

EGFR 基因突变与肿瘤靶向治疗

薛丽^a, 白玉杰^{b*} (海南医学院, a.科学实验中心; b.海南省干细胞研究所, 海口 571101)

摘要: 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)属于受体酪氨酸激酶超家族, 在多种恶性肿瘤中表达。配体与 EGFR 结合诱导形成二聚体和构象变化, 活化酪氨酸激酶及信号转导途径, 产生细胞增殖、浸润、转移及抗凋亡等效应。EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)类靶向药物, 如吉非替尼和厄洛替尼等已应用于临床。临床研究显示仅 10%~30%患者对 TKIs 敏感, 部分位于 EGFR 激酶结构域的活化突变与药物敏感性相关。检测 EGFR 基因突变有助于预测对药物敏感性和提高疗效。随着治疗绝大多数敏感的患者获得继发耐药性, 其中约半数有继发突变 T790M, 降低药物对靶分子的亲和力, 其他许多位于 EGFR 下游信号途径或旁激活途径的分子也参与耐药形成。因此, 未来个体化用药和准确预测敏感性, 不仅仅要分析 EGFR 基因, 而且要综合考虑下游和其他信号途径的基因, 如 PI3K, K-RAS, BRAF, MET 和 PTEN 等。

关键词: 表皮生长因子受体; 酪氨酸激酶抑制剂; 突变; 靶向治疗; 肿瘤

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)04-0311-04

Progress of EGFR Mutation and EGFR-targeted Therapy

XUE Li^a, BAI Yujie^{b*} (Hainan Medical College, a.Medical Research Center; b.Institute of Stem Cell of Hainan Province, Haikou 571101, China)

ABSTRACT: The epidermal growth factor receptor(EGFR) belongs to the super-family of receptor tyrosine kinase and is expressed in many malignancies. Upon their ligand-induced dimerization and conformational change, it initiates activation of intracellular tyrosine kinase and a vast array of cell signaling pathways. The cascade of intracellular activation results in cell proliferation, invasion, metastasis and decreased apoptosis. EGFR represents a critical player in many types of malignancies and becomes a natural goal of the targeted therapy. Both monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors (TKIs), such as erlotinib and gefitinib, have already entered clinical application. Clinical trials have shown that only 10%-30% of patients responded to the TKIs treatment. Further studies have found that some mutations within the kinase domain activated the kinase and conferred sensitivity to the treatments. The detection of mutations will likely predict the sensitive patients and improve the outcome of current EGFR-targeted therapy. During the treatment, the vast majority of responders developed acquired resistance. Roughly half the mutant EGFR cases with acquired resistance to TKIs have a secondary mutation (T790M) that reduces drug affinity to the kinase target. Many molecules on the downstream of EGFR or by-pass activating pathways also contribute to the drug resistance. In the future, patient-specific treatment approach will have to consider not only the EGFR itself, but also genes on downstream and compensatory pathways, such as PI3K, K-RAS, BRAF, MET and PTEN.

KEY WORDS: epidermal growth factor receptor; tyrosine kinase inhibitors; mutations; targeted therapy; tumor

靶向药物选择性作用于特定分子标志的肿瘤细胞, 较传统细胞毒化疗药物更为安全, 因而成为抗肿瘤新药开发和治疗的方向。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是迄今最为重要的靶分子, EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)吉非替尼和厄洛替尼、

拉帕替尼, EGFR 抗体类药物西妥昔单抗和帕尼单抗等已应用于临床。这些靶向药物的敏感性及耐药性与肿瘤细胞 EGFR 突变密切相关, 美国国立综合癌症网络(national comprehensive cancer network, NCCN)推荐在用 TKIs 药物前检测 EGFR 基因突变, 帮助筛选敏感的患者。近年来对 EGFR 功能、

基金项目: 海南省重点科技项目(080204)

作者简介: 薛丽, 女, 硕士, 副研究员 Tel: (0898)66891979
(0898)66963658 E-mail: yujiebai@163.com

E-mail: xueli-65@163.com *通信作者: 白玉杰, 男, 博士, 研究员 Tel:

