DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2019.08.002

·研究快报·

莱菔素通过阻断STAT3信号通路杀伤三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-468和MDA-MA-231

高久蕉,张琦,杨永亮(大连理工大学 生物工程学院 分子药物中心,辽宁 大连 116024)

[摘 要] **目的**:探讨染色体区域维持因子1(CRM1)抑制剂莱菔素(LFS-01)通过抑制信号转导及转录激活因子3(STAT3)信号通路杀伤三阴性乳腺癌(TNBC)细胞的作用及其机制。**方法**:通过分子动力学模拟技术,验证LFS-01是否可与CRM1分子结构上的核输出信号(NES)口袋结合。通过CCK-8法检测LFS-01对4种不同的乳腺癌细胞杀伤活力。用不同浓度的LFS-01处理TNBC细胞MDA-MB-468和MDA-MB-231,免疫荧光法检测CRM1货物蛋白STAT3以及带有NES序列的蛋白在细胞内定位的变化;WB检测LFS-01对STAT-3信号通路以及其下游蛋白表达的影响;WB、细胞免疫荧光和透射电镜法检测自噬的发生;通过流式细胞术检测药物对细胞周期和凋亡的影响。**结果**:分子动力学模拟结果表明,LFS-01能够与CRM1的NES口袋结合,显示其在结构上影响后者蛋白转运功能的可能性。LFS-01能特异性杀伤TNBC细胞MDA-MB-468和MDA-MB-231。10 μmol/L LFS-01处理后TNBC细胞中STAT3和带有NES标签的蛋白均被阻滞于细胞核中,而在对照组中这些蛋白均匀分布在细胞质中。随着LFS-01剂量的提高和处理时间的延长,MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞中磷酸化STAT3蛋白、Bcl-xL和Cylin D1表达均降低,细胞内自噬标志蛋白LC3B表达上升;同时出现高密度、多层的团状自噬小体;细胞周期阻滞于S期,并且凋亡率显著升高(P<0.05或P<0.01)。**结论**:LFS-01可阻断CRM1运载蛋白出核、进而抑制STAT3信号通路的激活,从而促进TNBC细胞MDA-MB-468和MDA-MB-231发生自噬、细胞周期阻滞和凋亡。

[关键词] 莱菔素;信号转导及转录激活因子3;染色体区域维持因子1;三阴性乳腺癌;MDA-MB-468细胞; MDA-MB-231细胞
[中图分类号] R737.9; R730.5 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2019)08-0837-08

Sulforaphene kills triple negative breast cancer MDA-MB-468 and MDA-MA-231 cells by blocking STAT3 signaling pathway

GAO Jiujiao, ZHANG Qi, YANG Yongliang (Center for Molecular Medicine, School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116023, Liaoning, China)

[Abstract] Objective: To investigate the role and mechanism of chromosomal region maintenance 1 (CRM1) inhibitor sulforaphene (LFS-01) in killing triple negative breast cancer (TNBC) cells by inhibiting signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathways. **Methods:** Whether LFS-01 could combine with the NES pocket of CRM1 was verified by molecular dynamics simulation techniques. The killing activity of LFS-01 on four different breast cancer cell lines was detected by CCK-8 method. TNBC MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells were treated with different concentrations of LFS-01, and the intracellular localization of CRM1 cargo protein STAT3 and protein with NES sequence was detected by immunofluorescence; WB was used to detect the effect of LFS-01 on the expression of STAT-3 signaling pathway and its downstream proteins; WB, cellular immunofluorescence and transmission electron microscopy were adopted to detect the occurrence of autophagy; the effect of LFS-01 on cell cycle and apoptosis was detected by flow cytometry. **Results:** Molecular dynamics simulations showed that LFS-01 can bind to the NES pocket of CRM1, indicating that it may structurally affect the latter's protein transport function. LFS-01 could specifically kill TNBC MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells. STAT3 and NES-tagged proteins were mainly blocked in the nucleus of TNBC cells after the treatment with 10 μmol/L LFS-01, while they were evenly distributed in the cytoplasm in the control group. The expressions of phosphorylated STAT3 protein, Bcl-xL and Cylin D1 were decreased in MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells with the increase of LFS-01 dose and the prolongation of treatment time; the expression of autophagy marker protein LC3B increased, and high-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81874301)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81874301)
[作者简介] 高久蕉(1988-),女,博士生,主要从事抗肿瘤药物的研究,E-mail:gaojiujiao@126.com
[通信作者] 杨永亮(YANG Yongliang,corresponding author),博士,副教授,博士生导师,主要从事抗肿瘤药物的研发,E-mail:everbright99@fox-mail.com

density, multi-layered autophagosomes appeared at the same time; cell cycle arrest was observed in S phase and apoptosis rate was significantly increased (P<0.05 or P<0.01). **Conclusion:** LFS-01 blocks the export of CRM1 carrier protein, thereby inhibiting the activation of STAT3 signaling pathway and promoting autophagy, cell cycle arrest and apoptosis in TNBC MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells.

