

藤黄新酸抑制肝癌细胞生长的机制研究*

徐波 邢丞 李敏 郭维 崔景荣**

(北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 在肿瘤细胞中蛋白酶体活性的抑制可以导致细胞凋亡和周期阻滞. 藤黄新酸(TH2)是从中药藤黄中提取的一个新的吡啶酮类衍生物. 研究结果显示, TH2 可以抑制人肝癌 Bel-7402 细胞的增殖, 诱导细胞产生凋亡, 且呈浓度和时间依赖性. 同时, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 TH2 与细胞作用 24 h 后, 可以导致早期凋亡标志性蛋白 PARP 发生裂解. 在体外采用特异性荧光底物检测 TH2 对蛋白酶体活性的影响, 发现该化合物能够抑制蛋白酶体的糜乳蛋白酶样、胰蛋白酶样活性和谷氨酰后水解活性. 抑癌基因 p53 是细胞内的蛋白酶体降解底物, TH2 可使 p53 蛋白的降解受到阻滞, 表达增加. 由此可见, TH2 具有抑制人肝癌 Bel-7402 细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用, 可能的分子机制与其抑制细胞内蛋白酶体活性、导致 p53 蛋白降解受阻有关.

关键词 藤黄新酸, 蛋白酶体, Bel-7402 细胞, 凋亡, p53

学科分类号 R965.1

泛素-蛋白酶体途径是一条广泛存在于真核细胞内依赖 ATP 的蛋白质降解途径. 由泛素、泛素活化酶、泛素偶联酶、泛素-蛋白连接酶、26 S 蛋白酶体和泛素再循环酶组成. 其中 26 S 蛋白酶体是蛋白质降解的场所, 由 1 个 20 S 核心蛋白酶体和 2 个 19 S 调节复合物组成. 20 S 蛋白酶体由 14 种不同的蛋白亚基组成, 其中 7 个同源的 α 亚单位和 7 个同源的 β 亚单位分别组成 α 环、 β 环、 β 环和 α 环, 4 个环层叠形成圆筒状结构. α 环形成底物蛋白通道, 主要用于底物识别以及与调节亚基结合, 构成 26 S 蛋白酶体; β 环上存在催化亚基, 主要参与底物降解. 已发现 20 S 蛋白酶体具有 3 种明显的酶活性: 类似胰凝乳蛋白酶 (chymotryptic-like, CT-L) 的活性, 位于 $\beta 5$ 亚基上; 类似胰蛋白酶的 (tryptic-like, T-L) 活性, 位于 $\beta 2$ 亚基上; 谷氨酰后水解活性 (postglutamyl hydrolase, PGPH), 位于 $\beta 1$ 亚基上^[1~3]. 泛素-蛋白酶体途径能够选择性地降解蛋白质, 使细胞内各种蛋白质的降解受到精确的调控. 从而维持了细胞许多重要生理功能, 如周期调控、转录调控、抗原提呈和凋亡等. 目前发现, 许多遗传性和获得性疾病的发生都与此途径功能失调有关, 特别是肿瘤疾病^[4].

在蛋白酶体抑制剂的研究过程中, 实验已证实, 特异性的抑制剂可以明显抑制肿瘤细胞增殖, 阻滞细胞周期, 诱导细胞凋亡, 抑制肿瘤血管形成

以及肿瘤转移, 同时还可以提高肿瘤细胞对化疗放疗的敏感性^[5]. 到目前为止, 已经发现了多种蛋白酶体的抑制剂, 其中硼酸肽类抑制剂 bortezomib (VELCADE™) 已进入三期临床试验, 用于治疗多发性骨髓瘤和其他肿瘤^[6]. 然而, 近年来蛋白酶体作为某些抗肿瘤药物的第二作用靶点的研究也越来越受到重视^[7,8]. Vinblastine 是一个作用于细胞微管的抗肿瘤药物. 研究发现, 它可以在体外抑制蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样和胰蛋白酶样活性, 同时能够引起 HL-60 细胞内泛素蛋白的聚集和 I κ B 的表达增加^[9]. 因此认为, 蛋白酶体作为一种新的靶标, 为开发新的抗肿瘤药物提供了新思路, 其抑制剂的应用也为肿瘤治疗提供新的方向.

藤黄(Gamboge)为藤黄科(Guttiferae)植物藤黄树(*Garcinia hanbaryi* Hook.f.)的树干被割伤后流出的胶状树脂. 主要产于柬埔寨、泰国、越南. 同科属植物在我国南方广东省和海南省也有分布. 其生物学活性在中国古代医书上早有记载, 具有消肿、化毒、止血、杀虫的功效^[10]. 近 20 年来的研究表明, 中药藤黄具有抗肿瘤活性, 临床上用于治疗乳腺癌、淋巴肉瘤、皮肤癌均取得一定的疗效^[11]. 目前已分离出的主要活性成分有藤黄酸(gambogic acid)、

*国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2004AA2Z3783).

