

XPO1抑制剂KPT-8602对U937细胞增殖和凋亡的影响

肖晓慧, 李益清, 黄克智, 谢双锋, 肖洁, 马丽萍, 尹松梅, 聂大年

(广东省恶性肿瘤表观遗传学和基因调控重点实验室//中山大学孙逸仙纪念医院血液内科, 广东广州 510120)

摘要:【目的】探讨核输出蛋白(XPO1)选择性抑制剂KPT-8602对人组织细胞淋巴瘤细胞系U937细胞增殖、周期、凋亡的影响及其可能的机制研究。【方法】以U937细胞为研究对象,给予不同浓度的KPT-8602处理细胞后,CCK-8法检测细胞活力;流式细胞术检测细胞周期及凋亡;Western blot法检测XPO1、p-AKT、AKT、Cleaved Caspase-3、p21的表达情况;荧光显微镜观察XPO1的亚细胞定位。【结果】CCK-8结果显示KPT-8602可抑制U937细胞的活力,在一定范围内具有剂量-效应依赖关系($P<0.001$)及时间-效应依赖关系($P<0.001$),但是对正常人外周血单个核细胞(PBMC)无明显影响;流式细胞仪检测显示不同浓度KPT-8602作用U937细胞48 h后,各组细胞周期停滞在G1期的比例增加($P<0.001$),细胞凋亡率增加($P=0.016$);Western blot结果显示与正常人PBMC相比,U937细胞的XPO1表达明显升高($P=0.003$);KPT-8602处理U937细胞后,XPO1表达下降($P=0.011$),Cleaved Caspase-3表达增加($P=0.009$),p-AKT表达下降($P=0.011$),胞核及胞浆的XPO1蛋白的表达均下降($P<0.05$),货物蛋白p21在胞浆胞核的表达均升高($P<0.05$);荧光显微镜下观察到KPT-8602处理U937细胞后,XPO1在胞浆胞核中的表达均下降。【结论】KPT-8602能抑制U937细胞增殖,使细胞周期阻滞于G1期,诱导细胞凋亡;其机制可能与下调XPO1表达,抑制PI3K/AKT通路有关。

关键词: XPO1;KPT-8602;U937细胞;周期;凋亡;AKT

中图分类号: R733 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2019)01-0037-09

Effects of XPO1 Inhibitor KPT-8602 on Proliferation and Apoptosis in U937 cells

XIAO Xiao-hui, LI Yi-qing, HUANG Ke-zhi, XIE Shuang-feng, XIAO Jie, MA Li-ping,
YIN Song-mei, NIE Da-nian

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Malignant Tumor Epigenetics and Gene Regulation // Department of Hematology, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

Corresponding to: NIE Da-nian; E-mail: niedanian@hotmail.com

Abstract: 【Objective】To explore the effects and the possible mechanism of KPT-8602, a novel selective inhibitor of nuclear export protein (XPO1), on proliferation, cell cycle and apoptosis in human histiocytic lymphoma cell line U937 cells. 【Methods】U937 cells were treated with different concentrations of KPT-8602. Cell viability was assessed by CCK-8 assay. The cell cycle distribution and the apoptosis rate were analyzed by flow cytometry. The proteins expression of XPO1, p-AKT, AKT, Cleaved Caspase-3, p21 were determined by Western blot. Fluorescence microscope was used in observing the intracellular location of XPO1. 【Results】KPT-8602 inhibited the growth of U937 cells in a dose-dependent ($P<0.001$) and time-dependent manner ($P<0.001$), but normal PBMC were unaffected. 48 h after treatment with KPT-8602, a higher proportion of cells in G1 phase was observed ($P<0.001$) and the apoptosis rate increased ($P=$

收稿日期: 2018-09-18

基金项目: 广东省自然科学基金(2016A030313360, 2017A030313612); 广东省科技发展专项资金(2016A020215062)

作者简介: 肖晓慧, 硕士研究生, 研究方向: 血液肿瘤, E-mail: xiaoxh9@mail2.sysu.edu.cn; 聂大年, 通信作者, E-mail: niedanian@hotmail.com

0.016) with drug concentration in U937 cells. XPO1 protein expression of U937 cells was significantly higher than normal PBMC ($P=0.003$). 48 h after treatment with KPT-8602, the protein expression of XPO1 decreased ($P=0.011$), p-AKT decreased ($P=0.011$), and Cleaved Caspase-3 increased ($P=0.009$). In addition, the protein expression of p21, the cargo protein of XPO1, increased in both the nuclei and the cytoplasm ($P<0.05$) after treatment with KPT-8602. XPO1 decreased in both the nuclei and the cytoplasm under the fluorescence microscope after treatment with KPT-8602. 【Conclusion】 KPT-8602 can inhibit the proliferation of U937 cells, block the cell cycle at G1 phase, and induce cell apoptosis, which may partially be attributed to the down-regulation of XPO1 and inhibition of PI3K/AKT signaling.

