

蛋白激酶 C β 与肿瘤的关系及其抑制剂 Enzastaurin 的研究进展

李香艳, 陈晓光*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 蛋白激酶 C β (PKC β) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是细胞内多种信号转导通路的重要成分, 参与细胞周期的调控、分化、增殖、凋亡与血管形成等多种生理过程。在许多肿瘤中观察到 PKC β 活性增加, 如结肠癌、乳腺癌、血液系统肿瘤等, 目前临床前和临床试验中研究最多的是选择性 PKC β 抑制剂 Enzastaurin。本文从 PKC β 的结构与功能、PKC β 与肿瘤的关系及 PKC β 抑制剂 Enzastaurin 等方面进行综述。

关键词: 蛋白激酶 C β ; 恶性肿瘤; 抑制剂

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 05-0449-07

Role of PKC β in the malignant tumors and Enzastaurin, a PKC β inhibitor

LI Xiang-yan, CHEN Xiao-guang*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Protein kinase C beta (PKC β) is a multifunctional serine/threonine protein kinase, which plays an important role in many cell signaling pathways. PKC β takes part in multiple physiological processes, including regulation of the cell cycle, differentiation, proliferation, apoptosis and angiogenesis. Increased PKC β activity has been observed in many human cancers, such as colon, breast and haematological malignancies. At present, Enzastaurin is mostly studied in preclinical and clinical studies, which is a selective PKC β inhibitor. This review focuses on the functional properties of PKC β , its role played in tumors and Enzastaurin.

Key words: protein kinase C beta; malignant tumor; inhibitor

蛋白激酶C (PKC) 是一组丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族。PKC传导来自细胞外的大量受体信号, 在多种生理过程中起重要作用。PKC亚型较多, 每种亚型在不同的肿瘤细胞中表达, 有的表达增加、有的表达降低, 同时还参与细胞内多条信号转导通路, 这些使PKC与肿瘤的关系越来越复杂。其中蛋白激酶C β (PKC β) 与多种实体瘤和血液系统肿瘤密切相关, PKC β 的结构、功能和调控的深入研究, 及其特异性抑制剂 (Enzastaurin, LY317615-HCl) 在临床前和 I ~ II 期临床研究的结果, 使我们看到了该靶点在肿瘤治疗中的前景, PKC β 可能成为一个新的比较理想的抗肿瘤药物作用靶点。

本文从 PKC β 的结构与功能、PKC β 与肿瘤的关系

及 PKC β 抑制剂 Enzastaurin 等方面进行综述。

1 PKC β 的结构、功能及调控

1977 年 Nishizuka Y 和他的同事发现了一种蛋白激酶, 其活化不需要 Mg²⁺ 参与, 当时命名为 PKM。1979 年他们发现该酶可以被膜磷脂和 Ca²⁺ 依赖的钙蛋白酶 (Calpain) 活化, 又将其命名为 PKC。1982 年 Nishizuka Y 与 Castagna M 研究发现佛波酯类肿瘤促进剂如 TPA (PMA) 能代替二酰基甘油 (DAG) 在体外直接激活 PKC, 最终导致特殊的细胞功能被激活或无法控制的细胞增殖, 这些都促使 PKC 可能成为肿瘤治疗的靶点。

基于 PKC 的结构、底物特异性及活化特点将其分为 3 类: 第 1 类经典型 PKC (cPKCs; α 、 β I、 β II、 γ) 是 Ca²⁺ 依赖的、磷脂 (PS) 和 DAG 激活的激酶; 第 2 类新型 PKC (nPKCs; δ 、 ϵ 、 μ 、 θ 、 η) 是 Ca²⁺ 非

收稿日期: 2009-01-06.

*通讯作者 Tel: 86-10-63165207, E-mail: chxg@imm.ac.cn

依赖的、由 PS 和 DAG 调控;第 3 类非经典 PKC (aPKCs; ζ , λ/ι) 是 Ca^{2+} 非依赖的, 尽管 PS 调控其活性, 但活化不需要 DAG。

PKC β 与 cPKCs 其他成员一样, 是由 N-末端的调控区 (约 20~40 kD) 和 C-末端的催化区 (约 45 kD) 组成的单一多肽, 分为 4 个保守区 (C1~C4) 和 5 个可变区 (V1~V5)。C1 区包括 2 个串联重复富含半胱氨酸 (Cys) 的模序, 形成 DAG/佛波酯结合位点, C1 区之前为自体抑制的假底物序列; C2 区形成 Ca^{2+} 结合位点; C3 和 C4 区形成 ATP 和底物结合的激酶核心。

