

药物分子伴侣: 蛋白质折叠运输缺陷的新疗法

卢丽丽^{1, 2)} 肖敏^{1, 2)*} 赵晗^{1, 2)} 徐晓东^{1, 2)} 王凤山^{2, 3)}

(¹⁾山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100; ²⁾山东大学国家糖工程技术研究中心, 济南 250100; ³⁾山东大学药学院, 济南 250100)

摘要 大量遗传性疾病的发生是由于基因突变引起蛋白质错误折叠而不能运输到作用位点, 从而导致功能缺陷。近年来兴起的药物分子伴侣是恢复蛋白质折叠运输缺陷的新疗法, 这类化合物一般为目的蛋白的底物类似物、受体配基或酶抑制剂等化学小分子, 具细胞通透性, 能在内质网中特异性识别并结合突变蛋白, 校正并稳定其正确构象, 协助其运输到正确位点, 直接恢复突变蛋白功能, 可治疗各种由蛋白质折叠运输缺陷导致的内分泌及代谢疾病。目前已报道的由药物分子伴侣恢复功能的突变蛋白主要为质膜蛋白及细胞器蛋白, 如 ATP 结合盒转运蛋白、G- 蛋白耦联受体及溶酶体酶等。大量的细胞及动物实验结果显示了药物分子伴侣的临床应用前景广阔, 目前已有一例临床实验获得了成功。

关键词 药物分子伴侣, 蛋白折叠运输缺陷, ABC 转运蛋白, G- 蛋白耦联受体, 溶酶体酶

学科分类号 Q51, R96

目前的研究发现, 大量的遗传性疾病是由于基因突变引起蛋白质发生错误折叠而导致的, 约有 16 000 种错义突变与人类疾病的发生有关。很多情况下, 蛋白质分子中氨基酸的突变并不完全影响其功能, 突变蛋白只要能够到达作用位点就仍然可以行使其功能, 而细胞内该类错误折叠的突变蛋白在到达作用位点之前往往会被质量监控系统清除, 从而导致其功能的缺陷。一些低分子质量具细胞通透性的化合物如甘油、二甲基亚砷、三甲基胺等能校正并稳定突变蛋白的构象, 协助突变蛋白逃离质量监控系统, 正确运输到作用位点, 恢复其功能, 这类分子被称为化学分子伴侣(chemical chaperones)。然而, 化学分子伴侣不具有选择性, 在稳定目的突变蛋白的同时也稳定其他突变蛋白, 可能会导致细胞内蛋白质水平的不利变化, 并且化学分子伴侣的使用浓度太高(mmol/L), 在临床中并不适用。近年来, 低浓度(nmol/L~ μ mol/L)的底物类似物、受体配基及酶抑制剂等被发现具有化学分子伴侣的功能, 且能选择性识别突变蛋白, 恢复其功能, 这类分子被称为药物分子伴侣(pharmacological chaperones)^[1, 2]。

1 药物分子伴侣的研究概况

药物分子伴侣作为恢复蛋白质折叠运输缺陷的新疗法, 目前已广泛应用于研究由各种突变蛋白所引起的内分泌及代谢疾病, 其中涉及质膜及细胞器突变蛋白的报道较多。定位于质膜或细胞器的蛋白质合成具有精密的调控机制, 运输过程十分复杂。膜蛋白合成比较低效, 许多野生型膜蛋白成功定位于正确位点的效率低于 50%, 其正确折叠与错误折叠之间的能量平衡非常灵敏, 单个氨基酸突变引起的 6.27 kJ/mol 的能量变化即能将该类蛋白质的折叠运输效率降低到 10% 以下, 从而导致其功能的缺陷。大量的研究表明, 药物分子伴侣能促进质膜突变蛋白如 ATP 结合盒转运蛋白、G- 蛋白耦联受体及细胞器突变蛋白如溶酶体酶等的正确折叠、运输与定位, 直接恢复其功能。表 1 列举了已报道的药物分子伴侣在治疗由蛋白质折叠运输缺陷导致的疾病中的应用。

* 通讯联系人。

Tel: 0531-88365128, E-mail: minxiao@sdu.edu.cn

收稿日期: 2007-12-16, 接受日期: 2008-03-06

Table 1 Application of pharmacological chaperones

表 1 药物分子伴侣的应用举例

突变蛋白	蛋白质功能或相关疾病	药物分子伴侣
ATP 结合盒转运蛋白	P-gp (ABCB1) CFTR (ABCC7) SUR1 (ABCC8) BCRP (ABCG2) MRP1 (ABCC1)	药物抗性 囊性纤维化 先天性高胰岛素血症 药物抗性 药物抗性
		环孢菌素, 壬基酚聚氧乙烯醚 ^[3,4] CFcor-325, corr4a, corr-2b, CFpot-532 ^[5~7] 磺脲类, 二氮嗪 ^[8,9] 盐酸米托恩醌 ^[10] 谷胱甘肽 ^[11]
G- 蛋白耦联受体	抗利尿激素 V2 受体 GnRH 受体 视紫红质 多巴胺 D4 受体 红藻氨酸受体 激肽 B1 受体 烟碱型乙酰胆碱受体 δ - 阿片类受体	肾性尿崩症 低促性腺激素性性功能低减 视网膜色素变性 原发性帕金森病 神经传递 气道过敏性疾病 离子通道 疼痛
		SR121463, VPA 985, OPC31260, OPC41061 ^[12,13] GnRH 拟肽类拮抗剂 ^[14] 类维生素 A ^[15] 多巴胺 ^[16] 红藻氨酸, 谷氨酸 ^[17] 非肽类拮抗剂 ^[18] 胆碱能配基 ^[19] 纳屈酮 ^[20]
溶酶体酶	α - 半乳糖苷酶 β - 葡萄糖苷脂酶 β - 半乳糖苷酶 β - 乙酰氨基葡萄糖苷酶	Fabry 病 Gaucher 病 GM1 神经节苷脂贮积病 Tay-Sachs 病, Sandhoff 病
		半乳糖, DGJ (1- 脱氧半乳糖野尻霉素) ^[21,22] NN-DNJ(n-(n- 壬基)- 脱氧野尻霉素), CO-DNJ, isofagomine 及其金刚烷衍生物 ^[23~26] 半乳糖衍生物 NOEV ^[27] N- 乙酰氨基葡萄糖衍生物 NGT ^[28]
其他蛋白	P 型铜转运 ATP 酶 肉毒碱转运蛋白 HERG K ⁺ 通道 p53 Smo 酪氨酸酶 抗磷酸胆碱抗体 转甲状腺素蛋白	Menke 卷发综合征 肉毒碱缺乏症 长 QT 综合征 癌症 癌症 白化病 抗细菌感染 转甲状腺素蛋白淀粉样变性
		铜离子 ^[29] 肉毒碱 ^[30] E-4031 ^[31] CP-31398 ^[32] 环杷明 ^[33] DOPA, 酪氨酸 ^[34] 4- 硝基苯磷酸胆碱 ^[35] 二氟尼柳 ^[36]

本表部分内容参考文献[1]和文献[2].

