 个月,与化疗药物联用时病情进展的中位时间约 7.4 个月,提示患者对曲妥珠单抗存在原发性耐药或继发性耐药^[2-5]。曲妥珠单抗在胃癌中的耐药问题更为严重,曲妥珠单

抗耐药机制的研究现已成为基础和临床研究的热点问题^[6],故笔者阐述曲妥珠单抗耐药机制,同时介绍逆转曲妥珠单抗耐药策略的研究进展。

1 曲妥珠单抗的耐药机制

1.1 HER2 及 EGFR 家族成员

1.1.1 HER2 表达、定位、切割与曲妥珠单抗抗性

HER2 过表达是曲妥珠单抗临床应用的前提,HER2 表达水平与乳腺癌患者曲妥珠单抗治疗获益率呈正相关。目前,临床上主要应用免疫组织化学法检测 HER2 蛋白的表达水平,应用原位杂交法检测 *HER2* 基因扩增。近年来有研究^[7]发现,在部分 HER2 阳性乳腺癌组织中存在 HER2 蛋白表达和基因扩增的区域异质性;与 HER2 呈均一性表达的患者相比,HER2 异质性表达的患者预后较差。对 112 例转移性乳腺癌曲妥珠单抗反应性的研究^[8]结果证实,乳腺癌组织中 *HER2* 基因扩增的异质性与曲妥珠单抗客观反应率低下密切相关。在 HER2 阳性(免疫组化 III)的进展性胃癌组织中,亦存在 *HER2* 基因扩增的异质性,且当原发肿瘤中 *HER2* 基因呈异质性扩增(*HER2* 基因扩增水平低)时,转移灶中亦可能具有相似的基因扩增特征,提示原发及转移肿瘤均可能对曲妥珠单抗产生抗性^[9]。动物实验研究^[10]结果亦表明,肿瘤细胞的异质性可影响曲妥珠单抗的疗效。这些研究结果提示,在进行免疫组化分析时,肿瘤组织取材应尽可能足够大,以观察是否存在 HER2 表达的异质性。对 HER2 异质性表达的患者,可能需要联合敏感的化疗药物或针对其他靶分子的治疗。

HER2 是 I 型穿膜受体,通常定位在细胞膜表面发挥其生物学功能。然而,在部分乳腺癌组织标本中,可观察到 HER2 呈核染色阳性。以往临床上曾将 HER2 核染色判定为假阳性。但是,大量的研究表明,HER2 核定位与患者的不良预后密切相关。Hung 研究小组^[11]报道,*HER2* 发生核转位后可作为转录因子,调控肺转移相关基因 *COX2* 转录。最近的研究^[12]证实,全长 *HER2* 可在细胞核内与 HER3 及信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 相互作用,形成复合物并结合于细胞周期蛋白 D1 启动子,促进其转录(图 1)。神经调节蛋白 (heregulin) $\beta 1$ (HER3 和 HER4 的配体)则可诱导 HER2/HER3/STAT3 转录复合物与细胞周期蛋白 D1 启动子相互作用。曲妥珠单抗只能与定位于细胞膜表面的 HER2 结合,不具有抑制核内 HER2/HER3/STAT3 复合物形成的作用,阻断 HER2 入核可抑制曲妥珠

单抗抗性的乳腺癌细胞系 JIMT-1 增殖。因此,HER2 入核与乳腺癌细胞的曲妥珠单抗抗性密切相关,HER2 的亚细胞定位应作为预判断患者对曲妥珠单抗反应性的重要指标之一。

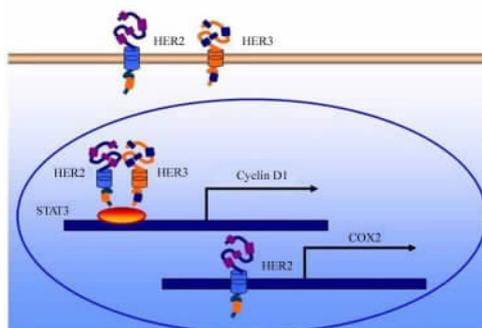


图 1 HER2 核转位与曲妥珠单抗的抗性

HER2 可入核,作为转录因子调控基因转录;全长 HER2 可调控 *COX2* 转录,亦可与 HER3 及 STAT3 形成复合物,促进细胞周期蛋白 D1 转录

HER2 是分子量为 185 kDa 的跨膜蛋白。p95HER2 是缺失 N 末端的 HER2 C 末端片段,是 HER2 裂解或 HER2 mRNA 选择性起始翻译的产物,约 30% HER2 阳性的乳腺癌表达 p95HER2^[13]。Scaltriti 等^[14]报道,表达 p95HER2 的乳腺癌患者对曲妥珠单抗的反应率低,可能是因为曲妥珠单抗识别的 HER2 抗原表位位于 N 末端,而 p95HER2 不能被曲妥珠单抗识别与结合,提示肿瘤组织中 p95HER2 水平升高可能预示患者对曲妥珠单抗治疗不敏感。目前,已有针对 p95HER2 的抗体及检测试剂盒 (VeraTag),p95HER2 已被用作判断曲妥珠单抗耐药的标志物。然而,2011 年 GeparQuattro 临床试验的结果^[15]表明,p95HER2 的表达水平与曲妥珠单抗新辅助治疗的反应性呈正相关。对这两项相互矛盾的报道进行仔细分析不难发现,Scaltriti 等^[14]的研究中,56% 的乳腺癌患者仅给予曲妥珠单抗单药治疗,而在 GeparQuattro 临床试验中,所有患者均接受了曲妥珠单抗 + 化疗,提示化疗可能提高 p95HER2 阳性乳腺癌对曲妥珠单抗治疗的敏感性。最近的一项研究^[16-17]利用表达 p95HER2 的移植瘤模型证明,用多柔比星 (doxorubicin) 处理可增加乳腺癌细胞表面 HER2 分子的水平,使移植瘤恢复了对曲妥珠单抗的敏感性。因此,合理的药物配伍将可能使 p95HER2 阳性的乳腺癌患者从曲妥珠单抗治疗中获益。

早期的研究报道,HER2 分子裂解多发生于转

移性和进展性乳腺癌患者, 复发、转移乳腺癌中超过一半的患者在其循环中游离的 HER2 胞外域水平增高而存活期短。近年的研究(包括本课题组的研究)发现, HER2 分子经解聚素金属蛋白酶结构域蛋白 10 (ADAM10) 水解, 可释出可溶性 HER2 胞外域, 同时伴有 p95HER2 磷酸化。理论上, 游离的 HER2 胞外域可能与穿膜 HER2 受体竞争结合曲妥珠单抗, 临床上将血清中 HER2 胞外域水平降低作为患者对曲妥珠单抗治疗敏感的指标。ADAM10 是诱导 HER2 切割的重要蛋白酶。研究^[18]证实, FGFR2 信号通路活化可通过调控 ADAM10 活性促进 HER2 分子被切割, 从而产生游离的胞外段及残存的 p95HER2, 导致乳腺癌细胞对曲妥珠单抗产生抗性(图 2)。此外, Feldinger 等^[19-20]观察到, 抑制 ADAM10 表达及其活性可增强乳腺癌细胞对曲妥珠单抗的敏感性。值得注意的是, 曲妥珠单抗治疗可导致乳腺癌细胞中 ADAM10 表达水平升高, 高水平的 ADAM10 与曲妥珠单抗的疗效呈负相关, 而与乳腺癌患者无复发生存期缩短呈正相关, 提示肿瘤细胞中存在活跃的负反馈机制, 以维持其在药物的压力下存活。

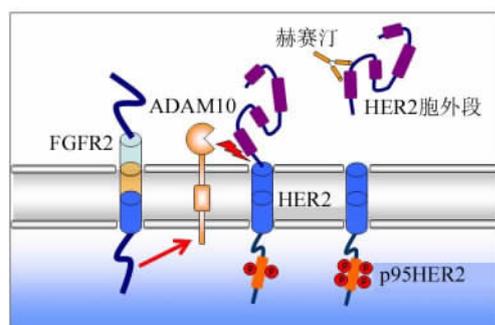


图 2 HER2 裂解与曲妥珠单抗的抗性

FGFR2 信号通路活化, 可调控解聚素金属蛋白酶结构域蛋白 10 (ADAM10) 的活性, 诱导 HER2 分子被切割, 释出可溶性 HER2 胞外段, 产生缺失 N 端的 HER2 胞内段 (p95HER2), 同时伴有 p95HER2 磷酸化

此外, 缺失第 16 外显子的 HER2 剪接突变体 (HER2 Δ 16) 亦可能是 p95HER2 分子的来源^[21]。HER2 Δ 16 在近一半的 HER2 阳性乳腺癌中高表达, 且与曲妥珠单抗耐药相关。基因表达谱分析结果显示, 在过表达 HER2 Δ 16 的 MCF-7 细胞中, miR-7 的表达下调, 后者可抑制 EGFR 表达并阻断 Src 信号通路活化^[22]。体外实验研究^[23-24]显示, HER2 Δ 16 可抑制曲妥珠单抗与 HER2 阳性的肿瘤细胞结合, 导致曲妥珠单抗耐药。然而, 亦有人通过

