



· 论 著 ·

类泛素化neddylation修饰调控乳腺癌中核纤层蛋白Lamin B1的表达

贾晓青, 孙晓寅, 蒋蓓琦, 梅章懿, 傅 韵, 莊志刚

同济大学附属第一妇婴保健院乳腺科, 上海 201204

[摘要] 背景与目的: 类泛素化neddylation修饰在乳腺癌中的作用鲜有报道。该研究的前期研究发现, 抑制neddylation修饰可诱导乳腺癌细胞发生衰老, 但具体机制尚未完全阐明。研究报道核纤层蛋白lamin B1缺失可导致细胞衰老。本研究旨在探讨在乳腺癌中, neddylation修饰与lamin B1是否存在相关性及其可能的机制。方法: 利用113例乳腺癌患者肿瘤组织制成的组织芯片对neddylation修饰过程中关键蛋白神经前体细胞表达发育下调蛋白8 (neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8, NEDD8)、NEDD8活化酶1 (NEDD8-activating enzyme 1, NAE1) 及核纤层蛋白lamin B1进行免疫组织化学染色。采用Spearman rank分析NEDD8和NAE1与lamin B1表达的相关性。采用CRISPR/Cas9技术敲低NEDD8的表达以阻断neddylation修饰, 采用蛋白质印迹法 (Western blot) 检测neddylation修饰对Lamin B1表达的调控作用及其机制。结果: Lamin B1表达与NEDD8 ($r=0.817$, $P<0.0001$) 和NAE1 ($r=0.406$, $P<0.0001$) 表达呈显著正相关。敲低NEDD8以阻断neddylation修饰可显著抑制Lamin B1的表达。沉默P53表达可部分逆转阻断neddylation修饰对lamin B1表达的抑制。结论: Neddylaton修饰与lamin B1表达呈正相关, 靶向neddylation修饰可能通过P53依赖的方式抑制lamin B1的表达。这为乳腺癌的治疗提供了新的靶点和方向。

[关键词]: 类泛素化; Neddylaton; Lamin B1; 乳腺癌

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2022.06.008

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2022)06-0535-07

Neddylaton modification regulates lamin B1 expression in breast cancer JIA Xiaoping, SUN Xiaoyin, JIANG Beiqi, MEI Zhangyi, FU Yun, ZHUANG Zhigang (Department of Breast Surgery, First Maternal and Infant Health Care Hospital, Tongji University, Shanghai 201204, China)

Correspondence to: ZHUANG Zhigang E-mail: zhuang_zg@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** The role of neddylation modification in breast cancer has rarely been reported. Previous study found that neddylation modification blocking induced cellular senescence in breast cancer, however, the potential mechanism has not yet been fully elucidated. It is reported that lamin B1 deletion leads to cellular senescence. The purpose of this study was to investigate the correlation between neddylation modification and lamin B1 expression in breast cancer and its possible mechanism. **Methods:** Neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8 (NEDD8) and NEDD8-activating enzyme 1 (NAE1), two key proteins of neddylation modification process, in addition to lamin B1 were immunohistochemically stained in tissue microarray from 113 breast cancer patients. The correlation of NEDD8 and NAE1 with lamin B1 was analyzed using Spearman's rank analysis. The expression of NEDD8 was knocked down to block neddylation modification by CRISPR/Cas9 technique. Western blot assay was used to detect the regulation of lamin B1 by neddylation modification and its mechanisms. **Results:** Lamin B1 expression was positively correlated with NEDD8 ($r=0.817$, $P<0.0001$) and NAE1 ($r=0.406$, $P<0.0001$) expressions. Blocking neddylation modification by knocking down NEDD8 significantly inhibited the expression of lamin B1. Silencing of p53 partially reversed the inhibition of lamin B1 by neddylation modification blocking. **Conclusion:** Neddylaton modification was positively

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (82102944), 上海市卫生健康委员会卫生行业临床研究专项青年项目 (20204Y0131)。

第一作者: 贾晓青 (ORCID: 0000-0002-4515-9678), 博士, 医师。E-mail: jiaxiaoping12@126.com

通信作者: 莊志刚 (ORCID: 0000-0002-7827-4402), 博士, 主任医师。E-mail: zhuang_zg@163.com

correlated with lamin B1 expression. Targeting neddylaton modification inhibited the expression of lamin B1 in a p53-dependent manner. This study provides new target and clue for the treatment of breast cancer.

