

## ER $\alpha$ 通路代偿性激活在乳腺癌细胞的拉帕替尼获得性耐药中的作用

李 喆<sup>1\*</sup>, 常 涛<sup>1</sup>, 石林祥<sup>1</sup>, 房 林<sup>1</sup>, 杨生生<sup>2\*</sup>, 方国恩<sup>3</sup>

1. 同济大学附属第十人民医院甲状腺乳腺外科, 上海 200072

2. 第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433

3. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 了解雌激素受体  $\alpha$  (estrogen receptor $\alpha$ , ER $\alpha$ )通路代偿性激活在乳腺癌细胞 BT474 的拉帕替尼获得性耐药发生过程中的作用和可能机制。**方法** 利用 real-time PCR 和蛋白质印迹检测 BT474 被拉帕替尼作用后人表皮生长因子受体 2(HER2)通路和 ER $\alpha$  通路活性的改变;利用拉帕替尼浓度递增、持续培养的方法建立乳腺癌细胞 BT474 的拉帕替尼获得性耐药细胞(rBT474)模型;采用流式细胞术检测拉帕替尼对 rBT474 细胞凋亡的影响,进一步以蛋白质印迹法分析 BT474 和 rBT474 在 HER2 通路和 ER 通路上的差别;应用 MTT 法检测 rBT474 在拉帕替尼和氟维司群作用下的生长情况;利用克隆形成实验观察双靶点治疗对预防拉帕替尼获得性耐药的可能性。**结果** Real-time PCR 和蛋白质印迹检测显示拉帕替尼抑制 BT474 细胞 HER2 磷酸化,同时诱导叉头蛋白 3A (FOXO3a)和孕激素受体(PR)的表达升高;成功获得的耐药细胞株 rBT474 在含有 5  $\mu$ mol/L 拉帕替尼的培养液中仍可持续生长;蛋白质印迹结果显示,rBT474 细胞与 BT474 细胞相比,其磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)通路受抑制,而促分裂素原活化蛋白激酶(MAPK)通路激活,ER 通路的活化更加明显;MTT 法检测结果显示,与单用拉帕替尼相比,联合使用拉帕替尼和氟维司群可抑制 rBT474 细胞活力( $P < 0.01$ );克隆形成实验结果表明,与二甲亚砷组、拉帕替尼组和氟维司群组相比,拉帕替尼和氟维司群联合用药组可抑制 BT474 细胞克隆形成( $P < 0.01$ ),具有预防获得性耐药发生的可能。**结论** ER $\alpha$  通路的代偿性激活可能是导致 HER2(+)/ER $\alpha$ (+) 的乳腺癌细胞对拉帕替尼产生获得性耐药的机制之一,而 PI3K/AKT 抑制和 MAPK 激活可能是 ER $\alpha$  代偿激活的主要原因。

**[关键词]** 拉帕替尼;乳腺肿瘤;肿瘤抗药性;雌激素受体  $\alpha$ ; erbB-2 受体**[中图分类号]** R 737.9**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2013)06-0616-07

### Compensatory activation of estrogen receptor $\alpha$ signaling in acquired resistance to lapatinib of HER2-overexpressing/ER $\alpha$ -positive breast cancer cells

LI Zhe<sup>1\*</sup>, CHANG Tao<sup>1</sup>, SHI Lin-xiang<sup>1</sup>, FANG Lin<sup>1</sup>, YANG Sheng-sheng<sup>2\*</sup>, FANG Guo-en<sup>3</sup>

1. Department of Thyroid and Breast Surgery, the Tenth Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200072, China

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of compensatory activation of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) signaling in acquired resistance to lapatinib of breast cancer cells BT474 and the related mechanism. **Methods** Real-time PCR and Western blotting analysis were used to determine the changes of HER2 and ER $\alpha$  pathways in BT474 cells treated by lapatinib. Acquired resistant model of rBT474 cells was induced with increasing concentrations of lapatinib (from 0.25  $\mu$ mol/L to 5  $\mu$ mol/L); the apoptosis in rBT474 cells was determined by flow cytometry. Western blotting analysis was used to evaluate the differences between BT474 and rBT474 in the HER2 and ER pathways. The growth of rBT474 cells treated by lapatinib and/or fulvestrant was detected by MTT assay, and colony formation was used to observe the possibility of preventing acquired resistance to lapatinib in BT474 cells by double targets therapy. **Results** The results of real-time PCR and Western blotting analysis showed

**[收稿日期]** 2013-01-17**[接受日期]** 2013-02-22

**[基金项目]** 国家自然科学基金(51003078),上海市科学技术委员会资助课题(12140902302),上海市卫生局资助科研课题(2008133). Supported by National Natural Science Foundation of China(51003078), Research Projects of Shanghai Municipal Science and Technology Commission(12140902302) and Research Projects of Shanghai Municipal Health Bureau (2008133).

