

基于凋亡机制治疗血液系统恶性肿瘤

张首国¹, 王 林^{1*}, 曹艳红²编译

(1. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850;

2. 95900 部队指挥自动化站, 河南 开封 475003)

摘要:近年来研究表明,白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤常常有一条或多条细胞凋亡通路发生异常,决定了此类细胞的存活率高于相应的正常细胞。而且,细胞凋亡应答异常对白血病和淋巴瘤细胞耐药性的产生至关重要。对凋亡机制的深入研究,促进了对许多凋亡靶标分子的识别,从而推动了以癌细胞中表达异常或失调的抗凋亡分子为靶标的新药研发。本文介绍了涉及凋亡的药物靶标和相关药物,以及其对白血病和淋巴瘤细胞的作用。

关键词:凋亡;白血病;淋巴瘤;抗肿瘤

中图分类号:R979.1 文献标识码:A 文章编号:1001-0971(2006)05-0339-03

癌症的标准疗法包括化疗、手术切除和放疗。但这些治疗策略往往不能治愈疾病且伴随有副作用。因此,需要研发基于新药的替代性治疗策略,此类新药应具有不同的作用机制,能特异性靶向肿瘤细胞,并且其毒性处于可接受范围之内。近20年的研究大大加深了对凋亡机制的理解,其对正常细胞和白血病细胞的分化、增殖和存活具有控制作用。从细胞、分子和结构水平对凋亡机制的理解和对白血病细胞和淋巴瘤细胞异常的认识,促进了对少数凋亡分子的识别,此类分子可作为潜在靶标用以开发白血病和淋巴瘤的新疗法。

1 凋亡与癌症

DNA 修复缺陷易诱发基因组不稳定性,癌症发生,此种基因组不稳定性导致正常细胞蓄积大量变异从而变为恶性细胞。而此类正常细胞可与肿瘤抑制蛋白 p53 配合发挥抗基因组不稳定作用,p53 是防止细胞癌变的“基因组保护神”,可诱导有遗传缺陷细胞的死亡。p53 是人体癌症中最易突变的基因,因其突变而失活对肿瘤的发生发展具有重要作用。目前,有证据表明,除 p53 失活之外,肿瘤细胞还存在细胞凋亡通路的多重缺陷。对细胞死亡尤其是凋亡的抵抗作用是肿瘤发展及肿瘤对抗癌药产生抗药性的关键因素。在肿瘤的几种发病机制中,抑

制细胞凋亡具有重要作用,它能使肿瘤细胞比正常细胞更易于异常存活,减少对外源性生长因子的需求量,防止缺氧和氧化应激的发生,使附加遗传异常的发展时间延长并使其发生概率增加,而附加遗传异常可影响细胞增殖,阻碍细胞分化,促进血管生成并增强肿瘤发展进程中的细胞运动性和侵袭能力。理解肿瘤细胞凋亡的抑制机制具有重要意义,不仅有利于更好地理解癌症生物学,还有助于研究开发基于克服凋亡抑制并诱导癌细胞凋亡的癌症新疗法。

2 凋亡通路

程序性细胞死亡(programmed cell death)最常见的形式是细胞凋亡,即细胞自杀的生理过程,此过程对维持胚胎发育过程中细胞内环境稳定和造血细胞与淋巴样细胞的分化和功能来讲是必需的。凋亡过程通常涉及半胱天冬酶(caspase),即胞内半胱氨酸蛋白酶(半胱氨酸天冬酰胺特异性蛋白酶)。此类酶在动物细胞中不显活性,但常通过保守天冬氨酸残基的蛋白酶解加工达到激活状态。caspase 按其作用水平可分为启动子型和效应子型,两者分别在凋亡过程的初期和后期发挥作用。一经活化,效应子 caspase 可引起多种细胞蛋白的溶蛋白性裂解,最终使其在细胞死亡时达到极点。启动子 caspase 的结构特征是,有一个大的 N 端区域包含一或两个与功能密切相关的结合区。而效应子 caspase 的蛋白质区域包含20~30个氨基酸残基。

