

调控生物钟的小分子化合物的研究进展^Δ

凡杰夫*,何颖,王伟忠,谭兴,张 建,王杨凯[#](海军特色医学中心海洋生物医药与极地医学研究室,上海200433)

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)07-0890-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.07.21

摘要 目的:了解调控生物钟的小分子化合物的研究进展,为生物节律干预策略的研究和相关药物的研发提供参考。方法:对钟基因的调控机制、调控生物钟的小分子化合物[如靶向蛋白激酶、靶向核受体、靶向隐花色素蛋白(CRY)、靶向时钟蛋白(CLOCK)]的作用机制及其筛选和鉴定方法进行综述。结果与结论:生物体内与生物钟的发生和维持相关的基因被称为节律基因,包含钟基因和钟控基因两类。钟基因是维持生物钟节律的关键,其表达受到转录-翻译反馈环路的调控。钟基因表达失调将导致生物钟节律的减弱或紊乱,从而导致多种疾病的发生、发展。生物钟相关蛋白调控小分子化合物可靶向蛋白激酶参与的翻译后修饰,在生物钟的调控中具有重要作用,其突变可能参与了多种由生物钟紊乱所致的疾病;靶向核受体的小分子化合物可对癌细胞产生明显的细胞毒性效果,可为多效抗癌药的研发提供帮助;靶向CRY的小分子化合物可增强CRY稳定性和CRY-周期基因(PER)蛋白复合体对核转运类似蛋白1(BMAL1)-CLOCK的抑制作用,减少关键钟基因的表达,从而使患者胶质母细胞瘤干细胞发生周期停滞,引起凋亡增加;靶向CLOCK的小分子化合物是调控钟基因转录-翻译反馈环路的重要组成部分,其含量和活性能显著影响生物钟的稳定性和振幅强度。目前,对大多数小分子调节物质的研究仍停留在基础实验阶段,还存在对钟蛋白的精确调控存在困难,对BMAL1和PERs等关键钟蛋白的调节物的研究仍处于盲区等不足;而对已知调控生物钟的小分子化合物,进一步的修饰与改造、优化其药动学特性、减轻其不良反应,是该领域重要的研究方向。

关键词 生物节律;钟基因;小分子化合物;表型筛选;靶向筛选;生物钟调控

- 2140-2146.
- [50] KESHAVARZI S, KERMANSHAHI S, KARAMI L, et al. Protective role of metformin against methamphetamine induced anxiety, depression, cognition impairment and neurodegeneration in rat: the role of CREB/BDNF and Akt/GSK3 signaling pathways[J]. *Neurotoxicology*, 2019, 72: 74-84.
- [51] DOWLATI Y, HERRMANN N, SWARDFAGER W, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression[J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 67(5): 446-457.
- [52] LIU W, LIU J, HUANG Z, et al. Possible role of GLP-1 in antidepressant effects of metformin and exercise in CUMS mice[J]. *J Affect Disord*, 2019, 246: 486-497.
- [53] ŁABUZEK K, SUCHY D, GABRYEL B, et al. Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide[J]. *Pharmacol Rep*, 2010, 62(5): 956-965.
- [54] 李改芬, 赵名, 赵彤, 等. 二甲双胍对慢性应激大鼠抑郁行为的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2019, 35(3): 245-249.
- [55] OWEN R P, ALEXANDER K O, YEVGENIYA V Z, et al. Insulin resistance is associated with smaller brain volumes in a preliminary study of depressed and obese children[J]. *Pediatr Diabetes*, 2018, 19(5): 892-897.
- [56] JING W, DENIS G R, LOREN M D, et al. Metformin activates an atypical PKC-CBP pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(1): 23-35.
- [57] CULMSEE C, MONNIG J, KEMP B E, et al. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation[J]. *J Mol Neurosci*, 2001, 17(1): 45-58.
- [58] 陈昊. 作用于5-羟色胺受体的抗抑郁药物研究进展[J/CD]. *临床医药文献电子杂志*, 2017, 4(48): 9473.
- [59] 荣晖, 彭建美, 宋宇, 等. 探讨二甲双胍对多囊卵巢综合征患者的疗效及其心理健康和血清单胺类神经递质浓度的关系[J]. *国际精神病学杂志*, 2017, 44(5): 867-869, 876.
- [60] EL M M, ALAEDDINE L M, ALI L, et al. Metformin: a growing journey from glycemic control to the treatment of Alzheimer's disease and depression[J/OL]. *Curr Med Chem*, 2020[2020-11-30]. https://www.researchgate.net/publication/344213340_Metformin_A_Growing_Journey_from_Glycemic_Control_to_the_Treatment_of_Alzheimer's_Disease_and_Depression. DOI: 10.2174/09298673276662-00908114902.

