

DOI: 10.13376/j.cbbs/202501060122

文章编号: 1004-0374(2025)10-1270-09

靶向TNIK在肿瘤治疗中的研究进展

张来顺^{1,2}, 许磊^{2,3*}, 李佳^{1,2,3,4,5*}

(1 遵义医科大学, 遵义 563006; 2 中科中山药物创新研究院, 中山 528400; 3 中国科学院上海药物研究所, 生命过程小分子调控全国重点实验室, 上海 201203; 4 国科大杭州高等研究院, 杭州 310000; 5 中科环渤海(烟台)药物高等研究院, 烟台新药创制山东省实验室, 烟台 264117)

摘要: TNIK 是 STE20 激酶家族成员, 正日益受到学术界和药物研发领域的广泛关注。TNIK 与多种蛋白相互作用, 参与多条癌症相关信号通路, 进而影响细胞的增殖、迁移、分化和代谢, 其异常表达与多种肿瘤的发生发展密切相关。因此, 靶向 TNIK 为治疗癌症提供了一种新的策略, 截至目前已报道多项靶向 TNIK 治疗癌症的研究。本综述主要对 TNIK 的生物学信息、在癌症中的作用、相关抑制剂研究进展进行总结, 并重点对 TNIK 抑制剂的研发方向、应用前景进行了探讨。

关键词: TNIK; 癌症; WNT 信号; 结直肠癌; TNIK 抑制剂

中图分类号: R730.5; R96 **文献标志码:** A

Research progress of targeting TNIK in cancer therapy

ZHANG Lai-Shun^{1,2}, XU Lei^{2,3*}, LI Jia^{1,2,3,4,5*}

(1 Zunyi Medical University, Zunyi 563006, China; 2 Zhongshan Institute for Drug Discovery, Zhongshan 528400, China; 3 State Key Laboratory of Chemical Biology, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 4 Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310000, China; 5 Shandong Laboratory of Yantai Drug Discovery, Bohai Rim Advanced Research Institute for Drug Discovery, Yantai 264117, China)

Abstract: TNIK, a member of the STE20 kinase family, is attracting growing interest from both the academic community and the field of drug discovery research. Through multiprotein interactions, TNIK exerts pleiotropic effects on cancer-relevant pathways, driving the rewiring of proliferative, migratory, differentiative, and metabolic programs. Moreover, abnormal TNIK expression is closely associated with the development and progression of various cancers. As a result, targeting TNIK has emerged as a novel strategy for cancer therapy. To date, multiple studies on TNIK-targeted cancer treatments have been published. This review summarizes the biological characteristics of TNIK, its roles in cancer, the progress in TNIK inhibitor research, and explores the development directions and potential applications of TNIK inhibitors.

Key words: TNIK; cancers; WNT signaling; colorectal; TNIK inhibitors

TNIK (TRAF2- and NCK-interacting kinase, TNIK 和 NCK 相互作用激酶) 是 STE20 激酶家族中的 GCKs (germinal center kinases, 生发中心激酶)

亚家族成员。它与 TRAF2 (TNF receptor associated factor 2, 肿瘤坏死因子受体相关因子 2) 和 NCK1 (NCK adaptor protein 1, NCK 衔接蛋白 1) 相互作用,

收稿日期: 2025-05-16; 修回日期: 2025-06-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(92253306, 82130099, 82342005); 中科中山药物创新研究院高水平创新研究院建设自主部署项目“创新药物基础研究及其关键技术”(ZIDD202301); 广东省博士工作站科研经费

*通信作者: E-mail: 0024xl@zidd.ac.cn (许磊); jli@simmm.ac.cn (李佳)

参与TRAF2信号转导^[1]。TNIK是RAP-2a (Ras-related protein 2a, Ras 相关蛋白 2a) 的效应子, 调节肌动蛋白细胞骨架及细胞扩散^[2]。TNIK 还是 WNT 信号通路的重要组分, 参与通路的活化过程, 在癌症发生发展中扮演重要角色, 其主要功能包括但不限于对癌细胞增殖、分化、干细胞表型维持以及迁移的调节^[3-5]。因此, 科学家们对 TNIK 开展了许多研究: 从 TNIK 在不同癌症中的不同功能, 到 TNIK 相关药物的开发, 这无疑为治疗相关疾病提供了新的思路。

本文综述了 TNIK 的分子结构特征、在细胞各个通路中的作用, 以及 TNIK 作为新的癌症诊断和治疗靶点的研究现状, 并对目前的现状和未来研究方向进行探讨, 以期对 TNIK 相关研究提供参考。

