

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.03.052

嵌合分子(DHT-PROTAC)在前列腺癌研究中的进展*

魏海彬 王悦童 孙 丰 邵 怡 卓 见 庞 昆 孙晓文[△]

(上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科 上海 200080)

摘要: 前列腺癌多发于老年男性,已成为老年男性常见肿瘤之一。内分泌治疗目前是晚期前列腺癌主要治疗方法,但仍避免不了前列腺癌最终进展成激素非依赖性前列腺癌,导致内分泌治疗的失败。当前,对前列腺癌细胞株的 AR 表达的研究,主要集中在 DNA 水平及 mRNA 水平,而对 AR 蛋白翻译后调控的研究较少。近些年来,嵌合分子(DHT-PROTAC)是基于蛋白水平,调控 AR 蛋白的表达,成为研究前列腺癌转归新的热点。DHT-PROTAC 是一种新型人工合成的异型双功能小分子;这种小分子是 DHT 与泛素连接酶 E3 识别基团的嵌合体,它不仅能与 AR 结合,而且能在结合后,诱导 AR 的泛素化,从而通过泛素-蛋白酶途径降解 AR;本文介绍了嵌合分子的作用原理,回顾了近些年前列腺癌的治疗进展,分析了嵌合分子将来在前列腺癌治疗中的应用前景。

关键词: 嵌合分子;DHT-PROTAC;前列腺癌;进展

中图分类号: R737.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)03-590-03

The Application and Progress of Chimeric Molecules (DHT-PROTAC) in Prostate Cancer*

WEI Hai-bin, WANG Yue-tong, SUN Feng, SHAO Yi, ZHUO Jian, PANG Kun, SUN Xiao-wen[△]

(The First Affiliated Hospital of Shanghai, JiaoTong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT: Prostate cancer occurs mainly in older men, and has become one of common tumors in older men. Endocrine therapy is the main treatment of advanced prostate cancer, but still can't avoid eventually into androgen-independent prostate cancer, leading to the failure of endocrine therapy. At present, AR expression studies of prostate cancer, mainly concentrate in DNA level and mRNA level, while few studies focus on the AR protein post-translational regulation. In recent years, chimeric molecule is based on the protein level, regulating AR protein expression, and become the new hot spot of prostate cancer study. Post-translational degradation of protein plays an important role in cell apoptosis. Chimeric molecule (dihydrotestosterone-based proteolysis-targeting chimeric molecule [DHT-PROTAC]) is a novel synthetic heterobifunctional small molecule; DHT-PROTAC is a chimera of a ligand for Androgen Receptor (AR), a linker moiety and a ligand for an E3 ubiquitin ligase; DHT-PROTAC induces interaction between the target protein AR and the E3 ubiquitin ligase, leading to artificial polyubiquitination of AR and subsequently degradation via the ubiquitin-proteasome pathway (UPP). This article focuses the role of the chimeric molecules, investigating the role of AR in cell proliferation and viability in prostate cancer cells, reviewing progress in the treatment of prostate cancer recently, and analysis the application prospects of chimeric molecules in prostate cancer.

Key words: Chimeric molecule; DHT-PROTAC; Prostate cancer; Progress

Chinese Library Classification: R737.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)03-590-03

现代分子生物学从 3 个基本层次上调控蛋白的表达水平:首先,在 DNA 水平,通过基因敲除,从而使目标蛋白的 DNA 失活^[1];其次,在 mRNA 水平,通过小分子 RNA,与目标蛋白的 mRNA 结合,从而抑制 mRNA 的翻译及表达^[2];再次,在蛋白水平,通过对翻译后靶蛋白的修饰,例如甲基化、磷酸化、糖基化等,从而调整靶蛋白的量及活性^[3];当前,对前列腺癌细胞株的 AR 表达的研究,主要集中在 DNA 水平及 mRNA 水平,而对 AR 蛋白翻译后调控的研究较少。近些年来,嵌合分子(DHT-PROTAC)是基于蛋白水平,调控 AR 的表达,正逐渐走进研究人员的视野。

