

“靶点+活性”快速发现苦蕒中靶向Hsp90抗胰腺癌有效成分的研究

钱亚芳¹, 杨波², 冯迪², 钱亿帆², 吴亚莉², 张姁², 谷满仓^{2*}

(1. 浙江中医药大学附属第一医院(浙江省中医院), 浙江 杭州 310006;

2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053)

摘要: 本研究基于“靶点+活性”双重导向快速发现技术筛选苦蕒中靶向Hsp90蛋白杀伤胰腺癌细胞的活性单体。通过将体外抗肿瘤活性筛选技术、双萤光素酶报告基因技术与多元色谱分离技术相耦合, 从中药苦蕒中筛选靶向Hsp90的活性单体。研究化合物抗胰腺癌细胞BXPC-3生长活性, 初步探讨化合物抑制Hsp90分子机制。结果显示从苦蕒中分离得到醉茄内酯类化合物withanolide E (WE) 与4 β -hydroxywithanolide E (HWE)。MTT结果显示, WE与HWE处理BXPC-3细胞48 h的半数抑制率(IC₅₀)分别为0.71 \pm 0.03和1.23 \pm 0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 萤光素酶报告基因实验结果显示, WE与HWE可使细胞热休克元件活性增强12.5 \pm 3.4倍与28.1 \pm 3.4倍; 两者均呈现量效与时效关系。分子机制研究提示, 与DMSO组相比5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WE和HWE分别处理BXPC-3细胞48 h可诱导Hsp90二聚体蛋白表达上调6.5 \pm 1.3和11.8 \pm 2.0倍, Hsp90客户蛋白Akt表达下调至DMSO组的21.7% \pm 2.8%和9.8% \pm 1.4%; shRNA干扰Hsp90基因表达可阻断其抑制Akt表达与杀伤肿瘤细胞的作用。采用“靶点+活性”双重导向快速发现技术可从苦蕒中筛选得到靶向Hsp90蛋白杀伤胰腺癌细胞的活性单体WE与HWE; 其分子机制可能与诱导胰腺癌细胞形成无活性Hsp90二聚体, 进而抑制Hsp90客户蛋白Akt表达有关。

关键词: 双重导向快速筛选; 苦蕒; 双萤光素酶报告基因; 热休克蛋白90; 胰腺癌细胞

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)03-0475-07

The "target + activity" method for rapid discovery of active compounds targeting Hsp90 in pancreatic cancer cells from *Physalis angulata* L.

QIAN Ya-fang¹, YANG Bo², FENG Di², QIAN Yi-fan², WU Ya-li², ZHANG Xu², GU Man-cang^{2*}

(1. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University (Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine), Hangzhou 310006, China; 2. School of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: The purpose of this study was to select the active compounds targeting Hsp90 protein in pancreatic cancer cells through a new dual "target + activity" rapid discovery technique. We combined an *in vitro* anti-cancer activity screening method with a dual-luciferase reporter gene and multi-chromatography separation technology, for rapid discovery of potential Hsp90 inhibitors from the Chinese herbal medicine *Physalis angulata* L. The anti-proliferation activity of those compounds was assessed in pancreatic cancer cell line BxPC-3 by MTT assays. The molecular mechanisms of Hsp90 inhibition were explored by Western blot and shRNA knockdown assays. As a result, two withanolides, withanolide E (WE) and 4 β -hydroxywithanolide E (HWE), were identified from *Physalis*

收稿日期: 2018-09-30; 修回日期: 2018-11-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673607, 81303235, 81774011); 浙江省自然科学基金资助项目(Y19H280009, Y17H280023); 湖州市科技计划公益类研究(2018GZ24).

*通讯作者 Tel: 86-571-61768158, E-mail: gmancang@zcmu.edu

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0891

angulata L. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of WE and HWE were 0.71 ± 0.03 and 1.23 ± 0.10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for the growth of BxPC-3 cells in 48 h. Luciferase reporter assay demonstrated that WE and HWE significantly induced heat shock element (HSE) activity in a dose- and time-dependent manner. The molecular mechanism study showed that after exposing to $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ WE or HWE for 48 h, the aggregation of Hsp90 dimer was upregulated to 6.5 ± 1.3 and 11.8 ± 2.0 fold, while the expression of Hsp90 client protein Akt was downregulated to $21.7\% \pm 2.8\%$ and $9.8\% \pm 1.4\%$ of the control group. Moreover, the Hsp90 inhibitory activity of WE or HWE was canceled by shRNA mediated Hsp90 knockdown. Overall, based on the dual "target + active" rapid discovery technique, two new Hsp90 inhibitors WE and HWE were found from *Physalis angulata* L. The Hsp90 inhibitory mechanism of WE and HWE may be mediated by induction of Hsp90 aggregate dimer and inhibition of Hsp90 client protein Akt expression.