1 TNIK的生物学信息

1.1 TNIK的分子结构特征

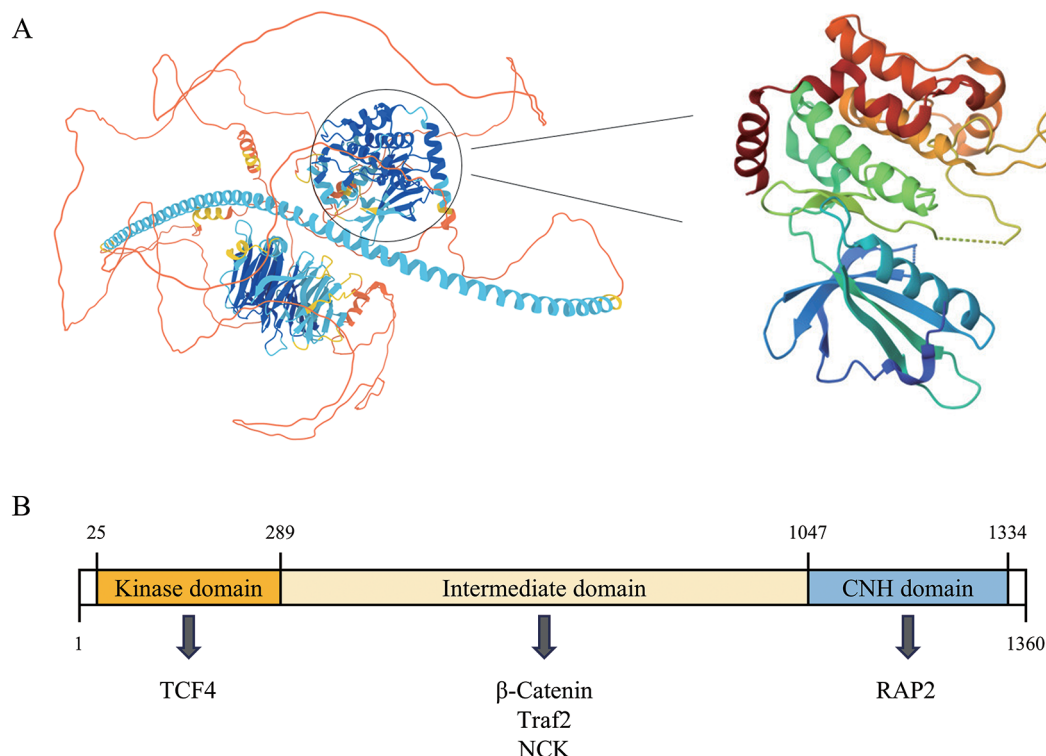
TNIK 基因编码一个由 1 360 个氨基酸组成的蛋白 (图 1), 其具有 N 端激酶结构域、中间结构域和 C 端 CNH (Citron homology, Citron 同源) 结构域。TNIK 蛋白 C 端和 N 端结构域均与 NIK (NCK-

interacting kinase, NCK 相互作用激酶) 有 90% 的同源性, 而其中间结构域与 NIK 仅有 53% 的同源性; 研究发现, 该蛋白具有八种剪切体亚型^[1]。

根据人类蛋白质图谱 (Human Protein Atlas) 数据库, TNIK 蛋白在大部分器官中均有表达, 但是表达量和亚型占比却不尽相同, 其在心脏、脑和骨骼肌中水平较高。TNIK 的八个剪切体由三个外显子 (ex14、ex16、ex21) 的表达与否导致: 脑中主要表达包含 ex14、ex16、ex21 的亚型, 脊髓、骨骼肌、肝中主要表达包含 ex14、ex16 的亚型, 而睾丸、肺、肾主要表达包含 ex16 的亚型^[6]。这表明, TNIK 基因在不同组织中的剪切受到严格调控, TNIK 蛋白在不同组织中可能扮演不同的角色, 比如: 在培养神经元细胞中, ex14 的加入可抑制 F- 肌动蛋白束的形成^[6]; 在睾丸中, ex14 不利于肌动蛋白束的形成, PTBP1 (polypyrimidine tract binding protein 1, 多聚嘧啶区结合蛋白 1) 参与该剪切调控^[7]。

1.2 TNIK对细胞骨架和扩散的调控

TNIK 最初被发现与 F- 肌动蛋白结构破坏和细胞扩散抑制相关, 是首个被报道的可能参与细胞骨架调节的 GCK 家族激酶^[1]。研究表明, TNIK 是



A: 图左为TNIK蛋白的完整结构, 由AlphaFold3预测得到(AF-Q9UKE5-F1); 其激酶结构域如图右所示, 该结构来自PDB数据库(PDB ID: 5CWZ)。B: TNIK与其他蛋白相互作用的结构域示意图。

图1 TNIK蛋白结构及互作蛋白示意图

RAP-2a 调节肌动蛋白细胞骨架的特异性效应物, RAP-2a 与 TNIK 的 CNH 结构域结合, 促进其自磷酸化和易位到不溶性细胞骨架部位, 增强其抑制细胞扩散的能力^[2]。

1.3 TNIK对糖脂代谢的调控

使用 *Tnik* 转基因动物模型研究发现, TNIK 是一种关键的调控糖脂代谢的激酶。TNIK 参与多种细胞信号转导过程, 包括 JNK (c-Jun N-terminal kinase, c-Jun N 末端激酶)、NF- κ B (nuclear factor kappa B, 核因子 κ B)、WNT 和 AMPK (AMP activated protein kinase, 腺苷酸活化蛋白激酶) 信号通路, 这些信号共同参与调节糖脂代谢^[8]。在小鼠/果蝇中, *Tnik/msn* 基因敲除可导致脂肪生成减少; 研究发现, *Tnik* KO 小鼠活动能力增强, 胰岛素信号增强, 骨骼肌、白色脂肪组织、肝脏组织中葡萄糖和脂质处理能力提高; 并且在人 2 型糖尿病数据库中, TNIK 与多项代谢指标存在显著相关性, 包括随机血糖、空腹血糖、糖化血红蛋白 (HbA1c)、体重指数 (BMI)、2 型糖尿病患病状态以及甘油三酯 (TG) 水平^[8]。

TNIK 与糖脂代谢相关其实早已有相关报道。转录因子 TCF4/TCF7L2 (transcription factor 4, 转录因子 4, 也被称为 TCF7L2) 参与调控糖脂代谢, 其基因多态性与糖尿病的发生相关^[9, 10], 而 TNIK 可以与 TCF4 结合并调控其转录活性^[11-13]。敲除 *Tnik* 基因第四外显子 (将导致 TNIK 激酶结构域缺失) 的小鼠体重明显更低, 且 TNIK 缺失小鼠血清总胆固醇 (T-CHO)、葡萄糖 (GLU) 和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平显著降低^[12]。这些研究表明, TNIK

可能在调控肥胖方面有着非凡的潜力。

2 TNIK与癌症

TNIK 在多种癌症中异常表达。在肺鳞状细胞癌 (LSCC) 中, 近半数的患者肿瘤中存在 TNIK 拷贝数增加的现象; 在 LSCC 细胞系中, TNIK 的 mRNA 和蛋白水平比正常肺上皮细胞更高^[14]。在中国胃癌患者中, 约有 7% (8/106) 的病例存在 TNIK 基因扩增, 该遗传学改变与 TNIK 蛋白表达上调密切相关^[15]。

