

• 国外医学报道 •

雌激素受体-配对盒基因 2 对 ERBB2 的调控决定他莫西芬治疗的反应性

雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)阳性的患者对内分泌治疗有效,预后好。他莫西芬(tamoxifen, TAM)是治疗激素依赖性乳腺癌最成功有效的方法之一,但是其产生的耐药现象在临床上很常见。对他莫西芬耐药的乳腺癌而言,ER 的表达水平并不能反应真正的治疗效果,在 ER 阳性细胞株中如果 ERBB2 过度表达就会产生他莫西芬耐药。Antoni Hurtado 等在 2008 年《Nature》杂志上发表题为“Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen”的论著,从分子水平上对乳腺癌的内分泌治疗抵抗机制进行探讨,深入分析了配对盒基因 2(paired box gene 2, PAX2)与 ERBB2 在乳腺癌内分泌治疗中的作用。本文对其研究结果进行简要介绍。

ER 和 ERBB2/HER-2 两种作用途径的交叉反应涉及到乳腺癌的内分泌疗效,但在转录水平迄今还没有发现两者的直接关系。该研究表明,通过人类细胞株中 ERBB2 基因的反式调节作用元件,ER 和 TAM 共同直接抑制 ERBB2 的转录。以前不为人熟知其作用的 PAX2,如今已被证实在 ERBB2 抑制 ER 阳性乳腺癌的 TAM 治疗中起到关键性介导作用。该研究结果显示,PAX2 和辅助激活因子 AIB-1/SRC-3 竞争结合 ER 受体,以调控 ERBB2 的转录,从而决定 TAM 对乳腺癌细胞的抑制反应。乳腺癌分子亚型 luminal A 对 TAM 治疗的敏感是由于 ER-PAX2 抑制 ERBB2 的作用所致;而表现为不敏感的 ER 阳性、ERBB2 阳性的乳腺癌, luminal B 则是通过抑制上述机制使肿瘤呈现侵袭性进展。

ER 结合点的基因图谱显示了乳腺癌细胞中 ER 的功能,包括 ER 很少与促进剂区域结合,ER 的结合需要先导因子(如 FoxA1)的存在等。在 ER(+) 的 MCF-7 细胞株中,ER 基因组免疫沉淀分析结果表明:在 8525 个 ER 结合位点中,86% 的 ER 结合位点为正确阳性表达,还有 5% 为阴性结合点。在 ERBB2/HER-2 基因带的基因内区里,包括新发现的位点,有大量的区段是 ER 的结合位点。继而对 8525 个 ER 结合位点进一步分析显示 PAX 转录因子是有统计学意义($P < 0.01$)的聚集。虽然作者对 PAX 蛋白在激素信号调

节途径中的作用知之甚少,然而已有证据显示,PAX2 在乳腺癌的亚型中得以表达,且被证实为乳腺癌细胞中 TAM 的效应分子。

TAM 是治疗激素依赖性乳腺癌最成功有效的方法之一,但是临床上对其产生抵抗现象很常见。TAM 抵抗型乳腺肿瘤的特征是 ERBB2 高表达,并且 ER 阳性细胞株中如果 ERBB2 过表达就会产生 TAM 耐药。该研究者评估了相邻于重要雌激素调节基因的 PAX2 与选择性 ER 结合点,包括最新发现识别的 ERBB2 基因内的结合位点。在这个位点上,PAX2 只有经过 TAM 治疗后才能得到恢复,ERBB2 内 ER 结合点的 PAX2 则需要雌激素和 TAM 共同治疗后才可修复。先前的证据显示,雌激素和 TAM 都可以抑制 ERBB2 表达。该研究者推测 PAX2 可能像普通的 ER-相关转录抑制因子那样发挥作用,并且在 ERBB2 内的 ER 结合点可能是顺式作用调节因子发挥 ER 主动抑制功能。该研究证实,在 MCF-7 细胞株中,雌激素和 TAM 治疗后 ERBB2 信使 RNA 水平降低。免疫共沉淀反应显示:在 TAM 治疗和 re-ChIP 实验之后,ER 和 PAX2 形成一种复合物,占据 ERBB2 基因内相同的 ER 结合点。此外,该研究证实这个 ER 结合点是 ERBB2 基因顺式作用调节因子。这个不受调控区域独立于先前已经识别的可调控区域,虽然这个已知特征的区域在 ERBB2 转录调控中可能起间接的作用。

在预后很差的 luminal B 乳腺肿瘤中,ERBB2 表达水平往往较高,并且近半数 ERBB2 阳性的乳腺肿瘤 ER 表达阳性。因此,该研究者提出 TAM 疗法的抗增殖作用需要抑制 ERBB2 的表达,并且通过提高 ERBB2 水平或者抑制正常情况下控制 ERBB2 转录的机制,使乳腺癌能够潜在地获得对 TAM 耐药。与 TAM 不同,雌激素对 ERBB2 的抑制作用可能不是关键性因素,因为雌激素介导的细胞增殖可能缘于雌激素介导的大量致癌基因上调。