激活 caspase 的通路有两条,分别为外在和内在凋亡通路,二者均可激活效应子 caspase,但需要不

收稿日期:2006-04-29

作者简介:张首国,男,在读博士研究生,研究方向:糖类化合物及手性药物的合成研究,E-mail:jacky_7968@tom.com

*通讯作者:王 林,男,教授,博士生导师,研究方向:药物设计与合成研究,Tel:010-66932239,E-mail:wanglin07@sina.com

同的启动子 caspase 启动其激活进程。外在通路由细胞膜上的死亡受体衔接激活。内在通路由多种胞外和胞内应激启动,此类应激包括生长因子剥夺、DNA 损伤、致癌基因诱导、缺氧和细胞毒性药物。内外两条凋亡通路会聚于效应子 caspase,如 caspase-3 和 7 的激活点。凋亡末期的活性受控于一族作为凋亡蛋白抑制剂(IAP)的蛋白,此类蛋白可与 caspase-3,7 和 9 结合,但不与 caspase-8 结合。IAP 在肿瘤细胞中优先表达,是肿瘤细胞生存优势的影响因素之一,因此有可能作为肿瘤治疗靶标。可能的药物研发策略是,抑制 IAP 的表达或功能,并模拟 Smac/Diablo 家族蛋白的功能。使用基于 XIAP 直接抑制 caspase-3 的生物化学阻抑分析法,并对化合物组合库进行筛选,可识别出活性药效团。含聚苯胺药效团的化合物活性最强。化合物 1396-12 的性质最值得关注,它是一个 XIAP 抑制剂,能诱导细胞系和原发白血病胚细胞的直接凋亡,并使此类细胞对化疗诱导凋亡的敏感性增强。存活素在大多数肿瘤细胞中过表达,且与正常组织相比,它是癌组织中排名第 4 的高表达蛋白。因此,存活素很可能适于作为一个广泛表达的肿瘤抗原靶标而用于治疗。

3 死亡配体与死亡受体

通过激活外在凋亡通路杀死癌细胞的治疗策略研发,越来越受到重视。TNF 家族部分成员可直接启动凋亡,且其激活作用可用于诱导杀死肿瘤细胞。研究人员认为,TNF 家族的三种配体(TNF- α , FasL 和 TRAIL)及其相应的 4 个受体(TNF-R1, Fas 和 TRAIL-R1/TRAIL-R2)有可能用于癌症治疗。

潜在药物的研发策略包含两个内容,一是合成重组配体,二是生产单克隆抗体,其可与死亡膜受体结合,然后通过激活凋亡机构诱发细胞死亡。其中第一个作为潜在抗癌药物进行研究的分子是 TNF- α ,已证实它可选择性杀死肿瘤细胞而非正常细胞,这为其用于癌症治疗增加了希望。不幸的是,TNF- α 显著的促炎症效应使其不能全身用药。随后的研究集中在 FasL 和 TRAIL 两个细胞因子上,与 TNF- α 不同的是,它们不具有促炎症效应,因而适合作为潜在的抗癌药物。不幸的是,启动 Fas 激活的促效抗体具有高肝毒性,可诱发小鼠死亡。相反,TRAIL、抗 TRAIL-R1 或抗 TRAIL-R2 促效抗体具有良好的体内耐受性。早期研究已表明,TRAIL/Apo-2L 抗体具有显著抗癌活性,对基因缺陷小鼠的人肿瘤异种嫁接

模型的细胞毒性效应最小。但是,TRAIL 配体体内半衰期很短,表明抗 TRAIL-R1 或抗 TRAIL-R2 促效抗体因体内半衰期延长而可能具有更佳的药理作用。抗 TRAIL-R1 或 TRAIL-R2 促效抗体的另一个优点是,其与 TRAIL 配体不同,常存在于肿瘤细胞膜且不与 TRAIL 诱饵受体 TRAIL-R3 和 TRAIL-R4 结合。两个抗 TRAIL-R 抗体已用于临床,一个是对 TRAIL-R1 具有高选择性和特异性的人完全促效抗体,名为 HGS-ETR1。另一个是针对 TRAIL-R2 和 KMTR2 的完全人抗体,该抗体与 TRAIL-R2 结合后诱导肿瘤细胞死亡,不需要通过交联诱发细胞凋亡。