Key words: XPO1; KPT-8602; U937 cells; cell cycle; apoptosis; AKT

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(1): 37-45]

核输出蛋白1 (exportin-1, XPO1), 又称为染色体区域稳定蛋白1 (chromosome region maintenance 1, CRM1), 是一种广泛存在的核输出受体蛋白, 可识别超过200种蛋白, 如关键肿瘤抑制蛋白和调节蛋白 p53、p73、p21、p27、I κ B、Rb、BRCA1等, 这些蛋白被称为XPO1的货物蛋白^[1], XPO1可以将其通过核孔从胞核转运到胞浆。XPO1的抑制剂KPT-330口服具有良好的生物利用度, 我们和其他研究小组报道了KPT-330对多种血液肿瘤^[2-3]和实体瘤^[4-5]的作用, 当前临床试验已经进入了II/III期^[6-8]。第二代XPO1抑制剂KPT-8602在患者源性异种移植小鼠模型中有更低的中枢神经渗透浓度, 不会引起厌食、恶心, 显示出更强的生物耐受性和更强的效果^[9]。KPT-8602对复发/难治性多发性骨髓瘤、转移性结直肠癌、转移性去势抵抗性前列腺癌和高危骨髓增生异常综合征患者的安全性、耐受性和功效研究也进入了临床试验的I/II期(NCT02649790)。非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma, NHL) 是一组具有不同的组织学特点和起病部位的淋巴瘤, 易发生早期远处扩散。难治或复发的NHL预后差, 缺乏有效的治疗方案。一项纳入79名各型难治或复发的NHL患者的临床研究结果表明KPT-330以35 mg/m²的剂量口服是安全的, 并且对难治或复发的NHL患者具有令人鼓舞和持久的抗癌活性^[10](NCT01607892)。但是KPT-8602对NHL的研究未见报道。本研究以人组织细胞淋巴瘤细胞系U937细胞为研究对象, 探讨KPT-8602对淋巴瘤细胞的作用及其可能的机制, 以期对NHL的治疗提供新依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人组织细胞淋巴瘤细胞系U937购自中国科学院细胞库。细胞接种于用含100 mL/L胎牛血清的RPMI-1640完全培养基中, 置于含体积分数5% CO₂的37℃培养箱中培养, 取对数生长期的细胞进行实验。人外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 提取于健康自愿献血者外周静脉血。KPT-8602粉末 (美国 Selleck) 溶于DMSO中制成浓度为1 \times 10⁷ nmol/L的原液, 实验时用完全培养液稀释成工作液, DMSO的终体积分数浓度小于0.1%。RPMI1640培养基 (美国 Gibco); 胎牛血清 (以色列 Biological Industries); AnnexinV-FITC/PI凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒 (美国 Invitrogen); Cell Counting Kit-8 试剂盒 (日本 Dojindo Laboratories); BCA蛋白定量试剂盒 (北京康为世纪); 核蛋白-胞浆蛋白提取试剂盒 (美国 ThermoFisher); ECL发光液 (美国 Millipore); 抗 GAPDH 抗体 (英国 Abcam, ab181602); 抗 XPO1 抗体 (美国 Santa Cruz, sc-74454); 抗 Caspase-3 抗体 (英国 Abcam, ab32351); 抗 AKT 抗体 (美国 Cell Signaling Technology, #4691); 抗 p-AKT (Ser473) (美国 Affinity Biosciences, AF0016); 抗 Lamin-B1 抗体 (美国 Immunoway, YT2522); 抗 P21 cip1 抗体 (美国 Cell Signaling Technology, #2947); 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (美国 Cell Signaling Technology, #7074); 辣根过氧化物酶标记的马抗

小鼠 IgG (美国 Cell Signaling Technology, #7076); DAPI 溶液 (北京索莱宝); Alexa Fluor[®] 594 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (北京中杉金桥)。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法检测细胞活力 将细胞按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔培养板, 实验组加入不同浓度的 KPT-8602, 对照组加入与实验组等体积的完全培养液, 每组设 3 个复孔; 分别培养 20、44、68 h 后, 在每孔各加入 10 μ L CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 测 $D_{450 \text{ nm}}$ 值。按公式计算细胞的存活率: 细胞的存活率 = $(D_{\text{实验孔}} - D_{\text{空白孔}}) / (D_{\text{对照孔}} - D_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

1.2.2 PI 单染法检测细胞周期 将 U937 细胞按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板, 实验组加入不同浓度的 KPT-8602, 使其终浓度为 10、100、200 nmol/L, 对照组加入与实验组等体积的完全培养液。培养 48 h 后 200 $\times g$ 离心 5 min, 弃去上清液, PBS 洗涤 1 次, 用 70% 的冰乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。PBS 洗涤 1 次, 弃去上清液, 细胞沉淀加 50 μ L RNA 酶, 450 μ L PI 染色液, 上机检测。

1.2.3 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡 将 U937 细胞按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板, 实验组加入不同浓度的 KPT-8602, 使其终浓度为 100、200、1 000 nmol/L, 对照组加入与实验组等体积的完全培养液。培养 48 h 后收集细胞, PBS 洗涤 1 次, 用试剂盒专用结合缓冲液重悬细胞, 实验组加入 FITC 标记的 AnnexinV 试剂 5 μ L, 室温避光孵育 15 min, 然后加入 10 μ L PI 染色混匀, 上机检测。

1.2.4 Western blot 将 U937 细胞按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板, 实验组加入不同浓度的 KPT-8602, 使其终浓度为 10、100、200、1 000 nmol/L, 对照组加入与实验组等体积的完全培养液。培养 48 h 后收集细胞, 洗涤、裂解细胞, 提取细胞总蛋白或胞核蛋白及胞浆蛋白。用 BCA 法测定蛋白浓度后每孔按 30 μ g 蛋白上样。将蛋白经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后转移至 PVDF 膜上, 用含 5% BSA 的 TBST 溶液室温封闭 1 h, 加入相应的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 TBST 洗膜后, 加入相应的 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, ECL 化学发光成像。GAPDH 作为总蛋白及胞浆蛋白的内参蛋白, Lamin B1 作为胞核蛋白的内参蛋白。

1.2.5 细胞免疫荧光检测 XPO1 亚细胞定位 将 U937 细胞按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板, 实验组加入不同浓度的 KPT-8602, 使其终浓度为 100、

