

## 二氢乳清酸脱氢酶作为抗肿瘤靶点的研究进展

刘力超<sup>1,2</sup> 董 振<sup>2</sup> 胡焕荣<sup>1,2</sup> 刘亚玲<sup>1\*</sup> 崔红娟<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>河北医科大学第三附属医院皮肤科, 石家庄 050051; <sup>2</sup>西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716)

**摘要** 二氢乳清酸脱氢酶(dihydroorotate dehydrogenase, DHODH)是存在于线粒体内膜的一种含铁的黄素依赖酶, 这种酶催化嘧啶核苷酸从头合成途径的第4步反应。而嘧啶核苷酸可用于DNA、RNA、糖蛋白和磷脂生物合成, 对于细胞代谢和细胞增殖至关重要。近年来的研究表明, DHODH与多种肿瘤的发生、发展密切相关, 抑制或下调DHODH可以降低肿瘤细胞增殖, 诱导其凋亡或者增加其他靶点药物的抗肿瘤效果。该文结合所在实验室目前的研究成果及进展, 就DHODH作为治疗恶性肿瘤靶点的相关机制及当前DHODH抑制剂的研究进展作一综述。

**关键词** 二氢乳清酸脱氢酶; 肿瘤; DHODH抑制剂; 分子靶向治疗; 从头合成途径

### Advances in DHODH: A Target for Treating Tumors

Liu Lichao<sup>1,2</sup>, Dong Zhen<sup>2</sup>, Hu Huanrong<sup>1</sup>, Liu Yaling<sup>1\*</sup>, Cui Hongjuan<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Dermatology, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Abstract** Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) is the fourth enzyme of pyrimidine nucleotide *de novo* synthesis that catalyzes the conversion of dihydroorotate to orotate. Pyrimidine bases are essential for cellular metabolism and cell proliferation, and are considered as important precursors used in the biosynthesis of DNA, RNA, glycoproteins and phospholipids. In recent years, more and more studies confirmed that the expression of *DHODH* gene was associated with the development of a variety of tumors. Therefore, DHODH had some research prospects as a new anticancer target. Based on research achievements and advances of our laboratory, we depicted the related mechanisms of DHODH in cancer treatment and the research progress of DHODH inhibitors in this review.

**Keywords** dihydroorotate dehydrogenase; cancer; DHODH inhibitor; molecular targeted therapy; *de novo* synthesis

近年来, 肿瘤生物学的研究表明, 细胞信号转导通路异常在肿瘤恶性进程中起着重要的作用。抗肿瘤药物也从最初的细胞毒性药物逐渐转变为针对肿瘤发生、发展过程各环节中靶点的低毒、高效的特异性分子靶向抗肿瘤药物。与正常细胞相

比, 肿瘤细胞内核酸的代谢存在显著差异, 而这种差异与肿瘤的恶性程度及其预后有着密切的关系<sup>[1]</sup>。二氢乳清酸脱氢酶(dihydroorotate dehydrogenase, DHODH) (EC 1.3.3.1)存在于人类线粒体内膜, 是一种含铁的黄素依赖酶, 在嘧啶从头合成途径中起着

收稿日期: 2015-12-23 接受日期: 2016-03-28

国家自然科学基金青年项目(批准号: 81502574、31501100)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18533112933, Fax: 0311-87023626, E-mail: lzling\_liu@126.com; Tel: 18523178903, Fax: 023-68251128, E-mail: hongjuan.cui@gmail.com, hcui@swu.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81502574, 31501100)

\*Corresponding author. Tel: +86-18533112933, Fax: +86-311-87023626, E-mail: lzling\_liu@126.com; Tel: +86-18523178903, Fax: +86-23-68251128, E-mail: hongjuan.cui@gmail.com, hcui@swu.edu.cn

网络出版时间: 2016-05-30 10:58:32

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160530.1058.002.html>

关键的作用<sup>[2]</sup>。DHODH抑制剂影响嘧啶合成,早在1959年就被证明可以抑制肿瘤<sup>[3]</sup>。近年来,不论是在体外细胞培养还是动物模型研究中,DHODH的失活或者下调可以明显抑制肿瘤细胞的增殖,尤其是黑色素瘤<sup>[4]</sup>。DHODH可能是潜在的肿瘤治疗靶点,重新受到了人们的关注。本文就DHODH在肿瘤中的作用及其抑制剂的研究进展进行综述。

## 1 DHODH简介

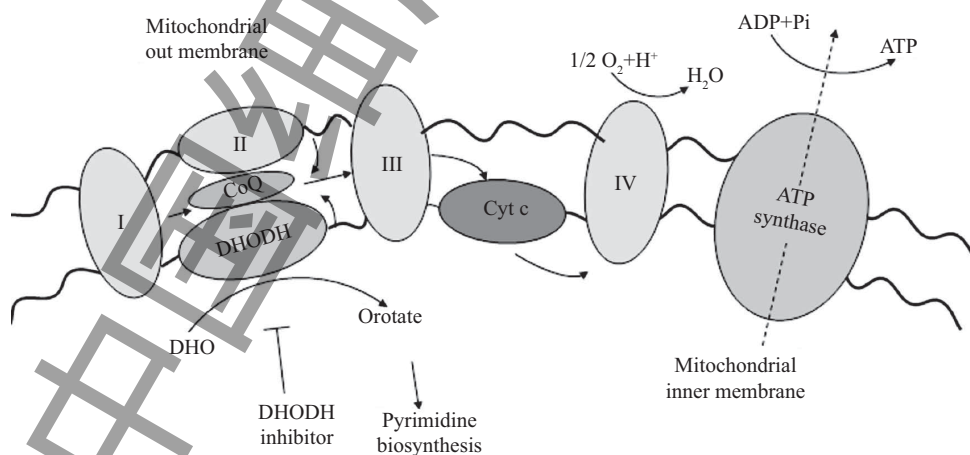
### 1.1 DHODH的结构

DHODH基因位于人类染色体16q22,开放阅读框(open reading frame, ORF)全长1 191 bp,编码一个含有397个氨基酸序列的蛋白质<sup>[2]</sup>。在原核生物中,DHODH(由*pyrD*基因编码)位于胞质膜内侧;在某些酵母,如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,该酶(由*URA1*编码)位于胞质中;在其他更高等的动物中,则位于线粒体内膜的外表面。自然界中,DHODH根据其氨基酸顺序、辅酶种类、在细胞中的定位被分为两大家族<sup>[5]</sup>。一类位于胞质或者胞质膜内侧,存在于原核生物及低等真核生物体内,其电子受体为延胡索酸酯或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD),这一家族又进一步被划分为1A、1B、1S。1A为一类含有半胱氨酸残基作为其活性部位并使用延胡索酸酯作为其电子受体的同二聚体。1B为由黄素单核苷酸(flavin mononucle-

otide, FMN)、铁硫化合物及黄素二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)组成的异四聚体,其电子受体为NAD。1S则以辅酶Q和分子氧作为电子受体。另一类位于哺乳动物和某些原生动物的线粒体内膜上,以辅酶Q作为电子受体。人类二氢乳清酸脱氢酶(hDHODH)属于第二类,主要由位于C-端和N-端的两个结构域组成。DHODH的C-端由 $\alpha$ 螺旋围绕以 $\alpha/\beta$ 折叠和8个平行排列的 $\beta$ 螺旋构成的支架组成,是氧化还原反应的结合位点,辅助因子黄素单核苷酸位于此处。N-端为由两个 $\alpha$ 螺旋,即由一个短氨基酸环连接的 $\alpha 1$ 与 $\alpha 2$ 组成的结构域,为辅酶Q的结合位点<sup>[6]</sup>。

