

引用格式: 堵忠颖, 夏东方, 高学云. 硫氧还蛋白还原酶结构与肿瘤治疗的研究进展[J]. 北京工业大学学报, 2024, 50(2): 246-260.

DU Z Y, XIA D F, GAO X Y. Review on progress of thioredoxin reductase structure and tumor therapy[J]. Journal of Beijing University of Technology, 2024, 50(2): 246-260. (in Chinese)

硫氧还蛋白还原酶结构与肿瘤治疗的研究进展

堵忠颖, 夏东方, 高学云

(北京工业大学环境与生命学部, 北京 100124)

摘要: 硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)是硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)系统里主要的功能蛋白,在调节多种细胞氧化还原信号通路中起关键作用。近年来,TrxR/Trx被越来越多地认为是肿瘤发展的重要调节剂,因此靶向TrxR/Trx是一种很有前景的肿瘤治疗策略。该文对TrxR的结构特点、与肿瘤相关的生理功能、TrxR抑制剂进行综述,以对TrxR的研究提供参考。

关键词: 硫氧还蛋白还原酶; 氧化还原平衡; 蛋白结构与功能; 肿瘤治疗; 细胞凋亡; 抑制剂

中图分类号: U 461; TP 308

文献标志码: A

文章编号: 0254-0037(2024)02-0246-15

doi: 10.11936/bjutxb2023070042

Review on Progress of Thioredoxin Reductase Structure and Tumor Therapy

DU Zhongying, XIA Dongfang, GAO Xueyun

(Faculty of Environment and Life, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: Thioredoxin reductase (TrxR) is a major functional protein in the thioredoxin system (Trx) and plays a key role in regulating various cellular redox signaling pathways. In recent years, TrxR/Trx has been increasingly recognized as an important regulator of tumor development, therefore, targeting TrxR/Trx is a promising tumor treatment strategy. In this paper, the structural characteristics, tumor-related physiological functions and inhibitors of TrxR were reviewed to provide references for the research of TrxR.

Key words: thioredoxin reductase (TrxR); redox equilibrium; protein structure and function; tumor therapy; apoptosis; inhibitor

硫氧还蛋白系统作为生命体内应对刺激、维持代谢平衡的重要屏障,是细胞内重要的抗氧化系统^[1]。该系统由硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)、硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)以及

还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)组成,在DNA合成、抗细胞凋亡、促细胞增长、免疫功能调节、抗氧化应激和信号传导等生理过程中起着关键

收稿日期: 2023-07-28; 修回日期: 2023-11-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(U2067214)

作者简介: 堵忠颖(1993—),女,博士研究生,主要从事生物分析方面的研究, E-mail: duzhongying123@foxmail.com

通信作者: 高学云(1969—),男,教授,主要从事生物分析方面的研究, E-mail: gaoxy@ihp.ac.cn

作用^[2]。Trx 系统由于其重要功能,一直受到研究人员的广泛关注^[3]。TrxR 的结构和功能不断被研究,期望作为抗肿瘤药物的潜在靶点,为肿瘤治疗研究提供可靠的依据。

1 TrxR 的结构

TrxR 是一种硒蛋白,属于吡啶核苷酸-二硫键氧化还原酶家族,具有辅酶 FAD、NADPH 的结合位点,以及含有巯基/二硫醇的氧化还原活性位点^[4-5]。除 TrxR 外,该家族还包括谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR)、硫辛酰胺脱氢酶、谷胱甘肽亚精胺还原酶、汞还原酶等成员^[6]。与原核生物、酵母、植物细胞的 TrxR 分子量(35 kDa)相比,哺乳动物的 TrxR 分子量较大,每个亚基为 55 kDa,具有与 GR 相似的整体结构和催化机制^[7-8]。

TrxR 蛋白的 C 端具有一段保守的活性位点序列 Gly-Cys-Sec-Gly,该序列中的硒半胱氨酸 Sec 是发挥酶活性的重要位点。这段序列存在于各种 TrxR 亚型中。目前研究较多的是哺乳动物细胞中的 TrxR,已发现 3 种亚型,分别是 TrxR1、TrxR2 以及 TrxR3,并且它们在细胞中分布于不同的区域。在来源细胞中,这 3 种亚型由 3 种不同的基因编码,即 TXNRD1、TXNRD2 和 TXNRD3。TrxR1 主要存在于细胞浆中,TrxR2 主要存在于线粒体中。TrxR1 和 TrxR2 的空间结构和催化机制很相似。经过比对氨基酸序列发现,TrxR2 与 TrxR1 的同源性为 56%,相似性超 70%。TrxR2 作为一种线粒体蛋白,具有额外的 N 端线粒体靶向序列(33 个氨基酸)^[9]。TrxR1 和 TrxR2 在细胞质和线粒体中发挥重要功能,可以清除过多的自由基,保护细胞免受氧化应激

的损伤。这 2 个亚基对生命体的正常发育至关重要。将小鼠 TrxR1 或 TrxR2 敲除直接导致胚胎死亡^[10-11]。另外,在睾丸组织中存在着 TrxR3,具有 FAD、NADPH 以及界面结合区域,但在 N 端还有一个额外的单硫醇谷氧还蛋白结构区域^[12]。TrxR3 也被称为硫氧还蛋白谷胱甘肽还原酶(TGR),通过催化还原型谷胱甘肽和 Trx 影响蛋白中二硫键的形成,并且被认为与精子细胞成熟有关^[7]。在这 3 个亚型中,TrxR1 的研究最为广泛。因此,本文的主要关注内容集中在 TrxR1。

1.1 TrxR1 的底物

Trx 蛋白是一种氧化还原蛋白,其分子量相对较小,约为 12 kDa,在活性位点区域具有一段保守的 Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys 序列^[13]。TrxR1 以首尾相连的二聚体形式存在,是唯一一种能够催化硫氧还蛋白底物中二硫化物还原的氧化还原酶。在 TrxR 催化的反应中,TrxR1 从 NADPH 中获得电子,通过 N 端的 Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys (CVNNGC) 活性位点区域将电子传递给另一个亚基的 C 端的活性位点序列 Gly-Cys-SeCys-Gly (GCUG),形成了一个硫化硒/硒化硒氧化还原活性区域。C 端的硫化硒/硒化硒形式引起活性中心电子穿梭和链条的摆动,将电子传递到氧化型 Trx 活性位点区域内 Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys 上的二硫键(—S—S—),通过巯基/二硫键交换生成邻位二硫醇(—SH)₂(还原型 Trx)。来自还原型 Trx 活性位点内的邻位二硫醇通过巯基/二硫键交换反应与下游靶蛋白相互作用,生成二硫键(氧化型 Trx)。Trx 及其靶蛋白中的这种巯基/二硫键交换形成了氧化还原调控的基础。Trx 体系的催化简化过程如图 1 所示。

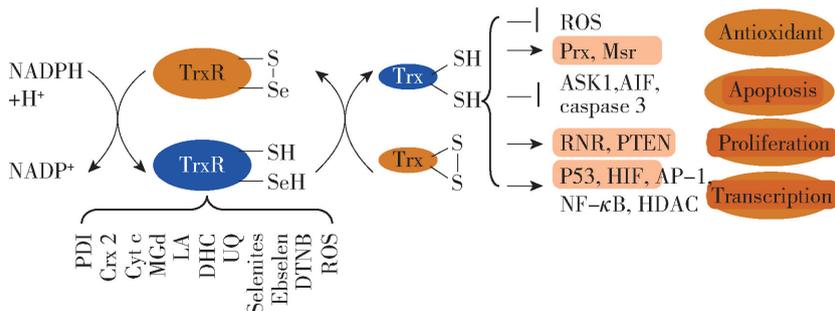


图 1 硫氧还蛋白体系的催化循环与功能^[14]

Fig. 1 Catalytic cycles and functions of the thioredoxin system^[14]

因 TrxR1 蛋白 C 末端存在可以灵活摆动的高反应性和表面暴露的 Sec 残基氧化还原活性位点区域,不仅能催化天然氧化型 Trx 上的—S—S—还原

成(—SH)₂维持 Trx 的还原型,还可以将电子从 NADPH 传递到其他底物上,如谷氧还蛋白 2(Grx2)、蛋白二硫键异构酶(PDI)和一些小分子,包括亚硒

酸盐、 H_2O_2 、脱氢抗坏血酸(DHC)、硫辛酸(LA)、泛醌(UQ)、细胞色素 C(Cyt c)、四氧吡啶和抗癌药物莫替沙芬(MGd)^[5, 15](见图1)。虽然还原型 Trx 在执行 Trx 系统的大部分功能方面起到了重要作用,但在一些研究中发现,有些药物以靶向 TrxR1 的方式发挥治疗作用。抑制 TrxR1 会导致细胞中还原型 Trx 水平的下降,从而抑制 Trx 的氧化还原功能。相较于抑制 Trx,靶向抑制 TrxR1 有 2 个优势:1) 除了抑制还原型 Trx 生成,还可以作用于其他底物蛋白;2) 一些抑制剂在抑制 TrxR1 活性后,会引起细胞内 ROS 含量升高,进而破坏抗氧化防御体系,引起细胞死亡。

1.2 TrxR1 的结构

hTrxR1 最早是从人胎盘中克隆出来的,相较于低等生物的 TrxR1 序列,其同源性仅为 31%^[16]。hTrxR1 (GeneBank: AAB35418.1) 和 hGR (GenBank: AAP88037.1) 的基因序列进行比对显示,它们之间的同源性为 34%,相似性则为 52% (见图 2(a))。在 GR 的 N 端中存在和人 TrxRs 的 N 端同样的催化位点 Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys,两者都位于酶的 FAD 结合域。不同的是,*E. coli* TrxR 的催化位点 Cys-Ala-Thr-Cys 在 NADPH 结合域(见图 2(b))^[14, 17]。通过比对 hTrxR 的 3 个亚型和 GR 发现,这 3 个 TrxR 相比 GR 在 C 端均多出一条延伸链,延伸链为 16 个氨基酸。值得注意的是,该链中包含一个独特且不可或缺的 Sec 残基^[18-19]。这个 Sec 残基与相邻的 Cys 通过硫化硒/硫化硒交换反应形成另一个氧化还原活性位点。用于比较 hTrxR、*E. coli* TrxR 和 hGR 的主要结构的简化模型如图 2 所示。