200 nmol/L, 对照组加入与实验组等体积的完全培养液。培养 48 h 后收集细胞, PBS 洗涤 1 次, 加入 40 g/L 多聚甲醛溶液, 室温固定 10 min。将细胞悬液涂在防脱载玻片上, 60 $^{\circ}$ C 烘烤玻片直至干燥, PBS 洗 3 次。0.3% Triton-100 溶液破膜 15 min, PBS 洗 3 次。避光滴加 PBS 稀释的荧光二抗, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h, PBS 洗 3 次。避光滴加 DAPI 溶液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 5 min, PBS 洗 3 次, 滴加少量防淬灭剂后盖上干净盖玻片, 在荧光显微镜下观察, 拍照。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析。计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 描述。两独立样本均数的比较用 t 检验, 多个样本均数的比较用单因素或多因素方差分析, 组间比较采用 LSD- t 检验进行多重比较, 统计前经方差齐性检验, 不满足方差齐性的多个样本均数的比较用 Kruskal-Willis 秩和检验。相关性分析采用 Spearman 秩相关。检验水准定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 U937 细胞 XPO1 蛋白表达水平高于正常人 PBMC

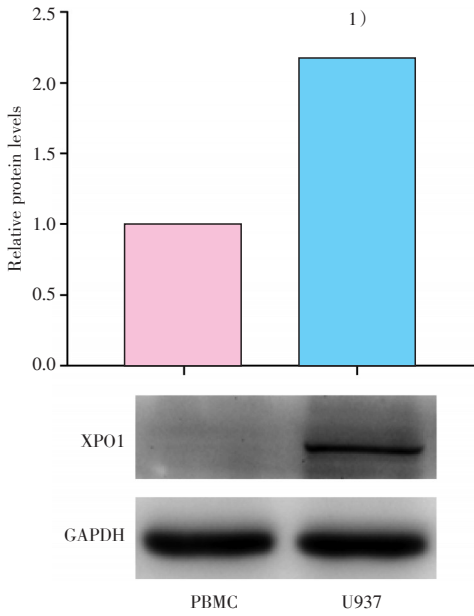
应用 Western blot 法检测正常人 PBMC、U937 细胞株 XPO1 蛋白表达, 结果显示与正常人 PBMC 相比, U937 细胞的 XPO1 表达明显增高 ($P < 0.001$, 图 1)。

2.2 KPT-8602 抑制 U937 细胞的活力

用 CCK-8 法检测细胞活力, 分析不同浓度 KPT-8602 作用不同时间对细胞活力的影响。结果显示: KPT-8602 对正常人 PBMC 的生长基本无明显的影响, KPT-8602 可抑制 U937 细胞的活力, 药物浓度越大, 细胞活力越低 ($F=41.420$, $P < 0.001$); 随着作用时间的延长, 细胞活力越低 ($F=17.554$, $P < 0.001$); 时间和药物浓度两因素存在交互效应 ($F=1614.574$, $P < 0.001$; 图 2); KPT-8602 作用 U937 细胞后, 24、48、72 h 的 IC_{50} 分别为 (280 ± 14)、(123 ± 5)、(84 ± 6) nmol/L。

2.3 KPT-8602 使 U937 细胞周期阻滞在 G1 期

流式细胞仪检测显示, 不同浓度 KPT-8602 处理 U937 细胞 48 h 后, 各组细胞周期停滞在 G1 期的比例增加, 组间差异有统计学意义 ($F=26.232$, $P < 0.001$; 图 3), 且随着药物浓度的增加, G1 期所占百



1) $t=-17.54, P<0.001$, compared with PBMC group. $n=3$.

图1 正常人PBMC、U937细胞XPO1蛋白表达水平
Fig.1 The expression of XPO1 in PBMC and U937 cells

分比逐渐增多($r=0.935; P<0.001$)。提示KPT-8602对U937细胞有周期阻滞作用,可使细胞周期阻滞于G1期。

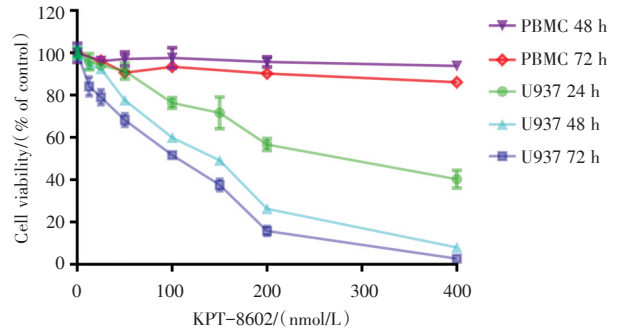


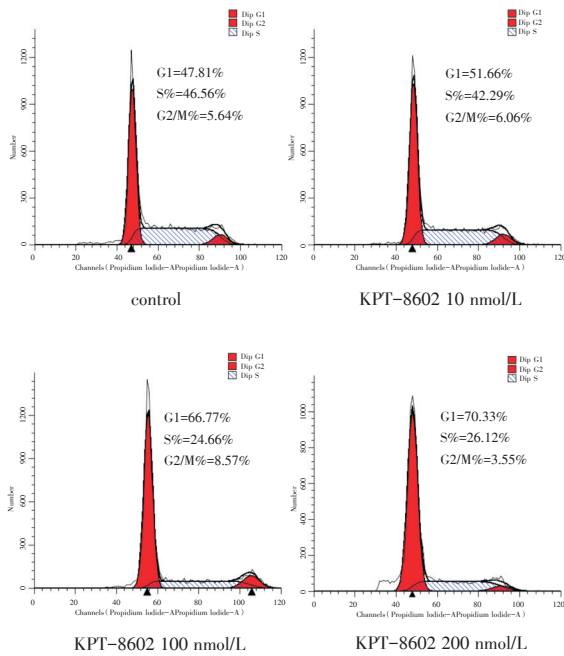
图2 KPT-8602抑制U937细胞的活力
Fig.2 The cell viability inhibition of KPT-8602 on U937 cells

