

凋亡信号调节激酶-1 抑制剂在非酒精性脂肪性肝炎中的研究进展

韩 磊^{1,2}, 张小猛², 全 旭², 雷永华², 钱 海^{1*}

(¹中国药科大学新药研究中心,南京 210009; ²南京圣和药业股份有限公司,南京 211100)

摘要 非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 是最常见的慢性肝病, 当前未见有效疗法。凋亡信号调节激酶-1 (apoptosis signal regulating kinases 1, ASK-1) 是细胞丝裂原活化蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase kinases, MAPKKKs) 家族成员之一, 当机体受到细胞内活性氧簇应激、内质网应激、钙内流和细胞外炎症等信号刺激时, ASK-1 激活 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun amino terminal kinase, JNK) 和 p38 MAPK 通路, 从而促进细胞增殖、分化、凋亡以及炎症因子的产生, 诱发 NASH、纤维化等疾病, 因此可通过抑制 ASK-1 的活性来治疗 NASH。本文对当前 NASH 的治疗手段、ASK-1 结构和作用机制以及近年 ASK-1 抑制剂治疗 NASH 的研究进展进行综述, 旨在为该类抑制剂的设计与开发提供参考。

关键词 ASK-1 抑制剂; 非酒精性脂肪性肝炎; 凋亡信号调节激酶-1; 进展

中图分类号 R914.5 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2019)02-0135-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190202

引用本文 韩磊, 张小猛, 全旭, 等. 凋亡信号调节激酶-1 抑制剂在非酒精性脂肪性肝炎中的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(2):135-142.

Cite this article as: HAN Lei, ZHANG Xiaomeng, QUAN Xu, et al. Research progress of apoptosis signal regulating kinases-1 and its inhibitors in non-alcoholic steatohepatitis [J]. J China Pharm Univ, 2019, 50(2):135-142.

Research progress of apoptosis signal regulating kinases-1 and its inhibitors in non-alcoholic steatohepatitis

HAN Lei^{1,2}, ZHANG Xiaomeng², QUAN Xu², LEI Yonghua², QIAN Hai^{1*}

¹Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²Nanjing Sanhome Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 211100, China

Abstract Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is the most common chronic liver disease. However, the treatment of NASH remains challenging. Apoptosis signal regulating kinases-1 (ASK-1) is a member of mitogen-activated protein kinase kinase kinases (MAPKKKs). When the body is stimulated by reactive oxygen species, endoplasmic reticulum stress, calcium influx and extracellular inflammatory signals, c-Jun amino terminal kinases (JNK) and p38 MAPK are activated, which then promotes cell proliferation, differentiation, apoptosis and production of inflammatory factors, and causes NASH, fibrosis and other diseases. Therefore, ASK-1 inhibitors can be used to treat NASH. This paper reviews the current treatment methods of NASH, the structure and mechanism of ASK-1, and the research progress of ASK-1 inhibitors in the treatment of NASH in recent years, which aims to explore the guiding significance for the design and development of ASK-1 inhibitors.

Key words ASK-1 inhibitors; non-alcoholic steatohepatitis; apoptosis signal regulating kinases-1; advances

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81673299)

收稿日期 2018-12-01 *通信作者 Tel:025-83271051 E-mail:qianhai24@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81673299)

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种最常见的慢性肝脏疾病, 现在全世界约四分之一的成年人患有 NAFLD^[1], 其临床表现为过多的脂肪变性后以甘油三酯的形式堆积在肝脏中^[2]。NAFLD 的发病机制尚不十分明确, 是由环境因素和遗传因素共同导致的, 同时, 后天的肝脏受损也可能导致肝脏脂肪变性、炎症和纤维化的发生^[3]。未经治疗的 NAFLD 将进展为非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 并可继续恶化为肝硬化和肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC), 也是导致终末期肝病以及肝移植的主要原因^[4]。

生活方式和习惯的调节, 如控制饮食中的热量摄入和增加运动量, 目前是 NAFLD/NASH 治疗的基本手段, 但很难改善患者的病情, 因此药物治疗显得十分迫切需要, 然而, 目前仍没有针对该疾病的药物批准上市^[5]。

1 现有 NASH/NAFLD 治疗手段

当前 NASH 的治疗药物有抗氧化剂/护肝药、过氧化物酶体增殖激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 激动剂、降糖药、降脂药、降压药和法尼酯类受体 (farnesoid X receptor, FXR) 激动剂等^[5]。