2 药物分子伴侣及其功能举例

2.1 药物分子伴侣与突变 ATP 结合盒转运蛋白

ATP 结合盒(ATP binding cassette, ABC)转运蛋白是一类质膜蛋白, 一般由 2 个核苷酸结合区(NBD)和 2 个跨膜区(TMD)组成, 每个跨膜区有 6 个 TM 片段(图 1a). 人体存在 48 种不同的 ABC 转运蛋白, 其中 ABCB1、ABCC7、ABCC8 等 14 种转运蛋白的缺陷与一些疾病的发生相关, 如囊性纤维化、婴儿持续性高胰岛素性低血糖症、胰岛素依赖型糖尿病、进行性家族性肝内胆汁淤积、Tangier 病、Stargardt 病、老年黄斑变性、免疫缺陷、慢性特发性黄疸、肾上腺脑白质营养不良等.

ABC 转运蛋白 ABCB1, 即 P- 糖蛋白(P-gp), 是一种 ATP 依赖性药物外排泵, 通过脂质双分子

层将多种疏水化合物排出细胞. 在生理状态下, P-gp 与防止毒素入侵等功能有关, 其底物可能是细胞毒性药物、一些常用药物、细胞毒性的代谢物、饮食和环境中的毒素等.

P-gp 是最早发现的 ATP 膜转运蛋白家族中的成员, 被作为药物分子伴侣研究的模式蛋白. 野生型 P-gp 蛋白合成时先翻译折叠产生 4 个处于松散构象的结构域, 各结构域及 TM 片段之间再继续折叠紧凑, 然后离开内质网, 经由高尔基体, 最后运输到细胞表面(图 1b 步骤 1~5). 若 P-gp 发生突变, 如第 490 位酪氨酸缺失, 则会在蛋白质折叠过程中形成热力学障碍, 折叠中间物在内质网中积累而随后被迅速水解, 不能完成折叠及运输过程(图 1b 步骤 1D). Loo 等^[3]于 1997 年发现, P-gp 底物(如 vinblastine、capsaicin)或抑制剂(如 cyclosporin、

verapamil)等药物分子伴侣与突变蛋白的结合, 能够使其折叠状态接近于天然构象, 并稳定该构象, 协助突变蛋白避开降解途径, 运输到细胞表面发挥作用(图 1c). 随后的研究表明, 药物分子可能促进 TMD 之间的相互作用, P-gp 即使 2 个 NBD 同时缺失也能被药物分子恢复活性^[37, 38]. P-gp 蛋白存在 3 个 N-糖基位点, 滞留在内质网的突变蛋白与细胞表面的野生型蛋白的糖基化修饰程度存在差异,

前者仅存在核心糖的部分糖基化修饰, 其糖结构对内切糖苷酶 H(Endo H)敏感, 而后者经由高尔基体进行了完全糖基化修饰, 成为成熟蛋白, 其糖结构对 Endo H 具有抗性; 仅有核心糖修饰的未成熟蛋白分子比完全糖基化修饰的成熟蛋白分子在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移得快. 这些性质可用于监测 P-gp 突变蛋白以及其他类似的突变糖蛋白在药物分子伴侣作用后的成熟程度.

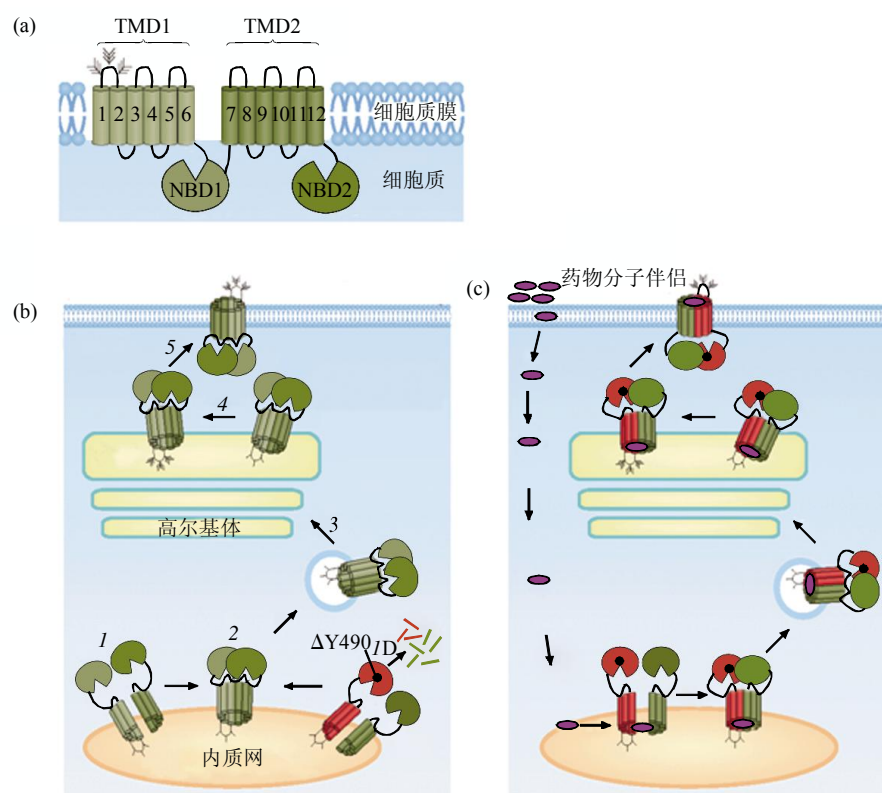


Fig. 1 Pharmacological chaperones rescue folding and trafficking of mutant P-glycoprotein^[2]

图 1 药物分子伴侣促进突变 P-糖蛋白的折叠和运输^[2]

(a) P-gp 蛋白由核苷酸结合区 NBD1、NBD2 与跨膜区 TMD1、TMD2 组成. (b)野生型 P-gp 蛋白在内质网合成, 发生核心糖基化修饰, 各结构域紧密折叠, 被运输到高尔基体, 进行完全糖基化修饰, 随后运输到细胞表面(步骤 1~5); 突变蛋白如 $\Delta Y490$ 等因不能正确折叠而被降解(步骤 1D). (c)药物分子伴侣协助 P-gp 突变蛋白正确折叠、运输到细胞表面.

ABC 转运蛋白 ABCC7, 即囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(CFTR), 是一类位于多种细胞表面 cAMP 激活的氯离子通道蛋白, 其突变会导致囊性纤维化(CF). CF 是一类典型的由 ABC 转运蛋白突变导致的疾病, 患者的肺等器官氯离子通道活性丧失, 盐平衡失调, 离子水平遭到破坏, 抗微生物肽的活性降低, 气道黏液层脱水变黏, 导致细菌感染不能根除而长期存在, 患者因慢性肺感染引起呼吸功能衰弱, 最终导致肺功能衰竭.

