

# 蛋白质核质转运的过程和应用

但德苗 郭忠建\*

(江苏大学, 生命科学研究院, 镇江 212000)

**摘要** 真核生物区别于原核生物的特征之一是存在被核膜包被的细胞核。核膜是一种磷脂双分子膜, 由内膜和外膜组成, 对蛋白质转运具有高度的选择性。核膜上嵌有核孔复合体, 其是完成细胞核内外蛋白质转运所必需的。除此之外, 该过程还需转运受体蛋白、Ran系统以及货物蛋白自身的结构协同参与完成。该文着重就真核生物蛋白质核质转运的机制及近年来转运受体蛋白在肿瘤治疗中的临床应用进行综述。

**关键词** 核孔复合体; 转运受体蛋白; NLS/NES; Ran系统; 肿瘤

## The Process and Application of Nucleocytoplasmic Transport of Proteins

DAN Demiao, GUO Zhongjian\*

(Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China)

**Abstract** One of the characteristics that distinguish eukaryotes from prokaryotes is the presence of the nuclei. The NE (nuclear envelope) is a phospholipid bimolecular membrane, including inner membrane and outer membrane. The NPC (nuclear pore complex) embedded in the NE is necessary for the process of transportation of some proteins through the NE. In addition, the process also requires the coordination of the transport receptor protein, the Ran system, and the structure of cargo protein. This article focuses on the process and mechanism of eukaryotic nucleocytoplasmic transport and the clinical application of transport receptor proteins in tumor therapy in recent years.

**Keywords** nuclear pore complex; transport receptor protein; nuclear localization signal/nuclear export signal; Ran system; tumor

核孔复合体是连接细胞质与细胞核之间物质运输的选择性通道, 控制蛋白质、核酸和其他分子在胞核之间的运输。其中相关功能蛋白的核质转运在细胞增殖、分化、凋亡和信号传递中发挥着重要作用。目前, 已在不同类型的肿瘤细胞中发现了转运受体蛋白的异常表达, 这使其成为了一个有潜力的肿瘤治疗靶点。本文着重对核质转运的过程及转运蛋白作为肿瘤治疗靶点的相关进展进行综述。

输在基因调控、信号转导、细胞周期等多种生命活动进程中发挥着重要作用。而蛋白质的核质转运是通过一种复杂的结构即核孔复合体(nuclear pore complex, NPC)介导的。NPC是一种嵌入细胞核双层膜的大分子结构, 含有一个直径约为9 nm的中央运输通道。该通道允许离子、小分子和小于40 kDa的部分蛋白质通过被动运输以进行自由扩散, 而直径大于6 nm的分子(相当于50 kDa的蛋白质)则需要依附特殊的载体蛋白才能扩散<sup>[1]</sup>。

### 1 核孔复合体概述

在真核细胞中, 细胞核与细胞质之间的物质运

冷冻电子断层扫描(cryo-electron tomography, cryo-ET)将NPC分为环绕中央运输通道的三个环, 即

收稿日期: 2020-04-06

接受日期: 2021-05-25

国家自然科学基金(批准号: 31370184、31770174)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13951287662, E-mail: gzh762677@ujs.edu.cn

Received: April 6, 2021

Accepted: May 25, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31370184, 31770174)

\*Corresponding author. Tel: +86-13951287662, E-mail: gzh762677@ujs.edu.cn

核质环、胞质环以及连接二者的内环组成。胞质环上附有胞质纤丝,核质环上附有核质纤丝,它们在内环末端底部形成一个笼状结构,我们称之为核篮<sup>[2]</sup>。

NPC由大约30种不同的核孔蛋白质(nuclear pore protein, NUP)组成。通常,这些核孔蛋白按照结构功能可分为以下三类。(1)跨膜NUP:跨膜NUP蛋白均含有跨膜 $\alpha$ 螺旋,跨膜 $\alpha$ 螺旋可以将NPC固定在核膜上,在稳定核内膜与外膜之间的相互作用中起到重要作用<sup>[3]</sup>。(2)结构性支架NUP(scaffold NUP):主要包含FG重复序列和卷曲螺旋结构域,这些FG重复序列为核转运受体提供了结合位点,并在其中发挥了结构性的作用,大大增强了NPC的稳定性<sup>[4]</sup>。(3)FG-NUP:具有重复一致的FXFG和/或GLFG,大多数FG-NUP位于中央转运通道内,参与构成与转运受体家族相互作用的通透性屏障,且与转运蛋白-货物复合物特异性结合,从而促进扩散屏障的选择性快速通过,进而完成核质运输<sup>[5]</sup>。

在真核细胞中,NPC完成跨膜转运通常需要三类运输因子,分别是转运受体蛋白(karyoperins)、货物蛋白中的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)/核输出信号(nuclear export signal, NES)和RanGTPase系统。核转运受体蛋白可直接或间接结合货物蛋白上的NLS/NES位点,当核质间存在RanGTP浓度差异时,方可启动货物蛋白的核质穿梭。

## 2 Importin- $\beta$ 1途径介导的核输入

Karyoperins可以直接与NPC相互作用,并在细胞核和细胞质之间穿梭,目前在人类中已经报道的转运受体蛋白约为20种<sup>[6]</sup>。这些蛋白质的分子量为50~90 kDa和等电点 $pI$ 为4.0~5.0,且均含有螺旋HEAT重复序列,依据转运底物的运输方向不同可分为核输入蛋白(importin)、核输出蛋白(exportsin)和双向转运受体蛋白。人类中共有10种参与货物蛋白进口的核转运受体蛋白(importin- $\beta$ 1、importin- $\beta$ 2、importin-4、importin-5、importin-7、importin-8、importin-9、importin-11、transportin-SR1、transportin-SR2)、7种核转运蛋白(CRM1/exportsin-1, CAS/exportsin-2、exportsin-5、exportsin-6、exportsin-7、exportsin-t和RanBP17)参与货物蛋白的出口运输和2种转运受体蛋白(importin-13、exportsin-4)参与货物蛋白的双向运输(表1)。

