

· 综述 ·

库欣病的分子机制及靶向药物

辅容 卢琳 龚凤英 潘慧 朱慧娟 陆召麟

【摘要】 由垂体瘤分泌过多的促肾上腺皮质激素导致的库欣综合征,又称为库欣病,首选治疗为手术治疗,放射治疗和药物治疗为其辅助治疗,但疗效均有限。近年来关于库欣病发病机制的研究集中于调控细胞增殖的异常蛋白表达和调控激素分泌的异常信号转导,靶点主要为表皮生长因子受体(EGFR)、细胞周期蛋白 E(CDK2/Cyclin E)和热休克蛋白 90(HSP90),相应的靶向药物吉非替尼、roscovitine 和水飞蓟素均能有效减小肿瘤体积,降低促肾上腺皮质激素水平。

【关键词】 促肾上腺皮质激素分泌垂体腺瘤;靶向治疗;表皮生长因子;细胞周期蛋白依赖激酶 2;热休克蛋白 90

基金项目:中华医学会临床医学科研专项资金-下丘脑垂体研究项目(13050940479);国家临床重点专科基金(WBYZ2011-873)

Molecular mechanisms of Cushing's disease and targeted drug Fu Rong, Lu Lin, Gong Fengying, Pan Hui, Zhu Huijuan, Lu Zhaolin. Department of Endocrinology, Key Laboratory of Endocrinology of National Health and Family Planning Commission, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China

Corresponding author: Lu Lin, Email: lulin88@sina.com

【Abstract】 Cushing's disease, also called Cushing's syndrome is due to excessive secretion of adrenocorticotropin hormone (ACTH) caused by pituitary adenoma. Surgery is recommended as the first-line therapy, while radiotherapy and medicine are adjunctive therapies. But effects of these therapies are limited. Recently, the studies on the pathogenesis of Cushing's disease have focused on the abnormal protein expressions of cell proliferation and dysregulated signal transductions of hormone secretion. Targets includes epidermal growth factor receptor, cyclin-dependent kinase 2/Cyclin E and heat-shock protein 90. Corresponding targeted drugs such as gefitinib, roscovitine, silibinin are proven to be effective to reduce the volume of the tumor and the level of ACTH.

【Key words】 Adrenocorticotropin hormonesecreting pituitary adenoma; Targeted therapy; Epidermal growth factor; Cyclin-dependent kinase 2; Heat-shock protein 90

Fund program: The Hypothalamic-Pituitary Research Project, Clinical Medical Project of Chinese Medical Association (13050940479); National Key Program of Clinical Science (WBYZ2011-873)

库欣病是由于垂体促肾上腺皮质激素(ACTH)腺瘤过度分泌 ACTH,刺激肾上腺产生过多的皮质醇,进一步作用于全身靶器官而引起腹型肥胖、多血质外貌和多种物质代谢紊乱的一组临床综合征。目前针对库欣病的首选治疗为手术治疗,其次为放射治疗和药物治疗。而无论手术治疗和放射治疗都不能达到 100% 的治愈率,垂体术后仍有不缓解和复发的可能性,需要放射治疗和药物治疗作为辅助手

段。但传统治疗药物均疗效有限,不能彻底治愈肿瘤,而近年来对库欣病发病机制的研究取得了很大进展,不仅部分阐明了库欣病的发病机制,而且为靶向治疗库欣病的药物研究奠定了理论基础。

1 库欣病的临床特点

库欣病是一种罕见疾病,有报道,其患病率为 21 人/百万人~42 人/百万人,平均年发病率为 1.2/百万~2.4/百万^[1-2]。由于高皮质醇血症可引起心脑血管疾病、高血压、糖代谢异常和易患重症感染,导致库欣病患者死亡率明显高于普通人群。如病情控制不佳,其死亡率会增加 4 倍^[3]。经鼻蝶窦垂体瘤手术为一线治疗方案,术后缓解率为 70%~