常用的抗氧化剂/护肝药有维生素 E 和谷胱甘肽 (glutathione, GSH)。维生素 E 是一种自由基清除剂, 可有效降低患者血清谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和转化生长因子-1 活性^[6], 但长期服用可能诱发前列腺癌^[7] 和出血性中风^[8]。GSH 具有抗氧化作用, 可降低患者的 ALT 水平和肝脂肪变性, 但其有效性和安全性尚待研究^[9]。

吡格列酮 (pioglitazone) 是常用的 PPAR-激动剂, 可显著改善患者的脂肪变性和坏死性炎症^[10], 但可能诱发前列腺癌或胰腺癌以及心血管疾病发病等^[5]。胰岛素增敏剂二甲双胍可减少肝糖原生成, 增强葡萄糖分解利用, 改善肝脏的胰岛素抵抗, 降低患者的 ALT 水平, 但并未发现对肝功能和肝组织学的改善^[2]。

他汀类降脂药的治疗机制可能与抑制肝脏炎症、改善肝纤维化和降低肝癌的发生有关, 但尚未得到证实^[11-12]。奥贝胆酸 (obeticholic acid, OCA)

是一种 FXR 激动剂, 可减少肝脏葡萄糖和脂肪合成同时抑制脂肪变性, 降低 NASH 患者发展为肝纤维化的风险, 但会诱导低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 水平升高^[13]。

上述药物虽有一定的缓解 NASH 作用, 但作用机制不明确且具有明显甚至较严重的不良反应。最新开发的凋亡信号调节激酶-1 (apoptosis signal regulating kinases-1, ASK-1) 抑制剂 (如 selonsertib) 具有良好的治疗效果, 作用机制明确, 不良反应较小, 现已进入Ⅲ期临床试验阶段, 具有良好的发展前景, 有望成为首个批准上市的 NASH 治疗药物, 现将 ASK-1 及其抑制剂的研究进展进行综述。

2 ASK-1 的结构及其作用机制

ASK-1 是细胞丝裂原活化蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase kinases, MAPKKKs) 家族成员之一, 负责调节 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun amino terminal kinases, JNK) 和 p38MAPK 通路^[3]。当细胞被氧化还原应激以及炎性细胞因子应激时可被激活, 从而在天然免疫和病毒感染中发挥重要作用^[14-15]。

2.1 ASK-1 的结构

ASK-1 是一条由大约 1 000 个氨基酸组成的多肽链, 其结构如图 1 所示。



图 1 凋亡信号调节激酶-1 (ASK-1) 的结构

ASK-1 结构的主体部分为上图中的“激酶结构域”部分, 而在其的 N 端和 C 端两侧各有一个螺旋线圈盘绕结构域, 分别称为 N 端盘管结构域 (N-terminal coiled-coil domain, NCC) 和 C 端盘管结构域 (C-terminal coiled-coil domain, CCC)^[16], 这两个区域对于 ASK-1 单体互相作用形成寡聚体至关重要, 而 ASK-1 在细胞中的活性形式则为寡聚体, 也被称为“ASK-1 信号小体”^[17-18]。

位于 ASK-1 结构中央的是丝氨酸/苏氨酸激酶结构域, 该结构在真核生物中高度保守, 包含了 ASK-1 激活所必须的磷酸化位点, 该位点位于激酶结构域的激活环中的 Thr845^[16], 当被激活后引发

一系列的蛋白激酶级联反应^[19]。

激酶结构域的 N 端有多个具调节作用的区域, 如 NCC 结构两侧的硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx) 和 TNF 受体相关因子 (TNF receptor-associated factors, TRAF) 特异性结合区域^[19]。Trx 是一种约 12 kD 的二硫醇氧化还原蛋白, 可以根据细胞的氧化还原状态而改变自身的结构, 被认为具有抗液亡的作用^[20]。通常条件下, Trx 为还原态形式, 结合到 Trx 结合位点, 抑制 ASK-1 之间形成寡聚体, ASK-1 活性被抑制。在氧化还原应激条件下, Trx 转化成氧化态形式, 与 Trx 结合位点和激酶结构域之间的区域解离, 并且和 TRAF 蛋白结合, ASK-1 的 NCC 和 CCC 结构暴露, 促进形成寡聚体, 进而促进 ASK 活化和激酶活性^[20-21]。TRAF 是一种重要的衔接蛋白, 对 ASK-1 下游信号有积极的调节作用^[22], 在氧化应激情况下与解离下来的 Trx 结合发挥作用。除此之外, 在 N 端还具有一个 CIB1 的结合区域, 以检测 Ca^{2+} 应激信号, 此外还有其他蛋白-蛋白相互作用的位点^[23-24]。