[Key words] sulforaphene(LFS-01); signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3); chromosomal region maintenance 1 (CRM1); triple-negative breast cancer (TNBC); MDA-MB-468 cell; MDA-MB-231 cell

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(8): 837-844. DOI：10.3872/j.issn.1007-385X.2019.08.002]

三阴性乳腺癌（triple negative breast cancer，TNBC）是指雌激素受体（estrogen receptor，ER）、孕激素受体（progesterone receptor，PR）和人表皮生长因子受体2（human epidermal growth factor receptor 2，HER-2）均为阴性的乳腺癌[1-3]。研究[4]表明，乳腺癌的治疗靶点主要有 乳腺癌易感基因1（breast cancer susceptibility gene 1，BRCA1）、上皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）、血管生成因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）和多聚ADP核糖聚合酶（poly ADP-ribose polymerase，PARP），它们可以通过激活信号转导及转录激活因子3（STAT3）信号通路增强肿瘤细胞的耐药性。染色体区域维持因子1（chromosomal region maintenance 1，CRM1），也称核输出蛋白1（exportin 1，XPO1），在乳腺癌中普遍过度表达，是细胞内重要调控蛋白的运输载体，主要负责将蛋白质和少数RNA从细胞核运输到细胞质中[5-7]。目前发现的CRM1可以运输的蛋白多达265个，这些蛋白被称为CRM1的“货物蛋白”。CRM1运输的货物蛋白大部分是抑癌蛋白，这些抑癌蛋白在肿瘤细胞质中失去抑癌的作用。STAT3是CRM1货物蛋白之一，STAT3信号通路参与调控细胞的免疫、分化、死亡和肿瘤的形成[8-9]。STAT3同时也具有促进干细胞形成的功能[10-11]。SASIDHARAN等[12]研究发现，在乳腺癌细胞中双重抑制STAT1和STAT3的激活可以下调PD-L1的表达。抑制STAT3信号通路的激活，可以作为抑制乳腺癌的有效方法之一。通过天然产物数据库中筛选出CRM1的抑制剂莱菔素（sulforaphene），命名为LFS-01。本研究探讨LFS-01对STAT3的作用，及其对TNBC细胞周期、凋亡和自噬的影响，以期为乳腺癌的治疗提供新的靶点。

1　材料与方法

1.1　细胞与主要试剂

人乳腺上皮细胞MCF10A，TNBC细胞MDA-MB-231、MDA-MB-468，HER2阳性乳腺癌细胞MCF-7和三阳乳腺癌细胞BT-474均来源于美国ATCC细胞库。核输出信号（nuclear export signal，NES）-GFP质粒由徐州医学院临床学院内科学（血液病）实验室惠赠，GFP-LC3质粒（#11546）购自Addgene公司，Lipofectamine™2000购自美国Invitrogen公司，STAT3（#9139）、phospho-STAT3（#9145）、Actin（#3700）、Bcl-xL（#2764）、Cyclin D1（#2978）、LC3A/B（#4108）抗体购自美国CST公司，凋亡检测试剂盒（#88-8005）购自美国Thermo Fisher Scientific公司。激光共聚焦显微镜（#FV-1000）购自Olympus公司。

1.2　CCK-8法检测LFS-01对乳腺癌细胞及人乳腺上皮细胞增殖的影响

待4种乳腺癌细胞（MDA-MB-231、MDA-MB-468、MCF-7、BT-474）和人乳腺上皮细胞MCF10A生长至对数生长期，消化细胞后接种到96孔板中，每孔3×10^3个细胞。隔天加入药物LFS-01（配制LFS-01工作液50 μmol/L，按照2倍稀释法，稀释为10个药物梯度），加入细胞后培养72 h，加入CCK-8试剂检测波长450 nm处光密度（D）值，通过Graphpad prism软件计算LFS-01对5种细胞的IC_{50}值。

1.3　细胞免疫荧光法检测LFS-01对MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞自噬的影响

将GFP-LC3质粒稀释于无血清的细胞培养基中，将Lipofectamine™ 2000脂质体稀释在无血清的培养基，分别静置5 min，混合两种溶液静置20 min，将混合液加入MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞中，培养6 h，更换为正常培养基培养24 h。加入药物LFS-01处理24 h后收集细胞样品。通过常规的细胞免疫荧光方法处理细胞，最后通过激光共聚焦显微镜观察。以细胞中出现的高荧光强度、点状形态的结构即自噬体。相反，细胞中荧光大部分均匀分布的状态，认为是细胞处于无自噬或者少量自噬的状态。

1.4　透射电子显微镜技术检测LFS-01对MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞自噬的影响

LFS-01处理MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞24 h后，常温离心、吸去上清，缓慢加入2.5%戊二醛，4 ℃固定过夜。第2天离心取细胞沉淀，用PBS缓冲液洗细胞后离心，加入1%锇酸再次固定细胞2.5 h，PBS洗一次后离心；30%、50%、70%、80%丙酮梯度脱水，每级作用时间30 min；纯丙

