

EGFR 与肿瘤细胞放射敏感性

俞家华 刘芬菊

(苏州大学放射医学与公共卫生学院放射生物学教研室 苏州 215123)

摘要 表皮生长因子 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 属于酪氨酸激酶受体, 在多种上皮来源的恶性肿瘤中存在着过度表达和变异。EGFR 与相应配体结合后激活, 继而活化一系列下游信号通路并产生众多的生物效应。EGFR 信号通路与肿瘤细胞放射敏感性降低密切相关, 其机制可能与促进细胞增殖、抑制凋亡、调控细胞周期阻滞、促进 DNA 辐射损伤修复有关, 运用 EGFR 单克隆抗体和小分子特异性抑制剂可以增强肿瘤细胞的放射敏感性。

关键词 表皮生长因子受体, 恶性肿瘤, 放射敏感性

中图分类号 R811.5, R818.05

增强恶性肿瘤的放射敏感性是提高临床放疗效果的关键手段之一。表皮生长因子受体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 在多种上皮来源的恶性肿瘤中有过度表达和变异, 其表达水平与肿瘤的放射敏感性呈负相关。研究 EGFR 降低肿瘤放射敏感性的内在机制, 以及 EGFR 特异性抑制剂提高放射敏感性的效果是目前的热点问题。

1 EGFR 在肿瘤中的表达

EGFR 属 I 型跨膜酪氨酸激酶受体 (Tyrosine kinase receptor, TKR), 分子量约为 170kD, 也称为受体酪氨酸激酶 (Receptor tyrosine kinase, RTK), 是原癌基因 *c-erbB1* 的表达产物, 该基因定位于人 7p13-p12, 目前已知 EGFR 家族包括四个成员: EGFR (ErbB1/HER1)、ErbB2 (HER2/neu)、ErbB3 (HER4)、ErbB4 (HER4)。EGFR 是定位在胞膜上的单链多肽, 由胞外配体结合区, 疏水性跨膜区, 胞内酪氨酸激酶区三部分组成, 以无活性的单体形式存在。EGFR 的配体有 EGF、转化生长因子 α (Transforming growth factor, α TGF α)、双向调节因子 (Amphiregulin) 等, 当 EGFR 胞外区与配体结合后, 其胞内区发生自身磷酸化, EGFR 家族之间形成同源二聚体或异二聚体, 随后激活胞内酪氨酸激酶活性, 使下游的一系列胞内信号分子发生磷酸化^[1], 发挥相应的生物效应。

在多种上皮来源的恶性肿瘤中, EGFR 存在着

过度表达和变异, 包括非小细胞肺癌 (Nonsmall-cell lung cancer, NSCLC)、乳腺癌、头颈部肿瘤、胃癌、结肠癌、食道癌, 前列腺癌、膀胱癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌等。EGFR 信号通路的活化可以使肿瘤细胞增殖、肿瘤组织血管生成、凋亡减少, 这些效应是被一系列复杂的信号通路调控的。高 EGFR 表达水平与肿瘤高度恶性、易侵袭性、对放化疗的抵抗密切相关, 在部分肿瘤中, 还与预后不良有关^[2]。

EGFR 在肿瘤中最常见突变体是 EGFRvIII (EGFR class III variant), 由于缺少了 EGFR 胞外区的 267 个氨基酸, 变为截短的 EGFR, 分子量约为 145kD。EGFRvIII 可以不依赖配体而持续激活^[3], Lammering 等^[4]对中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary, CHO) 研究中发现, 在电离辐射后, EGFRvIII 比野生型 EGFR 更具有细胞保护功能。

