

生命奥秘

LifeOmics

2018年 5月刊 总第105期

癌症疗法的前沿进展

引发生物学革命的细胞
螃蟹能用鳃“吃东西”

无奇不有
生命世界
解读生命
走进科学

目录 : CONTENTS

专 题 — 癌症疗法的前沿进展

前言	01
一、治疗癌症减少用药，或效果更佳	02
二、四种机制完全不同的癌症药物疗法	08
1. 肿瘤表观遗传学：概念、挑战和治疗前景	08
2. PARP抑制剂类药物：协同致死效应在临床上的应用	19
3. 锁定RAS蛋白：知己知彼方能百战百胜	29
4. “垃圾”清理：一个极有前途的抗癌新策略	40

下一期（2018年6月刊）预告：肌萎缩侧索硬化症

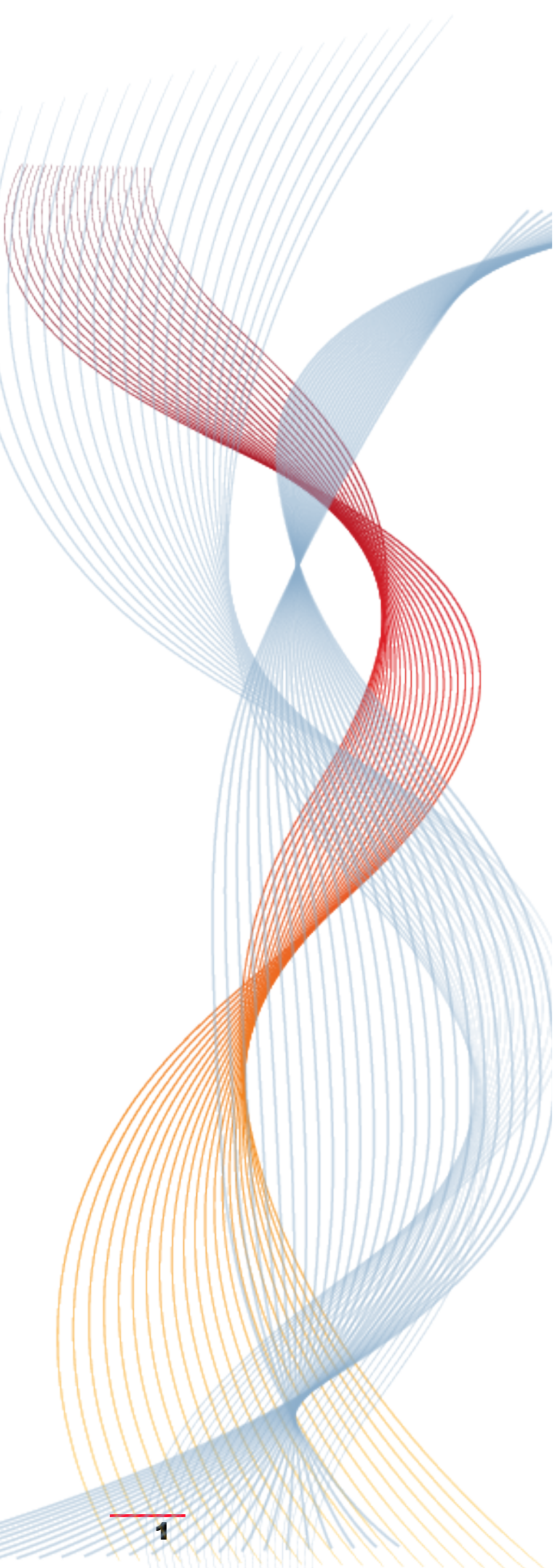
下一期《生命奥秘》将以《肌萎缩侧索硬化症》为专题。肌萎缩侧索硬化症（Amyotrophic lateral sclerosis, ALS）是一种毁灭性的疾病，人们至今对其病因知之甚少，无法找到有效的治疗方法。但是，尽管如此，研究人员的不断努力让该病患者逐渐看到了希望。本专题主要介绍了疾病遗传研究和流行病学研究揭开ALS的神秘面纱的过程、即将面世的新药和其它疗法，以及从可为疾病提供资金资助的ALS冰桶挑战活动中获得的经验和教训。

热点

引发生物学革命的细胞	53
------------------	----

百态

螃蟹能用鳃“吃东西”	60
为什么毛虫生病也会没胃口?	62



专题

癌症疗法的前沿进展

前言

耗时十年的癌症基因组项目提供的信息让我们对这种疾病复杂性的了解不容乐观。遗传突变会促进肿瘤的生长，但是不同患者的肿瘤生长情况各不相同，原发肿瘤和转移性肿瘤也各有差异，甚至同一肿瘤的不同部位之间都会大相径庭。肿瘤这种异质性解释了为何某种药物对一名患者起效，却对其他患者无效，以及为何患者在接受药物治疗的初始阶段病情有起色，但随后却复发，并产生了药物抗性。

尽管癌症的遗传复杂性给我们开发癌症疗法带来了许多艰巨的挑战，但研究人员不断努力，最终在四个方面取得了新进展，这四个方面包括肿瘤表观遗传学、PARP抑制剂、RAS蛋白和泛素-蛋白酶系统。

一、治疗癌症减少用药，或效果更佳



Chet Cooper与肿瘤学家Antoni Ribas一起，为他的黑色素瘤设计了一个服药—停药周期性方案。

如果将一些治疗癌症的药物剂量减少到刚好抑制肿瘤生长的量，疗效可能更好。

在2014年夏天的一趟商务旅行中，杂志出版商Chet Cooper发现自己的腹部存在奇怪的结节。他迅速回到加州，并拜访了一位当医生的朋友。Cooper接受了活组织检查后，结果显示，他患上了转移性黑色素瘤——一种在身体里扩散的皮肤癌。大多数患有这种疾病的人

存活期不超过5年。

另一位朋友在得知这一消息后，敦促Cooper参加加州大学（University of California, UCLA）洛杉矶分校的一项临床试验。该临床试验采取两种免疫疗法相结合的方式。其中一种疗法是将疫苗注射进他的肿

瘤；另一种则是检查点抑制剂——新的癌症治疗方法，它可关闭免疫系统的“刹车功能”，使之更有效地杀伤肿瘤。不幸的是，这种联合疗法并没有杀死Cooper的肿瘤。所以2015年6月，他又加入了另外一个试验。这次临床试验使用了两种药物来调控细胞生长的信号通路。事实上，这两种药物都不是新药，但试验的核心是检验给药策略的效果：患者不是按照传统的做法，每天服药一次，而是间歇性地服药——服药5周，停药3周。

佛罗里达坦帕莫菲特癌症研究中心（Moffitt Cancer Center）的放射学家Robert Gatenby指出，在治疗癌症时，传统观点认为我们需要尽可能多地杀死癌细胞。鉴于此，医生会倾向于大剂量给药，但这样很容易导致患者被药物杀死。这种观点简直是癌症治疗界的异端邪说。然而，它却是已存在50年或更长时间的癌症指导性治疗原则。对于许多传统的化学疗法来说，在高毒性治疗过程中，间歇性停药是不可避免的，因为我们要为患者的恢复留出一定的时间。但是较新的靶向疗法则很少停药，往往是一直用药，直到治疗结束。

目前包括Gatenby在内的少数几个实验

室正在挑战教条，尝试间歇性给药。癌症生长的理论模型和动物研究的证据表明，临时停止或减少药物剂量可以减少癌细胞的耐药性，甚至可以致使一些细胞死亡，延长患者的生命。

Cooper的肿瘤专家，加州大学洛杉矶分校的癌症研究员Antoni Ribas表示，定期停止癌症治疗可能会减少给患者带来的毒性。Cooper也认为这种疗法可能更有效。他指出，这就像放一个时间足够长的假期，然后再重新开始。在这种情况下，癌细胞不容易对治疗产生抵抗。

现在已有临床试验在癌症患者身上测试这些新剂量策略的有效性了。有些试验完全停药，然后经过固定的时间后再重新开始给药；有些试验给药时交替使用高、低剂量；还有一些试验则等待肿瘤明显收缩后再停药。虽然离获得最后结论还有很长时间，但这种策略在Cooper身上非常有效。Ribas表示，经过近2年的服药—停药周期，尽管Cooper仍然存在肿瘤残留，但肾脏外最令人担忧的肿瘤已经缩小了一半以上，效果明显优于大多数连续服药的晚期黑色素瘤患者。

2001年，Gleevec被获批用于治疗由一种突变引起的白血病。

该药物的惊人疗效似乎支持了靶向药物应该持续给药的传统。对于大多数患者来说，每天服用Gleevec，最终寿命与正常人没有差别。Gleevec已经引发了一波类似的、阻断传播生长信号的突变蛋白药物的出现。这些药物包括治疗黑素瘤的BRAF和MEK抑制剂（Cooper服用的两种药物），以及治疗肺癌的EGFR和ALK抑制剂。但是，与最初Gleevec治疗的血癌不同，这些药物靶向的实体瘤基因复杂，其细胞亚群携带了你所能想象得到的每一个抗性突变。最终，这些药物往往会随着少数几个肿瘤细胞出现抗性和增殖，而

在一年内失效。

几年前，为了帮助患者解决抗性问题，Novartis公司和加州大学旧金山分校（University of California San Francisco, UCSF）的研究人员持续给肿瘤小鼠服用BRAF抑制剂，直到它们的肿瘤形态从一开始的缩小，转而继续生长才结束用药，最终构建了耐药的黑色素瘤细胞模型。然而，当研究人员停药时，肿瘤又意外出现萎缩。对此，UCSF的前研究员，现就职于盐湖城犹他大学（University of Utah）亨斯迈癌症研究所（Huntsman Cancer Institute）的Martin

McMahon认为，其原因可能是，用药期间，存活下来的肿瘤细胞通过提高BRAF蛋白的水平来抵抗药物作用。停药后，高水平的BRAF对细胞却是致命的。通过在小鼠模型上实施服药—停药的给药策略，Novartis公司的UCSF合作者发现这样可以控制肿瘤的大小，且小鼠的存活期达到近7个月。2013年2月，他们将相关研究结果发表在《自然》（*Nature*）杂志上。相比之下，大多数被连续给药的小鼠肿瘤都生长过快，以致于在约3.5个月后不得不被安乐死。

同年晚些时候，研究显示，人类也同样可以从间歇给药策略中受益。英国黑色素瘤肿瘤学家报告了一项研究，在19例因肿瘤耐药而停止服用BRAF抑制剂的患者中，14例停药后出现肿瘤生长较慢、甚至萎缩的现象。在后续的肿瘤细胞系实验中，加州大学洛杉矶分校的Roger Lo和Ribas共同证明，将BRAF和MEK抑制剂联合（默认的黑素瘤治疗），停药也能够引发癌细胞死亡。

基于上述研究结果，国家癌症研究所（National Cancer Institute）启动了间歇给药策略的临床试验——就是Cooper加入的那个。（Cooper已经正式退出了临床试验，但仍然在Ribas监督下遵守间歇给药规则）。目

前该研究已招募了原定240名黑素瘤患者中的135名患者，其中一半接受间歇性治疗，另一半持续给药。UCSF的试验主管Alain Algazi指出，明年或许就能获得早期的结果。Ribas预测，试验至少要继续到患者发生遗传抵抗。

英国研究人员正在落实一项计划——拟招募150名黑色素瘤患者，以开展一个为期两年的间歇给药试验。牛津大学（University of Oxford）肿瘤学家Mark Middleton指出，他们将收集患者肿瘤随时间变化的数据，同时进行动物研究以改进剂量方案，然后再对大量患者进行测试。他预计肿瘤学家和患者会对减少剂量感到“紧张”，即便这意味着减少副作用和降低药物成本。“更多就是更好”是肿瘤学界的一个金标准。但是，你必须遵循科学规律。

研究人员认为靶向药物的剂量策略也适用于其它肿瘤。佛罗里达州迈阿密大学（University of Miami）的Jonathan Schatz报道称，与暴露于BRAF抑制剂的黑素瘤细胞一样，接受了ALK抑制剂治疗的淋巴瘤细胞也开始产生抗性，即间歇给药也能对这种淋巴瘤发挥效用。Schatz指出，UCSF和Novartis合作项目最初的发现开辟了一种全新的方式，以了解、确认并最终治疗这些癌症。

波士顿达纳-法伯癌症研究所（Dana-Farber Cancer Institute）的进化生物学家Franziska Michor提醒说，简单的间歇给药方案可能并不总是正确的。

她使用肿瘤生长的数学模型来研究非小细胞肺癌的耐药性。在大约一半时间里，EGFR抑制剂——目前最先进的针对携带EGFR蛋白突变的肺癌靶向治疗——最终却失效了，因为肿瘤细胞发生了特异性抗性突变。

但是，无论是实验室里还是患者研究中，携带这种突变的肿瘤生长都较为缓慢。Michor和合作者的发现，表明了细胞产生抗性会对自身增殖产生适度的影响。2011年，Michor说

在《科学转化医学》（*Science Translational Medicine*）上的一项研究指出，间歇给药效果并不佳。这是因为停止给药会让更健康的、对药物敏感的细胞生长更快。她的团队得出的结论反而是，患者应每周接受高剂量的EGFR抑制剂，每周使用两次高剂量，其间使用低剂量，即“脉冲”给药策略。

这种模型指导的“脉动”给药方案已经在晚期非小细胞肺癌的小型临床试验中进行了

测试。然而就发生抗性的速度而言，脉动给药组与持续给药组一样快。研究人员认为，这主要是因为人吸收和代谢药物的速率与小鼠不同。这次临床试验的负责人、纽约市纪念斯隆凯特琳癌症中心（Memorial Sloan Kettering Cancer Center）的Helena Yu指出，药物的浓度不能超过关键的血液峰值，然而只有到峰值

才能阻止抗性细胞的产生。

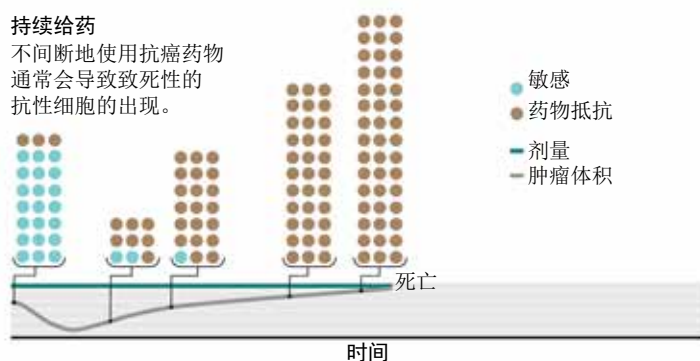
初步试验确实有一个意想不到的好处：药物阻止了转移到脑部的肿瘤的生长，这主要是因为高剂量可以帮助药物穿过血脑屏障。Michor希望用更新、更有效的EGFR抑制剂启动另一次“脉冲”试验。

治疗时间表

某些研究人员尝试使用新的治疗策略，以期减缓肿瘤生长。不过他们不会持续使用这些抗肿瘤药物的最大安全剂量。

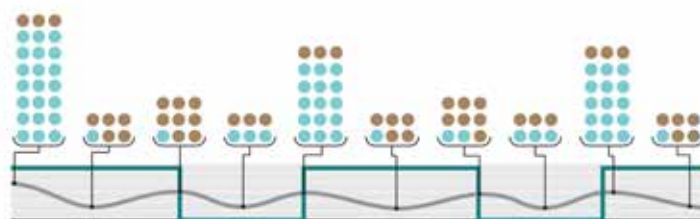
持续给药

不间断地使用抗癌药物通常会导致致死性的抗性细胞的出现。



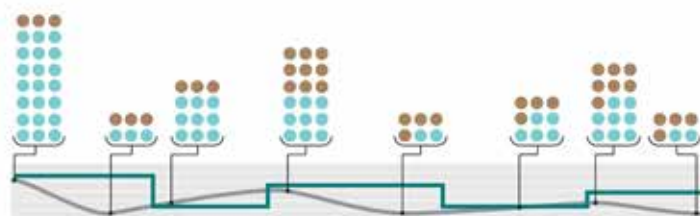
间歇性给药

由于抗药细胞在给药情况下，生长最快，所以中断治疗能够引起这些细胞的死亡，延长患者的寿命。



适应性给药

根据肿瘤体积调整给药剂量，会让敏感细胞和耐药细胞相互竞争，延缓肿瘤生长。



癌症生物学家William Sellers表示，随着时间的推移，相比于总剂量相同的平均给药，脉冲式给药能更有效地杀死细胞。他最近离开了Novartis公司，加入了博德研究所（Broad Institute）。他还指出，（脉冲式给药时）肿瘤响应的生物学机制可能是完全不同的。

McMahon等人提出了间歇给药的另一种思路：暂停一种靶向治疗时，可以施加第二种靶向另一种蛋白的抗癌药物。McMahon表示，这或许能更强有力地杀伤肿瘤，从而更好地延长寿命。

Gatenby认为，变换剂量策略不仅仅适用于靶向药物，也适用于传统化疗药物和荷尔蒙药物。他更喜欢称之为“适应性治疗”，因为它并不依靠模型建立一个固定的剂量计划，而是根据患者肿瘤的发展调整剂量——当肿瘤足够小时，甚至可以停止给药。他的目标是保留一群药物敏感细胞，使之与耐药细胞竞争，并抑制其生长。

在去年《科学转化医学》（*Science Translational Medicine*）杂志上发表的论文中，Gatenby的团队对植入人乳腺肿瘤细胞的小鼠进行了大剂量化疗，随后在肿瘤开始缩小后降低了药物剂量。这种策略使肿瘤的大小稳定了6个月——比连续给药长得多。12只肿瘤

小鼠中，有9只能够在一段时间内完全停止治疗。Gatenby在卵巢癌方面已经取得了类似的临床前成功，目前正计划展开乳腺癌临床试验。

他还在测试传统的前列腺癌药物适应性剂量策略。肿瘤学家通常规定一种药物的连续最大剂量，该剂量能抑制人体的雄激素，从而抑制肿瘤生长。但是，当患者的肿瘤发展出不依赖雄激素而存活的能力时，患者往往会对雄激素阻滞剂产生药物抵抗。Gatenby的团队现在正在进行一项临床试验，当患者开始对雄激素阻滞剂阿比特酮出现抵抗时，就停药。等到成像测试显示肿瘤开始增长或前列腺特异性抗原水平（前列腺癌的血液生物标志物）显著升高时，再继续给药。

在下个月的美国癌症研究协会年会（American Association for Cancer Research）上，Gatenby团队将报告11名患者中有9名患者仍然对阿维酮酮产生响应的情况，其响应时长的中位数为21个月，大约是正常时间的两倍。值得一提的是，这些人服药的剂量不到常规剂量的40%。Gatenby指出，他们的目标是尽量长时间地抑制肿瘤生长，延长寿命，提高生活质量。

研究不同给药方案的研究人员指出，这些方案仍处于试验阶段。

值得警惕的是，如果癌症患者突然停药，肿瘤可能爆发性生长。Gatenby提醒，医生们要当心，因为很可能肿瘤的生长会失控。

支持者认为，癌症领域最迫切需要的是更为基础的实验室研究。可变剂量并不完全是一个蓬勃发展的研究领域。纪念斯隆凯特琳癌症中心（Memorial Sloan Kettering Cancer Center）的癌症生物学家Neal Rosen指出，我们很少有人想到这些问题。

同时研究者们也注意了到其它障碍。Rosen表示，大多数进行临床前癌症研究的学术实验室都没有精细地检测药物的相关代谢参数，而剂量调整策略需要这些信息。他补充说，公司关注的重点是获得药物监管部门的批准。在药物进入临床之前，人们并没有给予替代性给药方案足够的重视。

纪念斯隆凯特琳癌症中心的Paul Chapman指出，基金审核员对这类临床试验

非常警惕。Chapman正在开展一项间歇性剂量试验，以靶向治疗眼睛中的黑色素瘤。他和他的合作者——哥伦比亚大学（Columbia University）的Richard Carvajal受到了很多质疑，其中部分原因是他们选择了一种半衰期很短的、适合间歇给药的药物（一种MEK抑制剂），而不是适用于标准癌症治疗的适合连续

给药的药物。

Chapman认为，鉴于越来越多的证据表明许多癌症会对连续给药产生抗性，癌症领域应该对新的剂量策略持更开放的态度。

Chapman等人并不知道这样会有效，而是认为这是有道理的，应该尝试一下。

资讯 · 频道

www.LifeOmics.com



二、四种机制完全不同的癌症药物治疗法

1. 肿瘤表观遗传学：概念、挑战和治疗前景

表观基因组学自诞生起便对肿瘤生物学产生了非常大的影响。表观基因组学固有的动态变化特性，已经使其成为了一个备受关注的治疗靶点。近几年来，靶向表观遗传学治疗（targeted epigenetic therapies）研究领域也获得了丰厚的资金支持。下文将向读者介绍最近在肿瘤表观遗传学研究领域取得的一些研究成果，以及表观遗传学在肿瘤的发生、进展，以及演变过程中所起到的调控作用；此外，下文还探讨了最近开发的表观遗传学治疗方法，以及与这些疗法的敏感性及耐药性相关的分子细胞作用机制；最后，本文还评估了将表观遗传学疗法与现有抗癌治疗手段联用的价值。

人体内每一个有核的细胞都含有遗传物质DNA。这些DNA展开后长达2 m，但是在细胞核内，它们却被压缩到不到10 μ m。这些被高度压缩的DNA就是我们常说的染色质（chromatin），这是由DNA与组蛋白结合而成的高分子复合体，其中组蛋白就是整个人体基因组折叠的支架结构，（图1）。在染色质中，高度重复的基本单元结构就是核小体（nucleosome），这是一个由4个H3组蛋白和4个H4组蛋白组成的八聚体结构，其中还插入了由H2A/H2B组蛋白组成的二聚体结构。每一个核小体上缠绕了大约150bp的DNA链。连接组蛋白（linker histones）和其它的染色质结构辅因子（chromatin architectural cofactors）让染色质进一步压缩，最后形成更高级的染色质结构。有多种因素可以对染色质的局部结构和整体结构进行调控，但其中最具有影响力的调控就得算DNA与组蛋白的共价修饰作用（covalent modification）了。一般来

说，表观遗传学指的是与DNA序列无关的遗传性状。但是最近，表观遗传学又被用到了染色质生物学（chromatin biology）研究领域，而在本文，表观遗传学将有更宽泛的意义。

科学家们已经知道，染色质修饰（即表观遗传学修饰）在所有以DNA为模板的生化过程（包括DNA转录、修复和复制等）的调控机制中都起到了重要的指导作用。而且所有这些表观遗传学修饰作用都是动态变化的（图1），既可以添加某种修饰物，也可以去除这些修饰物，同时整个动态修饰过程也受到了高度调控。其中最重要的一点就是，在很多表观遗传学调控因子（epigenetic regulators）上都有特定的结构域，从而让这些调控因子可以识别染色质修饰物，并且与它们结合，进而发挥相应的作用（图1）。

对DNA转录、修复和复制过程的精准调控作用还会受到每一个有功能的染色质复合体（functional chromatin complexes）主要组

分的更进一步的精确调控。比如，多梳蛋白（polycomb group protein, PcG protein）就是一种高度保守的、必需的、多细胞生物转录抑制因子，PRC1和PRC2这类大分子复合体里都存在这些蛋白。进化的压力使得多梳蛋白编码基因得到进一步的扩展，比如果蝇基因组中仅有15个多梳蛋白编码基因，但是在哺乳动物的基因组里，就增加到了接近40个。经典的

PRC1复合体由四个核心组分构成，它们分别是PCGF、CBX、RING和HPH蛋白家族的成员。其中CBX和PCGF等蛋白家族都有5至6个成员蛋白。在非经典的PRC1复合体里，也有这些经典的组分参与构成，不过同时也有其它的组分参与构成复合体。据科学家们估计，在哺乳动物体内，大约存在180种不同的PRC1复合体。

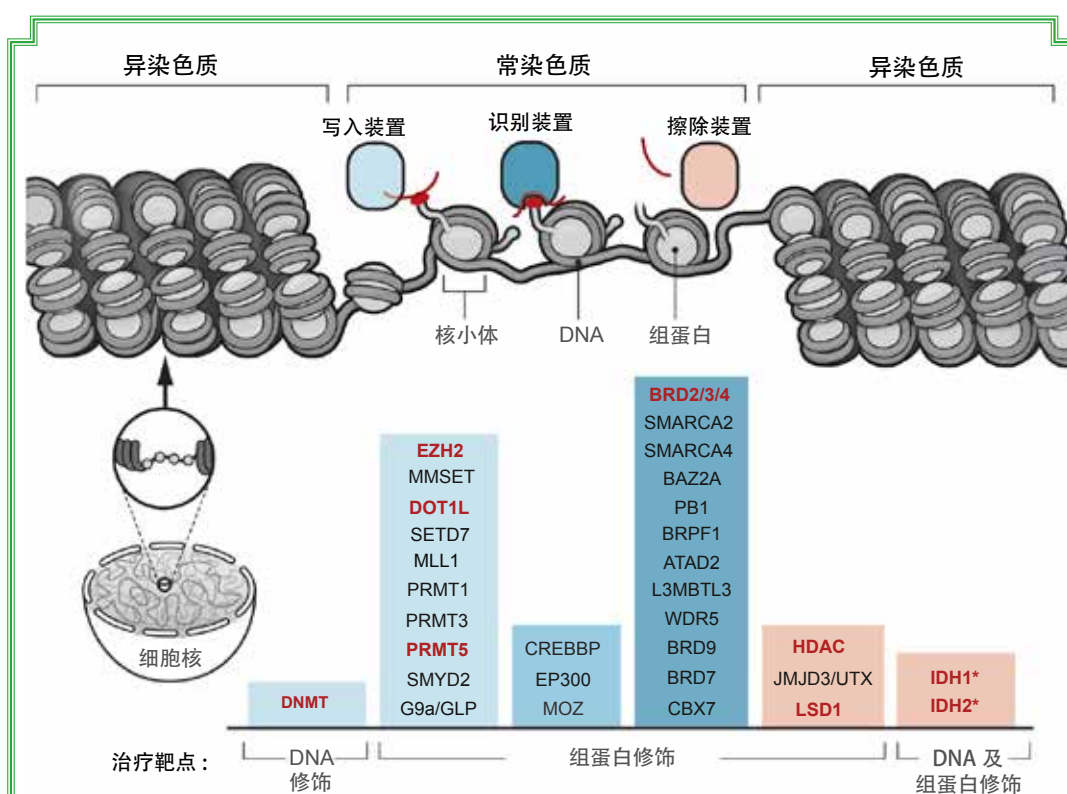


图1 现有的及新兴的表观遗传学治疗策略简介。染色质主要以打开的、松弛的常染色质和高度压缩的异染色质这两种形式存在。常染色质可以进行DNA转录，而异染色质不可以。染色质究竟处于何种状态，主要由染色质的修饰作用决定，比如甲基化修饰（methylation）和乙酰化修饰（acetylation）。表观遗传学写入装置可以让染色质发生上述修饰，而表观遗传学识别装置可以识别染色质的修饰状态，最后表观遗传学擦除装置则可以去除染色质上的修饰作用。很多表观遗传学蛋白质都具有多个功能结构域，因此可以同时具备表观遗传学写入、识别和擦除等多重作用。目前科研人员已经开发出了越来越多的小分子药物，它们能够与这些表观遗传学调控装置发生相互作用。图中红色表示的就是目前已经进入临床，或者已经在开展临床试验的表观遗传学靶向药物的作用靶点。用星号标注的IDH1和IDH2虽然不是表观遗传学蛋白，但如果它们发生突变，则能够极大地影响DNA甲基化修饰擦除装置和组蛋白甲基化擦除装置的作用。IDH1及IDH2蛋白抑制剂能够降低癌代谢物（oncometabolite）2HG的水平，并减轻对这些表观遗传学擦除装置的抑制作用。

