

核转位在肿瘤发生发展中的研究进展

周杰¹, 黄英辉^{2*}

(陆军军医大学 1. 西南医院 肿瘤科; 2. 预防医学院 复合伤研究所, 重庆 400038)

摘要:核转位是导致基因异常定位的一个重要原因,该现象出现在肿瘤发展的各阶段,并与肿瘤的治疗及耐药密切相关。本文总结核转位通路的基本结构、生物学功能、调控机制,以及在肿瘤发生发展中的作用,旨在为探索新的抗肿瘤策略提供理论依据。

关键词:核转位;分子机制;治疗;研究进展

中图分类号:R730.23 文献标志码:A

Research progress of nuclear-cytoplasmic translocation in the genesis and development of tumor

ZHOU Jie¹, HUANG Ying-hui^{2*}

(1. Department of Oncology, Southwest Hospital; 2. Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Nuclear-cytoplasmic translocation is an important cause of abnormal gene localization, which occurs at various stages of tumor development and is closely related to tumor treatment and drug resistance. In this paper, the basic structure, biological function and regulatory mechanism of nuclear translocation are described, and the role of nuclear-cytoplasmic translocation in the genesis and development of tumors, as well as the progress in tumor therapy and drug resistance are further reviewed, in order to provide theoretical basis for exploring novel anti-tumor strategies.

Key words: nuclear-cytoplasmic translocation; molecular mechanism; therapy; research progress

肿瘤是严重危害人类健康的重大疾病^[1]。中国肿瘤病死率自2006年以来有所降低,但是仍然是中国居民重要的死亡原因,也是最主要的公共健康问题,全球肿瘤发病率和病死率也依然在快速增长^[1]。因此,对于肿瘤的发生发展,依然是值得广大研究者不断去深入探索的一个主题。

肿瘤发生发展是一个多因素参与的过程,这个过程中包括了抑癌基因的失活、癌基因的异常激活、

蛋白表达的空间时间发生紊乱等,而胞核-胞质(nuclear-cytoplasmic translocation,简称“核转位”)转位则在上述过程中扮演了重要的角色,最终导致肿瘤恶性程度高、治疗效果差。因此,核转位近年来也愈发受到广大研究者的关注,如:对核转位进行调控可治疗难治性肺癌;代谢调节酶PFKFB3的核转位异常可促进糖酵解^[2]等。因此,本文对核转位通路的基本结构、生物学功能及其调控机制进行综述,旨在

探索通过调控功能蛋白的核转位而抑制肿瘤,将从一个新的角度探究肿瘤发生发展的分子机制及其干预措施。

1 核转位通路的基本结构

真核细胞的细胞质、细胞核被细胞核膜分隔开。细胞核内的功能蛋白在胞质中合成,经过唯一的通道——核孔复合体(nuclear pore complex, NPC)进入胞核,在细胞增殖、分化、凋亡和基因表达调控等过程中发挥了重要作用^[3]。小分子物质可通过主动扩散在胞核胞质之间移位,而大分子蛋白、复合物等则需要借助于核转位受体介导的主动运输。

1.1 核孔复合体

NPC 又称为核孔蛋白,为具有“分子筛”功能的孔状结构,镶嵌于核膜,故命名为“核孔”。NPC 形状类似于篮球网状结构,内外各有 8 个球状颗粒,核孔中央有一个中心颗粒,中心颗粒的细丝与 16 个球状颗粒相互连接。NPC 分子质量为 125 ku,由 30 余种高度保守的蛋白构成,它能提供靶蛋白与核转位受体的结合位点,使其通过 NPC 入核^[4]。

1.2 核转位信号

核转位信号主要包括入核信号(nuclear localization signal, NLS)和出核信号(nuclear export signal, NES)。二者均为富含碱性氨基酸的肽段,一般不超过 8~10 个氨基酸。NLS 通常分为两类:4~7 个氨基酸构成的短基本序列,以及由两个延伸的基本氨基酸序列组成的较长的二部分序列,该序列由 5~20 个保守性较低的氨基酸隔开^[5]。NES 则大致符合以下序列 Φ -X₂-3- Φ -X₂-3- Φ -X- Φ (Φ =L, I, V, F, M; X 为任意氨基酸)^[6]。靶蛋白需要具备核转位信号才能被核转运受体识别,而携带核转位信号并非一定会发生核转位。核转运信号被覆盖或者被修饰均会导致核转位失败^[2,7]。

