

三、针对泛素修饰系统的肿瘤治疗方案

泛素修饰系统由一系列能催化细胞内靶蛋白泛素化的酶和底物蛋白所组成，该修饰系统能对细胞内的多种功能进行调控。如果泛素修饰系统出了问题会引起人体内的多种病理改变，比如各种肿瘤的发生等等。我们现在已经发现，在肿瘤的发生阶段和进展阶段都伴随有泛素系统的异常，因此，我们可以借此开发出一系列的诊断及治疗方法来抗击肿瘤。

泛素蛋白是一种小分子修饰蛋白，能以特异性的方式标记靶蛋白。与磷酸化修饰一样，泛素化修饰（即用泛素蛋白来修饰靶蛋白）也是细胞内非常常见的一种修饰途径，它广泛参与了细胞内正常的生理过程以及病理过程。最初，我们认为泛素化修饰途径只能诱导靶蛋白被细胞蛋白酶体降解。但是随着研究的深入，我们发现了与各种泛素修饰途径（比如单泛素化修饰和多泛素化修饰等）相关的越来越多的功能，这些新功能包括调节蛋白转运功能、信号通路蛋白复合体的组装功能以及酶的激活与失活功能等等。

细胞内很多受泛素途径修饰的蛋白质都参与控制细胞内肿瘤发生相关生理（病理）进程，比如细胞周期调控、凋亡、受体下调以及基因转录等多种重要的细胞进程。最近几年，人们对泛素修饰途径在肿瘤相关进程中的分子机制这一课题进行了深入的研究，取得了一定的成果。本文将向读者介绍，有哪些泛素系统组分参与了肿瘤发生发展过程，并将探讨这些“参与者”在肿瘤治疗方面具有哪些潜在价值（图1）。

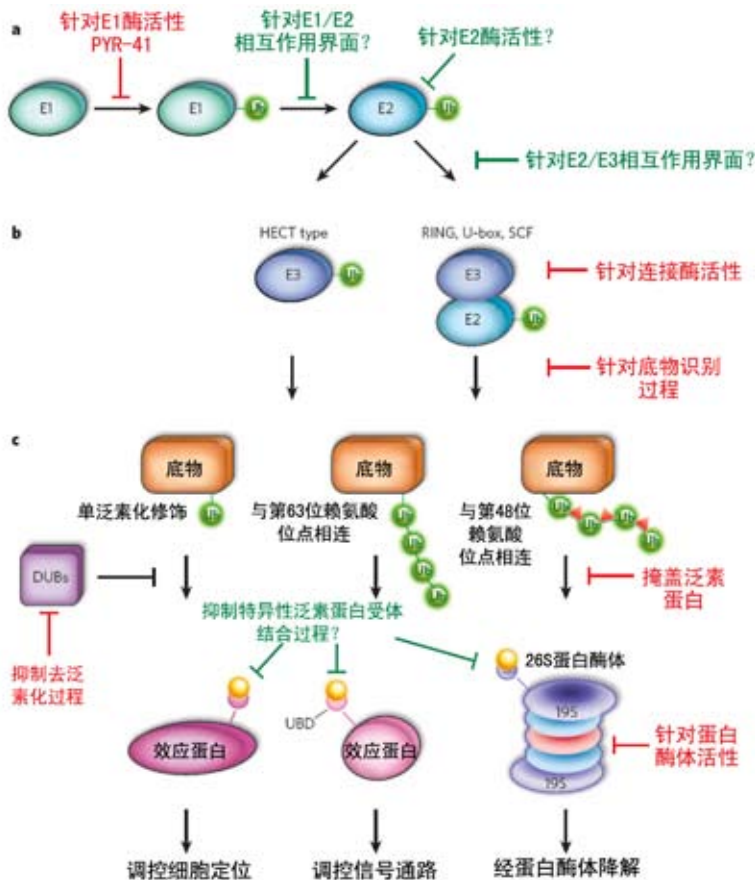


图1 泛素修饰系统为抗癌治疗提供了众多靶点。已知的干扰途径和药物在图中以红色表示，潜在的干扰途径在图中以绿色表示。a：如果阻断早期的结合反应步骤，比如在E1酶和E2酶阶段阻断，就可以从全局上改变整体情况。b：抑制E3酶能起到更加特异性的效果。通过针对E3酶与底物间的相互作用，可以将抑制作用局限于某一个特异性的底物，比如RITA或Nutlins。这种策略也可用于针对去泛素化酶。c：泛素蛋白受体识别泛素化修饰的靶蛋白，然后介导各种细胞进程发生。这些步骤也都可以被抑制剂所抑制。比如图中红色三角所示的由ubistatins掩盖的泛素蛋白修饰物。另一条高度特异性的干扰通路就是干扰泛素蛋白与UBD间的相互作用。第48位赖氨酸被多聚泛素蛋白修饰的靶蛋白会经蛋白酶体途径降解。除了用硼替佐米、NPI-0052、PR-171和argyrin A等药物抑制酶活性之外，还可以使用针对能与泛素修饰靶蛋白相结合的受体的药物，比如针对蛋白酶体中的Rpn10受体的药物或者针对HRad23（图中黄色所示）等穿梭受体的药物。

1. 泛素连接系统是致癌信号通路的重要治疗靶标



E3连接酶被认为是整个泛素修饰系统中最重要的一個组分，因为它负责直接将泛素蛋白与靶蛋白相连接，因此，E3连接酶起到了控制泛素修饰途径特异性的作用。E3连接酶可以根据它们的结构和作用机制分为几大类，比如是否具有HECT、U-box或RING结构域。在有些情况下，E3连接酶的核心是由好几种蛋白质构成的，比如SCF蛋白复合体就是由SKP1、CUL1、RBX1和一个可变的底物特异性的F-box蛋白等好几种不同蛋白组合而成。有部分E3连接酶与肿瘤有关，这很大程度上是因为它们能导致癌基因或肿瘤抑制物降解。我们研究得比较清楚的与癌症相关的E3连接酶是环状E3连接酶Hdm2。Hdm2蛋白是一种非常关键的肿瘤抑制蛋白p53蛋白的负调节蛋白，它同时也是能调控细胞周期的多亚基SCF连接酶的负调节蛋白。根据E3连接酶的底物特异性不同，它既可以起到促进肿瘤发生的作用，也可以起到抑制肿瘤发生的作用。比如在某些组织中该E3连接酶可能起到的是促进肿瘤发生的作用，而在另一些组织中却能起到抑制肿瘤发生的作用。