2.4 KPT-8602促进U937细胞凋亡

流式细胞仪检测显示,不同浓度KPT-8602作用U937细胞48 h后,细胞凋亡率增加,组间差异有统计学意义($\chi^2=10.385, P=0.016$,图4),且随着药物浓度的增加,凋亡率增加更加明显($r=0.972; P<0.001$)。表明KPT-8602能促进U937细胞凋亡,且随着药物浓度增加,促凋亡作用越明显。

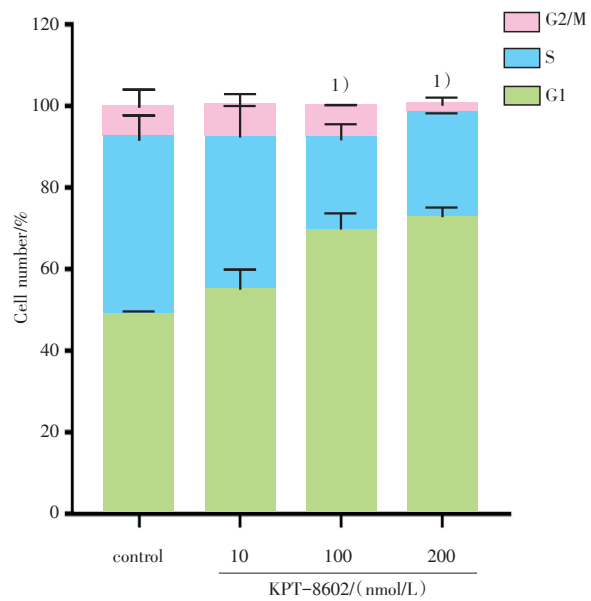
2.5 KPT-8602抑制U937细胞XPO1蛋白表达

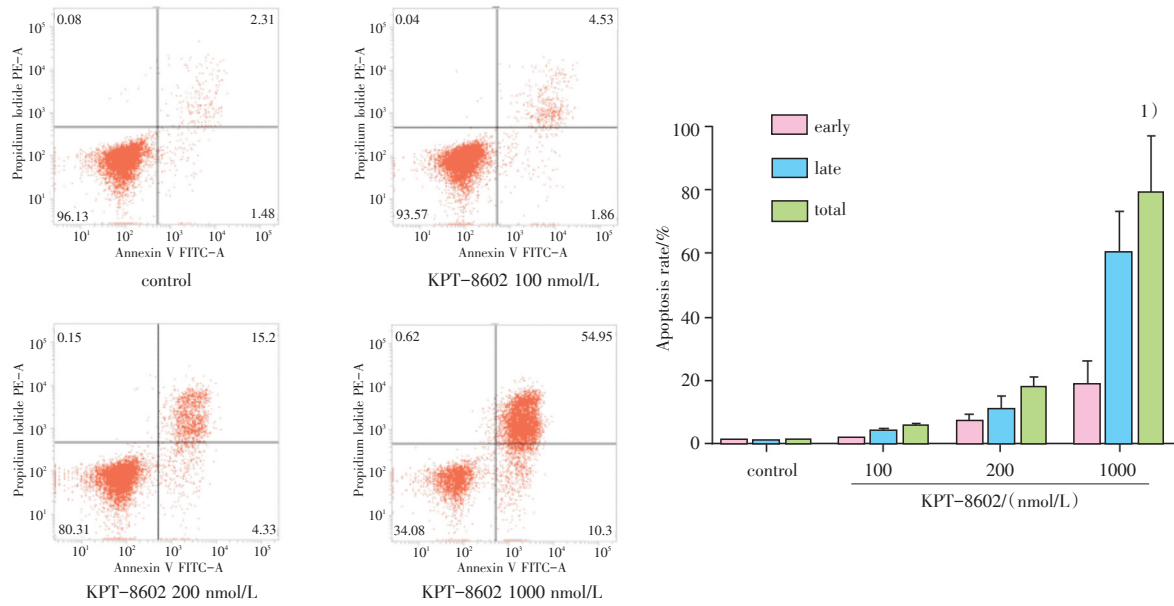
2.5.1 Western blot 不同浓度KPT-8602作用



compared with the cell number in G1 phase of the control. $n=3$.

图3 KPT-8602使U937细胞周期阻滞在G1期
Fig.3 KPT-8602 blocked the cell cycle of U937 cells at G1 phase





1) $P < 0.05$, compared with the total apoptosis rate of the control. $n = 3$.

图4 KPT-8602促进U937细胞凋亡
Fig.4 KPT-8602 promotes apoptosis of U937

U937细胞48 h后,XPO1蛋白的表达下降,组间差异有统计学意义($\chi^2 = 13.127, P = 0.011$;图5),且随着药物浓度的增加,XPO1蛋白的表达下降更明显($r = -0.964, P < 0.001$)。表明KPT-8602作为XPO1的抑制剂,可以抑制XPO1在U937细胞的表达。

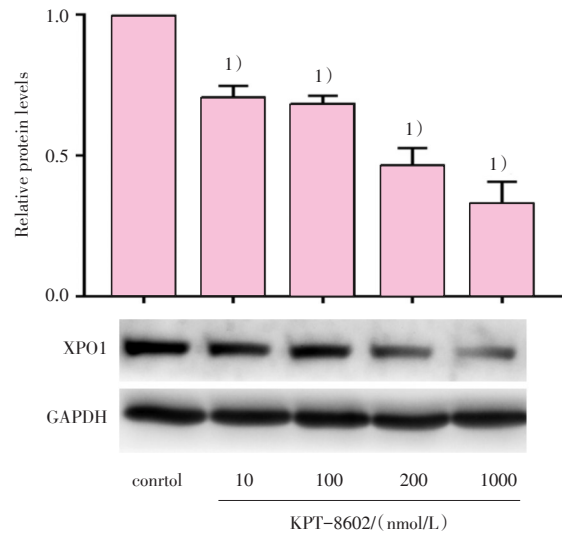
2.5.2 细胞免疫荧光 图6为荧光显微镜下观察各组细胞XPO1蛋白的表达情况,可以看到,XPO1在胞浆胞核中均有表达,KPT-8602作用U937细胞48 h后,XPO1在胞浆胞核中的表达均下降。