[Key words] Ubiquitin-like; Neddylaton; Lamin B1; Breast cancer

Neddylaton修饰是新近发现的一种类泛素化蛋白翻译后修饰方式, 类泛素分子神经前体细胞表达发育下调蛋白8 (neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8, NEDD8) 在NEDD8活化酶1 (NEDD8-activating enzyme 1, NAE1)、NEDD8结合酶UBC12和底物特异性NEDD8-E3连接酶的催化下, 经过三步级联酶促反应被活化, 活化的NEDD8结合到其底物蛋白上并使之通过蛋白酶体降解^[1]。Cullin家族作为多亚基Cullin-RING E3连接酶 (Cullin-RING ligases, CRL) 的必要组成部分, 是neddylaton最常见的底物^[2]。CRL通过靶向数以百计的蛋白, 主要是抑癌蛋白并使之通过蛋白酶体降解, 从而调控多种生物学过程^[3]。CRL的功能异常将会导致肿瘤的发生^[4]。研究发现neddylaton修饰在多种肿瘤中高度活化, 包括肺癌^[5]、肝癌^[6]、脑胶质瘤^[7]和淋巴瘤^[8]等。进一步研究发现靶向neddylaton修饰可显著抑制肿瘤的生长和转移。本课题组前期研究^[9]发现, neddylaton修饰在乳腺癌中过度活化, 靶向neddylaton修饰可增加雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 阳性乳腺癌对氟维司群的敏感性。在研究过程中, 我们发现靶向neddylaton修饰可诱导乳腺癌MCF-7细胞发生细胞衰老, 其具体机制仍不清楚。

核纤层位于核外缘, 紧靠核膜, 维持细胞核的大小、形状和稳定性^[10]。核纤层主要成分是核纤层蛋白, 包括A型核纤层蛋白 (lamin A) 和B型核纤层蛋白 (lamin B)^[11]。哺乳动物中, lamin A包括lamin A和lamin C, 两者是同一基因的不同转录产物, 有相同的氨基酸序列。Lamin B包括lamin B1和lamin B2^[11]。核纤层参与多种细胞核活动, 包括DNA复制和转录、染色质结构和重塑、细胞周期进展、细胞发育和分化、细胞核迁移及细胞凋亡^[11-14]。此外, 核纤层还维持细胞核的结构, 调控核孔复合体 (nuclear pore complex, NPC) 及启动细胞有丝分裂^[15]。

研究^[16]报道, lamin B1缺失诱导细胞衰老, 其在细胞衰老过程中发挥了关键作用。我们推测靶向neddylaton修饰诱导的细胞衰老与lamin B1有关, Neddylaton修饰与lamin B1可能存在相关性, 本研究旨在探索neddylaton修饰与lamin B1之间是否存在调控关系及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

MCF-7细胞系购自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC), 胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素、RPMI-1640培养基、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲生理盐水 (phosphate-buffered saline, PBS) 均购自美国Gibco公司, LipofectamineTM2000购自美国Invitrogen公司, 抗NEDD8抗体购自美国Cell signaling Technology公司, 抗NAE1抗体购自德国默克公司, 抗lamin B1抗体购自上海泊湾生物科技有限公司, 抗P53抗体购自美国Santa Cruz公司, GAPDH抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠和山羊抗兔IgG (H+L) 二抗购自美国Proteintech公司, 免疫组织化学检测试剂盒购自丹麦DAKO公司。