目前对 ASK-1 的 C 端区域的研究还不够深入, 认为其在 ASK-1 形成寡聚物的过程中发挥重要作用, 且包括一个 14-3-3 蛋白的结合位点, 其对 ASK-1 活性的影响机制类似于 Trx^[24-25]。

连接 N 端 Trx 结合位点和激酶结构域的是中央调控区, 该区域是一个异常致密的四肽重复序列 (tetratricopeptide repeat, TPR), 并且被一个血小板-白细胞 C 激酶底物——普列克底物蛋白 (pleckstrin) 同源结构覆盖, 该结构及 TPR 结构的完整性对 ASK-1 活性的保持至关重要。相关文献报道^[19]提出了其可能的作用机制, 其可以变构激活 ASK-1 的激酶结构域, 同时与 ASK-1 下游底物 MKK-6 结合, 启动 MKK-6 底物的磷酸化。

通过分析 ASK-1 与 ATP 和配体的结合位点, 可以了解其独特的结构特征, 对于设计选择性 ASK-1 抑制剂具有重要的意义, 图 2 和图 3 是文献化合物与 ASK-1 结合的模式图。

通过文献化合物与 ASK-1 晶体结构的对接模型分析 (如图 2 所示) 表明, ASK-1 的关键作用位点位于其铰链区的 Val757 残基以及内结合口袋位置的 Lys709 残基^[26]。其中, 配体咪唑并吡啶结构中咪唑环上的氮原子与 Val757 骨架的氨基形成氢键, 文献化合物紧邻咪唑并吡啶环的氨基与 ASK-1

主链的羰基形成较强的氢键作用 (如图 3 所示)。配体咪唑环上的氮原子则与 ASK-1 内结合口袋的 Lys709 残基的侧链直接相互作用, 以上即为 ASK-1 与配体的 3 个关键结合位点^[26]。除此之外, 配体酰胺键的羰基可通过水分子与 Ser761 形成较弱的氢键作用, 叔丁基苯基侧链则伸入 ASK-1 的溶剂暴露区, 此处若连有亲脂性基团则可以占据亲水空间, 利于分子间结合^[26-27]。由此可见, 咪唑并吡啶或其他含有氮原子的母环结构以及连接的酰胺键, 含氮杂环侧链均为 ASK-1 抑制剂设计的关键结构。

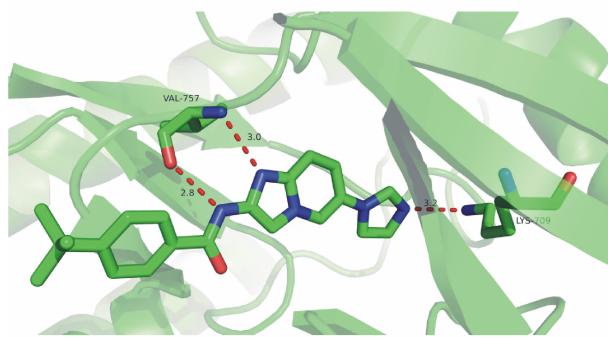


图 2 ASK-1 晶体结构对接模型图 (PDB 3VW2)

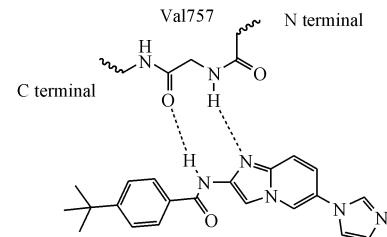


图 3 文献化合物与 ASK-1 结合的化学结构分析图

2.2 ASK-1 作用机制

ASK-1 的作用机制如图 4 所示。当机体受到来自多方面的应激刺激时, 如细胞内活性氧簇应激 (reactive oxygen species, ROS)、内质网应激、钙内流和细胞外炎症信号, 如肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 等, ASK-1 的蛋白激酶级联通路被激活^[28]。ASK-1 被激活后, Trx 从 N 端解离, ASK-1 通过末端寡聚形成 ASK-1 信号小体, 同时, 激活结构域激活环内的苏氨酸残基磷酸化, 其下游底物 MAP2K 被激活, 此 MAP2K 底物可分为 MKK-4 (SEK-1)、MKK-7 和 MKK-3、MKK-6 两条途径。MAP2K 继续磷酸化激活下游的 MAPK 底物, 上