转基因小鼠研究发现 HER2 Δ 16 阳性乳腺癌对曲妥珠单抗治疗有反应性。临床数据分析^[25]的结果表明, HER2 Δ 16 阳性乳腺癌患者仍可从曲妥珠单抗 + 化疗的治疗中显著获益, 其机制尚不清楚。最近也有研究^[26]发现, HER2 基因 C 末端 898 ~ 906 和 897 ~ 902 位氨基酸残基突变形成的两个 HER2 基因的新亚型与 HER2 阳性胃癌细胞获得性曲妥珠单抗耐药发生相关。

虽然 HER2 分子的发现已有几十年的历史, 但对于 HER2 分子及其功能的认识仍有待拓展和深入。HER2 的亚细胞定位变化、HER2 的分子加工过程、HER2 突变体的形成及表达, 以及 HER2 在肿瘤中表达的异质性均可显著影响 HER2 阳性肿瘤细胞对曲妥珠单抗的反应性, 阐明相关的分子机制将有助于提高靶向 HER2 治疗的疗效。

1.1.2 EGFR 家族其他成员对曲妥珠单抗耐药的影响 在 HER2 过表达的肿瘤细胞中, HER2 与该家族其他成员相互作用, 形成异二聚体, 活化下游的 ERK 和 PI3K/AKT 通路。有研究^[27-28]发现, 经曲妥珠单抗处理后, 乳腺癌细胞中 EGFR 的表达水平显著升高, 其下游信号通路明显活化。在 HER2 阳性乳腺癌细胞中过表达 EGFR, 可诱导肿瘤细胞对曲妥珠单抗产生抗性^[29-30], 提示 EGFR 过表达及活化可能在曲妥珠单抗耐药过程中发挥重要作用。临床研究^[31]结果亦显示, EGFR 过表达与原发 HER2 阳性乳腺癌患者的不良预后及曲妥珠单抗反应性密切相关; 但在转移性 HER2 阳性乳腺癌中, EGFR 过表达与曲妥珠单抗反应性、无进展生存期和总生存期的相关性无统计学意义。

HER2/HER3 被认为是最具活性的异二聚体形式。有研究者^[32]采用生色原位邻近连接分析 (chromogenic in situ proximity ligation assay) 对 143 例接受曲妥珠单抗治疗的乳腺癌患者肿瘤组织中 HER2/HER3 异二聚体进行了分析, 发现高水平的 HER2/HER3 异二聚体及 P21 表达缺失的患者预后不良, 提出 HER2/HER3 异二聚体和 P21 的水平可预测乳腺癌对曲妥珠单抗治疗的反应性。另一项研究^[33]结果显示, 磷酸化 HER3 (p-HER3) 水平的上调与曲妥珠单抗获得性耐药的发生相关, 其机制尚不清楚, 提示 HER 家族异二聚体形成可能影响曲妥珠单抗的疗效。也有研究^[34]证实, Her3 信号异常活化, 激活 PI3K/AKT 信号通路可能是造成 Her2 阳性乳腺癌细胞对曲妥珠单抗产生抗性的主要原因。虽然曲妥珠单抗能阻断配体非依赖的组成性 HER2/HER3 相互作用, 降低 HER3 和 AKT 的磷酸化水平^[35], 但

在体内生长因子刺激下,曲妥珠单抗可能难以控制 HER2 家族成员间的相互作用。

已有研究^[36]报道,HER4 在乳腺癌获得性曲妥珠单抗耐药中似发挥某种作用,在获得性曲妥珠单抗耐药的乳腺癌细胞中,HER4 可被蛋白酶切割并入核;敲低 HER4 表达可增强乳腺癌细胞对曲妥珠单抗的敏感性,逆转耐药细胞对曲妥珠单抗的抗性。 γ 分泌酶抑制剂(可抑制 HER4 被切割及核定位)能增强乳腺癌细胞对曲妥珠单抗的反应性。用来那替尼(neratinib,一种 HER2/EGFR 抑制剂)阻断 HER4 的激酶活性,亦可获得类似的效应。然而,对乳腺癌细胞系 BT474 移植瘤模型及对乳腺癌组织标本的研究均发现,曲妥珠单抗治疗可使 HER4 核定位增加,且高水平 HER4 核定位与单用曲妥珠单抗的疗效呈负相关,而与 HER2 阳性乳腺癌患者的不良预后呈正相关^[37]。体外研究^[36]结果显示,在获得性曲妥珠单抗或拉帕替尼(lapatinib,小分子 EGFR/HER2 酪氨酸激酶抑制剂)耐药的乳腺癌细胞中敲低 HER4 表达,可诱发肿瘤细胞凋亡,这些结果提示,HER4 可能参与乳腺癌曲妥珠单抗耐药的过程,曲妥珠单抗治疗后 HER4 水平升高、分子裂解及核定位可能是乳腺癌细胞存活的一个潜在机制。最近有研究^[26]表明,在 HER2 阳性乳腺癌细胞中发现的 HER 家族成员介导曲妥珠单抗耐药机制,如:HER3、HER4 信号活化、支架蛋白 IQGAP1(参与调控 HER2 蛋白表达、磷酸化)的过表达,均可在获得性曲妥珠单抗耐药的胃癌细胞中得到印证。

HER 家族成员在共同或不同的配体作用下,发生自身磷酸化和交互磷酸化,其下游信号通路间的交互作用可能形成网络效应,不仅活跃地参与肿瘤发生和进展过程,而且可能在分子靶向药物的作用下,发生代偿性应答,导致药物抗性的产生。因此,深入探索药物压力下 EGFR 家族成员间互作的动态变化及其对肿瘤细胞存活的影响,将有助于揭示曲妥珠单抗耐药的分子机制及建立靶分子导向的肿瘤“精准治疗”的新策略。

1.2 PI3K/AKT/mTOR 信号通路

以往大量研究表明,PI3K/AKT/mTOR 信号通路异常活化是曲妥珠单抗耐药的一个重要机制。EGFR 家族成员酪氨酸激酶活化的信号激活 PI3K,催化质膜上 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇[phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate,PIP2]磷酸化形成 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)形式。PIP3 是肿瘤发生过程中重要的脂类第二信使,通过激活 AKT 及其他信号通路,抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤细胞增殖、

运动及血管生成。肿瘤细胞中磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)催化亚基 α (PIK3CA)基因突变及人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, PTEN)缺失均可导致 PI3K/AKT 信号通路激活。在名为“Long-HER2”的临床研究^[38]中发现,曲妥珠单抗治疗 1 年内复发的乳腺癌患者肿瘤中可携有 4~5 个 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关基因的突变,而曲妥珠单抗治疗 3 年内无进展患者肿瘤中最多仅含有 2 个相关基因的突变,提示 PI3K/AKT/mTOR 通路活化与曲妥珠单抗耐药相关。

1.2.1 PIK3CA 基因突变 PI3K 由 85 kD 的调节亚基和 110 kD 的催化亚基组成。PIK3CA 基因编码 PI3K 催化亚基 α ,该基因所定位的染色体 3q26 在肿瘤中扩增的频率较高,多种肿瘤中可见 PIK3CA 基因激活突变。PIK3CA 基因的突变在多个外显子中均可观察到,其中最常见的突变位于第 9 和 20 外显子,分别对应 PIK3CA 的螺旋和激酶结构域,约占 PIK3CA 突变的 80% 以上,突变后酶活性显著增强。

多项研究^[39-40]发现,约 25% 的乳腺癌存在 PIK3CA 激活突变,其中两种最常见的 PIK3CA 突变体(E545K 和 H1047R)比野生型 PI3K 活性更高,可在体外诱导强烈的曲妥珠单抗抗性。采用转基因小鼠乳腺癌模型的研究结果显示,HER2⁺/PIK3CA 突变体的动物自发肿瘤的潜伏期更短,体外培养中能更有效地形成乳腺球(mammospheres),并可导致肿瘤肺转移及曲妥珠单抗抗性,应用 PI3K 抑制剂可逆转曲妥珠单抗耐药^[41]。对 504 例曲妥珠单抗治疗的乳腺癌患者肿瘤组织的研究^[42]结果表明,21.4% 患者含 PIK3CA 突变,其病理完全缓解率(pCR)低。临床研究^[43]结果亦支持 PIK3CA 激活突变与靶向治疗药物敏感性的关系。然而,近期的几项研究对上述结果提出了质疑^[44-45],例如对 19 项研究的荟萃分析结果显示,在曲妥珠单抗治疗的患者中,野生型与突变型 PIK3CA 乳腺癌患者之间不存在客观反应率的差异,因而认为 PIK3CA 突变不能作为曲妥珠单抗反应性的预测指标。

1.2.2 PTEN 基因缺失 PTEN 基因编码 403 个氨基酸组成的蛋白,是 PIP3 的磷酸酶。与 PI3K 的功能相反,PTEN 可特异性地催化 PIP3 去磷酸化,降低 PIP3 的水平,负调控 PI3K 活性,抑制 AKT 活化及其调控的下游信号事件。研究证实,曲妥珠单抗可通过抑制 Src 降低 PTEN 的磷酸化水平,迅速增加 PTEN 的膜定位及磷酸酶活性;曲妥珠单抗亦可通