1.2 CRISPR/Cas9技术敲低NEDD8

首先构建NEDD8 gRNA质粒。在网站 (<http://www.genome-engineering.org/crispr/>) 上进行NEDD8 gRNA的设计。将针对NEDD8的gRNA序列分别克隆至lenti-guide-puro质粒中。将包含NEDD8 gRNA的lenti-guide-puro质粒 (4 μg) 与慢病毒包装质粒AGP091 (3.0 μg) 和AGP090 (1.2 μg) 共转染HEK-293T细胞。48 h后收集、过滤病毒上清液, 并感染MCF-7/Cas9细胞, 用嘌呤霉素 (2 μg/mL) 筛选1~2周, 从而获得NEDD8稳定敲低细胞系。

1.3 细胞培养与转染

采用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、

100 U/mL链霉素的RPMI-1640培养基，将细胞置于37 ℃，CO₂体积分数为5%培养箱中培养。待细胞贴壁生长融合度达80%时，加入胰蛋白酶消化并传代。取对数生长期的细胞，接种于6孔板中，待细胞密度达到70%左右。将20 μL P53-RNAi片段及20 μL NC-RNAi片段分别与100 μL不含10%胎牛血清的空RPMI-1640培养基混匀，静置5 min；同时将6 μL LipofectamineTM2000与不含10%胎牛血清的空RPMI-1640培养基混匀，静置5 min；将以上两种复合物混匀，静置20 min，轻轻滴加至细胞中，充分混匀。6~8 h后更换含10%胎牛血清的新鲜培养基。

1.4 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测

在6 cm培养皿中加入100 μL RIPA裂解液，置于冰上，用细胞刮迅速将细胞刮下，移至预冷的1.5 mL Eppendorf试管中，冰上裂解40 min，于4 ℃ 12 000 r/min离心15 min，吸取上清液至新的预冷1.5 mL Eppendorf试管中，利用蛋白定量试剂盒调整蛋白浓度一致。加入5×十二烷基硫酸钠 (sodium dodecylsulphate, SDS) 上样缓冲液，100 ℃煮沸10 min。冷却至室温后进行SDS-PAGE电泳。60 V恒压电泳2 h，220 mA恒流转膜90 min，5%脱脂牛奶室温封闭1 h后，加入一抗 (NEDD8、NAE1、lamin B1、P53和GAPDH) 4 ℃过夜，次日TBST洗涤10 min×3次后加二抗室温温育1 h，TBST洗涤10 min×3次后，加入ECL发光显影。

1.5 临床标本收集

乳腺癌组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司。该组织芯片包含2000年1月—2003年12月接受手术的113例乳腺癌患者，有完整的临床及病理学资料，包括年龄、肿瘤大小、肿瘤分期、组织学分级、淋巴结状态、ER及孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 蛋白表达等。该项研究已经相关伦理委员会通过。

1.6 免疫组织化学法检测

石蜡包埋组织切片常规脱蜡，用含3%过氧化氢的甲醇溶液封闭内源性过氧化物酶。对

neddylation修饰过程中关键蛋白NEDD8和NAE1，采用0.01 mol/L柠檬酸溶液 (pH=6.0) 进行抗原修复，煮沸20 min，取出后置于柠檬酸缓冲液中在室温下自然冷却。对于lamin B1，采用EDTA溶液进行抗原修复，煮沸10 min，取出后置于EDTA溶液中在室温下自然冷却。封闭20 min。依次加入鼠抗人NAE1 (1:100) 单克隆抗体、兔抗人NEDD8 (1:80) 多克隆抗体和兔抗人lamin B1多克隆抗体 (1:1 000)，即用型辣根过氧化物酶标记的二抗室温温育1 h，DAB显色，苏木精对比染色细胞核，常规脱水、透明、中性树胶封固。PBS代谢一抗作为阴性对照，其余步骤同上。用已知阳性切片作为各蛋白的阳性对照。

