·综 述·

谷氨酰胺酶新型抑制剂及其抗肿瘤活性研究进展*

廖英 冀林华 综述 崔森 审校

摘要 肿瘤细胞利用各种代谢途径以满足增殖的能量和生物合成需求。除葡萄糖外，谷氨酰胺也是肿瘤细胞生长的重要前体物质及能量来源。谷氨酰胺酶(glutaminase，GSL)活性与Ras、c-Myc等癌基因以及Rho GTP酶相关。诸多临床前研究已证实谷氨酰胺酶抑制剂不仅具有抗肿瘤活性，还可以明显增强耐药肿瘤细胞对靶向药物的敏感性。目前新型GSL抑制剂CB-839已进入Ⅰ期临床试验，有望成为癌症治疗的新型药物。本文就谷氨酰胺代谢及其新型抑制剂抗肿瘤研究进展做一综述。

关键词 谷氨酰胺代谢 谷氨酰胺酶 肿瘤 谷氨酰胺酶抑制剂 CB-839

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2019.07.273

Research progress on the novel glutaminase inhibitor and its antitumor activity

Ying Liao, LinHua Ji, Sen Cui

Correspondence to: Sen Cui; E-mail: 13897284366@163.com

Department of Hematology, Qinghai University Affiliated Hospital, Xilin 810000, China

The work was supported by the Ministry of Human Resources and Social Security for High-level Overseas Talents to Return to China in 2017 (No.2017-200)

Abstract Tumor cells use several metabolic pathways to support bioenergetic and biosynthetic demands of proliferation. In addition to glucose, glutamine is an important source of precursor substances and energy for cancer cell growth. Glutaminase (GSL) activity is associated with Ras, c-Myc, and other oncogenes, as well as Rho GTP enzyme. Many preclinical studies have confirmed that glutaminase inhibitors not only exhibit anti-tumor activity, but can also remarkably enhance the sensitivity of resistant cancer cells to targeted drugs. At present, the novel GSL inhibitor CB-839 has entered phase I clinical trials and is expected to become a new drug for cancer treatment. This paper reviews the research progress on this novel glutaminase inhibitor and its antitumor activity.

keywords: glutamine metabolism, glutaminase, tumor, glutaminase inhibitor, CB-839

肿瘤发生及癌细胞增殖与代谢重编程密切相关，癌细胞可通过改变营养素的摄取和分解代谢协调代谢重编程，使其能够维持增殖能力，增强对氧化应激的抵抗力，并逃避免疫介导的破坏[1]。许多肿瘤细胞具有“谷氨酰胺成瘾”这一特性，并且研究发现，在靶向药物治疗时肿瘤细胞谷氨酰胺代谢代偿性增强，可能是肿瘤产生耐药的一个潜在因素谷氨酰胺酶(glutaminase，GSL)是谷氨酰胺代谢途径的关键酶，对依赖于谷氨酰胺代谢的肿瘤细胞抑制其GLS活性，将导致肿瘤代谢途径的破坏，影响大分子合成、ATP产生和细胞氧化还原平衡。本文介绍肿瘤谷氨酰胺代谢及GSL抑制剂作用机制以及其新型制剂抗肿瘤研究进展。

1 谷氨酰胺在肿瘤细胞生长中的作用

癌细胞即使在有氧情况下也会将大部分葡萄糖酵解产生ATP维持其能量需求，即“Warburg效应”。但这一改变使得进入三羧酸(TCA)循环的底物减少，为满足生物大分子合成的需求，肿瘤细胞大量摄入谷氨酰胺并在谷氨酰胺酶的作用下将其转变为谷氨酸，再进一步转变为α-酮戊二酸(α-KG)以补全TCA循环，即为“谷氨酰胺酵解”[2]。谷氨酰胺是血液和肌肉中含量最丰富的氨基酸，不仅为各类氨基酸、蛋白质、核苷酸及其他重要生物分子提供前体物质和能量，还提供NADPH(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)和谷胱甘肽(GSH)以促进细胞增殖并维持细胞内氧化还原稳态[3]。谷氨酰胺还可通过多种机制调节雷帕霉素复合物(mTORC1)活性，谷氨酰胺酶活性的提高与癌基因如Myc[4]和Ras[5]上调以及Rho GTP酶[6]的过度活化相关，通过驱动致癌因子的转录和翻译、抑制自噬和增强大分子物质生物合成而促进肿瘤细胞生长和增殖。