为了解 PAX2 在雌激素和 TAM 介导的 ERBB2 抑制中的作用,该研究者特别用短链的干扰 RNA(SiRNA)使 PAX2 沉默。免疫印迹法显示,PAX2 蛋白水平有效降低,ER 水平不受影响。通过对照细胞转染,雌激素和 TAM 都能快速的抑制 ERBB2 的 mRNA 表达,但是,在雌激素和 TAM 双重治疗的情况下,PAX2 SiRNA 消除了这种抑制作用,继而 ERBB2 转录增加,并且 ERBB2 蛋白水平升高。其结果与 PAX2 SiRNA 存在时进行雌激素和 TAM 治疗,作为 ERBB2 促进剂的磷酸化 RNA 聚合酶 II 的聚集相一致。研究发现,转染 PAX2 SiRNA 的细胞接受 TAM 治疗可以导致细胞数增加,而对照组则得出相反结果。这些实验被其他的 PAX2 SiRNA 证实。用抗 ERBB2 的抗体-赫赛汀阻断 PAX2 SiRNA 介导的细胞生长,就能确定在 PAX2 沉默之后的细胞增长主要是由于 ERBB2 水平的升高所致。

该研究在另一组乳腺癌 ER(+)细胞株 ZR75-1 中来重复这些结果。

TAM 抑制 ZR75-1 细胞株中 ERBB2 mRNA 表达和 ERBB2 的蛋白质水平, 这种抑制现象在 PAX2 沉默就会消失。在 MCF-7 细胞株中也有相同的情况, PAX2 SiRNA 逆转了 TAM 的生长抑制作用, 从而导致 PAX2 缺失的 ZR75-1 细胞株获得 TAM 耐药。

与 ERBB2 水平升高一样, TAM 耐药的乳腺癌患者常伴有 ER 辅助激活因子乳腺癌增殖-1(AIB-1, 也称为 SRC-8)水平的升高。AIB-1 促进肿瘤的发生, 并且是 ERBB2 驱动乳腺癌变的基础。该研究评定了 AIB-1 是否与 PAX2 竞争性结合 ERBB2, 提高 ERBB2 水平导致他莫西芬耐药肿瘤发生。ChIP 结果显示, 在雌激素和 TAM 治疗之后, 结合在 ERBB2 顺式作用调节因子上的 AIB-1 水平下降, 这很可能是 PAX2 发挥取代作用的结果。这个设想被 SiRNA 抑制 PAX2 表达从而使雌激素和 TAM 介导 AIB-1 补充 ERBB2 调节因子的实验所证实。

该研究结果表明, AIB-1 与 PAX2 竞争性结合 ERBB2 顺式作用调节因子, 并且在 TAM 存在时即可导致 ERBB2 转录增加和细胞增殖。AIB-1 水平升高会阻断 PAX2 的竞争性结合和抑制 ERBB2 表达, 从而逆转 TAM 的抗增殖作用。这提示在结合和调控 ERBB2 方面, 辅助激活因子 AIB-1 和假定的 PAX2 抑制之间有一个化学结构的平衡, 为研究 AIB-1 在 TAM 反应的功能作用提供了一个机械学的研究角度。而在 MCF-7 细胞株, AIB-1 水平提高的同时也能提高 PAX2 水平, 这就解释了为什么 MCF-7 细胞株保留了 TAM 治疗敏感性。而且, 该研究也证实了 AIB-1 的表达可以抑制 T47D 细胞株中 TAM 的抗增殖作用, T47D 细胞株是一种没有 AIB-1 水平高的细胞株。这些数据均证实了 AIB-1 可在 ER(+)乳腺癌细胞株中逆转 TAM 反应。

数据显示, 通过用抗 ERBB2 抗体(赫赛汀)治疗, 可以抑制 TAM 耐药的乳腺癌细胞生长。该研究对 ERBB2 的抑制作用需要 PAX2 参与的假设进行了验证, 结果发现 TAM 抵抗可能是由于这条路径的变化所致。该研究检测已获得 TAM 抵抗的 MCF-7 细胞株, 发现 ERBB2 表达水平升高, 但没有 ERBB2 扩增。在野生型的 MCF-7 细胞株中, TAM 能够抑制 ERBB2 mRNA 和 ERBB2 蛋白的表达水平, 但是在 Tam-R(TAM 抵抗)细胞株中 ERBB2 水平并不因为 TAM 作用而下降。用 Western blot 分析对比野生型和 Tam-R 型 MCF-7 细胞株, 结果显示 ER 蛋白表达没有变化。这进一步支持了临床研究的结论, 即对 TAM 抵抗的乳腺癌, ER 的表达水平并不能反应真正的治疗效果。研究发现, 在 Tam-R 细胞株中, AIB-1 蛋白水平没有改变, 而 PAX2 蛋白水平较低。这为 Tam-R 抵抗的细胞株 ERBB2 水平的升高提供了解释。

