

生物还原剂的作用机理研究概况

陈晓晶 金一尊

(复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

摘要 乏氧现象存在于多数实体肿瘤中。生物还原剂是一种具有肿瘤乏氧靶向性的前药,它会在还原性环境中被还原产生具有细胞毒性的代谢物。目前,生物还原剂主要有硝基杂环类、杂环氮氧类、醌类等几类。生物还原剂不仅可以作为放射增敏剂、化学增敏剂,还可以用于基因向导的酶前药治疗(GDEPT)。总之生物还原剂的研究对未来恶性肿瘤治疗有很大的意义。

关键词 生物还原剂, 乏氧, 还原酶, 基因向导的酶前药治疗, 硝基杂环化合物, 氮氧化合物, 醌类化合物
中图分类号 R730.53, R730.55

手术、放射治疗、化学治疗仍是目前恶性肿瘤治疗的3种主要方法。但是,肿瘤乏氧细胞大大降低了放化疗的效果。随着放射增敏剂研究的深入,生物还原剂的研究成为新的热点。本文就生物还原剂的作用原理、典型药物的机理及临床研究等进行了综述。

1 作用原理

实体肿瘤内不同程度地存在乏氧细胞。这种乏氧细胞可能是由于血管的开合产生的急性乏氧,也可能是由于肿瘤细胞离血管半径超过150 μ m而产生的慢性乏氧。乏氧区细胞都具有氧张力低、营养不足、pH低和血管生成因子过量表达的特点。

针对肿瘤的这种乏氧特性,60年代早期人们就开始设计研究具有乏氧靶向性的生物还原剂。生物还原剂是一种前药(Prodrug),它在还原环境(如乏氧或还原酶)中能被还原生成或释放出细胞毒性极高的活性物,达到治疗的作用。目前发现,还原酶主要有氧依赖的二电子还原酶:DT-黄递酶(NQO1, EC1.6.99.2);单电子还原酶:NADPH:细胞色素P450还原酶、细胞色素b5还原酶、黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶、羧基还原酶及能还原含有硝基化合物的硝基还原酶(NTR)。以前主要是利用生物还原剂对乏氧细胞的选择性毒性来提高乏氧状态下的放疗效果,目前还利用这类药物的乏氧靶向的特点,将它作为有效药物的乏氧选择性载体^[1]。

2 生物还原活性物的类别

2.1 双功能的硝基杂环化合物

2.1.1 化合物的作用机理 当硝基得到奇数个电子

后,产生一个自由基中间物;当得到偶数个电子则分别产生亚硝基、羟胺基和氨基的还原物。氧可以抑制或逆转这个反应。因此,对于乏氧细胞的选择性作用主要归功于氧的抑制或逆转的消除及中间物的产生(如亚硝基等的衍生物)。其中,研究较多的有CB1954、RSU1069和RB6145,因为它们除了具有生物还原毒性外还有放射增敏的作用,所以被称为双功能的化合物。

2.1.2 CB1954 CB1954由英国的Chester Beatty研究所合成,在整体实验中能有效地抑制小鼠Walker256瘤生长,但它的作用仅在Walker256等一些敏感细胞株中存在。其作用位点是分子中的氮丙啶。CB1954可以使敏感细胞的DNA交联。80年代,Knox等^[2]发现了CB1954对Walker256细胞株的强效作用与细胞中活性DT-黄递酶有关。这种酶可以把4位的硝基还原成羟胺基,后者与硫代酸酯反应使DNA交联^[2]。而当非敏感细胞与活性酶或敏感细胞一起培养时,CB1954对它们也有杀伤作用,这说明了CB1954的还原毒性物具有可弥散性^[3]。由于这种“旁观效应(Bystand effect)”,CB1954现被试用于基因向导的酶前药治疗(Gene-directed enzyme prodrug therapy, GDEPT)。