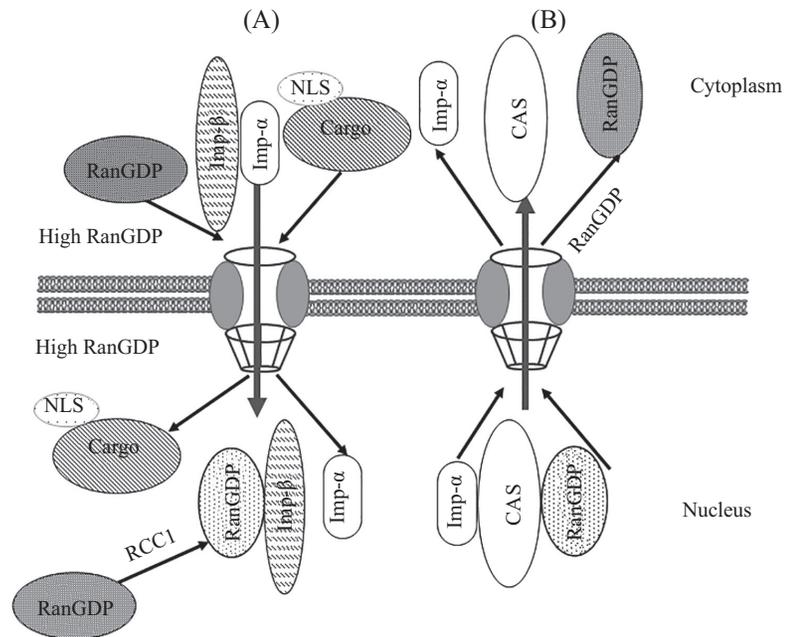
Importin中研究得最为广泛的是importin- $\beta$ 1及其转运相关衔接因子importin- $\alpha$ 。Importin- $\beta$ 1通常不直接与货物蛋白作用而是通过识别被称作importin- $\alpha$ 的衔接因子才能识别经典的NLS序列<sup>[7]</sup>。其中importin- $\alpha$ 主要由N-端富含碱性氨基酸(尤其是精氨酸)的IBB(importin- $\beta$ -binding)结构域、C-端疏水区域及以及包含10个ARM重复序列的中央NLS结合区域组成<sup>[8-10]</sup>。经典的NLS(classical NLS, cNLS)包含可以被importin- $\alpha$ 识别的单分型或双分型信号。典型的单分型NLS最初被发现于SV40的大T抗原,是一段富有正电荷的氨基酸短肽,序列为PKKKRKV。二分型NLS最早是在非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)表达的核浆素(nucleoplasmin)中发现的,其序列为KRPAATK-KAGQAKKK<sup>[11]</sup>。现已证明,单分型cNLS通常是包含4~8个氨基酸的短肽,且含有丰富的带正电荷的Lys和Arg<sup>[12]</sup>;二分型NLS的N-端为一小段碱性氨基酸簇,中间为一段含10~12个非保守氨基酸的间隔序列(spacer),C-端为一段稍长的碱性氨基酸簇<sup>[13]</sup>。

在cNLS依赖的importin- $\beta$ 1核输入途径中,含cNLS的货物蛋白与importin- $\alpha$ 结合,importin- $\alpha$ 通过N-端的IBB结构域与importin- $\beta$ 1相结合,形成货物蛋白-importin- $\alpha$ -importin- $\beta$ 1三元复合物,从而被importin- $\beta$ 1靶向运输至NPC,并定位于核膜<sup>[14]</sup>。Importin- $\beta$ 1与核孔蛋白相互作用,通过NPC介导三元复合物易位进入细胞核。在细胞核中,importin- $\beta$ 1与高浓度的RanGTP结合,并发生结构改变促使复合物解离,货物蛋白和importin- $\alpha$ 被释放从而进入细胞核中,而与RanGTP结合的importin- $\beta$ 1可再次通过NPC被转运回细胞质(图1A)。

对转运到细胞核中的importin- $\alpha$ ,由于没有与importin- $\beta$ 1结合,因此,其IBB结构域可竞争性抑制cNLS与importin- $\alpha$ 的结合,使得importin- $\alpha$ 对货物蛋白NLS的亲合力下降,导致货物蛋白与importin- $\alpha$ 解离。由于importin- $\alpha$ 不能通过NPC发生自我易位,因此必须结合一个特定的出口受体CAS<sup>[15]</sup>,在RanGTP的协同作用下,CAS对importin- $\alpha$ 的亲合力大大增强,形成importin- $\alpha$ /CAS/RanGTP复合体,并通过NPC中央通道转运到细胞质。在细胞质中RanGAP1的作用下,importin- $\alpha$ /CAS/RanGTP复合物中RanGTP发生水解,导致importin- $\alpha$ /CAS/RanGTP复合物解离<sup>[16]</sup>。解离后的CAS自行返回细胞核,而importin- $\alpha$ 将与importin- $\beta$ 1、货物蛋白形成一个新的