Key words: dual-oriented rapid discovery; *Physalis angulata* L.; dual-luciferase reporter gene; heat shock protein 90; pancreatic cancer cell

胰腺癌是一种恶性程度极高的消化系统肿瘤,近年来已成为我国癌症患者死亡的第五大恶性肿瘤,然而常规的治疗手段疗效十分有限,急需开发新型的药物用于胰腺癌的临床治疗^[1]。特异性地拮抗 Hsp90 功能可以同时抑制肿瘤细胞内多条关键信号通路的活性,有望通过对肿瘤细胞特异性地“多靶点打击”诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长^[2]。随着雷公藤红素 (celastrol)^[3]和姜黄素衍生物^[4]等中药有效成分拮抗 Hsp90 介导肿瘤杀伤的作用机制得到详细阐明,从传统中药中寻找新型 Hsp90 小分子抑制剂用于肿瘤治疗已成为研究热点之一。

苦蕒,为茄科酸浆属植物 *Physalis angulata* L. 的全草,《本草纲目拾遗》中记载本品具有清热解毒、利咽、化痰、利尿等作用,被广泛用于肺热咳嗽、咽喉肿痛、湿热黄疸以及多种肿瘤等的治疗。现代药理研究报道苦蕒提取物在体内和体外对于乳腺癌、前列腺癌和肝癌等恶性肿瘤生长具有较好的抑制作用^[5]。课题组前期研究显示,苦蕒甲醇提取物可以诱导热休克因子 (heat shock element, HSE) 活性,提示苦蕒抑制胰腺癌细胞生长的作用可能与其拮抗 Hsp90 功能有关,但苦蕒拮抗 Hsp90 抑制胰腺癌生长的具体物质基础和分子机制仍不明确。

与传统中药化学提取分离技术以化合物为导向不同,活性化合物快速发现技术以生物活性为导向,可在中药提取分离过程中快速筛选出有价值的活性单体^[6]。以双荧光素酶报告基因系统为基础的靶点筛选技术可实现靶向小分子化合物的高通量筛选^[7]。通过将活性筛选与靶点筛选技术相结合,可实现靶向活性小分子化合物快速发现,为从传统中药中高效寻找药效物质基础提供新的方法。

本研究将体外抗肿瘤活性筛选技术、双荧光素酶

报告基因技术与多元色谱分离技术相耦合,建立了“活性+靶点”双重导向的 Hsp90 抑制剂快速筛选技术,并从苦蕒中筛选得到靶向 Hsp90 的活性单体,初步研究其抑制胰腺癌细胞增殖的活性以及靶向 Hsp90 的分子作用机制。

材料与方法

材料与试剂 苦蕒粗提物 (实验室自制); 人胰腺癌细胞株 BxPC-3 和人肾胚细胞株 HEK293T (中国科学院上海细胞库提供); 质粒 pGL4[HSE-luc] vector、pGL4.75[hRluc / CMV] vector、Dual-Luciferase Assay System (美国 Promega 公司); Lipofactmine 2000 (美国 Invitrogen 公司); Hsp90 α/β shRNA 慢病毒颗粒、对照 shRNA 慢病毒颗粒与 Polybrene、Hsp90 和 β -actin 一抗 (美国 Santa Cruz 公司); 层析硅胶 (100~200 目, 中国青岛海洋化工厂); 色谱纯甲醇 (美国 Tedia 公司); Opti-MEM、PRMI1640 细胞培养液、胎牛血清 (美国 Gibco 公司), 青/链霉素、0.25% 胰蛋白酶/EDTA、1 \times PBS (中国吉诺生物技术有限公司), 噻唑蓝 (美国 Amersco 公司); Akt 一抗 (美国 CST 公司)。

植物来源与鉴定 苦蕒于 2012 年 11 月采自广东省梅州, 经浙江中医药大学中药资源教研室陈孔融主任中药师鉴定为茄科酸浆属植物苦蕒 *Physalis angulata* L. 的干燥全草。

植物提取与分离 取苦蕒干燥全草 4.0 kg, 适当粉碎, 95% 乙醇渗漉, 渗漉液减压回收乙醇至无醇味, 得浸膏, 经石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯萃取。取其中二氯甲烷提取物用适量二氯甲烷溶解, 湿法上样; 硅胶与样品约 15:1, 选用二氯甲烷-甲醇 (1:0、60:1、30:1、15:1、0:1) 梯度洗脱, 按照薄层检识的结果, 合并流份。采用反相高效液相色谱分析不同流份物质组成的差

异, 色谱条件: Waters 1525-717-2996 色谱仪; Kromasil C18 色谱柱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 甲醇/水为流动相, DAD 检测器, 检测波长 220 nm。取活性较好且样品量较大的流份反复重结晶, 得无定型白色粉末。产物用制备反相高效液相色谱分离, 色谱条件: Waters 600-2487 半制备色谱仪。Agilent XDB-C18 半制备色谱柱, (9.4 mm×250 mm, 5 μm)。样品供试液: 取待分离流份饱和上清液, 加甲醇-水稀释, 样品过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

