

# 泛素蛋白酶体抑制剂的分子机制

李明<sup>1</sup>综述,刘跃亮<sup>2</sup>审校(1. 重庆市巫溪县人民医院检验科 405800; 2. 重庆医科大学检验医学院,重庆 400000)

【关键词】 泛素化; 蛋白酶复合物; 抑制剂; 分子机制

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.05.047 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)05-0691-03

生物体细胞在精细的调节之下进行蛋白质合成,这有助于维持机体细胞的正常增殖、分化和代谢运转,以及选择性地降解多余无用的蛋白质。泛素化蛋白质降解系统,是机体内蛋白质降解的另一主要方式。该系统步骤多、过程复杂,主要包括底物蛋白质的多泛素化修饰和 26S 蛋白水解酶复合物对底物蛋白质的降解。由机体细胞自然识别程序识别出需要降解的蛋白质,泛素蛋白分子通过共轭双键与底物蛋白质连接形成标签蛋白(即泛素降解底物蛋白质),再被 26S 蛋白水解酶复合物系统识别并水解。针对泛素化蛋白酶降解系统的抑制剂(即泛素蛋白酶体抑制剂),不仅可以促进机体有害代谢物的清理,还表现出明显的抗癌效果,该抑制剂已经被美国食品药品监督管理局(FDA)批准作为部分实体性肿瘤治疗的一线用药。但是,众多临床试验已经发现该抑制剂具有不可忽略的不良反应且不具有经口服的生物可利用特性,这在很大程度上影响其广泛地应用于临床。本文就泛素蛋白酶体抑制剂的分子机制进行综述,为其在新药开发、临床前试验研究和实体性肿瘤的临床治疗评估提供理论依据。

## 1 泛素化、去泛素化和蛋白质降解系统

细胞内环境或外界环境中某些信号分子的刺激启动细胞凋亡程序,再通过识别需要降解的蛋白质,如损伤的蛋白质或错误折叠的蛋白质,以及无生物功能的废弃蛋白质等,启动泛素化蛋白质降解系统。泛素化蛋白质降解主要通过两个步骤来完成:底物蛋白质(即待降解蛋白质)的多泛素化和以水解方式降解底物蛋白质<sup>[1]</sup>。该过程包括许多其他蛋白质和酶的参与、复杂而精细的蛋白质间的作用和其他生化反应。

**1.1 泛素化蛋白酶复合物** 泛素化蛋白酶复合物主要由泛素活化酶(E1)、泛素结合酶(E2)和泛素连接酶(E3)构成。在所有泛素化修饰的类型中,研究较透彻的是第 48 位赖氨酸连接的泛素化修饰(K48)和第 63 位赖氨酸连接的泛素化修饰(K63)。前者的主要功能是对底物蛋白质进行标记,使蛋白酶体能够特异地识别并降解被修饰的蛋白;后者的主要功能是通过修饰作用赋予底物蛋白质新的生物功能而不会导致其降解,如使其具有蛋白质转运或开启其他信号通路的功能。

**1.2 底物蛋白质的多泛素化** 多泛素化修饰过程主要包括:(1)泛素活化,即泛素分子的 C 末端与 E1 半胱氨酸残基共价连接形成硫酯键。具体过程:胞质中存在的游离的、由 76 个氨基酸构成的泛素分子在三磷酸腺苷(ATP)的参与下被泛素活化酶激活后,泛素分子的第 76 位甘氨酸(Gly)与泛素活化酶上特殊的半胱氨酸(Cys)残基形成一个高能硫酯键,然后将转酯作用活化的泛素分子从泛素活化酶转移到泛素结合酶的 Cys 上<sup>[2]</sup>,释放出泛素活化酶,形成泛素结合酶-泛素复合物,使底物蛋白质发生泛素化。(2)在 E3 连接酶参与下,泛素分子从泛素结合酶-泛素复合物上脱离,通过共价连接的硫酯键连接到底物蛋白质的赖氨酸(Lys)残基上,形成泛素-底物蛋白质复合物。最后,多个泛素分子重复地连接到已经被泛素化的待降

解蛋白质,形成多泛素链。E3 连接酶是指环状结构,其主要功能是拉近 E2 结合酶与底物之间的距离,最终使泛素充分接近底物蛋白质的 Lys 残基;少数 E3 连接酶含有 HECT 结构域<sup>[3]</sup>,其在转移泛素分子到底物蛋白之前,先与泛素通过共价结合为中间体,促进继续泛素化,由单泛素化延长成多泛素链。通常至少需要 4 个泛素残基,才能被 26S 蛋白酶体识别并降解目的蛋白质<sup>[4]</sup>。

