

拮抗 IAP 在肿瘤放疗增敏中的应用

褚玉新,宋启斌,胡伟国

(武汉大学人民医院肿瘤中心,湖北 武汉 430060)

摘要:凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins,IAP)是一类内源性细胞凋亡抑制因子,其过度表达与肿瘤发生密切相关。尽管放疗能够激活肿瘤细胞中一系列复杂的信号转导途径,导致肿瘤细胞死亡,然而,肿瘤细胞中高表达 IAP 会诱导很多肿瘤耐放射。因此,以 IAP 为靶点的拮抗剂治疗可能为放疗增敏开辟新的途径。

关键词:凋亡抑制蛋白;拮抗剂;放疗增敏

中图分类号:R730.55 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-0242(2013)11-0901-04

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2013.11.A013

The Application of IAP Antagonist to Cancer Radiotherapy Sensitivity

CHU Yu-xin, SONG Qi-bin, HU Wei-guo

(Cancer Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: IAP(inhibitor of apoptosis proteins) is a class of intrinsic apoptosis inhibitor, whose over-expression is tightly associated with tumorigenesis. Although radiotherapy can activate a variety of signaling events in cancer cells that eventually lead to cell death, over-expression of IAP in cancer cells often induces radio-resistance in various tumors. Hence antagonists targeting IAP proteins may open up a new way for enhancing cancer radiotherapy sensitivity.

Key words: IAP; antagonist; radiotherapy sensitivity

放射治疗是临床上抑制肿瘤生长的经典方法,然而,很多恶性肿瘤对放疗不敏感,存在放射抗性。抗凋亡是导致多种恶性肿瘤对放疗不敏感的关键。因此,深入了解肿瘤细胞抗凋亡的信号转导机制可能为解决放疗耐受提供新的思路。本文主要关注 IAP 异常表达所导致的肿瘤耐放射,探讨如何通过拮抗 IAP 蛋白来增加肿瘤细胞对放疗的敏感性。

1 IAP 在肿瘤耐放射中的作用

肿瘤细胞内凋亡信号通路调控的异常,往往是肿瘤细胞对放射治疗产生耐受性的原因之一。肿瘤细胞内 IAP 蛋白的高水平表达会抑制 caspase 的活性,从而降低肿瘤细胞对放疗的敏感性。IAP 是一类

结构相关的抑制细胞凋亡的蛋白家族,包括 XIAP、cIAP1、cIAP2、livin 和 survivin 等^[1]。IAP 抑制凋亡主要是通过其 BIR 结构域(baculovirus IAP repeats domain)与 caspase 结合,抑制 caspase 的活性来实现^[1]。肿瘤细胞内 IAP 蛋白表达上调是肿瘤细胞产生放射抗性的基础。

据报道,XIAP 发挥抗凋亡的能力最强,能够抑制 caspase-3、-7、-9^[2]。此外,前凋亡因子,如 Smac 和活化的 caspase 被 XIAP 的 E3 连接酶泛素化并降解之后,会增强肿瘤细胞的抗凋亡能力^[3]。XIAP 也可以调节其他的信号通路,如 NF- κ B 信号通路。cIAP1 和 cIAP2 既参与经典的 NF- κ B 信号通路,也参与非经典的 NF- κ B 信号通路。在经典的 NF- κ B 信号通路中,cIAP1 和 cIAP2 可以介导受体反应蛋白 1(receptor-interacting protein 1, RIP1)激酶泛素化,这对于受体介导的 NF- κ B 激活至关重要,这些都有助于

收稿日期:2013-06-03;修回日期:2013-07-10

通讯作者:宋启斌,E-mail:347952582@qq.com

肿瘤细胞抵抗凋亡^[4]。

2 拮抗 IAP 有利于放疗增敏

理论上,靶向 IAP 蛋白对于克服放射耐受是一种很有前景的治疗方法。因为某些 IAP 蛋白,如 XIAP 和 cIAP1,在细胞应激的情况下,能够在翻译水平被调节。XIAP 和 cIAP1 mRNA 通过内核糖体进入位点(internal ribosome entry site,IRES)翻译蛋白质。细胞在应激状态下,例如,放射线照射之后,内质网应激,产生大量的活性氧类物质,这种 IRES 位点也能让蛋白质持续翻译,让 XIAP 和 cIAP1 的蛋白表达水平维持稳定。最近的报道^[5],MDM2 (murine double minute 2) 参与调节放疗后的 XIAP 翻译。放射线引发的 DNA 损伤会诱导 MDM2 去磷酸化,改变其胞浆定位,促进 IRES 依赖的 XIAP 翻译。MDM2 可以与 XIAP 的 5'-非翻译区 IRES 相互作用,刺激 XIAP 的 IRES 活性。IAP 蛋白持续高水平的表达,会更容易逃避放射线诱导的细胞凋亡,从而产生放射抗性^[5]。因此,干扰 IAP 蛋白表达,或拮抗 IAP 的功能可能会增加肿瘤细胞对放疗的敏感性。

