

类泛素化修饰neddylaton与肿瘤发生和治疗

庄伟浩 黄梦园 倪鑫鑫 欧文斌*

(浙江理工大学, 浙江省家蚕生物反应器和生物医药重点实验室, 杭州 310018)

摘要 类泛素化修饰neddylaton是一种与泛素化类似的蛋白质翻译后修饰, 这一过程通过一系列级联反应将标签分子NEDD8结合到靶蛋白上, 从而影响被修饰蛋白质的结构功能。包括Cullin家族在内大多数的neddylaton修饰底物同时也是泛素连接酶E3的底物或其组成部分, 因而, neddylaton修饰过程与泛素化一样广泛参与到细胞的生长代谢等生命活动中并对基因的表达调控起着重要的作用。该文着重对neddylaton修饰过程与肿瘤相关信号通路和肿瘤微环境之间的联系以及靶向neddylaton途径进行癌症治疗的相关研究进行综述。

关键词 类泛素化; neddylaton; 肿瘤信号; 肿瘤微环境; 癌症治疗

The Ubiquitin-Like Modification of Neddylaton Associated With Tumorigenesis and Therapies

ZHUANG Weihao, HUANG Mengyuan, NI Xinxin, OU Wenbin*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Silkworm Bioreactor and Biomedicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract Ubiquitin-like modification neddylaton is a post-translational modification of proteins similar to ubiquitination. This process binds the tag molecule NEDD8 to the target protein through a series of cascade reactions, thereby affecting the structure and function of the modified protein. Most modified substrates by neddylaton, including the Cullin family members, are also substrates or components of ubiquitin ligase E3. Therefore, the neddylaton modification process is similar to ubiquitination, which plays a crucial role in the regulation of cell growth, metabolism, and gene expression. This review focuses on the relationship between the neddylaton modification process, and tumor signaling pathways, and the tumor microenvironment, as well as the related research progress by targeting neddylaton pathways in cancer therapies.

Keywords ubiquitination-like; neddylaton; tumor signaling; tumor microenvironment; cancer therapies

蛋白质泛素化修饰在蛋白质的定位、功能调节和降解等过程中起着非常重要的作用, 包括细胞的增殖分化、周期、凋亡和基因的表达调控及各类炎症反应在内几乎一切的生命活动都离不开蛋白质的泛素化修饰。随着研究的深入, 如SUMO(small ubiquitin-like modifier)、NEDD8(neural precursor

cell expressed, developmentally down-regulated 8)、FAT10(F-associated transcript 10)、ISG15(interferon-stimulated gene 15)、Atg8(autophagy gene 8)和Atg12(autophagy gene 12)^[1]等通过类似泛素化对底物蛋白进行修饰从而影响蛋白结构功能的类泛素蛋白及其介导的类泛素化修饰过程被逐一发现。本

收稿日期: 2020-04-01 接受日期: 2020-06-08

国家自然科学基金(批准号: 81728012)、浙江理工大学科技发展专项(批准号: 2020Y002)和2020国家级大学生创新创业训练计划项目资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86843303, E-mail: ouwenbin@tsinghua.org.cn

Received: April 1, 2020 Accepted: June 8, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81728012), the Fundamental Research Funds of Zhejiang Sci-Tech University (Grant No.2020Y002), and 2020 National Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship

*Corresponding author. Tel: +86-571-86843303, E-mail: ouwenbin@tsinghua.org.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5364>

文将对NEDD8及其介导的类泛素化修饰过程neddylolation对生命活动的调控及与其相关的癌症发生发展的基础研究和转化医学研究进行综述。

1 NEDD8介导的neddylolation修饰

神经前体表达发育性下调因子NEDD8最早是由KUMAR等^[2-3]报道并在小鼠胚胎脑组织中克隆得到的类泛素蛋白。NEDD8与泛素在蛋白序列上具有57.8%的一致性和78.9%的同源性^[4-5], 相较于其他类泛素蛋白, 如图1所示, 根据刘超等^[6]的报道, NEDD8与泛素蛋白在结构上最为接近。且同泛素一样, NEDD8在各组织器官中广泛表达, 并具有高度的种间保守性, 这表明, NEDD8在真核细胞的生长代谢过程中同样起到重要的作用。与泛素均匀分布于细胞核和细胞质不同的是, NEDD8主要在细胞核中高表达, 而在细胞质中的表达相对较低^[7]。

NEDD8由81个氨基酸组成, 可在多种同工酶[NEDP1(NEDD8 protease 1)、USP21(ubiquitin specific peptidase 21)、UCH-LC3(ubiquitin C-terminal hydrolase-LC3)]的水解作用下暴露出第76位甘氨酸残基并与底物的赖氨酸残基共价结合进而对底物进行类泛素化修饰^[5,8], 这一过程被称为neddylolation。Neddylolation的过程与泛素化修饰颇为相似, 同样需要激活酶E1、结合酶E2和连接酶E3共同参与来完成一系列级联反应。

激活酶NAE(NEDD8 activating enzyme)是由APPBP1(NAE1)与UBA3(ubiquitin-Like modifier activating enzyme 3)组成的异源二聚体, 通过其ATP依赖性的催化亚基在NEDD8分子C末端甘氨酸与UBA3的半胱氨酸活性位点上催化生成一个高能硫

脂键, 可将NEDD8分子活化^[9]。活化后的NEDD8将被转移结合至结合酶E2并最终由连接酶E3将NEDD8分子结合到底物靶蛋白上, NEDD8结合底物而释放的结合酶E2将重新结合下一个活化的NEDD8分子完成新一轮的neddylolation修饰过程^[10]。目前, NAE是目前已发现唯一能进行neddylolation修饰的激活酶E1, 但有研究表明, 组蛋白H2A的neddylolation并不依赖NAE而是依赖于UBA1。

Neddylolation特异的结合酶E2有UBE2M(ubiquitin-conjugating enzyme E2M)和UBE2F两种, 两者都只有在NAE结合两分子NEDD8时才能将NEDD8分子转移并与自身结合。最近, ZHOU^[11]等发现, UBE2M是一种应力诱导蛋白, 可促进UBE2F的泛素化和降解。