表1 脊椎动物的核转运蛋白家族  
Table 1 Karyopherin family of vertebrates

| 脊椎动物转运受体蛋白<br>Vertebrate karyopherin | 货物蛋白<br>Cargo  | 功能<br>Function   |
|--------------------------------------|--|------------------|
| Importin-β1/Kapβ1                    | Ribosomal proteins <sup>[17]</sup> , viral proteins <sup>[18]</sup> , HIV Rev and Tat <sup>[19]</sup> , Smad proteins <sup>[20]</sup> , HTLV Rex <sup>[21]</sup> | Import           |
| Kapβ2/transportin-1                  | hnRNPA1 <sup>[22]</sup> , mRNA-binding proteins <sup>[23]</sup> , ribosomal proteins <sup>[17]</sup>   | Import           |
| Importin-5/Kapβ3                     | Ribosomal proteins <sup>[17]</sup> , histones <sup>[23]</sup>  | Import           |
| Importin-4                           | HIF1-α <sup>[24]</sup> , rPS3a <sup>[25]</sup> , TP2 <sup>[26]</sup> , VDR <sup>[27]</sup>   | Import           |
| Importin-7                           | Smad3 <sup>[20]</sup> , ribosomal proteins <sup>[17]</sup> , histone H1 <sup>[25]</sup>  | Import           |
| Importin-8                           | Signal recognition particle (SRP19) <sup>[28]</sup> , Smad4 <sup>[29]</sup>  | Import           |
| Importin-9                           | Histones <sup>[23]</sup> , ribosomal proteins <sup>[17]</sup>  | Import           |
| Importin-11                          | UbcM2, UbcH6, UBE2E2 <sup>[30]</sup> , rpL12 <sup>[31]</sup>   | Import           |
| Transportin-SR1                      | SR proteins <sup>[32]</sup>  | Import           |
| Transportin-SR2                      | SR proteins <sup>[32]</sup>  | Import           |
| Importin-13                          | UBC9 <sup>[33]</sup> , Y14 <sup>[34]</sup><br>eIF1A <sup>[35]</sup>  | Import<br>Export |
| CRM1/exportin-1                      | Proteins with leucine-rich NES sequences <sup>[36]</sup> , Snurportin 1, rRNA  | Export           |
| Exportin-t/Xpo-t                     | tRNAs <sup>[37]</sup>  | Export           |
| CAS/exportin-2                       | Importin-α family <sup>[15]</sup>  | Export           |
| Exportin-4                           | eIF5A <sup>[38]</sup> , Smad3 <sup>[39]</sup><br>Sox-2 <sup>[40]</sup> , SRY <sup>[40]</sup>   | Import<br>Export |
| Exportin-5                           | pre-miRNA <sup>[41]</sup>  | Export           |
| Exportin-6                           | profilin-actin <sup>[42]</sup>   | Export           |
| Exportin-7/RanBP16                   | p50Rho-GAP <sup>[43]</sup>   | Export           |
| RanBP17                              | Unclear  | Export           |
| RanBP6                               | Unclear  | Unclear          |



A: importin-β1介导的NLS货物的核输入; B: CAS介导的importin-α回收的核输出途径。Imp-α: importin-α; Imp-β1: importin-β1。  
A: importin-β1 mediated nuclear import of NLS cargo; B: CAS-mediated nuclear export of importin-α recovery. Imp-α: importin-α; Imp-β1: importin-β1.

图1 Importin-β1途径介导的核质转运

Fig.1 Nuclear cytoplasmic transport mediated by the importin-β1 pathway

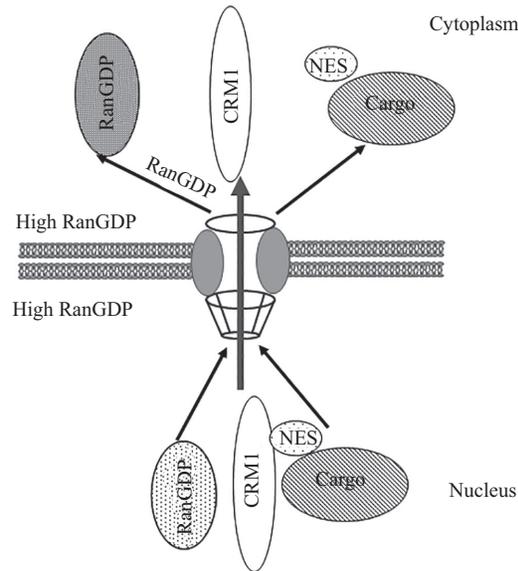


图2 CRM1途径介导NES货物的核输出

Fig.2 Nuclear export of NES cargo mediated by CRM1

三元复合物,开始下一次入核转运(图1B)。

### 3 CRM1途径介导的核输出

Exportin识别特定的NES序列。常见的NES为一段富含亮氨酸的疏水氨基酸序列,其共有基序为 $\Phi$ -X<sub>2-3</sub>- $\Phi$ -X<sub>2-3</sub>- $\Phi$ -X- $\Phi$ ( $\Phi$ 代表疏水性残基L、I、F、M或V;X为任何氨基酸)。已有研究表明,染色体区域维持蛋白1(chromosome region maintenance protein 1, CRM1)又名exportin1或XPO1,是哺乳动物主要的出口蛋白<sup>[36]</sup>。在具有较高浓度RanGTP的细胞核内,CRM1可识别并结合货物蛋白的NES位点,形成CRM1-Cargo-RanGTP三元复合物并特异性结合NPC的对接位点,从而穿过核孔进入细胞质中。在细胞质中,CRM1-Cargo-RanGTP复合物在RanGAP1和胞质Ran结合蛋白RanBP1的协同作用下,CRM1-Cargo-RanGTP复合物中的RanGTP被水解,导致复合物解离,货物蛋白被释放并进入细胞质中(图2)。研究还发现,CRM1介导的核输出受到RanBP3的调控。RanBP3可以增加CRM1与RanGTP的亲合力从而增加细胞核中CRM1-Cargo-RanGTP三元复合物的稳定性,提高货物蛋白的核输出速度。在不存在RanGTP和货物蛋白的情况下,RanBP3还可以抑制CRM1与NPC的相互作用,从而避免了无效转运的发生。RanBP3还可调控CRM1对底物的选择,如RanBP3的存在增强了CRM1对HIV-1 Rev NES的亲合力,而降低了对Snurportin 1的亲合力<sup>[44]</sup>。

### 4 Ran系统

迄今为止真核细胞中几乎所有的核质运输过程都依赖于RanGTPase。Ran是一种Ras相关的GTPase,是蛋白质和RNA跨NPC运输所必需的,同时对mRNA加工、维持细胞核结构完整性和细胞周期调控具有至关重要的作用。与GTPase超家族的其他成员一样,Ran可在GTP和GDP结合状态之间切换,充当控制核质运输的开关。Ran的主要核苷酸交换因子(nucleotide exchange factor, RanGEF)是RCC1(guanine nucleotide exchange factor)。它是一种与染色质结合的核蛋白,通过稳定Ran的无核苷酸形式,促进Ran结合核苷酸(GTP或GDP)以及随后的核苷酸结合状态的切换,因此可在细胞核内产生高浓度的RanGTP<sup>[45]</sup>。Ran自身的GTPase活性较低,在必须发生RanGTP水解的细胞质中,GTPase活化蛋白RanGAP1的存在促进了RanGTP的水解。研究发现,importin/exportin与RanGTP的结合会抑制RanGAP1激活的RanGTP的水解,抑制作用的发生是由importin/exportin与RanGAP1竞争性结合Ran结合位点导致的。而定位于细胞质中的RanBP1可以与RanGTP和importin形成三元复合物,使得RanGTP/importin复合物解离,解离后的RanGTP可在RanGAP1作用下水解<sup>[46]</sup>。综上,RCC1、RanBP1和RanGAP1的不对称分布使得RanGTP在核膜内外存在由高到低的浓度梯度<sup>[47]</sup>,正是这种RanGTP浓度梯度促进了核质转运。