**1.3 泛素介导的蛋白质水解** 有机生物体内负责聚泛素化蛋白质降解的蛋白酶复合物是 26S 蛋白酶复合物,主要由具有催化功能的 20S 核心颗粒和具有受体作用的覆盖其两端盖状结构的 19S 调节颗粒组成。经泛素活化的底物蛋白质聚集到 26S 蛋白酶体周围,与蛋白酶体 19S 的泛素受体相互作用,多泛素化蛋白质被执行去泛素化和打开蛋白质的折叠结构,去折叠后的蛋白质再通过两个孔状结构进入 26S 蛋白酶复合体的 20S 核心颗粒内部。经酶催化的多次切割,最终形成 3~22 个氨基酸残基的小肽。与其他的翻译后修饰类似,泛素化修饰是一个可逆的过程,泛素链能够被去泛素化酶移除,分解为单个泛素分子被循环再利用。

**1.4 去泛素化** 去泛素酶,是指泛素化蛋白质在特异性水解酶(去泛素化酶)的作用下,多泛素链被解离为单个泛素分子,可再次参与泛素化过程。去泛素化酶(DUB)与泛素化蛋白酶体复合物,在一定程度上存在竞争关系。DUB 属于蛋白酶体超家族,根据其催化亚基结构的不同,分为泛素 C 末端水解酶家族(UCH)、含 JAB1/PAB1/MPN 结构域的金属蛋白酶家族(JAMM)、泛素特异性蛋白酶家族(USP)、卵巢癌蛋白酶家族(OTU)和 MJD 结构域蛋白酶家族<sup>[5]</sup>。在真核细胞内已发现多种 DUB,它们能利用活性硫醇位点将泛素与底物蛋白质拆开<sup>[3]</sup>。DUB 能水解泛素和底物蛋白质之间的硫酯键,还能把错误识别的底物从泛素化复合物中释放出来,并重新释放出泛素分子。19S 蛋白酶体的底座蛋白质成分在打开底物蛋白质折叠结构后,具有运输未折叠的蛋白质和转移去泛素化底物蛋白到催化核心颗粒等作用。20S 核心催化颗粒由 4 层指环状结构的蛋白质包裹<sup>[6]</sup>。外层指环状结构由 7 个  $\alpha$  亚单位构成,分别是  $\alpha 1 \sim \alpha 7$ ,而内层为 7 个  $\beta$  指状结构,分别为  $\beta 1 \sim \beta 7$ , $\beta 1$  亚单位具有半胱氨酸蛋白酶样(C-L)水解活性, $\beta 2$  具有胰蛋白酶样(T-L)水解活性, $\beta 5$  亚单位表现糜蛋白酶(CT-L)活性<sup>[7]</sup>。

## 2 泛素-蛋白酶体抑制剂相关的信号通路

**2.1 人乳头瘤病毒(HPV)感染与 p53 蛋白的泛素化** p53 是一种肿瘤抑制蛋白质,具有转录因子作用,参与细胞周期抑制调节,可诱导细胞凋亡。p53 表达水平是在泛素蛋白酶系统的严密调控下进行的<sup>[8]</sup>。HDM2 是一个指状的 E3 连接酶,与 p300/CBP 组合为一种复合物,促进多泛素化和 p53 蛋白的快速降解<sup>[9]</sup>。因此,在抗肿瘤治疗研究中,抑制 p53 蛋白与 HDM2 蛋白的相互作用及抑制蛋白酶体活性成为研究的关键点,可通过这种方案来增加 p53 蛋白的细胞内水平。当然,前

提是肿瘤细胞可以表达野生型的 p53 蛋白。但是,多数肿瘤细胞都发生了 p53 基因的突变或缺失,因此给抗肿瘤药物的设计带来了限制。研究表明 HPV 自身的 E6 蛋白(HPV-E6)及相关蛋白具有 HECT 结构域 E3 连接酶作用,可促进泛素化蛋白酶对 p53 蛋白的降解。p53 蛋白很容易通过 HPV-E6 蛋白介导的程序发生转移,使 HPV 感染相关肿瘤,如多数的子宫癌和越来越多的头颈部肿瘤,具有低选择性的突变或缺失 p53 基因<sup>[8-10]</sup>。所以,几乎所有的 HPV 感染阳性的宫颈癌和头颈部肿瘤都保留着表达野生型 p53 蛋白的特性。由此认为,如果抑制 HPV 病毒 E6 蛋白酶表达,在一定程度上,可以促进野生型 p53 蛋白在 HPV 阳性实体肿瘤的表达增强。