2.1 TNIK在癌症相关信号通路中的作用

当 WNT 信号蛋白与其受体结合时, β -Catenin 蛋白的降解过程被削弱, 导致 β -Catenin 在胞质中积累并入核, 稳定的 β -Catenin 在核内与 TCF/LEF 转录因子结合形成转录共激活因子, 开启 WNT 靶基因的转录^[16, 17]。TNIK 通过作用于 TCF4 转录因子从而影响 WNT/ β -Catenin 通路 (图 2)。具体而言, β -Catenin 首先介导 TNIK 磷酸化活化且促进其入核^[13]; 然后, TNIK 在细胞核内同时与 β -Catenin 和 TCF4 结合, 并直接磷酸化 TCF4 转录因子, 诱导下游靶基因转录^[11-13]。当 TNIK 被干扰时, TCF4 的转录因子活性被抑制^[11-13]; TNIK 蛋白 K54R 突变 (将第 54 位的赖氨酸突变为精氨酸, 将导致 TNIK 失去激酶活性^[1]) 可抑制 TCF4 的转录因子活性, 相反, 过表达野生型 TNIK 可以显著增强 TCF4 的转录因子活性, 并且这种激活可以被 TCF4 第 154 位残基的失活突变逆转^[11]。由此可见, TNIK 的激酶催化活性对 WNT 通路的激活过程非常重要。

在超过 30% 的肺鳞癌患者中存在 *TNIK* 基因扩增, TNIK 在肺鳞癌细胞中通过直接磷酸化 Merlin

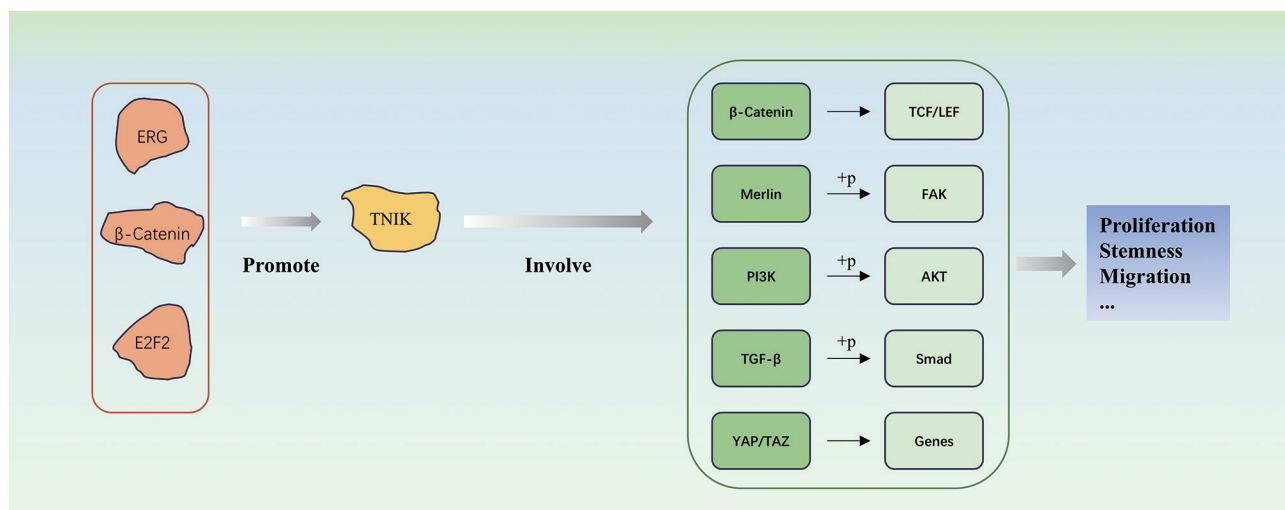


图2 TNIK的上游调控蛋白及其参与调控的下游通路示意图

蛋白,介导FAK(focal adhesion kinase,局部黏着斑激酶)蛋白磷酸化增加,并介导YAP转录因子上调(图2),促进癌症发展^[14]。在LSCC细胞中敲低TNIK可抑制FAK第397位的磷酸化,并抑制细胞生长,重新表达TNIK可恢复FAK磷酸化^[14]。

通过抑制TNIK可实现对TGF- β (transforming growth factor- β ,转化生长因子 β)-Smad通路、WNT通路、TGF- β -FAK通路以及YAP-TAZ靶基因的抑制(图2),抑制TGF- β 引起的A549细胞的上皮间质转化(EMT)以及形态学变化^[18,19]。

在胃癌中,TNIK通过AKT途径促进癌症发展(图2):在TNIK扩增的胃癌细胞中抑制TNIK表达,可显著抑制细胞生长并诱导其死亡;研究发现,以上作用通过AKT通路以及细胞自噬途径实现^[15]。

2.2 TNIK对癌细胞干性的调控

众所周知,WNT通路对于多种癌症的干细胞干性维持具有重要作用,而癌症干细胞是多种癌症复发的元凶^[20-22]。在肠道中,WNT信号对于维持肠道干细胞的未分化状态和自我更新能力至关重要^[23],由于遗传改变导致的WNT信号异常激活可诱导癌症发生或癌症干细胞产生^[24-26]。

研究发现,结直肠癌肿瘤干细胞标志物CD44和LGR5是WNT信号通路的靶基因^[12]。而TNIK可以调控WNT通路活性,因此对肿瘤细胞干性具有调节作用。TNIK抑制剂NCB-0846可以下调结直肠癌肿瘤干细胞表面标志物(CD44、CD133、CD166、CD29和EpCAM)高表达的细胞比例和ALDH活性,显著影响癌细胞成球能力及在小鼠体内的成瘤率^[12]。在慢性骨髓性白血病(CML)中,CD27与其配体CD70结合,通过促进活性 β -Catenin和TNIK的核定位,增强白血病干细胞中WNT靶基因的表达,从而促进白血病干细胞增殖和分化^[27]。以上研究揭示了TNIK在维持肿瘤干细胞干性中的重要作用。