**[作者简介]** 李 喆,博士,副教授、副主任医师。

\* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-66300588, E-mail: lizhe@medmail.com.cn; Tel: 021-81870970, E-mail: ysscn@126.com

that Lapatinib inhibited phosphorylation of HER2 and induced expression of forkhead-box protein O 3A (FOXO3a) and progesterone receptor (PR) in BT474 cells. Acquired resistance cell model of rBT474 was established in a 5  $\mu$ mol/L lapatinib condition. Western blotting analysis showed that the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) pathway was inhibited in rBT474 cells compared with that in the BT474 cells, while the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, especially the ER pathway, were activated in the BT474 cells. MTT results showed that, Lapatinib combined with fulvestrant had a significantly greater inhibition on rBT474 cell vitality compared with lapatinib alone ( $P < 0.01$ ). Colony formation results also showed that combination of lapatinib and fulvestrant had a significantly greater inhibition effect against colon formation of BT474 cells compared with each drug alone and DMSO ( $P < 0.01$ ), showing a possible prevention ability against acquired resistance. **Conclusion** Compensatory activation of estrogen receptor  $\alpha$  signaling might be one of the mechanisms of acquired resistance to lapatinib in HER2-overexpressing/ER $\alpha$ -positive breast cancer cells, and inhibition of PI3K/AKT and activation of MAPK might be the main reason for compensatory activation of ER $\alpha$ .

[Key words] lapatinib; breast neoplasms; neoplasm drug resistance; estrogen receptor alpha; erbB-2 receptor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(6): 616-622]

拉帕替尼(lapatinib)是继曲妥珠单抗(赫赛汀)之后第2个被美国FDA批准用于人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)阳性乳腺癌的分子靶向药物,可以同时抑制表皮生长因子受体(EGFR)和HER2的酪氨酸激酶活性,具有相对分子质量小、可以通过血脑屏障,且口服给药的特点。临床研究证实,其治疗曲妥珠单抗耐药的乳腺癌患者仍然有效,可降低乳腺癌脑转移的发生风险,且心脏毒性小。但同其他靶向治疗药物一样,原发性和获得性耐药严重限制了其疗效。拉帕替尼单药反应率约为24%,初始治疗有效的患者多数在半年左右出现耐药<sup>[1-2]</sup>。因此深入了解拉帕替尼获得性耐药的机制,是发挥其疗效的关键。目前对拉帕替尼获得性耐药机制研究尚不深入,仅有的一些结果提示获得性耐药细胞的存活不再完全依赖HER2通路,而转而依赖一些代偿性生存通路的激活<sup>[3-4]</sup>。由于HER2通路与雌激素受体(estrogen receptor, ER)通路存在交互作用<sup>[4-6]</sup>,拉帕替尼可能在抑制HER2通路同时也对ER通路发挥作用。关于ER通路代偿性活化在拉帕替尼获得性耐药过程中的意义和具体机制还存在争议。为进一步了解拉帕替尼对ER通路的影响,及耐药株与敏感株在HER2/EGFR和ER通路方面的差异,本研究应用临床治疗浓度的拉帕替尼长期培养筛选乳腺癌细胞。模拟临床过程,体外建立拉帕替尼获得性耐药模型;明确ER通路激活在拉帕替尼获得性耐药发生过程中的作用,并探讨其可能的分子机制。

## 1 材料和方法

1.1 细胞及试剂 BT474乳腺癌细胞株购于中国

科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;拉帕替尼(Cat. S1028)和氟维司群(fulvestrant, Cat. S1191)购于Selleck Chemicals公司;RPMI 1640培养基和胎牛血清(FBS)购于Hyclone公司;HER2抗体、磷酸化HER2抗体、ER抗体、孕激素受体(PR)抗体、叉头蛋白3A(FOXO3a)抗体购于Epitomics公司、AKT抗体、磷酸化AKT抗体(Ser-437)、ERK抗体、磷酸化ERK抗体和羊抗兔IgG二抗购于Proteintech公司;TRIzol购自Invitrogen公司;RIPA蛋白裂解液购于碧云天生物技术有限公司;M-MLV RTase cDNA Synthesis试剂盒和SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>试剂盒购于TaKaRa公司;CCK-8细胞增殖-毒性检测试剂盒购于日本同仁化学研究所(Dojindo);吉姆萨(Giemsa)染液购自上海博光生物技术有限公司,PCR引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2 细胞培养及拉帕替尼获得性耐药细胞模型的建立 BT474细胞用含10%FBS的RPMI 1640培养液,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养;分别以0.25~5  $\mu$ mol/L浓度的拉帕替尼共持续培养12周后,获得能持续在含5  $\mu$ mol/L拉帕替尼的完全培养液下存活的拉帕替尼耐药细胞株rBT474,用含5  $\mu$ mol/L拉帕替尼、10%FBS的RPMI 1640培养液在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。

