

一种新型 PAK1 抑制剂诱导结直肠癌 DLD-1 细胞凋亡的机制研究

王佳祺^{1,2}, 陈 娅^{1,2}, 孙晓艳^{1,2}, 卢悟广^{1,2}, 杨 洋^{1,2}, 蔡雪婷^{1,2}, 王小宁^{1,2}, 曹 鹏^{1,2*}

(¹南京中医药大学附属中西医结合医院,南京 210028; ²江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室,南京 210028)

摘要 PAK1 蛋白激酶在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用,筛选开发新的 PAK1 抑制剂作为肿瘤治疗靶向药物具有重要意义。传统的 PAK1 抑制剂筛选方法存在成本高、效率低等缺陷,而计算机虚拟筛选可降低发现活性先导化合物的成本,提高筛选效率。本实验采用计算机辅助药物虚拟筛选结合 Z'lyteTM高通量激酶筛选出 1 种 PAK1 靶向候选化合物,体外酶活性检测发现化合物 18(K788)具有良好的 PAK1 抑制活性(抑制率为 42.7%)。进一步通过 MTT 检测发现 K788 具有显著的 PAK1 阳性肿瘤杀伤活性,抑制活性优于阳性药 IPA-3 (inhibitor of p21-activated kinase compound-3)。采用流式细胞分析、Western blot 检测发现 K788 能通过抑制 PAK1 的表达及其活化以激活 caspase 凋亡通路,诱导结肠癌细胞 DLD-1 的凋亡。K788 具有临床开发应用的潜力,可作为 PAK1 靶向先导分子进行深入研究。

关键词 计算机辅助药物设计; PAK1; 酶活; 增殖抑制; 促凋亡

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)02-0229-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180214

引用本文 王佳祺,陈娅,孙晓艳,等. 一种新型 PAK1 抑制剂诱导结直肠癌 DLD-1 细胞凋亡的机制研究[J]. 中国药科大学学报,2018,49(2):229–237.

Cite this article as: WANG Jiaqi, CHEN Jiao, SUN Xiaoyan, et al. A mechanism research of novel inhibitor of PAK1 inducing colorectal cancer DLD-1 apoptosis[J]. *J China Pharm Univ*, 2018, 49(2):229–237.

A mechanism research of novel inhibitor of PAK1 inducing colorectal cancer DLD-1 apoptosis

WANG Jiaqi^{1,2}, CHEN Jiao^{1,2}, SUN Xiaoyan^{1,2}, LU Wuguang^{1,2}, YANG Yang^{1,2}, CAI Xuetong^{1,2}, WANG Xiaoning^{1,2}, CAO Peng^{1,2*}

¹ Nanjing University of Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028;

² Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Nanjing 210028, China

Abstract PAK1 plays an important role in the development of tumors. It is of great significance to screen and develop new PAK1 inhibitors as targeted drugs for cancer treatment. The traditional PAK1 inhibitor screening method has the problems of high cost and low efficiency. Computer virtual screening can reduce the cost of finding active lead compounds and improve the screening efficiency. In this study, a kind of PAK1 candidate compound was screened by computer assisted virtual screening combined with Z'lyteTM high flux kinase screen. *In vitro* enzyme activity screening showed that compound 18 (K788) had good PAK1 inhibitory activity (inhibition rate was 42.7%). Furtherly by MTT detection, it was found that K788 had significant PAK1 positive tumor killing activity, which was even better than the positive drug IPA-3. Flow cytometry and Western Blot showed that K788 could activate caspase apoptosis pathway and induce apoptosis of colon cancer cell DLD-1 by inhibiting PAK1 expression and activation. K788 has great potential for clinical development and application, and can be used as a PAK1 target for further research.

Key words CADD; PAK1; kinase activity; proliferation inhibition; pro-apoptosis

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81573665, No. 81602733)

蛋白激酶作为驱动子,在肿瘤细胞的生长、存活和转移过程中发挥着至关重要的作用,参与了人类肿瘤的发生和发展过程。许多与肿瘤相关的蛋白激酶也成为了药物设计的有效靶点。多种蛋白激酶抑制剂类抗肿瘤药物能够通过抑制蛋白激酶的活性从而有效限制肿瘤的发展。但仍有报道多种蛋白激酶抑制剂出现药物耐受现象,故寻找新的药物靶点、开发新型蛋白激酶抑制剂类药物显得尤为重要。p21活化的蛋白激酶(p21-activated kinases, PAKs)属于进化保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,是小分子GTP酶Cdc42和Rac1下游的效应子。PAKs位于多条肿瘤形成相关信号通路的交汇处,被突变或上游效应子激活的PAKs能够促进细胞的增殖、存活、侵袭及转移。同时,PAKs在多种恶性肿瘤中活化并发挥重要作用^[1]。PAKs结构上主要包含高度同源的C端激酶催化区域和存在差异的N端调节区域。根据结构和活化方式的异同,PAK家族被分为两个亚群:亚群I(PAK1-3)和亚群II(PAK4-6)^[2]。PAKs各种亚型分布于不同组织且在肿瘤的病理过程中具有不可取代的作用。其中,PAK1是最有特点的一个亚型,在传递胞外信号、调节细胞运动性方面发挥着重要作用^[3-4]。PAK1广泛表达于脑、肌肉及脾脏等组织中,同时其在多种恶性肿瘤中表达显著增高,如卵巢癌、乳腺癌和膀胱癌^[5-7]。研究表明,PAK1通过调节细胞增殖、存活、侵袭和转移,影响着多种恶性肿瘤的形成以及癌前病变过程^[8-10]。因此,PAK1被认为是重要的肿瘤治疗靶点之一,筛选开发PAK1抑制剂作为肿瘤靶向治疗药物具有重要意义。

传统的PAK1抑制剂筛选主要是通过人工筛选和高通量筛选的方法,两种方法各有其优缺点。前者耗时耗力且人为操作误差较大,后者虽可采用自动化的操作系统进行大规模的化合物筛选,但需要的靶酶或靶细胞较多且阳性率低,因此成本高、效率低。随着计算机技术的发展和大数据分析的出现,应用虚拟筛选方法发现先导化合物就逐渐成为主流。基于分子对接的计算机辅助药物筛选方法(computer-aided drug screening, CADD)是通过受