述两条途径的底物分别是 JNK 家族和 p38 家族^[29-30]。激活 p38 和 JNK 信号可促进炎症反应、纤维化以及细胞增殖、分化、凋亡,进而诱发多种疾病,如肝脏肾脏疾病、神经退行性疾病、免疫疾病和纤维化等^[31]。

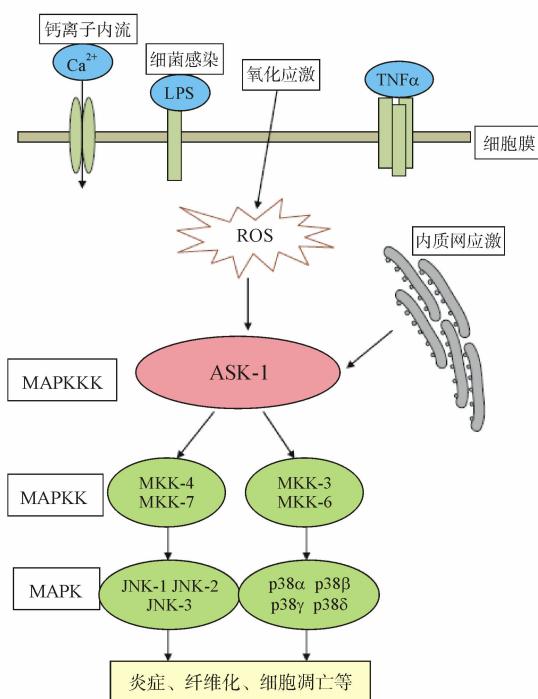


图 4 ASK-1 作用机制示意图

因此,ASK-1 控制的蛋白激酶级联通路也被称为 ASK1-JNK-p38 通路,而在 NAFLD 和 NASH 患者中,此通路是高度激活的,这种过度激活与胰岛素抵抗、炎症和脂肪增多呈正相关^[32]。当 ASK-1 的活性被抑制时,ASK1-JNK-p38 通路被切断,因此导致的细胞增殖、分化、凋亡以及炎症均被抑制。在肝脂肪变性小鼠模型的实验中,ASK-1 缺陷型的小鼠通过抑制 ASK-1 的表达,改善了肝脂肪变性和纤维化程度^[33],故 ASK-1 作为新型的 NASH 治疗的靶点具有其优越性。

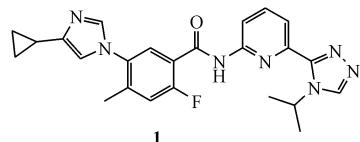
3 ASK-1 抑制剂研究现状

当前,ASK-1 抑制剂的研究处于蓬勃发展的阶段,全球多家公司都投入了对其的研发,其中首个进入临床研究的是吉利德(Gilead)公司的 selonsertib(GS-4997,1),也是当前进展最快且最有希望获得上市许可的化合物。由于 selonsertib 表现出

较强 ASK-1 抑制活性和对 ASK-1 相关疾病的显著治疗效果,本文将介绍 selonsertib 的研究进展以及其他在研治疗 NASH 已报道的化合物。

3. 1 selonsertib

吉利德公司于 2013 年 8 月首先公布了 ASK-1 抑制剂 selonsertib 的专利文献。Selonsertib 首先被用于治疗肺动脉高压和糖尿病肾病,但因其Ⅱ期临床结果不理想(NCT02234141 和 NCT02177786)进而转向对 NASH 治疗的研究,并取得了较为满意的治疗效果,目前已进入Ⅲ期临床阶段。



该化合物具有与 ASK-1 的 ATP 结合位点竞争性结合的酰胺键和三氮唑结构,通过多项生物学分析也证实其为一个强效的 ASK-1 抑制剂。经时间分辨荧光能量共振转移 (TR-FRET) 测定法测得 selonsertib 抑制 ASK-1 的 IC_{50} 为 3.0 nmol/L; ASK-1 的 293 细胞水平测定得到其在细胞中的效能 EC_{50} 为 2.0 nmol/L; K_d 为 0.24 nmol/L, 能够在缺少 ATP 的情况下有效结合 ASK-1 受体;在人血浆中的未结合分析物百分比为 11.94%;经药物代谢动力学测试得到 $t_{1/2}$ 为 5.07 h, 口服生物利用度为 75%^[34]。这些测试中 selonsertib 均表现出优秀的 ASK-1 抑制活性和良好的耐受性,在同期吉利德所设计的化合物当中脱颖而出,成为吉利德公司主推的化合物。同时,在小鼠的 NASH 模型中, selonsertib 也显著改善了 NASH 相关代谢参数以及肝脂肪变性、炎症和肝纤维化程度^[35]。