Exportin与importin- $\alpha$ /CAS复合物的核输出导

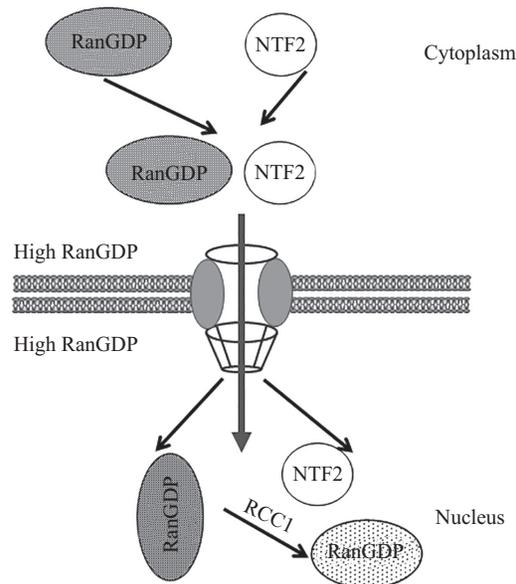


图3 NTF2介导的RanGDP的核输入

Fig.3 Nuclear import of RanGDP mediated by NTF2

致核内RanGTP不断进入细胞质中,为了维持核质转运的Ran平衡,则必须将RanGTP循环回细胞核内,该过程是通过核转运因子(nuclear transport factor, NTF2)介导的<sup>[48]</sup>。NTF2是一种胞质蛋白,最初被认为是促进含有NLS的货物蛋白进行核输入所必需的,进一步研究发现其可直接与富含FxFG的核孔蛋白结合,从而介导Ran的易位<sup>[49]</sup>。在该转运过程中,NTF2可以与RanGDP特异性结合,使得NTF2对NPC核孔蛋白组分的亲和力显著提高,从而介导NTF2-RanGDP复合物易位进入细胞核。在细胞核内,RanGDP在RCC1的作用下转化成RanGTP,导致NTF2与RanGTP解离。而NTF2与RanGTP无亲和力故而在细胞核中解离,由于NTF2是一种小分子量二聚体蛋白(28 kDa),故可自由通过NPC中央运输通道返回细胞质中进行下一轮RanGDP的核转运<sup>[50]</sup>(图3)。

## 5 肿瘤中转运受体蛋白的失调

在正常细胞中,各种蛋白与因子呈现核-质之间的动态平衡分布。这种平衡关系是exportin介导的核输出与importin介导的核输入共同作用的结果。但是在肿瘤细胞中,这些转运受体蛋白表达失调,导致了异常核-质分布,从而使细胞出现异常的细胞增殖与凋亡失活。对转运受体蛋白的研究为癌症的治疗提供了新思路。

多项研究报道发现,转运受体蛋白在多种肿瘤细胞中高表达进而导致蛋白质转运失调,其中包括

黑色素瘤、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、前列腺癌、食道癌、肺癌和淋巴瘤等。在这些转运受体家族成员中,importin-β1、KPNA2、CRM1、CAS是在肿瘤细胞中最常见的过表达蛋白。这些转运受体蛋白表达的上调与核质转运效率的提高有关,即转运受体蛋白表达上调可能促进了具有致癌功能的蛋白质表达量的增加,从而满足了肿瘤细胞的增殖、代谢需求<sup>[51]</sup>。随着越来越多的转运受体蛋白被发现与肿瘤的发生发展有关,其过表达的发生机制也进一步被阐明。已有研究表明,importin-β1和KPNA2在肿瘤中的过表达主要是由肿瘤细胞中E2F活性失调导致的,并最终影响肿瘤表型<sup>[52]</sup>。HENNA等<sup>[106]</sup>发现,importin-β1的过表达是importin-α/importin-β1依赖性核转运活性增加的关键因素,同时importin-β1的表达水平会随着肿瘤发展状态变化而变化。KPNA2的过表达除了与E2F活性失调有关,在卵巢癌中,microRNA-26b的表达水平降低同样会导致KPNA2表达水平升高<sup>[53]</sup>。在肿瘤细胞中常见到的高水平表达转运受体是CRM1,研究表明该蛋白参与p53的核输出<sup>[54-55]</sup>。在DNA损伤条件下,p53表达量增加并进入细胞核从而抑制CRM1的表达,因而p53缺陷可能会导致CRM1的过表达<sup>[54]</sup>。CAS作为核转运蛋白家族的一员,参与了将importin-α衔接因子转运回细胞质中等生理过程。目前已发现CAS在包括膀胱癌、白血病、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌和非霍奇金淋巴瘤在内的肿瘤细胞中过表达。