相较于E1和E2, neddylolation连接酶E3的数量众多, 且在将NEDD8定位到目标蛋白分子的过程中发挥着重要的作用, 现已发现的neddylolation E3有RBX1(ring-box 1)、RBX2、MDM2(murine double minute 2)、FBXO11(F-box protein 11)、c-CBL(c-casitas B-lineage lymphoma)、DCNL1-5(defective in cullin neddylolation 1-like protein 1-5)、IAPs(inhibitor of apoptosis proteins)、RNF111(ring finger protein 111)、TFB3(transcription initiation factor 3)和TRIM40(tripartite motif containing 40)等^[12]。

NEDD8的修饰会影响其靶蛋白的稳定性、亚细胞定位、构象和功能, 进而广泛影响多种生命活动的进程。研究表明, 在蛋白毒性应激的过程中, neddylolation修饰促进以核糖体蛋白为主的核蛋白聚集, 使得核泛素蛋白酶体系统免受压力引起的功能障碍, 确保蛋白质质量控制(protein quality control, PQC)网络通过分子伴侣进行蛋白质修复和重折叠,

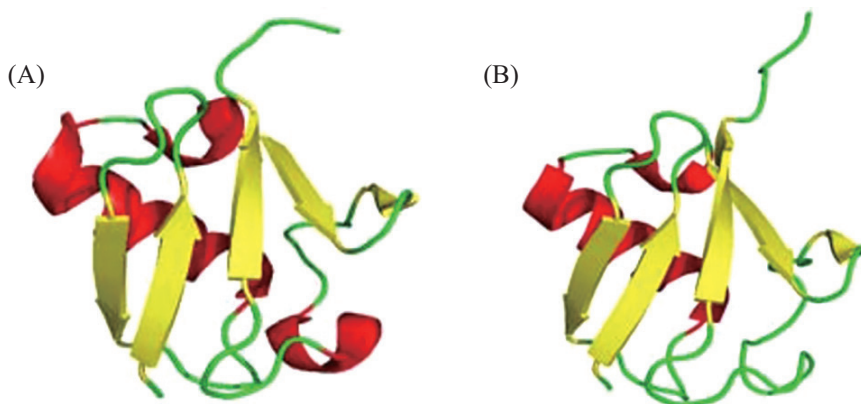


图1 NEDD8(A)与ubiquitin(B)蛋白结构示意图(根据参考文献[6]修改)

Fig.1 Protein structures of NEDD8 (A) and ubiquitin (B) (modified from reference [6])

或通过溶酶体和蛋白酶体降解消除容易聚集的错误折叠的蛋白质, 因而neddylaton的异常可能与人类神经退行性疾病的发生相关^[13-14]。在减数分裂过程中, 由于不存在从头mRNA转录(*de novo* mRNA transcription), 诸如neddylaton这样的翻译后修饰过程便显得更为重要。研究发现, 后期促进复合物/环体(anaphase-promoting complex/cyclosome, APC/CFzr1)的关键抑制子, 即早期有丝分裂抑制子1(early mitosis inhibitor 1, Emi1)是由neddylaton介导的蛋白质降解的底物, 对neddylaton修饰的抑制使卵母细胞在减数分裂期间, 因纺锤体装配检查点(spindle assembly checkpoint, SAC)过度激活导致纺锤体受损, 而被阻滞在减数分裂中期^[15]。

Neddylaton是一个可逆的动态修饰过程, 通过NEDD8解聚酶可以将NEDD8分子标签与底物分离, 这一过程被称为去neddylaton化, 即deneddylaton。

锌金属蛋白酶 COP信号小体(constitutive photomorphogenesis signalosome, CSN)由CSN1到CSN8共8个亚基组成, 当8个亚基完备时, CSN以CSN5亚基为主要催化亚基发挥其deneddylaton活性。SU等^[16]研究发现, 小鼠细胞内包括Cullin等多种被neddylaton修饰的蛋白质因CSN的失活而积聚, 表明CSN具有deneddylaton活性。前文提及的NEDD8特异性蛋白酶1(NEDP1、DEN1)除了参与NEDD8前体的加工, 也负责将NEDD8分子标签从其共轭复合物上解离下来。

参与deneddylaton过程的解聚酶除了NEDP1和CSN这样的NEDD8特异酶, 也包括USP21、UCH-L1和UCH-L3等参与泛素化修饰的去泛素化酶。

2 Neddylaton修饰的底物

Cullin家族成员是最早被鉴定也是最经典的neddylaton修饰底物。Cullin既是介导Cullin-Ring连接酶(Cullin-Ring ligases, CRLs)形成的支架蛋白, 也是NEDD8-E3复合体的核心组成亚基。CRLs作为泛素连接酶E3最大的家族, 控制着约20%的蛋白酶体调节蛋白的降解^[17-18], 涉及多种重要的生物学功能。研究表明, CRLs的激活需要NEDD8结合Cullin C末端的赖氨酸残基诱导其构象改变, 使得CRL负调控因子CAND1(cullin associated and neddylaton dissociated 1)分离以促进功能性CRL的组装和底物的泛素化^[19-20], 即neddylaton是调控Cullin-RBX1/2泛素

连接酶活性的重要机制之一^[21]。阻断NEDD8对Cullin蛋白的修饰活化, 将导致泛素连接酶复合体CRL募集的底物积聚, 影响如p27、p21、Wee和磷酸化的I κ B α 等底物的泛素化^[22]。UBE2M通过RBX1发挥功能来介导Cullin1-4的neddylaton修饰, 而UBE2F则与RBX2配对以控制Cullin5的neddylaton修饰^[23]。

