

文章编号 :1004-0374(2010)02-0161-08

## IAP 家族分子与肿瘤靶向治疗

许 杨, 赵晓航\*

(中国医学科学院/北京协和医学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

**摘 要:** 凋亡抑制因子(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)是一类高度保守的内源性抗细胞凋亡因子家族, 主要通过抑制 Caspase 活性和参与调节核因子 NF- $\kappa$ B 的作用而抑制细胞凋亡。细胞抗凋亡机制在肿瘤发生、发展以及肿瘤耐药性形成中发挥重要作用。肿瘤细胞高表达 IAPs 是导致肿瘤细胞抵抗凋亡的关键。细胞凋亡调控异常与肿瘤细胞耐药密切相关, 增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性成为近年来肿瘤治疗的重要策略之一。该文综述了 IAP 家族蛋白的结构、生物学特性及其作为肿瘤治疗靶点的研究进展。

**关键词:** IAP; 凋亡; 肿瘤; 化疗敏感性

中图分类号: Q255; R73-362 文献标识码: A

## IAP family and IAP-targeted cancer therapy

XU Yang, ZHAO Xiao-hang\*

(State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

**Abstract:** The inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) are known as a group of highly conserved endogenous proteins that regulate the activity of caspases and NF- $\kappa$ B survival pathways. The mechanism of resistant apoptosis has played a crucial role in the tumorigenesis, tumor progress and drug resistance. Overexpression of IAPs has been shown to confer protection against a number of apoptosis in a variety of stress and is believed to have important consequences with respect to human cancer. Deregulation of apoptosis is associated to tumor resistance to chemotherapeutic agents. Enhanced chemosensitivity of tumor cells is one of important therapeutic strategies for cancer therapy. This review will focus on biological characteristics and the structure of IAP proteins, and IAP-targeted therapies for cancer treatment.

**Key words:** IAP; apoptosis; tumor; chemosensitivity

细胞凋亡是机体消除有害细胞防止细胞过度增殖的正常生理过程, 细胞凋亡调控是机体维持正常的细胞更新和增殖的关键。肿瘤的发生往往是细胞凋亡异常导致细胞过度增生的结果。Roy 等<sup>[1]</sup>于 1995 年首次从脊髓性肌萎缩症研究中发现了 IAP 蛋白是神经元性凋亡抑制蛋白(neuronal apoptotic inhibitor protein, NAIP), 随后人们陆续发现了细胞凋亡抑制蛋白(cellular IAP、c-IAP 1 和 c-IAP 2)、X 染色体连锁凋亡抑制因子(X-linked IAP, XIAP)、Survivin、黑色素瘤凋亡抑制蛋白(melanoma-IAP, ML-IAP/Livin)、睾丸特异凋亡抑制蛋白(testis-spe-

cific IAL, Ts-IAP/hILP)和含泛素连接酶的杆状病毒 IAP 重复序列<sup>[2]</sup>(baculoviral IAP repeat containing ubiquitin conjugating enzyme, BRUCE/apollon)等, 至今已发现 8 个人类 IAPs 家族蛋白成员。凋亡抑制因

收稿日期: 2009-07-31; 修回日期: 2009-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30428011; 30772507); 国家高技术发展计划("863"计划)(2006AA02A403; 2006AA02A308); 国际科技合作与交流专项(2008DFA31130)

\*通讯作者: Tel: 010-67709015; E-mail: zhaoxh@cicams.ac.cn

子(inhibitor of apoptotic proteins, IAPs)主要通过抑制 Caspase3、7、9 等酶的活性而发挥阻断凋亡的作用。本文就 IAP 家族蛋白的结构、生物学特性及肿瘤靶向治疗进展进行综述。

## 1 IAP蛋白家族的基本结构

IAP 是一类重要的抗细胞凋亡因子, 该家族结构的共同特点是 N 端含有 1 个或 3 个包含 70 个氨基酸的杆状病毒 IAP 重复序列(baculoviral IAP repeat, BIR), C 端包含或不包含 1 个指环(ring finger)结构。IAP 广泛存在于病毒、细菌、酵母、昆虫和哺乳动物中, 其编码蛋白对细胞凋亡具有较强的抑制作用。人类 IAP 基因家族成员分别定位于不同染色体上。IAPs 家族蛋白主要定位于细胞浆, 部分 IAP 蛋白分子, 如 Livin 和 Survivin 定位于细胞核(表 1)。