这些PRC1复合体还仅仅只是参与了染色质结构与功能调控作用的表观遗传学蛋白质复合体的冰山一角。表观遗传学调控机制拥有如此的复杂性，这不仅是一个让科研人员们感到好奇的现象，更重要的是，这也是细胞自我更新和遗传的重要调控机制。比如，含有CBX7蛋白的PRC1复合体对于维持造血干细胞的自我更新能力（self-renewal capacity）就具有十分重要的意义，它同时也能够维持胚胎干细胞（embryonic stem cell）的多向分化潜能（pluripotency）。含有CBX2、CBX4或CBX8蛋白组分的PRC1复合体则对于上述这些细胞的分化具有重要的意义。

长非编码RNA（Long noncoding RNA, lncRNA）也在表观遗传学调控机制中扮演了

十分重要的角色，它同时还参与了DNA的转录调控过程。这些RNA分子可能起到了分子骨架（molecular scaffold）的作用，为表观遗传学复合体提供指引；同时也可能起到“诱饵”的作用，将表观遗传学复合体和转录因子引诱到其它地方，远离染色质模板。lncRNA的表达具有非常明显的组织特异性，而且在细胞谱系遗传和自我更新方面也起到了重要的作用。鉴于科研人员们不断认识到在正常细胞和肿瘤细胞内，以及包括lncRNA在内的非编码RNA分子在染色质调控方面的作用，使其也成为了一个新兴的热点研究领域。最近已经有人针对这个领域做了专门的综述，因此本文将不再赘述。

肿瘤细胞里的表观遗传学变异

近十年来，通过对人体肿瘤基因组进行全面分析已经发现，在很多不同的肿瘤细胞里，涉及基因表达、DNA修复和DNA复制等过程的表观遗传学调控装置都发生了突变。在肿瘤细胞内，表观遗传学写入装置（writers）、识别装置（readers）、擦除装置（erasers），以及一些染色质重构复合体的组分蛋白发生突变的情况比比皆是，不发生突变的情况极为少见。据估计，在所有类型的肿瘤细胞中，SWI/SNF染色质重构复合体的突变率超过了20%。而SWI/SNF染色质重构复合体仅仅是100多种可能发生突变的、具备表观遗传学调控作用的染色质修饰复合体中的一种。再加上我们已经观察到的，大量与细胞恶变进展及阻滞作用有关的组蛋白突变（oncohistones）情况，我们可以相信，表观遗传学调控作用异常，对于肿瘤的发生和发展起到了十分重要的作用。

那么，为什么在肿瘤细胞内，这些表观遗传学调控装置的编码基因突变的几率会这么高呢？我们知道，染色质是各种细胞作用

的综合平台，也是细胞内各种不同信号通路的集散地。因此，如果表观遗传学调控装置发生了突变，那就为肿瘤细胞提供了极大的方便，能够重新改写整个DNA转录过程，使肿瘤细胞迅速地适应各种环境生长压力，以及抗癌药物的杀灭压力。人体的每一个细胞内，全都拥有一套完整的、一模一样的基因组，但是各个不同的细胞不论在形态、还是在功能上，又都各不相同。这说明，不同的细胞之间完全是可以相互转换的。人体组织的发育过程也往往被描绘成从多向分化潜能干细胞向祖细胞，直至终末细胞的单向分化模式。不过Gurdon和Yamanaka等人的工作也早就证明，细胞去分化（dedifferentiation）和转分化（transdifferentiation）是完全可行的，而且都是由表观遗传学调控装置来介导的。实际上，上皮细胞-间充质细胞间的表型转换（epithelial-mesenchymal transition, EMT）是组织正常发育，以及组织稳态维持的必要前提。由于EMT过程使细胞具有了迁移和侵入的

能力，所以EMT过程也是很多肿瘤细胞具有的一大特征和标志。而这些肿瘤EMT过程的背后，也伴随着表观遗传学调控装置的突变。

在分子层面，这些细胞的转换过程主要受到转录因子和表观遗传学调控因子（epigenetic regulator）共同调控。组蛋白及DNA修饰的多样性和丰富性使得这套表观遗传学调控装置有了极大的复杂性，能够对细胞内的转录机制进行非常精细的调控。这些染色质修饰作用（包括乙酰化、甲基化和磷酸化等修饰作用）都不是固定的、也不是一成不变的，而是会根据细胞的实时状态动态变化。值得注意的是，能够激活或者抑制转录过程的染色质修饰并不一定是完全不同的染色质修饰，比如“双功结构域（bivalent domain）”就能在正常细胞和恶变细胞里调控基因转录。最初，我们在胚胎干细胞里发现，有些基因的启动子就是双功启动子（bivalent promoter），

该启动子既能够与具备基因转录激活功能的H3K4me3组蛋白修饰共存，也可以与具备基因转录抑制功能的H3K27me3组蛋白修饰共存。该启动子与肿瘤的发展有关，而且启动子内的CpG岛也存在DNA超甲基化修饰现象。与组蛋白H3K27甲基化修饰作用有关的多梳蛋白复合体，以及与组蛋白H3K4甲基化修饰作用有关的Trithorax (TrxG)复合体也主要以两种截然相反的方式来抑制或促进基因表达。这两种复合体的组分在肿瘤细胞内也是最常发生突变的。很多恶性肿瘤，比如B细胞淋巴瘤（B cell lymphomas）等肿瘤细胞内的多梳蛋白复合体EZH2蛋白组分，或者TrxG复合体MLL2蛋白组分都会发生突变。此外，CREBBP、EP300等组蛋白乙酰转移酶也都会发生突变。这说明，这些B细胞的转录过程如果出现问题，就会阻止细胞发育成熟，这就是导致细胞癌变的最主要原因。

表观遗传学调控异常与肿瘤发生之间的关系

我们知道，所谓肿瘤就是突变的癌前干细胞（premalignant stem cell）和癌前祖细胞（progenitor cell）的克隆性增殖过程。这些细胞还会进一步突变，进而演变出更具生长优势和增殖优势的肿瘤亚克隆，最终形成在临床上见到的恶性肿瘤。科研人员们已经在造血系统肿瘤里清楚地看到了这个演进过程。最近的研究成果表明，表观遗传学调控异常可能是导致肿瘤疯狂生长的首要因素。多个课题小组发现，在65岁以上的老年人群中，只有不到10%是由存在体细胞突变的造血细胞（包括造血干细胞和祖细胞）的克隆性造血过程来为人体提供大部分的血细胞。DNMT3A、TET2和ASXL1是三个最常见的，导致造血干细胞克隆性增殖的突变基因，而这三个基因编码的都是表观遗传学调控因子。这些突变使细胞在自

我更新能力上获得了更大的竞争优势，于是形成了突变细胞克隆。科研人员们目前还不清楚这背后的分子机制，但是已经发现，克隆性造血过程（clonal hematopoiesis）就是各种造血系统肿瘤的前期表现，其中就包括骨髓异常增殖综合症（myelodysplastic syndrome）、急性髓细胞白血病（acute myeloid leukemia, AML）等。除此之外，越来越多的证据表明，DNA从头甲基转移酶（de novo DNA methyltransferase）DNMT3A这种表观遗传学调控因子如果发生了突变，那么携带该突变基因的白血病癌前细胞就会对传统的化疗药物产生耐药性，这也就是白血病复发的机制之一。至于表观遗传学调控异常与其它类型肿瘤发生之间是否也存在这种关系，还需要开展进一步的研究来加以证实。

“暗物质（dark matter）”里的肿瘤突变能够影响染色质调控

今天，我们几乎已经完成了全外显子组的注释工作。结果发现，这才刚刚揭开了肿瘤基因组（cancer genome）的面纱。在基因组里，非编码调控区域（noncoding regulatory）又被称作暗物质区，这些区域的突变速度几乎要比基因编码区域快一倍。不过我们还不清楚，这些暗物质对肿瘤发生究竟有什么意义和作用。但是在很多肿瘤细胞内都发现，很多基因的启动子区域和增强子区域都存在突变的现象。最有名的一个例子就是在70%以上的黑色素瘤细胞内都发现，*TERT*基因的启动子发生了突变，而*TERT*基因编码的就是端粒酶催化亚单位。虽然我们都知道，肿瘤细胞内具有很高的端粒酶活性，但是在人体肿瘤基因组内，端粒酶编码基因发生突变的情况却并不常见。有意思的是，*TERT*基因启动子突变似乎增加了*TERT*酶的表达量，因为该启动子突变之后会形成一个ETS结合基序，帮助其与转录因子结合。

除了启动子突变之外，增强子上发生的突变也会对表观遗传学调控造成影响。AML患者如果发生了inv(3)(q21q26.2)或t(3;3)(q21;q26.2)等染色体转位（Chromosomal translocations）突变，那么预后就会很差，这其中一部分因素就是因为*EVII*原癌基因异常持续表达。后续的研究又发现，这种染色体转位突变使得原本位于远处的*GATA2*转录因子的增强子改变了位置，结果使得*GATA2*基因的表达量下降，同时还为*EVII*基因提供

了一个异位活化（ectopically activates）的超强增强子（superenhancer）。这些“超强增强子”指的就是能够与转录共激活因子（transcriptional coactivator），以及其它转录装置组分高强度结合的DNA调控单元。在每一个细胞内，都存在好几百个超强增强子，它们可以对能够决定细胞命运的基因，或者促使肿瘤发生、发展的基因起到调控作用。恶性的超强增强子，以及与之相配套的高水平的转录共激活因子都是表观遗传学治疗药物的绝佳作用靶点。在T细胞急性淋巴细胞白血病（T cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL）患者体内也发现了这种恶性的超强增强子，这些增强子因为发生了体细胞突变，所以产生了一个可以与MYB转录因子结合的位点，而MYB转录因子就正是激活*TAL1*癌基因的转录因子。

超强增强子也可能是一种遗传性肿瘤高危风险因素。rs2168101 G>T单核苷酸多态性（single-nucleotide polymorphism, SNP）与神经母细胞瘤（neuroblastoma）之间的关系就证明了有一个超强增强子对*LMO1*癌基因的表达起到了调控作用。在该SNP位点为G核苷酸时，该超强增强子内部就形成了一个保守的*GATA3*结合位点，导致*LMO1*癌基因大量表达。这些发现说明，（i）某些肿瘤的形成都与先天或者后天的突变有关，这些突变导致细胞内形成了新的调控元件，促使原癌基因激活；（ii）表观遗传学治疗可能为干预这些新的调控元件提供了一个新的途径和渠道。

肿瘤代谢组学对肿瘤表观基因组学的影响

多种人类肿瘤，尤其是神经胶质瘤（gliomas）和急性髓细胞白血病都存在异柠檬酸脱氢酶（isocitrate dehydrogenase, IDH）突变的情况。这些突变使得IDH酶有了新的酶活性，最终让细胞内的癌代谢产物2羟

基戊二酸二乙酯（2-hydroxyglutarate, 2HG）大量堆积。野生型的IDH能够将异柠檬酸转换成 α 酮戊二酸（ α ketoglutarate, α KG），而这些突变的IDH则会进一步将 α KG转换成2HG的D型镜像异构体（D-enantiomer）。

表观遗传学调控因子举例

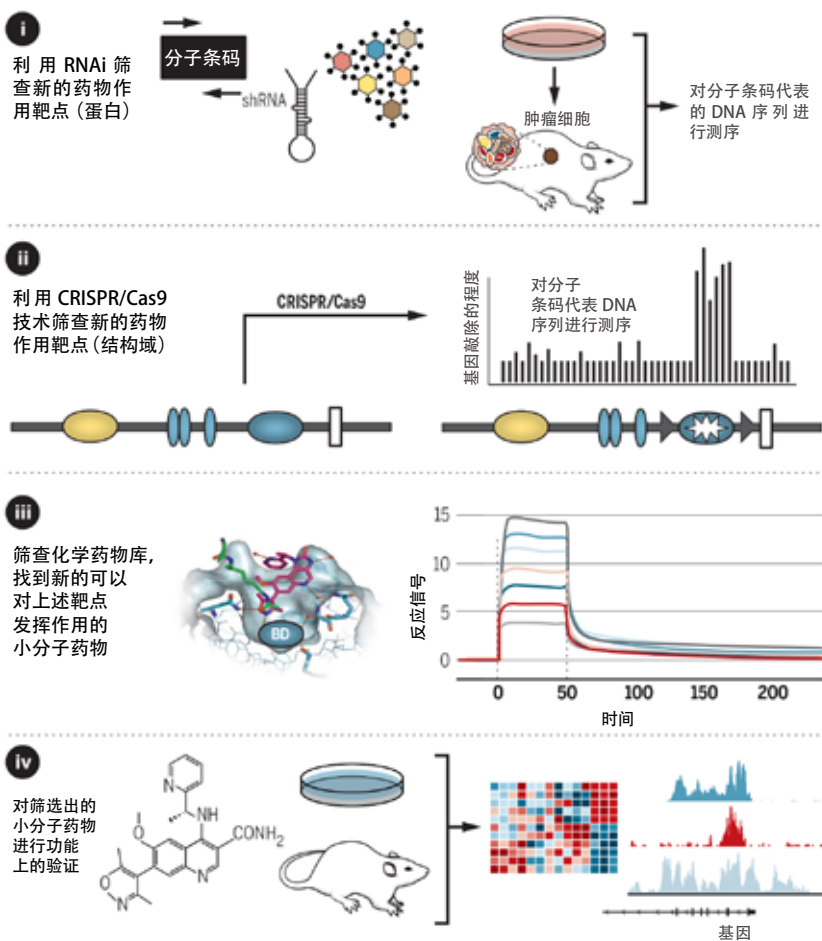
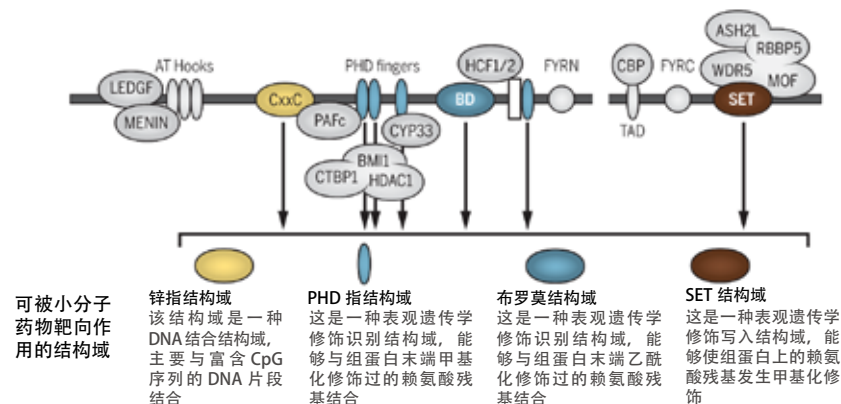


图 2 发现新的表观遗传学治疗药物。上图简要地介绍了表观遗传学治疗药物的开发流程。首先，研究人员利用 RNAi 技术，对肿瘤细胞进行体外和体内实验，以干扰候选的表观遗传学调控因子，从而查看是否会让细胞的表型产生相应的改变。其中最大的困难就在于，大多数表观遗传学调控因子上都有多个不同的功能结构域，这也就意味着都存在多个药物作用靶点，如图中举例的 MLL1 所示，既存在表观遗传学修饰识别结构域，也存在表观遗传学修饰写入结构域。利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术可以进一步精确地确定靶点结构域，因为该技术可以模拟出基因敲除的表型。如果能够开发出可以抑制某个结构域的小分子药物，那么接下来，就可以在体外利用细胞和分子生物学实验，以及肿瘤动物模型体内实验对该药物进行功能学验证了。

细胞内大量堆积的2HG似乎就是IDH酶突变细胞病变的最主要因素，这是因为，2HG是依赖二价铁离子和2-氧戊二酸的双加氧酶（Fe(II)-dependent and 2-oxoglutarate (2OG)-dependent dioxygenases）的竞争性抑制剂。诸如与DNA去甲基化作用有关的TET（ten-eleven translocation）家族蛋白，以及与组蛋白去甲基化有关的JumonjiC结构域蛋白等表观遗传学调控因子，它们的染色体催化活性都会受到高浓度2HG的影响。除了IDH突变之外，琥珀酸脱氢酶（succinate dehydrogenase, SDH）、延胡索酸水合酶（fumarate hydratase, FH）等三羧酸循环（tricarboxylic acid cycle）关键酶的突变也都与肿瘤有关。这些突变似乎可以促使肿瘤基因组DNA中的CpG岛发生超甲基化修饰（CpG island hypermethylation phenotype, CIMP）。这些CIMP最终会使染色体正常的拓扑结构被破坏，形成顺势调控元件（cis-

regulatory element）与癌基因异常并排排列（juxtaposition）的现象。CIMP似乎也是EMT表型的分子基础，而EMT表型就是缺乏延胡索酸水合酶的肿瘤细胞恶性侵袭的作用机制。

肿瘤代谢组与肿瘤表观基因组之间这种“互惠互利”式的相互作用，要比前面提到的三羧酸循环酶突变现象常见得多。现在已经清楚，细胞内的营养成分水平可以调节关键代谢途径之间的动态相互作用，而这些代谢途径又可以为染色质翻译后修饰（比如组蛋白甲基化修饰、DNA甲基化修饰、组蛋白乙酰化修饰、O-GlcNAc转移酶催化的O-GlcNAc糖基化修饰等）提供各种底物。因此，肿瘤代谢组学对肿瘤表观基因组学的影响也成了个发展迅速的研究方向。通过这方面的研究，我们极有可能发现肿瘤细胞内表观遗传异常调控作用的相关机制，从而发现新的抗癌治疗途径。

表观遗传治疗

研究发现，在肿瘤细胞内，许多标志性事件都会受到表观遗传调控机制的影响，这就引起了很多科学家、临床医生，以及制药企业研发人员的极大兴趣，大家都希望找到能够调控肿瘤表观基因组学的好办法。鉴于此，科研人员陆续开展了大量的药物筛查工作，希望找到能够抑制表观遗传学修饰写入因子、读取因子、擦除因子，以及染色质重构因子的小分子药物（图1）。与此同时，也有很多研究人员在探究和肿瘤无关的表观遗传学调控因子与人体其它疾病之间的关系。

目前，发展得最为成熟的表观遗传学抗癌治疗药物就是DNA低甲基化药物（DNA hypomethylating agent，又名DNA甲基转移酶抑制剂（DNA methyltransferase inhibitor, DNMTi））和组蛋白脱乙酰基酶抑制剂

（histone deacetylase (HDAC) inhibitor）。在肿瘤细胞中，CpG中胞嘧啶上5碳（5mC）处的DNA甲基化修饰可能就是最容易识别的染色质修饰。有明确的证据证明，多种肿瘤细胞都存在广泛的DNA甲基化修饰异常现象，而这些异常修饰又与抑癌基因被抑制、普遍的染色质结构异常，以及基因组内可转位元件（transposable element）的抑制被解除有关。尤其值得一提的是，儿童室管膜瘤（pediatric ependymoma）患者可以仅凭DNA甲基化修饰的改变（而不需要参考体细胞DNA突变的信息），来准确地判断他们的预后。虽然全基因组DNA甲基化修饰图谱已经被用于各种肿瘤的分类和预后判断等工作，但是迄今为止，这种分类方法在临床治疗上还是没有发挥太大的作用，比如不会根据这

种分类方法来决定是否给患者使用氮杂胞苷（azacitidine）或地西他滨（decitabine）等DNA甲基转移酶抑制剂类药物。

因此可以说，氮杂胞苷是最成功的一款表观遗传学治疗药物。它可以改变骨髓异常增殖综合症（myelodysplastic syndromes, MDS）的自然病程。但是关于该药的作用机制，目前尚存在争议。氮杂胞苷可以让肿瘤细胞内非正常沉默的基因重新活化，但是现在还没有找到相应的分子标志物（基因特异性的信号）来指导我们如何对骨髓异常增殖综合症患者，或者其他肿瘤患者使用氮杂胞苷这种药物。此外，虽然我们对氮杂胞苷的了解都主要集中在它对DNA低甲基化修饰的作用上，但是我们也知道，这种核苷酸类似物同样会掺入到RNA链中，进而明显地改变RNA和蛋白质的代谢。最近的研究发现表明，DNA甲基转移酶抑制剂类药物可以激活细胞内源性的逆转录病毒元件（retroviral element），从而产生一种细胞固有的免疫激活刺激信号，这也可能与其抗癌作用有关。这也为表观遗传学治疗开辟了一条新的道路，即好好利用表观遗传学调控机制与机体免疫系统之间的相互作用，来达到抗癌治疗的目的。

近几年来，我们已经开发出了很多种表观遗传学治疗药物。比如BET蛋白（bromodomain and extraterminal protein）抑制剂、赖氨酸特异性组蛋白去甲基酶1（lysine-specific histone demethylase-1, LSD1）抑制剂、突变的IDH1/IDH2抑制剂、EZH2（enhancer of zeste 2）抑制剂、精氨酸蛋白甲基转移酶5（protein arginine methyltransferase 5, PRMT5）抑制剂和端粒沉默破坏因子1样蛋白（disruptor of telomeric silencing-1-like, DOT1L）抑制剂等。目前所有这些药物都已经进入了临床试验（图1）。虽然最终的实验数据还在收集整理中，但是我们已经从中获得了很多有益的信息。

有一些表观遗传学药物已经被用于治疗某些特异性的体细胞突变（这些突变被认为就是细胞癌变的主要原因）肿瘤。比如，用BET抑制剂来治疗罕见的睾丸核蛋白中线癌（nuclear protein in testis midline carcinoma, NMC）。这种患者体内存在异常的BRD4-NUT融合蛋白，或更罕见的BRD3-NUT融合蛋白。同样地，在淋巴瘤患者体内也存在EZH2突变现象，而在神经胶质瘤患者和急性粒细胞白血病患者体内存在IDH1和IDH2突变现象。这些现象都说明，我们可以针对这些突变的靶点来治疗这些肿瘤。比如针对突变的IDH，用于治疗急性粒细胞白血病的药物，就已经在早期临床试验里获得了不错的效果。最近取得的1期临床试验（单药治疗）结果表明，40%的患者都取得了不错的疗效，而且病情完全缓解率也达到了20%。由于参与实验的急性粒细胞白血病患者都是之前已经经过了大量的临床常规治疗，但病情依旧得不到良好控制的难治性患者，或者复发的患者，所以这个1期试验结果还是非常让人兴奋的。

表观遗传学药物也被用于靶向治疗具有非癌基因表观遗传学依赖性（non-oncogene epigenetic dependency）的肿瘤。比如，直接靶向DOT1L这类特定表观遗传学修饰写入因子、BET这类特定表观遗传学修饰读取因子，或者LSD1这类特定表观遗传学修饰擦除因子的药物，其实并非靶向肿瘤细胞内的体细胞突变蛋白，这和我们常说的靶向抗癌药物是完全不同的。这类表观遗传学药物主要用于治疗急性粒细胞白血病这类对恶性转录因子有依赖的肿瘤。由于这些表观遗传学调控因子在各种细胞中普遍都有表达，因此这类药物都存在一个治疗窗（therapeutic window）。如果这些表观遗传学调控因子在正常细胞内表达量都比较稳定，但是在肿瘤细胞内都大量表达，那么就可以使用这类药物。尽管一开始，大家都担心针对这些普遍表达的细胞必需蛋白可能会带来

副作用，不过就目前已经获得的数据来看，患者对这类表观遗传学药物的耐受性还是挺不错的，而且单药使用时都可以达到15%的起效率，甚至有些患者还获得了临床完全缓解的治疗效果。这些临床试验结果既让我们兴奋，又让我们感到迷惑。比如，给有MLL融合蛋白表达的白血病患者使用DOT1L抑制剂药物治疗是完全合理的，是有充分的分子作用机制基础的，而且在临床前动物模型试验里也取得了很不错的治疗效果。可是到了人体临床试验却发现，疗效并没有我们想象中的那么好。参与临床试验的患者一共34名，但只有两名患者起效。用BET抑制剂治疗急性粒细胞白血病患者也存在同样的情况。这背后的原因，我们现在还不清楚，也不知道应该使用哪种分子标志物来预测治疗效果。

这种临床前试验结果与临床试验结果不一致的现象也暴露出几个问题。首先，我们使用的临床前动物模型可能不合适。其次，我们在临床前试验工作中对小分子药物活性的鉴别和了解不够深入。在评价一款小分子药物时，最理想的情况应该是能够看到这种药物在细胞内的定位，以明确它们在细胞内所结合的靶标。对于表观遗传学药物来说，我们还需要明确它们在基因组内与染色质结合的情况。如果这些药物进入了临床前试验，开始做动物实验了，那么我们还需要了解是否有特定的组织累积效应。对于抗癌治疗而言，我们还需要了解这些药物在同一组织里的肿瘤细胞内和正常细胞内的分布情况。因此，科研人员们还需要采用更新的化学手段、动物模型，以及实验策略，来解决上述问题。

肿瘤异质性（Tumor heterogeneity）与转录可塑性（transcriptional plasticity）问题

很多恶性肿瘤都存在一个共同的现象，即一个肿瘤组织内存在多个不同的亚克隆群体，这些亚克隆不论在遗传学上，还是在功能上都有很多差异。这种肿瘤异质性（tumor heterogeneity）现象也可能是非遗传机制导致的。正常的细胞分化给我们认识肿瘤异质性现象提供了很好的例子。任何一个组织都是由在遗传学上完全一样，但是在表型和功能上却又各不相同的多种不同细胞共同组成的。细胞在多种内在和外在因素的共同作用下，在细胞的自我更新能力与分化能力之间达成了一个巧妙的平衡。肿瘤组织也是一样，在肿瘤组织内，既存在我们称之为肿瘤干细胞（cancer stem cell，这种细胞与肿瘤的发生和维持有关）的一群细胞，也存在寿命较短且不能自我增殖的其它肿瘤细胞。可是这些细胞在遗传学背景上都完全一样，那么它们在功能和表型上的差异，就极有可能是由于表观遗传调控因子对基因转录的调控作用，使得这些转录作用有所差

异而导致的了。

表观遗传学异质性的动态可变程度要远远超过遗传学异质性。我们认为，转录机制的可塑性就极有可能是表观遗传学调控因子的作用，只有这样，肿瘤细胞才能在各种环境因素和抗癌药物的作用下“侥幸”逃生。还有一种理论认为，抗癌治疗失败也是肿瘤干细胞对环境适应之后的一种结果。最近的临床前研究发现，正是因为存在一个白血病干细胞亚克隆，所以急性粒细胞白血病患者对表观遗传学治疗产生了耐药性，这也是对上述假设的一种证实。这个耐药模型并非在遗传学上发生了改变，只不过是转录层面上发生了改变，这也是最近在肿瘤生物学领域里非常热门的一个新兴研究方向，即研究肿瘤对表观遗传学药物的耐药机制。

虽然这些研究工作解决了一些关键性的问题，但同时也发现了一些新的问题。为什么有一些白血病干细胞对表观遗传学药物治疗敏

感，而另外一些白血病干细胞却不敏感呢？是什么因素导致转录机制发生了改变？在不同的组织中，这种适应性反应都是一样的吗？虽然存在这些问题，不过这种肿瘤对表观遗传学药物的耐药现象也可能催生出了一些新的治疗机会。在没有发生看门基因突变或遗传学进化的情况下，表观遗传学抗癌药物对各种不同肿瘤细胞亚克隆的压力也在客观上形成了一个瓶

