

微卫星不稳定性恶性肿瘤合成致死新靶点 WRN 的研究进展

陈琪¹, 文原梅^{2*} (1.中国生物技术发展中心, 北京 100039; 2.浙江大学智能创新药物研究院, 杭州 310000)

摘要: 微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)是一种肿瘤细胞中由错配修复受损或缺陷导致而出现新的微卫星等位基因的现象。MSI 可以导致肿瘤细胞基因组进一步紊乱和突变, 从而促进恶性肿瘤的发生发展, 是公认的重要致癌途径之一。Werner syndrome protein(WRN)解旋酶是属于 RecQ 家族的 DNA 解旋酶, 该酶在 DNA 修复和维持基因组稳定性中发挥着重要的作用。近年来研究发现, MSI 恶性肿瘤的生长高度依赖 WRN 解旋酶, 提示 WRN 是潜在的 MSI 恶性肿瘤合成致死新靶点。文章系统综述了 WRN 解旋酶的结构和生物学功能, 总结该蛋白作为合成致死新靶点的最新进展, 以及 WRN 解旋酶抑制剂的研究进展, 以期对 MSI 恶性肿瘤的治疗和 WRN 抑制剂研发提供参考。

关键词: WRN; 合成致死; 微卫星不稳定性恶性肿瘤; WRN 抑制剂

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)18-2600-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20231166

引用本文: 陈琪, 文原梅. 微卫星不稳定性恶性肿瘤合成致死新靶点 WRN 的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(18): 2600-2607.

Research Progress on the Synthetic Lethal New Target WRN in Microsatellite Instability Malignant Tumors

CHEN Qi¹, WEN Yuanmei^{2*} (1.China National Center for Biotechnology Development, Beijing 100039, China; 2.Innovation Institute for Artificial Intelligent in Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China)

ABSTRACT: Microsatellite instability(MSI) is a phenomenon in which new microsatellite alleles arise due to impaired or defective DNA mismatch repair in tumor cells. As one of the recognized important oncogenic pathways, MSI can lead to further disorder and mutation of tumor cell genome, thereby promoting the occurrence and development of malignant tumors. Werner syndrome protein (WRN) helicase, belonging to the RecQ family, plays an important role in DNA repair and maintenance of genome stability. Recent studies have discovered that the growth of malignancies with MSI is significantly reliant on WRN helicase, suggesting that targeting WRN could be a promising approach for developing therapies against MSI-associated cancers. Therefore, this review aims to conduct a systematic review of the structure and biological functions of WRN helicase, which is a new target for synthetic lethality. Additionally, latest progress on WRN helicase inhibitors are overviewed with the goal of providing a reference for the treatment of MSI malignant tumors and the development of WRN inhibitors.

KEYWORDS: WRN; synthetic lethal; microsatellite instability malignant tumors; WRN inhibitor

1 前言

1.1 合成致死

合成致死现象最早在 1922 年由遗传学家 Calvin Bridges 报道^[1], 其在黑腹果蝇中发现, 具有 *pd* 和 *Pdr* 双基因突变的果蝇不能存活, 而 *pd* 或 *Pdr* 基因单独突变都不会导致果蝇死亡。随后, Theodor Dobzhansky 在 1946 年正式提出了“合成致死”的概念^[2], 用来描述这种不同基因之间的互补性致死作用, 其含义是在细胞或生物体中, 某 2 个基因中的任何一个发生突变对细胞几乎没有影

响, 但 2 个基因同时发生突变会导致细胞死亡, 见图 1a。近年来, 随着对肿瘤生物学认识的不断深入, 如何基于合成致死理论发展肿瘤精准治疗策略, 研发仅会诱导肿瘤细胞死亡而不会对正常细胞产生作用的抗肿瘤药物, 已成为肿瘤研究领域的前沿热点之一。

目前, 在肿瘤细胞中已经发现了多个合成致死基因对, 例如 *MARCH5/WSB2*^[3]、*TIA1/TIAL1*^[4]、*BRCA/PARP*^[5]以及 *CDK4/CDK6*^[6]等。其中, 聚(ADP-核糖)聚合酶抑制剂(poly ADP-ribose

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGF22H310006)

作者简介: 陈琪, 男, 博士, 助理研究员 E-mail: chenqi@cncbd.org.cn *通信作者: 文原梅, 女, 硕士, 助理研究员 E-mail: wymres@126.com

polymerase inhibitors, PARPi)治疗 BRCA1/2 缺陷恶性肿瘤是最典型的基于合成致死理论的抗肿瘤策略^[7]。这一合成致死组合的原理是:正常细胞对 DNA 断裂的修复主要通过依赖聚(ADP-核糖)聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)的碱基切除修复(base-excision repair, BER)和依赖 BRCA1/2 蛋白进行高保真修复的同源重组修复(homologous recombination repair, HRR)。在正常的细胞中, PARPi 可将 PARP 固定在受损的 DNA 上,导致复制叉停滞,进而激活涉及 BRCA1/2 的 HRR 途径,以修复和重新激活复制叉^[8];而在 BRCA1/2 缺陷的恶性肿瘤细胞中,细胞复制叉被 PARPi 停滞,只能通过出错率更高的微同源末端连接进行修复。该过程可导致高水平的基因组不稳定性,从而使肿瘤细胞死亡^[9]。目前,已经获批应用于临床的 PARPi 有奥拉帕尼(Lynparza)、尼拉帕尼(Zejula)和鲁卡帕尼(Rubraca),其适应证包括对铂类化疗敏感的复发性 BRCA1/2 缺陷型卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌^[10]。多个 PARPi 的成功研发及其在临床实践中的巨大成功,证实了合成致死理论用于抗肿瘤

药物研发策略是可行的。

1.2 微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)