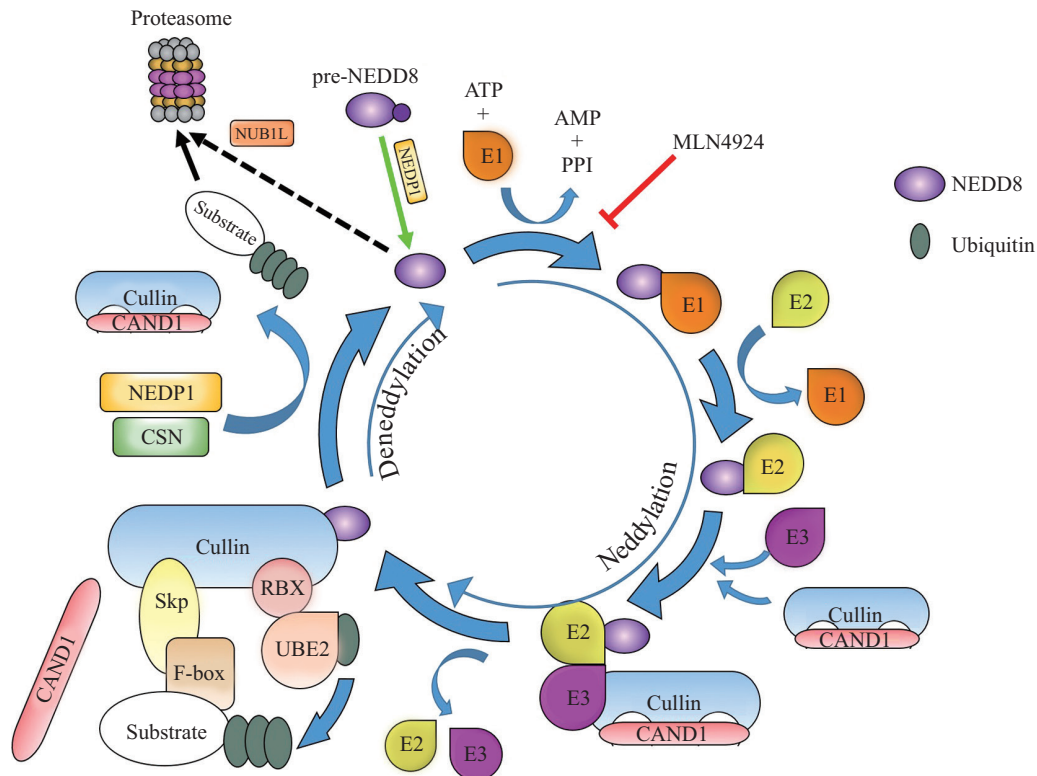
除了Cullin家族成员, 与泛素蛋白酶体途径相关可作为neddylaton修饰底物的蛋白质还有MDM2和Smad泛素化调节因子1(Smad ubiquitination regulator factor 1, Smurf1)。MDM2既是E3泛素连接酶之一, 也是neddylaton的E3连接酶, neddylaton的修饰增强了其稳定性进而促进p53蛋白的泛素化降解^[24]; Smurf1其多个赖氨酸位点受neddylaton修饰后增强了自身的泛素连接酶活性^[25]。此外, 还有如parkin^[26]和XIAP(X-linked inhibitor of apoptosis protein)^[27]等E3泛素连接酶, 虽然未直接受到NEDD8修饰, 但其表达与活性受到了neddylaton的调控。

不仅包括泛素蛋白酶体途径相关的分子, NEDD8还介导了E2F1^[28]等转录因子、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)^[29]和TGF β R(transforming growth factor beta receptor)^[30]等信号转导受体以及p53蛋白^[31-32]等许多生命活动中至关重要的蛋白分子的neddylaton修饰。

3 Neddylaton与泛素化修饰

尽管neddylaton所修饰蛋白质的种类远不如泛素化修饰之多, 然而这并不影响neddylaton发挥其广泛调节蛋白质互作及转录因子活性等生物学功能, 这主要依赖于neddylaton与泛素化之间复杂的相互关系。如图2所示, 在KANDALA等^[33]的研究工作基础上, 本文总结更新了NEDD8介导的CRLs组装与激活的最新进展和发现。

首先, 前文提到, NEDD8通过结合Cullin家族成员使得CAND1与Cullin解离从而促使CRL复合物的组装和激活。CRLs复合物以Cullin蛋白为核心支架, CAND1的解离使得接头蛋白Skp1和RING蛋白RBX得已结合至Cullin上, 随之与Skp1互作的底物识别蛋白F-box识别结合底物, RBX蛋白招募E2泛素结合酶并将泛素标签连接至底物上, 行使CRL复合物的E3连接酶功能。而在NEDP1和CSN等去neddylaton酶的作用下, NEDD8从CRL复合物上解离并由干扰素诱导蛋白NUB1(NEDD8 ulti-



绿线表示由NEDP1介导的NEDD8前体加工; 虚线表示NUB1L介导部分的NEDD8泛素化降解; 红色箭头表示MLN4924抑制NAE对NEDD8的活化。

The green line indicates the processing of NEDD8 precursor mediated by NEDP1; the dotted line indicates the ubiquitination and degradation of NEDD8 mediated by NUB1L; the red arrow indicates that MLN4924 inhibits the activation of NEDD8 by NAE.

图2 NEDD8介导的CRLs组装与激活示意图(根据参考文献[33]修改)

Fig.2 NEDD8-mediated assembly and activation of CRLs (modified from reference [33])

mate buster 1)介导其蛋白酶体降解,失去NEDD8修饰的CRL复合物则解聚且带泛素标签的底物由蛋白酶体识别并降解。这意味着neddylation与deneddylation至少是以CRLs复合体为E3连接酶的泛素蛋白酶体降解途径中不可或缺的一环,并且对NEDD8本身及其介导的neddylation修饰的调控同样会影响蛋白质的泛素化降解。

其次,许多非泛素蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system, UPS)的neddylation修饰底物如核糖体蛋白既能被泛素化修饰也能被neddylation修饰^[34],甚至p53^[31]和EGFR的泛素化修饰与neddylation修饰更是靶向同一赖氨酸位点。这些可被修饰的底物及E3泛素连接酶的存在提示, neddylation不仅可以通过CRLs促进其底物的泛素化修饰,也与泛素化修饰间存在相互竞争的拮抗作用。HJERPE等^[35]研究表明,过表达NEDD8将导致NEDD8的UBE1依赖性激活及泛素底物被广泛地neddylation修饰,无独有偶,LEIDECKER等^[36]研究表明,抑制26S蛋白酶体、

热休克和氧化应激同样会导致UBE1介导的neddylation修饰广泛提升,这两者印证了上述推论。然而有关同一底物在何种情况下受泛素化修饰或neddylation修饰即泛素化修饰与neddylation修饰之间相互竞争的具体机制还有待进一步研究。

