

ONC206 抑制浆液性乳头状子宫内膜癌增殖和转移的体外研究

黄 裕, 王 冬, 顾荣花, 邹冬玲, 周 琦

(重庆大学附属肿瘤医院, 重庆 400030)

摘 要: [目的] 探讨 ONC206 对子宫浆液性乳头状腺癌(UPSC)细胞系增殖、粘附和侵袭的作用, 评估其抗肿瘤效能, 并分析其机制。[方法] 用 ONC201 或 ONC206 治疗 UPSC 细胞系 ARK1 和 SPEC2, MTT 法和半胱天冬酶-3, 9 (Caspase-3, 9) 测定检测细胞增殖和凋亡, 并进行粘附实验、伤口愈合实验量化其降低转移和侵袭的能力, 进行活性氧(ROS)和 JC-1 检测, 分析整合应激反应(ISR)。使用整合应激抑制剂 N-乙酰半胱氨酸预处理后, 重复进行 ONC206 的增殖, 侵袭和应激测定, 蛋白质印迹法检测相应蛋白表达水平。[结果] 在 UPSC 细胞系 ARK1 和 SPEC2 中, ONC206 以浓度依赖方式抑制其增殖, 平均 IC₅₀ 值分别为 330nM 和 240nM, 均低于 ONC201。Caspase-3, 9 表达水平升高, ROS 与基线相比增加 83%~105%, 线粒体膜电位降低 16%~38%, ISR 特异性蛋白表达增加, 上皮-间质转化蛋白表达下调。使用 NAC 后, ONC206 对肿瘤细胞黏附、增殖和侵袭的抑制功效降低。[结论] 亚吡啶酮家族药物 ONC206 通过肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)介导的凋亡途径, 同时激活 ISR 传播下游效应, 降低 UPSC 肿瘤细胞的增殖、粘附和侵袭能力。

主题词: ONC206; 子宫内膜癌; 侵袭转移; 凋亡; 整合应激反应

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)09-0796-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.09.B009

ONC206 Exhibits Anti-Proliferative and Anti-Metastatic via Activation of Integrated Stress Response in Uterine Papillary Serous Carcinoma *in vitro*

HUANG Yu, WANG Dong, GU Rong-hua, ZOU Dong-ling, ZHOU Qi

(Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing 400030, China)

Abstract: [Objective] To investigate the anti-tumorigenic effects of ONC206 on the proliferation, adhesion, and invasion of uterine papillary serous carcinoma(UPSC) cell lines, as well as elucidate its mechanisms of action. [Methods] UPSC cell lines ARK1 and SPEC2 were treated with either ONC201 or ONC206, cellular proliferation and apoptosis were measured by using MTT and caspase-3/9 assays. In vitro wound healing assay and adhesion test were performed to quantify metastatic and invasive potential, performed reactive oxygen species(ROS) and JC-1 detection, and analyze the integrated stress response(ISR). Proliferation, invasion, and stress assays were repeated after pretreatment of stress inhibitor N-acetylcysteine(NAC). Western blots were run to assess target protein expression levels. [Results] In UPSC cell lines ARK1 and SPEC2, ONC206 inhibited its proliferation in a dose-dependent manner, with average IC₅₀ of 330nM and 240nM, respectively, which were lower than ONC201. Caspase-3, 9 expression levels increased, ROS increased 83%~105% compared to baseline, mitochondrial membrane potential decreased 16%~38%, ISR-specific protein expression increased, and epithelial-mesenchymal transition protein expression was down-regulated. Efficacy of ONC206 on adhesion, wound healing, and cellular proliferation were significantly decreased after pretreatment with NAC. [Conclusion] The piperidine family drug ONC206 through the TRAIL-mediated apoptosis pathway, and simultaneously activates the downstream effects of ISR transmission, which significantly reduces the proliferation, adhesion and invasion of UPSC tumor cells.

Subject words: ONC206; endometrial cancer; invasion and metastasis; apoptosis; integrated stress response

ONC201 是一类抗肿瘤的亚吡啶酮小分子, 在

表型细胞筛选中被鉴定为 p53 独立的肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的诱导因子。ONC201 导致 AKT 和 MAPK 信号通路双重失活, 导致转录因子 FOXO3a 去磷酸化并导致 TRAIL 转录^[1-2]。在临床前

通信作者: 周琦, 主任医师, 学士; 重庆大学附属肿瘤医院妇科肿瘤中心, 重庆市沙坪坝区汉渝路 181 号(400030); E-mail: qizhou9128@163.com