Δ 基金项目: 海军军内科研重点项目(No.16A211)

* 本科生。研究方向: 特殊环境生理学。E-mail: fanjf6382018037@163.com

通信作者: 副研究员, 博士。研究方向: 特殊环境生理学。E-mail: wyangkai2005@163.com

(收稿日期: 2020-12-02 修回日期: 2021-01-26)

(编辑: 罗 瑞)

生物钟(Circadian clock)是生物适应外界环境规律性变化的一种内在机制,控制着生命活动的节律性,而多种钟基因及其蛋白产物所构成的复杂调控网络保证了生物钟节律与环境节律的一致性^[1-2]。生物钟受到外源性和内源性信号的调节,从而产生适应性变化。其中,光照和温度是调控生物钟的重要外源性信号,生物钟中枢区域下丘脑视交叉上核输出的神经和体液信号是调控生物钟的内源性因素^[2]。生物钟节律的减弱或紊乱与睡眠障碍、代谢失调、肿瘤等多种疾病息息相关^[3]。研究表明,多种小分子化合物具有对生物钟的调控作用,筛选并鉴定调控生物钟的小分子化合物并阐明其药理作用,对相关疾病的药物研发具有重要的意义,也为新型靶向药物的研发提供了可能。基于此,笔者就调控生物钟的小分子化合物的筛选方法和作用机制进行综述,以期对生物节律干预策略的研究和相关药物的研发提供参考。

1 钟基因的调控机制

生物体内与生物钟的发生和维持相关的基因被称为节律基因,包含钟基因(Clock genes)和钟控基因两类,前者对维持生物节律起关键作用。哺乳动物体内存在多种钟基因,包括时钟基因(*Clock*)、脑和肌肉组织芳香羟受体核转运类似蛋白1基因(*Bmal1*)、周期基因1-3(*Per1-3*)、隐花色素基因(*Cry*)等^[4]。钟控基因广泛分布于全身的组织、细胞,位于钟基因下游并受其调控,使得相关生理活动呈现节律性;同时,核受体亚家族1D组成员1基因(*NR1D1*, 又称 *Rev-erba*)、白蛋白D位点结合蛋白基因(*Dbp*)和腺病毒E4启动子结合蛋白4基因(*E4bp4*)等钟控基因对钟基因的表达具有反馈调节作用^[5-7]。多种节律基因及其蛋白产物构成了复杂的生物

钟调控网络,其转录、翻译、磷酸化等分子调控机制是维持生物钟周期性振荡的关键。小分子对钟基因表达的调节机制见图1。

1.1 钟基因的自主调控机制

钟基因的表达受到节律基因转录-翻译反馈环路的调控,其中钟基因及其蛋白产物构成核心调控环路,钟控基因参与构成两条调控钟基因的辅助环路^[8]。在核心环路中,*Clock*和*Bmal1*基因表达的蛋白产物CLOCK和BMAL1构成异二聚体,激活钟基因转录,发挥正向调控作用;而*Per*和*Cry*基因的蛋白产物PER、CRY入核形成稳定的复合物,抑制CLOCK-BMAL1异二聚体的作用,起负性调控作用^[8]。两条辅助环路中的第一条包括2个核受体家族,即REV-ERB α/β 和ROR $\alpha/\beta/\gamma$,它们竞争结合*Bmal1*顺式作用元件RORE,分别对*Bmal1*转录起抑制和促进作用^[9]。在另一条辅助环路中,CLOCK-BMAL1异二聚体促进下游钟控蛋白DBP和E4BP4生成,DBP参与构成的蛋白复合体可增强CLOCK-BMAL1异二聚体对*Per*的诱导作用;相反,E4BP4则使其诱导作用减弱^[9]。研究发现,DBP浓度在清晨达到高峰,在夜晚降至低谷,且与PER的浓度变化相符^[4]。这3条反馈环路是调控钟基因的主要途径,使钟基因的表达发生自主振荡,在生物体内稳定地运行,将生物节律维持在24 h左右^[4]。

1.2 钟蛋白修饰对钟基因调控的影响

钟蛋白的翻译后修饰在钟基因的调控过程中起重要作用,多种蛋白激酶如CK1、CK2、JNK、MAPK和GSK-3参与了钟蛋白的磷酸化过程,例如JNK可介导CLOCK和BMAL1的磷酸化、干扰其入核转运的过程并抑制CLOCK-BMAL1异二聚体的功能^[10];CK1和MAPK