2.6 KPT-8602促进U937细胞Cleaved Caspase-3蛋白表达

流式细胞术结果显示,KPT-8602可以诱导细胞凋亡,因此我们用Western blot检测Cleaved Caspase-3蛋白的表达变化,结果显示不同浓度KPT-8602作用U937细胞48 h后,Cleaved Caspase-3蛋白的表达增加($r = 0.986, P < 0.001$),组间差异有统计学意义($\chi^2 = 13.597, P = 0.009$;图7)。

2.7 KPT-8602抑制U937细胞p-AKT蛋白表达

Western blot检测KPT-8602处理U937细胞后p-AKT蛋白的表达,结果显示不同浓度KPT-8602作用U937细胞48 h后,AKT的磷酸化水平降低($r = -0.964, P < 0.001$),组间差异有统计学意义($\chi^2 = 13.127, P = 0.011$;图8)。



1) $P < 0.05$, compared with the control. $n = 3$.

图5 KPT-8602抑制U937细胞XPO1的表达
Fig.5 KPT-8602 inhibits the expression of XPO1 in U937 cells

2.8 KPT-8602处理U937细胞后胞核及胞浆蛋白的表达

核浆分离Western blot检测KPT-8602处理U937细胞后胞核及胞浆XPO1、p21蛋白的变化,

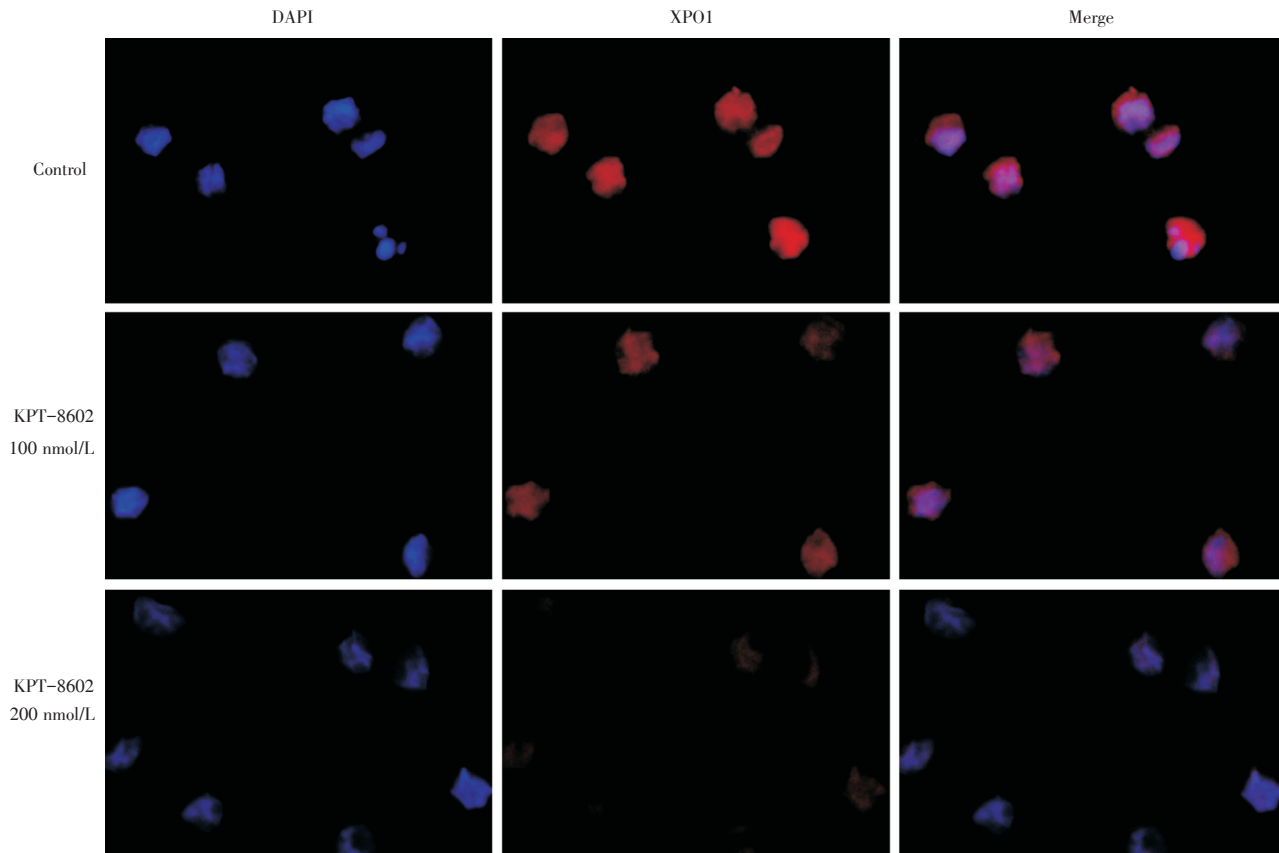
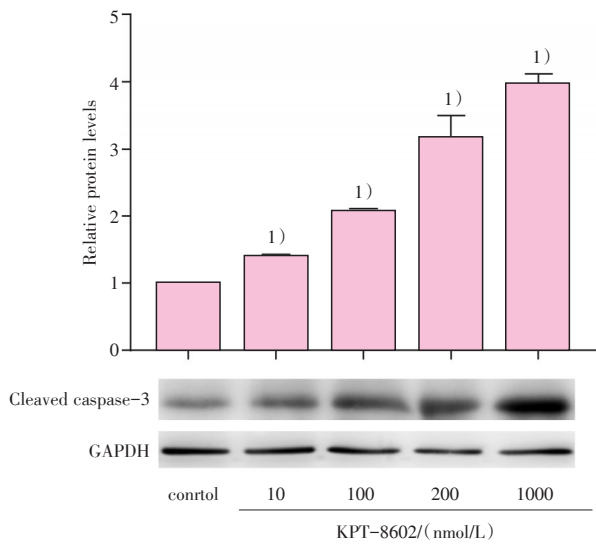