DHT-PROTAC 是一种新型的人工合成的异型双功能小分子;这种小分子是双氢睾酮(DHT)与泛素连接酶 E3 识别基团的嵌合体,它不仅能与雄激素受体(AR)结合,而且能在结合后,

诱导 AR 的泛素化,从而通过泛素-蛋白酶体途径降解 AR;本文旨在回顾近些年前列腺癌的治疗进展,介绍 DHT-PROTAC 的作用原理,分析嵌合分子将来在前列腺癌,特别是在激素非依赖性前列腺癌(HIPC)治疗中的应用前景。

1 前列腺癌的发展与转归

1.1 前列腺癌的转归

前列腺癌(Prostate cancer, CaP)多发于老年男性,已成为老年男性常见肿瘤之一。MM Center, A Jemal 等人报道,根据国际癌症研究机构(GLOBOCAN)在 50 多个个国家从 1985 年到 2008 年前列腺癌发病率及死亡率的统计,在 40 个统计发病率的 国家中,有 32 个国家发病率成上升趋势,主要位于北美、大洋洲、西部及北欧,而在经济欠发达的南美洲、加勒比地区及撒

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(30600618)

作者简介:魏海彬(1987-),男,硕士研究生,从事泌尿外科专业, E-mail:haibsjtu@gmail.com

△ 通讯作者:孙晓文, E-mail:sunxiaowen1973@126.com

(收稿日期:2013-04-24 接受日期:2013-05-19)

哈拉以南的非洲,前列腺癌仍具有较高的死亡率^[4]。

前列腺癌内分泌治疗目前是晚期前列腺癌主要治疗方法,内分泌治疗的初始阶段,各种抗雄治疗(ADT)是有效的,但经过中位时间 14-30 个月后,几乎所有的患者病变都将由雄激素依赖性前列腺癌(HDPC)逐渐发展成为雄激素非依赖性前列腺癌(HIPC),中位生存期小于 20 个月,从而导致内分泌治疗的失败^[5]。如何逆转或者减缓这一过程进展,成为晚期前列腺癌治疗中所要解决迫在眉睫的问题。

1.2 AR 在前列腺癌转归过程中的作用

Yuanjie Niu 等人研究发现:CaP 的间质细胞的 AR 能够促进 CaP 的进展。Niu 等人通过建立 AR 被敲除的小鼠模型,发现腔面层的上皮细胞是逐渐凋亡的,而基底层上皮细胞增殖加速,从而导致 CaP 的上皮组织中中间层细胞的比例增加,从而使 CaP 的侵袭性增加^[6]。

Lin PC 等人发现 AR 在 CaP 的发病机制中起着至关重要的作用。研究结果发现:在肿瘤抑制基因的 miRNA 中,miR-31 能够使表达 AR 的基因启动子区域甲基化,从而使 AR 表达下降,而 CaP 细胞表现出侵袭能力的下降。实验证实了 AR 的表达水平与 CaP 的侵袭能力呈负相关^[7]。

HDPC 发展成 HIPC 的机制尚未完全明确,但 AR 在其中有关键作用。在 HIPC 形成的过程中,既往关于 AR 变化研究总结起来主要有以下发现:(1) AR 对配体选择的特异性降低,在缺乏雄激素的环境中,一些细胞因子可以与 AR 结合,从而增加 AR 的活性,例如表皮生长因子及胰岛素样生长因子-1、白介素-6、蛋白激酶 A、蛋白激酶 C 等^[8];(2) AR 扩增及表达增强,表现为 AR 介导的通路高敏感性,即使在更低雄激素水平仍然可以被激活;在雄激素非依赖性前列腺癌中,几乎三分之一存在雄激素受体的扩增的证据,证明 AR 基因表达的增强^[9];(3) AR 的突变,增加了受体的活性^[10];(4) AR 协同调节物增加,在激素抵抗性前列腺癌中,与 DNA 结合的复合物中的某些蛋白,存在过度表达^[9]。

