

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.06.003

核质转运通路及其抑制剂在肿瘤靶向治疗中的研究进展

颜文青综述,侯健审校

关键词:转录因子;核质转运;出入核抑制剂;信号通路;恶性肿瘤

中图分类号:R730.231 文献标识码:A

0 引言

恶性肿瘤是世界范围内死亡率较高的疾病,并有逐年上升的趋势。尽管近年来不断涌现出新的抗肿瘤药物,但肿瘤的高复发性和耐药性仍不可避免。肿瘤细胞的恶性增殖与一系列信号转导通路的异常激活或抑制密切相关。其中转录因子及转录辅助因子,通过核孔复合体(nuclear pore complexes,NPC)和出入核转运受体进出细胞核,诱导或阻滞下游基因的表达,可促使信号转导通路异常激活或抑制^[1]。已有许多报道证实通过出入核抑制剂阻断这些重要转录因子的作用可抑制肿瘤细胞的增殖,诱导细胞凋亡和逆转肿瘤的耐药性。本文对目前核质转运通路及其抑制剂在恶性肿瘤靶向治疗中的进展加以阐述。

1 出入核转运通路

所有的分子都通过嵌入核膜的 NPC 出入核。NPC 是一种具有分子筛功能的孔状结构,通常可允许相对分子质量小于 40~65 kD 的小分子物质以弥散方式自由通过,而相对分子质量超过此范围或直径大于 6 nm 的生物大分子则须在转运受体蛋白的协助下,以能量依赖的方式主动转运入核^[2]。

1.1 依赖入核转运受体 Importin α/β 的入核转运通路

一些分子在细胞内的核质穿梭受控于其本身含有特殊的氨基酸或信号序列,即核定位信号(nuclear localization signal, NLS)和核输出信号(nuclear export signal, NES)。入核转运受体 Importin α 可识别这类分子的 NLS 并与 Importin β -Ran GTP 结合;在 Ran GTP 酶活化因子等作用下,形成 NLS-Importin α -Importin β -Ran GDP 的转运复合物,经

NPC 入核后 GDP 转换成 GTP,使得 Importin α 与含 NLS 的分子解离,从而完成入核过程^[3]。通过该通路入核且与恶性肿瘤细胞增殖高度相关的蛋白包括 NF- κ B 二聚体、STAT3、DR5、HIV-1 整合酶和非结构蛋白 5(NS5)等。

1.2 仅依赖 Importin β 及其同系物的入核通路

有一些蛋白具有氨基酸序列不规则的 NLS,不需要 Importin α 的识别,而直接与 Importin β 及其同系物结合转运入核^[4]。包括一些含有 N-末端疏水性或碱性基序和 C-末端 RX₂₋₅PY 基序的蛋白,可直接与 Karyopherin β -2 结合而入核^[5]。这种转运类似于 Importin α/β 介导的入核机制。

1.3 仅依赖 Importin α 的入核通路

目前已知的少数蛋白入核时与 Importin α 结合,而不需要 Importin β 或其同系物的协同参与。例如钙/钙调素依赖性蛋白激酶 IV (CaMK IV)能与 Importin α 的 C 末端发生交互作用,形成异源二聚体而入核,且体外实验证实,当 Importin α 发生突变,即与 Importin β 结合的 IBB 结构域出现缺失时,能促进 CaMK IV 的入核^[6]。

1.4 直接依赖核孔蛋白的入核途径

核孔蛋白是核孔复合体的重要组成部分,当胞质蛋白与核孔蛋白的重要区域产生交互作用,则不需要 Ran GTP 浓度梯度,可自由通过核孔复合体屏障而入核。例如 Importin β 及其同系物、 β -catenin 和 I κ B α 的入核^[7-9]。

1.5 染色体区域维持蛋白 1(CRM1)介导的出核转运通路

CRM1 可识别蛋白和 RNA 的 NES,在 Ran GEF 的磷酸化作用下 GDP 转换成 GTP,形成 NES-CRM1-RanGTP 复合物,经 NPC 出核,在 Ran GAP 作用下使 Ran GTP 去磷酸化,复合物解离,完成出核过程^[10]。APC、p53、BRCA1、Topoisomerase I、Topoisomerase II α 、FOXO、BCR-ABL、Hsp90 等蛋白都是由 CRM1 介导出核转运,与肠癌、乳腺癌、急慢性髓系白血病、多发性骨髓瘤等多种恶性肿瘤

