

T790M 的起源、遗传易感性和体内自然选择

评价者: 余细勇^{1a}

文献合成者: 陈思远^{1b, 2}

(1. 广东省人民医院 a. 医学研究中心; b. 肿瘤中心; 2. 广东省肺癌研究所, 广州 510080)



余细勇, 男, 1962 年生, 医学博士、研究员、教授, 从 1997 年起先后担任广东省心血管病研究所硕士生导师、博士生导师和博士后合作导师, 2004 年起担任南方医科大学博士生导师, 2006 年起担任汕头大学医学院博士生导师。曾先后留学于香港大学医学院和美国贝勒医学院从事博士后及国际合作研究工作。主要社会兼职: 美国药理学与实验治疗学会 (ASPET) 外籍委员, 广东省药理学会常务副理事长, 中国药理学学会理事, 中国药理学学会临床药理专业委员会委员, 中国药理学学会心血管专业委员会委员, 美国心脏学会 (AHA) 会员, 国际心脏研究会 (ISHR) 中国分会执委, 中国病理生理学会心血管专业委员会秘书长, 广东省中西医结合学会副会长, 中国中西医结合学会理事, 广东省中西医结合学会中青年工作委员会副主任委员。主要从事临床药理学和分子药理学研究, 先后在国际著名期刊《Circulation Research》、国内核心期刊《中华医学杂志》等学术刊物上发表论文 300 多篇, 其中 SCI 论文 40 多篇, 累计 SCI 影响因子超过 100 分。参与编写学术专著 6 部。近年来承担国家

自然科学基金、国家 973 计划子课题、省自然科学基金和科技攻关项目 20 多项。先后获广东省医药卫生科技进步奖 5 项 (其中一等奖 1 项、二等奖 1 项、三等奖 3 项), 广东省科技进步二等奖 3 项。申请国家发明专利 8 项, 已获授权发明专利证书 6 项。到目前为止, 共培养硕士、博士研究生及博士后 20 多人。先后被授予广东省卫生系统“五个一科教兴医工程”学术与技术带头人, “全国中西医结合优秀中青年科技工作者”称号, 葛兰素优秀青年医师奖, 广东省十大杰出青年提名奖, 国务院政府特殊津贴专家, 第八届广东省丁颖科技奖, 广东省省直机关岗位排头兵。

[关键词] 非小细胞肺癌; 酪氨酸激酶抑制剂; 获得性耐药; T790M 突变; 遗传易感性

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-5144(2008)04-0205-05

The Origin, Inherited Susceptibility and Nature Selection in Vivo of T790M // Reviewer: YU Xi-yong^{1a}, Literature Co-worker: CHEN Si-yuan^{1b, 2}

Key words: non-small cell lung cancer; tyrosine kinase inhibitors; acquired resistance; T790M mutation; inherited susceptibility

Reviewer's address: Medical Research Centre, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China

1 文献来源

Bell WD, Gore I, Okimoto AR, et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR[J]. Nat Gene, 2005, 37(12): 1315-1316.

Balak NM, Gong Y, Riely JG, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(21): 6494-6501.

Jackman DM, Holmes AJ, Lindeman N, et al. Response and resistance in a non-small-cell lung

cancer patient with an epidermal growth factor receptor mutation and leptomeningeal metastases treated with high-dose Gefitinib[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(27): 4517-4520.

2 证据水平

2b。

3 背景

• 研究一：酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKI)在部分非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者,尤其是非吸烟者、妇女和患腺癌伴有支气管肺泡分化者中取得了较好的疗效。以往研究认为,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) T790M突变是在应用TKI治疗后出现的继发突变。然而在另一些研究中发现,从未给予TKI治疗的NSCLC患者中,也可发现T790M突变。