颈，使得各个亚克隆承受的压力有所平均，因为这些压力促使肿瘤干细胞调用了另外的转录机制，来维持自身的生长。虽然这种适应性反应很有可能与细胞自身有关，但我们也可以预测这种适应性反应，所以也就可以利用这种适应性反应，比如协同致死效应（**synthetic lethal**）。

联合治疗策略

通常，我们在抗癌工作中都会选择联合治疗方案。临床上对更好的联合治疗方案更是有迫切的需要，当然，也有一些非常重要的经验和教训需要注意。由于正常的表观遗传学调控作用和异常的表观遗传学调控作用都与细胞自身密切相关，因此，凭经验来制定会明显改变表观基因组的联合用药方案可能就是有害的。比如，单独使用**DNA**甲基转移酶抑制剂药物能够延长很多骨髓异常增生综合症患者的生命，单独使用组蛋白脱乙酰基酶抑制剂也可以获得类似的效果。可是如果将这两种药物联合使

用，不仅收不到任何的协同作用，反而还出现了拮抗作用，患者的预后反而更差了。这些情况表明，我们需要从分子机制上仔细思考，如何才能制定出最佳的联合用药方案，同时也必须开展人体肿瘤原代肿瘤细胞试验、临床前试验和临床试验，以验证这些联合用药方案的效果。包括**BET**抑制剂与端粒沉默破坏因子1样蛋白抑制剂联合用药方案、**IDH**抑制剂与**BCL2**抑制剂联合用药方案（此处利用了协同致死效应）在内的多个联合用药方案都是根据上述策略制定出来的，而且也都将开展临床测试。

开发新的表观遗传学药物

现在，大家对开发能够有效调控肿瘤表观基因组的小分子药物都产生了浓厚的兴趣。可是目前，大家都还没有一个清晰的概念，不知道该如何开发这种药物。很多表观遗传学药物的开发工作都是从这个化学药物可能会起到什么作用的思维角度来考虑的，而不是从我们需要开发什么样的药物这个角度来思考的。为了解决这个问题，很多科研工作者都采用了遗传筛查（**genetic screens**）方法，来寻找新的靶标。虽然究竟是采用**CRISPR/Cas9**技术来做基因敲除比较好，还是采用**RNAi**技术来做基因敲除比较好都不是本文讨论的重点，不过

我们还是需要向读者介绍几个与此相关的、需要关注的重点。首先，很多表观遗传蛋白因子都参与构成了复合体，并且在不同的复合体中也发挥了相应的作用，它们既可能发挥催化作用，也可能发挥靶向作用，或者起到支持作用。因此，虽然只是敲除一个表观遗传蛋白因子，也有可能影响整个复合体的功能，所以我们通过这种基因敲除筛查策略发现的所谓“靶点”可能并不是真正的靶点。第二，在一个表观遗传蛋白因子上也可以存在多个不同的功能结构域（图2）。其中很多结构域都能够与**DNA**或者组蛋白翻译后修饰物结合；还有

一些结构域具有催化活性，它们可以行使表观遗传学修饰写入功能，也可以发挥表观遗传学修饰擦除功能。这一点也非常重要，因为每一个结构域都在表观遗传学调控机制中发挥了各自独特的功能。因此，明确每一个结构域的功能，以及这些结构域对表型的作用，是我们成功开发表观遗传学药物的基础。最近人们发现，使用基因组编辑（genome editing）技术

确定蛋白质结构域，是一个不错的药物开发策略。首先，我们可以根据表观遗传修饰写入因子、读取因子和擦除因子结构域的编码序列设计出相应的向导RNA，然后引入突变，来明确这些结构域的功能。未来，将这些药物开发策略与更精密的肿瘤模型技术相结合，才是最佳的表观遗传学药物开发策略（图2）。

总结与展望

现在，我们已经认识到，表观遗传学调控作用在肿瘤的发生和发展过程中起到了关键性的作用，而且可以成为抗癌治疗的作用靶点，这也为抗癌治疗提供了新的思路 and 机会。迄今为止，我们已经在肿瘤复发，或者传统化疗治疗失败的的患者人群中进行了早期临床试验，来验证这些表观遗传学抗癌药物的功效。经过一段时间的单药治疗，其中有一些患者已经达到了临床完全缓解的标准，这也让我们看到了表观遗传学抗癌药物的希望。不过表观遗传学抗癌药物也不可能是包治百病的神药。因此，我们还将继续开发效果更好的联合用药策略。即便是急性粒细胞白血病这种恶性程度非常高的、治愈难度非常大的肿瘤，采用联合化疗方案（比如两种细胞毒性药物联合使用）也是非常有效的，也可以获得临床完全缓解的治疗效果。问题在于，如何维持疗效，如何避免肿瘤复发，如何彻底清除肿瘤干细胞。研究发现，表观遗传调控因子的突变往往是细胞恶变的早期事件，因此，以这些突变因子为靶点的

药物就有可能可以巩固化疗药物的疗效。表观遗传学药物还可以与协同致死效应结合。比如，临床前模型证实，含有SWI/SNF突变的肿瘤细胞对EZH2抑制剂更加敏感。

越来越多的证据显示，肿瘤表观遗传学与肿瘤免疫学之间也存在非常密切的相互依赖性。我们已经发现，表观遗传学药物可以引发抗癌免疫反应，还可以增强过继免疫治疗（adoptive immunotherapy）和免疫检查点抑制剂（immune checkpoint inhibitor）药物的功效。因此，研究人员也已经准备开展临床试验，来检验免疫治疗与表观遗传学药物联合方案的功效。虽然肿瘤细胞在各种抗癌压力下还是会不断的突变、进化，但随着我们对表观遗传学调控作用的认识不断加深，一定会找到更多的抗癌治疗新机会。随着科研人员们不断地以基于表观遗传学药物的联合治疗方案来改变肿瘤的自然病程，表观遗传学抗癌治疗领域的未来一定会一片光明。

2. PARP抑制剂类药物：协同致死效应在临床上的应用

PARP抑制剂（PARP inhibitors, PARPi）是一种针对多聚ADP核糖聚合酶（poly(ADP-ribose) polymerase）的抗癌药物，也是第一款被批准上市的，利用了科学家们在一个世纪之前就发现了的“协同致死效应（synthetic lethality, SL）”的药物。*BRCA1*或者*BRCA2* 基因生殖系突变（germline mutations）的肿瘤患者对PARPi药物极度敏感，因为这些患者体内的DNA修复机制存在先天性的缺陷。因此，PARPi药物对于其它DNA修复机制存在缺陷的肿瘤也同样应该有很好的治疗效果。不过，与其它靶向药物一样，很多晚期肿瘤患者对PARPi药物也有耐药性。而且，我们也很难制定一套包括PARPi药物在内的联合抗癌用药方案。然而无论如何，PARPi药物的临床前研究已经发现了SL效应，及其目前在临床上的应用情况，这些都让科学家对继续开发这类药物产生了浓厚的兴趣。下文将对这类药物，及其在临床上所能发挥的最大潜力做一个全面的介绍。

DNA损伤后修复是生物体的自然防御机制，如果损伤后的修复发生问题，就会出现DNA突变，进而导致肿瘤发生。凡是健康的细胞都有一整套机制，以防止DNA损伤给细胞带来不利影响。DNA损伤响应（DNA damage response, DDR）就是其中一种机制。DDR可以发现DNA损伤、暂停细胞周期，并启动DNA修复，从而最大限度地保证细胞基因组的完整性。DDR的核心是多聚ADP核糖（PAR）聚合酶1和2（PARP1 和PARP2）。这两种酶都能够感知DNA损伤，并能通过翻译后修饰途径（即给靶蛋白加上带负电的、分枝状多聚ADP核糖侧链修饰（PARylation））将损伤信号传递下去。PARP1能够与损伤DNA的单链DNA损伤末端（single-strand DNA break, SSB）以及其它DNA损伤（DNA lesions）位点结合，进而引起一系列变构效应，并激活自身催化结构域（图1）。由此进一步产生后续的靶蛋白翻译后修饰反应，招募XRCC1等DNA修复因子，及其它染色质结构重构因子，从而完成DNA损伤后修复。最后，PARP1也会对自己进行多聚ADP核糖侧链修饰（auto-PARylation）。这些带负电的侧链分子可能会

使PARP1从损伤的DNA位点上解离下来，终止修复反应（图1B）。

对PARP1 和PARP2 在DDR反应中作用的了解让科研人员们开发了小分子PARP1/2抑制剂类药物（PARPi）（图1C）。科学家们最开始的设想是，PARPi可以让肿瘤细胞对传统的化疗药物或放疗更加敏感，毕竟这些传统手段还是目前抗癌治疗中的主力军。研究人员通过传统疗法对肿瘤细胞的DNA造成损伤，然后再利用PARPi的力量破坏这些肿瘤细胞的DNA损伤修复机制，使其因为不能完成修复而死亡，从而达到抗癌治疗的目的。大约30年前，科研人员们发现，小分子烟酰胺类似物（nicotinamide analogs）具有抑制PARylation的作用，并且能够增强DNA损伤剂——硫酸二甲酯（dimethyl sulfate）的细胞毒性。后续的药物研发工作又进一步开发出了veliparib（Abbvie）、rucaparib（Pfizer/Clovis）、olaparib（KuDOS/AstraZeneca），及niraparib（Merck/Tesaro）等目前可用于临床的PARPi。最近，人们又联合推出了作用更强的第二代PARPi——talazoparib（Lead/Biomarin/

Medivation/Pfizer)。所有这些PARPi都能够与PARP1和PARP2的催化结构域内，与PARP酶辅因子—— β 烟碱酰胺腺嘌呤二核苷酸（ β nicotinamide adenine dinucleotide, β -NAD⁺）的结合位点发生相互作用，但是正如下文将会提到的那样，这些相互作用会因细胞毒性的浓度和在DNA上捕获PARP1能力的不同而有所差异。

这些携带了有害*BRCA1*和*BRCA2*基因生殖系突变杂合体的人罹患乳腺癌、卵巢癌和其它肿瘤的风险都有明显升高。因为在肿瘤发生的过程中，野生型*BRCA*等位基因会丢失，所以这些野生型基因被认为是典型的抑癌基因。*BRCA1*及*BRCA2*蛋白都通过同源重组修复（homologous recombination repair, HRR）过程对双链DNA断裂（double-strand DNA breaks, DSBs）发挥非常重要的作用。HRR就是以同源的正常DNA序列为模板，来修复损伤的DSB。鉴于此，HRR也是一种保真度非常高的修复机制。如果细胞内该修复机制出现了问题（比如因为*BRCA1*和*BRCA2*基因发生了突变），那么细胞内其它保真性没那么高的修复机制，比如非同源末端结合修复机制（nonhomologous end joining, NHEJ）就开始发挥作用。这些修复机制会将断裂的DSB末端不经修复地直接结合在一起，甚至还会将这些断裂的末端与临近的、同源的DNA片段相连，而将中间“多余的”DNA片段切除。也就是说，当细胞HRR出现问题，并转而使用NHEJ这些保真度不高的修复机制时，非常容易发生DNA突变，比如缺失突变，从而导致肿瘤的发生和发展。这也能够在一定程度上解释，为什么*BRCA1*和*BRCA2*基因发生了突变的人患癌风险更高。当然，*BRCA1*和*BRCA2*基因在染色质重构（chromatin remodeling）和转录调控（transcriptional regulation）等方面的作用，也可能与这些突变体携带者患癌风险升高有关。

2005年，有两个课题组报道称发现了

PARP抑制剂与*BRCA1*和*BRCA2*突变基因之间存在SL效应（图1A）。这也为我们治疗*BRCA*基因突变的肿瘤患者提供了一条新的治疗思路。早在一个世纪之前，遗传学家们就发现了SL效应，即两个基因中的任何一个基因发生突变，是不会对细胞造成非常大的影响的；但如果两个基因同时发生突变，那么就会导致细胞死亡。研究发现，与携带有野生型*BRCA*基因的细胞相比，*BRCA*突变肿瘤细胞对PARPi的敏感性会增加1000倍（具体数值会因所使用的PARPi及实验条件的不同而有所差异）。于是，科研人员们想到了用PARPi来治疗*BRCA*基因发生了突变的肿瘤患者。他们最初的设想是利用PARP抑制剂在肿瘤细胞内造成SSB，进而在细胞复制时形成DSB（因为在细胞复制时，DNA复制叉碰到SSB之后就会被破坏，形成DSB）。但事实上，研究发现一些PARPi（尤其是rucaparib、olaparib、niraparib和talazoparib）会将PARP1固定在DNA上，从而阻碍这些PARP1蛋白的autoPARylation反应，从而无法从DNA上解离下来（图1B和图1D）。可能某些PARPi就是通过这种方式固定住PARP1蛋白来发挥细胞毒性作用的，这类似于拓扑异构酶II（topoisomerase II）抑制剂类抗癌药物的作用机理。

不过如果按照这种理论，那么这些PARPi对缺乏PARP1蛋白的肿瘤细胞来说应该就没有毒性作用了。在临床上使用的各种PARPi对于PARP1蛋白的固定能力是不同的，比如talazoparib的固定能力就比niraparib强100倍，而niraparib的固定能力又比olaparib和rucaparib更强（图1C）。然而，veliparib似乎对PARP1蛋白没有什么固定能力，但是它具有抑制PARylation反应的作用（图1C）。这些PARPi在固定PARP1蛋白方面的差异，而不是抑制PARylation反应作用方面的差异，可能就是我们在*BRCA*基因突变细胞体外实验中预测这些PARPi细胞毒性作用的依据，比如talazoparib的细胞毒性作用就是最强的。

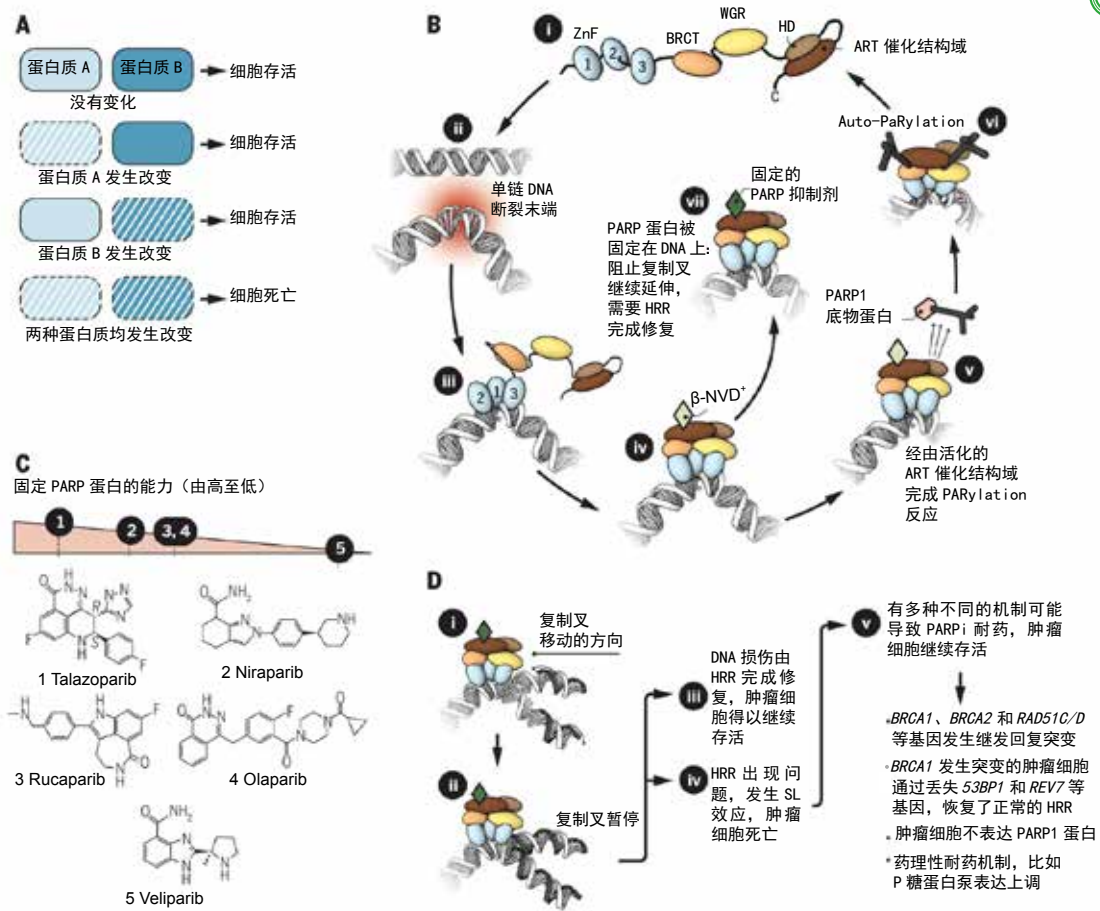


图1 PARPi作用机制。(A) SL效应简单图解。只有当A、B两个蛋白都发生突变时，细胞才会死亡，其中任何一个蛋白突变均不会导致细胞死亡。对于抗癌治疗而言，A代表癌基因、抑癌基因或致癌信号通路中的某一个基因；B代表当A出现问题之后的某一个抗癌治疗靶点。(B) 该模型解释了PARP1蛋白在细胞内的作用。(i) 在未与DNA结合时，PARP1蛋白以较松散的结构存在，我们称之为“串珠状”结构。图中展示了PARP1蛋白的各个结构域，比如ZnF1、2、3；BRCT；WGR；HD和ART催化等。此时，HD对整个PARP1蛋白起到了自身抑制的作用，以防止PARP1蛋白的ART结构域与其辅因子 β -NAD⁺结合。(ii) 双链DNA损伤之后，往往会形成单链损伤末端(SSB)。这些SSB会使正常的双螺旋方向发生反向改变。(iii) 这就为PARP1蛋白的ZnF结构域提供了一个DNA结合位点，ZnF1、2和3与DNA结合之后促使PARP1蛋白的各个结构域与DNA形成一个核蛋白复合结构(见iv)。这使PARP1蛋白因自身的抑制作用被取消而激活。(v) ART催化结构域促使PARP1蛋白的PARylation反应活性，对其底物蛋白进行修饰，招募DNA修复因子和染色质重构因子，以完成DNA修复。(vi) PARP1蛋白的自身PARylation作用促使其从DNA链上解离下来，重新成为松散的串珠状结构。(vii) 目前在临床上使用的几种PARPi都能够与PARP1蛋白的催化结构域结合，阻止其从DNA上解离，并将其固定在DNA损伤处，从而阻碍了PARP1蛋白发挥正常的作用。(C) 介绍了5种目前在临床上使用的PARPi的化学分子式，及其对PARP1蛋白的固定能力(这种固定能力可能与药物的细胞毒性作用有关)。(D) PARPi SL作用模式图。PARP1/DNA核蛋白复合体阻止了复制叉的正常行进过程。(i) 被固定在DNA上的PARP1蛋白处于复制叉行进方向的前方。(ii) 复制叉被固定在DNA上的PARP1蛋白阻碍，这往往会引发DNA损伤反应。(iii) 正常的抑癌因子——BRCA1和BRCA2蛋白在其中发挥了重要作用的HRR是细胞内保真度最高的DNA修复机制，该机制也可以使被PARPi终止的复制叉重新恢复。如果细胞的HRR出现了问题，那么细胞就会选择其它保真度较低的修复机制来完成DNA修复。(iv) 此时可能会导致大范围的DNA重排，引起细胞死亡，也可称之为发挥SL效应。(v) 即使细胞的HRR出现了问题，还是有可能出现PARPi耐药现象。这可能是由多种机制引起的。ZnF(zinc finger-related domains)：锌指蛋白相关结构域；BRCT(BRCA1 C-terminus domain)：BRCA1蛋白C末端结构域；WGR(tryptophan, glycine, arginine-rich domain)：富含色氨酸、甘氨酸和精氨酸的结构域；HD(helical domain)：双螺旋结构域。

我们在设计包括PARPi在内的联合用药方案时，需要考虑其对PARP1蛋白固定能力方面的差异，因为当与传统的细胞毒性抗癌药物联用时，这些因素也可能会给临床带来不可接受的毒性反应。PARP1和PARP2蛋白除了在DDR方面具有作用之外，在基因转录、细胞凋亡，以及免疫等方面也具有非常重要的作用。因此，在使用PARPi时，也需要考虑它在这几方面可能存在的作用。

与其它靶向治疗药物一样，大部分晚期肿瘤患者都存在PARPi耐药问题（图1D）。科研人员们通过体外实验（in vitro experimentation）发现了几条可能的PARPi耐药作用机制：53BP1或REV7这类DNA修复蛋白失活，使得HRR恢复正常；细胞内缺失维持复制叉稳定的某些蛋白，包括PARP1蛋白等，也会诱发PARPi耐药性；能恢复开放阅读框和重获HRR功能的BRCA1或BRCA2基因的继发性回复突变，也是导致这类药物耐药的可能机制。这也是到目前为止，唯一一种在临床上被验证了的PARPi耐药机制，而且这些继发性突变也是临床上肿瘤患者对铂剂类药物产生耐药性的机制。

与其它靶向治疗药物一样，PARPi对缺乏BRCA蛋白的肿瘤细胞带来的选择压力也是促使耐药克隆产生的原因，至少对于晚期肿瘤患者的确如此。因此，我们目前急需能够防止或延缓耐药性问题出现的新治疗策略。而且，由于某些机制既会导致患者出现PARPi耐药性，又会导致患者产生铂剂类药物耐药性，所以我们更加应该以谨慎的态度来使用PARPi。

BRCAness这个词被用来表示BRCA1基因或BRCA2基因非生殖系突变的癌症患者，这一大类患者都有共同的表型特征，尤其表现为HRR存在缺陷。比如，不论是BRCA1基因还是BRCA2基因，如果发生了体细胞突变，就会使细胞的HRR出现问题，或者至少会表现出部分BRCA1基因或BRCA2基因生殖系突变的

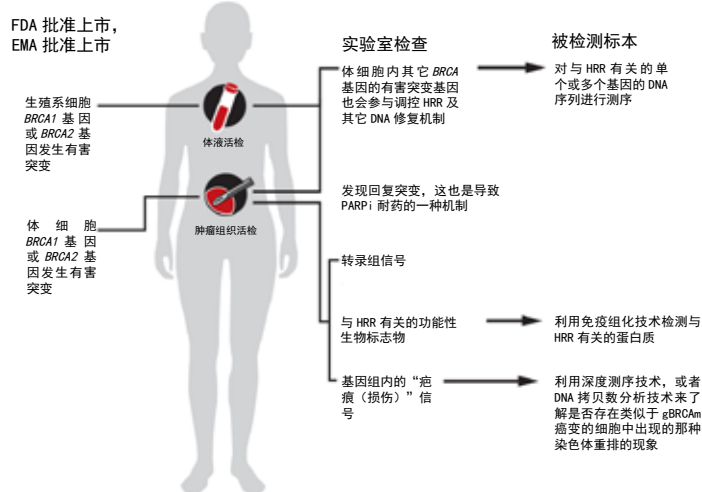
的表型特征。这也和BRCA1基因的启动子区域发生超甲基化修饰（hypermethylation），或者其它与DSB修复以及复制叉稳定性有关的基因发生突变的情况类似。由于细胞的HRR出现了问题，所以这些BRCAness肿瘤患者与BRCA1基因或BRCA2基因发生了生殖系突变的患者对药物的反应性是一样的，比如都对铂剂治疗敏感。就在我们发现BRCA1基因或者BRCA2基因突变的患者对PARPi非常敏感之后不久，科研人员们又陆续发现，ATM、ATR、PALB2以及FANC等与HRR有关的抑癌基因如果出现突变或者障碍，那么这些患者对PARPi也会非常敏感。大规模的肿瘤基因组测序研究也发现，大量的肿瘤都与涉及细胞HRR的基因发生体细胞突变有关。这些肿瘤尤其包括恶性程度较高的浆液性卵巢癌（high-grade serous ovarian cancer, HGSOVCa）、晚期前列腺癌、和胰腺癌等。因此，这些肿瘤患者可能都适用于PARPi。

科研人员们也在努力地寻找其它分子标志物，比如转录标志物和突变信号标志物（mutational signature），以帮助我们发现和确认BRCAness患者，及其他对PARPi敏感的患者。同时，对铂剂治疗的敏感性也可以帮助我们发现BRCAness患者，并预测这些患者对PARPi的敏感性。研究发现，BRCA1基因或BRCA2基因生殖系突变患者的肿瘤细胞基因组往往都会存在所谓的“突变疤痕（mutational “scar”）”，这是一种大规模的基因组重排（genomic rearrangements）突变，说明细胞的HRR出现了问题，所以只能利用保真度很低的其它修复机制来修复DNA损伤。同时我们也可以利用这些基因突变标志物，比如基因拷贝数或者突变疤痕等突变的种类信息，来发现BRCAness患者，并预测这些患者对PARPi或者铂剂类药物的敏感性。但究竟哪一种分子标志物的预测效果最好，我们目前还不是十分清楚。比如，虽然BRCAness患

者的突变疤痕可能反映了他们细胞内既往的突变及修复过程，但这还是无法准确地预测细胞目前的HRR是否正常，而这恰恰是决定使用PARPi能否起到良好抗癌功效的关键因素。虽然，对这些突变疤痕进行更进一步的检测（比如对多个肿瘤克隆的突变疤痕进行检测）可能会让我们的预测变得稍微准确一点，但是，更

加准确也更加直接的方法，还是应该对细胞的HRR能力进行判断，比如可以对参与DNA修复的RAD51等关键因子进行免疫定位，或者活性检测（图2A）。虽然目前这种检测策略还没有得到验证，但是将HRR功能标志物与突变疤痕等标志物结合起来，应该是帮助我们发现BRCAness患者的最佳方案。

可用于预测 PARPi 敏感性的生物标志物



临床评价 PARPi 的 SL 能力

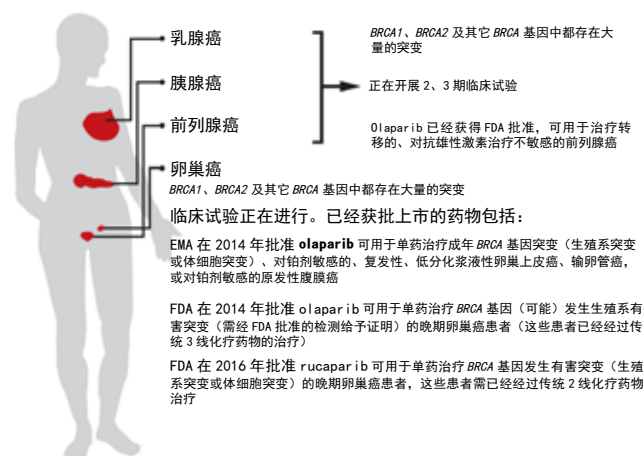


图 2 PARPi 的 SL 能力。（上图）预测 PARPi 敏感性的生物标志物。经过 FDA 或者欧洲药品监督管理局（EMA）批准的检测手段进行检测，来明确 *BRCA1* 基因或者 *BRCA2* 基因是否发生了（生殖系或体细胞）突变，这是目前预测 PARPi 敏感性的常规方法。实验性生物标志物是尚未获得上市批准的生物标志物，所以我们还不是很清楚它们的检测敏感性和特异性。这些标志物检测策略包括对与 PARPi 有关的 *BRCA* 基因进行测序，通过是否发现了突变来判断细胞 HRR 是否正常；通过了解染色体改变的方式及程度（往往在 *BRCA* 基因突变的肿瘤细胞内存在这些改变）来判断细胞 HRR 是否正常；通过对与 HRR 有关的关键蛋白质的检测来判断细胞对 PARPi 引起的 DNA 损伤的修复能力。（下图）临床评价 PARPi 的 SL 能力。绝大部分用于评价 PARPi 的 SL 能力的临床试验都将研究重点集中在几种 *BRCA1* 基因、*BRCA2* 基因或其它 *BRCA* 基因发生了有害突变的肿瘤上。FDA 及 EMA 等监管机构最近批准上市的几款 PARPi 也都是必须用于治疗 *BRCA1* 基因或 *BRCA2* 基因发生了有害突变（需经 FDA 等批准的检测给予证明）的卵巢癌患者。