1.3 细胞RNA抽提和real-time PCR 按TRIzol说明书方法分别提取BT474和rBT474细胞总RNA,并以oligo dT为引物,用M-MLV反转录酶,反转录获得cDNA,按SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>试剂盒说明书进行real-time PCR检测。HER2引物序列为:5'-GGA TGT GCG GCT CGT ACA C-3',

5'-TAA TTT TGA CAT GGT TGG GAC TCT T-3'; ER $\alpha$  引物: 5'-CTG CCC TGG AGA CCA CAA AT-3', 5'-GGA CTT TAC TGC TGA TGT TGT TCT TT-3'; PR 引物: 5'-TTC ACC AGG TCA AGA CAT ACA GTT G-3', 5'-TTG TCA TGT CCT GCA TAG ATC ACA-3'; FOXO3a 引物: 5'-TCT ACG AGT GGA TGG TGC GTT-3', 5'-CGA CTA TGC AGT GAC AGG TTG TG-3'.

1.4 蛋白质印迹检测 HER2、ER 通路相关蛋白 收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入含 1 mmol/L 的 RIPA 蛋白裂解液提取总蛋白, BCA 法定量后行 SDS-PAGE, 电转移至硝酸纤维素膜, 室温封闭 2 h, 加入相应比例的抗体, 4 $^{\circ}$ C 反应过夜, Tris 盐酸缓冲液洗膜, 加入相应二抗反应 2 h, 增强型化学发光检测, 成像。

1.5 流式细胞术检测拉帕替尼对 BT474 和 rBT474 细胞凋亡的影响 以 5  $\mu$ mol/L 拉帕替尼分别处理 BT474 和 rBT474 细胞 6 h 后收集细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入 500  $\mu$ L 的结合缓冲液悬浮细胞; 加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ L 碘化丙啶(PI)混匀后, 室温避光反应 10 min, 上机检测。

1.6 MTT 法检测拉帕替尼、氟维司群对 BT474 和 rBT474 增殖的影响 取对数生长期的 BT474 和 rBT474 细胞分别以  $5 \times 10^4$ /孔接种于 96 孔板, 将两者各分为 10 nmol/L 氟维司群处理和未处理组, 再以 0、0.5、1 和 5  $\mu$ mol/L 拉帕替尼处理, 每组设 5 个复孔。在处理 48 h 加入 5 g/L 的 MTT 20  $\mu$ L,

37 $^{\circ}$ C 避光孵育 4 h, 弃培养液, 每孔加 100  $\mu$ L 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), 避光震荡 10 min, 完全溶解后, 用酶标仪在 570 nm 处检测光密度(D)值, 按  $D_{\text{试验组}}/D_{\text{对照组}} \times 100\%$  计算各组细胞活力(%), 以未加药的 rBT474 组为对照, 实验重复 3 次。

1.7 克隆形成实验观察拉帕替尼/氟维司群对 BT474 增殖的影响 将 BT474 细胞分为 4 组, 以 300 个细胞/孔的密度接种于 6 孔板中, 分别以含 0.1% DMSO、1  $\mu$ mol/L 拉帕替尼、10 nmol/L 氟维司群和 1  $\mu$ mol/L 拉帕替尼/10 nmol/L 氟维司群的 RPMI 1640 培养液持续培养 21 d。PBS 洗涤 2 次, 甲醇固定 15 min 后, 用吉姆萨染色, 观察活细胞克隆形成个数(细胞数超过 50 个的为一个克隆)。按(克隆数/接种细胞数)  $\times 100\%$  计算克隆形成率(%), 实验重复 3 次。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 14.0 软件进行统计分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析或 *t* 检验。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 拉帕替尼对敏感株 BT474 细胞中 ER $\alpha$  通路和 HER2 通路的影响 应用 real-time PCR 和蛋白质印迹法分别检测 1  $\mu$ mol/L 拉帕替尼处理 24 h 后的敏感株 BT474 细胞中的 ER $\alpha$  通路及 HER2 通路的改变(图 1), 结果显示拉帕替尼能抑制 HER2 通路, HER2、AKT 和 ERK 的磷酸化水平降低; 并激活 ER 通路, PR 和 FOXO3a 表达水平上升( $P < 0.01$ )。