酮作用3次。渗透后包埋：将处理好的样品放入包埋板中，45 ℃聚合12 h，60 ℃聚合48 h；在超薄机上切片，柠檬铅染色15 min，双蒸水清洗3次，醋酸铀染色30 min，双蒸水清洗3次。待干燥后上机观察自噬小体，拍照。

1.5 细胞免疫荧光染色检测LFS-01对TNBC细胞中核蛋白转运的影响

0、10 μmol/L LFS-01分别处理已转染NES-GFP质粒的MDA-MB-231细胞3 h后，多聚甲醛室温固定细胞15 min，PBS洗3次。用含有0.5% Triton-X100的PBS室温通透15 min，PBS洗3次，加入封闭液37 ℃封闭1 h，加入一抗工作液4 ℃过夜保存。第2天洗去一抗，加入荧光二抗室温孵育1 h，PBS洗3次，加入细胞核染料Hoechst室温孵育10 min，洗去游离染料，使用单光子激光共聚焦显微镜观察结果。

1.6 WB检测LFS-01对细胞内IL-6/STAT3信号通路相关蛋白表达的影响

MDA-MB-231和MDA-MB-468细胞经过0、5、10、20、30 μmol/L LFS-01处理48 h，其中MDA-MB-231细胞P-STAT3蛋白本底表达水平较低，在加入LFS-01处理前，先加入10 ng/ml IL-6诱导细胞15 min。胰酶消化细胞，离心收集细胞沉淀，加入RIPA（含有PMSF蛋白酶抑制剂）裂解细胞，超声破碎细胞后冰上放置0.5 h，15 000×g离心15 min，取上清，使用BCA试剂盒定量蛋白质浓度；沸水煮10 min蛋白质变性，SDS-PAGE分离蛋白后，转移至PVDF膜；用含有5%脱脂奶粉TBST溶液封闭1 h，将含有蛋白的PVDF膜孵育在一抗（STAT3、phospho-STAT3、Actin、Bcl-xL、Cyclin D1、LC3A/B抗体）溶液（1∶1 000）中4 ℃过夜。第2天TBST洗去一抗，孵育HRP标记的IgG二抗（1∶4 000），TBST洗涤，加入HR发光液，通过凝胶成像仪观察并分析结果。

1.7 PI-单染流式术检测LFS-01对细胞周期的影响

0、5 μmol/L LFS-01分别处理MDA-MB-231和MDA-MB-468细胞24 h后，胰酶消化细胞，离心取细胞沉淀，PBS洗一遍后，加入预冷的80%乙醇中－20 ℃过夜，第2天PBS清洗1次，加入含有RNase A（100 μg/ml）、Triton X-100（0.2%）的PI染料（50 μg/ml）室温处理20 min，直接上机观察细胞周期的改变。

1.8 Annexin V/PI双染流式术检测LFS-01诱导细胞凋亡

0、10、20 μmol/L LFS-01分别处理MDA-MB-231和MDA-MB-468细胞8 h，经胰酶轻柔消化细胞，离心取细胞沉淀，PBS洗1次，加入Annexin V室温处理15 min，离心5 min收集细胞，用1×结合缓冲液清洗细胞，加入PI工作液，室温孵育20 min，流式细胞仪检测细胞凋亡的变化。

1.9 计算机模拟验证LFS-01与CRM1的结合

CRM1蛋白结构来自PDB（Protein Databank）数据库（PDB code：5ZPU）。5ZPU的晶体结构验证了CRM1与实验室前期发现的异硫氰酸酯结构LFS-829结合。为了方便计算，模拟计算均采用了CRM1的NES结构口袋部分。在验证CRM1和LFS-01分子对接试验中，采取了本实验室自主研发的FIPSDock工具，分子结构的图片通过软件PyMOL展示。

1.10 统计学处理

应用GraphPad Prism 6.0软件，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，两组间数据比较采用t检验。以$P<0.05$或$P<0.01$表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LFS-01特异性杀伤TNBC细胞

LFS-01结构见图1A，通过分子动力学模拟结果（图1B）显示LFS-01可以稳定地结合在CRM1的NES口袋中。如图所示，LFS-01的异硫氰酸酯键与CRM1的cys528位点接近，具有形成共价键的可能，导致CRM1丧失运输货物蛋白的功能。

CCK-8法检测结果（图1C、D）显示，LFS-01杀伤MDA-MB-468、MDA-MB-231、MCF-7、BT-474和MCF10A细胞的IC_{50}值分别为5.88、11.72、15.76、20.29和82 073 μmol/L。