1.7 染色结果判读

随机选取5个高倍视野 (×400)，计数肿瘤细胞和阳性细胞数，得出阳性细胞百分率。本课题前期研究^[9]报道了NEDD8和NAE1的免疫染色结果。对于lamin B1染色结果的判断，阳性细胞率0%~5%记为0分，6%~25%记为1分，26%~50%记为2分，51%~75%为3分，76%~100%为4分。再按多数阳性细胞呈现的染色强度予以计分，低表达为1分，中等表达为2分，强表达为3分。将上述2项得分相加，0~1分判为“-”，2~3分判为“+”，4分判为“++”，5~7分判为“+++”。由3位有经验的临床病理医师阅片，采用双盲评估的方法，根据其评分的平均值来确定判定结果。本研究进行结果分析时，以“++”和“+++”定义该蛋白为高表达，“-”和“+”定义为低表达。

1.8 统计学处理

应用SPSS 20.0统计学软件进行统计学分析。图表采用GraphPad Prism 8.0软件绘制。相关性分析采用Spearman rank分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Neddylation修饰过程关键蛋白NEDD8和NAE1及lamin B1在乳腺癌中的表达

采用免疫组织化学方法分析了neddylation修

饰过程关键蛋白NEDD8和NAE1及lamin B1在113例乳腺癌组织标本中的表达情况。结果显示,在NEDD8和NAE1高表达的组织中,lamin B1表达也升高;而在NEDD8和NAE1低表达的组织中,lamin B1表达也降低(图1)。提示二者之间可能存在相关性。

2.2 Neddylation修饰与lamin B1表达呈正相关

为了明确neddylation修饰与lamin B1表达之间是否存在相关性,我们进一步进行了相关性分析。结果表明,NEDD8($r=0.817, P<0.0001$)和NAE1($r=0.406, P<0.0001$)的表达与lamin B1表达呈显著正相关(图2)。