90%, 而 25% 的患者仍会在远期复发^[4-5]。术后复发或未缓解的患者在二线辅助治疗(放射治疗或药物治疗)无效或不耐受的情况下可考虑再次手术。因此, 药物治疗是术后复发、手术或放射治疗失败以及不能耐受手术/放射治疗患者的适应证^[6]。目前, 可用于治疗库欣病的药物主要分为以下 3 类: 作用于垂体抑制 ACTH 合成的药物如帕瑞肽和卡麦角林、作用于肾上腺类固醇激素合成酶而抑制皮质醇合成的药物如米托坦、酮康唑、甲吡酮以及作用于靶器官的糖皮质激素受体拮抗剂米非司酮^[4, 7]。然而多数药物并不能根治肿瘤, 仅能缓解症状; 此外药物治疗效果不肯定、个体间差异大, 以及存在药物的不良反应均阻碍了传统药物的长期治疗。作为一种功能性垂体瘤, 垂体 ACTH 腺瘤除了具有肿瘤增殖的特性, 还具有激素分泌过多的特点, 故治疗库欣病的理想药物, 应同时具有抑制肿瘤细胞增殖和抑制 ACTH 分泌的特点。而新型靶向治疗药物可克服传统药物的缺陷, 能够从分子水平阻断库欣病的进展, 并在控制肿瘤增殖的同时, 抑制过多的激素分泌, 从根本上治疗库欣病, 成为近年来的研究热点。

2 库欣病的新型靶向治疗药物

既往关于库欣病的分子遗传学研究集中于与遗传综合征相关的家族性库欣综合征如多内分泌腺瘤病、Carney complex 等, 而近年来有关库欣病发病机制和治疗靶点的研究主要集中于散发性库欣病中, 其中的热点有表皮生长因子受体(EGFR)、细胞周期蛋白依赖激酶 2(CDK2)/细胞周期蛋白(Cyclin)E 和热休克蛋白 90(HSP90)的调控改变^[6]。

2.1 EGFR 通路改变在库欣病发病机制中的作用

2.1.1 肿瘤组织中 EGFR 过表达 早期报道提示垂体肿瘤患者血清 EGFR 水平升高^[8]。在激素分泌活跃的人垂体瘤细胞中可检测到 EGFR 的表达, 在 40% ~ 80% 垂体 ACTH 腺瘤细胞膜或胞质中均可检测到 EGFR 表达水平升高^[9-11]。Fukuoka 等^[9]曾将过表达 EGFR 的小鼠 AtT20 细胞注射到裸鼠皮下, 与注射不表达 EGFR 的 AtT20 细胞的裸鼠相比, 实验组裸鼠的垂体瘤体积更大, 提示 EGFR 在垂体 ACTH 腺瘤发生中起促进作用。研究显示, 表皮生长因子与 EGFR 结合后可激活下游的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK), 一方面能促进垂体细胞增殖, 另一方面能增强阿片-促黑素细胞皮质素原(POMC)基因启动子活性, 增强其转录和翻译, 导致 ACTH 分泌增多^[9, 12-13]。2014 年 Reincke 等^[14]和 Ma 等^[15]均通过全外显子组测序的方法, 发现了垂体 ACTH 腺瘤中的一个热点突变基因——泛素特异性蛋白酶 8

(USP8) 基因, 突变率为 40% ~ 62%, 即 USP8 基因突变通过上调 EGFR 表达, 增加 ACTH 分泌。USP8 基因位于 15q21.2, 编码的泛素特异性蛋白酶通过剪切具有去泛素化活性。EGFR 是 USP8 的一个重要的去泛素化靶点, USP8 基因突变使编码的蛋白质易获得去泛素化活性, 过度去泛素化 EGFR 并使其返回至细胞膜上, 上调细胞外信号调节激酶 1/2 介导的 MAPK 信号通路的活性, 增强 POMC 的转录和翻译, 导致 ACTH 过度分泌, 从而促进垂体 ACTH 腺瘤的形成^[14-16]。

