

· 综述 ·

BCAR1/p130Cas 蛋白与乳腺癌抗雌激素药物耐药的相关研究

路洪超 耿翠芝

研究表明,雌激素在诱导乳腺癌发生和细胞增殖方面起到重要的作用^[1]。雌激素及其受体组成的蛋白复合体作用于乳腺细胞,促进多种基因的转录调节^[2]。临床上,大约 2/3 的乳腺癌雌激素受体(ER)阳性,且具备生物活性功能,能促进和维持乳腺肿瘤细胞的生长^[3-4]。因此,临床上通过检查乳腺癌细胞是否含有 ER,和 ER 对雌激素的应答性来决定是否应用抗雌激素药物。抗雌激素药物一旦与 ER 结合可使 ER 的构象发生异常改变,并导致无活性转录复合物,不能再调节其靶基因的表达。这种雌激素反应模式的抑制可以阻止细胞增生并且阻止肿瘤无休止地生长^[5-6]。已经证明,内分泌疗法的作用机制就是减少血清雌激素水平或阻断雌激素对癌细胞的作用^[7]。抗雌激素药物尤其是三苯氧胺在治疗激素敏感型乳腺癌方面很有效。然而,临床上仅约 1/2 的 ER 阳性患者对三苯氧胺有疗效反应;也就是说,另外近 1/2 的患者表现为不明原因的耐药反应。当前研究表明,一些蛋白参与了乳腺癌内分泌治疗过程中的耐药机制^[8]。

1 乳腺癌抗雌激素药物耐药

抗雌激素药物耐药是乳腺癌治疗进程中的严重障碍之一。已经证实,ER 阳性的原发性乳腺癌患者中大约 1/2 患者对三苯氧胺治疗有客观效果,其余有较短的疾病稳定期(6 个月内)或快速的疾病发展期,这种情况被称为内在性耐药;然而几乎所有对三苯氧胺有反应的复发或转移性乳腺癌患者最后均表现疾病复发,这称为获得性耐药^[9]。目前有关乳腺癌患者内在性或获得性耐药机制的研究尚少。抗雌激素药物的药理学改变、ER 结构和功能的修饰变化、以及肿瘤细胞和其周围环境之间的相互作用的变化(旁分泌相互作用)等一直被认为是抗雌激素药物耐药的主要原因^[10-11]。此外,肿瘤细胞的遗传或后天改变也被认为是抗雌激素药物耐药原因之一^[12-13]。尽管这些假设对

说明抗雌激素药物耐药的原因有一定作用,但是到目前为止,还不能解释大多数病人抗雌激素药物耐药的共同原因^[14]。抗雌激素药物耐药的发展很可能是一个多因素的过程。三苯氧胺耐药可能是多种机制造成的,其中包括基因变化导致的 ER 突变体和剪接变异体、以及三苯氧胺的吸收、分配、代谢变化等。因此三苯氧胺耐药的机制在癌生物学上是一个综合性变化^[15-16]。

2000年,有学者^[14]阐述了一种研究抗雌激素药物内在性耐药的新方法,随即的临床实验亦证实了这一设想。他们将逆转录病毒插入介导诱变产生耐药细胞,以此检验乳腺癌抗雌激素药物耐药性基因的部位。Lambert等^[17]把逆转录病毒插入诱变应用到人类雌激素依赖型乳腺癌细胞株 ZR-75-1 上,证明有缺陷的鼠逆转录病毒在 ZR-75-1 细胞株基因组上随机整合,使雌激素依赖型细胞转化为三苯氧胺耐药型。截至目前,普通整合位点的基因定位和细胞介导的基因转移试验已经确定了 3 个独立的基因座(BCAR1, BCAR2, BCAR3),它们和抗雌激素药物耐药有关^[18]。

与抗雌激素药物耐药细胞表型相关的第一个基因是 BCAR1(breast cancer antiestrogen resistance 1)。它是用与鼠 p130Cas 同源的衔接蛋白确定的基因,其蛋白功能尚不清楚,但它是病毒转癌基因的鼠细胞中的主要酪氨酸磷酸化蛋白,在对雌激素敏感的 ZR-75-1 乳腺癌细胞株的细胞培养过程中,将这种基因融合或转染给此细胞株,使之产生抗雌激素药物耐药。这种耐药性能使肿瘤细胞在高浓度抗雌激素药物中继续生长^[14]。