人类 PKC β 基因 (PRKCB) 有一个 2 172 bp 的开放阅读框架, 并有大小相同的 (22 kb) 内含子。PKC β 基因选择性剪切产生两种蛋白 PKC β I (671 个氨基酸) 和 PKC β II (673 个氨基酸), N-末端开始的 621 个氨基酸 100% 相同, 仅在 C-末端 V5 区的 50~52 个氨基酸是不同的, 但有 45% 的同源性; 这由两个连续的选择性剪接的外显子所编码。有意义的是, 这种选择性剪接在种属进化过程中被准确地保存下来, 例如大鼠、兔和人有相同的 PKC β I 和 PKC β II 氨基酸序列。

PKC β I 和 PKC β II 主要在脑、脾脏和造血细胞中表达, 而在心脏、肝或垂体中未发现。此后研究发现, PKC β 在大鼠的脑、垂体、松果体、脾、胸腺、视网膜、肺和小肠有不同的分布, 并在人白细胞中也有表达。在大鼠出生前 3 天到出生后 2~3 周, 脑 PKC β 表达逐渐增加, 之后保持不变; 胸腺内 PKC β 表达在大鼠出生后立即达到最高; 出生后 2 周内脾脏 PKC β 表达很低, 在 2~3 周之间明显增加。

PKC β 激活有两种重要调控机制。首先, 通过磷酸化作用正确地排列催化序列并使其定位到细胞浆; 其次, 通过配体结合使假底物从底物结合位点移除而激活该酶。

用 DAG 模拟剂佛波酯或非佛波酯类的 PKC 激动剂持续激活 (45~60 min) 能诱导 PKC β II 转位到内质网, 集中在微管形成中心或中心体附近的近核区; 而 GFP-PKC β I 仅转位到胞浆膜, 没有明显的进一步转位。PKC β II 转位到胞浆膜不依赖于激酶活性, 但转位到近核区激酶活性是非常必要的。在 TPA 刺激作用下, PKC β II 能转位到肌动蛋白的细胞骨架, 而 PKC β I 不能。PKC β II 和肌动蛋白的相互作用导致自身磷酸化明显增强及底物特异性的改变。PKC 转变为成熟形式包括一系列磷酸化步骤, 首先 PKC β 在活化环 (Thr⁵⁰⁰) 上由磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1

(PDK-1) 介导转磷酸化作用, 500 位带有负性电荷是 PKC β II 催化区域所必需的, 随后在转角模序 (PKC β I, Thr⁶⁴²; PKC β II, Thr⁶⁴¹) 和疏水模序 (PKC β I, Ser⁶⁶¹; PKC β II, Ser⁶⁶⁰) 发生自身磷酸化。Thr⁶⁴² (不是 Thr⁶³⁵) 是 PKC β I 的关键性位点, 其磷酸化是新合成 PKC β I 的早期步骤, 也是活化所必需的。而在 PKC β I N-末端和结合区自身磷酸化位点对 PKC β I 的功能无明显影响。

PKC β 参与多条肿瘤相关的信号转导通路。细胞外信号激活 G-蛋白偶联受体或酪氨酸激酶受体后, 激活与之偶联的磷脂酶 C γ (PLC γ) 或磷脂酶 C β (PLC β), 导致第二信使 DAG 和 3-磷酸肌醇 (IP3) 生成增多, IP3 与受体结合促进 Ca^{2+} 释放, 激活 PKC β 使下游的糖原合成酶激酶-3 β (GSK3 β)、c-RAF-MEK1/2-ERK1/2 等发生磷酸化而参与肿瘤发生发展的多个环节。另外, PKC β 是血管表皮生长因子 (VEGF) 信号转导通路的重要组成部分, 在 VEGF 介导的肿瘤血管形成中起重要作用。PKC β 也能激活 PI-3K/AKT 信号转导通路, 该通路是调控细胞存活和凋亡的关键通路。因此考虑到 PKC β 可能是抗血管形成和抗肿瘤药物研究开发的重要靶点。