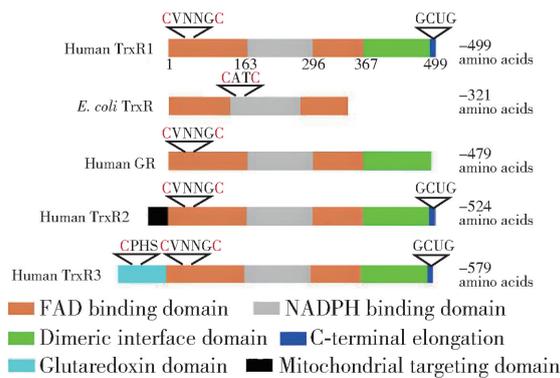
1991 年,TrxR1 结构首次被 Kuriyan 团队^[20]报道,在解析出的分辨率 2.0×10^{-10} m 的 *E. coli* TrxR1 蛋白晶体中,清晰地观察到 FAD、NADPH 结合区域。2001 年 Sandalova 团队^[7]首次报道大鼠 TrxR1 蛋白突变体(Sec498Cys)的三维结构,晶体分辨率达到 3.0×10^{-10} m。6 年后,Fritz-Wolf 团队^[21]公开了人类 TrxR1 蛋白结构,借助大肠杆菌表达系统大量表达出 hTrxR1 蛋白并纯化,生长出的蛋白晶体分辨率为 2.8×10^{-10} m。在对 hTrxR1 研究中发现,其整体结构与 rTrxR1 (GeneBank: AAF32362.1) 相似度较高,二者的一级序列同源性达 90%。rTrxR1 蛋白由 2 个完全相同的亚基组成,形成头对尾排列的结构,并在 2 个亚基的界面上形成双旋转对称(C2)轴(见图 3(c))。rTrxR1 的每个亚基中都存在一个 FAD 结合域(1—163 和 297—367 残基)、一个

```

1  MNPDSPELPS YVDYLLIIGG GSGGLAAA-----KEA AQVQKRVAV DVTFTPELT RAGLQGTQVN VQCKIKLRF
1  MGRGSEFQPG GFFPAGAVVA SYDYLVIQGG SGGLASAARA AELGAAAVV E-----SRKLGQGTQVN VQCVKIKRFVW
72  QAAIQQALQD DSRNYGNKVE ETVKEDMDRQ IEAVQNRIGS LNWGVRVALR EKVQVYENVA QQFQIGPRH-- IKAITNKGKE
72  NTAVHSSEFMI DHAQYGFQSC EG-KFQNRVLI KEKDAQVQR LMAIYQNHLLT ESHLEIINGH AAFYSDKPKFT IEVSGK---
150  KIVSASBFLI AVG---ERER YLGIQPKQKY CISSDCLFSL EYQFGQTVLR GASYVALECA GFLAGIQLGV YVMVR-SILL
148  --YTPARILL AVGGMPSTH ESQIQI-ASL GITSDGFFLL BELPGRSVLV GAGYVALECA GILSALGSKT SLMIRDPKVL
226  RGFDDMANK IGEHMERGI KEYKQVYPIK VESLEAG--L-----TPQRI EYVQGSVSE EIEEGXNYTV MLAGRDACT
225  RSPDSMISTN CTEELENAVQ EVLKFSQVKE VRKTLGSELV SMVTAVGRGL EVMNIPF--- ----DVDCL LMAIGRVPT
298  RKIGLETQVGV KINKEKTRIP VIOEQTNVQ YIYAIGDILE DRVLETPVAL QAGRLLAQRL YA-GSTVCKD YENVFTVET
297  RDAISLNLGL QTDK-GHEI VEEFQNRVWV IEYAVGVCV- GRALLTPVAL AGRKRLAIRL FEYKESDQHL YNNIFVYVS
377  DLEYGAGDLS EREAVKRFGE ENTEVYHVEY EPLMFTPTSR DNNIKYACTI CNKYKNERVV GHVTLSPNAG EMTQGFALG
375  HPIPIQVGLR EDEAIKRYGI ENKUYKTSF EIMYHAVIKR -KEKQKQVAV CANKE-EKVY GIMHQGLGCD IMLQGFVAVV
457  RGLGKPKOLD SFIQIHPVCA EYVFTLSTVK RSGASILQAG CUG -----> Human TrxR1
453  RMGATKAEFD NTVAIHTPS BELVLR -----> Human GR

```

(a) hTrxR1 和 hGR 的氨基酸序列比对(相同的氨基酸用蓝色表示,不同的氨基酸用红色表示)



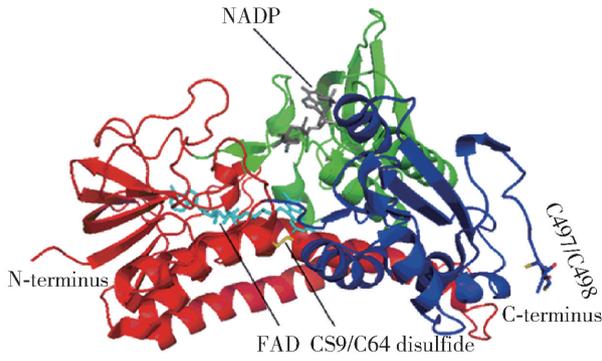
(b) hTrxR1、*E. coli* TrxR 和 hGR 的氨基酸序列和结构域的简化模型^[14]

图 2 硫氧还原蛋白还原酶及其相关酶的初级结构

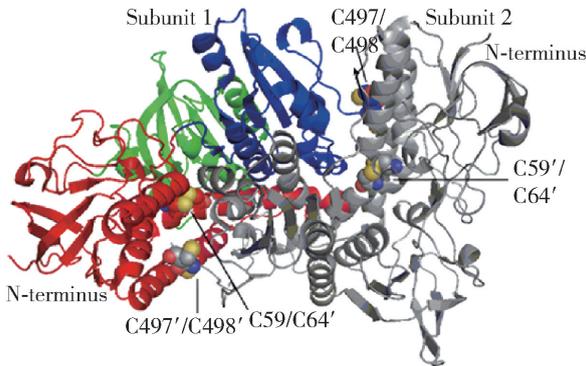
Fig. 2 Primary structures of thioredoxin reductases and related enzymes

NADP(H) 结合域(164—296 残基)以及一个界面域(368—499 残基)(见图 3(a))。N 端氧化还原中心埋藏在 FAD 结合域内,由 Cys59 和 Cys64 的 2 个 Cys 残基组成。与 GR 相比,rTrxR1 的 C 端具有一条由 16 个氨基酸组成的灵活延伸链,这个链条序列保守,其中的特征基序是 X-Cys-Sec-Y(X 和 Y 指任何氨基酸;rTrxR1/hTrxR1 该区域序列是 Gly-Cys497-Sec498-Gly)。这段区域形成了第二个氧化还原中心(硫化硒/硫化硒)。这个 C 端氧化还原中心远离 N 端氧化还原中心(见图 3(a)),其中 FAD 结合区域、NADP(H) 结合区域和相互作用区域分别标为红色、绿色和蓝色,NADP(灰色)和 FAD(青色)显示为棒状模型)。作为功能性酶,TrxR1 通过一个亚基的 C 端氧化还原中心靠近另一个亚基的 N 端氧化还原中心形成一个二聚体。在催化过程中,NADPH 首先将电子传递给酶结合的 FAD,随后 FAD 将电子转移到同一个亚基的 N 端 Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys 氧化还原中心(rTrxR1/hTrxR1 为 Cys59/Cys64),并将二硫键还原为单硫键。该 N 端硫基进一步将电子提供给另一个亚基 C 端硫化硒,并将其还原为硫化硒。TrxR 的电子流如图 3(d) 所示。从 rTrxR1 的晶体结构(见图 3(a)),一个亚基以

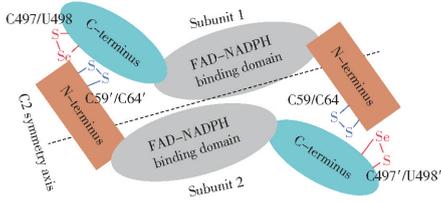
图 3(a)中描述的颜色表示,另一个以灰色表示。N 端氧化还原对 (Cys59/Cys64) 和 C 端氧化还原对 (Cys97/Sec498) 球形可以清楚地看出, C 端氧化还原中心 (Cys497/Sec498) 位于酶的表面, 而 N 端氧化还原中心 (Cys59/Cys64) 位于内部。



(a) 大鼠 TrxR1 的单体结构 (PDB 号: 1H6V^[7])



(b) 大鼠 TrxR1 二聚体结构



(c) 大鼠 TrxR1 头尾模型



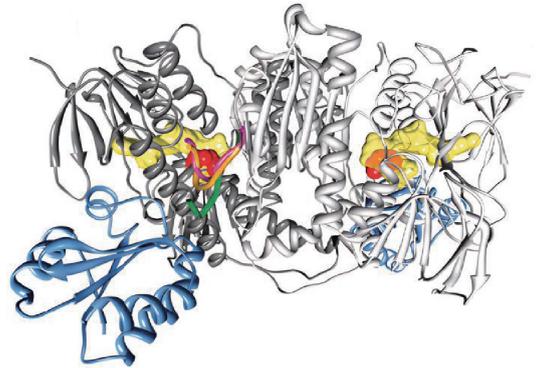
(d) 哺乳动物硫氧还蛋白还原酶 (TrxRs) 的简化电子流^[14]