BCAR1/p130Cas 蛋白即乳腺癌抗雌激素药物耐药性 1 基因/p130 Crk 相关底物蛋白(breast cancer antiestrogen resistance 1/p130 Crk-associated substrate, BCAR1/p130Cas),能在活体外诱导雌激素依赖性乳腺癌细胞对抗雌激素药物产生耐药。van der Flier 等^[19]研究了 BCAR1/p130Cas 蛋白在乳腺癌内分泌治疗中的临床作用,他们检测了 937 个原发乳腺癌患者提取物中 BCAR1/p130Cas 蛋白的表达水平,并且比较了该蛋白的表达水平和临床参数之间的关系。发现 BCAR1/p130Cas 蛋白高表达的原发乳腺癌患者疾病复发更迅速,总存活时间更短,且对抗雌激素药物产生耐药的风险更大。因此, Jordan^[20]在进一步阐明这一发现对将来在抗雌激素药物耐药性方面的研究意义之后,指出,BCAR1 基因检测的目的之一是能准确地确定哪些患者不能从抗雌激素药物治疗中获益。

2 BCAR1/p130Cas 的结构和功能

Lambert 等^[19]于 2000 年利用外显子截留和互补 DNA(cDNA)基因库筛选

分离了 BCAR1 完全编码序列。基因组分析显示 BCAR1 位于染色体的 16q23.1, 由 7 个外显子组成, 基因库的序列登记号为 AJ 242987。

BCAR1 基因和已知的鼠 p130Crk 相关底物对接蛋白(p130Cas)是人类同源染色体, 该蛋白由 870 个氨基酸组成, 其结构包括一个氨基末端的 SH3 区域、一个富含脯氨酸的区域(Pro_n)、结合 YXXP 的底物区域、富含丝氨酸的区域(Ser_n)、以及 COOH 末端。BCAR1/B 片段参与免疫, BCAR1/F1R5 片段被用于抗体纯化。p130Cas 则由一个与 Src 同源的 3(SH3)区域、一个富含脯氨酸的区域、以及一个含有多重 SH2 结合序列的底物区域组成。所以 BCAR1 和鼠 p130Cas 衔接蛋白染色体高度同源。覆盖 BCAR1 基因点的主要部分是 10 个重叠的 HC26 和 HC34 的粘粒克隆, 用外显子截留方法选择其中的 2 个鉴定转录物。复原总共 31 个被截留的序列, 其中 16 个和已知的基因有关, 即 8 个克隆和糜蛋白酶基因的外显子 2-7 相符合(登记号 No. NM-001906), 其余 8 个和鼠的 p130Cas 基因(登记号 No. D29766)序列表现同源染色体。在其余 15 个克隆体中, 2 个可能是由于在 BCAR1 基因位点中经常发生的 alu-type 重复序列中的隐藏剪接而产生的, 而其余克隆体则在可提供的数据中和已知的序列没有同源性。

BCAR1/p130Cas 蛋白是细胞质衔接蛋白, 属于参与很多细胞过程的衔接蛋白中的一个小家族, p130Cas 蛋白不仅在细胞粘附、细胞迁移、细胞生存和细胞增殖等生理调节方面起作用, 而且在细胞致癌性转化方面也起作用。p130Cas 蛋白分子由多重蛋白质相互作用的序列组成, 包括一个富含丝氨酸的区域, 这一区域在 Crk 和 Src 结合位点之间, 已经有研究报告这是 Cas 功能性区域的第一个结构。p130Cas 还参与 c-Src 信号系统, p130Cas 包含很多结合 Crk 的位点, 因此 Crk 可能是主要的下游效应器, 激发多种局部结合信号导致癌的发生^[21]。

目前认为, p130Cas 是在 v-Src-和 v-Crk-转化的细胞系中酪氨酸磷酸化蛋白的主要底物, 且涉及很多生物学过程, 包括细胞粘附、细胞迁移、生长因子激活、细胞因子受体衔接、以及细菌感染等^[22]。细胞融合介导的 BCAR1 基因点的转移实验和 BCAR1/p130Cas 蛋白互补 DNA(cDNA)转染进 ZR-75-1 细胞的实验证明, BCAR1/p130Cas 蛋白的过度表达导致细胞在抗雌激素药物存在的情况下持久性生长、增殖。