4 外在通路的胞内调节器

特定的胞内分子调节细胞对死亡配体的敏感性,发挥关键作用的是含有死亡结构域的 Fas 相关蛋白 FADD,c-FLIP 和核转录因子 NF- κ B,目前认为它们是抗癌疗法的重要靶标。

FADD 是一个关键转接分子,负责转导由死亡受体介导的死亡信号。FADD 蛋白存在于细胞核和细胞浆中,细胞浆 FADD 在细胞死亡信号发送中的作用得到确认,而细胞核 FADD 的作用尚不清楚。对癌症动物模型研究显示,FADD 可能作为一个肿瘤抑制器发挥作用。研究表明,FADD 可作为重要靶标,用于发展以恢复正常 FADD 表达为目标的抗白血病疗法。FADD 可引起 caspase-8 内死亡效应结构域间的相互作用,从而形成死亡受体信号复合体。

而其他 DED 蛋白如 FLIP,对控制死亡受体信号发送产生负面作用。FLIP 与 procaspase-8 相关且与 procaspase-8 和 10 竞争结合于 FADD,从而抑制死亡受体信号发送所需机构的装配。c-FLIP 过表达常发生于多种 B 细胞恶性肿瘤,部分急性髓细胞性白血病(AML)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。直接抑制 c-FLIP 的化合物尚未见报道,但已报道的几个实验药物可减少 c-FLIP 的表达并诱发凋亡。代表药物为合成三萜类化合物 2-氟基-3,12-二氧齐墩果烷基-1,9-二烯-28-酸(CDDO)及其衍生物 CDDO-Im。

核转录因子 NF- κ B 通过诱导抗凋亡蛋白和(或)抑制促凋亡蛋白而抑制凋亡。组成型 NF- κ B 激活常见于许多癌症,可保护肿瘤细胞免受凋亡刺激,包括由化疗药物诱发的凋亡。有趣的是,许多抗癌药均可激发 NF- κ B 的活性,反过来有助于肿瘤细胞对化学药物产生耐受能力。对抑制 NF- κ B 的若干药物已有描述,但其对 NF- κ B 均无特异性,且其在大多数病

例中的毒性还有待评价。唯一批准用于临床的 NF- κ B 抑制剂为蛋白酶体抑制剂 PS-341。NF- κ B 抑制剂 Bay-11-7082 和 Bay-11-7085 可抑制 I κ B α 磷酸化,从而阻断 I κ B α 在蛋白酶体的降解。二者还能诱导克隆癌细胞、白血病、T 细胞白血病和多发性骨髓瘤细胞的体外凋亡。

5 B 细胞淋巴瘤-2 家族蛋白

B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)家族蛋白是内在凋亡通路和线粒体完整性的关键调节剂。Bcl-2 家族蛋白中促凋亡与抗凋亡的数量之比,是决定细胞对不同凋亡刺激产生敏感性还是抵抗力的关键因素。此类凋亡刺激包括生长因子缺失、缺氧、辐射、氧化剂和抗癌药物。Bcl-2 家族蛋白的特征是含有 4 个 Bcl-2 同源性(BH)区域: BH1, BH2, BH3 和 BH4。Bcl-2 家族蛋白按其在凋亡中的作用可分为促凋亡型和抗凋亡型两类。其中,促凋亡型按结构/作用可进一步分为两种类型,一是 Bax/Bak 样多域促凋亡蛋白;二是 BH3 单域(BH3-only)促凋亡蛋白。Bax/Bak 样促凋亡蛋白包含 2~3 个 BH 区域,表达后可诱发细胞凋亡。基因敲除研究表明, Bax/Bak 是细胞对生长因子消失或某些细胞毒药物产生凋亡应答所必需的。激活 Bax/Bak 是凋亡引起细胞定型的一个关键因素。BH3 单域促凋亡蛋白与其他 Bcl-2 家族蛋白唯一的共同点是含有 BH3 区域,此类蛋白是启动应激诱发的凋亡所必需的。

