

基础研究

靶向线粒体酪蛋白裂解酶 ClpP 新型激动剂 004A 的发现及其体外抗肿瘤活性评价

杨 洋, 袁 静

(首都医科大学附属首都儿童医学中心, 首都儿科研究所 细菌学研究室, 北京 100020)

[摘要] **目的** 靶向人线粒体酪蛋白裂解酶 ClpP(hClpP)的新型激动剂研究。**方法** 通过 hClpP 肽酶活性检测模型筛选化合物,采用差示扫描荧光法(DSF)和细胞热位移实验(CETSA)验证化合物与靶点的结合。使用 MTT 法检测化合物对多种肿瘤细胞的增殖抑制效应,通过划痕实验评估其对肿瘤细胞迁移的影响。采用正常肝细胞 LO2 与心肌细胞 H9C2 初步评价细胞毒性。**结果** 化合物 004A 对 hClpP 肽酶活性有明显激动作用,EC₅₀ 为 1.31 μmol/L;同时能显著激活 hClpP 对蛋白底物的降解。DSF 和 CETSA 证实了 004A 直接结合于 hClpP。004A 可抑制多种肿瘤细胞的增殖(IC₅₀ 约 10 μmol/L),并抑制肿瘤细胞迁移。细胞毒性实验显示,004A 在 50 μmol/L 下对正常心肌细胞 H9C2 的抑制较强,而对肝细胞 LO2 影响较小。**结论** 004A 显著激活 hClpP,是一种新型、高效、特异的 hClpP 激动剂,在包括胃癌在内的多种肿瘤细胞中显示出治疗潜力,尽管其对心肌细胞的毒性提示需进一步结构优化以提高安全性。

[关键词] 线粒体;酪蛋白裂解酶;蛋白质稳态;激动剂;抗肿瘤活性

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-8159(2026)06-0605-10

Discovery of a novel agonist 004A targeting the mitochondrial protease ClpP and evaluation of its antitumor activity in vitro

Yang Yang, Yuan Jing

(Department of Bacteriology, Capital Institute of Pediatrics, Capital Center for Children's Health, Capital Medical University, Beijing 100020, China)

[Abstract] **Objective** To discover novel agonists targeting human mitochondrial caseinolytic protease P (hClpP). **Methods** Compounds were screened using an hClpP peptidase activity assay. Target engagement was verified by differential scanning fluorimetry (DSF) and the cellular thermal shift assay (CETSA). Antiproliferative effects on multiple tumor cell lines were assessed by MTT assay, and the effect on tumor cell migration was evaluated by wound healing assay. Cytotoxicity was preliminarily examined in normal hepatocyte LO2 and cardiomyocyte H9C2 cells. **Results** Compound 004A exhibited a marked agonistic effect on hClpP peptidase activity with an EC₅₀ of 1.31 μmol/L, and concurrently enhanced the degradation of protein substrates casein by hClpP. DSF and CETSA confirmed direct binding of 004A to hClpP. 004A inhibited the proliferation of multiple tumor cell lines (IC₅₀ ≈ 10 μmol/L) and suppressed tumor cell migration. Cytotoxicity assays showed that at 50 μmol/L, 004A strongly inhibited normal cardiomyocyte H9C2 cells, whereas it exerted only a modest effect on LO2 hepatocytes. **Conclusion** 004A potently activates hClpP, representing a novel, highly effective, and specific hClpP agonist with therapeutic potential against a range of tumor cells, including gastric cancer. Its cardiomyocyte toxicity, however, indicates that further structural optimization is warranted to improve the safety profile.

[Key words] mitochondria; ClpP; protein homeostasis; agonist; antitumor activity

[基金项目]北京市自然科学基金面上项目(NO:7252193)。

[通信作者]袁静,女,博士,研究员,研究方向:病原微生物及药理学,E-mail:yuanjing6216@163.com。

线粒体蛋白质稳态在癌症生物学中扮演着关键角色,特别是在氧化代谢需求旺盛或蛋白质质量控制缺陷的恶性肿瘤中尤为突出。癌细胞通过重编程线粒体功能,促进脂质、氨基酸及核苷酸等代谢物的合成,从而满足其快速增殖的需求^[1-4]。然而,这一代谢适应过程常伴随活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过度生成,若未能及时清除,将引发DNA损伤、脂质过氧化与蛋白质氧化,进而诱导线粒体功能障碍乃至细胞死亡^[5-7]。在此背景下,线粒体中异常蛋白的累积会激活线粒体未折叠蛋白反应(mitochondrial unfolded protein response, UPRmt),通过逆行信号通路诱导核基因表达,增强线粒体抗氧化防御、生物合成、自噬及蛋白质质量控制机制,以维持细胞存活与功能稳态^[8-9]。

在调控线粒体蛋白质质量的关键因子中,人酪蛋白裂解酶P(human mitochondrial caseinolytic protease P, hClpP)近年来作为抗肿瘤靶点备受关注。hClpP位于线粒体基质,与AAA+ATP酶ClpX组装形成ClpXP复合物,负责清除错误折叠或受损蛋白,对维持线粒体能量代谢及结构完整性至关重要^[10]。hClpP呈十四聚体双环状结构,与ClpX六聚体结合后形成成熟的ClpXP蛋白酶复合体^[11]。在生理状态下,hClpP作为UPRmt核心效应因子之一,与HSP60、HSP10、mtHSP70及LONP1等协同应对线粒体应激,保障氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)、线粒体翻译和代谢通路的正常运行^[11]。然而,在肿瘤中,该蛋白质质量控制机制常被“劫持”,为癌细胞在应激条件下维持生存提供支持。

hClpP在乳腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、睾丸癌、前列腺癌及原发性急性髓系白血病等多种恶性肿瘤中表达显著上调^[12-20]。肿瘤细胞通过上调hClpP表达,增强对高速代谢及高ROS环境所致蛋白毒性应激的耐受,从而提高代谢适应性与存活优势。这一肿瘤特异性依赖为靶向hClpP的药物开发提供了理论依据。目前,以hClpP为靶点的化合物研发策略主要分为抑制与过度激活两种,两者均被证实可抑制肿瘤生长。早期研究表明,hClpP被抑制可通过破坏OXPHOS、诱导ROS生成及激活凋亡通路发挥抗肿瘤作用^[21-22]。而近年来研究则更倾向于过度激活hClpP,认为其可引发灾难性线粒体应激,成为更具潜力的治疗策略^[13, 15, 23-28]。