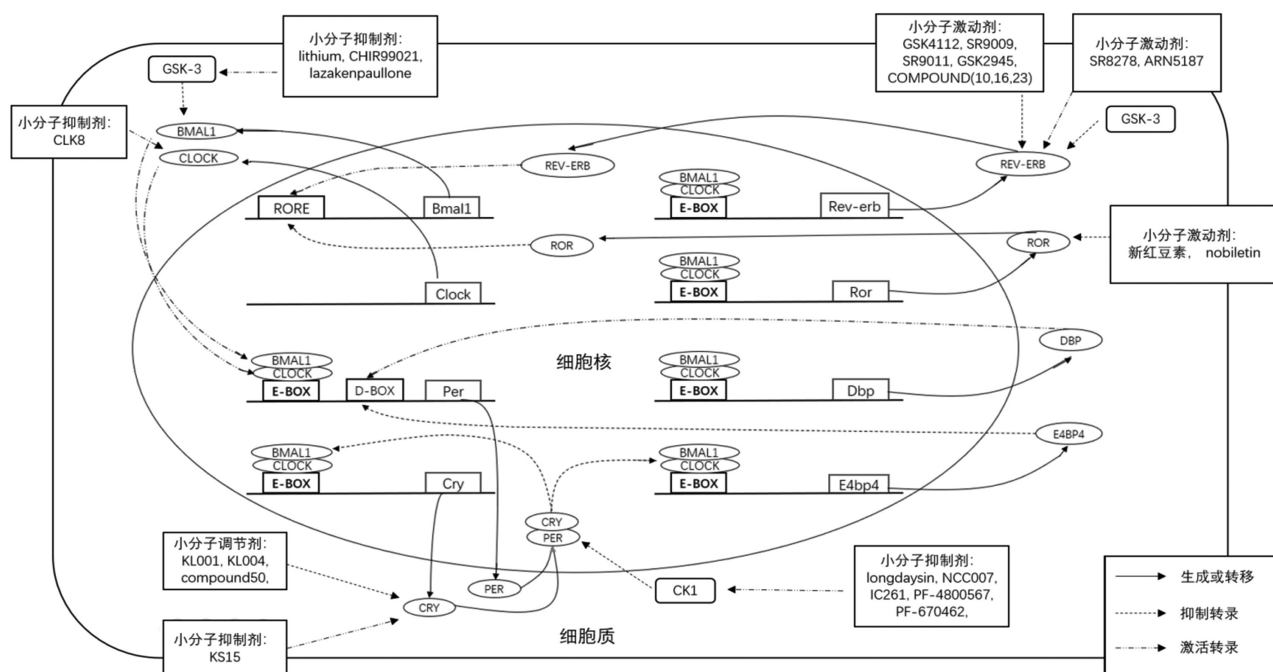


图1 小分子对钟基因表达的调节机制

则可介导 PER 和 CRY 的磷酸化,并增强其对 CLOCK-BMAL1 异二聚体的抑制作用^[11];泛素化影响钟蛋白的稳定性,如 F-box 蛋白介导 PER 和 CRY 单体发生泛素化,而后被蛋白酶体降解^[12]。翻译后修饰过程可显著影响生物钟自主调控过程中的关键蛋白的活性和功能,对于生理或病理情况下生物钟的调节与重置具有重要意义,异常的翻译后修饰将导致生物钟节律的紊乱,例如在家族性晚期睡眠综合征中,PER 蛋白磷酸化的缺失会导致节律周期前移 4 h^[13]。

2 调控生物钟的小分子化合物的筛选和鉴定方法

生物化学和高通量筛选技术的发展使得从成千上万的小分子物质中筛选出影响生物钟节律的小分子化合物成为可能。目前,表型筛选法和靶向筛选法是筛选与鉴定调控生物钟的小分子化合物的主要方法。

2.1 基于细胞表型的高通量筛选法

基于细胞表型的高通量筛选方法以无偏差方式筛选影响生物钟节律的小分子化合物,该方法依赖高通量筛选技术和信息技术从众多特征良好的化合物中挑选出能显著改变细胞节律表型的小分子化合物^[14]。

该方法对小分子化合物的作用靶点和作用机制没有限制,能更全面地筛选出影响生物钟的小分子化合物;并且在确定候选化合物的作用靶点时,有可能发现新的节律相关蛋白和作用机制。表型筛选法还能直接筛选出强烈影响生物钟动态的小分子化合物,并能对化合物的功能表现进行明确的鉴定与选择。但广泛而全面的筛选也造成了该方法的局限性,由于筛选容量庞大,对实验处理的精确性、一致性要求高,因此较难获得高质量和高准确度的数据。

2.2 靶向筛选法

X 射线晶体学的发展对蛋白晶体结构的解析起到了巨大的推动作用,而对钟蛋白结构的认识又使得筛选靶向特定蛋白的小分子化合物成为可能^[15]。

该方法可有针对性地寻找作用于目的蛋白的小分子化合物,避免了无偏差筛选的盲目性和偶然性,保证了筛选出的活性小分子能直接作用于调节生物钟的核心蛋白,而不是通过其他途径间接影响生物钟的节律。这些优点使靶向筛选法对于筛选鉴定调节生物钟的小

分子化合物具有十分重要的意义。目前,还没有发现作用于 PERs、BMAL1 等钟蛋白的小分子化合物,且已知的生物钟调节物也大多缺乏对蛋白亚型的选择性,因此更具针对性的靶向筛选法将在进一步的研究中起到重要作用。靶向筛选法的局限性主要表现在其研究范围仅限于直接作用于已知蛋白质结构的小分子化合物,而无法筛选其他作用方式的化合物,例如影响钟蛋白的亚细胞定位的小分子物质^[4]。

3 生物钟相关蛋白调控小分子化合物对钟基因的调控及应用

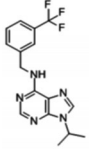
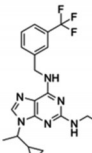
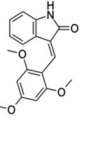
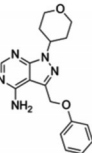
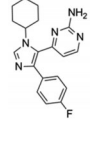
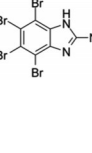
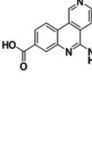
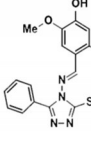
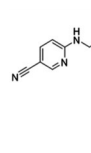
生物钟与睡眠、代谢、情绪反应等多种生理活动息息相关,研究人员也一直致力于探索生物钟调控药物对这些生理功能障碍引起的疾病的作用。数量众多的符合 Lipinski 规则的小分子化合物是具有潜力的生物钟调控药物,这些小分子化合物可结合生物钟相关蛋白并改变其生物活性,从而影响钟基因的表达以起到调控生物钟的作用^[3,16]。最初,研究人员使用基于表型的高通量筛选法鉴定出多种影响钟蛋白翻译后修饰过程的小分子化合物,发现蛋白激酶(如 CK1、CK2、GSK-3)为其主要的作用靶点;最近,研究人员尝试使用小分子化合物直接靶向调控钟基因的核心蛋白,包括 CRY、核受体(REV-ERB、ROR)和 CLOCK。下文将分别描述靶向多种生物钟相关蛋白的小分子化合物对钟基因和生物钟的影响,及其在相关疾病中的应用。