2.2 LFS-01阻滞NES-GFP和STAT3在MDA-MB-468细胞核中

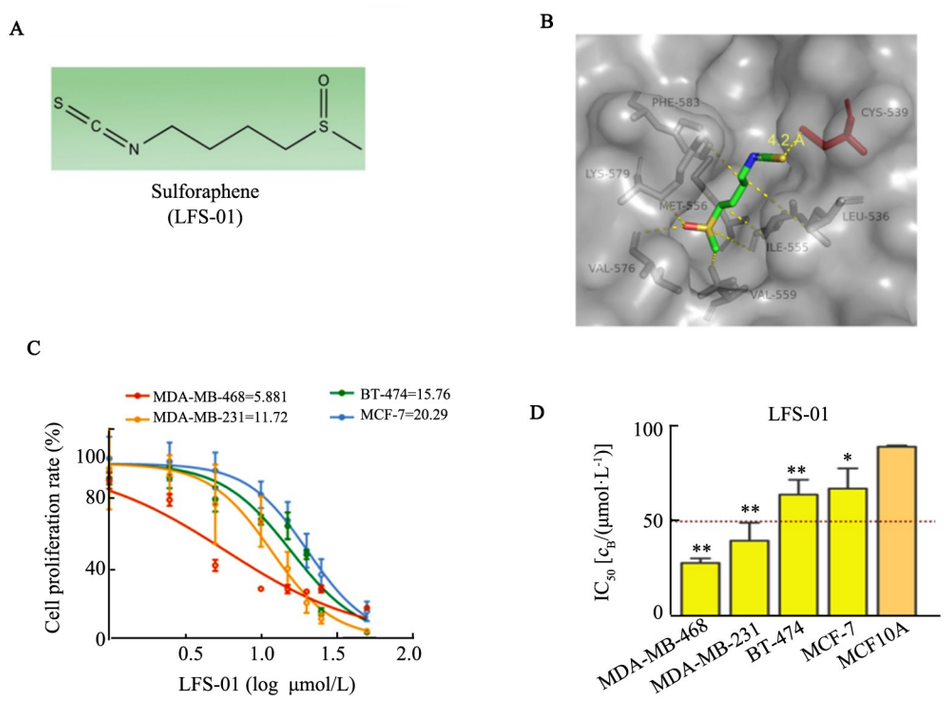
细胞免疫荧光实验检测结果（图2A）显示，10 μmol/L LFS-01处理组MDA-MB-468细胞中NES-GFP阻滞在细胞核中，而对照组NES-GFP荧光分布在细胞质中。

10 μmol/L LFS-01处理MDA-MB-468细胞3 h，固定细胞后孵育STAT3抗体，通过常规细胞免疫荧光实验，观察LFS-01对STAT3在细胞内分布的变化。结果如图2B所示，STAT3在对照组细胞中，主要分布在细胞质中，少量分布在细胞核中。LFS-01处理后，STAT3主要分布到细胞核中，少量分布在细胞质中。

2.3 LFS-01抑制TNBC细胞IL-6/STAT3信号通路的激活

WB实验检测结果显示，随着LFS-01剂量的提高和处理时间的延长，MDA-MB-468细胞中磷酸化STAT3蛋白表达降低，总STAT3蛋白表达不变，同时

STAT3下游信号通路蛋白Bcl-xL和Cylin D1表达水平下降（图3A、C、E）。对于MDA-MB-231细胞，在10 ng/ml IL-6存在条件下，随着LFS-01剂量的提高和处理时间的延长，MDA-MB-231细胞中磷酸化STAT3蛋白表达同样发生下降，总STAT3蛋白表达不变，同时STAT3下游信号蛋白Bcl-xL和Cylin D1表达水平下降（图3B、D、F）。

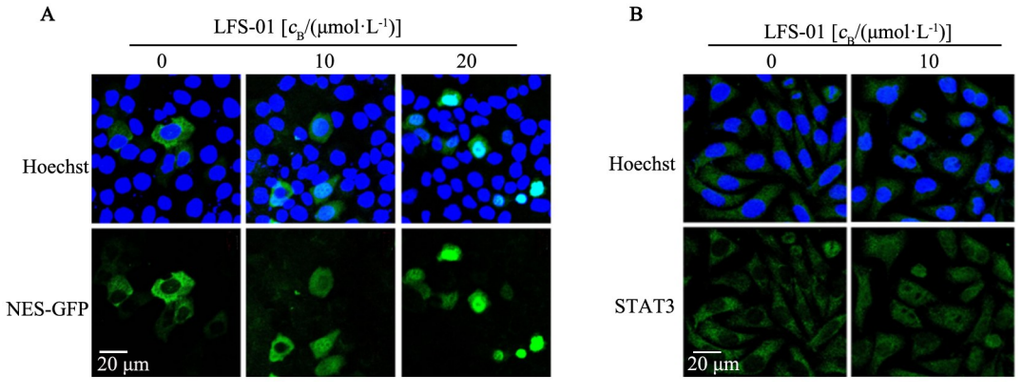


** P<0.01, * P<0.05 *vs* MDA-MB-468 or MDA-MB-231 cells

A: Structure of sulforaphene (LFS-01); B: LFS-01 covalently binds to the NES-pocket of CRM1 after 20 ns MD simulation, CRM1 is presented in grays, Cys528 are colored red, LFS-01 is presented in colored according to elements; C and D: Comparison of IC_{50} values of LFS-01 against indicated cell lines