ClpP过度激活策略目前已推动多种激动剂开

发,其中Imipridones类化合物,如ONC201、ONC206、ONC212等,在多种肿瘤模型中表现出显著抗肿瘤效果^[13-14, 29-30]。例如,ONC201在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)细胞中可下调线粒体呼吸链复合物亚基表达,损害OXPHOS,升高ROS水平,并诱导线粒体超微结构损伤及整合应激反应(integrated stress response, ISR)^[31]。其衍生物ONC212在过表达hClpP的套细胞淋巴瘤及病人来源的AML模型中均表现出强效抗肿瘤活性,能显著抑制肿瘤生长并延长小鼠生存期^[32]。值得关注的是,ONC201已于2025年获FDA批准用于治疗弥漫性中线胶质瘤,而ONC201与ONC206在多种实体瘤中的临床试验也已进入II期阶段^[11, 31-35],凸显了hClpP激动剂的临床转化前景。

近期,国内外多个团队基于ONC201等先导结构开展了系统的结构优化,开发出一系列新型骨架的hClpP激动剂,包括TR系列化合物、IMP075系列化合物以及7K系列化合物^[11, 15, 24-26, 28, 31, 36-38]。这些衍生物在靶点特异性、三维空间结构、体内外药效、抗肿瘤机制、药代动力学以及安全性等各方面均表现出巨大的转化潜力。结构生物学研究表明,该类Imipridones衍生物均以大致相同的作用方式与ClpP结合,结合在ClpP轴向顶端的一个远离活性中心的疏水口袋,该口袋位于两个亚基之间,围绕ClpP桶状结构的轴向孔分布,每个ClpP七聚体环上共有7个小分子结合口袋;而这一疏水口袋正是ClpX等伴侣蛋白通过保守的IGF/L结构与ClpP相互作用的区域^[39]。此类化合物结合后可能通过干扰内源性调节机制,诱导ClpP构象变化,从而促进其异常活化。

尽管Imipridones类hClpP激动剂展现出广阔的应用前景,其结构优化仍有巨大空间。此外,不同肿瘤对hClpP功能的依赖程度存在差异^[19-20],而目前hClpP激动剂在胃癌领域的研究尚较有限,亟需更多探针分子,以深化靶点功能认知并拓展治疗适应症。因此,本研究旨在发现结构新颖、高效特异的hClpP激动剂,并评价其在胃癌细胞模型中的抗肿瘤活性,以为胃癌治疗药物的研发提供一个新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 人线粒体 $clpP$ 基因序列来自A549细胞的cDNA;hClpP蛋白表达载体质粒

为 pRSF-duet-1, SUMO 蛋白酶表达质粒均由本实验室保存;质粒扩增所用菌株为大肠杆菌 DH5 α , 蛋白表达菌株均为大肠杆菌 BL21 (DE3), 菌株均由本实验室保存。

1.1.2 细胞株 人胃癌细胞 MGC803、HGC-27、AGS、SNU16 由中科院细胞库购入,人乳腺癌细胞 MD-MBA-231、人结直肠癌细胞 HCT116、人非小细胞肺癌细胞 A549、人宫颈癌细胞 Hela、人急性髓性白血病细胞 MV4-11、人慢性髓性白血病细胞 K562、人正常肝组织细胞 LO2、大鼠心肌细胞 H9C2 以及人胃癌细胞 GT39 和 AZ52 均由本实验室保存。

1.1.3 试剂 PCR 引物合成及基因测序由苏州金唯智股份有限公司完成;PrimeSTAR Max DNA Polymerase、Ex Taq[®] polymerase、Protein loading buffer、DpnI 限制性核酸酶 (TAKARA);限制性内切酶 BamH I (NEB);ClonExpressII One step Cloning Kit (诺唯赞);DNA Marker、DNA loading buffer 和 RI-PA 裂解液 (碧云天);蛋白定量试剂盒和蛋白预染 Marker (ThermoFisher Scientific);DNA 产物纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒 (Omega);Gold view 核酸染料 (北京泛博生物化学有限公司);酵母提取物、蛋白胨和琼脂 (OXID);琼脂糖、卡那霉素 (Invitrogen);Ni 离子亲和层析介质 (ThermoFisher Scientific);Superdex 200 10/300 层析柱、阴离子交换柱 (GE);超滤浓缩管 (Millipore);96 孔黑色酶标板 (Corning);SYPRO Orange 蛋白染料、磷酸肌酸激酶 CPK、FITC-casein (Sigma);三磷酸腺苷钠盐 ATP、磷酸肌酸 CP (百灵威);异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG);二硫苏糖醇 DTT、咪唑 (Amresco);短肽底物 AC-WLA-AMC (上海吉尔生化);DMEM 细胞培养基、RPMI 1640 培养基和胎牛血清 (Gibco);PVDF 膜、显影液 (Millipore);hClpP 一抗、 β -action 一抗和发光二抗 (Abcam);ONC201 (MCE);004A 由本实验室合成。

1.1.4 仪器及设备 PCR 仪、电泳槽及电泳仪 (JUNYI);细胞培养箱、生物安全柜、超声细胞破碎仪和 Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific);恒温小摇床、恒温多层摇床 (上海智成);金属浴 (江苏海门其林贝尔);酸度计 (ThermoFisher Scientific);蛋白纯化系统 AKTA (GE);多功能酶标仪 (BIOTEK);落地式高速低温离心机 (BECKMAN);高压破菌仪 (宁波新芝);普通光学显微镜 (Olympus);高压蒸汽灭菌锅 (SANYO)。

1.2 方法

1.2.1 hClpP 蛋白表达载体的构建 人线粒体 hClpP 蛋白的 N 端 (1-57aa.) 为线粒体蛋白的靶向序列 (MTS), 不影响蛋白水解活性, 因此本研究中构建的 hClpP 表达载体为缺失 MTS 序列^[34]。hClpP 蛋白的表达载体为改造后的 pRSF-duet-1, 采用无缝克隆技术构建表达质粒, 其中线性化载体均由 PCR 扩增得到。所涉及引物序列如下:

表 1 引物序列

引物名称	引物序列
pRSF-duet-1-Forward	CTCGAGTCTGGTAAAGAAACCG
pRSF-duet-1-Reverse	GGATCCACCAATCTGTTCTCTG
clpP-Forward	GAGAACAGATTGGTGGATC- CCCGCTCATTCCCATCGTG
clpP-Reverse	GTTTCTTTACCAGACTCGAGGGT- GCTAGCTGGGACAGGTTT