BIR 结构域是 IAP 家族的共有分子结构, BIR 由含有半胱氨酸/组氨酸序列的约 70 个氨基酸残基组成, 其 C 末端包含 CX<sub>2</sub>CX<sub>16</sub>HX<sub>6</sub>C 的锌指结构, 与相应的氨基酸残基共同构成疏水核心。BIR1 结构域包含 3 个  $\alpha$  螺旋和 5 个反相平行  $\beta$  折叠; BIR2 含 3 个  $\alpha$  螺旋和 3 个反相平行  $\beta$  折叠; BIR3 含 5 个  $\alpha$  螺旋和 3 个反相平行  $\beta$  折叠。不同的 BIR 结构域在结构表面形成小沟, 与靶蛋白 N 端序列表位亲和结合, 靶蛋白包含的特定 N 端序列表位构成 IAP 结合基序(IAP binding motif, IBMs)。依据 BIR 结构域的肽文库筛选, IBMs 第一点为丙氨酸(Ala), 其匹配序列为(NH<sub>2</sub>)AFPF, F 表示疏水氨基酸残基。XIAP 蛋白 BIR2 的 His223 和 BIR3 的 Trp323 等两个位点是 XIAP 与 IBM 相互作用的关键位点。IAP 家族蛋白通过 BIR 结构与活化的 Caspase 的 N 端 IBM 结合, 是抑制细胞凋亡的关键功能域。此外, 在 XIAP 蛋白的 BIR1 结构域中缺乏关键的 His 和 Trp 氨基酸位点, 不能形成相似的肽结合小沟, 因此 XIAP 蛋白

的 BIR1 不能与 IBM 相互作用, 缺乏抑制细胞凋亡的功能<sup>[8]</sup>。

在 IAPs 家族蛋白成员中, 5 个 IAP 家族蛋白的羧基端包含一个指环结构(ring domain), 如 c-IAP1、c-IAP2、XIAP、ILP2 和 Livin 等。指环结构具有 E3 泛素连接酶活性, 经泛素-蛋白酶体介导蛋白降解, 包含指环结构域的 IAP 蛋白还可介导自身和靶蛋白(Caspase 和 Smac)的泛素化降解<sup>[9]</sup>。c-IAP1/2 蛋白各包含 1 个 Caspase 活化募集结构域(caspase activating and recruitment domain, CARD), CARD 结构域位于 c-IAP1/2 蛋白分子 BIR 与指环结构域之间的一段序列, 由 6 个  $\alpha$  螺旋构成的结构域, 介导蛋白和蛋白相互作用, 通过与其他包含此结构域的蛋白形成寡聚体, 调节细胞死亡(图 1)。Plenchette 等<sup>[10]</sup>研究发现 CARD 结构域中包含 1 个功能性的核输出信号(nuclear export signal, NES)。NAIP 蛋白是 IAP 家族中包含核酸结合与寡聚化结构域(nucleotide-binding

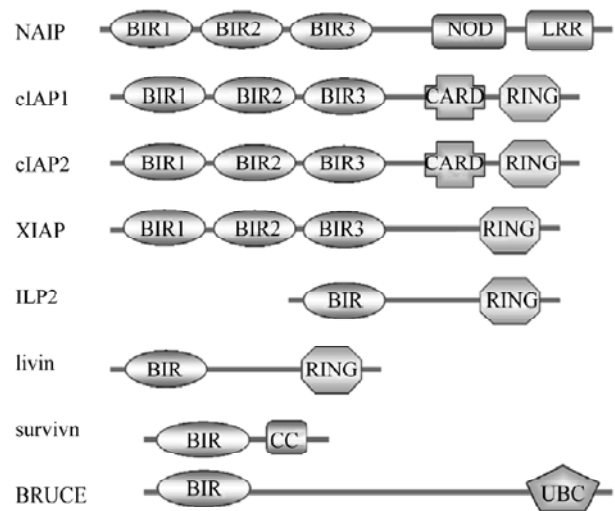


图1 人类IAP蛋白家族的结构域特征

表1 人类IAP基因家族基本特征

分类	基因	染色体定位	蛋白全长(aa)	结构域			细胞定位	参考文献
				BIR	CARD	RING		
NAIP	BIRC1	5q13.1	1403	3	-	-	胞浆	[2]
c-IAP1	BIRC2	11q22	618	3	1	1	胞浆	[3, 4]
c-IAP2	BIRC3	11q22	604	3	1	1	胞浆	[3, 4]
XIAP	BIRC4	Xq25	497	3	-	1	胞浆	[5]
Survivin	BIRC5	17q25	142	1	-	-	胞浆、胞核	[6]
BRUCE	Bruce	2p22	4829	1	-	-	胞浆	[2]
Livin	BIRC7	20q13.3	298	1	-	1	胞浆、胞核	[7]
ILP2	BIRC8	19q13.4	236	1	-	1	胞浆	[2]

and oligomerization domain, NOD)的一类蛋白, IAP 蛋白的CARD和NOD结构域的生物功能尚待进一步研究。Survivin 是 IAP 家族中相对分子质量最小的蛋白, 其 N 端包含一个保守的 BIR 结构域, C 端由 40 个氨基酸组成的螺旋结构域(coiled-coil domain, CC), CC 结构域参与纺锤体形成、染色体排列、姊妹染色单体分离、纺锤体检查点信号及胞质分裂等多种重要功能的调节<sup>[11]</sup>。BRUCE 是 IAP 家族中分子量最大的蛋白, 其相对分子质量为 530 k, N 端包含一个 BIR 结构域, C 末端包含一个泛素连接酶结构域。BRUCE 蛋白在促进 Smac 和 Caspase9 的泛素化并介导蛋白酶体降解, 抑制 Smac 诱导的细胞凋亡中, 发挥重要功能<sup>[12]</sup>。