WINKLER等<sup>[55]</sup>发现,在肝癌细胞中p53的表达可抑制CAS和KPNA2的转录,即p53的缺失会导致CAS的过表达。

## 6 转运受体蛋白在肿瘤诊断中的临床意义

肿瘤诊断的及时性是影响患者预后水平的主要因素,寻找理想的肿瘤标记物是提高肿瘤诊断水平所必需的。目前的研究已证明转运受体蛋白在肿瘤细胞中高水平表达,因此这些转运受体蛋白可被作为一种潜在的肿瘤诊断标志物。其中KPNA2可作为一种肿瘤诊断标志物,人们已经在肺癌细胞、卵巢癌、食道鳞状细胞癌和结直肠癌等肿瘤细胞中均检测到其分泌,并且其分泌水平相对于正常人明显更高,因而将KPNA2作为肿瘤细胞早期诊断标志物。目前已证实转运受体蛋白CAS具有膀胱癌和转移性结直肠癌的诊断潜力<sup>[56-57]</sup>。其中,CAS在膀胱癌肿瘤细胞中高表达,相比于健康人群在患者的尿液中可检测到CAS阳性的表达。此外,在转移性结直肠癌患者的血清中也可检测到高表达的CAS。在非小细胞肺癌中,importin- $\beta$ 1作为PD-L1的核质穿梭转运受体,可介导PD-L1通过Gas6/MerTK信号通路促进癌细胞的增殖<sup>[115]</sup>;而在大肠癌中,importin- $\beta$ 1的表达水平随着病理分期等级的增加而逐渐升高,可见importin- $\beta$ 1也可作为潜在的生物标志物和大肠癌生物治疗靶点。

在肿瘤手术干预治疗后,某些恶性肿瘤的复发率仍旧较高,因此对这些患者的术后反应进行复发预测十分重要。在2006年,EDGAR等<sup>[121]</sup>第一次将KPNA2鉴定为一种乳腺癌预后标志物,而后KPNA2逐渐被发现与多种癌症的预后不良反应相关,可作为包括大肠癌、前列腺癌和肝细胞癌在内等术后生存率的预测指标。有研究表明,KPNA2的表达与肿瘤的分期等级有关,SOTIROU等<sup>[58]</sup>已将KPNA2归类为与乳腺癌基因表达等级指数相关的基因之一。研究表明在早期病变中发现KPNA2的表达,因此例如在乳腺癌和非肌肉浸润性膀胱癌(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)中,已将KPNA2作为保守治疗NMIBC的进展标志物,并且其可作为接受根治性膀胱切除术的浸润性BC患者的预后标志物<sup>[59]</sup>,这些发现为肿瘤的早期预后诊断提供了依据。KPNA2的高表达除了降低患者的存活率外,还增加了前列腺癌、卵巢癌的复发风险以及促进了膀胱癌

的发展进程。由此可见,KPNA2在肿瘤的早期发生、转移以及影响个体生存的整个肿瘤发展过程中都是具有研究价值的预后标志。

## 7 转运受体蛋白的临床应用

在肿瘤细胞中,转运受体蛋白表达的上调及其与预后不良反应的关联都表明了其具有作为肿瘤治疗靶标的潜力。迄今为止,在转运受体蛋白家族成员中,CRM1的靶向抑制剂是临床试验中研究得最为成功的化学治疗靶标(表2)。其中LMB(leptomycin B)作为最先发现的CRM1天然抑制剂,通过与CRM1的半胱氨酸528(Cys528)共价且不可逆的结合,从而抑制蛋白质的核输出,且有研究发现LMB对CRM1的抑制作用还会导致CRM1自身亚细胞定位的改变<sup>[60]</sup>。然而由于LMB对于CRM1的永久性抑制作用,临床试验因其高毒性作用而被终止。随后,由Karyopharm Therapeutics公司开发并统称为核出口选择性抑制剂SINE(selective inhibitor of XPO1-mediated nuclear export)的化合物,作为新一代CRM1抑制剂在多项临床实验中已得到验证,其具有特异且可逆的阻断CRM1作为核输出蛋白的功能。目前,已研究报道的SINE化合物包括KPT-185、KPT-249、KPT-251、KPT-276、KPT-330和KPT-335等。与LMB相似,这些化合物可以与CRM1的NES结合区域中的Cys528共价相互作用;与其不同的是,SINE化合物是通过缓慢可逆的共价结合,同时还允许一定程度的核输出,这降低了其对非恶性细胞的毒性作用。其中KPT-185是研究的最多的SINE化合物,但是其在鼠类等模式生物中的可利用度有限<sup>[61]</sup>;相对于KPT-185,KPT-276在生物体内具有更高的口服利用度,已在多种小鼠模型中证实其具有抑制肿瘤细胞生长的功效,具有潜在的恶性血液肿瘤治疗前景<sup>[62]</sup>。KPT-335(Verdinexor)作为抗病毒药物,目前已获得美国食品药品监督管理局兽医医学中心的批准,可作为伴侣动物癌症的潜在治疗药物,用于治疗犬淋巴瘤<sup>[63]</sup>;KPT-8602(Eltanexor)作为第二代SINE化合物,能够显著降低血脑屏障渗透,在临床模型中对急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia, ALL)具有有效活性,并且对正常细胞的影响极小<sup>[64]</sup>。在所有的SINE化合物中,KPT-330(Selinexor)是最有潜力的肿瘤治疗药物,且科研人员已在多个早期临床试验中进行了广泛的基于此药物的研究。2019年7月,