图6 荧光显微镜观察 U937 细胞 XPO1 的表达情况(400×)

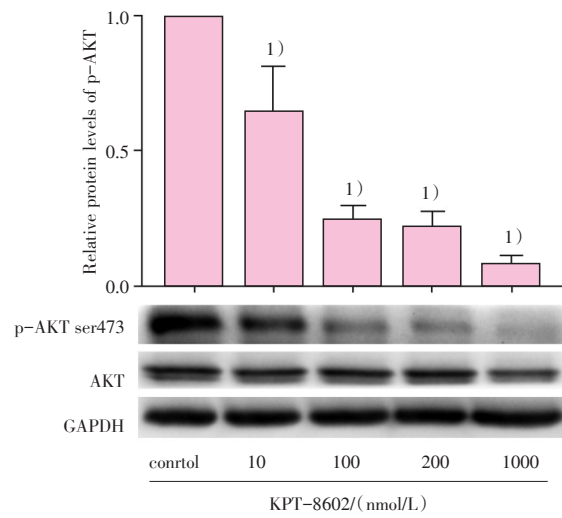
Fig.6 XPO1 expression of U937 cells after treatment with KPT-8602 for 48 h by fluorescence microscopy (400×)



1) $P < 0.05$, compared with the control. $n = 3$.

图7 KPT-8602 处理 U937 细胞后 Cleaved Caspase-3 的表达

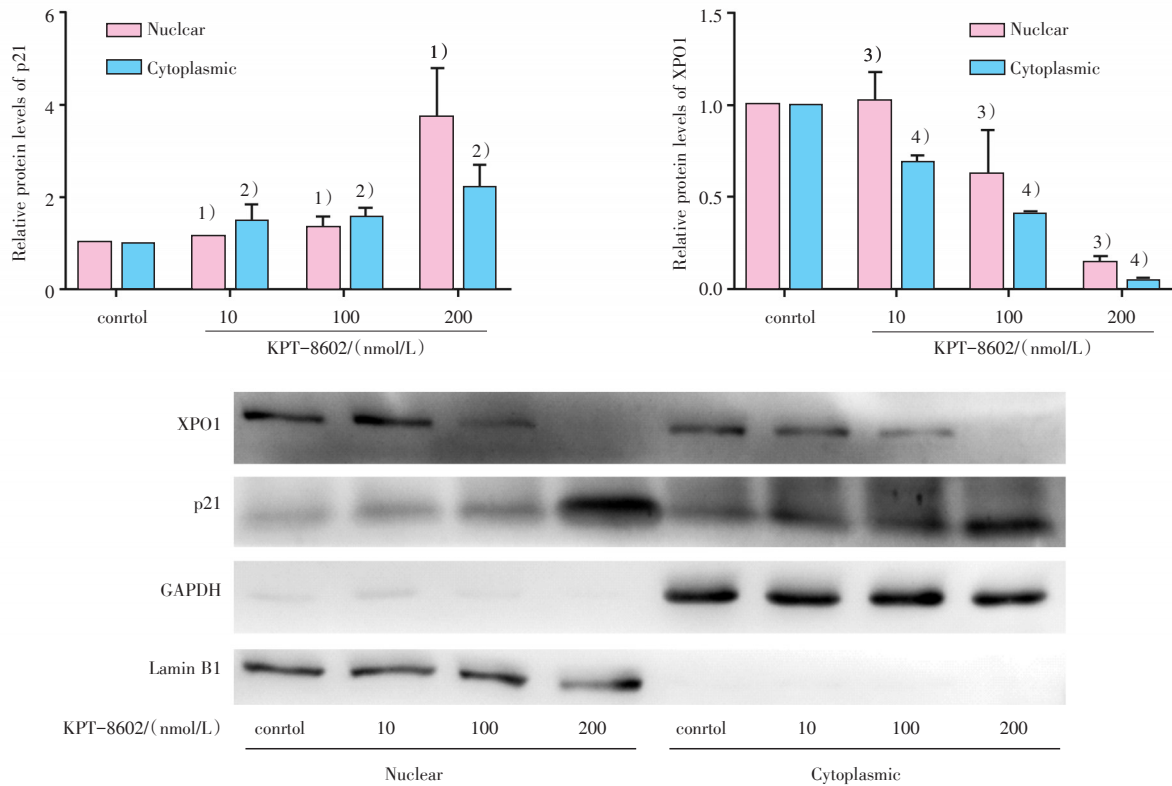
Fig.7 The expression of Cleaved Caspase-3 in U937 cells after treatment with KPT-8602



1) $P < 0.05$, compared with the control. $n = 3$.

