

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.09.003

· 基础研究 ·

桦木酸通过抑制STAT3的活化提高胰腺癌细胞对吉非替尼的敏感性

吴海霞^{1,2}, 艾克白尔·买买提¹, 王帅¹, 周科挺¹, 石森林¹(1. 浙江中医药大学 药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 宁波市第一医院 药学部, 浙江 宁波 315010)

[摘要] **目的:**探讨桦木酸(BEA)提高胰腺癌Panc-1、Miapaca-2细胞对吉非替尼的敏感性及其潜在的作用机制。**方法:**细胞培养完成后,将对吉非替尼不敏感的Panc-1、Miapaca-2细胞随机分为4组:对照组、BEA组、吉非替尼组及BEA联合吉非替尼组,分别予以不处理、BEA、吉非替尼及BEA联合吉非替尼处理。MTS法检测BEA对2种细胞的增敏效果,集落形成实验检测BEA协同吉非替尼的治疗效果,WB实验检测BEA对Panc-1细胞凋亡相关蛋白的影响,流式细胞术检测BEA对Panc-1细胞凋亡的影响,表面等离子体共振(SPR)实验验证信号转导子和转录激活子3(STAT3)和BEA的直接结合,分子对接和分子动力学模拟实验预测STAT3和BEA的结合模式。**结果:**BEA协同增强Panc-1、Miapaca-2细胞对吉非替尼的敏感性($P<0.05$),使其对两种细胞的 IC_{50} 值均降低至原值的50%以下。吉非替尼联合BEA较单用吉非替尼或BEA促进Panc-1细胞的凋亡以及凋亡相关蛋白cleaved-PARP和Bax的表达,减少对凋亡抑制蛋白Bcl-2的表达(均 $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。BEA对Panc-1细胞中STAT3的活化有剂量依赖性抑制作用($P<0.01$)。BEA通过与STAT3的Lys-591、Ser-613形成氢键而稳定BEA与STAT3的结合作用,同时BEA稳定在STAT3的蛋白结合位点内,以此阻断STAT3二聚发挥增敏作用。**结论:**联用BEA和吉非替尼显著抑制胰腺癌Panc-1、Miapaca-2细胞的增殖并促进其凋亡,这种增敏作用可能是由BEA对STAT3抑制作用所介导。

[关键词] 桦木酸;胰腺癌;Panc-1细胞;Miapaca-2细胞;吉非替尼;增敏作用;信号转导子和转录激活子3

[中图分类号] R735.9; R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)09-0948-07

Betulinic acid enhances gefitinib-sensitivity of pancreatic cancer cells via inhibition of STAT3 activation

WU Haixia^{1,2}, MAIMAITI Aikebaier¹, WANG Shuai¹, ZHOU Keting¹, SHI Senlin¹(1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China; 2. Department of Pharmacy, the First Hospital of Ningbo City, Ningbo 315010, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and the underlying mechanisms of betulinic acid (BEA) on sensitizing pancreatic cancer cell lines Panc-1 and Miapaca-2 to gefitinib. **Methods:** After the cell culture was completed, Panc-1 and Miapaca-2 cells were randomly divided into 4 groups: control group (without treatment), BEA group, gefitinib group and BEA combined with gefitinib group, respectively. The sensitization effect of BEA on gefitinib-insensitive pancreatic cancer cells was detected by MTS assay. The treatment effects of combined treatment of gefitinib and BEA against Panc-1 and Miapaca-2 cells were evaluated by colony formation assay. Flow cytometry was used to examine the effect of BEA on apoptosis of Panc-1 cells while WB was applied to determine the effect of BEA on apoptosis-related proteins. Surface plasmon resonance (SPR) experiment was used to detect the direct combination between signal transducer and activator of transcription 3(STAT3) and BEA; Molecular docking and molecular dynamics simulation experiments were adopted to predict the combining mode between STAT3 and BEA. **Results:** BEA synergistically enhanced the gefitinib-sensitivity of pancreatic cancer Panc-1 and Miapaca-2 cells ($P<0.05$), and IC_{50} of gefitinib on two cells were reduced by over 50%. Compared with single treatment, the combined treatment of BEA and gefitinib promoted the apoptosis and up-regulated the expressions of apoptosis-related proteins (cleaved-PARP and Bax), but reduced the apoptosis-inhibitory protein Bcl-2 (all $P<0.05$ or $P<0.01$). Moreover, the inhibitory effect of BEA on STAT3 activation in Panc-1 cells was in a dose-dependent manner ($P<0.01$). BEA stabilizes its binding to STAT3 by forming hydrogen bonds with Lys-591 and Ser-613 of STAT3; in the meanwhile, BEA stabilized in the binding site of STAT3, there by blocking STAT3 dimerization to enhance the drug sensitivity. **Conclusion:** Combined use of BEA and gefitinib could significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis of Panc-1 and Miapaca-2 cells, which might be mediated by the inhibition of BEA on STAT3.