1.2.2 hClpP 蛋白的表达及纯化 将上述测序验证无误的质粒转入 BL21 (DE3) 菌株, 37 °C 过夜培养;任意挑取 3 个单克隆菌落接种于 5 mL LB 培养基, 37 °C, 220 r/min, 过夜培养。按照 1:500 的比例将培养过夜的 5 mL 菌液接种于 1 L 的含有对应抗性的 LB 培养基中, 37 °C, 220 r/min, 培养至 OD₆₀₀ 值 0.6~0.8 时冷却至 16 °C, 加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 过夜诱导 (14~16 h)。采用 4 000 r/min 转速低温离心 15 min 收集过夜诱导的菌体, 然后重悬菌体进行高压破菌仪破碎至菌液清透。菌液经过 15 000 r/min 转速离心 30 min 后, 收集上清。hClpP 表达载体 N 端带有 6 $\times$ His 和 Sumo 标签, 故采用镍离子亲和层析, 对上清蛋白进行亲和层析, 收集从镍柱中洗脱的带有 6 $\times$ His 和 SUMO 标签的融合蛋白, 加入 SUMO 蛋白酶 Ulp1 进行酶切, 并同时低温过夜透析。酶切过夜后, 将透析袋中的蛋白收集液进行挂柱, 从而除去标签蛋白, 收集穿透液, 进行浓缩;浓缩后的样品再经过阴离子交换层析和分子筛进一步纯化, 最后将收集到的蛋白浓缩, 并采用 SDS-PAGE 检测目的蛋白纯度。

1.2.3 化合物 hClpP 肽酶活性筛选 采用 hClpP 肽酶模型进行初始筛选^[40], 化合物初筛浓度设置为 20 μ mol/L, 以 ONC201 为阳性对照。AC-WLA-AMC、ONC201 和待测化合物母液浓度均为 10 mmol/L, 且化合物溶剂均为 DMSO。向黑色 96 孔板孔中分别加入终浓度为 0.5 μ mol/L 的 hClpP 和 20 μ mol/L 的化合物溶液室温孵育 15 min, 最后加入 100 μ mol/L 的 AC-WLA-AMC 启动反应。酶活测试的缓冲溶

液为 25 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 7.5。多功能酶标仪设置孵育温度为 30 ℃, $E_x = 380$ nm, $E_m = 460$ nm, 每间隔 5 min 读数 1 次, 每次读数前振荡 5 s, 连续检测 30 min。按照如上步骤依次检测实验室在室化合物中约 200 个化合物, 每个化合物设置至少 3 个重复孔。对比空白对照及阳性对照, 得到苗头化合物。对初筛中 hClpP 酶活激动 > 50% 的化合物进行具体 EC_{50} 值的测定。待测苗头化合物母液稀释成一系列梯度, 终浓度设置为 100、50、25、10、5、1 $\mu\text{mol/L}$, 按上述酶活检测方法进行检测, 结合 Graphpad prism 进行作图, 计算 EC_{50} 值。每个化合物 EC_{50} 值测定至少重复 3 次。

1.2.4 蛋白酶评价模型 采用 FITC-casein 作为底物来评价化合物对 hClpP 蛋白酶活性的影响。测试体系为: 1 $\mu\text{mol/L}$ hClpP、4 mmol/L ATP、16 mmol/L CP、20 U/mL CPK、0.5 g/L FITC-casein 和 0.1 mmol/L 化合物溶液, 设置至少 3 个重复孔。化合物浓度参考此前研究中的筛选浓度^[31], 设置为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。酶活检测的缓冲溶液为 25 mmol/L Hepes, pH 7.6, 200 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L ATP, 5% glycerol。采用 pH8.0 Tris-HCl 缓冲液配制 FITC-casein, ATP 和 CPK 母液, 并用锡箔纸避光。所有检测均采用黑色 96 孔板, 温度为 30 ℃, $E_x = 494$ nm, $E_m = 521$ nm, 每间隔 5 min 读数 1 次, 每次读数前振荡 5 s, 连续检测 1 h。

1.2.5 差示荧光扫描(differential scanning fluorimetry, DSF)实验 采用 DSF 评估化合物 004A 与 hClpP 的结合能力^[41]。向 qPCR 八联管分别加入终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ hClpP、5 $\times$ SYPRO Orange 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 化合物溶液, 每孔设置至少 3 个重复孔, 室温孵育 15 min。反应体系为 25 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 7.5。使用 RT-PCR 仪器进行荧光检测, 选择熔融曲线, 设置温度 40 min 内从 25 ℃ 升至 99 ℃, 荧光检测通道选择 SYPRO Orange 通道, 记录数据, 并采用 Graphpad prism 进行数据分析。检测化合物对蛋白质热稳定性影响的 EC_{50} 值时(使蛋白 T_m 迁移 1/2(T_m 时对应的小分子浓度), 化合物终浓度分别为 100、50、25、10、5、1 $\mu\text{mol/L}$, 按上所述 DSF 实验步骤进行检测, 结合 Graphpad prism 进行作图, 计算 EC_{50} 值。

1.2.6 细胞热位移实验(cellular thermal shift assay, CETSA) 采用 CETSA 评估化合物 004A 在

细胞内是否靶向 hClpP^[42]。将处于对数期生长的 MGC803 细胞进行消化, 将细胞收入 15 mL 离心管中, 2 000 r/min 离心 5 min 去上清, 用 1 mL 预冷的 PBS 洗两次, 同时转移到 1.5 mL EP 管中, 5 000 r/min 离心 10 min。将 EP 管中的 PBS 晾干后, 加入细胞裂解液 RIPA 100~200 μL , 冰浴 ≥ 30 min; 然后进行超声破碎至无色透明状, 然后 4 ℃ 离心, 13 300 r/min 离心 10 min, 然后将细胞上清液转移至新的 1.5 mL 离心管中。然后将上述样品均分为 2 份, 分别为 DMSO 处理组和 004A 处理组。向 004A 处理组中加入终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 004A, 向 DMSO 处理组加入等体积的 DMSO, 冰上作用 1 h。之后将上述细胞样品在 4 ℃, 13 300 r/min 离心 10 min。然后将每组细胞上清液均分 8 份, 温度梯度设置为 46、50、54、58、62、66、70、74 ℃, 每份样品对应一个温度。然后使用 PCR 仪器, 对每组样品加热 3 min, 然后迅速置于冰上冷却。然后对每组样品 4 ℃ 离心, 13 000 r/min 离心 10 min。最后采用蛋白免疫印迹法(Western blotting, WB)检测 004A 处理组与对照组 hClpP 蛋白含量变化。