基于以上理论,最近几年涌现出多种不同的 IAP 拮抗剂,用于克服肿瘤耐放射,增加放疗敏感性。由于 XIAP 发挥最强的抗凋亡功能,有研究者设计反义寡核苷酸下调 XIAP 的表达水平^[6]。此外,也有小分子 IAP 拮抗剂用于模拟 Smac 的 N-末端,这是 Smac 与 IAP 蛋白结合的关键结构域^[7]。对 XIAP 与 Smac 结合位点的研究极大地促进了不同结构的 Smac 类似物的新药研发,用于拮抗 IAP 的活性,增加肿瘤细胞对放疗的敏感性。

3 Smac 在拮抗 IAP 中的作用

为了探索拮抗 IAP 蛋白用于放疗增敏的作用,人们研制了多种不同的基因干预方法。据报道内源性的 IAP 拮抗剂 Smac 水平上调,可以增加乳腺癌对放疗的敏感性^[8]。无论是全长形式的 Smac 还是成熟形式的 Smac,都可以明显增强放射诱导的细胞凋亡,减少肿瘤细胞克隆性增殖。全长 Smac 包含一个线粒体易位序列,定位于线粒体膜间腔,细胞凋亡

后,易位序列就从线粒体释放到细胞浆。成熟 Smac 缺乏线粒体易位序列而一直表达于细胞浆。任何一种形式的 Smac 高表达都会促进放射诱导的 caspase 级联放大效应,增加线粒体膜的通透性,促进细胞色素 C(Cyt C)从线粒体释放到细胞浆,使更多的 caspase-3 活化,促进 caspase 依赖的细胞凋亡。研究也发现,全长 Smac 或成熟 Smac 过表达均会增加放射诱导的乳腺癌细胞凋亡^[8]。放射线照射之后,Smac 异位表达会与 IAP 蛋白相互作用,增强 caspase-3 的活化,促进细胞凋亡^[8]。

除了诱导 Smac 过表达之外,用 RNA 干扰技术拮抗 XIAP 也会显著增加 γ 射线诱导的胰腺癌细胞凋亡,抑制肿瘤克隆性增殖^[9]。拮抗 XIAP 引起的放疗增敏与 caspase 活性增强和线粒体膜通透性增加有关^[9]。而且,拮抗 XIAP 会上调 caspase 活性,启动线粒体级联放大效应。此外,用 RNA 干扰技术沉默 XIAP 会增加喉癌细胞对放疗的敏感性^[10]。Vellanki 等^[11]报道,IAP 拮抗剂联合放疗主要增加中枢神经系统恶性肿瘤的细胞毒性,而不增加对正常的神经元和胶质细胞的毒性。而且,IAP 拮抗剂也不会增加正常成纤维细胞对放疗的敏感性。这些结果说明 IAP 拮抗剂会选择性地增加肿瘤细胞对放疗的敏感性,而不会对正常细胞增敏。

4 小分子 IAP 拮抗剂

一些模拟内源性 Smac 蛋白 N-末端结构的小分子化合物也能够拮抗 IAP 的活性。有报道称,二价的小分子 Smac 类似物 BV6 会增加胶质母细胞瘤对 γ 射线的敏感性^[12]。BV6 和放疗以高度协同的方式诱导肿瘤细胞凋亡。有趣的是,研究也同时发现 NF- κ B 是 Smac 类似物介导放疗增敏的关键因素。由此可见,Smac 类似物促进 DNA 与 NF- κ B 亚基结合。研究显示,通过 I κ B α 拮抗 NF- κ B 之后,Smac 类似物联合放疗活化 caspase 的能力降低,线粒体膜通透性降低,Cyt C 释放减少,凋亡也减少^[12]。同样,IKK2 高表达会拮抗 NF- κ B 的活性,也同样拮抗了 Smac 类似物诱导的放疗增敏。这些都说明 Smac 类似物在增加肿瘤细胞对放射线敏感性的过程中与 NF- κ B 信号转导通路密切相关。