2 谷氨酰胺酶及谷氨酰胺酶抑制剂

2.1 谷氨酰胺酶

GLS是一种线粒体酶，在谷氨酰胺代谢中起着至

作者单位：青海大学附属医院血液内科（青海省西宁市810000）

*本文课题受国家人力资源社会保障部2017年度高层次留学人才回国项目（编号：人社厅函{2017}200号）资助

通信作者：崔森 13897284366@163.com

关重要的作用。谷氨酰胺由细胞膜上氨基酸转运体SLC1A5(也称ASCT2)转运进入细胞后,在GLS催化作用下谷氨酰胺转化为谷氨酸,然后谷氨酸通过谷氨酸脱氢酶转化为α-KG并引入TCA循环。哺乳动物体内有两种编码谷氨酰胺酶的基因[7]:谷氨酰胺酶1(GLS1)和肝型谷氨酰胺酶(GLS2),二者由相同基因复制经基因分化而来,但蛋白结构、涉及的调节机制和动力性特征均不同。GLS1又分为两个变种:肾型谷氨酰胺酶和谷氨酰胺酶C(GAC)。GLS1在许多癌症类型中过表达,在一些人类癌细胞中,GLS1活性与c-Myc、Ras等癌基因表达呈正相关,GLS1水平升高提示更晚的疾病阶段和不良预后。相反,GLS2则能抑制肿瘤细胞的生长[8],在正常和肿瘤细胞中,由于GLS2基因启动子中含有可与p53基因结合的DNA片段,故GLS2是p53靶基因。以上均表明谷氨酰胺代谢与恶性肿瘤的发展存在一定关系,这一发现为靶向谷氨酰胺代谢治疗癌症提供了理论基础。

2.2 谷氨酰胺酶抑制剂

最早发现的是非竞争性谷氨酰胺酶抑制剂:谷氨酰胺类似物如6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸(DON)和重氮丝氨酸,通过与许多谷氨酰胺利用酶(包括谷氨酰胺酶)的活性位点不可逆地结合从而抑制谷氨酰胺酶的活性,但临床研究显示这些类似物抗肿瘤活性有限,且由于其广泛的拮抗作用导致的严重毒性进一步限制了开发利用。后来开发的两种变构小分子谷氨酰胺酶抑制剂,化合物968(5-(3-溴-4-(二甲基氨基)苯基)-2,2-二甲基-2,3,5,6四氢苯并[a]菲啶-4(1H)-酮)和BPTES(双-2-(5-苯基乙酰氨基-1,3,4-噻二唑-2-基)乙基硫醚)毒副作用明显减小,其通过不同的机制发挥作用,被广泛用于临床前研究[9]。化合物968为GLS1特异性抑制剂,可抑制GSL1重组表达,与未激活状态的谷氨酰胺酶结合阻止GSL1活化,但对经无机磷酸盐激活的谷氨酰胺酶作用效力明显降低[6]。BPTES是一种有效的、非竞争性的特异性GLS1抑制剂,BPTES与谷氨酰胺酶结合使其靠近催化位点的关键环发生剧烈构象改变从而抑制谷氨酰胺酶活性,而且其活性不受无机磷酸盐影响[10]。然而因BPTES效力中等、代谢稳定性较差以及溶解度低限制了其临床应用潜力。CB-839是一种新型可逆性的非竞争性谷氨酰胺酶抑制剂,首先由Le等[11]提出,作用机制与BPTES相似,但从活性测定结果看,CB-839相对于BPTES具有更强的抗肿瘤增殖活性;并且由于CB-839在BPTES结构基础上进行化学修饰使其比BPTES溶解度更大,亲和力更强[9]。

3 谷氨酰胺酶新型抑制剂CB-839抗肿瘤活性研究进展

3.1 CB-839抗肿瘤机制及特点

大部分肿瘤具有“谷氨酰胺成瘾”特性,但并非所有肿瘤细胞均依赖谷氨酰胺,谷氨酰胺酶与丙酮酸羧化酶之间存在补偿关系,当谷氨酰胺浓度较低而丙酮酸作为癌细胞中补充TCA循环的前体物质时,丙酮酸羧化酶进行诱导反应,此时肿瘤细胞更依赖于葡萄糖而非谷氨酰胺沉默[11]。因此,靶向谷氨酰胺治疗肿瘤时需考虑这种关系。

