

## 雷公藤红素通过抑制PAK1抗胰腺癌作用及其机制研究

朱陵霞<sup>1,2</sup>, 孙晓艳<sup>1,2</sup>, 陈 姣<sup>1,2</sup>, 蔡雪婷<sup>1,2</sup>, 曹 鹏<sup>1,2\*</sup>

(南京中医药大学 1. 附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028, 2. 药学院, 江苏 南京 210023)

**摘要:** P21 活化蛋白激酶 1 (p21-activated kinases 1, PAK1) 是 P21 活化蛋白激酶家族成员之一, 在胰腺癌细胞增殖和肿瘤形成过程中起着十分重要的作用, 是胰腺癌治疗的重要靶点。目前, 靶向 PAK1 的激酶抑制剂尚处于临床前研究阶段。因此, 筛选开发出新的 PAK1 激酶抑制剂对于胰腺癌治疗具有重要的意义。本研究发现天然产物雷公藤红素 (celastrol) 对 PAK1 具有显著的抑制作用, 其  $IC_{50}$  约为  $3.614 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分子对接结果显示, 雷公藤红素与 PAK1 激酶结构域的 ATP 结合口袋结合。MTT 实验结果表明, 雷公藤红素对胰腺癌细胞 BxPC-3、PANC-1 的增殖均具有抑制作用。进一步机制研究显示, 干扰 PAK1 后, 雷公藤红素对胰腺癌细胞 BxPC-3 的抑制作用发生逆转。同时, 雷公藤红素可以抑制 PAK1 及其下游信号通路蛋白的表达, 从而激活凋亡信号通路引发胰腺癌细胞发生凋亡。上述研究结果表明, 雷公藤红素可以通过靶向抑制 PAK1 激酶信号通路诱导胰腺癌细胞的凋亡, 具有用于治疗胰腺癌的潜在价值。

**关键词:** P21 活化蛋白激酶 1; 胰腺癌; 雷公藤红素; 增殖; 凋亡

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)01-0060-07

## Celastrol inhibits PAK1 kinase and inhibits the proliferation of pancreatic cancer cells

ZHU Ling-xia<sup>1,2</sup>, SUN Xiao-yan<sup>1,2</sup>, CHEN Jiao<sup>1,2</sup>, CAI Xue-ting<sup>1,2</sup>, CAO Peng<sup>1,2\*</sup>

(1. *Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China,* 2. *School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*)

**Abstract:** The p21-activated kinase 1 (PAK1) is a member of the P21-activated protein kinase family that plays an important role in the proliferation and onogenesis of pancreatic cancer. PAK1 is an important target for the treatment of pancreatic cancer. At present, kinase inhibitor targeting PAK1 is still in the preclinical research stage. Therefore, screening for new PAK1 kinase inhibitors is of great significance. In this study the natural compound celastrol was found to have a significant inhibitory effect on PAK1, with an  $IC_{50}$  value of  $3.614 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Molecular docking results showed that celastrol had good binding to PAK1. An MTT assay indicated that celastrol inhibited the proliferation of pancreatic cancer cells BxPC-3 and PANC-1. Mechanistic studies revealed that the inhibition of pancreatic cancer cells by celastrol was reversed by PAK1 siRNA. Celastrol inhibited PAK1 and the subsequent activation of downstream signaling pathways, thereby activating apoptosis signaling pathways and triggering apoptosis in pancreatic cancer cells. These findings suggested that celastrol induced apoptosis in pancreatic cancer cells by suppressing the PAK1 kinase signaling pathway and has potential value for the treatment of pancreatic cancer.

**Key words:** p21-activated kinase 1; pancreatic neoplasms; tripterygium; proliferation; apoptosis

收稿日期: 2019-07-19; 修回日期: 2019-09-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873057, 81973527); 江苏省社会发展——临床前沿技术项目 (BE2018755).

\*通讯作者 Tel: 86-25-85608666, E-mail: cao\_peng@njucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0580

胰腺癌是一种高度侵袭性的恶性肿瘤,其死亡率与诊断率几乎相当,5年生存率低于5%<sup>[1]</sup>。针对胰腺癌治疗的挑战主要有早期诊断不足以及治疗的药物极少。随着现代分子生物学的飞速发展,人们对胰腺癌发生发展中涉及的信号通路更加清楚,包括转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、Janus 激酶/信号转导与转录激活子 (Janus kinase/signal transducer and activator of trans-ions, JAK/STAT)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 和 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 等信号通路<sup>[2]</sup>。临床治疗主要是以吉西他滨化疗为主,然而并不能显著改善患者的生存质量。到目前为止,已有多项临床试验探讨了吉西他滨联合化疗药或吉西他滨联合分子靶向药物在胰腺癌中的疗效,结果没有一种方式能显著延长患者的生存期<sup>[3]</sup>。因此,深入了解胰腺癌发生的遗传和分子变化,研发出有效的药物是胰腺癌研究中亟待解决的问题之一。