2. 针对泛素连接酶的治疗方法



泛素连接酶能使特异性底物蛋白降解，因此我们最开始认为如果针对E3连接酶的活性位点，或针对它们与底物间的特异性相互作用，我们就能够开发出副作用小的高选择性药物。当然，Hdm2蛋白是首选药物靶标。在肿瘤患者体内，如果使Hdm2蛋白失活，就能够激活p53通路，导致细胞周期停滞，细胞凋亡。另一个药物靶标是SKP2蛋白，该蛋白是SCF连接酶复合体中的底物特异性亚基，如果在细胞周期抑制蛋白p27表达水平较低的肿瘤细胞中的SKP2蛋白失活，则可能也会起到一定的抑癌效果。不过从另一方面来看，似乎又有一些理由表明，我们应该提高E3连接酶的活性，即使这要比抑制它们的活性困难得多。比如在高表达c-Myc或cyclin E蛋白的肿瘤患者体内使用Fbxw7激动剂，就会促进上述这些癌基因产物降解；而促进VHL连接酶的活性也能够使HIF1 α 失稳，抑制肿瘤血管的形成。在近10年间，生物技术公司以及制药公司都在寻求E3连接酶的抑制剂或激动剂，不过到目前为止，还没有一种药物在临床上表现出抗癌效果。

为什么这些有大量理论基础证据支持的治疗方法一直都没能取得成功呢？我们从这些失败的经验中又能学到什么呢？以Hdm2连接酶为例，我们尝试了各种办法，比如抑制Hdm2蛋白表达，抑制其活性，抑制它与p53蛋白结合等等（图1b），最后都以失败告终。不过，我们也开发出了能特异性抑制Hdm2蛋白E3连接酶活性的小分子抑制剂。实际上，用HLI98抑制剂来治疗肿瘤的作用机理就是激活了p53信号通路，诱导细胞发生凋亡。但是，这些药物的生物效价很差，同时还有与p53无关的脱靶效应（off-target effects）。比如，现在有几种化学药物，其中最成功的要数Nutlins，该药物能针对Hdm2蛋白的沟槽（groove）结构，而该沟槽结构正是Hdm2蛋白与p53蛋白相结合的部位。虽然Nutlins药物刚问世时效果很好，给了我们极大的信心，但是后来

的深入研究发现了不少的问题，这些问题可能会影响这一类抑制剂药物的前景。比如，Nutlins药物只能针对表达野生型p53蛋白的肿瘤细胞起作用，而对表达突变型p53蛋白或不表达p53蛋白的肿瘤细胞则束手无策。Nutlins药物能诱导p53蛋白缺陷型细胞系细胞周期停滞，说明这类抑制剂并不是特异性针对p53信号通路发挥作用的，它们可能还能与其它蛋白一起竞争与Mdm2蛋白相结合的结合位点。也有证据表明，还有一些不会被Nutlins药物抑制的泛素连接酶也能针对p53蛋白，使其被降解。

还有一条开发泛素连接酶抑制剂的策略，那就是找到一种能与连接酶底物蛋白相结合的物质，从而阻止其被泛素蛋白修饰。我们可以针对野生型或突变型的底物蛋白来开发这些抑制剂。还是以p53蛋白为例，我们发现一种名为RITA的小分子化合物能够与p53蛋白的N末端相结合，使得细胞生长停滞（图1b）。不过RITA并不是通过特异性抑制p53蛋白与Hmd2蛋白间的相互作用来起作用的，它还能影响好几个能与p53蛋白相结合的其它蛋白，而这些蛋白都能通过不同于泛素修饰途径的方法来抑制p53蛋白。

在设计能干扰众多细胞周期连接酶蛋白与各自配体间相互作用的多肽类药物时也遇到了同样的问题。比如SCF- β -TrCP能识别 β -catenin或I κ B α 等蛋白内相距的两个磷酸化丝氨酸位点DS₅₂GXXS₅₆，SCF-Skp2能识别p27^{Kip1}蛋白中硫酸化的苏氨酸位点等。我们还不清楚对上述这种位点进行干扰是否足以特异性地抑制蛋白间的相互作用，而且任何经磷酸化修饰或类似磷酸化修饰的小分子物质都会因其亲水的特性而出现生物利用度（文后小词典1）的问题以及细胞膜通透性的问题。即使这些多肽类药物能够进入细胞，抑制连接酶与其底物蛋白间的结合，我们还需要考虑到特异性的问题，因为大部分连接酶的底物蛋白都不止一种。比如 β -TrCP药物能阻止肿瘤细胞内I κ B蛋白的降解，从而抑制原癌蛋白NF- κ B信号通路，但它同样也能抑制 β -catenin蛋白的降解，这反而会促进肿瘤进展，同时也会因为细胞内 β -catenin蛋白水平升高而导致其它问题。

3. E3连接酶与肿瘤血管形成之间的关系



肿瘤血管形成是肿瘤的一个标志性事件。肿瘤形成新生血管是肿瘤快速生长的必需条件，这些血管能够为肿瘤组织提供生长所必需的养分与氧气，因此肿瘤血管形成也是肿瘤发展过程中的重要限速环节。我们通过Elongin B/C-CUL2-VHL复合体就可以清楚认识到E3连接酶与肿瘤血管形成之间的关系。von Hippel-Lindau (VHL) 蛋白是Elongin B/C-CUL2-VHL复合体中决定底物特异性的组分，如果在VHL蛋白中引入突变位点会导致肾透明细胞癌（renal clear-cell carcinomas, RCC）或者希佩尔-林道病（文后小词典2）的发生。VHL蛋白的底物之一就是缺氧诱导因子（hypoxia-inducible factor, HIF），它在维持哺乳动物细胞内环境中氧稳定状态的过程中起到了关键性的作用。在高氧状态下，HIF因子的保守脯氨酸位点会被羟基化修饰，然后被VHL蛋白识别，继而通过泛素修饰途径而降解。在缺氧状态下，HIF因子不会被上述泛素化途径降解，所以能够激活一系列缺氧诱导基因，比如血管内皮生长因子（VEGF）、促红细胞生成素（EPO）和葡萄糖载体1（GLUT1）等等。这些蛋白因子都能促进血管生成，增加携氧红细