**2.2 细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂 p27 泛素化** 细胞周期素与蛋白激酶(CDK)的生物活性状态密切相关,可促进 CDK 的活化和细胞周期运行。约超过 15 种细胞周期素存在于人类基因组<sup>[7]</sup>。细胞周期素表达水平是转录诱导和蛋白酶体降解严密调控的结果。抑制蛋白酶体降解活性,可导致细胞周期蛋白的异常表达,从而促进不恰当的 CDK 活化、启动细胞周期进程,导致细胞周期紊乱。这一特点可以为肿瘤治疗提供有用的研究靶点,如启动细胞凋亡和程序性的有丝分裂中断机制。另外,p27 蛋白对调节静止期细胞进入细胞周期有着重要的作用<sup>[10]</sup>。由转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ )介导的细胞与细胞之间的相互作用所引起的细胞周期抑制,部分由 p27 蛋白参与。泛素化蛋白酶体降解 p27 蛋白后,可以恢复细胞周期进程,该生物现象通过一系列复杂的生化反应完成,其中涉及环指状 E3 连接酶与 SCFSkp2 复合<sup>[11]</sup>。另有研究表明,E3 连接酶片段 SCFSkp2 复合物的生物活性需要泛素样多肽蛋白 NEDD8 黏附到 SCFSkp2 复合物上形成蛋白复合物后,才能被泛素蛋白酶体所识别<sup>[12-13]</sup>。所以,致力于 NEDD8 蛋白抑制剂,可通过恢复 p27 蛋白的生物活性阻滞过度增殖的肿瘤细胞,使肿瘤细胞停滞于细胞周期的某一阶段,为抗肿瘤研究提供新思路。

**2.3 促凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白家族泛素化降解** Li 等<sup>[14]</sup>研究表明,抑制泛素化蛋白酶体可导致促凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白家族成员高表达,包括 Noxa、Bax 和 Bik 等蛋白表达上调。此外,关于使用反义寡核苷酸或干扰 RNA(siRNA)或短发夹 RNA(shRNA)的研究已经表明,在部分肿瘤的细胞模型中,如骨肉瘤、头颈部肿瘤、结肠癌等,Bcl-2 蛋白家族成员可通过泛素化蛋白酶体诱导降解的方式参与介导细胞凋亡<sup>[15-17]</sup>。在利用泛素蛋白酶体抑制剂处理部分实体性肿瘤细胞时,Noxa 和 Bax 等蛋白质表达增加时,p53 表达水平提高,其具体机制尚不清楚。此外,泛素蛋白酶体抑制剂还可促进 MCL-1 蛋白质(一种具有抗细胞凋亡作用的 Bcl-2 家族成员之一)的表达增加<sup>[18]</sup>。而 MCL-1 是一个直接的泛素化蛋白酶底物<sup>[19]</sup>,可以抑制细胞凋亡,泛素蛋白酶体抑制剂和 MCL-1 表达抑制剂共同处理肿瘤细胞,可增强泛素蛋白酶体抑制剂促进细胞凋亡的作用。事实上,MCL-1 抑制剂,如 obatoclax(GX15-070)或针对 MCL-1 蛋白表达的 mRNA 和 shRNA,已经被证明具有明显提高泛素蛋白酶体抑制剂杀死血液系统肿瘤或实体肿瘤细胞的作用<sup>[20]</sup>。

**2.4 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体和 NF- $\kappa$ B 信号通路的泛素化抑制** 死亡配体肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)与细胞质膜受体 DR4 和 DR5 结合后,可诱导外源性细胞凋亡通路活化<sup>[20]</sup>。泛素化蛋白酶体抑制剂作用于部分肿瘤细胞后,表现出 DR4 和 DR5 的表达上调,从而增强对 TRAIL 受体的敏感性。临床前实验已经表明,蛋白酶体抑制剂作用于 TRAIL 后,具有明显的抑制实体肿瘤细胞增殖的效果。

多种血液性肿瘤和实体恶性肿瘤细胞内,NF- $\kappa$ B 因子处于过表达和(或)过度活化状态。通常情况下,NF- $\kappa$ B 以无活性形式存在,被胞质中的内源性抑制剂  $\kappa$ B(I $\kappa$ B)所控制;活化后的 NF- $\kappa$ B 因子,可诱导多种与细胞增殖和存活相关基因的过表达和肿瘤组织血管生成异常活跃。NF- $\kappa$ B 被外源刺激物激活,涉及 I $\kappa$ B 的磷酸化、泛素化及蛋白酶体降解<sup>[21-24]</sup>。游离的 NF- $\kappa$ B 则迁移到细胞核内并促进相关基因的转录。部分泛素化蛋白酶体抑制剂的抗肿瘤研究,也是针对抑制 I $\kappa$ B 的降解而抑制结构性活化的 NF- $\kappa$ B 因子的促癌作用。

