

基因检测与分子靶向药物的疗效预测和预后判断的关系

Relationship of Gene Detection with Efficacy Prediction and Prognosis Assessment to Molecular Target Agents // YAO Yi, SONG Qi-bin

姚 颐, 宋启斌

(武汉大学人民医院, 湖北 武汉 430060)

摘 要: 药物基因组学的蓬勃兴起为肿瘤的个体化治疗带来了新的契机, 虽然获得了丰硕的成果, 但人们已经不能满足于肿瘤分子靶向药物的治疗现状。诸如表皮生长因子受体(EGFR)、K-ras、Her-2、PI3K、BRAF、c-kit 等靶向药物疗效预测和预后因子的基因检测, 成为了指导“个体化”肿瘤靶向治疗的关键。文章就当前上述基因检测应用的现状和进展作一综述, 浅论基因检测与分子靶向治疗疗效的预测和预后的关系。

主题词: 分子靶向药物; 表皮生长因子受体; K-ras; 基因检测; 靶向治疗

中图分类号: R73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)12-0909-04

在循证医学的推动下, 基因组学、蛋白质组学和代谢组学等生命科学通过与医学交融、转化, 陆续在肿瘤个体化治疗领域建立了一套日益完善的操作规范。大量患者从中获益, 各种基于循证医学的多中心、大样本、随机双盲的研究结果, 共同提示基因检测用于肿瘤靶向治疗和个体化化疗, 不仅是肿瘤医学领域的革命, 也将诊断病理学带入了分子病理、个体化治疗的新时代^[1]。

与传统的肿瘤放化疗相比, 分子靶向治疗可以根据肿瘤与正常组织的差异, 达到只攻击肿瘤细胞而几乎不影响正常细胞的目的, 因而不仅抗肿瘤效果突出, 而且不良反应小。分子靶向治疗的核心, 就是针对可能导致癌变的生物学行为, 包括细胞信号通路的异常活化、肿瘤血管的生成、细胞因子及其受体的高表达等, 从分子水平进行干预, 达到抑制肿瘤生长的目的^[2]。近年来, 肿瘤靶向治疗药物的开发和临床研究正在蓬勃开展, 其中不少已经成功上市, 然而靶向药物的有效性主要取决于肿瘤细胞相关靶点的特性, 靶分子的表达情况或突变状态影响药物的疗效。同一肿瘤在不同个体间由于基因型不同或基因表达差异, 可能导致对同一药物的反应性不同, 因此确定靶向治疗前的分子诊断显得尤为重要^[3]。本文就目前常用的靶向药物, 浅论基因检测与分子靶向治疗疗效的预测和预后的关系。

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2011CDB488)

通讯作者: 宋启斌, 主任医师, 教授, 博士; 武汉大学人民医院肿瘤中心, 湖北省武汉市武昌张之洞路(430060); E-mail: qib-insong@yahoo.cn。

收稿日期: 2012-09-18

1 表皮生长因子受体、K-ras 检测与酪氨酸激酶抑制剂治疗

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) 是原癌基因 *c-erbB1* 的表达产物, 是表皮生长因子受体家族(Her)成员之一。该家族包括 Her-1 (erbB1, EGFR)、Her-2 (erbB2, NEU)、Her-3 (erbB3) 及 Her-4 (erbB4), 在细胞生理过程中发挥重要的调节作用。EGFR 本身具有酪氨酸激酶活性, 一旦与表皮生长因子(EGF)结合则可启动核内的相应基因, 促进细胞分裂增殖。EGFR 的异常高表达可见于多种恶性肿瘤, 并与肿瘤细胞的恶性生物学行为以及患者的不良预后密切相关。其跨膜信号通路的酪氨酸激酶抑制剂(TKI)可抑制激活 EGFR 的酪氨酸激酶活性, 从而阻断 EGFR 的功能^[2]。