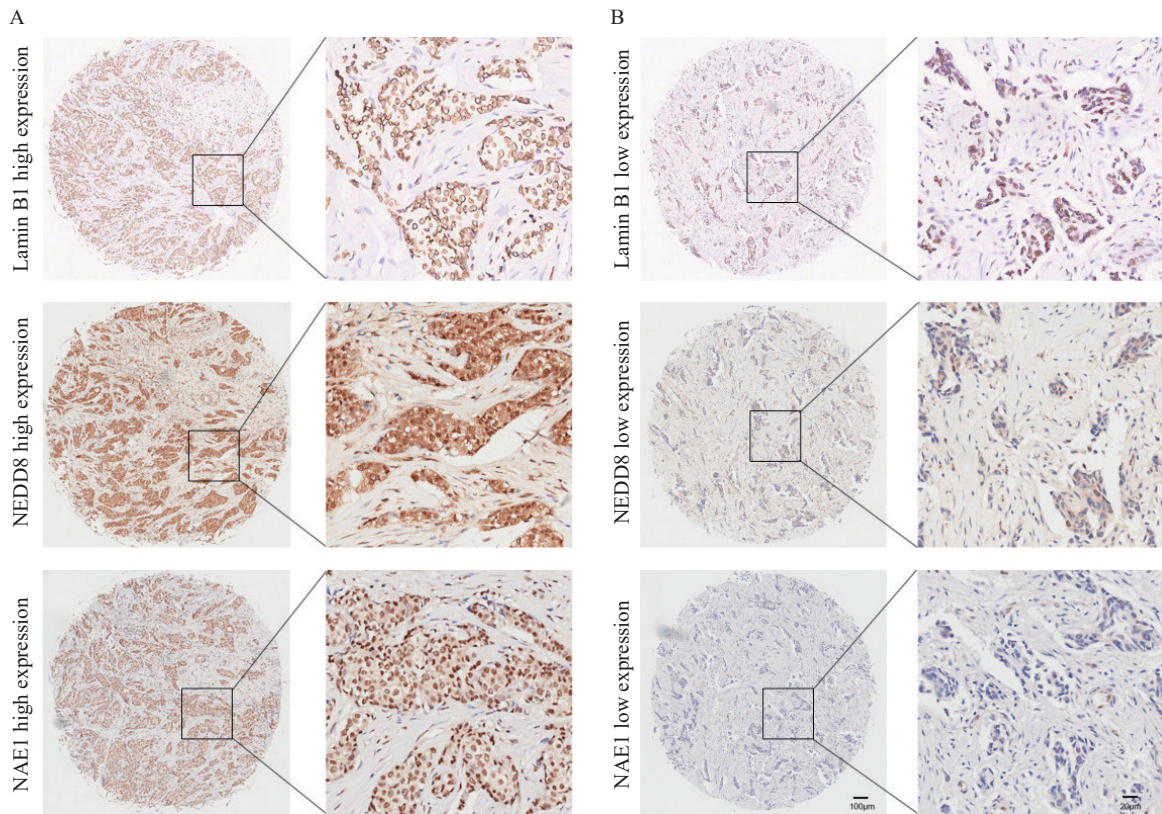


图1 免疫组织化学方法检测NEDD8、NAE1及lamin B1在乳腺癌中的表达

Fig. 1 The expressions of NEDD8, NAE1 and lamin B1 in breast cancer were detected by immunohistochemistry

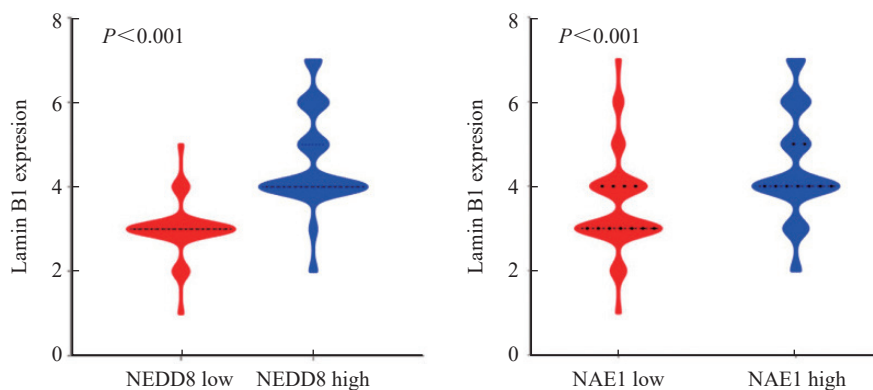


图2 NEDD8和NAE1与lamin B1表达呈正相关

Fig. 2 The expressions of NEDD8 and NAE1 were positively correlated with lamin B1 expression

A: A positive correlation between NEDD8 and lamin B1 expression level was presented by Violin Plot ($r=0.817, P<0.0001$); B: A positive correlation between NAE1 and lamin B1 expression level was presented by Violin Plot ($r=0.406, P<0.0001$).

2.3 Neddylaton修饰调控lamin B1表达

为了明确neddylaton修饰是否调控lamin B1表达,我们利用CRISPR/Cas9技术敲低了乳腺癌MCF-7细胞中NEDD8表达(以下称MCF-7/gNEDD8细胞)以阻断neddylaton修饰。通过Western blot方法检测NEDD8敲低情况及其对lamin B1表达的影响。结果显示,NEDD8成功被敲低(图3A),敲低NEDD8显著抑制了lamin B1的表达(图3B)。

2.4 Neddylaton修饰通过P53依赖的方式调控lamin B1表达

我们进一步研究了neddylaton修饰如何调控lamin B1的表达。研究报道,细胞衰老标志物P53调控lamin B1表达^[17],而P53是neddylaton修饰的底物^[18]。我们推测neddylaton修饰可能通过P53调控lamin B1的表达。首先利用si-P53和si-NC分别转染MCF-7/gNEDD8细胞和MCF-7/con细胞以沉默P53表达,Western blot方法检测P53及

lamin B1表达变化。结果显示,敲低NEDD8表达以阻断neddylaton修饰后,P53蛋白发生了积聚(图4A)。沉默P53部分逆转了阻断neddylaton修饰对lamin B1的抑制(图4B)。以上结果提示,neddylaton修饰可能通过P53依赖的方式调控lamin B1表达。

