

蛋白质亚细胞定位调控技术在抗肿瘤治疗中的应用

刘芳瑜 凌能 叶茂*

(湖南大学生物学院, 长沙 410082)

摘要 蛋白质亚细胞定位的精确调控对于理解细胞功能、疾病机制以及开发新型治疗策略具有重要意义。近年来, 随着蛋白质亚细胞定位调控技术的快速发展和不断完善, 为基础生物学研究和临床应用开辟了新途径。该文详细介绍了蛋白质亚细胞定位的分子机制、蛋白质异常定位与肿瘤的关系、调控蛋白质亚细胞定位的技术及其在抗肿瘤治疗中的应用进展, 并对该领域的未来发展趋势进行了展望。

关键词 蛋白质; 亚细胞定位; 调控技术; 肿瘤

Application of Protein Subcellular Localization Regulatory Technology in Anti-Tumor Therapy

LIU Fangyu, LING Neng, YE Mao*

(College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract Precise control of protein subcellular localization is critical for understanding cellular function, disease pathogenesis, and therapeutic development. Recent advances in localization-regulating technologies have opened up new opportunities in both fundamental research and clinical translation. This article systematically summarizes the molecular mechanisms governing protein localization, the dysregulation of protein localization in cancer, emerging techniques controlling protein localization, and applications of these techniques in antitumor therapy. Finally, future development trends in this field are discussed.

Keywords protein; subcellular localization; regulatory technology; tumor

蛋白质作为基因功能的主要执行者, 需要在正确的亚细胞区室中定位才能正常发挥功能, 以维持细胞内多种复杂的生化过程的高效进行, 保证细胞正常的生命活动^[1]。因此, 蛋白质亚细胞定位与其功能密切相关^[2], 蛋白质定位的异常往往导致肿瘤的发生发展。目前, 调控蛋白质亚细胞定位已被证实为抗肿瘤治疗的有效策略, 调控蛋白质亚细胞定位的技术虽处于起步阶段, 但发展迅速并在抗肿瘤应用中展现出极大应用潜力。本文主要介绍了蛋白质

亚细胞定位的分子机制、异常蛋白质亚细胞定位与肿瘤发生发展的关系, 调控蛋白质亚细胞定位的技术及其在抗肿瘤治疗中的应用进展, 并对该领域的未来发展趋势进行了展望。

1 蛋白质的亚细胞定位及调控机制

1.1 蛋白质亚细胞定位

真核细胞通过膜性区室来组织其内部结构, 每个区室都有其特定的结构和功能, 并通过复杂的运

收稿日期: 2025-08-27

接受日期: 2025-10-16

国家重点研发计划(批准号: 2021YFA0909400)和国家自然科学基金(批准号: 92253201、32350026、22334005)资助的课题

*通信作者。E-mail: goldleaf@hnu.edu.cn

Received: August 27, 2025

Accepted: October 16, 2025

This work was supported by the National Key R&D Program of China (Grant No.2021YFA0909400) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.92253201, 32350026, 22334005)

*Corresponding author. E-mail: goldleaf@hnu.edu.cn

输系统在这些区室之间传递分子。这些区室主要包括胞质、胞核、内质网、高尔基体、线粒体、溶酶体和过氧化物酶体等。根据主要定位区域,蛋白质可大致分为膜蛋白、胞质蛋白和核蛋白三大类,每类蛋白质的定位特征与其生物学功能密切相关。膜蛋白是一类能够结合或整合到细胞质膜或细胞器膜上的蛋白质^[3],负责物质运输、信号转导、催化反应、细胞识别与黏附和细胞通讯等功能;胞质蛋白是位于细胞质基质中的蛋白质,包括微管蛋白(如 α/β 微管蛋白)、核糖体蛋白等结构蛋白,以及参与代谢和信号调控的酶类;而核蛋白则是指存在于细胞核内,与核酸结合的蛋白质总称,主要参与遗传信息存储、复制、修复及表达调控。

1.2 蛋白质亚细胞定位的调控机制

1.2.1 运输途径 蛋白质在合成后依赖不同的运输途径到达不同的亚细胞区室,核质运输负责蛋白质在核质之间转运,线粒体运输负责蛋白质进入线粒体,囊泡运输则负责蛋白质在细胞内膜性细胞器之间及向细胞外的转运。上述三种主要运输途径的机制总结如下。

核运输是细胞核与细胞质间物质交换的关键机制,由核孔复合体(nuclear pore complexes, NPCs)介导。蛋白质主要通过自身核定位序列(nuclear localization signal, NLS)或核输出序列(nuclear export signal, NES)与输入蛋白(importins, IMPs)或输出蛋白(exportins, XPOs)结合,并在RanGTP酶循环驱动下实现核质穿梭。如图1A所示,IMPs在细胞质中与携带NLS的货物蛋白结合,形成的复合物通过核孔进入细胞核,RanGTP与输入蛋白结合,引起构象变化,从而释放货物蛋白。相反,exportins在核内与RanGTP及携带NES的货物蛋白形成三元复合物,该复合物转运至细胞质后,RanGTP在RanGAP1作用下水解为RanGDP,导致货物蛋白释放。随后,RanGDP通过核转运因子2(nuclear transport factor 2, NTF2)转运回细胞核,在核苷酸交换因子(nucleotide exchange factor, RanGEF)催化下重新生成RanGTP,完成循环^[4]。

线粒体蛋白转运是一个高度分化的精准过程,如图1B所示,绝大多数线粒体蛋白起始主要依赖外膜转位酶(translocase of outer mitochondrial membrane, TOM)识别带正电氨基酸组成的信号肽,根据最终定位不同分为多条通路。定位到基质的蛋白质通常拥有可被切除的N-端前导肽,通过内膜的

前导肽转位酶23(translocase of inner mitochondrial membrane 23, TIM23)与前导序列移位酶相关马达Pam(presequence translocase-associated motor)复合体进入;定位于内膜的蛋白质则依赖内部的信号序列,通过TIM22插入膜中;定位于外膜蛋白则由SAM(sorting and assembly machinery)复合物协助其进行折叠与锚定;而定位于膜间隙的蛋白质被线粒体MIA(mitochondrial intermembrane space import and assembly)复合物识别并插入,整个过程依赖膜电位维持^[5]。