P21 活化激酶 (p21-activated kinases, PAKs) 属于丝氨酸苏氨酸激酶家族,是 Cdc42 和 Rac 的效应蛋白,位于多条肿瘤相关信号通路的交汇处。根据其结构与功能,可以分为 2 个亚群,PAK1-3 为亚群 I, PAK4-6 为亚群 II<sup>[4]</sup>。PAKs 可以介导许多细胞过程,包括促进细胞的存活、增殖与迁移,抑制细胞的凋亡,调节细胞骨架动力学和细胞黏附等<sup>[5]</sup>。PAK1 参与多种肿瘤发生发展的过程,如非小细胞肺癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌和黑色素瘤<sup>[6-10]</sup>等。与癌旁组织相比,胰腺癌组织中的 PAK1 表达量有显著增加<sup>[11]</sup>。PAK1 抑制剂能抑制胰腺癌星状细胞生长进而延长胰腺癌小鼠的生存期<sup>[12]</sup>。由此可见,PAK1 是胰腺癌治疗的重要靶点,抑制 PAK1 有望开发出治疗胰腺癌的分子靶点药物。

本研究发现传统中药成分雷公藤红素 (celastrol) 能有效抑制 PAK1 活性,并采用分子对接的方式考察了雷公藤红素与靶蛋白 PAK1 的相互作用模式;为了进一步考察雷公藤红素对 PAK1 及其下游信号通路的影响,以胰腺癌细胞为模型,检测了雷公藤红素对 PAK1 相关蛋白表达的作用效果;为明确雷公藤红素在胰腺癌细胞的药效,采用 MTT 法、流式细胞术、siRNA 转染等方法考察雷公藤红素对胰腺癌细胞增殖、凋亡的影响及可能的作用机制。本研究为雷公藤红素治疗胰腺癌提供了初步的研究基础。

## 材料与方法

**细胞** 人胰腺癌细胞 PANC-1 用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养基进行培养;人胰腺癌细胞 BxPC-3 用含 10% FBS 的 1640 培养基进

行培养。以上细胞均购自上海中国科学院细胞库。

**试剂** 雷公藤红素 (美国 TargetMol 公司); PAK1 (美国 AdooQ BioScience 公司); ADP-Glo<sup>TM</sup> 激酶检测试剂盒 (美国 Promega 公司); MTT (美国 Sigma 公司); Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 试剂 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 凋亡检测试剂盒 PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (美国 BD Pharmingen 公司); PAK1 抗体、BAX 抗体、Bcl-2 抗体、cleaved-PARP 抗体、PARP 抗体、cleaved caspase-3 抗体、caspase-3 抗体、GAPDH 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司)。

**仪器设备** PowerPAC<sup>TM</sup> 凝胶电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Multiskan 全波长酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司); FACS Aria II 流式细胞仪 (美国 BD Pharmingen 公司); CKX41 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); Axio observer A1 倒置荧光显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司)。

**ADP-Glo<sup>TM</sup> 激酶检测化合物的激酶抑制性** 将底物与 PAK1 酶预先混匀,加入化合物,于 30 °C 摇床上孵育 20 min,再加入 ATP,形成酶-底物-ATP-化合物混合液,总体积为 10  $\mu$ L,于 30 °C 摇床上孵育 30 min。到达时间点后,加入 ADP-Glo<sup>TM</sup> 试剂 10  $\mu$ L,终止激酶反应并消耗体系中剩余的 ATP,于 30 °C 摇床上孵育 40 min,再加入激酶检测试剂 20  $\mu$ L 于 30 °C 摇床上孵育 30 min,将反应体系中 ADP 转化为 ATP 并允许使用荧光素酶或荧光素反应测量新合成的 ATP。产生的光与激酶测定中产生 ADP 的量相关,其指示激酶活性。于酶标仪上测量发光并计算化合物对酶活性的抑制率<sup>[13]</sup>。

**分子对接** 从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org>) 下载 PAK1 与竞争型抑制剂结合的复合物结构 4EQC (PDB ID),采用 Schrodinger 2015-3 软件的 Prep Wiz 模块对蛋白结构进行预处理:去除水分子,加氢,在 pH 7.4 下优化氢键,使用 OPLS3 力场对蛋白进行限制性能量优化,使重原子的 RMSD 收敛于 0.3 Å (1 Å = 0.1 nm)。在 Glide 模块中以晶体结构的原有配体所在位点为中心,定义周围 15 Å 内为活性口袋 (即 ATP 结合口袋) 生成格点文件用于后续分子对接。从 Selleck 库 (<https://www.selleck.cn>) 下载雷公藤红素的结构文件,在 LigPrep 模块中对小分子进行质子化加氢,并使用 OPLS3 力场进行能量最小化得到最优构象。将准备好的受体、配体在 Glide 中进行分子对接,对接模式选用 SP (standard precision)。