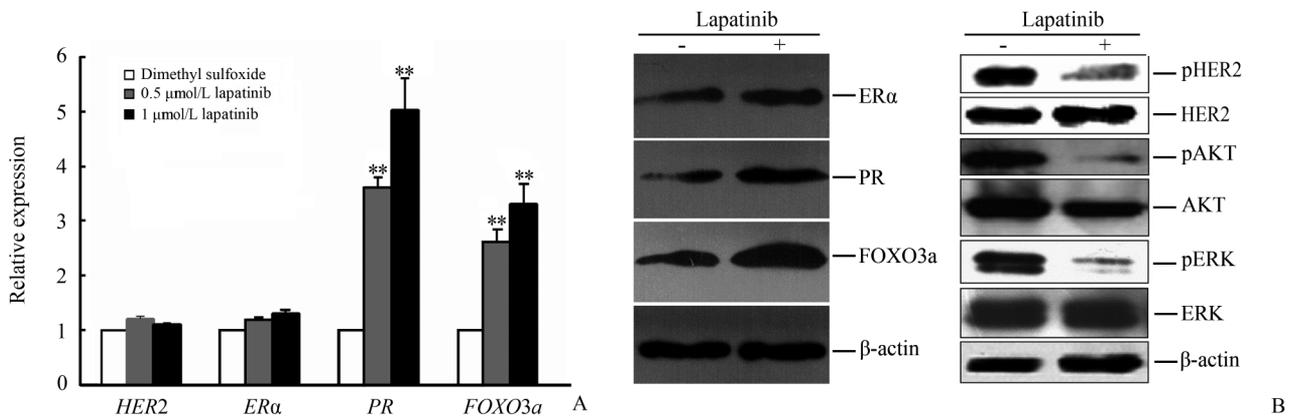


图 1 Real-time PCR(A)和蛋白质印迹法(B)检测拉帕替尼对敏感株 BT474 细胞中 ER $\alpha$  通路和 HER2 通路的影响

Fig 1 Effect of lapatinib on ER $\alpha$  and HER2 pathways in BT474 cells as revealed by real-time PCR (A) and Western blotting analysis (B)

ER $\alpha$ : Estrogen receptor  $\alpha$ ; HER2: Human epidermal growth factor receptor-2; PR: Progesterone receptor; FOXO3a: Fork-head-box protein O 3A. \*\*  $P < 0.01$  vs dimethyl sulfoxide group;  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 拉帕替尼获得性耐药细胞模型的建立 根据临床患者的血药浓度范围 2.43~4.87  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 应用不同浓度拉帕替尼培养液(0.25~5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )持续培养 BT474 细胞 21 d。选取在含有 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  拉帕替尼培养液中仍然存活的单细胞克隆, 获得耐药细胞株 rBT474。可见 BT474 在 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  拉帕替尼处

理 24 h 后细胞数减少, 而 rBT474 的细胞数无明显改变(图 2A)。流式细胞术检测也表明, 在 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  拉帕替尼处理 6 h 后 rBT474 的凋亡率[(11.42 $\pm$ 3.67)%]低于 BT474[(65.64 $\pm$ 2.14)%], 差异有统计学意义( $P < 0.01$ , 图 2B、2C), 说明成功建立获得性耐药细胞模型。