## 2 IAP 的生物功能

细胞凋亡是一种高度调控的细胞程序化死亡, 凋亡的主要执行者是一组天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶(Caspase), 包括启动型 Caspase 和效应型 Caspase 两类。细胞凋亡主要通过两条途径产生: 由 Fas/caspase8 诱导的死亡受体途径和细胞色素 C/caspase 9 线粒体途径。由于激活的 Caspase 酶将导致严重的后果, 因此 Caspase 的活性被严格调控, 包含两个水平的调节。其中, Caspase 激活的一级调控具有严格的催化特异性和高效性。生理条件下, Caspase 以酶原形式存在于细胞浆内, 当细胞受凋亡信号刺激后, Caspase 经酶促级联激活, 形成活化四聚体, 调控细胞程序化死亡。Caspase 二级调控是由在细胞内 IAP 蛋白迅速与活化的 Caspase 结合, IAPs 蛋白通过 BIR 结构域直接与 Caspase 的 IBM 结合, 抑制 Caspase3/7/9 的催化活性, 阻断细胞凋亡进程。

IAPs 蛋白可调节启动型 Caspase 和效应型 Caspase 的内源凋亡抑制蛋白家族。Eckelman 等<sup>[13]</sup>发现, XIAP 是最有效力的 Caspase 抑制剂, 具有强的稳定性和高效性。主要通过其 BIR2 和 BIR3 结构直接与活化的 Caspase-3/7/9 结合, 抑制 Caspase 酶催化活性。活化 Caspase-9 暴露出 C 末端的含 A-T-P-F 四肽的 IAP 结合基序(IBM), XIAP 蛋白的 BIR3 结构与活化的 Caspase-9 的 ATPF 四肽的 IBM 结合, 有效抑制活化的 Caspase-9<sup>[8]</sup>。BIR2 结构主要识别活化的 Caspase-3、Caspase-7 的 IAP 结合基序, 通过封闭 Caspase 与底物的结合, 抑制其催化活性。Livin 蛋白 N 端的 BIR 和 c-IAP1/2 蛋白的 BIR2 结构域参与调节活化的效应酶 Caspase-3/7, c-IAP1/2 的

BIR3 参与活化 Caspase-8 的 IBM 结合, 封闭 Caspase 与底物的结合, 抑制其催化活性<sup>[10]</sup>。

在 IAPs 家族蛋白成员中, 5 个 IAP 蛋白的羧基端包含指环结构域具有 E3 泛素连接酶活性。c-IAP1 通过 BIR2 与活化 Caspase-3/7 的 IBM 结合, 依赖 E3 泛素连接酶的活性, 经泛素介导 Caspase-3/7 蛋白酶体降解, 从而抑制细胞凋亡<sup>[14]</sup>。在凋亡过程中, c-IAP1 蛋白可被裂解生成 N 端和 C 端的两个片断, C 端片段包含 CARD 和指环结构域, 具有促凋亡的作用。c-IAP1 可调控含有指环结构的 c-IAP1、c-IAP2、XIAP 和 Livin 等 IAP 家族蛋白, 经泛素-蛋白酶体降解, 而不影响缺乏指环结构的 NAIP 和 Survivin 蛋白表达<sup>[15]</sup>。Ma 等<sup>[16]</sup>研究发现 Livin 通过 BIR 结构与 Smac 蛋白结合, 促进 Livin 蛋白 RING 的 E3 酶活性, 促使 Smac/DIABLO 经泛素-蛋白酶体途径降解, 降低了 Smac 的表达水平, 抑制了细胞凋亡。泛素-蛋白酶体途径介导的蛋白降解, 靶蛋白主要依赖泛素激活酶 E1、偶联酶 E2 和泛素连接酶 E3 与泛素分子结合, 经蛋白酶体介导靶蛋白降解。XIAP、c-IAP1、c-IAP2、Livin、hILP 蛋白利用其羧基端包含的指环结构域, 催化自身和其靶分子泛素化, 发生蛋白酶体介导的降解<sup>[9,14]</sup>。IAPs 蛋白通过泛素-蛋白酶体途径催化自身和降解关键凋亡调控因子的 E3 泛素连接酶的作用, 对于认识凋亡抑制蛋白泛素-蛋白酶体降解的调控意义重大。