过抑制 Src 与 HER2 相互作用而激活 PTEN。曲妥珠单抗处理 HER2 扩增的乳腺癌细胞系后, PTEN 与 PI3K 的调节亚基形成的复合物水平升高, 而 AKT 磷酸化水平降低^[46]; 抑制 PTEN 表达, 可导致曲妥珠单抗抗性。另一项研究^[47]发现, 曲妥珠单抗耐药的乳腺癌细胞中 lncRNA GAS5 (长链非编码 RNA GAS5) 的表达被抑制, GAS5 可以竞争性结合 miR-21, 降低游离 miR-21 水平; 其表达下调可能导致游离 miR-21 水平上调, 进而抑制 PTEN 表达 (miR-21 的靶分子), 从而降低了 HER2 阳性乳腺癌细胞对曲妥珠单抗的反应性。临床研究^[48-49]发现, PTEN 缺失的乳腺癌患者对曲妥珠单抗的敏感性差, 因而, PTEN 缺失被认为是预测曲妥珠单抗抗性的标志物。后续的研究^[50-51]亦支持上述结论, 并提出应用 PI3K 抑制剂作为克服曲妥珠单抗抗性的策略。

然而, 最近的几项研究^[52-54]获得了不同的结论。一项含 1 802 例乳腺癌患者的临床研究结果提示, 曲妥珠单抗治疗的获益率不依赖于 PTEN 表达。2015 年, Stern 等报道了迄今为止规模最大的有关 PTEN 表达与乳腺癌患者预后相关性研究的结果。该研究荟萃了 2000—2004 年进行的两个乳腺癌临床试验 (患者分别为 3 298 和 3 222 例), 结果显示, PTEN 表达完全缺失与乳腺癌患者的不良预后密切相关, 但 PTEN 完全缺失的患者仍可从曲妥珠单抗治疗中获益^[53]。因此, PTEN 缺失患者仍可纳入曲妥珠单抗治疗的适应范围。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路异常活化在曲妥珠单抗耐药中的作用已得到大量研究的证实, 但单一分子标志 (PIK3CA 突变或 PTEN 缺失) 似乎难以准确判断曲妥珠单抗耐药的发生, 或许需要多分子标志物的组合对于预测曲妥珠单抗反应性更具实际意义。

1.3 神经递质信号

越来越多的证据表明, 神经系统的活动可影响肿瘤的发生、发展及转移。神经纤维广泛分布于肿瘤组织, 神经递质作用于肿瘤细胞表面的相应受体, 激活肿瘤细胞内与增殖、生存、迁移相关的信号通路, 从而调控肿瘤细胞的生物学行为。近年来的研究证实, 某些神经递质在乳腺癌和胃癌曲妥珠单抗耐药过程中发挥重要的作用。

1.3.1 儿茶酚胺与 β_2 肾上腺素能受体 (β_2 -adrenergic receptor, β_2 -AR) 正常体循环中去甲肾上腺素的水平为 1 nmol/L, 而在肿瘤微环境中, 儿茶酚胺的浓度可高达 10 μ mol/L。儿茶酚胺可与泛在表达

于不同类型细胞表面的 β -AR 结合, 触发其介导的信号级联反应, 导致 cAMP 合成、蛋白激酶磷酸化及转录因子激活。在肿瘤细胞中, β_2 -AR 是介导儿茶酚胺效应的主要受体^[55-56]。本课题组研究^[57-58]发现, 在乳腺癌组织中, β_2 -AR 常呈过表达, 且与 HER2 的表达具有良好的相关性。肾上腺素、去甲肾上腺素、异丙肾上腺素 (ISO) 及 β_2 -AR 激动剂沙美特罗可通过活化 β_2 -AR 信号通路, 诱导乳腺癌细胞 HER2 表达上调, 反向激活 HER2 及其介导的信号, 导致乳腺癌细胞的增殖活性增强; 而 HER2 过表达导致的 ERK 组成性激活, 则可促进乳腺癌细胞中儿茶酚胺合成的 4 种限速酶 (酪氨酸羟化酶、多巴胺- β -脱羧酶、芳香 L-氨基酸脱羧酶及苯乙醇胺-N-甲基转移酶) 表达, 导致乳腺癌细胞中肾上腺素自分泌释放。进一步研究证实, β_2 -AR 激动剂可诱导转录因子 STAT3 磷酸化。在 β_2 -AR 激动剂的刺激下, 活化的 STAT3 与 HER2 启动子区 STAT3 反应元件的结合活性明显增强, 从而促进 HER2 基因转录。同时, 儿茶酚胺刺激可抵消曲妥珠单抗对 HER2 表达及其介导的信号通路的抑制作用, 拮抗曲妥珠单抗的抗增殖效应。研究结果提示, β_2 -AR 及 HER2 可能在乳腺癌细胞中形成一种正反馈调控机制, 这种神经递质诱导的不同受体间的相互作用可能触发更强的促有丝分裂效应, 削弱曲妥珠单抗的抗肿瘤作用 (图 3)。

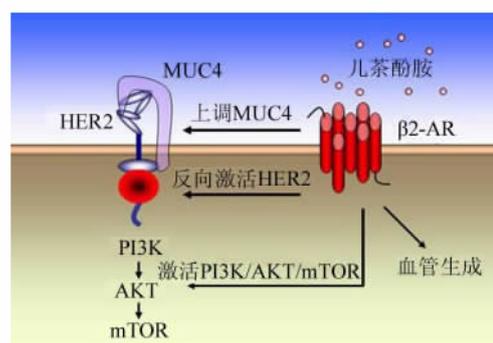


图3 神经信号与曲妥珠单抗的抗性

儿茶酚胺通过活化 β_2 -AR 信号, 诱导乳腺癌细胞中 HER2 表达上调, 反式激活 HER2 及其介导的信号, 导致乳腺癌细胞的增殖活性增强; 可通过多种机制促进曲妥珠单抗耐药依赖的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路活化; 可诱导 MUC4 表达上调, 后者可遮蔽曲妥珠单抗识别及结合 HER2 表位, 导致曲妥珠单抗耐药

1.3.2 β_2 -AR 信号调控曲妥珠单抗抗性依赖的通路 笔者课题组在最近的研究^[59]中, 对 83 例 HER2

阳性乳腺癌患者的肿瘤组织中 $\beta 2$ -AR 的表达进行了免疫组化分析,发现 $\beta 2$ -AR 的表达水平与曲妥珠单抗反应性密切相关。儿茶酚胺诱导的 $\beta 2$ -AR 激活可通过多种机制,调控与 PI3K/AKT 信号通路相关的 miRNA 及信号分子,诱导曲妥珠单抗耐药。进一步对 94 例接受化疗 + 曲妥珠单抗联合治疗的乳腺癌患者进行了回顾性分析,其中 31 例患者除接受化疗 + 曲妥珠单抗治疗外,同时使用了 β -AR 拮抗剂,63 例未用 β -AR 拮抗剂的患者作为对照组。结果显示,同时应用 β -AR 拮抗剂及化疗 + 曲妥珠单抗联合治疗的患者无进展生存期及总生存期更长,提示 $\beta 2$ -AR 信号参与了曲妥珠单抗耐药过程,而 β -AR 拮抗剂可能增强曲妥珠单抗的抗肿瘤活性。本课题组在另一项研究^[60]中观察到,在 HER2 过表达的胃癌细胞中,儿茶酚胺可通过激活 STAT3 及 ERK 通路,上调 MUC4 基因转录及蛋白表达,干扰曲妥珠单抗与胃癌细胞表面的 HER2 分子结合,使胃癌细胞对曲妥珠单抗的敏感性降低。此外,儿茶酚胺刺激可抑制曲妥珠单抗介导的 ADCC 效应,其机制尚未完全阐明。

1.3.3 其他神经递质 最近,对 3 489 例乳腺癌中神经介素 U (neuromedin U) 表达的分析结果^[61]表明,神经介素 U 的表达水平与乳腺癌患者的不良预后密切相关。在 HER2 靶向治疗药物 [曲妥珠单抗、拉帕替尼、来那替尼、阿法替尼 (afatinib)] 敏感的乳腺癌细胞中过表达神经介素 U,可导致这些细胞对药物的敏感性降低,而敲低神经介素 U 表达则可增强耐药细胞对药物的敏感性。机制研究结果证实,神经介素 U 可与 HSP27 为伴侣,稳定 HER2 的表达,外源性神经介素 U 可诱导 HER2 及 EGFR 表达上调,导致 HER2 靶向治疗药物耐药。有研究^[62]发现,抑制神经肽 P 物质可降低 HER2 和 EGFR 的稳定性,诱导曲妥珠单抗抗性肿瘤细胞死亡,提示 P 物质可能参与维持 EGFR 家族的基础活性。

肿瘤组织中不同类型的细胞均受神经的支配,神经系统的活动可能产生最广泛的生物学效应。神经信号及生长因子信号的相互作用可能在肿瘤微环境中形成恶性循环,影响肿瘤细胞对药物的反应性,而神经信号在肿瘤治疗(包括分子靶向治疗)中的作用和机制仍是尚待深入探索的一个领域,相关研究结果将可能为肿瘤新型药物的研发和治疗策略的建立提供重要的信息和理论依据。