3 基于TNIK的癌症诊断策略

3.1 TNIK表达水平与癌症预后的关系

研究发现,TNIK在多种癌症中异常表达,且与更差的预后相关。一项预后标志物验证研究分析了220例I-III期结直肠癌患者的TNIK蛋白表达与患者特征的关系,结果显示TNIK高表达组II期($p=0.028$)和III期($p=0.006$)患者的无复发生存率明显低于TNIK低表达组;在多变量分析中,TNIK

高表达被确定为III期患者远端复发的重要独立危险因素^[28]。另一项关于胰腺癌的研究发现,91例胰腺癌患者样本中TNIK的mRNA和蛋白质水平均显著高于癌旁组织;TNIK表达量与病理T($p=0.045$)和TNM($p=0.040$)分期呈正相关;此外,Kaplan-Meier生存曲线表明,TNIK高表达患者的总生存期(OS)和无病生存期(DFS)均短于低表达患者^[29]。对302例肝细胞癌(HCC)样本进行免疫组化分析发现:核p-TNIK表达也与病理性M1期(pM1期)相关($p<0.0001$),且单变量(DFS, $p=0.049$; OS, $p=0.037$)和多元分析(DFS, $p=0.006$; OS, $p=0.003$)也证实了核p-TNIK表达对肝癌的预后具有重要意义^[30]。另外,TCGA泛癌分析显示TNIK基因扩增与癌症患者短生存期相关($p=1.1\text{e-}7$,扩增人数:未扩增人数=635:9987),Gepia2数据库分析显示TNIK高表达和宫颈腺/鳞癌、间皮瘤患者生存期负相关。

3.2 TNIK作为癌症预后的标志物与治疗靶标

鉴于TNIK与多种癌症的预后高度相关,因此可以作为预后标志物,检测其表达水平有助于对患者预后的预测。

既往研究已揭示TNIK在癌症发生发展中的重要作用:TNIK敲低可显著抑制HCT116及DLD1细胞中WNT通路活性、WNT靶基因表达以及细胞增殖能力,且瘤内注射TNIK的siRNA可以显著抑制异种移植瘤生长^[13];小鼠全身敲除TNIK可显著减少偶氮甲烷诱导产生的肠道肿瘤数量^[12];另外,在肺鳞状细胞癌细胞系中敲低TNIK可以显著抑制细胞生长^[14]。靶点-功能-表型的多方位验证表明,TNIK在癌症,尤其是结直肠癌发生发展中扮演重要角色,有望成为癌症治疗靶点。

4 以TNIK为靶点的癌症治疗策略

4.1 小分子TNIK抑制剂的研究进展

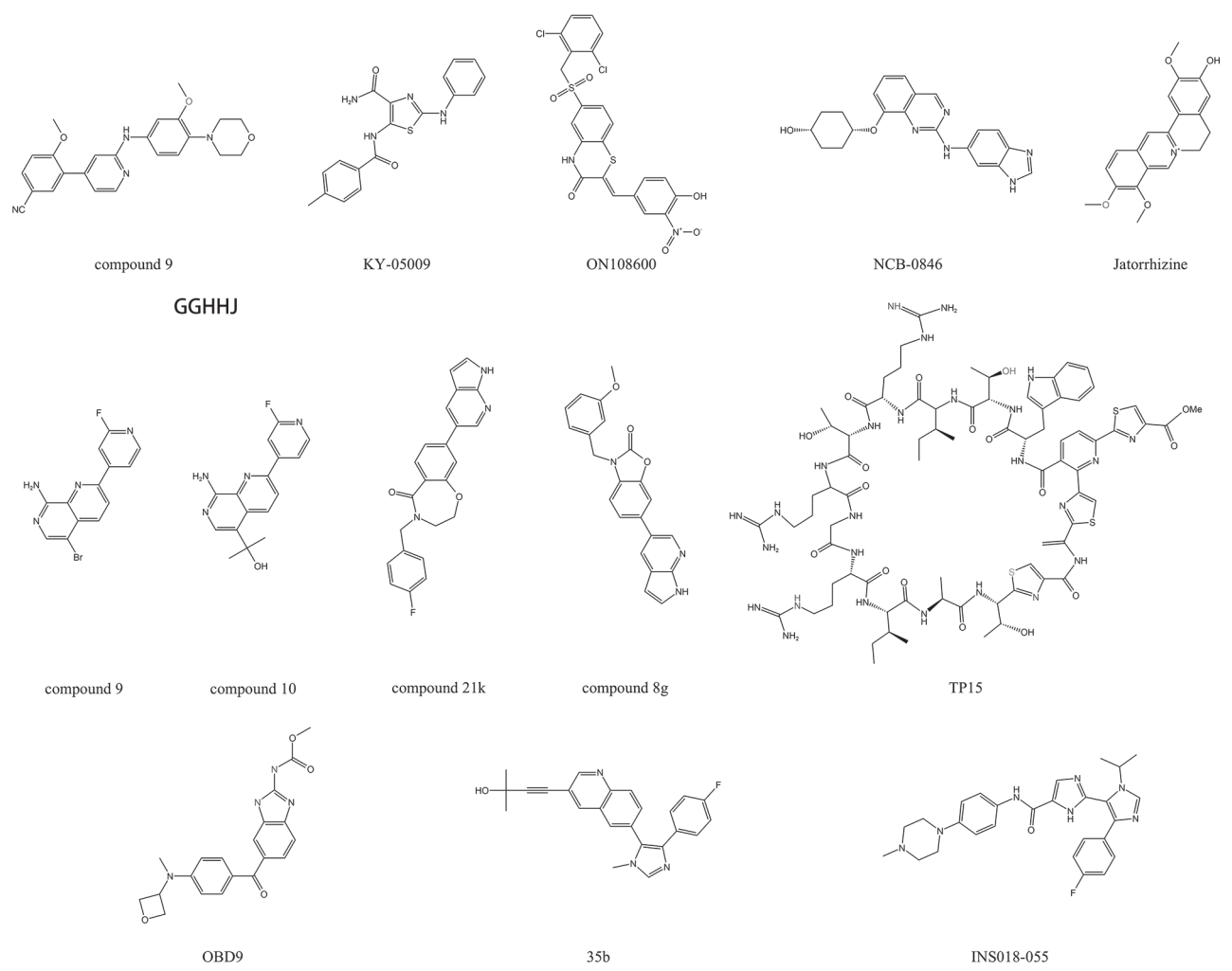
目前有多项基于TNIK研发的小分子抑制剂显示出对TNIK激酶催化活性的抑制作用(表1),这些化合物对应的化学结构见图3。