2.1.3 RSU1069 80年代以后,通过对构效关系的研究发现硝基咪唑类化合物的毒性部位,并对MISO结构进行了改进,合成了大量的新化合物,RSU1069是2-硝基咪唑类化合物中最典型的一个。RSU1069对乏氧细胞的毒性远大于有氧细胞(4.3-50.0倍),这主要是由于在RSU1069分子中有两个活性点——1位的氮丙啶和2位的硝基,活化过程类似于CB1954。这两个活性点的被还原使

国家自然科学基金(30100042)资助

第一作者:陈晓晶,女,1978年9月出生,2000年6月毕业于上海医科大学药系,现为复旦大学放射医学研究所硕士研究生

收稿日期:初稿 2002-03-04,修回 2002-05-17

DNA 交联。尽管 RSU1069 的整体和离体实验结果都表明它是一个很有潜力的药物,但在临床期试验发现 RSU1069 有胃肠道毒性,所以 RB6145 作为它的前药被开发出来。在体内, RB6145 会失去 HBr 而形成 RSU1069, 再通过 RSU1069 达到放射增敏的效果, 试验表明, RB6145 结合 X 射线对乏氧细胞的毒性与 RSU1069 相近。但因为临床试验中发现了 RB6145 会引起不可克服的视网膜病变, 所以也没有能够作进一步的临床研究^[4]。

3 醌类

3.1 丝裂霉素 (Mitomycin, MMC)

MMC (1) 是一种天然产物, 是一个研究最多

和最成熟的生物还原剂。它的还原机理见图 1。从图 1 中可见, 11 是单功能活化和双功能活化竞争的关键点。在中性条件下, 11 可以通过自催化和 MMC 产生 12, 后者可以作为单功能烷化剂与 DNA 反应; 在酸性条件下, 1-氮丙啶开环, 形成 C-1 鎓离子 13, 由于 13 的电子离域作用使其可以有充足的时间与细胞的亲核性物质反应, 最终形成 G-N⁷ 加合物和 G-N² 双功能加合物, 导致细胞死亡。由以上可以看出 MMC 的 1 位和 10 位是活性位置。最近又有报道 MMC 在 7C 位或氮丙啶的 N 位形成二聚体, 对 DNA 的作用高于 MMC 单体^[5]。