胞的数量，促进无氧代谢水平。如果肿瘤细胞内缺乏VHL蛋白，那么即使在氧含量正常的情况下，细胞内的上述缺氧相关蛋白因子的水平也会升高，因此促进了肿瘤血管的形成，促进了肿瘤的发展和生长。目前，罗氏公司生产的针对VEGF信号通路的单克隆抗体类抗癌药物贝伐单抗（bevacizumab）已经在临床上用于治疗结肠直肠癌患者、HER2基因阴性的乳腺癌患者和非鳞癌、非小细胞癌的肺癌患者了。贝伐单抗可以与VEGF相结合从而抑制VEGF与内皮细胞表面的受体相结合，来达到VEGF拮抗剂的作用。

4. 针对抗凋亡蛋白



抗凋亡蛋白（IAP）是一组含有1~3个杆状病毒IAP重复序列（baculoviral IAP repeats, BIR）的蛋白家族。BIR结构域具有抗凋亡活性，因为它们能与凋亡蛋白酶相结合，抑制其活性。此外，c-IAP1蛋白和c-IAP2蛋白通过它们的BIR结构域与肿瘤坏死因子相关蛋白2（TRAF2）相结合，抑制该因子介导的凋亡作用（图2）。不过IAP蛋白家族中的大部分成员也都具有RING结构域，因此也具有E3连接酶的活性，能针对各种底物发挥作用。这些底物包括凋亡因子和信号通路因子等，比如NIK、Mad1和TRAF2等等因子。而且，c-IAP1蛋白和c-IAP2蛋白，以及X相关抗凋亡蛋白（X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP）能够触发自身泛素化反应，在促凋亡信号的刺激下将自身降解掉。据报道，有些肿瘤细胞里的IAP蛋白水平会极度升高，这可能是由于NF- κ B蛋白的活性增高所致。另外，有人将c-IAP2蛋白的BIR结构域与MALT1这种E3泛素连接酶相融合，结果也诱导形成了MALT淋巴瘤。BIR-1结构域介导的自身寡聚化作用（self-oligomerization）也能增强MALT1 E3连接酶的活性，导致NF- κ B信号通路被持续激活，这说明MALT1起到了调节T细胞受体介导的NF- κ B激活途径作用。

c-IAP1蛋白和c-IAP2蛋白的自身泛素化过程需要线粒体蛋白SMAC（second mitochondrial activator of caspases），又称为DIABLO（direct IAP-binding protein with low pI）的参与。该蛋白在细胞凋亡后会从线粒体释放出来，激活凋亡蛋白酶，并以极低的pI与IAP蛋白相结合（图2）。该SMAC蛋白含有一IAP蛋白结合基序（IAP-binding motif, IBM）。该基序与IAP蛋白的BIR结构域相结合。首先，能与BIR结构域相结合的蛋白，比如凋亡蛋白酶能通过IAP介导的方式被释放出来；其次，IAP蛋白的E3连接酶活性能使自身被降解。目前，我们已经研究出了不同的策略来针对癌症模型里的IAP蛋白（图2），比如使用RNAi技术或反义技术下调IAP蛋白的表达，或者用IAP拮抗剂来抑制IAP蛋白的功能等。此外，我们还开发出了能模拟SMAC作用的小分子IAP拮抗剂。上述这些策略都已经被试验证明，能够诱导肿瘤细胞凋亡，其中的作用机制可能是通过非经典途径激活了NF- κ B信号通路，从而表达出了大量的TNF- α 蛋白，导致细胞死亡。从人体肿瘤组织样品和动物模型获得的临床前数据表明，用反义寡核苷酸抑制IAP蛋白的表达有望成为一种新型的癌症治疗方法。目前，用于治疗肿瘤的能抑制XIAP蛋白和存活素蛋白表达的反义复合物已经进入了I期和II期临床试验阶段。

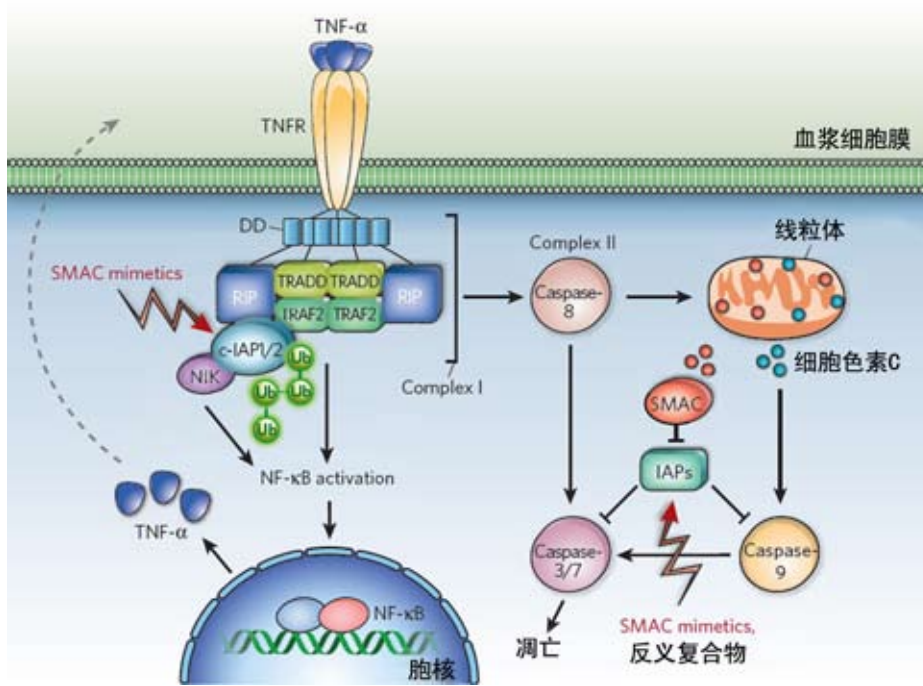
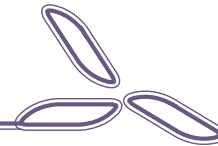