PARPi的临床开发工作

PARPi最开始是被作为联合用药进入临床，并接受临床实验研究的。当时的用药方案是低剂量的rucaparib联合足量的DNA烷化剂（DNA alkylating agent）替莫唑胺（temozolomide）进行抗癌治疗。临床前的实验数据表明，只有当PARPi和BRCA突变基因同时存在的情况下，才能够发挥SL效应。因此才选择了BRCA1基因或BRCA2基因发生了生殖系突变的患者，参加olaparib的1期临床实验。该实验发现，63%的癌症患者获得了很好的治疗效果，这也证明了SL效应抗癌理论的正确性。不过有一些患者也表现出了剂量限制性的（dose-limiting）骨髓抑制作用（myelosuppression）和中枢神经系统方面的副作用，但是总体来看，olaparib的副作用要远远低于传统的化疗药物。后来，人们又进一步将实验的样本人数扩大到50人，这些患者都是妇科肿瘤患者，因为她们之前接受的铂剂治疗取得了不错的治疗效果。该实验结果也证实，对铂剂治疗敏感的患者，使用PARPi也会取得不错的治疗效果。后来开展的2期临床实验进一步将乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌和前列腺癌等多种肿瘤患者（都是BRCA1基因或BRCA2基因发生了生殖系突变的患者）纳入了实验人群，结果发现，使用olaparib治疗也取得了不错的治疗效果（图2B）。其中对卵巢癌患者的疗效已经达到了FDA的审批标准。因此，FDA也批准将olaparib治疗用于已经接受过3线（或以上）抗癌药物治疗的晚期卵巢癌患者（图2B）。

后续人们又开展了多项研究，希望能够在BRCAness肿瘤患者中看到同样良好的治疗效果。这些肿瘤包括高度恶性的卵巢癌（high-grade serous ovarian cancers, HGSOvCa）、三阴性乳腺癌（triple negative breast cancers, TNBC）和晚期前列腺癌等。对于HGSOvCa患者来说，使用olaparib可以

降低肿瘤的复发率（recurrence）；而对于之前已经接受过铂剂药物化疗的患者来说，若将olaparib作为肿瘤的维持治疗药物，则可以延长无进展生存期（progression-free survival, PFS）。基于这些实验结果，欧洲医药管理局（European Medicines Agency, EMA）批准将olaparib作为肿瘤的维持治疗药物，以治疗对铂剂敏感的、BRCA基因有突变的妇科肿瘤患者。相关肿瘤包括卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌。这些BRCA基因有突变的妇科肿瘤患者既包括BRCA基因生殖系突变（gBRCAm）患者，也包括体细胞突变（sBRCAm）患者（图2）。在那些对抗雄性激素治疗耐药的前列腺转移癌患者中也可以观察到这种与BRCAness有关的临床效果。比如在TO-PARP 2期临床实验里就发现，30%的患者都对olaparib治疗有反应，其中有一半患者的肿瘤细胞中能检测到BRCA2基因，或者ATM基因缺陷。不过olaparib对于三阴性乳腺癌（TNBC）患者的疗效就不太一样了。虽然其中有些BRCA1基因或BRCA2基因突变的患者使用olaparib治疗之后病情会稳定一段时间，但是不论是这两个基因发生突变，还是没发生突变的患者，使用olaparib治疗后疗效都不稳定。这说明，在TNBC患者中，BRCAness的情况不如在HGSOvCa患者人群中那么普遍。

继olaparib被批准可用于治疗卵巢癌之后，又公布了将niraparib作为卵巢癌维持治疗药物的3期临床实验结果。该临床实验将对铂剂敏感的、卵巢癌复发患者作为实验人群，根据是否存在gBRCAm将入选患者分成了两组。研究人员会对其中没有gBRCAm的患者做进一步检测，以查看他们体内是否存在BRCAness那样的“DNA疤痕”。与接受安慰剂组相比，那些接受了niraparib治疗的患者的PFS明显延长，而这种现象又在gBRCAm的患者中最为

明显。在没有gBRCAm的患者人群中也能够观察到这种现象，即接受了niraparib治疗的患者与安慰剂组相比，其PFS明显延长，而且这种现象在sBRCAm患者中更加明显。从降低疾病进展风险的治疗方法来看，这部分患者和gBRCAm患者非常类似。综上所述，与体内没有这些DNA疤痕的患者相比，体内存在BRCAness那样的“DNA疤痕”的患者在使用niraparib治疗之后，其PFS明显延长。不过我们还需要继续在更大规模的3期临床实验中验证“DNA疤痕”这个生物标志物预测患者对PARPi敏感性的能力。

最近，人们又发现将rucaparib作为肿瘤的维持治疗药物时，可以延长患者的PFS。在ARIEL 2的2期临床实验（NCT01891344）中，研究人员根据患者肿瘤细胞的基因组特征（其中也包括了DNA疤痕特征，主要检测的是基因组内的染色体杂合性丢失（chromosomal loss of heterozygosity, LOH）指标），将对铂剂治疗敏感的、高度恶性的卵巢癌患者分成了3组，分别是BRCA基因突变（包括gBRCAm和sBRCAm）患者，LOH程度较高的BRCA野生型患者，以及LOH程度较低的BRCA野生型患者。

实验发现，若将rucaparib作为维持治疗药物，那么BRCA基因突变患者的PFS时间最长，LOH程度较高的BRCA野生型患者次之，LOH程度较低的BRCA野生型患者最短。不过，虽然有一部分BRCA野生型患者对rucaparib治疗表现出了持续性反应（durable responses），但是这部分患者的比例还是远远低于我们的预期，这提示我们，还需要开展进一步的研究，以判断是否应该用PARPi，而不是传统化疗药（铂剂类药物）来治疗携带BRCA野生型的患者。研究人员在后续的3期临床实验ARIEL 3（NCT01968213）中将解决这个问题，也将进一步验证在ARIEL 2中看到的，不同LOH患者临床获益存在差异的结果。

此外，他们还将决定是否应该将全基因组范围内的异质性缺失指标（genome-wide loss of heterozygosity score）作为一个生物标志物，以在临床上评价BRCAness患者。上述临床研究结果与另外一个HGSOvCa 2期临床实验NCT01482715的结果一起，都将被提交给FDA，以判断是否可以将rucaparib用于治疗BRCA基因发生突变的、已经使用过两种或以上化疗药物的、晚期卵巢癌患者（图2B）。

另一方面，talazoparib也开始显露出临床治疗作用。最近的一项研究显示，13名BRCA1或BRCA2基因生殖系突变的早期乳腺癌患者在接受Talazoparib的新型辅助治疗（在化疗和手术前使用）两个月后，体内的肿瘤都有缩小。该研究目前已经将talazoparib辅助治疗的时间延长到了4至6个月。Rucaparib也已经开展了类似的研究工作。

事实上，现阶段就对PARPi下结论，还为时过早。我们还不能判断这类药物是否就是治疗某些癌症患者的最佳选择。因为现有的临床实验，不论从实验设计，还是实验人群上，都不足以帮助我们得出明确的结论。不过，随着各种不同PARPi在生物化学和细胞效应方面的差异逐渐被发现，科学家们也开始思考，应该如何在临床上选择使用不同的PARPi。比如，虽然talazoparib在体外实验中，以很低的剂量（在某个评价指标上比olaparib和rucaparib要低200）就能够很好地杀死BRCA基因突变的肿瘤细胞（这也与talazoparib固定PARP1蛋白的能力最强相吻合），但是从治疗比（therapeutic ratio）这个指标来看，用talazoparib、olaparib和rucaparib这3种PARPi治疗BRCA基因突变细胞和治疗BRCA野生型细胞的效果其实是一样的。因此，我们现在还不明确talazoparib强大的PARP1蛋白固定能力是否能够带来更大的治疗比。此外，通过对被PARPi固定住的PARP蛋白进行质谱分析也发现，各种PARPi的固定机制各不相同。然而我

们目前也不清楚，这些靶向机制上的差异是否会影响PARPi的抗癌功效，是否与药物的副作用有关。因此，只有对更科学的3期临床实验

的结果进行比对之后，我们才有可能了解应该在哪种情况下，采用哪种PARPi才是最佳的选择。

几个与PARPi有关的，尚待解决的关键问题：

除了BRCA1和BRCA2蛋白之外，还有哪些蛋白与PARP1蛋白固定作用有关？

为什么若不解放固定在复制叉处的PARP1蛋白，就会导致细胞死亡呢？

PARP1蛋白在DNA修复之外的作用（例如炎症反应、细胞凋亡、免疫机能等作用）会影响PARPi的抗癌功效吗？

BRCA1和BRCA2基因突变，或者BRCAness等生物标志物在预测铂剂或PARPi的抗癌功效方面，预测效力究竟有多大？哪种手段才是评价BRCAness的最佳方案？

部分患者对PARPi超级敏感（superresponders，即用药效果好而且持久）背后的作用机制是什么？

BRCA基因突变，或者BRCAness患者对PARPi具有耐药性的机制是什么？

PARPi如何与其他药物联合使用，才能够发挥最佳的抗癌功效？

PARPi的联合用药问题

如前所述，PARPi具有使肿瘤细胞对损伤细胞DNA的化疗药物变得更加敏感的能力，由此我们获得了在临床上使用这类药物的理由和依据。最近，我们又发现，PARPi还能够使肿瘤细胞对烷化剂替莫唑胺（temozolomide）和拓扑异构酶抑制剂及毒性药物变得更加敏感。PARPi之所以能够增强肿瘤细胞对temozolomide的敏感性，主要是因为PARPi对PARP1蛋白具有固定作用，而之所以使肿瘤细胞对拓扑异构酶抑制剂及毒性药物变得更加敏感，则是因为PARPi抑制了PARP1蛋白的催化功能（与PARPi对PARP1蛋白的固定作用关系不大）。这种机制也在临床上得到了印证，比如科研人员们在临床上也发现，veliparib这种对PARP1蛋白固定作用较弱的PARPi就不能够增强BRCA基因发生突变的乳腺癌细胞对temozolomide的敏感性。不过veliparib在与卡铂（carboplatin）或紫杉醇（paclitaxel）

联用时效果就不错。我们在临床上将化疗药物与PARPi联用也积累了很多的经验。比如我们经常看到剂量限制性的组织毒性（dose-limiting tissue toxicity），即常规剂量的化疗药物与PARPi联用之后表现出了组织毒性。一些临床前研究已经发现，高剂量的PARPi与较低剂量的化疗药物联用可以起到抑制肿瘤细胞生长的作用。也有科研人员正在开展类似的临床研究（比如NCT02049593；ClinicalTrials.gov），以检测这种联合用药方案的耐受性和治疗效果。而且，临床前研究还发现，磷脂酰肌醇3激酶信号通路（phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway）上的多个靶点的抑制剂都可以赋予肿瘤细胞BRCAness表型，或者增强这种表型。这也就是说，这些抑制剂可以增强肿瘤细胞对PARPi的敏感性。目前这方面的临床试验正在进行之中。另外还有一种治疗策略，即将PARPi与能够阻止肿瘤让

细胞周期暂停（细胞可以利用这个暂停的机会完成DNA修复）的药物联用。这些药物包括WEE1抑制剂、ATR抑制剂和CHEK1/2抑制剂。之所以与这些药物联用，是由于WEE1抑制剂及ATR抑制剂类药物的开发工作取得了重大突破。现阶段，这类临床试验也正在进行之中，比如NCT02264678和NCT02576444等临床试验。随着CTLA4和PD1/PDL-1等免疫治疗类药物逐渐走进临床，将它们与PARPi联用也成为一种可能。鉴于BRCA1/2基因突变，或BRCAness患者的致突变几率更高，出现新型（肿瘤）抗原（neo-antigen）的可能性也更高，所以机体的抗癌免疫反应肯定也会更强烈。目前检测这种联合用药方案的临床试验也正在进行之中。此外，还有证据表明，BRCA蛋白缺陷会引发对STING依赖的天然免疫反应（STING-dependent innate immune response），这有可能会影响免疫治疗类药物与PARPi联用的临床功效。MEDIOLA（NCT02734004）临床试验就是将PARPi

olaparib与抗PD-L1的durvalumab联用的一个1、2期临床试验项目。我们期待该试验的结果能够带给我们更多的信息。目前，我们在制定联合用药方案时，主要考虑的都是如何最大限度地造成肿瘤细胞DNA损伤，或者影响肿瘤细胞的DNA修复机制，以此来发挥PARPi的抗肿瘤功效。不过，PARPi还可以与其它特异性针对某些肿瘤特征（与同源重组机制或BRCA基因功能无关的特征）的药物联合使用，比如将olaparib与西地尼布（cediranib是一种泛血管内皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂）联合使用。采取联合用药方案可使耐药性大幅度降低，因为这两种药物的作用机制毫无相关性。

除了替PARPi寻找出患者能够良好耐受的联合用药方案之外，发现能够预测治疗效果的生物标志物也是一项非常重要的工作。同样，解决PARPi的耐药问题，获得更持久的临床效益也非常关键。为了获得最佳的综合临床效益，我们还需要关注在联合用药方案中，何时、以何种顺序来使用PARPi的问题。

结论及展望

利用SL效应成功开发出针对BRCA基因突变患者的PARPi是转化医学史上的又一成功案例。在转化医学研究领域，我们还有更多的SL效应机制可供选择和利用，因此，现在也可以通过PARPi的开发工作总结出一些经验和教训，以供后来者参考、学习和借鉴。这些经验和教训包括：(1) 最好是有一种能够筛选患者的生物标志物，以选出最适合的用药人群，从而尽可能地发挥SL效应，使用药者获得最大的临床治疗效果；(2) 利用高外显效应（penetrant effects），即利用生物标志物来预测患者对药物的敏感性，尽可能地抑制SL效应的靶分子；(3) 直面各种人体肿瘤所展现出的、大量的分子多样性和易变性问题；(4) 要

在药理学方面容易实现；(5) 背后的分子机制要研究透彻，因为这有助于发现相关的生物标志物，解决耐药性问题。例如PARPi就在体外试验中取得了非常好的效果。对这类药物功效及外显率的研究也发现，它们属于高外显率药物，用药者的遗传背景及其它分子异常对这类药物的影响也不大。了解耐药机制的临床前研究，以及早期临床研究可以进一步阐明PARPi的作用机制，以及一些在临床试验中观察到的，不完全临床反应（incomplete clinical responses）的相关机制。PARPi之所以能这么快取得成功，最重要的一点经验就是，在发现了BRCA SL效应不久，人们就找到了PARPi。这也说明了医药化学和药理学等科学

的重要性，以及肿瘤遗传学及药物筛选等协同合作的重要性。

在以SL作用为基础开展临床试验时，不论是实验的设计，还是对试验结果的解读，最理想的状态都应该是以生理学假设和强有力的临床前研究数据为前提。虽然最近临床前研究数据纷纷证实了科学家们早在十几年前就发现的SL效应，并且直接促成了多个PARPi的上市申请获批，可用于治疗BRCA基因发生突变的肿瘤患者，但PARPi的成长之路可不能够用“一帆风顺”这个词来形容。比如，iniparib这种PARPi虽然在早期临床试验中取得了非常不错的试验结果，但是在3期临床试验中就没有达到预期的疗效。鉴于此，整个以SL效应为基础的一大类药物都遭受了质疑。回顾性研究也显示，iniparib作为PARPi的证据并不充分。这就让我们进一步怀疑，临床前生物学（preclinical biology）对临床药物研发工作的意义。当然，我们目前对PARPi SL效应的临床前调查和临床调查远未结束。前文介绍了几个目前亟待解决的关键问题。比如，我们已经发现，大约有15%的BRCA基因突变的卵巢癌患者在使用PARPi治疗5年后，病情依然没有任何进展。弄清楚这背后的原因和作用机制，既有助于我们开发出更好的治疗方案，也有助于找到可以更好地预测患者疗效的生物标志物。

随着科技的进步，科学家们现在已经可以利用酵母系统，从全基因组的角度来发现新的SL靶点，并且对每一个与肿瘤发生和发展有关的靶点进行精确定位。因此，从理论上来说，我们还可以开发出更多的SL抗癌药物。这其中的关键就是更深入地了解触发SL作用的因子、决定SL作用强度的因子，以及这些SL作用是

否能够轻易地被其它因素影响，如何预测SL作用的强弱等，而不仅仅是做了一个全基因组筛查。比如，我们已经知道，在蛋白质层面就有较强相互作用的分子间作用，很有可能就是一对SL分子（基因）。彼此之间直接发生相互作用，或者经由一至两个蛋白质（或节点）发生相互作用的分子也很有可能是一对SL分子（基因）。此外，具有相似功能的蛋白质也有可能是一对SL分子（基因）。基于这些假设，已经有人开发出了预测SL作用的软件。将功能基因组学与蛋白质组学、计算机网络分析技术结合起来，我们就很有可能预测出高外显率的SL作用，进而开发出更好的治疗策略。

从BRCA基因突变SL效应被发现，到PARPi的上市已有十几年了。从最近发表的临床前研究结果，以及其它正在开展的研究来看，PARPi已经成为了一个热门的研究领域。大家都对这类药物充满了信心，相信很快会在市场上看到更多的、可用于治疗多种肿瘤患者的PARPi。我们认为应该重点关注与个体化抗癌治疗相关的三个领域。(1) 明确患者。这可以通过PARPi的作用机制，以及相关的生物标志物来判断。(2) 解决耐药问题。要解决这个问题，我们可以借助以下几个途径：阐明PARPi的耐药机制、发现能够预测耐药性的生物标志物、认识肿瘤的异质性及可塑性对耐药性的影响、制定能够延缓或预防耐药性出现的临床用药方案。(3) 优化联合用药方案。我们可以借助协同抗癌作用（synergistic antitumor effect）的相关机制来制定联合用药方案，也可以寻找联合用药疗效预测生物标志物。

我们坚信，如果上述问题都得到了解决，那么PARPi一定会为抗癌治疗贡献自己的一份力量。

3. 锁定RAS蛋白：知己知彼方能百战百胜

在各种人类肿瘤中，有3种RAS原癌基因是最常发生突变的。各种研究早已证实，这些突变、并被激活的RAS基因在肿瘤的发生和发展过程中都起到了至关重要的作用，因此，科研人员们采用各种办法来抑制这些突变RAS基因的作用，以期达到治疗癌症的目的。可是，尽管科研人员们已经付出了30多年的努力，但还是没有找到很好的抗RAS的手段和药物，这些RAS突变蛋白似乎变成了一个无法攻克的堡垒。不过，随着新技术和新兴研究方向的出现，以及我们几十年来对RAS系统复杂程度的了解，抗RAS研究领域又迎来了新的希望。

RAS基因是人体肿瘤中被发现的第一个突变基因，它的发现标志着分子靶向抗癌治疗时代的到来。虽然，到目前为止，我们已经发现了600多个肿瘤基因（<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>），但是那3个RAS基因的突变率还是最高的，在大约25%的人体肿瘤中都能发现RAS基因突变。可是，尽管科研人员们已经付出了30多年的努力，但还是没有找到一款在临床上疗效不错的RAS抑制剂药物。整个RAS抑制剂药物的研发历程也充满了曲折和

失误，研究人员在当中走了不少的弯路。正如中国著名军事家孙子在《孙子兵法》中写的那样：知己知彼，才能百战不殆，美国国立癌症研究院（U.S. National Cancer Institute）在2013年启动了RAS项目（RAS Initiative）。虽然我们对RAS家族的认识远远不足，但现在好像已经隐隐看到了胜利的曙光。下文将介绍最近在RAS抑制剂研究领域里取得的最新进展和主要开发策略（图1）。

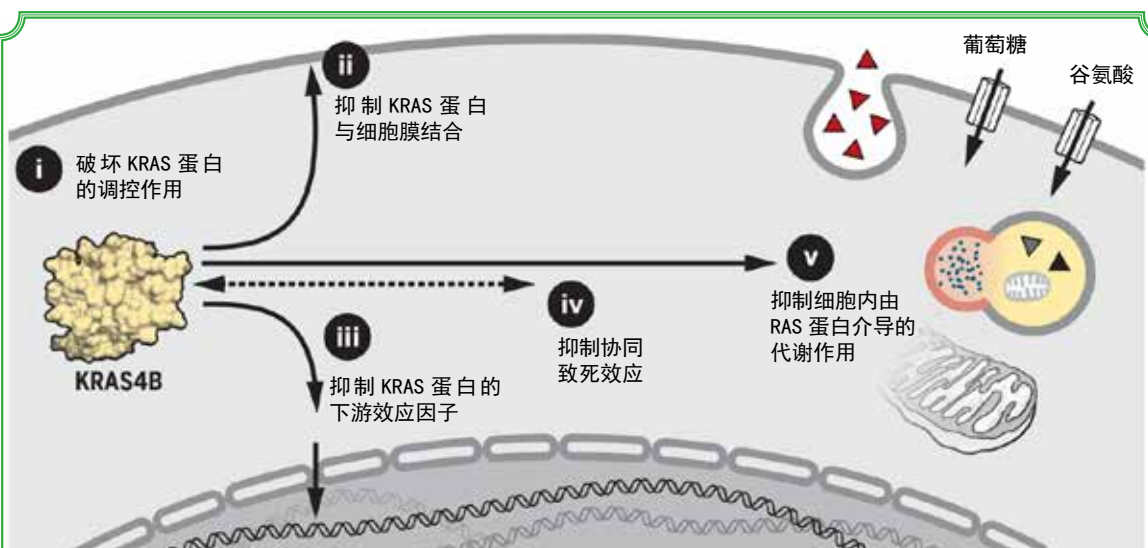


图1 5种抗RAS蛋白策略简介。(i)直接与RAS蛋白结合，破坏鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor)，或者RAF丝苏氨酸激酶(RAF serinethreonine kinases)等其它效应因子之间的相互作用。(ii)抑制法呢酰基转移酶(farnesyltransferase)或PDE δ 等能够调控RAS蛋白空间位置，或者与细胞膜结合的因子的作用。(iii)抑制RAF、PI3K等RAS下游信号因子的作用。(iv)抑制突变RAS蛋白的协同致死效应。(v)抑制细胞内由RAS蛋白介导的代谢作用。

肿瘤细胞里各种异常的RAS作用

在肿瘤细胞中，3种RAS基因发生突变的几率是不同的。其中KRAS基因是突变率最高的，在所有因为RAS基因发生突变而致癌的肿瘤中达到了85%；其次是NRAS基因，其突变率为12%；最后是HRAS基因，其突变率仅为3%。在美国，每年致死率最高的前三名肿瘤分别是胰腺导管腺癌（pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC，致死率为95%）、结直肠腺癌（colorectal adenocarcinoma, CRC，致死率为52%）和肺腺癌（lung adenocarcinoma, LAC，致死率为31%）。RAS基因突变也是这3种肿瘤中最为常见的突变。不过在乳腺癌、卵巢癌和脑癌等肿瘤中，

RAS基因突变就不那么常见了。

在PDAC、CRC和LAC中，KRAS突变基因是最多见的突变异构体，而NRAS突变基因则多见于皮肤黑色素瘤（cutaneous melanomas）、急性髓细胞白血病（acute myelogenous leukemia）；HRAS突变基因则多见于膀胱癌（bladder carcinomas）和头颈部鳞癌（head and neck squamous cell carcinoma）。为什么从整体来看，KRAS基因的突变率最高，而单就某一种肿瘤来看，又是某一种RAS基因的突变率最高呢？这个问题现在还没有找到答案！

RAS抑制剂新药研发出师不利

最开始，科研人员们在了解了突变RAS蛋白具有种种功能缺陷之后，就萌生了开发RAS蛋白抑制剂（RAS inhibitors）的想法。KRAS、HRAS和NRAS这三种RAS基因一共编码了4种RAS蛋白，即KRAS4A、KRAS4B、HRAS和NRAS。它们全都是用于水解GTP的GTP磷酸酶（guanosine triphosphatases, GTPases）。由于HRAS蛋白在表达载体、抗体等试验材料方面更加方便，因此目前我们关于RAS蛋白的知识，绝大多数都来自早先对HRAS蛋白的研究工作。科研人员们尝试开发出法尼基转移酶抑制剂（farnesyltransferase inhibitor, FTI），以期达到抑制RAS蛋白功能的目的，结果遭遇了失败，因为大家误以为所有这4种RAS蛋白全都具备相同的功能。后来大家逐渐意识到，在每一种肿瘤中，不同的RAS蛋白起着不同的作用，于是科研人员们又将研究的重点放到了KRAS这个最常见的突变蛋白上，尤其

是KRAS4B蛋白，它是最多见的剪接变异体（splice variant）。

RAS蛋白在细胞内主要起到了分子开关（molecular switches）的作用，它能够调控一系列胞内的信号传导通路。RAS蛋白主要有“开”和“关”两种状态，当它与GDP结合时，就处于“关闭”的状态；而与GTP结合时，就处于“打开”的状态。活化的RAS-GTP能够与多种不同的下游信号分子结合。这个RAS GDP-GTP开关装置主要受SOS1等鸟苷酸转换因子（nucleotide exchange factor, GEF）的调控。这些GEF蛋白可以促使鸟苷酸转换成RAS-GTP。神经纤维瘤蛋白（neurofibromin）等能够活化GTP酶的蛋白质（GTPase-activating protein, GAP）则促使GTP水解，生成无活性的RAS-GDP。

与肿瘤相关的RAS突变基因全都存在错义突变（missense mutation），主要都集中在12、13或者61位密码子处。这些错义

突变主要影响突变RAS蛋白对GTP的水解速度（hydrolysis rates），以及（或者）增强这些突变RAS蛋白的交换速度（exchange rate），并使这些突变RAS蛋白不需要任何刺激（在正常情况下是受到GAP激活），就可以一直处于RAS-GTP活化状态。因此，科研人员们最开始就想到了，要开发出一种能够与GTP竞争RAS蛋白结合位点的小分子拮抗剂。可是，RAS蛋白与GTP的结合力非常弱，只有皮摩尔级（picomolar），但是细胞内GTP的浓度却达到了毫摩尔级（millimolar）。这也就意味着，在细胞内GTP是远远过量的，因此开发RAS蛋白竞争性抑制剂就显得尤为困难。同样，开发GAP类似物的工作也没有任何进展。由于这些失败的经验，以及我们对RAS

蛋白表面水解活性位点的认识也不够清楚，所以RAS蛋白就成为了一个无法解决的难题。于是，科研人员们开始寻找其它间接的解决办法。比如从RAS蛋白与细胞膜的相互作用，或者RAS蛋白下游效应因子等方面入手，以查看是否有更好的办法。后来，协同致死效应（synthetic lethality）也被应用于RAS抑制的研究工作，以寻找能够与突变RAS蛋白发生相互作用的其它因子。随着肿瘤细胞代谢问题的再次兴起，也有人开始寻找依赖RAS蛋白的代谢途径。直到最近，人们转而开始重新寻找能够直接抑制RAS蛋白的抑制剂，因为有一些研究成果显示，我们还是有可能找到这种抑制剂的。接下来，我们就将逐一介绍在各个研究方向上取得的最新进展和成果。