### 1.2 DHODH的功能

DHODH在生物体内催化嘧啶核苷酸合成的氧化还原反应,它是核酸中嘧啶核苷酸合成的限速酶,催化嘧啶核苷酸从头合成途径中的第4步反应。如图1所示,在人的线粒体内膜中,DHODH利用黄素作为氧化还原因子,催化二氧乳酸盐(dihydroorotate, DHO)转化为乳酸盐(orotate, ORO)。在其介导的还原反应中,电子转移到FMN并转化成了二氢黄素单核苷酸(dihydroflavin mononucleotide, FMNH<sub>2</sub>)。除此之外,DHODH还与线粒体呼吸链(mitochondrial respiratory chain, MRC)功能密切相关,抑制DHODH可以降低线粒体内膜上的辅酶Q,进而使线粒体呼吸链复合体III功能紊乱<sup>[7]</sup>。DHODH可能是毒性活性



I: NADH-辅酶Q还原酶; II: 琥珀酸-辅酶Q还原酶; III: 辅酶Q-细胞色素c还原酶; IV: 细胞色素c氧化酶。

I: NADH-coenzyme Q reductase; II: succinate-coenzyme Q reductase; III: coenzyme Q-cytochrome reductase; IV: cytochrome c oxidase.

图1 DHODH在线粒体中的定位及在线粒体呼吸链和嘧啶合成中的功能

Fig.1 Location of DHODH in the inner mitochondrial membrane and its function on respiratory chain and pyrimidine biosynthesis

氧的来源之一<sup>[8]</sup>。另有研究发现, *DHODH*基因突变会引起米勒综合征(Miller syndrome), 又称轴后肢端面骨发育不全(postaxial acrofacial dystosis), 是一种罕见的遗传病<sup>[9]</sup>。

## 2 DHODH与恶性肿瘤

嘧啶核苷酸为生物体内合成DNA、RNA、糖蛋白和磷脂所必需, 因此, 嘧啶核苷酸的合成对细胞的增殖及新陈代谢至关重要。在大多数生物体内, 嘧啶核苷酸的合成有两个途径, 一种为从头合成途径, 一种为补救途径。在处于静止期或者已经完全分化的细胞中, 嘧啶核苷酸合成主要由补救途径产生<sup>[10]</sup>; 而在肿瘤细胞中, 嘧啶核苷酸需要量远远大于正常细胞需要量, 其合成主要依靠从头合成途径<sup>[11-12]</sup>。因此, 从理论上来说, 抑制DHODH可以阻断新生嘧啶核苷酸的合成, 致使DNA(含腺嘧啶和胞嘧啶)、RNA(含尿嘧啶和胞嘧啶)、糖蛋白和磷脂等生物合成产生障碍, 从而引起细胞周期阻滞, 抑制细胞的异常增殖<sup>[13]</sup>。

在早期的研究中发现, *DHODH*在白血病细胞中活性明显增高<sup>[3]</sup>。随后, 在缺氧培养的艾氏腹水瘤细胞中利用抗代谢药物(dihydro-5-azaorotic acid)能够抑制DHODH的活性, 并抑制了细胞增殖<sup>[4]</sup>, 而且其特异性抑制剂布喹那(brequinar)能够明显抑制异体移植的头颈鳞状细胞癌的增殖<sup>[15]</sup>。截至目前, *DHODH*已被证明与多种肿瘤, 如甲状腺髓样癌<sup>[16]</sup>、乳腺癌<sup>[17]</sup>、多发性骨髓瘤<sup>[18]</sup>、慢性淋巴细胞白血病<sup>[19]</sup>、神经母细胞瘤<sup>[20]</sup>、结肠癌<sup>[21]</sup>、前列腺癌<sup>[22]</sup>及皮肤肿瘤<sup>[4]</sup>的发生、发展密切相关, 有望成为治疗癌症的分子靶标。

### 2.1 DHODH与多发性骨髓瘤

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种淋巴细胞恶性增生性疾病, 主要侵犯骨髓, 占血液系统恶性肿瘤的10%~20%<sup>[23]</sup>。在有丝分裂原刺激下的淋巴细胞增殖需要大量嘧啶核苷酸, 这些嘧啶核苷酸的合成主要依赖于DHODH。在多发性骨髓瘤细胞生长、增殖中, *DHODH*同样起着关键的作用。在骨髓瘤细胞系中, *DHODH*普遍表达, *DHODH*特异性抑制剂来氟米特(leflunomide)或其活性代谢产物特立氟胺(teriflunomide/aubagio, TFN)处理后, 能够引起骨髓瘤细胞增殖抑制及细胞凋亡, 且通过作用

于Cyclin D2抑制Rb蛋白磷酸化将细胞阻滞在G<sub>1</sub>期; 除此之外, 特立氟胺还引起蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/Akt)、核糖体蛋白S6激酶1(ribosomal S6 kinase 1, S6K1/p70S6K)及真核翻译起始因子4E结合蛋白1(4E-binding protein-1, 4E-BP-1)磷酸化的降低<sup>[18]</sup>。以上研究表明, *DHODH*的表达与多发性骨髓瘤细胞的生长、增殖密切相关, *DHODH*在多发性骨髓瘤的临床诊断与治疗中有广阔的应用前景。

### 2.2 DHODH与慢性淋巴细胞白血病

慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)是一种成熟淋巴细胞克隆增殖性肿瘤, 在西方国家是最常见的成人白血病<sup>[24]</sup>。研究表明, 来氟米特可以将增生活跃的T淋巴细胞及来自于CLL患者的B淋巴细胞阻滞在G<sub>1</sub>期<sup>[25-26]</sup>, 布喹那也能明显抑制白血病细胞系L1210的增殖<sup>[27]</sup>, 这为DHODH抑制剂应用于CLL提供了思路。研究表明, 来氟米特的活性产物A771726能够通过调解JAK/STAT(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription)信号通路阻断CD40L和IL-4介导的细胞增殖, 并使细胞对氟达拉滨更加敏感<sup>[19]</sup>。这表明, *DHODH*抑制剂联合其他药物, 有望提高CLL对某些化疗药物的敏感性。

### 2.3 DHODH与神经母细胞瘤

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是发生于儿童早期的胚胎性肿瘤, 为神经内分泌瘤的一种, 约占儿童肿瘤的12%<sup>[28-29]</sup>。本实验室前期的研究结果表明, 在离体的神经母细胞瘤细胞系中DHODH均有表达, 应用来氟米特处理后, 细胞增殖明显受到抑制, 而且在神经母细胞瘤皮下移植的裸鼠模型中, 来氟米特可显著抑制肿瘤的生长<sup>[20]</sup>。因此, *DHODH*在临床上有望成为神经母细胞瘤治疗的新靶点, 但是目前DHODH在神经母细胞瘤中的研究较少, 其作用机制仍需进一步研究。

### 2.4 DHODH与结肠癌

结肠癌是消化系主要的恶性肿瘤之一, 在世界范围内占男性肿瘤发生率的第三位、女性肿瘤发生率的第二位<sup>[30]</sup>。在早期的结肠癌小鼠实验中, Pizzorno等<sup>[31]</sup>发现, *DHODH*抑制剂布喹那能够增强5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)的抗肿瘤能力。体外实验中, 研究人员通过在结肠癌细胞系中应用siRNA技术干