近年研究表明, NF- $\kappa$ B 途径在 IAP 家族蛋白抗凋亡中发挥重要作用。NF- $\kappa$ B 信号通路主要包括经典途径和旁路途径。在经典途径中, 细胞在静息状态下 p50/p65 与 I $\kappa$ B 结合, 在细胞质中形成三聚体。当细胞受到外源刺激, I $\kappa$ B 激酶(IKK)被磷酸化, 磷酸化 I $\kappa$ B $\alpha$ , 经蛋白酶体介导 I $\kappa$ B $\alpha$  降解, 激活 p50/p65 的 NF- $\kappa$ B, 调节基因转录。旁路途径主要由 p100 或 p105 组成的二聚体激活 NF- $\kappa$ B。细胞受到外源刺激后, 在 NF- $\kappa$ B 诱导激酶(NF- $\kappa$ B induced kinase, NIK)作用下, 引起 IKK 磷酸化而被激活, 使 p100 发生磷酸化并剪切成有活性的 p52/RelB 异源二聚体的 NF- $\kappa$ B, 调节基因转录<sup>[17]</sup>。人类 c-IAP1/2 抑制凋亡功能与 TNF $\alpha$  信号通路中 NF- $\kappa$ B 诱导活化相关, c-IAP1/2 调控 TNF $\alpha$  介导的 NF- $\kappa$ B 的活性。c-IAP1/2 可与 TNF $\alpha$  受体相关因子 2 (TNF $\alpha$  receptor associated factor 2, TRAF2)结合, 通过 TAK1(TGF-beta activated kinase 1)信号途径激活 NF- $\kappa$ B 经典途径。当细胞受到 TNF $\alpha$  刺激, TNF $\alpha$  与 TNF-R1 结合, c-IAP1/2 和受体相互作用蛋白 1 (receptor-interacting

protein, RIP1)被迅速募集到 TNF-R1 上, c-IAP1/2 蛋白可作为 E3 泛素连接酶, 靶向 Rip 通过 K63 位点进行多聚泛素化, 进一步募集 TAK1 和 TAB23, 形成一个大的蛋白激酶复合体磷酸化 IKK, 催化 I $\kappa$ B 磷酸化与降解, 释放并活化 NF- $\kappa$ B 因子, 促进细胞存活。RIP 的多聚泛素化依赖 c-IAP1/2 的 E3 连接酶活性<sup>[18]</sup>。IAP 小分子拮抗剂可以导致 c-IAP1/2 蛋白迅速降解, 调节 NF- $\kappa$ B 旁途径的关键调节因子 NIK 蛋白, 诱导产生 TNF $\alpha$ , 触发细胞凋亡<sup>[19,20]</sup>。近年发现, XIAP、NAIP 和 Livin 通过选择性激活由 TAK1 介导的 MAP 激酶 JNK1, 显著抑制由 TNF $\alpha$  诱导的细胞凋亡。TAK1/JNK1 途径增强了 XIAP 抗凋亡作用, XIAP 通过 BIR1 结构域特异性与 TAK1 结合蛋白(TAK1 binding protein, TAB)结合, 经 TAB1 与 TAK 的结合, 介导 TAK1 依赖的 NF- $\kappa$ B 的活化, 促进细胞存活<sup>[21]</sup>。研究表明, IAPs 家族成员抑制细胞凋亡功能与 NF- $\kappa$ B 诱导活化的存活信号相关。

### 3 IAP 家族蛋白的内源拮抗剂

IAP 家族蛋白的抗凋亡活性可被多种内源抑制蛋白调控, 如 Smac/DIABLO、Omi/HtrA2 和 XIAP 相关因子(XIAP-associated factor1, XAF)。Smac 基因编码一种由线粒体释放的促凋亡蛋白, 是参与细胞凋亡线粒体内源通路二级反应蛋白, 促进细胞凋亡。Smac/DIABLO 蛋白是由细胞核编码的线粒体蛋白, 通过线粒体定位信号介导进入线粒体膜间隙, 经蛋白酶水解形成相对分子质量为 23 k 的成熟蛋白<sup>[22]</sup>。当细胞受到外源刺激, Smac 蛋白由线粒体释放进入细胞浆, 其 N 末端 Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) 四肽序列结构, 与 IAPs 家族蛋白的 BIR2 和 BIR3 结构形成双价结合, 竞争 XIAP 的 BIR 结构与 Caspase 相互作用, 释放活化的 Caspase, 促进细胞凋亡。Omi/HtrA2 是 HtrA 丝氨酸蛋白酶家族成员, 由细胞核基因编码, 通过线粒体定位信号进入线粒体内、外膜之间的膜间隙, 经蛋白酶水解形成相对分子质量为 37 k 的成熟蛋白<sup>[23]</sup>。当细胞受到外源刺激, Omi 蛋白由线粒体释放进入细胞浆, 通过自身的丝氨酸蛋白酶活性, 酶切 XIAP 促进其降解, 形成对 XIAP 不可逆的抑制效应。Omi/HtrA2 蛋白的丝氨酸蛋白酶区域突变后, 降低了活化 Caspases 效应能力, 对外源凋亡刺激信号敏感性降低<sup>[24]</sup>。不同于 Smac 蛋白, XAF1 主要定位于细胞核, 在正常生理条件下不与靶蛋白 XIAP 结合。当细胞受到凋亡信号刺激时, XAF1 可组成性的与 XIAP 结合, 抑

制 XIAP 蛋白抗 Caspases 级联反应作用, 促进 TNF $\alpha$  介导细胞凋亡<sup>[25]</sup>。XAF1 蛋白可与 XIAP、c-IAP1、c-IAP2、Livin、IPL2 和 NAIP 蛋白结合。XAF1 蛋白不与 Survivin 直接结合, 而通过与 XIAP 蛋白形成复合物, 间接促进 Survivin 降解<sup>[26]</sup>。这表明 XAF1 蛋白与 IAP 结合, 抑制 IAP 蛋白的抗凋亡功能, 间接促进细胞凋亡。