体外细胞培养 取对数生长期的人胰腺癌细胞 BXPC-3 细胞株或肾胚细胞株 HEK293T 常规贴壁生长, 传代培养于含体积分数为 10% 胎牛血清、100 u·L⁻¹ 青霉素和 100 mg·L⁻¹ 链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的细胞培养箱中孵育, 2 天换液, 3 天传代 1 次。

MTT 法定测定体外细胞增殖率 取汇合度 80% 以上的 BXPC-3 细胞, 胰酶消化, 终止反应, 制成细胞悬液, 按每毫升 6×10⁴~8×10⁴ 个接种于 96 孔培养板, 置培养箱孵育过夜。取苦蕒单体溶于 DMSO, 用新鲜培养液稀释成不同药物浓度, 每个浓度 5 个复孔; 另设溶剂对照组, 放回培养箱培养; 待达到规定的药物处理时间, 去除含药培养液, 每孔加入新鲜配制的含 0.5 mg·L⁻¹ MTT 的无血清培养液, 继续培养 4 h, 吸去上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 酶标仪在波长 490 nm 处检测 OD 值。绘制柱状图。细胞增殖率计算公式如下, 并采用中效方程计算 IC₅₀。

细胞增殖率 = [(OD_{药物处理组} - OD_{空白组}) / (OD_{对照组} - OD_{空白组})] × 100%。

双荧光素酶报告基因法检测 HSE 活性 取汇合度 80% 以上 HEK293T 细胞, 胰酶消化, 终止反应, 制成细胞悬液, 按每毫升 5×10⁵ 个接种于 24 孔培养板, 放回培养箱孵育 24 h。将培养液换成 Opti-MEM, 平衡 30 min。取适量 pGL4[HSE-luc] vector 质粒、pGL4.75 [hRluc/CMV] vector 质粒与 lipofectamine 2000 用 Opti-MEM 稀释, 混合均匀, 静置 20 min, 取该混合物加入到 HEK293T 细胞中, 质粒终浓度为每孔 0.5 μg, 置培养箱中继续孵育 4~6 h。换成新鲜培养液孵育 24 h, 弃去原培养液。取苦蕒单体适量溶于 DMSO, 用新鲜培养液稀释成适当药物浓度, 加入各培养孔, 每个浓度 3 个复孔, 另设溶剂对照组, 置培养箱; 待达到规定的药物处理时间, 去除含药培养液。用 Dual-Luciferase Assay System 试剂盒检测每个处理组的萤火虫萤光素酶活性 (Fluc) 与海肾萤光素酶活性 (Rluc), Fluc/Rluc 即为转染效率线性化的萤火虫萤光素酶活性, 绘制柱状图。

蛋白免疫印迹实验 取对数生长期 BXPC-3 细

胞, 以每皿 2×10⁶ 个接种于 100 mm 细胞培养皿中。待细胞贴壁后, 分别用不同种类的药物处理 24~48 h, 溶剂对照组加入相同体积溶剂。RIPA 裂解液裂解细胞, 采用 BCA 法测蛋白含量。取适量细胞裂解液加入适量 SDS-PAGE 上样缓冲液。各处理组取等量蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳分离, 转印至 PVDF 膜, 封闭 1 h, 按一定稀释比例分别加入相应一抗, 4 °C 孵育过夜, HRP 标记二抗, BeyoECL Plus 化学发光试剂盒显影, Bio-rad ChemiDoc XRS 凝胶成像系统曝光并分析蛋白表达水平。为研究 Hsp90 蛋白二聚体, 采用非还原性 SDS-PAGE。BXPC-3 细胞经药物处理后, 弃去含药培养液, 用含 40 mmol·L⁻¹ 碘乙酰胺的冰 PBS 孵育 5 min, RIPA 裂解液裂解细胞, 取细胞裂解液加入适量非还原性的 SDS-PAGE 上样缓冲液, 再按上述步骤进行蛋白免疫印迹实验。

shRNA 干扰 Hsp90 基因表达实验 取对数生长期 BXPC-3 细胞, 以每孔 5×10⁵ 个接种于 12 孔细胞培养板中, 孵育过夜。待细胞贴壁后, 将原培养液换成 Opti-MEM 培养液, 平衡 30 min。取适量 Hsp90α/β shRNA 慢病毒颗粒 (终浓度 10 μL·mL⁻¹) 或对照 shRNA 慢病毒颗粒 (终浓度 5 μL·mL⁻¹) 与 Polybrene (终质量浓度 6 μg·mL⁻¹) 用 Opti-MEM 稀释, 混合均匀。向每孔中加入 1 mL 含慢病毒颗粒和 Polybrene 的 Opti-MEM 替代原培养液, 孵育过夜。弃去培养液, 向各孔中加入 1 mL PRMI 1640 完全培养液, 孵育过夜。各组细胞按 1:2 传代, 继续培养 48 h。弃去培养液, 向各孔中加入含 8 μL·mL⁻¹ 嘌呤霉素盐酸盐培养液, 继续培养 7 天, 每 3 天更换一次含嘌呤霉素盐酸盐培养液, 直至形成稳定表达 shRNA 的 BXPC-3 细胞克隆。蛋白免疫印迹实验验证细胞克隆的 Hsp90 蛋白表达。