1.4 其他参与曲妥珠单抗耐药的信号通路

1.4.1 胰岛素样生长因子 1 受体 (IGF-IR) IGF-IR 是一个穿膜酪氨酸激酶受体。大量的研究^[63]表

明,IGF-IR 及其配体 IGF 在乳腺癌组织中高表达,IGF-IR 信号调控乳腺癌细胞增殖,提示 IGF-IR 信号可能影响曲妥珠单抗的疗效。实验研究^[64]发现,IGF-IR 过表达可影响曲妥珠单抗诱导的抗增殖效应。IGF-IR 可与 HER2 形成异二聚体,这种相互作用专一性地发生于曲妥珠单抗抗性细胞。IGF-I 刺激可导致抗性细胞中 HER-2 磷酸化水平升高,IGF-IR 酪氨酸激酶抑制剂 (I-OMe-AG538) 则可抑制 HER-2 磷酸化,IGF-IR 特异性抗体 (alpha-IR3) 可阻断 HER-2/IGF-IR 相互作用,二者均可恢复抗性细胞对曲妥珠单抗的敏感性。另一项研究^[65]发现,在曲妥珠单抗抗性的乳腺癌细胞中,IGF-IR 可与 HER2 和 HER3 形成异源三聚体,导致下游增殖信号增强。采用 RNA 干扰技术敲低 HER3 或 IGF-IR 表达,可恢复抗性细胞对曲妥珠单抗的敏感性。最近有研究^[34]证实,IGF-IR 信号异常活化,上调磷酸化 Src (p-Src) 水平,降低 HER2 阳性乳腺癌细胞对曲妥珠单抗的敏感性。后续研究^[66]亦支持上述报道,几种靶向 IGF-IR 的抑制剂目前尚在研发中。

1.4.2 STAT3 信号 绝大多数 HER2 过表达的乳腺癌患者常在曲妥珠单抗治疗 1 年内发生获得性耐药。最近几个研究小组的工作均揭示了 STAT3 信号在获得性耐药中的重要作用。Wicha^[67]的研究小组发现,IL-6 炎症反馈环路诱导肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 扩增,CSC 是曲妥珠单抗抗性细胞的来源。应用靶向 IL-6 受体的单克隆抗体阻断炎症反馈环路可抑制 CSC 扩增,并可抑制小鼠移植瘤的体内生长及肿瘤转移。本课题组用曲妥珠单抗对胃癌细胞进行梯度加压诱导,建立了曲妥珠单抗耐药的胃癌细胞株,此耐药细胞的形态及表型发生了明显的改变,上皮标志性蛋白 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、紧密连接蛋白-1 (ZO-1) 的表达明显下调,而间质标志性蛋白波形蛋白 (vimentin) 的表达则明显升高,上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的重要调控分子 ZEB1、Slug、Snail 的表达亦上调,提示耐药细胞发生了 EMT。耐药细胞的迁移能力、侵袭性及转移能力均显著增强,表明曲妥珠单抗长期处理导致胃癌细胞产生了药物抗性 & 获得了恶性表型。Sharieh 研究小组^[68]发现,曲妥珠单抗耐药的乳腺癌细胞也会出现 EMT 表型,经曲妥珠单抗长期诱导的乳腺癌细胞 EMT 相关基因 TGF-beta1、EGF 的表达被显著上调,而上皮性标志物 GLI1 的表达却受到抑制,提示细胞获得曲妥珠单抗抗性的同时也发生了 EMT 的表型转化。进一步观察发现,在曲妥珠单抗耐药的胃癌细胞中,干细胞

相关蛋白(CD133、OCT-4、CD44)的水平明显升高,细胞的自我更新能力及致瘤原性显著增强,提示曲妥珠单抗耐药的胃癌细胞已获得了CSC样表型。机制研究结果揭示,亲本细胞中赖以生存的信号通路(AKT和ERK)受到显著抑制,而STAT3呈异常活化(图4)。应用Jak2/STAT3抑制剂可显著抑制耐药细胞的增殖,并恢复耐药细胞对曲妥珠单抗的敏感性。这些研究结果提示,在曲妥珠单抗的压力下,胃癌细胞中生存信号发生了偏转,STAT3信号异常活化在胃癌细胞曲妥珠单抗耐药中发挥关键的作用。本课题组研究^[69]发现,抗性细胞中IL-6 mRNA的表达水平比亲本细胞增加>150倍,其分泌水平高达7 000 pg/mL,提示IL-6大量分泌导致STAT3持续活化可能是胃癌细胞对曲妥珠单抗产生抗性的重要原因。本课题组在另一项研究^[60]中观察到,STAT3活化可促进黏蛋白4(mucin 4, MUC4)表达。MUC4是一种大分子穿膜黏蛋白,由高度糖基化的大分子的胞外 α 亚单位(可长达2 μm)和穿膜的胞内 β 亚单位组成。MUC4 β 亚单位含2个EGF样结构域,可与HER2结合,诱导HER2磷酸化,并激活其下游的信号级联反应。MUC4与HER2相互作用产生的位阻效应可能干扰曲妥珠单抗与HER2结合,导致曲妥珠单抗脱靶(图3)。国内郭亚军教授课题组的研究^[70]发现,曲妥珠单抗持续刺激可导致胃癌细胞中纤连蛋白(fibronectin)、EGF和IL-6的表达水平上调及STAT3活化,活化的STAT3又可促进纤连蛋白、EGF和IL-6表达,从而形成一个正反馈环路,放大并维持STAT3信号,后者诱导MUC1和MUC4表达,通过持续活化HER2及遮蔽曲妥珠单抗识别的HER2表位,导致曲妥珠单抗耐药。

1.4.3 Notch 信号 近年来,Notch信号通路在肿瘤发生发展中的重要性逐渐被研究者所认识。两个研究组^[71-72]的研究结果提示,用曲妥珠单抗处理乳腺癌细胞或抑制HER2信号通路均可引起Notch信号活化,应用 γ -分泌酶抑制剂阻断Notch信号,可增强曲妥珠单抗对乳腺癌细胞的增殖抑制效应,且可逆转耐药细胞对曲妥珠单抗的抗性。对4 000余例乳腺癌组织的基因芯片数据分析发现,Notch信号与肿瘤复发率呈正相关^[73]。本课题组^[69]的研究结果显示,曲妥珠单抗耐药的胃癌细胞中Notch蛋白的表达及转录激活活性均明显增强;Notch活化可促进IL-6表达,后者可上调胃癌细胞中Notch配体Jagged-1表达; γ 分泌酶抑制剂可显著降低IL-6 mRNA的水平,表明耐药细胞中IL-6过表达与Notch活化有关;在胃癌细胞中过表达Jagged-1可上调IL-

6及Notch的靶基因HEY1、HEY2表达,提示Jagged-1、Notch、IL-6在耐药的胃癌细胞中可能形成正反馈环路,影响肿瘤细胞对曲妥珠单抗的敏感性。临床研究^[74]结果亦表明,Notch信号活化与胃癌患者的不良预后密切相关。

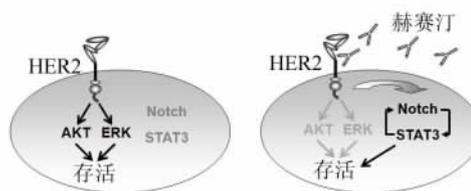


图4 曲妥珠单抗长期处理诱导耐药

在曲妥珠单抗的长期压力下,胃癌细胞中发生生存信号偏转,肿瘤细胞赖以生存的ERK和PI3K/AKT信号受到抑制,而STAT3和Notch信号通路异常活化,促进肿瘤细胞在曲妥珠单抗的压力下存活

2 逆转曲妥珠单抗耐药的候选策略

曲妥珠单抗耐药的问题已成为制约其临床应用的重要障碍。在过去的十几年中,针对曲妥珠单抗耐药的机制,多种新型小分子抑制剂及生物类药物正在研发中(表1),并提出了多种逆转曲妥珠单抗耐药的策略,为提高曲妥珠单抗耐药患者的疗效带来了新的希望。

2.1 抗体类药物

帕妥珠单抗(pertuzumab)是一种靶向HER2受体胞外域第二结构域的单克隆抗体,作用于HER2/HER3异二聚体形成的界面,可阻断HER2与HER3的相互作用,抑制配体依赖的HER下游信号转导^[75]。帕妥珠单抗于2012年获得美国FDA批准,用于HER2阳性转移性乳腺癌的临床治疗。曲妥珠单抗识别的表位位于HER2分子胞外域第四结构域,因而其阻断HER2/HER3复合物形成的作用不如帕妥珠单抗。由于帕妥珠单抗与曲妥珠单抗的作用机制不同,两种抗体联用具有协同效应。一项包括808例转移性乳腺癌患者的III期临床实验(CLEOPATRA)结果^[76-77]表明,帕妥珠单抗与曲妥珠单抗联用,可显著延长患者的无进展生存期和总生存期。

T-DM1(商品名:Kadcyla)是曲妥珠单抗与化疗药物(美登素,DM1)通过硫醚键分子SMCC连接的抗体-药物偶联物,于2013年获得美国FDA批准,用于曲妥珠单抗及紫杉类药物治疗无效的转移性乳腺癌患者。T-DM1保留了曲妥珠单抗的生物学活性,并可通过抗体的导向作用,将强效抗微管药物