尽管 CFTR 基因中已鉴别有 1 000 多种突变与 CF 的发生有关, 但至少 90% 的 CF 病人 CFTR 蛋

白 NBD1 区缺失了第 508 位苯丙氨酸($\Delta F508$). 将 CFTR $\Delta F508$ 在体外表达时, 突变蛋白在内质网中合成又迅速被降解, 而降低温度(27°C)进行表达能增加细胞表面的突变蛋白, 增强氯离子通道活性, 说明 F508 的缺失引起了 CFTR 折叠的温度敏感缺陷, 同时也说明突变蛋白只要能到达细胞表面就仍能行使功能. P-gp 蛋白分子中的 Y490 缺失与 $\Delta F508$ 在 CFTR 中的突变位置相当, 并且 P-gp 蛋白与 CFTR 结构相似, 被称为 CFTR 的姊妹蛋白, 其在药物分子伴侣方面的研究为治疗 CF 提供了模式. Loo 等 2005 年采用幼仓鼠肾细胞表达 CFTR

$\Delta F508$, 发现新型的喹唑啉化合物 CFcor-325 (图 2a) 在 $1 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ 浓度范围内能促进该蛋白质成熟和运输, 恢复其功能. 进一步研究表明, 该化合物也能促进位于 CFTR TMD1 区的 R258G 与位于 TMD2 区的 S945L、H949Y 突变蛋白的成熟, 并且用人胚肾 293 细胞进行实验也得到了相同的结果, 说明该化合物能恢复 CFTR 蛋白不同结构域的突变, 而且该作用的发挥不依赖于特定的细胞系^[9]. CFcor-325 通过促进 TMD1 和 TMD2 以及 TM 片段之间的正确折叠使 CFTR 蛋白组装成天然构象, 该药物分子也能恢复 CFTR 姊妹蛋白 P-gp 的活性. 为了进一步获得高亲和力的药物分子, Pedemonte 等^[6]进行了大量的药物筛选, 获得了二氢甲基二噻唑衍生物 corr-4a、噻唑衍生物 corr-2b(图 2a)等药物分子伴侣, 用 corr-4a 处理来源于 $\Delta F508$ 病人的气道上皮细胞, 氯离子的分泌浓度从检测不到上升至正常上皮细胞的 8%, 而校正水平只要达到正常 CFTR 活性的 6%~10%就足以防止或降低肺病变. Wang 等^[7]2006 年检测了一种新型的吡唑型激活剂

CFpot-532(图 2a)及 corr-4a、corr-2b 等药物分子伴侣的特异性, 结果发现 corr-4a 也能恢复 P-gp 突变体的活性, 而 CFpot-532 及 corr-2b 对 P-gp 突变体不起作用, 具有严格的特异性. CFpot-532 和 corr-2b 在结构上具有一定的相似性, 五元环的两端连接苯环, 可能通过与 CFTR 跨膜区作用而促进其折叠. 进一步研究发现, CFpot-532 的校正效率低于 corr-4a 和 CFcor-325, 它对 CFTR $\Delta F508$ 的主要作用是作为增强剂增大通道的开放率(P_o), 野生型蛋白 F508 芳香基侧链在决定通道关闭状态的耐受时间中起重要作用, 突变酶 F508 的缺失导致 P_o 比野生酶低 3~4 倍, 当用 CFpot-532 处理携带该突变基因的细胞后, 细胞表面氯离子通道 P_o 增大 4 倍, 与野生型蛋白相似. 尽管 CFpot-532 不如 CFcor-325 和 corr-4a 校正效率高, 但它可作为先导化合物衍生出具有更高校正活性且保留增强剂特征的化合物, 更进一步提高 CFTR $\Delta F508$ 成熟效率或增强离子通道活性.

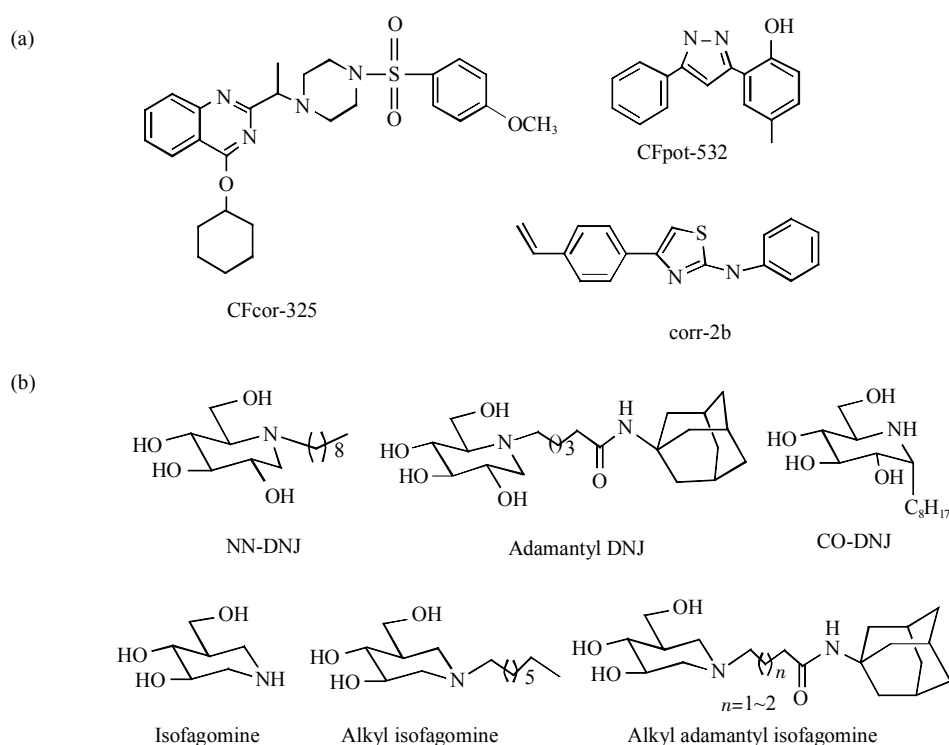


Fig. 2 Structures of some pharmacological chaperones

图 2 部分药物分子伴侣的分子结构

(a)和(b)分别为 ABC 转运蛋白 CFTR 及溶酶体酶 β -Gluc 的药物分子伴侣.