细胞克隆形成实验 取生长有稳定表达 shRNA_{Hsp90 α/β} 和对照 shRNA 的 BXPC-3 细胞克隆的 12 孔细胞培养板。向稳定表达 shRNA_{Hsp90 α/β} 的各孔细胞克隆中分别加入 5 μmol·L⁻¹ withanolide E (WE) 与 4β-hydroxywithanolide E (HWE), 对照组和表达对照 shRNA 细胞克隆组加入等体积 DMSO, 孵育 48 h。取一部分药物处理后的细胞采用结晶紫溶液染色。简要实验流程如下, 弃去各孔培养液, PBS 清洗 2 次, 10% 甲醛固定 5 min, 弃去甲醛, 各孔加入 0.05% 结晶紫溶液染色 30 min, 流水洗去多余结晶紫溶液, 倒置于室温中使干燥。拍照获取各孔细胞克隆形成数量。向各孔加入 1 mL 甲醇, 室温震荡 10 min, 使各孔结晶紫完全溶解于甲醇, 移取 100 μL 至一新的 96 孔板, 酶标仪在波长 540 nm 处检测 OD 值, 绘制柱状图。另一部分细胞样本提取总蛋白, 蛋白免疫印迹法检测 Hsp90 和 Akt

蛋白表达, β -actin 为内参。每次实验重复 3 次。

统计学方法 所有实验至少独立重复 3 次。用 SPSS12.0 软件分析实验数据, 数据以均数 \pm 标准误 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间样本比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间样本两两比较用 student's *t*-test, 以 $P<0.05$ 为差异有显著统计学意义, 以 $P<0.01$ 为差异有极显著统计学意义。

结果

1 苦蕒二氯甲烷部位流份分离、鉴定与活性筛选

苦蕒二氯甲烷部位经二氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 按照薄层检识的结果, 合并流份, 经高效液相色谱分析, 共得到 9 个不同的流份。进一步检查这 9 个流份的体外抑制胰腺癌细胞 BXPC-3 的活性以及诱导肾胚细胞 HEK293T 的热休克效应活性。结果如表 1 所示, 3~6 号流份具有较强的体外抑瘤活性, 其中 4 号流份还具有较强的诱导热休克效应活性, 故下一步将重点研究 4 号流份的物质组成。采用甲醇反复重结晶, 反向高效液相色谱分析, 发现 4 号流份共有 5 个峰。反相制备液相收集其中主峰 A 与 B, 得 A 约 11 mg, 得 B 约 26 mg。经质谱、 ^1H NMR 与 ^{13}C NMR 鉴定其结构, 与文献数据比对分别为内酯类麦角甾烷化合物 WE^[8] 和 HWE^[9] (图 1), 均为已知化合物, 但在酸浆属植物苦蕒中鲜有报道。

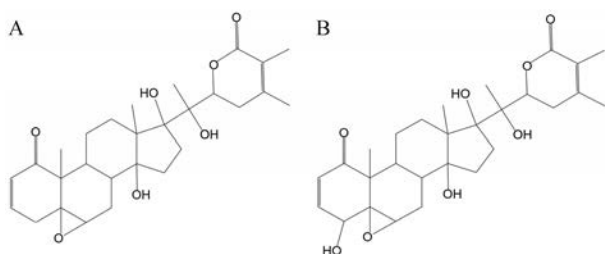


Figure 1 The chemical structures of withanolide E (WE, A) and 4 β -hydroxywithanolide E (HWE, B)

Table 1 The activity screening results of dichloromethane fractions from *Physalis angulata* L. in BXPC-3 cells. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs DMSO group. IC₅₀: Half maximal inhibitory concentration

Fraction	24 h IC ₅₀ / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	HSE induction activity (Fluc/Rluc/%)	
		DMSO	Treatment
1	>100		144.1 \pm 18.3
2	>100		138.3 \pm 22.9
3	31.7 \pm 0.7		477.2 \pm 95.3 [#]
4	4.35 \pm 0.3		2274.3 \pm 472.4 ^{##}
5	11.6 \pm 0.3	143.3 \pm 24.4	1410.7 \pm 220.7 ^{##}
6	56.2 \pm 1.3		389.7 \pm 88.5 [#]
7	>100		149.5 \pm 24.9
8	>100		121.9 \pm 20.9
9	>100		140.0 \pm 23.7