谷氨酰胺抑制剂抗肿瘤作用机制:1)饥饿作用:通过抑制肿瘤细胞对谷氨酰胺的摄取及利用,从而阻断肿瘤细胞能量及前体物质来源。但有研究表明CB-839治疗和谷氨酰胺剥夺的效应存在差异[12-13],说明CB-839诱导一组特定的分子效应,这些效应与通过从细胞中提取全部或部分谷氨酰胺诱导的分子效应不同。2)破坏细胞内外氧化还原稳态:谷氨酰胺是合成谷胱甘肽和NADPH的重要前体物质,保护肿瘤细胞免受活性氧ROS破坏,维持细胞内外环境的氧化还原稳态[14]。3)通过影响癌基因调节肿瘤信号传导通路:谷氨酰胺可通过双向转运蛋白SLC7A5/SLC3A2[15]以及进入细胞内的亮氨酸来激活mTORC1,驱动致癌因子的翻译,抑制自噬和增强脂质生物合成而有利于肿瘤发生[16]。癌信号(如c-Myc、Ras等)和谷氨酰胺代谢密切相关。致癌基因MYC是GLUT1、SLC1A5、SLC38A1和GLS的转录调节因子,厄洛替尼和CB-839联合应用不仅降低了肿瘤中MYC蛋白水平,也相应降低其下游靶标的蛋白质水平[17]。4)抑制细胞自噬:自噬在癌症发生发展中依赖环境发挥作用:虽然自噬可以通过去除异常蛋白质和损伤细胞器来抑制肿瘤的发生,其可通过为既定癌症细胞生长和存活提供底物来促进细胞生长[18]。谷氨酰胺可通过激活mTORC1,抑制AMBRA1和TRAF6的相互作用来控制ULK1泛素化,从而抑制自噬[19];此外,由于ROS是自噬诱导剂,谷氨酰胺还可通过谷胱甘肽和NADPH消除ROS来抑制自噬[20]。肿瘤细胞对CB-839敏感性的相关因素:1)肿瘤细胞对谷氨酰胺的依赖程度。2)细胞内谷氨酸和谷氨酰胺水平。3)GAC表达量。

CB-839对三阴性乳腺癌[21]、神经胶质瘤[22]和多发性骨髓[12]等多种肿瘤均具有抗增殖活性。在胶质瘤和白血病中存在异柠檬酸脱氢酶(IDH)高频突变,IDH突变将影响谷氨酰胺代谢途径,最终导致染色质高度甲基化,这种甲基化影响正常细胞分化,导致未成熟细胞增殖,引发脑部肿瘤发生[23]。用CB-839处理IDH1野生型和突变体神经胶质瘤细胞系,无论IDH1突变状态如何,CB-839对更具侵袭性的胶质瘤

衍生细胞系抗生长活性更强[22]。CB-839对耐药小细胞肺癌细胞在极低浓度作用下即存在强杀伤作用，并可诱导细胞自噬作用[24]，靶向谷氨酰胺酶治疗还可抑制肿瘤转化[6]。

3.2 CB-839与靶向药物的联合应用

靶向治疗是在细胞分子水平上，针对肿瘤细胞内部的蛋白分子或基因片段来设计相应的治疗药物，药物通过与特异性靶点结合使肿瘤细胞死亡，而不影响肿瘤周围正常组织细胞，目前已成为癌症治疗的热点。但目前应用的靶向药物多针对致病蛋白或基因形成，且诸多靶向药物对肿瘤细胞能量代谢的影响多是对葡萄糖代谢产生抑制，从而忽略谷氨酰胺对肿瘤细胞生长繁殖的营养支持作用。另一方面，靶向治疗药物虽显示极好的抗肿瘤作用，但在临床中均不可避免出现肿瘤耐药这一问题，近年为解决恶性肿瘤的耐药性，逐渐采用联合用药治疗方案。通过选用不同作用机制的抗癌药物联合给药，不仅能够增强药物疗效、减少用药量，且较大程度地降低了化疗药物带来的不良反应及耐药性，显著提高治疗效果，减轻患者治疗时的痛苦。