体与化合物之间的空间匹配和能量匹配从大量有机化合物中遴选出可能的有效候选化合物,以便后续实验验证。这种方法避免了对化合物的盲目筛选,大大降低发现活性先导化合物的成本,缩短了药物研发周期,是目前较为常用的一种药物筛选模式^[11]。本实验通过分子对接的虚拟筛选方法,根据化合物与PAK1结合的打分筛选出可能的有效候选化合物,进一步通过高通量Z'lyteTM激酶检测和肿瘤细胞杀伤活性检测筛选出一种新型PAK1小分子抑制剂——K788。

1 材料

1.1 细胞株

人原位胰腺腺癌细胞株(BxPC-3)、人胰腺癌细胞(PANC-1)、人肺癌细胞株(A549、H1975、PC9)、人结肠癌细胞株(DLD-1)购于上海中科院细胞库。

1.2 试剂

PAK1抑制剂阳性药IPA-3(美国Selleck[®]公司),溶于DMSO中制成浓度为20 mmol/L的母液,贮存于-20℃冰箱,稀释后用于实验;人重组蛋白激酶PAK1(美国AdooQ Bioscience公司);MTT(美国Sigma公司);Z'lyteTM激酶检测试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司);RMPI-1640培养基、DMEM培养基、胰酶(0.25% Trypsin-EDTA)、胎牛血清、青霉素加链霉素(美国Gibco公司)。凋亡检测试剂盒PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I(美国BD Pharmingen公司)。

1.3 仪器和软件

Multiskan全波长酶标仪(美国Thermo Scientific公司);Axio observer A1倒置荧光显微镜(德国Carl Zeiss公司);CKX41倒置显微镜(日本Olympus公司);Odyssey近红外激光成像仪(美国Li-COR公司);PowerPACTM凝胶电泳仪(美国Bio-Rad公司);FACS Aria II流式细胞仪(美国BD Pharmingen公司);曙光TC6600, Schrodinger(2015-3)软件,PDB数据库(ID:4EQC和4ZJJ),ChemDiv多样性小分子数据库。

2 方法

2.1 计算机辅助筛选 PAK1 靶向的候选药物

目前针对 PAK1 研究的小分子抑制剂主要分为 ATP 竞争型和别构型。ATP 竞争型抑制剂在 PAK1 结构的催化中心处与 ATP 竞争性结合,从而抑制 PAK1 的活化。而别构调节型抑制剂可以通过结合到 PAK1 结构中 ATP 口袋邻近的区域或 PAK1 背面的结合口袋,引起 PAK1 构象的变化干扰其活化^[12]。两种类型的抑制剂对 PAK1 均有较好的抑制效果,因此本实验对两种作用模式的抑制剂均进行了筛选。计算机筛选流程图如图 1 所示。

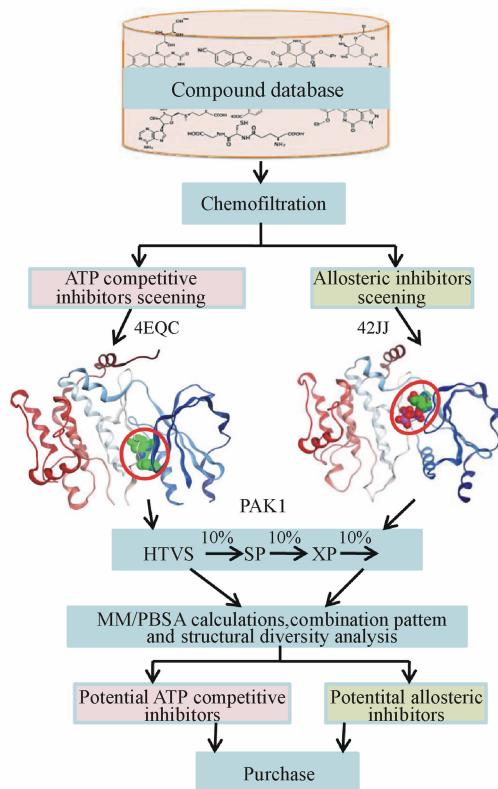


Figure 1 Overall drug screening process
HTVS: High throughput screening; SP: Standard precision screening;
XP: Extra precision screening

首先,本研究以 PAK1 与竞争性抑制剂 FRAX597 结合的复合物的晶体结构(PDB: 4EQC)和 PAK1 与别构调节抑制剂 ABAMECTIN 结合的复合物结构(PDB: 4ZJJ),采用 Schrodinger(2015-3)软件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。以晶体结构中的原有配体所在位点为

中心,定义周围 15 Å 范围为活性口袋生成格点文件。然后,候选化合物库被进行成药性过滤(滤除相对分子质量大于 600、小于 200 且环数大于 10、可旋转键数大于 10 的分子),在 pH = 7.0 ± 2.0 下采用 Epik 方法对 ChemDiv 数据库进行质子化,使用 OPLS3 力场对数据库分子进行构象生成,保持分子原有手性特征,每个分子最多产生 32 个构象。所有候选化合物的虚拟筛选使用 Glide 模块逐级筛选方法,算法精度依次升高:高通量筛选模式(HTVS)→标准精度筛选模式(SP)→超高精度筛选模式(XP),每步筛选保留 10% 的分子,通过结合能及结合模式分析,对竞争性和别构调节抑制剂各选 20 个候选化合物进行活性验证。