收稿日期: 2020-02-02; **修回日期:** 2020-03-19

癌症模型中,ONC201 在各种晚期实体瘤中均表现出抗癌活性,而在动物癌症模型中毒副作用不明显。2014 年 FDA 批准 ONC201 作为多种人类癌症的抗肿瘤治疗剂进行 I/II 期临床试验^[3-5]。ONC206 是 ONC201 的化学衍生物,用卤代苄基取代 ONC201 的 2-甲基-苄基基团,具有更宽的体外治疗窗口,初步研究结论其具有更强的抗肿瘤效力^[6-7]。本实验通过检测 ONC206 在 UPSC 细胞系中产生的抑制增殖、诱导凋亡、促进内质网应激等作用,为特殊类型子宫内膜癌的临床治疗提供新的药物方向。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和试剂

UPSC 细胞系 ARK1 和 SPEC2 用于实验。ARK1 细胞保存于含 10%胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养基中,SPEC-2 细胞保存在含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基中。所有培养基均补充 100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素,在 37℃、5%CO₂ 培养箱中进行细胞培养。ONC201、ONC206 均购自美国 Oncocetetics 公司。MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐)购自美国 Sigma 公司。所有抗体均购自美国 Cell Signaling 公司。Caspase-3(Ac-DEVD-AMC)和 Caspase-9(Ac-LEHD-AMC)购自美国 MCE 公司,增强的化学发光免疫印迹检测试剂购自美国 Amersham 公司。

1.2 MTT 检测

将 ARK1 和 SPEC2 细胞以 $4 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$ 细胞/孔的浓度铺板 96 孔板并培养 24h。用不同剂量的 ONC201 和 ONC206 治疗细胞 72h。将 MTT(5mg/ml)以 5μl/孔添加至 96 孔板,再孵育 1h。添加 100μl 二甲基亚砷(DMSO)终止反应。用酶标仪(Tecan,美国)测量 570nm 波长处的吸收值读取结果。将 ONC201 和 ONC206 作用吸收值计算为对照相同 96 孔板上生长 DMSO 处理的细胞获得的增殖百分比。

1.3 Caspase-9、Caspase-3 测定

使用特异性底物测量暴露于不同浓度 ONC206 的 UPSC 细胞的半胱天冬酶活性。将 ARK1 和 SPEC2 细胞 (1×10^6 细胞/孔)在 6 孔板中培养,CO₂ 培养箱中 37℃温育过夜后,加入不同浓度 ONC206 (0.05、0.5 和 5μm)再孵育 24h。随后收集细胞裂解,离心,取上清,加入底物,37℃孵育 20min,添加 100μl

Caspase-9 或 Caspase-3 上样缓冲液到不同浓度上清中并轻轻混合,加入 96 孔 ELISA 板,读取 380nm 或 450nm 波长处的吸收值。

1.4 粘附测定实验

在 96 孔板每个孔上包被 100μl 层黏连蛋白 (10μg/ml),37℃下孵育 1h。吸出液体后加入 200μl/孔的封闭缓冲液 45min,PBS 洗涤并置于冰上。将 SPEC2 和 ARK1 细胞以 3000 细胞/孔重悬于不同浓度的 ONC206,37℃下孵育 1h,吸出培养基,室温下以 100μl/孔添加 5%戊二醛固定细胞 30min,PBS 洗涤,0.1%结晶紫溶液染色 30min。无菌水洗涤后加入 100μl/孔 10%乙酸溶解染料,摇动平板 5min 后,酶标仪 575nm 波长测量吸光度。

1.5 伤口愈合实验

将 ARK1 和 SPEC2 细胞以 2×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板,使用 20μl 移液器吸头穿过细胞单层形成均匀的伤口^[8]。洗涤细胞,分别用 0.05、0.5 和 5μm ONC206 处理 48h,拍摄照片并用 Image J 软件(美国国立卫生研究院,马里兰)分析刮擦区域,通过与对照细胞比较来测量百分比。预处理则在使用 ONC206 之前 4h 加入 1M 浓度 NAC 2μl/孔。

1.6 活性氧(reactive oxygen species,ROS)测定

以 $6 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$ 细胞/孔接种 ARK1 和 SPEC2 细胞于 96 孔板并培养 24h,随后用不同剂量 ONC206 治疗细胞 12h。将细胞与 DCFH-DA (20μM)孵育 30min 后,荧光酶标仪测定 485nm 激发波长和 530nm 激发波长下的荧光强度^[9]。

1.7 线粒体膜电位测定

如前述数量的 ARK1 和 SPEC2 细胞接种 96 孔板,ONC206 浓度 0.05、0.5 和 5μm 治疗细胞。JC-1 (1μl/ml)37℃下染色 20min,PBS 洗涤后荧光酶标仪分别测量 485~535nm 激发波长(绿光)、535~590nm 激发波长(红光)的荧光强度,并计算其比值^[10]。以上所有实验一式 3 份进行,并重复 2 次以评估反应的一致性。