临床上, MMC 通常是与其他化疗药和放疗一起治疗胸部、头部颈部和非小细胞肺癌。近来研究发现, 它与阿霉素合用可有效的治疗局部膀胱癌^[6]。

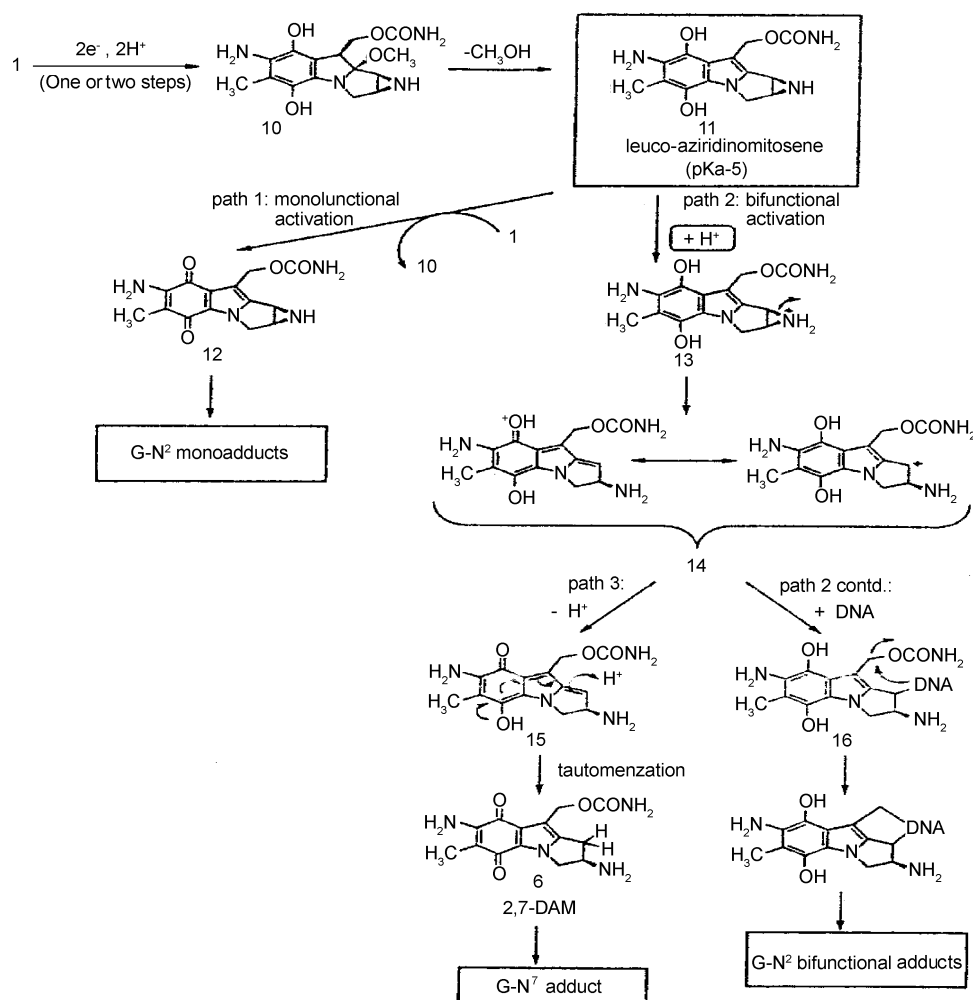


Fig.1 Pathways of metabolic activation of mitomycin C leading to covalent modification of DNA.

3.2 E09

吡啶酮 E09 是 MMC 同型物中有效的化合物。对多种人体肿瘤细胞进行离体研究结果表明，E09 对乏氧细胞有选择性毒性。照射 10Gy 后立即腹腔注射不同剂量的 MMC 或 E09 至荷 KHT 瘤小鼠内，结果两种情况下的细胞存活率比较接近，两者的放射增敏作用相似，而且 E09 在人体内对多种癌（如结直肠癌、非小细胞肺癌、胰腺癌等）有抑制作用。它的作用机理类似于 MMC。经过对 E09 的各种还原酶、抗癌作用及代谢物的研究发现：E09 在有氧状态主要是受高活性 DT-黄递酶的作用，使细胞发生 DNA 双链断裂或交联；而在乏氧且 DT-黄递酶浓度较低时，主要由还原型辅酶 II (NADPH) 激活形成自由基和具有损伤 DNA 的物质，最后使 DNA 单链断裂^[7]。经过 I 期临床研究，得出最大剂量为 15mg/m² 每周，在该剂量下，除了蛋白尿外没有其它毒性，建议 II 期临床研究采用 12mg/m² 每周的剂量。目前欧洲癌治疗研究协会 (EORTC) 正进行它的 II 期临床研究^[8]。

3.3 杂环氮氧化合物

在这类化合物中研究较多的是 SR4233，化学名：3-氨基-1, 2, 4-苯并三唑-1, 4-二氧化物。(3-amino-1, 2, 4-benzotriazine-1, 4-di-N-oxide Tirapazamine, TPZ)。它是由 Brown 和 Cownkers 合成的。体外实验表明，TPZ 对多种哺乳动物乏氧细胞具有很强的选择性毒性，其在正常和乏氧条件下产生相同毒性，所需浓度之比 (HCR) 为 50—300，而 MMC 仅为 1—5，硝基咪唑类化合物也只是 10—20。Siim 等^[9]采用体内培养体外分析技术，研究了 SR4233 对多种肿瘤组织的放射增敏效应。他们采用 8×2.5Gy (每日两次) 的方案照射荷瘤小鼠，照射前 30min 按 0.12mmol·kg⁻¹ 的剂量给药，结果显示 SR4233 在 SCCV 和 RIF-1 肿瘤中增敏比 (SER) 达 1.7，在人 A549 和 HT29 肿瘤中也表现出较高的增敏能力，SER 分别为 1.3 和 1.5。