图 3 哺乳动物硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 的结构

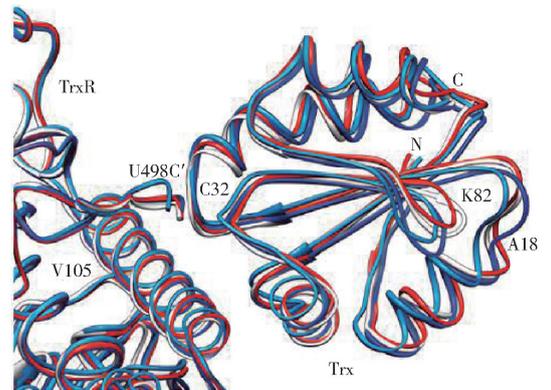
Fig. 3 Structures of mammalian thioredoxin reductase (TrxR)

2011 年, Fritz-Wolf 团队^[22] 解析出 TrxR1-hTrx 复合蛋白结构。与 2006 年表达 hTrxR1 蛋白一样, 借助大肠杆菌系统表达 hTrxR1 蛋白并与过量底物蛋白 hTrx 在接近生理的条件下共同孵育后得到 hTrxR1-Trx 复合蛋白, 纯化后结晶。为了得到复合蛋白, 使用 hTrxR1 突变体 (hTrxR1^{Cys497Ser, Sec498Cys}、

hTrxR1^{Sec498Ser}、hTrxR1^{Cys497-trunc}) 和 hTrx 突变体 (hTrx^{Cys73Ser}、hTrx^{Cys32Ser, Cys73Ser}、hTrx^{Cys35Ser, Cys73Ser})。将它们组合之后, 只有 hTrxR1^{Cys497Ser, Sec498Cys} 和 hTrx^{Cys35Ser, Cys73Ser} 可以形成稳定复合物。hTrxR1-Trx 复合结构见图 4 (hTrxR1 和 hTrx 分别用灰色和蓝色色带表示, FAD (黄色) 和 N 端氧化还原中心 (红色) 用球表示, C 末端 (最后 8 个残基) 在“氧化等待位置”“还原等待位置”和在 hTrxR1-hTrx 复合体中发现的不同构象分别为洋红色、橙色和绿色, 使用 uCsF Chimera40 软件包制作分子图形图像)。同源二聚体 TrxR1 具有 2 个氧化还原中心, 这 2 个中心是催化作用所必需的。N 端的氧化还原中心 (Cys59/Cys64) 被埋在蛋白质中, 而第二个氧化还原中心位于 C 末端 (Cys497/Sec498) 的一个灵活的柔性链上。同时, 晶体结构中, Cys497 和 Cys35 之间距离 10×10^{-10} m, 超过了经典认为的电子传递的 5×10^{-10} m 范围, 此结果有力地证实电子通过溶剂中的水在 Cys497^{hTrxR1} 和 Cys35^{Trx} 之间传递的假说。



(a) hTrxR1-hTrx 复合蛋白整体二聚体结构



(b) 4种 hTrxR1-hTrx 配合物的叠加结构

图 4 hTrxR1-hTrx 复合蛋白整体二聚体结构及 4 种 hTrxR1-hTrx 配合物的叠加结构^[22]

Fig. 4 Overview structure of the hTrxR1-hTrx complex protein and superimposed structures of the four hTrxR1-hTrx complexes^[22]

在图4(b)4种hTrxR1-hTrx配合物的叠加结构中(使用色带表示法来显示4种配合物中Trx分子的不同位置。正交:灰色和青色;单斜:蓝色和红色)。Sec498Cys^{hTrxR1}和Cys32^{hTrx}在分子内二硫化物附近只有微小的差异,但在Lys82和Ala18附近,C α 原子之间的距离增加到 4×10^{-10} m,每个hTrxR1^{Cys497Ser,Sec498Cys}的C端有一个hTrx^{Cys35Ser,Cys73Ser},hTrxR1-hTrx复合物的界面相当小,仅涉及Trx中的31—74残基和TrxR1中103—146的 α 螺旋残基。hTrxR1-hTrx复合物通过这些残基之间的弱相互作用进一步稳定了结构,包括Trp31-Trp114'、Asp63-Lys146'、Glu70-Arg121'、Lys36-Glu103'、Asp60-Arg117'和Lys72-Glu122'。

硒半胱氨酸Sec是半胱氨酸Cys的类似物,其中硫被硒取代,两者的化学性质总体相似。稍有不同的是,Sec中硒醇基团的 pK_a 值显著低于Cys的硫醇基团(Sec的 pK_a 为5.8,Cys的 pK_a 为8.3),这意味着Sec中的硒醇几乎完全以硒化物(R-Se)的形式存在,而Cys中的大部分硫醇在生理条件(pH = 7.4)下以非电离形式存在(R-SH)^[23]。这说明,在相同反应环境中Sec比Cys更容易发生反应。这一推论在将Sec498突变成Cys后TrxR1活性急剧降低实验中被证实^[24]。

2 TrxR的功能

2.1 TrxR与肿瘤

TrxR通过还原Trx催化生物体内一系列生理生化反应并调节氧化还原平衡,与细胞增殖、生长、凋亡、肿瘤发生、转移和血管生成密切相关^[25]。在肿瘤发展早期阶段,因为Trx系统通过抵抗或清除来自外源性物质或致癌物质引起的氧化应激,起到对正常细胞的保护和预防作用,避免正常细胞向癌细胞方向转化。然而,一旦健康细胞启动肿瘤表型后,高表达的TrxR/Trx在许多方面促进肿瘤的进展和转移,例如诱导血管生成、抑制凋亡以及促进肿瘤细胞的生长等,还可能导致化疗药物的耐药性增加。迄今为止,在多种肿瘤细胞中已发现TrxR/Trx系统的过度表达,这些肿瘤包括肺癌、宫颈癌、胰腺癌、肝癌、前列腺癌、恶性胸膜间皮瘤、淋巴瘤和白血病。

TrxR间接清除自由基,并通过降低其他自由基清除剂的水平来维持细胞功能。TrxR作为一种电子载体,对生物合成酶的催化循环至关重要。它保护细胞质蛋白免受氧化,使其形成二硫化物,并抑制其自身的活性,从而诱导肿瘤细胞凋亡^[26]。肿瘤细

胞的快速生长、扩散、转移与细胞凋亡不平衡有关^[25]。Trx系统的抑制可以改变细胞内的氧化还原状态,主要通过积累ROS、激活凋亡信号调节酶1(apoptosis signal-regulating kinase 1,ASK1)以及抑制procaspase 3亚硝基化,从而诱导细胞凋亡^[27]。因此,有效干预细胞凋亡过程可能是肿瘤治疗的重要策略。

2.2 TrxR与线粒体凋亡通路

线粒体途径通过抑制TrxR/Trx来诱导细胞发生凋亡^[28]。ASK1是一种有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK),作为将信号从细胞表面传递到细胞核内的重要传递者,负责激活JNK和p38/MAPK激酶通路^[29-30]。BCL-2蛋白家族的成员,包括促进细胞凋亡的Bax蛋白和抵抗细胞凋亡的BCL-2蛋白,在线粒体凋亡通路中发挥重要作用。Bax蛋白促进Cyt c释放到细胞质中,形成Cyt c/Apaf-1/caspase 9凋亡复合物并激活caspase 3^[31]。有文献报道,金属配合物可以与TrxR的C端Cys-Sec氧化还原活性中心结合并抑制其活性,从而促进ROS的积累,破坏氧化还原稳态,改变线粒体膜的通透性^[32]。刺激Cyt c释放,最终诱导肿瘤细胞发生凋亡^[33]。综上所述,靶向抑制TrxR可促进癌细胞凋亡。

此外,氧化还原调节最重要的作用是清除线粒体呼吸产生的ROS^[28,34]。ROS可以通过信号转导和氧化应激介导的凋亡途径促进细胞死亡^[35]。TrxR通过诱导Trx,刺激下游通路来抑制细胞凋亡^[36]。Trx通过抑制ASK1抑制细胞凋亡,ASK1通过p38和JNK途径介导,最终导致细胞凋亡^[30]。还原型Trx与ASK1的N端结合,形成复合体Trx-ASK1来抑制ASK1作为信号传递因子的功能^[37]。一旦Trx残基被氧化就会促进复合体的分解及ASK1磷酸化,引起下游ASK1信号的激活,Cyt c的释放,激活caspase 3,最终导致细胞凋亡^[38]。

2.3 TrxR与内质网凋亡通路

作为细胞凋亡的一种机制,内质网在TrxR系统中起着重要的调控作用。在TrxR还原作用下,将底物蛋白的2个半胱氨酸残基上的巯基还原成一个二硫键^[39]。通过改变蛋白质二硫键的形成,TrxR活性影响蛋白质折叠和构象^[40]。ROS的增加会扰乱细胞内的氧化还原稳态,并导致内质网中展开蛋白的持续积累^[41]。为了保持这种平衡状态,随后触发内质网反应^[42]。通过激活以下3个跨膜内质网传感器来实现内质网反应:胰内质网激酶(PERK)、肌醇需要酶(IRE1)和激活转录因子6(ATF6)。在这

3种传感器中,IRE1的作用持续时间短,激活内质网响应快,是最敏感的传感器^[43]。此外,IRE1作为内质网的一个单体表达,同时具有蛋白激酶和RNA核酸内切酶活性。当内质网受到压力刺激时,自磷酸化发生二聚反应,随后激活相应的核酸酶活性。下游底物被裂解转化为活跃的转录因子,进入细胞核,激活下游转录因子以缓解内质网压力^[43-44]。此外,内质网介导的细胞凋亡主要与诱导高水平表达CHOP有关(CHOP是内质网介导细胞凋亡的下游转录共激活因子CAAT区/增强子结合蛋白(CAAT/enhancer binding proteins, C/EBP)),在内质网介导的细胞凋亡中起关键作用^[45]。TrxR直接影响ROS水平,进而激活内质网通路。