2 DHT-AR 信号通路特点

2.1 DHT 的分布特点

在正常男性的血液中,主要性激素是睾酮,而超过 95% 的睾酮来自于睾丸。在 5 α 还原酶的作用下,睾酮 A 环中的双键被还原,从而转变成 DHT。5 α 还原酶至少存在两种亚型,1 型主要存在于皮肤及前列腺上皮,2 型主要存在于人体附属性腺组织并且局限在纤维肌组织为主的间质成分中,也是在前列腺中起显著作用的亚型^[11];在前列腺组织中,DHT 是主要雄激素,其浓度是睾酮的 5 倍,并且 DHT 与 AR 的亲合能力是睾酮的 10 倍左右^[12],因此在前列腺中起主要作用的是 DHT。DHT 与 AR 结合后,启动相关基因表达,从而调节细胞代谢、生长、分化、凋亡等。

2.2 AR 介导的信号传导通路特点

DHT 与细胞质中的 AR 受体结合,引起 AR 构象改变,从而形成 AR 同源二聚体,并且在若干位点上被磷酸化;随后这一配体-受体复合物移位进入细胞核中,与特定的雄激素反应位点结合,即与靶基因的启动子特异性结合,进而使 RNA 聚合酶与靶基因的起始位点相结合,启动靶基因的转录;在雄激素撤退后,AR 复合物迅速解离,返回进入细胞质中,为再次与雄

激素结合做准备^[13]。

3 泛素-蛋白酶体途径的原理

泛素(Ubiquitin)是一种存在于真核细胞中由 76 个氨基酸组成、具有高度保守序列的小分子蛋白。它的主要功能是标记靶蛋白,使标记的靶蛋白能被蛋白酶体识别,从而使靶蛋白降解;这一过程被称为泛素/蛋白酶体系统(UPS)。在活细胞的多项代谢活动中,例如细胞生长、信号转导、DNA 修复、抗原呈递中,UPS 发挥着重要作用^[13]。

UPS 过程主要有以下三个步骤^[14]:1.泛素的活化:泛素的羧基末端与泛素活化酶 E1 的巯基相结合,这个步骤需要以 ATP 作为能量,最终形成一个泛素和泛素活化酶 E1 之间的酯键;2.泛素的交联:E1 将活化后的泛素通过交酯化过程交给泛素结合酶 E2;3.E3 将泛素复合体与靶蛋白结合:泛素连接酶 E3 将结合 E2 的泛素连接到靶蛋白上,若靶蛋白上已经存在泛素,结合了 E2 的泛素可直接连接在靶蛋白上。蛋白酶体识别出被标记的靶蛋白,从而把靶蛋白水解成 7-8 个氨基酸长度的肽链,完成靶蛋白的降解。

4 嵌合分子的发展过程

嵌合分子的设计原理:嵌合分子具有异源双功能分子,由 DHT、E3 泛素连接酶识别基团、连接基团构成;耦合 DHT 的目的是为了与在该分子的天然配体的 AR 结合;E3 泛素连接酶识别基团的目的是与靶蛋白结合后,导致靶蛋白泛素化,最终使靶蛋白被蛋白酶体降解;连接基团的目的是将 DHT 与 E3 泛素连接酶识别基团有机结合起来,增加可溶性,避免被其体蛋白酶体降解。

最初的嵌合分子设计是 DHT-linker-Ik B-Polyarginine tags,其中,Ik B 磷酸化酶主要起到识别并结合 E3 泛素连接酶的作用^[15];Polyarginine tags,即多聚精氨酸基团主要起到增加通透性的作用。这一嵌合分子设计并合成后,显微注射到人胚肾细胞(HEK-293)中,已被绿色荧光标记(GFP)的 AR 被明显降解。然而这一设计具有明显的局限性,首先嵌合分子中含有双磷酸基团,渗透性欠佳,不能明显通过细胞膜进入到细胞质中,使嵌合分子的利用率明显下降;其次,嵌合分子发挥作用,主要依靠 Ik B 磷酸化酶的活性,而 Ik B 磷酸化酶在发挥活性的同时,会导致自身磷酸化,从而失去活性。因此,最初的这一设计并未得到广泛应用。