[作者简介] 吴海霞(1986-),女,本科,主管中药师,主要从事天然产物分子生物学的研究,E-mail:wuhaixia0574@126.com

[通信作者] 石森林(SHI Senlin, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事中药学抗肿瘤的研究,E-mail:pjstone@163.com

[Key words] betulinic acid (BEA); pancreatic cancer; Panc-1 cell; Miapaca-2 cell; gefitinib; sensitization effect; signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(9): 948-954. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.09.003]

胰腺癌是一种高度恶性、发病隐匿、侵袭转移能力强的消化道实体性肿瘤^[1]。由于早期症状不明显,大多数胰腺癌患者确诊时已错过手术切除的最佳时期,只能通过放化疗进行治疗^[2]。近20年来,化疗药吉西他滨一直是晚期胰腺癌患者的首选药物^[3]。然而,其巨大的毒副作用和容易产生获得性耐药的特点,极大地削弱了其在临床治疗上的收益^[4]。近年来,肿瘤靶向治疗被广泛证实能够极大地改善癌症患者的预后,在疗效和毒性方面,都明显优于化疗。已有研究^[5]表明,表皮细胞生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)信号通路在胰腺癌细胞中持续异常激活,而EGFR抑制剂吉非替尼(gefitinib, Gefi)对多种胰腺癌细胞具有良好的抑制活性。不过遗憾的是,不同胰腺癌细胞对吉非替尼的敏感性差异巨大,极大限制了吉非替尼在治疗胰腺癌患者方面的临床应用前景^[6]。桦木酸(betulinic acid, BEA)是一种天然的多功能小分子,具有抗肿瘤、抗炎、抗疟疾等多种生物活性^[7-8]。此前的研究^[9-10]发现, BEA不仅具有高效低毒的抗肿瘤作用,而且还是一种肿瘤药物增敏化合物,其与化疗药吉西他滨和靶向药索拉菲尼都能产生良好的协同杀伤肿瘤细胞的效果。由此,推测BEA联合吉非替尼或许同样能起到协同杀伤胰腺癌细胞的作用。因此,本课题组选用了天然吉非替尼低敏感性的胰腺癌Panc-1和Miapaca-2细胞株,通过联用吉非替尼和BEA,以此对比联合用药方案与单用吉非替尼对胰腺癌细胞增殖、凋亡等的影响,并对BEA增敏吉非替尼的作用机制进行初步探索,为临床治疗提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人胰腺癌细胞系Panc-1和Miapaca-2均购于中国科学院上海细胞库。细胞培养所用DMEM高糖培养基、0.25%胰蛋白酶(含EDTA)、胎牛血清和青霉素、链霉素均购自杭州四季青公司,PBS缓冲液购自杭州吉诺生物医药科技有限公司,MTS以及PMS溶液均购自Promega公司,吐温-20、结晶紫粉末购自Sigma公司,PVDF膜、30%丙烯酰胺溶液、考马斯亮蓝染色液、AP、TEMED、脱脂奶粉、Tris、SDS以及GLH芯片和蛋白偶联、封闭所用试剂及ProteOn XPR36蛋白相互作用阵列系统购于Bio-Rad公司,Cleaved-PARP、Bcl-2、Bax、磷酸化STAT3(Y705)、STAT3、Actin等一抗均购自CST公司,羊抗兔IgG-

HRP抗体购自Santa Cruz生物技术公司,BEA粉末和吉非替尼粉末均购自Medchem Express中国公司,(纯度经HPLC检验均大于98%)。

1.2 细胞培养

所有细胞均在CO₂浓度为5%的37℃恒温培养箱中培养,并在含质量分数为10%的胎牛血清DMEM高糖培养基中,加入1%青霉素/链霉素溶液防止细菌污染。贴壁细胞用质量分数为0.25%的胰酶消化传代,每2~3 d传代1次。

1.3 MTS法检测BEA对吉非替尼不敏感胰腺癌细胞的增敏效果

Panc-1和Miapaca-2细胞用含有5%的热灭活血清、100 U/ml青霉素和100 mg/ml链霉素的DMEM完全培养基培养,以5×10³/孔的细胞密度铺盘,于37℃含5% CO₂的细胞培养箱中培养24 h。然后将受试化合物用DMSO溶解并且用DMEM培养基连续稀释至各种浓度后加入。细胞和受试化合物共同孵育48 h后,再将DMEM培养液稀释后终浓度为5 mg/ml的MTS溶液加至每孔,CO₂培养箱中孵育30 min,于酶标仪测定波长490 nm处的光密度(D)值。细胞增殖率=(实验组D值/对照组D值)×100%。实验重复3次。