图1　LFS-01通过靶向CRM1特异性杀伤TNBC细胞

Fig.1　LFS-01 selectively killed TNBC cells by targeting CRM1



A: Effect of LFS-01 on the distribution of NES-GFP in MDA-MB-468 cells;

B: Effect of LFS-01 on the distribution of STAT3 in MDA-MB-468 cells. Green: NES-GFP or STAT3; Blue: Nucleus

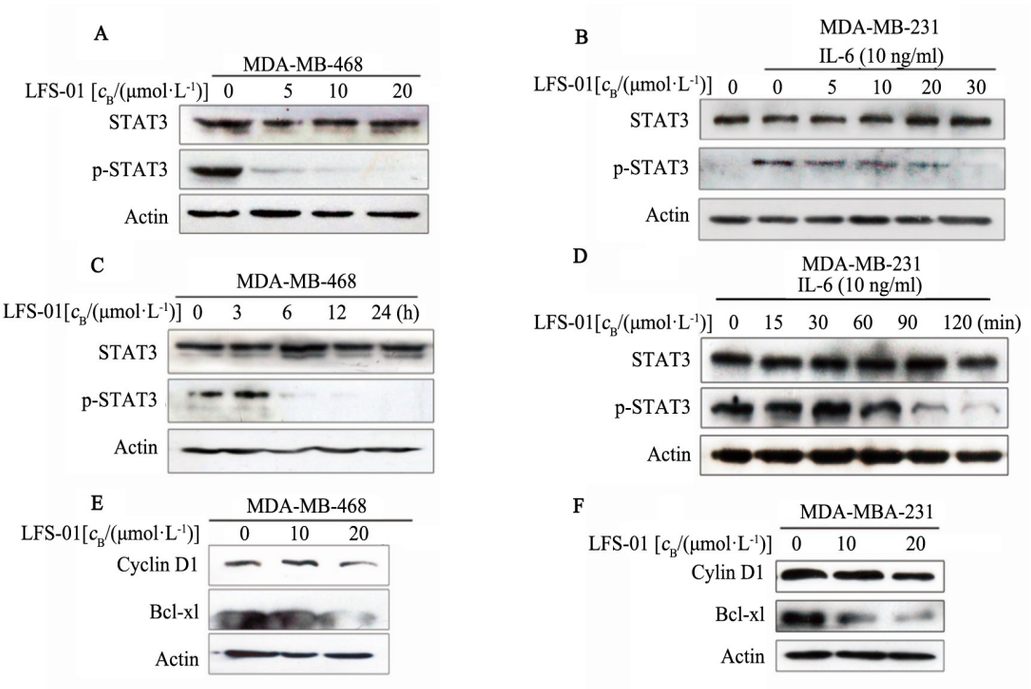
图2　LFS-01阻滞NES-GFP和STAT3在TNBC细胞核中

Fig. 2　LFS-01 blocked NES-GFP (A) and STAT3 (B) in nucleus of TNBC cells

2.4　LFS-01诱导TNBC细胞发生自噬

WB检测结果（图4A）显示，随着LFS-01剂量增加，MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞内自噬相关蛋白LC3B的表达呈上升趋势。免疫荧光检测结果

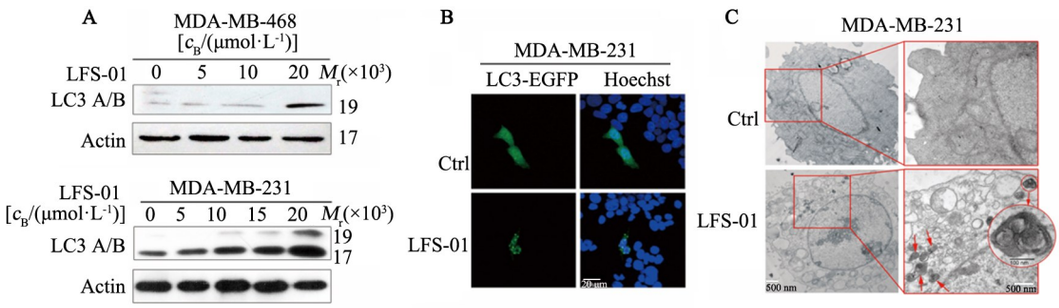
（图4B）显示，转染带有LC3-GFP标签的质粒进入MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞后，对照组细胞内荧光分布均匀；经10 μmol/L LFS-01处理后，处理组荧光出现明显点状分布，代表自噬小体的出现。电子透射电镜观察（图4C）到，LFS-01处理组细胞出现了明显的高密度、多层的团状自噬小体结构。