2.5 Lamin B1高表达在乳腺癌中的预后价值

我们前期研究发现neddylaton过度活化患者预后较差^[9]。考虑到neddylaton修饰对lamin B1的调控作用,lamin B1在乳腺癌中的预后作用显得尤为重要。目前对于lamin B1的预后价值仍有争议。我们利用Kaplan-Meier Plotter在线预后分析网站(<https://kmplot.com>)进行了分析,结果发现lamin B1高表达与患者较差的无进展生存时间(progression-free survival, PFS)(图5A)和总生存时间(overall survival, OS)(图5B)呈正相关,提示lamin B1高表达患者预后较差。

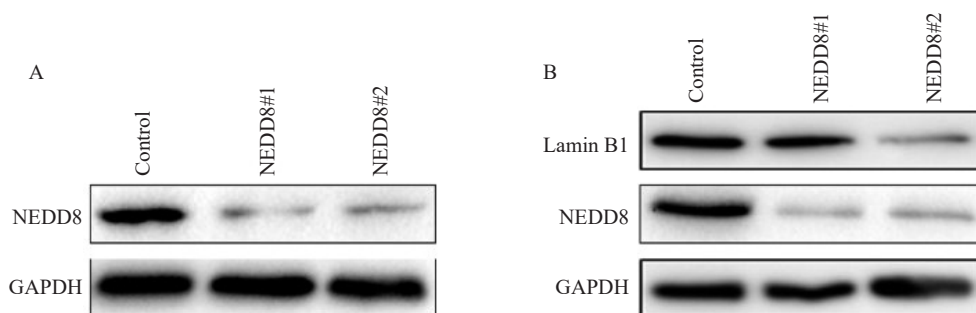


图3 Neddylaton修饰调控lamin B1的表达

Fig. 3 Neddylaton modification regulates lamin B1 expression

A: The expression of NEDD8 was knocked-down by CRISPR Cas9 technique. CRISPR Cas9-inducible NEDD8 KD cells were harvested for Western blot analysis in MCF-7 cells, the NEDD8 expression was successfully knocked down; B: CRISPR Cas9-inducible NEDD8 KD cells were harvested for Western blot analysis in MCF-7 cells, the expressions of NEDD8 and lamin B1 were analyzed.

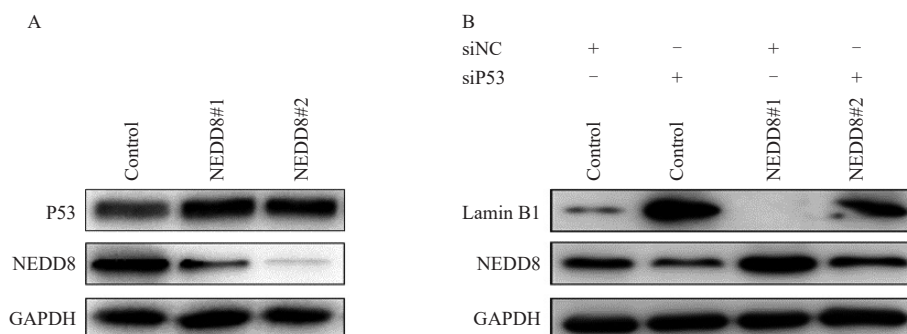


图4 Neddylaton修饰通过P53依赖的方式调控lamin B1表达

Fig. 4 Neddylaton modification regulated lamin B1 expression in P53-dependent manner

A: CRISPR Cas9-inducible NEDD8 KD cells were harvested for Western blot analysis in MCF-7 cells, the expression of P53 was analyzed; B: The expression of P53 was silenced by siRNA assay. Western blot was used to detect lamin B1 and P53 expression when silencing P53 in CRISPR Cas9-inducible NEDD8 KD cells.