2.2 Z'lyte™ 激酶检测候选化合物的 PAK1 激酶抑制活性

将底物与酶溶液预先混合孵育 10 min,加入候选化合物(终浓度 10 μmol/L)后轻轻混匀,于 30 °C 反应振荡反应 1 h。然后加入 Development Reagent 并轻轻混匀,室温孵育 1 h。时间点到后继续加入 Stop Reagent 终止酶反应,于酶标仪上检测 445 nm/520 nm 处发射光值,并计算发射光比值 $E_{445/520}$;试剂盒中底物两端被香豆素和荧光素标记,酶有活性时可催化底物发生磷酸化,不会被 Development Reagent 切割。在激发光的作用下香豆素和荧光素会发生荧光共轭能量转移,发射光比值改变。酶活被抑制时则发射光比值不变,基于发射光比值的变化来计算化合物对酶活抑制率。酶活抑制率见公式(1):

$$\text{Inhibition rate} =$$

$$\left(1 - \frac{(E_{445/520} \times F_{100\%}) - C_{100\%}}{(C_{0\%} - C_{100\%}) + [E_{445/520} \times (F_{100\%} - F_{0\%})]} \right) \times 100\% \quad (1)$$

其中: $C_{100\%}$ 表示香豆素 100% 磷酸化对照孔发射光强度均值; $C_{0\%}$ 表示香豆素 0% 磷酸化对照孔发射光强度均值; $F_{100\%}$ 表示荧光素 100% 磷酸化对照孔发射光强度均值; $F_{0\%}$ 表示荧光素 0% 磷酸化对照孔发射光强度均值。

2.3 MTT 法检测候选化合物对肿瘤细胞抑制活性

MTT 法用于检测不同候选药物对 BxPC-3、PANC-1、A549 3 种细胞的增殖抑制作用。取对数生长期的细胞以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板中。各候选化合物按照预设的药物浓度加

药,各组设置3个复孔,于37℃培养箱中培养24 h。药物处理时间结束后,每孔加入浓度为5 g/L的MTT 10 μL,37℃培养箱孵育4 h后,吸取上清液,每孔加入DMSO 100 μL于振荡器上溶解10 min,测定A_{570/630}并计算增殖抑制率。增殖抑制率计算见公式(2):

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{control}, 570 \text{ nm}} - A_{\text{test}, 570 \text{ nm}}}{A_{\text{control}, 570 \text{ nm}} - A_{\text{control}, 630 \text{ nm}}} \times 100 \quad (2)$$

2.4 Western blot 法检测 K788 对肿瘤细胞中 PAK1 及 pPAK1 表达水平的影响

取对数生长期的结直肠癌细胞株 DLD-1,肺癌细胞株 A549、H1975 和 PC-9,胰腺癌细胞株 PANC-1 和 BxPC-3,以每毫升2×10⁵个细胞的密度种入6孔板后于37℃,5% CO₂的细胞培养箱中培养过夜,待细胞长到80%融合度后分别加入不同浓度的K788(0, 5, 10, 20, 30 μmol/L)处理24 h,在冰上用RIPA裂解细胞30 min提取全蛋白,加入Sample buffer用煮样器煮沸3 min后上样进行SDS-PAGE,再70 V转膜1 h,用5%脱脂牛奶封闭2 h后,孵育一抗(1:1 000稀释)于4℃孵育过夜,用TBST(含0.1%吐温-20)漂洗4遍(间隔10 min)后二抗

(1:10 000稀释)孵育1 h,经TBST漂洗4遍后于ECL曝光显影,曝光PAK1、p-PAK1、AKT、p-AKT、Cleaved-PARP、Caspase 3、Bcl-2、BAX等目的条带。