微卫星也称为短串联重复或简单序列重复,由 1~6 个核苷酸的重复序列组成,约占基因组的 3%。DNA 错配修复(mismatch repair, MMR)系统广泛存在于原核生物与真核生物中,是细胞进化中高度保守的 DNA 修复机制,可以识别和修复基因组复制过程中由 DNA 聚合酶以及外部物理或化学因素造成的碱基错配,保证基因组的完整性和稳定性。由于肿瘤细胞内 MMR 系统存在缺陷,基因组容易发生重复序列的插入或缺失突变,导致肿瘤细胞发生较为独特的 MSI 现象^[11],活跃 DNA 修复机制。MSI 结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是最早被发现的 MSI 恶性肿瘤。有 15% CRC 患者是 MSI CRC^[12],DNA MMR 系统中的关键基因 *MLH1* 或 *MSH2* 在大部分该类患者中发生突变,或者是发生 *MLH1* 启动子超甲基化。22%的胃癌患者也能检测到 MSI^[14],并且观察到 *MLH1* 启动子甲基化的现象。除此之外,子宫内膜癌(30%)^[15]、

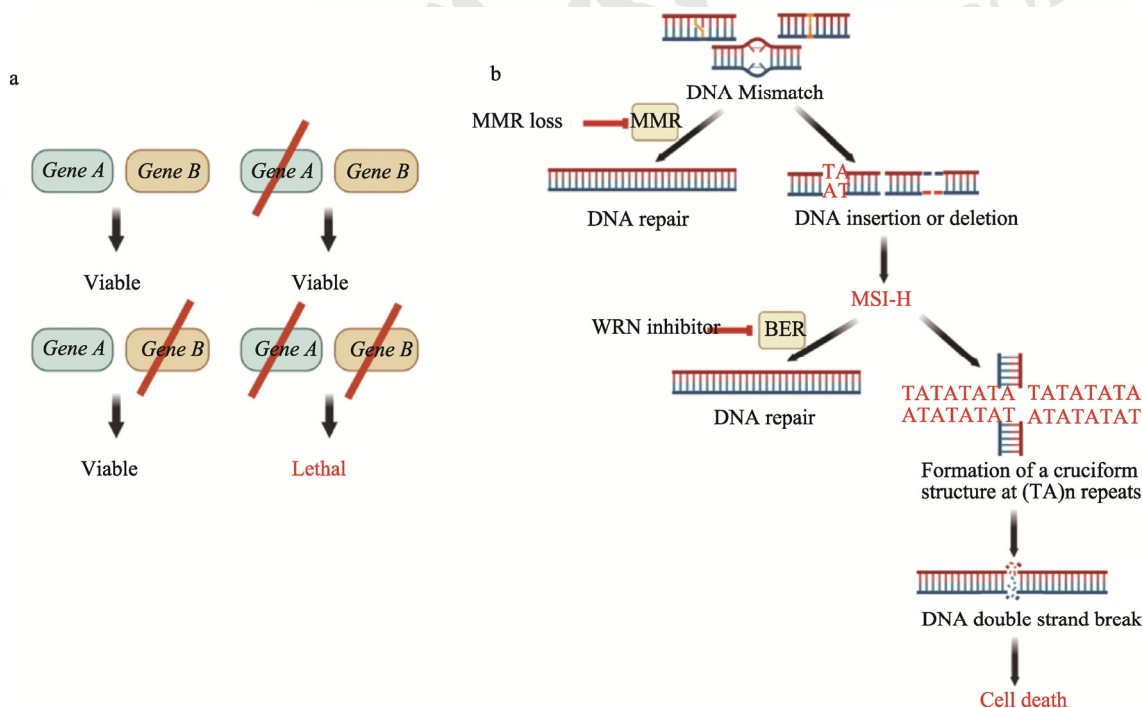


图 1 WRN 和高微卫星不稳定性合成致死的关系

a-合成致死示意图; b-WRN 和高微卫星不稳定性合成致死的关系。当 DNA 在复制过程中发生错配,正常细胞主要由 DNA 错配修复蛋白(MSH2 或 MLH1)进行 DNA 错配修复,而高微卫星不稳定性肿瘤细胞由于缺乏错配修复基因或错配修复系统存在缺陷,存在大量的(TA)_n 重复序列。当抑制 WRN 酶活性后,(TA)_n 重复序列处形成十字形结构,引发 DNA 双链断裂,进而发生细胞凋亡^[13]。

Fig. 1 Synthetic lethality between WRN and microsatellite instability-high(MSI-H)

a-Schematic representation of synthetic lethality; b-relationship between WRN and MSI-H synthetic lethality. During DNA replication, mismatch repair proteins(MSH2 or MLH1) mainly repair mismatches in normal cells, while MSI-H tumor cells have a large number of (TA)_n repeat sequences due to the lack of mismatch repair genes or defects in the mismatch repair system. When WRN enzyme activity is inhibited, cruciform structures are formed at (TA)_n repeat sequences, which trigger double-strand breaks and subsequently lead to cell apoptosis^[13].