1.3 核转运受体

核转运受体 Karyopherin 是一种受体蛋白,与选择性转运密切相关。Karyopherin 家族包括 Karyopherin α 和 Karyopherin β ^[8]。Karyopherin β (Kap β , importin/exportin)亚家族包含超过 20 个成员,发挥入核或出核转运的功能。Karyopherin β 1(Kpn β 1),又叫 Importin β ,是主要的入核转运受体。而 Karyopherin β 亚家族中: CAS、染色质区域维持因子 1

(chromosomal region maintenance 1, CRM1)、exportin-t、MSN5 是目前已证明的参与出核的 4 种转运蛋白。Karyopherin α (Kpn α),又叫 Importin α ,是 NLS 的受体蛋白,其 C 端为 NLS 结合域, N 端为 Karyopherin β 1 结合域。Importin α 与 Importin β 结合后形成 Importin α/β 异源二聚体,再识别货物蛋白的 NLS 形成三聚体^[8]。该三聚体通过 NPC 入核,从而完成经典的核转位过程。

2 核转位通路介导的出入核机制

2.1 浆蛋白入核

胞质-胞核转运通路(图 1)。经典的核输入过程: Karyopherin α/β 1 异源二聚体形成后, Karyopherin α 识别含有 NLS 序列的货物蛋白形成三聚体。该三聚体通过 Karyopherin β 1 结合到 NPC 的胞质面并与 Ran-GDP 结合形成复合体,在转运因子 NTF2 和核孔蛋白等的协助下入核^[9]。胞核内,在鸟苷酸交换因子 RanGEF 的作用下, Ran-GDP 转换为 Ran-GTP 导致三聚体构象改变进而将靶蛋白和 Karyopherin α 释放到胞核。Karyopherin α 再与胞核内其他 Ran-GTP 结合,被出核受体凋亡易感性蛋白(cellular apoptosis susceptibility, CAS)携带出核。剩下 Karyopherin β 1 与 Ran-GTP 的二聚体通过核孔复合体回到细胞质。Ran-GTP 在胞质中水解为 RanGDP,而 CAS 再通过 NPC 入核,如此循环反复^[10]。

2.2 核蛋白出核

在胞核内,出核转运蛋白与含有 NES 的靶蛋白、Ran-GTP 直接结合,形成出核转运蛋白-靶蛋白-RanGTP 三聚体复合物,穿过 NPC 出核。在胞质中, Ran-GTP 活化蛋白(Ran-GTPase activating protein, Ran-GAP)与 Ran 结合蛋白(RanBP1)结合,将 Ran-GTP 去磷酸化成为 Ran-GDP,靶蛋白被释放。出核转运蛋白再经 NPC 再次入核,从而完成靶蛋白的核质转位^[10,12]。CRM1(又叫 XPO1)作为 Karyopherin β 家族中最主要的出核转运蛋白,介导超过 200 个核蛋白出核。更重要的是,它是几类重要的肿瘤相关蛋白唯一的出核转运载体,包括:1)肿瘤抑制蛋白,如 P53、P73、Rb、APC 和 BRCA1 等。2)细胞周期调控蛋白,如: p21、p27 和 Tob。3)免疫反应调节因子,如: NF- κ B 抑制因子, I κ B。4)癌基因,如: BCR-ABL。

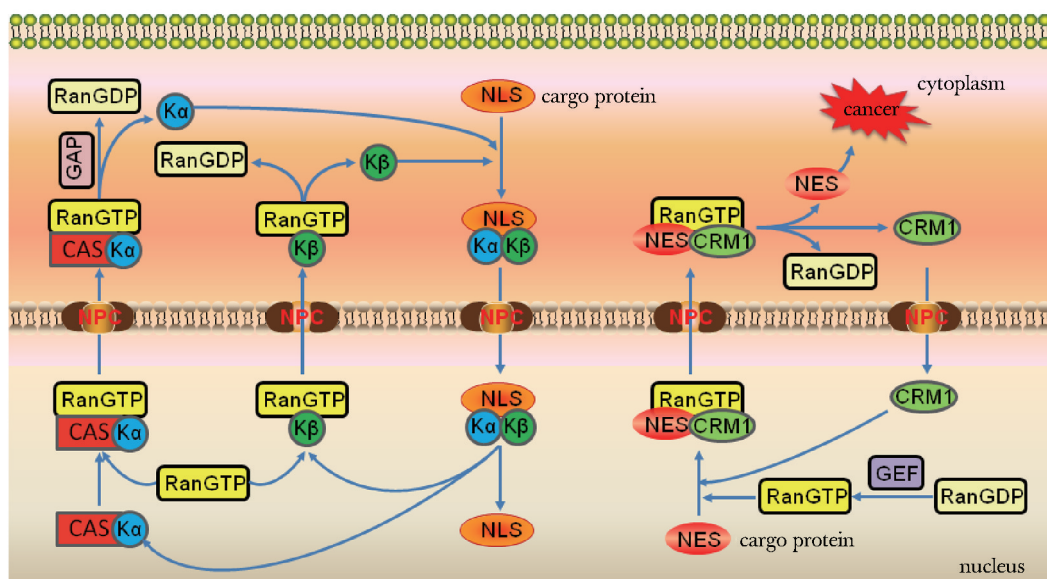
图1 胞核-胞质转运通路示意图^[11]