其作用机理是：TPZ 在乏氧状态下会被多种还原酶还原形成一个高活性的自由基中间体，后者可以与 DNA 发生抽氢反应形成二电子代谢产物 SR4317(3-amino-1, 4-benzotriazine-1-N-oxide)，使 DNA 单链或双链断裂，导致细胞死亡。而在有氧状态下，TPZ 游离基会优先与氧反应生成超氧自由基，所以 TPZ 对乏氧细胞有很强的选择性^[10]。体外研究发现，乏氧时能够还原 TPZ 的酶包括：P450 还原

酶、DT-黄递酶和黄嘌呤氧化酶。近来对 TPZ 的作用、细胞中代谢物及各种还原酶的研究发现：只有在细胞核中的 TPZ 还原物能损伤 DNA。其中，DNA 单链的断裂是由于细胞核中大量的还原酶的存在，而双链的断裂是由于一种未知的依赖 NADPH 酶作用的结果^[11]。Katherine 等^[12]利用分子克隆的方法研究了 TPZ 对 HCT116 和 HeLa 细胞 DNA 复制的影响后发现：TPZ 对 DNA 复制的抑制作用大大强于电离辐射产生的抑制作用，这种抑制作用与 p21^{Waf1/Cip1}、RPA (Replication Protein A) 的损伤和 RPA 在细胞内重分配有关。目前，TPZ 作为放射增敏剂已经进入临床 I 期试验，同时合并化疗药物顺铂观察化疗增敏作用，初步观察表明 TPZ 能有效的治疗头颈部癌、非小细胞肺癌和宫颈癌^[13]。

4 其它

4.1 拓扑 II 异构酶的抑制剂 AQ4N

AQ4N 化学名为 1,4-二[[2-(二甲氨基-氮氧化物)乙基]氨基]-5,8-二氢蒽酚-9,10-二酮 (1,4-bis-[[2-(dimethylamino-N-oxide)ethyl]amino]-5,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione)，它是一种由细胞核分离得到的前药。AQ4N 的 DNA 结合能力和对 DNA 拓扑异构酶 II 的抑制作用都很弱，但它的还原物 AQ4{1,4-bis-[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]-5,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione} 对 DNA 具有很高的亲和力且能有效地抑制 DNA 拓扑异构酶 II。体外研究表明，AQ4N 对乏氧细胞有很高的选择性毒性。Friery 等^[14]对比了 AQ4N 和 TPZ 对环磷酰胺的抗癌作用后发现：AQ4N 能更有效的提高环磷酰胺的抗癌作用，且不像 TPZ 那样对骨髓细胞具有毒性作用，但有关它的还原酶仍不清楚。Patterson 等^[15]通过整体试验得出以下结论：200mg/kg 的 AQ4N 结合 25Gy 的照射对 RIF-1 肿瘤的延缓作用是单纯照射的 1.4 倍，类似的结果也存在于 SCCV、MAC16、MAC26、T50/80 等肿瘤模型中。AQ4N 还能有效的提高环磷酰胺、顺铂、三胺硫磷等化疗药的效果，100mg/kg 的 AQ4N 合并 100mg/kg 环磷酰胺的作用等同于 200mg/kg 环磷酰胺的作用，能够大大降低化疗药物的用量，并且基本上没有观察到毒性反应^[16]。目前 AQ4N 已进入 II 期临床研究。