卵巢癌(12%)^[16]和淋巴瘤/白血病^[17]等恶性肿瘤中都能检测到 MSI。

按照 MSI 出现的频率,可分为高微卫星不稳定性(MSI-high, MSI-H)、低微卫星不稳定性(MSI-low, MSI-L)和微卫星稳定性(microsatellite stable, MSS) 3 种类型。临床研究发现,与 MSI-L 患者和 MSS 患者相比,MSI-H 患者在手术治疗后表现出更好的抗肿瘤免疫反应、抑制肿瘤细胞生长的能力以及良好的预后。例如:对 472 例胃癌患者(包括 111 例 MSI-H 患者)的随访结果显示,MSI-H 胃癌患者 5 年生存率显著高于 MSS 患者(67.6%与 35.0%, $P<0.001$)^[18];在 1 250 例 CRC 患者(包括 138 例 MSI 表型患者)中,MSI 患者的淋巴结阳性率和转移率明显低于 MSS 患者(MSI: 24.8%, MSS: 46.2%, $P<0.001$),并且 I/II 期 MSI 患者的疾病特异性生存期更长^[19]。然而,MSI-H 患者虽然整体预后较好,但转移性 MSI-H 患者的预后效果并不理想,且大部分 MSI 恶性肿瘤患者存在对化疗药物耐药和对免疫治疗的反应率低等情况^[20]。目前尚未有针对 MSI-H 恶性肿瘤患者的靶向治疗药物。因此,对于 MSI-H 恶性肿瘤仍需开发有效的治疗药物和方案。可见,MSI 有潜力成为评估肿瘤恶性程度、疗效和预后的关键预测指标,为临床医师制定个性化治疗策略提供更多有价值的信息。

2 WRN

2.1 WRN 的蛋白结构域

DNA 解旋酶(DNA helicase)是一类在 DNA 或 RNA 复制过程中起到催化双链 DNA 或 RNA 解开的生物酶。该类酶参与了 DNA 复制、修复、转录、重组以及端粒的维持等细胞代谢过程,在维持染色体的稳定性中具有重要的作用。近年来,有研究发现,这些恶性肿瘤的生存依赖于 WRN 解旋酶的活性^[21-24]。WRN 位于染色体 8p12,由 34 个外显子组成。当其发生突变时,会引起染色体隐性遗传性疾病 Werner 综合征。WRN 是 DNA 解旋酶 RecQ 家族的成员之一,该家族蛋白还包括 RECQ1、BLM、RECQ4 和 RECQ5 等,与常染色体隐性遗传病布鲁姆综合征等遗传性疾病或早衰症都关系密切。该蛋白有 4 个结构域,分别是位于 N 末端区域的 3'→5'核酸外切酶结构域、ATPase 结构域、与 DNA 结合的 RQC(RecQ C 端)结构域和介导蛋白质相互作用的 HRDC(解旋酶和核糖核

酸酶 DC 端)结构域。其中,ATPase 结构域和 RQC 结构域是 WRN 发挥解旋酶功能的核心,见图 2a。另外,WRN 是其家族成员中唯一拥有核酸外切酶结构域的 RecQ 蛋白,具有核酸外切酶活性。WRN 解旋酶和核酸外切酶结构域既独立又相互协同,以分解多种 DNA 底物,例如双链 DNA、D 环、复制叉和气泡结构、G-四链体、Holliday 连接、DNA flaps 等^[25]。

2.2 WRN 的生物学功能

研究发现,WRN 参与很多生物学过程,包括 DNA 损伤修复、端粒维持、自噬、基因组维护等^[26],其中 WRN 在 DNA 损伤修复中的作用及其机制的研究最为深入。常见的 DNA 损伤有碱基受到氧化、脱氨基、甲基化等化学修饰而发生改变的碱基替换、错配、跨链连接和 DNA 断裂等。研究表明,WRN 与 pol δ 、pol β 、APE1、PARP1^[27] 等多个参与 BER 的蛋白在功能上具有相互作用。WRN 解旋酶活性能够刺激 pol β 介导的 DNA 链置换合成,WRN 核酸外切酶和解旋酶活性则可以与 pol β 协同作用处理 3'错配^[28],见图 2b。

在 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB)修复中,WRN 通过经典的非同源末端连接(canonic non-homologous end-joining, c-NHEJ)修复和 HRR 发挥作用。c-NHEJ 介导的 DSB 修复在细胞周期中占主导地位。KU70/80 异二聚体和 DNA-PK 形成稳定的复合物,并启动 DSB 修复;KU70/80 异二聚体的直接相互作用可刺激 WRN 的核酸外切酶活性,有助于处理 DSB 末端^[29]。当 KU70/80 缺陷时,DSB 修复从 c-NHEJ 切换为替代型 NHEJ (alternative NHEJ, alt-NHEJ),见图 2c。在 alt-NHEJ 修复中,DSB 末端被 PARP 和 MRE11 识别,随后 MRE11/RAD50/NBS1(MRN)复合物和 CtIP 通过切除处理断裂末端。值得注意的是,当 WRN 被招募到 DSB 时,它会抑制 MRE11 和 CtIP 的招募,并保护断裂的 DNA 免受 5'端切除,抑制 alt-NHEJ^[30]。HRR 由 MRN 复合物通过 MRE11 的核酸内切酶和 3'-5'核酸外切酶活性与 CtIP 启动^[31]。细胞周期蛋白依赖性激酶 1 可磷酸化 WRN 的丝氨酸 1 133 位点,调节 DSB 处的 MRE11 募集来切换 HRR 和 NHEJ^[32]。WRN 可与 DNA 复制解旋酶/核酸酶 2 发生相互作用,促进 RPA 依赖的 DNA 末端加工和切除^[32],见图 2d。另外,BRCA1 还直接与 WRN 相互作用并刺激 WRN 的解旋酶和核酸外切酶活

性, 促进 DNA 末端切除^[33]。

R 环(R-loop)是转录相关基因组不稳定性的主要来源。R 环会破坏 S 期的复制叉进程, 导致 DNA 复制叉的破坏、发生 DSB 或进入有丝分裂前的不完整复制。研究表明, WRN 在限制 R 环相关基因组不稳定性中发挥了重要作用^[34]。ATR 激酶是参与识别和稳定停滞复制叉的主要激酶, WRN 和 ATR 通路之间存在相互作用; 在复制压力下, ATR 依赖的 WRN 磷酸化, 充当 CHK1 激活的介质^[35], 促进复制的恢复和防止在停滞的分叉处形成 DSB, 见图 2e。同时, WRN 解旋酶活性对于保护 DNA 脆弱位点免于断裂至关重要。