针对RAS蛋白与胞膜之间的作用想办法

研究发现，RAS蛋白首先需要与细胞质膜（plasma membrane）的内表面结合，才能够被活化。随后人们又发现，蛋白质的翻译后修饰作用可以调节这个RAS蛋白与质膜的结合过程，从而为研究人们开发抗RAS蛋白药物指明了新的方向。RAS蛋白突变体是在胞浆中被合成的，合成之后处于非活化状态。RAS蛋白的羧基端是一个CAAX基序，其中C是半胱氨酸（cysteine）、A是脂肪族氨基酸（aliphatic amino acid），而X是终末氨基酸（terminal amino acid）。这个四肽基序是一系列翻译后修饰作用的信号因子。首先，法尼基转移酶催化法尼基团与CAAX基序上的半胱氨酸共价结合。接着，在内质网表面发生RAS

转换酶1（RAS converting enzyme 1, RCE1）水解作用，去除AAX这最末端的3个氨基酸。最后，再由细胞内质网相关异戊烯半胱氨酸羧基甲基转移酶（endoplasmic reticulum-associated isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase, ICMT）介导甲基化反应，使已经位于羧基末端的半胱氨酸残基与甲基基团结合，消除末端所带的负电荷，避免质膜排斥RAS蛋白。这种翻译后对RAS蛋白CAAX信号肽的修饰，对HRAS、KRAS4A和KARS4B蛋白的棕榈酸（palmitate fatty acid）修饰，以及对KRAS4A及KARS4B蛋白的聚赖氨酸（polylysine sequences）修饰，全都促进了RAS蛋白与细胞质膜系统的结合（图2）。

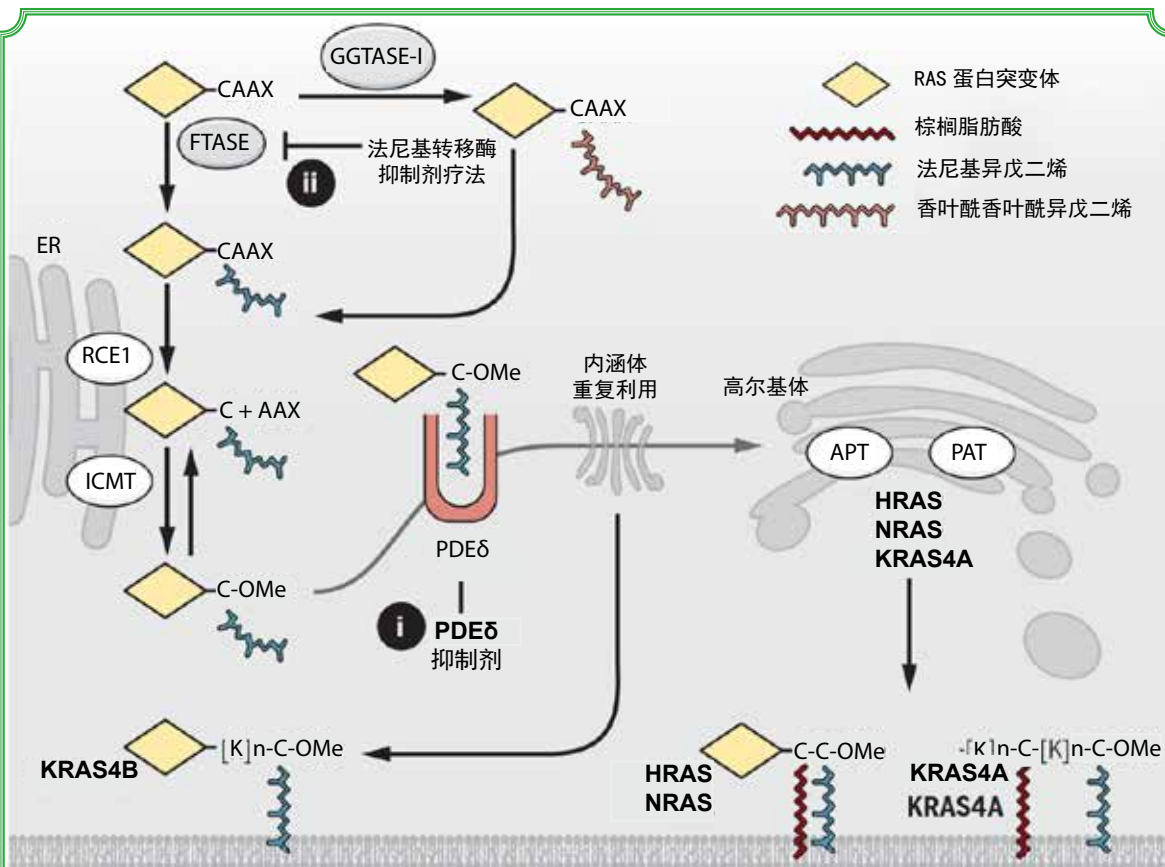


图2 调控 RAS 蛋白在细胞内的亚细胞定位 (subcellular localization)，以及 RAS 蛋白与细胞膜结合 (membrane association) 等作用。细胞胞浆内的法尼基转移酶 (farnesyltransferase, FTASE) 可以识别 RAS 蛋白上的 CAAX 基序，并使 CAAX 基序上的半胱氨酸残基共价结合一个法尼基异戊二烯。然后，细胞内质网相关蛋白酶 RCE1 去除 AAX 残基，再由 ICMT 介导甲基化反应，使已经位于羧基末端的半胱氨酸残基永久法尼基化 (farnesylated)。这些经过修饰的 CAAX 基序是促使 RAS 蛋白与胞膜发生相互作用，以及 RAS 蛋白在细胞内进行亚细胞定位，以发挥 RAS 蛋白功能的必要条件 (但不是充分条件)。RAS 蛋白 (HRAS 蛋白、NRAS 蛋白与 KRAS4A 蛋白) 与胞膜发生相互作用还需要另外一个基序，那就是与棕榈脂肪酸共价结合的半胱氨酸残基，该反应主要发生于高尔基体，由高尔基体相关棕榈酰乙酰转移酶 (Golgi-associated palmitoyl acyltransferase, PAT) 催化完成。RAS 蛋白 (KRAS4A 及 KRAS4B 蛋白) 与胞膜发生相互作用也需要另外一个基序，那就是聚赖氨酸序列 (polylysine sequence)。在细胞膜上富集 RAS 蛋白还需要 δ 异戊二烯结合蛋白磷酸二酯酶 (PDE δ) 的参与。PDE δ 可以识别 RAS 蛋白上的法尼基基团，使 RAS 蛋白溶解，重新进入循环的内涵体或高尔基体，再重新转运至胞膜。Deltarasin 等小分子药物可以抑制 PDE δ (i)。法尼基转移酶抑制剂能够阻止最开始的 CAAX 修饰反应，以及所有的后续修饰反应 (ii)。在缺乏法尼基转移酶活性的时候，KRAS 蛋白和 NRAS 蛋白都是香叶酰香叶酰转移酶 1 (geranylgeranyl transferase I, GGTASE - I) 的底物，会与香叶酰香叶酰基异戊二烯 (geranylgeranyl isoprenoid) 共价结合，完成异戊烯化反应 (prenylation)，然后再发生 RCE1 和 ICMT 修饰。APT (acyl protein thioesterase)：酰基蛋白硫酯酶；Me (methyl)：甲基基团。

由于法尼基修饰是RAS蛋白必经的翻译后修饰作用，也是RAS蛋白活化所必需的，因此，上世纪90年代兴起了一股寻找法尼基转移酶抑制剂（farnesyltransferase inhibitor, FTI）的热潮。其中很多研究人员发现，这些FTI在体外实验和多种小鼠肿瘤动物模型实验中都对HRAS蛋白依赖的肿瘤细胞增殖起到了很好的抑制作用。其中lonafarnib和tipifarnib这两种药物更是进入了3期临床试验，用于治疗KRAS基因发生突变的胰腺癌、结肠癌和肺癌患者。可惜的是，它们都没能获得明显的治疗效果。回顾性研究发现，其实早期的细胞培养试验就已经预示了这个试验结果。与HRAS蛋白相比，KRAS4B蛋白和NRAS蛋白都可以在存在FTI的情况下与细胞质膜系统结合，因为这些蛋白都是被香叶酰香叶酰异戊二烯（geranylgeranyl isoprenoid）修饰的。

FTI类药物的研发经验再一次打击了制药企业试图开发抗RAS蛋白药物的热情，尤其是彻底封死了针对RAS蛋白与胞膜之间作用的研究之路。不过，近几年来，这个方向又重新回到了大家的视线，这主要是因为人们又发现了一些新靶点。多个利用了无偏倚功能筛查技术（unbiased functional screens）开展的研究发现了多个新的、能够促进KRAS4B蛋白与细胞质膜系统结合的因子。其中一个就是从化学药物库中筛出的苯乙二苯丙胺（fendiline）。

靶向RAS蛋白下游的信号因子

阻断信号通路的效应因子，这是最常用的药物研发策略，在抗RAS蛋白领域也不例外。不过，RAS下游信号通路至少存在11种不同的效应因子，那么最关键的问题就是，哪一些效应因子才应该是我们的治疗靶点，是否应该同时抑制多种效应因子。其中两条引起了大家重视的信号通路是MAPK信号通路和PI3K-AKT-mTOR信号通路。BRAF基因和PIK3CA基因分

这是一种L型钙离子通道蛋白阻滞剂，也是KRAS4B蛋白膜结合作用高选择性抑制剂。苯乙二苯丙胺还能够非特异性地抑制酸性鞘磷脂酶（acid sphingomyelinase），降低质膜的磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine）水平。

最近，科研人员们又发现了一个新的靶点，那就是 δ 异戊二烯结合蛋白磷酸二酯酶（prenyl-binding protein phosphodiesterase δ , PDE δ ）。PDE δ 起到了促溶的作用，能够帮助RAS蛋白与高尔基体，或者循环内含体结合，然后RAS蛋白再经由泡状转运系统直接转运至质膜（图2）。Deltarasin和deltazinone是两种小分子药物，它们都能够占据PDE δ 的法尼基结合结构域。当用这些分子抑制PDE δ 后，RAS蛋白就会从质膜系统“转移”至内含体上，从而抑制了RAS蛋白的活化。在小鼠肿瘤移植动物模型试验中也发现，使用了这些抑制剂之后，RAS基因突变肿瘤细胞的癌性生长也受到了影响。从原理上来说，以PDE δ 作为治疗靶点可以避免FTI存在的那些问题。不过，因为PDE δ 也能够调节其它法尼基修饰蛋白的功能，因此，PDE δ 抑制剂的疗效也可能会因为不依赖RAS蛋白的信号通路产生的“脱靶效应”而大打折扣。所有能够影响RAS蛋白膜定位功能的蛋白都有可能存在RAS蛋白之外的其它底物，所以，这种非特异性问题将会成为影响这类药物的大麻烦。

别是这两条信号通路的重要组成成分，如果这两个基因发生突变，就会引发多种癌症，而且这两个基因的编码产物都是可以用药物抑制的激酶类蛋白质。

人们目前已经就MAPK信号通路和PI3K-AKT-mTOR信号通路开发出了大量的抑制剂，以抑制这些信号通路中的各个组分，而且其中很多抑制剂都已经进入了临床评估阶段。就目

前已有的证据来看，在依赖RAS蛋白才能生长的肿瘤细胞中，RAF信号通路是最关键的一条信号通路。比如，胰腺导管腺癌（这是在比较少见的RAS基因没有发生突变的肿瘤中最常见的一种肿瘤）就可能存在BRAF基因错义突变，或者缺失突变。而PI3K基因突变则通常会伴随着RAS基因突变，这也说明，RAS蛋白可能不会激活PI3K信号通路。小鼠动物模型试验发现，如果BRAF基因突变，而PI3K基因不突变，就可以模拟出KRAS基因突变模型，这会导致小鼠患上胰腺导管腺癌。RAS基因生殖系突变（germline RAS mutations，又名RASopathies）携带者会存在发育障碍（developmental disorders）问题，这种患者的RAF-MEK-ERK基因也都存在突变。最后，只有RAF-MEK-ERK信号通路里的因子能够弥补细胞缺失的RAS蛋白功能，恢复所有缺失了RAS等位基因的小鼠胚胎成纤维细胞（mouse embryo fibroblasts）的生长。由于RAFMEK-ERK MAPK这条信号通路是RAS蛋白调控的关键信号通路，因此，我们最近的研究工作就全都集中到了这个方向上。

在MAPK信号通路中，第一个被RAS蛋白激活的激酶就是RAF丝苏氨酸激酶（RAF serine threonine kinases），包括ARAF、BRAF和CRAF/RAF1。MEK1、MEK2双特异性激酶（MEK1 and MEK2 dual-specificity kinases）是目前唯一已经被确认的RAF激酶底物蛋白，而MEK1、MEK2双特异性激酶的唯一底物又是ERK1、ERK2丝苏氨酸激酶（ERK1 and ERK2 serine threonine kinases）。可ERK1、ERK2丝苏氨酸激酶的底物多达200多种，既包括胞浆内的底物，也有核内的底物，其中就包括了原癌基因MYC。MYC蛋白就是在依赖ERK信号通路生长的肿瘤细胞中非常重要的一个癌蛋白。

起初我们认为，RAF-MEK-ERK信号通路就只是一条线状的、单向的信号通路，随之也想当然地认为，只要抑制了RAF蛋白和MEK

蛋白，自然就可以抑制ERK蛋白的活性。第一代RAF抑制剂vemurafenib和dabrafenib已经被批准用于治疗BRAF基因发生突变的黑色素瘤（BRAF-mutant melanomas）患者。不过，当用这些抑制剂治疗RAS基因发生突变的肿瘤时，却出现了ERK信号通路被激活而不是被抑制的奇怪现象。后来人们发现，这是因为BRAF-CRAF异二聚体（在RAS蛋白突变时会形成该二聚体）在“捣乱”。由于第一代RAF抑制剂只能抑制RAF蛋白，但是却可以激活CRAF蛋白，所以才继而激活了ERK蛋白。于是，科研人员们又开发出了第二代RAF抑制剂，比如LY3009120和PLX8394。在RAS基因发生突变的情况下使用这些药物，就再也不会活化MAPK信号通路了。

目前，科研人员们已经开发出了强效的高选择性MEK1/MEK2抑制剂，其中trametinib和cobimetinib已经被批准用于治疗BRAF基因发生突变的黑色素瘤患者。不过，这些药物对RAS基因突变的肿瘤患者没有治疗效果，部分原因是缺少了ERK介导的反馈抑制机制。虽然上调的ERK信号活性能够促使肿瘤细胞生长，但是如果ERK信号通路异常活化，也会抑制细胞的生长。由此可见，反馈抑制机制（feedback inhibition mechanisms）起始于ERK对MEK信号通路上游因子（例如CRAF）的磷酸化修饰作用，能够减少参与信号通路级联反应的因子。因此，通过抑制MEK蛋白来抑制ERK因子的活性（最后会抑制反馈抑制通路），就可以借助RAF途径，起到上调信号通路活性的作用。如果抵消MEK抑制剂的作用，就会导致ERK蛋白被激活。科研人员们已经发现了与肿瘤相关的MEK突变，这些突变也会让肿瘤细胞对MEK抑制剂表现出耐药性。由于MEK抑制剂的出现引出了这么多让我们意想不到的结果，于是大家又转向了ERK抑制剂的研发工作。目前，已经有几款ERK抑制剂进入了临床评估阶段。

在肿瘤细胞生长需要依赖RAS蛋白的情

况下，PI3K-AKT-mTOR信号通路的作用就没有那么重要了，不过该信号通路与RAF-MEK-ERK通路之间具有极大的互补作用。肿瘤细胞可以通过激活PI3K-AKT-mTOR信号通路的方式，获得对ERK-MAPK信号通路抑制剂耐药的结果。正是基于这种互补的特性，科研人员对这两条信号通路都进行了抑制，结果在小鼠动物模型中取得了很好的抗肿瘤效果。不过令人遗憾的是，这种抗癌治疗方案在临床试验中并没有取得我们预期的良好治疗效果。部分原因是药物的毒性反应，因此用药剂量不能太高。现在大家都在开发RAF抑制剂和PI3K抑制剂的联合治疗方案，以降低药物的毒性反应，同时又可以避免引出肿瘤细胞的耐药性。

最近出现了另外一种RAS通路阻断策略，那就是rigosertib。Rigosertib是一种广谱的、多种激酶抑制剂，但不会与ATP去竞争激酶结合位点。目前，该药物已经进入临

床试验阶段，用于治疗骨髓增生异常综合征（myeloid dysplastic syndrome）。在研究过程中，人们又发现了rigosertib的另外一种作用，我们称之为RAS模拟作用（RAS mimetic），因为该药物可以占据RAS效应因子上的RAS结合位点，以及RAS相关的结构域。所以rigosertib可能还具有阻断RAS下游信号通路活性（例如RAF或其它通路）的作用。不过，最近还有一篇报道指出，rigosertib与RAS结合位点，以及RAS相关结构域的亲合力可能还不足以阻断RAS信号通路。而且，由此导致的ERK信号通路活性下调其实是通过间接途径引起的，即应激激活了JNK因子，进而使得SOS1因子和RAF蛋白磷酸化修饰而失活。由于还有一些其它非RAS相关的活性也被认为与使用了rigosertib有关，因此我们还需要进一步开展研究，以明确rigosertib的抗肿瘤活性是否与其RAS模拟作用有关。

RAS突变与协同致死效应

还有一种间接的抗突变RAS策略就利用了协同致死效应。突变RAS蛋白的协同致死因子（Synthetic lethal interaction partners）只有在RAS基因发生突变的细胞里才是必需的，而在RAS基因没有发生突变的细胞里就不是必需的。这些基因编码的蛋白质产物可能与RAS信号通路有直接的关系，也可能没有。2009年，多个研究团队都发现了突变RAS蛋白的协同致死因子，比如STK33和TBK1等多种蛋白激酶。不过，后来的研究没能证明它们的协同致死作用。到目前为止，寻找突变RAS蛋白协同致死因子的工作还在进行之中，不过一直没有找到一个非常有价值的因子。

回过头来看，我们当初对这些因子的过高期望也许是非常不切合实际的，因为这些以RNA干扰技术（RNA interference, RNAi）

为平台筛选出来的协同致死因子在多个方面都有明显的不足。在这些筛查工作中，最常用的一种策略就是利用同基因型的人体肿瘤细胞系（isogenic human tumor cell lines）作为试验材料，这些肿瘤细胞系只在RAS基因位点发生了突变。构建这些肿瘤细胞系的方法就是使杂合型突变KRAS基因（G13D突变）结肠癌细胞系里的突变KRAS基因稳定缺失（stable deletion）。这种突变RAS蛋白“急性”缺失会严重影响肿瘤细胞的增殖能力，如果细胞的增殖能力又恢复了，那么就说明细胞发生了适应性突变，不再需要突变RAS蛋白也能够正常生存。如果是那样，RAS基因的突变状态就不再是唯一的差别。这种筛查策略的另外一个问题就是，没有充分考虑RNA干扰文库（RNAi libraries）固有的脱靶问题。大量的筛查研究

都使用了同一个细胞系作为实验材料，结果却发现了各种各样、完全不同的协同致死因子，这就足以说明这种筛查技术存在先天不足。

尽管早期的筛查研究进展得很不顺利，但是科研人员们对寻找协同致死因子还是充满了热情，因为大家都相信，一定会取得不错的成果。为了解决RNAi的不足，Sabatini等人又使用了CRISPR-Cas9技术（大家都认为这种技术的脱靶问题会小一些），对RAS基因突变和未突变的急性髓性白血病细胞系进行了筛查，结果发现了五个协同致死因子。其中RCE1和ICMT因子都是与RAS膜结合作用相关的酶因子，RAF1、SHOC2和PREX1 RAC选择性鸟苷酸转换因子（PREX1 RAC-selective

GEF）则都是ERK-MAPK信号通路的调控因子。Sabatini等人并没有发现新的RAS调控因子。这一次发现的5个因子都与RAS蛋白的功能有着密切的联系，这也说明了这种筛查技术在准确性上有了明显的提高。将来，利用三维细胞培养技术（three-dimensional culture systems）、类器官培养技术（organoid cultures），或者活体内模型来筛查协同致死因子势必进一步提高试验的准确性和特异性。不过，大家也都清楚，肯定不会在所有RAS突变肿瘤细胞里都存在协同致死作用，而且这种致死作用的强度也肯定会受到其它与RAS基因无关的基因状态的影响。

干扰受RAS蛋白调控的代谢通路

在肿瘤的十大特征当中，有一条就是肿瘤细胞需要自己的能量和营养物质代谢途径，来满足它们旺盛的生长需要，包括细胞内能量物质再循环，或者清除胞外成分等（图3）。最近的研究发现，突变的RAS蛋白也参与了这些代谢途径。因此，弄清楚这些代谢途径的具体代谢机制，以及哪一个突变RAS蛋白影响了哪一条代谢途径，都有助于我们发现新的、相关的治疗靶点，并针对RAS基因突变肿瘤细胞开发出新的抗癌药物。

我们知道，RAS基因可以诱发巨胞饮作用（macropinocytosis）。这是一种胞吞作用（endocytic process），即细胞利用质膜将胞外的营养物质摄取到胞内的一种作用。科研人员们在KRAS基因发生突变的胰腺导管腺癌细胞里，以及在KRAS基因突变的胰腺导管腺癌小鼠动物模型里都发现了巨胞饮作用增强的现象。目前，还没有药物可以选择性地抑制巨胞饮作用，但是有研究发现，EIPA这种Na⁺/H⁺离子交换通道抑制剂能够抑制巨胞饮作用。体内实验也发现，使用EIPA可以干扰

胰腺导管腺癌肿瘤的形成。虽然我们已经发现，胰腺导管腺癌细胞巨胞饮作用的增强依赖于突变RAS基因，但是对其背后的具体机制还是一无所知。白蛋白（albumin）是细胞通过巨胞饮作用摄取的主要营养物质，它可以作为细胞重要的氨基酸来源。据推测，白蛋白结合型紫杉醇（nab-paclitaxel）这种纳米粒子（nanoparticles）药物可能就是通过“绑架”了细胞的巨胞饮作用，才能够在临床上发挥治疗胰腺导管腺癌的作用。

细胞大自噬作用（macroautophagy）也是RAS基因参与的一种代谢作用，细胞可以利用大自噬作用获得生长所需要的大分子物质。在细胞自噬过程中，细胞会降解（或者剥夺其功能）自身不再需要的胞内成分，比如细胞器，细胞通过这种方式可以获得氨基酸、脂质、核酸等多种大分子原料，以供细胞生长、增殖。人们在KRAS基因发生突变的胰腺导管腺癌细胞里，也观察到了细胞自噬作用增强的现象。此外，人们在小鼠动物实验中发现，氯喹（Chloroquine）可以抑制溶

酶体酸化 (lysosomal acidification)，阻止自噬体形成，进而影响胰腺导管腺癌细胞的生长。氯喹是一种非选择性的自噬抑制剂，因此，它也可以抑制巨胞饮作用。氯喹的衍生物——羟化氯喹 (hydroxychloroquine) 目前已进入临床实验阶段，以用于治疗胰

腺导管腺癌 (clinicaltrials.gov identifier, NCT01506973)。细胞自噬作用是一种机制非常复杂的代谢过程，它可以给我们提供很多高选择性的药物作用靶点，比如ULK丝苏氨酸激酶。

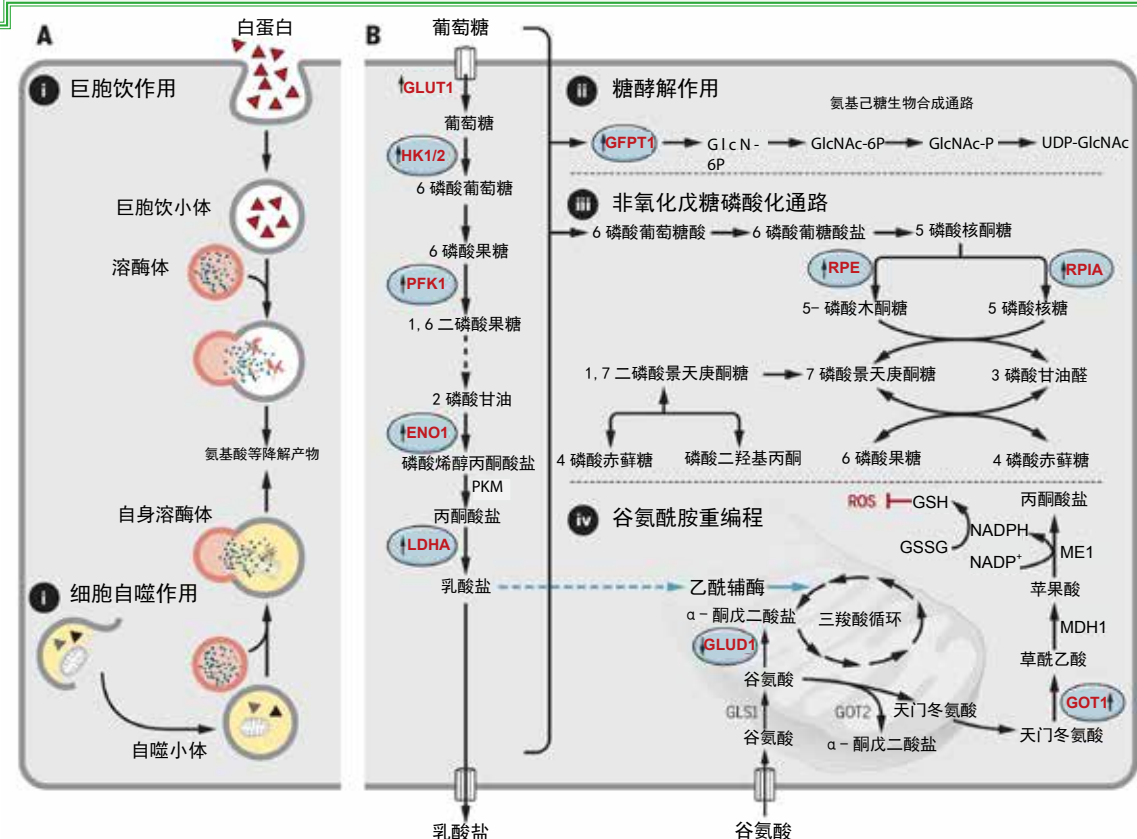


图 3 由 RAS 蛋白调控的几条细胞代谢途径。(A) RAS 蛋白发生突变的肿瘤细胞都有一个明显的特征，那就是细胞巨胞饮活性和自噬活性明显增加 (i)。这会给细胞产生更多的能量和大分子物质，帮助肿瘤细胞更快地增殖。(B) KRAS 蛋白可以上调很多在糖酵解代谢途径起到关键作用的酶的表达 (ii)，促进葡萄糖进入氨基己糖生物合成途径。而且，KRAS 蛋白还可以诱导无氧戊糖磷酸化代谢通路 (iii)，以增加核酸的生物合成。胰腺导管腺癌肿瘤细胞还可以利用非经典的代谢通路，处理谷氨酰胺 (iv)，以维持细胞内的氧化还原反应平衡 (redox balance)，帮助肿瘤细胞生长。图中红色字母表示的都是依赖 RAS 蛋白的基因，基因旁的箭头表示基因表达上调或下调。GLUT1 (glucose transporter 1)：葡萄糖转运蛋白 1；HK1/2 (hexokinase 1 and 2)：己糖激酶 1、2；PFK1 (phosphofructokinase 1)：磷酸果糖激酶 1；ENO1 (enolase 1)：烯醇化酶 1；PKM (pyruvate kinase)：丙酮酸激酶；LDHA (lactate dehydrogenase A)：乳酸脱氢酶 A；GFPT1 (glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase 1)：6 磷酸氨基葡萄糖果糖胺基转移酶 1；GlcN (glucosamine)：氨基葡萄糖；GlcNAc (N-acetylglucosamine)：N 乙酰基氨基葡萄糖；UDP (uridine diphosphate glucose)：尿苷二磷酸葡萄糖；RPE (ribulose-5-phosphate-3 epimerase)：5-磷酸核酮糖 3 表异构酶；RPIA (ribulose-5-phosphate isomerase)：5-磷酸核酮糖异构酶；ROS (reactive oxygen species)：活性氧簇；GSH (glutathione)：谷胱甘肽；GSSG (glutathione disulfide)：氧化型谷胱甘肽；NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced))：还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸；NADP⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized))：氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸；ME1 (malic enzyme)：苹果酸酶 1；MDH1 (malate dehydrogenase 1)：苹果酸脱氢酶 1；GOT1 (aspartate transaminase 1)：天门冬氨酸氨基转移酶 1；GOT2 (aspartate transaminase 2)：天门冬氨酸氨基转移酶 2；GLU1 (glutamate dehydrogenase 1)：谷氨酸脱氢酶 1；GLS1 (glutaminase 1)：谷氨酰胺酶 1。