基因突变与药物敏感性、耐药分子机制等进行了更深入研究, 本文将简要总结这些方面的新进展。

1 EGFR 功能及在肿瘤发生中的作用

EGFR 为受体酪氨酸激酶超家族成员, 是由 1 186 个氨基酸组成的跨膜糖蛋白, 含有 3 个主要的功能结构域: 细胞外的配体结合结构域; 跨膜结构域; 胞浆内的酪氨酸激酶结构域, 有高度保守的区域: ①N 端小叶(N-lobe): 其 ATP 磷酸结合环(P-loop)中的 GSGSFG 基序为 γ -磷酸基团的结合位点; ② α C 螺旋(α C-Helix): α -和 β -磷酸基团结合位点位于此, 对构象变化和自身磷酸化起关键作用; ③C 端小叶(C-lobe): 20~30 个氨基酸组成的

活化环(A-loop)为酪氨酸激酶的活性中心, 其中 DFG 基序与酶活性直接相关。结构见图 1。

表皮生长因子和转化生长因子等配体与胞外配体结合区结合后, EGFR, HER2, ErbB3 等 ErbB 家族成员形成同源或异源二聚体, 引起胞浆内酪氨酸激酶区蛋白构象改变, 与 ATP 结合而自身磷酸化, 进而活化下游信号分子。通过 PI3K, K-RAS, STAT3, STAT5, JAK2 和 PLC γ 等信号途径, 发挥维持细胞生长增殖、血管生成等多种生理功能, 见图 2。例如通过 PI3K 活化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT 或 PKB, 激活凋亡抑制蛋白 Caspase 9, 抑制凋亡促进细胞增殖^[1]。

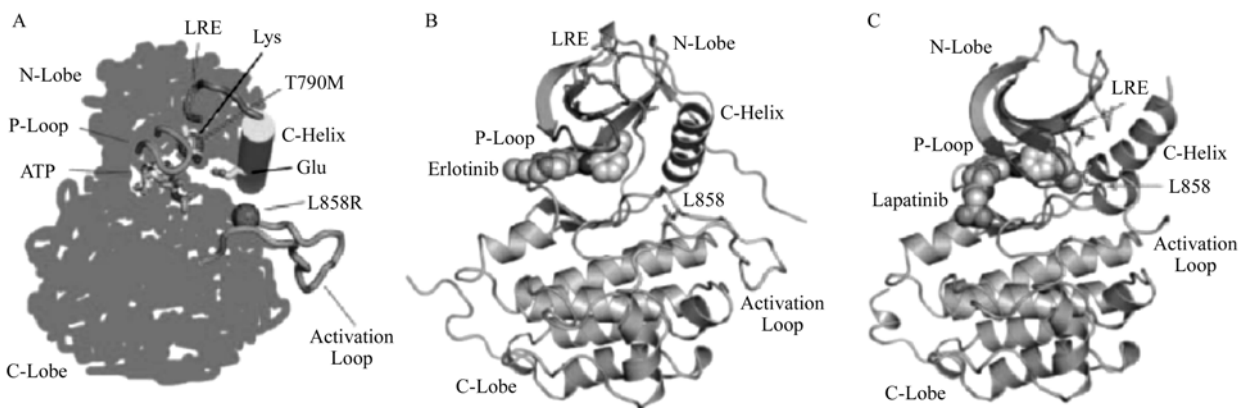


图 1 EGFR 酪氨酸激酶区域晶体结构

A-活化状态酪氨酸激酶功能结构域; B-小分子 TKI 吉非替尼结合于 TK 区的晶体结构; C-小分子 TKI 拉帕替尼结合于 TK 区的晶体结构

Fig 1 EGFR tyrosine kinase (TK) crystal structures

A-illustration of the active-state locations of the major structural regions of EGFR-TK; B-crystal structure of EGFR-TK in complex with erlotinib; C-crystal structure of EGFR-TK in complex with lapatinib