2.3 WRN 是 MSI 恶性肿瘤的合成致死新靶点

研究表明, DNA MMR 缺陷的 MSI 肿瘤细胞在敲除 WRN 基因或耗尽 WRN 蛋白后, 会发生合成致死效应, 导致细胞死亡^[21-24,36]。Lieb 等^[24]用 RNA 干扰技术对多种 MSI-H 细胞和 MSS 细胞同

时进行 WRN 的基因沉默并检测细胞凋亡。结果显示, MSI-H 细胞在 WRN 沉默后, 细胞发生明显的凋亡, 而 MSS 细胞未观察到细胞凋亡现象。当用 CRISPR-Cas9 敲除 HCT-116 细胞的 WRN 基因后, 细胞也发生了凋亡。Behan 等^[21]和 Kategaya 等^[23]利用 RNA 干扰技术和 CRISPR-Cas9 技术, 对一系列 MSI 细胞进行 WRN 沉默和敲除实验, 也得到了类似的结果, 提示 WRN 是 MSI 恶性肿瘤的一个潜在合成致死靶点。更重要的是, MMR 缺陷的合成致死相互作用与其他 RECQL 解旋酶无关, 仅与 WRN 解旋酶活性相关。当 WRN 解旋酶活性丧失时, MSI 的合成致死作用才被激活^[21,24]。

在 MSI-H 细胞中, DNA 损伤修复功能高度活跃, 几乎不存在内源性 DSB; 当沉默 WRN 后, 细胞内特定基因组位点出现大量 DSB, 进而导致细胞周期停滞、基因组不稳定和细胞凋亡^[21-24,36]。以上说明, MSI 细胞可选择性地依赖 WRN 解旋酶

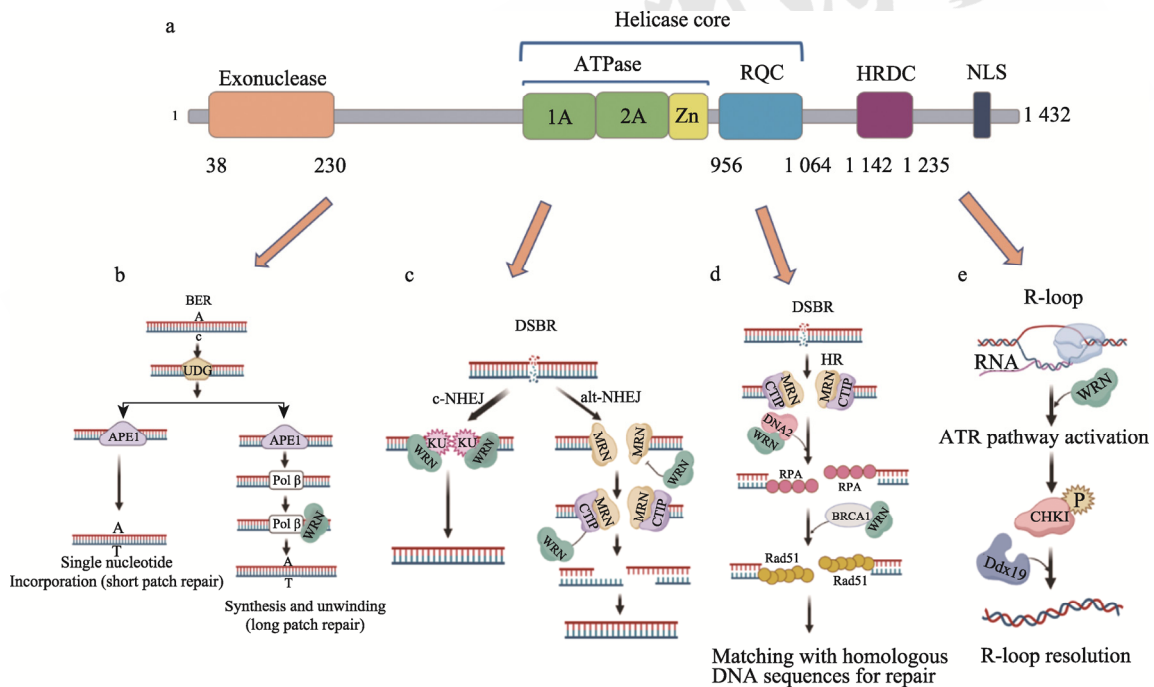


图 2 WRN 的蛋白结构域与生物学功能

a-WRN 解旋酶的蛋白结构域; b-WRN 解旋酶在碱基切除修复长补丁修复途径中的调节作用, WRN 识别 pol β -DNA 复合物并刺激 pol β -DNA 链置换合成; c-WRN 解旋酶在双链断裂修复途径-NHEJ 修复中的作用, c-NHEJ 是主要的双链断裂修复通路, 用粗箭头表示, WRN 通过抑制 MRE11 和 CtIP 的募集来促进 c-NHEJ 并抑制 alt-NHEJ; d-WRN 解旋酶在双链断裂修复途径-HRR 中的作用, WRN 与 DNA2、BRCA1 发生相互作用, 促进 DNA 末端加工和切除; e-WRN 解旋酶在限制 R 环相关基因组不稳定性中的作用, ATR 依赖的 WRN 磷酸化, 可充当 CHK1 激活的介质, 确保 R 环及时解决, 从而确保基因组稳定性。

Fig. 2 Protein domains and biological functions of WRN

a-Protein domains of WRN helicase; b-regulation effect of WRN helicase in the base excision repair(BER) long patch repair pathway, WRN recognizes the pol β -DNA complex and stimulates pol β -DNA strand displacement synthesis; c-role of WRN helicase in double-strand break(DSB) repair pathway-non-homologous end joining(NHEJ); c-NHEJ is the main DSB repair pathway, indicated by the thick arrow, WRN promotes c-NHEJ and inhibits alt-NHEJ by suppressing the recruitment of MRE11 and CtIP; d-role of WRN helicase in DSB repair pathway-homologous recombination repair(HRR), WRN interacts with DNA2 and BRCA1, promoting DNA end processing and cleavage; e-role of WRN helicase in restricting R-loop-mediated genomic instability, ATR-dependent phosphorylation of WRN can act as a mediator for CHK1 activation to ensure timely resolution of R-loops, thereby ensuring genomic stability.