ABC 转运蛋白 ABCC8, 即磺脲类药物受体 (SUR1), 在内质网中与膜内向整流钾离子通道蛋

白(Kir6.2)作用, 然后共同被运输到胰岛 β 细胞表面, 形成 ATP 敏感钾离子通道(K_{ATP}). 该通道根据

血糖浓度的变化调节胰岛素的分泌水平。当血糖浓度增高时, ATP/ADP 比值升高, ATP 结合到 K_{ATP} 通道上抑制其活性, 该通道关闭, 细胞膜去极化, 当膜电位达到一定阈值时, 膜上的电压依赖性钙通道(VDCCs)迅速开放, Ca^{2+} 内流, 触发胰岛素分泌; 当血糖浓度降低时, ATP/ADP 比值降低, ADP 结合到 K_{ATP} 通道, 该通道开放, 钾离子释放, 改变膜电位, VDCCs 关闭, 抑制胰岛素的释放。若 SUR1 发生突变会导致该蛋白质的错误折叠, 阻碍 SUR1 和 Kir6.2 运输到细胞表面, 导致细胞表面 K_{ATP} 通道缺失, VDCCs 持续开放, 胰岛素即使在血糖水平降低时也会释放, 引起先天性高胰岛素血症, 随之发生的低血糖症会引起脑损伤。近年来的研究显示磺脲类药物如格列本脲等能促进内质网中 SUR1 突变蛋白的成熟, 显著增加细胞表面的 K_{ATP} 通道蛋白^[8]。Yan 等^[9]2006 年以 SUR1 A116P 和 SUR1 V187D 两种突变蛋白为例探索了格列本脲的作用机制, 发现该药物分子在内质网中结合于 SUR1 折叠中间物的药物结合位点, 对 SUR1-Kir6.2 复合物发挥伴侣作用, 不仅能恢复 SUR1 突变导致的功能缺陷, 也能恢复 Kir6.2 突变导致的功能缺陷, 这一研究对恢复其他类似的复合蛋白折叠运输缺陷有着重要意义, 格列本脲类药物目前已被用于治疗 Kir6.2 突变导致的新生儿糖尿病。

2.2 药物分子伴侣与突变 G-蛋白耦联受体

G-蛋白耦联受体(G-protein-coupled receptors, GPCR)是人体内最大的膜受体蛋白家族, 是一大类具有 7 个 TM 螺旋的跨膜蛋白, 通过与胞外配基的结合激活胞内耦联的 G 蛋白, 从而将外界信号跨膜传递到细胞内。已发现至少有 10 种不同的疾病与 GPCR 突变有关, 如肾性尿崩症、低促性腺激素性性功能低减、视网膜色素变性、家族性低尿钙性高钙血症、先天性巨结肠症等。

抗利尿激素 V_2 受体(V_2R)是第一个用于药物分子伴侣疗法研究的 GPCR 类突变蛋白, 该受体在肾脏集合管重吸收水分浓缩尿液的过程中发挥着重要作用, 其突变会引起细胞表面抗利尿激素受体功能障碍、肾脏集合管对抗利尿激素不起反应而出现尿浓缩障碍, 导致肾性尿崩症(NDI), 发生多饮、多尿、尿比重降低, 病症严重时会导致死亡。已发现有 150 多种 V_2R 的突变能引起 NDI, 其中绝大部分的突变导致 V_2R 蛋白不能正确折叠及运输到细胞表面。Morello 等^[12]2000 年发现细胞通透性拮抗剂如 SR121463A、VPA-985 等能促进 8 种 V_2R

突变蛋白的正确折叠和运输, 恢复其细胞表面抗利尿激素受体功能。为寻找亲和力更强的药物分子伴侣, Robben 等^[13]2007 年对拮抗剂 SR49059、OPC31260、OPC41061、SR121463B 进行了研究, 发现这些药物能对多种 V_2R 突变体发挥作用, 且作用效果与药物浓度及其与受体的亲和力存在相关性, 其中 OPC31260 和 OPC41061 与受体 V_2R 的亲和力较强, 在临床使用浓度即能有效发挥药物分子伴侣的作用, 是治疗 NDI 很有前景的候选药物。

近年来大量的研究表明, 药物分子伴侣也能有效促进其他 GPCR 突变蛋白的正确折叠和运输, 如引起低促性腺激素性性功能低减的突变 GnRH 受体、引起视网膜色素变性的突变视紫红质以及与疼痛有关的突变 δ -阿片类受体等^[14~20]。Leskela 等^[20]2007 年以 δ -阿片类受体为模型首次直接证实了药物分子伴侣在内质网中结合新合成的 GPCR 蛋白分子, 校正并稳定其构象, 协助蛋白质逃离内质网降解途径、最终运输到细胞表面。

2.3 药物分子伴侣与突变溶酶体酶

溶酶体内的酸性水解酶在细胞内起着清道夫的重要作用, 对生物大分子有着强烈的消化作用, 以维持细胞的正常代谢活动。若溶酶体酶功能缺失, 则会引起生物大分子如鞘糖脂、糖原、粘多糖等不能水解而贮积在溶酶体内, 同时细胞成分与结构得不到更新, 发生代谢紊乱, 从而导致溶酶体贮积病。其中, 鞘糖脂异常代谢是最普遍发生的溶酶体贮积病。鞘糖脂是细胞膜的重要组成部分, 其分子结构为长度不均的糖链连接到神经酰胺上, 该组分在细胞内通过溶酶体中的几十种可溶性水解酶和膜整合蛋白来代谢降解。在正常代谢过程中, 鞘糖脂从非还原末端被依次降解, 释放糖类分子, 最终产生神经酰胺和单糖, 在细胞质内进行循环, 而如果参与降解途径的酶蛋白发生突变, 则会引起分解代谢阻遏, 导致底物在溶酶体贮积, 引起鞘糖脂贮积疾病如 Fabry、Gaucher、Tay-Sachs、Sandhoff、Niemann-Pick 和 GM1 神经节苷脂贮积等(图 3)。这类疾病虽然发病率低, 但对人体的破坏性很大, 药物分子伴侣在这类疾病中的研究较多。突变溶酶体酶的药物分子伴侣一般为该类酶的竞争性抑制剂, 可与突变酶结合于活性中心, 协助其在内质网中正确折叠, 从而避开降解途径, 正确运输到溶酶体, 溶酶体存在高浓度的代谢底物, 与结合于突变酶的药物分子进行竞争, 使得酶蛋白与药物分子发生解离, 作用于正常代谢底物(图 4)。

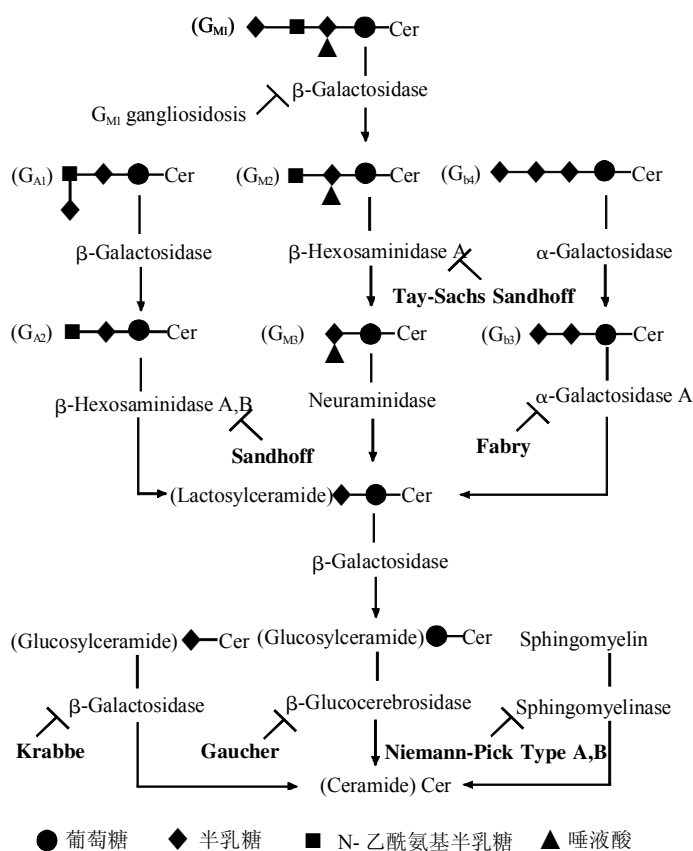


Fig. 3 Glycosphingolipid storage disorders resulting from mutant lysosomal enzymes^[39]