涉DHODH表达后,上调了肿瘤抑制基因p53的表达,显著抑制了细胞的生长,且外源性尿嘧啶可以阻断这一效应<sup>[32]</sup>。除此之外,具有抑制结肠癌增殖作用的miR-502能够靶标到DHODH的mRNA上,并促使其降解,且miR-502的表达受到p53的反馈调节<sup>[33]</sup>。同时,研究证明,抑制DHODH引发的结肠癌细胞凋亡依赖于p53上调后诱发的MRC复合物Ⅲ的下调<sup>[21]</sup>。种种迹象表明,DHODH可能在结肠癌中起到关键的作用,但是其机制和具体的效应还需要进一步确认。

### 2.5 DHODH与前列腺癌

在世界范围内,前列腺癌是男性肿瘤发生率为第二、死亡率为第五的恶性肿瘤<sup>[30]</sup>。在小鼠异体移植实验中,特立氟胺能够明显抑制前列腺癌细胞的增殖。在体外实验中,特立氟胺能够减少细胞中尿苷水平,降低氧消耗,抑制活性氧产生,减少核仁数量及大小,并使细胞阻滞在S期,而且其抑制作用呈剂量-时间依赖关系<sup>[22]</sup>。这表明,DHODH抑制剂在前列腺癌中扮演的角色非常重要,为前列腺癌化学治疗及预防开辟了新方向。

### 2.6 DHODH与皮肤肿瘤

皮肤肿瘤是一类起源于皮肤组织的肿瘤,其中恶性黑色素瘤(malignant melanoma, MM)是起源于神经嵴黑色素细胞的高度恶性肿瘤,已成为严重危及人民健康的疾病之一。在我国,黑色素瘤多原发于皮肤和黏膜,以肢端最为多见<sup>[34]</sup>。临床上,特立氟胺可以调节角质形成细胞,从而应用于轻度至中度银屑病的治疗<sup>[35]</sup>。在培养的角质形成细胞、人永生表皮细胞、皮肤鳞状细胞癌细胞中检测DHODH,发现在癌变前期及恶性肿瘤细胞中,DHODH的表达高于正常细胞中的三倍<sup>[36]</sup>。在斑马鱼模型中,来氟米特能显著抑制恶性黑色素瘤的生长<sup>[4]</sup>。用DHODH抑制剂特立氟胺处理黑色素瘤,能够降低线粒体跨膜电势,诱发活性氧产生,促进线粒体释放细胞色素c,诱发细胞凋亡<sup>[37]</sup>。除此之外,另一项研究显示,在黑色素瘤细胞系A375中,特立氟胺除了抑制DHODH外,还能够抑制S6K1及嘧啶核苷酸合成通路中的氨基甲酰磷酸合成酶Ⅱ(carbamyl phosphate synthetase II, CPS-II)的活性,从而通过活化S6K1负调控的蛋白胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1, IRS-1),进而反馈激活PI3K和MAPK通

路,AMPK的激活促进细胞周期进入S期,但是因为DHODH及CAD活性被抑制,嘧啶合成受阻,从而使得DNA合成及染色体复制遇到障碍,细胞阻滞在S期<sup>[18]</sup>。当然,来氟米特及其活性代谢物特立氟胺的靶标基因并不限于上述靶标基因,据研究来氟米特能够抑制芳烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)<sup>[38]</sup>,且具有同样的抑制黑色素瘤细胞增殖的作用<sup>[39]</sup>。总之,DHODH是皮肤肿瘤治疗中一个重要的作用靶点,其抑制剂有望成为治疗皮肤肿瘤的药物。

## 3 DHODH抑制剂

抑制DHODH活性可耗竭细胞内的嘧啶核苷酸,从而抑制肿瘤细胞增殖,这预示着DHODH是肿瘤中的潜在治疗靶点。因此,其特异性抑制剂的开发和研究具有重要的意义,近年来相关研究层出不穷。

### 3.1 来氟米特及其类似物

来氟米特是一种5-甲基异恶唑-4-甲酰胺衍生物,是第一个被批准用于临床治疗的DHODH抑制剂<sup>[40]</sup>。其活性代谢产物特立氟胺又称A771726,也于2012年9月被美国FDA(Food and Drug Administration)批准用于多发性硬化的治疗<sup>[41]</sup>。KF778是A771726的衍生物,与A771726相比具有更高的免疫效能及更短的半衰期,是一种高效的新型免疫抑制剂。有研究表明,KF778同时对细胞增殖性疾病有效,此功能主要与视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, pRb)的磷酸化状态有关<sup>[42]</sup>。除此之外,来氟米特类似物LAS-1886323及LAS-186323也可以抑制DHODH活性,进而用于治疗类风湿性关节炎<sup>[43]</sup>。另一种类似物4-SC可用于溃疡性结肠癌、克罗恩病的治疗<sup>[44]</sup>。这些类似物对肝脏毒性都较来氟米特有不同程度的降低。后又通过以5-甲基异恶唑-4-甲酰胺为分子支架的改造,发现了UTL-4系列化合物。此系列化合物基于与来氟米特相同的分子支架,虽然在一定程度上降低了细胞毒性,但相对于来氟米特并没有显著的药理优势。而以5-甲基异恶唑-3-甲酰胺为分子支架的UTL-5系列化合物可以显著降低细胞毒性<sup>[45]</sup>。来氟米特的临床效果已得到肯定,在此基础上研发的低毒、高效化合物能更好地应用于临床。

### 3.2 布喹那及其类似生物

布喹那是一种6-氟-3-甲基-4-喹酸钠盐<sup>[47]</sup>,其作

用靶点如图3所示。布喹那具有广泛药理活性, 分别于1986、1988和1990年进行了用于治疗肿瘤的I期临床试验, 但其骨髓抑制等副作用较大, 一直未被临床批准使用<sup>[15,27,48-49]</sup>。因此, 需要开发细胞毒性更低新型抑制剂以满足临床需求。布喹那类似物KF-20044同样具有抑制DHODH活性的作用, 能够显著抑制骨胶原引起的关节炎<sup>[50]</sup>, 但是其对细胞的毒性目前尚无研究。

### 3.3 喹啉-2-羧酸衍生物

早期的研究发现, 喹啉-4-羧酸(quinoline-4-carboxylic acid)类似物中能够抑制DHODH活性的都具备如下特征: C2位带有笨重的疏水基团; C4位的羧酸及其相应的盐。一项利用比较分子力场分析(comparative molecular field analysis, CoMFA)和比较分子相似性指数(comparative molecular similarity indices, CoMSIA)方法的研究发现, 在喹啉-2-羧胺