2 EGFR 与肿瘤放射敏感性

EGFR 的表达水平与放射敏感性呈负相关, Liang 等^[5]将 EGFR 的表达型载体转染入鼠类卵巢癌细胞 (Ovarian carcinoma, OCA-I) 中, 并使之表达不同水平的 EGFR, 成功转染的 OCA-I 细胞对辐射产生不同程度的抵抗, 与未转染的细胞相比, EGFR 的低中高表达组的细胞辐射抗性分别增加了 1.28、1.37、1.60 倍。Akimoto 等^[6]在九种不同的鼠类肿瘤体内模型中发现 EGFR 的表达水平与放射敏感性存在良好的负相关。Ang 等^[7]在临床头颈部肿

第一作者: 俞家华, 男, 1981年2月出生, 2004年毕业于苏州大学放射医学与公共卫生学院, 获医学学士学位, 现攻读苏州大学放射医学与公共卫生学院放射生物学硕士学位

通讯联系人: 刘芬菊

收稿日期: 初稿 2005-10-10, 修回 2006-01-11

瘤中也发现 EGFR 的表达水平是肿瘤放疗敏感性的一个良好的预测因子。放射生物学研究表明,在有 EGFR 过度表达的肿瘤细胞中,没有相应配体存在时,辐射也可以直接激活 EGFR,并可以促进辐射后的肿瘤细胞损伤修复和存活,并在一定程度上加速了肿瘤的再增殖。这些证据提示可以将 EGFR 作为提高肿瘤放疗敏感性的治疗靶点^[8,9]。

目前,已经有两大类抗 EGFR 的药物进入临床试验,其中少部分已经在一些国家上市,一类是以 IMC-C225 (Cetuximab, Erbitux) 为代表的单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAB),能阻止配体与 EGFR 的胞外段结合;第二类是以 ZD1839 (Gefitinib, Iressa) 和 Tarceva (Erlotinib) 为代表的小分子酪氨酸特异性抑制剂 (Tyrosine kinase inhibitor, TKI),能抑制 EGFR 胞内段的磷酸化,抗 EGFR 药物可以明显地增强多种肿瘤的放射敏感性,提高疗效。在一项国际多中心临床 III 期实验表明,对于头颈部肿瘤,IMC-C255 联合放疗与单独放疗相比,能够显著提高局部控制率和延长生存期,中位生存期从 28 个月延长到 54 个月。抗 EGFR 与化疗联合也有明显的协同作用。但是在临床实验中发现抗 EGFR 药物常常引起痤疮状皮疹、恶心、呕吐、腹泻等不良反应,可能与皮肤毛囊和消化道上皮有 EGFR 表达有关,IMC-C255 作为生物制品,还能引起过敏反应,输液反应,间质性肺病等严重的不良反应^[10-12]。

EGFR 信号通路与肿瘤细胞放射敏感性的关系主要和以下几点有关。

2.1 EGFR 的下游信号通路

当 EGFR 被激活后,能激活众多下游信号通路。其中比较明确的主要有两条途径:一条是丝裂原激活蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinases, MAPK) 通路^[1],MAPK 通路活化后能催化细胞核内许多反式作用因子的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化,促进基因的转录和细胞分裂,另一条是 PI-3K (Phosphatidylinositol-3-kinase, 磷脂酰肌醇-3-激酶) /Akt 通路^[13],这是重要的抗凋亡通路。EGFR 还能活化信号转导与转录激活因子 (Signal transducers and activators of transcription, STAT),胁迫活化蛋白激酶 (Stress activated protein kinase, SAPK),核因子 κ B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 等^[13,14]。EGFR 降低肿瘤细胞放射敏感性很大程度上依赖于其下游信号通路,辐射后,活化众多 EGFR 下游通路总的效应可以促进细胞增殖,抑制凋亡,降低放射敏感性。