突变的RAS蛋白还与糖代谢活性增强有关，它还可以促使糖代谢转换到核酸，以及脂质的生物合成途径。RAS蛋白还可以上调GLUT1的表达水平，增强细胞对葡萄糖的摄取能力；KRAS蛋白可以上调糖酵解酶（glycolytic enzymes）的表达水平，促使丙酮酸（pyruvate）转换成乳酸（lactate）。此外，RAS蛋白还可以调节一些酶编码基因的表达，这些酶能够促使葡萄糖进入非氧化磷酸戊糖（nonoxidative pentose phosphate）和氨基己糖（hexosamine）生物合成途径，这主要是因为通过RAF-MEK-ERK信号通路的作用，调节了MYC基因表达的缘故。因此，如果抑制了ERK-MAPK信号通路，可能也就能阻止KRAS基因导致的糖代谢紊乱。

最后，RAS基因突变的胰腺导管腺癌细胞还有一大特征，那就是细胞在合

成NADPH，维持氧化还原平衡（redox balance）时，会更加依赖谷氨酰胺（glutamine）。突变的KRAS基因可以调节这个平衡，GOT2利用谷氨酰胺生成天门冬氨酸，然后天门冬氨酸在GOT1的作用下转换成草酰乙酸（oxaloacetate）。MDH1继续将草酰乙酸转换成苹果酸。紧接着，ME1利用苹果酸生成NADPH，维持细胞的氧化还原平衡。谷氨酰胺酶可以在谷氨酰胺代谢途径的第一个步骤发挥调控作用。CB-839这种GLS1抑制剂目前已经进入了临床实验阶段，可用于治疗白血病和实体瘤等疾病（clinicaltrials.gov）。目前有多种针对该代谢途径其它组份的抑制剂也已经进入了临床前实验阶段。虽然针对RAS相关代谢通路的抗癌策略可能具有美好的前景，但目前这个研究领域还处于起步阶段，还需要开展大量的研究工作。

直接抑制RAS蛋白

1989年，科研人员们首次获得了HRAS蛋白的结晶结构。通过这个结构图，他们发现在HRAS蛋白的表面并没有与小分子物质特异性结合的“口袋”状结合位点。于是，科研人员们失去了继续寻找RAS蛋白结合分子的兴趣。但是最近，这个领域又取得了一些不错的进展。2012年，通过对化学药物文库的筛查，好几个科研团队都发现了能够与重组KRAS4B蛋白直接结合，并干扰其功能的小分子药物。其中有多种药物都能够与重组KRAS4B蛋白上的SOS1结合位点发生相互作用，阻止KRAS-ATP的形成。有一组药物可以与KRAS蛋白效应因子相互作用结构域（KRAS effector interaction domain）结合，阻止KRAS蛋白与CRAF结合，并且进一步影响其它效应因子的活化。在体外实验中发现，这些小分子药物与KRAS蛋白的亲和力都在毫摩尔级，非常低。

虽然在体外细胞实验中能够抑制肿瘤细胞的生长，但这究竟是因为拮抗了KRAS蛋白的正常功能，还是因为脱靶效应，目前还不得而知。不过无论如何，目前已经获得成功的研究结果还是激起了大家重新寻找RAS蛋白直接抑制剂的兴趣。但是这种RAS蛋白选择性小分子抑制药物与RAS蛋白的结合能力必须非常高，同时还要能够靶向KRAS4B蛋白的功能结构域。只有满足了这些要求，它们才能够在临床上发挥抗癌功效。

在这些能够直接与RAS蛋白结合的小分子药物当中，大家最感兴趣的就是能够与RAS的突变体G12C特异性结合的药物。虽然这种突变体在所有人体肿瘤相关KRAS突变蛋白中只占到了12%的比例，但却是肺癌患者群体中最多见的一种KRAS突变体。Shokat等人开发了一种GDP类似物，它可以特异性地与RAS

G12C突变体共价结合，将其维持在失活状态。**Westover**等人也开发出了另外一种**RAS G12C**突变体特异性抑制剂。这些抑制剂都非常重要，都属于概念验证型研究结果，不过细胞活性都比较低。在后续的研究中，人们又发现了**ARS-853**，它与之前的**RAS G12C**突变体特异性抑制剂作用机制一致，但是在生化活性和细胞活性方面都有了明显的提高。细胞实验证实，**ARS-853**可以明显地抑制携带有**RAS G12C**突变体的肿瘤细胞的生长。

ARS-853还给我们带来了另外的启示，那就是不同的**RAS**突变体具有不同的功能。在此

之前，大家都认为**RAS**突变蛋白会一直与**GTP**结合，而不论依赖**GEF**的信号通路是否被激活。可是在**ARS-853**相关研究结果公布之后，大家发现，**RAS G12C**突变体持续活化是依赖表皮生长因子受体（**epidermal growth factor receptor, EGFR**）介导的信号通路，以及依赖**GEF**信号通路而活化的。因此，**ARS-853**联合**EGFR**抑制剂一同使用，可以更好地抑制**KRAS G12C**突变体的功能。而**GEF**活化抑制剂也可以被用于治疗某些**RAS**突变肿瘤。该研究成果也促使科研人员开始寻找突变特异性的抗**RAS**蛋白类药物。

总结及展望

尽管抗**RAS**蛋白药物的研发历程充满了曲折，但是大家还是充满了信心，相信在不久的将来会取得非常好的成果。不过我们也发现，**RAS**突变肿瘤细胞里还隐藏着很多未知的秘密，这将给抗**RAS**药物研发工作留下不少障碍。其中一个事实是，如果将来我们真的开发出了一款抗**RAS**蛋白药物，那肯定不能治疗所有**RAS**突变肿瘤。突变**RAS**蛋白的功能很大程度上会受到细胞和遗传背景的影响。由于**RAS**突变肿瘤细胞在遗传背景上具有极大的异质性，所以开发“广谱的”抗**RAS**蛋白药物才是未来的发展方向。这方面的工作也在加紧进行之中。刚刚进入这个研究领域的科研人员们也提供了很多新的思路和研究策略。那么哪一种策略会最先取得成功？哪一种策略又会开发

出最有效的**RAS**抑制剂呢？随着越来越多的**RAS**抑制剂进入临床评估，我们估计，**RAS**效应因子抑制剂可能会是最早走进临床的抗**RAS**药物。不过，**RAS**蛋白直接抑制剂可能会是功效最好、疗效持续时间最长的抗**RAS**蛋白药物。那么，还有没有其它开发策略也会获得成功呢？随着免疫抗癌疗法的兴起，未来我们有可能发现**RAS**信号通路与肿瘤免疫之间的关系，可能还会在这个方向上有所发现。如果在给药途径和效价方面取得了进展，那么利用**RNAi**技术，或者**CRISPR-Cas9**技术抑制突变**RAS**蛋白的表达可能也会是一个不错的抗**RAS**策略。总体而言，虽然目前还存在很多问题和困难，但是科研人员们相信一定能攻克**RAS**蛋白这个难题。

4. 泛素-蛋白酶系统：一个极有前途的抗癌新策略

抗癌靶向治疗药物 (targeted therapies) 通常指的都是能够特异性抑制某些蛋白质分子 (这些分子的主要作用就是促进肿瘤细胞生长) 活性的小分子药物 (small molecules)，或者单克隆抗体类药物 (monoclonal antibodies)。虽然很多患者接受这类药物治疗后都能取得了不错的治疗效果，但是疗效都不持久，这主要是因为肿瘤细胞对这些靶向治疗药物产生了耐药性 (resistance)。靶向治疗的另外一个问题就是，无法抑制所有的致癌蛋白质分子。于是，科研人员们又提出了另外一种治疗策略，即利用细胞自身的“质控系统 (quality-control machinery)”——泛素蛋白酶系统 (ubiquitin-proteasome system) 来清除细胞内特异性的致癌蛋白分子。下文将介绍这种新型抗癌策略，首先会介绍几种已有的、利用了这种抗癌策略的抗癌药物，然后还会对最近该领域取得的进展进行简述，并介绍几种已经开展了临床前试验的小分子药物，这些药物都可以特异性地降解某些特定的致癌分子。

癌症一直是个威胁人体健康的全球性问题。据估计，到2025年，全球每年将新诊断2000万名癌症患者。目前我们在抗癌新药研发方面取得了令人瞩目的成果和进展，其中免疫抗癌治疗药物和靶向抗癌治疗药物的开发工作更是成绩斐然。但是，庞杂的癌症问题要求我们不断开发出新的抗癌策略。很多靶向抗癌治疗药物都是能够特异性抑制某些蛋白质分子 (这些分子的主要作用就是促进肿瘤细胞生长) 活性的小分子药物，或者是单克隆抗体类药物。但是，肿瘤细胞常常会通过过表达靶向分子，或者产生新突变靶向分子的方式来逃避靶向药物的杀伤作用，并产生耐药性。

近15年来，科研人员们又新开发出了一种抗癌治疗策略，即通过调控蛋白质的表达，而不是活性的方式来控制蛋白质的功能。科研人员们发现能够抑制蛋白质降解的蛋白酶抑制剂 (proteasome inhibitors) 具有抗肿瘤作用，由此想到了这种治疗策略，该策略主要利用了细胞内的蛋白质稳态 (proteostasis) 机制。Carfilzomib和bortezomib就属于这类药物，目前美国FDA已经批准这两种药物用于治疗多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM)。科

研人员们也开发出了其它治疗手段，比如利用泛素-蛋白酶系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 来保持，或者促进与疾病相关的蛋白质的降解 (表1)。比如，有些科研人员一直在研究如何阻断蛋白质与泛素蛋白E3连接酶 (ubiquitin E3 ligases) 之间的相互作用，因为这些泛素蛋白E3连接酶可以促使与其结合的蛋白质发生降解。抑癌因子p53蛋白及其泛素蛋白E3连接酶MDM2就是科研人员们关注的一对靶标。临床前研究发现，能够抑制它们之间相互作用的药物RG7112可以杀死表达野生型p53蛋白的肿瘤细胞，同时抑制肿瘤细胞生长。有些蛋白质具有稳定其它蛋白质分子 (比如癌蛋白) 的作用，抑制这些稳定蛋白因子，也可以达到降低癌蛋白 (oncoproteins) 水平的目的。比如，泛素特异性蛋白酶7 (ubiquitin-specific protease 7, USP7) 就是一种泛素分解酶 (deubiquitinating enzyme, DUB)，它可以使MDM2蛋白去泛素修饰，起到稳定MDM2蛋白的作用。如果抑制了USP7蛋白的作用，就可以降低MDM2蛋白的水平，从而上调p53蛋白的水平。多发性骨髓瘤异种移植动物模型研究表明，USP7蛋白抑制剂

P5091也的确表现出了抗肿瘤活性。

最近，科研人员们的兴趣又集中到了利用UPS来诱导特定靶蛋白（尤其是那些尚未发现相应DUB或E3蛋白的靶蛋白）的降解这个方向上来了。这些新型治疗策略全都利用了细胞自身的“质控系统”，在翻译后

（posttranslationally）的层面上清除与疾病有关的蛋白质。接下来，我们将用几个简单的例子来介绍靶蛋白降解技术，以及达到蛋白质稳态的机制和应用情况。我们还将重点介绍该领域的最新进展，以及面临的问题和挑战。

表1 利用受控蛋白稳态机制(controlled proteostasis mechanism)开发的几种抗癌药物简介

分子（药物）名称	作用靶标	适用疾病	作用机制	目前所处开发阶段
Bortezomib	20S蛋白酶体	MM	抑制蛋白酶体	处于临床审批阶段
Carfimizomib	20S蛋白酶体	MM	抑制蛋白酶体	处于临床审批阶段
Lenalidomide	CRBN	MM	CK1a、Ikaros和Aiolos降解	处于临床审批阶段
P5091	USP7	MM	抑制DUB	处于临床前研发阶段
Fulvestrant	ER α	乳腺癌	选择性降解ER α	处于临床审批阶段
RAD1901	ER α	乳腺癌	选择性降解ER α	处于1期临床试验阶段
SNIPER (ER)	ER α	乳腺癌	利用SNIPER PROTAC技术降解靶蛋白	处于体外肿瘤细胞实验阶段
SARD279	AR	前列腺癌	由疏水标签介导降解靶蛋白	处于体外肿瘤细胞实验阶段
ARV-771	BET	前列腺癌	利用PROTAC技术降解靶蛋白	处于临床前研发（异种移植动物实验）阶段
dBET1	BET	AML	以IMiD为基础，借助PROTAC技术降解靶蛋白	处于临床前研发（异种移植动物实验）阶段
Arsenic	PML-RARa	APL	降解靶蛋白	处于临床审批阶段
RG7112	MDM2	血液系统肿瘤	抑制泛素蛋白E3连接酶	处于1期临床试验阶段

（续下表）

(接上表)

分子（药物）名称	作用靶标	适用疾病	作用机制	目前所处开发阶段
ARV825	BRD4	Burkitt淋巴瘤	利用PROTAC技术降解靶蛋白	处于临床前研发（异种移植动物实验）阶段
TX2-121-1	HER3	多种肿瘤	由疏水标签介导降解靶蛋白	处于体外肿瘤细胞实验阶段
MZ1	BRD4	多种肿瘤	利用PROTAC技术降解靶蛋白	处于体外肿瘤细胞实验阶段

MM (multiple myeloma): 多发性骨髓瘤; CK1 α (casein kinase 1 α): 酪蛋白激酶 1 α ; USP7 (ubiquitin-specific protease 7): 泛素蛋白特异性蛋白酶 7; DUB (deubiquitinating enzyme): 泛素分解酶; ER α (estrogen receptor alpha): α 雌激素受体; SNIPER (specific and nongenetic IAP-dependent protein eraser): 特异性、非遗传性 IAP 依赖性蛋白质清除子; PROTAC (proteolysis targeting chimera): 靶向蛋白水解嵌合体; AR: 雄激素受体; BET (bromodomain and extra-terminal): 溴结构域蛋白及额外片段; AML (acute myeloid leukemia): 急性髓细胞白血病; IMiD (immunomodulatory drug): 免疫调节药物; PML-RAR α (promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor alpha): 早幼粒细胞白血病 α 维甲酸受体; APL (acute promyelocytic leukemia): 急性早幼粒细胞白血病; MDM2 (mouse double minute 2 homolog): 小鼠双微体 2 同源物; BRD4 (bromodomain containing protein 4): 含有溴结构域的蛋白 4; HER3 (human epidermal growth factor receptor 3): 人表皮生长因子受体 3。

以“占领为目的 (occupancy-driven)”的新药开发模式的弊端

在当今这个后基因组时代 (postgenomic era)，我们已经对致癌的分子机制有了更加深入的认识和了解，也因此开发出了多种更有效的抗癌治疗策略和药物。比如 imatinib、erlotinib 和 palbociclib 等抑制蛋白激酶 (protein kinases) 的药物，belinostat 等抑制组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases) 的药物，olaparib 等抑制多二磷酸腺苷核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase) 的药物。所有这些小分子抑制剂类药物都是通过占领被抑制蛋白的活性位点的方式，来达到抑制其靶标蛋白作用的目的。不过，由于大多数抑制剂都是通过非共价键的 (noncovalently)、可逆的方式与其靶标蛋白结合，因此必须在药物浓度较高的情况下才能够发挥临床治疗

效果。这就是我们常说的以“占领为目的 (occupancy-driven)”的新药 (图1)。这类药物必须占领靶蛋白上的活性位点，才能够发挥其治疗功效。可是这类药物必须在患者的全身维持一个较高的血药浓度 (systemic drug levels)，这就成了该类药物开发工作中的一大难题。因为这种较高的血药浓度势必会带来各种脱靶效应 (off-target effects)，或者说副作用。以蛋白激酶抑制剂为例，我们试图使用 ATP 类似物 (ATP analogs) 来占领蛋白激酶上的 ATP 活性位点，但由于很多蛋白激酶的结构都非常相似，所以这种做法并不占优势。但有时情况会发生变化，特别是当我们靶向的是依赖于多个细胞信号通路的活化的肿瘤时，劣势就有可能变为优势。

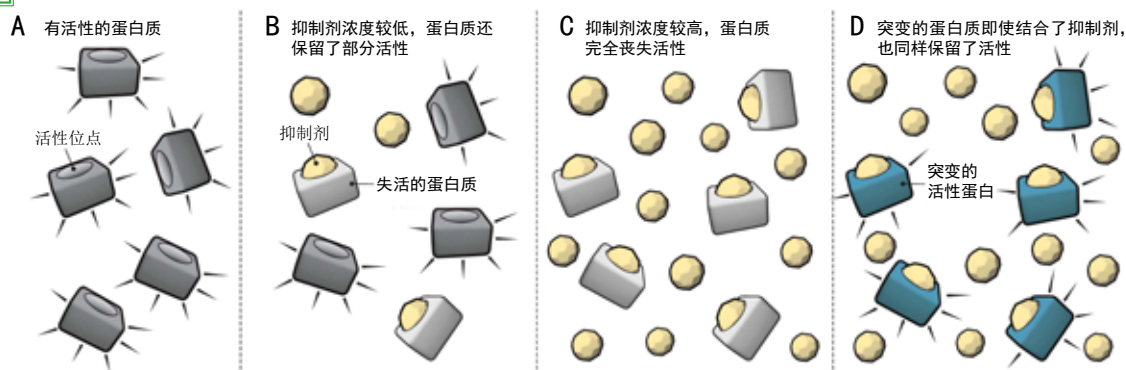


图1 以占领蛋白质活性位点为策略的药物的作用方式。(A) 在没有抑制剂存在时, 靶蛋白活性位点未被药物占据, 蛋白仍然具有活性。(B) 当抑制剂浓度较低时, 靶蛋白活性位点未被药物完全占据, 因此蛋白质还保留有部分活性。(C) 当抑制剂浓度较高时, 靶蛋白活性位点被药物完全占据, 因此蛋白质无法表现出活性。有一些蛋白质除了具备这些活性位点的功能之外, 还有其它功能, 此时这些功能不会受影响。(D) 在癌变时, 蛋白质会发生突变(比如雄激素受体第 876 位氨基酸会从苯丙氨酸突变成亮氨酸), 此时抑制剂反而会变成激动剂, 起到进一步增强靶蛋白功能的作用。

新药开发新策略——诱导蛋白降解 (Induced protein degradation)

蛋白定向降解策略正成为一种新的药物开发思路。按照这种思路, 我们只需要利用小分子药物与靶蛋白发生相互作用, 诱导靶蛋白降解, 就可以达到抑制靶蛋白功能的目的。这是一种“诱导事件发生(event-driven)”的新药开发策略, 不过这种结合只是暂时的(图2)。这类药物主要利用了细胞自身的质控系统, 只需要对靶蛋白进行一番标记, 细胞自身的泛素酶系统就会清除这些目标蛋白。而且在这些蛋白标记和降解过程中, 小分子药物自身并不会被破坏, 因此可以不断地发挥作用, 发挥远远超过药物剂量的作用。在自然界中, 我们将这种作用称作催化作用(catalytic)。由

此可见, 这种药物并不需要太大的剂量, 就足以发挥治疗功效。如果需要逆转蛋白质降解的作用, 只需要细胞重新再合成被降解蛋白就可以了。

细胞的泛素系统会经由一系列的步骤, 通过E3连接酶对靶标蛋白进行8.5kDa泛素蛋白标记物的标记。这种单泛素修饰(monoubiquitinated)的蛋白会继续经过多次泛素蛋白修饰, 成为多泛素修饰蛋白(polyubiquitinated protein), 然后被系统识别, 最终在26S蛋白酶体的作用下被细胞降解并清除。

几种能抑制蛋白质活性, 诱导其降解的小分子药物

早期的文献报道表明, 能够抑制蛋白质活性的小分子药物也可以诱导这些靶标蛋白质降解, 不过当时并不清楚当中具体

的降解机制。Canertinib (CI-1033)就是这样一种不可逆的酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor)。它可以诱导多泛素化修

饰，使酪氨酸激酶受体ErbB-2（又名HER2/neu，这也是多种人体肿瘤的重要治疗靶点）降解。Fulvestrant则是另外一种ER α 信号通路小分子抑制剂，同时也可以诱导ER α 降解。对于ER α 蛋白阳性的乳腺癌患者来说，使用Fulvestrant可以获得非常好的治疗效果，其疗效远远超过ER α 拮抗剂他莫昔芬（tamoxifen）。三氧化二砷（Arsenic trioxide）是APL的特效药，其部分作用机制也是降解PML-RAR α 。PML-RAR α 是APL特异性融合蛋白，它可以破坏骨髓细胞正常的分化过程。最近，人们又发现可以治疗MM的免疫调节药物lenalidomide会使CK1 α 和另外两个对于MM非常重要的转录

因子——Ikaros和Aiolos被泛素系统降解。其它能够诱导蛋白降解的小分子药物还包括可预防肿瘤的isothiocyanates，该药物能够选择性地与人体肿瘤细胞的 α 、 β 微管蛋白（ α 、 β -tubulins）结合，并促使其降解。CaCC_{inh}AO1则可以使需要钙离子激活的氯离子通道蛋白（calciumactivated chloride channel）ANO1降解。因此，CaCC_{inh}AO1可以抑制ANO1依赖性肿瘤细胞的生长。这些药物的成功也激发了科研人员们的兴趣，希望开发出更多类似的药物。不过，由于这些药物都是偶尔被发现的，所以我们目前还很难针对某个目的蛋白来开发出特异性的诱导降解药物。

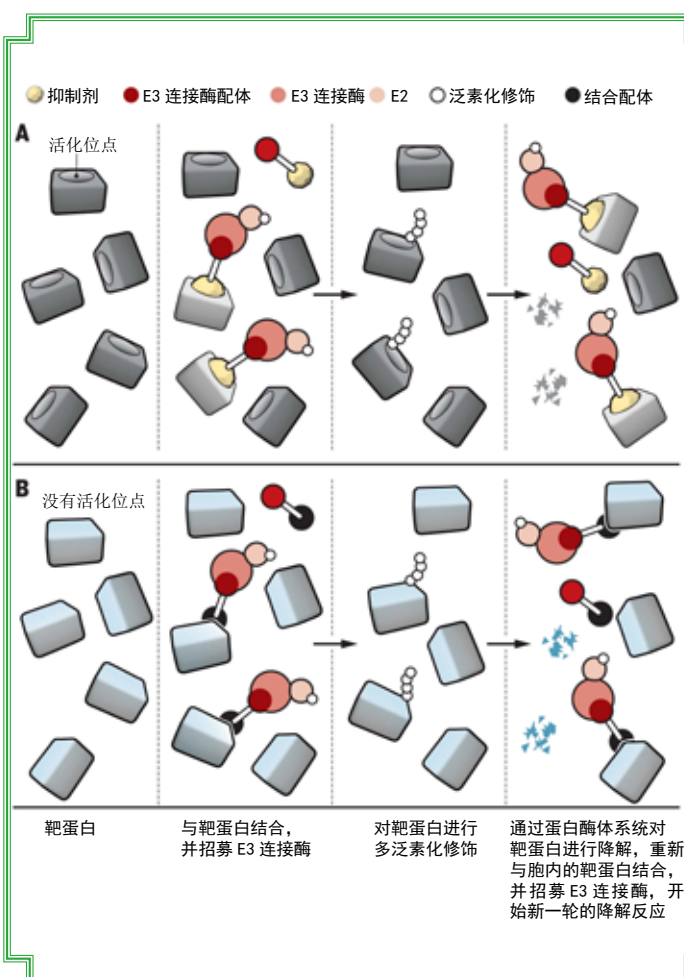


图2 事件驱动性的（Event-driven）药物开发策略。(A) 与各种蛋白酶（enzymatic proteome）的活性位点结合。一个嵌合分子与靶蛋白的活性位点结合，抑制靶蛋白功能；同时也利用标签（比如泛素蛋白）招募细胞蛋白质降解系统，完成对靶蛋白的降解。这种嵌合分子还可以以类似催化剂的方式反复发挥作用，因此，只需要较低的浓度就足以达到降解靶蛋白的目的。这套系统还可以干扰靶蛋白的非酶学功能。如果要恢复靶蛋白的功能，只能通过重新表达靶蛋白的方式。另外，这套系统也可以降解那些突变的靶蛋白，只要这些靶蛋白还能够与系统中用到的配体结合。(B) 与非蛋白酶（enzymatic proteome）的非活性位点结合。这种作用方式与(A)图类似，只不过不是特异性地与靶蛋白的活性位点结合，而是与靶蛋白的任意位点结合，这样就可以降解没有活性位点的靶蛋白，例如转录因子、结构蛋白等。

PROTAC技术

一般来说，E3泛素连接酶需要一个特定的识别信号（**recognition signal**）来帮助它寻找天然底物，以完成对底物的泛素化修饰作用。可是，借助蛋白水解靶向嵌合体技术（**proteolysis targeting chimera technology**），可以对任何蛋白质进行水解，即使是那些在天然状态下并不能够被泛素化修饰的蛋白质，也可以被水解掉。通过采用一种杂合的、有两种功能的分子（**heterobifunctional molecule**）来将靶蛋白与E3连接酶结合在一起，研究人员成功获得了PROTAC复合物，完成了泛素化修饰反应，令靶蛋白降解。最初，科研人员们在研究中发现脂肪连接子（**aliphatic linker**）——卵假散囊菌素（**ovalicin**）可以通过共价键将甲硫氨酸氨肽酶2（**methionine aminopeptidase 2**）和连接了泛素连接酶复合体SCF ^{β -TrCP}（**Skp1/Cullin/Fbox ^{β -TrCP}**）的磷酸肽（**phosphopeptide**）连接在一起。随后，他们将这个PROTAC复合物与非洲爪蟾（*Xenopus*）卵提取物一起孵育，结果甲硫氨酸氨肽酶2发生了泛素化修饰，并最终被降解。后来，科研人员们又使用同样的方法，成功地对雌激素受体和雄激素受体这两种分别在乳腺癌和前列腺癌中发挥了重要作用的蛋白质进行了泛素化修饰及降解操作。不过，这些第一代PROTAC操作都暴露出一个问题，即反应效率太低。科研人员们认为这可能是因为细胞膜对试验中用到的肽段（**peptide**）的通透性太低而导致的。