### 3 小 结

泛素蛋白酶体抑制剂,在实体性肿瘤治疗中已初见成效。目前,在抗实体性肿瘤的临床研究中,第一代泛素蛋白酶体抑制剂,如硼替佐米已经投入应用。而第二代抑制剂,主要针对第一代药物的不足而研究设计,如增强抑制剂对实体性肿瘤细胞的敏感性,使其可以通过口服应用,或研究其他更利于开展临床应用的方案。在作用机制方面,也增加了更多的抑制位点或通过对不同的生物信号通路进行调控,间接调控促进细胞凋亡与抑制细胞凋亡之间的平衡,如针对去泛素酶作用药物的作用靶点,通过泛素蛋白酶来调节去泛素酶的水平<sup>[22]</sup>。而 Chauhan 等<sup>[23]</sup>研究表明,小分子物质(P5091)可以作为泛素蛋白酶抑制剂的抑制剂,对硼替佐米耐药的肿瘤细胞,通过诱导其凋亡而产生抗实体性肿瘤的作用。Li 等<sup>[24]</sup>研究证实泛素蛋白酶体抑制剂可诱导吞噬细胞对实体性肿瘤细胞的抗原提呈作用来发挥机体自身免疫系统的调节作用。此外,被诱导的吞噬细胞还具有增强正常细胞的生存能力和增加异质细胞对抑制剂药物的敏感性的作用。总之,泛素蛋白酶体抑制剂的研究与应用,还需要大量的、有价值的研究工作和研究数据的支撑,因此应该积极地关注新的研究发现和进展。

### 参考文献

- [1] Shen M, Schmitt S, Buac D, et al. Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy[J]. *Exp Opin Ther Targets*, 2013, 17(9): 1091-1108.
- [2] Zhang N, Chen T, Liu C, et al. Inhibition of ubiquitin protein expression and 20S proteasome activity by irbesartan prevents post-infarction ventricular remodeling and decreases TNF- $\alpha$  generation[J]. *Biomed Rep*, 2013, 1(6): 935-939.
- [3] Spratt DE, Walden H, Shaw GS. RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions[J]. *Biochem J*, 2014, 458(3): 421-437.
- [4] Gallastegui N, Groll M. The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine[J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(11): 634-642.
- [5] Li J, D'Angiolella V, Seeley ES, et al. USP33 regulates centrosome biogenesis via deubiquitination of the centriolar protein CP110[J]. *Nature*, 2013, 495(7440): 255-259.
- [6] Winkler LL, Hwang J, Kalejta RF. Ubiquitin-independent proteasomal degradation of tumor suppressors by human cytomegalovirus pp71 requires the 19S regulatory particle[J]. *J Virol*, 2013, 87(8): 4665-4671.
- [7] Liu X, Xiao W, Wang XD, et al. The p38-interacting protein (p38IP) regulates G2/M progression by promoting  $\alpha$ -tubulin acetylation via inhibiting ubiquitination-induced degradation of the acetyltransferase GCN5 [J]. *J Biol*