CB-839与肿瘤特定靶向治疗药物联用显示出极好的协同作用。mTOR是肿瘤细胞基因突变信号传导通路中的关键效应物质，不仅可以激活下游信号通路从而促进肿瘤生长、存活和侵袭转移[25]，还可介导肿瘤细胞对特异性激酶靶向治疗药物产生耐药[26]，mTOR已成为抗肿瘤的一个重要靶点。mTOR靶向抑制剂可显著抑制肿瘤细胞葡萄糖消耗，但谷氨酰胺酵解代偿性增强，GLS的表达增加，使肿瘤细胞能够在mTOR靶向治疗中存活，说明GLS可促进细胞对mTOR靶向治疗获得性耐药，而RNA干扰下调GSL表达或使用CB-839可增加mTOR靶向治疗肿瘤细胞的敏感性，并协同抑制体内肿瘤生长，在胶质母细胞瘤[27]和卵巢癌[28]中均得到证实。在EGFR突变肺腺癌、EGFR突变非小细胞肺癌[17,29]体外及异种移植模型中，CB839与EGFR酪氨酸激酶抑制剂（EGFRi）联用，EGFR和GLS的双重抑制诱导了强烈的能量应激，刺激AMPK活化和诱导自噬，引起代谢危象，抗肿瘤作用较单项靶向治疗药物显著增强。Gregory等[30]研究发现，与谷氨酰胺酶抑制剂CB-839作用相似，FLT3抑制剂AC220可使FLT3突变的AML细胞谷氨酰胺摄取减少，而Gallipoli等[31]最近的研究结果表明FLT3酪氨酸激酶抑制剂可显著降低糖酵解，但不影响FLT3 ITD细胞中的谷氨酰胺摄取，谷氨酰胺代谢支持酪氨酸激酶抑制剂作用FLT3 ITD细胞应激状态下细胞线粒体功能和氧化还原稳态。但二者研究结果均表明当CB-839与AC220联合使用时，细胞内谷氨酰胺水平显著下降，相应的使抗氧化因子谷胱甘肽产生减少，诱导线粒体活性氧物质，并通过细胞凋亡导致活力丧失。在源自患者的异种移植AML小鼠模型中，CB-839促进AC220白血病细胞消除，并显著改善存活。另外，CB-839靶向谷氨酰胺代谢可通过增强蛋白酶体抑制剂（PI）诱导PI耐药多发性骨髓瘤细胞的ER应激信号传导，从而协同促进细胞凋亡，其中与第二代PI卡菲佐米的协同作用最强[12]。

CB-839不仅可协同靶向药物发挥更强的抗肿瘤作用，在小鼠模型的临床前研究中也显示出良好的耐受性，未观察到体重减轻或毒性[21]。对于局部晚期、转移性和（或）难治性实体瘤及血液系统肿瘤患者，CB-839正在开放式Ⅰ期临床试验中被评估（NCT02071862，NCT02071888，NCT02771626）。

4 结语

代谢途径相关酶作为癌症治疗的潜在靶向药物的研究逐年增加，谷氨酰胺代谢与肿瘤发生发展密切相关，GSL作为谷氨酰胺代谢过程中的关键酶受到越来越多的关注，前期用于诸多肿瘤模型且疗效确切。研究者在开发具有代谢稳定性、优异的药效学和选择性、无毒的小分子谷氨酰胺酶抑制剂方面投入了大量时间，CB-839因其分子量小，具有良好的口服生物利用度，时间依赖性和缓慢可逆的动力学等诸多优势从众多GSL抑制剂中脱颖而出。除了上述多种肿瘤，CB-839的抗肿瘤作用在肾上皮细胞[9]、软组织肉瘤[32]等也得到证实，目前已进入临床试验研究阶段，有望用于临床中协同肿瘤化疗药物作用，优化组合结构，减少不良反应，解决耐药的难题。

参考文献

[1] Tarrado-Castellarnau M, de Atauri P, Cascante M. Oncogenic regulation of tumor metabolic reprogramming[J]. Oncotarget, 2016, 7(38):62726-62753.

[2] Damiani C, Colombo R, Gaglio D, et al. A metabolic core model elucidates how enhanced utilization of glucose and glutamine, with enhanced glutamine-dependent lactate production, promotes cancer cell growth: The WarburQ effect[J]. PLoS Comput Biol, 2017, 13(9): e1005758.

[3] Choi YK, Park KG. Targeting glutamine metabolism for cancer treatment [J]. Biomol Ther (Seoul), 2018, 26(1):19-28.

[4] Qu X, Sun J, Zhang Y, et al. c-Myc-driven glycolysis via TXNIP suppression is dependent on glutaminase-MondoA axis in prostate cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 504(2):415-421.

[5] Son J, Lyssiotis CA, Ying H, et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway[J]. Nature, 2013, 496(7443):101-105.

[6] Wang JB, Erickson JW, Fuji R, et al. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation[J]. Cancer Cell, 2010, 18(3): 207-219.

[7] Katt WP, Lukey MJ, Cerione RA. A tale of two glutaminases: homol-

ogous enzymes with distinct roles in tumorigenesis[J]. Future Med Chem, 2017, 9(2):223-243.

[8] Liu J, Zhang C, Lin M, et al. Glutaminase 2 negatively regulates the PI3K/AKT signaling and shows tumor suppression activity in human hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2014, 5(9):2635-2647.