A: MDA-MB-468 cells were treated with indicated LFS-01 for 48 h. The cell extractions were detected with STAT3, p-STAT3 and actin antibody by immunoblotting; B: MDA-MB-231 cells were pretreated with IL-6 as indicated. Then the cells were further treated with indicated LFS-01. The cell extractions were detected with STAT3, p-STAT3; C: MDA-MB-468 cells were treated with 10 μmol/L LFS-01 for 0, 3, 6, 12, 24 h. STAT3, p-STAT3 were detected by immunoblotting; D: MDA-MB-231 cells were pretreated with IL-6 as indicated. Then the cells were further treated with 10 μmol/L LFS-01 for 0, 15, 30, 90, 60, 120 min. STAT3, P-STAT3 were then detected; E, F: Cyclin D1 and Bcl-xl as the downstream of STAT3 were detected by immunoblotting

图3 LFS-01抑制TNBC细胞IL-6/STAT3信号通路的激活

Fig. 3 LFS-01 inhibited the activation of IL6/STAT3 signaling pathway in TNBC cells



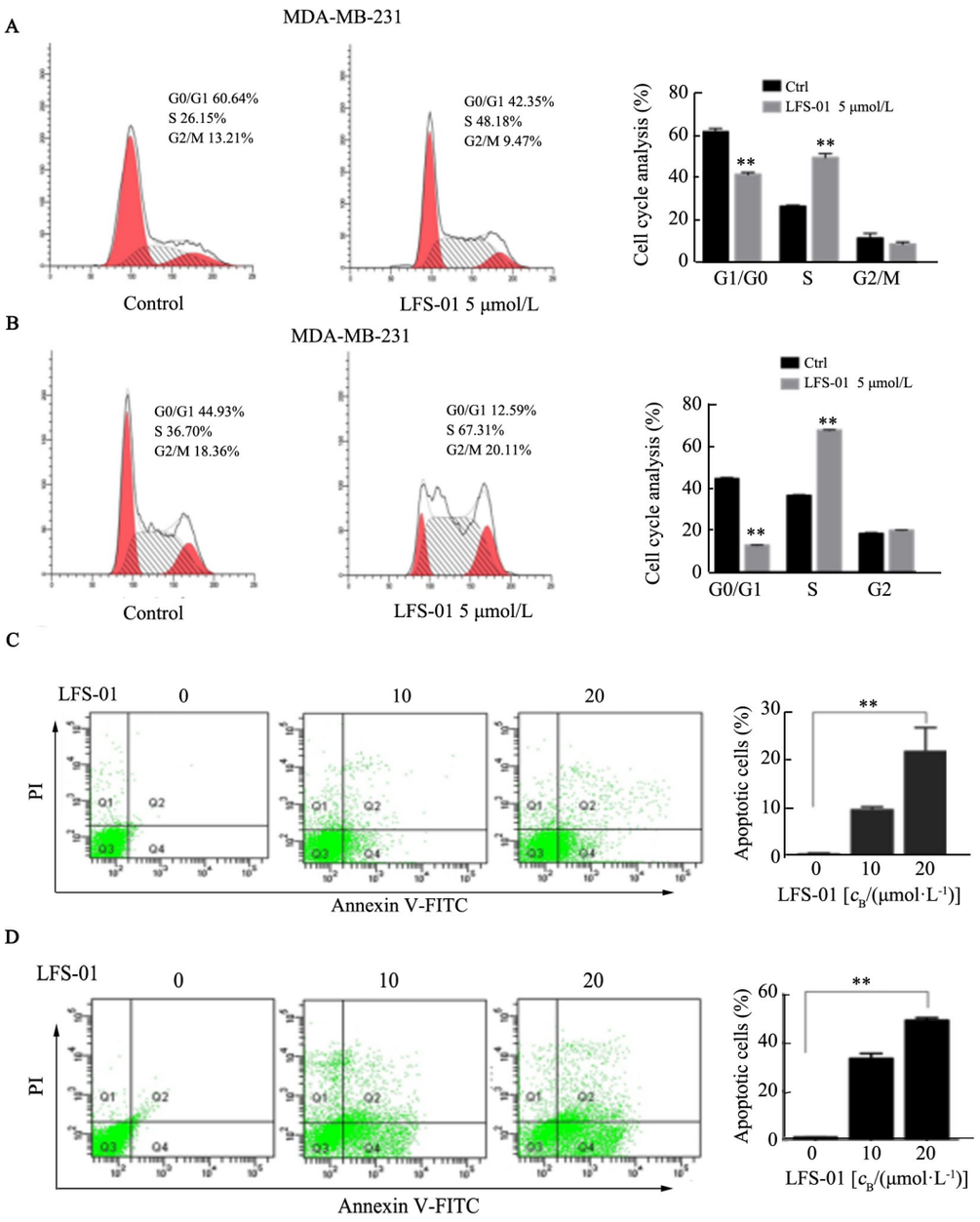
A: MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells were treated with indicated concentration of LFS-01, and LC3A/B protein was detected by immunoblotting; B: MDA-MB-231 cells were transfected with 2 μg of E-GFP-LC3 construct. After 24 h transfection, cells were treated with LFS-01 (10μmol/L) for additional 24 h, the localization of LC3 was examined by confocal microscopy; C: The effect of LFS-01 treatment (10 μmol/L for 24 h) on autophagy in MDA-MB-231 cells was observed by transmission electron microscopy. Red arrow indicates autophagosome

