

· 专 论 ·

活性导向的细胞毒类抗肿瘤中药毒效关联性评价和成药性优化

陶 丽¹, 盛晓波¹, 王爱云^{1,2}, 陈文星^{1,2}, 陆 茵^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

2. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210046

摘要: 来源于具有毒性的中药材的独特成分抗肿瘤效应显著, 但因不可预见的毒性使其临床应用的安全性受到质疑。为完善该类药物的成药性, 迫切需加强其抗肿瘤活性和细胞毒效关联性研究。活性导向的化学蛋白质组学研究能够实现以药物自身活性指导下的中药药理和毒副作用发现以及合理药物设计。同时鉴于中药分子的泛靶点性, 利用比较正常与肿瘤细胞靶标谱的生物网络计算方法搜寻潜在的成药性靶标, 开展药物结构的优化设计, 通过“药→病→靶→药”的回路研究模式, 以期从有毒中药开发出高效、低毒的抗肿瘤新药提供参考。

关键词: 有毒中药; 抗肿瘤活性成分; 毒效关系; 成药性; 毒效关联性评价

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)14-1867-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.001

Evaluation of effectiveness-cytotoxicity correlation and optimization of druggability for activity-based poisonous Chinese materia medica with antitumor activity

TAO Li¹, SHENG Xiao-bo¹, WANG Ai-yun^{1,2}, CHEN Wen-xing^{1,2}, LU Yin^{1,2}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacodynamics and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210046, China

Abstract: The antitumor activity of the constituents from poisonous Chinese materia medica (CMM) is very strong, but mainly mediated by their unforeseeable cytotoxic effects, which results in increasingly prominent security issues in clinic. To improve the druggability of these drugs, it is urgent to put much attention on the effectiveness-cytotoxicity correlation study. Activity-based protein profiling can realize the discovery of pharmacological and cytotoxic information and drug design under the guidance of chemicals activity. In view of the promiscuity of natural chemicals, we utilize the method of comparative targets profile to calculate and seek druggable targets in biological networks for drug structure optimization. In conclusion, we take the loop mode of drug→disease→target→drug method, hoping to provide the reference for the research and development of new drug with high efficiency and low toxicity from poisonous CMM.

Key words: poisonous Chinese materia medica; antitumor constituents; effectiveness-cytotoxicity correlation; druggability; evaluation of effectiveness-cytotoxicity correlation

具有自主知识产权的、来源于中药的抗肿瘤有效成分或有效部位的新药研制逐年增多, 然而随着申报品种数量的增加, 临床评价中的安全性问题日渐突出^[1]。客观因素分析, 新品种中含毒性药材比重较大, 而抗肿瘤药以细胞毒类占主导, 其抗肿瘤

作用很可能通过直接的细胞毒作用介导。因此, 如何权衡抗肿瘤活性良好但有潜在细胞毒作用的中药新药, 是研发者面临的棘手问题^[2]。本文提出基于活性导向的细胞毒类抗肿瘤中药毒效关联性评价和成药性优化的研究思路, 试图在药物研发早期即可

收稿日期: 2013-04-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173174, 81202655); “十一五”科技支撑计划项目(2008BAI51B02); 教育部博士点基金(20113237110008); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2010085, 2010562); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CXZZ13_0627); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 陶 丽, 博士在读。E-mail: tl20082008@126.com