图3 溶酶体酶突变导致的鞘糖脂贮积病^[39]

Fabry 病是由于溶酶体 α -半乳糖苷酶 A (α -GalA, EC3.2.1.22) 突变, 导致三聚己糖神经酰胺 (Gb3) 在心脏、肝脏、肾脏、眼、脑及皮肤的神经、血管等多种组织细胞的溶酶体中堆积, 引起一系列异常表现. α -GalA 基因上不同的突变类型显示了这种病的遗传异质性. 半乳糖是第一个发现的用于治疗溶酶体贮积紊乱的药物分子伴侣. Ishii 等^[41]1993 年将引起非典型心脏型 Fabry 病的 Q279E 突变酶基因在体外表达时, 发现室温表达酶蛋白显示出了野生型酶的活性. 进一步研究发现, Q279E 具有天然 α -GalA 的动力学特征, 但该突变酶在中性 pH 不耐热, 在内质网环境中易错误折叠, 继而被蛋白酶降解. 当在组织培养物中加入半乳糖后, Q279E 的酶活性提高了, 半乳糖增强了该酶在中性 pH、37°C 的稳定性. 随后发现半乳糖对 α -GalA 其他突变酶如 A156V、L166V、G260A、G373S、R301Q 和 M296I 也能起稳定作用^[42]. 由此推测, 很多 α -GalA 错义突变能表达有催化活性的蛋白

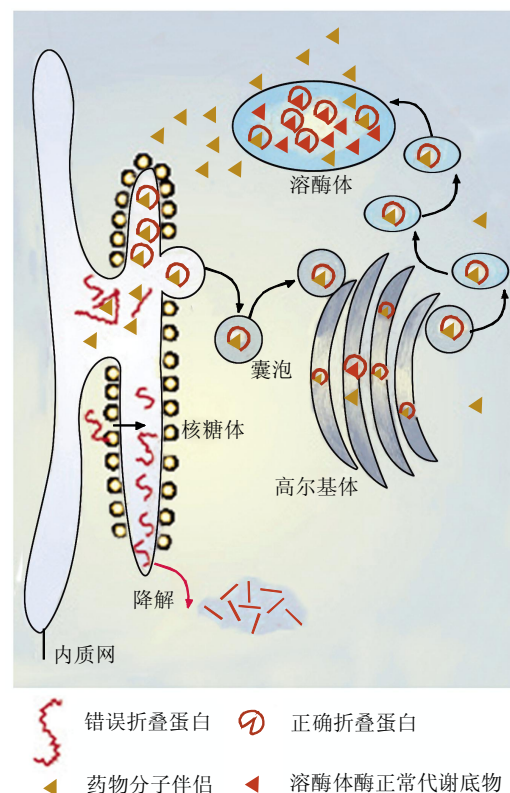


Fig. 4 Pharmacological chaperones rescue folding and trafficking of mutant lysosomal enzymes^[40]

图4 药物分子伴侣促进突变溶酶体酶的折叠运输^[40]

质, 但会被快速降解, 半乳糖的结合保护突变酶免于降解, 增多了突变酶向溶酶体的运输. Frustaci 等^[21]2001 年将半乳糖应用于临床研究, 发现能有效治疗 α -GalA G328R 突变引起的典型心脏型 Fabry 病. 一位 55 岁男性患者每隔一天口服半乳糖 (1 g/kg 体重), 三天后其冠状窦血液中成淋巴细胞 α -GalA 的活性明显提高, 三个月后其心肌收缩能力明显提高, 心脏重量降低 20%, 这些症状的改善在治疗后持续了两年, 病人不需要再进行心脏移植手术. 这一成功的临床试验结果促进了其他更高效、选择性更强的非毒性药物分子伴侣的发展.

由于半乳糖与 α -GalA 结合能力弱, 代谢不稳定, Fan 等^[22]1999 年选择 α -GalA 潜在的竞争性抑制剂 1-脱氧半乳糖野尻霉素 (DGJ) 来进行试验. DGJ 的质子化形式能模拟糖苷酶反应的过渡态电荷分布状态, 从而稳定突变酶的构象, 20 μ mol/L 的 DGJ 能在体外分别将来源于心脏型 Fabry 病人的成淋巴细胞 α -GalAR301Q 或 Q279E 活性提高 7~8

倍, 采用该化合物处理体外表达 α -GalA R301Q 的转基因鼠成纤维细胞得到了相似的结果, 在动物实验中, 携带 α -GalA R301Q 突变的转基因鼠口服 DGJ(0.003~0.03 g 每 kg 体重每天)一周后, 其心脏等器官的 α -半乳糖苷酶活性显著升高, 证实了体内实验的有效性. Yam 等^[43]2005 年通过研究细胞的形态和生化特征直接验证了 DGJ 协助转基因鼠成纤维细胞中内质网滞留的 α -GalA R301Q 运输到溶酶体, 并且该突变酶具有催化活性. 正常情况下, α -GalA 在内质网合成, 而后运输到高尔基体, 酶蛋白寡糖链上的甘露糖残基发生磷酸化形成 6-磷酸甘露糖, 该糖是介导溶酶体酶运输到溶酶体的受体识别标志. 当 α -GalA 发生突变后, 突变酶被内质网质量监控系统滞留, 与分子伴侣 BiP 形成复合物, 被识别为错误折叠蛋白而最终降解, 这种折叠运输缺陷导致溶酶体内 α -GalA 功能的缺失, 使得相应的代谢底物如 Gb3 大量积累. Yam 等^[43]发现, DGJ 在中性条件下如内质网中能增强突变 α -GalA 的稳定性, 降低突变酶与 BiP 的结合几率, 协助突变酶通过依赖于 6-磷酸甘露糖的机制运输到溶酶体, 溶酶体内大量的底物分子及酸性 pH 促使 DGJ 从突变但未失去催化活性的 α -GalA 中解离, α -GalA 将积累的 Gb3 清除. 进一步研究发现, DGJ 处理后的细胞没有明显的毒性反应, 显示了该药物的安全性^[44]. 目前 DGJ 已进入了 II 期临床实验.