已经证明^[14], BCAR1/p130Cas 蛋白在人类乳腺癌细胞的抗雌激素药物耐药性生长中起到保护作用, 并且和原发性乳腺癌不良预后有关。此外,

BCAR1/p130Cas 还和犬齿科和猫科动物的乳腺癌有关系^[23],与恶性黑色素瘤及几种非白血性白血病有关^[24]。最近研究表明,在活体外,BCAR1/p130Cas 蛋白对前列腺癌 KAI1/CD82 介导的转移抑制有阻碍作用^[25]。

3 BCAR1/p130Cas 蛋白抗雌激素药物耐药机制

p130Cas 蛋白 CAS(Crk-associated substrate, p130Cas)的酪氨酸磷酸化是维持正常细胞运动、增殖以及生存的关键信号途径。某些癌蛋白,包括 v-Crk 和 c-Src 诱导的 CAS 酪氨酸异常磷酸化可能导致正常细胞癌变、生长和转移^[22]。已经证明^[26],BCAR1/p130Cas 蛋白的磷酸化和抗雌激素药物三苯氧胺的影响正相关。雌激素激活 c-Src 激酶并导致雌激素依赖性细胞分裂,而细胞骨架蛋白质 p130Cas 蛋白是活性 c-Src 激酶的主要酶作用底物。Burnham 等^[27]发现 BCAR1/p130Cas 蛋白能被磷酸化于酪氨酸残基上并且能和含有 SH2 区域的很多蛋白结合,而且 BCAR1/p130Cas 蛋白的 SH3 区域也能和其他蛋白通过包含脯氨酸的靶序列结合,因此 BCAR1/p130Cas 蛋白在抗雌激素药物耐药机制方面起衔接蛋白作用。

尽管有许多关于 BCAR1/p130Cas 蛋白在不同细胞系统中作用的报道,但尚未发现细胞中导致增殖控制变化的途径。虽然有研究表明 BCAR1/p130Cas 蛋白在细胞粘附和转移方面的变化可能影响细胞的增殖,但是在乳腺癌组织中的具体作用机制还不清楚。

4 BCAR1/p130Cas 蛋白表达和三苯氧胺治疗反应性

大约 1/3 ER 和 PR 阳性的乳腺肿瘤 BCAR1/p130Cas 蛋白高表达,同时发现 BCAR1/p130Cas 蛋白高表达者 8 年生存率明显降低。van der Flier 等^[19]研究发现,乳腺肿瘤细胞对内分泌治疗一线药物三苯氧胺的反应性与 BCAR1/p130Cas 蛋白表达水平有关。他检测了经三苯氧胺治疗后复发性或转移性乳腺癌患者中 BCAR1/p130Cas 蛋白的表达水平,发现蛋白表达呈中水平、低水平和无表达 3 组患者中,三苯氧胺的反应有效率相似,分别为 58%、50% 和 53%;而高表达者的有效率仅 33%,有明显差异($P < 0.05$)。同时分析了总的 ER 阳性原发性乳腺癌患者的三苯氧胺治疗有效率,发现 BCAR1/p130Cas 蛋白高表达和低表达者分别为 34% 和 61% ($P = 0.02$)。在绝经状况、无病间隔期以及 ER 状态(作为二分变量)校正后的多变量分析后,发现影响三苯氧胺疗效的因素分别为绝经前、ER 阴性及 BCAR1/p130Cas 蛋白高表达。如果把 ER 作为一个连续变量(log 转换)进行分析,发现 BCAR1/p130Cas 蛋白高

表达者对三苯氧胺反应较差($P = 0.01$)。Cox 回归分析也显示,无论接收三苯氧胺治疗时的临床分期如何,随着原发乳腺癌中 BCAR1/p130Cas 蛋白表达水平的增加,病人的无瘤生存期从 7 个月(无表达,低表达,中等表达)减少到 3 个月(高表达)。