最后, SINGH等^[37]的研究证明, NEDD8和泛素蛋白在细胞内和体外均可结合成异二聚体,延伸成链,并受到蛋白酶体和信号体的调控处理。LEIDECKER^[36]的研究也表明, NEDD8会在应激条件下由UBE1介导与泛素蛋白结合,参与泛素链的延伸。这表明, neddylation修饰与泛素化修饰之间还存在更为复杂的相互作用机制,其生物学功能和机制还有待进一步的研究。

4 Neddylation与癌症

与泛素化广泛参与各种生命活动过程相类似, neddylation修饰过程也在肿瘤细胞的增殖凋亡迁移等多个方面影响着细胞的生长。近年来的许多研究

表明, 在肺癌、胰腺癌和膀胱癌等癌症中均存在过度表达的NEDD8或neddylation途径相关的酶, 预示着NEDD8介导的neddylation修饰过程与肿瘤的发生和生长之间有着密切的联系。免疫组化结果表明, NEDD8在膀胱癌中高度表达并与患者的低存活率相关, 通过siRNA敲低NEDD8的表达会诱导膀胱癌细胞的凋亡, 抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭等一系列细胞表型活动^[38]。在来自发生肝转移患者的小肠神经内分泌肿瘤细胞中同样检测到NEDD8的高表达, 且相关性分析显示, NEDD8与CRLs的关键成分RBX1共表达, 对两者的沉默提升了p27的稳定性从而诱导细胞发生凋亡^[39]。

除了NEDD8, neddylation途径的其他分子也与癌症的发展相关。肺癌组织中UBC2M的mRNA水平要远高于正常肺组织, 并与NEDD8的表达水平和疾病恶化呈正相关, 体内外实验发现, 敲低UBC2M的表达均会减弱neddylation对底物的修饰作用并对肺癌细胞的恶性表型有所抑制^[40]。E3连接酶RBX2是neddylation途径组分之一, 研究发现, 在巨噬细胞中, 其过表达会触发促肿瘤细胞因子IL-1 β 、IL-6和TNF α 的上调, 并导致抗肿瘤细胞因子IL-12和抗炎细胞因子IL-10的下调, 而敲低RBX2则导致了促凋亡蛋白如BAX等的积累, 从而诱导细胞凋亡^[41]。

LIN等^[42]通过MLN4924在人食道鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)细胞中抑制neddylation途径致使细胞周期阻滞于G₂/M期, 并诱导了p21、p27和Wee1等肿瘤抑制因子的积累以及周期蛋白cyclin B的上调, 表明neddylation途径通过调控周期相关蛋白的稳定性影响细胞周期进程, 也即是neddylation途径的过度激活会推动细胞周期进程而促进肿瘤的发展。

4.1 Neddylation与肿瘤发生相关信号通路

显然, neddylation途径的异常与多种癌症发生之间的密切关系意味着该途径或可成为癌症靶向治疗的关键切入点。Neddylation途径过度激活引发的细胞癌变的内在机理及相关信号通路也成了近来研究人员的关注焦点。

在胶质母细胞瘤细胞系和患者来源的干细胞中敲低*Smurf1*或用NAE抑制剂MLN4924阻断neddylation途径会减弱AKT的磷酸化并弱化其细胞外信号传导功能。相较于正常人星形胶质细胞, 胶质母细胞瘤细胞系和患者来源的干细胞对MLN4924

高度敏感, 且ERK和AKT异常激活, 表明其在ERK和AKT激活的情况下受到neddylation抑制的高度调节。另外, neddylation途径似乎直接调节Shc以促进ZAP70-Shc-Grb2信号复合物的形成并影响下游ERK的活化^[43]。

趋化性细胞因子配体2(chemotactic cytokine ligand, CCL2)是吸引单核/巨噬细胞到炎症部位的关键趋化因子, 在肝癌和胰腺癌中均存在CCL2的过度表达。CCL2及其受体CCR2(CC chemokine receptor 2)介导了肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)与肿瘤间的相互作用。RNA测序分析表明, neddylation的失活抑制了CCL2的转录激活, 同时, 受neddylation途径失活的影响, TAMs的浸润也受到了显著的抑制, 进而抑制了肺癌细胞的转移, 并且, 研究发现, 这种受neddylation途径失活影响而降低的TAMs浸润效果可通过添加CCL2来缓解, 表明neddylation途径可经由CCL2/CCR2信号通路促进肺癌中CCL2的激活和TAMs的浸润, 引起肿瘤细胞的恶性转移。另外, 由于I κ B α 是CRLs的底物之一, neddylation途径的失活对CRLs的抑制也诱导了I κ B α 的积聚从而阻断了NF- κ B的转录激活, 使得NF- κ B信号通路受到抑制^[44]。

TP53基因是重要的抑癌基因, 其编码的p53蛋白作为转录因子参与细胞周期的调控。当受到DNA损伤和氧化损伤等应力刺激或者检测到癌基因激活时, p53水平和转录活性显著提高以启动抗增殖和促凋亡程序, 发挥其细胞修复和抑制癌细胞增殖的生物学功能。前文提到, MDM2的neddylation修饰可促进p53的泛素化降解, 类似地, BAILLY等^[45]提出, NAE抑制剂MLN4924可通过RPL11(ribosomal protein L11)/RPL5-MDM2途径激活p53。不仅如此, XIRODIMAS等^[31]研究表明, MDM2还可作为E3连接酶介导p53的neddylation修饰降低其转录活性。除了MDM2, F-box蛋白家族成员之一的FBXO11也可与p53互作, 促进其K320和K321位点的neddylation修饰从而抑制其功能的发挥^[32]。可见, neddylation途径对于p53的调控起着重要的作用, 靶向neddylation途径激活p53或许能成为新的癌症治疗策略。

受体酪氨酸激酶作为调控细胞增殖、维持细胞运动和黏附平衡以及调节细胞分化定位的关键因子, 其突变或过度激活是肿瘤发生和发展的关键诱因之一。同样地, 部分受体酪氨酸激酶也

受到了 neddylation 的修饰及调控。OVED 等^[29]在研究中指出, EGFR 的泛素连接酶 c-CBL 也可介导 EGFR 的 neddylation 修饰, 并促使 EGFR 泛素化降解, 随后 NAJOR 等^[46]研究指出, 桥粒体通过桥粒成分 Dsg1 (desmoglein1) 和桥粒斑蛋白 Dp (desmoplakinin) 与 deneddylation 酶 CSN 的 CSN3 亚基之间的缔合, 促使 EGFR 的 neddylation 进而下调其表达水平。此外, ZUO 等^[47]研究表明, c-CBL 还可介导 TGF β RII 的 neddylation 修饰, 并与其泛素化降解相互拮抗, 从而增强 TGF β RII 的稳定性, 促进 TGF β 的信号转导。