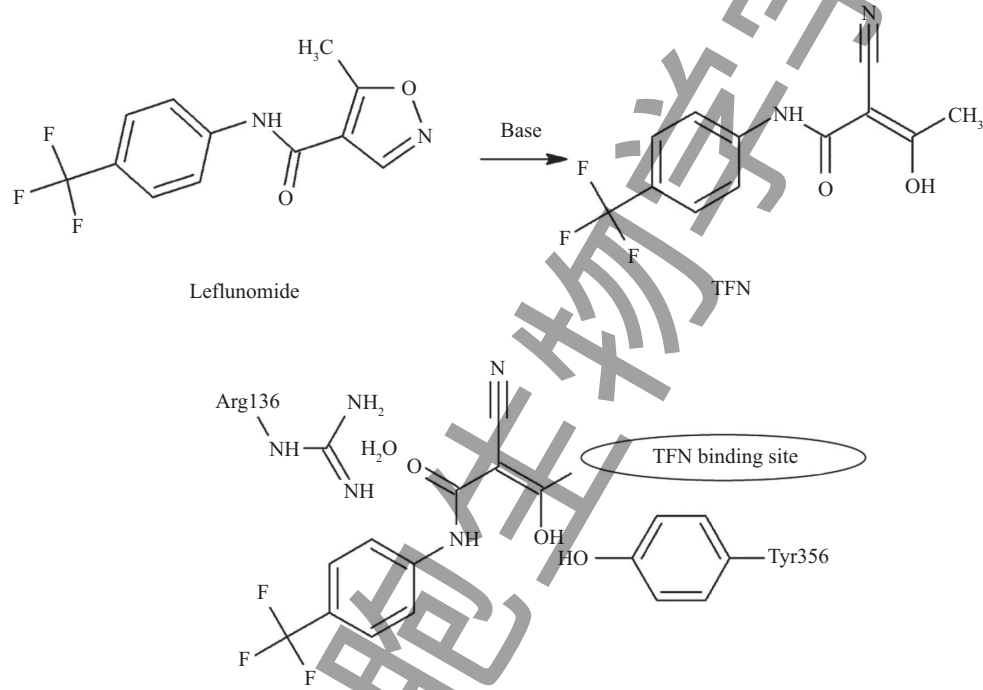


图2 来氟米特、特立氟胺的化学结构式及其与DHODH相互作用的靶点(根据参考文献[46]改编)  
Fig.2 Chemical structure of leflunomide, teriflunomide as well as their interaction binding sites with DHODH (modified from reference [46])

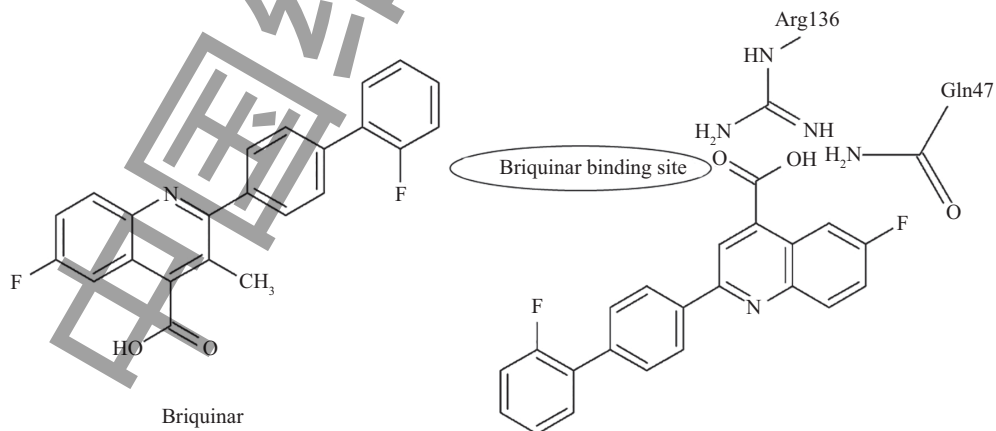


图3 布喹那的化学结构式及其与DHODH相互作用的靶点  
Fig.3 Chemical structure of briquinar as well as it's interaction binding site with DHODH

(quinoline-2-carboxamide)的衍生物中, 喹啉环上C6位带有 $-OCH_3$ 、 $-OCF_3$ 和 $-CF_3$ 的化合物具有很好的DHODH抑制活性<sup>[51-52]</sup>, 其基本结构如图4所示。此类化合物尤其是针对多种肿瘤细胞系方面已得到证实<sup>[51]</sup>, 但尚未进行临床试验, 其临床效果有待进一步研究。

### 3.4 苯并咪唑甲酰胺或苯并咪唑羧酸衍生物

自发现苯并咪唑类化合物多腺苷二磷酸核糖聚合酶-1(poly-ADP-ribose polymerase-1, PARP-1)和DHODH具有双重抑制作用以来, 通过对苯并咪唑环的改造, 得到一系列DHODH抑制活性的化合物, 并通过结构优化和构效关系分析得到了4种具有PARP-1与DHODH双重抑制活性的化合物, 如图5所示<sup>[1]</sup>。PARP-1与DHODH一样在DNA复制和修复中起着相似的作用, 因此这种双重抑制剂有望对肿瘤有更好的效果。

### 3.5 氨基烟酸或氨基异烟酸衍生物

2012年的一项研究发现了一系列氨基烟酸和异烟酸衍生物可以作为人DHODH抑制剂, 作者详细描述了DHODH抑制剂的制备方法<sup>[53]</sup>。另外, 针对该化合物用于治疗风湿性关节炎、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、多发性硬化症、韦格纳肉芽肿病、系统性红斑狼疮、牛皮癣等的具体用途, 他们还将该化合物进行了改造, 其代表化合物如图6所示。

### 3.6 4-羟基香豆素类、氯灭酸类及氨基酸类衍生物

Fritzson等<sup>[54]</sup>通过虚拟筛选发现了3种不同类型的DHODH抑制剂, 分别为4-羟基香豆素类、氯灭酸类和氨基酸类(图7), 这3种抑制剂包含具有识别功能的结构。其中, 氨基酸类对人类DHODH抑制作用优于其他2类。Active Biotech公司描述了一系列氨基酸衍生物具有抑制DHODH活性功能, 具有抗移植排斥反应作用, 最具代表性的为ABR-222417和ABR-