于是，科研人员们对PROTAC技术进行了改进，在第二代PROTAC操作中使用von Hippel-Lindau（VHL）这种抑癌蛋白替换了第一代PROTAC操作中用到的泛素连接酶复合体SCF ^{β -TrCP}蛋白。这些第二代PROTAC复合体结合分子上都含有一个来自von Hippel-Lindau蛋白天然底物——缺氧诱导因子1 α

（**hypoxia-inducible factor 1 α** ，**HIF1 α** ）转录因子的、较短的、含有羟基脯氨酸（**hydroxyproline**）的肽段。如果再同时使用一个靶向配体（**targeting ligand**）和一个细胞穿透肽段（**cell penetrating peptide**），那么就可以对细胞内的靶蛋白进行特异性的降解操作了。

虽然这些第一和第二代PROTAC蛋白降解药物都是可以穿透细胞膜的，但是还远远不足以当作药物来使用，因为还需要搭配供E3连接酶识别的肽段，同时也需要对细胞进行透化处理。鉴于此，科研人员们必须开发出一种非肽类的E3连接酶配体。只有这样，整套PROTAC蛋白降解体系才能够做到完全的小分子化，而且也只有这样，才能够不再需要对细胞进行透化处理。于是，有科研人员将选择性雄激素受体调控单位（**selective androgen receptor modulator**）与小分子抗癌药物nutlin结合到了一起。Nutlin是一种E3连接酶MDM2蛋白的配体，它可以破坏MDM2分子与其天然底物p53蛋白之间的结合。实验发现，这套PROTAC蛋白降解系统能够促使HeLa细胞中的雄激素受体与MDM2蛋白结合，并且最终降解这些雄激素受体。除此之外，以羟基脯氨酸为基础的小分子VHL配体（**hydroxyproline-based small-molecule VHL ligands**）的出现，也使PROTAC技术迎来了另外一次飞跃。因为这种以羟基脯氨酸为基础的小分子VHL配体可以替代过去在PROTAC技术中使用的HIF1 α 肽段。Bondeson等人使用这种新型分子设计了两套小分子PROTAC蛋白降解系统——PROTAC_ERR α 和PROTAC_RIPK2，分别特异性针对 α 雌激素相关受体（**estrogen related receptor alpha**, **ERR α** ）和丝氨酸苏氨酸激酶RIPK2。这两套新型降解系统在使用剂量较过去降低1000倍的情况下，分别可以使其靶蛋白水平降低90%以上。这些PROTAC

分子主要发挥的都是靶蛋白特异性的催化作用。目前多个研究团队也都开发出了类似的PROTAC系统，并且已经进入了临床前试验阶

段。我们将在下文继续介绍其中的几款代表性药物。

PROTAC技术未来的发展

正如前文所述，一套小分子PROTAC系统主要由3个部分组成，分别是能够与靶蛋白结合的配体（**target binding ligand**）、能够与E3连接酶结合的配体（**E3 ligase-binding ligand**），以及一个将这两个部分结合到一起的连接子（**linker**）。在一个成功的PROTAC系统里，这3个组成成员都必须得到尽可能的优化。幸运的是，我们已经储备了大量高亲和力的配体和各种小分子药物。有了如此充足的“弹药”，我们就能够对任何目标（肿瘤）蛋白发动攻击。

尽管人体大约有700多种内源性E3连接酶，可是目前被应用于PROTAC系统的，只有少数几个E3连接酶，因为科研人员们只开发出了这几个E3连接酶的配体，包括VHL、CRBN、MDM2和细胞凋亡蛋白1抑制子（**cellular inhibitor of apoptosis protein 1, cIAP1**）等。目前人们已经开发出了3种小分子CRBN配体，分别是**thalidomide**、**lenalidomide**和**pomalidomide**（这是一种免疫调节药物，用于治疗多发性骨髓瘤）。甲基贝他定（**Methyl bestatin, MeBS**）和**nutlin**则分别是cIAP1和MDM2蛋白的配体。在PROTAC系统中，除了靶蛋白配体和E3连接酶配体之外，连接子也非常重要。连接子的长度、亲水性和刚性等特征都必须适合各自的PROTAC系统，以便能够更好地穿透细胞膜进入细胞，同时也需要尽可能地帮助E3连接酶与靶蛋白结合在一起。

最近的研究工作也证实，所有这些PROTAC系统组分都非常重要，每一个分子发生任何一点微小的改变，都有可能给靶蛋白

降解带来明显的影响。比如有专门针对BCR-ABL融合酪氨酸激酶（是一种癌蛋白，与慢性髓细胞白血病的发病有关）的PROTAC研究就发现，酪氨酸激酶小分子抑制剂治疗这类疾病的效果非常好，虽然有部分患者表现出耐药，但这也是目前临床工作中的常规用药。科研人员们设计了多种连接子，将**imatinib**、**bosutinib**或**dasatinib**等c-ABL激酶结构域小分子抑制剂与VHL小分子配体，或者沙利度胺衍生物（**thalidomide derivative**）**pomalidomide**结合。这4种连接子中，只有1种连接子比较合适。可是**imatinib PROTACs**系统虽然能够与靶蛋白结合，并且抑制其功能，却没能按照我们的设想，降解BCR-ABL蛋白或c-ABL蛋白。不过**dasatinib-CRBN**和**bosutinib-CRBN PROTAC**系统都成功地降解了BCR-ABL蛋白和c-ABL蛋白。这说明，仅仅靠亲和力还不足以降解靶蛋白，因此，选择靶蛋白配体是非常重要的。**Bosutinib-VHL PROTAC**系统也不能降解BCR-ABL蛋白或c-ABL蛋白，而**dasatinib-VHL PROTAC**系统只能降解c-ABL蛋白，这说明改变E3连接酶配体可以改变PROTAC系统对靶蛋白的降解能力，以及对靶蛋白的选择特异性。从原理上来说，我们是可以对降解的特异性进行精细的调整，比如从不能降解任何靶蛋白，调整到选择性降解某一个靶蛋白（如只降解c-ABL蛋白），再调整到选择性降解多个靶蛋白（如只降解BCR-ABL和c-ABL蛋白）。我们需要做的只不过是选择不同的靶蛋白配体和E3连接酶配体组合而已。这种特异性的搭配也可以帮助科研人员选择各种抑制剂药物，从而开发出各种PROTAC系统。

其它靶蛋白定向降解策略

除了PROTAC方法之外，科研人员也开发出了其它几种极有前景的靶蛋白定向降解策略，这些方法全都使用小分子药物。比如，Itoh等人开发的MeBS（cIAP1配体）和全反式维甲酸（all-trans retinoic acid, ATRA，维甲酸受体配体，治疗APL的特效药）系统。该系统可以招募cIAP1，然后将细胞内的维甲酸结合蛋白（retinoic acid-binding protein, CRABP）降解。而且，这套系统还可以抑制IMR-32神经母细胞瘤细胞的迁移，因为该迁移过程也需要CRABP-II的参与。这套PROTAC系统名为SNIPER（specific and nongenetic IAP-dependent protein eraser, SNIPER，即特异性、非遗传性、IAP依赖性蛋白降解）PROTAC。由于它主要由MeBS与各个靶蛋白的配体组合而成，因此可以通过招募cIAP1蛋白来完成靶蛋白泛素化修饰，及蛋白质降解任务。Okuhira等人将这套SNIPER系统与ER α 的配体——4-羟基他莫昔芬（4-hydroxy tamoxifen）搭配，成功地使ER α 降解，并且让表达了ER α 的MCF-7乳腺癌细胞死亡。还有一种类似于PROTAC技术的方法，不过此时使用的不是像在PROTAC系统中那样的大分子融合药物，而是两个独立、分开的小分子药物。这两部分药物进入细胞之后才会结合到一起，这样一来，PROTAC系统就更加容易进入细胞，也就拥有了更好的生理化学特性。有科研人员利用这种技术，成功地利用E3连接酶cereblon降解了重要的抗癌治疗靶点——

BRD4蛋白和ERK1/2蛋白。

疏水性标签（hydrophobic tag）则是另外一种靶蛋白定向降解策略，此时主要发挥蛋白质降解作用的是UPS。未完全折叠、或者错误折叠的蛋白质表面都会暴露出疏水肽段，这些疏水性标签就会招募细胞内的E3泛素连接酶，对其进行泛素化修饰，然后将其降解。科研人员们也成功地利用了细胞的这种自我清理机制，在识别靶蛋白的小分子配体上添加一个低分子疏水标签，完成了对靶蛋白的清除任务。比如，就有研究者利用这种策略，在HER3假激酶蛋白（这也是一个一直被认为是“无药可治”的肿瘤靶标蛋白）选择性配体TX1-85-1上添加了一个疏水标签，形成了一个有两种功能的TX2-121-1复合物，成功地降解了HER3假激酶蛋白。依赖HER3蛋白的细胞被TX2-121-1处理之后，HER3蛋白的表达被抑制了，相应的下游信号通路也被抑制了，并最终抑制了细胞的增殖。Gustafson等人则利用这种疏水标签技术开发了一个雄激素受体选择性降解系统（selective androgen receptor degrader, SARD）。研究发现，SARD279与恩扎鲁胺（enzalutamide）的疗效相当，可以抑制人前列腺癌细胞的增殖。我们知道，enzalutamide是经FDA批准的雄激素受体信号通路抑制剂。更重要的是，对于对enzalutamide耐药的前列腺癌细胞SARD279同样有效。

已经进入临床前试验阶段的抗癌蛋白降解类药物

近两年来，抗癌蛋白降解类药物的开发工作取得了长足的进展，对于几种重要的肿瘤靶点，这些抗癌蛋白降解类药物不论从特异性，

还是疗效方面，都有重大突破。比如BRD4这种BET蛋白，在急性髓细胞白血病、多发性骨髓瘤、Burkitt淋巴瘤、卵巢癌和前列腺癌等多

种肿瘤的进展中都起到了重要的作用。因此，科研人员们也开发出了多种BET蛋白小分子抑制剂，并且其中很多已经进入了临床试验阶段。以现有的数据来看，这些抑制剂只能够对下游的*c-MYC*癌基因蛋白起到部分抑制作用，而且肿瘤细胞还会通过上调BRD4蛋白水平的方式，发挥代偿（耐药）作用。

多个实验室都报道称，使用PROTAC系统可以降解细胞内的BRD4蛋白。比如，Lu等人就开发了一套ARV-825系统，它联合BET抑制剂OTX015，通过招募CRBN E3连接酶来降解BRD4蛋白。BL细胞实验证明，ARV-825系统仅仅在次纳摩尔级的浓度水平就足以让细胞内的BRD4蛋白几乎彻底降解，同时它还能抑制*c-MYC*蛋白的表达。此外，ARV-825系统诱导BL细胞凋亡的能力也远远强过JQ1和OTX015等传统的BET抑制剂。Winter等人开发的dBET1系统则是将JQ1和邻苯二甲酰亚胺

（phthalimide）相连，同时利用了cereblon E3连接酶。dBET1系统对于急性髓细胞白血病细胞和淋巴瘤细胞都有极强的抗增殖作用，效果远远好于JQ1。此外，在急性髓细胞白血病小鼠移植动物模型试验中发现，dBET1系统也可以抑制白血病病情的进展。Raina等人开发的ARV-771系统利用VHL E3连接酶来降解BET蛋白。研究人员在多个前列腺癌细胞系试验中发现，ARV-771系统在次纳摩尔级的浓度水平就可以起到降解BET蛋白的作用。而且，ARV-771系统也能够抑制对enzalutamide耐药的前列腺癌细胞的增殖。同时，在前列腺癌小鼠移植动物模型试验中也发现，ARV-771系统也能够抑制对去势治疗（castration）无效的前列腺癌细胞的增殖。Zengerle等人将JQ1与配体结合，同时联合VHL E3连接酶，开发了一套BRD4 PROTAC系统。体外细胞实验证实，这套系统可以选择性地降解BRD4蛋白。

总结

靶蛋白定向清除抗癌策略最有吸引力的一点在于，目前有很多靶蛋白都是还没有开发出相应的抑制剂药物的。比如，结构蛋白（scaffolding proteins）、假激酶（pseudokinases）和转录因子（transcription factors）等。在人体蛋白质组中，有80%的蛋白质都处于“无药可治”的状态。这些蛋白质既不是酶，也不是受体，无法被抑制剂结合。要锁定这些蛋白质，就先得开发出一个特异性的识别配体。不过，由于PROTAC系统可以与靶蛋白表面的任何位点结合（并不限定于活性位点）（图2），因此，开发相应的识别配体还是要简单得多。所以，有了PROTAC系统之后，这些原本“无药可用”的蛋白质靶点也都可以成为治疗的靶标。

靶蛋白降解技术还可以解决让人头痛的

耐药问题。在使用靶蛋白抑制剂治疗时，肿瘤细胞会上调被抑制靶蛋白的表达量，或者使靶蛋白突变，起到代偿作用，从而导致了耐药问题的发生。目前，不论是针对BET蛋白的PROTAC系统，还是针对雄激素受体蛋白的PROTAC系统，在临床前试验中都取得了非常不错的试验结果，我们也似乎看到了解决耐药性问题的曙光。比如对西妥昔单抗（cetuximab）耐药的非小细胞肺癌细胞，就会大量表达西妥昔单抗的作用靶点——上皮生长因子受体。而使用PROTAC系统就可以极大地降低上皮生长因子受体的水平，从而抑制上皮生长因子受体的功能。最后需要提醒读者的是，虽然本文一直在介绍PROTAC系统在抗癌治疗方面的作用，但是该技术也可应用于其它疾病的治疗和药物开发工作。

原文检索:

Jocelyn Kaiser. (2017) When less is more. *Science*, 355(6330): 1144-1146.

Mark A. Dawson. (2017) The cancer epigenome: Concepts, challenges, and therapeutic opportunities. *Science*, 355: 1147-1152.

Christopher J. Lord¹ and Alan Ashworth. (2017) PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*, 355: 1152–1158.

Bjoern Papke & Channing J. Der. (2017) Drugging RAS: Know the enemy. *Science*, 355: 1158–1163.

Jemilat Salami and Craig M. Crews. (2017) Waste disposal—An attractive strategy for cancer therapy. *Science*, 355: 1163-1167.

Eason、张洁/编译



百态·频道

www.LifeOmics.com

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

岗位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

慢病毒包装服务

重磅来袭，低至 **2000** 元！

促销日期 2018 年 3 月 15 日 - 6 月 15 日

- 重磅新推出小规格，不分长短，震撼价2000元
- 高滴度 $\geq 1 \times 10^8$ TU/mL
- 实验周期短；现货产品多
- 小规格分装，避免反复冻融
- 100000+个现货ORF质粒,10000+个miRNA上调和下调质粒，5000+个shRNA质粒，5000+个启动子质粒（物种涵盖人小鼠大鼠），免使用费

产品名称	滴度	规格	特惠价
ORF 慢病毒 Promoter 慢病毒 lncRNA 慢病毒	$\geq 10^8$ TU/ml	100ul (50ul× 2管)	¥ 2,000
miRNA 过表达慢病毒 miRNA inhibitor 慢病毒	$\geq 2 \times 10^8$ TU/ml	50ul (50ul×1管)	¥ 2,000
shRNA 慢病毒	$\geq 2 \times 10^8$ TU/mL	50ul (50ul×1管) 200ul (50ul× 4管)	¥ 2,000 (单条shRNA) ¥ 6,400 (一套4条)

客户发表文章举例：

- ◆ A predictive computational framework for direct reprogramming between human cell types. 2016. *Nature Genetics*, IF 27.959. Lv165 vector expressing CDH1, FOS, FOXQ1, IRF1, MAFB, REL, SMAD1, SOX9, SOX17, TAL1 or TCF7L1.
- ◆ Integrin- $\alpha 10$ dependency identifies RAC and RICTOR as therapeutic targets in high-grade myxofibrosarcoma. 2016. *Cancer Discovery*, IF 20.011. Lentivirus construct bearing ITGA10 (Lv151).
- ◆ Helicobacter pylori-induced cell death is counteracted by NF- κ B-mediated transcription of DARPP-32. 2016. *Gut*, IF 16.658. Lentivirus Lentivirus particles expressing DARPP-32 shRNA or control shRNA.
- ◆ Micellar delivery of miR-34a modulator rubone and paclitaxel in resistant prostate cancer. 2017. *Cancer Research*, IF 9.122. Lentivirus encoding GFP and luciferase (LP-hLUC-Lv201-0200).

DIY系列 慢病毒包装试剂

任意 2 款: 9.5 折!

任意 3 款: 8.5 折!

任意 4 款: 7.5 折!

OmicLink™ 慢病毒
载体表达克隆

包装质粒



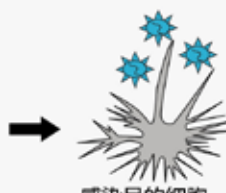
共转染



包装细胞



包装细胞产生假病毒颗粒



感染目的细胞



目标基因成功转导并稳定表达

图 1. 慢病毒包装使用流程

产品列表

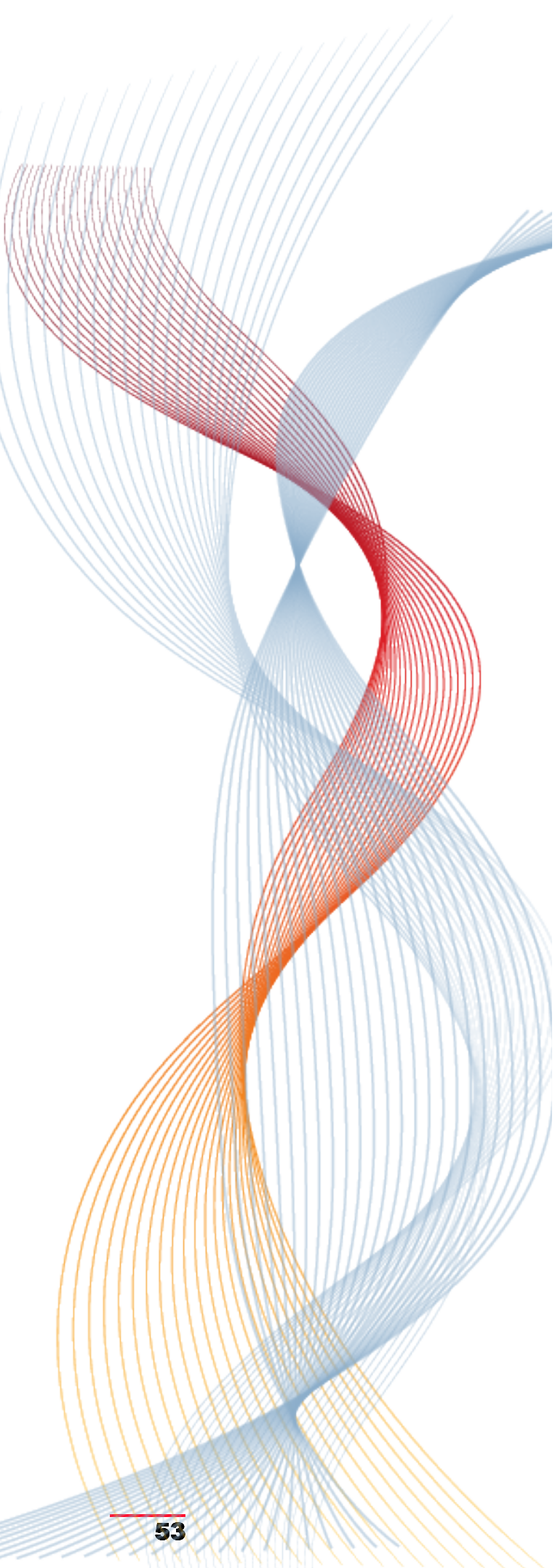
产品名称	产品特点	货号	规格	目录价
Lenti-Pac™ 慢病毒包装试剂盒 Hot!	含优化的慢病毒包装质粒、高效转染试剂和专利滴度增强配方。	LT001	20 rxns	¥4736
		LT002	40 rxns	¥7912
		LT003	5 rxns	¥1500
Lenti-Pac™ 慢病毒浓缩试剂盒 Hot!	操作简便, 甩掉复杂操作或复杂仪器, 普通离心机 + 简单几步。	LT007	50 ml	¥1500
Lenti-Pac™ HIV qRT-PCR 慢病毒滴度检测试剂盒	利用 qPCR 法快速、简便测定慢病毒拷贝数。	LT005	20 次 RT+ 50 次 qPCR	¥2850

★ 强烈建议, 转染细胞前进行支原体检测, 以保证实验顺利进行

客户发表文章举例:

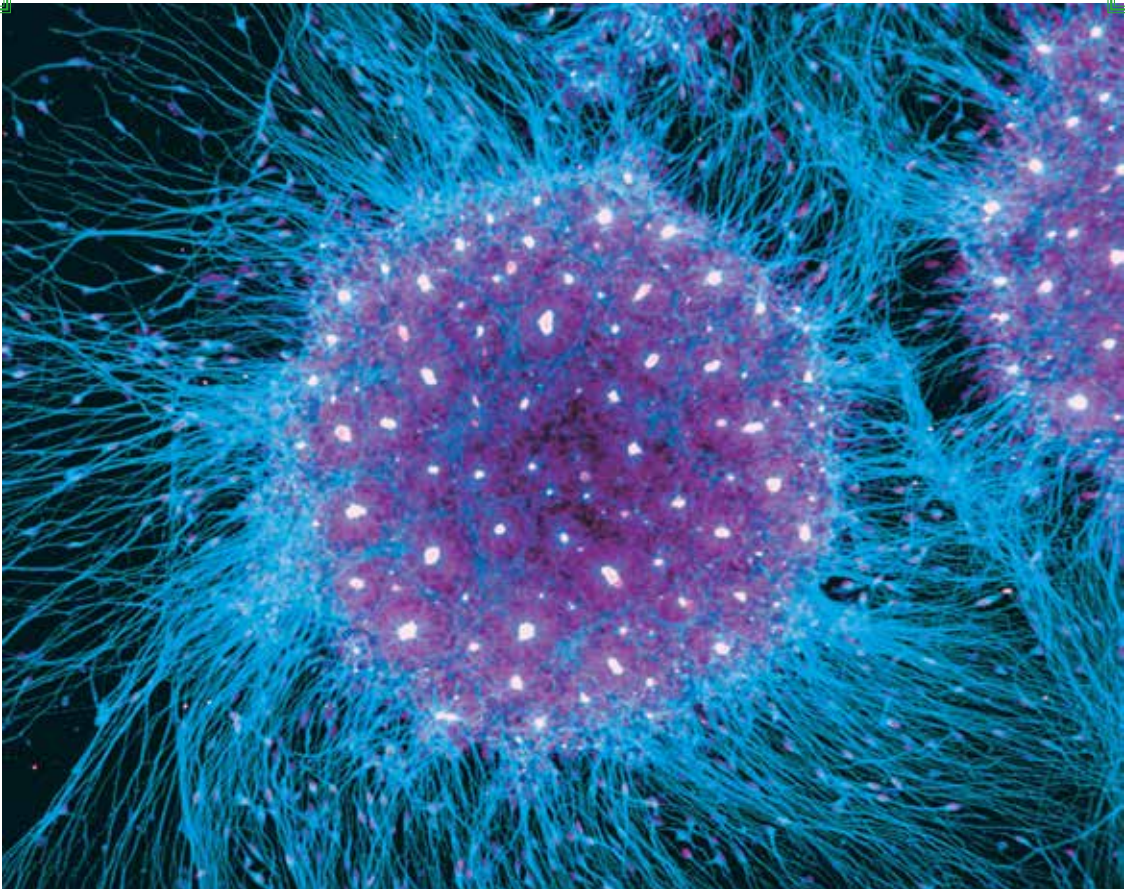
- Comprehensive models of human primary and metastatic colorectal tumors in immunodeficient and immunocompetent mice by chemokine targeting. 2015. *Nature Biotechnology*, IF 41.667. Lenti-Pac HIV Expression Packaging Kit (LT001).
- GPRC5A suppresses protein synthesis at the endoplasmic reticulum to prevent radiation-induced lung tumorigenesis. 2016. *Nature Communications*, IF 12.124. Lenti-Pac HIV Expression Packaging Kit (LT001).