1.2.7 体外细胞水平抗肿瘤活性评价 本研究采用 MTT 法检测 004A 对各细胞株增殖能力的影响。将状态良好的处于对数生长期的不同细胞分别以 3 000~5 000 个/孔的密度加入 96 孔板中, 每孔 100 μL , 过夜培养后第 2 天进行加药处理。待测化合物采用细胞培养基将其稀释成一系列浓度梯度: 100、50、10、5、1、0.1、0.01 $\mu\text{mol/L}$ 。将上述药液依次加入 96 孔板中, 每孔加入 100 μL , 每个梯度设置 3 个重复孔。每板设置 DMSO 对照组。药物处理 72 h 后, 先在显微镜下观察 96 孔板中细胞生长状况, 然后向每孔中加入 20 μL 的 5 g/L MTT 溶液, 置于培养箱中培养。作用 2~4 h 后, 取出培养板, 弃去上清液, 向每孔加入适量的 DMSO(控制对照组 $OD_{570\text{ nm}}$ 为 1 左右), 置于摇床上溶解 15 min, 最后于 570 nm 下进行吸光度检测。计算得到每个药物浓度下的抑制率后, 使用 Graphpad Prism 8 软件进行拟合计算 IC_{50} 。

1.2.8 划痕实验 取对数生长期的 AGS 细胞, 用 0.25% Trypsin-EDTA 对细胞进行消化, 收集细胞, 将细胞悬液移至 50 mL 离心管内, 1 000 r/min, 离心 3 min, 弃上清, 加入含 10% FBS 的新鲜培养基重悬, 进行细胞计数。调整细胞悬液中细胞浓度为 5×10^5 个/mL, 将细胞接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 置于 37 ℃ 培养箱过夜培养。待细胞贴壁后, 将无

菌直尺放于 6 孔板上,使用经过灭菌的 200 μL 枪头顺着直尺在每孔缓缓划线。划线完成后去除每孔中的上清培养液,用 PBS 轻轻清洗 2 遍,加入 IC_{50} 值附近浓度的化合物溶液来进行加药处理(用无血清的培养液配制出药物),每孔加入 2 mL 化合物溶液。倒置显微镜拍照,记录 0 h 时和 72 h 后各孔划痕状态。最后,比较药物处理组与对照组的划痕愈合情况,实验独立重复 3 次。

1.2.9 细胞水平毒性评价 采用人正常肝组织细胞 LO2 和人正常心肌细胞 H9C2 初步考察化合物 004A 的细胞毒性,方法同 1.2.7 所述。

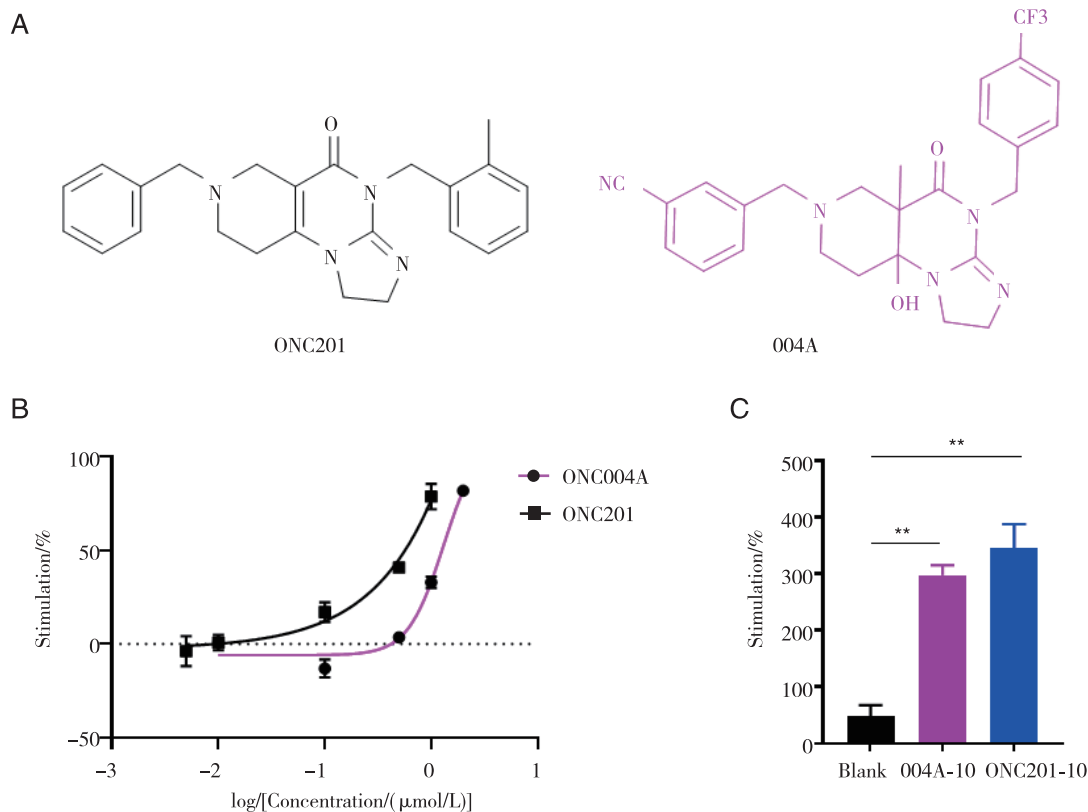
1.3 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据统计分析,3 组比较采用单因素方差分析 (ANOVA),进一步两两比较采用 Bonferroni's 检验;两组间比较采用 Student's *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 化合物库筛选及活性验证 hClpP 能够特异降解带有荧光基团的短肽底物 AC-WLA-AMC,因

此通过检测该荧光底物水解过程中产生的荧光信号来评价小分子对其酶活性的影响。基于此,从实验室构建的 Imipridones 类结构优化化合物库中,初步筛选了约 60 个化合物,初筛浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$,并以 ONC201 作为阳性对照(图 1 A)。筛选结果发现,化合物 004A 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下表现出 $> 50\%$ 的激动作用,继而测试了其肽酶水平的 EC_{50} ,具体为 1.31 $\mu\text{mol/L}$,与 ONC201 对 hClpP 活性的激动作用相当(图 1 B)。

hClpP 需要和伴侣蛋白 hClpX 形成 hClpXP 蛋白酶复合物发挥生物学功能,只有 hClpP 单独存在时可以降解多肽类小分子,但不能对具有空间结构的蛋白质进行降解。因此,本研究又采用球蛋白 FITC-casein 作为底物来评价化合物对 hClpP 蛋白酶活性的影响。当没有激动剂存在时,hClpP 单独不能水解球蛋白底物 FITC-casein,因而荧光信号不会上升;而当有激动剂结合时,hClpP 水解 FITC-casein,致使荧光信号上升。蛋白酶活性检测结果显示,化合物 004A 与 ONC201 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下,均显著提升 hClpP 对 FITC-casein 的水解(图 1 C)。