TAM 介导的 ER 填充到 ERBB2 顺式作用调节因子中的过程, 在 Tam-R 型和野生型 MCF-7 细胞株均相同。然而, 如预期的那样, 在 Tam-R 细胞株中

PAX2 水平较低,该细胞株中 PAX2 的结合也明显减少。同样地,仅在野生型细胞株中出现的组蛋白脱乙酰基酶 1 (HDAC-1),Tam-R 型细胞株中不存在。由此确定,活性抑制出现在野生型细胞株的 ERBB2 顺式作用调节因子中而非出现在 Tam-R 型细胞株中。相反,尽管 AIB-1 的水平没有改变,TAM 介导的 AIB-1 的恢复在 Tam-R 型细胞株中是升高的。为检验这种假说,即在 Tam-R 型细胞株中 PAX2 水平降低会造成 ERBB2 表达增加以改变对 TAM 的反应,该研究者再次将 PAX2 引入到这些细胞中。在 Tam-R 型细胞株中,PAX2 的过度表达使 TAM 又能够抑制 ERBB2 mRNA 和 ERBB2 蛋白的表达水平。PAX2 的过度表达导致 pol II 与 ERBB2 促进剂结合以及 AIB-1 与 ER 结合降低,进一步证实了 AIB-1 和 PAX2 竞争性结合且调控 ERBB2 基因表达的假说。正如 HDAC-1 所显示,PAX2 的表达恢复了 TAM 抵抗细胞株中 TAM 抑制细胞增殖的作用。

该研究以 BT-474 乳腺癌细胞株来说明这些发现。BT-474 为 ER(+)但对 TAM 抵抗的乳腺癌细胞株,这可能是 ERBB2 基因座染色体扩增的结果。这种细胞株可能代表另外一种可获得 TAM 抵抗的运行机制。在 ER(+)乳腺癌细胞株中,ERBB2 基因的扩增能够抵抗 TAM 抑制细胞生长的作用。PAX2 在 BT-474 细胞株中的表达可抑制 TAM 介导的 ERBB2 mRNA 和 ERBB2 蛋白表达,从而遏制依赖 TAM 细胞的生长。即使在 ERBB2 基因座扩增的情况下,PAX2 可逆转 ERBB2 的作用使 TAM 的抑制功能得到恢复。

该研究者建议:PAX2 是 TAM 治疗反应中一个关键的决定性因素。为了在原发性乳腺癌中证实这些研究结果,该研究对 109 名 ER(+),接受 TAM 治疗的乳腺癌患者进行了 PAX2 的免疫组化检测,其中 68 名患者 PAX2(+),41 名患者 PAX2(-)。与 PAX2(-)患者相比,PAX2(+)患者的无复发生存期(recurrence free survival,RFS)明显延长。另外,在 PAX2(+)患者中,AIB-1(+)表达比 AIB-1(-)表达者的预后差;PAX2(+)和 AIB-1(-)的患者预后最好,且复发率只有 5.8%。直线回归分析显示,在已经确定的复发病例中,PAX2 和 AIB-1 的表达水平是一个相对立的独立预测指标($P < 0.03$)。PAX2(-)、AIB-1(-)的患者中 ERBB2 阳性表达率也很低,这证实了该研究先前的假设,即 PAX2 和 AIB-1 之间的平衡最终将影响 ERBB2 的表达并决定 TAM 治疗的有效性。

内分泌治疗抵抗是乳腺癌临床治疗中一个亟待解决的难题。对 TAM 抵抗的乳腺癌患者的临床特征是:AIB-1 和 ERBB2 表达水平均升高。该研究结果显示,PAX2 是 TAM 作用过程中关键的 ERBB2 转录抑制因子,AIB-1 表达增强能取代其与 PAX2 结合,直接导致 ERBB2 表达上升。AIB-1 和 PAX2 之间的量化比例决定了 TAM 在乳腺癌内分泌治疗中的有效性。这些新数据

表明了 ER 为主的肿瘤与 ERBB2 为主的肿瘤之间有内在的转录关系,这一关系决定了乳腺癌细胞的增殖差异。目前,PAX2 作为抑制因子的作用仍不明确,因为一般认为,PAX2 是转录激活剂,可以通过 TAM 调节基因编码从而导致子宫内膜癌的发生。已知 TAM 在乳腺癌中有抗增殖的作用,但对子宫内膜中有主缩肌的特性,因此它的组织特异性将会成为女性生殖器官中选择雌激素受体调节因子的首要决定因素之一。

(李赛男 摘译 耿翠芝 审校)

(收稿日期:2009-03-02)

(本文编辑:周艳)

李赛男 摘译. 雌激素受体-配对盒基因 2 对 ERBB2 的调控决定他莫西芬治疗的反应性[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2009,3(3):358—362.