1.4 集落形成实验检测BEA协同吉非替尼的治疗效果

将Panc-1细胞铺板接种于6孔板(1×10³个/孔)中,过夜贴壁培养后,加入含药物的新鲜DMEM培养液,孵育24 h后更换培养液。待孔中出现较多肉眼可见的克隆团时终止培养,此过程大约需要10~14 d,期间每3 d为细胞更换新鲜培养液。然后将细胞用PBS洗涤一次,用1 ml甲醇固定15 min后,吸干甲醇,再加入1 ml 0.1%结晶紫染色液染色20 min。回收染色液后,用缓慢流水轻柔洗涤6孔板,并将洗好的孔板倒置,晾干后进行拍照,在显微镜下计数集落数,以大于50个细胞认为是1个集落,并计算集落形成率。实验重复3次。

1.5 WB实验检测BEA对Panc-1细胞凋亡相关蛋白的影响

取对数期生长的人胰腺癌细胞Panc-1接种于6孔板(2×10⁵个/孔)中,过夜贴壁培养后,更换培养基,加入DMSO溶解的药物溶液,孵育24 h后,收集细胞和总蛋白。将煮沸变性后的蛋白样品行SDS-PAGE、电转到PVDF膜,用5%的脱脂牛奶封闭90 min,用相应的特异性一抗(1:500)室温孵育2 h后,4℃孵

育过夜,再用 HRP 标记的二抗体(1:1 000)室温孵育 1.5 h,将膜放入凝胶成像仪中用 ECL 显影液暗室孵育 1~2 min,加入发光液后曝光、拍照,统计灰度值、计算相关蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测 BEA 对 Panc-1 细胞的凋亡的影响

将 Panc-1 细胞铺板接种于 6 孔板(2×10^5 个/孔)中,贴壁加药后,除去培养基,先用 PBS 洗 2 遍,再用胰酶消化,1 500×g 离心 5 min,PBS 重悬,再次离心。去除上清后,将细胞用 500 μ l 1×结合缓冲液制成悬液,并转移至流式管中,再加入 5 μ l Annexin V 和 5 μ l PI 染色液,室温下避光染色 15 min 后,流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

1.7 表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)实验验证 STAT3 和 BEA 的直接结合

1.7.1 芯片的预处理 将 GLH 芯片从冰箱中取出后缓慢恢复至室温,第 1 次使用时通过空气初始化过程初始化芯片,并通过在芯片表面按顺序依次流过 0.5% SDS、50 mmol/L NaOH 和 100 mmol/L HCl 溶液来活化芯片;同时配制体系缓冲液 PBST,即 PBS+0.005%吐温-20。

1.7.2 激活芯片并固定 STAT3 将 40 mmol/L 的 EDAC 以及 10 mmol/L 的 sNHS 混合后流过芯片表面,激活芯片表面的氨基偶联受体,并在 30 min 内在不同的通道上流过 STAT3 蛋白,在结合信号值到达预期信号值之后,用盐酸乙醇胺封闭芯片上的未活化位点。用系统缓冲液在高流速的情况下流过芯片表面,去除未结合的蛋白。

1.7.3 对待测化合物进行浓度梯度的检测 将化合物梯度稀释成 100、80、60、40、20 μ mol/L,上机检测;检测结果在通过扣除参照通道、缓冲液以及 DMSO 溶剂影响后,通过 Langmuir-Kinetic 分析实验结果,计算结合常数 K_a 、解离常数 K_d 以及解离平衡常数 KD 值。

1.8 分子对接和分子动力学模拟实验预测 STAT3 和 BEA 的结合模式

STAT3 的蛋白结构从蛋白结构库下载(<https://www.rcsb.org/>),其编号为 1BG1^[11]。采用 AutoDock-Tools 软件将 STAT3 的蛋白文件和 BEA 文件转化成 AutoDock 软件识别的 PDBQT 格式,该过程包括加氢原子和加电荷。利用 AutoGrid 软件生成分子对接所需要的格点文件。最终利用 AutoDock 软件进行分子对接,产生蛋白-配体复合物结构。随后,采用 Gaussian16 软件计算 BEA 的电荷,AMBER 16 软件中的 Antechamber 模块转化成 AMBER 16 软件识别的带电荷 MOL2 格式。接着,蛋白质和配体小分子分别赋

予 Amber ff14SB 力场和 gaff 力场,采用 LEaP 模块给蛋白添加氢原子,加水和抗衡离子,使得模拟的蛋白溶于一个含水的中性水盒子内。之后,对模拟体系进行能量优化、升温、NVT 系宗平衡、NPT 平衡体系,最终对 STAT3 和 BEA 的复合物进行 60 ns 的 NPT 系宗模拟。最终数据采用 CPPTRAJ、PyMol 和 Chimera 软件进行分析。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计数据分析,用 GraphPad Prism 7 软件绘制图片。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BEA 协同增强胰腺癌细胞对吉非替尼的敏感性