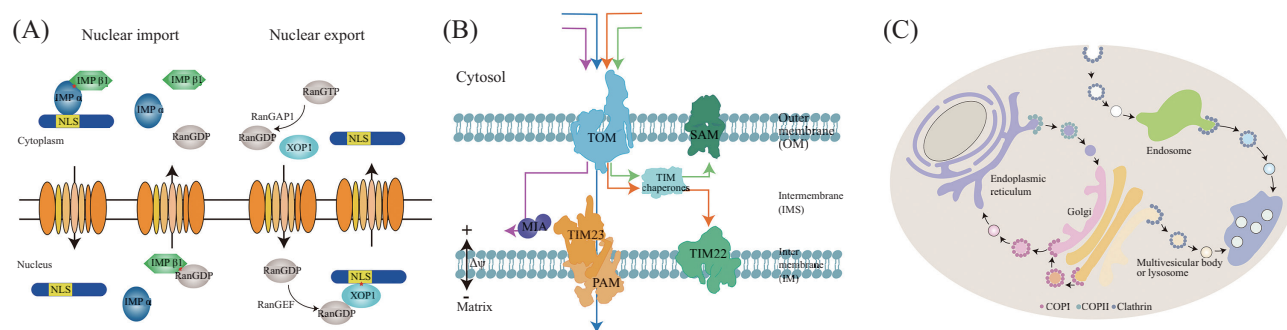
蛋白质在细胞内膜系统内的定向运输主要通过由特定包被蛋白驱动的囊泡运输来实现,该过程确保了货物蛋白在区室间的有序流动。如图1C所示,其运输始于内质网,新合成的蛋白质由COPII包被的囊泡识别并包裹,从内质网出芽,定向运输至顺面高尔基体;而逆向回收(如逃逸的内质网驻留蛋白)则由COPI包被的囊泡负责,将其从高尔基体运回内质网。在高尔基体内,蛋白质经过加工修饰后,其命运发生分选:前往质膜或分泌途径的蛋白质通常由COPI囊泡在高尔基体堆叠间进行运输,而最终定位于内体、多泡体或溶酶体的蛋白质,则通常由网格蛋白包被的囊泡从高尔基体反面或质膜出芽,将其运送至晚期内体或多泡体,并最终与溶酶体融合完成降解。因此,COPII、COPI和网格蛋白这三种关键包被蛋白通过介导不同方向和目的的囊泡转运,共同构成了一个精密的内膜系统运输网络,保证了蛋白质能够准确抵达其功能位点^[6]。

1.2.2 影响蛋白质亚细胞分布的主要因素 蛋白质在细胞区室中的分布主要取决于:(1)蛋白质上定位信号的类型和数量;(2)每个信号的相对强度;(3)自由扩散分子的浓度;(4)定位信号受体的浓度和活性^[7]。细胞通过多重调控机制动态调整蛋白质亚细胞定位,展现出高度的可塑性和适应性,如细胞可以通过调节定位信号的强度(如通过磷酸化掩蔽NLS^[8])、改变受体浓度(如调控核输出蛋白的表达^[9])或重塑区室化特征(如改变线粒体膜电位^[10]),使细胞快速调节蛋白质的亚细胞定位,从而灵活地应对环境变化或执行特定的细胞功能。

2 蛋白质亚细胞定位异常与肿瘤

2.1 肿瘤抑制蛋白核定位丧失与肿瘤

肿瘤抑制蛋白(tumor suppressor proteins, TSPs)



A: 核质运输。该过程由NPCs介导。携带NLS的货物蛋白与IMPs结合,在RanGTP梯度驱动下进入细胞核(核输入,左);携带NES的货物蛋白则与XPOs及RanGTP结合,转运至细胞质(核输出,右)。RanGTP/GDP的核质浓度差由RanGEF和RanGAP维持,确保了运输的单向性。B: 线粒体运输。细胞质中合成的线粒体蛋白通过TOM复合体进入线粒体。随后,其转运路径根据最终定位而分化:前往基质的蛋白通过TIM23复合体并依赖PAM动力系统;定位于内膜的蛋白通过TIM22复合体插入;定位于外膜的蛋白由SAM复合体协助组装;而定位于膜间隙的蛋白则由MIA复合体进行氧化折叠与锚定。C: 囊泡运输。负责蛋白质在内膜系统间的转运。正向运输:COPII包被的囊泡负责将新合成的蛋白质从内质网运输至高尔基体。逆向回收:COPI包被的囊泡负责将蛋白质从高尔基体运回内质网。晚期运输:网格蛋白包被的囊泡负责将货物从高尔基体反面或质膜运输至内体,并最终抵达溶酶体进行降解。NPC:核孔复合体;NLS:核定位信号;IMP:输入蛋白;NES:核输出信号;XPO:输出蛋白;TOM:外膜转位酶;TIM23:内膜的前导肽转位酶;PAM:线粒体输入刺激因子伴侣蛋白。

A: nuclear transport. This process is mediated by NPCs. The cargo protein carrying NLS binds to IMPs and enters the nucleus under the drive of RanGTP gradient (nuclear input, left); the cargo protein carrying NES binds to XPOs and RanGTP and is transported to the cytoplasm (nuclear export, right). The nuclear cytoplasmic concentration difference between RanGTP and GDP is maintained by RanGEF and RanGAP, ensuring the unidirectionality of transportation. B: mitochondrial transport. The mitochondrial proteins synthesized in the cytoplasm enter the mitochondria through TOM complexes. Subsequently, its transport pathway differentiates based on its final localization: proteins heading towards the matrix pass through the TIM23 complex and rely on the PAM dynamical system; proteins located in the endometrium are inserted through the TIM22 complex; proteins located on the outer membrane are assembled with the assistance of SAM complexes; proteins located in the membrane gap are oxidized, folded, and anchored by the MIA complex. C: vesicle transport. This pathways are responsible for the transport of proteins between the endometrial system. Positive transport: the vesicles coated with COPII are responsible for transporting newly synthesized proteins from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. Reverse recycling: COPI coated vesicles are responsible for transporting proteins back from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum. Late-stage transport: vesicles coated with clathrin are responsible for transporting goods from the opposite side of the Golgi apparatus or plasma membrane to the endosome, and ultimately reaching lysosomes for degradation. NPC: nuclear pore complexes; NLS: nuclear localization signal; IMP: importins; NES: nuclear export signal; XPO: exportins; TOM: translocase of outer mitochondrial membrane; TIM23: translocase of inner mitochondrial membrane 23; PAM: presequence translocase-associated motor.