PTEN/PI3K/AKT 信号通路是调节细胞生长增殖、凋亡和代谢等多种生物活动信号转导的重要途径。肿瘤抑制子 PTEN 作为蛋白质和脂质双重磷酸酶, 通过靶向 PIP3 负调控 PI3K 信号通路。JONASON 等^[48]在其研究中指出, PTEN 负调控 cyclin D1 的表达, 而沉默 *CCND1* 的表达或者抑制 PI3K 信号通路会增强 Cullin1 与 CAND1 的结合, 阻碍 SCF (Skp2) 的组装, 并且两者都降低了 neddylation 修饰的 Cullin1 的活性, 表明 PTEN/PI3K 信号转导途径结合 cyclin D1 共同调节 Cullin 的 neddylation 修饰及其与 CAND1 的结合来调控 SCF (Skp2) 复合体的装配。

GUO 等^[49]发现, 通过 MLN4924 抑制 neddylation 途径可部分抑制 mTOR 信号通路, 反之以沙潘替尼抑制 mTOR 信号通路可部分抑制 neddylation 途径, 其内在机理尚未明确。有研究人员认为, MLN4924 抑制 Cullin1 的 neddylation 修饰, 而 mTORC1 和 mTORC2 的天然抑制剂 DEPTOR 作为 CRLs 的底物其泛素化降解受到抑制, 从而导致 mTOR 信号通路的失活^[50-53]。更多与 neddylation 有关的癌症相关信号通路还有待进一步的研究。

4.2 Neddylation 与肿瘤微环境

早在一百多年前, 英国医生 Stephen Page 便提出“种子与土壤”的假说, 他基于乳腺癌的器官特异性转移中的临床观察指出, 肿瘤周围的细胞和非细胞组份作为肿瘤细胞生长的“土壤”, 为“种子”即肿瘤细胞提供了发生和转移所依赖的微环境。肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 如同一个小的生态环境, 既受到全身或局部组织的代谢或免疫的调节以抑制肿瘤的发展, 又由肿瘤细胞自分泌或旁分泌的细胞因子或蛋白酶等的影响而发展变化成具有低氧、酸性、高液压及免疫炎症多发等特性的适宜肿瘤生长的环境。肿瘤微环境的异常是癌症发生和

治疗研究不可忽视的重要途径之一。

近来的多方面研究表明, neddylation 途径可通过调节肿瘤细胞的多种细胞应答 (例如凋亡和衰老) 或调节 TME 中基质细胞的功能 (例如血管生成和免疫应答) 来影响肿瘤进展。

癌症相关的成纤维细胞 (cancer-associated fibroblast, CAF) 是肿瘤微环境主要的基质成分, 通过释放生长因子、炎性细胞因子和趋化因子在调节肿瘤细胞的血管生成和转移中发挥重要作用。LISHA 等^[23]经 RNA 测序分析发现, 从肝癌组织中分离得到的 CAF 经 MLN4924 处理后有 406 个基因的水平发生显著的变化, 其中 165 个基因表达上调, 241 个基因表达降低, 且被显著下调的基因与细胞周期和 DNA 复制途径有关。另外有若干种炎性细胞因子表达水平明显因 MLN4924 的处理而降低, 例如 CCL2, 而 CCL2 可促进 CAF 介导的促肿瘤炎症, 说明 MLN4924 处理可以抑制 CAF 的增殖和活化。MLN4924 处理或 siRNA 介导的 *NEDD8* 或 *NAE1* 敲低抑制 CAF 的迁移也印证了 neddylation 途径对 CAF 活化的影响。

内皮细胞是 TME 的重要组成部分, 对血管生成和肿瘤转移的调节有重要作用。MLN4924 处理可显著抑制毛细血管样网络的形成以及人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 和小鼠内皮细胞的跨孔迁移和迁移距离, 并且 HUVEC 内 neddylation E3 连接酶 RBX2 的遗传缺失也导致了与 MLN4924 处理同样的抗血管生成效应^[54-55]。而在胰腺癌的原位模型中, MLN4924 的处理同样抑制了体内肿瘤血管的生成、进展和转移^[54-55]。研究表明, MLN4924 对内皮细胞的抑制作用归因于 CRLs 底物 RhoA 的积累, 从而抑制了细胞迁移和毛细血管的形成^[56]。

TME 涉及不同类型的浸润免疫细胞, 它们在肿瘤形成的所有阶段中都起着关键作用, 从起始、促进、发展到转移。研究表明, neddylation 修饰在巨噬细胞、T 细胞和树突状细胞等许多免疫细胞的功能调节方面起到重要作用。骨髓来源的抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cell, MDSC) 是骨髓来源的一群异质性细胞, 是树突状细胞、巨噬细胞和粒细胞的前体, 具有显著抑制免疫细胞应答的能力。肿瘤浸润的免疫细胞富含 MDSC, 这有助于产生免疫抑制微环境。在 MLN4924 处理或 *NEDD8* 敲除的肺癌肿瘤中发现 Gr-1⁺ CD11b⁺ MDSC 的比例显著降

低^[23], 亦表明neddylation途径在抑制免疫细胞应答上发挥着重要作用。

TAM是存在于肿瘤中的巨噬细胞, 是最丰富的癌症基质细胞。作为TME的关键成分, TAM通过诱导生长因子、血管生成调节剂和炎性介质来改变肿瘤微环境, 从而加速肿瘤进程和转移。研究发现, MLN4924的处理或siRNA的干扰敲除*RBX2*会通过抑制Cullin1介导的I κ B降解阻断NF- κ B的易位和转录激活从而抑制巨噬细胞中脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的促炎细胞因子(例如TNF- α 和IL-6)的产生, 并且抑制TAMs的浸润, 抑制肺癌细胞的转移^[44,57]。