Gaucher 病在溶酶体疾病中发病最普遍, 是由于 β -葡萄糖脑苷脂酶(EC3.2.1.45, β -Gluc)突变导致葡萄糖苷酰鞘氨醇在巨噬细胞积累, 引起肝脾增大、贫血、骨骼损伤及中枢神经系统功能障碍. 过去认为引起 Gaucher 病的最常见突变即 β -Gluc N370S 和其他类突变是由于活性位点发生改变导致蛋白质失去功能, 但现在的研究表明, 这些突变仅仅干扰 β -Gluc 在内质网的折叠及运输, 采用抑制剂能部分恢复蛋白质活性. 这类抑制剂似乎提供了一种互补于 β -Gluc 活性位点的模板, 能使突变酶在内质网中折叠为正确构象, 并协助突变酶离开内质网, 运输到溶酶体, 溶酶体内的高浓度糖脂底物能竞争性替代抑制剂, 使酶行使正常功能. Sawkar 等^[23]2002 年用 *n*-(*n*-壬基)-脱氧野尻酶素(NN-DNJ)处理携带 Gaucher 病人 β -Gluc N370S 基因的成纤维细胞, 将突变酶的活性提高了 2 倍. 2005 年 Sawkar 等^[24]研究了 34 种化合物包括葡萄糖衍生物、碳苷类似物、DNJ 类似物及其他化合物对体外表达的

人源突变酶活性的影响, 结果表明, 葡萄糖衍生物及碳苷类似物对突变酶不起作用, 而几乎所有的 DNJ 类似物都能对 N370S 和 G202R 起到药物分子伴侣作用, 其中烷基链末端为疏水金刚烷(adamantyl)的 DNJ 类似物活性很高, 但 DNJ 类似物异头碳上缺少取代基, 不能特异性模拟糖类分子异头碳的 α 或 β 结构, 从而也能结合到其他酶分子上如 α -葡萄糖苷酶并抑制其活性. Yu 等^[25]2007 年检测了一系列烷基侧链位于 α 异头碳的 DNJ 类似物, 结果发现了一种新的药物分子伴侣 CO-DNJ 能将 N370S 突变酶的活性提高 2 倍, 并且不抑制细胞内 α -Gluc 的活性. 非 DNJ 结构的化合物如亚氨基糖 isofagomine 及其衍生物也能提高 N370S 和 G202R 的活性, 并且 isofagomine 目前已进入了 II 期临床实验. Yu 等^[26]最近将 isofagomine 与烷基 adamantyl 酰胺疏水结构组合, 获得了目前治疗 Gaucher 病最有效的一类药物分子伴侣, 能分别将 N370S、G202R 的活性提高 2.5 倍和 7.2 倍, 图 2b 显示了这些药物分子伴侣的化学结构.

GM1 神经节苷脂贮积病是由于 β -半乳糖苷酶(EC3.2.1.23, β -Gal)发生突变, 引起 GM1 神经节苷脂及其脱唾液酸衍生物(GA1)在中枢神经系统贮积. Matsuda 等^[27]2003 年合成的半乳糖衍生物 NOEV 能提高该类突变酶的活性, 将携带 β -Gal R201C 突变的转基因鼠口服 NOEV 一周, 其脑部和其他组织的 β -半乳糖苷酶活性显著提高, 贮积在大脑皮层和脑干神经元细胞的 GM1 和 GA1 的数量明显降低. 这一结果首次揭示了药物分子伴侣有可能成为治疗中枢神经系统相关的溶酶体贮积紊乱的有效方式.

GM2 神经节苷脂贮积病是由于 β -N-乙酰氨基己糖苷酶(EC3.2.1.52, β -Hex)发生突变, 导致 GM2 神经节苷脂及其脱唾液酸衍生物(GA2)在神经元贮积. 溶酶体 β -N-乙酰氨基己糖苷酶以多种二聚体形式存在, 其中 β -HexA 由 α 、 β 亚基组成, 水解 GM2 神经节苷脂及 GA2 糖脂, β -HexB 由两个 β 亚基组成, 主要水解 GA2 糖脂. 这类酶 α 或 β 亚基的突变会分别引起 Tay-Sachs 病或 Sandhoff 病. Tropak 等^[28]2004 年报道了该类酶的抑制剂 N-乙酰氨基葡萄糖衍生物 NGT 能作为药物分子伴侣, 在体外分别恢复来源于 Tay-Sachs 或 Sandhoff 病人成纤维细胞中的 α G269S 突变酶或 β P504S 突变酶的功能.

采用药物分子伴侣治疗溶酶体贮积病, 其应用

前景十分广阔。药物分子伴侣疗法是通过口服溶酶体酶抑制剂,直接恢复内源溶酶体酶的功能,并且药物分子能穿越血脑屏障治疗中枢神经系统相关的贮积疾病,比现有的其他治疗方法如酶替代疗法和底物减少疗法更简便、更适于长期治疗。酶替代疗法是通过静脉注射重组溶酶体酶,补充内源溶酶体酶的缺陷,但重组酶在体内会很快被降解,需要持续治疗,价格昂贵,并且重组酶不能穿越血脑屏障,底物减少疗法是通过口服糖基转移酶抑制剂,抑制突变酶代谢底物的合成,降低底物数量,改善病症,该疗法可通过一种化合物治疗多种溶酶体贮积病,但同时也改变了细胞正常的合成代谢,具有潜在的副作用。

2.4 药物分子伴侣与其他类突变蛋白

除 ATP 结合盒转运蛋白、G-蛋白耦联受体及溶酶体酶外,药物分子伴侣也应用于其他突变蛋白的研究,其中包括膜蛋白如引起 Menke 卷发综合征的突变 P 型铜转运 ATP 酶,胞核蛋白如致癌的突变抑癌蛋白 p53,分泌蛋白如引起转甲状腺素蛋白淀粉样变性的突变转甲状腺素蛋白 (TTR) 等^[29~36]。

值得注意的是,有的突变分泌蛋白虽然发生了错误折叠,但由于折叠中间物异常稳定而能避开细胞内的降解途径,正常运输到胞外,但会大量聚集形成对细胞有毒性作用的淀粉样沉积物,引起退行性神经疾病。目前已发现 20 多种分泌蛋白在胞外的错误折叠、装配与细胞毒性的淀粉样变性发生有关。Kelly 研究室近年来对突变 TTR 药物分子伴侣的研究较多,该蛋白质野生型为同源四聚体,当发生某些突变如第 119 位苏氨酸突变为甲硫氨酸,会导致蛋白质天然构象发生解聚,同时亚基的构象改变为富含易于相互作用的 β 折叠结构,进而病理性聚合成淀粉样沉积物。小分子抑制剂如二氟尼柳等能在内质网中结合该蛋白质,稳定其天然聚集体构象,抑制病理性过渡态构象的形成,从源头上阻碍淀粉样变性的发生^[36]。