功能进行 DNA 损伤修复。Van Wietmarschen 等^[36]利用 END-seq(electronic nano-device sequencing)技术发现,与 WRN 缺失相关的 DSB 几乎都发生在 (TA)_n 重复序列处,并且这种现象在不同的 MSI 细胞系中高度保守。研究表明,(TA)_n 重复序列长度超过大约 20~22 个重复单元时可形成十字形结构,导致复制叉停滞和 DNA 脆弱位点在晚期复制时断裂^[37]。而 WRN 的重要生物学功能是作用于多种非 B 型 DNA 结构,例如复制叉、D 环、T 环、G-四链体等^[25]。当折叠成十字形 DNA 结构的 (TA)_n 重复序列导致复制叉停滞,ATR 激酶被激活,并募集 WRN 到这些位点发挥解旋酶功能^[36]。因此,耗尽 MSI 细胞中的 WRN 后,在有丝分裂前,没有解决 (TA)_n 形成的十字形结构导致复制叉停滞时,产生的中间体将被 SLX4-MUS81 核酸内切酶复合物切割发生 DSB,导致基因组 DNA 断裂,引起细胞死亡^[13]。Mengoli 等^[38]近期的研究也证实,WRN 可以解开这种十字形 DNA 结构,该过程由 WRN 解旋酶核心区段和 RQC 结构域完成。而 MSS 细胞中 (TA)_n 重复序列的累积比 MSI 细胞的丰度低很多。因此沉默 WRN 后, MSS 细胞并不会发生明显的细胞凋亡。以上

结果揭示了 MSI-H 恶性肿瘤细胞维持基因组稳定性的 WRN 依赖性分子机制,并表明 WRN 可能是 MSI-H 恶性肿瘤精准治疗的有效靶点之一,见图 1b。

3 WRN 抑制剂研究进展

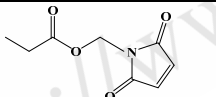
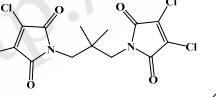
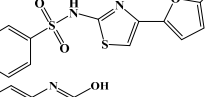
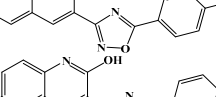
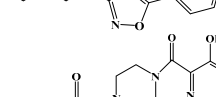
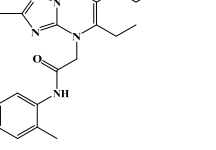
随着 WRN 可能是 MSI 恶性肿瘤的合成致死新靶点的发现,基于靶向 MSI 恶性肿瘤的 WRN 抑制剂的研究也引起了科研人员和药物研发人员的兴趣。目前,已经有多项 WRN 抑制剂被报道,相关信息总结见表 1。

3.1 NSC 19630

Aggarwal 等^[39]利用放射化学测定法对美国国家癌症研究所的化合物库进行高通量筛选,发现了 WRN 解旋酶活性抑制剂——NSC 19630[1-(propoxymethyl)-maleimide]。该化合物体外抑制 WRN 解旋酶活性的 IC₅₀ 为 20 μmol·L⁻¹; 3 μmol·L⁻¹ 的 NSC 19630 给药 2 d 可发生依赖于 WRN 的增殖抑制,抑制 95% 的 HeLa 细胞和 80% 的 U2OS 细胞增殖。NSC 19630 可抑制细胞内 WRN 活性,从而导致 DSB 的积累、DNA 合成抑制(细胞复制停滞在 S 期),最后发生细胞凋亡^[39]。同时, NSC 19630 会增加肿瘤细胞对 G-四链体结合化合物

表 1 已报道的 WRN 解旋酶抑制剂

Tab. 1 Reported inhibitors of WRN helicase

化合物名称	结构式	解旋酶活性 (IC ₅₀)/μmol·L ⁻¹	抗肿瘤活性	
			细胞实验(抑制率/GI ₅₀)	动物实验
NSC 19630 ^[39]		20	HeLa: 95%(3 μmol·L ⁻¹) U2OS: 80%(3 μmol·L ⁻¹)	-
NSC617145 ^[40]		0.23	HeLa: 98%(1.5 μmol·L ⁻¹) U2OS: 80%(1.5 μmol·L ⁻¹)	-
NCGC00357377-01 ^[41]		5	HeLa: n.d.(50 μmol·L ⁻¹) U2OS: n.d.(50 μmol·L ⁻¹)	-
NCGC00029283 ^[41]		2.3	HeLa: n.d.(50 μmol·L ⁻¹) U2OS: n.d.(50 μmol·L ⁻¹)	-
NCGC00063279 ^[41]		13	HeLa: n.d.(50 μmol·L ⁻¹) U2-OS: 40%(100 μmol·L ⁻¹)	-
三唑并嘧啶类似物-58 号化合物 ^[42]		0.06	SW48: GI ₅₀ =0.07 μmol·L ⁻¹ ; DLD1-WRN-KO: GI ₅₀ > 10 μmol·L ⁻¹	给药 18 d 后,小鼠肿瘤体 积缩小了 126%