3.1 靶向蛋白激酶

蛋白激酶参与的翻译后修饰在生物钟的调控中具有重要作用,蛋白激酶的突变可能参与了多种由于生物钟紊乱所致的疾病的发生、发展,因此蛋白激酶是小分子药物研发中备受关注的调控靶点。靶向蛋白激酶的生物钟调控小分子化合物见表 1。

蛋白激酶 CK1 在钟基因的调控中发挥着重要作用,PER 蛋白是其主要作用靶点^[11]。小分子化合物 Longdaysin 是最先被鉴定出的 CK1 抑制剂,具有延长周期的作用^[16]。虚拟分子对接研究显示,Longdaysin 的嘌呤环和亚胺基与 CK1 亮氨酸残基间形成氢键,介导两者结合;抑制 CK1 活性将导致 PER 磷酸化减弱,并使 PER-CRY 复合物对 CLOCK-BMAL1 异二聚体的抑制作用减弱,

表 1 靶向蛋白激酶生物钟的调控小分子化合物(部分)

项目	Longdaysin	NCC007	IC261	PF-4800567	PF-670462	DMAT	CX-4945	GO289	CHIR99021
作用靶点	CK1	CK1	CK1	CK1	CK1	CK2	CK2	CK2	GSK-3
结构式									
作用	CK1 α/δ 抑制剂	CK1 α/δ 抑制剂	CK1 抑制剂	CK1 ϵ 抑制剂	CK1 δ 抑制剂	CK2 抑制剂	CK2 抑制剂	CK2 抑制剂	GSK-3 α/β 抑制剂
表型影响	延长周期	延长周期	延长周期	延长周期	延长周期	延长周期	延长周期	延长周期	缩短周期
应用领域	睡眠障碍	睡眠障碍	睡眠障碍	-	-	-	-	癌症	代谢障碍

注:“-”表示无相关内容

从而增强钟基因的表达^[17]。在人类的家族性晚期睡眠综合征中发现 *Per* 或 *CK1δ* 基因的单点突变,使 PER 蛋白的磷酸化受到影响,导致睡眠等行为提前 4 h 出现;使用 CK1 抑制剂 Longdaysin 后,节律周期得以延长,显示出 Longdaysin 对于该综合征有良好的治疗潜力^[12]。进一步研究发现,Longdaysin 衍生物 NCC007 与 CK1 结合更稳定,并显示出更强的抑制作用^[17]。另外,IC261、SP600125 等小分子化合物也具有对 CK1 的抑制作用,并通过相似过程延长节律周期^[18]。值得关注的是,CK1 有 7 种亚型,其中 CK1 $\alpha/\delta/\epsilon$ 被证实参与钟基因的调节,这 3 种不同亚型的 CK1 具有相似的功能,而研究显示 CK1 δ 的作用最重要^[11]。针对不同亚型的 CK1 的小分子物质也会产生不同的结果,如特异的 CK1 ϵ 抑制剂 PF-4800567 只轻度延长周期,而 CK1 δ 的特异性抑制剂 PF-670462 则具有显著延长节律周期的作用^[19]。这些更具针对性的小分子抑制剂是研究各 CK1 亚型具体功能的基础,也将为药物的开发提供更多的可能。

CK2 也是一种重要的蛋白激酶,其抑制剂 DMAT、CX-4945 等表现出周期延长的效果,但这些抑制剂的特异性不强,会同时对多种激酶产生抑制作用^[20-21]。GO289 是最新被鉴定的 CK2 抑制剂,其对 CK2 的选择性很强且能高效地抑制 CK2 活性[半数抑制浓度 (IC₅₀) = 7 nmol/L],能显著延长细胞周期;其能通过溴代愈创木酚基团与 CK2 中 Glu114、Val116 和 Lys68 这 3 个在其他激酶中不保守的氨基酸残基形成氢键,这是其具有强烈选择性的分子基础^[22]。该研究进一步分析发现,CK2 的可能磷酸化位点很多,涉及 BMAL1、CLOCK、PER2、CRY1 等多种钟蛋白,其具体作用仍有待进一步研究。CK2 功能失调常见于癌症,抑制剂 GO289 对人肾癌细胞系和小鼠 MLL-AF9 急性髓系白血病细胞的生长产生明显的抑制作用^[20, 22]。因此,选择性的 CK2 抑制剂为治疗生物钟相关的癌症提供了一种可能的候选化合物。

GSK-3(α/β)可介导 100 多种底物的磷酸化,涉及多条细胞通路并与大量疾病相关,其作用包括加强 REV-ERB α 稳定性以抑制 *Bmal1* 基因转录、直接降低 BMAL1 蛋白稳定性等^[23]。Lithium、CHIR99021 和 Lazakenpaullone 是目前已知的 GSK-3 抑制剂,但其生物药效