3 问题与展望

药物分子伴侣的应用范围十分广泛,可能成为治疗由蛋白质错误折叠引起的疾病的通用策略,其开发为发展临床用化合物提供了新的途径。

目前药物分子伴侣的筛选是个巨大的工程,选择合适的化合物库将简化筛选过程,Tropak 等^[45, 46] 2007 年从 1 040 种 FDA 认证的化合物中鉴定了

pyrimethamine 为溶酶体酶 β -HexA 最有潜力的抑制剂,证实了从 FDA 库中筛选治疗遗传性代谢紊乱疾病的药物分子伴侣是切实可行的。FDA 库中的药物分子已通过动物和人体毒性测试应用于医疗,因而从该库中进行筛选比传统方式节省开发时间并节约成本。另外,引发同一种疾病的蛋白质分子一般存在不同的突变类型,若能获得各种突变体的通用药物分子伴侣,将会简化治疗相关疾病的药物筛选过程^[47]。

绝大部分的药物分子伴侣不能完全补偿突变导致的折叠缺陷,Wang 等 2007 年提出了新策略,即同时使用多个药物分子伴侣共同补偿突变导致的折叠缺陷。Wang 等发现,两种药物分子伴侣分子能同时结合到 ABC 转运蛋白 P-gp P709G 跨膜区的不同位点,并且比单一分子的结合更有效,corr-2b、CFcor325 或 corr-4a、corr-2b 的联合使用能恢复更多的 CFTR H1085R 蛋白分子,CFcor325 与 corr-2b 或 corr-4a 分别联合使用更能提高高尔基体及质膜中的 CFTR Δ F508 蛋白含量。这些分子的联合作用导致有利的构象变化,使得 P-gp 或 CFTR 突变引起的折叠能量障碍能被校正分子结合能的总和所克服^[48, 49]。这种多个药物分子伴侣联合使用的方法也可以延伸用于其他疾病的治疗。

药物分子伴侣疗法也存在一定局限性,当突变发生在催化位点或折叠缺陷太大使得蛋白质完全失去活性时,该疗法就难以恢复其功能。另外,有的突变膜蛋白虽已被药物分子伴侣恢复功能,但其在细胞表面的降解速率比野生型蛋白快,如何延缓突变蛋白的降解,还有待于进一步研究。尽管存在潜在的问题,但已有的研究结果显示,药物分子伴侣提供了一种令人振奋的治疗遗传性疾病的新疗法。目前能被药物分子伴侣治疗的疾病都是临床上最重要的类群,尽管应用于临床的药物分子伴侣还非常有限,但大量已有的细胞及动物实验结果预示着未来的几年内临床研究将成为热点,同时伴随着筛选工程的展开将会鉴定出更多临床有用的新型药物分子伴侣。

参 考 文 献

- 1 Bernier V, Lagace M, Bichet D G, *et al.* Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol Metab*, 2004, **15** (5): 222~228
- 2 Loo T W, Clarke D M. Chemical and pharmacological chaperones as new therapeutic agents. *Expert Rev Mol Med*, 2007, **9** (16): 1~18
- 3 Loo T W, Clarke D M. Correction of defective protein kinesis of

- human P-glycoprotein mutants by substrates and modulators. *J Biol Chem*, 1997, **272** (2): 709~712
- 4 Loo T W, Clarke D M. Nonylphenol ethoxylates, but not nonylphenol, are substrates of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **247** (2): 478~480
- 5 Loo T W, Bartlett M C, Clarke D M. Rescue of Delta F508 and other misprocessed CFTR mutants by a novel quinazoline compound. *Mol Pharm*, 2005, **2** (5): 407~413
- 6 Pedemonte N, Lukacs G L, Du K, *et al.* Small-molecule correctors of defective F508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest*, 2005, **115**: 2564~2571
- 7 Wang Y, Bartlett M C, Loo T W, *et al.* Specific rescue of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing mutants using pharmacological chaperones. *Mol Pharmacol*, 2006, **70** (1): 297~302
- 8 Yan F, Lin C W, Weisiger E, *et al.* Sulfonylureas correct trafficking defects of ATP-sensitive potassium channels caused by mutations in the sulfonylurea receptor. *J Biol Chem*, 2004, **279** (12): 11096~11105
- 9 Yan F F, Casey J, Shyng S L. Sulfonylureas correct trafficking defects of disease-causing ATP-sensitive potassium channels by binding to the channel complex. *J Biol Chem*, 2006, **281** (44): 33403~33413
- 10 Polgar O, Robey R W, Morisaki K, *et al.* Mutational analysis of ABCG2: role of the GXXG motif. *Biochemistry*, 2004, **43** (29): 9448~9456
- 11 Buyse F, Vandenbranden M, Ruyschaert J M. Mistargeted MRPdeltaF728 mutant is rescued by intracellular GSH. *FEBS Lett*, 2004, **578** (1-2): 145~151
- 12 Morello J P, Salahpour A, Laperrière A, *et al.* Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest*, 2000, **105** (7): 887~895
- 13 Robben J H, Sze M, Knoers N V, *et al.* Functional rescue of vasopressin V2 receptor mutants in MDCK cells by pharmacochaperones: relevance to therapy of nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, **292** (1): F253~F260
- 14 Janovick J A, Maya-Nunez G, Conn P M. Rescue of hypogonadotropic hypogonadism-causing and manufactured GnRH receptor mutants by a specific protein-folding template: misrouted proteins as a novel disease etiology and therapeutic target. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87** (7): 3255~3262
- 15 Noorwez S M, Kuksa V, Imanishi Y, *et al.* Pharmacological chaperone-mediated *in vivo* folding and stabilization of the P23H-opsin mutant associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *J Biol Chem*, 2003, **278** (16): 14442~14450
- 16 Van Craenenbroeck K, Clark S D, Cox M J, *et al.* Folding efficiency is rate-limiting in dopamine D4 receptor biogenesis. *J Biol Chem*, 2005, **280** (19): 19350~19357
- 17 Valluru L, Xu J, Zhu Y, *et al.* Ligand binding is a critical requirement for plasma membrane expression of heteromeric kainate receptors. *J Biol Chem*, 2005, **280** (7): 6085~6093
- 18 Fortin J P, Dziadulewicz E K, Gera L, *et al.* A nonpeptide antagonist reveals a highly glycosylated state of the rabbit kinin B1 receptor. *Mol Pharmacol*, 2006, **69** (4): 1146~1157
- 19 Kuryatov A, Luo J, Cooper J, *et al.* Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human alpha4beta2 acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, 2005, **68** (6): 1839~1851
- 20 Leskela T T, Markkanen P M, Pietila E M, *et al.* Opioid receptor pharmacological chaperones act by binding and stabilizing newly synthesized receptors in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 2007, **282** (32): 23171~23183
- 21 Frustaci A, Chimenti C, Ricci R, *et al.* Improvement in cardiac function in the cardiac variant of Fabry's disease with galactose-infusion therapy. *N Engl J Med*, 2001, **345** (1): 25~32
- 22 Fan J Q, Ishii S, Asano N, *et al.* Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat Med*, 1999, **5** (1), 112~115
- 23 Sawkar A R, Cheng W C, Beutler E, *et al.* Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta-glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (24): 15428~15433
- 24 Sawkar A R, Adamski-Werner S L, Cheng W C, *et al.* Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chem Biol*, 2005, **12** (11): 1235~1244
- 25 Yu L, Ikeda K, Kato A, *et al.* Alpha-1-C-octyl-1-deoxynojirimycin as a pharmacological chaperone for Gaucher disease. *Bioorg Med Chem*, 2006, **14** (23): 7736~7744
- 26 Yu Z, Sawkar A R, Whalen L J, *et al.* Isofagomine-and 2,5-anhydro-2,5-imino-D-glucitol-based glucocerebrosidase pharmacological chaperones for Gaucher disease intervention. *J Med Chem*, 2007, **50** (1): 94~100
- 27 Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, *et al.* Chemical chaperone therapy for brain pathology in G (M1)-gangliosidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (26): 15912~15917
- 28 Tropak M B, Reid S P, Guiral M, *et al.* Pharmacological enhancement of beta-hexosaminidase activity in fibroblasts from adult Tay-Sachs and Sandhoff Patients. *J Biol Chem*, 2004, **279** (14): 13478~13487
- 29 Kim B E, Smith K, Meagher C K, *et al.* A conditional mutation affecting localization of the Menkes disease copper ATPase. Suppression by copper supplementation. *J Biol Chem*, 2002, **277** (46): 44079~44084
- 30 Amat di San Filippo C, Pasquali M, Longo N. Pharmacological rescue of carnitine transport in primary carnitine deficiency. *Hum Mutat*, 2006, **27** (6): 513~523
- 31 Zhou Z, Gong Q, January C T. Correction of defective protein trafficking of a mutant HERG potassium channel in human long QT syndrome. Pharmacological and temperature effects. *J Biol Chem*, 1999, **274** (44): 31123~31126
- 32 Foster B A, Coffey H A, Morin M J, *et al.* Pharmacological rescue