Telomestatin 和 PARP 抑制剂的敏感性^[39]。Bou-Hanna 等^[43]研究发现, NSC19630 以 caspase-9 依赖型细胞凋亡途径而非 p53 依赖型细胞凋亡途径, 在正常人上皮细胞和原代间充质细胞中诱导细胞凋亡, 造成急性细胞毒性。

3.2 NSC617145

2013 年, Aggarwal 等^[44]基于 NSC 19630 结构改造得到了 1 个新型 WRN 解旋酶抑制剂——NSC 617145, 其体外抑制 WRN 解旋酶活性的 IC₅₀ 为 230 nmol·L⁻¹; 1.5 μmol·L⁻¹ 的 NSC 617145 给药 2 d 会发生依赖于 WRN 的增殖抑制, 抑制 98% 的 HeLa 细胞和 80% 的 U2OS 细胞增殖^[40]。此外, NSC 617145 与极低剂量的丝裂霉素 C 共同作用, 可在范可尼贫血通路缺陷的细胞中诱导 DSB 和染色体异常, 并通过干扰 HRR 的链间交联诱导产生双链 DNA 断裂^[40]。

3.3 NCGC00357377-01

Sommers 等^[41]用荧光检测法对 350 000 个小分子抑制 WRN 解旋酶结构域(aa500-946)酶活能力进行高通量筛选, 得到了 3 个对 WRN 解旋酶活性有抑制作用的化合物 NCGC00029283、NCGC00063279、NCGC00357377-01, 体外抑制酶活的 IC₅₀ 分别为 2.3, 13.0, 5.0 μmol·L⁻¹。Sommers 等^[41]同时也检测了 3 个化合物对其他解旋酶的抑制活性, 结果发现 3 个化合物对 BLM 和 FANCDJ 的抑制活性 IC₅₀ 分别为 12.5, 3.4, 46.1, 13.9, 13.0, 28.5 μmol·L⁻¹, 提示 3 个化合物均不是 WRN 特异性抑制剂。而在细胞实验上, NCGC00357377-01 对 HeLa 细胞和 U2OS 细胞都无增殖抑制效果, 其他 2 个化合物对 U2OS 细胞仅有 40%~50% 的增殖抑制效果, 其潜在的原因可能是细胞中缺乏诱导细胞凋亡的 p53 蛋白。

3.4 三唑并嘧啶类似物

众所周知, WRN 发挥解旋酶功能依赖 ATP 供能, ATP 水解生成 ADP。利用这一原理, 采用 ADP 检测手段, 即可对 WRN 解旋酶活性进行检测。近期, 诺华公司公开了一系列新的 WRN 解旋酶抑制剂——7-oxo-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-4(7H)-yl) 及其类似物和衍生物^[42]。利用 ADP 检测手段, 对这一系列化合物体外抑制 WRN 解旋酶活性进行检测, 酶活抑制 IC₅₀ 大多在 20~100 nmol·L⁻¹。用 SW48 和敲除 WRN 的结肠癌细胞系 DLD1-WRN-KO 对化合物进行细胞增殖抑制检测显示, 大部分化合物

对 SW48 增殖抑制的 GI₅₀ 值在 30~500 nmol·L⁻¹, 而对 DLD1-WRN-KO 增殖抑制的 GI₅₀ 均>10 μmol·L⁻¹。专利中的部分化合物还进行了动物实验。采用皮下注射的方式, 将 500 万个 SW48 细胞种植到雌性无胸腺裸鼠 [CrI: NU(NCr)-Foxn1nu] 中(n=7)。当肿瘤体积达到 186 mm³ 左右, 将 240 mg·kg⁻¹ 的 58 号化合物混合在饲料中, 通过口服的方式每天进行 1 次给药。在给药 18 d 后, 有 4 只小鼠肿瘤体积缩小了近 126%; 57 号化合物以 120 mg·kg⁻¹ 的量进行给药, 在 23 d 后肿瘤体积缩小了近 180%; 以 120 mg·kg⁻¹ 给药 42 号化合物 30 d 后, 肿瘤体积缩小了约 190%, 一直持续给药到 60 d 以后, 肿瘤体积开始变大, 说明该化合物容易产生耐药性; 而 96 号化合物在给药 22 d 后, 肿瘤体积基本没有变化。

4 结论与展望

恶性肿瘤一直都是威胁人类生命健康最重要的疾病。WRN 在 DNA 修复途径上是一个很重要的蛋白, 许多 MMR 系统存在缺陷的 MSI-H 恶性肿瘤细胞生存都是依赖于 WRN 活性。因此, WRN 是 MSI 恶性肿瘤合成致死的重要靶点。研究发现, 纯合 Wrn-null 小鼠并不会出现 Werner 综合征的早衰现象, 而对照组 Terc-null 小鼠则会出现早衰表型^[45]。这表明抑制 WRN 解旋酶功能不会诱导 Werner 综合征相关表型。2014 年第一个依据合成致死获批用于临床治疗卵巢癌的肿瘤药物——PARP 抑制剂的问世, 表明 WRN 抑制剂有望成为治疗 MSI-H 恶性肿瘤细胞的潜在药物。需要指出的是, 虽然有研究发现 MSI-H 对 PD-1 等免疫检查点抑制剂展现出更好的反应性和临床疗效, 但对 T 细胞浸润不足或并非通过 PD-1 信号轴来实现 T 细胞耗竭的肿瘤而言, 其疗效可能显著降低^[46]。鉴于 WRN 抑制剂直接作用于肿瘤细胞, 造成合成致死效应, 该作用可与 PD-1 免疫治疗方法联合, 起到更强的临床治疗效果。