应则完全相反,其中 Lithium 可延长节律周期,而 CHIR99021、Lazakenpaullone 则可缩短节律周期^[3, 24]。进一步研究发现,Lithium 可广泛抑制多种激酶的活性,但对 GSK-3 的特异性不强;而 CHIR99021、Lazakenpaullone 对 GSK-3 具有较强的选择性^[25]。研究还发现,Lithium 等非特异性抑制剂对于双相情感障碍、抑郁症等心理疾病具有良好的疗效,而 CHIR99021 等 GSK-3 特异性抑制剂则可以解除 GSK-3 抑制糖原合成的作用,从而对 2 型糖尿病产生治疗效果^[23]。

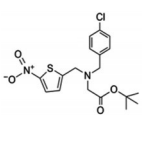
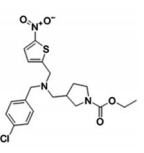
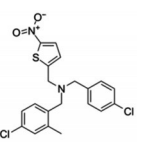
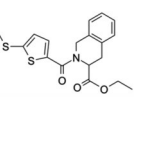
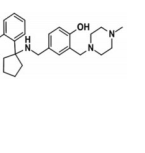
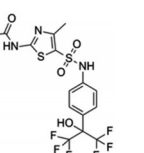
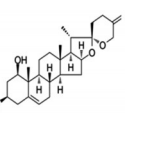
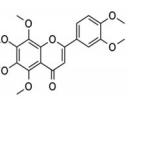
3.2 靶向核受体

REV-ERB 和 ROR 两个核受体家族参与构成的辅助环路在钟基因的调控中发挥着重要的作用,也是生物钟调控药物的主要靶点^[2]。目前,已发现多种靶向核受体的小分子化合物,其功能多样,在代谢障碍、精神和睡眠疾病等多个领域发挥作用。但其大多缺乏对受体亚型的特异性作用,因而疗效有限、不良反应多^[3]。同时,对于 REV-ERB、ROR 的受体-配体复合物结构的研究,目前只报道了 REV-ERB、ROR 分别与其天然配体血红素、胆固醇结合形成的复合体结构^[26-27]。阐明其与人工合成或天然提取的小分子化合物构成的复合物结构将有助于开发更有效的小分子调节物。靶向核受体的生物钟调控小分子化合物见表 2。

3.2.1 靶向 REV-ERB REV-ERB 是一种核激素受体,以血红素为天然配体,抑制 *Bmal1* 基因转录^[3]。首先发现的 REV-ERB 小分子化合物激动剂是 GSK4112^[28]。对 HepG2 肝细胞系的研究表明,GSK4112 可增强 REV-ERB 对 *Bmal1* 转录的抑制作用,减弱糖异生相关基因的表达,减少小鼠原代肝细胞合成葡萄糖^[28]。

GSK4112 衍生物 SR9009 和 SR9011 作为 REV-ERB 激动剂,可影响下丘脑交叉上核钟基因的表达,增强 *Pers* 基因的表达振幅,减弱 *Crys* 基因的表达振幅并使 *Bmal1* 基因的表达周期前移,引起肝脏、骨骼肌和脂肪组织中一系列代谢相关基因的节律表达模式发生改变,增加能量消耗,显著减轻肥胖模型小鼠的体质量^[29-30]。代谢物检测发现,SR9009 和 SR9011 还具有减少焦虑、诱发觉醒的作用,具有治疗相关疾病的潜力^[31]。后续研究表明,多种 GSK4112 衍生物具有更好药动学特性,例如

表 2 靶向核受体生物钟的调控小分子化合物(部分)

项目	GSK4112	SR9009	GSK2945	SR8278	ARN5187	SR1001	Neuroscogenin	Nobiletin
作用靶点	REV-ERB	REV-ERB	REV-ERB	REV-ERB	REV-ERB	ROR	ROR	ROR
结构式								
作用	REV-ERB 激动剂	REV-ERB 激动剂	REV-ERB 激动剂	REV-ERB 拮抗剂	REV-ERB 拮抗剂	ROR 激动剂	ROR 激动剂	ROR 激动剂
表型影响	重置相位	重置相位	重置相位	-	-	-	增强振幅	增强振幅
应用领域	代谢障碍	代谢障碍、睡眠障碍、精神疾病	代谢障碍、睡眠障碍、精神疾病	精神疾病代谢障碍	癌症	代谢障碍	代谢障碍	代谢障碍

注:“-”表示无相应内容

GSK2945 显示出较长的半衰期和良好的口服利用率;而 Compound 10、16、23 的半衰期较短,适用于短期急性注射治疗^[32]。

SR8278 是 REV-ERB 拮抗剂,通过抑制 REV-ERB 作用使其靶基因 *Bmal1*、*G6Pase* 和 *Pepck* 的表达增加;细胞试验还发现,SR8278 能有效抑制葡萄糖诱导的胰岛素释放,提示 REV-ERB 拮抗剂可在血糖调节方面发挥作用^[33]。另一种小分子化合物 ARN5187 具有拮抗 REV-ERB 和抑制细胞自噬的双重作用,对癌细胞产生明显的细胞毒性效果,可为多效抗癌药的研发提供帮助^[34]。

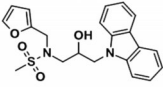
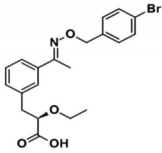
3.2.2 靶向 ROR ROR 也是一种核受体,与 REV-ERB 有着相似的 DNA 结合区域(DBDs)和各自的配体结合域(LBDs),并能与胆固醇结合。ROR 晶体结构中还存在一个可与共激活因子结合的 helix12 结构^[35]。T0901317、SR1001 及其多种衍生物被鉴定为 ROR 的可逆激动剂,对免疫、代谢等方面疾病模型的小鼠具有治疗效果^[4],但尚未有研究报道这些 ROR 可逆激动剂对生物钟功能的影响。