上述研究表明, 尽管内源 IAP 拮抗剂在正常生理条件下定位于不同的细胞器, 当细胞接受外源刺激后, 通过改变线粒体膜通透性, Smac/DIABLO 和 Omi/HtrA2 蛋白从线粒体释放进入细胞浆, 通过其 N 端 IAP 结合基序与 IAPs 家族蛋白的 BIR3 结构域结合, 阻断 Caspase-IAP 复合物形成, 促进细胞凋亡。而 Omi/HtrA2 蛋白还可通过丝氨酸蛋白酶发挥促凋亡的作用。

### 4 靶向 IAPs 蛋白的肿瘤治疗

细胞凋亡失调在肿瘤发生发展中起着十分重要的作用, 肿瘤细胞异常表达 IAPs 蛋白与肿瘤细胞抵抗凋亡密切相关, 细胞凋亡失调引起细胞过度增殖而导致肿瘤发生发展<sup>[27]</sup>。Zender 等<sup>[28]</sup>在对小鼠肿瘤模型和人肝癌的全基因组分析中发现, 小鼠染色体 9qA1 和人 11q22 区域存在基因扩增, c-IAP1 基因的扩增促进了小鼠模型中肝癌的发生发展。Shi 等<sup>[29]</sup>研究发现, XIAP 过表达增加细胞抗凋亡、移行及肿瘤转移能力。免疫组化分析 192 例配对肝癌组织样本中的 XIAP 蛋白表达, 90% 肝癌样本呈现 XIAP 高表达, XIAP 表达升高显著增加肝癌的复发和转移, 与患者不良预后相关<sup>[29]</sup>。提示 IAPs 蛋白抑制细胞凋亡, 对肿瘤的发生发展、侵袭和转移起着重要作用, 通过调节 IAP 蛋白的水平有可能改善肿瘤疗效。

在肿瘤治疗中, 绝大多数化疗药物经过线粒体途径激活细胞凋亡<sup>[30]</sup>。与此同时, 肿瘤细胞凋亡失调是导致对化疗药物耐药的主要原因之一, 凋亡抑制蛋白 IAPs 在抑制细胞凋亡过程中发挥着重要作用。在肺癌、胰腺癌和肾癌中 IAP 家族蛋白表达水平与耐药性相关<sup>[31,32]</sup>。Karasawa 等<sup>[33]</sup>用基因芯片分析, 比较了对化疗药物敏感的 DLD-1 和耐药的 DLD-1/FU 结肠癌细胞系, 发现耐药细胞 DLD-1/FU 中 c-IAP2 高表达, 在结肠癌组织中 c-IAP2 阳性患者化疗后易于早期复发, 提示 c-IAP2 表达与 5-Fu 治疗耐药相关。顺铂耐药细胞中 IAP 的表达, 包括 c-IAP1、XIAP 和 Survivin 蛋白表达与细胞的耐药表

型密切相关<sup>[34]</sup>。Gordon 等<sup>[35]</sup>研究发现, c-IAP1/2 蛋白过表达介导了恶性胸膜间皮瘤对顺铂或其他化疗药物的耐药性。尽管肿瘤的化疗耐药性是一个多基因参与的复杂过程。这些研究说明了 IAPs 家族蛋白不仅在细胞凋亡调控中发挥重要作用, 而且与肿瘤细胞的耐药关系密切。

由于 IAP 家族蛋白在细胞凋亡中的重要作用, IAPs 家族蛋白在肿瘤组织细胞中高表达。针对 IAP 蛋白分子为肿瘤治疗的靶点, 如何有效提高肿瘤细胞对凋亡敏感性, 成为肿瘤靶向治疗研究的热点。人们在利用 RNA 干扰、反义核酸、核酶、基因治疗等技术抑制 IAP 蛋白在肿瘤细胞内的表达, 通过靶向单一基因发挥作用, 有效地促进了肿瘤细胞凋亡, 在提高对放化疗的敏感性等方面的研究取得了进展。Lami 等<sup>[36]</sup>将靶向凋亡抑制蛋白 XIAP 的 RNA 干扰技术作用人乳腺癌细胞, 体内外实验表明, 诱导肿瘤细胞凋亡并增强了对传统化疗药物的敏感性。Chu 等<sup>[37]</sup>针对 BRUCE 蛋白的 RNA 干扰技术作用人宫颈癌和乳腺癌细胞, 体内外研究显示抑制了肿瘤细胞生长, 诱导凋亡, 与 5-fu 联合应用, 增强了化疗药物的疗效。Hu 等<sup>[38]</sup>用靶向 XIAP 蛋白的反义寡核苷酸作用人非小细胞肺癌, 表明有效的抑制了 XIAP 蛋白和 mRNA 的表达, 诱导细胞凋亡, 使癌细胞对放疗和化疗的敏感性升高。Shanker 等<sup>[39]</sup>应用 survivin 的反义寡核苷酸, 抑制了 survivin 表达, 通过 Caspase 依赖和非依赖途径诱导细胞死亡, 增强了对化疗的敏感性。当前, 靶向 XIAP 蛋白的反义寡核苷酸(AEG35156)已进入临床 I/II 期试验。Schimmer 等<sup>[40]</sup>报道了高剂量的 AEG35156, 有效地抑制了 XIAP 蛋白表达, AEG35156 与化疗药物联合治疗耐药/复发的急性髓细胞样白血病(AML)的 I/II 临床试验显示总有效率达 47%, 提高了单一方法的疗效。