**MTT 比色法** 取对数生长期的胰腺癌 BxPC-3、PANC-1 细胞,磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 遍,胰酶消化,以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板中,周围一圈用灭菌的 PBS 封闭,避免边缘效应。将化合物梯度稀释为 9 个浓度,每个浓度设置 3 个复孔并设置一组对照

孔, 于 37 °C 培养箱中培养 48 h。培养结束后, 每孔加入 5 mg·mL<sup>-1</sup> MTT 10 μL 于 37 °C 培养箱中孵育 4 h, 弃掉上清, 再加入 DMSO 100 μL, 避光振荡 15 min, 采用酶标仪测定 570 nm/630 nm 处的吸光度 (*A*) 值并计算增殖抑制率。计算公式: 细胞生长抑制率 (%) = (溶剂对照孔 *A* 值 - 药物处理孔 *A* 值) / (溶剂对照孔 *A* 值 - 空白对照孔 *A* 值) × 100%。

**Western blot 实验** 取对数生长期的细胞, 以每孔 2 × 10<sup>5</sup> 个/mL 的细胞数接种于 6 孔板中, 待细胞完全贴壁后加入化合物, 14 h 后弃上清, 用预冷的 PBS 清洗 2 遍, 洗去残留的培养基, 加入 RIPA 裂解液在冰上裂解 30 min 后收取蛋白, 用 BCA 定量, 将蛋白调整到统一浓度, 加入 loading buffer 后用煮样器煮 8 min, 每孔上样量为 30 μL。电泳后用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 于 4 °C 冰箱孵育一抗过夜, 用 TBST 清洗 3 遍 (间隔 10 min), 室温孵育二抗 1 h, 再次用 TBST 清洗 3 遍, 于 ECL 曝光显影。

**小干扰 RNA (siRNA) 转染** 取对数生长期的胰腺癌细胞 BxPC-3, 以每孔 2 × 10<sup>5</sup> 个/mL 的细胞数接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 于细胞培养箱中培养过夜。在 1.5 mL 离心管中加入 opti-MEM™ 培养基 125 μL 和 Lipofectamine™ 3000 试剂 7 μL, 另取 1 只 1.5 mL 离心管, 加入 opti-MEM™ 培养基 125 μL 和 siRNA 7 μL, 充分混匀, 孵育 15 min, 将复合物加入 6 孔板中, 转染 48 h。

**流式细胞仪检测凋亡** 取对数生长期的胰腺癌细胞 PANC-1, 以每孔 2 × 10<sup>5</sup> 个/mL 的细胞数接种于 6 孔板中, 于细胞培养箱中培养过夜, 加入不同浓度的化合物处理 24 h, 胰酶消化收集细胞, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 收集 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞, 加入结合缓冲液 100 μL 重悬细胞后, 加入 Annexin V-PE 试剂 5 μL, 再加入染料 7-AAD 5 μL, 混匀, 室温避光孵育 15 min 后, 采用流式细胞仪检测凋亡情况。

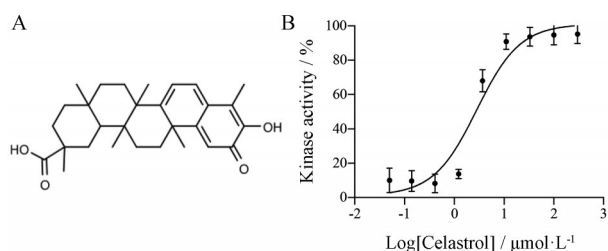
**统计学方法** 使用 SPSS 13.0 进行统计学分析, 每个样品重复 3 次, 实验数据表示为均数 ± 标准差, 多组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

## 结果

### 1 雷公藤红素抑制 PAK1 活性

利用 ADP-Glo™ 激酶检测试剂盒, 建立 PAK1 抑制剂的筛选方法。对实验室现有的化合物进行初步筛选, 初筛浓度设置为 10 μmol·L<sup>-1</sup>, 结果发现雷公藤红素 (图 1A) 对 PAK1 具有显著的抑制作用。将雷公藤红素进行梯度稀释, 设置浓度为 300、100、33.33、11.11、3.7、1.23、0.41、0.14 和 0.05 μmol·L<sup>-1</sup>, 使用 ADP-Glo™ 激酶

检测试剂盒检测其体外的 IC<sub>50</sub> (图 1B)。利用 Graphpad Prism7 计算得到其体外 IC<sub>50</sub> 值约为 3.614 μmol·L<sup>-1</sup>。