4.1.1 INS018-055

INS018-055由英矽智能研发,作为唯一进入临床研究阶段的TNIK调节剂,其适应证为特发性肺纤维化(IPF),而不是癌症^[19]。该化合物为一款I型抑制剂(ATP竞争型抑制剂),其抑制TNIK活性的IC₅₀为7.8 nmol/L,并且具有高度选择性(20 μ mol/L处理可使430个激酶中的43个活性低于

表1 已报道的TNIK抑制剂

药物名称	IC ₅₀ (nmol/L)	研究深度	研究单位	药物类型	时间
compound 9 ^[31]	8	细胞	Astex	小分子抑制剂	2013
KY-05009 ^[18]	9	细胞	韩国乙支大学	小分子抑制剂	2014
ON108600 ^[32]	5	动物	纽约伊坎医学院	小分子抑制剂	2015
NCB-0846 ^[12]	21	动物	日本国立癌症中心研究所	小分子抑制剂	2016
Jatorrhizine ^[33]	未公布	动物	浙江理工大学生命科学与医学院	生物碱类抑制剂	2019
compound 9、10 ^[34]	8、7	细胞	阿斯利康	小分子抑制剂	2019
compound 21k ^[35]	26	动物	四川大学华西医院	小分子抑制剂	2022
compound 8g ^[36]	50	细胞	四川大学华西药学院	小分子抑制剂	2022
TP15 ^[37]	14	细胞	东京大学化学系	硫肽类抑制剂	2022
OBD9 ^[38]	未公布	动物	路易制药波士顿研发中心	小分子调节剂	2023
35b ^[39]	6	动物	四川大学华西医院	小分子抑制剂	2024
INS018-055 ^[19]	7.8	临床II期	英矽智能	小分子抑制剂	2024



由KingDraw绘制，化合物展示顺序同表1。

图3 TNiK抑制剂的化学结构

20%，IC₅₀ 低于 100 nmol/L 的仅有 5 个)^[40]。INS018-055 在 I 期临床研究中显示出良好的体内代谢特征^[19]，其 IIa 期临床研究 (NCT05938920) 亦取得积

极效果：在为期 12 周的试验中，可在接受治疗的 患者中观察到剂量依赖性的肺功能改善。在每日一次 60 mg 的最高用药剂量组中，患者的 FVC 与基

线水平相比平均提高 98.4 mL, 而安慰剂组患者的 FVC 与基线水平相比平均下降 62.3 mL。

4.1.2 其他TNIK抑制剂

靶向 TNIK 研发的抑制剂大多针对结直肠癌, 其中部分化合物表现出对结直肠癌的体内抑制活性。NCB-0846 是由日本国立癌症中心研究所研发的一种 TNIK 激酶抑制剂, 属于 II 型抑制剂 (非 ATP 竞争型), 激酶抑制 IC_{50} 为 21 nmol/L, 对肿瘤细胞生长以及干性具有明显抑制作用, 并在体内表现出显著的抑瘤作用^[12, 14, 38]。但是, 该化合物表现出较差的激酶选择性^[35, 40]。21k 是四川大学华西医院研究的一种 TNIK 激酶抑制剂, 具有良好的分子活性 ($IC_{50} = 26$ nmol/L), 并具有优秀的激酶选择性 (在 413 种人类激酶中表现出良好的选择性)^[35], 150 mg/kg-BID 可抑制 HCT116 异种移植瘤模型的肿瘤生长。35b 也是四川大学华西医院研究的一种 TNIK 激酶抑制剂, 表现出良好的 TNIK 激酶抑制活性和 HCT116 细胞抑制活性 (IC_{50} 值分别为 6 nmol/L 和 2.11 μ mol/L), 以及良好的激酶选择性、药代动力学特征和口服生物利用度 (84.64%), 50 mg/kg-BID 可抑制 HCT116 异种移植瘤模型的肿瘤生长^[39]。OBD9 是路易制药波士顿研发中心研究的一种 TNIK 调节剂, 与以往抑制剂方向的研究不同的是, 该化合物是通过促进 TNIK 易位到溶酶体以促进其降解从而发挥抗肿瘤作用, 20 mg/kg-QOD 可以显著抑制小鼠体内皮下移植瘤的生长^[38]。

除此之外, 过去已有多种其他 TNIK 抑制剂被研发, 但尚处于体外研究阶段^[31, 34, 36, 37, 41]。总体来说, 以癌症为适应证的 TNIK 抑制剂的研发虽然已取得很多成果, 但尚未有与癌症相关的临床研究。另外, 药物与 TNIK 结合方式的差异也对药效有明显影响^[12, 42]。简单来说, 激酶 TNIK 从功能上存在活性和非活性两种状态, 这两种状态的构象并不完全相同, 主要区别在于 ATP 结合口袋的结构差异。不同结合方式的抑制剂在此基础上被分为多种类型^[43, 44]: I 型与活性激酶蛋白构象结合, 属于 ATP 竞争型抑制剂; 而 II 型与无活性激酶蛋白构象结合, 属于非 ATP 竞争型抑制剂; III 型抑制剂结合在 ATP 口袋附近位置; IV 型抑制剂不结合于 ATP 或底物结合位点; V 型抑制剂结合于蛋白激酶区的两个不同区域; VI 型抑制剂与 I~V 型可逆抑制剂不同, 与靶蛋白发生不可逆共价结合。而研究发现, 不同 TNIK 结合模式的抑制剂在 WNT 通路活性方面具有显著的药效差异^[12, 42]: I 型 TNIK 抑制剂可能对