2 PKC β 与肿瘤的关系

PKC β 参与多种实体瘤的发生发展过程, 如结肠癌、乳腺癌、神经母细胞瘤、肺癌等; 同样 PKC β 在血液系统肿瘤中也起着重要的作用。

2.1 结肠癌和胃癌

2.1.1 PKC β I 与结肠癌和胃癌的关系 稳定转染 PKC β I 和 PKC β II 的 HD3 结肠癌细胞, 与亲代细胞比较呈表型更低分化, 并重新获得对碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的增殖反应, 在裸鼠体内有更高的成瘤率。同时 PKC β I 和 PKC β II 高表达能激活几种 MBP 激酶, 其中包括 p57 MAP 激酶。在人结肠癌细胞 HT29 稳定转染 PKC β I 后细胞生长受到抑制, 成瘤率降低。稳定转染的 PKC β I 人结肠癌细胞 SW480 的倍增时间显著延长, 饱和密度降低, 这与其转位和内源性 PKC β I 部分下调有关。因此提示 PKC β I 在 HT29 和 SW480 这两种细胞中可作为一种抑制剂。而以前的试验结果表明, 在啮齿类动物成纤维细胞或大鼠肝上皮细胞系中, 组成性过表达 PKC β I 促进细胞的生长, 这说明 PKC β I 存在细胞类型的选择性。

PKC β I 过表达减弱人胃癌 AGS 细胞对吡哆美辛的凋亡反应, 与 p21 (waf1/cip1) 在 mRNA 和蛋白水平的过表达有关。通过反义 cDNA 抑制 p21 过

表达能部分降低 PKC β I 的抗凋亡作用。内源性 PKC β I 过表达通过上调 p21 来阻止吡咯美辛诱导的凋亡。反义 PKC β I 转染的胃癌细胞对丝裂霉素 C 或 5-氟尿嘧啶诱导的凋亡更敏感, 然而反义 PKC β II 的转染对细胞形态、生长及凋亡无明显影响; 反义 PKC β I 能明显地抑制软琼脂克隆原的形成及裸鼠移植瘤的生长。在胃癌细胞反义 PKC β I 有效地抑制活性蛋白的转录及与 DNA 结合活性, 提示 PKC β I 通过蛋白活性的调控来影响细胞生长。这些数据为反义 PKC β I 用于胃癌治疗提供了依据^[1]。

2.1.2 PKC β II 与结肠癌的关系 PKC β II 过表达是小鼠结肠癌形成的重要的早期促进因素, 其激活是结肠癌侵袭所必需的, 同时也在异常隐窝病灶 (ACF) 和结肠癌的发生发展中起作用; 而 PKC α 、PKC β I 的表达在肿瘤的发展过程中会降低, 甚至缺失。转 PKC β II 基因的小鼠结肠表现出过度增殖, 增加结肠肿瘤发生的易感性, 这与明显抑制 TGF β R II 表达有关。同时结肠内 β -catenin 水平增加, GSK3 β 活性降低, 提示 PKC β II 激活体内 Wnt/APC/ β -catenin 增殖信号通路。这些数据表明, PKC β II 在结肠上皮细胞增殖和肿瘤发生发展中起直接作用。转基因小鼠结肠上皮 PKC β II 的高表达能增加 AOM 诱导结肠癌形成的易感性^[2]。在小肠上皮细胞, 通过 PKC β II-Ras-PKC γ /Rac1-MEK 信号通路诱导侵袭的发生^[3]。在转染 PKC β II 的大鼠小肠上皮细胞和转 PKC β II 基因小鼠体内, PKC β II 促进结肠癌发生, 是通过 COX-2 的诱导以及 TGF- β 信号通路的抑制来实现的。在培养的和动物体内的大鼠小肠上皮细胞, PKC β II 通过 MAPK-ERK 依赖的信号通路调控自身的表达。

上述资料表明, 高表达 PKC β I 能抑制结肠癌细胞的生长, 但 PKC β I 的作用有细胞依赖性。而结肠癌的发生、发展与 PKC β II 过表达而激活 Wnt/APC/ β -catenin 信号通路, 或与诱导 COX-2、抑制 TGF- β 信号通路, 或与诱导 K-Ras 和 Ras 影响因子, 组成性激活 Rac1 而导致 MEK 活化等方面密切相关。

2.2 乳腺癌

Li 等^[4]研究表明, 组成性激活的 PKC β I 或 PKC β II 突变株质粒稳定转染到 MCF-7 细胞, 转染细胞生长率明显增加, 更能耐受 PKC β 特异性抑制剂的生长抑制作用。在野生的或组成性激活突变株转染的细胞, cyclin D1 水平明显增加, 区域表达缺陷的 PKC β I 或 PKC β II 转染细胞生长被抑制, cyclin D1 水平降低。在瞬时转染荧光素酶试验中, PKC β I 和 PKC β II 组成性激活也能增加 c-fos 的转录。这些结果

说明 PKC β I 和 PKC β II 在部分人乳腺癌细胞的生长中起重要作用, PKC β 可作为乳腺癌治疗的靶点, 为 PKC β 抑制剂在临床用于乳腺癌治疗提供了依据。