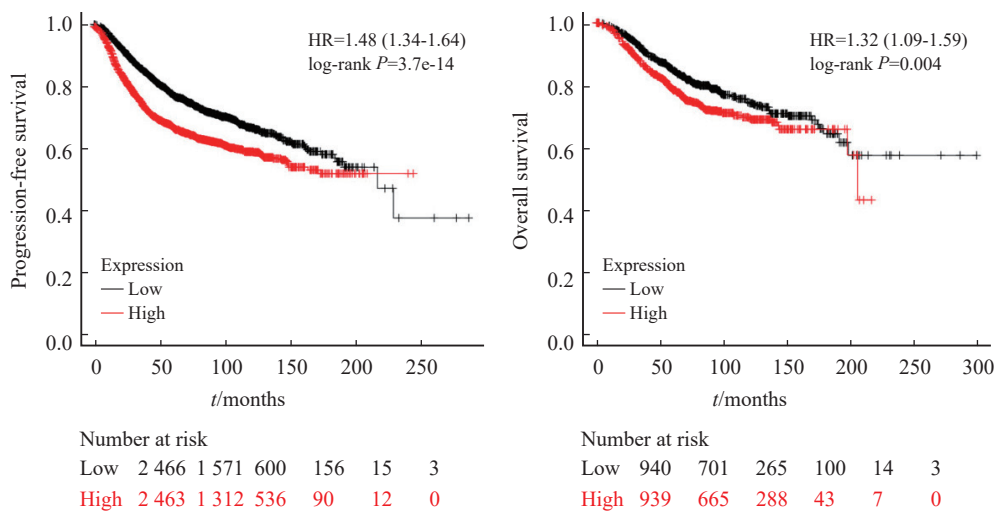


图5 Kaplan-Meier Plotter网站分析Lamin B1表达对PFS和OS的影响

Fig. 5 The effect of lamin B1 expressions on PFS and OS were analyzed using Kaplan-Meier Plotter dataset

A: Kaplan-Meier estimated the effect of lamin B1 expression on PFS; B: Kaplan-Meier estimated the effect of lamin B1 expression on OS.

3 讨 论

本研究利用乳腺癌组织芯片免疫组织化学染色,发现neddylation修饰与lamin B1表达呈正相关。进一步发现阻断neddylation修饰可抑制lamin B1表达,沉默P53表达可部分逆转阻断neddylation修饰对lamin B1的抑制。由此我们得出初步结果, neddylation修饰通过P53依赖的方式调控lamin B1的表达。

关于neddylation修饰与lamin B1之间的关系,目前未见研究报道。本研究发现neddylation修饰与lamin B1表达呈显著正相关,弥补了之前研究的空白。本课题组前期研究发现neddylation修饰在乳腺癌中过度活化并提示较差预后^[9]。本研究的结果发现, neddylation修饰调控lamin B1表达, lamin B1高表达提示患者较差预后。Neddylation修饰和lamin B1结合传统的预后因子可能为乳腺癌提供更加敏感和精确的预后模型。关于Lamin B1在乳腺癌中的预后预测价值及两者的结合是否能够提供更好的预测模型,尚待进一步的研究。

靶向neddylation修饰可作为一种潜在的肿瘤治疗方法。MLN4924作为一种小分子neddylation抑制剂,已进入I/II期临床试验阶段,并取得

了不错的结果,证明了其较好的安全性和有效性^[19]。lamin B1作为核被膜的主要组成成分,维持细胞核的形状和结构^[11]。lamin B1表达缺失可诱导细胞衰老,从而抑制肿瘤细胞的生长和增殖^[16]。本研究发现阻断neddylation修饰抑制lamin B1表达,据此推测neddylation修饰可能通过lamin B1发挥作用,进一步我们证实neddylation修饰通过P53调控lamin B1表达。lamin B1可能作为乳腺癌的潜在治疗靶点,有待于进一步研究证实,并明确neddylation修饰如何通过P53调控lamin B1表达。