2015年6月, selonsertib 进入Ⅱ期临床试验, 以研究其单用或联合 simtuzumab (SIM) 治疗 NASH 和 2 期至 3 期肝纤维化的安全性、耐受性和有效性 (NCT02466516)。SIM 是一种人源化单克隆抗体, 可抑制类赖氨酸氧化酶分子-2 (lysyl oxidase-like molecule 2, LOXL2)^[36], 与 ASK-1 抑制剂联用可抑制纤维化^[37]。此项试验将 72 名受试者分为 selonsertib 6 mg 或联用 SIM、selonsertib 18 mg 或联合使用 SIM 以及单用 SIM 3 个大组, 部分试验结果如表 1 所示^[38]。

表1 Selonsertib II期临床试验部分结果

试验指标	Selonsertib 18 mg ± SIM(例数/总数)	Selonsertib 6 mg ± SIM(例数/总数)	SIM(例数/总数)
纤维化改善≥1	43% (13/30)	30% (8/27)	20% (2/10)
转变为肝硬化	3% (1/30)	7% (2/27)	20% (2/10)
肝僵硬程度削减≥15%	15% (4/26)	32% (7/22)	0% (0/7)
肝脂肪减少≥30%	26% (8/31)	13% (3/24)	10% (1/10)

SIM: Simtuzumab, 一种 LOXL2 抑制剂, 与 ASK-1 抑制剂联用可抑制纤维化

在安全性评价方面, 部分患者治疗过程中出现至少一次不良反应, 但多为轻度症状, 主要表现为头痛、恶心、鼻窦炎、鼻咽炎、上腹痛、背痛和疲劳, 仅有3例因较严重的不良反应而中断治疗^[38]。

II期临床试验的结果表明, selonsertib 对于NASH 和中度至重度的肝纤维化患者具有明显的疗效, 且该疗效具有一定的剂量依赖性, 但也存在一定不良反应的风险, 还需要通过更进一步的研究以阐明其毒理机制, 扩大治疗窗。对此, 吉利德公司于2016年末和2017年初开启了 selonsertib 的III期临床试验, 以研究 selonsertib 治疗 NASH 和桥接纤维化以及 NASH 代偿性肝硬化的安全性和有效性(NCT03053050 和 NCT03053063), 目前仍在进

行中。2015年1月15日 selonsertib 获得了“孤儿药候选药物认证”, 是当前在研 ASK-1 抑制剂中最有希望获得上市和临床实际应用的产品, 具有良好的开发前景。

3.2 其他在研的 ASK-1 抑制剂

除 selonsertib 外, 目前尚没有其他进入临床试验阶段的 ASK-1 抑制剂, 但近期全球多家制药公司均以 selonsertib 作为参照化合物设计合成了新化合物, 保留其母环结构进行了结构修饰和改造, 且生物学检测显示具有较强的 ASK-1 抑制活性和较好的药物代谢动力学性质, 部分化合物较 selonsertib 更加具有优势, 具有良好的应用前景, 部分化合物的结构和生物学检测结果如表2所示^[39-42]。

表2 其他在研(生物学测试)的 ASK-1 抑制剂

序号	结构	IC ₅₀ /(nmol/L)	研发公司
2		0.46	东阳光
3		0.28	东阳光
4		0.43	东阳光
5		0.46	东阳光
6		0.9 ± 0.1	科伦豪泰
7		0.91 ± 0.12	科伦豪泰

(续表)