*通信作者 陆 茵 Tel: (025)86798154 E-mail: luyingreen@126.com

识别决定该类药物有效性和安全性的可控因素，从而趋利避害，以期大大降低后期评价实验失败的风险。

1 基于化合物活性导向的系统药理学/毒理学指导合理的药物设计

发生不良反应事件是抗肿瘤新药临床所有被迫召回因素中的核心问题。传统的细胞毒类抗肿瘤药物不可避免地影响正常细胞的生理机能，造成正常细胞损伤，在一定程度上加速了临床肿瘤化疗病人的死亡^[3]。理论上推测，细胞毒类药物的毒性机制与不能选择作用于肿瘤细胞与正常细胞存活的靶标有关，具有与治疗相关毒性。于是研究者转向开发可选择性杀伤或抑制肿瘤细胞恶性进程调控机制的靶向药物，使肿瘤治疗进入后化疗时代。虽然与疗效相关的肿瘤预警分子不断发现，但这些药物往往经历短暂辉煌后接踵而来的是病人响应率不足、获得性耐药及不良反应等问题造成治疗终止^[4]。分子靶向药物（或选择性抑制剂）的不良反应包括与作用机制直接相关（on-target），即由特定靶点带来意外的副作用，如环氧合酶-2（COX-2）选择性抑制剂塞来昔布（celecoxib）治疗结肠癌引发心血管风险^[5]，以及大多情况下药物脱靶（off-target）效应造成的毒副作用，如达沙替尼（dasatinib）是用于治疗慢性髓性白血病的第二代酪氨酸激酶抑制剂（TKIs），能强烈抑制癌蛋白 BCR-ABL 酪氨酸激酶活性，从而发挥抗肿瘤作用，但因血小板衍生生长因子受体（PDGFR）的脱靶效应造成病人严重的全身水肿和胸膜积液，故而限制了其临床应用^[6]。而这些毒副作用有时还不如传统化疗药物的毒副作用容易应对。

由于药物毒副作用造成的治疗终止只能在临床试验的晚期阶段才能被发现，因此能够在药物研发的早期阶段预测出其潜在的不良反应成为攻关的焦点。目前，对于机制已经明确的抗肿瘤药物，国际上发展和应用了关于上市药物与机制及脱靶效应有关的毒副作用预测的模型与方法，即基于配体/受体结合位点相似性计算的评价方法^[7-8]，但将其应用到一个机制不明的全新化学实体上，尚存在困难。

对肿瘤复杂生物学和进化机制已有认识，但还不足以前瞻性指导更合理的药物设计。“病→靶→药”的研发模式与临床治疗矛盾的出现，提示应慎重选择治疗靶点^[9]。正常和肿瘤组织没有绝对界限，细胞内挤满了密集的大分子，任何一个内外源性的小分子化合物进入细胞可以与之相遇，并产生不同

程度的相互作用，对生理和病理均产生重要影响^[10]。因此迫切需要寻找到一种基于多向药理学（polypharmacology）及化合物活性（有效性、安全性以及耐药程度）指导下的靶标系统搜寻方法^[11]，通过“药→病→靶→药”的回路模式，在正常/肿瘤样本内指认该药物分子作用的网络，绘制差异靶标谱，并发现毒效关联的分子事件，从而搜寻真正具有治疗价值的潜在靶标，再开展合理药物设计，这可能是从中药和天然药中寻找高效低毒、临床安全有效抗肿瘤药物的途径（图1）。

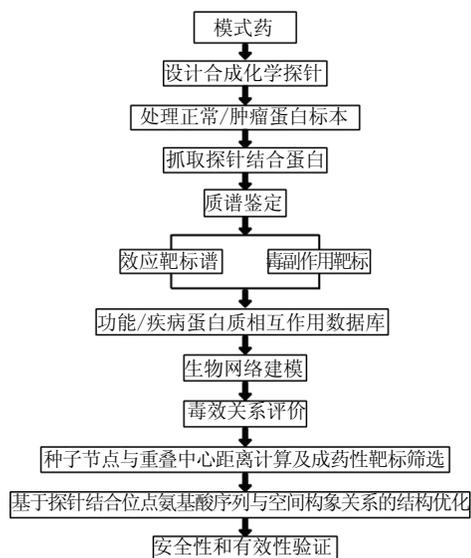


图1 活性导向的细胞毒类抗肿瘤中药毒效关联性评价和成药性优化研究思路

Fig. 1 Research approach on activity-based poisonous CMM with antitumor effect for effectiveness-cytotoxicity correlation evaluation and druggability optimization