图4 LFS-01诱导TNBC细胞发生自噬

Fig. 4 LFS-01 induced autophagy of TNBC cells

2.5　LFS-01阻滞TNBC细胞周期进程并诱导凋亡

经LFS-01处理MDA-MB-231和MDA-MB-468细胞，流式术检测结果（图5A、B）显示，LFS-01处理组G1期细胞减少、S期细胞明显增多（P<0.05或P<0.01），G2/M期无明显改变；细胞凋亡率（图5C、D）随着药物浓度增加而增高，在LFS-01（10、20 μmol/L）作用下，MDA-MB-231细胞早期凋亡率分别是（9.57±4.5）%、（21.68±16.2）%，MDA-MB-468细胞早期凋亡率分别是（33.5±4.4）%、（49.25±1.5）%（P<0.05或P<0.01）。



$^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01 *vs* Ctrl group.

A amd B: MDA-MB-231 (A) and MDA-MB-468 (B) cells were treated with 5 μmol/L LFS-01 for 24 h;

C and D: MDA-MB-231 (C) and MDA-MB-468 (D) cells were treated with 10 and 20 μmol/L LFS-01 for 48 h

图5　LFS-01对TNBC细胞周期和凋亡的影响

Fig. 5　Effects of LFS-01 on TNBC cell cycle and cell apoptosis

3　讨　论

目前CRM1抑制剂仍处于研发阶段，尚无上市药物。其中LMB（leptomycin B）作为CRM1的天然产物抑制剂，具有选择性强、专一性高的特点，但LMB毒性较大，不具备开发临床药物的潜能[13-14]。CRM1

抑制剂中selinexor（KPT-330）目前处于临床III期研究阶段[15-16]。Selinexor具有高度选择性和强专一性[17]，但在临床研究也发现其具有很强毒副作用，临床试验开展遇到巨大挑战。因此开发CRM1的低毒性、高选择性的抑制剂迫在眉睫。本课题组前期工作中，从天然产物数据库中筛选出CRM1的天然产物抑制剂莱菔素（LFS-01）[18]，其提取于十字花科萝卜种子中，具有低毒性的特点，本实验中证实LFS-01对正常乳腺细胞毒性明显低于乳腺癌细胞。

CRM1可以调控带有亮氨酸细胞NES蛋白的运输。本实验中通过分子对接和分子动力学模拟证明了LFS-01可稳定结合在CRM1的NES口袋中。LFS-01作为CRM1抑制剂，可以将其货物蛋白STAT3、survivin阻滞在细胞核内[19-20]。本研究表明，LFS-01可以有效降低STAT3的磷酸化水平，其机制可能是如WANG等[21]在较早研究中揭示的，细胞核内的survivin可以与STAT3的转录激活区域结合，从而抑制STAT3的激活。在肿瘤细胞中，STAT3信号通路在肿瘤的发生发展中发挥重要调控的功能，并且有利于肿瘤耐药性。STAT3的激活主要受肿瘤微环境中以及细胞内的多种细胞因子诱导的，如EGF、IL-5、IL-6等。本研究中LFS-01可以有效抑制IL-6诱导的磷酸化STAT3的表达，说明LFS-01可以直接抑制STAT3的激活，也可以抑制IL-6/STAT3信号通路的激活。

细胞核内的STAT3有利于自噬的发生。KROEMER团队[22-23]筛选出一系列STAT3抑制剂，这些抑制剂都可以诱发自噬的发生。值得注意的是，通过siRNA技术干扰STAT3的表达可以促进自噬的发生。本研究证明，LFS-01通过将STAT3阻滞细胞核内促进自噬的发生，并且可以诱导细胞周期阻滞以及促进凋亡的发生。

综上所述，LFS-01作为CRM1共价抑制剂，通过抑制STAT3信号通路的激活促进自噬的发生，并且通过将细胞周期阻滞在S期抑制乳腺癌细胞生长，最终导致细胞发生凋亡。同时LFS-01具有较低的毒性，可以作为良好的先导化合物，LFS-01提供了稳定性的CRM1抑制剂骨架结构，本课题组正在设计和优化其衍生物。本研究为LFS-01应用于TNBC的治疗提供了实验依据。

[参 考 文 献]

[1] 陈万青, 张思维, 曾红梅, 等. 中国2010年恶性肿瘤发病与死亡[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(1): 1-10. DOI:10.11735/j.issn.1004-0242.2014.01.A001.

[2] JHAN J R, ANDRECHEK E R. Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy[J]. Pharmacogenomics, 2017, 18 (17): 1595-1609. DOI:10.2217/pgs-2017-0117.

[3] 蔡铭泉, 陈强, 施纯枚. 受体三阴性乳腺癌的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14(3): 283-287. DOI:10.3969/j.issn.1009-0460.2009.03.024.