van der Flier 等^[19]通过对原发乳腺癌组织中 BCAR1/p130Cas 蛋白表达的分析,得出两个结果:①原发乳腺癌中 BCAR1/p130Cas 蛋白表达增高和疾病快速复发相关。BCAR1/p130Cas 蛋白高表达的患者与无表达和低表达的患者相比,复发风险高 62%。多变量分析亦表明,高表达 BCAR1/p130Cas 蛋白与肿瘤早期复发有关系,且是独立的经典预后参数,原发肿瘤提取物中 BCAR1/p130Cas 蛋白高表达患者的总生存数与无表达和低表达的患者相比减少 65%。上述结果显示 BCAR1/p130Cas 蛋白高水平表达肿瘤比低水平或者无表达者在行为上更具有侵袭性,细胞早期散播的风险性较高。②原发肿瘤中 BCAR1/p130Cas 蛋白表达水平与三苯氧胺反应性相关,体外模型也证实了这一点,即:BCAR1/p130Cas 蛋白的过度表达导致细胞株对抗雌激素药物耐药。这一发现可以解释临床上观测到的三苯氧胺内在耐药现象。即:ER 阳性的原发性及复发或转移性乳腺癌患者中,仅 1/2 患者对三苯氧胺有客观的反应而表现为疾病稳定,其余患者由于存在对三苯氧胺的内在耐药机制而使疾病迅速进展。因此,检测肿瘤组织中 BCAR1/p130Cas 蛋白水平可以确定适合三苯氧胺治疗的患者。

5 BCAR1/p130Cas 蛋白研究的临床应用前景

近来纤维蛋白酶原激活剂蛋白系统的 meta 分析表明,高表达 uPA(尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂)和 PAI-1(纤溶酶原激活物抑制剂 1)对早期乳腺癌患者疾病复发有预测性作用,但是蛋白定量分析表明,BCAR1 可以独立于传统和新的预测因素,如 PAI-1 和 uPA 而作为有效的预后指标^[28]。另外,BCAR1 蛋白表达状况可以预测三苯氧胺对 ER 阳性乳腺癌患者内分泌治疗的有效性,这一点也通过 ELISA 方法得到证实^[29]。

BCAR1/p130Cas 蛋白在乳腺正常细胞和癌细胞中的作用机制尚需要大量的研究资料进一步证实,然而,目前可以认为,它是制定 ER 阳性乳腺癌内分泌治疗客观、有价值的指标。BCAR1/p130Cas 蛋白的信使 RNA 在人类组织中无处不在,但其作用亟待大量的、有价值的基础和临床研究来阐明。具体地说,就是同时含有 ER 和 BCAR1/p130Cas 蛋白的细胞是转变了三苯氧胺的作用?还是基因激活了临近细胞的作用?肿瘤的免疫组化和对正常以及乳腺