2 利用化学蛋白质组学揭示中药活性成分与生物大分子的相互作用

基于活性导向的蛋白质谱技术（activity-based protein profiling, ABPP）利用经特殊标记（生物素或荧光基团等）的药物分子作为化学探针，在复杂的生物样品中特异性地标记处于功能状态下的蛋白质，从而实现靶蛋白的示踪和纯化^[12]。将这些毒效机制不明确的抗肿瘤活性成分，通过化学修饰和标记等手段，设计优化及应用以其为母核的分子探针，处理细胞或组织制备生物样本，结合一维或二维凝胶电泳、亲和色谱和质谱（MALDI-TOF-MS 或 LC-MS/MS）鉴定，以揭示化合物的直接靶标^[13]。ABPP 技术已在天然抗肿瘤药物靶标研究中获得了巨

大成功^[14-15]。在药理机制研究方面,通过该方法发现源自有毒中药雷公藤的抗肿瘤成分雷公藤甲素(triptolide)能与转录因子TFIIH的亚单位XPB共价结合,抑制XPB的磷酸腺苷酶(ATPase)活性,从而干扰肿瘤转录^[16-17];在毒理学方面,通过该方法发现过氧化物酶增殖体激活型受体 γ (PPAR γ)激动剂能与离子通道蛋白结合,从而解释了这些药物潜在的心脏毒性^[18]。因此基于化学探针的活性研究策略很有可能成为将来药物临床前研究的必选动作^[19]。

3 结合功能/疾病蛋白质组学构建中药活性成分多向药理/毒理学网络

Chu等^[20]利用组学的方法在宫颈癌细胞和正常的原代成纤维细胞中对比了与细胞凋亡功能相关的蛋白质相互作用网路,结果发现某些蛋白在维持组织正常功能的发挥中是必须的,而有些只在正常或者肿瘤组织中分别出现。药物干预可被简单视为生物系统的一种扰动,药物分子与治疗靶点(therapeutic target)、与毒副作用靶点(off-target)存在不同的亲和力和,如果将药物直接影响的生物大分子按照亲和力的大小排序并作为种子节点(seed nodes),这些信号之间发生串扰同时与另一部分大分子相互作用造成其他功能性通路的先后变化(转录调控或翻译后修饰),在线性或非线性顺序中发生药理效应和毒副作用有关的生物单元的叠加,产生治疗或毒副作用^[11,21]。从网络药理学角度解析,依赖于细胞毒的中药抗肿瘤活性成分可能在药理与毒理网络上存在较大的交联度。研究用正常组织样本应包括与肿瘤组织相同来源的正常细胞或一切与临床药物不良反应有关的受累器官的组织细胞,甚至亚细胞组分(线粒体、核糖体及内质网等);肿瘤样本则大多数是鉴定的符合临床病理分子特点的肿瘤细胞株,或与探针杂交后的病人肿瘤样本^[22]。在正常和肿瘤样本中对药物亲和的蛋白质进行定位、功能及参与的生物学功能注释,将药物靶点数据融合到已知的蛋白质相互作用、信号转导等功能蛋白质组学数据库^[23],形成多向药理及毒理学网络,再映射到与人类疾病(肿瘤与毒副作用表型发生途径)相关的靶点蛋白质相互作用网络,从而开展网络比较计算的工作,并发现药理和潜在毒副作用的蛛丝马迹。