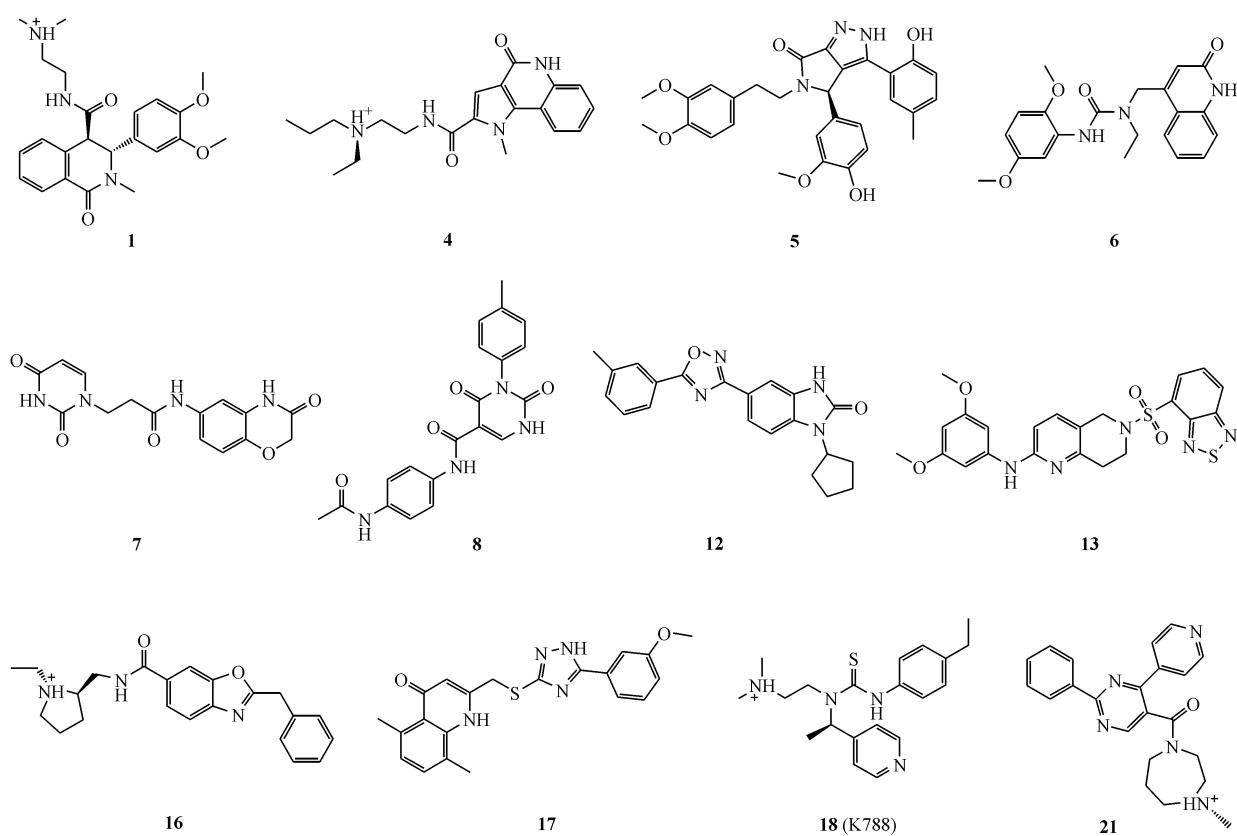
2.5 流式细胞术检测 K788 诱导肿瘤细胞凋亡

取对数生长期的DLD-1细胞,以每毫升1×10⁵个的密度种入6孔板后于37℃,5% CO₂细胞培养箱中常规培养过夜,待细胞长到80%汇合程度后分别加入不同浓度的K788(0, 10, 20, 40 μmol/L)处理24 h。到达时间点后用不含EDTA的胰酶消化收集细胞,用PBS洗涤细胞2次(2 000 r/min离心5 min)收集1×10⁵个细胞;加入Binding Buffer悬浮细胞100 μL;加入Annexin V-PE 5 μL混匀后,加入7-AAD 5 μL,混匀。室温、避光、反应15 min后,用流式细胞仪检测。

3 结 果

3.1 计算机辅助模拟筛选 PAK1 靶向候选化合物

根据对接打分、结合模式以及结构多样性分析,本实验筛选出27个ATP竞争型候选化合物(图2)和14个别构调节型候选化合物(图3),用于后续活性验证实验。



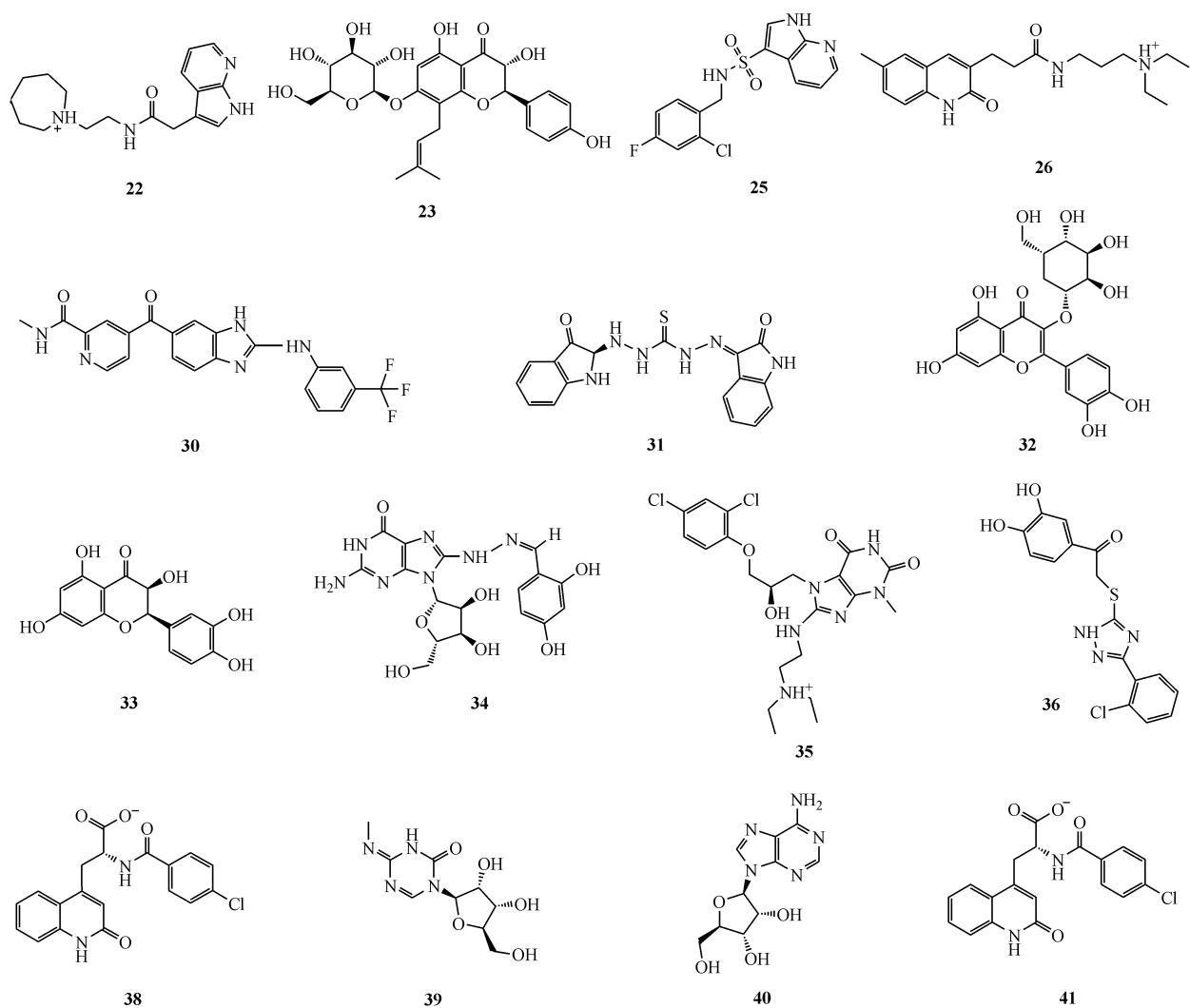
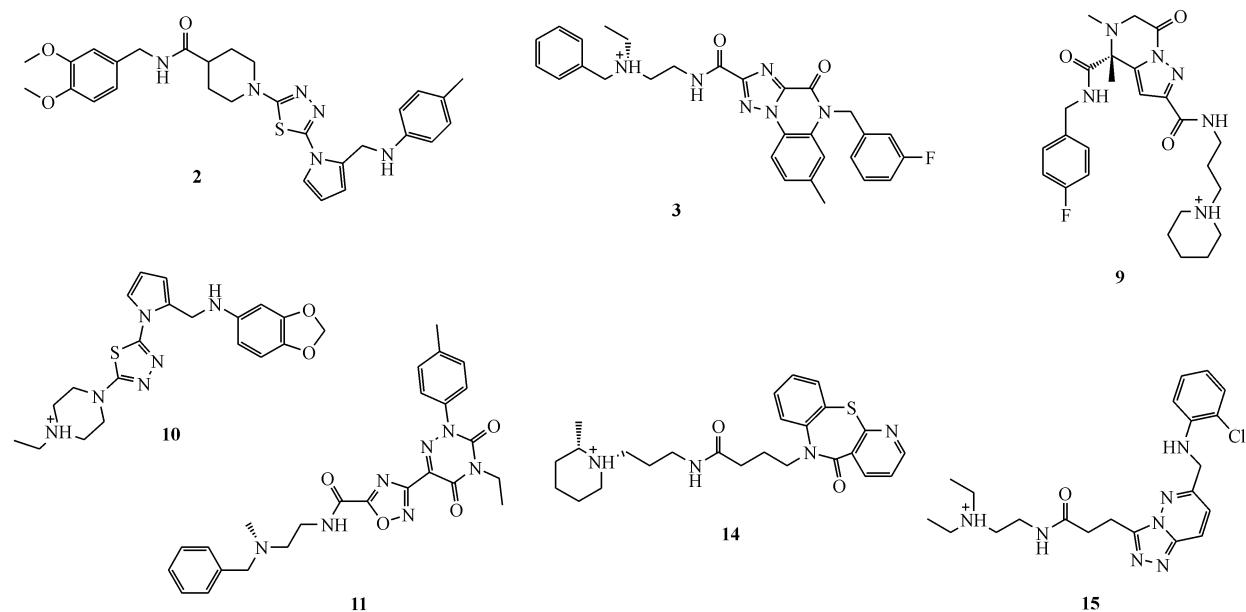