2.1.2 针对 EGFR 通路的靶向药物 吉非替尼(gefitinib)是一种针对 EGFR 通路的酪氨酸激酶抑制剂, 目前常用于肺腺癌的靶向治疗中。Liu 等^[17]回顾性分析了接受化学治疗的晚期肺腺癌患者, 发现接受吉非替尼治疗的患者中位生存时间明显长于未接受治疗的患者(33.5 个月比 14.1 个月), 因此针对肺腺癌的疗效肯定。Fukuoka 等^[9]证实, 在人、鼠和犬类的垂体 ACTH 腺瘤细胞的体外试验中, 吉非替尼能有效地抑制 ACTH 分泌和细胞生长, 在该研究中, 吉非替尼能够呈剂量依赖性地抑制原代培养的人垂体 ACTH 腺瘤细胞 POMC mRNA 的表达。在犬类垂体 ACTH 瘤的研究中, 吉非替尼也能明显抑制 POMC mRNA 表达(6/10 肿瘤细胞), 降低 ACTH 分泌水平(4/12 肿瘤细胞)。相反, 在犬类原代培养的非肿瘤垂体细胞中, POMC 表达并未受到吉非替尼影响。在小鼠 AtT20 细胞系中, 吉非替尼不仅降低 POMC 表达和 ACTH 分泌水平, 而且诱导细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖。在小鼠体内实验中, 肿瘤生长、肿瘤重量、网膜脂肪体积和皮质醇水平在吉非替尼治疗后均明显改善。此外, 在小鼠体内注入不表达 EGFR 的 AtT20 细胞后再予吉非替尼口服治疗, 其临床症状并无改善, 这也再次验证了 EGFR 通路异常在垂体 ACTH 腺瘤发生中的作用, 吉非替尼在库欣病中的应用研究值得进一步探索^[9]。

2.2 CDK 2/Cyclin E 在库欣病发病机制中的作用

2.2.1 促进细胞周期由 G1 期进入 S 期 CDK2/Cyclin E 复合物由调节亚基 Cyclin 和催化亚基(CDK)组成, 共同调控细胞分裂由 G1 期进入 S 期的过程。研究显示, Cyclin D 只在垂体腺瘤中表达, 而 Cyclin E 不仅在正常垂体组织中表达, 而且在垂体腺瘤组织中过表达^[18-19]。小鼠 AtT20 细胞中垂体肿瘤转化基因(PTTG)和 Cyclin E 水平升高, 而 p27^{kip1}水平降低; 同时, 在转染 PTTG 基因的斑马鱼垂体瘤组织中 Cyclin E 和 POMC mRNA 水平较野生型均显著升高, 而 p27^{kip1}无明显变化, 提示在垂体 ACTH 腺

瘤中,PTTG 基因过表达可以上调 Cyclin E 的表达,下调 p27^{kip1} 表达^[20]。另一项研究显示,敲除小鼠 p27^{kip1} 基因后垂体 ACTH 腺瘤发生率上升,也证实了 p27^{kip1} 水平降低与肿瘤发生有关,p27^{kip1} 蛋白与 Cyclin E 之间存在协同作用^[21]。静息状态下,CDK2/Cyclin E 受抑制因子 p21^{Cip1} 和 p27^{kip1} 的负向调节,当 CDK2/Cyclin E 磷酸化后,Cyclin E 使 p27^{kip1} 磷酸化,催化 p27^{kip1} 降解,并解除 p27^{kip1} 抑制作用,同时 Cyclin E 磷酸化视网膜母细胞瘤(Rb)蛋白,使 Rb/E2F1 复合物变构释放 E2F1, E2F1 结合在 POMC 启动子区域附近,并召集 Tpit/Tbx19 转录因子聚集,启动 POMC 转录和 ACTH 分泌;同时 E2F1 促进细胞增殖周期从 G1 期进入 S 期^[22-23]。