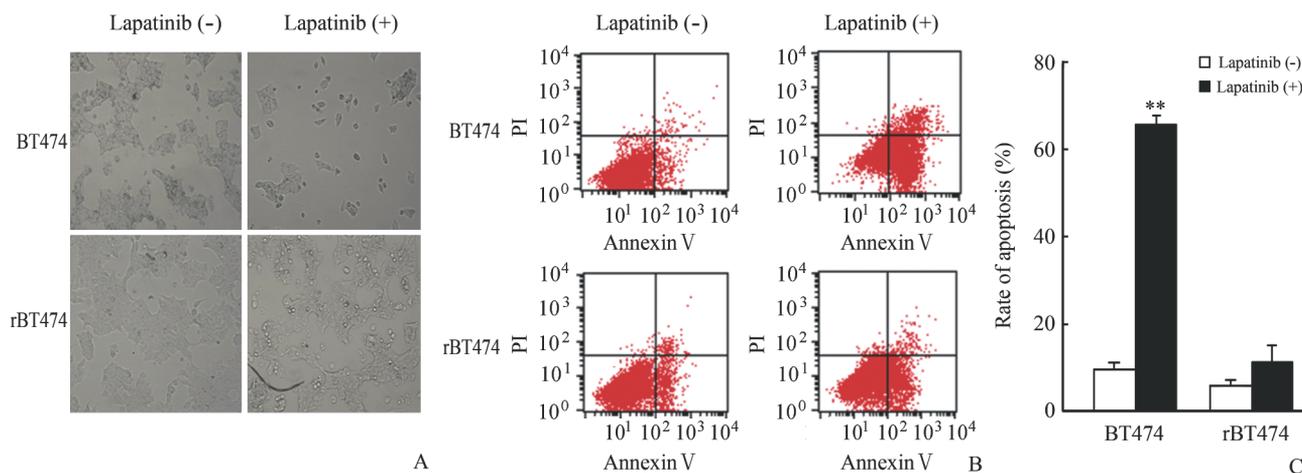


图 2 拉帕替尼获得性耐药细胞株 rBT474 的鉴定

Fig 2 Identification of rBT474 cells with acquired resistance to lapatinib

A: Cellular morphology of BT474 and rBT474 cells after treated by 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  lapatinib 24 h; B: Apoptosis analysis of BT474 and rBT474 cells after treated by 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  lapatinib 6 h; C: Apoptosis rate of BT474 and rBT474 cells. \*\*  $P < 0.01$  vs rBT474 with 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  lapatinib;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . Original magnification:  $\times 200$  (A)

2.3 蛋白质印迹法检测 rBT474 和 BT474 中 ER $\alpha$  通路和 HER2 通路的活性差异 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  拉帕替尼持续培养的 rBT474 细胞和未经处理的 BT474 细胞相比, 其 ER 通路激活, ER $\alpha$  和 PR 的蛋白水平增

加; HER2 及其下游的磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)通路受抑制而促分裂素原活化蛋白激酶(MAPK)-ERK 通路被激活, 磷酸化的 HER2 和 AKT 表达下降, 磷酸化的 ERK 表达增加。见图 3。

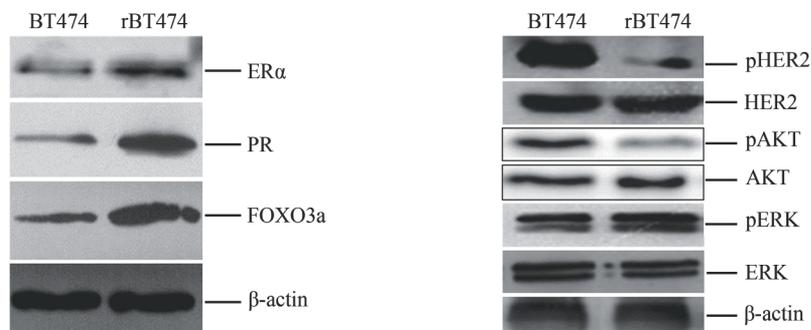


图 3 蛋白质印迹法检测耐药细胞株 rBT474 和敏感株 BT474 中 ER $\alpha$  通路和 HER2 通路的活性差异

Fig 3 Western blotting analysis of ER and HER2 pathway activation in BT474 and rBT474 cells

ER $\alpha$ : Estrogen receptor  $\alpha$ ; FOXO3a: Forkhead-box protein O 3A; PR: Progesterone receptor

2.4 抑制 ER $\alpha$  通路可逆转耐药细胞株 rBT474 对拉帕替尼的敏感性 上述结果表明, ER $\alpha$  通路代偿

性激活参与拉帕替尼耐药性产生的分子机制, 因此我们推测使用 ER $\alpha$  通路抑制剂可能有助于恢复

rBT474 对拉帕替尼的敏感性。雌激素受体的灭活剂氟维司群可以有效降解 ER $\alpha$ , 因此我们采用氟维司群抑制 ER $\alpha$  通路, 并用 MTT 法检测。结果显示, 单独使用 5  $\mu\text{mol/L}$  拉帕替尼处理 rBT474 细胞, 其细胞活力[(77.85 $\pm$ 6.37)%]未受到明显抑制; 而联合使用 5  $\mu\text{mol/L}$  拉帕替尼和 10 nmol/L 氟维司群处理后, 其细胞活力[(41.19 $\pm$ 8.24)%]低于单用 5  $\mu\text{mol/L}$  拉帕替尼处理组( $P < 0.01$ , 图 4)。结果提示, 拉帕替尼和氟维司群联合使用能抑制耐药细胞株 rBT474 的生长, 逆转拉帕替尼的获得性耐药。