收稿日期:2013-01-16;修回日期:2013-03-20
作者单位:200003 上海,第二军医大学长征医院血液科全军骨髓瘤与淋巴瘤疾病中心
通信作者:侯健,E-mail:houjian167@sohu.com
作者简介:颜文青(1986-),女,硕士,主要从事血液内科基础与临床研究

瘤的发病相关^[11-18]。

2 与恶性肿瘤发生发展密切相关的出入核蛋白

CRM1 在卵巢癌、神经胶质细胞瘤、胰腺癌、骨肉瘤、宫颈癌中高表达,与肿瘤的生长、转移、疾病无进展生存期和总生存期较短等紧密相关。Leaner 教授研究组证实了入核转运受体 Importin β 在宫颈癌中高表达^[19],其生物学意义有待进一步研究明确。在此列举了一些与恶性肿瘤细胞的增殖凋亡耐药密切相关且依赖 CRM1、Importin α/β 出入核的蛋白。

2.1 拓扑异构酶 2- α (Topoisomerase II α ,Topo II α)

Topo II α 在 DNA 复制、修复、转录、重组以及染色体分离等生命活动中发挥重要作用,其表达增高与肿瘤细胞增殖密切相关。Topo II α 抑制剂多柔比星和依托泊苷可在肿瘤细胞 DNA 复制时导致双股 DNA 断裂和细胞凋亡。这种 DNA 损伤机制建立在 Topo II α 定位在核内并与 DNA 结合的基础上。体内外实验均证实多发性骨髓瘤负荷较高时,细胞核内的 Topo II α 在 CRM1 的介导下出核,与 DNA 结合减少,从而导致对依托泊苷等耐药^[20]。因此,在多发性骨髓瘤中,抑制 Topo II α 经 CRM1 出核可以增加细胞毒作用。

2.2 半乳凝素 3(galectin-3,Gal-3)

Gal-3 是 β 半乳糖苷结合蛋白家族的一员,参与细胞的炎症反应和免疫应答,介导血管生成、细胞凋亡以及肿瘤的发生和转移。已有研究证实,在乳腺癌细胞中,为逃避药物对肿瘤细胞的杀伤作用,胞核内 Gal-3 可反馈性的向胞质转运^[21]。由此可见,在乳腺癌中,抑制 Gal-3 的出核有可能逆转化疗药物的耐药性。

2.3 BCR-ABL

BCR-ABL 融合基因使相应的酪氨酸激酶持续激活,引起细胞增殖、黏附和生存环境的改变,导致多种肿瘤的发生。酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼(IM)的出现大大改善了慢性髓系白血病(CML)的治疗效果,但耐药仍不可避免。通过对 35 例 CML 患者进行临床研究表明,对于野生型的 ABL 蛋白,抑制 BCR-ABL 的出核可保留其诱导凋亡作用,IM 与出核抑制剂的合用可更有效的治疗 CML^[17]。

2.4 核因子- κ B(nuclear factor- κ -gene binding,NF- κ B)

NF- κ B 是一种广泛存在于多种细胞的核转录因子。近年来关于 NF- κ B 在多数恶性肿瘤细胞中的高表达已备受关注,被认为是多发性骨髓瘤的最

重要致病信号通路^[22]。在静息状态时,NF- κ B 通常存在于胞质内,当其信号通路激活时 NF- κ B 与 I κ B 发生解离,其 NLS 暴露,与 Importin α/β 结合入核,调控下游基因的表达。因此通过抑制 Importin α/β 途径可阻断其信号通路,有可能成为肿瘤靶向治疗的新策略。

2.5 信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription-3,STAT3)

STAT3 普遍存在于细胞质内,在细胞外信号的刺激下,STAT3 二聚体进入细胞核调节下游靶基因的转录。有文献报道在白血病、多发性骨髓瘤、头颈部鳞状细癌、乳腺癌、前列腺癌等多种肿瘤中 STAT3 均有异常高表达,而降低其在肿瘤细胞中的表达水平,可不同程度的诱导细胞凋亡^[23]。STAT3 的入核依赖于 Importin- α/β -Ran 通路^[24]。因此干扰 STAT3 的入核可有效抑制肿瘤细胞的增殖。