图2 针对肿瘤细胞中抗凋亡蛋白（IAP）的几种不同策略。IAP蛋白是唯一已知的内源性caspases酶抑制因子，它是细胞凋亡信号通路下游关键的组分。IAP蛋白在各种不同的肿瘤细胞中都存在高表达现象，它也是各种抗癌药物、反义技术或SMAC类似物（能模拟天然IAP拮抗剂作用的人工复合物）的作用靶点。肿瘤细胞经上述药物处理之后能恢复对传统化疗药物的敏感性。SMAC类似物也能诱导内源性IAP蛋白降解并激活NF- κ B。这就会增加肿瘤坏死因子TNF- α 的表达量，继而通过TNFR信号途径杀灭肿瘤细胞。针对XIAP和survivin这两种IAP蛋白的反义复合物已经进入了I/II期临床试验。

5. 去泛素化酶在肿瘤进展中的作用



泛素修饰系统有一个很重要的特点，那就是由于去泛素化酶（DUB）的存在所导致的修饰反应的可逆性，因为去泛素化酶能将经泛素化途径修饰的靶蛋白上的泛素蛋白标签去除掉。大部分人类去泛素化酶都属于半胱氨酸蛋白酶（cysteine proteases），它们可以分为5类，即泛素蛋白特异性蛋白酶（ubiquitin-specific proteases, Usp）、泛素蛋白羧基端水解酶（ubiquitin carboxy-terminal hydrolases, UCH）、卵巢肿瘤样蛋白酶（ovarian tumour-like proteases, OTU）、JAMM/MPN金属蛋白酶（metalloproteases）以及马-约病蛋白酶（Machado-Jakob-disease proteases, MJD）。这些去泛素化酶都是致癌或抑癌E3连接酶的直接抑制物，我们也意识到可以将它们作为抗癌治疗的作用靶点。而其中最有望取得成功的就是核去泛素化酶（nuclear DUB），包括USP1、USP28和USP44，它们都与癌症的发生和发展有关。USP1蛋白通过抑制范康尼贫血互补基因D2蛋白（FANCD2）和PCNA蛋白的单泛素化作用调控DNA修复检查点。USP28蛋白在结肠癌患者与乳腺癌患者体内都过量表达，它通过抑制SCF-Fbxw7连接酶的泛素化活性来稳定cyclin E1蛋白和c-Myc蛋白。而USP44蛋白则能够通过去除Cdc20蛋白

的泛素化修饰作用来对抗细胞分裂后期促进蛋白APC/C的活性，防止纺锤体检查点（文后小词典3）过早失效。

其它与肿瘤相关的去泛素化酶还能调控NF- κ B信号通路。泛素蛋白连接酶以及去泛素化酶都参与了NF- κ B信号通路的调控过程。它们可能同处于一个复合体中，甚至共同位于一条多肽链上。正因为如此，它们才能更有效地对NF- κ B信号通路进行动态调控。这种泛素蛋白连接酶与去泛素化酶之间“亲密关系”最为经典的范例非A20蛋白莫属。A20蛋白的OUT结构域具有去泛素化酶活性，而A20蛋白的锌指结构具有E3连接酶的活性。A20蛋白能催化RIP蛋白和NEMO蛋白等底物蛋白上第63位赖氨酸位点去泛素化，也能促进靶蛋白的第48位赖氨酸位点与泛素蛋白连接，继而靶蛋白被蛋白酶体降解。

另一种名为CYLD的去泛素化酶也能调控NF- κ B信号通路。CYLD蛋白见于圆柱瘤病（cylindromatosis）这种皮肤肿瘤患者体内，由一种抑癌基因的突变体所编码。细胞内广泛存在的CYLD蛋白在其C末端含有一泛素蛋白水解酶结构域，该结构域能将连接在靶蛋白第63位赖氨酸残基上的多聚泛素蛋白修饰物水解去掉，这些靶蛋白中有许多都参与了细胞因子诱导的NF- κ B信号通路调控作用。在人体皮肤癌以及好几种其它人体肿瘤，比如肾脏肿瘤、肝脏肿瘤以及宫颈肿瘤等患者体内都发现CYLD蛋白的表达量下降，甚至被抑制，这说明CYLD蛋白具有普遍的抑癌作用。对敲除了CYLD基因的小鼠进行研究发现，BCL3蛋白是CYLD蛋白的重要底物，BCL3蛋白对于圆柱瘤病相关肿瘤的发生发展具有极其重要的作用。BCL3蛋白是一种转录辅助激活因子，它在胞质中处于失活状态，经多泛素蛋白修饰后活化进入核内，随后与NF- κ B1蛋白或NF- κ B2蛋白一起启动转录复合体，促进有助细胞增殖的靶基因表达。

对去泛素化酶进行更进一步的深入研究，了解其催化活性、底物特异性以及调控机制将有助于我们开发出去泛素化酶抑制剂并将其作为抗癌药物，造福人类。我们已经证实，针对泛素蛋白C末端水解酶（ubiquitin C-terminal hydrolase, UCH-L1）的小分子抑制剂具有治疗肺癌的作用。虽然这一成功案例证明，去泛素化酶抑制剂具有美好的前景，但是要将它真正应用到临床，还有很多问题需要克服。

6. 针对肿瘤细胞的蛋白酶体



经泛素蛋白修饰的靶蛋白大部分最终都会被蛋白酶体降解掉。而蛋白酶体的变化也会导致人体疾病，比如心脏功能障碍、白内障（cataract formation）、神经变性疾病、恶病质（cachexia）和类风湿疾病（rheumatoid diseases）等等，但是还没有发现蛋白酶体与肿瘤之间存在什么关联。这说明肿瘤细胞可能也需要蛋白酶体功能正常。事实上，有好几条抗凋亡信号通路和细胞增殖信号通路的确利用了蛋白酶体的活性，尤其是在多种肿瘤细胞中被广泛激活的NF- κ B信号通路更是如此。NF- κ B蛋白在胞质中由于NF- κ B抑制剂（I κ B）的作用而处于失活状态，只有当NF- κ B抑制剂被磷酸化、多泛素化修饰，继而被蛋白酶体降解之后，NF- κ B蛋白才能被激活。Millennium Pharmaceuticals公司生产的硼酸衍生物类抗癌药物硼替佐米（bortezomib），商品名万科（Velcade）就能可逆性地抑制20S蛋白酶体活性位点，因此硼替佐米可能就是通过上述机制（即阻止NF- κ B抑制剂被蛋白酶体降解，下调NF- κ B信号通路的活性）来发挥抗癌作用的。抑制了NF- κ B信号通路还能抑制炎症反应相关基因的表达，上调细胞

