

## 以半胱天冬酶家族为治疗靶点的研究进展

吴雅茗综述 谢捷明, 俞昌喜\*, 陈以旺审校

(福建医科大学药学院药理学系, 福建 福州 350004)

**摘要:** 半胱天冬酶(caspase)家族是细胞凋亡事件中的核心因子,其异常表达或活性失衡与许多慢性病理状态关系非常密切。一些天然及合成的 caspase 活性调节剂能通过影响该家族成员的活性或表达而发挥抑制或诱导凋亡作用,达到改善疾病状态的目的。本文将简要介绍国内外在此领域取得的一些研究进展和展望,提示以 caspase 家族为靶点设计干涉细胞凋亡进程的药物是有发展前景的。

**关键词:** 半胱天冬酶; 细胞凋亡; 抑制剂; 激活剂

**中图分类号:** Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2006)01-0059-04

半胱天冬酶(caspase)是一个半胱氨酸蛋白酶家族,在细胞凋亡的过程中起着关键性的作用,是药物开发的良好靶点。目前,该家族已有 14 个成员被克隆出<sup>[1]</sup>,在氨基酸序列、结构及酶的特性上均相似,根据在级联反应上下游的位置及功能的不同,可分为 3 大类。第 1 类为上游的凋亡始动子,包括 caspase-2, -8, -9, -10 等,能在其他蛋白参与下发生自我活化并激活下游的 caspase; 第 2 类为下游的凋亡效应子,包括 caspase-3, -6, -7, 被始动子激活后作用于特异性底物使细胞发生生化及形态学改变,导致细胞凋亡; 第 3 类包括 caspase-1, -4, -5, -13, -14, 主要参与细胞因子介导的炎症反应并在死亡受体介导的细胞凋亡途径中起辅助作用。由于 caspase 可自我活化并能相互激活,因此凋亡过程一旦触发,即呈级联放大效应。caspase 介导细胞凋亡的途径及作用底物均很多,以致其介导的细胞凋亡机制错综复杂,因此,人们对探索研发以 caspase 为靶点的药物的方法和策略也不少。本文将对近年来人们在以调节 caspase 活性为治疗靶点方面所做的研究进行综述。

### 1 caspase 抑制剂

许多疾病和一些严重损伤因素的病理过程与组织细胞的过度凋亡有关, caspase 抑制剂通过抑制

caspase 活性达到抑制细胞凋亡、改善疾病状态的目的。caspase 抑制剂有天然的和人工合成的,目前,研究和开发的重点是人工合成的 caspase。

#### 1.1 天然的 caspase 抑制剂<sup>[2]</sup>

细胞因子效应调节剂 A(cytokine response modifier A, CrmA)是第一个被证实的天然 caspase 抑制剂,结构上属于丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitor)家族,能抑制 caspase-1 和-8 的活性。Goswami 等研究发现,用 CrmA 转染 PC12 细胞能够有效抑制 caspase-8 的活性,阻断肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )诱导的细胞凋亡。CrmA 还能抑制由于缺氧所引起的心肌细胞中 caspase-8 的激活,以及相应的线粒体跨膜电位的下降和凋亡发生等。另一类常见的是凋亡蛋白抑制剂(inhibitors of apoptosis protein, IAP),在人体中研究最多的是生存蛋白(survivin)和活素蛋白,能与 caspase-3 和-7 直接结合并抑制其活性,后者还能抑制 caspase-9 的活性。survivin 和活素蛋白在正常细胞中不表达或低表达,但是,在胚胎及肿瘤细胞中则异常表达,提示抑制其表达将有可能成为肿瘤治疗的新策略<sup>[3]</sup>。其他天然的 caspase 抑制剂如 p53 蛋白能抑制 caspase-1, -3, -6, -7, -8 和-10 的活性,其机制与 p53 蛋白的 P1 位点被 caspase 水解后导致亚单位与 caspase 形成稳定的复合体有关。细胞内  $Zn^{2+}$  浓度降低会激活 caspase-3, -8 和-9,从而导致凋亡发生,其作用机制主要是干扰 Fas 配体路径及抑制 caspase-3 活性。Gunasekera 等发现从深海的 *Batzella* 属海绵中分离得到的一系列的天然小分子化合物能抑制 caspase-3 的活性。另外, Zech 等<sup>[4]</sup>研究发现,一氧化氮(NO)供体能抑制凋亡促进因子-1