近年来, 随着对 Smac 分子的结构研究, 促进了人们利用 Smac 小分子模拟物与 IAP 蛋白 BIR 结构域的多肽在肿瘤治疗中的研究。人们设计 Smac N 端四肽模拟物, 可同时靶向多个 IAP 蛋白家族分子, 如 XIAP, c-IAP1 和 c-IAP2, 作为小分子拮抗剂, 有效地介导 XIAP 和 c-IAP1 在细胞内的降解, 促进了细胞凋亡<sup>[41, 42]</sup>。Chęcinska 等<sup>[43]</sup>运用 Smac 模拟物联合化疗药物作用于非小细胞肺癌细胞, 显著促进了顺铂诱导的细胞凋亡。Smac 小分子模拟物促进 Caspase3 活化, 介导肿瘤细胞凋亡。Dai 等<sup>[44]</sup>发现联合小分子 IAP 抑制剂可以显著增强高表达 IAP

蛋白的前列腺癌的放疗敏感性。Li 等<sup>[45]</sup>合成的 Smac 小分子模拟物, 在肿瘤细胞中抑制 IAPs 蛋白的作用, 与 TNF $\alpha$  和 TRAIL 协同促进 Caspase 活化和细胞凋亡。Bilim 等<sup>[46]</sup>研究发现靶向 XIAP 蛋白的 shRNA 和 Smac 蛋白模拟物小分子 7 肽作用肾癌细胞, 显著增强了肾癌细胞对化疗药的敏感性, 提示靶向 IAPs 蛋白是一种有效克服肾细胞癌耐药的策略。Huang 等<sup>[47]</sup>依据 Smac 的 AVPI 四肽, 利用 Smac 蛋白 N 端四肽结构合成了化合物库, 通过筛选该化合物库发现了具有与 BIR3 相似结合的非肽类模拟物, 具有更好的细胞透膜性、血浆稳定性, 以及较低的作用浓度。各种靶向 XIAP 的 BIR3 结构域的非肽类的小分子化合物, 有效地促进了 TRAIL 诱导肿瘤细胞的凋亡。大量的研究表明, 由 Smac 蛋白衍生的四肽或非肽类模拟物, 同样可以和 IAP 蛋白的 BIR 结构域结合, 抑制 IAP 蛋白的功能, 促进 Caspase 活化和肿瘤细胞凋亡。IAP 小分子拮抗剂通过介导 c-IAP1/2 蛋白迅速降解, 活化 NF- $\kappa$ B 的通路, 促进了 TNF $\alpha$  的 mRNA 表达, TNF $\alpha$  信号通路和 Caspase 活化, 触发细胞的凋亡。利用 Smac 小分子模拟物, 协同化疗药物作用, 可以显著增强抗癌药物的疗效。

理论上, IAP 的小分子拮抗剂是一种凋亡敏感剂, 并不能直接诱导凋亡, 通过与放化疗的协同作用, 可有效地促进肿瘤细胞凋亡。近来对于 IAP 的小分子拮抗剂的研究发现, 小分子拮抗剂在低浓度时即可直接杀伤肿瘤细胞。对其作用机制的研究提示, Smac 模拟物通过刺激 c-IAP 的泛素化, 降解了 c-IAP1 蛋白, 诱导肿瘤细胞分泌 TNF $\alpha$  外源凋亡信号, TNF $\alpha$  外源凋亡通路活化 Caspase8, 进而活化 Caspase3/7 介导细胞凋亡通路<sup>[14, 48]</sup>。当前已报道了多种 IAP 的小分子拮抗剂, 使其发展为抗癌试剂, 其中两种化合物已经进入了一期临床试验研究(表 2)。针对 Smac 模拟物的大量研究为肿瘤的治疗带来了新的希望, 尤其是对化疗产生耐药的肿瘤治疗展现了光明的前景。

## 5 小结

综上所述, IAPs 家族蛋白与肿瘤耐药性密切相关, 研究表明, IAPs 介导的凋亡抑制可能是肿瘤细胞产生耐药性的原因之一。IAPs 蛋白是调控肿瘤细胞凋亡和对化疗药物敏感性的关键分子, 有可能发展为逆转肿瘤细胞耐药、提高疗效的新靶点。目前, 以 IAPs 家族蛋白为靶点的抗肿瘤耐药治疗研究