本研究存在一定的局限性。首先,对于lamin B1的检测,以往的研究多采用免疫组织化学法,也有研究者采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)的方法进行分析。本研究采用的是免疫组织化学法,存在一定的偏倚。其次,研究的样本量较小,可能会使结果的可信度下降。未来将增加样本量,继续深入研究。

本研究的结果表明, neddylation修饰调控lamin B1表达。基于neddylation修饰及lamin B1也许可以建立更好的乳腺癌预后预测模型,需要进一步的前瞻性研究加以证实。Lamin B1可能作为乳腺癌治疗的潜在靶点。

利益冲突声明：所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] RABUT G, PETER M. Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series [J]. *EMBO Rep*, 2008, 9(10): 969–976.
- [2] PAN Z Q, KENTSIS A, DIAS D C, et al. Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction [J]. *Oncogene*, 2004, 23(11): 1985–1997.
- [3] PETROSKI M D, DESHAIES R J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(1): 9–20.
- [4] NAKAYAMA K I, NAKAYAMA K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(5): 369–381.
- [5] LI L H, WANG M S, YU G Y, et al. Overactivated neddylation pathway as a therapeutic target in lung cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(6): dju083.
- [6] LUO Z G, YU G Y, LEE H W, et al. The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 induces autophagy and apoptosis to suppress liver cancer cell growth [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(13): 3360–3371.
- [7] HUA W, LI C J, YANG Z X, et al. Suppression of glioblastoma by targeting the overactivated protein neddylation pathway [J]. *Neuro-oncology*, 2015, 17(10): 1333–1343.
- [8] WANG Y C, LUO Z G, PAN Y F, et al. Targeting protein neddylation with an NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924 induced apoptosis or senescence in human lymphoma cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(3): 420–429.
- [9] JIA X Q, LI C J, LI L H, et al. Neddylation inactivation facilitates FOXO3a nuclear export to suppress estrogen receptor transcription and improve fulvestrant sensitivity [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(12): 3658–3672.
- [10] BURKE B, STEWART C L. Functional architecture of the cell's nucleus in development, aging, and disease [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2014, 109: 1–52.
- [11] SHIMI T, PFLEGHAAR K, KOJIMA S, et al. The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(24): 3409–3421.
- [12] SPANN T P, GOLDMAN A E, WANG C, et al. Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription [J]. *J Cell Biol*, 2002, 156(4): 603–608.
- [13] MOIR R D, SPANN T P, HERRMANN H, et al. Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication [J]. *J Cell Biol*, 2000, 149(6): 1179–1192.
- [14] SHUMAKER D K, SOLIMANDO L, SENGUPTA K, et al. The highly conserved nuclear lamin Ig-fold binds to PCNA: its role in DNA replication [J]. *J Cell Biol*, 2008, 181(2): 269–280.
- [15] GERACE L, BLUM A, BLOBEL G. Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution [J]. *J Cell Biol*, 1978, 79(2 Pt 1): 546–566.
- [16] RADSPIELER M M, SCHINDELDECKER M, STENZEL P, et al. Lamin-B1 is a senescence-associated biomarker in clear-cell renal cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(3): 2654–2660.
- [17] DREESEN O, CHOJNOWSKI A, ONG P F, et al. Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence [J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(5): 605–617.
- [18] ABIDA W M, NIKOLAEV A, ZHAO W H, et al. FBXO11 promotes the neddylation of p53 and inhibits its transcriptional activity [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(3): 1797–1804.
- [19] SARANTOPOULOS J, SHAPIRO G I, COHEN R B, et al. Phase I study of the investigational NEDD8-activating enzyme inhibitor pevonedistat (TAK-924/MLN4924) in patients with advanced solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(4): 847–857.

(收稿日期: 2022-02-10 修回日期: 2022-05-29)