图8 KPT-8602 处理 U937 细胞后 p-AKT 的表达

Fig.8 The expression of p-AKT in U937 cells after treatment with KPT-8602



1) $P < 0.05$ compared with the control. $\chi^2 = 9.595$ (Kruskal-Willis Test), $P = 0.022$, $r = 0.913$, $P < 0.001$, $n = 3$. 2) $P < 0.05$ compared with the control. $\chi^2 = 8.816$ (Kruskal-Willis Test), $P = 0.032$, $r = 0.848$, $P < 0.001$, $n = 3$. 3) $P < 0.05$ compared with the control. $\chi^2 = 9.596$ (Kruskal-Willis Test), $P = 0.022$, $r = -0.913$, $P < 0.001$, $n = 3$. 4) $P < 0.001$ compared with the control. $F = 1408.32$ (one-way ANOVA), $r = -0.978$, $P < 0.001$, $n = 3$.

图9 KPT-8602处理U937细胞后XPO1、p21蛋白的表达

Fig.9 The expression of XPO1 and p21 in U937 cells after treatment with KPT-8602

结果显示不同浓度KPT-8602作用U937细胞48 h后,胞核及胞浆的XPO1蛋白的表达均下降,胞核及胞浆的p21蛋白的表达均升高(图9)。

3 讨论

蛋白质的错误定位或者异常调节将导致各种疾病的产生,包括癌症、炎症、自身免疫性疾病等,胞核与胞浆转运系统调节肿瘤抑制蛋白的亚细胞定位^[11],XPO1在多种侵袭性肿瘤中都有高表达,并且XPO1在多种恶性肿瘤中的过表达与预后不良密切相关^[12-15],因此XPO1有望成为肿瘤治疗的靶点。

XPO1通过依赖Ran-GTP的机制发挥作用,货物蛋白结合XPO1后,在核内与Ran-GTP三者形成三聚体,通过核孔复合物转运至胞浆。在胞浆中,Ran-GTP水解为Ran-GDP,货物蛋白与XPO1

的亲水性减弱,从而在胞浆中释放。XPO1和Ran-GDP再返回核内循环利用^[16]。在卵巢肿瘤中,胞浆XPO1增强与更晚的分期,分化差和较高有丝分裂率有关^[17]。在食管肿瘤中,免疫组化也显示XPO1的定位发生了改变,从在正常组织中胞核表达转变为在癌组织中胞核和胞浆表达^[18]。XPO1在不同肿瘤中亚细胞定位并不总是一致。本实验中我们发现与正常人PBMC相比,U937细胞的XPO1表达明显增高,Western blot和免疫荧光的结果均显示,KPT-8602作用U937细胞后,XPO1蛋白在胞浆胞核中的表达均下降。

KPT-8602处理U937细胞后,CCK-8结果显示KPT-8602抑制U937细胞的活力,72 h的 IC_{50} 为 (83.82 ± 6.021) nmol/L。KPT-8602是新型的核输出选择性抑制剂(selective inhibitors of nuclear export, SINE),SINE选择性抑制XPO1,特异性结合XPO1的反应位点Cys528残基,使货物蛋白保

留在胞核里^[19-20],从而抑制肿瘤细胞增殖。本实验还发现同浓度 KPT-8602 对正常人 PBMC 的生长基本无明显的影响,既往也有研究显示 10 mmol/L KPT-8602 对正常人 PBMC 无明显影响^[21]。

p21 是细胞周期蛋白依赖性激酶的重要成员之一,负调节细胞周期过程,是肿瘤抑制蛋白。XPO1 可以识别和转运富含亮氨酸的核输出信号(nuclear export signal, NES)的货物蛋白,包括转录因子和肿瘤抑制蛋白,如 p53、p21、p27、FOXO。有研究表明 XPO1 抑制剂 S109 可下调肾癌细胞 Cyclin D1 的表达,诱导 FOXO1 和 p21 的核积累,从而阻碍细胞周期^[22]。与既往研究一致,我们发现 KPT-8602 能将细胞周期阻滞在 G1 期, KPT-8602 处理 U937 细胞后,细胞周期抑制蛋白 p21 在胞核和胞浆中的表达均升高。说明 XPO1 抑制剂对肿瘤抑制蛋白的影响可能导致细胞增殖抑制、细胞周期阻滞。

我们发现 KPT-8602 作用 U937 细胞后,细胞凋亡率增加,凋亡蛋白 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达增加,表明 KPT-8602 通过活化 Caspase 家族促进细胞凋亡。有研究表明 SINE 对多种肿瘤细胞具有抑制增殖的作用都与诱导细胞凋亡有关^[23],与本次研究结果一致。

在本研究中, KPT-8602 抑制 U937 细胞 p-AKT 的表达,表明可能通过抑制 PI3K/AKT 信号转导通路,从而抑制细胞增殖,阻滞细胞周期及促进细胞凋亡。PI3K/AKT 信号转导通路是细胞生存的重要通路之一,在许多肿瘤中异常激活^[24],针对该途径的多种小分子抑制剂已被开发作为癌症疗法^[25]。AKT 是 PI3K/AKT 信号通路的关键分子, PI3K 的活化使 AKT 发生磷酸化而激活,活化的 AKT 通过影响下游多种效应分子的活化状态而发挥作用,活化的 AKT 能够调节细胞增殖及周期相关的蛋白 p21 和 p27,进而影响细胞增殖^[26]。PI3K/AKT 信号转导通路可调控多个与细胞凋亡有关的蛋白或家族,如 FOXO、Bcl-2 家族及 Caspase-9 和细胞凋亡抑制蛋白等,从而调控细胞凋亡^[27]。

总而言之,新一代 XPO1 抑制剂 KPT-8602 可使 U937 细胞活力下降,使细胞周期阻滞于 G1 期,诱导细胞凋亡,其机制可能与下调 XPO1 表达,抑制 PI3K/AKT 通路有关。我们的研究结果支持了 KPT-8602 作为 NHL 患者的新型治疗策略具有一定的前景, KPT-8602 与其他抗肿瘤药物联合使用的效果如何,仍需进一步的体外和体内实验或临床试验来验证。