2.3 神经母细胞瘤

PKC β I 在神经母细胞瘤的生长与增殖中有促进作用, PKC β 抑制能增强作用于微管的抗肿瘤药物的作用。

2.4 肺癌

在转染 c-myc NCI H209 小细胞肺癌 (SCLC) 细胞中 PKC β 的表达显著增加。将大鼠 PKC β I 和牛 PKC β II 基因转染到 NCI H209 和转染 c-myc NCI H209 细胞中, PKC β I 对这些细胞无明显影响, 而 PKC β II 表达对细胞有直接的表型作用。在亲代 NCI H209 细胞, PKC β II 的高表达导致细胞聚集增加, 倍增时间延长; 细胞周期阻滞于 G₀~G₁ 期。在 c-myc 转染的细胞中, PKC β II 的高表达降低 myc 诱导的凋亡从而增加细胞的存活。

2.5 黑色素瘤

PKC β II 腺病毒质粒转染到黑色素瘤细胞, PKC β II 的高表达抑制肝细胞生长因子 (HGF) 诱导的 PI-3K 活化, 降低黑色素瘤细胞的侵袭能力。PKC β II 负性调控从衔接蛋白 Gab1 到 PI-3K 的 HGF 信号转导通路, PKC β II 的表达缺失对黑色素瘤细胞获得侵袭能力是非常重要的^[5]。

2.6 血液系统肿瘤

PKC β II 是慢性髓细胞性白血病 K562 细胞增殖所必需的。PKC β II 的高表达是慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 细胞的特征, 其活性与 CLL 细胞中 B 细胞受体信号通路密切相关, PKC β II 可能是 CLL 发展的重要因素^[6]。PKC β 基因表达水平与 TPA 诱导人早幼粒急性白血病 HL-60 细胞分化的易感性有关。PKC β 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)^[7,8]、T 细胞淋巴瘤和 T 细胞白血病患者的肿瘤组织中高表达。PKC β 过表达的 DLBCL 患者有较差的预后^[9,10], 5 年无病生存率较差, 特别是在低国际预后指数 (IPI) 的患者。此外, PKC β 参与促进骨髓癌细胞转移。这些结果表明, PKC β 可作为血液系统恶性肿瘤治疗的靶点。

3 PKC β 抑制剂 Enzastaurin

目前研究的 PKC 抑制剂比较多, 十字孢碱的出现开拓了 PKC 抑制剂的研究领域。PKC 抑制剂主要作用于 ATP 结合位点, 如 Midostaurin (PKC412)、Gö6850、Rö318220、UCN-01 和 Enzastaurin (LY317615-HCl) 等。在临床前和临床试验中研究最多的是选择性 PKC β 抑制剂 Enzastaurin, 其他抑制剂没有良好的

选择性, 对 PKC 各亚型均有不同程度的抑制。

Enzastaurin 为非环状的双咪唑马来酰亚胺, 是一种小分子的 PKC β 抑制剂, 通过与 ATP 竞争性结合抑制激酶活性, IC₅₀ 约为 6 nmol·L⁻¹; Enzastaurin 在高浓度时也能抑制其他 PKC 亚型 (PKC α 0.039 μ mol·L⁻¹、PKC γ 0.083 μ mol·L⁻¹、PKC ϵ 0.110 μ mol·L⁻¹)^[11]。

Enzastaurin 最初被开发为抗血管形成的药物, 但在之后的研究中发现多种人肿瘤细胞和移植瘤中有较好的作用。其通过直接抑制肿瘤细胞的增殖和诱导凋亡或间接阻断肿瘤诱导的血管形成这两方面来发挥抗肿瘤作用。

3.1 Enzastaurin 的作用机制

3.1.1 Enzastaurin 的直接抗肿瘤作用 PKC β 与肿瘤细胞增殖、凋亡及侵袭密切相关。在较低浓度时, Enzastaurin 就能诱导凋亡、抑制一系列肿瘤细胞的增殖和移植瘤的生长。

Hanauske 等^[12]研究发现, Enzastaurin 能抑制 10 种人肿瘤细胞 [乳腺癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、结肠癌、甲状腺癌、头颈部癌、肾癌、胰腺癌和黑色素瘤] 和肿瘤样本细胞的克隆原形成, 呈剂量依赖关系。Enzastaurin 敏感性与 GSK3 β mRNA 低水平表达和 IL-8 mRNA 高水平表达密切相关, 两者的表达情况可能是其敏感性的有效预测^[13]。