2.2 EGFR 与细胞凋亡

辐射诱导的细胞凋亡在肿瘤临床放疗中具有重要地位,EGFR 的激活能够抑制肿瘤细胞的凋亡,从而降低其放射敏感性。Stoll 等^[15]发现在人角质化细胞中当 EGFR 被其配体 EGF 或 TGF α 激活后,Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia 2) 家族中的抑制凋亡蛋白 Bcl-XL 表达水平上升,当用抗体 IMC-C225 阻断 EGFR 时,Bcl-XL 的 mRNA 和蛋白水平下降,细胞凋亡率增加,如果 EGFR 阻断之后导入外源性的 Bcl-XL,则凋亡受到抑制,细胞存活率增加。Spencer 等^[16]在对乳腺癌细胞 T47D 和肾癌细胞 HEK293 (Human embryonic kidney) 的研究中发现,EGFR 信号的激活能抑制 Fas 诱导的凋亡,其机制可能是 EGFR 信号抑制了 Fas 诱导的 caspase 的活化,并与 EGFR 下游的 Akt 活化密切相关。Huang 等^[17]在研究头颈部鳞癌对 IMC-C225 反应时同样发现了 Bcl-XL 的表达下降,另外还有 Bcl-2 家族的抑制诱导蛋白 Bax 表达的增加,在单次照射 6Gy 或分次照射 2Gy \times 3 次中,IMC-C255 都能增加辐射诱导的凋亡。Jost 等^[18]认为 Bcl-XL 表达水平上升是 EGFR 下游的 MAPK 通路的激活的结果,而与 PI-3K/Akt 通路无关。Bonner 等^[19]在头颈部鳞癌联合运用 5mg/mL 的 IMC-C225 和 3Gy 的辐射,发现有明显的抗增殖促凋亡的协同作用,并与信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 的磷酸化减少有关,STAT3 被为是凋亡的抑制因子。Bianco 等^[20]发现了 ZD1839 联合辐射在多种肿瘤细胞(结肠癌,卵巢癌,非小细胞肺癌,乳腺癌)中都有抗增殖和促凋亡作用,并认为 EGFR 下游的 Akt 活化受到抑制起重要作用。Sorella 等^[21]发现变异的 EGFR 在非小细胞肺癌细胞中在不接受细胞外信号的情况下,可以激活 PI-3K/Akt 和 STAT 信号通路,促进细胞增殖,用 RNA 干扰 (RNA interference) 技术敲除变异的 EGFR,或使用 AKT 和 STAT 的抑制剂之后可以观察到明显的凋亡。EGFR 抑制凋亡的机制是复杂的,其关键是 EGFR 通过其下游的信号通路作用,调节细胞内的抑制凋亡蛋白上升和诱导凋亡蛋白下降,使用 EGFR 抑制剂能明显促进辐射诱导的细胞凋亡,两者有协同作用。

2.3 EGFR 与细胞周期阻滞

细胞周期的调控是决定肿瘤对电离辐射敏感性的重要因素,细胞周期的不同阶段对辐射的敏感性是不同的,G2/M 期对辐射最敏感,其次为 G1, S 期最不敏感^[22]。EGFR 和其下游信号通路在调控细

胞周期有一定的作用。Chou 等^[23]提出 EGF 是未转化的乳腺上皮细胞系 MCF10A 通过 G1 期所必须的, 他们发现该种细胞必须依赖外源性的 EGF 而持续生长, 当 EGF 不存在时, 细胞很快就发生 G1 期阻滞而生长停止。在 Huang 等^[24]的研究中, 用 30nmol/L 的 IMC-C255 作用鳞状上皮细胞癌两天, 能使其发生 G0/G1 期阻滞, S 期细胞减少, 但对 G2-M 期没有明显影响。用免疫印迹分析发现 G1 期细胞周期蛋白依赖性激酶 (Cyclin-dependent kinase, CDK) 的抑制蛋白 P27 的增多, 提示 IMC-C255 通过提高 CDK 抑制蛋白的水平使细胞周期发生 G1 期阻滞。该科研小组^[25]在体内模型又发现 IMC-C255 联合辐射可以使鳞状上皮细胞癌发生 G1 和 G2/M 期阻滞, 同时 S 期细胞数量减少, 放射敏感性增加。Chinnaiyan 等^[26]发现 Tarceva 联合辐射与两者单独作用相比更能使 S 期细胞减少。这些结果提示阻断 EGFR 增强放射敏感性的机制可能是使细胞停留在对辐射相对敏感的 G1 期, 而辐射抗拒的 S 期细胞减少有关。