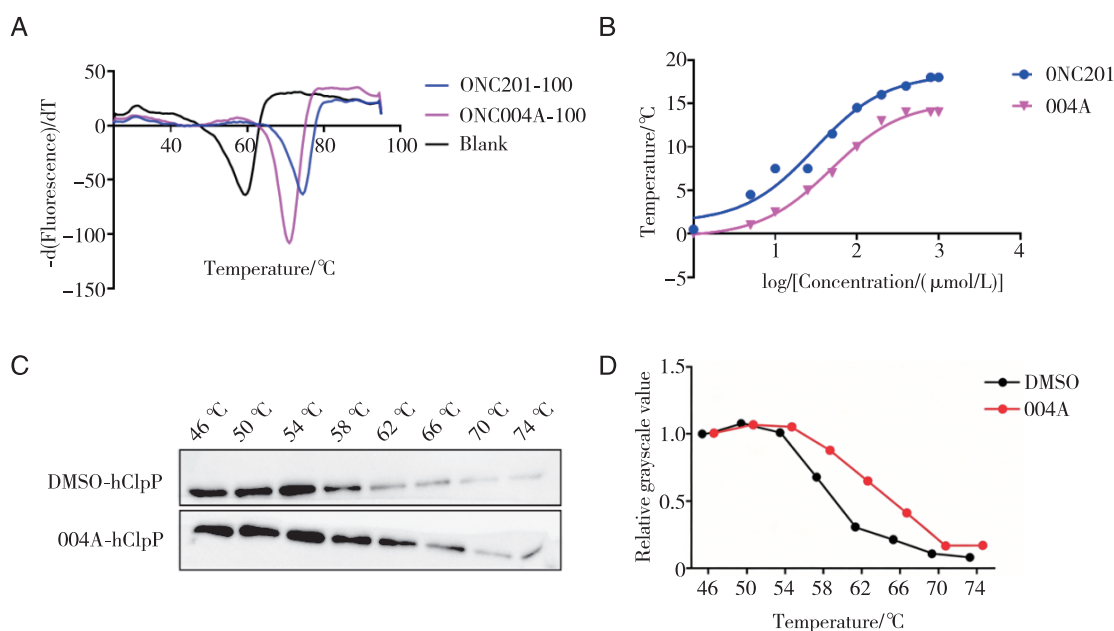
A: 化合物 ONC201 和 004A 的化学结构式; B: ONC201 和 004A 对 hClpP 肽酶活性的激动统计; C: ONC201 和 004A 对 hClpP 蛋白酶活性的激动效应统计; **: $P < 0.01$ 。

图 1 化合物库筛选及验证

2.2 生物物理手段验证小分子与靶点蛋白的相互作用 采用 DSF 评估化合物 004A 与 hClpP 的结合能力。该技术基于荧光染料 SYPRO Orange 与蛋白质受热暴露的疏水区域结合后荧光信号的变化,通过监测蛋白质溶解温度(T_m)的漂移判断小分子与靶蛋白的相互作用。本研究首先检测了 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,化合物 004A 是否对 hClpP 热稳定性产生影响,结果显示,100 $\mu\text{mol/L}$ 下化合物 004A 与 ONC201 都使得 hClpP 的 T_m 显著右移, ΔT_m 值 $> 10^\circ\text{C}$ (图 2 A)。进一步测试了化合物 004A 对 hClpP 热稳定改变的 EC_{50} 值,具体为 48.3 $\mu\text{mol/L}$,略高于 ONC201 对应的 EC_{50} (图 2 B)。

为确证化合物 004A 在细胞内是否靶向 hClpP,本研究采用 CETSA 进行评估。该技术基于小分子

结合可增强靶蛋白热稳定性的原理,通过检测加热处理后上清液中可溶性蛋白含量的变化,判断药物与靶点在细胞内的相互作用。本研究分别用 DMSO 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 004A 处理 MGC803 细胞裂解液,然后进行加热处理,用 WB 对可溶性 hClpP 含量进行检测,结果如图 2C、D 所示。研究结果显示,004A 处理组熔融曲线相较于 DMSO 对照组明显右移。DMSO 对照组样品在 62°C 时,hClpP 含量相较于最低温下的含量已经不足 50%,意味着此处理下 hClpP 的 T_m 值位于 $58 \sim 62^\circ\text{C}$;而 004A 处理组 hClpP 含量在 66°C 时不足 50%,说明此处理下 hClpP 的 T_m 位于 $62 \sim 66^\circ\text{C}$ 。因此,这一结果说明 004A 在细胞内仍对 hClpP 热稳定性有明显影响,再一次证实了 004A 对 hClpP 的靶向性。



A、B:DSF 检测 hClpP 结合化合物前后 T_m 的变化,ONC201 的 EC_{50} 为 30.58 $\mu\text{mol/L}$,004A EC_{50} 为 48.30 $\mu\text{mol/L}$;C、D:细胞裂解液中 hClpP 结合 004A 前后热稳定性变化。

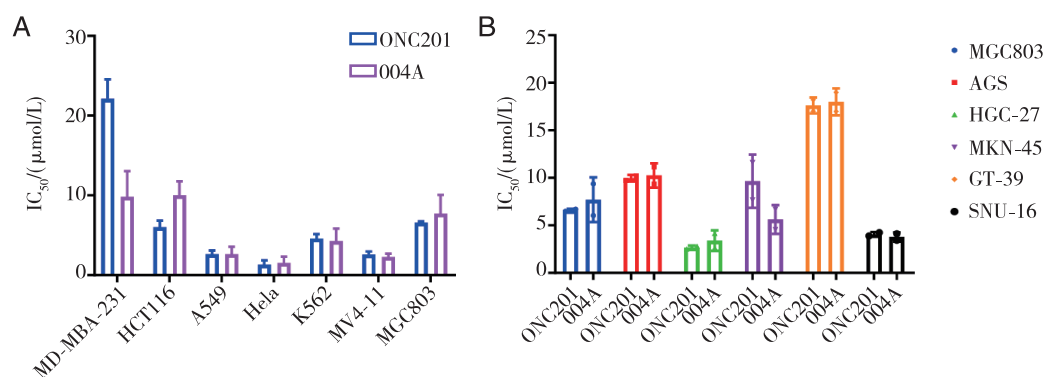
图 2 生物物理手段验证化合物 004A 与 hClpP 相互作用

2.3 化合物细胞水平抗肿瘤活性评价

2.3.1 化合物 004A 对肿瘤细胞增殖的影响

TCGA 数据库显示,人线粒体 hClpP 编码基因在多种肿瘤组织中呈高表达,而此前报道的 hClpP 激动剂 ONC201 及其类似物已在体内外证实在多种肿瘤模型中有效,且多个临床试验正在开展。为评价化合物 004A 的抗肿瘤活性,本研究选取了不同组织肿瘤细胞株进行评价。结果显示,004A 对所选择的多种细胞株的增殖有抑制作用,其 IC_{50} 值均在 10 $\mu\text{mol/L}$ 左右,与阳性化合物 ONC201 的肿瘤抑