总而言之, 肿瘤细胞中的neddylation途径的过度激活可能调节肿瘤来源的信号, 从而改善促肿瘤的微环境。

4.3 Neddylation抑制剂与癌症治疗的相关研究

目前, 对于neddylation途径的研究基本是通过siRNA干扰特定基因的表达或者利用小分子抑制剂MLN4924抑制neddylation途径激活酶NAE以达到失活整个neddylation途径的效果。MLN4924是由美国千禧制药开发的一种NEDD8激活酶NAE的小分子抑制剂。通过与NEDD8形成稳态共价结合物, 竞争性抑制NAE对NEDD8的激活从而阻断整个neddylation修饰途径, 从而在一定程度上抑制依赖于CRL的泛素化途径, 诱导其底物的积聚, 引发细胞周期阻滞、凋亡、衰老和自噬, 达到肿瘤的治疗效果。

目前, MLN4924在许多临床试验中展现出非凡的广谱抗肿瘤活力, 其单独用药或与其他化疗药物合用的多种抗肿瘤疗法已经进入临床治疗一期或二期的阶段^[58]。

组蛋白脱乙酰基酶1(histone deacetylase 1, HDAC1)在难治愈的急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者和具有耐药性的AML细胞中显著性地上调, 有研究表明, AML细胞内HDAC1蛋白表达水平受到由NEDD8介导的neddylation和泛素化的双重调节, 使用抑制剂MLN4924抑制neddylation途径促进HDAC1的降解, 有助于改善AML患者体内HL-60、K562和原代骨髓细胞(bone marrow cells, BMC)由于细胞内HDAC1的过表达而显著提升的对阿霉素的耐药性^[59]。索拉菲尼是一种多靶向性的肿瘤治疗药物, 多用于无法手术或远处转移的肝细胞癌的治疗, 研究表明, 在肝细胞癌中, MLN4924可以显著抑制细胞的生长, 降低克隆形成存活率, 增加细胞

凋亡并降低迁移能力, 并通过上调CRLs的底物p21、p27、Deptor和I κ B α 来增强索拉菲尼在肝癌细胞(hepatocellular carcinoma, HCC)中的抗肿瘤活性, 低浓度的MLN4924和索拉菲尼合用显著增强了索拉菲尼对细胞增殖迁移的抑制和诱导细胞凋亡的能力^[60]。类似地, 研究发现AKT抑制剂MK-2206的使用会使得乳腺癌细胞对MLN4924增敏, 两者的合用处理产生的细胞毒性和对迁移的抑制及诱导凋亡的能力明显要强于MLN4924单用药处理^[61]。

然而, MLN4924处理的选择压力可能导致NAE的亚基UBA3发生杂合突变, 并降低MLN4924的效价甚至使被抑制的neddylation途径恢复活性^[22]。针对产生耐药性的肿瘤细胞的治疗, 有研究人员通过在肝内胆管肿瘤的2个细胞株QBC939和HUCCT1中敲低NEDD8 E2结合酶*UBE2M*的表达, 达到了降低克隆形成存活率和细胞的活力, 并抑制体内肿瘤形成的效果^[62]。

除此之外, 各类新型的neddylation抑制剂也被陆续开发出来。研究人员发现, 1,2,4-三嗪类衍生物可通过疏水作用与NAE之间紧密结合, 使得UBC12与NEDD8之间的结合呈剂量依赖性减少而起到抑制NAE活性的效果^[63]。由1,2,4-三嗪类衍生物开发而成的复合物11可抑制胃癌MGC-803细胞的生长, 导致细胞周期阻滞在G₂/M期并通过内外凋亡途径诱导细胞凋亡, 其对胃癌MGC-803细胞具有最强的抗增殖能力, 半数致死浓度为8.22 μ mol/L, 有望作为新型的neddylation抑制剂。

降压药坎地沙坦酯(candesartan cilexetic, CDC)同样可以抑制肿瘤生长。CDC通过ATP竞争性抑制NAE, 可在体内和体外诱导人肺癌细胞A549的凋亡, 抑制肿瘤的生长, 其效果优于M22和mitoxantrone这两种代表性的非共价NAE抑制剂^[64]。

TAS4464是另一种高活性和选择性的新型NAE抑制剂, 相较于其他E1如UAE和SAE, TAS4464能更专一地抑制NAE^[65]。YOSHIMURA等^[65]通过酶学实验和细胞实验证明, TAS的抑制效果要强于已知的如MLN4924等其他NAE抑制剂; 细胞毒性分析表明, TAS4464具有强大的效力, 不仅对癌细胞系而且对患者衍生的肿瘤细胞均具有广泛的抗增殖活性。已有研究表明, TAS4464作为新型NAE抑制剂失活NF- κ B信号通路, 从而抑制多发性骨髓瘤的生长。而更多的实验则表明, TAS4464在包括血液肿瘤和

实体瘤在内的多种人类肿瘤异种移植小鼠模型的给药处理中表现出显著的抗肿瘤活性, 并且不会使小鼠有明显的体重减少^[66]。

5 总结与展望

Neddylaton修饰过程作为参与调节蛋白质泛素化的重要途径之一, 其在各种生命活动和代谢调控中发挥着关键的作用, 更由于其在多种肿瘤细胞中的过度激活及对肿瘤微环境调节起到的重要作用使之成为研究的热点。现有的最经典的neddylaton激活酶NAE的抑制剂MLN4924已经展现出了强效的抗肿瘤活力, 并被广泛地应用于各种抗肿瘤研究中, 更有以MLN4924作为靶向neddylaton途径的癌症治疗药物已经开展了一期、二期甚至三期临床研究, 可以说neddylaton途径及其抑制剂在癌症治疗的研究中具有相当大的潜在价值。但值得注意的是, neddylaton修饰过程对于癌症发展的内在机理还未研究透彻, 有研究人员发现, MLN4924对neddylaton修饰的抑制会显著减弱紫杉醇诱导的卵巢癌细胞的凋亡, 降低紫杉醇介导的抗增殖和抗迁移作用并中断其诱导的微管聚合, 提示neddylaton途径可能参与到紫杉醇介导的抗癌效应中^[67]。因此, 需要谨慎对待MLN4924等neddylaton抑制剂和其他抗癌药物合用的研究。另外, 由于neddylaton修饰过程本身也是正常的生理活动, 其抑制剂的使用无疑也会对正常细胞的生命活动造成影响, 若能够靶向癌细胞用药将会大大减轻治疗引起的副作用, 因而针对MLN4924等neddylaton抑制剂药物载体的开发将会使得该方向的癌症治疗方案更加安全高效。