周期蛋白依赖的激酶抑制物p21^{Cip1}和p27^{Kip1}的表达，从而促进肿瘤细胞凋亡。硼替佐米除了能作用于NF- κ B信号通路之外，还有证据表明，在某些类型的细胞中它还能通过抑制蛋白酶体的降解作用形成内质网应急反应（endoplasmic-reticulum stress），从而促进细胞死亡。目前，临床上主要用硼替佐米来治疗多发性骨髓瘤（multiple myeloma）等血液系统肿瘤，最近也开始用于治疗套细胞淋巴瘤（mantle-cell lymphoma）复发的病人。

硼替佐米的成功带动了一大批蛋白酶体抑制剂的研发，比如PR-171（carfilzomib）、NPI-0052和CEP-18770等。目前市面上的各种蛋白酶体抑制剂作用机制以及作用靶点各不相同，比如有针对20S蛋白酶体糜蛋白酶活性位点的、针对20S蛋白酶体胰蛋白酶活性位点的以及针对20S蛋白酶体半胱天冬酶活性位点等。作用机制也分为可逆性的抑制与不可逆性的结合或共价修饰等。比如NPI-0052能不可逆地抑制蛋白酶体糜蛋白酶活性以及胰蛋白酶活性，硼替佐米则是可逆性地影响蛋白酶体糜蛋白酶活性以及半胱天冬酶活性。NPI-0052发挥抗癌功效是针对FADD-caspase-8介导的细胞死亡信号通路发挥作用，而不是像硼替佐米那样针对NF- κ B信号通路。目前的临床研究以及临床前期研究都将目光投向了新型蛋白酶体抑制剂在治疗血液系统肿瘤以及其它各种实体瘤时的疗效。更重要的是，我们在体外试验中发现，将蛋白酶体抑制剂结合使用，比如将NPI-0052与硼替佐米结合，可以起到协同抗癌作用。同样，将硼替佐米与其它抗骨髓瘤药物比如左旋苯丙氨酸氮芥（melphalan，即美法兰）、泼尼松（prednisone）、地塞米松（dexamethasone）和酞咪哌啶酮（thalidomide，即反应停）等联用，对早期诊断的骨髓瘤患者也具有治疗作用，目前这种疗法已经进入了三期临床试验。现在对于临床医生来说，最大的任务就是确定合适的联用方案，比如使用哪些药物，每种药物的用药剂量等，以求达到优于单独使用硼替佐米的治疗效果。另一方面，我们也需要开发针对更多种底物、生物利用度更高、毒性更低的蛋白酶体抑制剂。argyrin A就是这样一种新型的蛋白酶体抑制剂，它是在筛选能稳定细胞周期抑制蛋白p27^{Kip1}的复合物时发现的，因此其抗癌活性必须依赖p27^{Kip1}蛋白的正常表达，如果缺乏p27^{Kip1}蛋白，那么argyrin A也就不能起到抗癌作用。

7. 非降解途径的泛素化修饰作用与肿瘤发生之间的关系



在肿瘤细胞中，蛋白被泛素修饰之后也可能不被降解。比如NF- κ B蛋白泛素化修饰后可以聚集形成信号通路复合体；p53蛋白和PTEN蛋白泛素化修饰后可以在胞质与胞核间穿梭，发挥致癌作用或抑癌作用；泛素化修饰作用还能将致癌复合体等招募到细胞核聚集体（Nuclear foci）这类亚细胞结构当中。不过，上述作用都是通过非典型泛素化修饰作用完成的，即泛素蛋白不是与靶蛋白第48位或63位赖氨酸相连，而是与其第6位、11位、27位、29位或33位赖氨酸位点相连。这些动态的修饰过程在细胞发生DNA损伤时起到了重要作用。为了避免发生有害的突变，细胞需要快速发现DNA损伤，确定损伤类型，启动相应的修复机制来完成修复。环状E3连接酶RNF8和BRCA1在细胞修复由电离辐射导致的DSB（DNA双链断裂）损伤时起到了关键作用（图3）。RNF8蛋白与E2结合酶UBC13一起对组蛋白H2A和H2AX进行了泛素化修饰，在组蛋白的第63位赖氨酸位点连接上了泛素蛋白。这种非降解修饰信号在修复复合体形成过程中起到

了重要作用，因为在组成修复复合体的BRCA1蛋白、RAP80蛋白以及其它蛋白中，RAP80蛋白具有两个泛素蛋白结合基序（ubiquitin-interacting motives, UIM），该基序能与靶蛋白第63位赖氨酸上的泛素修饰蛋白结合，并且能招募BRCA1蛋白复合体形成细胞核聚焦点，完成修复。如果BRCA1基因发生突变，则会诱发卵巢癌或乳腺癌，但是RAP80基因或RNF8基因突变却不会诱发上述癌症。