图1 蛋白质亚细胞定位的关键运输途径

Fig.1 Key transport pathways for protein subcellular localization

在肿瘤发生过程中发挥关键作用,许多TSPs需定位于细胞核才能有效抑制细胞周期进程或诱导凋亡。在肿瘤中,TSPs的核质穿梭失调常表现为核输出增加和/或胞质滞留。

例如,p21作为细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)抑制剂,正常情况下定位于细胞核,通过抑制CDK活性阻滞细胞周期进程。但在乳腺癌、结直肠癌等肿瘤中,p21常因异常磷酸化或与伴侣蛋白(如增殖细胞核抗原)相互作用而滞留于细胞质^[11],丧失其周期阻滞功能;p27同样在核内发挥抑癌作用,但在肺癌、前列腺癌等肿瘤中,常因Akt/mTOR通路过度激活导致p27被磷酸化并滞留于胞质^[12],无法抑制周期进展;视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, RB)在核内结合并抑制E2F转录因子,其核输出导致E2F转录因子释放,激活细

胞周期相关基因的表达,驱动肿瘤细胞的增殖^[13];而核输出蛋白XPO1过度活化导致p53、FOXO等抑癌蛋白异常胞质滞留,丧失转录功能,在急性髓系白血病中与化疗耐药密切相关。

2.2 酶蛋白异常定位与肿瘤

酶蛋白的亚细胞定位严格限定了其可接触的底物及所处微环境(如pH、离子),是其正常催化功能的基础。肿瘤中,酶的异常定位使其暴露于“错误”底物或新微环境,常导致其获得全新的催化活性或改变作用模式,驱动促癌进程。

例如,己糖激酶2(hexokinase 2, HK2)正常定位于线粒体外膜参与糖酵解,而在肺癌、胶质母细胞瘤中,HK2常异常定位于细胞核,不仅维持糖酵解功能,还获得磷酸化核内蛋白的能力,激活多种促增殖信号通路^[14],促进肿瘤细胞增殖;类似地,丙酮酸激酶M2亚

型(pyruvate kinase isozyme type M2, PKM2)正常定位于胞质催化糖酵解终产物生成,而在胶质瘤与乳腺癌中,其核转位后获得蛋白激酶活性,磷酸化组蛋白H3,激活促癌基因表达^[15],从而促进肿瘤发生发展。

2.3 受体与信号通路蛋白定位异常与肿瘤

受体和信号分子的正确定位是其接收胞外信号、精确传递并适时终止信号的关键基础。它们在肿瘤中的定位异常会破坏信号转导的时空精确性,导致信号持续性激活、异常通路连接或信号终止障碍,最终驱动不受控的增殖和存活等恶性表型。

例如,膜受体EGFR在肿瘤细胞中因内吞缺陷滞留于细胞膜,导致其介导的生长信号持续激活^[16];RAS家族蛋白(如KRAS)正常定位于质膜需棕榈酰化修饰,修饰异常导致其从质膜脱落至内体或高尔基体,无法在正确的位置有效招募下游效应蛋白(如RAF),反而可能异常激活特定的下游信号通路(如MAPK通路)^[17];核蛋白Ku70正常定位于细胞核参与DNA修复,在结直肠癌中异常转位至胞质,与Ras/Raf组装形成“信号体”,异常激活MEK-ERK通路,抑制凋亡并促进增殖^[18];而在免疫逃逸层面,程序性死亡配体1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)通常表达于肿瘤细胞膜表面与T细胞PD-1结合介导免疫抑制,但在部分免疫治疗抵抗的肿瘤中发现PD-L1异常滞留于内质网和高尔基体,导致膜定位减少削弱免疫检查点抑制剂的疗效^[19]。

2.4 细胞骨架与运动调节蛋白定位异常与肿瘤

参与细胞骨架组织和细胞运动的蛋白需定位于特定亚细胞区域(如细胞皮层、黏着斑、微绒毛)以协调细胞形态和运动。定位异常常导致其过度激活或功能紊乱。例如,细胞骨架调节蛋白Ezrin正常分布于绒毛和细胞皮层,在转移性肿瘤(乳腺癌^[20]和皮肤鳞癌^[21])中异常分布在整个胞质并被过度激活,促进伪足形成,增强肿瘤细胞的运动能力,显著增加淋巴结转移风险。

综上,肿瘤中关键功能蛋白的亚细胞定位异常,通过丧失正常抑癌功能、获得异常促癌活性,导致信号通路持续/错误激活、增强细胞运动能力以及介导治疗抵抗等多种机制,共同驱动了肿瘤的发生、发展、转移和耐药。因此,靶向调控蛋白质的亚细胞定位已成为抗肿瘤药物研发的重要策略。

3 调控蛋白质亚细胞定位技术与应用

蛋白质亚细胞定位的精确调控是干预肿瘤发生发展的新兴策略,调控蛋白质亚细胞定位的技术发展迅速。传统小分子抑制剂通过阻断核转运或激酶信号通路恢复抑癌蛋白功能,纳米颗粒则通过尺寸效应,实现对蛋白质转位的物理拦截,而化学诱导临近策略可通过双功能分子将靶蛋白招募至特点亚细胞位置。下面将详细介绍这几种技术(表1)。

3.1 小分子抑制剂

3.1.1 核输出抑制剂(selective inhibitors of nuclear export, SINE) 核质转运在肿瘤发生发展中至关重要,其中核输出蛋白(exportin 1, XPO1)因其介导多种关键抑癌蛋白的异常核输出而成为重要治疗靶点。如图2A所示,在肿瘤细胞中,XPO1的过度表达导致抑癌蛋白(如p53、p73、FOXO等)和促凋亡蛋白(如PAR-4)被异常输出至胞质而丧失功能,因此抑制XPO1活性、恢复抑癌蛋白的核定位成为创新的治疗策略^[9]。

SINE通过多重途径抗肿瘤:其一,它通过共价结合XPO1的Cys528位点,诱导其构象变化,从而特异性阻断其与NES底物的结合(如p53、p57等),抑制复合物形成,这促使抑癌蛋白在核内聚集,恢复其转录调控功能;其二,它通过阻滞促生存蛋白(如survivin)核输出抑制增殖;此外,该策略还能逆转某些肿瘤的耐药性。临床研究显示,核输出抑制剂Selinexor在晚期实体瘤和血液系统恶性肿瘤中表现出良好的耐受性和抗肿瘤活性。在妇科肿瘤和血液肿瘤的II期临床试验中,单药治疗疾病控制率约50%,部分患者获得长期疾病稳定^[22]。在复发难治性多发性骨髓瘤(STORM试验)中实现26.2%的客观缓解率,中位总生存期延长至8.6个月,针对TP53野生型急性髓系白血病,其联合化疗方案将完全缓解率提升至35%^[23]。目前全球有30多项相关临床试验正在进行,这些进展凸显了核输出抑制剂的抗肿瘤潜力。该技术的优势在于临床疗效显著,对多种实体瘤/血瘤有效;却存在固有局限:其疗效局限于XPO1依赖途径,且面临耐药性、脱靶风险与严重不良反应等挑战^[24]。