收稿日期:2005-08-24

基金项目:福建省重点高校建设科研基金资助项目(XZ04008)

作者简介:吴雅茗(1980-),女,在读硕士研究生,研究方向:抗肿瘤药物药理学, Tel: 0591-83569984, E-mail: gemma\_wym@hotmail.com

\* 通讯作者:俞昌喜,男,博士,教授,研究方向:神经药理学, Tel: 0591-83569311, E-mail: changxiyu@mail.fjmu.edu.cn

(Apaf-1)/caspase-9 凋亡复合体的形成,从而抑制 pro-caspase-3, -8 和 -9 的加工处理而起到抑制凋亡的作用。

## 1.2 人工合成的 caspase 抑制剂

### 1.2.1 短肽衍生物抑制剂

根据 caspase 底物的识别部位而获得的一些特异性 caspase 短肽衍生物抑制剂,作为活性 caspase 的假性底物竞争性抑制 caspase 活性,但并没有改变 caspase 蛋白酶的化学结构。短肽衍生物抑制剂的大小从单一的天冬氨酸(Asp)残基(Boc-Asp-FMK)到三聚体(z-VAD-FMK)和四聚体(YVAD-FMK)不等,但最近由 Maxim 制药公司推出的 MX1013 是二肽模拟物<sup>[5]</sup>。短肽所连接的化学基团决定了其抑制机制是否可逆,一般而言,连接氟-甲基酮(-FMK)或氯-甲基酮(-CMK)可得到不可逆的竞争性抑制剂;与醛基(-CHO)、腈类(-CN)基团连接则得到可逆性抑制剂。同时,这些化学基团也决定了短肽衍生物抑制剂的细胞膜渗透性,对于完整细胞,连接 -FMK 基团的抑制剂膜渗透性较好,而连接 -CHO 基团的抑制剂则很难进入细胞。虽然合成的短肽抑制剂对 caspase 特异性较高,但 z-VAD-FMK、z-DEVD-FMK 和 AC-YVAD-CMK 也会对少数其他蛋白酶起抑制作用,而且多数并不只针对单个 caspase 发挥作用,如 z-VAD-CHO 能有效抑制 caspase-1, -3, -5, -8 和 -9 活性。随着研究的发展,一些特异性更高的也陆续研制出来,如 YVAD-CHO 抑制 caspase-3 最有效, z-IETD-FMK 选择性抑制 caspase-8, 而 z-LEHD-FMK 仅抑制 caspase-9 活性。caspase 抑制剂的细胞保护作用在许多与过度细胞凋亡相关的疾病动物模型上得到广泛证明。例如, Chandrashekar 等<sup>[6-9]</sup>研究发现,给心肌梗死后发生急性肺损伤、肾毒性肾炎、蛛网膜下腔出血和心力衰竭的动物注射胰-半胱天冬酶(pan-caspase)抑制剂可显著降低细胞凋亡水平。新的抑制剂 IDN-1965 和 IDN-6556(IDUN 制药公司)可能会减少一些如心脏和肝脏损伤病理状态下的细胞损害量<sup>[9,10]</sup>。值得一提的是,在上述疾病模型上,动物发生炎症减少、生存期延长等情况也是很明显的。这是因为目前所开发的大多数 caspase 抑制剂都是广谱抑制剂,因此,既可以抑制凋亡,又可以影响炎症过程,如 caspase 抑制剂在败血症大鼠模型上就表现出高度保护作用。近期出现的广谱 caspase 抑制剂 MX1013(Maxim 制药公司)在 Fas 介导的肝损害、脑缺血或再灌注损伤、急性心肌梗死动物模型上也表现出类似的高保护效果<sup>[5]</sup>。因此,这些广谱 caspase 抑制剂的临床前试验提示这些药