2.6 死亡受体 5(death receptor 5,DR5)

TRAIL/DR5 介导的细胞凋亡途径在诱导肿瘤细胞凋亡方面起重要作用。大部分细胞中的 DR5 主要定位在胞质,包括人类黑色素瘤细胞、非小细胞肺癌等^[25]。但近期 Kojima 等^[26]研究组证实了,在对 TRAIL 不敏感的肿瘤细胞中,DR5 主要定位在胞核内,细胞表面 DR5 的表达则减少,继而抑制了 TRAIL/DR5 介导的细胞凋亡途径。研究显示干扰 Importin β 的表达后可有效抑制 DR5 的入核。目前,重组 TRAIL(dulanermin)和抗-DR5 单克隆抗体(lexatumumab)已应用到恶性肿瘤治疗中。因此抑制 DR5 入核有可能加强重组 TRAIL 和抗-DR5 单克隆抗体的抗肿瘤效应。

3 出入核抑制剂与恶性肿瘤的靶向治疗

目前已报道的出核抑制剂有 Leptomycin B 及其同系物、Ratjadone 同系物、KOS-2464、N-azoly-lacrylate 同系物、戊曲酯、ACA(acetoxychavicol acetate)、FOXO 家族出核抑制剂、CBS9106、KPT-115 和 KPT-127 等。与出核抑制剂相比,入核抑制剂的研究并不多,包括 karyostatin 1A、58H5-6、Importazole、伊维菌素等。下面就一些重要的出入核抑制剂加以阐述。

3.1 经典的出核抑制剂

3.1.1 Leptomycin B

Leptomycin B 是第一个特异性的 CRM1 抑制剂。较低浓度的 Leptomycin B 在短时间内即可诱导白血病 L1210、Lewis 肺癌、肺癌 A-549 等细胞凋亡,并对人结肠癌 HCT-8 移植小鼠有较好的疗效。

因此 1990 年由英国的 Newlands 教授发起了新药 (elactocin) 的 I 期临床试验, 入组了 19 名男性患者和 14 名女性患者, 中位年龄 49 岁, 包括 8 例结肠癌、4 例卵巢癌、4 例黑色素瘤、3 例神经胶质瘤、3 例恶性间叶肿瘤、2 例胰腺癌及其他一些单例的恶性肿瘤。但试验中出现了严重的不良反应, 包括厌食和乏力, 最终并不推荐应用于临床治疗^[27]。近年来美国 Mutka 教授研发了一系列 LMB 衍生物 NEIs (nuclear export inhibitors), 具有 LMB 抑制蛋白出核的作用, 且在小鼠实验中未出现严重不良反应^[28], 进一步证实了出核抑制剂可成为新型的抗肿瘤药物。

3.1.2 CBS9106

CBS9106 可与 CRM1 的活性基团——半胱氨酸 528 结合, 是可逆的 CRM1 抑制剂。可诱导肠癌、乳腺癌、膀胱癌、皮肤癌、肺癌等 60 个不同肿瘤细胞凋亡。在移植小鼠模型的研究中 CBS9106 能明显抑制肿瘤生长及延长生存期, 且不良反应较小^[29]。但 CBS9106 有其局限性, 可因活性基团发生突变以致无法与 CRM1 结合而失效。

3.1.3 KPT-115 和 KPT-127

KPT-115 和 KPT-127 是不可逆的 CRM1 水溶性抑制剂, 经证实可抑制 HIV-Rev-GFP、FOXO、p53 和 Topo II α 的出核^[30]。对 20 种基因表型不同的结肠癌细胞的中位 IC_{50} 约为 300 nM (MTT 检测)^[30], 可诱导血液系人多发性骨髓瘤 (RPMI-8226、U266、NIH-H929) 和白血病 (HL-60、KG-1a) 细胞凋亡, 不仅如此, 在骨髓瘤 NIH-H929 细胞中 KPT-115 和 KPT-127 还显示出与多柔比星有较好的抗肿瘤协同作用, 但具体机制暂不明确。在体内药物毒性检测实验中, KPT-127 连续 5 天皮下给药 (100 mg/kg), 小鼠仅出现轻度的淋巴细胞减少和体重下降^[30]。