3.1.2 核输入抑制剂(selective inhibitors of nuclear import, SINI) 鉴于核输入途径的重要性以及在XPO1水平上抑制核输出的临床成功,人们对开发核输入抑制剂产生了兴趣。由于IPOβ1是核输入的主要调节剂,因此最初的关注集中在开发IPOβ1抑制剂

上。例如图2A, 小分子抑制剂Importazole通过破坏RanGTP与IPO β 1, 导致p65和c-MYC等核因子滞留胞质, 在黑色素瘤、前列腺癌和卵巢癌的小鼠异种移植模型中减缓肿瘤生长^[25]。另外, 基于结构的计算机虚拟筛选的INI-43, 能有效抑制IPO β 1功能, 抑制了NFAT、AP-1和NF- κ B的核转位和转录活性。初步实验表明, 该抑制剂能诱导宫颈癌、食管癌、前列腺癌以及胶质母细胞瘤等多种肿瘤细胞系死亡^[26]。

介于核输入通路冗余性高, 靶点选择难度大, 单一抑制剂可能效果有限, 且同样存在干扰细胞基本功能的脱靶风险, 因此目前核输入抑制剂的基础研究起步晚, 但它们作为抗癌治疗方法具有巨大的应用前景。

3.1.3 激酶抑制剂(kinase inhibitor, KI) 激酶抑制剂可干扰磷酸化依赖性定位信号, 间接调控蛋白质亚细胞分布。例如图2B所示, 在肿瘤细胞中, 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶区域由于19号外显子缺失、L858R点突变和T790M二次突变, 这些突变导致EGFR即使在没有EGF的情况下也处于持续激活状态, 从而激活下游MAPK信号通路以及mTOR信号通路, 促进肿瘤细胞的增殖分化和迁移。而EGFR酪氨酸激酶抑制剂(如Osimertinib)是一款与ATP竞争结合EGFR蛋白ATP结合位的药物, 其不仅抑制EGFR的激酶活性, 还能中断下游信号通路中的磷酸化级联反应, 进而阻断磷酸化的ERK(p-ERK)的生成及核转位过程, 而丝裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MEK)抑制剂(如Trametinib、Cobimetinib)通过抑制MEK1/2的活性, 阻止其底物细胞外信号调节激酶(ERK)的磷酸化和活化, 从而抑制p-ERK转位入核。p-ERK入核是其发挥转录调控功能(如激活AP-1、ETS家族转录因子)的关键步骤, 抑制此过程能有效阻断RAS-RAF-MEK-ERK信号通路驱动的肿瘤生长。这一原理已成功应用于临床, 例如, MEK抑制剂常与BRAF抑制剂联用治疗BRAF V600突变黑色素瘤等^[27]。酪氨酸蛋白激酶抑制剂(如PP2)通过阻断黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)关键酪氨酸位点(如Tyr397)的磷酸化, 破坏FAK与黏着斑支架蛋白(如paxillin)的结合, 导致FAK从细胞膜黏着斑位点解离, 从而抑制其介导的细胞迁移和侵袭信号, 为靶向肿瘤转移提供了思路^[28]。KI的主要优势是靶点相对明确, 药物开发经验成熟; 其局限性在

于易产生耐药突变, 且对蛋白质定位的调控通常是其抑制酶活性的间接效应, 特异性与直接性不足。

总的来说, 小分子抑制剂是目前最为成熟的蛋白质定位调控策略, 其最大优势在于无需基因工程改造、易于临床转化。然而, 其作用通常依赖于特定的信号通路或转运机制, 靶点相对有限, 且可能因脱靶效应导致全身性副作用。

3.2 纳米颗粒

近年来, 纳米颗粒作为新兴递送载体, 凭借其独特的尺寸效应和多功能修饰特性, 为精准调控蛋白质空间分布提供了创新解决方案。这类材料的核心优势在于其尺寸选择性——当纳米颗粒直径超过核孔复合物的有效孔径时, 其可被天然阻隔在细胞核外, 这一特性使其成为理想的区室化调控载体。

通过表面修饰靶向配体(如核酸适体、抗体片段或肽段), 纳米颗粒可实现蛋白质的特异性捕获和定位调控^[29]。例如图2C, 将抗p65抗体偶联至介孔二氧化硅纳米颗粒(mesoporous silica nanoparticles, MSN)上, 可在核周区域特异性捕获p65蛋白, 由于p65蛋白结合后纳米颗粒复合物尺寸增大, 无法通过核孔进入细胞核, 从而实现了NF- κ B信号通路的精准调控^[30]。在抗肿瘤治疗应用中, 该技术通过抑制NF- κ B(p65/p50二聚体)的核转位, 有效阻断了其下游促炎、抗凋亡基因(如TNF- α 、IL-6)的转录激活。这不仅能削弱肿瘤微环境中的免疫抑制信号, 还可增强肿瘤细胞对凋亡的敏感性, 从而抑制肿瘤生长和转移。实验表明, 该策略为克服NF- κ B通路异常活化相关的肿瘤耐药性提供了新方案。此外, 研究者开发了基于核酸适体的近红外光响应纳米平台, 该平台由识别p65的核酸适体、与核酸适体互补的DNA链(cDNA)、含光激活剪切基团(PC-linkers)的阻断探针(bDNA)以及上转换纳米粒子(UCNPs)组成cDNA/bDNA杂交体-核酸适体-UCNPs复合物。复合物进入细胞后, 核酸适体捕获p65蛋白并抑制其核转运。在近红外激光激发下, UCNPs产生紫外光劈开bDNA, 释放出的cDNA竞争性结合核酸适体, 释放p65蛋白, 从而恢复p65核转位。通过对p65的细胞质-核穿梭行为进行光控制, 可调节p65靶基因(如A20、IkBa)的表达水平, 从而调节与其相关的信号通路。另外, 还建立了p53/核酸适体系统, 验证了此纳米平台操纵蛋白质从细胞质到线粒体的亚细胞易位的潜力^[31]。纳米颗粒技术的核心优势在于其物理尺寸效应提供了高度的空间控制能力, 且可