目前研究发现的 WRN 解旋酶抑制剂并不多, 并且这些抑制剂对其他解旋酶活性抑制尚未检测, 无法确定它们是否都是 WRN 解旋酶的特异性抑制剂。从体外的 IC₅₀ 数据来分析, 除了诺华公司专利中三唑并嘧啶类似物具有潜在的开发前景, 其他早期报道的化合物进一步开发的可能性较低。此外, 同一家族的 DNA 解旋酶在细胞衰老、基因组损伤修复中都扮演着重要的作用。如果现

有的 WRN 抑制剂无法实现对 WRN 的选择性抑制作用, 则将面临潜在的严重不良反应。

从药物研发的角度分析, 小分子化合物作用于 WRN 的模式也同样重要。鉴于 ATP 酶结构域的保守性, 开发 WRN 的变构抑制剂不失为一种潜在的化合物发现策略。此外, 蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC) 作为一种靶向蛋白降解的新型治疗方式, 是由三部分组成的异双功能分子, 包括与靶蛋白结合和与 E3 泛素连接酶结合的 2 个配体以及连接这 2 个配体的接头^[47]。PROTAC 利用 E3 泛素连接酶的活性对目标蛋白泛素化, 随后泛素化的目标蛋白被 26S 蛋白酶体降解, 以此介导特定目标蛋白的降解^[48]。从 2001 年第一个 PROTAC [靶向甲硫氨酸氨基肽酶-2(MetAP-2)蛋白] 出现至今, 已有很多 PROTAC 被开发, 例如靶向激酶、核受体、表观遗传蛋白以及 RNA 等^[49]。这些 PROTAC 在治疗恶性肿瘤、神经退行性疾病和病毒性疾病等难题上提供了新思路。因此, 在发现有效的 WRN 解旋酶特异性抑制剂基础上, 进一步利用 PROTAC 技术设计合成 WRN 降解剂, 有望进一步提升化合物对 WRN 蛋白的特异性, 也有可能进一步提高化合物活性, 为今后药物研发提供一种思路。

REFERENCES

- [1] BRIDGES C B. The origin of variations in sexual and sex-limited characters[J]. *Am Nat*, 1922, 56(642): 51-63.
- [2] DOBZHANSKY T. Genetics of natural populations; recombination and variability in populations of *Drosophila pseudoobscura*[J]. *Genetics*, 1946(31): 269-290.
- [3] DEWEIRD T P C, SANSON K R, SANGREE A K, et al. Optimization of AsCas12a for combinatorial genetic screens in human cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 94-104.
- [4] DEDE M, MCLAUGHLIN M, KIM E, et al. Multiplex enCas12a screens detect functional buffering among paralogs otherwise masked in monogenic Cas9 knockout screens[J]. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 262.
- [5] RYAN C J, MEHTA I, KEBABCI N, et al. Targeting synthetic lethal paralogs in cancer[J]. *Trends Cancer*, 2023, 9(5): 397-409.
- [6] PARRISH P C R, THOMAS J D, GABEL A M, et al. Discovery of synthetic lethal and tumor suppressor paralog pairs in the human genome[J]. *Cell Rep*, 2021, 36(9): 109597.
- [7] WU D, HUO X L, ZHU H J, et al. Research progress of selective PARP-1 inhibitors[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2022, 39(20): 2697-2706.
- [8] CORTESE L, RUGO H S, JACKISCH C. An overview of PARP inhibitors for the treatment of breast cancer[J]. *Target Oncol*, 2021, 16(3): 255-282.
- [9] ASHWORTH A, LORD C J. Synthetic lethal therapies for cancer: What's next after PARP inhibitors?[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(9): 564-576.
- [10] YI M, DONG B, QIN S, et al. Advances and perspectives of PARP inhibitors[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2019(8): 29.
- [11] YANG G, ZHENG R Y, JIN Z S. Correlations between microsatellite instability and the biological behaviour of tumours[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(12): 2891-2899.
- [12] ZIMMER K, PUCCINI A, XIU J, et al. WRN-mutated colorectal cancer is characterized by a distinct genetic phenotype[J]. *Cancers: Basel*, 2020, 12(5): E1319.
- [13] VAN WIETMARSCHEN N, NATHAN W J, NUSSENZWEIG A. The WRN helicase: Resolving a new target in microsatellite unstable cancers[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2021(71): 34-38.
- [14] NETWORK C G A R. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma[J]. *Nature*, 2014, 513(7517): 202-209.
- [15] KUNITOMI H, BANNO K, YANOKURA M, et al. New use of microsatellite instability analysis in endometrial cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 3297-3301.
- [16] PAL T, PERMUTH-WEY J, KUMAR A, et al. Systematic review and meta-analysis of ovarian cancers: Estimation of microsatellite-high frequency and characterization of mismatch repair deficient tumor histology[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21): 6847-6854.
- [17] MIYASHITA K, FUJII K, TAGUCHI K, et al. A specific mode of microsatellite instability is a crucial biomarker in adult T-cell leukaemia/lymphoma patients[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(3): 399-408.
- [18] MARRELLI D, POLOM K, PASCALE V, et al. Strong prognostic value of microsatellite instability in intestinal type non-cardia gastric cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2016, 23(3): 943-950.
- [19] MOHAN H M, RYAN E, BALASUBRAMANIAN I, et al. Microsatellite instability is associated with reduced disease specific survival in stage III colon cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2016, 42(11): 1680-1686.
- [20] SAHIN I H, AKCE M, ALESE O, et al. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of MSI-H/MMR-D colorectal cancer and a perspective on resistance mechanisms[J]. *Br J Cancer*, 2019, 121(10): 809-818.
- [21] BEHAN F M, IORIO F, PICCO G, et al. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens[J]. *Nature*, 2019, 568(7753): 511-516.
- [22] CHAN E M, SHIBUE T, MCFARLAND J M, et al. WRN helicase is a synthetic lethal target in microsatellite unstable cancers[J]. *Nature*, 2019, 568(7753): 551-556.
- [23] KATEGAYA L, PERUMAL S K, HAGER J H, et al. Werner syndrome helicase is required for the survival of cancer cells with microsatellite instability[J]. *iScience*, 2019(13): 488-497.
- [24] LIEB S, BLAHA-OSTERMANN S, KAMPER E, et al. Werner syndrome helicase is a selective vulnerability of microsatellite instability-high tumor cells[J]. *Elife*, 2019(8): e43333.