Enzastaurin 发挥直接的抗肿瘤作用, 抑制多发性胶质瘤和结肠癌两种移植瘤的生长, 并抑制肿瘤组织和外周血单核细胞 (PBMCs) 中 GSK3 β ^{Ser⁹} 的磷酸化, 提示 GSK3 β 磷酸化水平可作为 Enzastaurin 的一种药效学标志^[11]。Enzastaurin 还抑制核糖体蛋白 S6^{Ser240/244} 和 AKT^{Thr308} 的磷酸化, 说明其影响 AKT 信号通路。Enzastaurin 对 CEO 结肠癌和 PC3 前列腺癌细胞以及吉非替尼耐药细胞的生长有明显的抑制作用, 同时抑制 AKT、p70S6K、GSK3 β 的磷酸化及 VEGF 表达和分泌。在 GEO 及耐药细胞裸鼠移植瘤中, Enzastaurin 有显著的抗肿瘤作用并与吉非替尼有较好的协同作用, 延长中位生存期, 抑制肿瘤中上述蛋白的表达与分泌^[14]。

Enzastaurin 抑制 11 种 SCLC (IC₅₀ 为 3~10 μ mol·L⁻¹) 和 4 种 NSCLC 细胞 (IC₅₀ 为 3~10 μ mol·L⁻¹) 的生长, 减少 GSK3 β 的磷酸化, 并抑制 A549 移植瘤的血管形成。基于 PKC β 在肺癌中的表达和在肺癌发展中的作用, PKC β 可能成为肺癌治疗的靶点^[15]。Enzastaurin 和多靶点抗叶酸药 Pemetrexed 联合应用于 SW1573 和 A549 细胞表现出良好的协同作用, 有效地诱导细胞凋亡。在 Pemetrexed 作用后的细胞,

Enzastaurin 能减少 Cdc25C 磷酸化, 导致 G₂/M 调控点失控, GSK3 β 和 AKT 的磷酸化水平降低。Enzastaurin 还可有效降低 Pemetrexed 诱导的 TS 表达上调, 可能是通过降低 E2F-1 实现的, 然而这种联合用药能降低原位 TS 活性和 VEGF 分泌^[16]。此外, Enzastaurin 和 Pemetrexed 在甲状腺癌细胞亦表现出协同的抗肿瘤作用^[17]。

Faoro 等^[18]报道, 在 7 种恶性胸膜间皮瘤 (MPM) 和 1 种良性间皮瘤细胞中, PKC β I 的表达高于 PKC β II; 在 MPM 患者的肿瘤样本中, PKC β I 和 PKC β II 表达相同。PKC β II 表达依赖于肿瘤的发展阶段, 随着肿瘤的发展表达下降。

Dudek 等^[19]报道, Enzastaurin 能增加电离辐射对鼠 4T1 乳腺癌细胞和内皮细胞的作用, 抑制其增殖和克隆原形成; Enzastaurin 阻断 PKC β 、Ras 及两个下游影响因子 ERK1/2 和 RAL-GTP 的磷酸化。通过骨转移的原位模型发现 PKC β 抑制与局部辐射治疗能抑制肿瘤的生长和血管形成, 减少疼痛, 可能是通过抑制 Ras 通路实现的。

Teicher 等^[20–23]经皮下接种多发性胶质瘤 T98G、结肠癌 HT-29 与肾细胞癌 Caki、非小细胞肺癌 Calu-6 与小鼠 Lewis 肺癌、胃癌 HS746T 与肝细胞癌 Hep3B、乳腺癌 MX-1 与卵巢癌 SKOV₃、小细胞肺癌 SW2 的移植瘤小鼠, 灌胃给予 Enzastaurin 后, 经 CD31 或 CD105 免疫染色发现肿瘤内血管的数量较对照组减少, 抑制血管生成而延迟肿瘤的生长; 与吉西他滨、5-氟尿嘧啶、紫杉醇、卡铂联合应用表现出相加或协同的细胞毒作用。

Enzastaurin 诱导多种多发性骨髓瘤 (MM) 的凋亡是通过抑制 AKT 信号转导通路来实现的^[24, 25]。美法伦或阿霉素与 PKC 抑制剂 Gö6976 或 Enzastaurin 联合应用明显增加细胞毒作用, 其能抑制 I κ B 的磷酸化。这表明传统药物与 Enzastaurin 联合应用可能是非常有效的治疗 MM 的新策略。在 MM 的体内外试验中 Enzastaurin 表现出良好的抗癌作用, 单独或联合用药能改善 MM 患者的预后^[26]。Enzastaurin 抑制人骨髓瘤细胞系 (HMCLs) 的增殖 (IC₅₀ 为 1.3~12.5 μ mol·L⁻¹), 诱导的凋亡可被 ZVAD-fmk 广谱 caspase 抑制剂阻断; 这些结果与 AKT 和 GSK3 β 磷酸化降低一致。与硼替佐米或咪唑啉啉酮 (反应停) 联合应用表现出相加或协同的细胞毒作用^[27]。Enzastaurin 诱导皮肤 T 细胞淋巴瘤细胞的凋亡, 可能是通过抑制 AKT 途径实现的^[25]。Moreau 等^[28]研究发现, 在低分化的淋巴浆细胞淋巴瘤 (WM) 细胞中 PKC β 表达上调,