整合多种响应性元件实现智能调控;然而,其应用受限于复杂的合成工艺、潜在的生物相容性问题以及较低的体内递送效率。

3.3 化学诱导临近

化学诱导临近(chemically induced proximity, CIP)技术通过双功能小分子诱导目标蛋白物理接近,可实现对蛋白质功能、定位和活性的精准调控。研究者通过将目标蛋白分别与FKBP12(FK506结合蛋白)和FRB(雷帕霉素结合蛋白)结构域融合,再通过雷帕霉素处理诱导二者物理接近,从而实现精确操控目标蛋白的亚细胞定位。

3.3.1 对外源蛋白定位调控 研究人员基于CIP技术,开发了多种策略对外源表达的蛋白质进行精准的亚细胞定位调控。如图2D所示,开发了一种创新的双功能小分子工具NICE-01(AP1867-PEG2-JQ1),用于重定位外源表达的融合蛋白。该分子由两个功能域组成:JQ1结构域特异性结合核内富集的BRD4蛋白(BET溴结构域家族成员)、AP1867结构域靶向胞质中的外源的FKBP^{F36V}融合蛋白。当NICE-01同时桥接两种蛋白质时,NICE-01可将FFKBP^{F36V}标记的胞质蛋白“牵引”至细胞核。实验验证,在急性髓性白血病(acute myelogenous leukemia, AML)模型中,外源表达的致癌突变体NPM1c(通常滞留于胞质)可被NICE-0快速定位至核内,并整合入BRD4形成的生物分子凝聚体中。这一重定位不仅纠正了空间异常,更显著抑制了HOX基因异常表达,从而诱导了白血病细胞分化和死亡^[32]。雷帕霉素系统将FRB结构域与线粒体外膜定位信号(如TOM20蛋白的跨膜区)融合表达,使FRB稳定锚定于线粒体外膜,并将FKBP12与绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)融合表达于细胞质中,形成可移动的外源靶标单元。加入Rap后,其作为双功能桥梁同时结合FRB和FKBP12,形成FKBP12-Rap-FRB三元复合物。该复合物强制驱动了胞质中的外源FKBP12-GFP向线粒体外膜富集,实现了GFP在线粒体表面的特异性招募,解决了外源蛋白质难以靶向线粒体的难题^[33]。

3.3.2 对内源蛋白定位调控 针对细胞内源表达、未经基因工程改造的天然蛋白质的定位调控更具挑战性。研究团队开发了小分子偶联纳米抗体的新一代临近诱导体系(small molecule-nanobody conjugate induced proximity, SNACIP),该系统融合CIP临近诱导技术、纳米抗体化学工程化技术以及环状跨膜肽

非内吞递送三大技术,并有三个组成模块:(1) 纳米抗体模块:使用单链重链可变区片段(VHH),可高亲和力和特异性结合内源靶蛋白,无需基因修饰;(2) 小分子偶联模块:将纳米抗体与特定配体(如TMP)共价连接;(3) 跨膜递送模块:通过二硫键引入环状十精氨酸跨膜肽(cyclic decaarginine, cR10*)实现非内吞式快速穿膜(半衰期<10 min)。进入细胞后,胞内还原环境切断二硫键,释放的SNACIP分子利用纳米抗体结合内源靶标,配体结合锚定蛋白(如eDHFR融合定位信号),强制二者临近,从而实现对内源蛋白定位的操控,抑制微管成核阻断有丝分裂纺锤体形成,使癌细胞周期停滞^[34]。

此外,研究人员设计了靶向重定位激活分子(targeted relocation activating molecule, TRAM),通过CRISPR-Cas9技术将FKBP12^{F36V}或EcdHFR结构域插入内源蛋白基因(如PRMT9、SOS1),使其在内源性表达水平融合这些结构域,再通过双功能小分子将这些经工程化改造的内源蛋白重定位至特定细胞区室,逆转其促癌功能,抑制肿瘤进展。该系统已在内源性表达水平验证可行性,为治疗传统“不可成药”靶点(如转录因子)提供新思路^[35]。类似地,有研究团队开发出CDK转录/表观遗传学邻近化学诱导剂(cyclin-dependent kinase-transcriptional/epigenetic chemical inducers of proximity, CDK-TCIPs)。CDK-TCIPs由转录调节因子BCL6的配体和CDK9激酶的配体通过连接子连接而成,可将内源CDK9招募至染色体上的BCL6结合位点,进而将附近的RNA聚合酶II C-端丝氨酸进行磷酸化,从而实现促凋亡基因的激活,最终使漫大B细胞淋巴瘤细胞凋亡,达到治疗目的^[36]。

尽管CIP技术在蛋白质亚细胞定位调控中展现出巨大潜力,但其应用仍面临脱靶风险、时空控制精度不足,以及体内递送效率低、代谢稳定性及免疫原性等局限。综上所述,未来研究需致力于开发更高特异性、低毒性的小分子工具,并探索与物理调控技术联用的协同策略,以系统性地克服现有局限。

3.4 光遗传学与物理调控技术

以光遗传学技术为代表的新型调控手段,为精确控制信号蛋白的亚细胞定位提供了前所未有的时空分辨率。与传统生化方法相比,光遗传学的核心优势在于其非侵入性和可逆性,能够以秒级甚至毫

秒级的精度在活细胞特定区域内激活或抑制特定的信号通路。该技术的基本原理是利用对光敏感的蛋白结构域(如LOV、CRY2、PhyB/PIF等)与目标信号蛋白融合。这些光敏域在特定波长光照下会发生构象变化,如二聚化、解离或发生膜移位,从而如同一个“光控开关”般精确指导与之融合的目标蛋白在细胞不同区域间的快速转运或锚定。

如图2E所示,研究人员开发了一种新型的光控化学诱导二聚化(CID)系统——pcDH,该系统能够实现细胞内蛋白质定位的定量控制^[37]。其原理是利用光异构化配体实现eDHFR与HaloTag的可逆二聚化。在紫光照射下,配体从E异构体转换为Z异构体,诱导eDHFR与HaloTag的结合,大量的CytPINK1被强行从细胞质中招募并锚定到了线粒体外膜上;激活的PINK1开始磷酸化线粒体上的泛素分子;磷酸化的泛素被细胞质中的mIRFP670nano-Parkin识别,导致Parkin被大量招募到线粒体;线粒体被Parkin泛素化标记,进而被自噬受体识别,最终被自噬体包裹降解。而在绿光照射下,配体则从(Z)异构体转换回(E)异构体,导致蛋白质解离。实验证明这种光控机制使得研究人员能够通过不同波长的光照射,精确控制细胞内蛋白质的转运和定位。