以吉非替尼(gefitinib, 易瑞沙 iressa)、厄洛替尼(erlotinib, 特罗凯 tarceva)、埃克替尼(icotinib, 凯美纳 conmana)为代表的 TKI, 是目前肺癌治疗领域重要的靶向治疗药物。研究结果提示 TKI 对晚期非小细胞肺癌(NSCLC)患者中女性、不吸烟、腺癌、EGFR 基因突变型患者疗效显著^[4]。其中与 TKI 疗效相关的 EGFR 突变主要涉及在第 719 位处的甘氨酸向丝氨酸的置换突变(G719S, exon 18)、第 858 位处的亮氨酸向精氨酸的置换突变(L858R, exon 21)以及 exon 19 的缺失突变等。对 EGFR 突变型肿瘤, TKI 的有效率高达 80% 以上, 而对野生型肿瘤则基本无效^[5]。因此自 2009 年始, 美国国立综合癌症网络

(NCCN)临床操作指南将 *EGFR* 基因拷贝数和突变状态检测纳入常规检测项目,作为 TKI 靶向治疗适应证选择的指标,根据 *EGFR* 基因检测结果,可将 TKI 作为晚期 NSCLC 的一线治疗方案。2010 年 ASCO 年会上 Rosell 等报道的研究表明,在 *EGFR* 基因第 790 位处的苏氨酸向甲硫氨酸的置换突变(T790M, exon 20)不仅导致了肿瘤细胞对 EGFR-TKI 产生耐药,甚至还导致肿瘤细胞生长的加速。因此,在 EGFR-TKI 一线治疗中,有必要检测 20 号外显子 T790M 突变^[6]。

此外,不可逆的 EGFR-TKI 在 *EGFR* 突变患者一线治疗中也获得不错的疗效。BIBW-2992 (afatinib, 阿法替尼 tovonk) 一线治疗的无进展生存时间(PFS)与厄洛替尼相似(14 个月),另一种药物 PF299804 (dacomitinib) 也取得了很高的客观缓解率^[7,8]。而 2012 年 ASCO 年会上报道的 LUX-lung 3 研究则比较了 afatinib 与化疗一线治疗 *EGFR* 基因突变(Del19/L858R)肺癌患者的效果,其结果同样令人振奋^[9]。

K-ras 是一种原癌基因,是 *ras* 基因家族成员之一,编码 *K-ras* 蛋白,与肿瘤的发生、发展、迁移、扩散以及血管生成均有关系。在 NSCLC 中,最常见的 *EGFR* 下游信号分子的基因突变是 *K-ras* 基因突变。*K-ras* 基因突变时,即使没有 *EGFR* 信号,*K-ras* 也能活化而向下游传递信号,因而显著影响 EGFR-TKI 的疗效。TRIBUTE 研究中的亚组分析显示 *K-ras* 基因突变者预后差,该突变将导致 EGFR-TKI 治疗无效^[10]。

2 Her-2、PI3K 检测与曲妥珠单抗治疗

Her-2 (erbB2, NEU) 是 *EGFR* 家族的另一个重要成员,编码一个具有酪氨酸激酶活性的跨膜糖蛋白,与其配体 EGF 结合而启动胞内信号通路促进肿瘤细胞增殖、分化。据统计,25%~30% 的原发性乳腺癌患者有 Her-2 的过度表达,在胃癌患者中也有相当一部分 Her-2 高表达。研究证明,Her-2 过表达的肿瘤患者 PFS 显著小于低表达者。曲妥珠单抗(trastuzumab, 赫赛汀 herceptin) 是一种重组 DNA 衍生的人源化单克隆嵌合抗 Her-2 抗体,能选择性地结合于 Her-2 的胞外位点,竞争性抑制 Her-2 与其配体结合,从而阻断癌细胞的生长。Trastuzumab 还是抗体依赖的细胞介导的细胞毒反应(ADCC)的潜