• 研究二：肺腺癌患者应用TKI治疗后可继发EGFR T790M突变,而T790M突变常见于TKI治疗获得性耐药患者。

• 研究三：晚期NSCLC伴脑转移病人应用常规剂量的吉非替尼治疗常达不到理想的疗效。

4 目的

探讨EGFR基因20外显子T790M突变的起源、遗传易感性及体内自然选择过程。

5 研究设计

• 条件:

研究一: Massachusetts General Hospital Cancer Center and Department of Pathology, Harvard Medical School 和 Bruno Cancer Center, St. Vincent's Hospital。

研究二: Department of Medicine, Weill Medical College of Cornell University。

研究三: Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute; Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital; Harvard Medical School。

• 研究方法:

研究一: 反转录PCR, 基因测序, 家系分析等。

研究二: 限制性片段多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP), 反转录PCR, 基因测序, 免疫印迹和细胞生长抑制分析等。

研究三: 腰椎穿刺脑脊液分析, 血清转氨酶测定, CT、MRI等影像学分析, 体外肿瘤细胞药物抑制分析, 基因测序, 变性高效液相色谱(denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)检测。

• 研究对象:

研究一: 3代8人中6位患肺泡细胞癌的欧洲家庭, 肿瘤样本来源为-1手术切除的左肺5个独立原发病灶, -2肺癌转移病灶, -3和-4外周血单核细胞, 其中-1为TKI治疗有效, -2为TKI治疗耐药。

研究二: 16位接受TKI治疗的肺腺癌病人, 1例TKI治疗耐药的多发肿瘤病例尸体解剖样本。

研究三: 一位患晚期肺腺癌伴癌性胸腔积液, 纵隔、肝、骨、中枢神经系统多发转移的病人。

• 干预措施:

研究一: 将该家系中的-1和-2的肿瘤标本进行EGFR基因序列分析。

研究二: 将16例病人的肿瘤样本进行RFLP分析, 并对新发现的EGFR D761Y突变进行功能分析。

研究三: 对病人的肿瘤样本进行DNA序列分析, 发现EGFR 19外显子缺失突变, 并且是对吉非替尼治疗的敏感性突变, 2004年1月起给予6个周期的卡铂、紫杉醇、吉非替尼(250 mg/d)。并通过腰椎穿刺抽取脑脊液, 取得癌细胞, 建立该病人的DFCILU-011细胞系。2004年6月评价疗效, 发现出现多发性脑转移, 而全身其他部位的病灶得到控制。病人继续予吉非替尼单药治疗并接受40 Gy的全脑放疗。尔后按照病情变化以及脑脊液中吉非替尼浓度变化逐步加大吉非替尼剂量至1 250 mg/d。病人死亡后取其肠、肺、肝、软脑膜病灶进行基因测序及DHPLC分析。

• 评价指标: EGFR T790M突变分析。

6 主要结果

研究一: DNA测序发现-1、-2样本均有T790M杂合性突变, 同时-3和-4外周血单核细胞也发现相同的突变。同时将-1的5个独立原发灶和-2的转移病灶的石蜡包埋切片提取RNA, 并通过RT-PCR获得cDNA进行序列分析, 结果如表1。

研究二:

(1) 16个TKI治疗耐药病人中有8个存在肿瘤

表 1 家系 EGFR T790M 突变的等位基因分析

病人	肿瘤	体细胞突变	克隆数	克隆比例 (%)	
				突变型	野生型
-1	1	L858R	11	82	18
	2	None	-		
	3	L858R	25	100	0
	4	delL747-T751	22	82	18
	5	None	-		
-2	1	G719A	23	78	22
合计			81	86	14