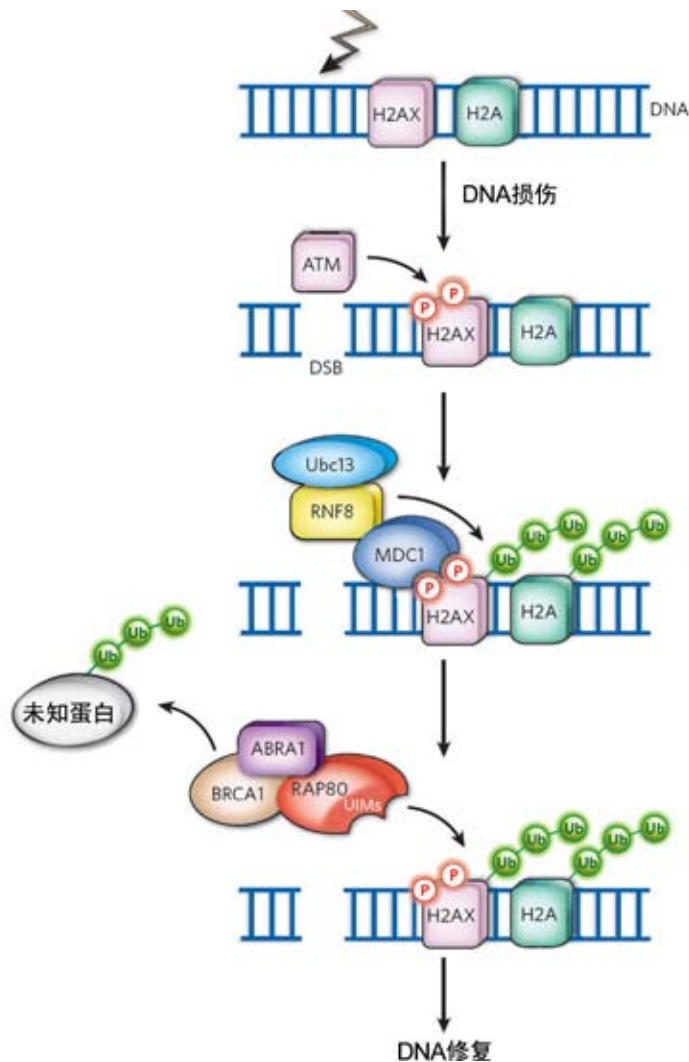


图3 非降解作用的泛素化修饰途径在DNA修复过程中的作用。细胞在诸如放射线等的损伤作用下会造成DNA双链断裂（DSB）。检查点激酶ATM会被招募到损伤位点，促使组蛋白H2AX磷酸化。然后再把MDC1蛋白和E3连接酶RNF8蛋白吸引到损伤处，与E2结合酶UBC13一起修饰组蛋白，使其在第63位赖氨酸位点被泛素蛋白修饰。这种泛素化修饰作用不会导致靶蛋白降解，而是使其形成复合物，参与DNA修复。在这个修复复合物中有一个关键的蛋白——RAP80，它含有两个泛素蛋白结合基序UIM，能够特异性识别第63位赖氨酸被泛素蛋白修饰的组蛋白H2A。RAP80蛋白与其它蛋白一起，将E3连接酶BRCA1招募到DNA损伤处。虽然我们还不知道BRCA1的底物蛋白是什么，但是我们知道如果BRCA1基因发生突变，人体会患上卵巢癌和乳腺癌。

细胞内另一条调控致癌信号通路的途径是改变信号通路关键组分的亚细胞定位，通常是通过对这些组分进行单泛素蛋白修饰从而使其在细胞内重新定位，p53蛋白就是非常好的例子。单泛素蛋白与p53蛋白C末端相连接之后能改变其构象，暴露出p53蛋白的核输出信号（NES）。p53蛋白进入胞质之后能直接导致细胞凋亡。不过对p53蛋白进行不同类型的泛素化修饰也能起到不同的作用，如果p53蛋白被多泛素蛋白修饰之后就会被降解。

肿瘤抑制蛋白PTEN是磷酸酶和张力蛋白（tensin）同系物，它也受泛素化修饰途径的调控。PTEN蛋白是一种脂质磷酸酶，能够负向调控磷脂酰肌醇3激酶（phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K）/AKT信号通路。PTEN基因也是所有人体肿瘤细胞中最常见的失活基因。PTEN蛋白依赖单泛素修饰途径入核的生理意义可以由第289位和第13位赖氨酸位点（这两个位点都是

泛素修饰位点)突变的PTEN蛋白来说明,在与癌症相关性非常高的疾病——Cowden综合征患者体内和脑肿瘤患者体内这两个位点分别发生了突变。不过即使上述这两个位点都发生了突变,PTEN蛋白仍然具有磷酸酶活性和膜定位特性,只是不能再入核罢了。PTEN蛋白不能入核与肿瘤发生后事件相关,此时PTEN蛋白往往不再表达,这是肿瘤进入晚期的一大标志。据报道,在体外实验中发现,HECT型E3连接酶Nedd4-1蛋白能够调控PTEN蛋白泛素化修饰后的蛋白酶体降解途径。不过细胞对PTEN泛素化途径的调控机制要复杂得多,因为在小鼠试验中发现,去除Nedd4-1蛋白后细胞仍然能对PTEN蛋白的稳定性和亚细胞定位状况进行调控。这极有可能是因为在细胞中有多种泛素连接酶在发挥作用。最近我们又发现疱疹病毒相关泛素蛋白酶(Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease, HAUSP)能去除PTEN蛋白的泛素化修饰作用,使其从核内转移至核外(图4a)。PML蛋白可以拮抗这种作用,因为PML蛋白可以通过转录抑制子DAXX抑制HAUSP蛋白的活性。PML蛋白是PML核小体的主要组成部分,在急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukaemia, APL)中,PML蛋白与视黄酸受体RAR- α 相融合。这种融合不仅没有影响PML蛋白的功能,反而导致PTEN蛋白在胞质中聚集,这也许就能解释HAUSP蛋白的异常激活问题了(图4a)。急性早幼粒细胞白血病患者通常都使用三氧化二砷(arsenic trioxide)即砒霜,或全反式维甲酸(all-*trans* retinoic acid)来治疗,这些药物都能促使PML-RAR- α 蛋白降解,同时也能促进PTEN泛素化过程及入核过程。