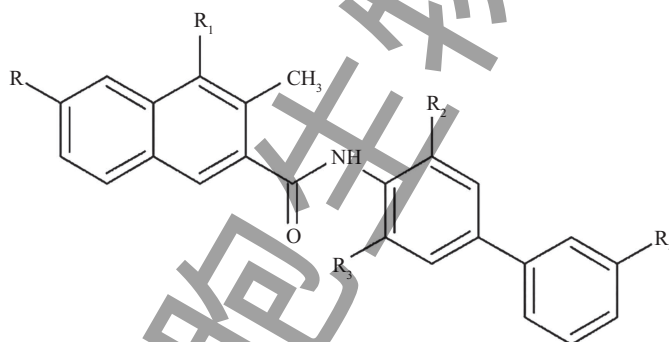


图4 喹啉-2-羧酸衍生物基本结构

Fig.4 Basic structure of quinoline-2-carboxylic acid

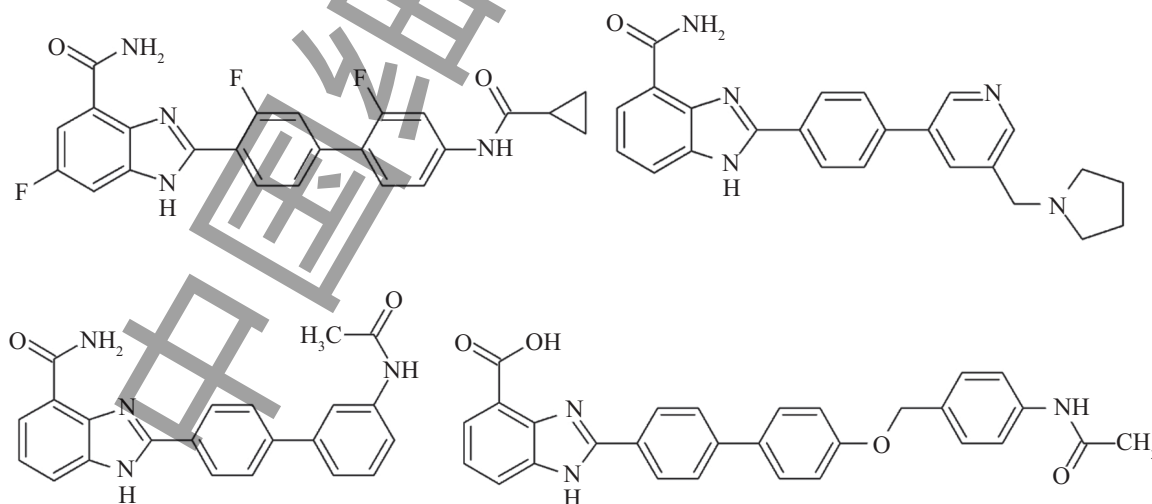


图5 苯并咪唑衍生物

Fig.5 Benzimidazole derivatives

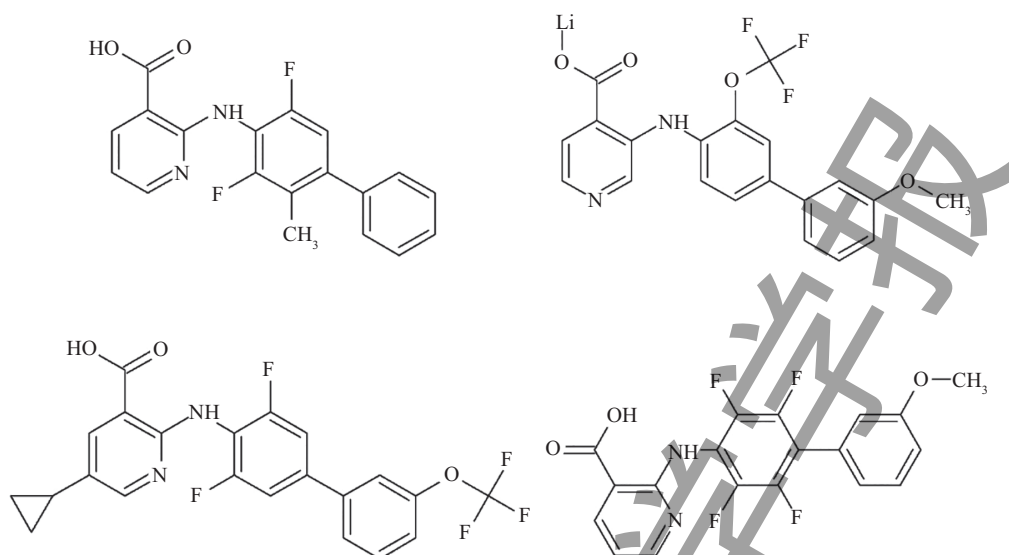


图6 氨基烟酸和异烟酸衍生物

Fig.6 Amino acid and isonicotinic acid derivatives

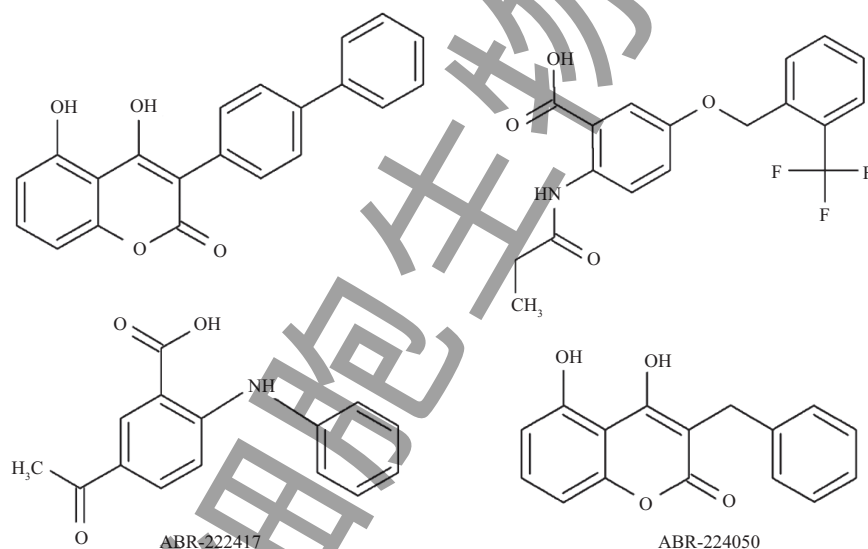


图7 氨基酸衍生物

Fig.7 Anthranilic acid derivatives

224050(图7), 这两种化合物都是N-(烷基羰基)氨基酸的氨基对位被苯酚及含其他官能团的苯酚取代<sup>[55]</sup>。

### 3.7 氨基苯甲酸衍生物

通过虚拟筛选和X光晶体研究发现, 一系列氨基苯甲酸衍生物可以作为DHODH抑制剂<sup>[56]</sup>, 这类化合物的作用机制为苯甲酸苯环占领由FMN和侧链Val134及Try356残基形成的疏水口袋, 如图8所示。通过射线晶体学确定了选定化合物的结合模式, 结果显示, 其与DHODH肽段中Arg136或Tyr365的侧链有氧键作用, 与Val134和Tyr356有疏水作用<sup>[57]</sup>。基于

结构活性分析, 这类DHODH抑制剂有望对肿瘤及免疫紊乱疾病有较好的疗效。

### 3.8 2(3-Alkoxy-1H-pyrazol-1-yl)azines衍生物

2(3-Alkoxy-1H-pyrazol-1-yl)azines衍生物这种DHODH抑制剂的设计是基于测定麻疹病毒复制的试验<sup>[58]</sup>, 其衍生物如图9所示, 对人类DHODH选择性较高。通过酶活性测定等方法分析其活性优于布喹那、特立氟胺, 并且通过作用于Jurkat细胞系证明这类衍生物对肿瘤细胞增殖具有较强的抑制作用。但其研究目前仅限于实验室中, 尚无进一步的研究。

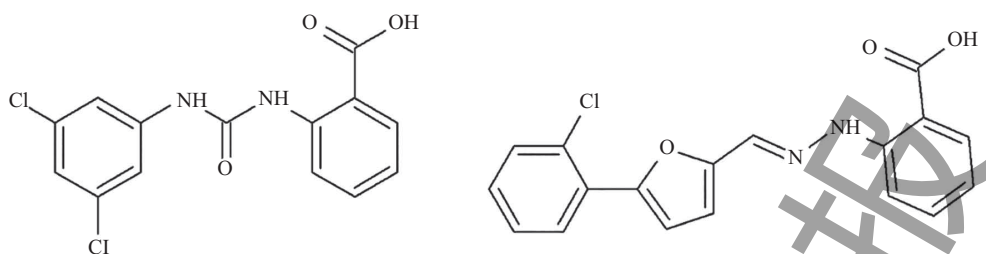


图8 氨基苯甲酸衍生物

Fig.8 Aminobenzoic acid derivatives

### 3.9 微生物来源

有研究利用高通量筛选方法从4 560株真菌菌株中筛选阳性菌株, 并对阳性菌株的发酵产物进行分离纯化, 获得2个活性化合物如图10所示<sup>[59]</sup>。经理化性质和核磁、质谱数据分析, 确定化合物F01WB-1315A为壳二孢呋喃酮(Ascofuranone), 化合物F01WB-1315B为壳二孢氯素(Ascochlorin)。对其进行DHODH抑制活性测定, F01WB-1315A的 $IC_{50}$ 值为 $0.07 \mu\text{g/mL}$ , F01WB-1315B的 $IC_{50}$ 值为 $0.51 \mu\text{g/mL}$ 。这为进一步开发效果好且毒副作用小的DHODH抑制剂打下了一定的基础。