4 基于网络拓扑学计算差异靶标谱中的疏性单元从而选择性优化合适的药靶分子

产生药理效应和毒副作用交叉反应的网络生物单元,组成了决定性稳定的重要模块,对于正常和

肿瘤细胞存活都不可或缺;另一方面这些单元有可能功能上毫无关联以及物理上不存在绝对的相互作用而往往处于孤立或边缘化地位。Lounkine等^[24]根据已有的数据知识结合生物学实验系统鉴定了与各类临床药物不良反应显著相关的靶点共3257个,并发现涉及脱靶效应的151靶点中,有39个都不与药物原先已知的初级靶点存在关联,即这些靶点在蛋白序列和结构上有很大差异,这可能成为更多合适药靶分子的来源。网络比对将会在药理、毒理学相关的功能模块的发现和预测中发挥重要作用,尤其是网络拓扑学计算可以用来确定与生理表型关联的蛋白质与病理表型关联的蛋白质的距离。Berger等^[25]利用平均首达时间(mean first passage time, MFPT)评价网络中2个蛋白节点之间功能上的亲疏关系,而最近邻法(nearest-neighbor method)则用于计算网络中2个节点之间的最短物理距离。利用这些算法用于计算种子靶标与药理/毒理网络交联重叠中心的距离及评价优先次序,从而筛选潜在的成药性靶标(图2)。

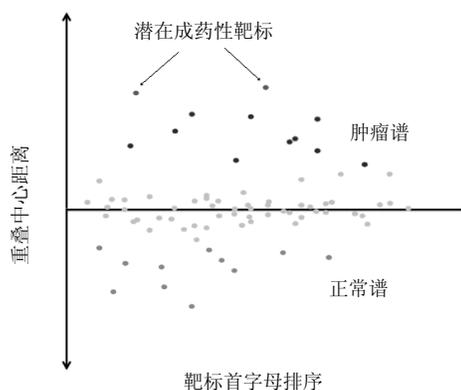


图2 潜在成药性靶标筛选

Fig. 2 Potential druggability targets screening

5 根据标记活性位点的氨基酸序列和结合模式完善抗肿瘤中药活性成分的成药性

利用标记的探针分子在导向靶点蛋白活性位点后,再经消化得到局部被标记的靶标多肽片段,方便解析其药物结合位点的氨基酸残基序列及结合模式^[12]。药物的泛靶点性体现在结合位点精细的结构内涵,经优化的能够成药的靶点,基本上排除具有可能相似结构域而造成的交叉反应,即使是活性位点结构域类似,会因不同的氨基酸序列而有所区别,因此从理论上是可以完善成药性的^[26]。Verkhivker^[27]发展了一种基于酪氨酸激酶功能域的一级序列-空

间构象-药物结合模式的关系研究,从激酶活性位点的进化原理结合计算蛋白质组学解释了不同酪氨酸酶抑制剂与激酶结合的特异性机制。这些信息都可以为进一步的结构改造和修饰提供帮助,从而增强药物与靶点结合的特异程度。

6 问题与展望

有毒中药抗肿瘤活性成分的安全性评价应具有特殊要求,除了抗肿瘤谱的筛选外,还应关注对暴露部位组织器官潜在功能的影响,并尽量阐明毒效关联的分子机制从而找到能够扬长避短的具体措施。中药分子的共同特点是与生物系统的多个靶分子相互作用,在健康和肿瘤系统中通过靶标相关的疾病与功能网络对比的方法进行抗肿瘤中药活性成分的毒效作用研究是可取的方法,但仍有诸多实际困难,如临床肿瘤组织标本来源有限以及标本的获取与维护的实验规范尚未完善,从而导致标本内蛋白组发生较大变异;基于探针设计的靶标鉴定方法无法避免的弊端,即合成探针往往会削弱药物的活性以及会偏向于检测到那些与高丰度蛋白之间的相互作用,并很难捕捉到同样与探针作用的微量生物大分子组分。但不可否认的是,随着各种新兴技术的发展和日益成熟,组学数据库和生物医学文献的海量扩充,将推动实现以药物自身活性指导下的中药药理和毒副作用发现以及合理的药物设计。