癌细胞株的研究可能会对三苯氧胺的内在耐药性提供依据。我们的目标是精确三苯氧胺辅助治疗,提高内分泌治疗的有效性,减少无为的损伤和副作用。

【关键词】 乳腺肿瘤; BCAR1/p130Cas 蛋白; ER; 抗雌激素药物耐药

【中图法分类号】 R737.9 【文献标识码】 A

参考文献

- [1] King R J, William L. McGuire Memorial Symposium. Estrogen and progestin effects in human breast carcinogenesis[J]. Breast Cancer Res Treat, 1993, 27: 3 - 15.
- [2] Beato M, Sanchez-Pacheco A. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex[J]. Endocr Rev, 1996, 17: 587 - 609.
- [3] Foekens J A, Rio M C, Seguin P, *et al*. Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status[J]. Cancer Res, 1990, 50: 3832 - 3837.
- [4] Clarke R B, Howell A, Potten C S, *et al*. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast[J]. Cancer Res, 1997, 57: 4987 - 4991.
- [5] Jordan V C. Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 1994, 31: 41 - 52.
- [6] Katzenellenbogen B S, Montano M M, Ekena K, *et al*. McGuire Memorial Lecture. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 1997, 44: 23 - 38.
- [7] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials[J]. Lancet, 1998, 351: 1451 - 1467.
- [8] Jaiyesimi I A, Buzdar A U, Decker D A, *et al*. Use of tamoxifen for breast cancer: twenty-eight years later[J]. J Clin Oncol, 1995, 13(2): 513 - 529.
- [9] Foekens J A, Schmitt M, Van Putten W L, *et al*. Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer[J]. J Clin Oncol, 1994, 12: 1648 - 1658.
- [10] Johnston S R, Haynes B P, Smith I E, *et al*. Acquired tamoxifen resistance in human breast cancer and reduced intra-tumoral drug concentration[J]. Lancet, 1993, 342: 1521 - 1522.
- [11] Murphy L C, Hilsenbeck S G, Dotzlaw H, *et al*. Relationship of clone 4 estrogen receptor variant messenger RNA expression to some known prognostic variables in human breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 1995, 1: 155 - 159.
- [12] Dorssers L C, Van Agthoven T, Sieuwerts A M. Genetic mechanisms involved in progression to hormone independence of human breast cancer[M]//Berns P M, Romijn J C, Schroeder F H. Mechanisms of progression to hormone-independent growth of breast and prostatic cancer. Carnforth (U. K.): Parthenon Publishing Group Ltd, 1991: 169 - 182.
- [13] Clarke R, Thompson E W, Leonessa F, *et al*. Hormone resistance, invasiveness, and metastatic potential in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 1993, 24: 227 - 239.
- [14] Brinkman A, van der Flier S, Kok E M, *et al*. BCAR1, a human homologue of the adaptor protein p130Cas, and antiestrogen resistance in breast cancer cells[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92: 112 - 120.
- [15] Chan C M, Dowsett M. A novel estrogen receptor variant mRNA lacking exons 4 to 6 in breast carcinoma[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1997, 62: 419 - 430.
- [16] Dowsett M, Daffada A, Chan C M, *et al*. Oestrogen receptor mutants and variants in breast cancer[J]. Eur J Cancer, 1997, 33: 1177 - 1183.
- [17] Dorssers L C, Van Agthoven T, Dekker A, *et al*. Induction of antiestrogen resistance in human breast cancer cells by random insertional mutagenesis using defective retroviruses: identification of bcar-1, a common integration site[J]. Mol Endocrinol, 1993, 7: 870 - 878.
- [18] Dorssers L C, Veldscholte J. Identification of a novel breast cancer anti estrogen resistance (BCAR2) locus by cell fusion mediated gene transfer in human breast cancer cells[J]. Int J Cancer, 1997, 72: 700 - 705.
- [19] van der Flier S, Brinkman A, Look M P, *et al*. Bcar1/p130Cas protein and primary breast cancer: prognosis and re-

- sponse to tamoxifen treatment[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92: 120 – 127.
- [20] Jordan V C. How Is Tamoxifen's Action Subverted[J]? Journal of the National Cancer Institute, 2000, 92: 92 – 94.
- [21] Takaya Gotoh, Xuejun Tian, Larry A, *et al*. Feig p130Cas Regulates the Activity of AND-34, a Novel Ral, Rap1, and R-Ras Guanine Nucleotide Exchange Factor[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 30118 – 30123.
- [22] Paul J. Ruest, Nah-Young Shin, Thomas R. Polte, *et al*. Mechanisms of CAS Substrate Domain Tyrosine Phosphorylation by FAK and Src[J]. Molecular and Cellular Biology, 2001, 21: 7641 – 7652.
- [23] Scibelli A, d' Angelo D, Pelagalli A, *et al*. Expression levels of the focal adhesion-associated proteins paxillin and p130CAS in canine and feline mammary tumors[J]. Vet Res, 2003, 34: 193 – 202.
- [24] de Jong R, van Wijk A, Haataja L, *et al*. BCR/ABL-induced leukemogenesis causes phosphorylation of Hef1 and its association with Crkl[J]. J Biol Chem, 1997, 272: 32649 – 32655.
- [25] Zhang X A, He B, Zhou B, *et al*. Requirement of the p130CAS-Crk coupling for metastasis suppressor KAI1/CD82-mediated inhibition of cell migration[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 27319 – 27328.
- [26] Cowell L N, Graham J D, Bouton A H, *et al*. Tamoxifen treatment promotes phosphorylation of the adhesion molecules, p130Cas/BCAR1, FAK and Src, via an adhesion-dependent pathway[J]. Oncogene, 2006, 25: 7597 – 607.
- [27] Burnham M R, Harte M T, Richardson A, *et al*. The identification of p130cas-binding proteins and their role in cellular transformation[J]. Oncogene, 1996, 12: 2467 – 2472.
- [28] Harbeck N, Schmitt M, Kates R E, *et al*. Clinical utility of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 determination in primary breast cancer tissue for individualized therapy concepts[J]. Clin Breast Cancer, 2002, 3: 196 – 200.
- [29] Dorssers L C J, Grebenchtchikov N, Brinkman A, *et al*. Application of a newly developed ELISA for BCAR1 protein for prediction of clinical benefit of tamoxifen therapy in patients with advanced breast cancer[J]. Clin Chem, 2004, 50: 1445 – 1447.

(收稿日期: 2006-09-15)

(本文编辑: 张毅)