抗凋亡型 Bcl-2 家族蛋白对几类癌细胞具有保护作用。在血液瘤中, Bcl-2 抗凋亡蛋白表达量增加或 Bcl-2 促凋亡蛋白表达量减少。据报道, CLL 患者的 Bcl-2 表达出现了三种异常(1)基因启动子低甲基化导致 Bcl-2 蛋白表达增加(2) Bax 表达减少常伴随启动子区的点突变(3)约半数患者 Mcl1 蛋白水平升高,并常伴随 Mcl1 基因启动子突变。以上观察结果显示, Bcl-2 有可能作为治疗几种血液学疾病的重要靶标。由此可设计三种策略(1)抑制 Bcl-2 基因转录(2)由反义寡核苷酸诱导 Bcl-2 mRNA 的降

解(3)通过小分子药物抑制蛋白功能。

报道称,已有通过转录机制减少 Bcl-2 表达的药物,如组蛋白脱乙酰基酶抑制剂。此类药物正处于临床研究阶段,显示出部分抗淋巴瘤和抗白血病的活性,但不能特异性作用于 Bcl-2 基因,还可影响许多其他基因。反义寡核苷酸可靶向作用于 Bcl-2 mRNA,从而影响 Bcl-2 的表达。第三类抗 Bcl-2 药物为小分子化合物,可与 Bcl-2 蛋白直接结合而对其产生抑制作用。Bcl-2 抗凋亡蛋白的其他类化学抑制剂,已通过计算模型法或 BH3 置换分析法得到,两种方法的代表药物分别为 HA-14-1 和 YC-137, BH-3I-1 和 BH-3I-2。

6 作为癌细胞凋亡应答调节剂的组蛋白脱乙酰酶抑制剂

组蛋白的结构修饰,由其 N 端的乙酰化/脱乙酰化调节,这对基因表达的调节来说至关重要,因为它能影响带有转录调控复合体的 DNA 之间的相互作用。组蛋白乙酰化与脱乙酰化之间的平衡,由两类不同的酶来调控,即乙酰基转化酶和组蛋白脱乙酰基酶(HDAC)。HDAC 的主要作用是在赖氨酸水平上去乙酰基,游离的赖氨酸牢牢结合于 DNA 磷酸盐骨架上,因而避免了转录的发生。组蛋白乙酰化/脱乙酰化在癌细胞中失控,基因表达模式随之发生变化。而且,对一些白血病的研究显示,染色体易位导致白血病细胞中 HDAC 与融合蛋白形成复合体,这对这类细胞中出现的细胞分化阻滞起着关键作用。以上观察结果推动了对抑制 HDAC 药物的研发。HDAC 抑制剂能阻断组蛋白脱乙酰化,引起细胞周期停滞和许多肿瘤的分化和(或)凋亡。目前已分离出大量可抑制 HDAC 的药物,根据结构可将其分为羧化物(短链脂肪酸)、氧肟酸盐、亲电性酮(环氧化物)、环肽、苯胺和杂环等五类。其中,部分化合物目前已进入 I 或 II 期临床试验。以 NF- κ B 抑制剂和 HDAC 抑制剂作联合治疗,可大大增强后者对白血病细胞凋亡的诱导作用。

《国际肿瘤学杂志》2007 年征订启事

《国际肿瘤学杂志》原刊名:国外医学肿瘤学分册)是中国生物医学核心期刊。1974 年创刊,月刊,大 16 开,80 页,每月 8 日出版,每期定价 12 元,全年 144 元。刊号 CN37-1439/R,ISSN1673-422X。邮发代号 24-64,欢迎在各地邮局订阅,漏订者可汇款至济南市经十路 89 号《国际肿瘤学杂志》编辑部补订。编辑部地址:济南市经十路 89 号;邮编 250062;电话(传真)0531-82949227,82919917,E-mail:gjzlxjn@126.com,gwyxjn@sina.com。