制活性相近(图 3A)。前期报道称,hClpP 激动剂在体内外对多种不同组织肿瘤细胞模型均显示出明显的效果,目前有关 hClpP 激动剂在胃癌中的研究较少,因此本研究选用 6 株不同分化的胃癌细胞株进行 004A 的体外抗肿瘤活性检测。结果显示,阳性对照 ONC201 和 004A 对多株胃癌细胞的增殖均有明显的抑制作用,其中对 MGC-803、HGC-27、MKN-45 和 SNU-16 细胞的 IC_{50} 值在 10 $\mu\text{mol/L}$ 以下(图 3B)。



A: 化合物 004A 对不同组织肿瘤细胞增殖的影响; B: 化合物 004A 对不同胃癌细胞株增殖的影响。

图 3 化合物 004A 对肿瘤细胞增殖的影响

2.3.2 化合物 004A 对胃癌细胞迁移能力的影响

本研究采用划痕实验检测了化合物 004A 对胃癌细胞 MKN-45 迁移能力的影响,结果如下图 4 所示。

对比药物处理前和药物处理 72 h 后细胞划痕面积,发现化合物 004A 和 ONC201 在 6 $\mu\text{mol/L}$ (接近 IC_{50} 值) 浓度下均抑制了 MKN-45 细胞的迁移。

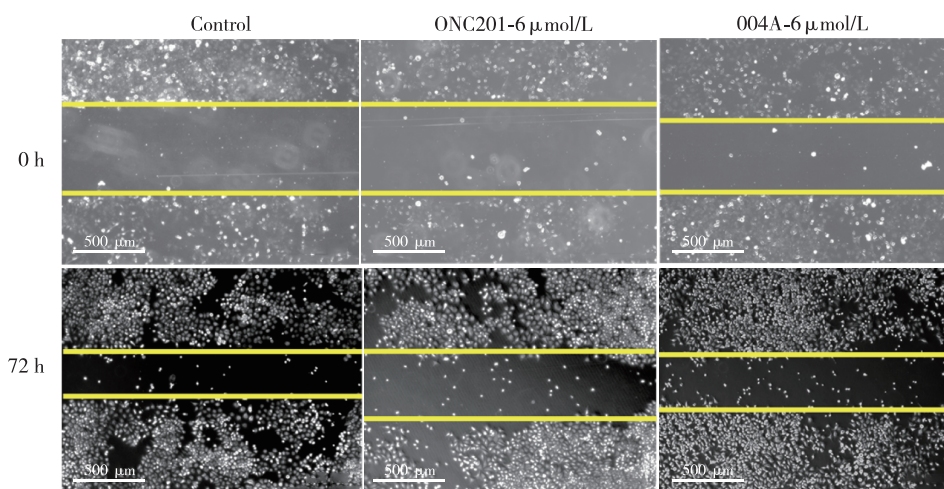
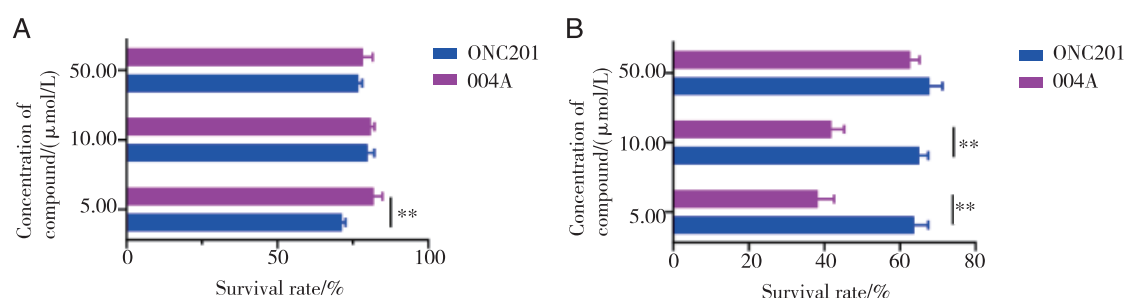


图 4 化合物 004A 对 MKN-45 细胞迁移能力影响

2.4 化合物 004A 对正常组织来源细胞株增殖能力的影响

为了考察 004A 对正常细胞的毒性,本研究评价了化合物 004A 对正常组织细胞增殖的影响,其中 LO2 为人正常肝组织细胞, H9C2 为小鼠心肌细胞。结果显示, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 ONC201 和

004A 处理 72 h 后, LO2 细胞的存活率仍在 70% ~ 80% (图 5A); 但 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 004A 处理对 H9C2 的增殖存在一定影响, 存活率减少至 40% 左右, 相较于 ONC201 表现出更强的心脏毒性 (图 5B)。



A: 化合物 004A 对 LO2 细胞增殖的影响; B: 化合物 004A 对 H9C2 细胞增殖的影响; **: $P < 0.01$ 。

图 5 004A 对人正常肝组织细胞 LO2 和小鼠心肌细胞 H9C2 增殖的影响

3 讨论

本研究基于 hClpP 的肽酶活性筛选模型,对实验室构建的 Imipridones 类化合物库进行了初步筛选,并成功发现了一个具有显著激动活性的先导化合物 004A。通过系列生物物理与细胞生物学实验,本研究证实 004A 能直接结合并激活 hClpP,在多种肿瘤细胞系,特别是胃癌细胞中展现出与经典激动剂 ONC201 相当的增殖抑制活性,并能有效抑制胃癌细胞的迁移能力。这些结果表明,004A 是一个结构新颖、靶向明确的 hClpP 激动剂,为针对该靶点的抗肿瘤药物研发提供了新的化学骨架。