### 3.10 孢呋喃酮中药成分

虎杖中主要含有蒽醌和二苯乙烯类化合物, 包括白藜芦醇以及虎杖苷(白藜芦醇苷), 有研究将

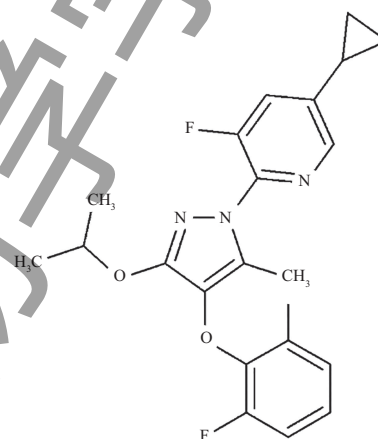
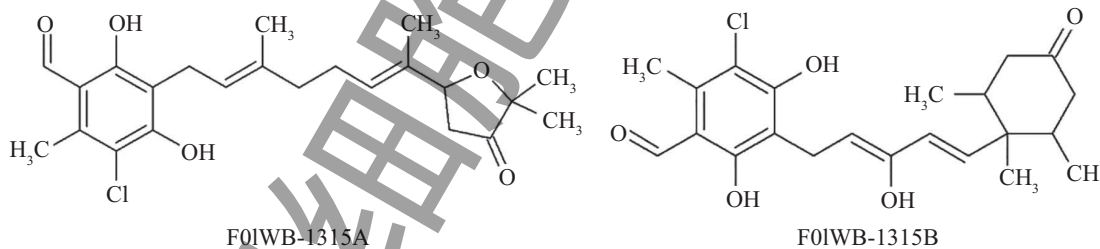


图9 2(3-Alkoxy-1H-pyrazol-1-yl)azines衍生物

Fig.9 2(3-Alkoxy-1H-pyrazol-1-yl) azines derivatives



F01WB-1315A

F01WB-1315B

图10 F01WB-1315A和F01WB-1315B

Fig.10 F01WB-1315A and F01WB-1315B

DHODH与虎杖中48个化合物进行对接, 发现虎杖中的大黄素-1-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、大黄素-1-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(如图11所示)等6种化合物对DHODH具有较强的抑制作用<sup>[60]</sup>。这提示, 从传统具有抗肿瘤、抗风湿类中草药中分离天然化合物结构为研发新型DHODH抑制剂提供了一种新途径。

就理论而言, 任何可以与底物或辅因子竞争性结合的化合物都可以阻断DHODH的作用。早期曾有以二氢乳清酸类似物作为抑制剂的研究报道,

该类抑制剂竞争结合在C-末端的氧化还原位点上。但近年来对DHODH抑制剂的研究主要针对CoQ结合位点<sup>[5,61]</sup>。除了上述的这些化合物, 目前尚有一些其他的DHODH抑制剂, 主要包括喹诺酮及其衍生物<sup>[62]</sup>、三唑并嘧啶衍生物、苯醌类衍生物、三氟甲基喹啉衍生物、芳香族酰胺化合物、环状脂肪族和芳香族羧酸酰胺衍生物、环戊烯羧酸酰胺衍生物、环戊烯二羧酸酰胺衍生物、环丙烷羰基衍生物、4-羟基-喹啉-3-酰胺衍生物、2-苯基喹啉-4-羧酸衍



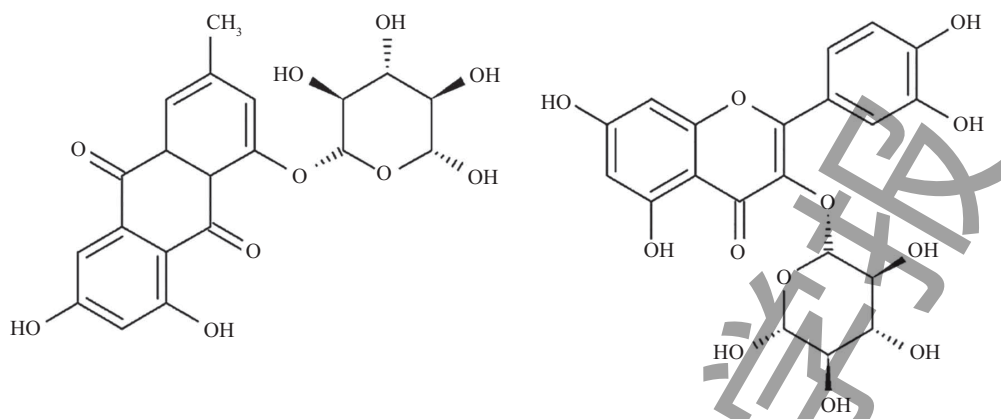


图11 虎杖中的有效成分

Fig.11 *Polygonum cuspidatum* extract

生物、三联苯羧酰胺衍生物、三联苯羧酰胺衍生物<sup>[5]</sup>等。这些DHODH抑制剂有些并不是人类DHODH的特异性抑制剂,但也在一定程度上对设计人类DHODH特异性抑制剂提供了反向的思考。

#### 4 结语

核酸代谢异常是肿瘤细胞增殖异常的重要基础。因此,如果能够抑制肿瘤细胞中异常的核酸代谢,将有可能逆转肿瘤的异质性,降低肿瘤的恶性。DHODH抑制剂抑制嘧啶核苷酸从头合成途径,影响细胞周期及线粒体功能,从而抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡。近年来,多种研究证明,DHODH抑制剂能够有效抑制多种不同类型肿瘤细胞的生长和增殖,并与其他抗肿瘤靶点具有协同或者抑制作用,因此可能是一类潜在的癌症治疗药物。虽然目前DHODH作为药物靶标应用于恶性肿瘤的临床治疗还有很长的路要走,但是DHODH抑制剂,尤其是来氟米特,作为一种免疫抑制剂已广泛应用于临床治疗风湿性疾病,其安全性良好。此外,对于新型DHODH抑制剂的设计及传统DHODH抑制剂的改良方面的研究也从未间断。

就目前的研究背景来看,DHODH作为抗肿瘤靶点的研究虽然方兴未艾,但是其作用机制尚不深入,还有很多需要进一步研究的问题:首先,由于代谢通路的改变往往伴随着整个细胞代谢的改变,DHODH介导的核酸代谢通路的改变对其他代谢通路及其他细胞信号通路的影响及其机制尚不明确;其次,DHODH作为一种线粒体酶,参与细胞核酸代谢,同时

可能引起线粒体功能失调,但是关于DHODH在肿瘤细胞线粒体中的具体功能尚不明晰;第三,DHODH抑制剂与其他抗肿瘤药物作用关系尚需进一步研究,从而为多靶点肿瘤的治疗提供新方案;第四,由于肿瘤细胞异质性特别强,且不同肿瘤中的核酸代谢也差异很大,而且肿瘤细胞对代谢改变的适应能力也比较强,如何防止代谢改变后引起的耐药性也值得考虑;最后,DHODH作为肿瘤治疗的靶点,如何利用科学的设计方法来开发一种高效、高特异性、少副作用的小分子抑制剂,也是值得深入研究的课题方向。