物有潜力成为抗凋亡的新药。事实上,由 IDUN 制药公司研制的广谱 caspase 抑制剂 IDN-6556 首次应用于人体,用于口服治疗慢性丙型肝炎病毒(HCV),现正在进行 II 期临床试验;而且在凋亡研究中发现, IDN-6556 对肝窦内皮细胞(sinusoidal endothelial cell, SEC)的凋亡抑制率及 caspase-3 活性的抑制率分别达到了 55% 和 94%<sup>[9]</sup>。而 Vertex 制药公司在推出 caspase-1 抑制剂的口服液 VX-740 和 VX-765 后,又成功研制出治疗败血症疗效更佳的药物 VX-799。

### 1.2.2 合成的小分子化合物

氯乙亚硝脒(BCNU)是一种双功能烷化剂,能抑制依托泊甙诱导的 HT58 凋亡细胞中的多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)裂解活性,与抑制 caspase-3 活性有关。双硫仑(disulfiram)是解酒药,最近发现也是 caspase-3 抑制剂。其他如异硫脲类化合物, peptidyl beta-homo-aspartals(3-amino-4-carboxybutyraldehydes)和 3-亚硝基苯甲酰胺等对 caspase 的若干亚型也具有抑制作用。这些小分子化合物结构简单,易于购得和合成,可以作为研究设计小分子 caspase 抑制剂的基础。

## 1.3 其他

近年来,人们提出利用分子生物学技术研究和开发新一代核酶类抗 caspase 蛋白酶抑制剂,筛选出高活力、高特异、高稳定的抗 caspase 核酶,通过其抗细胞凋亡的特性,来调控体内组织的炎症,从而阻断细胞的坏死,达到改善疾病状态的目的。Zender 等<sup>[11]</sup>研究表明,小干扰 RNA(siRNA)介导的肝 caspase-8 基因表达抑制可保护体内外的 Fas 介导的细胞凋亡。张韦等通过体外实验发现,其构建的核酶 Rz333 能够位点特异性地切割 caspase-7 mRNA。Xu 等在 BRL-3A 细胞也发现其构建的核酶 Rz107 对 caspase-3 具有特异性的切割作用,并提出将核酶治疗作为凋亡所致肝脏疾病的一种治疗手段是可行的。但将 siRNA 等核酶类 caspase 抑制剂作为一种治疗工具仍需要进一步的研究。

## 2 caspase 激活剂

选择性激活 caspase 或至少降低其激活阈值,可能有助于治疗发病机制与凋亡缺陷有关联的癌症及其他一些疾病。目前,针对 caspase 激活和引发凋亡进程的不同方案仍处于临床前试验阶段。Sophie 等发现,一种名为安全扣(safety-catch)的门冬氨酸三联体分子可促发分子内静电作用而使 caspase-3 处于非激活状态,推断若阻断该分子将有可能激活 cas-

pase-3 而触发凋亡。因此,人们尝试着针对该三联体分子的空间结构,设计一些具有药理学活性的小分子药物(绝大多数是多肽)来降低 caspase-3 的激活阈值或使其直接被激活,希望能因此杀伤癌细胞或至少能逆转耐药癌细胞的抗药性。如 Maxim 制药公司已经研制出的 caspase-3 激活剂 MX-2060 等一系列多肽类药物,经临床前试验已被证实具有抗癌活性,且作用机制不同于传统的抗癌药物。另一条触发凋亡的途径是以和凋亡效应子 caspase 连结的抗体融合蛋白或化合物为工具。Jia 等<sup>[12]</sup>研制出一种被称为免疫半胱天冬酶(immunocaspase)-3 或-6 的嵌合蛋白,是由一单链抗 erbB2/HER2 抗体和一激活的 caspase-3 或-6 分子组成的。结果发现,不管是肌肉、瘤内还是静脉内注射,在异种移植 HER2(+)肿瘤细胞的小鼠模型上均可观察到明显的肿瘤缩小和生命延长等现象。Eric 等发现,转染了抗体-caspase-3 嵌合蛋白的表达质粒的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞会发生“自然”死亡;因此,推测这是因为抗体-caspase-3 嵌合蛋白与 CHO 细胞上的相应抗原发生特异性结合,引起 caspase-3 自动激活并触发细胞发生不可逆性的凋亡。因此,构建 caspase-3 和针对细胞内外的肿瘤特异性抗原蛋白的抗体的融合蛋白,似乎为选择性诱导肿瘤细胞凋亡提供了一个引人注目的理论。除此之外,Shahrokh 等还提出了一种新的肿瘤基因治疗法,即把可被诱导的 caspase-1, -3 或-9 与一种无毒、有细胞渗透性的二聚化化学诱导物(chemical inducers of dimerization, CID)构建在一起,“按需”激活体内的 caspase-1 和-3,从而触发肿瘤细胞凋亡。而通过反义寡核苷酸或反义 RNA 来阻断天然 caspase 抑制剂的基因表达,是肿瘤治疗中相当有潜力的另一种策略。Hu 等<sup>[13]</sup>研究发现,反义寡核苷酸会下调肿瘤中 survivin 和 XIAP 的基因表达,从而直接促发肿瘤细胞凋亡。目前,正由 Isis 制药公司和 Abbott 实验室联合对此结果作进一步的研究,目的是为了开发出以反义寡核苷酸为基础的适用于临床的制剂。另外,Williams 等<sup>[14]</sup>以 siRNA 技术为基础也做出类似的实验,证明 Omi/HtrA2 能不可逆性地催化 c-IAP1 断裂,因而更有效地使 IAP 失活并增加 caspase 的活性。