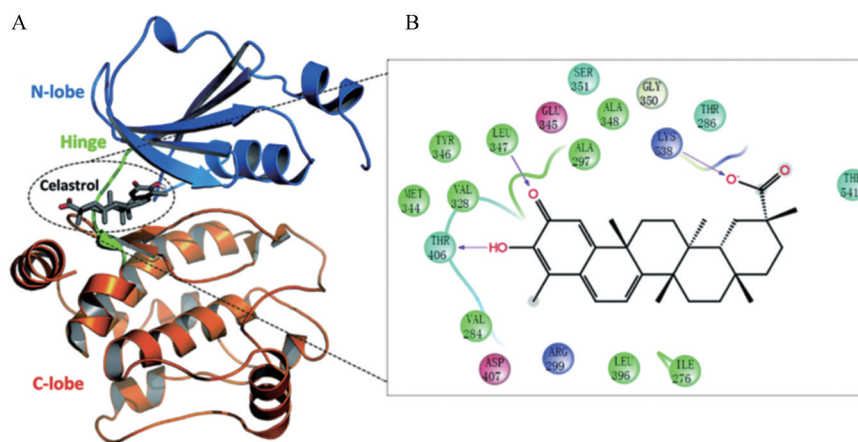
**Figure 1** Molecular structure of celastrol (A). Celastrol inhibits p21-activated kinases 1 (PAK1) enzymatic activity *in vitro* (B).  $n = 3, \bar{x} \pm s$

### 2 雷公藤红素与 PAK1 结构域的分子对接

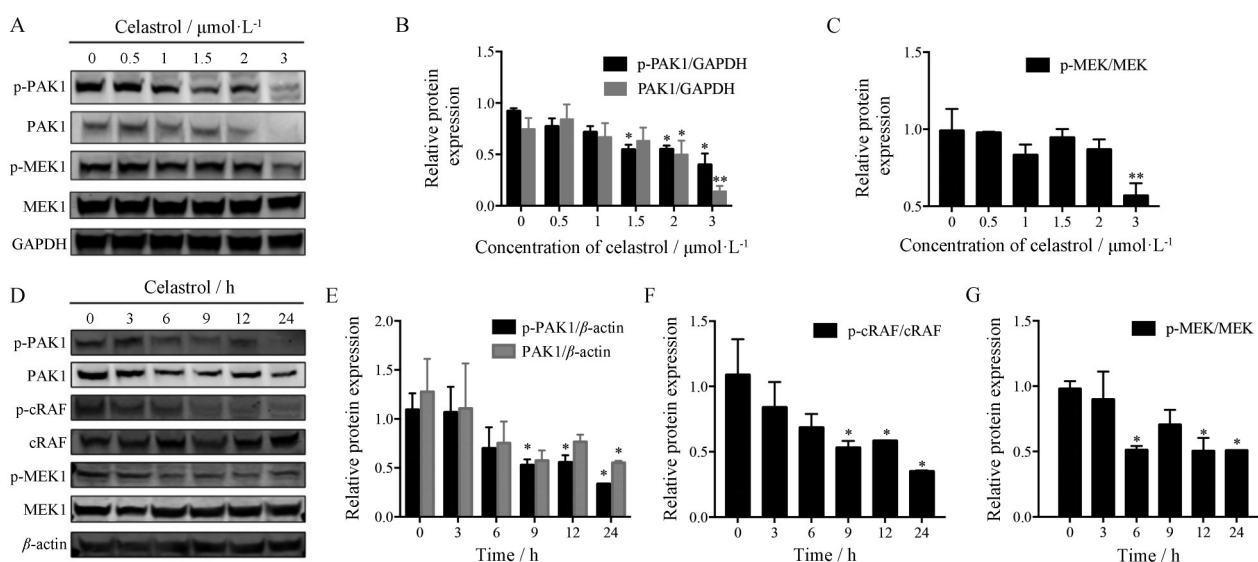
根据体外酶活实验提示, 雷公藤红素对 PAK1 的抑制活性是 ATP 浓度依赖性的, 推测雷公藤红素可能是 ATP 竞争型抑制剂, 所以采用 PAK1 与竞争型抑制剂结合的复合物结构 (PDB ID: 4EQC) 进行分子对接。PAK1 主要由 N-lobe 和 C-lobe 构成, 中间由铰链区连接, ATP 结合口袋就位于 N-lobe 和 C-lobe 的界面处, 这也是雷公藤红素与 PAK1 的作用位点 (图 2A)。雷公藤红素与 PAK1 的具体结合模式见图 2B, 其羰基氧与 Leu347 的骨架氨基形成氢键作用, 羟基与 Thr406 的侧链羟基形成氢键作用, 羧基与 Lys538 的侧链形成氢键作用; 此外, 雷公藤红素还与 Ile276、Leu396、Val284、Val328、Leu347、Tyr346、Ala29 等形成疏水作用。雷公藤红素与 PAK1 的对接打分为 -4.975, 结合自由能为 -33.448 kcal·mol<sup>-1</sup>。