** 通讯联系人. Tel: 010-82802467, E-mail: jrcui@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2006-11-06, 接受日期: 2006-12-06

新藤黄酸(neogambogic acid)和别藤黄酸(allogambogic acid)等. 藤黄新酸(TH2)是一类与藤黄酸结构相似的新衍生物, 其生物学活性尚未见报道. 1982年雷秋模等^[12]实验表明, 藤黄对小鼠腹水型肝癌 ECA 有抑制作用, 对体外培养的 Bel-7402 和 SMMC-7721 肝癌细胞株有明显的杀伤作用. 研究还发现, 藤黄及其提取物对其他肿瘤也有抑制作用^[13]. 鉴于肝癌是目前人类恶性程度最高、死亡率最大的一类肿瘤, 本文将着重探讨藤黄提取物藤黄新酸对体外培养的人肝癌 Bel-7402 细胞生长的影响, 并对其作用机制进行初步研究, 为中药藤黄在临床上的应用提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI-1640 培养基购自 Gibco BRL 公司. 小鼠抗人 PARP 单克隆抗体、蛋白酶体 T-L 特异性荧光底物 Z-Ala-Arg-Arg-AMC 为 CALBIOCHEM 公司产品. 小鼠抗人 P53 单克隆抗体、辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠二抗及山羊抗兔二抗、蛋白酶体 CT-L 特异性荧光底物 Suc-Leu-leu-Val-Tyr-AMC 和 PGPH 特异性荧光底物 Z-Leu-Leu-Glu-βNA 为 Sigma 公司产品.

1.2 化合物

藤黄新酸(TH2)(中国专利申请号 03109398), 由中国人民解放军北京军医学院黄正明教授提供. 其分子式为 $C_{38}H_{45}O_8$; 分子质量 629; 化学名: 2-丁烯酸, 4-[9-(3, 7-二甲基-2, 6-辛二烯基)-3, 4, 5, 7-四氢-8, 10-二羟基-3, 3-二甲基-11-(3-甲基-2-丁烯基)-7, 13-二羰基-1, 5-亚甲基-1H, 3H-呋喃-[3, 4-d]占吨-1-酰基]-2-甲基-[1R-1α, 1(Z), 3αβ, 5α, 9(E), 12αS]]. 结构式如图 1 所示. 藤黄新酸为黄色结晶, 溶于二甲基亚砷(DMSO)中, 配制成 100 mmol/L 的储备液, -20°C 储存, 用时以 PBS 稀释成相应浓度. 实验中 DMSO 的含量低于 0.1%.

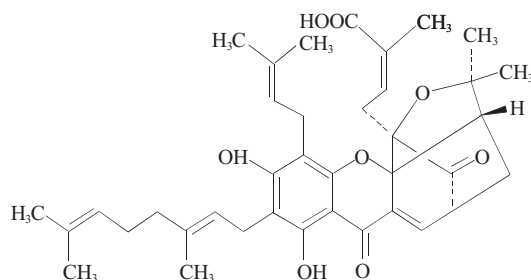


Fig. 1 The structure of TH2

1.3 细胞培养

人肝癌细胞 Bel-7402 由本实验室保存, 以含 10% 新生牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基, 置 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养, 常规消化传代.

1.4 乙酰罗丹明 B (SRB) 法

取对数生长期细胞 $5 \times 10^4/\text{ml}$, 接种于细胞培养板, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的化合物, 作用一定时间. 将细胞在 10% 三氯醋酸溶液中, 4°C 条件下固定 1 h. 去离子水冲洗, 空气干燥后加入 0.4% 乙酰罗丹明 B (SRB, Sigma 公司) 溶液 (1% 醋酸溶解), 室温染色 15 min, 用 1% 醋酸溶液冲洗游离的 SRB 染料, 空气干燥. 最后加入 10 mmol/L Tris 溶液, 充分震荡后于 540 nm 处测定吸光度值 (A_{540}). 按如下公式计算细胞活力: 样品组平均 A 值 / 溶剂对照组平均 A 值 $\times 100\%$.