WNT 通路无抑制作用, II 型 TNIK 抑制剂可能是有希望的抗癌药物研究方向。结合模式不同导致显著药效差异的原因目前尚未阐明。

4.2 TNIK抑制剂与放疗的联用效果

目前尚无关于 TNIK 联合传统化疗治疗癌症的研究, 但有研究联合 TNIK 与放射疗法治疗癌症。在进行辐射治疗之前使用 TNIK 抑制剂 NCB-0846 进行处理, 发现在体外和体内模型中均显示出显著增强的疗效, 而且这种效果在 TNIK 高表达的细胞中更显著, 表明这种效果很可能是依赖 TNIK 的^[45]。

4.3 基于TNIK的免疫治疗策略

免疫检查点抑制剂对某些癌症患者的出色疗效令人惊叹, 但大多数患者无法从中获益^[46, 47]。开发一种联合治疗策略以增强 ICB (immune checkpoint blockade, 免疫检查点阻断) 疗法的疗效, 对癌症治疗具有重要意义。2022 年, 麻省总医院系统生物学中心报道了 TNIK 抑制剂与 ICB 疗法联合治疗体内肿瘤的结果。研究发现, TNIK 抑制剂通过促进免疫原性细胞死亡和直接激活 $CD8^+$ T 细胞, 增强了肿瘤内 $PD-1^+$ $CD8^+$ T 细胞浸润并产生抗肿瘤作用; 当 TNIK 抑制剂与靶向 PD-1 的检查点抑制剂联合使用时, 在 50% 的小鼠中实现肿瘤的完全缓解^[48]。

5 TNIK作为癌症治疗靶点的优势和挑战

抗肿瘤治疗诱发的药物不良反应常导致癌症患者承受额外的生理和心理负担, 影响治疗耐受性与生活质量^[49-52]。这不仅无益于癌症治疗, 更加深了患者对药物的抗拒。鉴于此, 低副作用、高安全性一直是药物研发所追求的主要目标之一。值得一提的是, 以 TNIK 作为癌症治疗靶标具有显著的优势, 尤其是在安全性方面。在小鼠胚胎中敲除 *Tnik* 基因, 所有小鼠正常出生, 且不会对小鼠的外观及脏器发育产生明显影响^[8, 12], 这足以说明 TNIK 药物的安全性。

但是, TNIK 相关药物开发最难以克服的困难可能是选择性。众所周知, GCK 家族激酶的激酶区具有高度同源性^[53], 这为药物开发带来了挑战。但是, 英矽智能 INS018-055 的发现提示我们, 人工智能设计可能是小分子药物设计的未来发展方向^[19]。

6 总结与展望

TNIK 参与多种癌症的发生发展, 且和多种癌症的预后显著相关, 以 TNIK 为靶标的癌症治疗

药物已在开发中,相关疗法与其他疗法的联用也显示出良好的前景,但目前相关化合物的研发还处在早期阶段。研究还发现,TNFIK在其他适应证如特发性肺纤维化、肥胖的治疗中也具有非凡的潜力^[8, 19, 40]。

但是,以TNFIK为靶标的结直肠癌药物研发应当关注另一个重要问题:TNFIK在不同生物过程中最重要的是激酶催化活性还是其活性形式的结构特征,抑或者是两种都重要。如前文所述:II型TNFIK抑制剂(可阻止其向活性形式的构象转变)可能是有希望的抗结直肠癌药物研究方向,即表明活性形式的TNFIK的存在是重中之重,而究竟是激酶催化活性或是蛋白结构特征起到关键作用尚不能完全确定。在进行药物开发前,必须分析两者对WNT通路的重要性,找到正确的化合物设计方向。而要回答这个问题,需要从最基础的机制开始分析。TNFIK在WNT通路中的作用早已揭晓,这一作用过程分为两个阶段,入核和与TCF4结合。已知TNFIK K54R突变体的入核能力显著减弱,因此失去了激活WNT通路的作用^[13]。但我们更想知道的是,在正常的TNFIK入核之后,究竟是激酶催化活性发挥更重要的作用,还是其结构具有更重要的作用。虽然TNFIK可以直接磷酸化TCF4,但不能完全排除其非酶功能可能具有更重要的作用。

其实已有研究指出TNFIK对WNT通路的作用可能更依赖于其结构特征,而不是其激酶催化活性^[31]。然而在后续的研究中,这被认为是化合物结合模式不同导致的^[12, 42]。从结合模式上讲,化合物9结合在TNFIK的活性形式上,而NCB-0846结合在非活性形式的TNFIK上。但即便如此,化合物9与ATP口袋的结合并未使其发挥抑制WNT通路的作用^[31],这与预期不符,除非TNFIK的激酶催化活性不重要,或者在化合物9结合活性形式的TNFIK时,TNFIK已经发挥了其作用。

然而TNFIK的激酶催化活性是必要的:TNFIK的K54R无激酶催化活性突变或其底物TCF的S154A突变可以抑制TNFIK诱导的靶基因转录活性升高^[13],这帮助我们排除了第一种可能。我们有理由推测:在TNFIK转变为活性形式时,它很可能正处于与TCF4及其他共激活因子组成转录复合体的过程中或者初期,并在短时间内完成了对TCF4的磷酸化激活,之后TNFIK的激酶催化活性就不重要了,只有这样才能解释两种不同结合模式的化合物