Fig 1 Schematic diagram of nuclear-cytoplasmic translocation pathway

5) 化疗靶点,如拓扑异构酶 I 和 II^[6]。因此,CRM1 在肿瘤领域引起广泛关注,其与结直肠癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤等肿瘤发生密切相关^[13]。

3 核转位调控

3.1 蛋白出核抑制剂

目前蛋白出核抑制剂研究主要集中于 CRM1, CRM1 抑制剂能结合其 Cys528 残基,进而抑制其识别并结合含有 NES 区的靶蛋白。例如来普霉素 B (Leptomycin B, LMB), 是第一个鉴定出来的 CRM1 特异性抑制剂,可与 CRM1 发生不可逆性结合,进而抑制 CRM1 介导的靶蛋白出核,但是因毒性较大而未能应用于临床患者^[14]。一系列的出核特异性抑制剂(selective inhibitors of nuclear export, SINE), 即 KPT 类水溶性化合物,包括 KPT-127、KPT-185、KPT-214、KPT-251、KPT-276、KPT-330 (Selinexor) 和 KPT-335 (Verdinexor) 等。SINE 能与 CRM1 的活性氨基酸 Cys528 发生加成反应,从而抑制 CRM1 介导的靶蛋白出核^[13]。

3.2 蛋白入核抑制剂

Karyopherin β 在多种肿瘤中高表达,而抑制其表达能显著诱导肿瘤细胞死亡;2016 年 Karyopherin β 的特异性抑制剂 INI-43 [3-(1H-benzimidazol-2-yl)-1-(3-dimethylaminopropyl)] 被成功研发,通过抑制蛋白入核而发挥抗肿瘤效应^[15]。芬维 A 胺

[N-(4-hydroxyphenyl) retinamide, 4-HPR] 能显著抑制多种肿瘤,而且具有较小的副作用,因此备受研究人员青睐。目前,4-HPR 作为抗肿瘤药物已在多种肿瘤中开展 I~II 期临床实验,包括小细胞肺癌、前列腺癌、卵巢癌和恶性脑胶质瘤等^[16]。

3.3 靶蛋白修饰

核转位对细胞生命活动的调节具有重要作用,因此其转位调控逐渐受到重视。近期研究主要集中在:对靶蛋白 NLS 区、NES 区修饰,包括靶蛋白的磷酸化、甲基化、乙酰化和泛素化等,使靶蛋白滞留于胞质或胞核。例如:PFKFB3 的乙酰化使其在胞质中蓄积,进而促进糖酵解,导致铂耐药^[2]。Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)在多种肿瘤中高表达。YAP 入核后能激活转录因子 TEAD,促使下游癌基因转录和翻译,进而发挥促癌效应。Hippo 信号通路能磷酸化 YAP,使其滞留于胞质而抑制其活性,因而能够抑制肿瘤细胞增殖、促进细胞凋亡^[17]。

3.4 Ran 的表达调控

Ran (a small nuclear GTP-binding protein) 是 Ras 家族中的一员,是存在于真核细胞内的小分子 GTP 酶。货物蛋白的核质运输离不开 Ran 的协助。Ran 在 Ran-GTP 和 Ran-GDP 两种构像之间改变。在胞核内 Ran-GTP 可以促使入核的靶蛋白从入核聚合物上解离下来,同时促进出核复合物形成。在胞质

中 Ran-GTP 则是被水解为 Ran-GDP。因而 Ran-GTP 存在胞核内浓度高浆内浓度低的分布特点,这种浓度的差异使核质转运更具方向性。倘若 Ran 表达发生改变,势必影响靶蛋白正常功能的发挥。

3.5 蛋白相互作用

调节蛋白的核质分布,除了通过直接调节出入核转运受体外,还可以通过与稳定存在于胞质或胞核蛋白的相互作用实现^[18]。一个含有 NLS 的蛋白,不能正常的通过核转运的方式进入胞核。其中一个重要的原因在于其与稳定表达于胞质的蛋白紧密结合,这种结合将其 NLS 入核序列遮盖。同样,一个含有 NES 出核转运序列的蛋白滞留于胞核,也可能是由于与其他稳定表达于胞核的相互作用导致其出核障碍。例如:核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B),主要在胞核内发挥作用,然而,当它在胞质内与 I κ -B 结合时,NF- κ B 的 NLS 序列就会被遮盖,导致其不能入核,进而起到抑制肿瘤的作用^[18]。