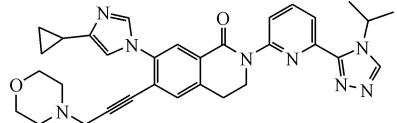
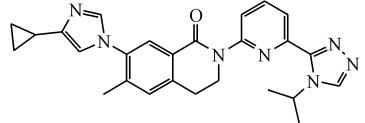
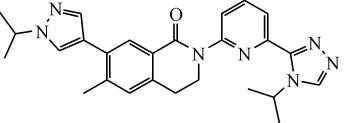
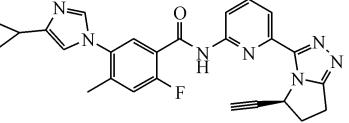
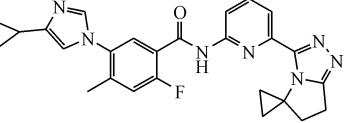
序号	结构	IC ₅₀ /(nmol/L)	研发公司
8		0.98 ± 0.12	科伦豪泰
9		1.8 ± 0.4	礼来
10		3.6 ± 0.8	礼来
11		1.0	豪森
12		1.9	豪森
13		1.9	豪森

表2所示的是部分已经通过专利公布的ASK-1抑制剂的化学结构,且具有较好的ASK-1抑制活性,根据对ASK-1与配体结合的晶体结构图分析,与ASK-1铰链区Val757残基和内结合口袋Lys709残基相互作用的酰胺以及临近含氮杂环和侧链含氮杂环(通常是咪唑或三氮唑)是抑制剂设计的必需基团。

其中,化合物2~5为广东东阳光药业于2018年5月公开的专利所报道的化合物,并使用酶法测定对ASK-1的抑制活性,筛选出了上述4个IC₅₀低于1nmol/L的化合物;此外,经过雄性SD大鼠的药代动力学测试,所筛选的化合物经口给药后在大鼠体内血药浓度及暴露量水平较高,清除率较低,具有良好的生物利用度;药物组织分布的研究发现化合物在大鼠肝和肾器官中的浓度较高^[39],可针对性抑制肝脏ASK-1活性,有发展成为NASH药物的潜力。

化合物6~8为四川科伦豪泰生物医药于2018年8月23日公开的专利所报道的化合物,经

酶法筛选出上述IC₅₀低于1nmol/L,对ASK-1酶具有较强的抑制活性;构建pcDNA3.1-ASK1表达载体测定化合物对细胞ASK-1酶的作用,表现出良好的抑制作用;药物代谢动力学实验也表现出良好的生物利用度^[40]。

礼来公司2018年9月7日公开的专利披露了其在研的ASK-1抑制剂的化学结构,其将selonsertib酰胺键右侧的结构完全保持,苯环或吡啶环与临近酰胺键成环,其余的改动则集中在苯环或吡啶环的取代基上。通过ASK-1酶实验和ASK-1自磷酸化实验测试ASK-1活性筛选出具有较好抑制活性的化合物9和化合物10^[41]。

化合物11~13为江苏豪森药业于2018年9月7日公开的专利所报道的部分化合物。豪森药业通过ASK-1酶学实验TR-FRET法筛选出激酶酶活抑制的IC₅₀小于1nmol/L的数个化合物,其作为ASK-1的有效抑制剂对NASH的治疗具有巨大的应用潜力。随后进行药代动力学分析,筛选出上述同时具有良好代谢性质、暴露量和最大血药浓度

的化合物,在体内的有效持续时间可达3 h以上,其半衰期较 selonsertib 也有明显的延长。此外还进行了化合物对高脂饮食和 CCl₄ 诱导的 NASH 模型小鼠血清中 ALT 和 AST 水平的影响实验,与 selonsertib 对比发现,所筛选的化合物均在下调 NASH 小鼠血清中 ALT 和 AST 的水平中表现出良好的效果,明显强于 selonsertib^[42]。

4 总结和展望

非酒精性脂肪性肝炎作为发病率最高最常见的慢性肝脏疾病,目前临床治疗中除通过日常生活饮食习惯的调节外,推荐的药物治疗方案疗效不明显、不良反应大、给药途径不够友好,使得药物科学家和患者迫切需要更加理想的治疗药物。ASK-1 是近年来受到广泛关注的新型靶点,其靶点作用机制清晰,同时,与配体的结合晶体结构模型分析的深入对抑制剂的设计提供了有价值的参考信息,多家制药公司以及科研机构投入对其的研究。其中 selonsertib 成为进展最快,最有希望获得上市的药物,在 I 期临床和 II 期临床中表现出良好的 ASK-1 抑制活性和对 NASH 病人各项指标的有效缓解,具有较好的安全性,当前已进入 III 期临床试验阶段,将进一步对药物有效性和安全性进行评价。各公司以 selonsertib 为先导所设计的化合物也在临床前的生物学测试中表现处良好的 ASK-1 抑制活性和药代动力学性质,其中豪森公司还实施了化合物对小鼠血清中 ALT 和 AST 水平影响的实验,可以明显降低其水平,具有继续推进的潜力。随着对 ASK-1 抑制剂的研究更加深入,会有更加有效且不良反应更小的化合物被发现,以 ASK-1 为靶点的药物有望为 NASH 患者带来福音。