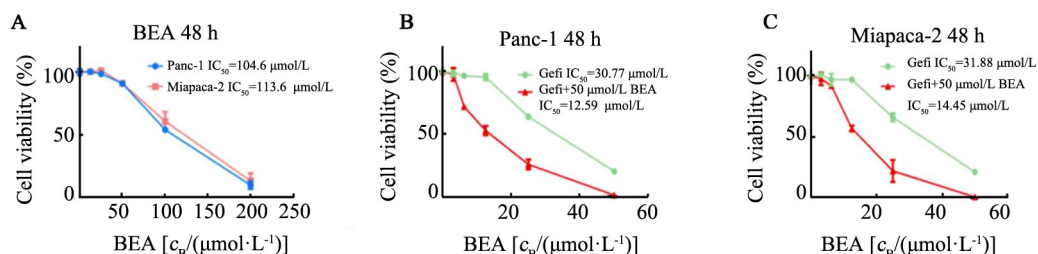
MTS 检测结果显示,BEA 对 Panc-1 和 Miapaca-2 细胞的半数抑制浓度(IC_{50})均大于 100 μ mol/L(图 1A),而吉非替尼对 2 株细胞的抑制活性同样并不好, IC_{50} 均大于 30 μ mol/L,其对敏感细胞一般 IC_{50} 在 5 μ mol/L 以下,甚至 nmol/L 级别(图 1B、C)。基于此,本研究选择了联合使用 50 μ mol/L BEA(1/2 IC_{50} 值)和 20 μ mol/L 的吉非替尼(IC_{50} 值),并用 MTS 法检测其对细胞的增殖抑制活性,结果(图 1B、C)表明,联合使用 BEA 明显提高了 Panc-1 和 Miapaca-2 细胞对吉非替尼的敏感性(IC_{50} 值降至 50% 以下)。集落形成实验检测结果(图 2)显示,吉非替尼联合 BEA 组对 Panc-1 和 Miapaca-2 细胞的集落形成较单独给药组明显更有效($P < 0.05$)。

2.2 联合使用吉非替尼和 BEA 增加 Panc-1 细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图 3A)显示,20 μ mol/L 的吉非替尼对细胞凋亡有一定效果,而单用 50 μ mol/L BEA 对细胞凋亡效果十分微弱,但是两者联用显著地增加了 Panc-1 细胞的凋亡($P < 0.05$)。WB 实验检测结果显示,吉非替尼联合 BEA 用药对凋亡相关蛋白 cleaved-PARP 和 Bax 表达的促进,以及对凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达的减少,效果要明显高于单独使用吉非替尼或 BEA($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 3B、C)。

2.3 BEA 对 STAT3 信号通路的活化产生抑制作用

WB 实验检测 BEA 对 Panc-1 细胞中 STAT3 磷酸化结果显示,BEA 对 Panc-1 细胞中 STAT3 的活化有剂量依赖性的抑制作用($P < 0.01$,图 4A、B)。SPR 检测结果(图 4C)显示,BEA 与 STAT3 蛋白具有良好的结合能力,其 KD 值为 30.5 μ mol/L。上述结果显示,BEA 通过直接与 STAT3 结合,并抑制 STAT3 磷酸化,对 STAT3 信号通路的活化产生抑制作用。



A: The anti-proliferative effects of BEA against Panc-1 and Miapaca-2 cells; B: Comparison of the anti-proliferative activities on Panc-1 cells between Gefi treatment alone and combined treatment of Gefi and BEA; C: Comparison of the anti-proliferative activities on Miapaca-2 cells between Gefi treatment alone and combined treatment of Gefi and BEA

图1 BEA 提高胰腺癌 Panc-1、Miapaca-2 细胞对吉非替尼的敏感性

Fig. 1 BEA enhanced the gefitinib-sensitivity of pancreatic cancer cell lines Panc-1 and Miapaca-2