带来的不同药效。另一个证据是p764-TNFIK(代表活性形式)明显富集于核内^[13],表明TNFIK转变为活性形式的过程很可能是在核内进行的,并且某种结合使TNFIK留在核内。基于上述假设,相较于靶向已激活的TNFIK,阻止其向活性构象转变或许是更优的策略。具体路径有二:一是效仿NCB-0846,结合于非活性形式的疏水区,实现TNFIK构象锁定;另一策略是研发靶向降解剂,旨在直接清除细胞内的非活性TNFIK。之所以针对其非活性形式,是因为活性TNFIK在完成对TCF4的激活后,其生理功能已部分实现,此时再对其进行降解,所能带来的抑癌收益可能会大打折扣。

有意思的是,现有的具有显著体内抗肿瘤药效的TNFIK抑制剂:NCB-0846^[12]、35b^[39]、21k^[35]、Jatorrhizine^[33],除21k之外,都对TNFIK的蛋白水平有影响。因此,研究这些化合物的起效原因,是导致了TNFIK的降解,还是抑制了TNFIK的合成,对后续的药物开发具有重要参考意义。

第二个需要考虑的问题是:基于不同结合方式的药物可能适用于不同的适应证。目前唯一进入临床研究阶段的TNFIK靶向调节剂是英矽智能研发的INS018-055,其临床适应证是特发性肺纤维化^[19]。作为一个选择性和活性都非常优异的抑制剂,其结合模式是结合活性形式^[40],而关于该化合物在结直肠癌中的作用并未披露。这不禁令人深思,是否TNFIK的激酶催化活性对肺纤维化的发展过程更重要,而其结构/活性形式转变对WNT通路更重要?这种差异将对药物开发设计产生指导作用,I型抑制剂的适应证可能是特发性肺纤维化,而II型抑制剂或者降解剂的适应证可能是肺纤维化以及癌症。至于肥胖等适应证的药物开发方向,需要更多更深入的研究来揭示。

总的来说,TNFIK参与多种癌症发生发展,且靶点安全性高,表明TNFIK相关药物具有良好的开发前景。近年来,TNFIK在其他疾病中的功能被逐渐发掘,包括但不限于肥胖和肺纤维化。但是,目前靶向TNFIK的抗肿瘤药物开发并不顺利,这可能是多种原因造成的。想要开发出一款优秀的TNFIK调节剂,需要对TNFIK具有更深入的了解,无论是机制还是结构。TNFIK与其他疗法的联合也应深入研究,尤其是免疫疗法。TNFIK的激酶催化活性和非酶功能也值得深入探讨,这对药物设计非常重要。同时,INS018-055的案例提示:借助人工智能等设

计工具可能是开发高活性高选择性靶向药物的巨大臂助。

[参 考 文 献]

- [1] Fu CA, Shen M, Huang BC, et al. TNIK, a novel member of the germinal center kinase family that activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and regulates the cytoskeleton. *J Biol Chem*, 1999, 274: 30729-37
- [2] Taira K, Umikawa M, Takei K, et al. The Traf2- and Nck-interacting kinase as a putative effector of Rap2 to regulate actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 2004, 279: 49488-96
- [3] Masuda M, Sawa M, Yamada T. Therapeutic targets in the Wnt signaling pathway: feasibility of targeting TNIK in colorectal cancer. *Pharmacol Ther*, 2015, 156: 1-9
- [4] Yamada T, Masuda M. Emergence of TNIK inhibitors in cancer therapeutics. *Cancer Sci*, 2017, 108: 818-23
- [5] Wu X, Zhang Z, Qiu Z, et al. TNIK in disease: from molecular insights to therapeutic prospects. *Apoptosis*, 2024, 29: 1361-76
- [6] Gumina V, Colombrita C, Fallini C, et al. TDP-43 and NOVA-1 RNA-binding proteins as competitive splicing regulators of the schizophrenia-associated TNIK gene. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862: 194413
- [7] Wang Y, Chembazhi UV, Yee D, et al. PTBP1 mediates Sertoli cell actin cytoskeleton organization by regulating alternative splicing of actin regulators. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52: 12244-61
- [8] Pham TP, Dollet L, Ali MS, et al. TNIK is a conserved regulator of glucose and lipid metabolism in obesity. *Sci Adv*, 2023, 9: eadf7119
- [9] Cauchi S, Froguel P. TCF7L2 genetic defect and type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*, 2008, 8: 149-55
- [10] Tong Y, Lin Y, Zhang Y, et al. Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Med Genet*, 2009, 10: 1-25
- [11] Mahmoudi T, Li VS, Ng SS, et al. The kinase TNIK is an essential activator of Wnt target genes. *EMBO J*, 2009, 28: 3329-40
- [12] Masuda M, Uno Y, Ohbayashi N, et al. TNIK inhibition abrogates colorectal cancer stemness. *Nat Commun*, 2016, 7: 12586
- [13] Shitashige M, Satow R, Jigami T, et al. Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. *Cancer Res*, 2010, 70: 5024-33
- [14] Torres-Ayuso P, An E, Nyswaner KM, et al. TNIK is a therapeutic target in lung squamous cell carcinoma and regulates FAK activation through Merlin. *Cancer Discov*, 2021, 11: 1411-23
- [15] Yu DH, Zhang X, Wang H, et al. The essential role of TNIK gene amplification in gastric cancer growth. *Oncogenesis*, 2014, 2: e89
- [16] Liu J, Xiao Q, Xiao J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7: 3
- [17] Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell*, 2017, 169: 985-99
- [18] Kim J, Moon SH, Kim BT, et al. A novel aminothiazole KY-05009 with potential to inhibit Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK) attenuates TGF- β 1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in human lung adenocarcinoma A549 cells. *PLoS One*, 2014, 9: e110180
- [19] Ren F, Aliper A, Chen J, et al. A small-molecule TNIK inhibitor targets fibrosis in preclinical and clinical models. *Nat Biotechnol*, 2025, 43: 63-75
- [20] Xu X, Zhang M, Xu F, et al. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Mol Cancer*, 2020, 19: 165
- [21] Zhao H, Ming T, Tang S, et al. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Mol Cancer*, 2022, 21: 144
- [22] Gajos-Michniewicz A, Czyz M. WNT/ β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma: the aberrant activation, pathogenic roles, and therapeutic opportunities. *Genes Dis*, 2024, 11: 727-46
- [23] Korinek V, Barker N, Moerer P, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet*, 1998, 19: 379-83
- [24] Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, et al. Apc restoration promotes cellular differentiation and reestablishes crypt homeostasis in colorectal cancer. *Cell*, 2015, 161: 1539-52
- [25] Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 2828-38
- [26] Fodde R, Brabletz T. Wnt/ β -catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19: 150-8
- [27] Schurch C, Riether C, Matter MS, et al. CD27 signaling on chronic myelogenous leukemia stem cells activates Wnt target genes and promotes disease progression. *J Clin Invest*, 2012, 122: 624-38
- [28] Takahashi H, Ishikawa T, Ishiguro M, et al. Prognostic significance of Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK) in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2015, 15: 794
- [29] Zhang Y, Jiang H, Qin M, et al. TNIK serves as a novel biomarker associated with poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Tumour Biol*, 2016, 37: 1035-40
- [30] Jin J, Jung HY, Wang Y, et al. Nuclear expression of phosphorylated TRAF2- and NCK-interacting kinase in hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis. *Pathol Res Pract*, 2014, 210: 621-7
- [31] Ho KK, Parnell KM, Yuan Y, et al. Discovery of 4-phenyl-2-phenylaminopyridine based TNIK inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 569-73
- [32] Padgaonkar A, Cosenza S, Pallela V, et al. The dual CK2/ TNIK inhibitor, ON108600 targets cancer stem cells and induces apoptosis of paclitaxel resistant triple-negative breast cancer cells. *Cancer Res*, 2015, 75: 4453
- [33] Sun Y, Gao X, Wu P, et al. Jatrorrhizine inhibits mammary carcinoma cells by targeting TNIK mediated Wnt/ β -catenin signalling and epithelial-mesenchymal transition