- of mutant p53 conformation and function. *Science*, 1999, **286** (5449): 2507~2510
- 33 Chen J K, Taipale J, Cooper M K, *et al.* Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev*, 2002, **16** (21): 2743~2748
- 34 Halaban R, Cheng E, Svedine S, *et al.* Proper folding and endoplasmic reticulum to golgi transport of tyrosinase are induced by its substrates, DOPA and tyrosine. *J Biol Chem*, 2001, **276** (15): 11933~11938
- 35 Wiens G D, O' Hare T, Rittenberg M B. Recovering antibody secretion using a hapten ligand as a chemical chaperone. *J Biol Chem*, 2001, **276** (44): 40933~40939
- 36 Johnson S M, Wiseman R L, Sekijima Y, *et al.* Native state kinetic stabilization as a strategy to ameliorate protein misfolding diseases: a focus on the transthyretin amyloidoses. *Acc Chem Res*, 2005, **38** (12): 911~921
- 37 Loo T W, Clarke D M. The transmembrane domains of the human multidrug resistance P-glycoprotein are sufficient to mediate drug binding and trafficking to the cell surface. *J Biol Chem*, 1999, **274** (35): 24759~24765
- 38 Wang Y, Loo T W, Bartlett M C, *et al.* Modulating the folding of P-glycoprotein and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator truncation mutants with pharmacological chaperones. *Mol Pharmacol*, 2007, **71** (3): 751~758
- 39 Sawkar A R, D' Haeze W, Kelly J W. Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders - a focus on Gaucher disease. *Cell Mol Life Sci*, 2006, **63** (10): 1179~1192
- 40 Cohen F E, Kelly J W. Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature*, 2003, **426** (6968): 905~909
- 41 Ishii S, Kase R, Sakuraba H, *et al.* Characterization of a mutant alpha-galactosidase gene product for the late-onset cardiac form of Fabry disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **197** (3): 1585~1589
- 42 Okumiya T, Ishii S, Takenaka T, *et al.* Galactose stabilizes various missense mutants of alpha-galactosidase in Fabry disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **214** (3): 1219~1224
- 43 Yam G H, Zuber C, Roth J. A synthetic chaperone corrects the trafficking defect and disease phenotype in a protein misfolding disorder. *FASEB J*, 2005, **19** (1): 12~18
- 44 Yam G H, Bosshard N, Zuber C, *et al.* Pharmacological chaperone corrects lysosomal storage in Fabry disease caused by trafficking-incompetent variants. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, **290** (4): C1076~C1082
- 45 Tropak M B, Blanchard J E, Withers S G, *et al.* High-throughput screening for human lysosomal beta-N-Acetyl hexosaminidase inhibitors acting as pharmacological chaperones. *Chem Biol*, 2007, **14** (2): 153~164
- 46 Maegawa G H, Tropak M, Buttner J, *et al.* Pyrimethamine as a potential pharmacological chaperone for late-onset forms of GM2 gangliosidosis. *J Biol Chem*, 2007, **282** (12): 9150~9161
- 47 Shin S H, Murray G J, Kluepfel-Stahl S, *et al.* Screening for pharmacological chaperones in Fabry disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **359** (1): 168~173
- 48 Wang Y, Loo T W, Bartlett M C, *et al.* Additive effect of multiple pharmacological chaperones on maturation of CFTR processing mutants. *Biochem J*, 2007, **406** (2): 257~263
- 49 Skach W R. Pharmacological chaperoning: two 'hits' are better than one. *Biochem J*, 2007, **406** (2): e1~e2

Pharmacological Chaperones: Novel Therapeutic Strategies to Rescue Defective Protein Folding and Trafficking

LU Li-Li^{1,2)}, XIAO Min^{1,2)*}, ZHAO Han^{1,2)}, XU Xiao-Dong^{1,2)}, WANG Feng-Shan^{2,3)}

¹⁾State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Shandong 250100, China;

²⁾National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Shandong 250100, China;

³⁾School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Shandong 250100, China)

Abstract Numerous inherited diseases are found to result from gene mutations that lead to mutant proteins, which can not fold correctly, fail to undergo trafficking, and are unable to reach their sites of action. Recently, pharmacological chaperones are developed as new therapeutics to rescue proteins defective in folding and trafficking. They are small cell-permeable chemicals, such as substrates, receptor ligands and enzyme inhibitors, which selectively recognize mutant proteins in the endoplasmic reticulum, correct their folding, stabilize the conformation, facilitate their trafficking to destination and yield functional proteins directly. Pharmacological chaperones represent promising avenues for the treatment of endocrine and metabolic diseases. They rescue a number of mutant proteins destined for the plasma membrane or organelles, such as ABC transporters, G-protein-coupled receptors, lysosomal enzymes and so on. Currently, one pharmacological chaperone has been successfully tested in clinical studies, and a lot of pharmacological chaperones have been tested and displayed positive results in cellular system and animal. This indicates that pharmacological chaperones will have great potential and broad prospects for clinical application in the future.

Key words pharmacological chaperones, defective protein folding and trafficking, ABC transporters, G-protein-coupled receptors, lysosomal enzymes

*Corresponding author .

Tel: 86-531-88365128, E-mail: minxiao@sdu.edu.cn

Received: December 16, 2007 Accepted: March 6, 2008