1.8 蛋白质印迹法检测相应蛋白表达水平

按 2×10^5 细胞/孔浓度将 ARK1 和 SPEC2 细胞分别接种在 6 孔板相应培养基中培养 24h,如需加入 NAC,则处理 4h 后吸出,再用不同浓度 ONC206 治疗细胞 18~24h。在 RIPA 缓冲液中制备细胞裂解物,通过凝胶电泳分离等量的蛋白质,并将其转移到

PVDF膜上。将膜在含0.1%Tween-20的Tris缓冲盐水中4%BSA中封闭,与1:1000稀释的一抗4℃孵育过夜。一抗包括TRAIL特征受体DR5、DRD2、DRD5;与内质网应激有关抗体如PERK、Bip、ATF4等;与细胞迁移和侵袭相关抗体Slug、Snail、VEGF等。洗涤膜后与过氧化物酶偶联的鼠或兔第二抗体一起孵育1h。使用增强的化学发光检测系统(Alpha Innotech,美国)检测抗体结合显像。显影后将膜剥离并使用 β -actin或 α -tubulin抗体重新探测,以确认均等的蛋白负荷。测量每个条带的强度,并以 β -actin或 α -tubulin作为标准内部对照。

1.9 统计学处理

将实验结果标准化为对照的平均值,并使用Student *t* 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ONC206 具有抑制 UPSC 细胞增殖活性

ONC206对两种细胞系的增殖生长均表现出剂量依赖性抑制效应,剂量远低于ONC201(Figure 1)。对于ARK1,ONC201的平均 IC_{50} 值为1.59nM,ONC206为330nM;对于SPEC2,ONC201平均 IC_{50} 值为810nM,ONC206为240nM。相较ONC201,ONC206产生的细胞增殖抑制效能更强。

Figure 1B免疫印迹所示应用ONC206后两种细胞的死亡受体5(death receptor 5, DR5)蛋白表达水平明显增高,而多巴胺D2样受体(dopamine D2-like receptor)DRD2和多巴胺D1样受体DRD5的表达降低,使用已知细胞应激抑制剂NAC预处理4h的ARK1和SPEC2细胞,对0.5 μ M和5 μ M ONC206的反应降低,结果显示两种细胞的增殖抑制作用下降(Figure 1C)。

2.2 ONC206 诱导 UPSC 细胞凋亡

如Figure 2A、2B所示,用ONC206(0.5 μ M和5 μ M)处理后,活性Caspase-9, Caspase-3荧光强度均增加,结果表明ONC206可以通过激活参与细胞内源性途径的半胱天冬酶来启动线粒体途径凋亡。

2.3 ONC206 引起 UPSC 细胞 ROS 改变和线粒体膜电位变化

不同浓度ONC206处理UPSC细胞24h后,如Figure 3A示,以对照组荧光度均值为1,用0.5 μ M和5 μ M ONC206处理的ARK1细胞ROS水平分别达到了1.8和2.0, SPEC2细胞为1.6和1.7。Figure 3B可见NAC可抑制两种细胞ROS的产生,并降低ONC206诱导的细胞死亡。