表2 靶向IAP家族蛋白的小分子拮抗剂

化合物	靶分子	分类	发展阶段	参考文献
AEG35156 GEM640	XIAP	Antisense	Phase 2	[2]
AEG40826 HGS1029	c-IAP1 c-IAP2	Smac mimetic	Phase 1	Aegera
LBW242	XIAP, livin, Survivin	Smac mimetic	Preclinical	[49]
Compound 3	XIAP, livin, Survivin	Smac mimetic	Preclinical	[50]
Compound 11	XIAP, livin, Survivin	Smac mimetic	Preclinical	[51]
CompoundC Compound 8	XIAP, livin, Survivin	Smac mimetic	Phase 1	[52]
BV6	XIAP, livin, Survivin	Smac mimetic	preclinical	[20]
GT-T Compound A	XIAP, livin, Survivin	Smac mimetic	Preclinical	[19]
SM-164 SM-122	XIAP, livin, Survivin	Smac mimetic	Preclinical	[53]
SM-131	XIAP, livin, Survivin	Smac mimetic	Preclinical	[54]
AEG40730	XIAP	Smac mimetic	Preclinical	[55]

有了初步进展,拮抗IAPs蛋白的治疗策略初步显示具有对特定肿瘤细胞的选择性。但是,机体对细胞凋亡的调控是极其复杂的,还需要不断认识人类肿瘤中IAPs抑制细胞凋亡的确切分子机理,如认识IAP抑制剂对肿瘤和相应正常细胞的敏感性、小分子抑制剂在体内潜在的毒副作用等,为肿瘤的临床治疗提供新的思路和方案。

#### [参 考 文 献]

- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*, 1995, 80 (1): 167-78
- LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, et al. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 2008, 27 (48): 6252-75
- Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, et al. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell*, 2008, 30 (6): 689-700
- Dai Z, Zhu WG, Morrison CD, et al. A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes. *Hum Mol Genet*, 2003, 12 (7): 791-801
- Fong WG, Liston P, Rajcan-Separovic E, et al. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics*, 2000, 70 (1): 113-22
- Konopka K, Spain C, Yen A, et al. Correlation between the levels of survivin and survivin promoter-driven gene expression in cancer and non-cancer cells. *Cell Mol Biol Lett*, 2009, 14 (1): 70-89
- Franklin MC, Kadkhodayan S, Ackerly H, et al. Structure and function analysis of peptide antagonists of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *Biochemistry*, 2003, 42 (27): 8223-31
- Eckelman BP, Drag M, Snipas SJ, et al. The mechanism of peptide-binding specificity of IAP BIR domains. *Cell Death Differ*, 2008, 15 (5): 920-8
- Vaux DL, Silke J. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6 (4): 287-97
- Plenchette S, Cathelin S, Rebe C, et al. Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: a nuclear export signal-mediated event. *Blood*, 2004, 104 (7): 2035-43
- Engelsma D, Rodriguez JA, Fish A, et al. Homodimerization antagonizes nuclear export of survivin. *Traffic*, 2007, 8 (11): 1495-502
- Hao Y, Sekine K, Kawabata A, et al. Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nat Cell Biol*, 2004, 6 (9): 849-60
- Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep*, 2006, 7 (10): 988-94
- Choi YE, Butterworth M, Malladi S, et al. The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspases-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing. *J Biol Chem*, 2009, 284(19):12772-82
- Cheung HH, Plenchette S, Kern CJ, et al. The RING domain of cIAP1 mediates the degradation of RING-bearing inhibitor of apoptosis proteins by distinct pathways. *Mol Biol Cell*, 2008, 19 (7): 2729-2740
- Ma L, Huang Y, Song Z, et al. Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Death Differ*, 2006, 13 (12): 2079-88
- Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF- $\kappa$ B signaling: balancing life and death: a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest*, 2005, 115 (10): 2625-32