1.5 流式细胞术分析

离心收集细胞, 用冷 PBS 清洗, 70% 乙醇固定过夜. 样品上机前用 PBS 洗涤, 再加入 1 mg/L RNA 酶于 37°C 孵育 30 min, PBS 清洗 2 次, 加入适量 10 mg/L 碘化丙锭和 0.1% Triton X-100, 由流式细胞仪 (Becton Dickinson FACScan) 检测分析, 激发光 / 发射光在 488 nm / 525 nm. 凋亡 Sub G1 峰用 Cell Quest 3.2 软件 (Becton-Dickinson) 读取数据并分析.

1.6 蛋白质印迹反应

离心收集细胞, 用冷的 PBS 清洗 2 遍. 加入适量细胞裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 5 mg/L Aprotinin, 5 mg/L Leupeptin 和 50 μmol/L PMSF) 置于冰上孵育 30 min, 在 4°C 以 14 000 g 离心 30 min. 小心取上清, 即为细胞全蛋白质. 蛋白质浓度用 BCA 蛋白质定量试剂盒 (Pierce 公司) 测定. 每个样品取蛋白质 50 μg, 加入 5× 上样缓冲液 (125 mmol/L Tris pH 6.8, 20% 甘油, 4% SDS 和 10% 二巯基乙醇), 95°C 加热 5 min 后用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离. 电泳后的样品电转移至硝酸纤维素膜上, 在含 5% 小牛血清白蛋白的 TBST 中室温封闭 1~2 h, 与适合比例稀释的一抗 (PARP 1:100, p53 1:200, β-actin 1:2 000) 4°C 孵育过夜, TBST 清洗, 再分别与相应的辣根过氧化物酶标记的二抗室温反应 1 h, 用 TBST 充分洗涤后, ECL 发光试剂盒显色 (GE Health 公司).

1.7 体外蛋白酶体活性的测定

在 100 μl Tris-HCl (20 mmol/L, pH 8.0) 的反应体系中含有 1 μg 纯化的 20 S 蛋白酶体(参照文献 [14]方法提取)、不同浓度的化合物和 100 $\mu\text{mol/L}$ 蛋白酶体特异性荧光底物, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 1 h. 用多功能读板机 (Fluostar OPTIMA, BMG Germany) 在 380 nm/440 nm (-AMC 底物) 或 335 nm/410 nm(- βNA 底物)的激发波长/吸收波长下读取荧光数值 A , A 值与蛋白酶体酶活性呈正相关性. 已知的蛋白酶体抑制剂 MG132 和 0.1% DMSO 分别用作阳性对照和溶剂对照. 用以下公式计算各浓度化合物对纯化的蛋白酶体酶活性的抑制率, 抑制率 = $(A_{\text{溶剂对照}} - A_{\text{化合物}}) / A_{\text{溶剂对照}} \times 100\%$.

1.8 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料分析采用 Student's t 检验.

2 结 果

2.1 藤黄新酸对 Bel-7402 细胞存活率的影响

初步结果显示, 藤黄新酸对多种人肿瘤细胞的生长有抑制作用(结果未显示). 这里仅对较敏感的人肝癌细胞株 Bel-7402 做进一步研究. 藤黄新酸与人肝癌 Bel-7402 细胞共同孵育, 细胞的生长受到抑制. 图 2 可见, 当藤黄新酸浓度在 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞的存活率由 12 h 的 86% 降低到 48 h 的

17.2%, 且这一抑制作用随药物浓度的提高及作用时间的延长而明显增强. 细胞经瑞式 - 吉姆萨染色后在光学显微镜下观察, 在给药组中, 细胞数量明显减少, 细胞膜皱缩, 胞浆减少, 染色质加深, 核固缩(结果未显示).

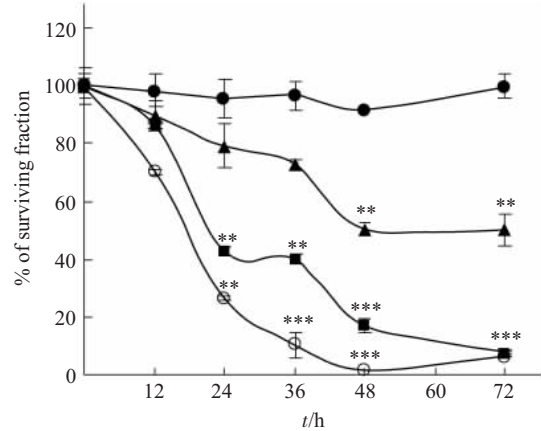


Fig. 2 Effect of TH2 on cell growth

Human hepatocellular carcinoma (Bel-7402) was exposed to increasing concentrations (2.5 to 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) of TH2 for indicated times. Surviving fractions were determined by SRB assay. Data were given as mean of triplicate $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$. ●—●: 2.5 $\mu\text{mol/L}$; ▲—▲: 5 $\mu\text{mol/L}$; ■—■: 10 $\mu\text{mol/L}$; ○—○: 20 $\mu\text{mol/L}$.