2.4 EGFR 与辐射后 DNA 损伤的修复

DNA 是辐射的主要靶分子, 细胞对辐射引起的 DNA 双链断裂 (Double strand break, DSB) 的修复与细胞的存活密切相关。细胞内存在一系列与 DSB 识别和修复有关的酶, 其中包括 ATM (Ataxia telangiectasia mutated), ATR (Ataxia telangiectasia related), DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) 等, 当这些与损伤识别修复有关的酶或其编码基因存在缺陷时, 细胞就会有较高的放射敏感性^[27]。目前, 对 EGFR 信号与 DSB 识别修复机制之间关系的了解还不多, 国外学者在以 EGFR 抑制剂为手段增强肿瘤放射敏感性的基础上进行了一定的研究。Huang 等^[25]发现肿瘤细胞受辐射后, 细胞核中的 DNA-PK 增多, 胞浆中也出现少量的 DNA-PK, 但在辐射前 1h 用 EGFR 的 IMC-C225 处理之后, 核中的 DNA-PK 大大减少, 胞浆中的 DNA-PK 增多, 另外 IMC-C225 可以抑制肿瘤细胞在辐射后的亚致死性修复 (Sublethal damage repair, SLDR) 和潜在致死性修复 (Potentially lethal damage repair, PLDR)。最近的研究表明, EGFR 被电离辐射激活后, 可以向核内转移, 并与 DNA-PK 的激活密切相关, 而 IMC-C225 与 EGFR 的胞外段结合后可以阻止 EGFR 进入细胞核内而停留在胞浆中, 使胞浆中 DNA-PK 增多, 但核内的 DNA-PK 不足, 最终使细胞不能有效地修复 DNA 损伤而放射敏感性增加。另外, EGF 激活 EGFR 后却不能使 EGFR 向核

内转移^[28]。Shinatani 等^[29]在口腔鳞癌中发现, EGFR 的酪氨酸抑制剂 ZD1839 能抑制辐射后细胞核中的 DNA-PK 的活性, Friedmann 等^[30]研究表明其机制可能是通过抑制 EGFR 下游的 PI-3K 通路引起的, 因为用 PI-3K 的抑制剂 LY294002 能观察到相同的 DNA-PK 活性降低。辐射直接激活 EGFR 后, 可以使 EGFR 进入核内激活 DNA-PK, 使细胞修复 DSB 的能力增强, 这可能是有 EGFR 过度表达的肿瘤细胞具有较低放射敏感性的一个原因, 但其详细机制还需进一步研究。

3 结论

在 EGFR 过度表达的各种肿瘤细胞中, EGFR 信号通路的激活可以明显降低放射敏感性。实验表明这与 EGFR 激活后促进增殖, 抑制凋亡, 调控细胞周期, DNA 损伤修复等生物效应有关, 运用 EGFR 抑制剂可以明显增强肿瘤细胞的放射敏感性。但目前, EGFR 通路如何促进肿瘤细胞在辐射后存活的机制还不是很清楚, 而且 EGFR 抑制剂的辐射增敏作用还需要进一步研究, 充分了解两者的机制可以为临床放疗增敏提供可靠的依据。

参考文献:

- 1 Wells A. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, **31**(6): 637-643
- 2 Carlos L, Arteaga. *Oncologist*, 2002, **7**(Suppl 4): 31-39
- 3 Kuan C T, Wikstrand C J, Bigner D D. *Endocr Relat Cancer*, 2001, **8**: 83-96
- 4 Lammering G, Hewit T H, Valerie K, *et al.* *Oncogene*, 2003, **22**(36): 5545-5553
- 5 Liang K, Ang K K, Milas L, *et al.* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, **57**(1): 246-254
- 6 Akimoto T, Hunter N R, Buchmiller L, *et al.* *Clin Cancer Res*, 1999, **5**(10): 2884-2890
- 7 Ang K K, Berkey B A, Tu X, *et al.* *Cancer Res*, 2002, **62**(24): 7350-7356
- 8 Lammering G, Hewit T H, Hawkins W T, *et al.* *J Natl Cancer I*, 2001, **93**(12): 921-929
- 9 Lammering G. *Curr Med Chem Anti Cancer Agents*, 2003, **3**(5): 327-333
- 10 Ciardiello F, Tortora G. *Clin Cancer Res*, 2001, **7**(10): 2958-2970
- 11 Harari P M. *Ann Oncol*, 2005, **16**(Suppl 6): 13-19
- 12 Vallbohmer D, Lenz H J. *Clin Colorectal Cancer*, 2005, **5**(Suppl 1): S19-27
- 13 Yarden Y, Sliwkowski M X. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2**(2): 127-137

- 14 Guo G, Wang T, Gao Q, *et al.* *Oncogene*, 2004, **23**(2): 535-545
- 15 Stoll S W, Benedict M, Mitra R, *et al.* *Oncogene*, 1998, **16**(11): 1493-1499
- 16 Spencer G, Shine T, Ryan O, *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**(25): 17612-17618
- 17 Huang S M, Bock J M, Harari P M. *Cancer Res*, 1999, **59**(8): 1935-1940
- 18 Jost M, Huggett T M, Kari C, *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **6**(9): 6320-6326
- 19 Bonner J A, Raisch K P, Trummell H Q, *et al.* *J Clin Oncol*, 2000, **18**(Suppl 21): 47S-53S
- 20 Bianco C, Tortora G, Bianco R, *et al.* *Clin Cancer Res*, 2002, **8**(10): 3250-3258
- 21 Sorella R, Bell D W, Haber D A, *et al.* *Science*, 2004, **305**(5687): 1163-1167
- 22 Pawlik T M, Keyomarsi K. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, **59**(4): 928-942
- 23 Chou J L, Fan Z, DeBlasio T, *et al.* *Breast Cancer Res Treat*, 1999, **55**(3): 267-283
- 24 Huang S M, Bock J M, Harari P M. *Cancer Res*, 1999, **59**(8): 1935-1940
- 25 Huang S M, Harari P M. *Clin Cancer Res*, 2000, **6**(6): 2166-2174
- 26 Chinnaiyan P, Huang S, Vallabhaneni G, *et al.* *Cancer Res*, 2005, **65**(8): 3328-3335
- 27 Khanna K K, Jackson S P. *Nat Genet*, 2001, **27**(3): 247-254
- 28 Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, *et al.* *J Biol Chem*, 2005, **280**(35): 31182-31189
- 29 Shinatani S, Li C, Mihara M, *et al.* *Int J Cancer*, 2003, **107**(6): 1030-1037
- 30 Friedmann B, Caplin M, Hartley J A, *et al.* *Clin Cancer Res*, 2004, **10**(19): 6476-6486

EGFR and radiosensitization of tumor cells

YU Jiahua LIU Fenju

(School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215123)

ABSTRACT EGFR belongs to tyrosine kinase receptors, and is overexpressed and mutant in a number of malignant tumors originated from epithelial origin. After ligand binding and activation, EGFR leads to a series of downstream signal pathways of activation and many biological effects. EGFR signal pathway is associated with radioresistance of tumor cells, and the mechanism is related to cell proliferation, reducing apoptosis, regulating cell cycle arrest, and DNA radiation damage repair. EGFR monoclonal antibodies and small molecule tyrosine kinase inhibitors can promote radiosensitization of tumor cells.

KEYWORDS Epidermal growth factor receptor, Malignant tumor, Radiosensitization

CLC R811.5, R818.05