2 苦蕒中活性成分的抑制肿瘤细胞增殖及诱导热休克效应研究

为了证实所分离得到的苦蕒中单体 WE 与 HWE 的活性, 本研究测定了这两种化合物体外杀伤 BXPC-3 细胞系的半数抑制率 (IC₅₀) 以及其诱导 HSE 萤光素酶活性。结果如图 2 所示, HWE 和 WE 可以显著抑制 BXPC-3 细胞体外增殖, 且呈现浓度 (图 2A) 与时间 (图 2B) 依赖效应。HWE 和 WE 处理 BXPC-3 细胞 48 h 的 IC₅₀ 分别为 0.71 \pm 0.03 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1.23 \pm 0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。WE 和 HWE 都可显著增强 HEK293T 细胞 HSE 萤光素酶报告基因活性 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且随着浓度和处理时间增加, 萤光素酶活性相应增强, 呈现出一定的量效 (图 2C) 与时效 (图 2D) 关系。其中 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WE 和 HWE 分别处理 BXPC-3 细胞 24 h 可诱导 HSE 活性上调 12.5 \pm 3.4 倍与 28.1 \pm 3.4 倍。提示 WE 和 HWE 的肿瘤杀伤作用可能与诱导肿瘤细胞热休克效应有关。

3 苦蕒活性单体 WE 与 HWE 可以诱导 Hsp90 形成二聚体

由于 WE 和 HWE 具有诱导肿瘤细胞热休克效应的能力, 本研究进一步研究了 WE 和 HWE 是否可以抑制 Hsp90 活性并进而造成其调控下游原癌基因的蛋白失稳。结果如图 3 所示, WE 和 HWE 可显著下调 BXPC-3 细胞 Hsp90 客户蛋白 Akt 水平 ($P<0.05$), 且呈一定的量效关系。其中 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WE 和 HWE 分别处理 48 h, 可使 Akt 蛋白表达水平下调至 DMSO 组的 21.7% \pm 2.8% 和 9.8% \pm 1.4% ($P<0.01$)。接下来采用非还原凝胶电泳检测 WE 和 HWE 对胞内 Hsp90 蛋白凝聚的影响。结果如图 4 所示, 与 DMSO 组相比, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WE 与 HWE 分别处理 BXPC-3 细胞 48 h 可诱导 Hsp90 二聚体表达上调 6.5 \pm 1.3 和 11.8 \pm 2.0 倍 ($P<0.01$), 但 Hsp90 单体表达无明显变化。

4 shRNA 干扰 Hsp90 基因表达可减弱 WE 和 HWE 体外杀伤 BXPC-3 细胞的作用

为了进一步阐明 WE 和 HWE 抑制 Hsp90 蛋白活性与其杀伤胰腺癌细胞作用之间的关联性, 本研究采用 shRNA 干扰细胞的 Hsp90 基因表达, 接着检测 WE 和 HWE 对表达 shRNA 细胞克隆的体外杀伤作用, 以及 Hsp90 和 Akt 蛋白表达。如结果所示 (图 5), 与对照组相比, shRNA 慢病毒颗粒显著抑制 BXPC-3 细胞增殖, 并显著降低 Hsp90 蛋白表达 (图 5A 和 B 左侧两列)。Hsp90 基因敲低的 BXPC-3 细胞经 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WE 和 HWE 处理 48 h, 结果显示 WE 和 HWE 虽仍可杀伤部分肿瘤细胞, 但与 Hsp90 基因敲低细胞的 DMSO 组相比无显著性差异 (图 5A 和 C)。蛋白免疫印迹结果显示, Hsp90 基因敲低后 WE 和 HWE 也不能抑制