靶向细胞质中的内质网途径是一个有趣的促凋亡抗癌途径^[42]。研究表明,TrxR诱导内质网通路相关信号转导绕过肿瘤耐药性^[40]。此外,抗癌药物诱导死亡的能力与ROS的产生及其诱发内质网的能力有关。ROS和内质网同时刺激不同的损伤相关分子模式,并通过不同的机制最终导致癌细胞死亡^[41]。一种针对性抑制Trx/TrxR系统的 β -酰氨基丙烯酸酰胺化合物(简称SK053),诱导淋巴瘤细胞(RAJI)内质网激活,进而导致细胞凋亡。SK053处理肿瘤细胞可诱导高水平CHOP的表达,且剪接XBP-1水平的增加先于诱导细胞凋亡。此外,与野生型小鼠胚胎成纤维细胞(WT MEFs)相比,CHOP缺陷小鼠胚胎成纤维细胞(CHOP^{-/-} MEFs)对SK053诱导的细胞凋亡具有更强的抗性,这表明肿瘤细胞的凋亡依赖于转录因子的表达^[46]。总之,这些结果表明ERS相关的凋亡依赖于TrxR抑制与肿瘤细胞内质网诱导之间的联系。

2.4 TrxR直接作用于死亡受体通路

TrxR是参与细胞内氧化应激信号调节的关键分子^[47]。TrxR可以抑制对氧化应激和炎症敏感的核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)和活化蛋白1(activator protein, AP-1)的活性。此外,它还通过调控ASK1和凋亡信号通路的转导,抑制炎症因子的表达,从而降低炎症反应^[48]。当细胞受损时,内源性TrxR和外源性重组hTrxR均表现出抗氧化活性和清除氧自由基能力,从而降低组织中丙二醛水平,增强超氧化物歧化酶活性,减轻组织和器官损伤,并改善组织缺血、微循环障碍和水肿的状况^[47,49]。

TrxR调控许多应激相关基因的表达,包括参与凋亡调控的基因。如TrxR调控caspase家族成员的

表达,这些成员均与凋亡相关^[50]。因此,可以通过调控TrxR活性来调控凋亡途径。实验证实,在用抑制剂抑制TrxR后,不仅导致TrxR功能丧失,还改变了细胞内转录进程,甚至减少抗凋亡蛋白的表达^[51]。TrxR调控的另一种方式是控制凋亡前体基因的表达^[52]。

2.5 TrxR与ROS

ROS是细胞代谢的正常产物,是一种含氧的化学分子,包括H₂O₂和超氧阴离子,在细胞代谢中起重要作用^[53]。ROS的平衡受ROS系统、TrxR系统、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶的调控^[54]。在细胞内,ROS发挥多种重要功能,如信号转导、细胞增殖和分化、调节酶活等。此外,它还参与调节细胞因子引发的炎症刺激和杀死外部病原体等生理过程,因此,是细胞中必不可少的成分^[55]。然而,与正常细胞相比,癌细胞由于其无控制的增殖、线粒体功能障碍、p53功能缺失以及高代谢率等特征,导致细胞内ROS水平不断上升。为了维持氧化还原平衡,癌细胞会上调抗氧化系统以抵消这一增加的ROS水平^[56]。值得注意的是,高ROS含量使得癌细胞对ROS的敏感性较普通细胞更高,这为以ROS介导的癌症治疗奠定了基础。越来越多的报道表明ROS在肿瘤发展中发挥双重作用。一方面,ROS的轻微升高可能通过调控基因组DNA的突变或诱导肿瘤信号通路的激活,促进肿瘤的发展。另一方面,过多的ROS诱导蛋白质中二硫键的形成,对蛋白质造成严重的氧化损伤^[57]。

TrxR是一种重要的ROS清除酶,维持细胞内氧化还原平衡,保护癌细胞免受大量ROS的破坏^[58]。化疗或物理辐照等多种癌症治疗方法都与ROS的清除密切相关。研究发现,癌细胞中高水平的TrxR/Trx表达会增加肿瘤治疗耐药性的概率,并且已经证明靶向抑制TrxR可以提高治疗效果^[59]。因此,设计开发促进肿瘤细胞中ROS积累的抗氧化酶特异性抑制剂是一种有效的抗癌策略,可以选择性地提高细胞毒性,导致癌细胞死亡^[60-61]。

3 TrxR的抑制剂功能

自21世纪初以来,TrxR作为一种癌症治疗潜在靶点在基础学科和临床上被广泛研究^[62-63],基于TrxR蛋白各种可能机制以及暴露在蛋白表面的含Sec活性位点,已经开发出了多种抑制剂^[64]。这些抑制剂根据结构类型主要分为3类:含金属离子的配合物(包括金、铂化合物)、含迈克尔受体的天然

产物及其衍生物^[65-66]、二硫化物和含硫/硒分子化合物。

3.1 含金属离子的配合物

哺乳动物 TrxR 异构体的一个特征是在其 C 端氧化还原中心存在邻巯基-硒醇对。由于硫醇的 pK_a 值较高(约 8.5),它们会部分电离成硫代酸盐,而硒醇的 pK_a 值较低(约 5.8),在生理条件下主要解离为硒代酸盐。根据“软硬酸碱”理论,硫酸盐和硒酸盐是软碱,容易与软酸,如金、铂、汞、银、锌、镉、钷等形成络合物^[67-69]。因此,多种金属配合物被开发为有效的 TrxR 抑制剂。TrxR 能够强烈结合毒性强的金属,同时它的底物 Trx 也是一种重金属结合蛋白质。当金属的总浓度远低于 Trx 的浓度时,Trx 可以帮助酶免受金属离子的抑制。底物不起强效抗抑制剂的作用,导致其抑制动力学难以测定。这个过程大概分为 2 个阶段,第一阶段是有毒金属与底

物结合的快速过程,第二阶段是将有毒金属从底物转移到酶的较慢过程^[70]。

一些经典的含金属离子的 TrxR 抑制剂如图 5 所示。金诺芬(1)^[71]和硫金代葡萄糖(2)^[72]是最先被报道的 TrxR 强效含金抑制剂,其 IC_{50} 值分别为 20 和 65 nmol/L。金诺芬被批准用于治疗关节炎,但是由于其亲脂性较高,对正常细胞具有严重的毒性,对患者产生较大的副作用,因此逐渐不被临床使用。研究显示,TrxR 硒半胱氨酸残基上的硒巯基是其特异性作用靶点。Lowe^[73]报道了一系列三吡啶-铂(II)配合物。这些分子抑制了 TrxR,其 IC_{50} 值浓度范围从几纳摩尔每升到几百纳摩尔每升。其中,化合物(3)(4)(5)和(6)以 IC_{50} 值为 3、4、7 和 6 nmol/L 在体外抑制纯 TrxR 蛋白活性。此外,在细胞毒性检测中发现,这几种化合物均能有效抑制肿瘤细胞的生长。同时,在酶活测定中发现,化合物

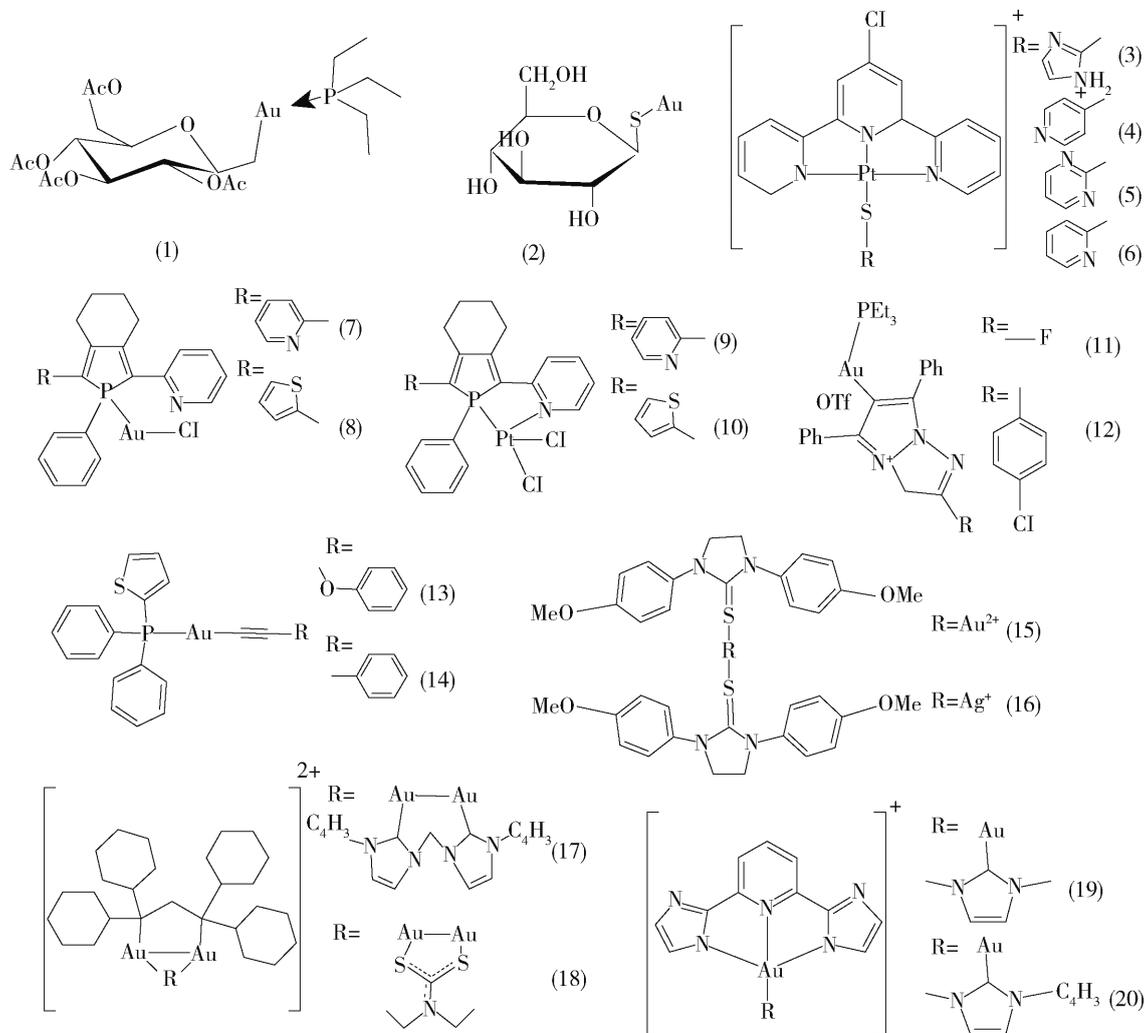


图5 含金属离子的 TrxR 抑制剂

Fig. 5 Metal complexes as TrxR inhibitors

(3)(4)对 TrxR 的抑制活性远高于 GR 蛋白(IC_{50} 值分别为 1 000 和 400 nmol/L)。在小鼠疾病模型中,(3)表现出很高的体内抑制肿瘤生长的作用。