4 核转位与肿瘤

4.1 核转位与肿瘤的发生

肿瘤是一个基因的疾病,其发生的过程就是基因调控紊乱的过程,各种抑癌基因“不在其位而不谋其政”促使或加速了该过程的发生。其中比较经典的当属抑癌基因 P53 的出核转运了,该蛋白主要在胞核内通过转录调控来实现抑癌作用,而其出核转位直接影响了抑癌作用的发挥^[19]。近年来,随着科学家们对核转位现象认识的逐渐加深,越来越多的核转位现象被发现,越来越多的肿瘤形成原因被揭露。值得注意的是,一些非癌基因或抑癌基因的蛋白,由于核转位的发生,产生了新的功能作用,并在肿瘤的发生发展中起到了巨大的推动作用。例如,在 DNA 损伤压力下,胞质 DNA 识别受体环鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)可以发生入核转运,并在核内通过抑制细胞的同源重组(homologous recombination, HR)修复使得基因组不稳定性增加,进而促进肿瘤的发生^[20]。因此,在对肿瘤发生发展的认识上,不应该仅仅局限于基因的突变及蛋白量的改变上,充分意识到核转位的作用可以使人们对肿瘤的发生发展认识更加全面。

4.2 核转位与肿瘤的治疗

基因的核转位现象不仅在肿瘤的发生发展上占

有举足轻重的地位,针对于该现象的研究在肿瘤治疗上也取得了令人振奋的成果。而目前针对于核质转位的治疗主要集中在以 CRM1 为代表的核转运蛋白上。例如,CRM1 的抑制剂 selinexor 在治疗血液肿瘤上就取得了突破性进展^[13],该抑制剂不仅于 2019 年 7 月 3 日被美国食品和药物管理局(FDA)批准上市,更是被写进了 NCCN 指南。另外,在实体瘤的治疗上,核转运蛋白抑制剂也开始展露锋芒。对于 Kras 基因突变的肺癌,一直以来都是无药可靶向。而研究者却发现抑制 XPO1 的 selinexor 会杀死依赖于 Kras 基因的肺癌细胞,这项发现可能会为难治性肺癌打开新世界的大门^[21]。当然,关于 Selinexor 的研究不仅仅限于血液肿瘤和肺癌,目前相关的临床试验已在妇科肿瘤、脑癌、前列腺癌和头颈癌等肿瘤中开展。相信在不久的将来,核转运蛋白抑制剂会为肿瘤的治疗史揭开新的篇章。

4.3 核转位与肿瘤的耐药

肿瘤的耐药是肿瘤的治疗过程中面临的一个巨大的挑战,而肿瘤耐药的发生也伴随了各种蛋白核转位现象的发生。包括代谢相关蛋白的核转位^[2]、氧化还原相关蛋白核转位^[22]等,这些蛋白或基因的异常核质定位从多个角度影响了化疗药物的敏感性。更加值得注意的是,核转位现象不仅发生在化疗药耐药,同样与靶向治疗的耐药也息息相关。例如,核蛋白激酶 C δ (PKC δ)作为多个已知 TKI 抗性机制共同轴,其核定位是 TKI 耐药必须的,而 TKI 灭活的 EGFR 与涉及 TKI 抗性的其他膜受体二聚化可促进 PKC δ 核转位,进而促使 TKI 耐药的发生^[23]。可以说核转位现象已经渗入到肿瘤耐药机制的方方面面。

5 问题与展望

肿瘤是基因的疾病,核转位是基因异常表达的重要原因。目前针对基因的研究中,靶向基因的突变和过表达的药已经使肿瘤治疗得到了质的飞跃。而核转位作为肿瘤中更为普遍的现象,发生在肿瘤的各阶段,并参与各种生物学行为,与肿瘤的治疗和耐药息息相关。因此,靶向核转位的治疗存在着巨大的潜力,未来必将在肿瘤的治疗史上留下浓墨重彩的一笔。然而,核转位通路参与因素众多、调控因子复杂,各因素间相互协同、制约,很难做到精准靶