多种天然小分子化合物具有调节 ROR 的作用,其中新红豆素(Neoruscogenin)被鉴定为 ROR 激动剂,其与 ROR 结合可增强 *Bmal1* 和代谢基因的表达,对动脉粥样硬化的治疗及脂糖代谢的改善具有潜在意义^[36]。另一种天然化合物诺比利丁(Nobiletin)在表型筛选实验中被确定为 ROR 激动剂,具有增强节律振幅的作用,可使糖尿病或肥胖模型小鼠的钟基因(*Bmal1*、*Npas2*)和钟控基因(*Ucp1*、*Atp5d*)表达显著上调,起到维持小鼠血糖血脂稳态、保护代谢功能等作用^[37]。诺比利丁、新红豆素及其代谢物质天然存在,无毒性,且具有良好的改善代谢的能力,是具有潜力的候选药物^[38-39]。

3.3 靶向 CRY 的小分子化合物

钟蛋白 CRY 是调控钟基因的核心环路负反馈途径中重要的组成部分,靶向 CRY 的生物钟调控小分子化合物见表 3。

表 3 靶向 CRY 的生物钟调控小分子化合物(部分)

项目	KL001	KS15
作用靶点	CRY	CRY
结构式		
作用	CRY 激活物	CRY 抑制剂
表型影响	延长周期	减弱振幅
应用领域	代谢障碍、癌症	癌症

最先被发现的 CRY 调节物是 KL001,它是一种含有甲磺酰胺和咪唑结构的咪唑类化合物^[40]。KL001 的甲磺酰胺结构可与泛素化相关物质 F-box/LRR 重复蛋白 3 (FBXL3) 和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)竞争 CRY 中 FAD 口袋处的结合位点,抑制 CRY 泛素化降解^[41]。在胶

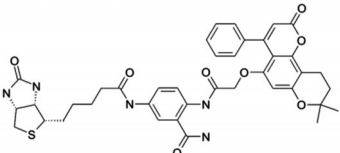
质母细胞瘤干细胞(GSCs)中,KL001 增强了 CRY 稳定性和 CRY-PER 蛋白复合体对 CLOCK-BMAL1 异二聚体的抑制作用,从而减少了关键钟基因的表达,使患者 GSCs 发生了周期停滞,引起其凋亡增加^[42]。口服 KL001 衍生物(Compound50、KL004)可延长 GSCs 移植小鼠的生存时间,提示 KL001 衍生物可能对肿瘤有抑制作用,同时也表明 CRY 蛋白对节律相关疾病的重要作用,为相关疾病的药物开发提供了重要的靶点^[42-43]。构效关系研究表明,KL001 的咪唑基是其保持活性的关键结构,此外含有甲磺酰胺和咪唑结构的 KL001 也比含有乙酰胺和氯氟苯基的 KL044 效果强 10 倍^[44]。

通过表型筛选法确定了另一种 CRY 抑制剂——KS15。结合生物素的 KS15 能阻断 CRY 对 CLOCK-BMAL1 异二聚体的抑制作用,在激活部分钟控基因表达的同时可减弱细胞节律的振幅^[45]。Chun 等^[46]对人乳腺癌 MCF-7 细胞的研究发现,KS15 可上调凋亡基因和细胞周期调节因子(如 p53 和 Bax)的表达量,并表现出对肿瘤细胞的抗增殖和促凋亡特性,但并不降低非癌细胞 MCF-10A 的活性。对 KS15 的构效关系分析确定了其抑制 CRY 的关键位点,但与其与 CRY 相互作用的分子机制仍不清楚^[45]。

3.4 靶向 CLOCK

CLOCK 是调控钟基因的转录-翻译反馈环路中重要的组成部分,其含量和活性显著影响生物钟的稳定性和振幅强度^[3]。靶向 CLOCK 的生物钟调控小分子化合物详见表 4。

表 4 靶向 CLOCK 的生物钟调控小分子化合物(部分)

项目	CLK8
作用靶点	CLOCK
结构式	
作用	CLOCK 抑制剂
表型影响	增强振幅

对 CLOCK-BMAL1 异二聚体的晶体结构研究发现,这两种关键钟蛋白通过相似的结构域(bHLH、PAS-A、PAS-B)结合,形成 3 个蛋白质-蛋白质接口以完成稳定的相互作用,这也为各种小分子化合物的结合提供了可能。目前,CLK8 是唯一鉴定出的靶向 CLOCK 的小分子化合物。分子对接研究发现,CLK8 可与 CLOCK 蛋白的 bHLH 和 PAS-A 结构域结合,从而减弱 CLOCK 和 BMAL1 的相互作用,并影响 CLOCK 蛋白的亚细胞定位,使其在细胞核内的含量降低;同时 CLK8 可减弱转录-翻译反馈环路中正反馈环路的作用,却不影响负反馈环路中 CRY 和 PER 的含量,导致生物节律振幅增强,但其具体机制仍不清楚^[47]。CLK8 作为一种新型生物钟