DM1 选择性地释放至 HER2 过表达的肿瘤细胞内^[78]。在一项含 991 例患者的临床试验显示^[79], T-DM1 治疗组患者的中位无进展生存期比对照组(拉帕替尼+卡培他滨)延长 3.2 个月, 中位总生存期比对照组延长 5.8 个月。

表 1 分子靶向治疗药物

类别	名称	靶标	阶段
抗体类	Pertuzumab	HER2	上市
	Trastuzumab-	HER2	上市
	DM1(TD-M1)		
	MM-111	HER2, HER3	临床试验
	“Four in one” antibody	EGFR, HER2, HER3, VEGF	临床前
	HER2-TDB	HER2	临床前
小分子抑制剂	Lapatinib	EGFR, HER2	上市
	Neratinib	EGFR, HER2, HER4	上市
	Afatinib	EGFR, HER2, HER4	临床试验
	Canertinib	EGFR, HER2, HER4	临床试验
	GDC-0941	PI3K	临床试验
	XL-147	PI3K	临床试验
	BKM120	PI3K	临床试验
	BEZ235	PI3K, mTOR	临床试验
	Triciribine	AKT	上市
	MK-2206	AKT	临床试验
	Buparlisib	PI3K	临床试验
	BAY 80-6946	PI3K	临床前
	Everolimus	mTOR	上市
	Sirolimus	mTOR	上市
	Temsirolimus	mTOR	上市
	AP23573	mTOR	上市
	Ridaforolimus	mTOR	临床试验
	BMS-754807	IGF-1R	临床试验
	Tanespimycin	Hsp90	临床试验
	Pazopanib	VEGFR, PDGFR, SCFR	临床试验
Sunitinib	VEGFR, PDGFR, SCFR, CSFR	临床试验	
Nordihydro-guaiaretic acid	IGF-1R, HER2	临床前	
NVP-AEW541A	IGF-1R	临床前	

双特异性抗体是近年来研发的热点, 多种双特

异性抗体正在火热的研发中或已进入临床试验。MM-111 是一种可靶向 HER2 和 HER3 的双特异性抗体, 由两条抗 HER2 和抗 HER3 单链抗体连接而成的单链融合蛋白。MM-111 可与高表达 HER2 和 HER3 的肿瘤细胞特异性结合, 形成三聚化复合物, 有效地抑制配基诱导的信号及肿瘤生长。在临床前研究中, MM-111 与曲妥珠单抗显示良好的协同效应, 目前 MM-111 与曲妥珠单抗联用治疗 HER2 阳性转移性乳腺癌已进入临床试验。HER2-TDB 是靶向 HER2 并可条件性激活 T 细胞的抗体, 可在低至皮摩尔的浓度下杀死 HER2 阳性的肿瘤细胞。由于 HER2-TDB 独特的作用机制, 有望用于曲妥珠单抗抗性的乳腺癌治疗^[80]。Hu 等^[81]通过基因工程技术, 构建了可识别 EGFR、HER2、HER3 及 VEGF 的“four in one”抗体, 这种多特异性的抗体不仅可抑制 EGFR 受体家族和 VEGF 介导的信号, 还可通过阻断 HER 和 MET 相互作用发挥更强的抑瘤功能。

此外, 将靶向 HER2 分子中不同结构域的 3 种抗体联合应用, 抗肿瘤效应可超过曲妥珠单抗与帕妥珠单抗联用^[82]。研究发现, 靶向肿瘤的治疗性抗体被蛋白酶水解灭活可能是肿瘤免疫逃逸的一个重要机制。IgG1 铰链区中单一肽键的断裂可引起 Fc 区的结构改变, 导致曲妥珠单抗抗肿瘤效应降低。有研究者对抗体蛋白水解酶识别作用的表位进行了基因工程修饰, 改造后的抗体能抵抗蛋白酶的切割, 因而其抗肿瘤效应优于曲妥珠单抗^[83]。

2.2 信号通路抑制剂

2.2.1 PI3K/AKT/mTOR 通路抑制剂

由于 PI3K/AKT/mTOR 通路异常活化在曲妥珠单抗耐药中具有重要的作用, 在过去的 10 余年中, 大量的研究集中于开发靶向 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂。临床前研究结果显示, 应用 AKT 和 mTOR 抑制剂可逆转曲妥珠单抗耐药, 已开发或正在开发的 PI3K/AKT 抑制剂包括 BAY 80-6946、buparlisib、perifosine、MK-2206 等, 这些抑制剂的抗肿瘤效应正在进行实验研究、临床前评价或已进入临床试验阶段。

高选择性、可逆的 PI3K 抑制剂 BAY 80-6946 可抑制乳腺癌细胞增殖及侵袭, 并可恢复耐药细胞对曲妥珠单抗的敏感性^[84]。曲西立滨(triciribine)是合成的三环核苷, 可特异性地抑制 AKT 信号。用曲妥珠单抗与曲西立滨处理 PTEN 缺失的乳腺癌细胞, 可在体内外抑制肿瘤细胞生长^[85]。MK-2206 是一种 AKT 小分子变构抑制剂, 临床前研究表明其与紫杉醇、曲妥珠单抗联用患者耐受性好, 且临床疗效显著^[86]。Buparlisib(可逆性泛 PIK3 抑制性口服药

物)已进入晚期乳腺癌的临床 I 期试验^[87]。然而, 现已在临床上应用的 PI3K 抑制剂的疗效并非理想, 药物抗性仍是其应用的主要障碍。最近的研究发现, 用不可逆性泛 PIK3 抑制剂 PX-866 处理成胶质细胞瘤细胞, 可引起肿瘤细胞内众多激酶(包括 AKT1、AKT2、mTOR 及其下游效应分子 70S6K 和 4EBP1)广泛磷酸化及多条生长因子受体通路相关基因转录上调, 肿瘤细胞中线粒体由核周迁移至质膜周围细胞骨架, 此效应可能为肿瘤细胞的侵袭和迁移提供能量, 促进肿瘤转移^[88], 提示获得性线粒体重编程与 PI3K 通路受到抑制相关。代谢组学研究^[89]结果揭示, PI3K 抑制剂处理可在体内外诱导肿瘤细胞中广泛的代谢重编程, 促进线粒体招募丝氨酸/苏氨酸激酶及 AKT2, 提示小分子 PI3K 抑制剂可能通过诱导肿瘤细胞的线粒体能量再利用及促生存作用而产生药物抗性。

现已开发的 mTOR 的抑制剂包括 temsirolimus、依维莫司(everolimus)、AP23573、西罗莫司(sirolimus)等。西罗莫司又称雷帕霉素(rapamycin), 是一种大环内酯抗生素, 也是常用的 mTOR 抑制剂。西罗莫司与曲妥珠单抗联合治疗 HER2 阳性转移性乳腺癌的总反应率为 11%, 临床获益率为 44%, 提示抑制 mTOR 通路可能对于克服某些乳腺癌患者的曲妥珠单抗抗性具有一定的意义^[90]。依维莫司是一种口服 mTOR 抑制剂, 目前已被美国 FDA 批准用于雌激素受体阳性晚期乳腺癌临床治疗。III 期临床试验的结果^[91]表明, 依维莫司联合曲妥珠单抗和长春瑞滨可显著延长曲妥珠单抗耐药的晚期乳腺癌患者的无进展生存期。

2.2.2 酪氨酸酶抑制剂 拉帕替尼和阿法替尼均为口服的 EGFR/HER2 酪氨酸激酶双重抑制剂。拉帕替尼与 EGFR 结合后解离速度慢, 可长时间地阻断 EGFR/HER2 的下游级联反应。拉帕替尼与曲妥珠单抗具有协同作用, 可延长曲妥珠单抗耐药患者中位无进展生存期和中位总生存期。阿法替尼对于曲妥珠单抗治疗后复发患者亦具有一定的疗效^[92]。此外, 拉帕替尼可阻断 p95HER2 的表达。鉴于拉帕替尼的作用不依赖于 HER2 胞外域, 因而, 对于曲妥珠单抗治疗后 HER2 表达下调或 p95HER2 水平升高的患者可能是良好的选择。卡奈替尼(canertinib, 又称 CI-1033)是一种泛 HER 抑制剂, 能与 EGFR 和 HER2 的酪氨酸激酶催化部位不可逆性结合, 阻断其下游信号^[93], 其疗效仍有待临床试验的评价。来那替尼(Neratinib)是一种口服的不可逆性泛 HER 受体酪氨酸激酶抑制剂, 能有效抑制 EGFR、HER2

和 HER4 活性。在 III 期临床研究中(ExteNET), 2 812 例手术 + 曲妥珠单抗辅助治疗的早期乳腺癌患者接受了来那替尼扩展治疗。与对照组相比, 来那替尼治疗组患者的无进展生存期改善达 33%, 预示来那替尼扩展性辅助治疗具有良好的应用前景。