Charvet 等^[74]合成出一系列与金属络合的磷孔衍生物作为 TrxR 抑制剂和抗癌剂。化合物(7)(8)(9)和(10)高效抑制 TrxR,其 IC_{50} 值分别为 0.8、1、1 和 1 nmol/L。但是在将 TrxR 第 498 位上的 Sec 突变为 Cys 后,这 4 种分子对突变酶 TrxR^{Sec498Cys} 的抑制作用较弱。这个结果有力证明 Sec 残基参与了酶与配合物之间的相互作用。李敏勇等^[75]制备了 2 种三唑基金配合物(11)(12),并评估了它们对 TrxR 的抑制效力和对肿瘤细胞的细胞毒性。结果显示,(11)(12)均以低纳摩尔浓度有效抑制 TrxR 酶活,以及具有显著的细胞毒性。

王浩等^[76]以金(I)与有机膦和炔基配位形成结构为(13)(14)的两个复合物。在酶活测定中发现,(13)(14)强效抑制纯化的人源 TrxR1 酶活,其 IC_{50} 值分别为 2 和 10 nmol/L。但是,对 GR 的抑制作用较弱($IC_{50} > 1\ 000$ nmol/L)。同时,化合物(13)在体内/体外实验中均显著抑制肿瘤生长。

Che 等^[77]制备了一组具有硫脲配体的 Au(I)(15)、Ag(I)(16)络合物。(15)和(16)在低微摩尔浓度下表现出细胞毒性。同时,在酶活测定中表现出高选择性地抑制 TrxR 而不抑制 GR 和谷胱甘肽过氧化酶,抑制效果在纳摩尔级别浓度。将(15)以腹腔注射方式注射进小鼠体内(每周 2 次,剂量为 100 mg/kg),在经过 4 周的给药后,小鼠肿瘤体积减少了 38%。

此外,双核金(I)化合物(17)(18)^[78]、含有 N-杂环卡宾配体的一些金(III)络合物(19)(20)^[79],均被证明能够抑制 TrxR 活性、癌细胞增殖,诱导肿瘤细胞发生凋亡并且在动物模型鼠体内抑制肿瘤生长。因此,这些含金化合物被证明是 TrxR 的抑制剂和潜在的抗癌药物。Du 等^[80]描述了一种与 RGD 环肽结合的金纳米团簇 Au₄RGD₃ 作为 TrxR 抑制剂和抗癌细胞杀伤剂。环肽序列为 cyclo[-Arg-Gly-Asp-Phe-Lys]-Tyr-Cys-Cys。癌细胞经过 Au₄RGD₃ 处理后,其 TrxR 酶活性显著受到抑制。同时,还能有效地抑制癌细胞的存活能力和模型鼠体内肿瘤生长。

3.2 含迈克尔受体的天然产物及其衍生物

迈克尔受体通常是与电子吸引基团(例如酯、酮、腈、亚硝基和磺酰基)相连的烯烃,也被称为 α , β -不饱和酯或烯酮。这些电子吸引基团将双键内的

电子密度拉向自身,使得烯烃的 β 碳缺乏电子并具有亲电性。作为一种多相的亲电体,迈克尔受体具有很好的生物学活性,并对硒醇以及巯基等亲核性基团具有很高的反应性^[81]。哺乳动物的 TrxR 酶具有暴露在表面的巯基/硒醇对,使它们能够轻易地攻击带有迈克尔受体结构的分子中存在的亲电性双键^[82-83]。含迈克尔受体的天然产物及其衍生物的 TrxR 抑制剂如图 6 所示。

Geoffrey 等^[84]和 Stevens 等^[85]合成出一系列以 4-羟基环己-2,5-二烯酮为核心结构的化合物((21)~(26)),在微摩尔浓度下均表现出不同程度的 Trx 系统抑制效果。其中 AW464(21)在肿瘤模型鼠体内有明显的抗癌效果^[86]。Ostaszewski 等^[87]用一系列酰基氧甲基丙烯酸酯对 Trx 系统进行了研究。结果发现,在这些化合物中,(27)对重组 TrxR 的抑制作用($IC_{50} = 37.1\ \mu\text{mol/L}$)明显高于 GR($IC_{50} > 100\ \mu\text{mol/L}$)。同时,(27)在微摩尔浓度下,对多种癌细胞产生明显的细胞毒性。Kunkel 等^[88]筛选了国家癌症研究所的药物数据库(大于 60 000 种化合物),并确定了几种具有大于 30 倍选择性的有效 TrxR 抑制剂,(28)就是其中一个化合物。顺铂(29)是临床上常用于治疗实体瘤的广谱化疗药,也是一种 TrxR 抑制剂^[89]。姜黄素(30)及类似物是一类多酚类 TrxR 不可逆抑制剂,它不可逆地使 TrxR 的催化活性位点 Cys497/Sec498 烷基化, $IC_{50} = 3.6\ \mu\text{mol/L}$ ^[90]。姜黄素通过抑制 Trx 系统而使细胞内氧化应激水平增高,从而诱导 ROS 的产生、DNA 损伤以及 Trx 活性丧失,最终导致细胞凋亡^[91]。棕榈毒素衍生物,如棕榈毒素 CPI(31)、PX-911(32)、PX-916(33)和 PX-960(34),表现出优秀的抑制纯化的人源 TrxR1 酶活性的效果,其 IC_{50} 值分别为 0.35、3.20、0.28 和 0.27 $\mu\text{mol/L}$ ^[92]。这些化合物均能有效抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞增长。在另一项体内研究中,PX-916(33)毒性较低。单次静脉注射 PX-916 25 mg/kg 后,24 h 内抑制 MCF-7 模型鼠体内肿瘤细胞中 TrxR 活力超过 50%,并且抑制作用持续 48 h 以上。同时,小鼠的肿瘤生长显著下降^[93]。三萜二氧化物(Triptolide)(35)是从传统中药中提取出来的一种具有生物活性的天然产物,在急性 T 细胞白血病细胞 Jurkat 细胞中通过 MALDI-TOF 肽指纹分析被发现与 TrxR 结合^[94]。但是目前还没有关于(35)对 TrxR 功能影响的报告。