Figure 2 ATP competitive candidate compounds



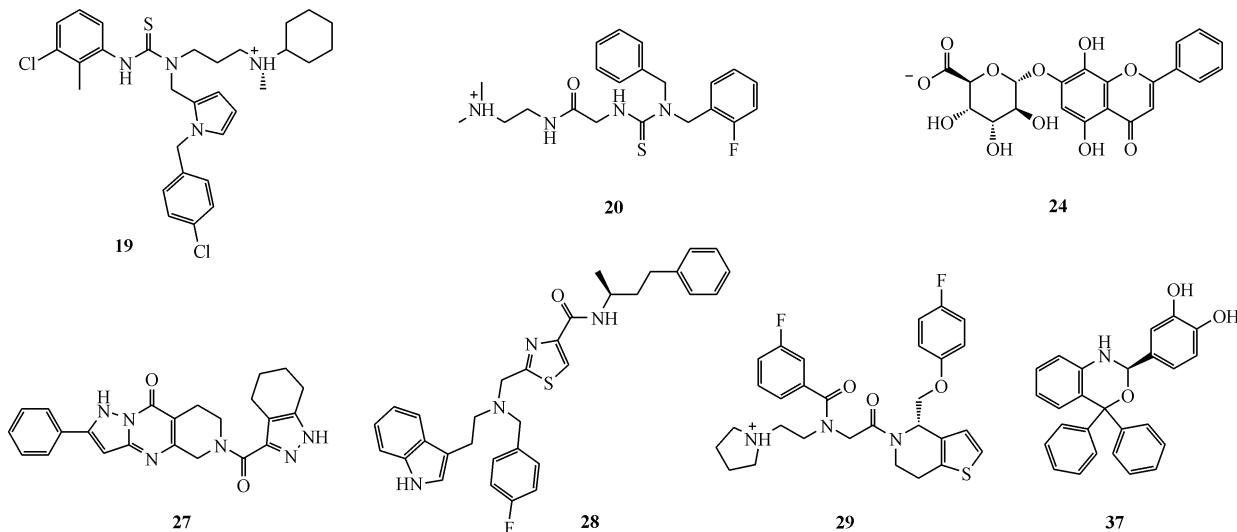


Figure 3 Allosteric candidate compounds

3.2 候选化合物对 PAK1 激酶的抑制作用

基于计算机辅助筛选的结果,本实验最终确定 41 个候选化合物。为探究候选化合物在体外酶反应体系中对酶活性的抑制效果,采用 Z'lyte 高通量激酶检测试剂盒对候选化合物的 PAK1 激酶抑制

活性进行检测。选取 PAK1 别构调节型抑制剂 IPA-3 作为阳性对照,各化合物初筛浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。如图 4 所示,41 个候选化合物中有 16 个化合物对 PAK1 酶活抑制率高于 10%,其中,化合物 2、5、7、19 的酶活抑制率大于 40%。

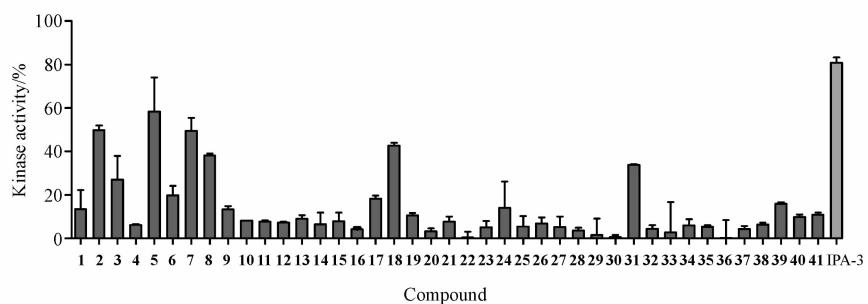


Figure 4 Inhibitory effect of candidate compounds on enzyme activity *in vitro*

3.3 候选化合物对肿瘤细胞的增殖抑制作用

为了验证候选 PAK1 抑制剂对肿瘤细胞的作用,本实验采用 MTT 法检测细胞活性来进一步评估上述 16 种对 PAK1 酶活抑制较好的候选化合物对 PAK1 阳性肿瘤细胞的增殖抑制作用。本实验选取 PAK1 高表达的胰腺癌细胞株 (BxPC-3 和 PANC-1) 和 PAK1 高度活化的肺癌细胞株 A549。将药物设置 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 两个浓度,于 BxPC-3 细胞上进行初筛,作用 24 h,结果如图 5-A 所示,结果显示,16 种化合物不同程度的抑制 BxPC-3 的增殖,其中化合物 3、5、17、18 和 40 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时的增殖抑制率都超过了 80%,化合物 3、5 和 18 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 时的抑制率也超过了 80%。而阳性药