### 3 雷公藤红素抑制 PAK1 磷酸化及其下游信号蛋白的表达

不同浓度的雷公藤红素干扰胰腺癌细胞 BxPC-3 细胞 14 h 后 (图 3A), Western blot 结果显示, 磷酸化的 PAK1 蛋白与 PAK1 蛋白表达量均随着浓度的升高而降低 (图 3B), PAK1 的下游信号蛋白丝裂原活化的细胞外信号调节激酶 (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase, MEK) 的磷酸化水平也随着给药浓度的升高而表达减少 (图 3C); 不同时间点同一浓度 3 μmol·L<sup>-1</sup> 处理胰腺癌细胞 BxPC-3 (图 3D), Western blot 结果显示, 随着给药时间的增加, PAK1 磷酸化蛋白和 PAK1 蛋白均有所下降 (图 3E), 下游信号蛋白 cRAF 原癌基因, 丝氨酸/苏氨酸激酶 (cRAF proto-oncogene, serine/threonine kinase, cRAF) (图 3F) 与 MEK (图 3G) 的磷酸化水平均有下降。上述结果表明, 雷公藤红素抑制了 PAK1 信号通路, 且抑制效果呈浓度与时间依赖性。



**Figure 2** Interaction models between celastrol and PAK1. A: Celastrol is bound at the interface between N-lobe and C-lobe of PAK1; B: Specific binding mode of celastrol and PAK1



**Figure 3** Celastrol inhibits PAK1 phosphorylation and its downstream signaling protein expression. A-C: Expression of PAK1 and MEK proteins was detected by Western blot at different doses of celastrol for 14 h; D-G: Expression of PAK1, cRAF and MEK1 proteins was detected by Western blot in  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  of celastrol for different reaction time. MEK: Mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group

#### 4 雷公藤红素抑制胰腺癌细胞增殖

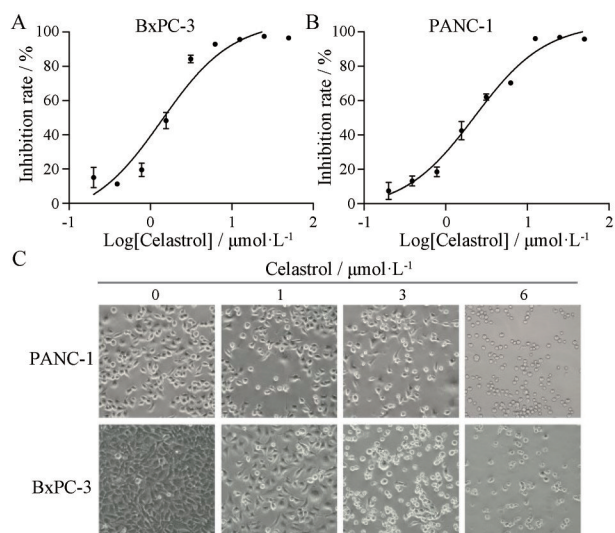
为了探究雷公藤红素能否通过抑制PAK1的活化而抑制胰腺癌细胞BxPC-3、PANC-1的增殖,使用MTT法检测雷公藤红素对胰腺癌细胞的生长抑制性。将雷公藤红素梯度稀释,设置浓度为50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39和0.20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,处理细胞48 h后,发现可以显著抑制BxPC-3(图4A)、PANC-1(图4B)细胞的增殖,且成浓度依赖性。使用GraphPad Prism 7软件分析,雷公藤红素对BxPC-3细胞48 h的 $\text{IC}_{50}$ 值为1.327  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,对PANC-1细胞48 h的 $\text{IC}_{50}$ 值为2.059  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。加药14 h后细胞形态发生变化(图4C)。

#### 5 PAK1干扰逆转雷公藤红素对胰腺癌细胞增殖的抑制作用

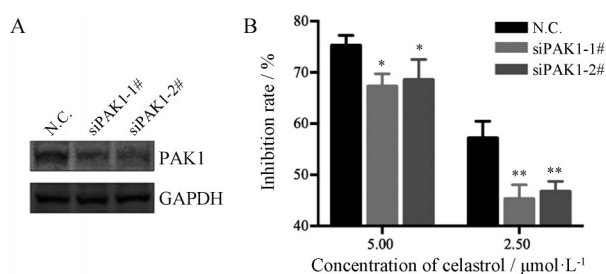
为了探究PAK1是否为雷公藤红素抑制胰腺癌细胞BxPC-3增殖作用的靶点,使用siRNA干扰BxPC-3中的PAK1(图5A),再用MTT法检测雷公藤红素对干扰PAK1的BxPC-3细胞增殖的抑制作用,发现在5和2.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,雷公藤红素对BxPC-3细胞增殖的抑制作用明显降低,与阴性对照组相比,具有显著性差异(图5B)。