表2 核转运抑制剂  
Table 2 Nuclear transport inhibitors

| 核转运蛋白<br>Nuclear transporters           | 抑制剂<br>Inhibitor                        | 研发阶段<br>Development phase | 试验状态<br>Experimental status   |
|---|---|---------------------------|---|
| Importin- $\alpha$ 5                    | cSN50.1 <sup>[70]</sup>                 | Cell culture              |   |
| Importin- $\alpha$ /importin- $\beta$ 1 | cSN50.1 <sup>[70]</sup>                 | Cell culture              |   |
|   | Ivermectin <sup>[71]</sup>              |                           | Ivermectin has been shown to have anticancer effects  |
|   | Bimax1 <sup>[72]</sup>                  | Cell culture              |   |
|   | Bimax2 <sup>[72]</sup>                  | Cell culture              |   |
|   | Karyostatin 1A <sup>[67]</sup>          | Cell culture              |   |
|   | Importazole <sup>[68]</sup>             | Cell culture              | Importazole is expected to be a treatment drug for myeloma  |
|   | INI-43 <sup>[69]</sup>                  | Cell culture              |   |
| Transportin 1                           | M9M <sup>[73]</sup>                     | <i>Xenopus</i> model      |   |
| CRM1                                    | Leptomycin B <sup>[74]</sup>            | Phase I                   | Discontinue due to its poor adverse effect profile  |
|   | Ratjadone analogs <sup>[75]</sup>       | Cell culture              |   |
|   | Anguinomycin <sup>[76]</sup>            | Cell culture              |   |
|   | Goniothalamine <sup>[76]</sup>          | Cell culture              |   |
|   | KOS-2464 <sup>[75]</sup>                | Xenograft mouse model     |   |
|   | N-azolyacrylate analogs <sup>[75]</sup> | HIV model                 | Highly specific inhibitor of CRM1 develop for use in HIV therapy  |
|   | CBS9106 <sup>[77]</sup>                 | Phase I                   | Ongoing in advanced solid tumors  |
|   | Curcumin <sup>[78]</sup>                | Phase I/II/III            | Phase II study under development in MM  |
|   | Selinexor <sup>[65-66]</sup>            | Phase I/II/III            | Treatment of solid tumors and hematological malignancies  |
|   | Eltanexor <sup>[64]</sup>               | Phase I/II                | Ongoing in relapsed/refractory MM, ALL, metastatic colorectal cancer, metastatic castration-resistant prostate cancer, and higher risk myelodysplastic syndrome |
|   | Verdinexor <sup>[63]</sup>              | Phase I/II                | Using of combining KPT-335 with cytotoxic chemotherapeutic agents in canine lymphoma  |
|   | KPT-276 <sup>[62]</sup>                 | Mouse model               | Potential treatment prospect of malignant blood tumor   |

美国食品药品监督管理局(FDA)批准Selinexor与低剂量地塞米松联用用于治疗多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)患者, 2020年6月, FDA再次批准了Selinexor作为单一口服药物可用于治疗复发性弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)患者。此外, 已开展了多项基于Selinexor的中期和后期临床试验, 试验基于Selinexor与细胞毒性化疗法联合使用, 以治疗多种实体瘤和恶性血液肿瘤<sup>[65-66]</sup>。

靶向CRM1的成功案例凸显了靶向核转运蛋白在肿瘤治疗中的潜在有效性。尽管目前对于核输入蛋白抑制剂的研究进展远不如CRM1抑制剂的研究, 但是仍有不少发现。其中, karyostatin 1A和importazole<sup>[67-68]</sup>作为最早被鉴定的importin- $\beta$ 1新型小分子抑制剂, 通过破坏importin- $\beta$ 1与RanGTPase之间的相互作用来抑制importin- $\beta$ 1介导的核输入, 并且其不会干扰transportin或CRM1介导的核质转运。目前, 已有研究表明, importazole可成功抑制骨髓瘤细胞

中importin- $\beta$ 1介导的p65核输入, 从而调节骨髓瘤细胞的增殖并诱导凋亡, 彰显出importazole作为骨髓瘤治疗药物的应用前景<sup>[68]</sup>。PAULINE等<sup>[69]</sup>利用计算机筛选出一种新型的importin- $\beta$ 1小分子抑制剂INI-43, 其可以抑制importin- $\beta$ 1转运货物如NF- $\kappa$ B/p65的核输入, 并且可抑制不同组织起源的癌细胞的增殖。INI-43处理会增强importin- $\beta$ 1的降解, 但是不会对转运蛋白家族的其他成员产生影响。这些结果表明, INI-43可作为importin- $\beta$ 1抑制剂在未来开发中的一个新方向, 同时也显示了importin- $\beta$ 1作为肿瘤治疗靶标的潜力。尽管目前关于importin- $\beta$ 1抑制剂的研究尚未有临床试验的证明, 但是随着CRM1抑制剂与化学治疗手段联用成功案例的积累, importin- $\beta$ 1抑制剂将成为未来肿瘤药物研发的热点之一。

## 8 结语与展望

蛋白质的核质转运在细胞增殖和细胞周期调

控中起到重要的作用,而其中一些抑癌基因、癌症相关核转运因子以及细胞凋亡相关蛋白的转运调控作用已被证明可作为控制癌细胞增殖的有力方法,随着我们对转运蛋白如何调控转运肿瘤抑制因子和致癌蛋白机理研究的进一步加深,抑制转运蛋白介导的核质转运成为了一种新型治疗癌症的方法,即在癌细胞不同蛋白质的错误定位和异常表达中,研究如何将这些蛋白质重新定位并降低表达量。随着科学研究的进步,利于癌症治疗的核转运蛋白抑制剂必将会成为治疗癌症的新型试剂。