IPA-3 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 时的抑制率已经超过 80%。

如图 5-B 和 5-C 所示。化合物 2 和化合物 3 在 25 $\mu\text{mol/L}$ 对 PANC-1 和 A549 细胞的增殖抑制率低于 40%,化合物 6 对 PANC-1 细胞更敏感,25 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制率达到 50%,而对 A549 细胞无明显抑制效果。化合物 18 在 25 $\mu\text{mol/L}$ 时对两种细胞的抑制率都高于 80%,且在相同浓度下对 PANC-1 和 A549 细胞的抑制效果均好于阳性药 IPA-3。其余化合物在两个高低浓度对细胞的增殖抑制率都低于 40%。综合 3 种肿瘤细胞的筛选结果来看,化合物 17 对胰腺癌细胞 BxPC-3 和 PANC-1 的抑制效果较好,而化合物 18 对 3 种细胞都有较好的抑制效果,更具有后续研究的价值。

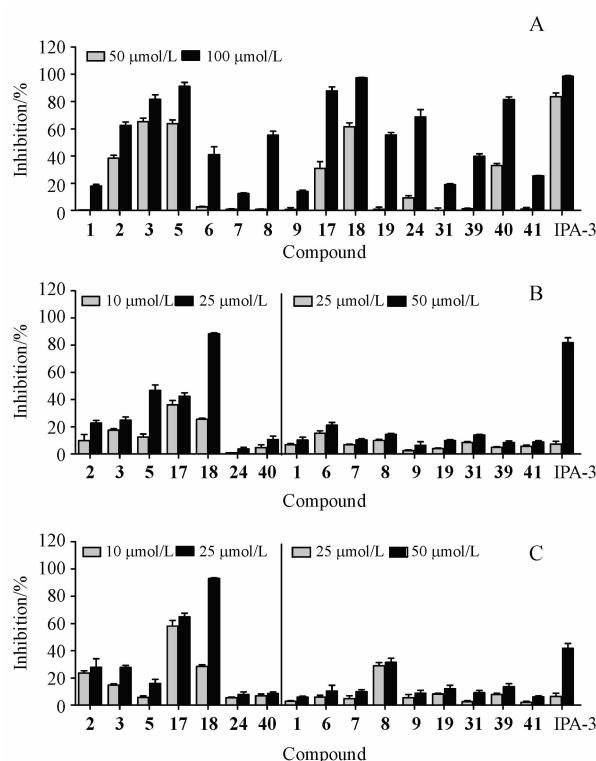


Figure 5 Effect of candidate compounds on proliferation inhibition of cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$). (A) Inhibititon effect of candidate compounds on BxPC-3 at 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$. (B) Inhibititon effect of compounds No. 2, 3, 5, 17, 18, 24 and 40 on PANC-1 at 10 $\mu\text{mol/L}$ and 25 $\mu\text{mol/L}$, concentration of the rest compounds are 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$. (C) Inhibititon effect of compounds No. 2, 3, 5, 17, 18, 24 and 40 on PANC-1 at 10 and 25 $\mu\text{mol/L}$, concentration of the rest compounds are at 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$

3.4 K788 与 PAK1 激酶相互作用的模式预测

通过体外酶活性水平和对细胞抑制作用的验证筛选,本实验找到1个活性较好的候选PAK1抑制剂(化合物18, K788)。为了更好地了解这个化合物发挥作用的方式,对化合物和靶蛋白PAK1的相互作用模式进行分析,结果如图6所示。化合物K788与PAK1的作用位点在ATP结合口袋的背面(图6-A),在此位点结合能够使PAK1发生别构,

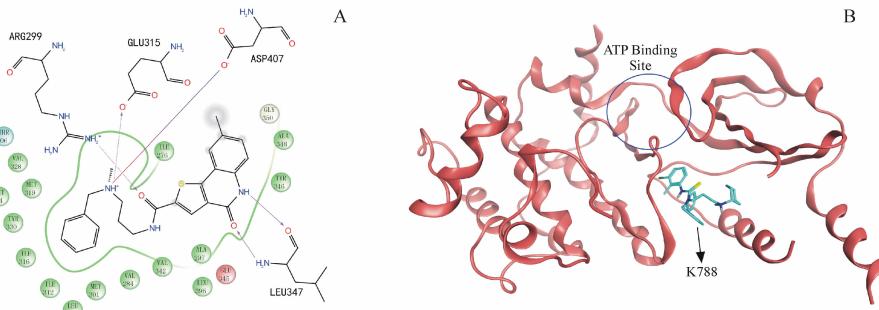


Figure 6 Interaction models between candidate inhibitor K788 and PAK1

A: View of the specific PAK1 binding sites in complex with CP734; B: Overall structure of PAK1 with CP734 bound in the ATP banding site