在介质,体外研究证实,在 Her-2 过表达的癌细胞中 trastuzumab 介导的 ADCC 作用显著强于低表达者^[11]。

目前, trastuzumab 已被批准用于 Her-2 阳性的乳腺癌和胃癌的治疗,并在单药以及联合化疗的临床研究中均取得了令人鼓舞的结果: trastuzumab 与紫杉醇或多西紫杉醇联用能有效治疗 Her-2 阳性的转移性乳腺癌。Her-2 高表达的晚期乳腺癌对表柔比星联合紫杉醇(ET 方案)化疗的敏感性显著高于表柔比星联合环磷酰胺(EC 方案)化疗^[11]。Toga 研究结果提示,与单用化疗药相比, trastuzumab 与化疗药物联用可使 Her-2 阳性胃癌患者的中位总生存期(OS)由 11.1 个月延长至 13.8 个月;对于 Her-2 高表达的患者,联合用药的效果更加显著,中位 OS 从 11.8 个月延长到 16 个月^[12]。以上结果为将 Her-2 基因检测作为 trastuzumab 疗效预测指标提供了有力依据。关于 Her-2 基因突变的研究,目前主要集中于两个位点:第一个是突变体 p95Her-2,因不能与 trastuzumab 分子结合,导致 p95Her-2 表达的乳腺癌患者对 trastuzumab 治疗的耐药性增高。另一个是在 655 位处发生由异亮氨酸向缬氨酸的置换突变(I655V),导致该蛋白跨膜结构域的 I655V 多态性^[13]。理论上,后者可进一步刺激下游酪氨酸激酶的活化和细胞转化,进而影响临床疗效和预后。但 Beauclair 等^[14]的研究则发现, I/V 基因型仅与 trastuzumab 的不良反应(心脏毒性)相关,而与疗效无关。

临床研究证实,在转移性乳腺癌及早期乳腺癌治疗中,化疗联合 trastuzumab 与单纯化疗相比,有着明显的生存率优势。但仍有 50% 的 Her-2 阳性的乳腺癌患者对 trastuzumab 不敏感,且相当一部分 trastuzumab 治疗有效的患者会在 1 年内产生耐药,因此探讨其耐药机制成为研究热点^[15]。PI3K/AKT 信号通路是 Her-2 受体激活的主要下游通路, *PIK3CA* 基因编码 PI3K 的 p110 α 亚基,也是一种重要的癌基因,该通路的状态在决定 trastuzumab 疗效方面有着举足轻重的作用。Berns 等^[16]的研究发现, *PIK3CA* 突变的乳腺癌患者在 trastuzumab 治疗中预后不及未突变者。人第 10 号染色体缺失的磷酸酶—张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, *PTEN*) 是一种与 *PI3K* 拮抗的磷酸酶。Berns 等^[16]应用大规模 RNAi 法筛选乳腺癌 trastuzumab 抗耐药相关的基因,发现 *PTEN* 对乳腺癌细胞的 trastuzumab 耐药性调节较明显。

Kortlever 等利用基因敲除抑制细胞内 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 Trastuzumab 耐药性增强。

3 K-ras、BRAF 检测与西妥昔单抗治疗

Ras 家族是人类重要的癌基因家族,与肿瘤相关的成员主要包括 H-ras、K-ras 和 N-ras,其中又以 K-ras 最为重要。ras 蛋白在细胞增殖、分化信号从跨膜受体传递到下游蛋白激酶的过程中起重要作用,当 ras 发生突变时,则阻止细胞凋亡,导致细胞持续生长。K-ras 基因突变是多种恶性肿瘤发生、发展的重要机制,最常见的激活方式为点突变,突变的位点集于 exon 1 的第 12 位密码子上,偶尔也有发生于 13 位点及 exon 2 的 61 位点^[17]。

在肠癌的靶向治疗中,K-ras 基因检测可作为西妥昔单抗(cetuximab,爱必妥 erbitux)治疗选择的依据,并能用于疗效预测。研究表明,K-ras 野生型肠癌对 cetuximab 的反应率约为 50%,而 K-ras 突变型的约为 9.5%。CRYSTAL 研究比较了 FOLFIRI 化疗联合 cetuximab 和 FOLFIRI 单纯化疗一线治疗转移性结肠癌的效果。结果提示,对 K-ras 野生型患者,联合化疗的疗效显著优于单纯化疗。而在突变型人群中,两组的无进展生存时间(PFS)和总有效率均无统计学差异,甚至联合化疗组的效果似乎更差^[18]。而 OPUS 研究也观察了 K-ras 状态与 cetuximab 一线治疗转移性结直肠癌疗效之间的关系。K-ras 野生型患者接受 cetuximab 联合 FOLFOX 治疗的总有效率和中位 PFS 都有显著提高,而突变型则恰好相反^[19]。