2.2.2 针对 CDK2 的靶向药物 曾有报道,roscovitine 可特异性地作用于 CDK1、2、5 的 ATP 结合区,抑制肺癌、乳腺癌和淋巴瘤形成^[22, 24]。Roscovitine 为更高选择性的 CDK2 抑制剂。斑马鱼垂体 ACTH 瘤模型体内实验中,roscovitine 特异地作用于 PTTG 过表达的 POMC 细胞,可使 POMC 表达水平下降为原来的 40%,但不导致斑马鱼出现生长缺陷;小鼠体内和体外实验表明,roscovitine 通过作用于 CDK2/Cyclin E 介导的细胞分裂抑制肿瘤生长,并降低 ACTH 水平^[20]。进一步研究表明,roscovitine 能抑制人垂体 ACTH 腺瘤的 POMC 转录,降低 ACTH 表达,且 Cyclin E 和 E2F1 具有相互正向调节的作用。Roscovitine 抑制 E2F1 与 POMC 基因启动子结合,并通过 E2F1 依赖和非依赖途径抑制 Tpit/TBX19 等特异的 POMC 转录因子转录,从而抑制 ACTH 分泌^[23]。目前该药物尚未进入临床试验阶段,但颇具研究前景。

2.3 HSP90 在库欣病发病机制中的作用

2.3.1 参与糖皮质激素受体(GR)抵抗的形成 目前有学者认为,库欣病还存在垂体水平的 GR 抵抗现象,导致负反馈作用减弱,垂体前叶过度分泌 ACTH,也参与了库欣病的发病^[25]。然而因编码 GR 的基因突变导致糖皮质激素抵抗的只有个案报道。最近的研究表明,GR 的空间构象改变也与此有关^[26]。HSP90 在 GR 配体结合区的正确折叠起关键作用^[27-28]。垂体 ACTH 腺瘤中,HSP90 表达水平较正常垂体和垂体无功能腺瘤明显升高。在 GR 修饰后,HSP90 仍继续与 GR 结合可减少其与 DNA 结合,破坏转录复合物的形成,使 GR 表达减少,负反馈抑制作用减弱^[26-28]。也有报道称,库欣病肿瘤组织中血管加压素受体 3 和促 ACTH 释放激素受体表达增多,说明 ACTH 受体减少与糖皮质激素抵抗的

发生亦有关^[29-31]。

2.3.2 HSP90 抑制剂 HSP90 过表达可减少 GR 与 DNA 结合,破坏转录复合物形成,减少 GR 表达。水飞蓟素是 HSP90 C 端抑制剂,具有抗氧化活性,早已用于临床,治疗急、慢性肝炎和防治动脉粥样硬化等,同时它能减少 HSP90 与 GR 结合,加强转录活性,增加 GR 表达,能起到负反馈抑制 POMC 转录的作用。在人原代培养的垂体 ACTH 腺瘤细胞和小鼠垂体 ACTH 腺瘤细胞系中,水飞蓟素能抑制 GR 与 HSP90 结合,并激发其转录活性。在皮下注射 AtT20 细胞的转基因小鼠模型中,水飞蓟素有抗肿瘤形成的作用,也有部分改变激素水平的作用,能缓解库欣病的症状。HSP90 抑制剂水飞蓟素能够改善 GR 抵抗并缓解库欣病的相关症状^[26]。