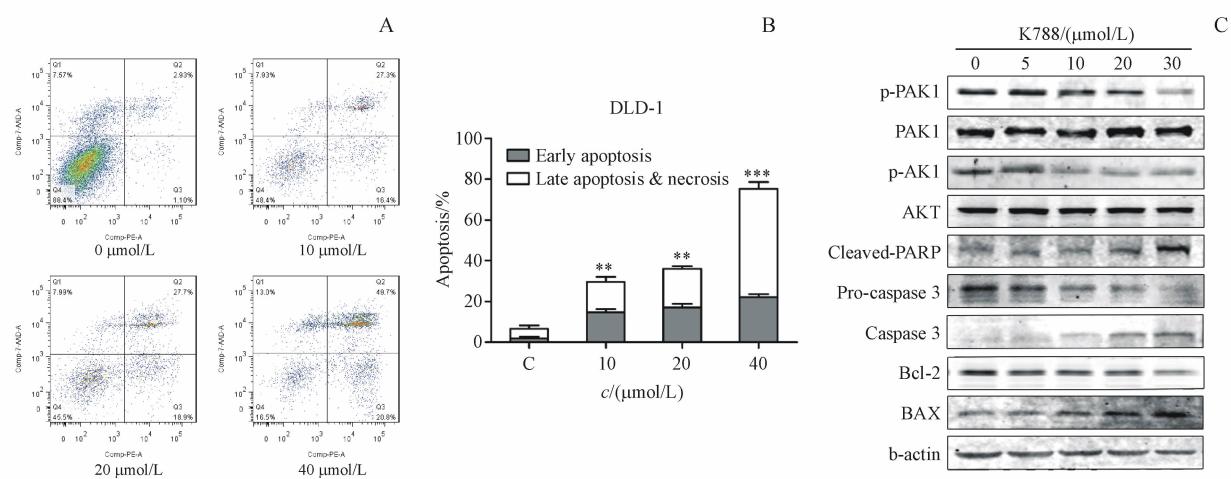
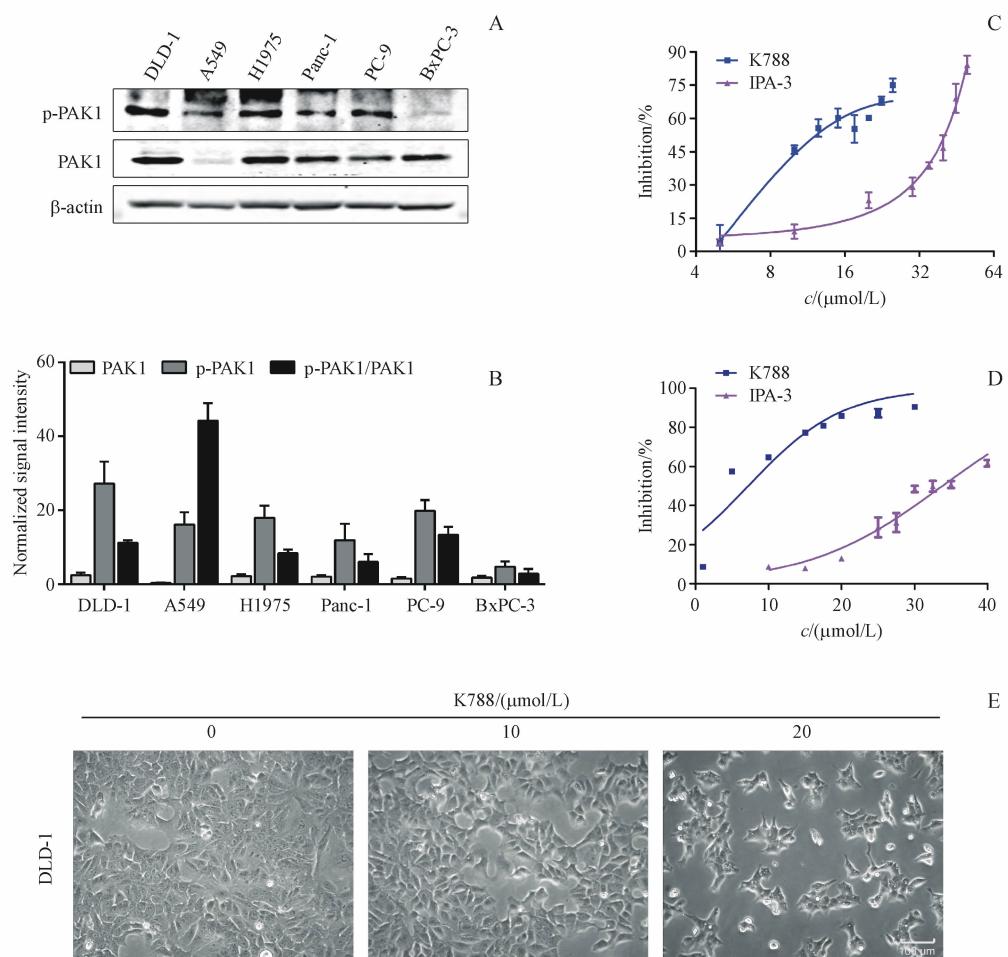
导致其酶活性受到抑制。K788与PAK1之间的相互作用力主要为疏水作用和氢键作用。K788结构中的季胺基团与Glu315形成氢键,两个苯环和环己烷深入到PAK1的疏水性口袋中(图6-B)。这些分子间作用力使得抑制剂与靶蛋白结合更加牢固,从而抑制PAK1的活化。

3.5 K788 对 PAK1 阳性肿瘤细胞的增殖抑制作用

进一步检测K788对6株PAK1表达阳性的肿瘤细胞中PAK1表达及活化水平的影响,结果如图7-A和7-B所示,PAK1在DLD-1细胞中表达和活化相对较高,而A549细胞中PAK1的表达量相对较低但活化程度最高。体外细胞毒性实验表明化合物K788对PAK1相对高度活化及高表达的肺癌细胞株A549(图7-C)和结直肠癌DLD-1细胞(图7-D)有较好的抑制活性,且抑制活性均高于阳性药IPA-3。化合物K788对DLD-1细胞更为敏感,加药24 h的细胞抑制 IC_{50} 为9.39 $\mu\text{mol/L}$,加药后24 h细胞开始发生皱缩死亡,胞内有类似凋亡小体样空泡出现,可能是药物诱导DLD-1细胞发生凋亡(图7-E)。