Enzastaurin 阻断 PKC β 活性, 抑制其增殖 (IC_{50} 为 $2.5 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 诱导的凋亡依赖于 caspase-3、-8、-9 和 PARP 断裂; 抑制 AKT 激酶活性及 AKT 和下游的 MARCKS 和 p70S6K 的磷酸化; 与硼替佐米合用有相加的细胞毒作用, 与氟达拉滨合用有协同的细胞毒性作用, 还能在体内抑制 WM 移植瘤的生长。

3.1.2 Enzastaurin 的抗血管形成作用 VEGF 在多种类型的肿瘤细胞中分泌, 是一种血管形成的刺激剂。在培养细胞中, Enzastaurin 明显抑制 VEGF 刺激的人脐静脉内皮细胞的增殖 (IC_{50} 为 $150 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 在大鼠角膜微囊实验中, Enzastaurin 能明显降低 VEGF 或 bFGF 诱导的新血管形成。人 SW-2 小细胞肺癌移植瘤裸鼠灌胃给予 Enzastaurin 后, 肿瘤内血管数量减少, 呈剂量依赖模式, 这与肿瘤生长延迟相一致。

Enzastaurin 能有效降低 SW2 小细胞肺癌和 Caki-1 肾癌移植瘤小鼠血浆中的 VEGF 水平, HCT-116 移植瘤小鼠的血浆 VEGF 水平没有改变; 而在所有移植瘤小鼠血浆中的 bFGF 和 TGF- β 水平均没有明显变化。以 CD31 免疫组化染色为指标, Enzastaurin 可使上述 3 种移植瘤内血管密度降低约 40%。在体内 PKC β 的抑制导致 VEGF 产生减少, 这与肿瘤内血管的减少相一致。因此血浆 VEGF 水平可作为 Enzastaurin 作用的标志, 而血浆 bFGF 和 TGF- β 水平与之关系不明显^[29]。Enzastaurin 影响 VEGF 信号转导通路从而抑制肿瘤, 是一种新的血管形成抑制剂。

3.2 Enzastaurin 的临床试验

3.2.1 Enzastaurin 的 I 期临床试验 在 47 个晚期癌症患者进行多中心的 I 期临床试验来评价 Enzastaurin 口服剂量递增的耐受性和药代动力学特点。Enzastaurin 主要由细胞色素 P450 3A (CYP3A) 代谢形成 LY326020 和 LY485912 两个代谢产物, 它们对 PKC β 有更好的抑制作用, IC_{50} 约为 $5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[30]。无明显毒性反应的最大耐受剂量 (MTD) 是 $700 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 。随着剂量增加, Enzastaurin 及其代谢产物增加, 在 525 mg 和 700 mg 达到坪值。每日口服 1 次 Enzastaurin (525 mg) 达到 $1\ 400 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的稳态浓度, 无不可耐受的毒性反应发生, 因此被推荐为 II 期临床试验使用剂量。最常见的不良反应包括色素尿、疲劳、头痛、嗜睡及其他胃肠道反应等。在健康人群有较好的耐受性^[31]。

同时在 I 期临床试验也评价了 Enzastaurin 与传统化疗药物联合应用后的药代动力学特点和安全性。Enzastaurin 与卡培他滨联合用药有较好的耐受性, II

期临床试验推荐剂量为 Enzastaurin $525 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 、卡培他滨 $1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ ^[32]。Enzastaurin 与吉西他滨和卡铂联合用药的 I 期临床试验结果显示, II 期临床试验推荐剂量为 Enzastaurin $525 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 、吉西他滨 $1\ 250 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ 和卡铂 $75 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ ^[33]。

3.2.2 Enzastaurin 的 II 期临床试验 Robertson 等^[34]首次报道, 在复发性或顽固性 DLBCL 患者进行多中心的 II 期临床试验, 直到疾病恶化或不可耐受的毒性反应发生时, 每日口服 1 次 Enzastaurin, 有较好的耐受性, 小部分患者无病情进展期延长。