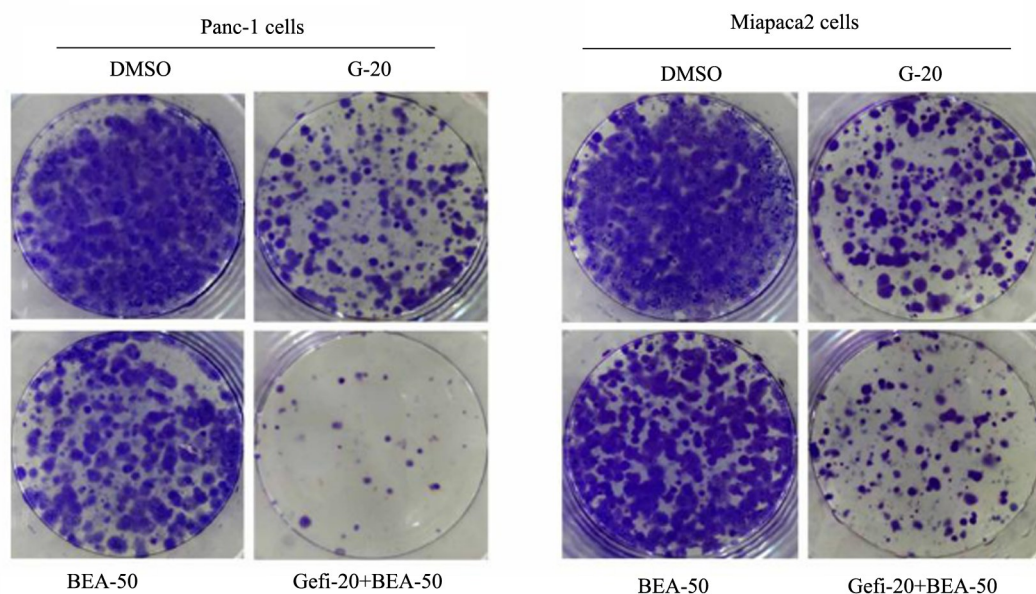


图2 吉非替尼与 BEA 协同抑制胰腺癌 Panc-1、Miapaca-2 细胞的集落形成

Fig. 2 Gefi and BEA synergistically suppressed the clone formation of Panc-1 and Miapaca-2 cells

2.4 BEA 与 STAT3 的分子对接及分子动力学模拟

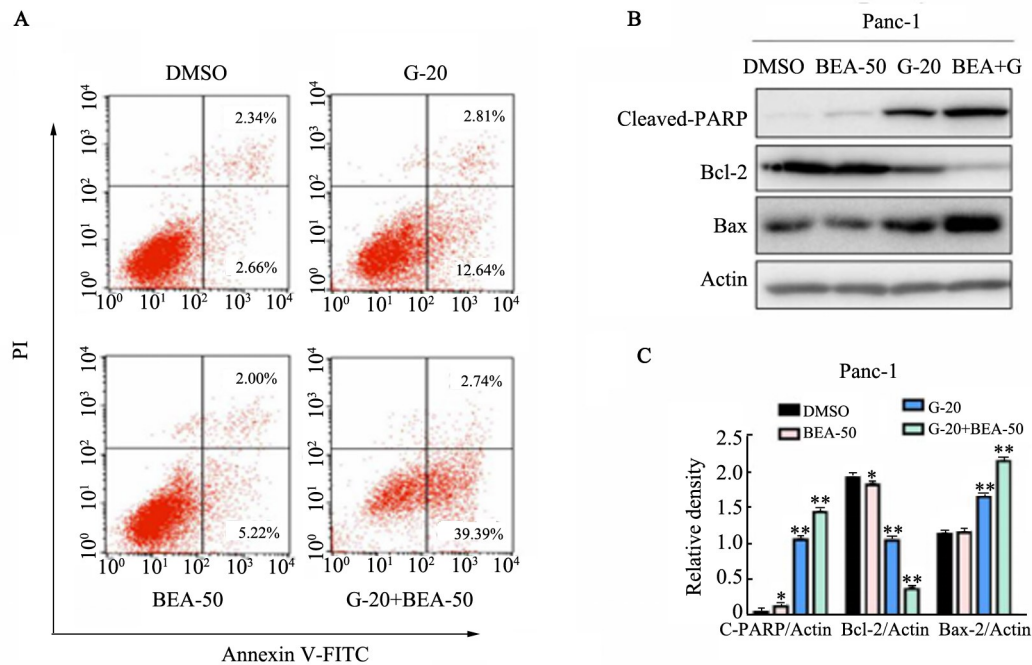
分子对接的结果(图 5A)显示, BEA 通过与 STAT3 的 Lys-591、Ser-613 形成氢键相互作用, 稳定 BEA 与 STAT3 的结合作用。分子动力学模拟结果(图 5B)显示, BEA 和 STAT3 蛋白骨架 C_α 在模拟过程中的均方根偏差(RMSD)保持动态波动, 并且幅度低于 0.1 nm, 表明 BEA 和 STAT3 在整个模拟中两者的结合非常稳定。此外, 图 5C 显示, BEA 稳定在 STAT3 的蛋白结合位点内, 以此阻断 STAT3 二聚体发挥增敏作用。

3 讨论

胰腺癌被称为“癌中之王”, 是最常见的消化系统恶性肿瘤之一, 东亚国家, 特别是中国一直是胰腺癌高发地区^[12]。据最新的肿瘤调查研究^[13]显示, 2018 年全世界新发胰腺癌患者预计超过 45 万人, 而预计