3.6 K788 通过调控 PAK1/AKT/Bcl-2 通路诱导结直肠癌细胞 DLD-1 凋亡

通过流式细胞术检测K788诱导DLD-1细胞凋亡活性,并进一步利用Western blot技术检测K788对胞内凋亡相关蛋白表达水平的影响。流式细胞仪统计结果表明:化合物K788在10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度加药8 h后,PE⁺/7-AAD⁻细胞增多,即细胞开始发生凋亡。综合分析发现K788能剂量依赖性促进DLD-1细胞凋亡。同时Western blot结果表明,K788通过降低PAK1磷酸化水平以降低PI3K/AKT/Bcl-2信号通路中AKT的活性,导致抗凋亡蛋白Bcl-2表达减少、促凋亡蛋白BAX表达增加,激活caspase凋亡通路,引起细胞凋亡^[14]。



4 讨 论

ATP 竞争型 PAK1 抑制剂主要有羟吲哚/顺丁烯二酰亚胺类、吡咯并吡唑类、单环氨基吡唑类、氮杂吲哚联芳基酮类、苯并咪唑类抑制剂;别构调节型抑制剂主要有二苯并二氮草类,活性较好的 PAK1 抑制剂为诺华公司研发的二苯并二氮草类化合物 **30** 和 IPA-3^[12]。尽管如此,目前,针对 PAK 的靶向抑制剂还没有成药上市,唯一进入临床试验的是辉瑞公司的 ATP 竞争型抑制 PF-3758309^[13],所以新型 PAK 抑制剂的发现就显得尤为重要。现今发现的 PAK1 抑制剂大多为 ATP 竞争型,其活性虽好但选择性较差,进入人体内很可能产生较大的不良反应,因此别构调节型相对于 ATP 竞争型在选择性上更有优势。

传统先导化合物筛选的方法存在盲目、成本高和效率低等问题。与传统筛选方法相比,虚拟筛选可以富集活性化合物,大大降低筛选的成本,提高药物筛选的可能性^[12]。本研究中,正是借助计算机辅助虚拟筛选,发现了一种新型新型 PAK1 抑制剂 K788。

本实验通过计算机辅助筛选出化合物 K788,其体外酶活的抑制率为 42.7%,稍逊于别构调节型 PAK1 抑制剂 IPA-3。但对于 PAK1 高表达以及高度活化的细胞株 DLD-1 和 A549, K788 则显示出更强的抑制活性。其对于 DLD-1 和 A549 细胞增殖抑制的 IC_{50} 分别为 $(9.39 \pm 0.023) \mu\text{mol/L}$ 和 $(13.04 \pm 0.026) \mu\text{mol/L}$,显著高于 IPA-3 ($IC_{50} = 26.27 \pm 0.065 \mu\text{mol/L}$)。此外, K788 能显著抑制 PAK1 的磷酸化从而下调 PI3K 信号通路下游 AKT 的活性,从而激活 caspase 凋亡通路,最终导致细胞死亡。

本研究表明,计算机辅助虚拟筛选是一种高效快速的激酶筛选技术体系,能够广泛应用于靶向药物的筛选和鉴定。同时筛选出的新型 PAK1 小分子抑制剂 K788 具有临床开发应用的巨大潜力。

参 考 文 献

[1] Radu M, Semenova G, Kosoff R, et al. PAK signalling during the development and progression of cancer [J]. *Nat Rev Cancer*,

2014, **14**(1): 13–25.

- [2] Kumar R, Vadlamudi RK. Emerging functions of p21-activated kinases in human cancer cells [J]. *J Cell Physiol*, 2002, **193**(2): 133–144.
- [3] Sells MA, Knaus UG, Bagrodia S, et al. Human p21-activated kinase (PAK1) regulates actin organization in mammalian cells [J]. *Curr Biol*, 1997, **7**(3): 202–210.
- [4] Delorme V, Machacek M, Dernardiroossian C, et al. Cofilin activity downstream of *Pak1* regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks [J]. *Dev Cell*, 2007, **13**(5): 646–662.
- [5] Balasenthil S, Sahin AA, Barnes CJ, et al. P21-activated kinase-1 signaling mediates cyclin D1 expression in mammary epithelial and cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**(2): 1422–1428.
- [6] Schraml P, Schwerdtfeger G, Burkhalter F, et al. Combined array comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis suggest PAK1 at 11q13.5-q14 as a critical oncogene target in ovarian carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2003, **163**(3): 985–992.
- [7] Ito M, Nishiyama H, Kawanishi H, et al. P21-activated kinase 1: a new molecular marker for intravesical recurrence after transurethral resection of bladder cancer [J]. *J Urol*, 2007, **178**(3): 1073–1079.
- [8] Vadlamudi RK, Adam L, Wang RA, et al. Regulatable expression of p21-activated kinase-1 promotes anchorage-independent growth and abnormal organization of mitotic spindles in human epithelial breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(46): 36238–36244.
- [9] Wang RA, Zhang H, Balasenthil S, et al. PAK1 hyperactivation is sufficient for mammary gland tumor formation [J]. *Oncogene*, 2006, **25**(20): 2931–2936.
- [10] Dummler B, Ohshiro K, Kumar R, et al. Pak protein kinases and their role in cancer [J]. *Cancer Metast Rev*, 2009, **28**(1/2): 51–63.
- [11] Sala-Vila A, Folkes J, Calder PC. The effect of three lipid emulsions differing in fatty acid composition on growth, apoptosis and cell cycle arrest in the HT-29 colorectal cancer cell line [J]. *Clin Nutr*, 2010, **29**(4): 519–524.
- [12] Rudolph J, Crawford JJ, Hoeflich KP, et al. Inhibitors of p21-activated kinases (PAKs) [J]. *J Med Chem*, 2015, **58**(1): 111.
- [13] Ndubaku CO, Crawford JJ, Drobnick J, et al. Design of selective PAK1 inhibitor G-5555: improving properties by employing an unorthodox low-pKa polar moiety [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2015, **6**(12): 1241–1246.
- [14] Beck JT, Ismail A, Tolomeo C. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: an emerging treatment strategy for squamous cell lung carcinoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, **40**(8): 980–989.