细胞 EGFR 基因二次突变, 其中 7 个为 T790M 突变, 1 个为在脑转移病灶中新发现的 D761Y 突变。

(2) D761Y 突变是 EGFR 761 位的酪氨酸被天冬氨酸替代, 而该病人的外周血细胞中未发现该突变。

(3) D761Y 突变的生化及生理学性质: D761Y 及 L858R 都存在时 EGFR 激酶活性与只有 L858R 存在时无差异。D761Y 及 L858R 都存在较只有 L858R 存在时吉非替尼对 293T 细胞系生长的抑制能力有所下降。构建只存在 L858R、同时存在 D761Y 及 L858R 以及同时存在 T790M 及 L858R 的 Ba/F3 细胞系, 通过不同浓度的吉非替尼对该细胞系抑制效果比较, 同时存在 T790M 及 L858R 较其他两组更易发生耐药。同时存在 D761Y 及 L858R 较只存在 L858R 时, 吉非替尼抑制细胞生长效果更差。

(4) 对一个 TKI 治疗耐药的多发肿瘤病例尸体解剖样本进行 DNA 序列分析, 肺、纵隔、肝、肾上腺病灶均可见 A750P 突变合并 T790M 突变, 而脑病灶仅见 A750P 突变。

研究三:

(1) 取该病人肿瘤样本进行 DNA 序列分析, 结果为 EGFR 19 外显子缺失突变, 与吉非替尼治疗敏感性相关。

(2) 取该病人胸腔积液建立 DFCILU-011 细胞系, 吉非替尼对该细胞系的半抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC_{50}) 为 10~50 nmol/L。

(3) 主要影像学检查结果: 2004 年 6 月发现多发性脑转移但全身其他病灶均得到控制; 2004 年 9 月发现颅内进展性转移合并软脑膜侵犯但其他病灶无明显变化; 2004 年 11 月颅内病灶有所缩小但软脑膜侵犯无变化; 2004 年 12 月颅内仅存轻微的软脑膜侵犯。

(4) 在治疗过程中, 增大吉非替尼的剂量, 脑脊液中吉非替尼的浓度如表 2。

表 2 吉非替尼剂量、脑脊液吉非替尼浓度以及脑脊液细胞学检查结果的关系

日期	吉非替尼剂量 (mg)	脑脊液吉非替尼浓度 (nmol)	脑脊液细胞学检查结果
2004-09-05	500	6.2	-
2004-09-21	500	18	+
2004-10-13	750	31	+
2004-11-23	750	NA	+
2004-12-15	1 000	42	-
2005-01-07	1 000	42	-
2005-02-16	1 250	39	NA

(5) 病人因 NSCLC 进展于 2005 年 3 月死亡。

(6) 取病人尸体解剖肠、肺、肝、软脑膜转移病灶样本, 进行 EGFR 18-21 外显子 DHPLC 及基因测序分析。肠、肺、肝样本均可发现 T790M 突变, 而在未予吉非替尼治疗的肿瘤样本和中枢神经系统肿瘤样本中均未发现该突变。

7 结 论

研究一: 该肺泡细胞癌家系的遗传易感性可能与 EGFR T790M 耐药突变有关, 见图 1。

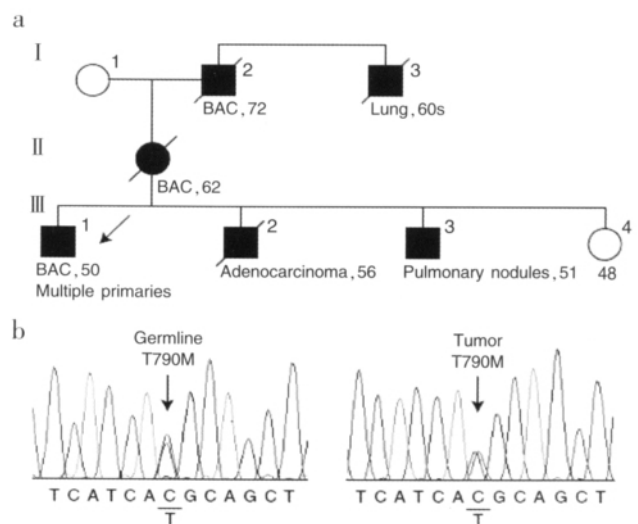


图 1 肺泡细胞癌家系分析

研究二: T790M 突变常见于获得性 TKI 治疗耐药的病人, TKI 耐药突变的类型和性质与肿瘤的解剖位置和 TKI 抑制的靶点有关。

研究三: 增加给药剂量可提高吉非替尼在脑脊液中的浓度, 达到治疗 NSCLC 脑转移的目的。给予吉非替尼治疗后, 病人肠、肝、肺等肿瘤病灶出现 T790M 突变而在中枢神经系统中未见该突变的原因可能是 T790M 突变在中枢神经系统病灶中缺乏长期存在优势, 见图 2。