此外,研究人员成功开发了一种工程化的光控去棕榈酰化酶系统,能够利用蓝光精准操控与肿瘤发生发展密切相关的蛋白质的膜定位循环^[38]。该技术的核心创新在于其巧妙地将去棕榈酰化这一关键的蛋白质翻译后修饰过程与光遗传学控制相结合。许多致癌信号蛋白,如小G蛋白NRas,需要通过棕榈酰化修饰锚定在细胞膜上才能发挥其促增殖功能。该团队工程化改造的去棕榈酰化酶能够在蓝光照射下被特异性激活,从而迅速且可逆地去除目标蛋白上的棕榈酰化修饰。这一作用迫使原本定位于质膜的NRas等蛋白质脱离膜结构,重新分布到细胞质中,进而有效中断其下游的致癌信号转导,并且这种调控是高度可逆的;一旦撤除光照,目标蛋白可以重新棕榈酰化并返回膜上,这使得研究人员能够以分钟级的时间尺度“开关”特定的信号通路,从而动态地研究其在肿瘤维持中的必要性。

尽管光遗传学技术力量强大,但其应用也面临挑战,如需要基因工程导入外源蛋白、光毒性的潜在风险以及组织穿透深度的限制。然而,通过不断开发新型光敏工具和结合其他技术(如双光子激发),

其应用范围正从单细胞研究扩展到模式生物的整体研究。此外,磁控、声控等物理调控手段也逐渐被探索用于蛋白质定位的调控(表1)。

4 总结与展望

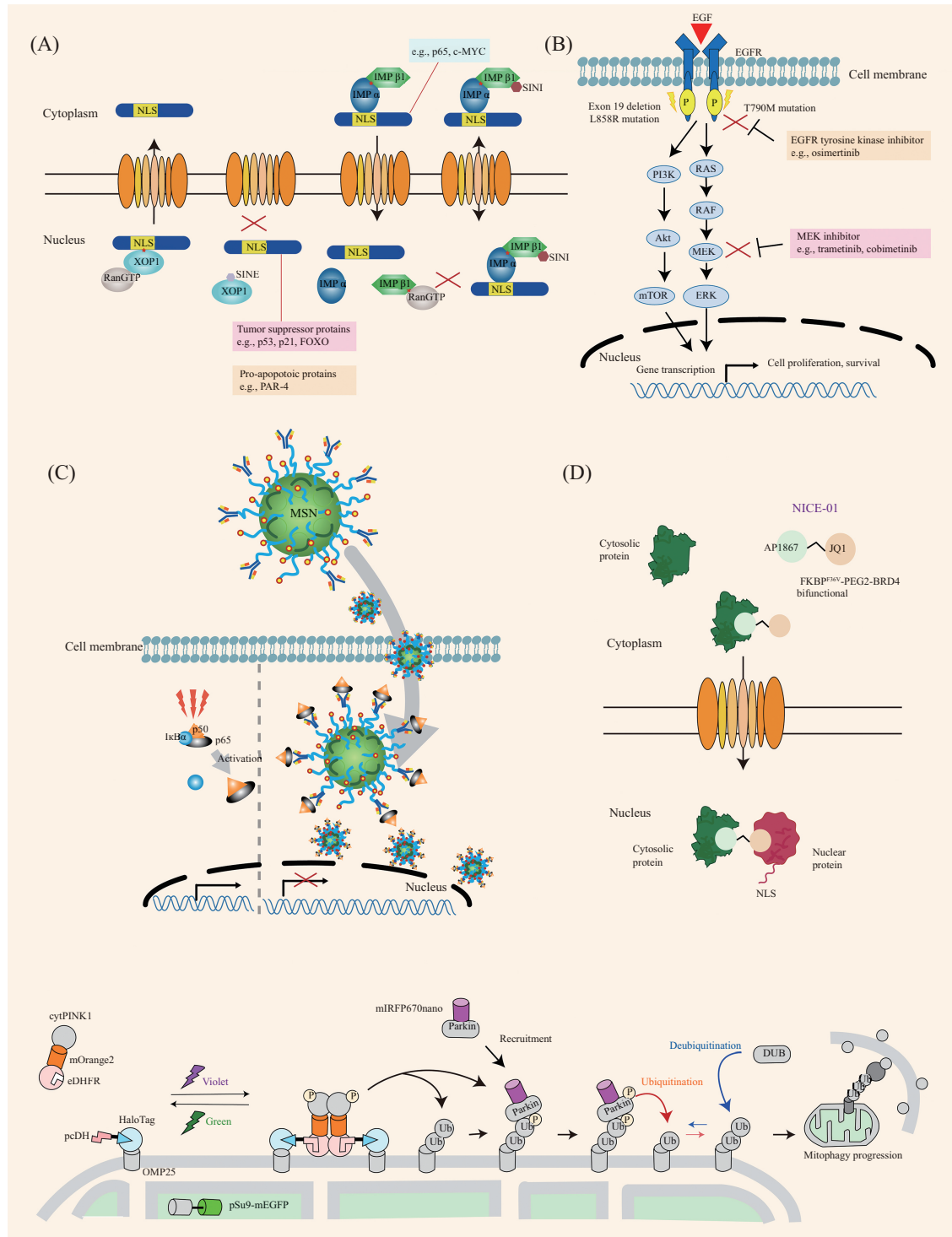
综上所述,蛋白质亚细胞定位调控技术为抗肿瘤治疗提供了新的干预策略。研究表明,肿瘤中关键蛋白的异常定位与肿瘤发生、转移和耐药密切相关,而通过小分子抑制剂、纳米颗粒和化学诱导临近等技术调控蛋白质定位,可恢复抑癌蛋白功能或阻断致癌蛋白活性。例如,XPO1抑制剂通过阻止p53等抑癌蛋白的核输出,已在临床试验中显示出抗肿瘤效果;纳米颗粒凭借尺寸效应可选择性阻断NF- κ B等蛋白质的核转位;而化学诱导临近技术则能精准操控蛋白质的亚细胞分布,为靶向传统“不可成药”蛋白提供了新思路。这些技术通过精准干预肿瘤相关蛋白的空间定位来调控其功能,为克服靶向治疗耐药性、提高抗癌策略的特异性开辟了新途径。

4.1 精准工具开发与智能预测

一方面,开发更精准的靶向工具是提升技术效能的核心。这包括利用具可编程性的核酸适体、具有精确配对能力的DNA纳米结构以及高特异性的抗体,来实现对目标蛋白的高选择性识别。同时,优化递送系统(如智能响应型纳米材料)和引入外部调控开关(如光控、热控或肿瘤微环境特异性响应的分子),将极大增强对蛋白质时空定位的操控能力与安全性。另一方面,人工智能预测模型将加速新靶点的发现和方案设计。例如,基于深度学习算法(如AlphaFold2的衍生模型或专门预测蛋白质定位的DeepLoc系列模型^[39])能够大规模预测蛋白质的亚细胞定位,从而快速筛选出可用于干预的关键靶标,并指导精准调控工具的设计。