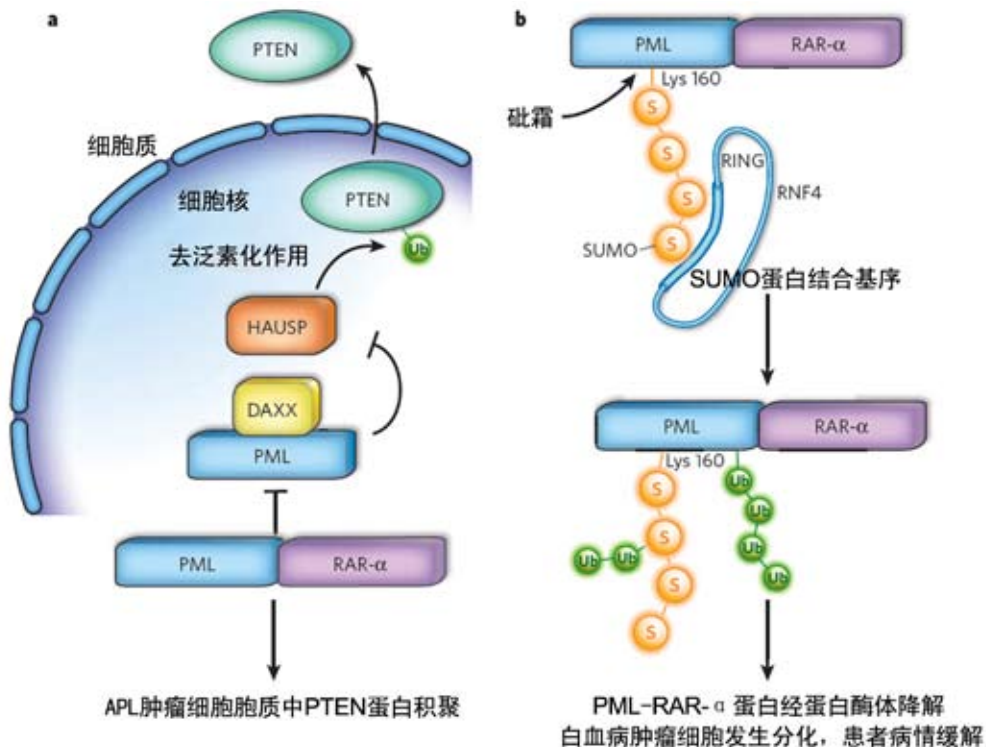
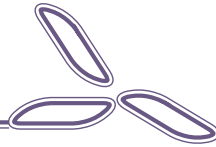


图4 针对核内的泛素系统。a: 抑癌蛋白PTEN的入核需要单泛素化修饰的帮助,而HAUSP蛋白的去泛素化作用又可以使PTEN蛋白返回到胞质内聚集。HAUSP蛋白的活性可以被PML蛋白所抑制。在APL患者体内,PML蛋白的功能会被致癌蛋白PML-RAR- α 所干扰,因此会丧失对HAUSP蛋白的抑制作用,使得PTEN蛋白都转移到了胞质中。b: RNF4介导砒霜诱导的PML-RAR- α 蛋白以及PML蛋白的降解过程示意图。砒霜刺激SUMO多聚物与靶蛋白第160位赖氨酸位点相连接,然后通过SIM结构域招募RNF4蛋白,RNF4蛋白介导泛素化修饰过程发生,然后经蛋白酶体将PML-RAR- α 蛋白降解。因此使用砒霜治疗APL患者会使其白血病肿瘤细胞发生分化,患者病情缓解。

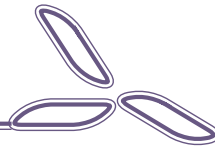
8. 干扰泛素蛋白识别过程



泛素化修饰能给被修饰的靶蛋白带来多种不同的功能，泛素蛋白结合结构域（UBD）能分辨各种不同的泛素修饰类型并与之结合。这些修饰类型包括单泛素修饰和多泛素修饰，而多泛素修饰又包括不同长度的修饰和不同连接类型的修饰等等。到目前为止，我们已经发现了20多种UBD家族蛋白。这些蛋白广泛参与了细胞内的多种生理过程，比如RAP80蛋白中的UIM结构域参与了双链DNA修复过程；TLS聚合酶中的UBM和UBZ结构域参与了跨损伤合成过程（translesion synthesis pathways, TLS）；NEMO蛋白和TAB蛋白中的UBD结构域参与了NF- κ B信号通路蛋白激酶的活化过程等等。

最具挑战性的癌症治疗方法当属干扰细胞内泛素蛋白与UBD间的相互作用（图1c）。这是一项艰难的任务，因为在泛素蛋白与UBD之间的疏水结合界面是扁平的，它们之间的亲和力也非常弱，但是在很多情况下，这种很弱的亲和力会通过多个结合位点间的结合作用得到补偿和加强。名为ubistatins的小分子抑制剂是第一个能够干扰泛素蛋白与UBD间相互作用的化合物。Ubistatins能与位于第48位赖氨酸上的多聚泛素蛋白疏水界面相结合，阻止其被蛋白酶体受体RPN10、RPN13UBD和穿梭受体（shuttling receptor）RAD23中的UBD结构域所识别（图1c）。虽然由于Ubistatins无法透过细胞膜而不能在临床上投入使用，但是它证明了我们可以使用小分子化合物来干扰泛素蛋白与UBD间的相互作用。与要获得具有生物活性的Ubistatins样小分子物质同样困难的是获得能针对某种靶蛋白UBD结构域发挥作用的物质，有了这种药物我们就可以特异性地调控细胞进程，而不用广泛地干扰泛素蛋白识别过程。

9. SUMO修饰过程与癌症的关系



泛素蛋白家族是第一大类泛素样蛋白（UBL）家族，该家族成员的数量还在不断增加，它们都具有相似的结构，即泛素蛋白球形 β -grasp fold结构，但是不一定在序列上具有很高的相似性。此外，所有的UBL蛋白都有一个高度保守的C末端甘氨酸残基，这个甘氨酸残基对于UBL蛋白的结合来说非常重要。所有的UBL蛋白也都需要同样的一套E1、E2和E3酶系统来完成修饰过程。SUMO是哺乳动物众多UBL蛋白中研究得最为清楚的一个UBL修饰蛋白。它主要参与核内代谢过程的调控，比如转录抑制过程、DNA复制过程、DNA损伤修复过程、PML核小体形成过程以及蛋白在胞核与胞质间穿梭过程等等。与泛素化途径不同的是，SUMO修饰途径只需要一个E2结合酶UBC9蛋白，该蛋白能直接与底物蛋白中某一特殊保守序列中的赖氨酸位点结合。在许多人体肿瘤细胞中UBC9蛋白都呈过表达状态，比如肺腺癌、卵巢癌与黑色素瘤等等。UBC9蛋白在SUMO修饰途径中具有关键作用，因此，它也是最热门的抗癌治疗靶点。有好几项针对UBC9蛋白的试验都已经展开，比如抑制其活性位点，干扰UBC9蛋白与E1酶的结合或者阻断UBC9蛋白与靶蛋白的结合等等。

与泛素化修饰途径一样，SUMO修饰途径的生理意义也是由含有SUMO结合基序（SIM）的蛋白来决定的。比如泛素E3连接酶RNF4蛋白（或者称为SNURF蛋白）就含有4个SIM结构