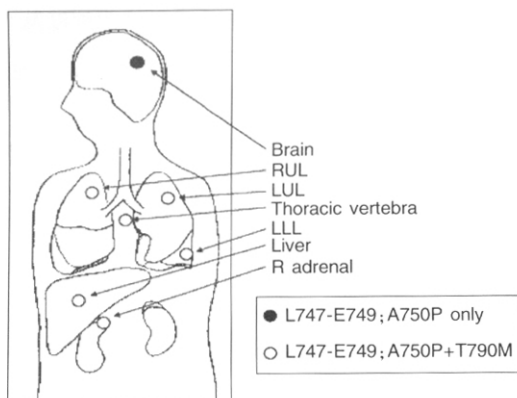


图2 多发转移患者的肿瘤异质性

8 评论

肺癌的治疗已从化疗时代转向分子靶向治疗时代,攻击肺癌细胞的靶点涉及到多个方面,包括:酪氨酸激酶抑制剂(TKI)、新生血管抑制剂、维甲酸受体(RXR)抑制剂、蛋白酶小体抑制剂、环氧合酶2(Cox 2)抑制剂、叶酸抑制剂等。在 NSCLC 患者中,有高达 40%~80%的比例发生 EGFR 过量表现(其中鳞癌为 85%,腺癌和大细胞癌为 65%),而小细胞肺癌罕见 EGFR 表达,20%~30%NSCLC 患者还伴有人表皮生长因子受体-2(Her2)的过表达。

在所有的分子靶向治疗剂中,酪氨酸激酶抑制剂倍受关注,其作用靶点是酪氨酸蛋白激酶(PTK)。TKI 抑制细胞膜表面 EGFR 细胞内众多酪氨酸激酶的自磷酸化作用,阻断肿瘤细胞信号的传导,抑制肿

瘤细胞的发展,诱导其凋亡。TKI 主要有 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂和 Bcr-Abl(一种下调肿瘤激酶)酪氨酸激酶抑制剂两种,前者主要用于 NSCLC 的治疗,后者主要用于慢性粒细胞性白血病和胃肠间质瘤。

目前针对信号传导分子-蛋白激酶而设计的 EGFR-TKI 主要有三种:吉非替尼(Gefitinib,商品名 Iressa)、埃罗替尼(Erlotinib,商品名 Tarceva)和拉帕替尼(Lapatinib,为 EGFR 和 Her2 双重抑制剂)。虽然 NSCLC 高表达 EGFR,但是临床试验显示吉非替尼治疗非小细胞肺癌在西方人群只有 10%左右的患者有反应,而东方人群接受吉非替尼治疗的临床疗效却高达 20%~30%。为何吉非替尼的疗效比理论预期值明显偏低,并且出现种族差异?推究其原因,后来发现原来吉非替尼只对带有 L858R 氨基酸改变或 L747-A750 缺失这两种突变形式造成的 EGFR 蛋白过量表现有明显的抑制效果,这种体细胞突变最常发生于腺癌、非吸烟者、亚洲人和女性。于是,研究非小细胞肺癌患者身上携带的 EGFR 突变是否异常便成为临床医师决定采用吉非替尼进行化学治疗的指征。

为何突变的受体对 TKI 更敏感?正常情况下,EGFR 与 EGF 或其他配体(如 TGF α)结合后,被激活形成二聚体,活化内源性酪氨酸激酶,EGFR 胞内酪氨酸残基发生自磷酸化,EGFR 激活后可激活许多的下游信号途径,如 PI3K-Akt、JAK-STAT、raf-MEK-erk/MAPK 等途径(见图3)。而在 EGFR 突变