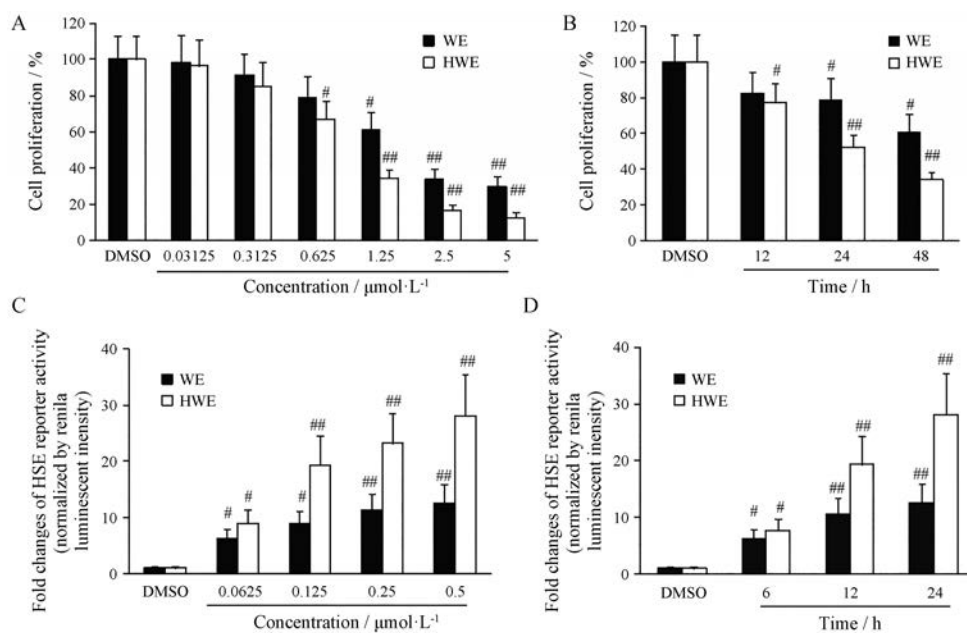


Figure 2 The anti-proliferation and heat shock induction activity of compounds from *Physalis angulata* L. A: The percentage of cell proliferation of BXPC-3 cells after exposing to different concentrations of WE and HWE for 48 h; B: The percentage of cell proliferation of BXPC-3 cells after exposing to 1.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WE and HWE for 12, 24 and 48 h; C: The fold changes of heat shock element (HSE) reporter activity in HEK293T cells for the treatment of WE and HWE (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h; D: The fold changes of HSE reporter activity in HEK293T cells for the treatment of 0.125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WE and HWE for 6, 12 and 24 h. $n = 3, \bar{x} \pm s. \#P < 0.05, \#\#P < 0.01$ vs DMSO group

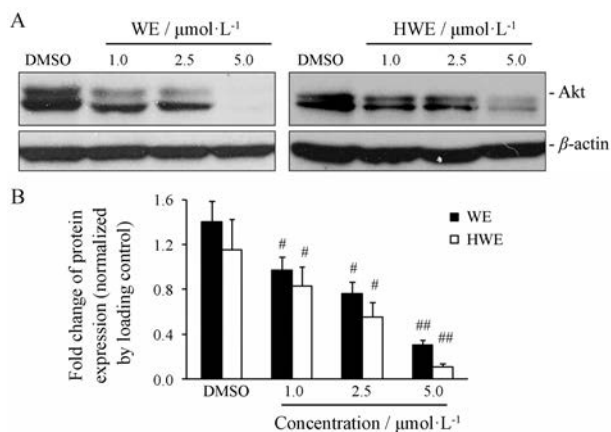


Figure 3 The inhibitory effect of WE and HWE on Hsp90 client protein Akt expression. A: The Akt protein expression in BXPC-3 cells after exposure to WE and HWE for 48 h; B: Quantitative analysis of Akt expression. $n = 3, \bar{x} \pm s. \#P < 0.05, \#\#P < 0.01$ vs DMSO group

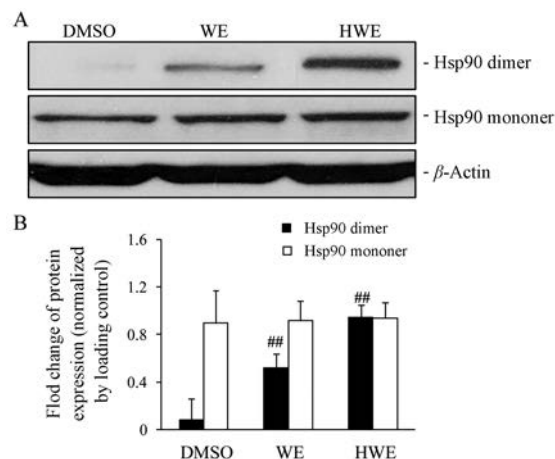


Figure 4 WE and HWE induced Hsp90 to aggregate dimer formation. A: The dimer, monomer and total expression of Hsp90 after exposure to 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WE and HWE for 48 h; B: Quantitative analysis of Hsp90 dimer and total protein expression. $n = 3, \bar{x} \pm s. \#\#P < 0.01$ vs DMSO group

Hsp90 客户蛋白 Akt 表达 (图 5B)。

讨论

传统植化提取分离以得到尽量多的化合物为首要目的, 但其中多数都不具有活性, 导致活性化合物筛选效率较低。目前从天然产物中发现活性化合物的研究

已越来越多采用以靶点为导向的提取分离方式, 并辅以体外活性筛选技术, 以期从植物中得到针对某种特定靶点的活性组分^[10]。如有研究以迈克尔受体反应为靶点从中药蜘蛛香中分离得到具有 STAT3 抑制活性的环氧环烯醚萜酯类有效成分^[11]。本研究以体外抑瘤活性与诱导热休克效应双重机制作为筛选条件, 充分