BRAF 也是一种癌基因,它编码一种丝/苏氨酸特异性激酶,后者可将信号由 Ras 向下游转导,参与细胞生长、分化和凋亡等的调控^[20]。BRAF 突变可见于多种恶性肿瘤,包括结直肠癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、甲状腺癌、恶性黑色素瘤等。以结直肠癌为例,BRAF 的突变率约为 15%,90%以上为 600 位的缬氨酸向谷氨酸的置换突变(V600E),研究证实该突变与 K-ras 突变状态具有互斥意义^[21]。Di 等^[22]对转移性结直肠癌患者 K-ras 及 BRAF 突变与耐药间的相关性进行了回顾性研究,发现 cetuximab 对 K-ras 野生型而 BRAF 突变患者无效,而治疗有效的患者均未发生 BRAF 突变。结果提示,K-ras 突变可能导致 30%~40%结直肠癌患者对 EGFR 靶向治疗无

效,而 K-ras 野生型患者若发生 BRAF 突变,则可能导致 10%~15%患者发生耐药。研究证明,在野生型 K-ras 肿瘤当中,发生 BRAF V600E 突变的个体,对两种药物完全不敏感,而没发生 BRAF 突变的 K-ras 野生型个体,32%有效,68%无效。提示检测 BRAF 突变对今后结肠癌的临床用药具有指导意义:BRAF 基因突变的患者接受 EGFR-TKI 药物治疗的有效率低,而且 BRAF 突变可导致部分 K-ras 野生型患者对 EGFR-TKI 及 EGFR 单抗药物不敏感。

4 c-kit、PDGFRA 检测与伊马替尼治疗

c-kit 受体(又称为 CD117,kit 受体)是Ⅲ型酪氨酸激酶,分布于细胞表面,其配体为干细胞因子(stem cell factor,SCF),二者结合形成二聚体,激活下游信号,包括 Ras/Raf/MAPK 通路,PI3K/Akt 通路等,从而调节基因表达、控制癌细胞的生长和增殖^[23]。胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)是消化道常见的间叶源性肿瘤,通常表现为 c-kit 基因或血小板源性生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor,PDGFR)基因突变。

伊马替尼(imatinib,格列卫 gleevec)作为一种 c-kit 或 PDGFR 酪氨酸激酶抑制剂,能选择性与 c-kit 蛋白胞内酪氨酸激酶的 ATP 位点结合,阻断其下游信号通路,从而抑制细胞增殖^[24]。Imatinib 临床疗效显著,可使 84%的患者临床获益,是转移复发性 GIST 的标准一线治疗药物。然而,实际应用中也会出现个体间疗效的差异,甚至对 imatinib 耐药的现象。体外及临床研究表明,c-kit 基因突变患者的疗效比 c-kit 野生型者好;exon 11 突变者的疗效比 exon 9 的好。原发性耐药见于无 c-kit 或 PDGFRA 基因突变的病例,亦可见于 PDGFRA 突变的患者;而二者编码区的二次突变是继发耐药的常见原因,涉及 c-kit exon 9、11、13、14、17 等,其中 exon 13、17 突变占 40%^[25]。因此,c-kit 或 PDGFRA 基因的检测可用于指导 GIST 的临床治疗。85%的 GIST 存在二者(或之一)的突变,其中发生概率最高的是 exon 11 (65%)和 exon 9 (10%~15%)的突变。exon 11 发生 DEL557/558 突变,其预后较其他的密码子突变差;exon 11 突变 GIST 对 imatinib 的疗效优于 exon 9 突变和野生型^[26]。exon 9 突变的 GIST,初始应给予高剂量 imatinib 治疗(600~800mg/d),可显著提高客观有效率^[23]。

5 基因检测的应用现状与思考

随着人类基因组学和蛋白质组学的不断发展,分子靶向药物的临床应用也愈加广泛。同时伴随着一大批大样本、多中心、随机双盲临床研究的不断深入,也涌现出许多诸如 *EGFR*、*K-ras* 之类具有预测或预后意义的基因指标,后者反过来又促进了肿瘤靶向治疗的科学性、规范化发展。在这样的背景下,药物基因组学(pharmacogenetics)被推到了生命科学的前台^[2]。美国 Kalorama Information 公司在 2007 年发表了关于分子诊断的专题市场调查报告“Molecular Diagnostics: Major World Market”。报告预计从 2006 年到 2016 年分子诊断市场的平均年增长率将达到 41.5%。药物基因组学在这 10 年间将有 184% 的平均年增长率,预计癌症相关基因的检测平均年增长率将达到 68%。而我国卫生部于 2007 年 6 月发布了《卫生部临床检验项目目录》中,规定了相关临床基因检测项目,其中涉及肿瘤个体化治疗及诊断的检测项目占据了主要篇幅。