热点

引发生物学 革命的细胞



这是一个体外培养的人体胚胎干细胞分化、增生形成的神经元细胞球。

人体胚胎干细胞（embryonic stem cell）经过了二十年的风风雨雨，已经彻底改变了生物学的基本概念，并大踏步地走进临床。

1998年，在Dieter Egli刚刚开始他的研究生学习生涯时，有关科研人员开发出了获取人体胚胎干细胞的技术。20多年过去了，人体胚胎干细胞彻底融入了Egli的职业生涯当中。如今，Egli已经是美国哥伦比亚大学（Columbia University in New York City）的一名生物学家，他已经通过对人体胚胎干细胞的研究，了解了DNA的重编程机制（reprogramme），也解决了糖尿病发病机制及治疗方面的一些难

题。他甚至还参与开发了一种新型的人体胚胎干细胞，这种新细胞能够极大地简化基因研究工作。

Egli的研究范围如此广泛，这让他成为了人体胚胎干细胞研究领域的领军人物。由于伦理方面的原因，人体胚胎干细胞研究领域受到了诸多的限制和挑战。不过即便如此，很多人仍然认为，这个研究方向比过去更有价值了。Egli对人体胚胎干细胞非常着迷。他相信这个

研究领域一定还会有能够改变我们生活的、前所未有的新发现。Egli对此充满了信心。

胚胎干细胞能够为我们提供大量与胚胎早期发育有关的信息，就好像天文学家通过研究宇宙大爆炸（big bang）来从根本上认识宇宙本质一样，生物学家也可以在胚胎干细胞这个“生命之源”里搜寻线索，来了解一个简单的细胞是如何演变成上亿个具备不同形态、不同功能的细胞的。科研人员已经知道如何使胚胎干细胞分化为机体内各种成熟的细胞。这些

细胞可用于药物检测、构建病理模型，或者用于治疗疾病。早在2010年，就有人尝试使用胚胎干细胞来治疗脊髓损伤，后来又有十几次胚胎干细胞临床试验陆续进行，用于治疗各种疾病，比如帕金森氏病和糖尿病等。这些临床试验获得的初步结果都挺不错，而本周公布的一项结果也很亮眼，是用干细胞来治疗老年黄斑变性（age-related macular degeneration）的临床试验，有两名患者经过治疗之后，视力得到了改善。

初期发展历程

早在1981年，科研人员就尝试在小鼠胚胎里培育干细胞。随后，他们意识到这些小东西具有巨大的潜力。这些干细胞不但可以不断地复制增殖，还可以分化出200多种小鼠体内的不同细胞。不过这项试验技术在随后的灵长类动物实验中屡遭失败。美国威斯康星大学麦迪逊分校（University of Wisconsin-Madison）的生物学家James Thomson花了14年才终于在猴子试验中获得了成功。三年后，他又利用人体辅助生殖工作中的无用胚胎，获得了世界上第一个人体胚胎干细胞系。

不过这一成果立即引起了潮水般的批评。尤其是宗教界，他们认为胚胎是人体之母，不得亵渎，因此他们抵制一切相关的工作。2001年，美国总统George W. Bush签署了限制令，要求联邦政府科研基金只能资助少数几个已有的胚胎干细胞系相关研究。这些禁令迫使在美国从事相关研究的科研人员只能寻求私人资金，或者各州资金的支持。而这些实验室往往都两条腿走路：一方面开展胚胎干细胞相关的研究，另一方面开展其它的工作，以争取美国政府的科研资金。在德国、意大利等国甚至连分离、培养胚胎干细胞的工作都被禁止了。

尽管困难重重，胚胎干细胞的研究工作还是进行了下去。美国、澳大利亚、新加坡、以色列和加拿大等国的科研人员很快就发现了将胚胎干细胞诱导成为神经元细胞、免疫细胞和心肌细胞等多种成熟细胞的方法。

科研人员还在尝试开发以体细胞核转移技术（somatic-cell nuclear transfer）培育的胚胎（即克隆动物多利羊的胚胎）为材料，获取胚胎干细胞的新方法。有了这种治疗性克隆（therapeutic cloning）技术，我们就可以为每一个个体量身定做出无数个干细胞。随后，科研人员又开始尝试在培养皿中研究复杂的遗传疾病，以及像更换汽车零件一样更换人体组织和器官。最开始，他们也经历过几次挫折，比如2005年韩国科学家Woo Suk Hwang的造假丑闻等。Woo Suk Hwang在2005年5月刊的《科学》（Science）杂志上发表论文中的干细胞数据是伪造的，伪造数据包括论文数据中的DNA指纹分析、畸胎瘤和胚胎照片、组织适合性和血型分析等。该论文宣称用患者体细胞克隆出的与患者基因吻合的11种特制型胚胎干细胞被证实也不存在。直到2013年，美国俄勒冈健康科学大学（Oregon Health and Science University in Portland）的干细胞研

究者Shoukhrat Mitalipov终于取得了成功。

发展到今天，众多从事胚胎干细胞研究的科研人员都将研究重点集中到了干细胞的多潜能性（**pluripotency**）上，即干细胞如何分化为各种成体细胞。慢慢地，其中的分子信号通路也逐渐被弄清楚了。据Mitalipov介绍，他们通过对胚胎干细胞的研究，已经了解了很多潜能性的信息。

这些研究工作极大地推动了再生医学（**regenerative medicine**）和生物学研究在21世纪的发展。比如，人们发现了诱导多潜能干细胞（**induced pluripotent stem cell, iPS cell**）。2006年，日本京都大学（**Kyoto University**）的干细胞生物学家Shinya Yamanaka研究出将小鼠成体细胞（**adult mouse cell**）诱导成胚胎样干细胞的方法，而该方法只需要4个遗传因子就足够了。一年之后，Shinya Yamanaka又和Thomson一起，成功地将人成体细胞诱导成了胚胎样干细胞。他们的这一研究成果从理论上来看，具有和治疗性克隆同样的价值，而且不会引发伦理冲突。

此后，很多人预言，iPS细胞将彻底取代胚胎干细胞的地位。不过十几年过去了，这一幕还没有出现。胚胎干细胞相关研究论文的发表数量在2006年之后还是在快速增长。自2012年以来，每年发表的胚胎干细胞相关研究论文数目都在2000+。部分原因是胚胎干细胞仍为该领域的金标准，在开展iPS研究时，需要用胚胎干细胞来做参照。另外一个原因是即使到了今天，iPS细胞的安全性还存在不确定性。中国科学院北京动物研究所（**Chinese**

Academy of Sciences Institute of Zoology in Beijing）的干细胞生物学家Zhou Qi就表达了他对iPS细胞的担忧，因为iPS细胞可能会致癌，所以他在他参与的十几项临床试验里，使用的都是胚胎干细胞。

此外，随着研究的深入，胚胎干细胞的使用也越来越方便了。比如起初获取胚胎干细胞的方法非常麻烦，而且需要很多技巧，研究人员必须小心地从胚胎中挑选出一个胚胎干细胞，然后进行培养、增殖，而这个功夫在整个工作中仅仅只占不到1%的时间。到了2007年，日本神户RIKEN发育生物学研究中心（**RIKEN Centre for Developmental Biology in Kobe, Japan**）的Yoshiki Sasai发现了一个ROCK抑制剂分子，这个分子可以对胚胎干细胞起到保护作用，使其不会从胚胎中分离的时候死亡。这一发现一下子让胚胎干细胞分离的成功率提高了27%。瑞典Lund大学（**Lund University in Sweden**）的细胞生物学家Malin Parmar现在就正在开展临床试验，利用胚胎干细胞诱导分化的神经元细胞来治疗帕金森氏病。他表示，这一研究成果从根本上影响了他们的研究工作，而且也让整个胚胎干细胞研究进入了一个黄金时代。

现在，我们可以快速、可靠、无限期地获得大量的胚胎干细胞，而且还不会癌变。日本东京大学（**University of Tokyo**）的干细胞生物学家Hiromitsu Nakauchi一直在研究如何利用胚胎干细胞和iPS细胞获得血小板。但至于为什么胚胎干细胞不会癌变，他们现在还没有弄清楚。

诱导分化

科研人员也在研究如何利用胚胎干细胞培育出组织和器官。只要给予了正确的信号因子和三维立体环境，胚胎干细胞就可以在

体外培养环境中自我组织成复杂的“类器官（**organoids**）”。这种能力对于美国辛辛那提儿童医院（**Cincinnati Children's Hospital**

in Ohio) 的科研人员 James Wells 等人来说非常重要。Wells 正在为药物检测工作开发肠道类器官, 而且他们希望将来也可以将这些类器官用于人体移植, 从而起到治疗的作用。

胚胎干细胞还可以用于遗传疾病的研究。比如早在2004年, 美国芝加哥的生殖医生就开始在体外受精 (in vitro fertilization) 试验中使用胚胎干细胞技术。针对因发现遗传缺陷而不能使用的胚胎, 这些医生会从中提取胚胎干细胞, 并培育成细胞系。他们通过这种方法, 获得了包括地中海贫血 (thalassaemia)、亨廷顿舞蹈病 (Huntington's disease)、马凡氏综合征 (Marfan's syndrome) 和肌肉萎缩症 (muscular dystrophy) 等多种疾病在内的遗传性疾病细胞病理模型。2007年, 科研人员利用胚胎干细胞确定了脆性X染色体综合征 (Fragile X syndrome) 的分子异常情况。

不过, 科研人员也表示, 在构建细胞病理模型方面, iPS 细胞的确更有优势, 因为这种技术可以为任何一位患者培育出相应的干细胞。然而也有很多科研人员认为, 胚胎干细胞在这个领域同样有非常大的潜力。很多疾病只会对成体细胞造成损伤, 若此时再利用这些损伤的细胞培育 iPS 细胞就没有什么意义了, 而胚胎干细胞就不存在这种问题。

比如在2008年, 美国哈佛大学 (Harvard University in Cambridge, Massachusetts) 的 Kevin Eggan 利用神经变性疾病——肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 患者的细胞, 培育出了 iPS 细胞。之前, Eggan 曾利用胚胎干细胞对这种疾病进行过研究, 他已经知道如何诱导干细胞分化出

运动神经元细胞和脑神经元细胞等会受到 ALS 疾病影响的细胞。当他获得了 ALS iPS 细胞之后, 马上就培育出了相应的运动神经元细胞和脑神经元细胞, 并且与之前的细胞进行了对比。结果发现, 患者的细胞要比健康人的细胞更加活跃。Eggan 表示, 结合之前在胚胎干细胞上的研究成果, 他们对 ALS 患者的运动神经元细胞有了更多的认识 and 了解。现在, 他们正在用一种能够使 ALS iPS 细胞 ‘安静’ 下来的抗惊厥药物 (anti-seizure) 做临床实验。预计再过两个月, 他们就可以看到实验结果了。

希伯来大学 (Hebrew University of Jerusalem) 的 Egli 和 Nissim Benvenisty 则根据只有23条染色体的胚胎干细胞 (即单倍体细胞), 彻底颠覆了人体生物学领域里一个经典概念。他们正在借助基因编辑技术, 对这些单倍体胚胎干细胞展开研究, 看看基因在人体发育过程中起到了哪些作用。Egli 表示, 由于这些细胞内只有一套染色体, 因此, 得到的结果也更加直接。

不过, 利用胚胎干细胞开展疾病研究, 并非一帆风顺。比如美国哈佛大学干细胞研究所 (Harvard Stem Cell Institute in Cambridge) 的 Douglas Melton 就花了15年来诱导胚胎干细胞分化成能够分泌胰岛素的胰腺 beta 细胞。不过他还是无法分辨, 利用胚胎干细胞分化出的 beta 细胞, 与利用1型或2型糖尿病患者 iPS 细胞分化出的 beta 细胞有什么区别。据 Melton 介绍, 我们知道, 糖尿病患者存在遗传易感性 (genetic susceptibility), 但是在体外实验中, 他们无法观察到这个现象。

细胞再生

Melton 还是没有放弃自己用胚胎干细胞培育出的 beta 细胞。他希望能够将这些细胞移植

到1型糖尿病患者体内, 从而发挥治愈疾病, 或者减轻病情的作用。目前, 他面临的最大困

难在于如何保证这些移植到患者体内的beta细胞不会被患者自身的机体免疫系统给清除掉。Semma治疗公司（Semma Therapeutics）是Melton在美国加利福尼亚州坎布里奇创办的一家科技公司，他们目前的主要工作就是研究将这些beta细胞装在一个人工装置里，制成一个人工胰腺，营养物质和beta细胞分泌的胰岛素可以自由进出这个人工胰腺，但是人体免疫系统不会对其中的外源beta细胞造成任何伤害。Melton计划在3年之内开展临床实验。美国加利福尼亚州圣地亚哥市的ViaCyte公司也在2014年刚刚启动了一个类似的临床实验项目，他们也是开发了一项细胞包裹新技术。丹麦的Novo Nordisk公司也正在启动类似的，利用胚胎干细胞治疗糖尿病的项目。

在临床领域，很多人都认为iPS细胞最终会超越胚胎干细胞。他们认为，iPS细胞最大的优势在于，这些细胞与患者自身完全同源，因此不会存在免疫排斥的问题。但是对于1型糖尿病这种遗传性疾病，iPS细胞也同样会携带有遗传缺陷，所以就起不到纠正遗传缺陷和治疗的作用了。

还有一个问题就是费用。据美国加利福尼亚州Scripps研究所（Scripps Research Institute in La Jolla, California）的干细胞生物学家Jeanne Loring介绍，目前为患者制备临床使用的iPS细胞需要大约100万美元。这几乎完全不可操作。不过Loring认为这个费用将来一定会下降，她也在开展用iPS细胞治疗帕金森氏病的研究工作。

到目前为止，科研人员只开展了一项iPS细胞人体实验，那就是日本RIKEN发育生物学中心（RIKEN Center for Developmental Biology）的眼科专家Masayo Takahashi开展的用iPS细胞治疗黄斑变性疾病（macular degeneration）的实验。不过该实验已经于2014年终止，因为当时他们决定简化流程，使用由志愿者捐赠的iPS细胞，而不是患者自身

来源的iPS细胞。该项目在去年又重新启动，可是在今年1月又遇到了麻烦，有一位患者的眼睛里长出了一层膜，因此不得不接受手术，将其切除。

黄斑变性疾病一直是胚胎干细胞治疗研究工作中最常见的一种疾病。在美国、英国、韩国、中国和以色列，至少已经开展了6个相关的临床实验。今年3月19日，英国伦敦治盲项目（London Project to Cure Blindness）的负责人，美国加州大学圣巴巴拉分校（University of California, Santa Barbara）的眼科专家Pete Coffey报告了他们的研究成果，他们将由胚胎干细胞分化出的细胞植入了两名视网膜受损的患者眼内。一年之后，患者就能够重新阅读了。

美国梅奥医学中心（Mayo Clinic in Rochester, Minnesota）的眼科医生Alan Marmorstein认为，这是他们眼科领域的一大科技进步。这也是我们头一次看到，干细胞治疗的治疗功效，并极大地促进了其它领域的干细胞治疗研究。Coffey认为，我们终于等到了这一重大研究成果，科研人员终于知道如何将干细胞植入人体，并且发挥治疗效果。据他介绍，十年前，他们认为只需要把细胞放到人体内就行了，细胞知道它们自己该干什么。可事实却并非如此，这些细胞还是得按照特定的方式才能够发挥作用。很多从事干细胞研究的科研人员认为，接下来我们即将能看到用干细胞治疗帕金森氏病的功效。帕金森氏病是因脑内神经递质多巴胺（dopamine）缺乏而导致的一种疾病，目前已有6家公司和医疗机构在利用胚胎干细胞或iPS细胞开展治疗帕金森氏病的研究工作。

值得思索的一个关键的问题是，在干细胞移植之前，应该使其分化、成熟到何种程度呢？2016年在澳大利亚开展的一项帕金森氏病临床实验，以及2017年在中国开展的一项帕金森氏病临床实验都使用了不成熟的神经前体细

胞，这些细胞都不能分泌多巴胺。科研人员认为，使用不成熟的前体细胞可以帮助这些植入的细胞更好地在人体内存活，并能更好地与患者的身体融合。但是GForce-PD项目（这是集

合了好几个胚胎干细胞和iPS细胞来治疗帕金森氏病临床实验项目的组织）的负责人认为，分化程度越高的干细胞，越容易形成多巴胺分泌细胞，而且也更容易受控制。

未来的发展

如果胚胎干细胞研究跨越了某些障碍，那么未来应该还有很大的发展空间。其中一大障碍就是还无法利用胚胎干细胞培育出很多类型的成熟细胞。据Melton估计，到目前为止，我们只能培育出大约十种具备正常功能的终末细胞。而且其中还有很多细胞，比如精子细胞和卵子细胞离临床应用还有相当长的一段距离。这些都是未来我们需要解决的问题。

还有一个问题就是科研经费来源的不确定性。比如我们经常听到有传言称，美国总统Donald Trump又要颁发干细胞研究禁令了。

虽然干细胞研究的道路上充满了挑战，但总是能够给我们带来惊喜，并且一次又一次地、出乎意料地证明了它们的价值。很多科研人员甚至都减少了动物模型的用量，因为胚胎干细胞在研究人体疾病方面，似乎比动物模型更加合适。Melton自己的科研格言就是：在任

什么时候，只用人体材料。

Yamanaka认为，胚胎干细胞就是激励他开展iPS细胞研究的源动力。是Thomson的人体胚胎干细胞研究成果让他们能够在短短一年的时间里，就获得了从小鼠iPS细胞到人体iPS细胞的成功。而在此之前，研究人员用了整整20年，才获得了由小鼠胚胎干细胞到人胚胎干细胞的成功。Yamanaka表示，他们已经非常清楚如何培育人体iPS细胞了。

Yamanaka认为，直至今今天，胚胎干细胞仍然是非常重要的，它可以帮助我们更好地了解多潜能性的作用机制，也可以帮助我们更好地在临床上使用这些具备多向分化潜能的细胞。我们在十几年前才认识到胚胎干细胞的重要性，而且他也认为这种重要性还将继续维持下去，还能维持至少20年。

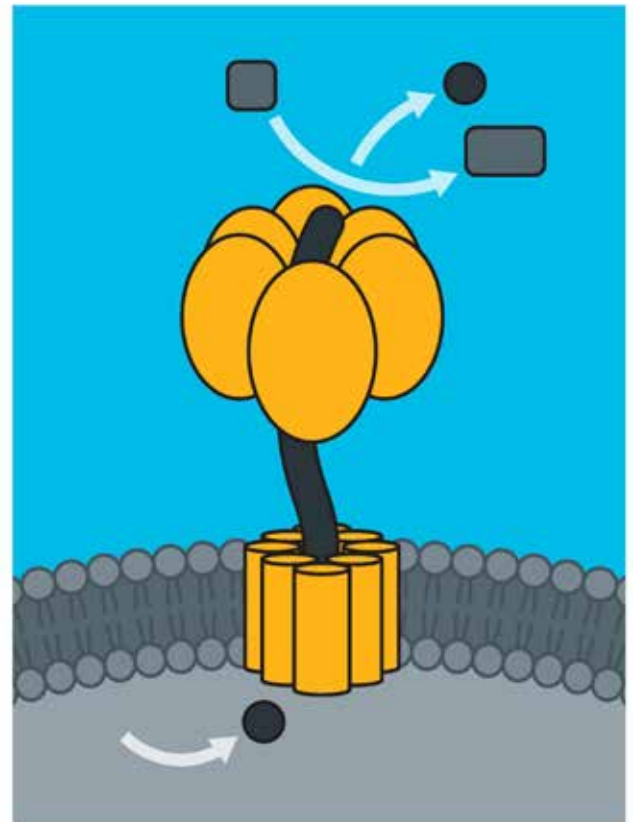
原文检索：

David Cyranoski. (2018) The cells that sparked a revolution. *Nature*, 555: 428-430.

Eason/编译

百态

螃蟹能用鳃“吃东西”



绿岸蟹 (green shore crab, *Carcinus maenas*) 遍布世界各地, 以其攻击性著称。这种常见的节肢动物生活在变化多端的河口环境中, 能够耐受水中盐度的改变、温度的波动以及日常高浓度的水体污染。不过, 最近, 研究者从貌似平凡无奇的绿岸蟹身上发现了一种极不平常的能力——用鳃“吃东西”——这在从前被认为是不可能的。

这是怎么回事呢?

原来, 来自加拿大阿尔伯塔大学 (University of Alberta) 的博士后研究员 Tamzin Blewett 及其同事 Greg Goss 发现了一件奇怪的事儿: 河口数量最多的栖居生物——节肢动物 (包括蟹类及其它甲壳纲动物) 似乎不能利用富含蛋白质的河口环境; 而早前有研究显示, 另一些种群, 例如软体无脊椎动物、某些脊椎动物以及贝类却能利用这种富含蛋白质的环境, 通过皮肤或鳃吸收其中的营养物质。这看上去好像没啥问题, 毕竟节肢动物身体坚硬, 鳃部隐藏在坚硬的外骨骼中, 因此不太可能像后者那样直接吸收水中的营养。

但事实真的如此吗?

此前的研究认为, 绿岸蟹的鳃部除了气体交换和离子调节之外, 就没什么别的功能了。

但两位研究者可不这么看, 他们开发了一种巧妙的技术手段来研究绿岸蟹吸收L-亮氨酸 (河口环境中最常见的氨基酸, 可作为动物机体蛋白质的来源) 的能力。研究者从绿岸蟹体内取出鳃的前后两部分 (分别参与气体交换和离子调节), 将其置入精密控制的溶液中 (内含人工海水和不同浓度的L-亮氨酸), 以测量它们对L-亮氨酸的吸收率, 然后汇总测量数据。由此, Blewett和Goss判定, 绿岸蟹的鳃确实能通过某种特殊的转运机制吸收L-亮氨酸。

两位研究者比较了绿岸蟹鳃部前后两部分对L-亮氨酸的吸收率, 结果发现鳃后部 (负责维持体内离子水平的稳定) 比鳃前部能吸收更多的L-亮氨酸。因此, 他们认为, 绿岸蟹对氨基酸的吸收可能与监控离子水平的机制相关。又或许, 这些氨基酸还有助于维持节肢动物体内渗透压的稳定和阻止不必要的水分吸收或流失, 使它们在环境多变 (特别是盐度的日常变化) 的河口生存。

当然, 上述结论还需要进一步验证, 但可以明确的是, 坚强勇敢的绿岸蟹能利用其所有的进化优势, 在地球最严酷环境之一的地方生机勃勃地活着。正如美国儿童节目《动物兄弟》(Wild Kratts) 中所言, 蟹拥有某种“令人惊异的生物力量”。

原文检索:

Blewett, T. A. and Goss, G. G. (2017). A novel pathway of nutrient absorption in crustaceans: branchial amino acid uptake in the green shore crab (*Carcinus maenas*). *Proc. R. Soc. B.* 20171298. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2017.1298>.

文佳/编译

为什么毛虫生病也会没胃口？



一条烟草鹰蛾毛虫（tobacco hawk moth caterpillar）。

又是一年流感季，此时，恐怕有一半的人在养病，而另一半则在想方设法防病。若是不幸中招，首当其冲的就是我们的食欲。对此，人们早已习以为常，但是细想一下：理论上，当我们的身体做好与疾病抗争的准备时会需要更多的能量，要是没胃口吃饭，能量供应跟得上吗？对此，来自加拿大达尔豪斯大学（Dalhousie University）的Shelley Adamo等人表示，对于动物在身体不适时可能挨饿的现象，一直有人试图用理论进行解释，但都无法全面地阐述清楚，特别是某些动物种群。

为此，该研究小组提出了另一种可能性：动物生病时不吃食物，是不是为了避免食物中毒？他们解释说，因为动物处理食物中所含毒性化合物的系统与其免疫系统有着某些重合的部分，所以可能当免疫系统受到攻击时，它们就会降低食欲，以避免中毒产生的风险。

基于此猜测，Adamo、Laura McMillan和Dylan Miller决定以烟草鹰蛾毛虫为研究对象来检验他们提出的理论。这种毛虫以富含尼古丁的毒性植物为生，患病时会停止进食，如此看来特别适合开展这项研究。而且更为不利

的是，饥饿的毛虫将面临更多挑战。对此，Adamo指出：第一，毛虫时期越长，被动物吃掉的可能性就越大；第二，毛虫吃得越少，其成年期的体型就越小，繁殖的成功率也随之降低。然而，毛虫在患病时依然选择付出这样沉重的代价，这表明，牺牲食欲利大于弊。

首先，三位研究者给毛虫喂食小剂量（非致死量）的苄氯菊酯——一种杀虫剂，然后向其体内注入死菌（粘质沙雷氏菌，*Serretia marcesens*），以激发其免疫系统，模拟毛虫对抗感染的情景。结果，他们发现虽然毛虫的免疫力大大降低，更容易受到感染，但它们体内的系统还是能够处理毒性物质的。于是，研究小组换了一种挑战方式——向毛虫体内注入活菌——以激发一次真正的感染，再给予它们非致死剂量的杀虫剂。这次，小剂量的毒物击垮了毛虫，几天之内，它们都死了。这说明毛虫无法耐受上述组合的攻击，这是为什么呢？

研究小组已经得知，毛虫体内含有谷胱甘肽，这是毛虫进行免疫防御以及分解食物所含毒素的必要物质，那么，两个系统在使用这一物质时是否存在竞争呢？研究者分别测量了

被给予毒物或受到感染的毛虫血液中的谷胱甘肽水平，结果发现，两组的水平都下降了，同时毛虫也生病了。而当它们被注入谷胱甘肽之后，身体情况就好多了，能在感染和中毒的双重打击下存活，而原本其中的任何一种都被证实对毛虫具有致命性。

因此，研究小组意识到，毛虫血液中谷胱甘肽的缺乏会增加它们对杀虫剂的敏感性。接下来，他们进一步研究了究竟是哪一种解毒物质可能会受到谷胱甘肽缺失的影响。于是，研究小组追踪了参与清除毛虫体内毒性的必需基因的活化和失活作用，结果发现，当毛虫同时遭受两种攻击时，无法启动两个关键的解毒基因——硫氧还蛋白（thioredoxin）基因和GSTI基因，因此导致毛虫对杀虫剂敏感。

如此看来，烟草鹰蛾毛虫在身患疾病的同时失去食欲，恐怕是为了避免因摄入毒性物质而导致的不良后果，并优先进行免疫防御。

Adamo表示，这项研究阐明了一个非常古老的疑问：为何我们在患病时会没有胃口，并认为少量进食才对身体有益。

原文检索：

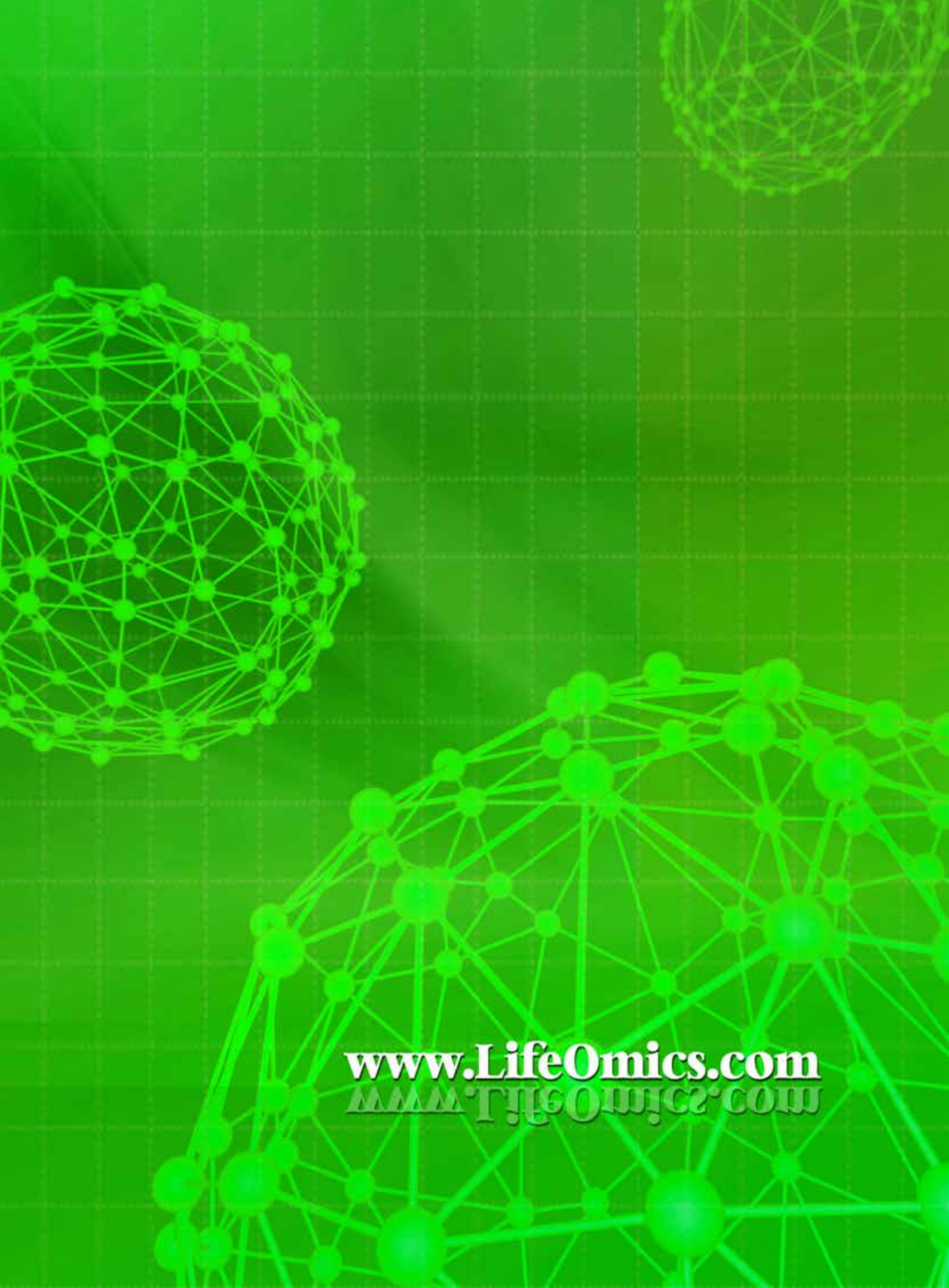
McMillan, L. E., Miller, D. W. and Adamo, S. A. (2018). Eating when ill is risky: immune defense impairs food detoxification in the caterpillar *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 221, doi:10.1242/jeb.173336.

文佳/编译

A group of people are forming a human pyramid against a cloudy sky. The pyramid is composed of several layers of people, with the most visible layer being a row of people standing on the shoulders of others. The people are wearing dark clothing, and the sky is a mix of white and grey clouds. The overall tone of the image is motivational and collaborative.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255

The background is a solid green color with a faint grid of dashed lines. Overlaid on this are three abstract molecular structures. One is a large, complex network of nodes and lines in the bottom right. Another is a smaller, more compact cluster in the middle left. A third, even smaller cluster is in the top right. All structures are composed of green lines and dots.

www.LifeOmic.com
www.TheOmic.com