然而,尽管 004A 与 ONC201 在体外抗肿瘤活性上表现相似^[31, 43-44],但初步安全性评价揭示了二者在毒性谱上的潜在差异。004A 在较高浓度下对正常心肌细胞 H9C2 显示出更强的抑制效应,这一发现提示,虽然 004A 与 ONC201 可能共享 hClpP 这一核心作用靶点,但其分子结构的不同可能导致差异化的脱靶效应或药代动力学的细微区别,从而引发独特的毒副作用。未来需深入阐明该类化合物心脏毒性的独特分子基础并指导安全窗口的优化。其中在机制层面,考虑到心肌细胞拥有体内最丰富的线粒体含量(30%~40% 细胞体积)高度依赖脂肪酸 β -氧化供能^[45-47],而 ONC 系列化合物过度激活 ClpP 导致氧化磷酸化复合物降解,不仅造成 ATP 耗竭,更可能引发脂肪酸氧化中断,导致长链酰基肉碱等脂毒性中间体大量堆积,直接触发线粒体通透性转换孔开放和凋亡^[45]。同时,心肌细胞线粒体自噬通量相对不足,无法及时清除受损的功能崩溃的线粒体,使之成为持续的活性氧泄漏源^[48]。后续验证可采用代谢组学和同位素示踪技术,定量描绘脂质通量变化,并比较心肌与癌细胞的自噬清除效率。其次,结构优化应致力于“药效-毒性”分离。直接策略是开发 ClpP 部分激动剂,使其仅适度激活以触发癌细胞的死亡受体通路,而不造成心肌电子传递链的灾难性降解,这需借助三维晶体结构进行理性设计。间接策略则包括构建 ROS 响应性前药,利用肿瘤高氧化应激微环境实现靶向释放;或拼合硫化氢供体等保护性药效团,构建可局部释放心肌保护信号的嵌合分子^[49]。最终,依托人源心肌细胞和心脏类器官平台建立预测模型,为开发内核安全的新一代 ClpP 激动剂奠定基础。

胃癌是全球范围内发病率和死亡率均居前列

的恶性肿瘤,其治疗仍面临巨大挑战^[50-54]。尽管手术、化疗及靶向治疗(如抗 HER2、抗血管生成药物)取得了一定进展^[55-57],但疗效有限且易产生耐药性,亟需开发基于新机制的治疗策略。本研究将 hClpP 激动剂 004A 应用于胃癌模型并观察到显著疗效,为胃癌的靶向治疗探索了一个全新的潜在方向。线粒体功能重编程与蛋白稳态维持是肿瘤细胞存活的关键,靶向 hClpP 以诱发线粒体蛋白水解灾难,理论上可规避部分传统化疗的耐药通路,可能为晚期或难治性胃癌患者提供新的治疗选择。

当然,本研究作为先导化合物的初期发现与评价,存在一定的局限性。首先,对 004A 的确切分子作用机制,包括其与 hClpP 结合的具体模式、对 ClpXP 复合物功能的精确影响以及下游信号通路的全面调控网络,尚未进行深入阐释。其次,所观察到的 H9C2 细胞毒性是否源于靶点相关效应;未来研究需通过蛋白质组学、转录组学等多组学技术,系统比较 004A 与 ONC201 处理后的细胞应答差异;并通过理性的结构优化,降低毒性,提升其成药性。

综上所述,本研究成功发现了一个靶向线粒体蛋白酶 hClpP 的新型激动剂 004A。该化合物在体外展现出广谱的抗肿瘤活性,特别是在胃癌细胞模型中能有效抑制细胞增殖与迁移,证实了 hClpP 作为胃癌治疗新靶点的可行性。尽管 004A 在初步评价中表现出一定的毒性,但这一发现为后续基于 hClpP 靶点的药物设计提供了重要的先导结构和新线索。未来的工作应聚焦于深入阐明 004A 的作用机制与构毒关系,并以此为基础进行系统的结构优化,以期获得活性更强、安全性更高的候选药物,推动靶向线粒体蛋白稳态的抗肿瘤策略向临床转化。

[参考文献]

- [1] Wang C, Youle R J. The role of mitochondria in apoptosis [J]. *Annu Rev Genet*, 2009, 43: 95-118.
- [2] Osellame L D, Blacker T S, Duchon M R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2012, 26(6): 711-723.
- [3] Ward P S, Thompson C B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 297-308.
- [4] Du H, Xu T, Yu S, et al. Mitochondrial metabolism and cancer therapeutic innovation [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 245.
- [5] Sies H, Jones D P. Reactive oxygen species (ROS) as

- pleiotropic physiological signalling agents [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 363-383.
- [6] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(7): 579-591.
- [7] Cheung E C, Vousden K H. The role of ROS in tumour development and progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(5): 280-297.
- [8] Kenny T C, Gomez M L, Germain D. Mitohormesis, UPR (mt), and the complexity of mitochondrial DNA landscapes in cancer [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(24): 6057-6066.
- [9] Costa-Mattioli M, Walter P. The integrated stress response: from mechanism to disease [J]. *Science*, 2020, 368(6489): eaat5314.
- [10] Song J, Herrmann J M, Becker T. Quality control of the mitochondrial proteome [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(1): 54-70.
- [11] Graves P R, Aponte-Collazo L J, Fennell E M J, et al. Mitochondrial protease ClpP is a target for the anticancer compounds ONC201 and related analogues [J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14(5): 1020-1029.
- [12] Zhang Y, Maurizi M R. Mitochondrial ClpP activity is required for cisplatin resistance in human cells [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2016, 1862(2): 252-264.
- [13] Armenise D, Baldelli O M, Liturri A, et al. Mitochondrial protease ClpP: cancer marker and drug target [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2025, 18(10): 1443.
- [14] Shu Z, Zhang J, Wu Y, et al. Recent advances in the design of small molecules targeting human ClpP [J]. *Future Med Chem*, 2025, 17(19): 2407-2424.
- [15] Liu X, Gu J, Liu S, et al. The mitochondrial protease ClpP is a promising target for multiple myeloma treatment [J]. *Biochem Pharmacol*, 2025, 236: 116855.
- [16] Chattopadhyay C, Roszik J, Bhattacharya R, et al. Imipridones inhibit tumor growth and improve survival in an orthotopic liver metastasis mouse model of human uveal melanoma [J]. *Br J Cancer*, 2024, 131(11): 1846-1857.
- [17] Nandha S R, Patwardhan R S, Sharma D, et al. Targeting mitochondrial proteases CLPP and LONP1 via disruption of mitochondrial redox homeostasis induces proteotoxic stress and suppresses tumor progression [J]. *Cell Commun Signal*, 2025, 23(1): 393.
- [18] Nouri K, Feng Y, Schimmer A D. Mitochondrial ClpP serine protease-biological function and emerging target for cancer therapy [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 841.
- [19] Seo J H, Rivadeneira D B, Caino M C, et al. The Mitochondrial unfoldase-peptidase complex clpxp controls bioenergetics stress and metastasis [J]. *PLoS Biol*, 2016, 14(7): e1002507.
- [20] Cole A, Wang Z, Coyaude E, et al. Inhibition of the mitochondrial protease ClpP as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(6): 864-876.
- [21] Culp E, Wright G D. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2017, 70(4): 366-377.
- [22] Alexopoulos J A, Guarné A, Ortega J. ClpP: a structurally dynamic protease regulated by AAA + proteins [J]. *J Struct Biol*, 2012, 179(2): 202-210.
- [23] Bonner E R, Waszak S M, Grotzer M A, et al. Mechanisms of imipridones in targeting mitochondrial metabolism in cancer cells [J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(4): 542-556.
- [24] Xiang X, Dai Z, Luo B, et al. Rational design of a novel class of human ClpP agonists through a ring-opening strategy with enhanced antileukemia activity [J]. *J Med Chem*, 2024, 67(8): 6769-6792.
- [25] Huang J, Zhang J, Luo B, et al. Discovery of a novel series of imipridone compounds as homo sapiens caseinolytic protease p agonists with potent antitumor activities in vitro and in vivo [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(11): 7629-7655.
- [26] Zhang J, Qiu Z, Liu S, et al. Discovery of a novel series of homo sapiens caseinolytic protease P agonists for colorectal adenocarcinoma treatment via ATF3-dependent integrated stress response [J]. *J Med Chem*, 2024, 67(4): 2812-2836.
- [27] Xu Z, Pokushalov D, Kabir M, et al. Targeting the mitochondrial protease ClpP for anticancer therapy [J]. *J Med Chem*, 2025, 68(20): 21377-21393.
- [28] Zhang J, Luo B, Sui J, et al. IMP075 targeting ClpP for colon cancer therapy in vivo and in vitro [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 204: 115232.
- [29] Wart S V, Phillips L, Ludwig E A, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of garenoxacin in patients with community-acquired respiratory tract infections [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(12): 4766-4777.
- [30] Wong K S, Mabanglo M F, Seraphim T V, et al. Acyldepsipeptide analogs dysregulate human mitochondrial ClpP protease activity and cause apoptotic cell death [J]. *Cell Chem Biol*, 2018, 25(8): 1017-1030.
- [31] Ishizawa J, Zarabi S F, Davis R E, et al. Mitochondrial ClpP-Mediated proteolysis induces selective cancer cell lethality [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(5): 721-737.