域，因此它也能够将SUMO系统与泛素系统联系起来。在APL患者体内，RNF4蛋白起到了重要作用，因为它能够识别SUMO修饰的PML蛋白，因此也就能识别与APL发病息息相关的PML-RAR- α 融合蛋白，从而促使PML-RAR- α 蛋白被蛋白酶体降解（图4b）。PML蛋白是PML核小体中必需的结构组分，它参与了细胞凋亡，细胞增殖抑制，维持细胞基因组稳定性和细胞抗病毒反应等众多的细胞生理过程。值得我们注意的是，在APL患者和其他一些实体瘤患者体内，PML核小体常常会缺失，这说明PML核小体具有抑癌功能。

三氧化二砷可以促进PML-RAR- α 蛋白以及PML蛋白的降解，因为它能够促进SUMO-1蛋白和SUMO-2蛋白与PML-RAR- α 蛋白的四个SIM间相结合。RNF4能特异性地与SUMO-2蛋白多聚体结合，因此也能在三氧化二砷的调控作用下进入PML核小体当中（图4b）。在PML-SUMO-2蛋白复合物中，RNF4既能泛素化修饰PML蛋白，也能修饰融合蛋白中的SUMO-2蛋白。PML-RAR- α 蛋白被蛋白酶体降解后，白血病肿瘤细胞会发生分化，患者也会获得临床缓解。三氧化二砷这个包法利夫人曾经服用过的毒药现在广泛地应用于临床，作为治疗APL患者的特效药在使用。而三氧化二砷背后的治疗机制告诉我们，针对泛素修饰系统设计药物不失为一条好的思路。

10. 未来还将面临的挑战




有大量主要来自体外培养细胞的试验证据，已经从分子层面解释了泛素修饰系统的改变是多种肿瘤的发病原因。在很多情况下，这些数据都已经得到了临床试验的证实，因此我们可以据此来设计针对泛素系统的抗癌药物和治疗措施。但是从体外培养的细胞得来的试验数据不一定总能真实地反应体内的状况，因此，我们还需要对肿瘤组织样品和动物模型进行试验才行。而且，在细胞转化或转移时，泛素信号通路往往会与其它致癌信号通路同时起作用，这就使情况变得更复杂了。要弄清楚体内这些动态过程的复杂情况，我们还需要对大量患者肿瘤组织样品进行全方位的基因组学和蛋白质组学研究才行。

比如蛋白酶体抑制剂硼替佐米这种能够干扰泛素修饰系统的药物设计思路就是非常好的发展方向。其它的方法也在不断探索之中，比如抑制E2泛素结合酶和E3泛素连接酶（见图1a、b）；阻止UBD与泛素蛋白间的结合或者设计新的蛋白酶体抑制剂（见图1c）等等。有时，试验结果可能会令人失望，比如寻找泛素连接酶抑制剂的过程就是如此，但是寻找新型的蛋白酶体抑制剂一定会取得成果。使用反义复合物和抑制蛋白间相互作用的方法都已经在临床试验中被证实有效，IAP拮抗剂就是明证（图2）。UBL系统也是治疗的靶点之一，因为它们也参与了更多抗肿瘤过程，比如自体吞噬过程等。只要我们进行更多的临床研究，就一定能发现更多更有效的抗癌疗法和药物。

原文出处：

Daniela Hoeller & Ivan Dikic.(2009) Targeting the ubiquitin system in cancer therapy, *Nature*, 458: 438-444.

 YORK/编译

1. **生物利用度 (Bioavailability)** 又称生理有效性 (physiological availability)，是指药物被机体吸收进入循环的相对量和速率，它是药物动力学研究中一个有重要实用价值的指标，其含义包括：①药物吸收程度：即实际吸收的药量占给药量的百分数；②药物吸收速率：是指血药浓度峰值和达峰时间。生物利用度是影响药物有效性、安全性的一个主要参数，用F表示， $F = (A/D) \times 100\%$ ，A为进入体循环的量，D为口服剂量。影响生物利用度的因素较多，包括药物颗粒的大小、晶型、填充剂的紧密度、赋型剂及生产工艺等。生物利用度是药物制剂质量的一个重要指标。

2. **希佩尔—林道病综合症 (VONHIPPEL-LINDAU SYNDROME)** 是一种以血管不正常生长为特征的多系统障碍疾病。正常血管生长象树状一样，但具VHL疾病的人却不时会有毛细管节出现，这些节称为血管瘤或成血管细胞瘤，可出现在视网膜，大脑某一部位，以及脊柱索，肾上腺和身体其他部位。VHL疾病的基因定位于染色体3上，以显性方式遗传，如果父母一方有一种显性基因，那么他（她）的下一代就有50%的机会遗传该基因。VHL基因是一种肿瘤抑制基因，它在正常细胞中的作用是抑制无控制的生长和增殖。如果VHL基因缺失或突变，能引起癌生长。

3. **纺锤体检查点 (spindlecheckpoint)** 是细胞周期中的一个重要检查点，由Mad2、Bub1等染色体动粒 (kinetochore) 蛋白构成，像“传感器”一样能感知微管与动粒结合情况和张力。纺锤体检查点阻滞细胞进入分裂后期直到所有染色体着丝点正确与微管联接，确保染色体均等分配，维持基因组稳定性。

扩展阅读

《自然》(Nature)曾于2009年4月刊登了由Millennium Pharmaceuticals公司的科学家发表的文章，该文介绍了一种全新的治疗癌症的方式——以“泛素-蛋白酶”为靶位的抗癌新药物。

文中，研究人员指出，他们新发现了一种与癌症相关的蛋白酶体抑制因子，它正成为一种新的抗肿瘤药物。首次报告被用于临床的蛋白酶体抑制因子是“硼替佐米”(Bortezomib)，它可用来治疗多种骨髓瘤和一些淋巴瘤。

这篇文章中Soucy等人报告了MLN4924，它是“NEDD8-激发酶”(NAE)的一个小分子抑制因子，目前正在进行一期临床试验。NAE调控“泛素连接酶”一种亚型(即cullin-RING)的活性，后者又控制各种不同细胞蛋白的降解。MLN4924在小鼠癌症模型中诱导癌细胞死亡和产生抗肿瘤活性。这为抗肿瘤药物的开发开辟了新的道路。

下面，就让我们仔细了解该新药物的研发过程。