4.2 DNA 靶向药物

如果药物具有 DNA 靶向作用则可提高它的放射增敏及乏氧细胞毒性作用。Skov^[17]在 80 年代末，

设计将 MISO 和铂形成螯合物,以提高它的 DNA 靶向作用。但实验结果表明,它在增强乏氧毒性的同时,降低了放射增敏的作用。之后, Wilson 等^[18]设计了一系列硝基吡啶类化合物(如 Nitracridine),它可以嵌入 DNA,增强药物的放射增敏及乏氧毒性作用,但它在体内会被快速的代谢。2-硝基咪唑吡啶(NLA-1)能有效提高分子毒性,但是增敏作用只有 2-硝基咪唑的一半。之后 Cowan 等^[19]又研究了 2-硝基咪唑菲啶类化合物(2-NLP-3),对实体瘤体内研究后发现它具有放射增敏作用但没有乏氧毒性。

在以上基础上, Papadopoulou 等^[20]研究了一系列含有 2-硝基咪唑的弱 DNA 结合物,其中以 NLCPQ-1、NLCQ-1、THNLA-1 最有发展潜力。NLCPQ-1 化学名为 9-(3-(2-硝基-1-咪唑)丙胺基)-环戊烷[b]喹啉盐酸盐(9-(3-(2-Nitro-1-imidazolyl)propylamino)-cyclopentano[b]quinolinehydrochloride), NLCQ-1 化学名为 4-[3-(2-硝基咪唑)丙胺基]-7-氯喹啉盐酸盐(4-[3-(2-nitroimidazolyl)propylamino]-7-chloroquinoline hydrochloride), THNLA-1 化学名为 9-(3-(2-硝基-1-咪唑)丙胺基)-1,2,3,4-四氢吡啶盐酸盐(9-[3-(2-Nitro-1-imidazolyl)propylamino]-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride) NLCPQ-1 在体内外乏氧条件下都能增强顺铂、左旋苯丙氨酸氮芥对肿瘤细胞的作用,它的增强随着 NLCPQ-1 和化疗药物浓度的变化而变化。而在有氧条件下没有这种增强作用,它可能作用的机理是:(1)多方面的 DNA 损伤作用;(2)抑制 DNA、RNA、蛋白质的合成;(3)阻碍潜在致死损伤修复;(4)延迟细胞 S 期的过程^[21]。之后研究的 NLCQ-1 和 THNLA-1 也具有类似的作用^[22, 23]。

4.3 生物还原剂的研究意义及前景

随着对肿瘤本质的研究,人们发现乏氧不仅是前列腺、头颈和宫颈癌的主要预测指标,还是更多恶性肿瘤的表现,影响着基因的稳定性、细胞的凋亡和血管生成与转移。因此,对乏氧细胞有特异毒性的生物还原剂对将来恶性肿瘤的治疗有很大的意义^[24]。

由于肿瘤独特而复杂的微环境,至今还没有一个生物还原剂在临床中得以应用,但已有许多生物还原剂(如 E09、TPZ 等)进入临床、期试验,相信不久的将来就会有成熟的适用于临床的生物还原新药。目前正继续从以下 3 方面研究:(1)以电子转移和氧化应激为要点设计合成新的化合物^[25];

从药物的还原中间物及同型物中,筛选有效的成分;(2) GDEPT,即寻找各药物对应的还原酶,然后将编码有活性酶的基因在肿瘤特异性启动子的控制下导入到肿瘤细胞中,借此提高药物的作用,降低药物的有效用量,相应降低它的毒副作用。可用于基因治疗的酶包括辣根过氧化酶(indole-3-acetic acid)、细菌硝基还原酶、P450 还原酶、DT-黄递酶^[1]。将来有关 GDEPT 的研究主要集中在以下几点:包含有乏氧效应元件(HRE)的启动子的寻找;新的前药/酶体系的发现;合适的转移媒介及载体(如脂质体、腺病毒、逆转录病毒)的构建^[26];(3)针对不同的疾病,将生物还原剂和不同的化疗药物合用,寻找最佳的临床用法。