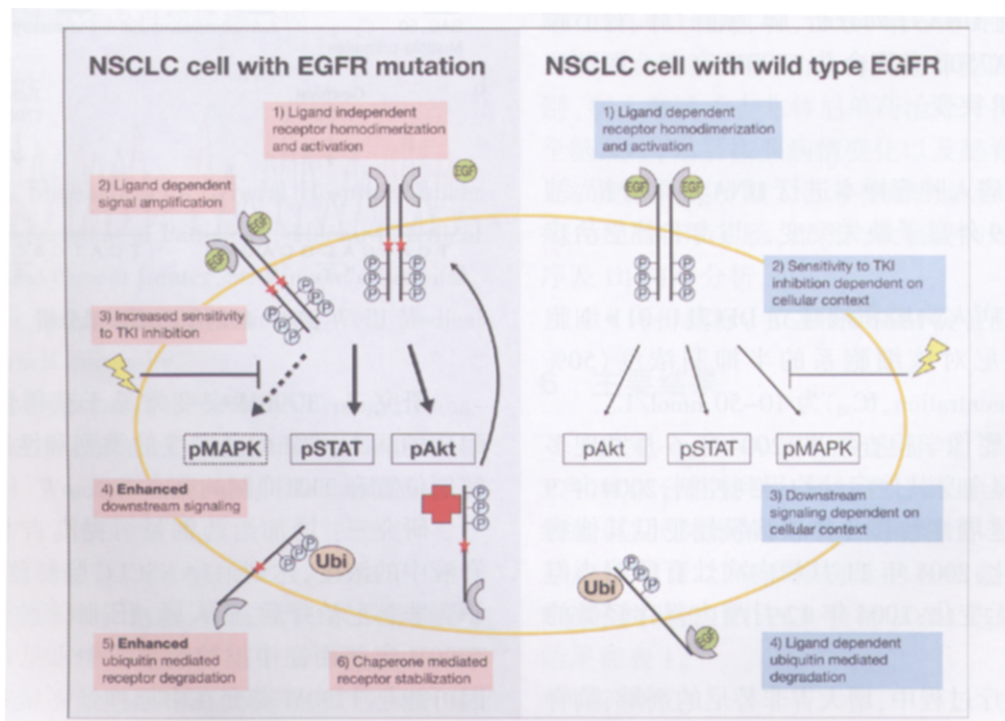
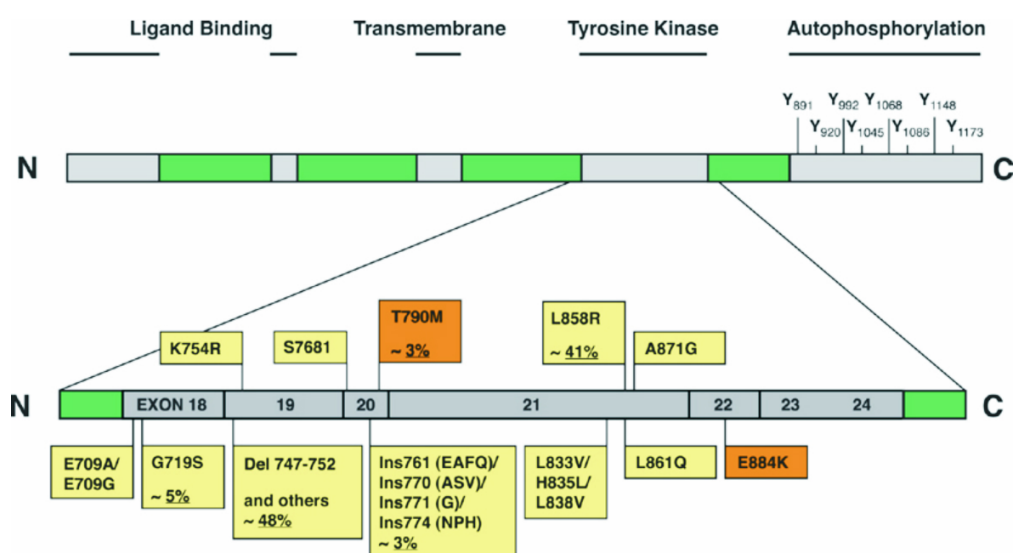