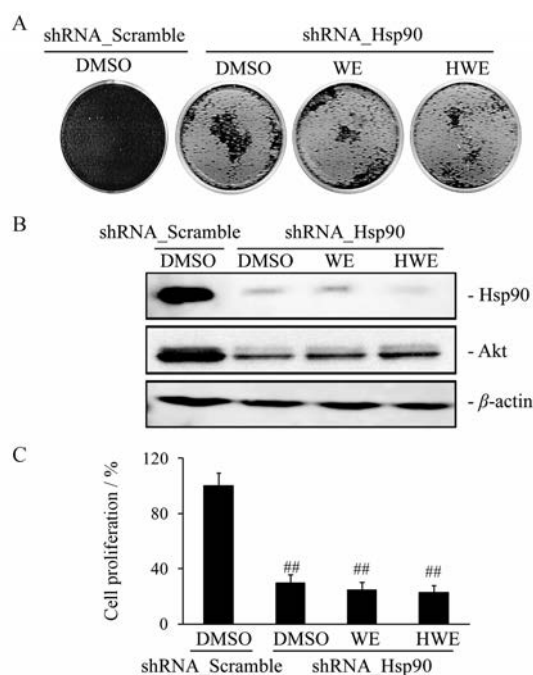


Figure 5 shRNA knockdown Hsp90 blocked the anti-proliferation activity of WE and HWE. BXPC-3 cells were pre-treated with scramble shRNA or Hsp90 α/β shRNA. Then the Hsp90 knockdown clones were exposed to 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WE and HWE or DMSO for 48 h, respectively. The clones expressed scramble shRNA were serviced as control. A: The clone formation of each group was assessed by crystal violet staining assay; B: The Hsp90 and Akt protein levels. β -Actin was loading control for Western blot assay. C: The percentage of cell proliferation. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.01$ vs DMSO group

利用MTT法和萤光素酶报告基因技术简单、快速、直观、适合高通量筛选的特点,实现筛选与分离紧密结合。相比其他以单一抑瘤活性为基础的筛选模式,该方法能够更加快速地从大量流份中锁定目标产物。

本研究从苦蕒二氯甲烷部位中分离得到9个不同流份,发现其中4号与5号流份具有较强的胰腺癌杀伤活性并且可以增强HSE萤光素酶活性。其中4号流份物质质量较大,活性更强,提示该流份中可能含有靶向热休克蛋白且杀伤胰腺癌细胞的有效成分。进一步从4号流份分离得到5个化合物,经鉴定其中A与B化合物分别为内酯类麦角甾烷化合物WE和HWE。WE和HWE属于醉茄内酯类甾体化合物,多分布于*Solanum ciliatum*^[12]和*Withania somnifera*^[13]等茄科植物,在酸浆属植物苦蕒中鲜有发现。研究显示WE可通过增强TRAIL诱导的细胞凋亡抑制肾癌细胞增殖^[14];HWE可通过抑制组蛋白修饰和Hsp90客户蛋白表达诱导细胞凋亡^[15],从而杀伤肿瘤细胞增殖。体外活性筛选实验显示WE和HWE均可显著增强HSE萤光素酶活性,提

示这两个化合物可能是苦蕒二氯甲烷部位中靶向Hsp90蛋白的活性成分,然而WE和HWE靶向Hsp90蛋白的分子机制尚不明确。

分子机制研究显示,WE和HWE可诱导Hsp90形成无功能的二聚体,并下调Hsp90客户蛋白Akt表达。WE和HWE分子在甾体母核A环含有 α,β -不饱和羰基结构,被称为“迈克尔反应”受体,具有该类结构的分子容易与Hsp90蛋白分子C端丰富的半胱氨酸残基形成共价键结合^[16]。如同样含有“迈克尔反应”受体的醉茄内酯类化合物tubocapsenolide A^[17]和withaferin A^[18]可与Hsp90蛋白分子催化活性位点直接共价结合从而抑制其活性。因此,WE和HWE可能也是通过其 α,β -不饱和羰基结构与Hsp90蛋白分子的半胱氨酸残基形成共价键结合,从而诱导Hsp90分子形成无活性二聚体结构^[19]。在肿瘤细胞中,Hsp90蛋白主要通过与客户蛋白以及分子伴侣形成超分子复合体,起到修复客户蛋白活性的作用^[20]。原癌基因Akt是Hsp90重要的客户蛋白之一,也是Hsp90信号通路下游重要的生物标志物^[21]。若Hsp90与小分子化合物结合形成无活性二聚体结构,则无法与客户蛋白Akt和分子伴侣形成超分子复合体结构,从而导致Akt蛋白无法修复而经蛋白酶体途径降解^[18]。

为了进一步验证WE和HWE靶向Hsp90蛋白与抑制胰腺癌细胞增殖直接相关,采用shRNA敲低BXPC-3细胞的Hsp90表达。由于Hsp90为肿瘤细胞生长的关键激酶,干扰Hsp90表达可显著抑制客户蛋白表达以及肿瘤细胞增殖^[22]。此时再用WE和HWE处理BXPC-3细胞,虽仍可少量抑制肿瘤细胞增殖,但与仅敲低Hsp90的对照组相比无显著性差异,且未见Hsp90客户蛋白Akt表达进一步显著下调。该结果提示,WE和HWE抑制胰腺癌细胞增殖的作用至少部分与其抑制Hsp90蛋白直接相关。