参考文献

- [1] Xu D, Grishin NV, Chook YM. NESdb: a database of NES-containing CRM1 cargoes [J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(18):3673-3676.
- [2] Nie D, Huang K, Yin S, et al. KPT-330 inhibition of chromosome region maintenance 1 is cytotoxic and sensitizes chronic myeloid leukemia to Imatinib [J]. *Cell Death Discov*, 2018, 4:48-60.
- [3] Etchin J, Montero J, Berezovskaya A, et al. Activity of a selective inhibitor of nuclear export, selinexor (KPT-330), against AML-initiating cells engrafted into immunosuppressed NSG mice [J]. *Leukemia*, 2016, 30(1):190-199.
- [4] Subhash VV, Yeo MS, Wang L, et al. Anti-tumor efficacy of Selinexor (KPT-330) in gastric cancer is dependent on nuclear accumulation of p53 tumor suppressor [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):12248-12257.
- [5] Como C, Stucchi S, De Cesare M, et al. FoxO-1 contributes to the efficacy of the combination of the XPO1 inhibitor selinexor and cisplatin in ovarian carcinoma preclinical models [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 147:93-103.
- [6] Mahipal A, Malafa M. Importins and exportins as therapeutic targets in cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 164:135-143.
- [7] Vogl DT, Dingli D, Cornell RF, et al. Selective Inhibition of Nuclear Export With Oral Selinexor for Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(9):859-866.
- [8] Chen C, Siegel D, Gutierrez M, et al. Safety and efficacy of selinexor in relapsed or refractory multiple myeloma and Waldenstrom macroglobulinemia [J]. *Blood*, 2018, 131(8):855-863.
- [9] Etchin J, Berezovskaya A, Conway AS, et al. KPT-

- 8602, a second-generation inhibitor of XPO1-mediated nuclear export, is well tolerated and highly active against AML blasts and leukemia-initiating cells[J]. *Leukemia*, 2017, 31(1):143-150.
- [10] Kuruvilla J, Savona M, Baz R, et al. Selective inhibition of nuclear export with selinexor in patients with non-Hodgkin lymphoma [J]. *Blood*, 2017, 129(24):3175-3183.
- [11] Gravina GL, Senapedis W, Mccauley D, et al. Nucleo-cytoplasmic transport as a therapeutic target of cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7(1):85-94.
- [12] Gousias K, Niehusmann P, Gielen GH, et al. Karyopherin $\alpha 2$ and chromosome region maintenance protein 1 expression in meningiomas: novel biomarkers for recurrence and malignant progression [J]. *J Neurooncol*, 2014, 118(2):289-296.
- [13] Zhou F, Chen E, You D, et al. Both high expression of nucleophosmin/B23 and CRM1 predicts poorer prognosis in human gastric cancer [J]. *APMIS*, 2016, 124(12):1046-1053.
- [14] Sun Y, Xie J, Xie H, et al. Expression of CRM1 and CDK5 shows high prognostic accuracy for gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(11):2012-2022.
- [15] Liu X, Chong Y, Tu Y, et al. CRM1/XPO1 is associated with clinical outcome in glioma and represents a therapeutic target by perturbing multiple core pathways [J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1):108-122.
- [16] Ishizawa J, Kojima K, Hail N, et al. Expression, function, and targeting of the nuclear exporter chromosome region maintenance 1 (CRM1) protein [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 153:25-35.
- [17] Noske A, Weichert W, Niesporek S, et al. Expression of the nuclear export protein chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 is a prognostic factor in human ovarian cancer [J]. *Cancer*, 2008, 112(8):1733-1743.
- [18] VAN DER Watt PJ, Zemanay W, Govender D, et al. Elevated expression of the nuclear export protein, Crm1 (exportin 1), associates with human oesophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(2):730-738.
- [19] Azmi AS, Al-Katib A, Aboukameel A, et al. Selective inhibitors of nuclear export for the treatment of non-Hodgkin's lymphomas [J]. *Haematologica*, 2013, 98(7):1098-1106.
- [20] Etchin J, Sun Q, Kentsis A, et al. Antileukemic activity of nuclear export inhibitors that spare normal hematopoietic cells [J]. *Leukemia*, 2013, 27(1):66-74.
- [21] Vercauteren T, De Bie J, Neggers J E, et al. The Second-Generation Exportin-1 Inhibitor KPT-8602 Demonstrates Potent Activity against Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(10):2528-2541.
- [22] Liu X, Chong Y, Liu H, et al. CRM1 inhibitor S109 suppresses cell proliferation and induces cell cycle arrest in renal cancer cells [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2016, 20(2):161-168.
- [23] Tai Y, Landesman Y, Acharya C, et al. CRM1 inhibition induces tumor cell cytotoxicity and impairs osteoclastogenesis in multiple myeloma: molecular mechanisms and therapeutic implications [J]. *Leukemia*, 2014, 28(1):155-165.
- [24] Liu H, Xu J, Zhou L, et al. Hepatitis B virus large surface antigen promotes liver carcinogenesis by activating the Src/PI3K/Akt pathway [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(24):7547-7557.
- [25] Schatz J H. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in Non-Hodgkin's lymphoma: Results, biology, and development strategies [J]. *Curr Oncol Rep*, 2011, 13(5):398-406.
- [26] Wang L, Cao X, Chen Q, et al. DIXDC1 targets p21 and cyclin D1 via PI3K pathway activation to promote colon cancer cell proliferation [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(10):1801-1808.
- [27] Shultz JC, Goehle RW, Wijesinghe DS, et al. Alternative splicing of caspase 9 is modulated by the phosphoinositide 3-Kinase/Akt pathway via phosphorylation of SRp30a [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22):9185-9196.

(编辑 孙慧兰)