- [32] Nii T, Prabhu V V, Ruvo V, et al. Imipridone ONC212 activates orphan G protein-coupled receptor GPR132 and integrated stress response in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2019, 33(12): 2805-2816.
- [33] Pearson A D, Mueller S, Filbin M G, et al. Paediatric strategy forum for medicinal product development in diffuse midline gliomas in children and adolescents ACCELERATE in collaboration with the European Medicines Agency with participation of the Food and Drug Administration [J]. *Eur J Cancer*, 2025, 217: 115230.
- [34] Wong K S, Houry W A. Chemical modulation of human mitochondrial ClpP: potential application in cancer therapeutics [J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14(11): 2349-2360.
- [35] Jackson E R, Duchatel R J, Staudt D E, et al. ONC201 in combination with paxalisib for the treatment of H3K27-altered diffuse midline glioma [J]. *Cancer Res*, 2023; Of1-Of17.
- [36] Miciaccia M, Baldelli O M, Fortuna C G, et al. ONC201-derived tetrahydropyridopyrimidindiones as powerful ClpP protease activators to tackle diffuse midline glioma [J]. *J Med Chem*, 2025, 68(5): 5190-5210.
- [37] Odia Y, Hall M D, Cloughesy T F, et al. Selective DRD2 antagonist and ClpP agonist ONC201 in a recurrent non-midline H3 K27M-mutant glioma cohort [J]. *Neuro Oncol*, 2024, 26(Supplement_2): S165-S172.
- [38] Sathe S, Li Q, Jung J, et al. Targeting the mitochondria in high-grade gliomas [J]. *Cancers (Basel)*, 2025, 17(18): 3062.
- [39] Kim Y I, Levchenko I, Fraczkowska K, et al. Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase [J]. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(3): 230-233.
- [40] Akopian T, Kandror O, Raju R M, et al. The active ClpP protease from *M. tuberculosis* is a complex composed of a heptameric ClpP1 and a ClpP2 ring [J]. *EMBO J*, 2012, 31(6): 1529-1541.
- [41] Vollrath F, Hawkins N, Porter D, et al. Differential scanning fluorimetry provides high throughput data on silk protein transitions [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5625.
- [42] Jafari R, Almqvist H, Axelsson H, et al. The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(9): 2100-2122.
- [43] Prabhu V V, Allen J E, Dicker D T, et al. Small-molecule ONC201/TIC10 targets chemotherapy-resistant colorectal cancer stem-like cells in an Akt/Foxo3a/TRAIL-dependent manner [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(7): 1423-1432.
- [44] Parker C S, Zhou L, Prabhu V V, et al. ONC201/TIC10 plus TLY012 anti-cancer effects via apoptosis inhibitor downregulation, stimulation of integrated stress response and death receptor DR5 in gastric adenocarcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2023, 13(12): 6290-6312.
- [45] Cao Y P, Zheng M. Mitochondrial dynamics and inter-mitochondrial communication in the heart [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 663: 214-219.
- [46] Gao J, Shen W. Sirtuin-3-mediated cellular metabolism links cardiovascular remodeling with hypertension [J]. *Biology (Basel)*, 2023, 12(5): 686.
- [47] Houten S M, Violante S, Ventura F V, et al. The biochemistry and physiology of mitochondrial fatty acid β -oxidation and its genetic disorders [J]. *Annu Rev Physiol*, 2016, 78: 23-44.
- [48] Tannous P, Zhu H, Johnstone J L, et al. Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(28): 9745-9750.
- [49] Smith R A, Hartley R C, Murphy M P. Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(12): 3021-3038.
- [50] Siegel R L, Miller K D, Wagle N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [51] Sundar R, Nakayama I, Markar S R, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2025, 405(10494): 2087-2102.
- [52] Luo D, Liu Y, Lu Z, et al. Targeted therapy and immunotherapy for gastric cancer: rational strategies, novel advancements, challenges, and future perspectives [J]. *Mol Med*, 2025, 31(1): 52.
- [53] Wang G, Huang Y, Zhou L, et al. Immunotherapy and targeted therapy as first-line treatment for advanced gastric cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2024, 198: 104197.
- [54] Huang L, Liu H, Yu J, et al. Long-term outcomes in laparoscopic D2 gastrectomy for gastric cancer: a large comprehensive study proposing novel hypotheses [J]. *J Gastrointest Surg*, 2019, 23(7): 1349-1361.
- [55] Huang L, Yang H, Chen K, et al. The suppressive efficacy of THZ1 depends on KRAS mutation subtype and is associated with super-enhancer activity and the PI3K/AKT/mTOR signalling in pancreatic ductal adenocarcinoma: a hypothesis-generating study [J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(12): e1500.
- [56] Chen Z M, Huang L, Li M M, et al. Inhibitory effects of isocryptotanshinone on gastric cancer [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9307.
- [57] Smyth E C, Nilsson M, Grabsch H I, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648.

[收稿 2026-01-31;修回 2026-05-14]

(编辑:陈 婷)