2.5 双靶点治疗可预防 BT474 对拉帕替尼的获得性耐药 结果显示用药 21 d 后, 1  $\mu\text{mol/L}$  拉帕替尼/10 nmol/L 氟维司群组 BT474 细胞所形成的克隆数少于 DMSO 组、1  $\mu\text{mol/L}$  拉帕替尼组和 10 nmol/L 氟维司群组( $P < 0.01$ ), 其克隆形成率分别为 (10.67 $\pm$ 3.06)%、(95.67 $\pm$ 4.04)%、(60.67 $\pm$

4.73)%和(70.33 $\pm$ 5.51)%, 表明拉帕替尼和氟维司群联合用药可抑制 BT474 细胞克隆形成, 具有预防获得性耐药发生的可能。见图 5。

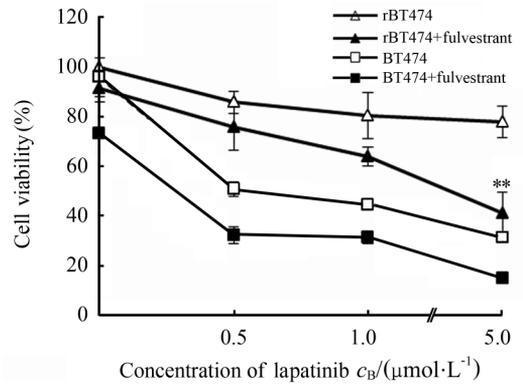


图 4 拉帕替尼和氟维司群对 BT474 和 rBT474 增殖的影响

Fig 4 Effect of lapatinib and fulvestrant on proliferation of BT474 and rBT474 cells

\*\*  $P < 0.01$  vs rBT474 group;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

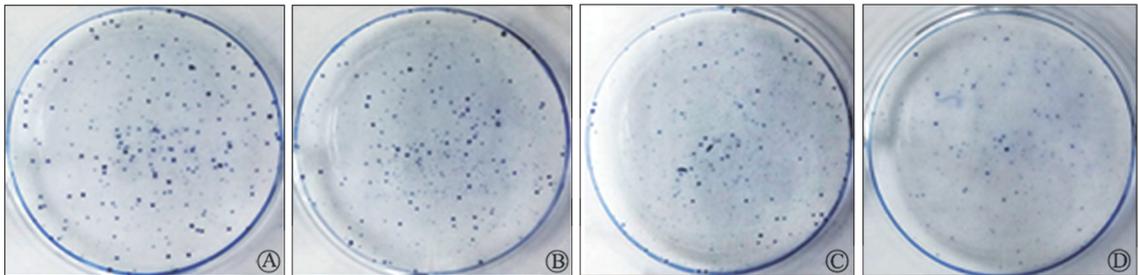


图 5 拉帕替尼和氟维司群联用对 BT474 克隆形成的影响

Fig 5 Effect of lapatinib combined with fulvestrant on colony formation of BT474 cells

A: 0.1% DMSO; B: 1  $\mu\text{mol/L}$  lapatinib; C: 10 nmol/L fulvestrant; D: 1  $\mu\text{mol/L}$  lapatinib+10 nmol/L fulvestrant

### 3 讨论

有 25% 的乳腺癌患者高表达 HER2 基因, HER2 表达阳性的乳腺癌恶性程度高, 侵袭性强, 患者预后极差<sup>[1-2]</sup>。针对 HER2 基因的靶向治疗药物是目前的研究热点, 其中曲妥珠单抗和拉帕替尼已经获批应用于临床。拉帕替尼可作用于 HER1 和 HER2 双靶点, 故对曲妥珠单抗耐药的乳腺癌仍然有效; 相对分子质量小, 可穿透血脑屏障, 降低乳腺癌脑转移的发生风险; 并且心脏毒性小, 可口服给药, 应用方便; 上市之初就被寄予厚望<sup>[7-8]</sup>。但人们发现拉帕替尼的有效率仅为 24%, 原发性和获得性耐药严重限制了其疗效, 大多数患者在用药半年左右出现耐药<sup>[9-10]</sup>。因此, 明确拉帕替尼获得性耐药