在具有高膜电位的未损伤线粒体中,JC-1在活细胞中形成聚集体(红色荧光),而在凋亡细胞中,JC-1形成具有低线粒体膜电位的单体(绿色荧光)。

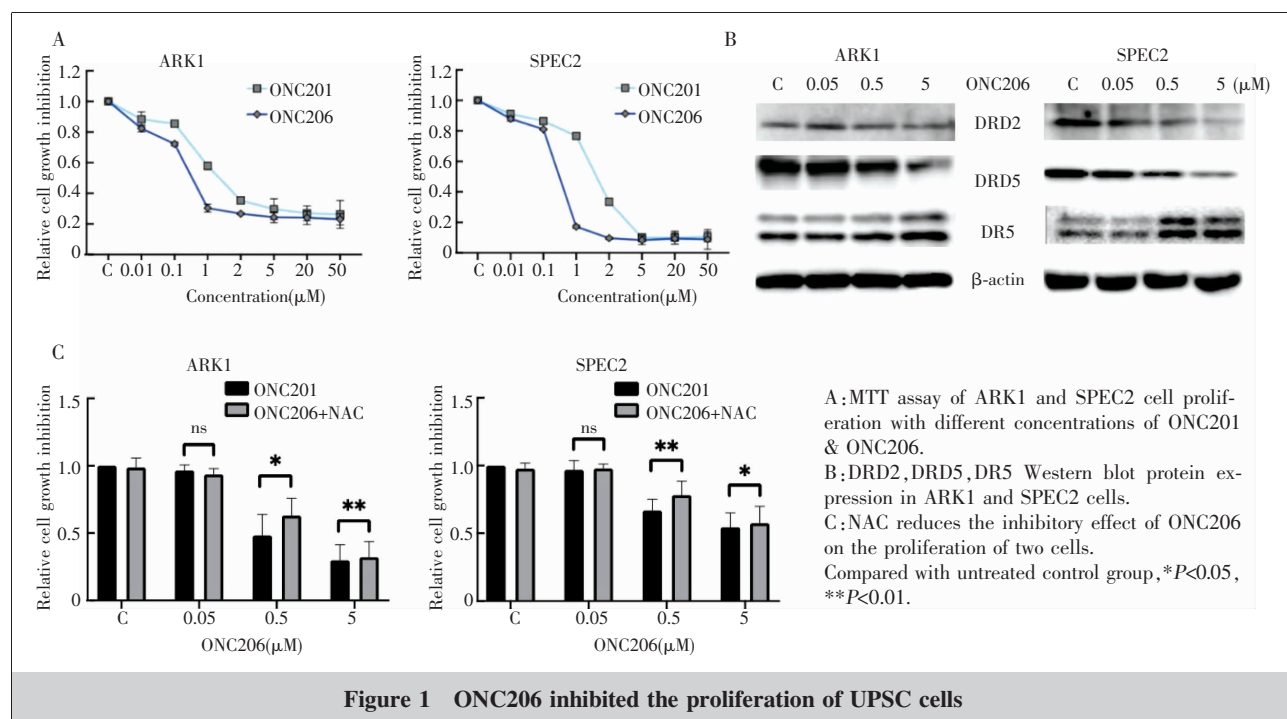
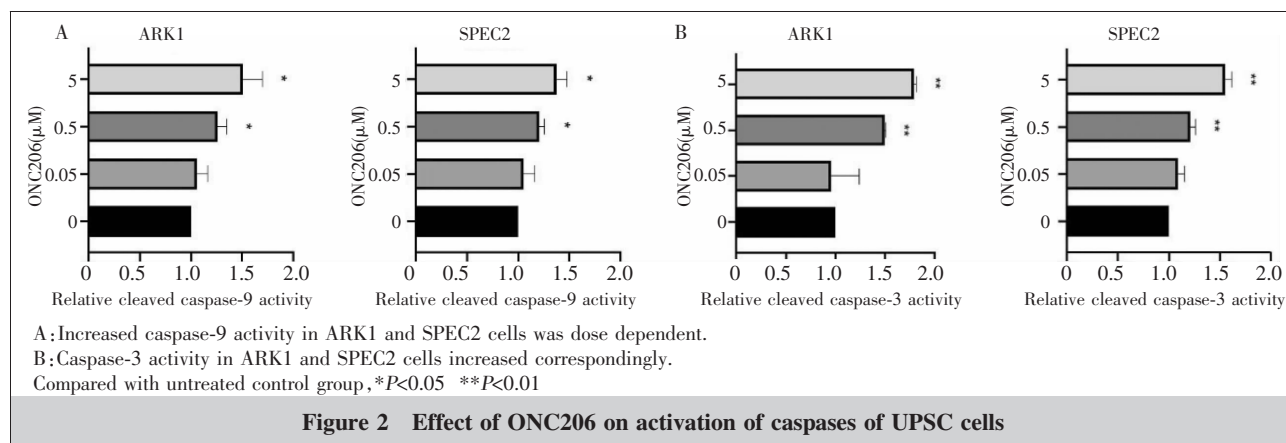


Figure 1 ONC206 inhibited the proliferation of UPSC cells



与对照组相比,用浓度较高的 ONC206 (0.5 μ M 和 5 μ M)处理细胞,随着浓度增加,ARK1 细胞聚集体/单体的比例分别从对照组的 1.0 降至 0.5 μ M 组的 0.7584 和 5 μ M 组的 0.5974, SPEC2 细胞降至 0.7841 (0.5 μ M) 和 0.5022 (5 μ M),结果表明 ONC206 能诱导 UPSC 细胞中线粒体膜电位的丧失(Figure 3C)。