参 考 文 献

- [1] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. *Hepatology*, 2016, **64**: 73–84.
- [2] Xu L, Mi YQ. Progress in drug treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Chin J Clinicians (Electronic Ed)* (中华临床医师杂志 电子版), 2015, **9**(20): 3666–3670.
- [3] Susanne S, Ariel EF. Novel therapeutic strategies targeting ASK1 in NASH [J]. *Nat Med*, 2017, **23**: 439–449.
- [4] Goldberg D, Ditar IC, Saeian K, et al. Changes in the prevalence of hepatitis C virus infection, nonalcoholic steatohepatitis, and alcoholic liver disease among patients with cirrhosis or liver failure on the waitlist for liver transplantation [J]. *Gastroenterology*, 2017, **152**: 1090–1099.
- [5] Yoshio S, Masashi Y. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH [J]. *J Gastroenterol*, 2018, **53**(3): 362–376.
- [6] Yoneda M, Hasegawa T, Sato K. Vitamin E therapy for NAFLD/NASH [J]. *Nutrition*, 2015, **31**: 898–899.
- [7] Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, et al. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the selenium and vitamin E cancer prevention trial [J]. *JAMA*, 2009, **301**: 39–51.
- [8] Schurks M, Glynn RJ, Rist PM, et al. Effects of vitamin E on stroke subtypes: meta-analysis of randomised controlled trials [J]. *BMJ*, 2010, **4**(341): c5702.
- [9] Honda Y, Kessoku T, Sumida Y, et al. Efficacy of glutathione for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: an open label, single-arm, multicenter, pilot study [J]. *BMC Gastroenterol*, 2017, **17**: 96.
- [10] Aithal GP, Thomas JA, Kaye PV, et al. Randomized, placebo controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Gastroenterology*, 2008, **135**: 1176–1184.
- [11] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American association for the study of liver diseases [J]. *Hepatology*, 2018, **67**(1): 328–357.
- [12] Singh S, Singh PP, Singh AG, et al. Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Gastroenterology*, 2013, **144**: 323–332.
- [13] Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, et al. NASH Clinical Research Network. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2015, **385**(9972): 956–965.
- [14] Miyakawa K, Matsunaga S, Kanou K, et al. ASK1 restores the antiviral activity of APOBEC3G by disrupting HIV-1 Vif-mediated counteraction [J]. *Nat Commun*, 2015, **6**: 6945.
- [15] Okazaki T, Higuchi M, Takeda K, et al. The ASK family kinases differentially mediate induction of type I interferon and apoptosis during the antiviral response [J]. *Sci Signal*, 2015, **8**(388): ra78. doi:10.1126/scisignal.aab1883.
- [16] Hattori K, Naguro I, Runchel C, et al. The roles of ASK family proteins in stress response and disease [J]. *Cell Commun Signal*, 2009, **7**: 9. doi:10.1186/1478-811X-7-9.
- [17] Iriyama T, Takeda K, Nakamura H, et al. ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis [J]. *EMBO J*, 2009, **28**(7): 843–853.
- [18] Federspiel JD, Codreanu SG, Palubinsky AM, et al. Assembly dynamics and stoichiometry of the apoptosis signal-regulating