因其死亡的患者人数更是高达 43 万人。由于胰腺癌早期症状隐匿, 难以诊断, 且病程进展快, 当患者确诊时多处于癌症中晚期, 错过了手术治疗的最佳时期。当前, 化疗是治疗晚期胰腺癌、延长患者生存期的主要治疗手段。然而, 严重的耐药性, 使得化疗药物的临床效益显著降低。近年来, 肿瘤靶向治疗快速发展, 并被广泛证实能够极大地改善患者的预后和延长生存期。研究^[14]表明, EGFR 信号通路在胰腺癌细胞中持续异常激活, 而 EGFR 抑制剂吉非替尼对多种胰腺癌细胞具有良好的抑制活性。然而, 吉非替尼对不同胰腺癌细胞敏感性差异巨大, 极大限制了吉非替尼靶向治疗胰腺癌患者的临床应用。早在 2006 年, 有学者^[15]就发现了不同胰腺癌细胞对吉非替尼的敏感性十分不同, 并且其对吉非替尼的敏感性和细胞 TGF- α 的表达量密切相关。然而, 其具体机制尚未阐明, 并且在提高吉非替尼敏感性方面相

关研究也极少。

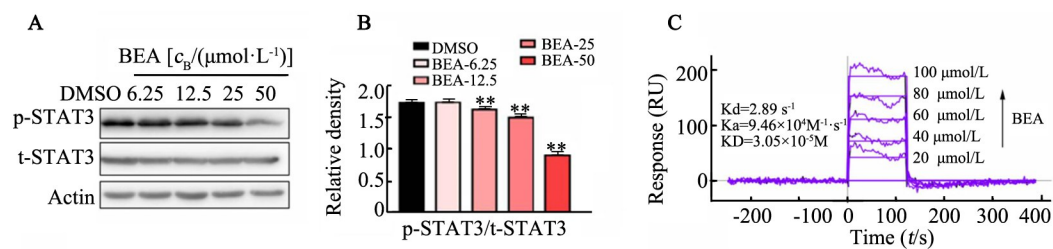


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DMSO group

A: Combination treatment with Gefi and BEA promoted apoptosis of Panc-1 cells; B: The expression of apoptosis-related proteins; C: Relative expression of apoptosis-related proteins (cleaved-PARP/Actin, Bcl-2/Actin and Bax/Actin) was quantified by Image J software, and analyzed by Graphpad Prism.

图3 吉非替尼联用BEA促进胰腺癌细胞Panc-1的凋亡与调节相关蛋白表达

Fig. 3 Combined treatment with Gefi and BEA promoted apoptosis and regulated the expression of apoptosis-related proteins in Panc-1 cells



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DMSO group

A: BEA inhibited the phosphorylation of STAT3 in Panc-1 cells; B: Relative expression of phosphorylated STAT3 (p-STAT3/STAT3) was quantified; C: The direct binding of BEA and STAT3 was determined by SPR assay

图4 BEA抑制胰腺癌Panc-1细胞内STAT3的磷酸化

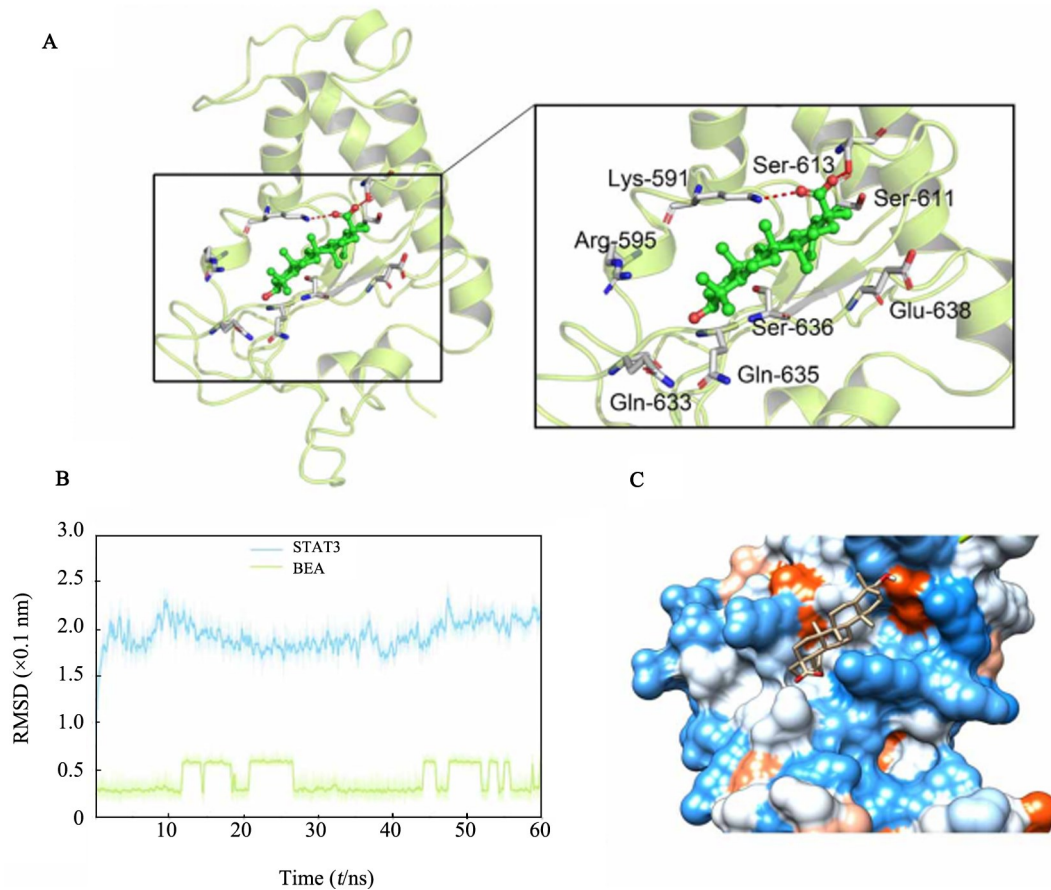
Fig.4 BEA inhibited the phosphorylation of STAT3 in Panc-1 cells