不同浓度 ONC206 处理两种细胞 24h 后, PERK、Bip、钙联接蛋白、ATF4、IRE- α 表达增加,而

PDI 降低(Figure 3D),说明细胞应激可能是 ONC206 产生抗肿瘤活性的主要机制。

2.4 ONC206 抑制 UPSC 细胞黏附和侵袭

Figure 4A 显示 ARK1 和 SPEC2 细胞在 ONC206 浓度 0.5 μ M 和 5 μ M 作用下,粘附力下降。

从 Figure 4B 可以看到细胞迁移能力降低,随药物浓度升高创面愈合下降,细胞不能迁移覆盖的宽度上升。在暴露于 ONC206 之前使用 NAC 对 ARK1

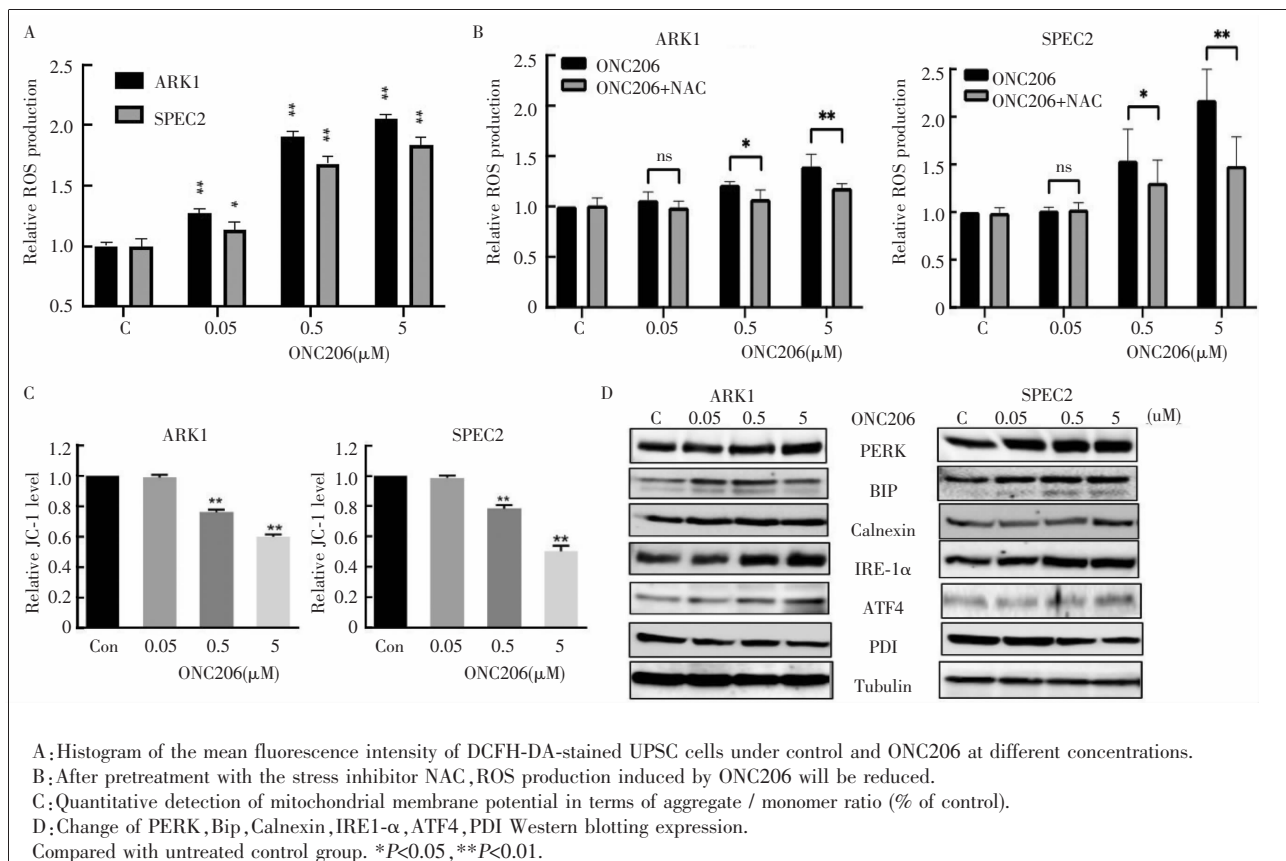


Figure 3 Effect of ONC206 on ROS generation and mitochondrial membrane potential of UPSC cells

和 SPEC2 细胞进行预处理后,“刮擦”区域愈合的宽度较未预处理组变窄,说明 NAC 阻滞了 ONC206 对两种细胞的伤口愈合抑制作用(Figure 4C)。

免疫印迹实验表明 Slug、Snail、E-Cadherin、Vimentin 和 VEGF-C 等相关蛋白表达均呈现剂量依赖性下调趋势 (Figure 4D)。而加入 NAC 抑制剂后,