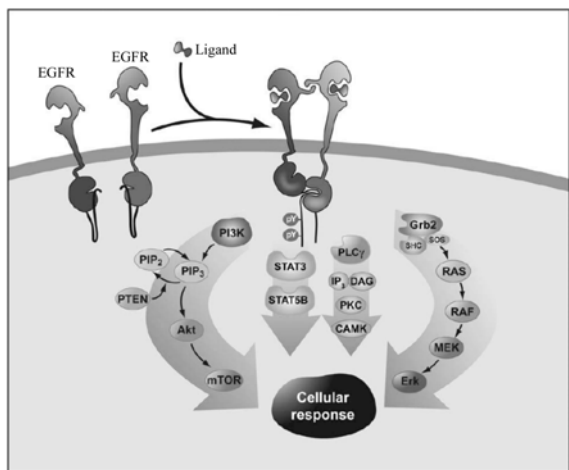


图 2 EGFR 活化及信号转导途径

Fig 2 Activation mechanisms and signaling pathways engaged by EGFR

EGFR 活性增高或持续性活化, 促使细胞过度增殖和肿瘤发生, 与肿瘤浸润、转移、新生血管生成、抗凋亡等肿瘤细胞学行为密切相关^[2]。EGFR 在多种肿瘤中高表达, 如 40%~80%肺癌、14%~91%乳腺癌、33%~74%胃癌、40%~80%前列腺癌及 36%~100%的头颈部肿瘤等^[3]。表达水平越高, 恶性程度越高, 预后越差, 因而 EGFR 成为重要的肿瘤治疗靶分子。

TKIs 靶向药物吉非替尼和厄洛替尼竞争性结合 EGFR 胞浆内酪氨酸激酶 ATP 结合位点, 阻断受体自身磷酸化及下游信号分子活化, 诱导肿瘤细胞凋亡^[4]。2003 年美国批准用于治疗晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC), 约 20%的 NSCLC 获得显著疗效, 大剂量治疗仅出现

暂时性痤疮样皮疹和腹泻等轻微不良反应，而未发生细胞毒化疗药物的骨髓抑制和神经病变等严重不良反应，被认为具有高效安全的优势。

2 药物敏感性相关 EGFR 基因突变

2003 年两项大规模临床研究 IDEAL1 和 IDEAL2，结果显示仅 8.8%~19% NSCLC 患者对吉非替尼敏感^[5]。发现肿瘤组织类型、性别、吸烟及种族等因素与药物敏感性相关，分别为腺癌>鳞癌、女性>男性、不吸烟者>吸烟者、亚洲人>欧美人^[6]。2004 年 Lynoh 和 Paeg 最先报道药物敏感性相关 EGFR 基因突变，之后相继发现和证实了多种突变并揭示其机理。

人 EGFR 基因位于染色体 7p12-14，由 24 个外显子组成，第 18~24 外显子编码 TK 功能区，第 18~20 外显子编码 N-loob，第 21-24 外显子编码 C-lobe。TKI 药物敏感性相关突变集中于第 18~21 外显子。约 49% 为第 19 外显子 746~752 位密码子区域的缺失突变，其中 80% 以上有亮氨酸(L)-精氨酸(R)-谷氨酸(E)-丙氨酸(A)基序缺失，LREA 基序位于 ATP 结合口袋(ATP-binding pocket, ABP)的侧壁，是小分子 TKI 作用位点。LREA 缺失引起 ABP 角度和形状改变，与 TKI 的结合更为稳定，因而药物的抑制作用增强。约 45% 为第 21 外显子的点突变 L858R(858 位亮氨酸突变为精氨酸)，临近 A-Loop 高保守区域，突变提高了 A-Loop 的稳定性，使 TK 活性较野生型高 20 倍。其他频率较低的突变包括 18 外显子 G719S 和 21 外显子 L861Q 等。这些突变从两方面影响对 TKI 的敏感性。一方面，突变导致配体非依赖性活化或配体结合后 TK 活性升高或作用时间延长，具有促进肿瘤生长作用。体外实验发现 L858R 和 exon19 del 突变成纤维细胞可转化为肺癌细胞^[7]，突变细胞优先活化生存相关的 STST3，STAT5 和 AKT 途径。突变的肿瘤细胞更高度依赖 EGFR 信号途径^[8]。另一方面，突变使药物亲和力增高，作用时间延长。如体外实验完全阻断 L858R 突变细胞株 EGFR 磷酸化仅需 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 吉非替尼，而野生型细胞株则需要 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，敏感性增高 100 倍^[9]。两方面效应共同增加突变细胞对 TKI 药物的敏感性。