针对上述缺陷,后续合成的嵌合分子进行了相应的改进。首先,模仿 HIV-Tat58,对 Polyarginine tags 进行改进,增加了聚精氨酸的分子转运功能,提高了嵌合分子细胞膜的通透性^[16]。再次,利用缺氧诱导因子-1(HIF-1)替代 Ik B 磷酸化酶,HIF-1 中的脯氨酸序列被氧化后,能够与 E3 连接酶结合,从而启动泛素化降解途径^[17]。

5 嵌合分子对前列腺癌细胞的影响

前列腺癌的内分泌治疗,大多是通过手术或药物减少雄激素的产生或阻断与 AR 的结合或者阻断雄激素与 AR 的结合,从而减缓前列腺癌的进展。常规治疗仅对 AR 以前的信号通路进行阻断,并没有真正降解 AR。在 HDPC 发展成 HIPC 过程中,AR 起来重要作用。嵌合分子通过直接靶向降解 AR,从而

在 AR 水平真正阻断这一通路,可能是治疗 HIPC 一种潜在的治疗方法。

5.1 嵌合分子明显降解 AR

Schneekloth, JS 的研究证实,DHT-PROTAC 能明显降解 AR^[18]。在 HEK-293 细胞株中,用 GFP 标记 AR,然后用嵌合分子 DHT-PROTACS 去处理 HEK293 细胞株,实验结果显示嵌合分子能明显降解 AR,并且随着嵌合分子浓度的升高,降解效果越明显。

唐悦清等人^[19]研究 DHT-PROTAC 对 HDPC 细胞(LNCaP 细胞)AR 的靶向降解作用,通过 Western 免疫印迹方法及免疫组化 IHC 检测 DHT-PROTAC 处理后,AR 的表达情况。结果显示,用 100 L mol/L DHT-PROTAC 处理 LNCaP 细胞 4 h 后,AR 的表达明显下降。

施云峰等人^[20]研究了 DHT-PROTAC 对 HIPC(C4-2B)细胞 AR 的靶向降解作用。结果显示,DHT-PROTAC 处理后,C4-2B 细胞中,AR 阳性的细胞数量明显减少。处理前后平均阳性率分别为 78.62%、36.65%。

5.2 对细胞凋亡及活性的影响

唐悦清、施云峰等人^[19,20]同样通过噻唑兰(MTT)比色法检测 DHT-PROTAC 处理后,LNCaP 细胞及 C4-2B 细胞的增殖抑制情况,并通过细胞计数绘制生长曲线观察细胞的增殖能力;MTT 实验结果表明,处理 LNCaP 细胞及 C4-2B 细胞的吸光度值显著低于对照组($P < 0.05$),而且随着处理时间延长,抑制率逐渐增大。结果证实了 DHT-PROTAC 对 HDPC 及 HIPC 细胞增殖的抑制能力,并且随着处理时间的延长,对增殖的抑制率逐渐增大。

5.3 对 PSA 水平的影响

前期实验证实,将雄激素依赖性前列腺癌细胞(LNCaP 细胞)和 HIPC 细胞(LNCaP-C81 细胞)分别培养,用嵌合分子(DHT-PROTACS)去处理细胞,再分别取培养液上清检测 PSA 的表达情况^[21]。结果显示,无论是 LNCaP 细胞,还是 LNCaP-C81 细胞,PSA 水平都有明显下降。