- kinase (ASK) signalosome in response to electrophile stress [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2016, **15**(6): 1947-1961.
- [19] Weijman JF, Kumar A, Jamieson SA, et al. Structural basis of autoregulatory scaffolding by apoptosis signal-regulating kinase 1 [J]. *PNAS*, 2017, **114**(11): E2096-E2105.
- [20] Hanschmann EM, Godoy JR, Berndt C, et al. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, **19**(13): 1539-1605.
- [21] Kosek D, Kylarova S, Psenakova K. Biophysical and structural characterization of the thioredoxin-binding domain of protein kinase ASK1 and its interaction with reduced thioredoxin [J]. *J Biol Chem*, 2014, **289**(35): 24463-24474.
- [22] Xiang M, Wang PX, Wang A, et al. Targeting hepatic TRAF1-ASK1 signaling to improve inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis [J]. *J Hepatol*, 2016, **64**: 1365-1377.
- [23] Yu Z, Chen T, Li X, et al. Lys29-linkage of ASK1 by Skp1-Cullin 1-Fbxo21 ubiquitin ligase complex is required for antiviral innate response [J]. *eLife*, 2016, **5**: e14087.
- [24] Kawarazaki Y, Ichijo H, Naguro I. Apoptosis signal-regulating kinase 1 as a therapeutic target [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, **18**(6): 651-664.
- [25] Petrvska O, Kosek D, Kukacka Z, et al. Structural insight into the 14-3-3 protein-dependent inhibition of protein kinase ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) [J]. *J Biol Chem*, 2016, **291**(39): 20753-20765.
- [26] Onkar S, Anthony S, Peter C, et al. Crystal structures of ASK1-inhibitor complexes provide a platform for structure-based drug design [J]. *Protein Sci*, 2013, **22**(8): 1071-1077.
- [27] Frank L, Paul M, Christophe A, et al. Rational approach to highly potent and selective apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, **145**: 606-621.
- [28] Sakauchi C, Wakatsuki H, Ichijo H, et al. Pleiotropic properties of ASK1 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, **1861**: 3030-3038.
- [29] Ryoichi H, Teruyuki H, Kohsuke T, et al. Therapeutic targets in the ASK1-dependent stress signaling pathways [J]. *Proc Jpn Acad*, 2012, **88**: 434-453.
- [30] Kim EK, Choi EJ. MAPK signaling in human diseases: an update [J]. *Arch Toxicol*, 2015, **89**: 867-882.
- [31] Nishida T, Hattori K, Watanabe K. The regulatory and signaling mechanisms of the ASK family [J]. *Adv Biol Regul*, 2017, **66**: 2-22.
- [32] Xie L, Wang PX, Zhang P, et al. DKK3 expression in hepatocytes defines susceptibility to liver steatosis and obesity [J]. *J Hepatol*, 2016, **65**: 113-124.
- [33] Yamamoto E, Dong Y, F, Kataoka K, et al. Olmesartan prevents cardiovascular injury and hepatic steatosis in obesity and diabetes, accompanied by apoptosis signal regulating kinase-1 inhibition [J]. *Hypertension*, 2008, **52**: 573-580.
- [34] Gilead sciences, INC. Apoptosis signal-regulating kinase inhibitor; *WO*, 2013/112741 A1 [P]. 2013-08-01 [2019-03-11].
- [35] Karnik S, Charlton M, Li L, et al. Efficacy of an ASK1 inhibitor to reduce fibrosis and steatosis in a murine model of NASH is associated with normalization of lipids, hepatic gene expression, and a reduction in serum biomarkers of inflammation and fibrosis [J]. *Hepatology*, 2015, **62** (Suppl): 877A.
- [36] Talal AH, Feron-Rigodon M, Madere J, et al. Simtuzumab, an antifibrotic monoclonal antibody against lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) enzyme, appears safe and well tolerated in patients with liver disease of diverse etiology [J]. *J Hepatology*, 2013, **58** (Suppl 1): S409-S556.
- [37] Ikenaga N, Liu SB, Peng ZW, et al. Dual combination therapy directed against lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) and apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) potently inhibits fibrosis and portal hypertension in a new mouse model of PSC-like liver disease [J]. *Hepatology*, 2015, **62** (Suppl): 881A.
- [38] Rohit L, Eric L, Parvez S, et al. The ASK1 inhibitor selonsertib in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a randomized, phase 2 trial [J]. *Hepatology*, 2018, **67**(2): 549-559.
- [39] Sunshine Lake Pharma Co., Ltd. Amide derivative and use thereof in medicine; *WO*, 2018/090869 A1 [P]. 2018-05-24 [2019-03-11].
- [40] Sichuan Kelun-biotech Biopharmaceutical Co., Ltd. Kinase inhibitor and preparation method therefor and use thereof; *WO*, 2018/149284 A1 [P]. 2018-08-23 [2019-03-11].
- [41] Eli lilly and company. Isoquinolin and naphthydrin compounds; *WO*, 2018/160406 A1 [P]. 2018-09-07 [2019-03-11].
- [42] Jiangsu Hanso Pharmaceutical Group Co., Ltd. Amide derivative inhibitor and preparation method and application thereof; *WO*, 2018/157856 A1 [P]. 2018-09-07 [2019-03-11].