[4] BRODIE K M, HENDERSON B R. Characterization of BRCA1 protein targeting, dynamics, and function at the centrosome[J]. J Biol Chem, 2012, 287(10): 7701-7716. DOI:10.1074/jbc.m111.327296.

[5] FORNEROD M, OHNO M, YOSHIDA M, et al. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals[J]. Cell, 1997, 90 (6): 1051-1060.

[6] NIU M S, WU S J, MAO L, 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): 1042-1052. DOI: 10.1111 / tra.12090.

[7] KIM J, MCMILLAN E, KIM H S, et al. XPO1-dependent nuclear export is a druggable vulnerability in KRAS-mutant lung cancer[J]. Nature, 2016, 538(7623): 114-117. DOI:10.1038/nature19771.

[8] YU H, LEE H, HERRMANN A, et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(11): 736-746. DOI:10.1038/nrc3818.

[9] BANERJEE K, RESAT H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review[J]. Int J Cancer, 2016, 138(11): 2570-2578. DOI:10.1002/ijc.29923.

[10] BEKAII-SAAB T, EL-RAYES B. Identifying and targeting cancer stem cells in the treatment of gastric cancer[J]. Cancer, 2017, 123 (8): 1303-1312. DOI:10.1002/cncr.30538.

[11] LI Y Z, ROGOFF H A, KEATES S, et al. Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(6): 1839-1844. DOI: 10.1073 / pnas.1424171112.

[12] SASIDHARAN NAIR V, TOOR S M, ALI B R, et al. Dual inhibition of STAT1 and STAT3 activation downregulates expression of PD-L1 in human breast cancer cells[J]. Expert Opin Ther Targets, 2018, 22(6): 547-557. DOI:10.1080/14728222.2018.1471137.

[13] SUN Q X, CARRASCO Y P, HU Y C, et al. Nuclear export inhibition through covalent conjugation and hydrolysis of Leptomycin B by CRM1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(4): 1303-1308. DOI:10.1073/pnas.1217203110.

[14] NISHI K, YOSHIDA M, FUJIWARA D, et al. Leptomycin B targets a regulatory cascade of CRM1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression[J]. J Biol Chem, 1994, 269(9): 6320-6324.

[15] KASHYAP T, ARGUETA C, ABOUKAMEEL A, et al. Selinexor, a selective inhibitor of nuclear export (SINE) compound, Acts through NF-κB deactivation and combines with proteasome inhibitors to synergistically induce tumor cell death[J]. Oncotarget, 2016, 7(48): 78883-78895. DOI:10.18632/oncotarget.12428.

[16] ABDUL RAZAK A R, MAU-SOERENSEN M, GABRAIL N Y, et al. First-in-class, first-in-human phase I study of selinexor, a selec-

tive inhibitor of nuclear export, in patients with advanced solid tumors[J]. J Clin Oncol, 2016, 34(34): 4142-4150. DOI:10.1200/JCO.2015.65.3949.

[17] MACHLUS K R, WU S K, VIJEY P, et al. Selinexor-induced thrombocytopenia results from inhibition of thrombopoietin signaling in early megakaryopoiesis[J]. Blood, 2017, 130(9): 1132-1143. DOI:10.1182/blood-2016-11-752840.

[18] WU S J, ZHANG K R, QIN H Q, et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) revisited: Covalent modulation of XPO1/CRM1 activities and implication for its mechanism of action[J]. Chem Biol Drug Des, 2017, 89(5): 655-662. DOI:10.1111/cbdd.12905.

[19] KNAUER S K, KRÄMER O H, KNÖSEL T, et al. Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin[J]. FASEB J, 2007, 21(1): 207-216. DOI:10.1096/fj.06-5741com.

[20] CHENG Y, HOLLOWAY M P, NGUYEN K, et al. XPO1 (CRM1) inhibition represses STAT3 activation to drive a survivin-dependent oncogenic switch in triple-negative breast cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2014, 13(3): 675-686. DOI: 10.1158 / 1535-7163. MCT-13-0416.

[21] WANG H J, HOLLOWAY M P, MA L, et al. Acetylation directs survivin nuclear localization to repress STAT3 oncogenic activity[J]. J Biol Chem, 2010, 285(46): 36129-36137. DOI: 10.1074 / jbc. M110.152777.

[22] NISO-SANTANO M, SHEN S S, ADJEMIAN S, et al. Direct interaction between STAT3 and EIF2AK2 controls fatty acid-induced autophagy[J]. Autophagy, 2013, 9(3): 415-417. DOI: 10.4161 / auto.22910.

[23] SHEN S S, NISO-SANTANO M, ADJEMIAN S, et al. Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity[J]. Mol Cell, 2012, 48(5): 667-680. DOI:10.1016/j.molcel.2012.09.013.

［收稿日期］ 2019-04-16　　［修回日期］ 2019-07-18
［本文编辑］ 黄静怡