在多个国家、地区和人群中进行的一系列临床研究，证实了 EGFR 基因突变预测 TKI 药物敏

感性和指导用药的价值，例如：吉非替尼治疗 NSCLC 的总有效率为 10%~30%，基因突变者有效率为 75%~95%，无基因突变者小于 10%。与铂类和紫杉醇化疗相比，EGFR 基因突变者单用吉非替尼疗效优于化疗，而野生型肿瘤则不如化疗效果^[10]。用药前分析 EGFR 基因突变状态，有助于筛选对 TKIs 敏感的患者，提高治疗的有效率。因此，NCCN 将 EGFR 基因突变检测列入肿瘤临床实践指南。

3 耐药相关基因突变及耐药分子机理

尽管大部分 EGFR 基因突变肿瘤采用 TKI 获得良好的短期疗效，但仍有 30% 患者无效，且随着治疗逐渐产生耐药，最终几乎所有患者继发耐药。在约半数继发耐药患者发现了 EGFR 第 20 外显子 T790M 突变，第 790 位苏氨酸位于 ABP 中，当被体积更大的蛋氨酸替换后，与吉非替尼结合的芳香环结构被破坏，阻碍药物分子的结合而失去对 TK 的抑制功能^[11]。T790M 突变一方面影响底物结合特异性，使得 EGFR 处于更易激活的状态^[12]。另一方面通过逃避负调控而延长活化时间。生理情况下 EGFR 活化后自身磷酸化，泛素连接酶 CBL 识别磷酸化的 1045 位酪氨酸残基(Y1045)，与磷酸化 EGFR 结合并引发溶酶体降解，从而控制 EGFR 活化的时限。T790M 突变使自身磷酸化选择不同于野生型的酪氨酸位点，CBL 无法识别其磷酸化状态，失去负调控而导致活化状态延长^[13]。此两方面效应使得 T790M 成为最主要的耐药相关基因突变。

在继发耐药的肿瘤组织中除 T790M 突变外，还发现 PI3K，K-RAS，BRAF 等下游分子的基因突变^[14]，以及 MET 基因扩增和 PTEN 表达水平降低等旁路激活途径分子异常。PI3K，K-RAS，BRAF 等处于 EGFR 下游，突变导致绕过 EGFR 的异常活化，不依赖 EGFR 而维持肿瘤细胞生长^[15]。MET 通过形成杂合二聚体切换酪氨酸激酶途径，直接活化下游的 PI3K 和 AKT^[16]。PTEN 为肿瘤抑制基因，抑制 PI3K 的活化，PTEN 水平降低则 PI3K 不依赖 EGFR 持续活化，见图 2。体外实验中增高耐药细胞株 PTEN 表达水平可恢复对 TKI 药物敏感性，表明 PTEN 水平与耐药相关^[17]。

耐药机制还涉及肿瘤异质性、克隆选择、逃

避机制以及冗余信号途径及信号途径间相互作用等复杂分子机制。例如, 肿瘤由多个不同细胞亚群组成, 在局部微环境如缺氧、炎症反应、药物治疗等选择压力作用下, 通过克隆选择机制使耐药克隆逐步成为优势克隆^[18-19]。另外肿瘤细胞可同时表达多个 ErbB 家族受体(如 EGFR, HER2, ErbB3), 单纯抑制 EGFR 不能有效抑制肿瘤细胞生长。EGFR 和 COX2 在许多肿瘤同时升高, EGFR 活化 MAPK 而增加 COX2 转录, 诱导生成前列腺素 PEG2 等, 后者又诱导 EGFR 配体双调蛋白(amphiregulin)的表达活化 EGFR, 从而形成相互促进的正反馈^[20], 此时采用 COX2 抑制剂塞米考昔与吉非替尼联合治疗取得更佳效果。因此, 联合应用针对不同靶分子的靶向药物有可能是克服耐药性的策略。