#### 参考文献 (References)

- 1 Abdullah I, Chee CF, Lee YK, Thunuguntla SS, Satish Reddy K, Nellore K, *et al.* Benzimidazole derivatives as potential dual inhibitors for PARP-1 and DHODH. *Bioorg Med Chem* 2015; 23(15): 4669-80.
- 2 Barnes T, Parry P, Hart I, Jones C, Minet M, Patterson D. Regional mapping of the gene encoding dihydroorotate dehydrogenase, an enzyme involved in UMP synthesis, electron transport, and superoxide generation, to human chromosome region 16q22. *Somat Cell Mol Genet* 1993; 19(4): 405-11.
- 3 Smith LH Jr, Baker FA. Pyrimidine metabolism in man. I. The biosynthesis of orotic acid. *J Clin Invest* 1959; 38(5): 798-809.
- 4 White RM, Cech J, Ratanasirintraooot S, Lin CY, Rahl PB, Burke CJ, *et al.* DHODH modulates transcriptional elongation in the neural crest and melanoma. *Nature* 2011; 471(7339): 518-22.
- 5 Vyas VK, Ghate M. Recent developments in the medicinal chemistry and therapeutic potential of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2011; 11(12): 1039-55.
- 6 Madej T, Lanczycki CJ, Zhang D, Thiessen PA, Geer RC, Marchler-Bauer A, *et al.* MMDB and VAST<sup>™</sup>: Tracking structural similarities between macromolecular complexes. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(Database issue): D297-303.

- 7 Loffler M, Jockel J, Schuster G, Becker C. Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Mol Cell Biochem* 1997; 174(1/2): 125-9.
- 8 Lakaschus G, Kruger H, Heese D, Loffler M. Evidence from *in vitro* studies that dihydroorotate dehydrogenase may be a source of toxic oxygen species. *Adv Exp Med Biol* 1991; 309A: 361-4.
- 9 Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, *et al.* Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 2010; 42(1): 30-5.
- 10 Mascia L, Turchi G, Bemi V, Ipata PL. Uracil salvage pathway in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1524(1): 45-50.
- 11 Smith CM, Henderson JF. Relative importance of alternative pathways of purine nucleotide biosynthesis in Ehrlich ascites tumor cells *in vivo*. *Can J Biochem* 1976; 54(4): 341-9.
- 12 Tong X, Zhao F, Thompson CB. The molecular determinants of *de novo* nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19(1): 32-7.
- 13 Loffler M, Fairbanks LD, Zameitat E, Marinaki AM, Simmonds HA. Pyrimidine pathways in health and disease. *Trends Mol Med* 2005; 11(9): 430-7.
- 14 Loffler M. On the role of dihydroorotate dehydrogenase in growth cessation of Ehrlich ascites tumor cells cultured under oxygen deficiency. *Eur J Biochem* 1980; 107(1): 207-15.
- 15 Braakhuis BJ, van Dongen GA, Peters GJ, van Walsum M, Snow GB. Antitumor activity of brequinar sodium (Dup-785) against human head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Cancer Lett* 1990; 49(2): 133-7.
- 16 Alhefdhi A, Burke JF, Redlich A, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Leflunomide suppresses growth in human medullary thyroid cancer cells. *J Surg Res* 2013; 185(1): 212-6.
- 17 Bahr HL, Toraih EA, Mohammed EA, Mohammad HM, Ali EA, Zaitone SA. Chemopreventive effect of leflunomide against Ehrlich's solid tumor grown in mice: Effect on EGF and EGFR expression and tumor proliferation. *Life Sci* 2015; 141: 193-201.
- 18 Doscas ME, Williamson AJ, Usha L, Bogachkov Y, Rao GS, Xiao F, *et al.* Inhibition of p70 S6 kinase (S6K1) activity by A77 1726 and its effect on cell proliferation and cell cycle progress. *Neoplasia* 2014; 16(10): 824-34.
- 19 Dietrich S, Kramer OH, Hahn E, Schafer C, Giese T, Hess M, *et al.* Leflunomide induces apoptosis in fludarabine-resistant and clinically refractory CLL cells. *Clin Cancer Res* 2012; 18(2): 417-31.
- 20 Zhu S, Yan X, Xiang Z, Ding HF, Cui H. Leflunomide reduces proliferation and induces apoptosis in neuroblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 2013; 8(8): e71555.
- 21 Khutornenko AA, Dalina AA, Chernyak BV, Chumakov PM, Evstafieva AG. The role of dihydroorotate dehydrogenase in apoptosis induction in response to inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex III. *Acta Naturae* 2014; 6(1): 69-75.
- 22 Hail N Jr, Chen P, Bushman LR. Teriflunomide (leflunomide) promotes cytostatic, antioxidant, and apoptotic effects in transformed prostate epithelial cells: Evidence supporting a role for teriflunomide in prostate cancer chemoprevention. *Neoplasia* 2010; 12(6): 464-75.
- 23 Palumbo A, Bringhen S, Ludwig H, Dimopoulos MA, Blade J, Mateos MV, *et al.* Personalized therapy in multiple myeloma according to patient age and vulnerability: A report of the European Myeloma Network (EMN). *Blood* 2011; 118(17): 4519-29.
- 24 Lim KH, Thomas G, van Beers EJ, Hosman AE, Mourits MP, van Noesel CJ, *et al.* Acute sinusitis and blindness as the first presentation of chronic lymphocytic leukaemia. *Neth J Med* 2014; 72(10): 548-50.
- 25 Lang R, Wagner H, Heeg K. Differential effects of the immunosuppressive agents cyclosporine and leflunomide *in vivo*. Leflunomide blocks clonal T cell expansion yet allows production of lymphokines and manifestation of T cell-mediated shock. *Transplantation* 1995; 59(3): 382-9.
- 26 Ringshausen I, Oelsner M, Bogner C, Peschel C, Decker T. The immunomodulatory drug Leflunomide inhibits cell cycle progression of B-CLL cells. *Leukemia* 2008; 22(3): 635-8.
- 27 Anderson LW, Strong JM, Cysyk RL. Cellular pharmacology of DUP-785, a new anticancer agent. *Cancer Commun* 1989; 1 (6): 381-7. eng.
- 28 Smith MA, Seibel NL, Altekruze SF, Ries LA, Melbert DL, O'Leary M, *et al.* Outcomes for children and adolescents with cancer: Challenges for the twenty-first century. *J Clin Oncol* 2010; 28(15): 2625-34.
- 29 Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010; 362(23): 2202-11.
- 30 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5): E359-86.
- 31 Pizzorno G, Wiegand RA, Lentz SK, Handschumacher RE. Brequinar potentiates 5-fluorouracil antitumor activity in a murine model colon 38 tumor by tissue-specific modulation of uridine nucleotide pools. *Cancer Res* 1992; 52(7): 1660-5.
- 32 He T, Haapa-Paananen S, Kaminsky VO, Kohonen P, Fey V, Zhivotovsky B, *et al.* Inhibition of the mitochondrial pyrimidine biosynthesis enzyme dihydroorotate dehydrogenase by doxorubicin and brequinar sensitizes cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene* 2014; 33(27): 3538-49.
- 33 Zhai H, Song B, Xu X, Zhu W, Ju J. Inhibition of autophagy and tumor growth in colon cancer by miR-502. *Oncogene* 2013; 32(12): 1570-9.
- 34 Zhang Y, Zhu S, Yi L, Liu Y, Cui H. Neurotensin receptor1 antagonist SR48692 reduces proliferation by inducing apoptosis and cell cycle arrest in melanoma cells. *Mol Cell Biochem* 2014; 389(1/2): 1-8.
- 35 Nash P, Thaci D, Behrens F, Falk F, Kaltwasser JP. Leflunomide improves psoriasis in patients with psoriatic arthritis: An in-depth analysis of data from the TOPAS study. *Dermatology* 2006; 212(3): 238-49.
- 36 Hail N Jr, Chen P, Kepa JJ, Bushman LR, Shearn C. Dihydroorotate dehydrogenase is required for N-(4-hydroxyphenyl) retinamide-induced reactive oxygen species production and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010; 49(1): 109-16.
- 37 Hail N Jr, Chen P, Rower J, Bushman LR. Teriflunomide encourages cytostatic and apoptotic effects in premalignant and malignant cutaneous keratinocytes. *Apoptosis* 2010; 15(10): 1234-46.