3 小结和展望

近年来对库欣病特异的基因突变、调控细胞增殖和激素分泌异常 mRNA 和蛋白表达的研究已逐步深入,尤其对细胞周期相关蛋白如 EGFR 和 Cyclin E 及 HSP90 参与 GR 抵抗的研究都取得了很大进展。基于此理论基础,靶向药物治疗的相关研究也取得了新进展,EGFR 和 Cyclin E 在垂体 ACTH 腺瘤中过表达,通过增强一系列信号转导通路导致细胞分裂周期紊乱,出现细胞过度增殖、肿瘤生长;同时增强了 POMC 转录和 ACTH 分泌,出现库欣综合征的相关激素分泌过多临床表现。而 EGFR 的酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼和 CDK2 抑制剂 roscovitine 特异性地抑制细胞分裂 G1/S 期,并减少 POMC 的表达和 ACTH 分泌;HSP90 过表达可减少 GR 与 DNA 结合,破坏转录复合物形成,引起 GR 抵抗,破坏下丘脑-垂体-肾上腺轴的正、负反馈平衡,而 HSP90 抑制剂水飞蓟素减少 HSP90 与 GR 结合,增加 GR 表达,从而能够负反馈抑制 POMC 的转录。这些均为库欣病的靶向药物治疗提供了广阔的前景。除了上述 3 种作用于不同靶点的药物,信号通路中的其他表达异常的蛋白或抑制因子均可作为未来药物研发的目标靶点。

参 考 文 献

- [1] Brue T, Castinetti F. The risks of overlooking the diagnosis of secreting pituitary adenomas [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2016, 11 (1):135. DOI:10.1186/s13023-016-0516-x.
- [2] Bolland MJ, Holdaway IM, Berkeley JE, et al. Mortality and morbidity in Cushing's syndrome in New Zealand [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2011, 75 (4):436-442. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2011.04124.x.