### 3 联合应用

不久的将来,在癌症治疗方面,最有希望的可能是依靠上述的凋亡调节策略联合常规的放疗、化疗

方案。因此,人们对 caspase 靶向药物与化疗、放疗联合应用治疗肿瘤给予极大的关注。例如, Pennati 等<sup>[15]</sup>发现核酶介导的 survivin 表达抑制会使人黑素瘤细胞对  $\gamma$ -辐射更敏感; Yanamandra 等<sup>[16]</sup>也发现过度表达的 caspase-9 与放疗联合应用在抑制神经胶质瘤侵袭方面有协同作用。同时,也有大量的研究表明,可激活 caspase 和(或)使天然 caspase 抑制剂失活的药物与传统化疗药物联合应用也比单一用药更有效。许多 caspase 靶向的试剂对化疗药物诱导的细胞凋亡的增效作用已经在多种恶性肿瘤,包括神经胶质瘤、黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、膀胱癌和卵巢癌等均得到证实<sup>[17]</sup>。例如,抗 survivin 的寡核苷酸可增强一种抗 CD20 的单克隆抗体利妥昔单抗(rituximab)对侵袭性非霍奇金淋巴瘤的疗效<sup>[18]</sup>;同样地, Htert/rev-caspase-6 基因治疗可使恶性神经胶质瘤细胞对紫杉醇的细胞毒作用更敏感。进一步的研究发现,以上方案联合应用人类端粒末端转移酶逆转录酶(hTERT)基因启动子系统,可以增强这些治疗方法的肿瘤特异性,因为端粒末端转移酶在肿瘤细胞和正常细胞中的表达水平大有差异<sup>[19]</sup>。总之,当联合应用肿瘤选择性靶向技术时,上述联合方案作为一种新的肿瘤治疗方法可能是很有发展前景的。

### 4 结语

近年来,人们逐渐认识到 caspase 家族是细胞凋亡过程中的关键因子,其异常表达或活性失衡与众多急慢性疾病关系极其密切。大量研究结果也表明,单用 caspase 活性调节剂或与化疗、放疗联合应用等其他治疗方法,可影响 caspase 家族成员的活性表达而抑制或促进细胞凋亡,从而达到改善疾病状态的目的。因此, caspase 蛋白酶似乎有望成为细胞凋亡治疗研究的理想靶标。然而,尚有一些问题亟待解决:(1)对 caspase 家族内部各因子的作用特异性相对还是较低,因此对细胞凋亡的调节效果有待提高;(2)绝大多数没有组织选择性,对其他酶系统也有影响,从而造成不可避免的一些副作用;(3) caspase 家族也参与体内其他的许多细胞生理活动,因此其活性若受到长期慢性抑制可能导致不良反应的发生。除此之外,凋亡机制被抑制的细胞是否还能存活,以及这些被动地延长生命的细胞是否会促进其自身恶性转变?目前,人们对此还没有明确的认识。但是,虽然确实存在这些潜在的不足,随着基

因工程技术日臻成熟,能否利用 caspase 开发新的治疗药物,将会随着对其研究的不断深入找到答案。

参 考 文 献

[1] Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27(2):199 - 214.