参考文献 (References)

- [1] GLICKMAN M H, CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2): 373-428.
- [2] KUMAR S, TOMOOKA Y, NODA M. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 185(3): 1155-61.
- [3] KUMAR S, YOSHIDA Y, NODA M. Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 195(1): 393-9.
- [4] KAMITANI T, KITO K, FUKUDA-KAMITANI T, et al. Targeting of NEDD8 and its conjugates for proteasomal degradation by NUB1 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(49): 46655-60.
- [5] KAMITANI T, KITO K, NGUYEN H P, et al. Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(45): 28557-62.
- [6] 刘超. 泛素连接酶Smurf2类泛素化Neddylaton修饰的功能及机制[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2017.
- [7] 何珊, 张令强, 贺福初. 类泛素化修饰Neddylaton的功能和调控机制研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*(HE S, ZHANG L Q, HE F C. Research progress on the function and regulation mechanism of ubiquitin-like modification Neddylaton [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*), 2009, 36(9): 1089-94.
- [8] WADA H, KITO K, CASKEY L S, et al. Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3 [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 1998, 251(3): 688-92.
- [9] LEE I, SCHINDELIN H. Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes [J]. *Cell*, 2008, 134(2): 268-78.
- [10] HUANG D T, WALDEN H, DUDA D, et al. Ubiquitin-like protein activation [J]. *Oncogene*, 2004, 23(11): 1958-71.
- [11] ZHOU W, XU J, LI H, et al. Neddylaton E2 UBE2F promotes the survival of lung cancer cells by activating CRL5 to degrade NOXA via the K11 linkage [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(4): 1104-16.
- [12] ZHAO Y, MORGAN M A, SUN Y. Targeting Neddylaton pathways to inactivate Cullin-RING ligases for anticancer therapy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(17): 2383-400.
- [13] DIL KUAZI A, KITO K, ABE Y, et al. NEDD8 protein is involved in ubiquitinated inclusion bodies [J]. *J pathol*, 2003, 199(2): 259-66.
- [14] MORI F, NISHIE M, PIAO Y S, et al. Accumulation of NEDD8 in neuronal and glial inclusions of neurodegenerative disorders [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2005, 31(1): 53-61.
- [15] YANG M, JIN Y, FAN S, et al. Inhibition of neddylaton causes meiotic arrest in mouse oocyte [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(11): 1254-67.
- [16] SU H, LI J, MENON S, et al. Perturbation of Cullin neddylaton via conditional Csn8 ablation impairs the ubiquitin-proteasome system and causes cardiomyocyte necrosis and dilated cardiomyopathy in mice [J]. *Circ Res*, 2011, 108(1): 40-50.
- [17] DESHAIES R J, JOAZEIRO C A. RING domain E3 ubiquitin ligases [J]. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78: 399-434.
- [18] NAKAYAMA K I, NAKAYAMA K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(5): 369-81.
- [19] ZHENG J, YANG X, HARRELL J M, et al. CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(6): 1519-26.
- [20] MERLET J, BURGER J, GOMES J E, et al. Regulation of Cullin-RING E3 ubiquitin-ligases by neddylaton and dimerization [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(11/12): 1924-38.
- [21] ZHENG N, SCHULMAN B A, SONG L, et al. Structure of the Cul1-RBX1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex [J]. *Nature*, 2002, 416(6882): 703-9.
- [22] JIANG Y, CHENG W, LI L, et al. Effective targeting of the ubiquitin-like modifier NEDD8 for lung adenocarcinoma treatment [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2020, 36(4): 349-64.
- [23] ZHOU L, JIANG Y, LUO Q, et al. Neddylaton: a novel modulator of the tumor microenvironment [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 77.
- [24] WATSON I R, LI B K, ROCHE O, et al. Chemotherapy induces NEDP1-mediated destabilization of MDM2 [J]. *Oncogene*, 2010,