STAT3 作为多个受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 信号通路的下游重要的一个调节因子, 其参与的 JAK-STAT3 信号通路在 RTK 介导的肿瘤细胞的增殖、分化、存活以及血管生成等生物学过程中具有重要作用; 此外, STAT3 亦与众多酪氨酸激酶抑制剂 (TKIs) 耐药性的形成有着密切联系。大量研究^[16]证实, 小分子靶向 TKIs 药物对 EGFR、间变性淋巴瘤激酶 (anaplastic Lymphoma Kinase, ALK)、成

纤维细胞生长因子受体 (fibroblast growth factor receptor, FGFR) 以及人表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 等酪氨酸激酶的长期抑制, 会引起 STAT3 的反馈性激活, 而此作用很大程度上会反过来诱导肿瘤细胞对上述激酶抑制剂的耐药性。最新研究^[17-18]表明, 利用特异性小分子抑制剂靶向 STAT3, 阻断 JAK-STAT3 信号通路的激活, 不仅能有效抑制肿瘤生长、诱导肿瘤细胞凋

亡,并且有望克服胰腺癌细胞对 EGFR 抑制剂获得性耐药的难题。虽然多个小分子 STAT3 抑制剂(如 STA-21、OPB-31121 和 OPB-51602)在体内外抗肿瘤活性上有不错的前景,但事实上,毒性才是限制这些

抑制剂被开发为抗肿瘤药物的最大瓶颈^[9]。因此,本项目将研究对象瞄准了相对低毒性的天然来源 STAT3 抑制剂。



A: Binding mode of BEA and STAT3 predicted by molecular docking; B:RMSD of protein backbone C_{α} against 60 ns molecular dynamics simulation; C: Binding mode of BEA and STAT3 after molecular dynamics simulation

图5 BEA和STAT3的结合模式预测

Fig.5 Binding mode prediction for BEA and STAT3

近年来, BEA 因其高效低毒的抗肿瘤作用, 受到众多研究者的密切关注。同时, 作为众多天然产物中的一个明星分子, BEA 与多种临床上一线抗癌药物联合用药的研究报道, 也层出不穷^[20]。其中, SUN 等^[9]在评价 BEA 的胰腺癌抑制活性的同时, 发现 BEA 在吉西他滨敏感细胞 Panc-1 中可以与吉西他滨发挥协同杀伤作用。但 BEA 是否也能增敏 EGFR 激酶抑制剂(如吉非替尼)对胰腺癌细胞的抑制活性, 以及 BEA 与吉非替尼产生协同作用的具体机制是如何的, 目前仍未可知。基于此, 本研究通过细胞活力测定、流式细胞术、WB、SPR 实验等多种实验手段, 发现联合使用 BEA 能显著提高多种胰腺癌细胞对吉非替尼的敏感性, 包括增强吉非替尼对胰腺癌细胞的增殖抑制和诱导凋亡的作用。作用机制方面,

BEA 能直接结合于 STAT3 蛋白, 并有效地抑制细胞内 STAT3 信号通路的活化, 可能是其潜在的作用机制。

此外, 本研究在上述基础上, 综合分子对接和分子动力学模拟, 预测了两者可能的结合模式, 结果显示 BEA 在空间结构上具有巨大的化学修饰空间以进一步提高其活性。例如, 除了 BEA 与 STAT3 蛋白的氢键相互作用, BEA 周围的重要氨基酸残基, 例如 Arg-595、Ser-611、Gln-633、Gln-635、Ser-636、Glu-638 这些氨基酸提供了重要的形成分子间氢键相互作用所需的氢键供受体。化学结构修饰提高活性可以从增加氢键供受体方面考虑, 例如增加甲氧基、羟基等。综上, 本研究成功发现了一个潜在的 EGFR 抑制剂增敏化合物, 为提高吉非替尼在胰腺癌治疗方面