小分子 IAP 拮抗剂 LBW242 与 IAP 的 BIR 结

构域有很高的亲和力,能够结合 cIAP1-BIR3,破坏 IAP 蛋白之间的相互作用,从而有利于 caspase 活化,还能够协同替莫唑胺诱导肿瘤细胞凋亡。LBW242 促进放射诱导细胞凋亡,减少了肿瘤细胞的克隆性增殖。更为重要的是,LBW242 联合放疗所产生的胶质瘤干细胞毒性要高于任一疗法的单独使用。此外,LBW242 也会协同放疗和替莫唑胺,抑制动物模型中胶质母细胞瘤的生长^[13]。

Yang 等^[14]发现,二价的 Smac 类似物 SM-164 在 nM 浓度时就可以增加乳腺癌细胞对放疗的敏感性;SM-164 能够下调 cIAP1,减少 XIAP 与 caspase-9 的结合,促进 caspase-9,-8,-3 的活化。除对乳腺癌之外,SM-164 也会增加头颈鳞状细胞癌对放疗的敏感性^[15]。对其分子机制的研究显示,SM-164 诱导放疗增敏需要 caspase 的活化,用全 caspase 拮抗剂或 RNA 干扰技术拮抗 caspase 之后,SM-164 诱导放疗增敏效应则无法产生^[15]。而且,这种放疗增敏效应也涉及到 Smac 类似物激活 NF- κ B, TNF α 的转录激活和分泌增加,这又反过来诱导更多的细胞凋亡。值得注意的是,SM-164 也会增加小鼠移植肿瘤模型对放疗的敏感性,明显抑制了肿瘤的生长^[15]。

Dai 等^[16]发现,单价的 Smac 类似物 SH-130 会增加前列腺癌中放射诱导的 caspase 活化和细胞凋亡。免疫共沉淀实验显示,SH-130 能够结合 XIAP 和 cIAP,干扰 XIAP 和 cIAP 与 Smac 的结合。SH-130 能够诱导放射线激活 NF- κ B。在前列腺癌移植小鼠模型中,SH-130 能协同放疗抑制肿瘤生长,使肿瘤退化 80% 以上。

研究者还评估了 Smac 类似物 JP-1201 在结直肠癌放疗增敏中的作用,结果发现 JP-1201 协同电离辐射抑制了结直肠癌细胞的增殖。在小鼠移植肿瘤模型中,JP-1201 联合放疗对肿瘤的拮抗力强于单纯放疗^[17]。此外,两种小分子 XIAP 拮抗剂 compound 1396-11 和 1396-12 能够协同放射线拮抗胰腺癌的生长,减少软琼脂中的集落形成^[18]。

最近天然化合物 embelin 也被鉴定为一种新型放疗增敏剂。Embelin 是中草药的一种活性成分,以前的研究发现 embelin 能够拮抗 XIAP。在拮抗前列腺癌细胞增殖方面,embelin 联合放疗要优于任何一种方式的单独使用,其会导致肿瘤细胞停滞于 G₂/M 期,产生 caspase 非依赖的细胞凋亡,同时还导致肿

瘤生长减缓,而毒副作用极低。对肿瘤组织的免疫组化分析显示,embelin 联合放疗会协同抑制肿瘤细胞增殖,诱导凋亡,减少肿瘤微血管形成^[19]。

5 IAP 拮抗剂的临床试验

近年来,针对 IAP 蛋白的靶向制剂已经进入临床试验阶段。针对 IAP 的反义寡核苷酸和小分子 IAP 拮抗剂已经进入 I/II 期临床试验阶段,有些为单独治疗,有些则联合传统化疗。XIAP 反义寡核苷酸和 IAP 拮抗剂在早期临床试验阶段疗效很好,拮抗 IAP 蛋白之后,肿瘤细胞或周围组织中 XIAP 和 cIAP1 表达下调。初期临床试验的结果也支持 IAP 拮抗剂能够激活肿瘤细胞死亡信号通路^[20]。