3.3 含二硫化物和含硫/硒分子的化合物

硫、硒和碲等卤族元素是氧化还原活性元素,通

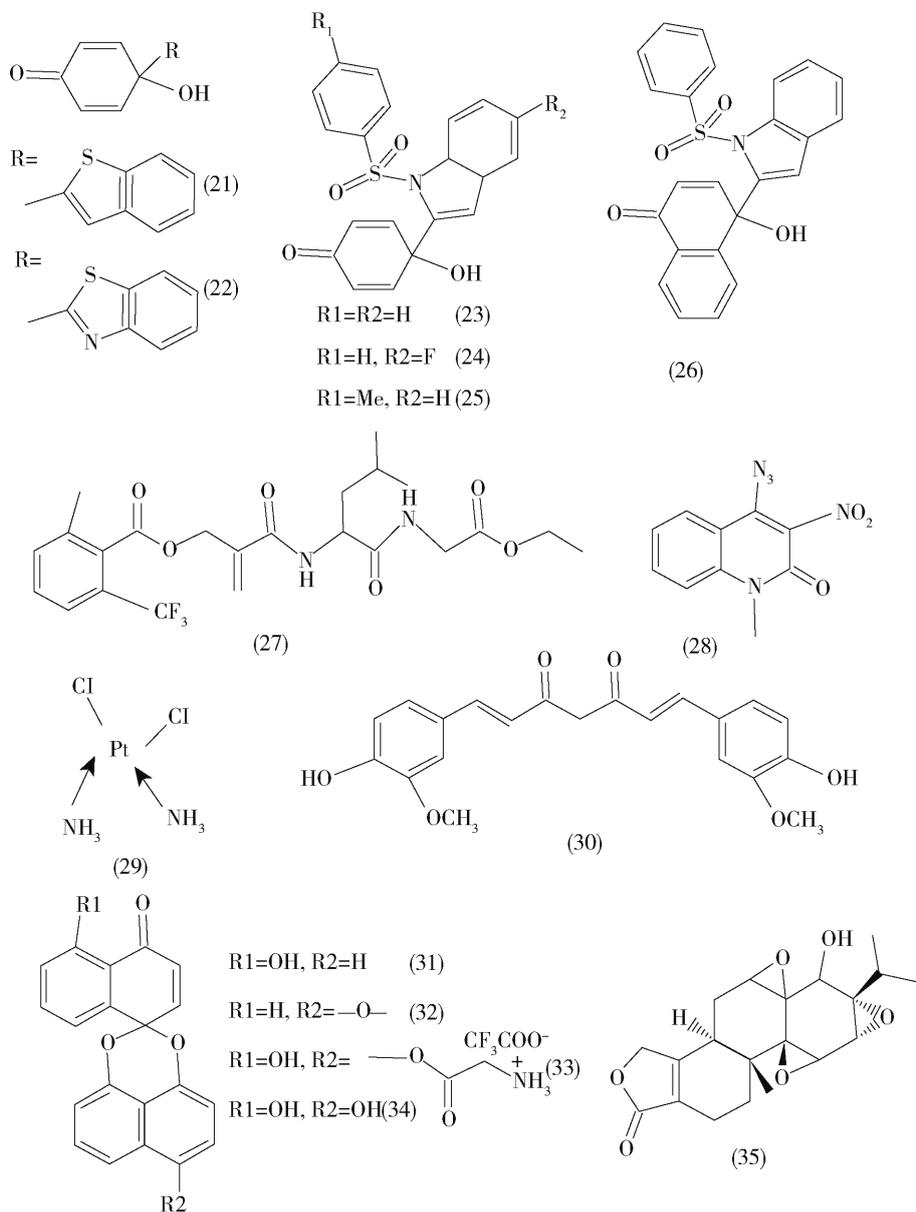


图6 含迈克尔受体的 TrxR 抑制剂

Fig.6 Michael acceptors as TrxR inhibitors

常具有多种氧化态。例如,硫的常见氧化态范围为 $-2 \sim +6$, 包括 $-2, 0, +2, +4$ 和 $+6$ 。卤族元素的氧化还原特性使得含有它们的分子能够与 TrxR 酶相互作用, 既可以作为抑制剂, 也可以作为底物^[95]。正是利用这一原理, 用哺乳动物 TrxR 酶对二硝基苯磺酸钠 (DTNB) 进行还原反应, 已成为检测 TrxR 活性的经典方法^[96]。一些含二硫化物和含硫/硒分子的 TrxR 抑制剂如图 7 所示。

Kirkpatrick^[97] 合成出一系列不对称二硫化物作为潜在的 Trx 和 TrxR 抑制剂, 其中效果显著的一个分子 PX-12 ((36), 也被称为 IV-2) 通过与蛋白质中的 Cys 残基形成混合二硫键而共价结合到 Trx 上。

有趣的是, PX-12 是 TrxR 的底物, 因此也是 TrxR 还原氧化型 Trx 时的竞争性抑制剂 ($K_i = 31 \mu\text{mol/L}$)。PX-12 能够抑制癌细胞增殖并缩小动物模型中肿瘤大小。目前, PX-12 对晚期和转移性癌症患者进行的临床 I 期试验已经完成。对晚期胰腺癌患者进行的 II 期临床试验, 由于疗效不佳已终止, 但 PX-12 仍是一种潜力很大的抗癌药物^[98]。Hausheer 等^[99] 证实二硫代乙磺酸二钠盐 ((37), 也被称为 dimesna、BNP7787 和 TavoceptTM) 具有该特性。这种二硫化物是 Trx 系统的底物 ($K_m = 72 \mu\text{mol/L}$), 但对 TrxR 单独不起作用, 并且对 Trx/TrxR 介导的胰岛素还原表现出弱抑制作用。TavoceptTM 在日本完成了

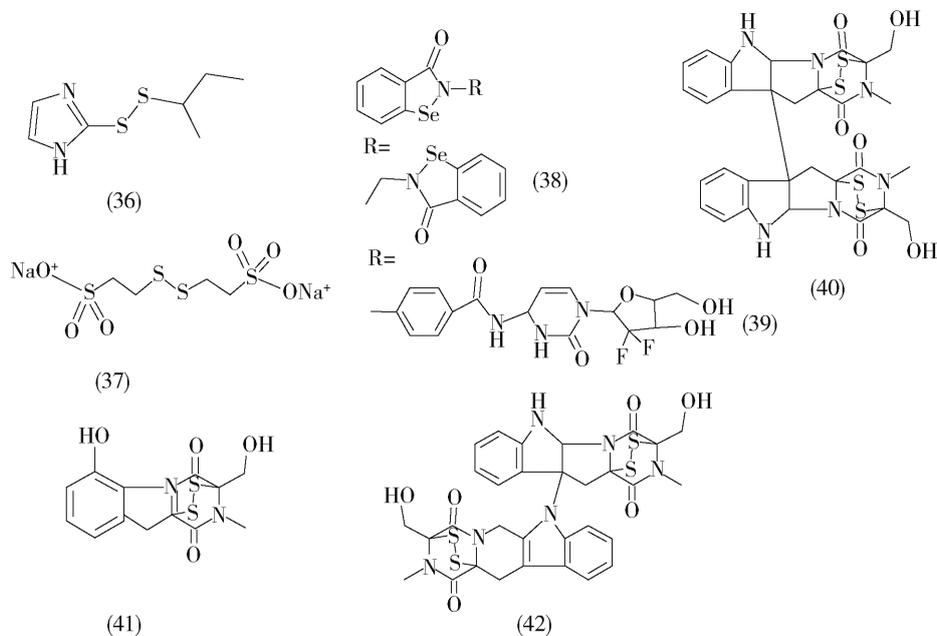


图7 含二硫化物和含硫/硒分子的 TrxR 抑制剂

Fig. 7 Dichalcogenides and sulfur/selenium-containing inhibitors of TrxR

III期临床试验,证明接受 Tavocept™ 治疗的晚期非小细胞肺癌患者的生存时间增加。

研究人员曾制备出基于依布硒啉(ebselen)骨架的一系列化合物,并确定了它们对 TrxR 的抑制作用^[100]。其中, Ethaselen (38) 和 (39) 均对纯化的 TrxR 具有强效抑制作用, IC₅₀ 值分别为 0.35 和 0.03 μmol/L。这 2 种化合物在低微摩尔浓度下皆有效抑制 MCF-7 细胞的生长。在小鼠疾病模型中, (38) 在给药后,非常高效地抑制肿瘤体积。由于非小细胞肺癌细胞高表达 TrxR 的特性, (38) 已在进行非小细胞肺癌 I 期临床试验。

含有二环二硫化物结构的分子也可作为治疗癌症的药剂。Bible 等^[101] 发现木壳素((40), chaetocin)、胶毒素((41), gliotoxin) 和毛壳菌素((42), chaetomin) 是 TrxR 的底物,其 K_m 值分别为 4.6、16.9 和 16.1 μmol/L。在他们的实验条件下, Trx 的 K_m = 104.7 μmol/L。这些数据表明, (40) (41) 和 (42) 对 TrxR 具有更高的亲和力,因此它们是 TrxR 的竞争性抑制剂。进一步研究表明, (40) 通过诱导氧化应激促进癌细胞凋亡。

4 结论

Trx 系统在调节细胞死亡途径中扮演重要角色。作为 Trx 系统的主要功能蛋白, TrxR 控制着 Trx 的氧化还原状态,从而决定了该系统的多项功能。研究表明, TrxR 过表达对于维持肿瘤表型、肿

瘤生长和转移至关重要,并已在多个肿瘤实验中得到验证^[102]。因此, TrxR 具有成为癌症治疗药物的潜力,值得进一步研究和开发。

目前靶向 TrxR 抑制剂的开发现状主要集中在以下几个方面:

1) 虽有一些 TrxR 抑制剂正在临床试验中,但这些抑制剂对 TrxR 并不是特异性的。

2) 开发 TrxR 的特异性抑制剂,目前还处于临床前阶段。

3) 由于 TrxR 的抑制会引起胞内氧化应激升高,将 TrxR 抑制剂和 ROS 促进剂联合使用,可能会增强在癌症治疗中的临床效果。

参考文献:

- [1] DLER F D M, AMNA A, KHADIJA E H, et al. The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 19(11): 1266-1303.
- [2] 冷宁, 赵永利, 李茂江, 等. 硫氧还蛋白还原酶在肺癌诊断、治疗及预警中的应用[J]. *临床肺科杂志*, 2017, 22(2): 199-202.
- [3] LENG N, ZHAO Y L, LI M J, et al. Role of plasma thioredoxin reductase for diagnosis, alert and therapy in lung cancer [J]. *Journal of Clinical Pulmonary Science*, 2017, 22(2): 199-202. (in Chinese)
- [3] BARBOSA N V, NOGUEIRA C W, NOGARA P A, et al. Organoselenium compounds as mimics of selenoproteins