- [25] TIAN Y Y, WANG W M, LAUTRUP S, et al. WRN promotes bone development and growth by unwinding SHOX-G-quadruplexes via its helicase activity in Werner Syndrome[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5456.
- [26] DE RENTY C, ELLIS N A. Bloom's syndrome: Why not premature aging?: A comparison of the BLM and WRN helicases[J]. *Ageing Res Rev*, 2017(33): 36-51.
- [27] AHN B, HARRIGAN J A, INDIG F E, et al. Regulation of WRN helicase activity in human base excision repair[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(51): 53465-53474.
- [28] HARRIGAN J A, OPRESKO P L, VON KOBBE C, et al. The Werner syndrome protein stimulates DNA polymerase beta strand displacement synthesis via its helicase activity[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(25): 22686-22695.
- [29] KARMAKAR P, SNOWDEN C M, RAMSDEN D A, et al. Ku heterodimer binds to both ends of the Werner protein and functional interaction occurs at the Werner N-terminus[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(16): 3583-3591.
- [30] SHAMANNA R A, LU H M, DE FREITAS J K, et al. WRN regulates pathway choice between classical and alternative non-homologous end joining[J]. *Nat Commun*, 2016(7): 13785.
- [31] DESHPANDE R A, MYLER L R, SONIAT M M, et al. DNA-dependent protein kinase promotes DNA end processing by MRN and CtIP[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(2): eaay0922.
- [32] PALERMO V, RINALDUCCI S, SANCHEZ M, et al. CDK1 phosphorylates WRN at collapsed replication Forks[J]. *Nat Commun*, 2016(7): 12880.
- [33] CHENG W H, KUSUMOTO R, OPRESKO P L, et al. Collaboration of Werner syndrome protein and BRCA1 in cellular responses to DNA interstrand cross-links[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(9): 2751-2760.
- [34] MARABITTI V, VALENZISI P, LILLO G, et al. R-loop-associated genomic instability and implication of WRN and WRNIP1[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1547.
- [35] BASILE G, LEUZZI G, PICHIERRI P, et al. Checkpoint-dependent and independent roles of the Werner syndrome protein in preserving genome integrity in response to mild replication stress[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(20): 12628-12639.
- [36] VAN WIETMARSCHEN N, SRIDHARAN S, NATHAN W J, et al. Repeat expansions confer WRN dependence in microsatellite-unstable cancers[J]. *Nature*, 2020, 586(7828): 292-298.
- [37] KAUSHAL S, WOLLMUTH C E, DAS K, et al. Sequence and nuclease requirements for breakage and healing of a structure-forming (AT)_n sequence within fragile site FRA16D[J]. *Cell Rep*, 2019, 27(4): 1151-1164.e5.
- [38] MENGOLI V, CEPPI I, SANCHEZ A, et al. WRN helicase and mismatch repair complexes independently and synergistically disrupt cruciform DNA structures[J]. *EMBO J*, 2023, 42(3): e111998.
- [39] AGGARWAL M, SOMMERS J A, SHOEMAKER R H, et al. Inhibition of helicase activity by a small molecule impairs Werner syndrome helicase (WRN) function in the cellular response to DNA damage or replication stress[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(4): 1525-1530.
- [40] AGGARWAL M, BANERJEE T, SOMMERS J A, et al. Werner syndrome helicase has a critical role in DNA damage responses in the absence of a functional fanconi anemia pathway[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(17): 5497-5507.
- [41] SOMMERS J A, KULIKOWICZ T, CROTEAU D L, et al. A high-throughput screen to identify novel small molecule inhibitors of the Werner Syndrome Helicase-Nuclease (WRN)[J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0210525.
- [42] BORDAS V, BRUN J, DECKER A, et al. Triazolo-pyrimidine analogues for treating diseases connected to the inhibition of werner syndrome recq helicase (wrn): WIPO, WO2022249060[P]. 2022-12-01.
- [43] BOU-HANNA C, JARRY A, LODE L, et al. Acute cytotoxicity of *MIRA-1*/NSC19630, a mutant p53-reactivating small molecule, against human normal and cancer cells via a caspase-9-dependent apoptosis[J]. *Cancer Lett*, 2015, 359(2): 211-217.
- [44] AGGARWAL M, BANERJEE T, SOMMERS J A, et al. Targeting an Achilles' heel of cancer with a WRN helicase inhibitor[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(20): 3329-3335.
- [45] CHANG S, MULTANI A S, CABRERA N G, et al. Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(8): 877-882.
- [46] OLIVEIRA A F, BRETES L, FURTADO I. Review of PD-1/PD-L1 inhibitors in metastatic dMMR/MSI-H colorectal cancer[J]. *Front Oncol*, 2019(9): 396.
- [47] XIE M H, GAO M M, LING J N, et al. Research progress on small-molecule proteolytic targeting chimera[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2021, 38(22): 2891-2899.
- [48] PAIVA S L, CREWS C M. Targeted protein degradation: Elements of PROTAC design[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2019(50): 111-119.
- [49] ZOU Y T, MA D H, WANG Y Y. The PROTAC technology in drug development[J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37(1): 21-30.

收稿日期: 2023-04-27
 (本文责编: 李艳芳)