- [3] Dekkers OM, Biermasz NR, Pereira AM, et al. Mortality in patients treated for Cushing's disease is increased, compared with patients treated for nonfunctioning pituitary macroadenoma[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(3): 976-981. DOI: 10.1210/jc.2006-2112.
- [4] Tritos NA, Biller BM. Cushing's disease[J]. Handb Clin Neurol, 2014, 124: 221-234. DOI: 10.1016/B978-0-444-59602-4.00015-0.
- [5] Petersenn S, Beckers A, Ferone D, et al. Therapy of endocrine disease: outcomes in patients with Cushing's disease undergoing transphenoidal surgery: systematic review assessing criteria used to define remission and recurrence[J]. Eur J Endocrinol, 2015, 172(6): R227-R239. DOI: 10.1530/EJE-14-0883.
- [6] van der Pas R, de Herder WW, Hofland LJ, et al. Recent developments in drug therapy for Cushing's disease[J]. Drugs, 2013, 73(9): 907-918. DOI: 10.1007/s40265-013-0067-6.
- [7] Castinetti F, Morange I, Conte-Devolx B, et al. Cushing's disease[J]. Orphanet J Rare Dis, 2012, 7: 41. DOI: 10.1186/1750-1172-7-41.
- [8] Kong YG, Ren ZY, Su CB, et al. Elevated soluble epidermal growth factor receptor level in pituitary adenoma and carcinoma[J]. Chin Med Sci J, 2004, 19(3): 199-202.
- [9] Fukuoka H, Cooper O, Ben-Shlomo A, et al. EGFR as a therapeutic target for human, canine, and mouse ACTH-secreting pituitary adenomas[J]. J Clin Invest, 2011, 121(12): 4712-4721. DOI: 10.1172/JCI60417.
- [10] Onguru O, Scheithauer BW, Kovacs K, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor and activated epidermal growth factor receptor expression in pituitary adenomas and carcinomas[J]. Mod Pathol, 2004, 17(7): 772-780. DOI: 10.1038/modpathol.3800118.
- [11] Theodoropoulou M, Arzberger T, Gruebler Y, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in neoplastic pituitary cells: evidence for a role in corticotropinoma cells[J]. J Endocrinol, 2004, 183(2): 385-394. DOI: 10.1677/joe.1.05616.
- [12] Wondisford FE. A new medical therapy for Cushing disease[J]. J Clin Invest, 2011, 121(12): 4621-4623. DOI: 10.1172/JCI61127.
- [13] Ferone D, Pivonello C, Vitale G, et al. Molecular basis of pharmacological therapy in Cushing's disease[J]. Endocrine, 2014, 46(2): 181-198. DOI: 10.1007/s12020-013-0098-5.
- [14] Reincke M, Sbiera S, Hayakawa A, et al. Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease[J]. Nat Genet, 2015, 47(1): 31-38. DOI: 10.1038/ng.3166.
- [15] Ma ZY, Song ZJ, Chen JH, et al. Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease[J]. Cell Res, 2015, 25(3): 306-317. DOI: 10.1038/cr.2015.20.
- [16] Perez-Rivas LG, Theodoropoulou M, Ferrau F, et al. The gene of the ubiquitin-specific protease 8 is frequently mutated in adenomas causing Cushing's disease[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(7): E997-E1004. DOI: 10.1210/jc.2015-1453.
- [17] Liu YT, Hao XZ, Li JL, et al. Survival of patients with advanced lung adenocarcinoma before and after approved use of gefitinib in China[J]. Thorac Cancer, 2015, 6(5): 636-642. DOI: 10.1111/1759-7714.12267.
- [18] Jordan S, Lidhar K, Korbonits M, et al. Cyclin D and cyclin E expression in normal and adenomatous pituitary[J]. Eur J Endocrinol, 2000, 143(1): R1-R6.
- [19] Muşat M, Morris DG, Korbonits M, et al. Cyclins and their related proteins in pituitary tumorigenesis[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 326(1-2): 25-29. DOI: 10.1016/j.mce.2010.03.017.
- [20] Liu NA, Jiang H, Ben-Shlomo A, et al. Targeting zebrafish and murine pituitary corticotroph tumors with a cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(20): 8414-8419. DOI: 10.1073/pnas.1018091108.
- [21] Roussel-Gervais A, Bilodeau S, Vallette S, et al. Cooperation between cyclin E and p27(Kip1) in pituitary tumorigenesis[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(9): 1835-1845. DOI: 10.1210/me.2010-0091.
- [22] Fukuoka H. New potential targets for treatment of Cushing's disease: epithelial growth factor receptor and cyclin-dependent kinases[J]. Pituitary, 2015, 18(2): 274-278. DOI: 10.1007/s11102-015-0637-6.
- [23] Liu NA, Araki T, Cuevas-Ramos D, et al. Cyclin E-mediated human proopiomelanocortin regulation as a therapeutic target for Cushing's disease[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(7): 2557-2564. DOI: 10.1210/jc.2015-1606.
- [24] Meijer L, Borgne A, Mulner O, et al. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5[J]. Eur J Biochem, 1997, 243(1-2): 527-536.
- [25] Keller-Wood ME, Dallman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion[J]. Endocr Rev, 1984, 5(1): 1-24.
- [26] Riebold M, Kozany C, Freiburger L, et al. A C-terminal HSP90 inhibitor restores glucocorticoid sensitivity and relieves a mouse allograft model of Cushing's disease[J]. Nat Med, 2015, 21(3): 276-280. DOI: 10.1038/nm.3776.
- [27] Freeman BC, Yamamoto KR. Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones[J]. Science, 2002, 296(5576): 2232-2235. DOI: 10.1126/science.1073051.
- [28] Kang KI, Meng X, Devin-Leclerc J, et al. The molecular chaperone Hsp90 can negatively regulate the activity of a glucocorticoid-dependent promoter[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(4): 1439-1444.
- [29] Dahia PL, Ahmed-Shuaib A, Jacobs RA, et al. Vasopressin receptor expression and mutation analysis in corticotropin-secreting tumors[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81(5): 1768-1771. DOI: 10.1210/jcem.81.5.8626831.
- [30] Luque RM, Ibáñez-Costa A, López-Sánchez LM, et al. A cellular and molecular basis for the selective desmopressin-induced ACTH release in Cushing's disease patients: key role of AVPR1b receptor and potential therapeutic implications[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(10): 4160-4169. DOI: 10.1210/jc.2013-1992.
- [31] Tateno T, Izumiya H, Doi M, et al. Differential gene expression in ACTH-secreting and non-functioning pituitary tumors[J]. Eur J Endocrinol, 2007, 157(6): 717-724. DOI: 10.1530/EJE-07-0428.