调节物,对于治疗由病理情况或衰老引起的振幅衰减具有潜在意义,并且已证明核心钟蛋白CLOCK是具有潜力的调控靶点,这也为钟基因相关疾病的治疗提供了更多的可能性。

4 结语

生物钟失调参与了睡眠障碍、代谢紊乱、癌症等多种疾病的发生、发展,而小分子化合物能通过调控钟基因的表达影响生物钟,从而改善病变机体的生理功能,具有治疗生物钟失调相关疾病的潜力^[2-3]。蛋白激酶、核受体(REV-ERB、ROR)、CRY、CLOCK等在维持和调控生物节律中有着重要的作用,可作为小分子化合物的作用靶点。目前,鉴定出的小分子调节物大多缺乏针对不同亚型钟蛋白的选择性,这使得对钟蛋白的精确调控存在困难。另外,对BMAL1和PERs等关键钟蛋白的调节物的研究仍处于盲区,还有待于对蛋白晶体结构的深入探索和进一步的靶向筛选鉴定。而对已知调控生物钟的小分子化合物,进一步的修饰与改造、优化其药理学特性、减轻其不良反应,是该领域重要的研究方向。目前,对大多数小分子调节物质的研究仍停留在基础实验阶段,对于已在动物模型上显示出良好治疗效果和药理学特性的生物钟调节化合物也需进入其下一阶段的临床试验。

参考文献

[1] 王晗.生物钟生物学及其研究进展[J].生命科学,2015,27(11):1313-1319.

[2] 郭金虎,徐瓔,张二荃,等.生物钟研究进展及重要前沿科学问题[J].中国科学基金,2014,28(3):179-186.

[3] MILLER S, HIROTA T. Pharmacological interventions to circadian clocks and their molecular bases[J]. J Mol Biol, 2020, 432(12):3498-3514.

[4] CHEN Z, YOO S H, TAKAHASHI J S. Development and therapeutic potential of small-molecule modulators of circadian systems[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2018, 58(1):231-252.

[5] ZHANG Y, FANG B, EMMETT M J, et al. Discrete functions of nuclear receptor Rev-erb α couple metabolism to the clock[J]. Science, 2015, 348(6242):1488-1492.

[6] YOSHITANE H, ASANO Y, SAGAMI A, et al. Functional D-box sequences reset the circadian clock and drive mRNA rhythms[J]. Commun Biol, 2019, 2:300.

[7] MORISHITA Y, MIURA D, KIDA S. PI3K regulates BMAL1/CLOCK-mediated circadian transcription from the Dbp promoter[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2016, 80(6):1131-1140.

[8] YU X, ZECHARIA A, ZHANG Z, et al. Circadian factor BMAL1 in histaminergic neurons regulates sleep architecture[J]. Curr Biol, 2014, 24(23):2838-2844.

[9] TANOUE S, FUJIMOTO K, MYUNG J, et al. DEC2-E4BP4 heterodimer represses the transcriptional enhancer

activity of the EE element in the Per2 promoter[J]. Front Neurol, 2015, 6:166.

[10] MAUVOISIN D. Circadian rhythms and proteomics: it's all about posttranslational modifications[J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2019, 11(5):e1450.

[11] LEE H, LEE J W. The roles of CK I in circadian rhythm[J]. Future Med Chem, 2019, 11(20):2621-2624.

[12] XING W, BUSINO L, HINDS T R, et al. SCF (FBXL3) ubiquitin ligase targets cryptochromes at their cofactor pocket[J]. Nature, 2013, 496(7443):64-68.

[13] KALMBACH D A, ANDERSON J R, DRAKE C L. The impact of stress on sleep: pathogenic sleep reactivity as a vulnerability to insomnia and circadian disorders[J]. J Sleep Res, 2018, 27(6):e12710.

[14] HIROTA T, LEWIS W G, LIU A C, et al. A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3 β [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(52):20746-20751.

[15] ESTRELLA M A, DU J, KORENNYKH A. Crystal structure of human nocturnin catalytic domain[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):16294.

[16] HIROTA T, LEE J W, LEWIS W G, et al. High-throughput chemical screen identifies a novel potent modulator of cellular circadian rhythms and reveals CK I α as a clock regulatory kinase[J]. PLoS Biol, 2010, 8(12):e1000559.

[17] LEE J W, HIROTA T, ONO D, et al. Chemical control of mammalian circadian behavior through dual inhibition of casein kinase I α and β [J]. J Med Chem, 2019, 62(4):1989-1998.

[18] KON N, SUGIYAMA Y, YOSHITANE H, et al. Cell-based inhibitor screening identifies multiple protein kinases important for circadian clock oscillations[J]. Commun Integr Biol, 2015, 8(4):e982405.

[19] VARGHESE R T, YOUNG S, PHAM L, et al. Casein kinase 1 epsilon regulates glioblastoma cell survival[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):13621.

[20] CHEN X, LI C, WANG D, et al. Recent advances in the discovery of CK2 allosteric inhibitors: from traditional screening to structure-based design[J]. Molecules, 2020, 25(4):870.

[21] QIAO Y, CHEN T, YANG H, et al. Small molecule modulators targeting protein kinase CK1 and CK2[J]. Eur J Med Chem, 2019, 181:111581.

[22] OSHIMA T, NIWA Y, KUWATA K, et al. Cell-based screen identifies a new potent and highly selective CK2 inhibitor for modulation of circadian rhythms and cancer cell growth[J]. Sci Adv, 2019, 5(1):eaau9060.