- Chem, 2013, 288(51):36648-36661.
- [8] Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(32):4294-4301.
- [9] Pan W, Lahue BR, Ma Y, et al. Core modification of substituted piperidines as Novel inhibitors of HDM2-p53 protein-protein interaction[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(8):1983-1986.
- [10] 肖春海, 吴娟芳. 人类乳头瘤病毒分型在宫颈早期病变中的临床意义[J]. *检验医学与临床*, 2012, 9(22):2794-2795.
- [11] Chen L, Wu T, Wei TQ, et al. Skp2-mediated degradation of p27 regulates cell cycle progression in compressed human bladder smooth muscle cells[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2014, 30(4):181-186.
- [12] Weathington NM, Mallampalli RK. Emerging therapies targeting the ubiquitin proteasome system in cancer[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(1):6-12.
- [13] Ungermannova D, Lee J, Zhang G, et al. High-throughput screening AlphaScreen assay for identification of small-molecule inhibitors of ubiquitin E3 ligase SCF-Skp2-Cks1[J]. *J Biomol Screen*, 2013, 18(8):910-920.
- [14] Xu GW, Toth JI, da Silva SR, et al. Mutations in UBA3 Confer Resistance to the NEDD8-Activating Enzyme Inhibitor MLN4924 in Human Leukemic Cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4):1-10.
- [15] Li T, Ho L, Piperdi B, et al. Phase II study of the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341, Velcade) in chemotherapy-na? ve patients with advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Lung Cancer*, 2010, 68(1):89-93.
- [16] Bedford L, Lowe J, Dick LR, et al. Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(1):29-46.
- [17] van Dijk M, Murphy E, Morrell R, et al. The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes AML with myelomonocytic differentiation to TRAIL mediated apoptosis[J]. *Cancers*, 2011, 3(1):1329-1350.
- [18] Kahana S, Finniss S, Cazacu S, et al. Proteasome inhibitors sensitize glioma cells and glioma stem cells to TRAIL-induced apoptosis by PKC $\epsilon$ -dependent downregulation of AKT and XIAP expressions[J]. *Cell Signall*, 2011, 23(8):1348-1357.
- [19] Zang Y, Thomas SM, Chan ET, et al. Carfilzomib and ONX 0912 inhibit cell survival and tumor growth of head and neck cancer and their activities are enhanced by suppression of Mcl-1 or autophagy[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(20):5639-5649.
- [20] Doi K, Li R, Sung SS, et al. Discovery of marinopyrrole A (maritoclax) as a selective Mcl-1 antagonist that overcomes ABT-737 resistance by binding to and targeting Mcl-1 for proteasomal degradation [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(13):10224-10235.
- [21] Yang QH, Xu YJ, Feng GF, et al. Effects of soothing liver and invigorating spleen recipes on NF-kappaB signal pathway related genes and proteins in primary hepatocytes of rats with NASH[J]. *Zhong Yao Cai*, 2013, 36(9):1469-1467.
- [22] Fraile JM, Quesada V, Rodriguez D, et al. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options[J]. *Oncogene*, 2012, 31(19):2373-2388.
- [23] Chauhan D, Tian Z, Nicholson B, et al. A small molecule inhibitor of ubiquitin-specific protease-7 induces apoptosis in multiple myeloma cells and overcomes bortezomib resistance[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(3):345-358.
- [24] Li C, Johnson DE. Bortezomib induces autophagy in head and neck squamous cell carcinoma cells via JNK activation[J]. *Cancer Letter*, 2012, 314(1):102-107.

(收稿日期:2014-10-26 修回日期:2014-11-20)

(上接第 690 页)

- and adolescents with hypertension [J]. *Hypertension*, 2010, 55(6):1323-1330.
- [22] Vigier RO, Zberg PM, Teuffel O, et al. Preliminary experience with the angiotensin II receptor antagonist irbesartan in chronic kidney disease[J]. *Eur J Pediatr*, 2000, 159(8):590-593.
- [23] Franscini LM, von Vigier RO, Pfister R, et al. Effectiveness and safety of the angiotensin II antagonist irbesartan in children with chronic kidney disease[J]. *Am J Hypertens*, 2002, 15(12):1057-1063.
- [24] Flynn JT, Newburger JW, Daniels SR, et al. A randomized, placebo-controlled trial of amlodipine in children with hypertension[J]. *Pediatr*, 2004, 145(3):353-359.
- [25] Trachtman H, Frank R, Mahan JD, et al. Clinical trial of extended release felodipine in pediatric essential hypertension[J]. *Pediatr Nephrol*, 2003, 18(6):548-553.
- [26] Flynn JT. Management of hypertension in the young: role of antihypertensive medications [J]. *Cardiov Pharma*, 2011, 58(2):111-120.
- [27] Batsky DL, Sorof JM, Sugg J, et al. Efficacy and safety of extended release metoprolol succinate in hypertensive children 6 to 16 years of age: a clinical trial experience [J]. *Pediatr*, 2007, 150(2):134-139.
- [28] Sorof JM, Cargo P, Graepel J, et al. Beta-blocker/thiazide combination for treatment of hypertensive children: a randomized, placebo-controlled trial [J]. *Pediatr Nephrol*, 2002, 17(5):345-350.
- [29] Li JS, Flynn JT, Portman R, et al. The efficacy and safety of the novel aldosterone antagonist eplerenone in children with hypertension: a randomized, double-blind, dose-response study[J]. *Pediatr*, 2010, 157(2):282-287.
- [30] Lurbe E, Cifkova R, Cruickshank JK, et al. Management of high blood pressure in children and adolescents: recommendations of the European Society of Hypertension[J]. *Hypertension*, 2009, 27(9):1719-1742.

(收稿日期:2014-08-11 修回日期:2014-10-21)