Kim 等^[94]通过基因表达谱分析提出, 多数 HER2 基因扩增的胃食管癌具有第二分子特征改变, 主要包括细胞周期调控基因表达上调、PI3K 和受体酪氨酸激酶活化。在 HER2 过表达的细胞中, 这些第二分子特征的活化可使肿瘤细胞对 HER2 靶向治疗药物产生抗性。EGFR 作为最常见的第二分子特征, 在 HER2 扩增的胃食管癌中过表达, 此类肿瘤细胞常对 HER2/EGFR 双重抑制剂敏感。

去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid, NDGA)是一种酚类化合物, 可在曲妥珠单抗抗性的乳腺癌细胞中抑制 IGF-1R 和 HER2 信号, 导致下游 PI3K/AKT 信号通路抑制及肿瘤细胞死亡。NDGA 与曲妥珠单抗联用可显著抑制曲妥珠单抗抗性细胞的增殖及存活^[95]。吡咯并咪啉衍生物 NVP-AEW541A 是具有高特异性的 IGF-1R 通路选择性激酶抑制剂, 与曲妥珠单抗联合具有协同效应^[96]。

2.3 新型用药方案

有研究^[97]提出了“生物标志物指导的序贯靶向治疗”的新概念。该研究以 HER2 过表达/PTEN 缺失的高侵袭性乳腺癌为模型, 观察到拉帕替尼能抑制曲妥珠单抗抗性移植瘤的生长, 但是由于 PI3K/mTOR 信号通路活化, 使肿瘤产生了对拉帕替尼的抗性; 随后, 应用 PI3K/mTOR 双重抑制剂 BEZ235, 可克服曲妥珠单抗/拉帕替尼抗性。然而, BEZ235 治疗可导致 HER2 表达增强及磷酸化, 从而又产生了 BEZ235 抗性; 再次应用拉帕替尼 + BEZ235, 则可恢复肿瘤细胞对 BEZ235 的敏感性。如此依据生物标志物的变化, 不断地调整相应的靶向性药物, 使携高度侵袭性肿瘤的小鼠生存期得到显著延长。由于 BEZ235 可诱导 HER2 表达上调, 或许亦可恢复肿瘤细胞对曲妥珠单抗的敏感性。一项临床前研究^[98]发现, 重组人 IL-21 蛋白与曲妥珠单抗联用可增强曲妥珠单抗介导的 ADCC 效应, 增加 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞的细胞毒效应, 减少肿瘤组织中浸润的 Treg 细胞的数量, 提高曲妥珠单抗的疗效。所以 IL-21 信号的活化可能成为克服曲妥珠单抗耐药的候选策略之一。由此可以看出, 目前克服曲妥珠单抗原发性或获得性耐药的主要策略是联合用药, 恢复耐药细胞对赫赛汀的敏感性, 改善 HER2 阳性乳腺癌患者的预后。但同时多药联用势必会给患者

带来沉重的负担。最近 Gu 研究小组^[99]设计了一套二氧化硅纳米粒子递送系统可将优化后的 HER2 siRNA 递送到曲妥珠单抗耐药的肿瘤细胞内, 体内外实验结果表明, HER2 siRNA 可有效沉默 HER2、p95HER2 以及 HER2 Δ 16 的表达, 抑制耐药细胞中 HER2、AKT 和 ERK 磷酸化水平, 逆转原发性及获得性耐药的发生, 且不容易产生耐药。

3 结 语

实际上, 曲妥珠单抗耐药的机制是十分复杂的, 现已揭示的相关机制仍无法解释肿瘤细胞对曲妥珠单抗产生抗性的速度、强度及广度, 或不具普遍意义。首先, 肿瘤细胞具有高度的异质性, 即使在 HER2 过表达的肿瘤细胞中, 仍存在 *HER2* 基因扩增的区域异质性, 可能在靶向治疗的过程中, 由于 HER2 表达水平降低而逐渐失去靶标使治疗无法延续。在靶向治疗过程中, 肿瘤细胞可能通过转换赖以生存的信号通路, 从而维持在药物的压力下存活, 而生存信号的转换可能是导致药物抗性的一个重要驱动因素。长期的曲妥珠单抗治疗还可能由于 CSC 相关的信号通路激活, 诱导 CSC 扩增, 这些 CSC 将成为曲妥珠单抗抗性细胞的重要来源。此外, 肿瘤微环境中脂肪细胞和成纤维细胞分泌的肿瘤基质成分可能在肿瘤细胞/治疗性抗体/免疫细胞间形成物理屏障, 削弱抗体的 ADCC 效应^[100]。总之, 彻底揭示肿瘤细胞中与生存相关的重要信号的调控, 阐明曲妥珠单抗抗性产生的关键机制, 不仅有助于新型靶向药物的研发, 亦将为抗肿瘤治疗新策略的建立奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] BASELGA J, SWAIN S M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3 [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9 (7): 463-475. DOI: 10.1038/nrc2656.
- [2] SINGER C F, KOSTLER W J, 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. DOI: 10.1016/j.bbcan.2008.02.003.
- [3] COBLEIGH M A, VOGEL C L, TRIPATHY D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(9): 2639-2648.
- [4] SLAMON D J, 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 Engl J Med*, 2001, 344(11): 783-792.
- [5] VOGEL C, COBLEIGH M A, TRIPATHY D, et al. First-line, single-agent Herceptin(R) (trastuzumab) in metastatic breast cancer: a preliminary report [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(Suppl 1): 125-129.
- [6] STERN H M. Improving treatment of HER2-positive cancers: opportunities and challenges [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(127): 127rv122. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001539.
- [7] SEOL H, LEE H J, CHOI Y, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance [J]. *Mod Pathol*, 2012, 25(7): 938-948. DOI: 10.1038/modpathol.2012.36.
- [8] LEE H J, SEO A N, KIM E J, et al. HER2 heterogeneity affects trastuzumab responses and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer [J]. *Am J Clin Pathol*, 2014, 142(6): 755-766. DOI: 10.1309/AJCP1RL4GUVGK3YX.
- [9] SAITO T, KONDO C, SHITARA K, et al. Comparison of intratumoral heterogeneity of HER2 expression between primary tumor and multiple organ metastases in gastric cancer: clinicopathological study of three autopsy cases and one resected case [J]. *Pathol Int*, 2015, 65(6): 309-317. DOI: 10.1111/pin.12290.
- [10] SONG H, KIM T O, MA S Y, et al. Intratumoral heterogeneity impacts the response to anti-neu antibody therapy [J/OL]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 647 [2015-12-25]. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-647>. DOI: 10.1186/1471-2407-14-647.
- [11] WANG S C, LIEN H C, XIA W, et al. Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2 [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(3): 251-261.
- [12] CORDO RUSSO R I, BEGUELIN W, DIAZ FLAQUE M C, et al. Targeting ErbB-2 nuclear localization and function inhibits breast cancer growth and overcomes trastuzumab resistance [J]. *Oncogene*, 2015, 34(26): 3413-3428. DOI: 10.1038/onc.2014.272.
- [13] ARRIBAS J, BASELGA J, PEDERSEN K, et al. p95HER2 and breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5): 1515-1519. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3795.
- [14] SCALTRITI M, ROJO F, OCANA A, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(8): 628-638.
- [15] TURAL D, AKAR E, MUTLU H, et al. P95 HER2 fragments and breast cancer outcome [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2014, 14(9): 1089-1096. DOI: 10.1586/14737140.2014.929946.
- [16] American Association for Cancer Research. Chemotherapy helps overcome trastuzumab resistance [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(1): OF7. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-NB2014-169.
- [17] PARRA-PALAU J L, MORANCHO B, PEG V, et al. Effect of p95HER2/611CTF on the response to trastuzumab and chemotherapy [J/OL]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(11): dju291 [2015-12-25]. <http://jnci.oxfordjournals.org/content/106/11/dju291>. DOI: 10.1093/jnci/dju291.