- 38 O'Donnell EF, Saili KS, Koch DC, Kopparapu PR, Farrer D, Bisson WH, *et al.* The anti-inflammatory drug leflunomide is an agonist of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One* 2010; 5(10): doi: 10.1371/journal.pone.0013128.
- 39 O'Donnell EF, Kopparapu PR, Koch DC, Jang HS, Phillips JL, Tanguay RL, *et al.* The aryl hydrocarbon receptor mediates leflunomide-induced growth inhibition of melanoma cells. *PLoS One* 2012; 7(7): e40926.
- 40 Alcorn N, Saunders S, Madhok R. Benefit-risk assessment of leflunomide: An appraisal of leflunomide in rheumatoid arthritis 10 years after licensing. *Drug Saf* 2009; 32(12): 1123-34.
- 41 Jeffery DR. Recent advances in treating multiple sclerosis: Efficacy, risks and place in therapy. *Ther Adv Chronic Dis* 2013; 4(1): 45-51.
- 42 Hoppe-Seyler K, Weigand K, Lohrey C, Hoppe-Seyler F, Sauer P. Cellular growth inhibition by FK778 is linked to G1 arrest or S phase accumulation, dependent on the functional status of the retinoblastoma protein. *Int J Mol Med* 2009; 23(3): 415-20.
- 43 Erra M, Moreno I, Sanahuja J, Andres M, Reinoso RF, Lozoya E, *et al.* Biaryl analogues of teriflunomide as potent DHODH inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21(24): 7268-72.
- 44 Herrlinger KR, Diculescu M, Fellermann K, Hartmann H, Howaldt S, Nikolov R, *et al.* Efficacy, safety and tolerability of vidooflumidus in patients with inflammatory bowel disease: the ENTRANCE study. *J Crohns Colitis* 2013; 7(8): 636-43.
- 45 Song Y, Zhang Y, Lee AR, Huang WH, Chen B, Palfey B, *et al.* Comparison of two molecular scaffolds, 5-methylisoxazole-3-carboxamide and 5-methylisoxazole-4-carboxamide. *Curr Pharm Des* 2014; 20(1): 146-52.
- 46 Munier-Lehmann H, Vidalain PO, Tangy F, Janin YL. On dihydroorotate dehydrogenases and their inhibitors and uses. *J Med Chem* 2013; 56(8): 3148-67.
- 47 Palmer AM. Teriflunomide, an inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase for the potential oral treatment of multiple sclerosis. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11(11): 1313-23.
- 48 Chen SF, Ruben RL, Dexter DL. Mechanism of action of the novel anticancer agent 6-fluoro-2-(2'-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)-3-methyl-4-quinolinecarboxylic acid sodium salt (NSC 368390): inhibition of *de novo* pyrimidine nucleotide biosynthesis. *Cancer Res* 1986; 46(10): 5014-9.
- 49 Arteaga CL, Brown TD, Kuhn JG, Shen HS, O'Rourke TJ, Beougher K, *et al.* Phase I clinical and pharmacokinetic trial of Brequinar sodium (DuP 785; NSC 368390). *Cancer Res* 1989; 49(16): 4648-53.
- 50 Kobayashi K, Nakashima A, Nagata H, Nakajima H, Yamaguchi K, Sato S, *et al.* Anti-arthritis effects of KF20444, a new immunosuppressive compound inhibiting dihydroorotate dehydrogenase, on rat collagen-induced arthritis. *Inflamm Res* 2001; 50(1): 24-31.
- 51 Vyas VK, Variya B, Ghate MD. Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel substituted quinoline-2-carboxamide derivatives as human dihydroorotate dehydrogenase (hDHODH) inhibitors and anticancer agents. *Eur J Med Chem* 2014; 82: 385-93.
- 52 Vyas VK, Ghate M. CoMFA and CoMSIA studies on aryl carboxylic acid amide derivatives as dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors. *Eur J Med Chem* 2012; 8(4): 271-82.
- 53 Vyas V, Ghate M. 2D and 3D QSAR study on amino nicotinic acid and isonicotinic acid derivatives as potential inhibitors of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH). *Med Chem Res* 2012; 21(10): 3021-34.
- 54 Fritzon J, Svensson B, Al-Karadaghi S, Walse B, Wellmar U, Nilsson UJ, *et al.* Inhibition of human DHODH by 4-hydroxycoumarins, fennamic acids, and N-(alkylcarbonyl)anthranilic acids identified by structure-guided fragment selection. *ChemMedChem* 2010; 5(4): 608-17.
- 55 Chen J, Xia J, Axelsson B, Fritzon J, Ekberg H, Torngren M, *et al.* An N-(alkylcarbonyl) anthranilic acid derivative prolongs cardiac allograft survival synergistically with cyclosporine A in a high-responder rat model. *Transpl Immunol* 2010; 23(4): 180-4.
- 56 McLean LR, Zhang Y, Degnen W, Peppard J, Cabel D, Zou C, *et al.* Discovery of novel inhibitors for DHODH via virtual screening and X-ray crystallographic structures. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20(6): 1981-4.
- 57 Vyas VK, Ghate M. QSAR study on a series of aryl carboxylic acid amide derivatives as potential inhibitors of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH). *Med Chem* 2013; 9(2): 222-39.
- 58 Lucas-Hourani M, Munier-Lehmann H, El Mazouni F, Malmquist NA, Harpon J, Coutant EP, *et al.* Original 2-(3-Alkoxy-1H-pyrazol-1-yl)azines Inhibitors of Human Dihydroorotate Dehydrogenase (DHODH). *J Med Chem* 2015; 58(14): 5579-98.
- 59 Qi Q, Lu X, Zheng Z, Li Y, Fan Y, Zhu J, *et al.* F01WB-1315 A and B, two dihydroorotate dehydrogenase inhibitors from microbial metabolites. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2009; 49(4): 485-91.
- 60 张明波, 张蕾, 黄婷, 栾泽柱, 郭晏华. 虎杖中二氢乳清酸脱氢酶抑制剂的虚拟筛选. *辽宁中医杂志* (Zhang Mingbo, Zhang Lei, Huang Ting, Luan Zezhu, Guo Yanhua. Liaoning J Traditional Chin Med) 2013; 11: 2326-7.
- 61 Baldwin J, Michnoff CH, Malmquist NA, White J, Roth MG, Rathod PK, *et al.* High-throughput screening for potent and selective inhibitors of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase. *J Biol Chem* 2005; 280(23): 21847-53.
- 62 Zhang Y, Clark JA, Connelly MC, Zhu F, Min J, Guiguemde WA, *et al.* Lead optimization of 3-carboxyl-4(1H)-quinolones to deliver orally bioavailable antimalarials. *J Med Chem* 2012; 55(9): 4205-19.