的机制并加以预防是发挥其疗效的关键, 但目前对拉帕替尼的耐药机制研究尚不深入。研究表明, 磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚单位  $\alpha$  (PIK3CA) 基因突变导致 PI3K 信号通路的过度活化是拉帕替尼原发和继发性耐药的主要机制<sup>[11]</sup>; TK 激酶受体 Brk 和 HER2 共表达可导致 Ras/MAPK 和 E/cdk2 两条通路共同激活, 增强细胞增殖信号, 导致拉帕替尼原发性耐药<sup>[12]</sup>。HER3 受体过度表达, 与 HER2 形成 HER2/HER3 杂合体, 导致下游 PI3K/AKT 通路的过度激活, 拉帕替尼只能抑制 HER2 受体的 TK 激酶活性, 而对 HER3 的 TK 激酶无效; 因此 HER3 受体的过度表达被认为是所有针对 HER2TK 抑制剂的共同机制<sup>[13]</sup>。目前认为, 获得性耐药的机制主要是拉帕替尼强力抑制 HER2 通路后, 引发原有通

路之间的交互影响发生改变,导致其他代偿通路的激活,从而使癌细胞不再单纯依赖 HER2 通路<sup>[5,14-17]</sup>。也有临床试验支持 HER2 和 ER 通路联合用药,以延长 HER2(+)/ER(+)患者的无病生存期<sup>[7]</sup>。但现有的研究中关于拉帕替尼获得性耐药机制中 HER2 和 ER $\alpha$  通路的激活状态和激活机制存在不同观点,有研究发现耐药株中存在着 PI3K/AKT 通路的代偿性激活<sup>[18]</sup>。

我们以 HER2(+)和 ER(+)的乳腺癌细胞 BT474 为模型,检测了拉帕替尼对其 HER2 和 ER 通路的影响,发现拉帕替尼可抑制 HER2 通路活化,使 HER2、AKT 和 ERK 的磷酸化水平降低;并可诱导 ER $\alpha$  通路活性,使 ER $\alpha$  的靶基因 PR 表达升高。通过参照临床拉帕替尼治疗乳腺癌的剂量,我们获得了 BT474 的拉帕替尼获得性耐药株 rBT474,并检测了敏感株 BT474 和耐药株 rBT474 细胞之间 HER2 和 ER 通路活化状态的差异。结果发现 rBT474 细胞内的 ER 通路确实存在活化;并且 PI3K/AKT 通路受到抑制,磷酸化 AKT 表达降低,FOXO3a 表达降低;而 MAPK 通路激活,磷酸化 ERK 有所增加。

研究已证实,FOXO3a 是 ER 的转录激活因子,在乳腺癌细胞系中 ER 的表达与活化的 FOXO3a 水平呈正相关,异源性的 FOXO3a 可诱导 ER 蛋白水平和启动子活性,下调 FOXO3a 降低 ER 水平;而 PI3K/AKT 通路激活可使 FOXO3a 磷酸化失活,从而使 ER 表达降低<sup>[19]</sup>。rBT474 细胞中 PI3K/AKT 通路受抑制,解除对 FOXO3a 的抑制作用,从而激活 ER 通路。此外,大量研究表明,MAPK 通路在乳腺发育和乳腺癌中,对 HER2 和 ER 之间的交互作用起重要的核心作用<sup>[20-23]</sup>。在 ER(+)的乳腺癌细胞中,MAPK 可以通过 Src 磷酸化 ER 及其共调节因子,使之活化并增强其对靶基因的转录活性<sup>[24]</sup>。rBT474 细胞中 MAPK 通路的异常激活可能是 ER 通路代偿性激活的重要机制。

为评价抑制 ER 通路对拉帕替尼获得性耐药的逆转和预防作用,我们进行了 MTT 检测和克隆形成实验,发现拉帕替尼和氟维司群联合用药可抑制 rBT474 细胞的增殖,并有效地抑制 BT474 细胞的克隆形成。针对 HER2 和 ER 通路的联合用药可能是预防拉帕替尼获得性耐药的有效方法,进一步的