参考文献

- [1] 韩玲. 从抗肿瘤中药新药的长毒高发补率看中药的安全性评价 [A] // 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 药品技术评价文集 (第一辑) [C]. 北京: 中国医药科技出版社, 2006.
- [2] Wang S, Wu X, Tan M, *et al.* Fighting fire with fire: poisonous Chinese herbal medicine for cancer therapy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 140(1): 33-45.
- [3] Hannun Y A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy [J]. *Blood*, 1997, 89(6): 1845-1853.
- [4] Klener P Jr, Klener P. Molecularly-targeted and biological anti-cancer therapy [J]. *Folia Biol*, 2012, 58(1): 1-6.
- [5] Solomon S D, McMurray J J, Pfeffer M A, *et al.* Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(11): 1071-1080.
- [6] Giles F J, O'Dwyer M, Swords R. Class effects of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2009, 23(10): 1698-1707.
- [7] Keiser M J, Setola V, Irwin J J, *et al.* Predicting new molecular targets for known drugs [J]. *Nature*, 2009, 462(7270): 175-181.
- [8] Milletti F, Vulpetti A. Predicting polypharmacology by binding site similarity: from kinases to the protein universe [J]. *J Chem Inf Model*, 2010, 50(8): 1418-1431.
- [9] Gashaw I, Ellinghaus P, Sommer A, *et al.* What makes a good drug target [J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17(Suppl): 24-30.
- [10] Zhou H X, Rivas G, Minton A P. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences [J]. *Annu Rev Biophys*, 2008, 37: 375-397.
- [11] Zhao S, Iyengar R. Systems pharmacology: network analysis to identify multiscale mechanisms of drug action [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012, 52: 505-521.
- [12] Bantscheff M, Scholten A, Heck A J. Revealing promiscuous drug-target interactions by chemical proteomics [J]. *Drug Discov Today*, 2009, 14(21/22): 1021-1029.
- [13] Böttcher T, Pitscheider M, Sieber S A. Natural products and their biological targets: proteomic and metabolomic labeling strategies [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49(15): 2680-2698.
- [14] Krysiak J, Breinbauer R. Activity-based protein profiling for natural product target discovery [J]. *Top Curr Chem*, 2012, 324: 43-84.
- [15] Nomura D K, Dix M M, Cravatt B F. Activity-based protein profiling for pathway discovery in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(9): 630-638.
- [16] McCallum C, Kwon S, Leavitt P, *et al.* Triptolide binds covalently to a 90 kDa nuclear protein. Role of epoxides in binding and activity [J]. *Immunobiology*, 2007, 212(7): 549-556.
- [17] Titov D V, Gilman B, He Q L, *et al.* XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(3): 182-188.
- [18] Hoffmann B R, El-Mansy M F, Sem D S, *et al.* Chemical proteomics-based analysis of off-target binding profiles for rosiglitazone and pioglitazone: clues for assessing potential for cardiotoxicity [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(19): 8260-8271.
- [19] Serim S, Haedke U, Verhelst S H. Activity-based probes for the study of proteases: recent advances and developments [J]. *Chem Med Chem*, 2012, 7(7): 1146-1159.
- [20] Chu L H, Chen B S. Construction of a cancer-perturbed protein-protein interaction network for discovery of apoptosis drug targets [J]. *BMC Syst Biol*, 2008, 30(2): 56.

- [21] Bai J P, Abernethy D R. Systems pharmacology to predict drug toxicity: integration across levels of biological organization [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53: 451-473.
- [22] Rix U, Remsing Rix L L, Terker A S, *et al.* A comprehensive target selectivity survey of the BCR-ABL kinase inhibitor INNO-406 by kinase profiling and chemical proteomics in chronic myeloid leukemia cells [J]. *Leukemia*, 2010, 24(1): 44-50.
- [23] Huang L C, Wu X, Chen J Y. Predicting adverse side effects of drugs [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(Suppl): 5-11.
- [24] Lounkine E, Keiser M J, Whitebread S, *et al.* Large-scale prediction and testing of drug activity on side-effect targets [J]. *Nature*, 2012, 486(7403): 361-367.
- [25] Berger S I, Ma'ayan A, Iyengar R. Systems pharmacology of arrhythmias [J]. *Sci Signal*, 2010, 118(3): 30.
- [26] 郭宗儒. 药物的杂泛性 [J]. *药学报*, 2011, 46(4): 361-369.
- [27] Verkhivker G M. Exploring sequence-structure relationships in the tyrosine kinome space: functional classification of the binding specificity mechanisms for cancer therapeutics [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(15): 1919-1926.