#### 6 雷公藤红素诱导胰腺癌细胞发生凋亡

通过流式细胞术检测不同浓度的雷公藤红素对胰腺癌细胞BxPC-3凋亡的影响,并进一步通过Western



**Figure 4** Celastrol inhibits proliferation of pancreatic cancer cells. A: Dose-response curves of BxPC-3 cells from 48 h MTT assays; B: Dose-response curves of PANC-1 cells from 48 h MTT assays; C: Photograph (100 $\times$ ) of PANC-1 and BxPC-3 cells on drug treatment after 14 h.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$



**Figure 5** PAK1 interference reverses the inhibitory effect of celastrol on proliferation of pancreatic cancer cells. A: BxPC-3 cells are transfected with control siRNA and PAK1 siRNA for 48 h; B: The transfected BxPC-3 is treated with celastrol in 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and 2.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 24 h.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs normal control (N.C.) group

blot技术检测雷公藤红素对凋亡相关蛋白表达的影响。流式结果表明: 给药24 h后, 随着雷公藤红素浓度增加, 细胞凋亡率明显上升, 与对照组相比, 具有统计学意义(图6A、B)。同时, Western blot结果表明(图6C), 雷公藤红素上调了分裂的DNA修复酶(cleaved-poly ADP-ribose polymerase, cleaved-PARP)(图6D)以及分裂的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cleaved caspase-3)蛋白水平, 而含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase-3)蛋白无明显变化(图6E); BCL2-associated X的蛋白质(BAX)随着给药浓度增加而上升, 而B细胞淋巴瘤/白血病-2蛋白(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)随着药物浓度增加而下降, Bax/Bcl-2比值上升(图6F), 所有结果与对照组比均具有统计学意义。上述结果表