[2] Cassens U, Lewinski G, Samraj AK, et al. Viral modulation of cell death by inhibition of caspase[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2003, 51(1):19 - 27.

[3] Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, et al. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9[J]. *Mol Cell*, 2003, 11(2):519 - 527.

[4] Zech B, Kohl R, von Knethen A, et al. Nitric oxide donors inhibit formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome and activation of caspase[J]. *Biochem J*, 2003, 371(Pt 3):1055 - 1064.

[5] Yang W, Guastella J, Huang JC, et al. MX1013, a dipeptide caspase inhibitor with potent *in vivo* antiapoptotic activity[J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 140(2):402 - 412.

[6] Chandrashekar Y, Sen S, Anway R, et al. Long-term caspase inhibition ameliorates apoptosis, reduces myocardial troponin-1 cleavage, protects left ventricular function, and attenuates remodeling in rats with myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(2):295 - 301.

[7] Yang B, Johnson TS, Haylor JL, et al. Effects of caspase inhibition on the progression of experimental glomerulonephritis[J]. *Kidney Int*, 2003, 63(6):2050 - 2064.

[8] Zhou C, Yamaguchi M, Kusaka G, et al. Caspase inhibitors prevent endothelial apoptosis and cerebral vasospasm in dog model of experimental subarachnoid hemorrhage[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(4):419 - 431.

[9] Kreuter M, Langer C, Kerkhoff C, et al. Stroke, myocardial infarction, acute and chronic inflammatory diseases: caspases and other apoptotic molecules as targets for drug development[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2004, 52(3):141 - 155.

[10] Hoglen NC, Chen LS, Fisher CD, et al. Characterization of IDN-

6556(3-[2-(2-tert-butyl-phenylaminoxy)amino]-propionylamino-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-phenoxy)-pentanoic acid): a liver-targeted caspase inhibitor[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 309(2):634 - 640.

[11] Zender L, Hutker S, Liedtke C, et al. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(13):7797 - 7802.

[12] Jia LT, Zhang LH, Yu CJ, et al. Specific tumoricidal activity of a secreted proapoptotic protein consisting of HER2 antibody and constitutively active caspase-3[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12):3257 - 3262.

[13] Hu Y, Cherton-Horvat G, Dragowska V, et al. Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9:2826 - 2836.

[14] Williams NS, Gaynor RB, Scoggins S, et al. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(3):931 - 946.

[15] Pennati M, Binda M, Colella G, et al. Radiosensitization of human melanoma cells by ribozyme-mediated inhibition of surviving expression[J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 120(4):648 - 654.

[16] Yanamandra N, Kondraganti S, Srinivasula SM, et al. Activation of caspase-9 with irradiation inhibits invasion and angiogenesis in SNB19 human glioma cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(13):2339 - 2346.

[17] Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak TJ, et al. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities[J]. *Exp Oncol*, 2004, 26(2):82 - 97.

[18] Ansell SM, Arendt BK, Grote DM, et al. Inhibition of survivin expression suppresses the growth of aggressive non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Leukemia*, 2004, 18(3):616 - 623.

[19] Takeuchi H, Kanzawa T, Kondo Y, et al. Combination of caspase transfer using the human telomerase reverse transcriptase promoter and conventional therapies for malignant glioma cells[J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(1):57 - 63.



关注药物安全性



葛兰素史克公司不同意帕罗西汀的成年人自杀性研究结果

葛兰素史克公司不同意其 5-羟色胺重摄取抑制剂(SSRI)帕罗西汀与成年人的自杀增加有关。公司认为,帕罗西汀增加成年人自杀的根据只是从 40 个研究报告中有选择的 16 个得到的。试验中服用帕罗西汀的总计 916 名,安慰剂为 550 名,多数用药 6 周。结果研究病例中无 1 名自杀,帕罗西汀组 7 名有自杀企图,安慰剂组则为 1 名。帕罗西汀及其他 SSRI 药与儿童和青年中自杀行为增加有关,在欧洲和美国均已发出限用与警告,但在成年人中的影响尚未证实。公司认为抑郁增加自杀企图,临床经验表明,特别在恢复早期自杀倾向有增加趋势,病人与医生都要警惕,在抑郁治疗时需要密切监视。

(黄世杰)