- and thiol modifier agents [J]. *Metallomics*, 2017, 9(12): 1703-1734.
- [4] LEE S, KIM S M, LEE R T. Thioredoxin and thioredoxin target proteins; from molecular mechanisms to functional significance [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 18(10): 1165-1207.
- [5] ARNÉR E S J. Focus on mammalian thioredoxin reductases — important selenoproteins with versatile functions [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2009, 1790(6): 495-526.
- [6] MUSTACICH D, POWIS G. Thioredoxin reductase [J]. *Biochemical Journal*, 2000, 346(1): 1-8.
- [7] SANDALOVA T, ZHONG L, LINDQVIST Y, et al. Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase; implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(17): 9533-9538.
- [8] ARSCOTT L D, GROMER S, SCHIRMER R H, et al. The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(8): 3621-3626.
- [9] MIRANDA-VIZUETE A, SPYROU G. Genomic organization and identification of a novel alternative splicing variant of mouse mitochondrial thioredoxin reductase (TrxR2) gene [J]. *Molecules and Cells*, 2002, 13(3): 488-492.
- [10] JAKUPOGLU C, PRZEMECK G K H, SCHNEIDER M, et al. Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(5): 1980-1988.
- [11] CONRAD M, JAKUPOGLU C, MORENO S G, et al. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(21): 9414-9423.
- [12] SUN Q A, KIRNARSKY L, SHERMAN S, et al. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(7): 3673-3678.
- [13] LAURENT T C, MOORE E C, REICHARD P. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* b [J]. *The Journal of biological chemistry*, 1964, 239(1): 3436-3444.
- [14] ZHANG J, LI X, HAN X, et al. Targeting the thioredoxin system for cancer therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38(9): 794-808.
- [15] ARNER E S J, ZHONG L W, HOLMGREN A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase [J]. *Oxidants and Antioxidants*, 1999, 300(1): 226-239.
- [16] GASDASKA P Y, GASDASKA J R, COCHRAN S, et al. Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase [J]. *FEBS Letters*, 1995, 373(1): 5-9.
- [17] WAKSMAN G, KRISHNA T S R, WILLIAMS C H, et al. Crystal structure of *Escherichia coli* thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution; implication for a large conformational change during catalysis [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 236(3): 800-816.
- [18] GLADYSHEV V N, JEANG K T, STADTMAN T C. Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to tga in the human placental gene [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(12): 6146-6151.
- [19] ZHONG L W, ARNER E S J, HOLMGREN A. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase; the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(11): 5854-5859.
- [20] KURIYAN J, KRISHNA T S, WONG L, et al. Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes [J]. *Nature*, 1991, 352(6331): 172-174.
- [21] FRITZ WOLF K, URIG S, BECKER K. The structure of human thioredoxin reductase 1 provides insights into C-terminal rearrangements during catalysis [J]. *J Mol Biol*, 2007, 370(1): 116-127.
- [22] FRITZ WOLF K, KEHR S, STUMPF M, et al. Crystal structure of the human thioredoxin reductase-thioredoxin complex [J]. *Nat Commun*, 2011, 2(383): 1-8.
- [23] ZHANG B, GE C, YAO J, et al. Selective selenol fluorescent probes: design, synthesis, structural determinants, and biological applications [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(2): 757-769.
- [24] ZHONG L W, HOLMGREN A. Essential role of selenium

- in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(24): 18121-18128.
- [25] CRANE M S, HOWIE A F, ARTHUR J R, et al. Modulation of thioredoxin reductase-2 expression in EAhy926 cells; implications for endothelial selenoprotein hierarchy [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 2009, 1790(10): 1191-1197.
- [26] NORDBERG J, ARNER E S J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, 31(11): 1287-1312.
- [27] HOLMGREN A, LU J. Thioredoxin and thioredoxin reductase; current research with special reference to human disease [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 396(1): 120-124.
- [28] FAN X Y, LIU Y J, CHEN K, et al. Organic arsenicals target thioredoxin reductase followed by oxidative stress and mitochondrial dysfunction resulting in apoptosis [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 143(1): 1090-1102.
- [29] LIANG B, SHAO W, ZHU C, et al. Mitochondria-targeted approach; remarkably enhanced cellular bioactivities of TPP2a as selective inhibitor and probe toward trxr [J]. *Acs Chemical Biology*, 2016, 11(2): 425-434.
- [30] HWANG B H, JEONG J W, HAN M H, et al. Auranofin, an inhibitor of thioredoxin reductase, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma hep3b cells by generation of reactive oxygen species [J]. *General Physiology and Biophysics*, 2017, 36(2): 117-128.
- [31] TSIMAKOURIDZE E V, ALIBHAI F J, MARTINO T A. Therapeutic applications of circadian rhythms for the cardiovascular system [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2015, 6(1): 77-87.
- [32] YAO X F, ZHENG B L, BAI J, et al. Low-level sodium arsenite induces apoptosis through inhibiting TrxR activity in pancreatic beta-cells [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015, 40(2): 486-491.
- [33] DUAN D, ZHANG B, YAO J, et al. Shikonin targets cytosolic thioredoxin reductase to induce ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia hl-60 cells [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 70(1): 182-193.
- [34] XIE Q, LAN G, ZHOU Y, et al. Strategy to enhance the anticancer efficacy of X-ray radiotherapy in melanoma cells by platinum complexes, the role of ROS-mediated signaling pathways [J]. *Cancer Letters*, 2014, 354(1): 58-67.
- [35] ZHANG H, ROSE B J, PYUEN A A, et al. In vitro antineoplastic effects of auranofin in canine lymphoma cells [J]. *Bmc Cancer*, 2018, 18(1): 522-532.
- [36] BEILLEROT A, BATTAGLIA E, ALINE B, et al. Protection of CDC25 phosphatases against oxidative stress in breast cancer cells; evaluation of the implication of the thioredoxin system [J]. *Free Radical Research*, 2012, 46(5): 674-689.
- [37] BRANCO V, COPPO L, SOLA S, et al. Impaired cross-talk between the thioredoxin and glutathione systems is related to ASK-1 mediated apoptosis in neuronal cells exposed to mercury [J]. *Redox Biology*, 2017, 13(1): 278-287.
- [38] BALGOMA D, MONTERO O, BALBOA M A, et al. Calcium-independent phospholipase a (2)-mediated formation of 1, 2-diarachidonoyl-glycerophosphoinositol in monocytes [J]. *Febs Journal*, 2008, 275(24): 6180-6191.
- [39] WANG F Y, TANG X M, WANG X, et al. Mitochondria-targeted platinum (II) complexes induce apoptosis-dependent autophagic cell death mediated by er-stress in A549 cancer cells [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 155(1): 639-650.
- [40] HE C, LI B, SONG W, et al. Sulforaphane attenuates homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress through Nrf-2-driven enzymes in immortalized human hepatocytes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(30): 7477-7485.
- [41] ZEESHAN H M A, LEE G H, KIM H R, et al. Endoplasmic reticulum stress and associated ros [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(3): 327-347.
- [42] LU J, HOLMGREN A. The thioredoxin antioxidant system [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 66(1): 75-87.
- [43] LI H, KORENNYKH A V, BEHRMAN S L, et al. Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(37): 16113-16118.
- [44] HAYASHI S, WAKASA Y, TAKAHASHI H, et al. Signal transduction by IRE1-mediated splicing of bZIP50 and other stress sensors in the endoplasmic reticulum stress response of rice [J]. *Plant Journal*, 2012, 69(6): 946-956.
- [45] DU C, WU M, LIU H, et al. Thioredoxin-interacting

- protein regulates lipid metabolism via Akt/mTOR pathway in diabetic kidney disease [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2016, 79(1): 1-13.
- [46] MUCHOWICZ A, FIRYCZUK M, WACHOWSKA M, et al. SkO53 triggers tumor cells apoptosis by oxidative stress-mediated endoplasmic reticulum stress [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2015, 93(4): 418-427.
- [47] 牛桂军, 唐国都. 硫氧还蛋白 1 与炎性相关性疾病 [J]. *医学综述*, 2010, 16(6): 808-811.
NIU G J, TANG G D. Thioredoxin1 and inflammation associated disease [J]. *Medical Recapitulate*, 2010, 16(6): 808-812. (in Chinese)
- [48] SAKURAI A, YUASA K, SHOJI Y, et al. Overexpression of thioredoxin reductase 1 regulates NF-kappa B activation [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2004, 198(1): 22-30.
- [49] STRALIOTTO M R, HORT M A, FIUZA B, et al. Diphenyl diselenide modulates oxldl-induced cytotoxicity in macrophage by improving the redox signaling [J]. *Biochimie*, 2013, 95(8): 1544-1551.
- [50] WIPF P, LYNCH S M, POWIS G, et al. Synthesis and biological activity of prodrug inhibitors of the thioredoxin-thioredoxin reductase system [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2005, 3(21): 3880-3882.
- [51] ANGELUCCI F, SAYED A A, WILLIAMS D L, et al. Inhibition of schistosoma mansoni thioredoxin-glutathione reductase by auranofin: structural and kinetic aspects [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(42): 28977-28985.
- [52] XIE L, LUO Z, ZHAO Z, et al. Anticancer and antiangiogenic iron(II) complexes that target thioredoxin reductase to trigger cancer cell apoptosis [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 60(1): 202-214.
- [53] DOMRACHEVA I, KANEPE-LAPSA I, JACKEVICA L, et al. Selenopheno quinolinones and coumarins promote cancer cell apoptosis by ROS depletion and caspase-7 activation [J]. *Life Sciences*, 2017, 186(1): 92-101.
- [54] NAGAKANNAN P, EFTEKHARPOUR E. Differential redox sensitivity of cathepsin B and L holds the key to autophagy-apoptosis interplay after thioredoxin reductase inhibition in nutritionally stressed SH-SY5Y cells [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, 108(1): 819-831.
- [55] LIU Y, DUAN D, YAO J, et al. Dithiaarsanes induce oxidative stress-mediated apoptosis in HL-60 cells by selectively targeting thioredoxin reductase [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 57(12): 5203-5211.
- [56] HEDSTROM E, ERIKSSON S, ZAWACKA-PANKAU J, et al. P53-dependent inhibition of TrxR1 contributes to the tumor-specific induction of apoptosis by RITA [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(21): 3584-3591.
- [57] GUNDALA S R, YANG C, MUKKAYILLI R, et al. Hydroxychavicol, a betel leaf component, inhibits prostate cancer through ROS-driven DNA damage and apoptosis [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014, 280(1): 86-96.
- [58] CHEN G, LI A, ZHAO M, et al. Proteomic analysis identifies protein targets responsible for depsipeptide sensitivity in tumor cells [J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(7): 2733-2742.
- [59] CURBO S, GAUDIN R, CARLSTEN M, et al. Regulation of interleukin-4 signaling by extracellular reduction of intramolecular disulfides [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 390(4): 1272-1277.
- [60] AI Y, ZHU B, REN C, et al. Discovery of new monocarbonyl ligustrazine-curcumin hybrids for intervention of drug-sensitive and drug-resistant lung cancer [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59(5): 1747-1760.
- [61] BROGI S, FIORILLO A, CHEMI G, et al. Structural characterization of *Giardia duodenalis* thioredoxin reductase (gTrxR) and computational analysis of its interaction with NBDHEX [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 135(1): 479-490.
- [62] BENHAR M, SHYTAJ I L, STAMLER J S, et al. Dual targeting of the thioredoxin and glutathione systems in cancer and HIV [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2016, 126(5): 1630-1639.
- [63] POWIS G, KIRKPATRICK D L. Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy [J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2007, 7(4): 392-397.
- [64] 吴石威, 张惠, 李乾斌, 等. 硫氧还蛋白还原酶及其抑制剂的研究进展 [J]. *中国药科大学学报*, 2016, 47(5): 511-520.
WU S W, ZHANG H, LI Q B, et al. Advances in thioredoxin reductase and its inhibitors [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2016, 47(5): 511-520. (in Chinese)
- [65] ZHENG X, XU W, SUN R, et al. Synergism between thioredoxin reductase inhibitor ethaselen and sodium selenite in inhibiting proliferation and inducing death of human non-small cell lung cancer cells [J]. *Chemo-Biological Interactions*, 2017, 275(1): 74-85.
- [66] WANG L, FU J N, WANG J Y, et al. Selenium-containing thioredoxin reductase inhibitor ethaselen sensitizes non-small cell lung cancer to radiotherapy [J].