- [18] WEI W, LIU W, SERRA S, et al. The breast cancer susceptibility FGFR2 provides an alternate mode of HER2 activation [J]. *Oncogene*, 2015. DOI: 10.1038/onc.2014.440 [Epub ahead of print].
- [19] DUFFY M J, CROWN J, MULLOOLY M. ADAM10 and ADAM17: New players in trastuzumab resistance [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(22): 10963-10964. DOI: 10.18632/oncotarget.2794.
- [20] FELDINGER K, GENERALI D, KRAMER-MAREK G, et al. ADAM10 mediates trastuzumab resistance and is correlated with survival in HER2 positive breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(16): 6633-6646. DOI: 10.18632/oncotarget.1955.
- [21] KWONG K Y, HUNG M C. A novel splice variant of HER2 with increased transformation activity [J]. *Mol Carcinog*, 1998, 23(2): 62-68.
- [22] HUYNH F C, JONES F E. MicroRNA-7 inhibits multiple oncogenic pathways to suppress HER2Delta16 mediated breast tumorigenesis and reverse trastuzumab resistance [J/OL]. *PLoS ONE*, 2014, 9(12): e114419 [2015-12-25]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0114419>. DOI: 10.1371/journal.pone.0114419.
- [23] CASTIGLIONI F, TAGLIABUE E, CAMPIGLIO M, et al. Role of exon-16-deleted HER2 in breast carcinomas [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13(1): 221-232. DOI: 10.1677/erc.1.01047.
- [24] MITRA D, BRUMLIK M J, OKAMGBA S U, et al. An oncogenic isoform of HER2 associated with locally disseminated breast cancer and trastuzumab resistance [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(8): 2152-2162. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0295.
- [25] CASTAGNOLI L, IEZZI M, GHEDINI G C, et al. Activated d16HER2 homodimers and SRC kinase mediate optimal efficacy for trastuzumab [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(21): 6248-6259. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0983.
- [26] ARIENTI C, ZANONI M, PIGNATTA S, et al. Preclinical evidence of multiple mechanisms underlying trastuzumab resistance in gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.7575 [Epub ahead of print].
- [27] NARAYAN M, WILKEN J A, HARRIS L N, et al. Trastuzumab-induced HER reprogramming in "resistant" breast carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(6): 2191-2194. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1056.
- [28] GIJSEN M, KING P, PERERA T, et al. HER2 phosphorylation is maintained by a PKB negative feedback loop in response to anti-HER2 herceptin in breast cancer [J/OL]. *PLoS Biol*, 2010, 8(12): e1000563 [2015-12-25]. <http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1000563>. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000563.
- [29] DUA R, ZHANG J, NHONTHACHIT P, et al. EGFR over-expression and activation in high HER2, ER negative breast cancer cell line induces trastuzumab resistance [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 122(3): 685-697. DOI: 10.1007/s10549-009-0592-x.
- [30] HENJES F, BENDER C, VON DER HEYDE S, et al. Strong EGFR signaling in cell line models of ERBB2-amplified breast cancer attenuates response towards ERBB2-targeting drugs [J]. *Oncogenesis*, 2012, 1e16. DOI: 10.1038/oncsis.2012.16.
- [31] LEE H J, SEO A N, KIM E J, et al. Prognostic and predictive values of EGFR overexpression and EGFR copy number alteration in HER2-positive breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(1): 103-111. DOI: 10.1038/bjc.2014.556.
- [32] GREEN A R, BARROS F F, ABDEL-FATAH T M, et al. HER2/HER3 heterodimers and p21 expression are capable of predicting adjuvant trastuzumab response in HER2⁺ breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 145(1): 33-44. DOI: 10.1007/s10549-014-2925-7.
- [33] CHA Y, HAN S W, SEOL H, et al. Immunohistochemical features associated with sensitivity to lapatinib-plus-capecitabine and resistance to trastuzumab in HER2-positive breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(8): 4275-4280.
- [34] LYU H, YANG X H, EDGERTON S M, et al. The erbB3- and IGF-1 receptor-initiated signaling pathways exhibit distinct effects on lapatinib sensitivity against trastuzumab-resistant breast cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 2921-2935. DOI: 10.18632/oncotarget.6404.
- [35] JUNTILLA T T, AKITA R W, PARSONS K, et al. Ligand-independent HER2/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. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.03.020.
- [36] CANFIELD K, LI J, WILKINS O M, et al. Receptor tyrosine kinase ERBB4 mediates acquired resistance to ERBB2 inhibitors in breast cancer cells [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(4): 648-655. DOI: 10.4161/15384101.2014.994966.
- [37] MOHD NAFI S N, GENERALI D, KRAMER-MAREK G, et al. Nuclear HER4 mediates acquired resistance to trastuzumab and is associated with poor outcome in HER2 positive breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(15): 5934-5949. DOI: 10.18632/oncotarget.1904.
- [38] GAMEZ-POZO A, PEREZ CARRION R M, MANSO L, et al. The Long-HER study: clinical and molecular analysis of patients with HER2⁺ advanced breast cancer who become long-term survivors with trastuzumab-based therapy [J/OL]. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e109611 [2015-12-25]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0109611>. DOI: 10.1371/journal.pone.0109611.
- [39] PARK B H, DAVIDSON N E. PI3 kinase activation and response to Trastuzumab Therapy: what's new with herceptin resistance? [J]. *Cancer Cell*, 2007, 12(4): 297-299. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.10.004.
- [40] BERNS K, HORLINGS H M, HENNESSY B T, 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. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.08.030.
- [41] HANKER A B, PFEFFERLE A D, BALKO J M, et al. Mutant

- PIK3CA accelerates HER2-driven transgenic mammary tumors and induces resistance to combinations of anti-HER2 therapies [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(35): 14372-14377. DOI: 10.1073/pnas.1303204110.
- [42] LOIBL S, VON MINCKWITZ G, SCHNEEWEISS A, et al. PIK3CA mutations are associated with lower rates of pathologic complete response to anti-human epidermal growth factor receptor 2 (her2) therapy in primary HER2-overexpressing breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(29): 3212-3220. DOI: 10.1200/JCO.2014.55.7876.
- [43] MAJEWSKI I J, NUCIFORO P, MITTEPERGHER L, et al. PIK3CA mutations are associated with decreased benefit to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2-targeted therapies in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(12): 1334-1339. DOI: 10.1200/JCO.2014.55.2158.
- [44] POGUE-GEILE K L, SONG N, JEONG J H, et al. Intrinsic subtypes, PIK3CA mutation, and the degree of benefit from adjuvant trastuzumab in the NSABP B-31 trial [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(12): 1340-1347. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.2439.
- [45] IBRAHIM E M, KAZKAZ G A, AL-MANSOUR M M, et al. The predictive and prognostic role of phosphatase phosphoinositol-3 (PI3) kinase (PIK3CA) mutation in HER2-positive breast cancer receiving HER2-targeted therapy: a meta-analysis [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 152(3): 463-476. DOI: 10.1007/s10549-015-3480-6.
- [46] RABINOVSKY R, POCHANARD P, MCNEAR C, et al. p85 Associates with unphosphorylated PTEN and the PTEN-associated complex [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(19): 5377-5388. DOI: 10.1128/MCB.01649-08.
- [47] LI W, ZHAI L, WANG H, et al. Downregulation of lncRNA GAS5 causes trastuzumab resistance in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.8413 [Epub ahead of print].
- [48] DAVE B, MIGLIACCIO I, GUTIERREZ M C, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(2): 166-173. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.7814.
- [49] FUJITA T, DOIHARA H, KAWASAKI K, et al. PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(2): 247-252. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602926.
- [50] NAGATA Y, LAN K H, 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. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.06.022.
- [51] PANDOLFI P P. Breast cancer--loss of PTEN predicts resistance to treatment [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(22): 2337-2338. DOI: 10.1056/nejmcibr043143.
- [52] NUCIFORO P G, AURA C, HOLMES E, et al. Benefit to neoadjuvant anti-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-targeted therapies in HER2-positive primary breast cancer is independent of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) status [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(7): 1494-1500. DOI: 10.1093/annonc/mdv175.
- [53] STERN H M, GARDNER H, BURZYKOWSKI T, et al. PTEN loss is associated with worse outcome in HER2-amplified breast cancer patients but is not associated with trastuzumab resistance [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(9): 2065-2074. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2993.
- [54] ZHANG X, PARK J S, PARK K H, et al. PTEN deficiency as a predictive biomarker of resistance to HER2-targeted therapy in advanced gastric cancer [J]. *Oncology*, 2015, 88(2): 76-85. DOI: 10.1159/000366426.
- [55] SHI M, LIU D, YANG Z, et al. Central and peripheral nervous systems: master controllers in cancer metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2013, 32(3/4): 603-621. DOI: 10.1007/s10555-013-9440-x.
- [56] CHEN H, LIU D, YANG Z, et al. Adrenergic signaling promotes angiogenesis through endothelial cell-tumor cell crosstalk [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2014, 21(5): 783-795. DOI: 10.1530/ERC-14-0236.
- [57] SHI M, LIU D, DUAN H, et al. The beta2-adrenergic receptor and Her2 comprise a positive feedback loop in human breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 125(2): 351-362. DOI: 10.1007/s10549-010-0822-2.
- [58] SHI M, ZHAO M, HU M, et al. beta2-AR-induced Her2 transactivation mediated by Erbin confers protection from apoptosis in cardiomyocytes [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(4): 1570-1577. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.04.093.
- [59] LIU D, YANG Z, WANG T, et al. Beta2-AR signaling controls trastuzumab resistance-dependent pathway [J]. *Oncogene*, 2015, 35(1): 47-58. DOI: 10.1038/onc.2015.58.
- [60] SHI M, YANG Z, HU M, et al. Catecholamine-induced beta2-adrenergic receptor activation mediates desensitization of gastric cancer cells to trastuzumab by upregulating MUC4 expression [J]. *J Immunol*, 2013, 190(11): 5600-5608. DOI: 10.4049/jimmunol.1202364.
- [61] RANI S, CORCORAN C, SHIELS L, et al. Neuromedin U: a candidate biomarker and therapeutic target to predict and overcome resistance to HER-tyrosine kinase inhibitors [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(14): 3821-3833. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2053.
- [62] MAYORDOMO C, GARCIA-RECIO S, AMETLLER E, et al. Targeting of substance P induces cancer cell death and decreases the steady state of EGFR and Her2 [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(4): 1358-1366. DOI: 10.1002/jcp.22848.
- [63] LU Y, ZI X, ZHAO Y, et al. Insulin-like growth factor- I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin) [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(24): 1852-1857. DOI: 10.1093/jnci/93.24.1852.