Slug、Snail 和 VEGF-C 印迹密度表达较未使用 NAC 者增强(Figure 4E)。

3 讨论

Ⅱ型子宫内膜癌,又称特殊类型子宫内膜癌,病

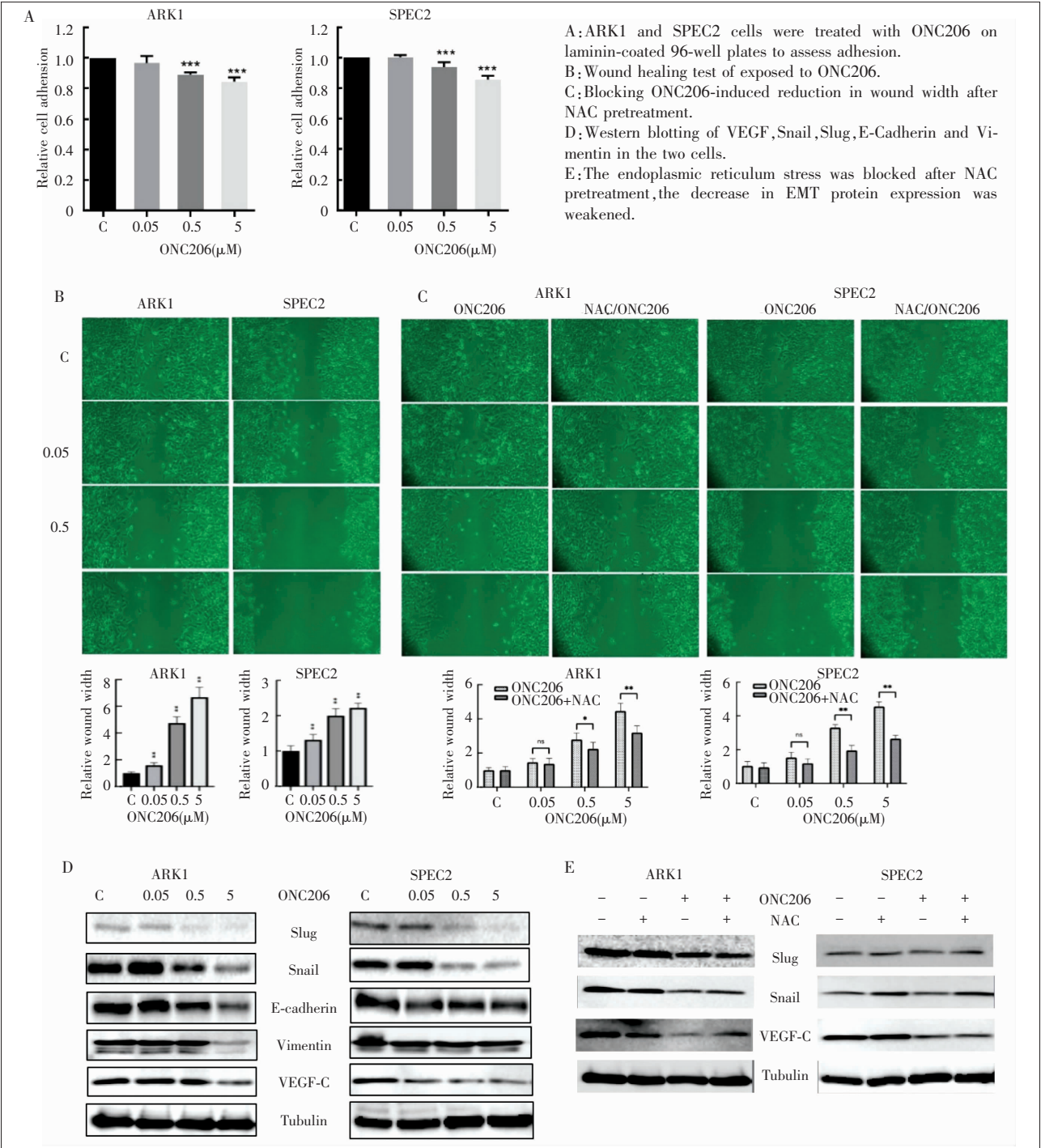


Figure 4 ONC206 decreased adhesion and invasion in UPSC cells

理组织类型以浆液性乳头状腺癌为主,虽然发病率仅占整个子宫内膜癌的10%左右,但由于早期诊断率低、侵袭转移率高、化疗药物不敏感等原因,相对I型子宫内膜癌预后差,死亡率高^[11]。因此,如何改善II型子宫内膜癌对化疗药物的敏感性成为改善治疗效果与提高生存率的重要一环,也是探索新的治疗策略的持续性需求。

以ONC201为代表的咪唑酮类化合物的抗实体瘤细胞生长增殖作用是一个活跃的研究领域,这类化合物最大特点是通过TRAIL依赖性和非依赖性两种途径发挥其抗癌活性。TRAIL途径是先天宿主免疫反应中一种强大的效应细胞因子,即使在抑癌基因p53缺失状态下,该类化合物仍能诱导TRAIL的转录,诱导AKT和ERK磷酸化的双重抑制,从而导致Foxo3a去磷酸化。然后,去磷酸化Foxo3a从细胞质移入细胞核,并与TRAIL基因的启动子结合以上调TRAIL基因的转录。受体DR5触发外源性细胞死亡途径,选择性诱导肿瘤和转化细胞(包括癌症干细胞)的凋亡,而不会影响正常细胞^[12-13]。恶性肿瘤患者p53功能障碍常见,也是导致肿瘤产生侵袭、转移和化疗耐药的根本原因之一,亚胺吡啶酮小分子诱导剂对于无法耐受多种治疗方案或没有治疗反应的患者无疑是一种很好的选择。