- (EMT). *Phytomedicine*, 2019, 63: 153015
- [34] Read J, Collie IT, Nguyen-McCarty M, et al. Tool inhibitors and assays to interrogate the biology of the TRAF2 and NCK interacting kinase. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29: 1962-7
- [35] Li Y, Zhang L, Yang R, et al. Discovery of 3,4-Dihydrobenzo[f][1,4]oxazepin-5(2H)-one derivatives as a new class of selective TNIK inhibitors and evaluation of their anti-colorectal cancer effects. *J Med Chem*, 2022, 65: 1786-807
- [36] Luo X, Yang R, Li Y, et al. Discovery of benzo[d]oxazol-2(3H)-one derivatives as a new class of TNIK inhibitors for the treatment of colorectal cancer. *Bioorg Med Chem Lett*, 2022, 67: 128745
- [37] Vinogradov AA, Zhang Y, Hamada K, et al. *De novo* discovery of thiopeptide pseudo-natural products acting as potent and selective TNIK kinase inhibitors. *J Am Chem Soc*, 2022, 144: 20332-41
- [38] Zhou K, Cheong JE, Krishnaji ST, et al. Inhibition of Wnt signaling in colon cancer cells via an oral drug that facilitates TNIK degradation. *Mol Cancer Ther*, 2023, 22: 25-36
- [39] Teng Y, Wu R, Bo W, et al. Fragment growth-based discovery of novel TNIK inhibitors for the treatment of colorectal cancer. *Eur J Med Chem*, 2024, 268: 116240
- [40] Aladinskiy V, Kruse C, Qin L, et al. Discovery of Bis-imidazolecarboxamide derivatives as novel, potent, and selective TNIK inhibitors for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *J Med Chem*, 2024, 67: 19121-42
- [41] Arokiaraj SR, Tajuddin NB, Muthusamy K, et al. TRAF2 and NCK-interacting kinase inhibitors for colorectal cancer: *in vitro* and theoretical validations. *ACS Comb Sci*, 2020, 22: 608-16
- [42] Kukimoto-Niino M, Shirouzu M, Yamada T. Structural insight into TNIK inhibition. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 13010
- [43] Roskoski R Jr. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol Res*, 2016, 103: 26-48
- [44] Modi V, Dunbrack RL Jr. Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116: 6818-27
- [45] Nguyen T, Carrieri FA, Connis N, et al. TNIK inhibition sensitizes TNIK-overexpressing lung squamous cell carcinoma to radiotherapy. *Mol Cancer Ther*, 2024, 23: 1201-11
- [46] Yamaguchi H, Hsu JM, Sun L, et al. Advances and prospects of biomarkers for immune checkpoint inhibitors. *Cell Rep Med*, 2024, 5: 101621
- [47] Yi M, Zheng X, Niu M, et al. Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions. *Mol Cancer*, 2022, 21: 28
- [48] Kim J, Oh J, Peterson HM, et al. TNIK inhibition has dual synergistic effects on tumor and associated immune cells. *Adv Biol (Weinh)*, 2022, 6: e2200030
- [49] Li N, Wang G, Hou X, et al. Adverse and unconventional reactions related to immune checkpoint inhibitor therapy for cancer. *Int Immunopharmacol*, 2022, 108: 108803
- [50] Tan S, Li D, Zhu X. Cancer immunotherapy: pros, cons and beyond. *Biomed Pharmacother*, 2020, 124: 109821
- [51] Wright JJ, Powers AC, Johnson DB. Endocrine toxicities of immune checkpoint inhibitors. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17: 389-99
- [52] Mishra R, Patel H, Alanazi S, et al. PI3K inhibitors in cancer: clinical implications and adverse effects. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 3464
- [53] Chuang HC, Wang X, Tan TH. MAP4K family kinases in immunity and inflammation. *Adv Immunol*, 2016, 129: 277-314