参考文献

- 1 Mohammed J, Kaye J, Williams Ian J. Stratford Adv Drug Deli Rev, 2001, **53**(2): 217-228
- 2 Knox R J, Boland M P, Friedlos F *et al.* Biochem Pharmacol, 1988, **37**(24): 4671-4677
- 3 Bridgewater J A, Knox R J, Pitts J D *et al.* Human Gene Ther, 1997, **8**(6): 709-717
- 4 Parker R F, Vincent P W, Elliot W L. Vet Pathol, 1996, (33): 625
- 5 Cummings J, Spanswick V J, Tomasz M *et al.* Biochem Pharm, 1998, **56**(4): 405-414
- 6 Rita P, Andrea S, Avigdor L *et al.* Br J Clin Pharmacol, 2001, **52**(3): 273-278
- 7 Bailey S M, Lewis A D, Patterson L H *et al.* Biochem Pharmacol, 2001, **62**(4): 461-468
- 8 Aamdal S, Lund B, Koier I *et al.* Cancer Chemother Pharmacol, 2000, **45**(1): 85-88
- 9 Siim B G, Menke D R, Dorie M J *et al.* Cancer Res, 1997, **57**(14): 2922-2928
- 10 Denny W A, Wilson W R. Opin Investig Drugs, 2000, **9**(12): 2889-2901
- 11 Delahoussaye Y M, Evans J M, Brown J M *et al.* Biochem Pharmacol, 2001, **62**(19): 1201-1209
- 12 Ketherine B, Peters, Hongyan Wang *et al.* Cancer research, 2001, **61**(14): 5425-5431
- 13 Craighead P S, Pearcey R, Stuart G. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000, **48**(3): 791-795
- 14 Friery O P, R Gallagher, M M Murray *et al.* Br J Cancer, 2000, **82**(8): 1469-1473
- 15 Patterson L H, McKeown S R. Br J Cancer, 2000, **83** (12): 1589-1593

- 16 McKeown S R, Friery O P, Gallagher R *et al.* Br J Cancer, 2001, **85**(4): 625-629
- 17 Skov K A. Int J Radiat Biol, 1989, **56**(3): 387- 393
- 18 Denny W A, Roberts P B, Anderson R F *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1992, **22**(3): 553-556
- 19 Cowan D S M, Matejovic J F, McClelland R *et al.* Br J Cancer, 1994, **70**(6): 1067-1074
- 20 Papadopoulou M V, Ji M, Blommer W D. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998, **42**(4): 775-779
- 21 Papadopoulou M V, Ji M, Khan S H *et al.* Oncol Res, 1998, **10**(3): 163-173
- 22 Papadopoulou M V, Ji M, Khan S H *et al.* Oncol Res, 1999, **11**(8): 345-357
- 23 Papadopoulou M V, Ji M, Rao M K *et al.* Oncol Res, 2000, **12**(8): 325-333
- 24 Wouters B G, Wepler S A, Koritzinsky M *et al.* Eur J Cancer, 2002, **38**(2): 240-257
- 25 Wardman P. Curr Med Chem, 2001, **8**(7): 739-761
- 26 Marples B, Greco O, Joiner M C *et al.* Eur J Cancer, 2002, **38**(2): 231-239

A REVIEW ON THE STUDY OF BIOREDUCTIVE DRUGS

CHEN Xiaojing JIN Yizun

(Shanghai Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032)

ABSTRACT Hypoxia is a feature that exists in most solid tumors. Bio-reductive drugs are pro-drugs that can selectively target the hypoxia cells in tumors. In reductive environment, they are reductively metabolized to generate toxic species. There are 3 main classes of bio-reductive drugs: the nitro-aromatics, N-oxides and quinones. Recently, bio-reductive drugs were combined with GDEPT for the treatment of cancer, in addition to radiation and the chemotherapeutic agents. Bio-reductive drugs will play a significant role in future cancer therapy.

KEYWORDS Bio-reductive drugs, Hypoxia, Reductive enzymes, Gene-directed enzyme pro-drug therapy (GDEPT), Nitro-aromatics, N-oxides, Quinones

CLC R730.53, R730.55