- [18] Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, et al. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (33): 11778-83
- [19] Vince JE, Wong WW, Khan N, et al. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF $\alpha$ -dependent apoptosis. *Cell*, 2007, 131 (4): 682-93
- [20] Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, et al. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF- $\kappa$ B activation, and TNF $\alpha$ -dependent apoptosis. *Cell*, 2007, 131 (4): 669-81
- [21] Lu M, Lin SC, Huang Y, et al. XIAP induces NF- $\kappa$ B activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol Cell*, 2007, 26 (5): 689-702
- [22] Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000, 102 (1): 33-42
- [23] Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenabeele P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ*, 2008, 15 (3): 453-60
- [24] Suzuki Y, Takahashi-Niki K, Akagi T, et al. Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways. *Cell Death Differ*, 2004, 11 (2): 208-16
- [25] Straszewski-Chavez SL, Visintin IP, Karassina N, et al. XAF1 mediates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis and X-linked inhibitor of apoptosis cleavage by acting through the mitochondrial pathway. *J Biol Chem*, 2007, 282 (17): 13059-72
- [26] Arora V, Cheung HH, Plenchette S, et al. Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. *J Biol Chem*, 2007, 282 (36): 26202-9
- [27] Shibata T, Noguchi T, Takeno S, et al. Disturbed XIAP and XAF1 expression balance is an independent prognostic factor in gastric adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15 (12): 3579-87
- [28] Zender L, Spector MS, Xue W, et al. Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell*, 2006, 125 (7): 1253-67
- [29] Shi YH, Ding WX, Zhou J, et al. Expression of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein in hepatocellular carcinoma promotes metastasis and tumor recurrence. *Hepatology*, 2008, 48 (2): 497-507
- [30] Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 2002, 108 (2): 153-64
- [31] Yonesaka K, Tamura K, Kurata T, et al. Small interfering RNA targeting survivin sensitizes lung cancer cell with mutant p53 to adriamycin. *Int J Cancer*, 2006, 118 (4): 812-20
- [32] Lopes RB, Gangeswaran R, McNeish IA, et al. Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *Int J Cancer*, 2007, 120 (11): 2344-52
- [33] Karasawa H, Miura K, Fujibuchi W, et al. Down-regulation of cIAP2 enhances 5-FU sensitivity through the apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Sci*, 2009, 100 (5): 903-13
- [34] Nomura T, Yamasaki M, Nomura Y, et al. Expression of the inhibitors of apoptosis proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells. *Oncol Rep*, 2005, 14 (4): 993-7
- [35] Gordon GJ, Mani M, Mukhopadhyay L, et al. Inhibitor of apoptosis proteins are regulated by tumour necrosis factor- $\alpha$  malignant pleural mesothelioma. *J Pathol*, 2007, 211 (4): 439-46
- [36] Lima RT, Martins LM, Guimaraes JE, et al. Specific downregulation of bcl-2 and XIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11 (5): 309-16
- [37] Chu L, Gu J, Sun L, et al. Oncolytic adenovirus-mediated shRNA against Apollon inhibits tumor cell growth and enhances antitumor effect of 5-fluorouracil. *Gene Ther*, 2008, 15 (7): 484-94
- [38] Hu Y, Cherton-Horvat G, Dragowska V, et al. Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (7): 2826-36
- [39] Shankar SL, Mani S, O'Guin KN, et al. Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways. *J Neurochem*, 2001, 79 (2): 426-36
- [40] Schimmer AD, Estey EH, Borthakur G, et al. Phase I/II Trial of AEG35156 X-linked inhibitor of apoptosis protein antisense oligonucleotide combined with idarubicin and cytarabine in patients with relapsed or primary refractory acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 2009, 27 (28): 4741-6
- [41] Sasaki Y, Minamizawa M, Ambo A, et al. Cell-penetrating peptide-conjugated XIAP-inhibitory cyclic hexapeptides enter into Jurkat cells and inhibit cell proliferation. *FEBS J*, 2008, 275 (23): 6011-21
- [42] Cossu F, Mastrangelo E, Milani M, et al. Designing Smac-mimetics as antagonists of XIAP, cIAP1, and cIAP2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378 (2): 162-7
- [43] Checinska A, Hoogeland BS, Rodriguez JA, et al. Role of XIAP in inhibiting cisplatin-induced caspase activation in non-small cell lung cancer cells: a small molecule Smac mimics sensitizes for chemotherapy-induced apoptosis by enhancing caspase-3 activation. *Exp Cell Res*, 2007, 313 (6): 1215-24
- [44] Dai Y, Liu M, Tang W, et al. Molecularly targeted radiosensitization of human prostate cancer by modulating inhibitor of apoptosis. *Clin Cancer Res*, 2008, 14 (23): 7701-10
- [45] Li L, Thomas RM, Suzuki H, et al. A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNF $\alpha$ -mediated cell death. *Science*, 2004, 305 (5689): 1471-1474
- [46] Bilim V, Yuuki K, Itoi T, et al. Double inhibition of XIAP and Bcl-2 axis is beneficial for retrieving sensitivity of renal cell cancer to apoptosis. *Br J Cancer*, 2008, 98 (5): 941-949
- [47] Huang JW, Zhang Z, Wu B, et al. Fragment-based design of small molecule X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibitors. *J Med Chem*, 2008, 51 (22): 7111-8
- [48] Wang L, Du F, Wang X. TNF- $\alpha$  induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, 2008, 133 (4): 693-703
- [49] Weisberg E, Kung AL, Wright RD, et al. Potentiation of

- antileukemic therapies by Smac mimetic, LBW242: effects on mutant FLT3-expressing cells. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6 (7): 1951-61
- [50] Petersen S, Wang L, Yalcin-Chin A, et al. Autocrine TNF $\alpha$  signaling renders human cancer cells susceptible to smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer Cell*, 2007, 12 (5): 445-56
- [51] Bockbrader K, Tan M, Sun Y. A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, 2005, 24 (49): 7381-8
- [52] Park C, Sun C, Olejniczak E, et al. Non-peptidic small molecule inhibitors of XIAP. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15 (3): 771-5
- [53] Golstein P, Kroemer G. A multiplicity of cell death pathways. Symposium on apoptotic and non-Apoptotic cell death pathways. *EMBO Reports*, 2007, 8 (9): 829-33
- [54] Sun H, Nikolovska-Coleska Z, Lu J, et al. Design, synthesis and evaluation of a potent, cell-permeable, conformationally constrained second mitochondria derived activator of caspase (Smac) mimetic. *J. Med. Chem*, 2006, 49 (26): 7916-20
- [55] Bertrand M, Milutinovic S, Dickson K, et al. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell*, 2008, 30 (6): 689-700