[23] REISCHL S, KRAMER A. Kinases and phosphatases in the mammalian circadian clock[J]. Febs Lett, 2011, 585(10):1393-1399.

- [24] MOORE S F, VAN DEN BOSCH M T, HUNTER R W, et al. Dual regulation of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) α/β by protein kinase C (PKC) α and Akt promotes thrombin-mediated integrin α II b β 3 activation and granule secretion in platelets[J]. *Biol Chem*, 2013, 288(6):3918-3928.
- [25] BEUREL E, GRIECO S F, JOPE R S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) : regulation, actions, and diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 148:114-131.
- [26] MINAMI Y, OISHI I, ENDO M, et al. ROR-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signaling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases[J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(1):1-15.
- [27] STRICKER S, RAUSCHENBERGER V, SCHAMBONY A. ROR-family receptor tyrosine kinases[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2017, 123:105-142.
- [28] GRANT D, YIN L, COLLINS J L, et al. GSK4112, a small molecule chemical probe for the cell biology of the nuclear heme receptor Rev-erb α [J]. *ACS Chem Biol*, 2010, 5(10):925-932.
- [29] CHEN H, ISAYAMA K, KUMAZAWA M, et al. Integration of the nuclear receptor REV-ERB α linked with circadian oscillators in the expressions of *Alas1*, *Ppargc1a*, and *Il6* genes in rat granulosa cells[J]. *Chronobiol Int*, 2015, 32(6):739-749.
- [30] CHU G, ZHOU X, HU Y, et al. Rev-erb α inhibits proliferation and promotes apoptosis of preadipocytes through the agonist GSK4112[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18):4524.
- [31] DIERICKX P, EMMETT M J, JIANG C, et al. SR9009 has REV-ERB-independent effects on cell proliferation and metabolism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(25):12147-12152.
- [32] ZHANG T, ZHAO M, LU D, et al. REV-ERB α regulates CYP7A1 through repression of liver receptor Homolog-1[J]. *Drug Metab Dispos*, 2018, 46(3):248-258.
- [33] LEE J, KIM D E, GRIFFIN P, et al. Inhibition of REV-ERBs stimulates microglial amyloid-beta clearance and reduces amyloid plaque deposition in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Aging Cell*, 2020, 19(2):e13078.
- [34] DE MEI C, ERCOLANI L, PARODI C, et al. Dual inhibition of REV-ERB β and autophagy as a novel pharmacological approach to induce cytotoxicity in cancer cells[J]. *Oncogene*, 2015, 34(20):2597-2608.
- [35] KOJETIN D J, BURRIS T P. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(3):197-216.
- [36] HELLEBOID S, HAUG C, LAMOTTKE K, et al. The identification of naturally occurring neuroscogenin as a bioavailable, potent, and high-affinity agonist of the nuclear receptor ROR α (NR1F1) [J]. *J Biomol Screen*, 2014, 19(3):399-406.
- [37] HE B, NOHARA K, PARK N, et al. The small molecule nobiletin targets the molecular oscillator to enhance circadian rhythms and protect against metabolic syndrome[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(4):610-621.
- [38] HUANG H, LI L, SHI W, et al. The multifunctional effects of nobiletin and its metabolites in vivo and in vitro[J/OL]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016[2020-06-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27761146/>. DOI: 10.1155/2016/2918796.
- [39] MULVIHILL E E, BURKE A C, HUFF M W. Citrus flavonoids as regulators of lipoprotein metabolism and atherosclerosis[J]. *Annu Rev Nutr*, 2016, 36:275-299.
- [40] LEE J W, HIROTA T, KUMAR A, et al. Development of small-molecule cryptochrome stabilizer derivatives as modulators of the circadian clock[J]. *Chem Med Chem*, 2015, 10(9):1489-1497.
- [41] MILLER S, AIKAWA Y, SUGIYAMA A, et al. An isoform-selective modulator of cryptochrome 1 regulates circadian rhythms in mammals[J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27(9):1192-1198.
- [42] DONG Z, ZHANG G, QU M, et al. Targeting glioblastoma stem cells through disruption of the circadian clock[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(11):1556-1573.
- [43] HUMPHRIES P S, BERSOT R, KINCAID J, et al. Carbazole-containing amides and ureas: discovery of cryptochrome modulators as antihyperglycemic agents[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(3):293-297.
- [44] OSHIMA T, YAMANAKA I, KUMAR A, et al. C-hactivation generates period-shortening molecules that target cryptochrome in the mammalian circadian clock[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(24):7193-7197.
- [45] JANG J, CHUNG S, CHOI Y, et al. The cryptochrome inhibitor KS15 enhances E-box-mediated transcription by disrupting the feedback action of a circadian transcription-repressor complex[J]. *Life Sci*, 2018, 200:49-55.
- [46] CHUN S K, CHUNG S, KIM HD, et al. A synthetic cryptochrome inhibitor induces anti-proliferative effects and increases chemosensitivity in human breast cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467(2):441-446.
- [47] DORUK Y U, YARPARVAR D, AKYEL Y K, et al. A clock-binding small molecule disrupts the interaction between CLOCK and BMAL1 and enhances circadian rhythm amplitude[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(11):3518-3531.

(收稿日期:2020-06-05 修回日期:2021-01-02)
(编辑:罗 瑞)