复发性或顽固性套细胞淋巴瘤 (MCL) 的 II 期临床试验表明, Enzastaurin 可以单独治疗和联合细胞毒类药物治疗 MCL。

Oh 等^[35]报道 Enzastaurin 作为 NSCLC 二线或三线药物的多中心 II 期临床试验表明, 用药 6 个月时, 14% 的患者无疾病进展。

3.2.3 Enzastaurin 正在进行的临床试验 正在进行 Enzastaurin 单独用药治疗顽固性中枢神经系统肿瘤、复发性胶质瘤、白血病等 I 期临床试验。还同时进行与阿瓦斯汀 (晚期或转移癌)、替莫唑胺 (实体瘤和肺癌)、卡铂 (复发性或顽固性脑肿瘤)、它赛瓦 (肺癌) 等药物联合应用的临床试验。

在非霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、NSCLC、转移性结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌和脑肿瘤患者, 正在进行 Enzastaurin 单独用药或与其他细胞毒类药物联合应用的 II 期临床试验。

正在进行的 III 期临床研究包括 Enzastaurin 与洛莫司联合治疗胶质瘤和 Enzastaurin 预防顽固性淋巴瘤 (<http://www.clinicaltrials.gov>)。

上述资料提示, Enzastaurin 是正在兴起的一种新的有前途的抗肿瘤药物。Enzastaurin 通过直接抑制肿瘤细胞生长、诱导凋亡和间接抑制血管形成这两方面作用而发挥作用。Enzastaurin 在单独用药或联合多种细胞毒类药物治疗恶性肿瘤的临床研究中, 表现出较好的抗癌作用和耐受性, 在肿瘤治疗领域有较大的开发价值。

结论

抑制 PKC β 这单一靶点可以抑制肿瘤相关的多条信号转导通路而发挥较好的抗肿瘤作用, 使 PKC β 成为肿瘤治疗比较有前景的分子靶点, 临床前和临床研究结果让我们看到了 PKC β 抑制剂治疗多种恶性肿瘤的潜力。因此, PKC β 抑制剂必将成为新药研究与开发的热点。

References

- [1] Jiang XH, Tu SP, Cui JT, et al. Antisense targeting protein kinase C alpha and beta1 inhibits gastric carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 5787–5794.
- [2] Liu Y, Su W, Thompson EA, et al. Protein kinase CbetaII regulates its own expression in rat intestinal epithelial cells and the colonic epithelium *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 45556–45563.
- [3] Zhang J, Anastasiadis PZ, Liu Y, et al. Protein kinase C (PKC) betaII induces cell invasion through a Ras/Mek-, PKC iota/Rac 1-dependent signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 22118–22123.
- [4] Li H, Weinstein IB. Protein kinase C beta enhances growth and expression of cyclin D1 in human breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 11399–11408.
- [5] Oka M, Kikkawa U, Nishigori C. Protein kinase C-betaII represses hepatocyte growth factor-induced invasion by preventing the association of adapter protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in melanoma cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128: 188–195.
- [6] Abrams ST, Lakum T, Lin K, et al. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase CbetaII [J]. *Blood*, 2007, 109: 1193–1201.
- [7] Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Expression of PKC-beta or cyclin D2 predicts for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Mod Pathol*, 2005, 18: 1377–1384.
- [8] Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning [J]. *Nat Med*, 2002, 8: 68–74.
- [9] Schaffel R, Morais JC, Biasoli I, et al. PKC-beta II expression has prognostic impact in nodal diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Mod Pathol*, 2007, 20: 326–330.
- [10] Li S, Phong M, Lahn M, et al. Retrospective analysis of protein kinase C-beta (PKC-beta) expression in lymphoid malignancies and its association with survival in diffuse large B-cell lymphomas [J]. *Biol Direct*, 2007, 2: 8.
- [11] Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, et al. The protein kinase Cbeta-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615-HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 7462–7469.
- [12] Hanauske AR, Oberschmidt O, Hanauske-Abel H, et al. Antitumor activity of enzastaurin (LY317615.HCl) against human cancer cell lines and freshly explanted tumors investigated *in-vitro* [corrected] soft-agar cloning experiments [J]. *Invest New Drugs*, 2007, 25: 205–210.
- [13] Hanauske AR, Eismann U, Oberschmidt O, et al. Correlations of mRNA expression and *in vitro* chemosensitivity to enzastaurin in freshly explanted human tumor cells [J]. *Invest New Drugs*, 2008, 26: 215–222.
- [14] Gelardi T, Caputo R, Damiano V, et al. Enzastaurin inhibits tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99: 473–480.
- [15] Lahn M, McClelland P, Ballard D, et al. Immunohistochemical detection of protein kinase C-beta (PKC-beta) in tumour specimens of patients with non-small cell lung cancer [J]. *Histopathology*, 2006, 49: 429–431.
- [16] Tekle C, Giovannetti E, Sigmond J, et al. Molecular pathways involved in the synergistic interaction of the PKC beta inhibitor enzastaurin with the antifolate pemetrexed in non-small cell lung cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99: 750–759.
- [17] Oberschmidt O, Eismann U, Schulz L, et al. Enzastaurin and pemetrexed exert synergistic antitumor activity in thyroid cancer cell lines *in vitro* [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2005, 43: 603–604.
- [18] Faoro L, Loganathan S, Westerhoff M, et al. Protein kinase C beta in malignant pleural mesothelioma [J]. *Anticancer Drugs*, 2008, 19: 841–848.
- [19] Dudek AZ, Zwolak P, Jasinski P, et al. Protein kinase C-beta inhibitor enzastaurin (LY317615-HCl) enhances radiation control of murine breast cancer in an orthotopic model of bone metastasis [J]. *Invest New Drugs*, 2008, 26: 13–24.
- [20] Teicher BA, Menon K, Alvarez E, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of a protein kinase Cbeta inhibitor in human T98G glioblastoma multiforme xenografts [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 634–640.
- [21] Teicher BA, Menon K, Alvarez E, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of a protein kinase Cbeta inhibitor in human HT-29 colon carcinoma and human CaKi1 renal cell carcinoma xenografts [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21: 3175–3184.
- [22] Teicher BA, Menon K, Alvarez E, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of a protein kinase Cbeta inhibitor in murine lewis lung carcinoma and human Calu-6 non-small-cell lung carcinoma xenografts [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2001, 48: 473–480.
- [23] Teicher BA, Menon K, Alvarez E, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of a protein kinase Cbeta inhibitor in human breast cancer and ovarian cancer xenografts [J]. *Invest New Drugs*, 2002, 20: 241–251.
- [24] Rizvi MA, Ghias K, Davies KM, et al. Enzastaurin (LY317615), a protein kinase Cbeta inhibitor, inhibits the AKT pathway and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5: 1783–1789.