向。目前针对于核转运蛋白的抑制剂虽然能改变蛋白的核质定位,但无法做到某一蛋白定位的精准改变,这就造成了副作用大等弊端。但是,随着对核质

转位研究的不断深入,以及基因技术的不断成熟,高效性、特异性和低毒性的核转位抑制剂有望成为恶性肿瘤的治疗靶点。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018,68:7-30.
- [2] Li FL, Liu JP, Bao RX, *et al.* Acetylation accumulates PFKFB3 in cytoplasm to promote glycolysis and protects cells from cisplatin-induced apoptosis[J]. *Nat Commun*, 2018,9:508. doi:10.1038/s41467-018-02950-5.
- [3] Lin DH, Correia AR, Cai SW, *et al.* Structural and functional analysis of mRNA export regulation by the nuclear pore complex[J]. *Nat Commun*, 2018,9:2319. doi:10.1038/s41467-018-04459-3.
- [4] Bui KH, von Appen A, DiGuilio AL, *et al.* Integrated structural analysis of the human nuclear pore complex scaffold[J]. *Cell*, 2013,155:1233-1243.
- [5] Zhou M, Liu H, Xu X, *et al.* Identification of nuclear localization signal that governs nuclear import of BRD7 and its essential roles in inhibiting cell cycle progression[J]. *J Cell Biochem*, 2006,98:920-930.
- [6] Xu D, Grishin NV, Chook YM. NESdb: a database of NES-containing CRM1 cargoes[J]. *Mol Biol Cell*, 2012,23:3673-3676.
- [7] Tavolieri MV, Droppelmann CA, Campos-Melo D, *et al.* A novel overlapping NLS/NES region within the PH domain of Rho guanine nucleotide exchange factor (RGEF) regulates its nuclear-cytoplasmic localization[J]. *Eur J Cell Biol*, 2019,98:27-35.
- [8] Chook YM, Blobel G. Karyopherins and nuclear import [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2001,11:703-715.
- [9] Kapinos LE, Huang B, Rencurel C, *et al.* Karyopherins regulate nuclear pore complex barrier and transport function[J]. *J Cell Biol*, 2017,216:3609-3624.
- [10] Barbato S, Kapinos LE, Rencurel C, *et al.* Karyopherin enrichment at the nuclear pore complex attenuates Ran permeability[J]. *J Cell Sci*, 2020,133. doi:10.1242/jcs.238121.
- [11] Kau TR, Way JC, Silver PA. Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004,4:106-117.
- [12] Plafker K, Macara IG. Facilitated nucleocytoplasmic shuttling of the Ran binding protein RanBP1[J]. *Mol Cell Biol*, 2000,20:3510-3521.
- [13] Gandhi UH, Senapedis W, Baloglu E, *et al.* Clinical implications of targeting XPO1-mediated nuclear export in multiple myeloma [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2018,18:335-345.
- [14] Rahmani K, Dean DA. Leptomycin B alters the subcellular distribution of CRM1 (Exportin 1) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017,488:253-258.
- [15] Stelma T, Leaner VD. KPNB1-mediated nuclear import is required for motility and inflammatory transcription factor activity in cervical cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017,8:32833-32847.
- [16] Cooper JP, Reynolds CP, Cho H, *et al.* Clinical development of fenretinide as an antineoplastic drug: pharmacology perspectives[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017,242:1178-1184.
- [17] Sorrentino G, Ruggeri N, Specchia V, *et al.* Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway[J]. *Nat Cell Biol*, 2014,16:357-366.
- [18] Cyert MS. Regulation of nuclear localization during Signaling[J]. *J Biol Chem*, 276:20805-20808.
- [19] de Polo A, Luo Z, Gerarduzzi C, *et al.* AXL receptor signalling suppresses p53 in melanoma through stabilization of the MDMX-MDM2 complex[J]. *J Mol Cell Biol*, 2017,9:154-165.
- [20] Liu H, Zhang H, Wu X, *et al.* Nuclear cGAS suppresses DNA repair and promotes tumorigenesis [J]. *Nature*, 2018,563:131-136.
- [21] Kim J, McMillan E, Kim HS, *et al.* XPO1-dependent nuclear export is a druggable vulnerability in kras-mutant lung cancer[J]. *Nature*, 2016,538:114-117.
- [22] Wang J, Lu Q, Cai J, *et al.* Nestin regulates cellular redox homeostasis in lung cancer through the keap1-nrf2 feedback loop[J]. *Nat Commun*, 2019,10:5043. doi:10.1038/s41467-019-12925-9.
- [23] Lee PC, Fang YF, Yamaguchi H, *et al.* Targeting PKC δ as a therapeutic strategy against heterogeneous mechanisms of EGFR inhibitor resistance in EGFR-mutant lung cancer [J]. *Cancer Cell*, 2018,34:954-969.