ONC206保留了亚胺吡啶酮核心结构,以2,4-diF-苄基在R1基团内取代ONC201的2-甲基-苄基(R1)基团,具有更强的化学效力^[14]。本文研究中首先进行了与ONC201对比UPSC细胞增殖抑制的实验,结果显示同样浓度下ONC206作用的细胞增殖仅为ONC201的一半,说明用卤代苄基取代R1基团增加了效力。小分子ONC206是D2样多巴胺受体的选择性拮抗剂,多巴胺受体在肿瘤中的作用尚未完全清楚,既往研究显示在胃癌、神经内分泌肿瘤、胶质母细胞瘤、乳腺癌、宫颈癌和结肠直肠癌中均发现了D2样DRD2和D1样DRD5的过度表达^[3-4,15-16],通过siRNA转染对DRD2基因产生减弱效果或直接敲低DRD2的表达,或抑制DRD5结合,能够显著性减低细胞活力,显示出包括子宫内膜癌细胞在内的抗肿瘤作用^[17-19]。在本实验中应用ONC206后细胞中DRD2和DRD5表达均呈降低趋势,表明受体拮抗作用具有抗癌作用,结合研究文献认为ONC206激活的ISR可破坏多巴胺受体的表达

和活性,从而产生细胞毒性作用。

免疫蛋白印迹实验提示DR5表达上调与ONC206浓度增加呈一致性,说明其激活的信号通路与ONC201类似,即激活整合应激反应途径导致DR5上调,进而其配体TRAIL上调,迅速诱导肿瘤细胞凋亡。配体与DR5结合后,发生构象变化,招募Fas相关死亡结构域(Fas-associated death domain, FADD)来诱导细胞凋亡。FADD是接头蛋白结合Caspase-8的前体,如此便形成了“配体-死亡受体-FADD-半胱天冬酶原”组成的死亡诱导信号复合物。激活的Caspase-8启动线粒体依赖途径,引起细胞色素C(c-Myc)释放进入胞质,形成凋亡复合体激活Caspase-9,进而通过Caspase-3诱导肿瘤细胞凋亡。Prabhu等^[20]研究认为凋亡蛋白Bcl-2过表达可防止ONC201诱导的细胞凋亡,而Bcl-2表达的抑制则协同增加这些细胞凋亡。在相同浓度下,ONC206在干样GBM细胞中增加了促凋亡Bcl-2家族成员的表达,此外,在降低ATP水平,抑制糖酵解和氧化磷酸化方面更有效,从而导致“能量饥饿的转录状态”并激活GBM细胞中与ER应激有关的途径^[7,21]。我们发现在UPSC细胞中,在ONC206作用下,Caspase-9和Caspase-3表达显著性增加,表明ONC206通过TRAIL依赖性方式抑制细胞的生长。

鉴于UPSC具有很大的细胞异质性,同时基于已有的ONC201研究,我们认为ONC206也具有独立于多巴胺受体以外的其他抗癌途径。在不依赖TRAIL的途径中,咪唑酮类化合物可以诱导内质网应激反应(ER)或整合应激反应(ISR)最终导致活化转录因子4(ATF4)的增强^[22]。在经典ER应激途径中,未折叠蛋白的积累导致分子伴侣蛋白Bip从eIF2a激酶PERK分离,然后被自磷酸化激活使eIF2a磷酸化,从而导致ATF4选择性增加。本研究结果显示ONC206可诱导PERK、Bip、Calnexin、ATF4表达上调,损害线粒体呼吸及造成线粒体膜电位变化,印证亚胺吡啶酮通过抑制糖酵解和氧化磷酸化来影响能量代谢,并伴随着涉及ATF4的丝氨酸-碳-甘氨酸(SOG)途径协同诱导细胞死亡^[21,23]。

细胞粘附和侵袭是转移的早期步骤,涉及肿瘤细胞对细胞外基质(ECM)的降解和随之而来的细胞迁移,Wagner等^[24]发现,即使在TRAIL抗性癌细胞中,ONC201也有减弱癌细胞的迁移和侵袭能力。粘

附测定和伤口愈合测定结果显示 ONC206 通过钙黏蛋白及其相关转录因子的介导,降低了 UPSC 细胞粘附和侵袭的能力。免疫印迹 EMT 相关蛋白 Snail、Slug、E-钙黏着蛋白和体现血管上皮侵袭能力 VEGF 的表达水平测定提示 ONC206 可能通过调 AMPK/AKT/mTOR 和 MAPK 途径,对 UPSC 细胞的增殖和侵袭产生抑制作用。但是,其影响 EMT 和 VEGF 的潜在生物学机制仍待进一步研究。添加已知 ISR 抑制剂 NAC 的伤口愈合测定、ROS 实验结果和 Snail、Slug、VEGF 免疫印迹灰度变化也反向证明了细胞应激途径参与亚胺吡啶酮介导的抑制细胞粘附、侵袭的假设。

参考文献:

- [1] Ishizawa J, Kojima K, Chachad D, et al. ATF4 induction through an atypical integrated stress response to ONC201 triggers p53-independent apoptosis in hematological malignancies[J]. *Sci Signal*, 2016, 9(415):ra17.
- [2] Allen JE, Krigsfeld G, Mayes PA, et al. Dual inactivation of Akt and ERK by TIC10 signals Foxo3a nuclear translocation, TRAIL gene induction, and potent antitumor effects[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(171):171ra17.
- [3] Stein MN, Bertino JR, Kaufman HL, et al. First-in-human clinical trial of oral ONC201 in patients with refractory solid tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(15):4163-4169.
- [4] Arrillaga-Romany I, Chi AS, Allen JE, et al. A phase 2 study of the first imipridone ONC201, a selective DRD2 antagonist for oncology, administered every three weeks in recurrent glioblastoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(45):79298-79304.
- [5] Ralff MD, Lulla AR, Wagner J, et al. ONC201: a new treatment option being tested clinically for recurrent glioblastoma[J]. *Transl Cancer Res*, 2017, 6(Suppl 7):S1239-S1243.
- [6] Wagner J, Kline CL, Ralff MD, et al. Preclinical evaluation of the imipridone family, analogs of clinical stage anti-cancer small molecule ONC201, reveals potent anti-cancer effects of ONC212[J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(19):1790-1799.
- [7] Chi AS. Identification of more potent imipridones, a new class of anti-cancer agents[J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(17):1566-1567.
- [8] Zheng Y, Yang X, Wang C, et al. HDAC6, modulated by miR-206, promotes endometrial cancer progression through the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):3576.
- [9] Kim SM, Hwang KA, Choi DW, et al. The cigarette smoke components induced the cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition via production of reactive oxygen species in endometrial adenocarcinoma cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 121:657-665.
- [10] Bikas A, Jensen K, Patel A, et al. Mitotane induces mitochondrial membrane depolarization and apoptosis in thyroid cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2019, 55(1):7-20.
- [11] Suarez AA, Felix AS, Cohn DE. Bokhman redux: endometrial cancer "types" in the 21st century [J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 144(2):243-249.
- [12] Yuan X, Gajan A, Chu Q, et al. Developing TRAIL/TRAIL death receptor-based cancer therapies[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2018, 37(4):733-748.
- [13] Anderson PM, Scott J. Imipridone family on successful TRAIL[J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(16):1487-1488.
- [14] Nii T, Prabhu VV, Ruvalo V, et al. Imipridone ONC212 activates orphan G protein-coupled receptor GPR132 and integrated stress response in acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2019, 33(12):2805-2816.
- [15] Błasiak E, Łukasiewicz S, Szafran-Pilch K, et al. Genetic variants of dopamine D2 receptor impact heterodimerization with dopamine D1 receptor[J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(2):235-241.
- [16] Prabhu VV, Madhukar NS, Gilvary C, et al. Dopamine receptor D5 is a modulator of tumor response to dopamine receptor D2 antagonism[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(7):2305-2313.
- [17] Kline CLB, Ralff MD, Lulla AR, et al. Role of dopamine receptors in the anticancer activity of ONC201[J]. *Neoplasia*, 2018, 20(1):80-91.
- [18] Fang Z, Wang J, Clark LH, et al. ONC201 demonstrates anti-tumorigenic and anti-metastatic activity in uterine serous carcinoma in vitro[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(8):1551-1563.
- [19] Arrillaga-Romany I, Odia Y, Prabhu VV, et al. Biological activity of weekly ONC201 in adult recurrent glioblastoma patients[J]. *Neuro Oncol*, 2020, 22(1):94-102.
- [20] Prabhu VV, Talekar MK, Lulla AR, et al. Single agent and synergistic combinatorial efficacy of first-in-class small molecule imipridone ONC201 in hematological malignancies[J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(4):468-478.
- [21] Graves PR, Aponte-Collazo LJ, Fennell EMJ, et al. Mitochondrial protease ClpP is a target for the anticancer compounds ONC201 and related analogues[J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14(5):1020-1029.
- [22] Romaguera JE, Lee HJ, Tarapore R, et al. Integrated stress response and immune cell infiltration in an ibrutinib-refractory mantle cell lymphoma patient following ONC201 treatment[J]. *Br J Haematol*, 2019, 185(1):133-136.
- [23] Pruss M, Dwucet A, Tanriover M, et al. Dual metabolic reprogramming by ONC201/TIC10 and 2-Deoxyglucose induces energy depletion and synergistic anti-cancer activity in glioblastoma[J]. *Br J Cancer*, 2020, published online ahead of print.
- [24] Wagner J, Kline CL, Zhou L, et al. Dose intensification of TRAIL-inducing ONC201 inhibits metastasis and promotes intratumoral NK cell recruitment [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(6):2325-2338.