临床试验有待开展。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Pommier S J, Quan G G, Christante D, Muller P, Newell A E, Olson S B, et al. Characterizing the HER2/neu status and metastatic potential of breast cancer stem/progenitor cells [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17: 613-623.
- [2] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60: 277-300.
- [3] Wang Y C, Morrison G, Gillihan R, Guo J, Ward R M, Fu X, et al. Different mechanisms for resistance to trastuzumab versus lapatinib in HER2-positive breast cancers-role of estrogen receptor and HER2 reactivation [J]. *Breast Cancer Research*, 2011, 13: R121.
- [4] Xia W, Bacus S, Hegde P, Husain I, Strum J, Liu L, et al. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 7795-7800.
- [5] Bender L M, Nahta R. Her2 cross talk and therapeutic resistance in breast cancer [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 3906-3912.
- [6] Chu Q S, Cianfrocca M E, Goldstein L J, Gale M, Murray N, Loftiss J, et al. A phase I and pharmacokinetic study of lapatinib in combination with letrozole in patients with advanced cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 4484-4490.
- [7] Bauerfeind I, Elling D, Heinemann V. Lapatinib in the treatment of hormone receptor-positive/ErbB2-positive breast cancer [J]. *Breast Care (Basel)*, 2010, 5(s1): 13-15.
- [8] Geyer C E, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu C G, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355: 2733-2743.
- [9] Macfarlane R J, Gelmon K A. Lapatinib for breast cancer: a review of the current literature [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2011, 10: 109-121.
- [10] Esteva F J, Yu D, Hung M C, Hortobagyi G N. Molecular predictors of response to trastuzumab and lapatinib in breast cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7: 98-107.
- [11] Gomez H L, Doval D C, Chavez M A, Ang P C, Aziz Z, Nag S, et al. Efficacy and safety of lapatinib as first-line therapy for ErbB2-amplified locally advanced or meta-

static breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 2999-3005.

[12] Eichhorn P J, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 9221-9230.

[13] Xiang B, Chatti K, Qiu H, Lakshmi B, Krasnitz A, Hicks J, et al. Brk is coamplified with ErbB2 to promote proliferation in breast cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 12463-12468.

[14] Sergina N V, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat K M, et al. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3[J]. *Nature*, 2007, 445: 437-441.

[15] Campone M, Juin P, André F, Bachelot T. Resistance to HER2 inhibitors: is addition better than substitution? Rationale for the hypothetical concept of drug sedimentation[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2011, 78: 195-205.

[16] Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, Greshock J, Annan R, et al. Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL[J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 6871-6878.

[17] Azuma K, Tsurutani J, Sakai K, Kaneda H, Fujisaka Y, Takeda M, et al. Switching addictions between HER2 and FGFR2 in HER2-positive breast tumor cells: FGFR2 as a potential target for salvage after lapatinib failure[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407: 219-224.

[18] Rexer B N, Ham A J, Rinehart C, Hill S, Granja-Ingram Nde M, González-Angulo A M, et al. Phosphoproteomic mass spectrometry profiling links Src family kinases to escape from HER2 tyrosine kinase inhibition[J]. *Oncogene*, 2011, 30: 4163-4174.

[19] Guo S, Sonenshein G E. Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the Her-2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 8681-8690.

[20] Jin W, Wu L, Liang K, Liu B, Lu Y, Fan Z. Roles of the PI-3K and MEK pathways in Ras-mediated chemoresistance in breast cancer cells[J]. *British J Cancer*, 2003, 89: 185-191.

[21] Atanaskova N, Keshamouni V G, Krueger J S, Schwartz J A, Miller F, Reddy K B. MAP kinase/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling and tumor growth but does not confer tamoxifen resistance[J]. *Oncogene*, 2002, 21: 4000-4008.

[22] Zora N, Dragica N. Cross-talk between ER and HER2 in breast carcinoma[J]. *Archive Oncol*, 2006, 14: 146-150.

[23] Edwards D P. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone[J]. *Ann Rev Physiol*, 2005, 67: 335-376.

[24] Lange C A, Gioeli D, Hammes S R, Marker P C. Integration of rapid signaling events with steroid hormone receptor action in breast and prostate cancer[J]. *Ann Rev Physiol*, 2007, 69: 171-199.

[本文编辑] 尹 茶

• 读者 • 作者 • 编者 •

## 数值的修约规则

对某一表示测量结果的数值,根据保留位数的要求,将多余的数字进行取舍,按照一定的规则,选取一个近似数来代替原来的数,这一过程称为数值修约。数值修约时应注意遵循以下规则:

- (1)拟舍弃数字的最左一位数字小于5时,则舍去,即保留的各位数字不变。如将12.1498修约到一位小数,则得12.1。
- (2)拟舍弃数字的最左一位数字大于5;或者是5,而其后跟有并非全部为0的数字时,则进一,即保留的末位数字加1。如将1268修约到“百”数位,得 $13 \times 10^2$ 或1300;将1.05001修约到一位小数,得1.1。
- (3)拟舍弃数字的最左一位数字为5,而右面无数字或皆为0时,若所保留的末位数字为奇数(1,3,5,7,9)则进一,为偶数(2,4,6,8,0)则舍弃。如将1.050修约到一位小数,得1.0;而将1.15修约到一位小数,则得1.2。
- (4)负数修约时,先将它的绝对值按上述3条规定进行修约,然后在修约值前面加上负号。
- (5)拟修约数字应在确定修约位数后一次修约获得结果,而不得连续修约。