[9] Ramachandran S, Pan CQ, Zimmermann SC, et al. Structural basis for exploring the allosteric inhibition of human kidney type glutaminase [J]. Oncotarget, 2016, 7(36):57943-57954.

[10] Katt WP, Ramachandran S, Erickson JW, et al. Dibenzophenanthridines as inhibitors of glutaminase C and cancer cell proliferation[J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(6):1269-1278.

[11] Le A, Lane AN, Hamaker M, et al. Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells[J]. Cell Metab, 2012, 15(1):110-121.

[12] Thompson RM, Dytfeld D, Reyes L, et al. Glutaminase inhibitor CB-839 synergizes with carfilzomib in resistant multiple myeloma cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(22):35863-35876.

[13] Bajpai R, Matulis SM, Wei C, et al. Targeting glutamine metabolism in multiple myeloma enhances BIM binding to BCL-2 eliciting synthetic lethality to venetoclax[J]. Oncogene, 2016, 35(30):3955-3964.

[14] Lee JI, Kang J, Stipanuk MH. Differential regulation of glutamate-cysteine ligase subunit expression and increased holoenzyme formation in response to cysteine deprivation[J]. Biochem J, 2006, 393(Pt 1):181-190.

[15] van Geldermalsen M, Wang Q, Nagarajah R, et al. ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer[J]. Oncogene, 2016, 35(24):3201-3208.

[16] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(1): 21-35.

[17] Momcilovic M, Shackelford DB. Dual targeting of EGFR and glutaminase in lung cancer[J]. Mol Cell Oncol, 2018, 5(3):e1297883.

[18] White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(6):401-410.

[19] Nazio F, Strappazzon F, Antonioli M, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(4):406-416.

[20] Dewaele M, Maes H, Agostinis P. ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy[J]. Autophagy, 2010, 6(7):838-854.

[21] Gross MI, Demo SD, Dennison JB, et al. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2014, 13(4):890-901.

[22] Peterse E, Niessen B, Addie RD, et al. Targeting glutaminolysis in chondrosarcoma in context of the IDH1/2 mutation[J]. Br J Cancer, 2018, 118(8):1074-1083.

[23] Molenaar RJ, Botman D, Smits MA, et al. Radioprotection of IDH1-mutated cancer cells by the IDH1-mutant inhibitor AGI-5198[J]. Cancer Res, 2015, 75(22):4790-4802.

[24] 沈伟涛,魏婷.谷氨酰胺酶抑制剂CB-839对耐药小细胞肺癌细胞H69AR的杀伤作用研究[J].中国临床药理学杂志,2018,34(14):1641-1644.

[25] Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways[J]. Nature, 2008, 455(7216):1061-1068.

[26] Tanaka K, Babic I, Nathanson D, et al. Oncogenic EGFR signaling activates an mTORC2-NF-kappaB pathway that promotes chemotherapy resistance[J]. Cancer Discov, 2011, 1(6):524-538.

[27] Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, et al. Compensatory glutamine metabolism promotes glioblastoma resistance to mTOR inhibitor treatment[J]. J Clin Invest, 2015, 125(4):1591-1602.

[28] Guo L, Zhou B, Liu Z, et al. Blockage of glutaminolysis enhances the sensitivity of ovarian cancer cells to PI3K/mTOR inhibition involvement of STAT3 signaling[J]. Tumour Biol, 2016, 37(8):11007-11015.

[29] Momcilovic M, Bailey ST, Lee JT, et al. Targeted Inhibition of EGFR and Glutaminase Induces Metabolic Crisis in EGFR Mutant Lung Cancer[J]. Cell Rep, 2017, 18(3):601-610.

[30] Gregory MA, Nemkov T, Reisz JA, et al. Glutaminase inhibition improves FLT3 inhibitor therapy for acute myeloid leukemia[J]. Exp Hematol, 2018, 58:52-58.

[31] Gallipoli P, Giotopoulos G, Tzelepis K, et al. Glutaminolysis is a metabolic dependency in FLT3(ITD) acute myeloid leukemia unmasked by FLT3 tyrosine kinase inhibition[J]. Blood, 2018, 131(15):1639-1653.

[32] Sheikh TN, Patwardhan PP, Cremers S, et al. Targeted inhibition of glutaminase as a potential new approach for the treatment of NF1 associated soft tissue malignancies[J]. Oncotarget, 2017, 8(55):94054-94068.

（2019-03-18收稿）
（2019-04-18修回）
（编辑：郑莉 校对：邢颖）

作者简介

廖英 专业方向为血液病诊断与治疗。
E-mail：543396578@qq.com