- [25] Querfeld C, Rizvi MA, Kuzel TM, et al. The selective protein kinase C beta inhibitor enzastaurin induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines through the AKT pathway [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126: 1641–1647.
- [26] Podar K, Raab MS, Zhang J, et al. Targeting PKC in multiple myeloma: *in vitro* and *in vivo* effects of the novel, orally available small-molecule inhibitor enzastaurin (LY317615-HCl) [J]. *Blood*, 2007, 109: 1669–1677.
- [27] Neri A, Marmiroli S, Tassone P, et al. The oral protein-kinase C beta inhibitor enzastaurin (LY317615) suppresses signalling through the AKT pathway, inhibits proliferation and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines [J]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49: 1374–1383.
- [28] Moreau AS, Jia X, Ngo HT, et al. Protein kinase C inhibitor enzastaurin induces *in vitro* and *in vivo* antitumor activity in *Waldenstrom macroglobulinemia* [J]. *Blood*, 2007, 109: 4964–4972.
- [29] Keyes KA, Mann L, Sherman M, et al. LY317615 decreases plasma VEGF levels in human tumor xenograft-bearing mice [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, 53: 133–140.
- [30] Carducci MA, Musib L, Kies MS, et al. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of enzastaurin, an oral protein kinase C beta inhibitor, in patients with advanced cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 4092–4099.
- [31] Welch PA, Sinha VP, Cleverly AL, et al. Safety, tolerability, QTc evaluation, and pharmacokinetics of single and multiple doses of enzastaurin HCl (LY317615), a protein kinase C-beta inhibitor, in healthy subjects [J]. *J Clin Pharmacol*, 2007, 47: 1138–1151.
- [32] Camidge DR, Gail Eckhardt S, Gore L, et al. A phase I safety, tolerability, and pharmacokinetic study of enzastaurin combined with capecitabine in patients with advanced solid tumors [J]. *Anticancer Drugs*, 2008, 19: 77–84.
- [33] Rademaker-Lakhai JM, Beerepoot LV, Mehra N, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral protein kinase C beta-inhibitor enzastaurin in combination with gemcitabine and cisplatin in patients with advanced cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 4474–4481.
- [34] Robertson MJ, Kahl BS, Vose JM, et al. Phase II study of enzastaurin, a protein kinase C beta inhibitor, in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25: 1741–1746.
- [35] Oh Y, Herbst RS, Burris H, et al. Enzastaurin, an oral serine/threonine kinase inhibitor, as second- or third-line therapy of non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 1135–1141.