4 结论

靶向药物选择性抑制靶分子, 基因检测帮助选择特定基因型肿瘤细胞, 描绘了未来个体化治疗的前景。由于肿瘤的复杂性, 单纯检测 EGFR 基因突变仍有较大局限性, 为提高靶向药物疗效, 需综合分析 EGFR 及其下游基因、相互作用基因, 并考虑肿瘤异质性问题。未来通过高通量测序、基因芯片等基因组学新技术, 有望实现更为精确的预测, 并根据基因组信息制订联合治疗方案获得最佳疗效。

REFERENCES

[1] NAUTIYAL J, YU Y, ABOUKAMEEL A, et al. ErbB-inhibitory protein: a modified ectodomain of epidermal growth factor receptor synergizes with dasatinib to inhibit growth of breast cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(6): 1503-1514.

[2] HUANG P H, MUKASA A, BONAVIA R, et al. Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(31): 12867-12872.

[3] NORMANNO N, MAIELLO M R, DE LUCA A. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors(EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 194(1): 13-19.

[4] ENGELMAN J A, JANNE P A. Factors predicting response to EGFR tyrosine kinase inhibitors [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2005, 26(3): 314-322.

[5] FUKUOKA M, YANO S, GIACCONE G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for

previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. The IDEAL 1 trial [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(12): 2237-2246.

[6] PAEZ J G, JANNE P A, LEE J C, et al. EGFR mutations in lung cancer correlation with clinical response to gefitinib therapy [J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1497-1500.

[7] WON Y W, HAN J Y, LEE G K, et al. Comparison of clinical outcome of patients with non-small-cell lung cancer harbouring epidermal growth factor receptor exon 19 or exon 21 mutations [J]. *J Clin Pathol*, 2011, 64(11): 947-952.

[8] SINGH D K, KU C J, WICHAIDIT C, et al. Patterns of basal signaling heterogeneity can distinguish cellular populations with different drug sensitivities [J]. *Mol Syst Biol*, 2010(6): 369.

[9] PAEZ J G, JANNE P A, LEE J C, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy [J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1497-1500.

[10] MOK T S, WU Y L, THONGPRASERT S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2009(361): 947-957.

[11] MUMENTHALER S M, FOO J, LEDER K, et al. Evolutionary modeling of combination treatment strategies to overcome resistance to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(6): 2069-2079.

[12] TIBALDI C, GIOVANNETTI E, VASILE E, et al. Inherited germline T790M mutation and somatic epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer patients [J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(2): 395-396.

[13] CAI C Q, PENG Y, BUCKLEY M T, et al. Epidermal growth factor receptor activation in prostate cancer by three novel missense mutations [J]. *Oncogene*, 2008, 27(22): 3201-3210.

[14] SEQUIST L V, WALTMAN B A, DIAS-SANTAGATA D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(75): 75ra26.

[15] LAURENT-PUIG P, CAYRE A, MANCEAU G, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(35): 5924-5930.

[16] KONO S A, MARSHALL M E, WARE K E, et al. The fibroblast growth factor receptor signaling pathway as a mediator of intrinsic resistance to EGFR specific tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer [J]. *Drug Resist Updat*, 2009, 12(4/5): 95-102.

[17] JHAWER M, GOEL S, WILSON A J, et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(23): 1953-1961.

[18] ZHOU W, ERCAN D, CHEN L, et al. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M [J]. *Nature*, 2009(462): 1070-1074.

[19] SERGINA N V, RAUSCH M, WANG D, et al. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3 [J]. *Nature*, 2007(445): 437-441.

[20] O'BYRNE K J, DANSON S, DUNLOP D, et al. Combination therapy with gefitinib and rofecoxib in patients with platinum-pretreated relapsed non small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(22): 3266-3273.

收稿日期: 2011-08-25