明, 雷公藤红素可以促进胰腺癌细胞BxPC-3的凋亡。

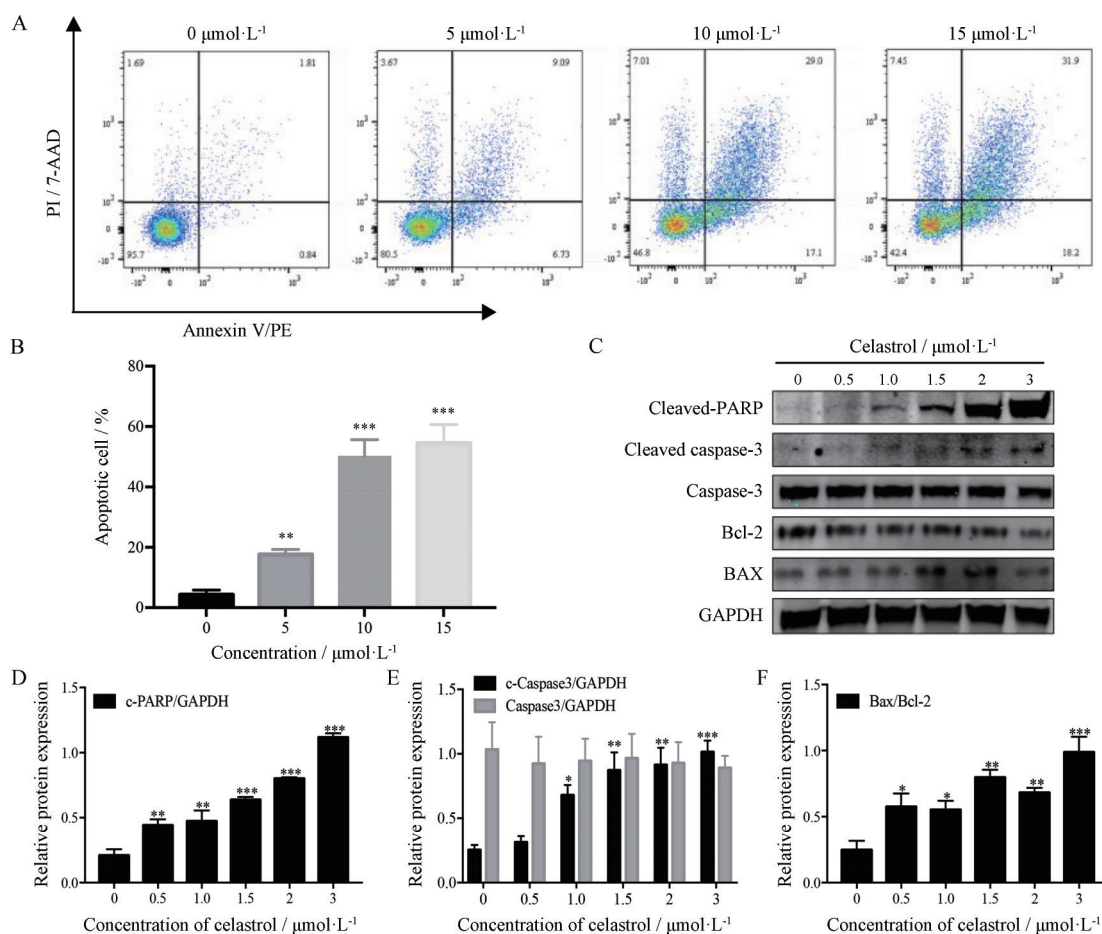
## 讨论

胰腺癌是常见的恶性肿瘤之一, 其5年生存率低于5%, 近年来其发病率及死亡率呈上升趋势。目前临床上治疗胰腺癌以化疗为主, 大多数针对胰腺癌的靶向治疗的临床试验都没有取得成功<sup>[14]</sup>。因此, 寻找新的治疗靶点及药物就显得十分重要。

PAK1在胰腺癌细胞增殖和肿瘤形成过程中发挥着十分重要的作用。在超过95%的胰腺癌中存在鼠类肉瘤病毒癌基因(kirsten rat sarcoma viral oncogene, KRAS)突变, KRAS可以直接和间接的激活Rho GTP酶如RAC1和Cdc42从而激活PAK1, PAK1活化后进一步激活下游多种信号途径, 从而促进肿瘤细胞的存活、增殖与迁移, 抑制凋亡, 调节细胞骨架动力学和细胞黏附<sup>[15]</sup>等。CRAF-MEK-ERK信号通路是其经典的下游信号通路, 当上游信号分子PAK1被活化时, 信号级联通路被激活, 细胞外调节蛋白激酶由胞质转位到核内, 进而介导ATF、c-fos等转录因子的活化, 从而调控多种生物学反应<sup>[16]</sup>。因此, PAK1被认为是一个潜在的治疗胰腺癌的靶点, 抑制PAK1可以有效抑制胰腺癌的发生发展。本研究通过建立PAK1抑制剂筛选方法发现雷公藤红素是一种潜在的PAK1抑制剂, 其体外酶活性 $\text{IC}_{50}$ 约等于3.614  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 分子模拟对接结果显示雷公藤红素与PAK1有良好的结合性, 通过Western blot实验发现, 雷公藤红素可以抑制PAK1的磷酸化及其下游信号通路。敲低PAK1后, 雷公藤红素对胰腺癌细胞BxPC-3抑制作用明显下降。

目前已经报道的PAK1抑制剂大多数是在实验室中化学合成, 也有少量是天然产物, 包括乐园树酮(glaucarubinone)、冲绳蜂胶(onikawa propolis)和海参皂苷(frondosides)等<sup>[17]</sup>。本研究筛选出来的雷公藤红素是首次报道来自药用植物的PAK1抑制剂。

已知雷公藤红素具有显著的抗肿瘤效应, 对多种肿瘤类型都有良好的治疗效果, 包括肝癌、乳腺癌和肺癌<sup>[18-20]</sup>等。然而其抗肿瘤机制至今尚未有定论。Rajendran等<sup>[21]</sup>首次证明雷公藤红素通过抑制信号传导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription, STAT3)信号从而抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡。Mou等<sup>[22]</sup>发现通过激活线粒体及FasL介导的途径, 雷公藤红素可以诱导非小细胞肺癌细胞A549的凋亡。Yadav等<sup>[23]</sup>发现雷公藤红素能够下调趋化因子受体4(recombinant chemokine C-X-C-motif receptor 4, CXCR4)的表达, 从而抑制胰腺癌细胞和结肠癌细胞的侵入和转移。然而, 雷公藤红素对PAK1的作用尚无报道。本研



**Figure 6** Celastrol induces apoptosis in pancreatic cancer cells. A: Induction of apoptosis by celastrol treatment for 24 h in BxPC-3 *in vitro* analyzed by flowcytometry; B: Percentage of apoptosis cells of BxPC-3; C-F: Celastrol induces the expression of apoptosis-associated proteins.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

究发现雷公藤红素对PAK1具有显著的抑制作用,进而抑制胰腺癌细胞生长,诱导凋亡。本研究结果不仅刷新了雷公藤红素的抗肿瘤作用机制,也为后续PAK1抑制剂的设计提供了参考和借鉴。

细胞凋亡途径通常可以分为半胱天冬酶依赖性和半胱天冬酶非依赖性。Caspase-3对半胱天冬酶依赖性细胞凋亡的起着决定性作用。Caspase-3的顺序激活导致PARP裂解,从而导致细胞凋亡<sup>[24]</sup>。作者发现caspase-3和PARP都被雷公藤红素切割。此外,促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白之间的比值决定了细胞对凋亡信号的易感性<sup>[25]</sup>。雷公藤红素可以促进BAX的表达而降低Bcl-2的表达,从而导致Bax/Bcl-2的比值上升。与雷公藤红素诱导胰腺癌细胞BxPC-3凋亡的结果相一致。