3.2 具有抗肿瘤潜力的入核抑制剂

3.2.1 Karyostatin 1A

karyostatin 1A 即 I β 1A, 是经证实的第一个入核抑制剂, 能影响 Importin β 与 Ran GTP 的结合而阻断 Importin α/β 介导的入核。在 HeLa 细胞的 IC_{50} 约为 9 μ M, 当浓度达到 25 μ M 时作用 30 min 后可通过荧光显微镜观察到明显的入核抑制作用^[31-32]。尽管该化合物具有抑制蛋白入核的功能, 可用于进一步研究核质转运机制, 但其结构不完善, 特异性不强。

3.2.2 Importazole

Importazole 即 2,4-二氨基喹啉, 被证实非非洲爪蟾卵提取物和培养细胞中能特异性阻断 Im-

portin β 介导的入核转运, 且不影响其他转运蛋白介导的入核及 CRM1 介导的出核, 作用于 HeLa 细胞的 IC_{50} 约为 22.5 μ M^[33]。在有丝分裂期, Importazole 一方面通过降解 Importin β 释放的敏感元件而改变其与 Ran GTP 的相互作用, 另一方面阻滞了纺锤体的聚集而不影响微管的纯化^[33]。因而 Importazole 可能具有靶向肿瘤治疗的潜力。

3.2.3 伊维菌素

在 HIV-1 及登革热病毒的研究当中, 伊维菌素可分别抑制 HIV-1 整合酶和非结构蛋白 5 (NS5) 的入核, 因而被证实是 Importin α/β 的抑制剂。澳大利亚的 JANS 教授研究组倾向于伊维菌素与转运蛋白的 NLS 竞争性结合 Importin α , 从而降低对 NLS 的识别, 在 Vero 细胞中当伊维菌素的浓度达到 25 μ M 时可明显抑制病毒的复制^[34]。因而伊维菌素有可能在将来成为抗病毒药, 且有潜力应用于恶性肿瘤的靶向治疗。

4 展望

通过抑制转录因子及转录辅助因子的出入核来发挥抗肿瘤作用, 是从一个新的角度探寻恶性肿瘤发生发展的分子机制, 为设计更有效的肿瘤靶向治疗药物提供了崭新的思路。然而迄今为止尚未出现可应用于临床治疗的出入核抑制剂, 我们期望在不远的将来有更多高选择性、低毒性、有效的出入核抑制剂来靶向治疗恶性肿瘤。

参考文献:

- [1] Cohen-Fix O. Cell biology: Import and nuclear size[J]. Nature, 2010, 468(7323):513-6.
- [2] Turner JG, Dawson J, Sullivan DM. Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(8):1021-32.
- [3] Gasiorowski JZ, Dean DA. Mechanisms of nuclear transport and interventions[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55 (6):703-16.
- [4] Antoine M, Reimers K, Wirz W, *et al.* Identification of an unconventional nuclear localization signal in human ribosomal protein S2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335(1): 146-53.
- [5] Lee BJ, Cansizoglu AE, Süel KE, *et al.* Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2[J]. Cell, 2006, 126(3):543-58.
- [6] Kotera I, Sekimoto T, Miyamoto Y, *et al.* Importin alpha transports CaMKIV to the nucleus without utilizing importin beta[J]. EMBO J, 2005, 24(5):942-51.
- [7] Nakielný S, Dreyfuss G. Import and export of the nuclear protein import receptor transportin by a mechanism independent of GTP hydrolysis[J]. Curr Biol, 1998, 8(2):89-95.
- [8] Fagotto F, Gluck U, Gumbiner BM. Nuclear localization signal-

- independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin[J]. *Curr Biol*, 1998, 8(4):181-90.
- [9] Sachdev S, Bagchi S, Zhang DD, *et al.* Nuclear import of IkappaBalpha is accomplished by a ran-independent transport pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(5):1571-82.
- [10] Terry LJ, Shows EB, Wente SR. Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport[J]. *Science*, 2007, 318(5855):1412-6.
- [11] Rosin-Arbesfeld R, Cliffe A, Brabletz T, *et al.* Nuclear export of the APC tumor suppressor controls beta-catenin function in transcription[J]. *EMBO J*, 2003, 22(5):1101-13.
- [12] O'Brate A, Giannakakou P. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code[J]. *Drug Resist Updat*, 2003, 6(6):313-22.
- [13] Rodriguez JA, Henderson BR. Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA1[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(49):38589-96.
- [14] Santos A, Calvet L, Terrier-Lacombe MJ, *et al.* In vivo treatment with CPT-11 leads to differentiation of neuroblastoma xenografts and topoisomerase I alterations[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(9):3223-9.
- [15] Oloumi A, MacPhail SH, Johnston PJ, *et al.* Changes in subcellular distribution of topoisomerase II alpha correlate with etoposide resistance in multicell spheroids and xenograft tumors[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(20):5747-53.
- [16] Vogt PK, Jiang H, Aoki M. Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins[J]. *Cell Cycle*, 2005, 4(7):908-13.
- [17] Aloisi A, Di Gregorio S, Stagno F, *et al.* BCR-ABL nuclear entrapment kills human CML cells: ex vivo study on 35 patients with the combination of imatinib mesylate and leptomycin B[J]. *Blood*, 2006, 107(4):1591-8.
- [18] Diehl MC, Idowu MO, Kimmelshue K, *et al.* Elevated expression of nuclear Hsp90 in invasive breast tumors[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(20):1952-61.
- [19] van der Watt PJ, Maske CP, Hendricks DT, *et al.* The Karyopherin proteins, Crm1 and Karyopherin beta1, are overexpressed in cervical cancer and are critical for cancer cell survival and proliferation[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(8):1829-40.
- [20] Engel R, Valkov NI, Gump JL, *et al.* The cytoplasmic trafficking of DNA topoisomerase IIalpha correlates with etoposide resistance in human myeloma cells[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 295(2):421-31.
- [21] Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, *et al.* Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(10):4395-406.
- [22] Demchenko YN, Kuehl WM. A critical role for the NFkB pathway in multiple myeloma[J]. *Oncotarget*, 2010, 1(1):59-68.
- [23] Rhee YH, Jeong SJ, Lee HJ, *et al.* Inhibition of STAT3 signaling and induction of SHP1 mediate antiangiogenic and anti-tumor activities of ergosterol peroxide in U266 multiple myeloma cells[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12:28.
- [24] Cimica V, Chen HC, Iyer JK, *et al.* Dynamics of the STAT3 transcription factor: nuclear import dependent on Ran and importin-beta1[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5):e20188.
- [25] Leithner K, Stacher E, Wurm R, *et al.* Nuclear and cytoplasmic death receptor 5 as prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy[J]. *Lung Cancer*, 2009, 65(1):98-104.
- [26] Kojima Y, Nakayama M, Nishina T, *et al.* Importin beta1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(50):43383-93.
- [27] Newlands ES, Rustin GJ, Brampton MH. Phase I trial of elacatin[J]. *Br J Cancer*, 1996, 74(4):648-9.
- [28] Mutka SC, Yang WQ, Dong SD, *et al.* Identification of nuclear export inhibitors with potent anticancer activity *in vivo*[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(2):510-7.
- [29] Sakakibara K, Saito N, Sato T, *et al.* CBS9106 is a novel reversible oral CRM1 inhibitor with CRM1 degrading activity[J]. *Blood*, 2011, 118(14):3922-31.
- [30] Draetta GF, Shacham S, Kauffman M, *et al.* Cytotoxicity of novel, small molecule, CRM1-selective inhibitors of nuclear export (SINE) in colorectal cancer (CRC) cells[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29: e14091[Abstract].
- [31] Hintersteiner M, Ambrus G, Bednenko J, *et al.* Identification of a small molecule inhibitor of importin beta mediated nuclear import by confocal on-bead screening of tagged one-bead one-compound libraries[J]. *ACS Chem Biol*, 2010, 5(10):967-79.
- [32] Ambrus G, Whitby LR, Singer EL, *et al.* Small molecule peptidomimetic inhibitors of importin alpha/beta mediated nuclear transport[J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(21):7611-20.
- [33] Soderholm JF, Bird SL, Kalab P, *et al.* Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin-beta[J]. *ACS Chem Biol*, 2011, 6(7):700-8.
- [34] Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, *et al.* Ivermectin is a specific inhibitor of importin alpha/beta-mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus[J]. *Biochem J*, 2012, 443(3):851-6.

[编辑:刘红武;校对:黄国玲]