- 29(2): 297-304.
- [25] XIE P, ZHANG M, HE S, et al. The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurf1 ubiquitin ligase in tumorigenesis [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3733.
 - [26] UM J W, HAN K A, IM E, et al. Neddylation positively regulates the ubiquitin E3 ligase activity of parkin [J]. *J Neurosci Res*, 2012, 90(5): 1030-42.
 - [27] NAGANO T, HASHIMOTO T, NAKASHIMA A, et al. X-linked inhibitor of apoptosis protein mediates neddylation by itself but does not function as a NEDD8-E3 ligase for caspase-7 [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(11): 1612-6.
 - [28] AOKI I, HIGUCHI M, GOTOH Y. NEDDylation controls the target specificity of E2F1 and apoptosis induction [J]. *Oncogene*, 2013, 32(34): 3954-64.
 - [29] OVED S, MOSESSON Y, ZWANG Y, et al. Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(31): 21640-51.
 - [30] ZUO W, HUANG F, CHIANG Y J, et al. c-CBL-mediated neddylation antagonizes ubiquitination and degradation of the TGF-beta type II receptor [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(3): 499-510.
 - [31] XIRODIMAS D P, SAVILLE M K, BOURDON J C, et al. Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity [J]. *Cell*, 2004, 118(1): 83-97.
 - [32] ABIDA W M, NIKOLAEV A, ZHAO W, et al. FBXO11 promotes the Neddylation of p53 and inhibits its transcriptional activity [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(3): 1797-804.
 - [33] KANDALA S, KIM I M, SU H. Neddylation and deneddylation in cardiac biology [J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2014, 4(4): 140-58.
 - [34] XIRODIMAS D P, SUNDQVIST A, NAKAMURA A, et al. Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway [J]. *EMBO Rep*, 2008, 9(3): 280-6.
 - [35] HJERPE R, THOMAS Y, KURZ T. NEDD8 overexpression results in neddylation of ubiquitin substrates by the ubiquitin pathway [J]. *J Mol Biol*, 2012, 421(1): 27-9.
 - [36] LEIDECKER O, MATIC I, MAHATA B, et al. The ubiquitin E1 enzyme Ube1 mediates NEDD8 activation under diverse stress conditions [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(6): 1142-50.
 - [37] SINGH R K, ZERATH S, KLEIFELD O, et al. Recognition and cleavage of related to ubiquitin 1 (Rub1) and Rub1-ubiquitin chains by components of the ubiquitin-proteasome system [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(12): 1595-611.
 - [38] TIAN D W, WU Z L, JIANG L M, et al. Neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8 promotes tumor progression and predicts poor prognosis of patients with bladder cancer [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(1): 458-67.
 - [39] FOTOUHI O, KJELLIN H, JUHLIN C C, et al. Proteomics identifies neddylation as a potential therapy target in small intestinal neuroendocrine tumors [J]. *Oncogene*, 2019, 38(43): 6881-97.
 - [40] LI L, KANG J, ZHANG W, et al. Validation of NEDD8-conjugating enzyme UBC12 as a new therapeutic target in lung cancer [J]. *EBioMedicine*, 2019, 45: 81-91.
 - [41] CHANG S C, DING J L. Ubiquitination by SAG regulates macrophage survival/death and immune response during infection [J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(9): 1388-98.
 - [42] LIN S, SHANG Z, LI S, et al. Neddylation inhibitor MLN4924 induces G(2) cell cycle arrest, DNA damage and sensitizes esophageal squamous cell carcinoma cells to cisplatin [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2): 2583-9.
 - [43] HAN S, SHIN H, OH J W, et al. The protein neddylation inhibitor MLN4924 suppresses patient-derived glioblastoma cells via inhibition of ERK and AKT signaling [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(12): 1849.
 - [44] ZHOU L, JIANG Y, LIU X, et al. Promotion of tumor-associated macrophages infiltration by elevated neddylation pathway via NF- κ B-CCL2 signaling in lung cancer [J]. *Oncogene*, 2019, 38(29): 5792-804.
 - [45] BAILLY A, PERRIN A, BOU MALHAB L J, et al. The NEDD8 inhibitor MLN4924 increases the size of the nucleolus and activates p53 through the ribosomal-Mdm2 pathway [J]. *Oncogene*, 2016, 35(4): 415-26.
 - [46] NAJOR N A, FITZ G N, KOETSIER J L, et al. Epidermal growth factor receptor neddylation is regulated by a desmosomal-COP9 (constitutive photomorphogenesis 9) signalosome complex [J]. *Elife*, 2017, 6: e22599.
 - [47] ZUO W, HUANG F, CHIANG Y J, et al. c-CBL-mediated neddylation antagonizes ubiquitination and degradation of the TGF- β type II receptor [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(3): 499-510.
 - [48] JONASON J H, GAVRILOVA N, WU M, et al. Regulation of SCF(SKP2) ubiquitin E3 ligase assembly and p27(KIP1) proteolysis by the PTEN pathway and cyclin D1 [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(8): 951-61.
 - [49] GUO N, AZADNIV M, COPPAGE M, et al. Effects of neddylation and mTOR inhibition in acute myelogenous leukemia [J]. *Transl Oncol*, 2019, 12(4): 602-13.
 - [50] CHENG M, HU S, WANG Z, et al. Inhibition of neddylation regulates dendritic cell functions via Deptor accumulation driven mTOR inactivation [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24): 35643-54.
 - [51] ZHAO Y, SUN Y. Targeting the mTOR-DEPTOR pathway by CRL E3 ubiquitin ligases: therapeutic application [J]. *Neoplasia*, 2012, 14(5): 360-7.
 - [52] GAO D, INUZUKA H, TAN M K, et al. mTOR drives its own activation via SCF (β TrCP)-dependent degradation of the mTOR inhibitor DEPTOR [J]. *Mol Cell*, 2011, 44(2): 290-303.
 - [53] LV Y, LI B, HAN K, et al. The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 suppresses colon cancer cell growth via triggering autophagy [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2018, 22(6): 617-25.
 - [54] LI H, TAN M, JIA L, et al. Inactivation of SAG/RBX2 E3 ubiquitin ligase suppresses KrasG12D-driven lung tumorigenesis [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(2): 835-46.
 - [55] YAO W T, WU J F, YU G Y, et al. Suppression of tumor angiogenesis by targeting the protein neddylation pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(2): e1059.
 - [56] HILL C S, WYNNE J, TREISMAN R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF [J]. *Cell*, 1995, 81(7): 1159-70.
 - [57] LI L, LIU B, DONG T, et al. Neddylation pathway regulates the proliferation and survival of macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432(3): 494-8.
 - [58] MAO H, SUN Y. Neddylation-independent activities of MLN4924 [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1217: 363-72.
 - [59] LAI Q Y, HE Y Z, PENG X W, et al. Histone deacetylase 1 induced by neddylation inhibition contributes to drug resistance

- in acute myelogenous leukemia [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 86.
- [60] YANG Z, ZHANG J, LIN X, et al. Inhibition of neddylation modification by MLN4924 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(6): 3257-69.
- [61] CHEN X, CUI D, BI Y, et al. AKT inhibitor MK-2206 sensitizes breast cancer cells to MLN4924, a first-in-class NEDD8-activating enzyme (NAE) inhibitor [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(16): 2069-79.
- [62] ZHAO B, GAO C, SHI D, et al. Knockdown of Nedd8-conjugating enzyme UBE2M suppresses the proliferation and induces the apoptosis of intrahepatic cholangiocarcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(6): 2670-9.
- [63] SONG J, CUI X X, WU B W, et al. Discovery of 1,2,4-triazine-based derivatives as novel neddylation inhibitors and anticancer activity studies against gastric cancer MGC-803 cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30(2): 126791.
- [64] NI S, CHEN X, YU Q, et al. Discovery of candesartan cilexetic as a novel neddylation inhibitor for suppressing tumor growth [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 185: 111848.
- [65] YOSHIMURA C, MURAOKA H, OCHIIWA H, et al. TAS4464, a highly potent and selective inhibitor of NEDD8-activating enzyme, suppresses neddylation and shows antitumor activity in diverse cancer models [J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(7): 1205-16.
- [66] MURAOKA H, YOSHIMURA C, KAWABATA R, et al. Activity of TAS4464, a novel NEDD8 activating enzyme E1 inhibitor, against multiple myeloma via inactivation of nuclear factor κ B pathways [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(12): 3802-10.
- [67] HONG X, LI S, LI W, et al. Disruption of protein neddylation with MLN4924 attenuates paclitaxel-induced apoptosis and microtubule polymerization in ovarian cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(3): 986-90.