4.2 联合治疗策略的深入探索

蛋白质定位调控技术与现有疗法的联合应用,有望产生协同增效作用,是未来的重要研究方向。例如,将Selinexor与免疫检查点抑制剂(如抗PD-1/PD-L1抗体)联用,可能通过恢复肿瘤细胞核内抑癌蛋白功能并同时激活T细胞免疫,显著增强抗肿瘤免疫应答^[40]。此外,定位调控技术与化疗、靶向治疗或放疗的联合方案,也有助于克服耐药性、抑制肿瘤转移,并降低传统疗法的毒副作用。系统评估不同联合策略的疗效与机制,将为临床实践提供坚实依据。



A: 利用小分子抑制剂阻断核输入或核输出通路, 改变蛋白质的核质分布; B: 利用激酶小分子抑制剂干预信号转导通路, 间接影响下游蛋白的定位; C: 利用纳米颗粒(如MSN)作为载体, 实现蛋白质的特异性包裹与靶向递送; D: 利用化学诱导剂(如NICE系统)促使两个工程蛋白模块发生二聚化, 从而重定向目标蛋白; E: 利用特定波长光照(如pcDH系统)诱导工程蛋白发生构象变化或二聚化, 实现对蛋白质定位的时空调控。

A: using small-molecule inhibitors to block nuclear import or export pathways, thereby altering the nucleocytoplasmic distribution of proteins; B: using small-molecule kinase inhibitors to interfere with signal transduction pathways, indirectly affecting the localization of downstream proteins; C: utilizing nanoparticles (e.g., mesoporous silica nanoparticles, MSN) as carriers for the specific encapsulation and targeted delivery of proteins; D: employing chemical inducers (e.g., the NICE system) to promote dimerization of two engineered protein modules, thereby redirecting the target protein; E: using specific wavelength light illumination (e.g., the pcDH system) to induce conformational changes or dimerization of engineered proteins, achieving spatiotemporal control over protein localization.

图2 调控蛋白质亚细胞定位典型技术示意图

Fig.2 Typical techniques for manipulating protein subcellular localization

表1 调控蛋白质亚细胞定位的技术作用机制及其优劣性					
Table 1 The technical mechanism and advantages and disadvantages of regulating protein subcellular localization					
技术类别	代表技术/工具	作用机制	优势	局限性	参考文献
Technical category	Representing technology/tools	Mechanism of action	Advantages	Limitations	References
Inhibitor	SINE	Blocks XPO1-mediated nuclear export of tumor suppressor proteins	Broad-spectrum anti-tumor effect and simultaneous restoration of multiple tumor suppressor functions	Restricted to XPO1 dependency pathway; drug resistance; off-target risk; adverse reaction	[9,22-24]
	SINI (e.g., Importazole, INI-43)	Inhibits IPOβ1-mediated nuclear import	Novel therapeutic approach	Complex mechanism of action, challenges in target selection, and potential toxicity and side effects	[25-26]
	KI (e.g., Palbociclib, PP2)	Interferes with phosphorylation-dependent localization signals	Well-defined targets and mature drug development experience	Drug resistance and off-target effects	[27-28]
CIP	TRAM/TCIP	Uses bifunctional small molecules to forcibly bring two target proteins into proximity	Potential for targeting “undruggable” proteins by enabling “editing” of protein localization	Off-target effects, insufficient spatiotemporal control accuracy, and low <i>in vivo</i> delivery efficiency, metabolic stability, and immunogenicity	[32-36]
Optogenetics & physical control technologies	pcDH	Uses photosensitive protein domains to control protein conformation and localization through light irradiation	Extremely high spatiotemporal resolution and reversible control	Need for importing exogenous proteins, phototoxicity, and limitations on tissue penetration depth	[37-38]

4.3 临床转化与机制研究的双向推动

推动该技术走向临床, 需要克服递送效率、体内稳定性和长期安全性等瓶颈。同时, 基础研究也需进一步深化。空间蛋白质组学技术能够原位揭示细胞中蛋白质的精确分布与相互作用, 为系统鉴定肿瘤特异性定位异常蛋白提供了可能。例如, 利用该技术深入探索蛋白质定位异常与肿瘤微环境动态互作的关联, 揭示定位变化如何影响肿瘤细胞的代谢重编程、免疫逃逸等关键生物学过程。这些机制研究的成果又将反哺技术的优化迭代。

随着精准工具的涌现、人工智能的赋能、联合策略的验证以及机制研究的深入, 蛋白质亚细胞定位调控技术有望发展成为抗肿瘤治疗体系中一项重要的补充手段, 为改善肿瘤治疗预后提供全新的策略。

参考文献 (References)

[1] AEBERSOLD R, MANN M. Mass-spectrometric exploration of

proteome structure and function [J]. Nature, 2016, 537(7620): 347-55.

[2] PARK S, YANG J S, SHIN Y E, et al. Protein localization as a principal feature of the etiology and comorbidity of genetic diseases [J]. Mol Syst Biol, 2011, doi: 10.1038/msb.2011.29.

[3] HEGDE R S, KEENAN R J. The mechanisms of integral membrane protein biogenesis [J]. Nat Rev Mol, 2021, 23(2): 107-24.

[4] KÜNZLER M, HURT E. Targeting of ran: variation on a common theme [J]? J Cell Sci, 2001, 114(Pt 18): 3233-41.

[5] DUDEK J, REHLING P, VAN DER LAAN M. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(2): 274-85.

[6] GRAHAM T R. Flippases and vesicle-mediated protein transport [J]. Trends Cell Biol, 2004, 14(12): 670-7.

[7] BAUER N C, DOETSCH P W, CORBETT A H. Mechanisms regulating protein localization [J]. Traffic, 2015, 16(10): 1039-61.

[8] KAWAGUCHI T, TAKENOSHITA M, KABASHIMA T, et al. Glucose and camp regulate the l-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(24): 13710-5.