- Anti-Cancer Drugs, 2011, 22(8): 732-740.
- [67] CARVALHO C M L, CHEW E H, HASHEMY S I, et al. Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(18): 11913-11923.
- [68] BRANCO V, CANARIO J, HOLMGREN A, et al. Inhibition of the thioredoxin system in the brain and liver of zebra-seabreams exposed to waterborne methylmercury-scienceDirect [J]. *Toxicology Applied Pharmacology*, 2011, 251(2): 95-103.
- [69] PRAST-NIELSEN S, CEBULA M, PADER I, et al. Noble metal targeting of thioredoxin reductase—covalent complexes with thioredoxin and thioredoxin-related protein of 14 kDa triggered by cisplatin [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(11): 1765-1778.
- [70] BRANCO V, CANÁRIO JO, LU J, et al. Mercury and selenium interaction in vivo; effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase [J]. *Free Radical Biology*, 2012, 52(4): 781-793.
- [71] FINKELSTEIN A E, WALZ D T, BATISTA V, et al. Auranofin—new oral gold compound for treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1976, 35(3): 251-257.
- [72] CAI W, ZHANG L, SONG Y, et al. Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, 52(2): 257-265.
- [73] LOWE G. Platinum (II) compounds: AU20000028150 [P/OL]. 2000-02-25 [2023-06-15]. <https://www.google.co.in/patents/AU20000028150>.
- [74] CHARVET E D, BRANDENBURG K B, DEBORDE V, et al. Phosphole derivatives complexed with metals, and pharmaceutical uses thereof; FR20040008427 [P/OL]. 2004-07-30 [2023-06-15]. <https://www.google.co.in/patents/FR20040008427>.
- [75] 李敏勇, 史晓东, 杜吕佩. 一种三唑金化合物及其制备方法与应用; CN105001244A [P/OL]. 2015-10-28 [2023-06-15]. <http://www.google.co.in/patents/CN105001244A>
- [76] 王浩, 张娣, 赵莹茜. 一种金磷炔化合物、其制备方法及应用; CN201310439357. 5 [P/OL]. 2013-09-24 [2023-06-15]. <https://www.google.co.in/patents/CN201310439357.5>
- [77] CHE C M. Metal complexes of thiourea and their derivatives as metal delivering anti-cancer and anti-inflammatory agents; WO2011134275. [P/OL]. 2011-04-19 [2023-06-15]. <https://www.google.co.in/patents/WO2011134275>.
- [78] CHE C M, ZOU T T. A method of using binuclear gold (I) compounds for cancer treatment; US201314070096 [P/OL]. 2013-11-01 [2023-06-15]. <https://www.google.co.in/patents/US201314070096>.
- [79] CHE C M, ZOU T T. Novel gold (III) complexes containing n-heterocyclic carbene ligand, synthesis, and their applications in cancer treatment and thiol detection; US201314078742 [P/OL]. 2013-11-13 [2023-06-15]. <https://www.google.co.in/patents/US201314078742>.
- [80] DU Z Y, HE Z S, FAN J D, et al. Au₄ cluster inhibits human thioredoxin reductase activity via specifically binding of au to Cys189 [J]. *Nano Today*, 2022, 47(12): 1686-1701.
- [81] DUAN D, ZHANG J, YAO J, et al. Targeting thioredoxin reductase by parthenolide contributes to inducing apoptosis of HELA cells [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(19): 176-199.
- [82] ZOU P, XIA Y, JI J, et al. Piperlongumine as a direct TrxR1 inhibitor with suppressive activity against gastric cancer [J]. *Cancer Letters*, 2016, 375(1): 114-126.
- [83] ZHANG J, YAO J, PENG S, et al. Securinine disturbs redox homeostasis and elicits oxidative stress-mediated apoptosis via targeting thioredoxin reductase [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017, 1863(1): 129-138.
- [84] GEOFFREY, W J M, BERRY T D, BRADSHAW A M. 4-substituted 4-hydroxycyclohexa-2, 5-dien-1-ones with selective activities against colon and renal cancer cell lines [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2003, 46(4): 532-541.
- [85] STEVENS M F G, WESTWELL A D, POOLE T D, et al. 4-(1-(sulfonyl)-1h-indol-2-yl)-4-(hydroxy)-cyclohexa-2, 5-dienone compounds and analogs thereof as therapeutic agents; CA20022508275 [P/OL]. 2002-12-20 [2023-06-15]. <https://www.google.co.in/patents/CA20022508275>.
- [86] MUKHERJEE A, WESTWELL A D, BRADSHAW T D, et al. Cytotoxic and antiangiogenic activity of AW464 (NSC 706704), a novel thioredoxin inhibitor: an in vitro study [J]. *British Journal of Cancer*, 2005, 92(9): 350-358.
- [87] OSTASZEWSKI R, KLOSSOWSKI S, ZIUZIA I, et al. Novel esters of (acyloxymethyl) acrylamide, a pharmaceutical composition containing them, and their use as inhibitors of the thioredoxin - thioredoxin reductase system; EP20110781886 [P/OL]. 2011-10-16 [2023-06-15]. <https://www.google.co.in/patents/EP20110781886>.

- [88] KUNKEL M, KIRKPATRICK D, JOHNSON J, et al. Cell line-directed screening assay for inhibitors of thioredoxin reductase signaling as potential anti-cancer drugs [J]. *Anti-cancer Drug Design*, 1997, 12(26): 659-670.
- [89] SASADA T, NAKAMURA H, UEDA S, et al. Possible involvement of thioredoxin reductase as well as thioredoxin in cellular sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II) [J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27(5/6): 504-514.
- [90] FANG J, LU J, HOLMGREN A. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(26): 25284-25290.
- [91] SACCOCCIA F, ANGELUCCI F, BOUMIS G, et al. Thioredoxin reductase and its inhibitors [J]. *Current Protein and Peptide Science*, 2014, 15(6): 621-646.
- [92] POWIS G, WIPF P. Palmarumycin based inhibitors of thioredoxin and methods of using same; CA20062622674 [P/OL]. 2006-09-15 [2023-06-15]. <https://www.google.co.in/patents/CA20062622674>.
- [93] POWIS G, WIPF P, LYNCH S M, et al. Molecular pharmacology and antitumor activity of palmarumycin-based inhibitors of thioredoxin reductase [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006, 5(3): 630-636.
- [94] FIDLER J M, MUSSER J H. Identification and screening of triptolide target molecules; US11665177 [P/OL]. 2005-10-12 [2023-06-15]. <https://www.google.co.in/patents/US11665177>.
- [95] ENGMAN L, KANDRA T, GALLEGOS A, et al. Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells [J]. *Anticancer Drug Design*, 2000, 15(15): 323-330.
- [96] ARNÉR E S J, ZHONG L W, ARNE H. Preparation and assay of mammalian thioredoxin reductase [J]. 1999, 300(27): 226-239.
- [97] KIRKPATRICK D L. Asymmetric disulfides and methods of using same; WO2004US22280 [P/OL]. 2004-07-12 [2023-06-15]. <https://www.google.co.in/patents/WO2004US22280>.
- [98] RAMANATHAN R K, ABBRUZZESE J, DRAGOVICH T, et al. A randomized phase II study of PX-12, an inhibitor of thioredoxin in patients with advanced cancer of the pancreas following progression after a gemcitabine-containing combination [J]. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 2011, 67(3): 503-509.
- [99] HAUSHEER F H. Compositions and methods of use of compounds to increase cancer patient survival time; US20080218470 [P/OL]. 2008-07-15 [2023-06-15]. <https://www.google.co.in/patents/US20080218470>.
- [100] ZENG H. Benzoisoselenazole derivatives with anti-inflammation, antiviral and antithrombosis activity and their use; AU2002346271 [P/OL]. 2002-06-10 [2023-06-15]. <https://www.google.co.in/patents/AU2002346271>.
- [101] BIBLE K C, ISHAM C R, XU R F, et al. Methods and compositions for treating cancer; US2009264421A1 [P/OL]. 2009-10-22 [2023-06-15]. <http://www.google.co.in/patents/US2009264421A1>.
- [102] 李秋妍, 王浩丞, 彭瑶, 等. 三种内源性抗氧化体系与非小细胞肺癌的关系 [J]. *中国医学创新*, 2020, 17(5): 168-172.
- LI Q Y, WANG H C, PENG Y, et al. Relationship between three endogenous antioxidant systems and non-small cell lung cancer [J]. *Medical Innovation of China*, 2020, 17(5): 168-172. (in Chinese)

(责任编辑 张蕾)