6 嵌合分子应用于治疗前列腺癌的远景及展望

从基因水平的功能基因的敲除,再到 mRNA 水平小分子 RNA 的干扰,较多的生化技术已被用来研究蛋白质表达调控;嵌合分子则在不影响 DNA 及 mRNA 的表达的情况下,在蛋白水平上直接调控蛋白表达,因此在伦理学上更容易接受。同时,嵌合分子作为一种新的蛋白调控方法,具有其他方法所不具有的优势,有可能成为基因治疗的一种替代方案。嵌合分子靶向降解功能蛋白,有可能研制成药物,成为 HIPC 新的治疗方法。

通过以上介绍,我们看到了嵌合分子在前列腺癌研究领域的应用。现在,嵌合分子的研究还只停留在实验室研究阶段,处于起步阶段,离真正的临床应用,为时尚远。嵌合分子在前列腺癌治疗领域的应用,除了要提高合成技术、改进不足外,还需要进行大规模的药理学、分子生物学、分子遗传学、结构生物学等交叉学科的研究。

参考文献(References)

- [1] Ikeda Y, Aihara K, Sato T, et al. Androgen receptor gene knockout male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (33): 29661-29666
- [2] Cogoni, C and Macino G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2000, 10(6): 638-643
- [3] Sakamoto M, Kyung B, Raymond J, et al. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(15): 8554-8559
- [4] Center M, Jemal A, Ward E, et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates [J]. *European urology*, 2012, 61 (6): 1079-1092
- [5] Debes D and Tindall J. Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(15): 1488-1490
- [6] Niu Y, Altuwaijri S, Lai KP, et al. Androgen receptor is a tumor suppressor and proliferator in prostate cancer [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(34): 12182-12187
- [7] Lin P, Chiu YL, Banerjee S, et al. Epigenetic repression of miR-31 disrupts androgen receptor homeostasis and contributes to prostate cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(24): 2968-2974
- [8] Ueda T, Mawji NR, Bruchovsky N, et al. Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(41): 38087-38094
- [9] Suzuki H, Ueda T, Ichikawa T, et al. Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2003, 10 (1677): 209-216
- [10] Edwards J and Bartlett M. The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: Modifications to the androgen receptor[J]. *BJU Int*, 2005, 95(9): 132 0-1326
- [11] Ntais C, Polycarpou A, Tsatsoulis A. Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes[J]. *Eur J Endocrinol*, 2003, 149(10): 469-477
- [12] Tyagi RK, Lavrovsky Y, Ahn SC, et al. Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14(8): 116 2-1174
- [13] Salomons FA, Acs K, Dantuma NP. Illuminating the ubiquitin/proteasome system[J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(8): 1289-1295
- [14] Ciechanover A, Everett RD, Orr A, et al. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life [J]. *EMBO J*, 1998, 17(24): 7151-7160
- [15] Sakamoto KM, Kim KB, Verma R, et al. Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(12): 1350-1358
- [16] Sakamoto KM. Protacs for treatment of cancer[J]. *Pediatric research*, 2010, 67(5): 505-508
- [17] Bruick RK and McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF[J]. *Science*, 2001, 294(5545):1337-1340
- [18] Schneekloth J and Crews CM. Chemical approaches to controlling intracellular protein degradation[J]. *Chembiochem*, 2005, 6(1): 40-46
- [19] Tang YQ, Han BM, Yao XQ, et al. Chimeric molecules facilitate the degradation of androgen receptors and repress the growth of LNCaP cells[J]. *Asian J Androl*, 2009, 11(1): 119-126
- [20] Shi YF, Tang YQ, Sun XW, et al. Targeted degradation of androgen receptors in androgen-independent prostate cancer cells: an experimental study[J]. *National Journal of Andrology*, 2009, 15(12): 1059-1 063
- [21] 孙晓文,唐悦清,刘海涛,等. DHT-PROTACS 对前列腺癌细胞分泌 PSA 的抑制情况观察[J]. *山东医药*, 2008, 48(012): 47-48
Sun Xiao-wen, Tang Yue-qing, Liu Hai-tao, et al. The observation of DHT-PROTACS to inhibit prostate cancer cells secreting PSA [J]. *Shandong Medical Journal*, 2008, 48(012): 47-48