IAP 蛋白在各种人类肿瘤中均异常表达,是治疗干预的重要靶点。大量的临床前试验发现 IAP 拮抗剂和放疗联合应用有协同抗肿瘤作用。因此,拮抗 IAP 来增加放疗敏感性是一种很有前景的肿瘤治疗策略。值得注意的是,IAP 拮抗剂也能够增加肿瘤干细胞中放射诱导的细胞毒性,而肿瘤干细胞被认为是耐放射的根源。IAP 拮抗剂联合放疗对于增加肿瘤对放疗的敏感性有重要意义,也必将成为今后研究的热点。

参考文献:

- [1] Mannhold R, Fulda S, Carosati E. IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy[J]. Drug Discov Today, 2010, 15(5-6): 210-219.
- [2] Tan ZL, Liao GC, Nie AH. Evolution of design and development of XIAP inhibitors[J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 18(1): 64-69. [谭祖磊, 廖国超, 聂爱华. XIAP 抑制剂的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(1): 64-69.]
- [3] Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(7): 439-452.
- [4] Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, et al. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination[J]. Mol Cell, 2008, 30(6): 689-700.
- [5] Gu L, Zhu N, Zhang H, et al. Regulation of XIAP translation and induction by MDM2 following irradiation[J]. Cancer Cell, 2009, 15(5): 363-375.

- [6] Tamm I. AEG-35156, an antisense oligonucleotide against X-linked inhibitor of apoptosis for the potential treatment of cancer[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2008, 9(6):638–646.
- [7] Straub CS. Targeting IAPs as an approach to anti-cancer therapy[J]. *Curr Top Med Chem*, 2011, 11(3):291–316.
- [8] Fandy TE, Shankar S, Srivastava RK. Smac/DIABLO enhances the therapeutic potential of chemotherapeutic drugs and irradiation, and sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2008, 7:60.
- [9] Giagkousiklidis S, Vellanki SH, Debatin KM, et al. Sensitization of pancreatic carcinoma cells for gamma-irradiation-induced apoptosis by XIAP inhibition [J]. *Oncogene*, 2007, 26(49):7006–7016.
- [10] Wang R, Li B, Wang X, et al. Inhibiting XIAP expression by RNAi to inhibit proliferation and enhance radiosensitivity in laryngeal cancer cell line[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2009, 36(3):332–339.
- [11] Vellanki SH, Grubbrucker A, Liebau S, et al. Small-molecule XIAP inhibitors enhance gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma [J]. *Neoplasia*, 2009, 11(8):743–752.
- [12] Berger R, Jennewein C, Marschall V, et al. NF- κ B is required for Smac mimetic-mediated sensitization of glioblastoma cells for {gamma}-irradiation-induced apoptosis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(10):1867–1875.
- [13] Ziegler DS, Keating J, Kesari S, et al. A small-molecule IAP inhibitor overcomes resistance to cytotoxic therapies in malignant gliomas in vitro and in vivo [J]. *Neuro Oncol*, 2011, 13(8):820–829.
- [14] Yang D, Zhao Y, Li AY, et al. Smac-mimetic compound SM-164 induces radiosensitization in breast cancer cells through activation of caspases and induction of apoptosis [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 133(1):189–199.
- [15] Yang J, McEachern D, Li W, et al. Radiosensitization of head and neck squamous cell carcinoma by a SMAC-mimetic compound, SM-164, requires activation of caspases[J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(4):658–669.
- [16] Dai Y, Liu M, Tang W, et al. Molecularly targeted radiosensitization of human prostate cancer by modulating inhibitor of apoptosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(23):7701–7710.
- [17] Huerta S, Gao X, Livingston EH, et al. In vitro and in vivo radiosensitization of colorectal cancer HT-29 cells by the smac mimetic JP-1201[J]. *Surgery*, 2010, 148(2):346–353.
- [18] Karikari CA, Roy I, Tryggestad E, et al. Targeting the apoptotic machinery in pancreatic cancers using small-molecule antagonists of the X-linked inhibitor of apoptosis protein[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(3):957–966.
- [19] Dai Y, Desano J, Qu Y, et al. Natural IAP inhibitor embelin enhances therapeutic efficacy of ionizing radiation in prostate cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2011, 1(2):128–143.
- [20] Sikic BI, Eckhardt SG, Gallant G, et al. Safety, pharmacokinetics (PK), and pharmacodynamics (PD) of HGS1029, an inhibitor of apoptosis protein (IAP), in patients with advanced solid tumors: results of a phase I study [C]. 2011 Annual ASCO Meeting, Chicago, IL.