综上所述,本研究证实雷公藤红素可以通过抑制PAK1从而抑制肿瘤活性,具有广阔的开发前景,随着研究不断深入,以PAK1为靶点设计筛选的靶向药物也会进入一个新的阶段。

## References

- [1] Bosetti C, Bertuccio P, Negri E, et al. Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology [J]. *Mol Carcinog*, 2012, 51: 3-13.
- [2] Xu QQ, Zhou ZS, Xiang M. Progress in the study of signal pathways for chronic inflammation-associated pancreatic carcinogenesis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 174-181.
- [3] Colucci G, Labianca R, Di Costanzo F, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with single-agent gemcitabine as first-line treatment of patients with advanced pancreatic cancer: the GIP-1 study [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28: 1645-1651.
- [4] Molli PR, Li DQ, Murray BW, et al. PAK signaling in oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2009, 28: 2545-2555.
- [5] Rane CK, Minden A. P21 activated kinase signaling in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 54: 40-49.
- [6] Ong CC, Jubb AM, Jakubiak D, et al. P21-activated kinase 1 (PAK1) as a therapeutic target in BRAF wild-type melanoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105: 606-607.
- [7] Qian Z, Zhu G, Tang L, et al. Whole genome copy number

- profiling of gastric cancer identifies PAK1 and KRAS gene amplification as therapy targets [J]. *Gene Chromosome Cancer*, 2014, 53: 883-894.
- [8] Yeo D, Huynh N, Beutler JA, et al. Glaucarubinone and gemcitabine synergistically reduce pancreatic cancer growth *via* down-regulation of P21-activated kinases [J]. *Cancer Lett*, 2014, 346: 264-272.
- [9] Chen MJ, Wu DW, Wang YC, et al. PAK1 confers chemoresistance and poor outcome in non-small cell lung cancer *via* beta-catenin-mediated stemness [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34933.
- [10] Wang K, Gao W, Dou Q, et al. Ivermectin induces PAK1-mediated cytostatic autophagy in breast cancer [J]. *Autophagy*, 2016, 12: 2498-2499.
- [11] Jagadeeshan S, Krishnamoorthy YR, Singhal M, et al. Transcriptional regulation of fibronectin by p21-activated kinase-1 modulates pancreatic tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 2015, 34: 455-464.
- [12] Yeo D, Phillips P, Baldwin GS, et al. Inhibition of group 1 p21-activated kinases suppresses pancreatic stellate cell activation and increases survival of mice with pancreatic cancer [J]. *Int J Cancer*, 2017, 140: 2101-2111.
- [13] Balzano D, Santaguida S, Musacchio A, et al. A general framework for inhibitor resistance in protein kinases [J]. *Chem Biol*, 2011, 18: 966-975.
- [14] Nicola S, Antonio G, Anna E. Target therapies in pancreatic carcinoma [J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21: 948-965.
- [15] Yeo D, Hong H, Graham S, et al. The role of p21-activated kinases in pancreatic cancer [J]. *Pancreas*, 2015, 44: 363-369.
- [16] Tabusa H, Brooks T, Massey AJ. Knockdown of PAK4 or PAK1 inhibits the proliferation of mutant KRAS colon cancer cells independently of RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling [J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11: 109-121.
- [17] Sampat N, Minden A. Inhibitors of the p21 activated kinases [J]. *Curr Pharmacol Rep*, 2018, 4: 238-249.
- [18] Mi C, Shi H, Ma J, et al. Celastrol induces the apoptosis of breast cancer cells and inhibits their invasion *via* downregulation of MMP-9 [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32: 2527-2532.
- [19] Li PP, He W, Yuan PF, et al. Celastrol induces mitochondria-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43: 137-148.
- [20] Lo Iacono M, Monica V, Vavala T, et al. ATF2 contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and celastrol induces cisplatin resensitization through inhibition of JNK/ATF2 pathway [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136: 2598-2609.
- [21] Rajendran P, Li F, Shanmugam MK, et al. Celastrol suppresses growth and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma through the modulation of STAT3/JAK2 signaling cascade *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2012, 5: 631-643.
- [22] Mou H, Zheng Y, Zhao P, et al. Celastrol induces apoptosis in non-small-cell lung cancer A549 cells through activation of mitochondria- and Fas/FasL-mediated pathways [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25: 1027-1032.
- [23] Yadav VR, Sung B, Prasad S, et al. Celastrol suppresses invasion of colon and pancreatic cancer cells through the downregulation of expression of CXCR4 chemokine receptor [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2010, 88: 1243-1253.
- [24] Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2002, 9: 459-470.
- [25] Burke PJ. Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer [J]. *Trends Cancer*, 2017, 3: 857-870.