不可否认,在这样一个良性循环的推动下,恶性肿瘤的靶向治疗正在实现突飞猛进的发展。但是其中存在的一些问题也是值得我们重视和思考的:①如何有效地开发和选择疗效预测和预后指标,使靶向药物治疗更加个体化?②在临床治疗中,应从何时开始使用靶向治疗药物?③如何与常规化疗方案联合,以获取更好的疗效?④多个靶向治疗药物联合应用是否更有利于控制肿瘤?要回答这些问题,仍需进行大量的基础和临床研究。我们相信,随着分子靶向治疗相关预测因子和预后因子的不断出现,相应的分子、基因诊断学也将成为未来肿瘤学的主题。

参考文献:

- [1] Dancy JE, Bedard PL, Onetto N, et al. The genetic basis for cancer treatment decisions[J]. *Cell*, 2012, 148(3): 409-420.
- [2] Mayo C, Bertran-Alamillo J, Molina-Vila MA, et al. Pharmacogenetics of EGFR in lung cancer: perspectives and clinical applications[J]. *Pharmacogenomics*, 2012, 13(7): 789-802.
- [3] Roti G, Stegmaier K. Genetic and proteomic approaches to identify cancer drug targets [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(2): 254-261.
- [4] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1497-1500.
- [5] Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, et al. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1167-1173.
- [6] Sequist LV, Martins RG, Spigel D, et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26

- (15): 2442-2449.
- [7] Metro G, Crino L. The LUX-Lung clinical trial program of afatinib for non-small-cell lung cancer[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11(5): 673-682.
- [8] Miller VA, Hirsh V, Cadranet J, et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(5): 528-538.
- [9] Yang JC. LUX-Lung 3: a randomized, open-label, phase III study of afatinib versus pemetrexed and cisplatin as first-line treatment for patients with advanced adenocarcinoma of the lung harboring EGFR-activating mutations[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(Suppl): abstr LBA 7500.
- [10] Herbst RS, Prager D, Hermann R, et al. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(25): 5892-5899.
- [11] Konecny GE, Thomssen C, Luck HJ, et al. Her-2/neu gene amplification and response to paclitaxel in patients with metastatic breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(15): 1141-1151.
- [12] Jorgensen JT, Hersom M. HER2 as a prognostic marker in gastric cancer—a systematic analysis of data from the literature[J]. *J Cancer*, 2012, 3: 137-144.
- [13] Scaltriti M, Rojo F, Ocaña 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.
- [14] Beauchair S, Formento P, Fischel JL, et al. Role of the HER2 [Ile655Val] genetic polymorphism in tumorigenesis and in the risk of trastuzumab-related cardiotoxicity [J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(8): 1335-1341.
- [15] Zhang Y, Zhang JS. Mechanisms of resistance to trastuzumab: an updated review [J]. *Chinese-German J Clin Oncol*, 2010, 9(11): 660-665.
- [16] 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.
- [17] Castellano E, Downward J. Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 346: 143-69.
- [18] Raoul JL, Van Laethem JL, Peeters M, et al. Cetuximab in combination with irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid (FOLFIRI) in the initial treatment of metastatic colorectal cancer: a multicentre two-part phase I/II study[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 112.
- [19] Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study[J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(7): 1535-1546.
- [20] Ikenoue T, Hikiba Y, Kanai F, et al. Functional analysis of mutations within the kinase activation segment of B-Raf in human colorectal tumors[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(23): 8132-8137.
- [21] Franssen K, Klintenas M, Osterstrom A, et al. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(4): 527-533.
- [22] Di NF, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(35): 5705-5712.
- [23] Debiec-Rychter M, Sciort R, Le CA, et al. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours[J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(8): 1093-1103.
- [24] Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate—a new oral targeted therapy[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(9): 683-693.
- [25] Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, et al. Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(29): 4764-4774.
- [26] 赵文毅, 曹晖, 张云, 等. c-kit 基因突变对胃肠道间质瘤预后影响的荟萃分析[J]. *中华外科杂志*, 2009, 47(11): 857-862.