- [64] NAHTA R, YUAN L X, ZHANG B, et al. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 11118-11128. DOI: 10.1158/0008-5472.can-04-3841.
- [65] 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. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3321.
- [66] BROWNE B C, CROWN J, VENKATESAN N, et al. Inhibition of IGF1R activity enhances response to trastuzumab in HER-2-positive breast cancer cells [J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(1): 68-73. DOI: 10.1093/annonc/mdq349.
- [67] KORKAYA H, KIM G I, DAVIS A, et al. Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2⁺ breast cancer by expanding the cancer stem cell population [J]. *Mol Cell*, 2012, 47(4): 570-584. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.06.014.
- [68] SHARIEH E A, AWIDI A S, AHRAM M, et al. Alteration of gene expression in MDA-MB-453 breast cancer cell line in response to continuous exposure to trastuzumab [J]. *Gene*, 2016, 575(2 Pt 2): 415-420. DOI: 10.1016/j.gene.2015.09.019.
- [69] YANG Z, GUO L, LIU D, et al. Acquisition of resistance to trastuzumab in gastric cancer cells is associated with activation of IL-6/STAT3/Jagged-1/Notch positive feedback loop [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(7): 5072-5087. DOI: 10.18632/oncotarget.3241.
- [70] LI G, ZHAO L, LI W, et al. Feedback activation of STAT3 mediates trastuzumab resistance via upregulation of MUC1 and MUC4 expression [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(18): 8317-8329. DOI: 10.18632/oncotarget.2135.
- [71] OSIPO C, PATEL P, RIZZO P, et al. ErbB-2 inhibition activates Notch-1 and sensitizes breast cancer cells to a gamma-secretase inhibitor [J]. *Oncogene*, 2008, 27(37): 5019-5032. DOI: 10.1038/onc.2008.149.
- [72] PANDYA K, MEEKE K, CLEMENTZ A G, et al. Targeting both Notch and ErbB-2 signalling pathways is required for prevention of ErbB-2-positive breast tumour recurrence [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(6): 796-806. DOI: 10.1038/bjc.2011.321.
- [73] ABRAVANEL D L, BELKA G K, PAN T C, et al. Notch promotes recurrence of dormant tumor cells following HER2/neu-targeted therapy [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(6): 2484-2496. DOI: 10.1172/JCI74883.
- [74] ZHANG H, WANG X, XU J, et al. Notch1 activation is a poor prognostic factor in patients with gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(9): 2283-2290. DOI: 10.1038/bjc.2014.135.
- [75] FRANKLIN M C, CAREY K D, VAJDOS F F, et al. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex [J]. *Cancer Cell*, 2004, 5(4): 317-328. DOI: 10.1016/s1535-6108(04)00083-2.
- [76] BASELGA J, CORTES J, KIM S B, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(2): 109-119. DOI: 10.1056/NEJMoa1113216.
- [77] SWAIN S M, KIM S B, CORTES J, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study [J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(6): 461-471. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70130-X.
- [78] LEWIS PHILLIPS G D, LI G, DUGGER D L, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(22): 9280-9290. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1776.
- [79] VERMA S, MILES D, GIANNI L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(19): 1783-1791. DOI: 10.1056/nejmx130019.
- [80] JUNTILLA T T, LI J, JOHNSTON J, et al. Antitumor efficacy of a bispecific antibody that targets HER2 and activates T cells [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(19): 5561-5571. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3622-T.
- [81] HU S, FU W, XU W, et al. Four-in-one antibodies have superior cancer inhibitory activity against EGFR, HER2, HER3, and VEGF through disruption of HER/MET crosstalk [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(1): 159-170. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1670.
- [82] PEDERSEN M W, JACOBSEN H J, KOEFOED K, et al. Targeting three distinct HER2 domains with a recombinant antibody mixture overcomes trastuzumab resistance [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(3): 669-680. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0697.
- [83] FAN X, BREZSKI R J, DENG H, et al. A novel therapeutic strategy to rescue the immune effector function of proteolytically inactivated cancer therapeutic antibodies [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(3): 681-691. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0715.
- [84] ELSTER N, CREMONA M, MORGAN C, et al. A preclinical evaluation of the PI3K alpha/delta dominant inhibitor BAY 80-6946 in HER2-positive breast cancer models with acquired resistance to the HER2-targeted therapies trastuzumab and lapatinib [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 149(2): 373-383. DOI: 10.1007/s10549-014-3239-5.
- [85] PEREZ E A, DUECK A C, MCCULLOUGH A E, et al. Impact of PTEN protein expression on benefit from adjuvant trastuzumab in early-stage human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer in the North Central Cancer Treatment Group N9831 trial [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(17): 2115-2122. DOI: 10.1200/JCO.2012.42.2642.
- [86] CHIEN A J, COCKERILL A, FANCOURT C, et al. A phase 1b study of the Akt-inhibitor MK-2206 in combination with weekly paclitaxel and trastuzumab in patients with advanced HER2-amplified solid tumor malignancies [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2016, 155(3): 521-530. DOI: 10.1007/s10549-016-3701-7.

- [87] SAURA C, BENDELL J, JERUSALEM G, et al. Phase I b study of Buparlisib plus Trastuzumab in patients with HER2-positive advanced or metastatic breast cancer that has progressed on Trastuzumab-based therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(7): 1935-1945. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1070.
- [88] CAINO M C, GHOSH J C, CHAE Y C, et al. PI3K therapy reprograms mitochondrial trafficking to fuel tumor cell invasion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(28): 8638-8643. DOI: 10.1073/pnas.1500722112.
- [89] GHOSH J C, SIEGELIN M D, VAIRA V, et al. Adaptive mitochondrial reprogramming and resistance to PI3K therapy [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2015, 107(3). DOI: 10.1093/jnci/dju502.
- [90] ACEVEDO-GADEA C, HATZIS C, CHUNG G, et al. Sirolimus and trastuzumab combination therapy for HER2-positive metastatic breast cancer after progression on prior trastuzumab therapy [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 150(1): 157-167. DOI: 10.1007/s10549-015-3292-8.
- [91] ANDRE F, OREGAN R, OZGUROGLU M, et al. Everolimus for women with trastuzumab-resistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(6): 580-591. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70138-X.
- [92] RING A, WHEATLEY D, HATCHER H, et al. Phase I study to assess the combination of afatinib with trastuzumab in patients with advanced or metastatic HER2-positive breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(12): 2737-2744. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1812.
- [93] ALLEN L F, LENEHAN P F, EISEMAN I A, et al. Potential benefits of the irreversible pan-erbB inhibitor, CI-1033, in the treatment of breast cancer [J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(3 Suppl 11): 11-21. DOI: 10.1016/s0093-7754(02)70122-x.
- [94] KIM J, FOX C, PENG S, et al. Preexisting oncogenic events impact trastuzumab sensitivity in ERBB2-amplified gastroesophageal adenocarcinoma [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(12): 5145-5158. DOI: 10.1172/JCI75200.
- [95] ROWE D L, OZBAY T, BENDER L M, et al. Nordihydroguaiaretic acid, a cytotoxic insulin-like growth factor- I receptor/HER2 inhibitor in trastuzumab-resistant breast cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(7): 1900-1908. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0012.
- [96] ESPARIS-OGANDO A, OCANA A, RODRIGUEZ-BARRUECO R, et al. Synergic antitumoral effect of an IGF- I R inhibitor and trastuzumab on HER2-overexpressing breast cancer cells [J]. *Ann Oncol*, 2008, 19(11): 1860-1869. DOI: 10.1093/annonc/mdn406.
- [97] SAHIN O, WANG Q, BRADY S W, et al. Biomarker-guided sequential targeted therapies to overcome therapy resistance in rapidly evolving highly aggressive mammary tumors [J]. *Cell Res*, 2014, 24(5): 542-559. DOI: 10.1038/cr.2014.37.
- [98] MITTAL D, CARAMIA F, MICHELS S, et al. Improved treatment of breast cancer with anti-HER2 therapy requires interleukin-21 signaling in CD8⁺ T cells [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(2): 264-274. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1567.
- [99] GU S, HU Z, NGAMCHERDTRAKUL W, et al. Therapeutic siRNA for drug-resistant HER2-positive breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.7409. [Epub ahead of print].
- [100] SINGHA N C, NEKOROSKI T, ZHAO C, et al. Tumor-associated hyaluronan limits efficacy of monoclonal antibody therapy [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(2): 523-532. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0580.
- [收稿日期] 2016 - 04 - 18 [修回日期] 2016 - 04 - 29
[本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对文稿中实验动物描述的要求

根据国家科学技术部 1988 年颁布的《实验动物管理条例》和卫生部 1998 年颁布的《医学实验动物管理实施细则》,本刊对文稿中有关实验动物的描述,要求写清楚以下事项:(1)品种、品系及亚系的确切名称;(2)遗传背景或其来源;(3)微生物检测状况;(4)性别、年龄、体质量;(5)质量等级及合格证书编号;(6)饲养环境和实验环境;(7)健康状况;(8)对动物实验的处理方式。

医学实验动物分为四级:一级为普通级;二级为清洁级;三级为无特定病原体(SPF)级;四级为无菌级(包括悉生动物)。省部级课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。

(本刊编辑部)