### 参考文献 (References)

- [1] BONNER W M. Proximity and accessibility studies of histones in nuclei and free nucleosomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 1978, 5(1): 71-85.
- [2] BECK M, FÖRSTER F, ECKE M, et al. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography [J]. *Science*, 2004, 306(5700): 1387-90.
- [3] DEVOS D, DOKUDOVSKAYA S, WILLIAMS R, et al. Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(7): 2172-7.
- [4] WEIS K. The nuclear pore complex: oily spaghetti or gummy bear [J]? *Cell*, 2007, 130(3): 405-7.
- [5] ALBER F, DOKUDOVSKAYA S, VEENHOFF L M, et al. The molecular architecture of the nuclear pore complex [J]. *Nature*, 2007, 450(7170): 695-701.
- [6] CAUTAIN B, HILL R, DE PEDRO N, et al. Components and regulation of nuclear transport processes [J]. *FEBS J*, 2015, 282(3): 445-62.
- [7] GOLDFARB D S, CORBETT A H, MASON D A, et al. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor [J]. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(9): 505-14.
- [8] KOBE B. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha [J]. *Nat Struct Biol*, 1999, 6(4): 388-97.
- [9] CONTI E, UY M, LEIGHTON L, et al. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha [J]. *Cell*, 1998, 94(2): 193-204.
- [10] FONTES M R, TEH T, KOBE B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha [J]. *J Mol Biol*, 2000, 297(5): 1183-94.
- [11] DINGWALL C, SHARNICK S V, LASKEY R A. A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus [J]. *Cell*, 1982, 30(2): 449-58.
- [12] HODEL M R, CORBETT A H, HODEL A E. Dissection of a nuclear localization signal [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(2): 1317-25.
- [13] LANGE A, MCLANE L M, MILLS R E, et al. Expanding the definition of the classical bipartite nuclear localization signal [J]. *Traffic*, 2010, 11(3): 311-23.
- [14] GASIOROWSKI J Z, DEAN D A. Mechanisms of nuclear transport and interventions [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(6): 703-16.
- [15] SUN C, GUO F, STEWART M, et al. Choreography of Importin  $\alpha$ /CAS complex assembly and disassembly at the nuclear pore complex [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(17): E1584-93.
- [16] KUTAY U, IZAURRALDE E, BISCHOFF F R, et al. Dominant-negative mutants of importin-beta block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex [J]. *EMBO J*, 1997, 16(6): 1153-63.
- [17] JÄKEL S, GÖRLICH D. Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells [J]. *EMBO J*, 1998, 17(15): 4491-502.
- [18] TRUANT R, CULLEN B R. The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(2): 1210-7.
- [19] REHBERGER S, GOUNARI F, DUCDODON M, et al. The activation domain of a hormone inducible HTLV-1 rex protein determines colocalization with the nuclear pore [J]. *Exp Cell Res*, 1997, 233(2): 363-71.
- [20] XIAO Z, LIU X, HENIS Y I, et al. A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(14): 7853-8.
- [21] PALMERI D, MALIM M H. Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(2): 1218-25.
- [22] FRIDELL R A, TRUANT R, THORNE L, et al. Nuclear import of hnRNP A1 is mediated by a novel cellular cofactor related to karyopherin-beta [J]. *J Cell Sci*, 1997, 110(Pt11): 1325-31.
- [23] YASEEN N R, BLOBEL G. Cloning and characterization of human karyopherin beta3 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(9): 4451-6.
- [24] CHACHAMI G, PARASKEVA E, MINGOT J M, et al. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390(2): 235-40.
- [25] STEFAN J, JOSÉ-MANUEL M, PETRA S, et al. Importins fulfill a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains [J]. *EMBO J*, 2002, 21(3): 377-86.
- [26] PRADEEPA M M, MANJUNATHA S, SATHISH V, et al. Involvement of importin-4 in the transport of transition protein 2 into the spermatid nucleus [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(13): 4331-41.
- [27] YOSHITERU M, TOSHIMI M, NAOKO S, et al. Importin 4 is responsible for ligand-independent nuclear translocation of vitamin D receptor [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(49): 40901-8.
- [28] DEAN K A, AHSEN O V, GÖRLICH D, et al. Signal recognition particle protein 19 is imported into the nucleus by importin 8 (RanBP8) and transportin [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 19): 3479-85.
- [29] YAO X, CHEN X, COTTONHAM C, et al. Preferential utilization of Imp7/8 in nuclear import of Smads [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(33): 22867-74.
- [30] PLAFKER S M, PLAFKER K S, WEISSMAN A M, et al. Ubiquitin charging of human class III ubiquitin-conjugating enzymes