的临床收益提供了值得参考的候选方案。

[参 考 文 献]

- [1] KAMISAWA T, WOOD L D, ITOI T, et al. Pancreatic cancer[J]. *Lancet*, 2016, 388(10039): 73-85. DOI: 10.1016 / s0140-6736(16) 00141-0.
- [2] LIN Q J, YANG F, JIN C, et al. Current status and progress of pancreatic cancer in China[J/OL]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(26): 7988-8003[2019-06-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4499341/>. DOI:10.3748/wjg.v21.i26.7988.
- [3] MCGUIGAN A, KELLY P, TURKINGTON R C, et al. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes[J/OL]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(43): 4846-4861 [2019-06-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6250924/>. DOI:10.3748/wjg.v24.i43.4846.
- [4] OETTLE H, LEHMANN T. Gemcitabine-resistant pancreatic cancer: a second-line option[J]. *Lancet*, 2016, 387(10018): 507-508. DOI:10.1016/S0140-6736(15)01035-1.
- [5] GRÜNER B M, LUBESEDER-MARTELLATO C, BRIEL T, et al. Abstract PR11: EGFR is essential for Ras-driven pancreatic cancer development[C]//Cancer Genomics, American Association for Cancer Research, 2011.DOI:10.1158/1538-7445.fbc11-pr11.
- [6] NEDAEINIA R, AVAN A, MANIAN M, et al. EGFR as a potential target for the treatment of pancreatic cancer: dilemma and controversies[J]. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(14): 1293-1301.
- [7] RÍOS J L, MÁÑEZ S. New pharmacological opportunities for betulinic acid[J]. *Planta Med*, 2018, 84(1): 8-19. DOI:10.1055/s-0043-123472.
- [8] GHEORGHEOSU D, DUICU O, DEHELEAN C, et al. Betulinic acid as a potent and complex antitumor phytochemical: a minireview [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14(7): 936-945.
- [9] SUN L K, CAO J Y, CHEN K, et al. Betulinic acid inhibits stemness and EMT of pancreatic cancer cells via activation of AMPK signaling[J/OL]. *Int J Oncol*, 2019, 54(1): 98-110[2019-06-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6254859/>. DOI:10.3892/ijo.2018.4604.
- [10] KUTKOWSKA J, STRZADALA L, RAPAK A. Synergistic activity of sorafenib and betulinic acid against clonogenic activity of non-small cell lung cancer cells[J/OL]. *Cancer Sci*, 2017, 108(11): 2265-2272[2019-06-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5666031/>. DOI:10.1111/cas.13386.
- [11] BECKER S, GRONER B, MULLER C W. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA[J]. *Nature*, 1998, 394(6689): 145-151.DOI: 10.2210/pdb1bg1/pdb.
- [12] LIN Q J, YANG F, JIN C, et al. Current status and progress of pancreatic cancer in China[J/OL]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(26): 7988-8003[2019-06-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4499341/>. DOI:10.3748/wjg.v21.i26.7988.
- [13] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [14] TROIANI T, MARTINELLI E, CAPASSO A, et al. Targeting EGFR in pancreatic cancer treatment[J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(6): 802-810.
- [15] PINO M S, SHRADER M, BAKER C H, et al. Transforming growth factor alpha expression drives constitutive epidermal growth factor receptor pathway activation and sensitivity to gefitinib (Iressa) in human pancreatic cancer cell lines[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(7): 3802-3812. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-05-3753.
- [16] ZHAO C G, LI H M, LIN H J, et al. Feedback activation of STAT3 as a cancer drug-resistance mechanism[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2016, 37(1): 47-61. DOI:10.1016/j.tips.2015.10.001.
- [17] SEN M, JOYCE S, PANAHANDEH M, et al. Targeting Stat3 abrogates EGFR inhibitor resistance in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(18): 4986-4996. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-12-0792.
- [18] HUYNH J, ETEMADI N, HOLLANDE F, et al. The JAK/STAT3 axis: A comprehensive drug target for solid malignancies[J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 45: 13-22. DOI:10.1016/j.semcancer.2017.06.001.
- [19] SIVEEN K S, SIKKA S, SURANA R, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors [J]. *Biochim Et Biophys Acta BBA-Rev Cancer*, 2014, 1845(2): 136-154. DOI:10.1016/j.bbcan.2013.12.005.
- [20] ALI-SEYED M, JANTAN I, VIJAYARAGHAVAN K, et al. Betulinic acid: recent advances in chemical modifications, effective delivery, and molecular mechanisms of a promising anticancer therapy [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2016, 87(4): 517-536. DOI: 10.1111 / cbdd.12682.

[收稿日期] 2019-06-11

[修回日期] 2019-07-18

[本文编辑] 王映红