图3 NSCLC 伴有 EGFR 突变与正常野生型受体的信号传导差异示意图

状态下, 配体依赖的 raf-MEK-erk/MAPK 途径受阻, 非配体依赖的 PI3K-Akt 途径起主要作用并呈现持续活化状态, 作用于胞内段激酶的药物 (如吉非替尼) 就能对仍处于高活性状态的 PI3K-Akt 发挥抑制作用。此外, 泛素(ubiquitin, Ubi)介导的受体降解在正常情况下是配体依赖的, 在突变状况下则是非受体依赖的; 而且依赖于分子伴侣 Hsp90(图中红色十字架)的受体成熟受到 PI3K-Akt 信号的调控。因此, 突变的 EGFR 对 TKI 更敏感。

然而, 科学界才替 TKI 药物吉非替尼找到新的出路, 却又遭遇到癌细胞的反扑。Shih 等^[1]首先报道在 EGFR-L858R 突变所致药物敏感的

NSCLC 腺癌病人中获得了 T790M 突变, 正是该突变导致了病人对吉非替尼的耐药。接着 Bell 等^[2]报道一个具有 NSCLC 的遗传家族, 6 个肿瘤患者中的 4 个发现 T790M 突变, 显示药物耐受性的遗传特征。EGFR-T790M 突变导致吉非替尼的耐药随后被进一步的人群研究所证实^[3, 4]。针对这一新的情况, 研究人员进一步探究发现, 不同于 L858R 或 L747-A750 使得 EGFR 成为 Gefitinib 的作用目标, T790M 的点突变却使 EGFR 能躲过 Gefitinib 的攻击, 因此带有 EGFR 在 T790M 位置突变的癌细胞反而能突破 Gefitinib 的重围而不断生长^[5, 6], 见图 4。



L858R 点突变的发生率为 41%, Del747-752 缺失突变的发生率为 48%; 对 Gefitinib 耐药的突变主要为 T790M, 对 Erlotinib 耐药的突变则包含 T790M 和 E884K。

图 4 NSCLC 的主要 EGFR 突变示意图

正所谓“成也突变, 败也突变”, 新的人类与疾病的斗争总是波浪式的前进。EGFR-T790M 点突变的发现, 一方面为我们预测药物疗效增添了新的 Biomarker, 另一方面新的突变或许能成为抗癌新药开发的潜在靶标。

[参考文献]

- [1] Shih JY, GOW CH, Yang PC. EGFR mutation conferring primary resistance to Gefitinib in non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2005, 353: 207-208.
- [2] Bell DW, Gore I, Okimoto RA, et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR[J]. Nat Genet, 2005, 37: 1315-1316.
- [3] Jackman DM, Holmes AJ, Lindeman N, et al. Response and

resistance in a non-small-cell lung cancer patient with an epidermal growth factor receptor mutation and leptomeningeal metastases treated with high-dose Gefitinib[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(27): 4517-4520.

- [4] Balak MN, Gong Y, Riely GJ, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-Mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(21): 6494-6501.
- [5] Suzuki T, Mitsudomi T, Hida T. The impact of EGFR mutation on Gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer [J]. Personalized Med, 2004, 1: 27-34.
- [6] Irmer D, Funk JO, Blaukat A. EGFR kinase domain mutations-functional impact and relevance for lung cancer therapy[J]. Oncogene, 2007, 26: 5693-5701.

[收稿日期] 2008-08-04