[9] CONFORTI F, WANG Y, RODRIGUEZ J A, et al. Molecular pathways: anticancer activity by inhibition of nucleocytoplasmic

- shuttling [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(20): 4508-13.
- [10] ZARA V, DIETMEIER K, PALMISANO A, et al. Yeast mitochondria lacking the phosphate carrier/p32 are blocked in phosphate transport but can import preproteins after regeneration of a membrane potential [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(11): 6524-31.
 - [11] MIN Y H, CHEONG J W, KIM J Y, et al. Cytoplasmic mislocalization of p27kip1 protein is associated with constitutive phosphorylation of akt or protein kinase b and poor prognosis in acute myelogenous leukemia [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5225-31.
 - [12] JAIN M V, JANGAMREDDY J R, GRABAREK J, et al. Nuclear localized akt enhances breast cancer stem-like cells through counter-regulation of p21(waf1/cip1) and p27(kip1) [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(13): 2109-20.
 - [13] KONAGAYA Y, ROSENTHAL D, RATNAYEKE N, et al. An intermediate rb-e2f activity state safeguards proliferation commitment [J]. *Nature*, 2024, 631(8020): 424-31.
 - [14] THOMAS G E, EGAN G, GARCÍA-PRAT L, et al. The metabolic enzyme hexokinase 2 localizes to the nucleus in aml and normal haematopoietic stem and progenitor cells to maintain stemness [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(6): 872-84.
 - [15] YANG W, XIA Y, JI H, et al. Nuclear pkm2 regulates β -catenin transactivation upon egfr activation [J]. *Nature*, 2011, 480(7375): 118-22.
 - [16] BLANDIN A F, CRUZ DA SILVA E, MERCIER M C, et al. Gefitinib induces egfr and $\alpha 5 \beta 1$ integrin co-endocytosis in glioblastoma cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(6): 2949-62.
 - [17] MUKHOPADHYAY S, VANDER HEIDEN M G, MCCORMICK F. The metabolic landscape of ras-driven cancers from biology to therapy [J]. *Nat Cancer*, 2021, 2(3): 271-83.
 - [18] PUCCI S, POLIDORO C, JOUBERT A, et al. Ku70, ku80, and sclusterin: a cluster of predicting factors for response to neoadjuvant chemoradiation therapy in patients with locally advanced rectal cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2017, 97(2): 381-8.
 - [19] WANG Y, ZHOU Y, YANG L, et al. Challenges coexist with opportunities: spatial heterogeneity expression of pd-1l in cancer therapy [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(1): e2303175.
 - [20] LI Q, WU M F, SONG A P, et al. Expression of ezrin and e-cadherin in invasive ductal breast cancer and their correlations to lymphatic metastasis [J]. *Ai Zheng*, 2006, 25(3): 363-6.
 - [21] ZHAI J W, YANG X G, YANG F S, et al. Expression and clinical significance of ezrin and e-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(3): 317-20.
 - [22] VERGOTE I, LUND B, HAVSTEEN H, et al. Preliminary phase ii results of selinexor, an oral selective inhibitor of nuclear export in patients with heavily pretreated gynecological cancers [J]. *J Clin Oncol*, 2015, doi: 10.1200/jco.2015.33.15_suppl.5565.
 - [23] ZHANG S, LI H, ZHAO P, et al. Targeting xpo1: a new perspective for malignant solid tumor especially small cell lung cancer [J]. *Chin Med J*, 2025, doi: 10.1097/CM9.0000000000003654.
 - [24] LAI C, XU L, DAI S. The nuclear export protein exportin-1 in solid malignant tumours: from biology to clinical trials [J]. *Clin Transl Med*, 2024, 14(5): e1684.
 - [25] NEWELL S, VAN DER WATT P J, LEANER V D. Therapeutic targeting of nuclear export and import receptors in cancer and their potential in combination chemotherapy [J]. *IUBMB Life*, 2024, 76(1): 4-25.
 - [26] VAN DER WATT P J, CHI A, STELMA T, et al. Targeting the nuclear import receptor kpn β 1 as an anticancer therapeutic [J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(4): 560-73.
 - [27] ROBERTS P J, DER C J. Targeting the raf-mek-erk mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer [J]. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3291-310.
 - [28] YAMAKITA Y, TOTSUKAWA G, YAMASHIRO S, et al. Dissociation of fak/p130(cas)/c-src complex during mitosis: role of mitosis-specific serine phosphorylation of fak [J]. *J Cell Biol*, 1999, 144(2): 315-24.
 - [29] YANG H M, PARK C W, WOO M A, et al. Her2/neu antibody conjugated poly(amino acid)-coated iron oxide nanoparticles for breast cancer mr imaging [J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(11): 2866-72.
 - [30] CHEN Y P, CHEN C T, LIU T P, et al. Catcher in the rel: Nanoparticles-antibody conjugate as nf- κ b nuclear translocation blocker [J]. *Biomaterials*, 2020, 246: 119997.
 - [31] XIE S, DU Y, ZHANG Y, et al. Aptamer-based optical manipulation of protein subcellular localization in cells [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1347.
 - [32] GIBSON W J, SADAGOPAN A, SHOBA V M, et al. Bifunctional small molecules that induce nuclear localization and targeted transcriptional regulation [J]. *J Am Chem Soc*, 2023, 145(48): 26028-37.
 - [33] NARENDRA D P, JIN S M, TANAKA A, et al. Pink1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate parkin [J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(1): e1000298.
 - [34] SUN X, ZHOU C, XIA S, et al. Small molecule-nanobody conjugate induced proximity controls intracellular processes and modulates endogenous unligandable targets [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1635.
 - [35] NG C S C, LIU A, CUI B, et al. Targeted protein relocation via protein transport coupling [J]. *Nature*, 2024, 633(8031): 941-51.
 - [36] SAROTT R C, GOURISANKAR S, KARIM B, et al. Relocalizing transcriptional kinases to activate apoptosis [J]. *Science*, 2024, 386(6717): ead15361.
 - [37] MASHITA T, KOWADA T, YAMAMOTO H, et al. Quantitative control of subcellular protein localization with a photochromic dimerizer [J]. *Nat Chem Biol*, 2024, 20(11): 1461-70.
 - [38] JAYARAMAN S, KOCHISS A, ALCALAY T L, et al. Engineered depalmitoylases enable selective manipulation of protein localization and function [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 3514.
 - [39] NIELSEN H. Practical applications of language models in protein sorting prediction: Signalp 6.0, deeploc 2.1, and deeplocpro 1.0 [J]. *Methods Mol Biol*, 2025, 2941: 153-75.
 - [40] FARREN M R, SHAKYA R, HENNESSEY R, et al. Selinexor, a selective inhibitor of nuclear export (sine), shows enhanced activity in combination with pd-1/pd-l1 blockade in syngeneic murine models of colon cancer and melanoma [J]. *J Immunother Cancer*, 2015, 3(Suppl 2): P355.