综上,本研究采用“靶点+活性”双重导向快速发现技术成功从苦蕒中筛选得到具有较强热休克诱导效应和杀伤胰腺癌细胞BXPC-3活性的单体化合物,经结构鉴定为已知醉茄内酯类化合物WE和HWE,这两个化合物在苦蕒中均少见报道。初步分子机制研究显示WE和HWE可能通过靶向Hsp90,诱导其形成无活性二聚体,并抑制客户蛋白分子Akt表达杀伤胰腺癌细胞。WE和HWE的体内抑瘤活性,其靶向Hsp90蛋白的特异性结合位点以及抑制Hsp90蛋白活性的具体分子机制还有待下一步研究。

References

- [1] Zhang SR, Jing W, Liu L, et al. New progress in basic research

- and diagnosis and treatment of pancreatic cancer in 2017 [J]. *Chin Oncol* (中国癌症杂志), 2018, 28: 1-10.
- [2] Shrestha L, Bolaender A, Patel HJ, et al. Heat shock protein (HSP) drug discovery and development: targeting heat shock proteins in disease [J]. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16: 2753-2764.
- [3] Ding QH, Cheng Y, Chen WP, et al. Celastrol, an inhibitor of heat shock protein 90beta potently suppresses the expression of matrix metalloproteinases, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in primary human osteoarthritic chondrocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 708: 1-7.
- [4] Fan YJ, Liu Y, Zhang L, et al. C0818, a novel curcumin derivative, interacts with Hsp90 and inhibits Hsp90 ATPase activity [J]. *Act Pharm Sin B*, 2017, 7: 91-96.
- [5] Fang JJ, Zheng XL, Xia H, et al. Study on the chemical constituents and cytotoxic activity of *Physalis angulata* L. [J]. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药), 2017, 48: 1080-1086.
- [6] Hu YJ, Wang YQ, Wang YP, et al. Discussion on the selection, compatibility and quality control of the medicinal componens in traditional Chinese medicine [J]. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药), 2016, 47: 2965-2971.
- [7] Pang WQ, Gao L, Dou YY, et al. Screening of natural small molecule IDO-1 inhibitors with anti-tumor role [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2017, 52: 1416-1423.
- [8] Joshi P, Misra L, Siddique AA, et al. Epoxide group relationship with cytotoxicity in withanolide derivatives from *Withania somnifera* [J]. *Steroids*, 2014, 79: 19-27.
- [9] Maldonado E, Alvarado VE, Torres FR, et al. Androstane and withanolides from *Physalis cinerascens* [J]. *Planta Med*, 2005, 71: 548-553.
- [10] Quan NH, Kang YJ, Li DH, et al. Research progress of high-throughput screening technology for active ingredients of Chinese herbal medicine [J]. *J Anal Sci* (分析科学学报), 2017, 33: 741-746.
- [11] Yang B, Shen JW, Zhou DH, et al. Precise discovery of a STAT3 inhibitor from *Eupatorium lindleyanum* and evaluation of its activity of anti-triple-negative breast cancer [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31: 1-9.
- [12] Zhu XH, Ando J, Takagi M, et al. Six new withanolide-type steroids from the leaves of *Solanum cilistum* [J]. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 2001, 49: 161-164.
- [13] Zhang H, Samadi AK, Cohen MS, et al. Anti-proliferative withanolides from the Solanaceae: a structure-activity study [J]. *Pure Appl Chem*, 2012, 84: 1351-1367.
- [14] Henrich CJ, Brooks AD, Erickson KL, et al. Withanolide E sensitizes renal carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by increasing cFLIP degradation [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1666.
- [15] Park EJ, Sang-Ngern M, Chang LC, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis with downregulation of Hsp90 client proteins and histone modification by 4beta-hydroxywithanolide E isolated from *Physalis peruviana* [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60: 1482-1500.
- [16] Nardai G, Sass B, Eber J, et al. Reactive cysteines of the 90-kDa heat shock protein, Hsp90 [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 384: 59-67.
- [17] Chen WY, Chang FR, Huang ZY, et al. Tubocapsenolide A, a novel withanolide, inhibits proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-231 cells by thiol oxidation of heat shock proteins [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 17184-17193.
- [18] Yu Y, Hamza A, Zhang T, et al. Withaferin A targets heat shock protein 90 in pancreatic cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79: 542-551.
- [19] Sarkar S, Dutta D, Samanta SK, et al. Oxidative inhibition of Hsp90 disrupts the super-chaperone complex and attenuates pancreatic adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132: 695-706.
- [20] Xue NN, Jin J, Chen XG. Co-chaperones: regulated action in conformational functions of HSP90 and their actions in cancer [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2017, 52: 1085-1090.
- [21] Belalcazar A, Shaib WL, Farren MR, et al. Inhibiting heat shock protein 90 and the ubiquitin-proteasome pathway impairs metabolic homeostasis and leads to cell death in human pancreatic cancer cells [J]. *Cancer*, 2017, 123: 4924-4933.
- [22] Yamada-Kanazawa S, Kajihara I, Fukushima S, et al. Inhibition of heat shock protein 90 exerts an antitumour effect in angiosarcoma: involvement of the vascular endothelial growth factor signalling pathway [J]. *Br J Dermatol*, 2017, 177: 456-469.