- triggers their nuclear import [J]. *J Cell Biol*, 2004, 167(4): 649-59.
- [31] PLAFKER S M, MACARA I G. Ribosomal protein L12 uses a distinct nuclear import pathway mediated by importin 11 [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(4): 1266-75.
- [32] KATAOKA N, BACHORIK J L, DREYFUSS G. Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins [J]. *J Cell Biol*, 1999, 145(6): 1145-52.
- [33] MINGOT J M, KOSTKA S, KRAFT R, et al. Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export [J]. *EMBO J*, 2001, 20(14): 3685-94.
- [34] BONO F, COOK A G, GRUNWALD M, et al. Nuclear import mechanism of the EJC component Mago-Y14 revealed by structural studies of importin 13 [J]. *Mol Cell*, 2010, 37(2): 211-22.
- [35] GRÜNWARD M, LAZZARETTI D, BONO F. Structural basis for the nuclear export activity of importin13 [J]. *EMBO J*, 2013, 32(6): 899-913.
- [36] WEN W, MEINKOTHT J L, TSIEN R Y, et al. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus [J]. *Cell*, 1995, 82(3): 463-73.
- [37] KUTAY U, LIPOWSKY G, IZAURRALDE E, et al. Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor [J]. *Mol Cell*, 1998, 1(3): 359-69.
- [38] LIPOWSKY G, BISCHOFF F R, SCHWARZMAIER P, et al. Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes [J]. *EMBO J*, 2000, 19(16): 4362-71.
- [39] KURISAKI A, KURISAKI K, KOWANETZ M, et al. The mechanism of nuclear export of Smad3 involves exportin 4 and Ran [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(4): 1318-32.
- [40] GONTAN C, GÜTTLER T, ENGELEN E, et al. Exportin 4 mediates a novel nuclear import pathway for sox family transcription factors [J]. *J Cell Biol*, 2009, 185(1): 27-34.
- [41] CALADO A, TREICHEL N, MÜLLER E C, et al. Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA [J]. *EMBO J*, 2002, 21(22): 6216-24.
- [42] STÜVEN T, HARTMANN E, GÖRLICH D. Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes [J]. *EMBO J*, 2003, 22(21): 5928-40.
- [43] MINGOT J M, BOHNSACK M T, JÄKLE U, et al. Exportin 7 defines a novel general nuclear export pathway [J]. *EMBO J*, 2004, 23(16): 3227-36.
- [44] LANGER K, DIAN C, RYBIN V, et al. Insights into the function of the CRM1 cofactor RanBP3 from the structure of its Ran-binding domain [J]. *PLoS One*, 2017, 6(2): e17011.
- [45] LI H Y, WIRTZ D, ZHENG Y. A mechanism of coupling RCC1 mobility to RanGTP production on the chromatin *in vivo* [J]. *J Cell Biol*, 2003, 160(5): 635-44.
- [46] RALF B F, KLAUS S, HERWIG P. How Ran is regulated. Results and problems in cell differentiation [J]. 2002, 35: 49-66.
- [47] IZAURRALDE E, KUTAY U, VON KOBBE C, et al. The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus [J]. *EMBO J*, 1997, 16(21): 6535-47.
- [48] RIBBECK K, GÖRLICH D. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes [J]. *EMBO J*, 2001, 20(6): 1320-30.
- [49] BAYLISS R, RIBBECK K, AKIN D, et al. Interaction between NTF2 and xFxFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP [J]. *J Mol Biol*, 1999, 293(3): 579-93.
- [50] CHAFE S C, PIERCE J B, MANGROO D. Nuclear-cytoplasmic trafficking of NTF2, the nuclear import receptor for the RanGTPase, is subjected to regulation [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42501.
- [51] KUUSISTO H V, WAGSTAFF K M, ALVISI G, et al. Global enhancement of nuclear localization-dependent nuclear transport in transformed cells [J]. *FASEB J*, 2012, 26(3): 1181-93.
- [52] WATT P J V D, NGARANDE E, LEANER V D. Overexpression of kpn $\beta$ 1 and kpn $\alpha$ 2 importin proteins in cancer derives from deregulated E2F activity [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27723.
- [53] LIN J, ZHANG L, HUANG H, et al. MiR-26b/kpn $\alpha$ 2 axis inhibits epithelial ovarian carcinoma proliferation and metastasis through downregulating Oct4 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 23793-806.
- [54] J VAN DER WATT P J, MASKE C P, HENDRICKS D T, 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.
- [55] WINKLER J, ORI A, HOLZER K, et al. Prosurvival function of the cellular apoptosis susceptibility/importin-alpha1 transport cycle is repressed by p53 in liver cancer [J]. *Hepatology*, 2014, 60(3): 884-95.
- [56] TAI C J, LIAO C F, SU T C, et al. Presence of CSE1L protein in urine of patients with urinary bladder urothelial carcinomas [J]. *Int J Biol Markers*, 2012, 27(3): e280-4.
- [57] STELLA TSAI C S, CHEN H C, TUNG J N, et al. Serum cellular apoptosis susceptibility protein is a potential prognostic marker for metastatic colorectal cancer [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(4): 1619-28.
- [58] SOTIRIOU C, WIRAPATI P, LOI S, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis [J]. *Jnci-J Natl Cancer I*, 2006, 98(4): 262-72.
- [59] LI J, LIU Q, LIU Z, et al. KPNA2 promotes metabolic reprogramming in glioblastomas by regulation of c-myc [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 194.
- [60] RAHMANI K, DEAN D A. Leptomycin B alters the subcellular distribution of CRM1 (Exportin 1) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 488(2): 253-8.
- [61] ETCHIN J, SUN Q, KENTISIS A, et al. Antileukemic activity of nuclear export inhibitors that spare normal hematopoietic cells [J]. *Leukemia*, 2013, 27(1): 66-74.
- [62] ZHANG K, WANG M, TAMAYO A T, et al. Novel selective inhibitors of nuclear export CRM1 antagonists for therapy in mantle cell lymphoma [J]. *Exp Hematol*, 2013, 41(1): 67-78.e4.
- [63] SADOWSKI A R, GARDNER H L, BORGATTI A, et al. Phase II study of the oral selective inhibitor of nuclear export (SINE) KPT-335 (verdinexor) in dogs with lymphoma [J]. *BMC Vet Res*, 2018, 14(1): 250.
- [64] DELPHINE V, SOFIE D, CRISTINA P, et al. The XPO1 inhibitor KPT-8602 synergizes with dexamethasone in acute lymphoblastic leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(21): 5747-58.
- [65] WANG A Y, LIU H T. The past, present, and future of CRM1/

- XPO1 inhibitors [J]. *Stem Cell Investig*, 2019, 6: 6.
- [66] KATERINA B, JANA M, ROMAN H, et al. Selinexor, selective inhibitor of nuclear export: unselective bullet for blood cancers [J]. *Blood Rev*, 2021, 46: 100758.
- [67] MARTIN H, GÉZA A, JANNA B, 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.
- [68] CANSIZOGLU A E, LEE B J, ZHANG Z C, et al. Structure-based design of a pathway-specific nuclear import inhibitor [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(5): 452-4.
- [69] VAN DER WATT P J, ALICIA C, TAMARA S, et al. Targeting the nuclear import receptor Kpn $\beta$ 1 as an anticancer therapeutic [J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(4): 560-73.
- [70] JOZEF Z, AMY A, JACEK H. Targeting nuclear import shuttles, importins/karyopherins alpha by a peptide mimicking the NF $\kappa$ B1/p50 nuclear localization sequence [J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(5): e000386.
- [71] WAGSTAFF K M, RAWLINSON S M, HEARPS A C, et al. An AlphaScreen(R)-based assay for high-throughput screening for specific inhibitors of nuclear import [J]. *J Biomol Screen*, 2011, 16(2): 192-200.
- [72] KOSUGI S, HASEBE M, ENTANI T, et al. Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activity-based profiling [J]. *Chem Biol*, 2008, 15(9): 940-9.
- [73] BERNIS C, SWIFT-TAYLOR B, NORD M, et al. Transportin acts to regulate mitotic assembly events by target binding rather than Ran sequestration [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(7): 992-1009.
- [74] KUDO N, WOLFF B, SEKIMOTO T, et al. Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1 [J]. *Exp Cell Res*, 1998, 242(2): 540-7.
- [75] ISHIZAWA J, KOJIMA K, HAIL N, Jr, et al. Expression, function, and targeting of the nuclear exporter chromosome region maintenance 1 (CRM1) protein [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 153: 25-35.
- [76] GADEMANN K. Controlling protein transport by small molecules [J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(11): 1574-80.
- [77] SWANUL K, DUNN A K, DUONG T Q, et al. Measurements and modeling of transient blood flow perturbations induced by brief somatosensory stimulation [J]. *Open Neuroimag J*, 2011, 5: 96-104.
- [78] MINGSHAN N, SIJIN W, LEI M, et al. CRM1 is a cellular target of curcumin: new insights for the myriad of biological effects of an ancient spice [J]. *Traffic*, 2013, 14(10): 1042-52.