2.2 藤黄新酸对 Bel-7402 细胞凋亡的影响

为了检测藤黄新酸是否可以引起肿瘤细胞产生凋亡, 我们采用单参数流式细胞分析法观察亚二倍体凋亡(sub-G0/G1 期)峰的出现, 该峰代表亚二倍

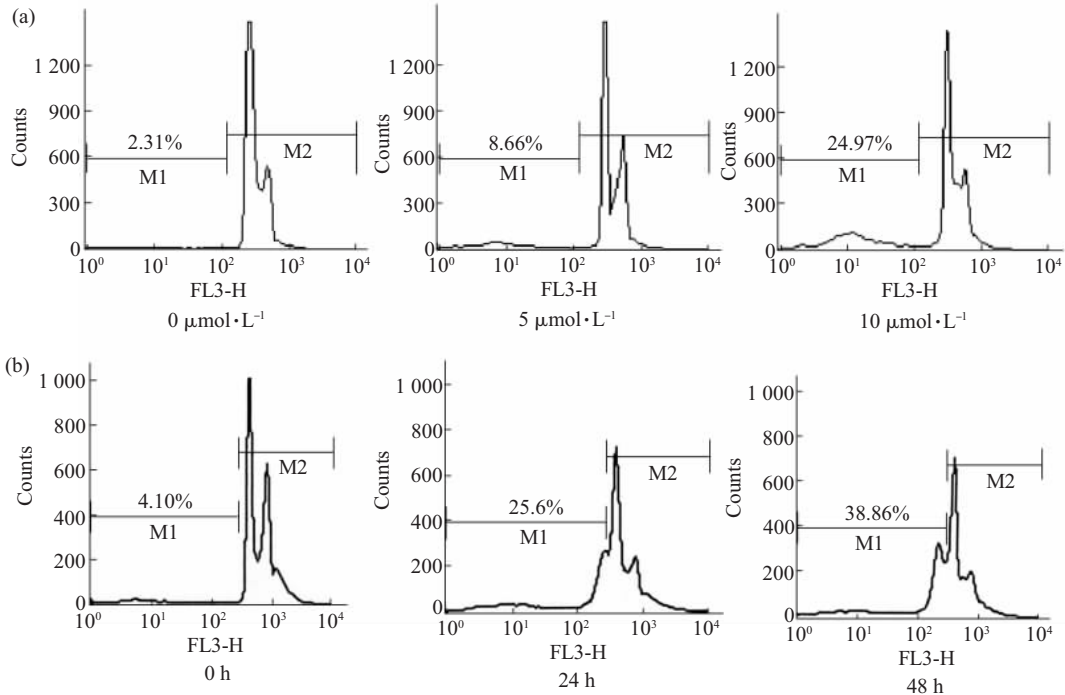


Fig. 3 Pro-apoptotic effect of TH2

Sub-G1 peak of Bel-7402 cells exposed to different concentrations of TH2 for 24 h (a) or Bel-7402 cells were exposed to 10 $\mu\text{mol/L}$ of TH2 for indicated time (b).

体 DNA 的产生, 是凋亡的特点之一. 如图 3 所示, 不同浓度藤黄新酸处理 Bel-7402 细胞, 24 h 后发现 sub-G0/G1 期峰逐渐增大, 由溶剂对照组的 2.31% 增加到给药组的 8.66% (5 $\mu\text{mol/L}$) 和 24.97% (10 $\mu\text{mol/L}$). 当给药浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 随着藤黄新酸作用时间的增加, 亚二倍体凋亡峰也持续增加, 呈正相时间依赖性.

2.3 藤黄新酸对凋亡相关蛋白表达的影响

为了进一步获得藤黄新酸诱导细胞凋亡的分子水平证据, 我们对凋亡标志性蛋白 -poly (ADR-ribose)polymerase(PARP) 的表达进行了分析. 以蛋白酶体特异性抑制剂 MG132 (10 $\mu\text{mol/L}$) 为阳性对照, 考察了藤黄新酸对 Bel-7402 细胞内 PARP 蛋白表达的影响. 如图 4 所示, 溶剂对照组只检测到一条 116 ku 的 (ADR-ribose) polymerase (PARP) 蛋白. 然而, 当 Bel-7402 细胞经 10 $\mu\text{mol/L}$ 藤黄新酸作用 24 h 后, 在 85 ku 处又检测到一条裂解带 (图 4a), 且裂解带灰度随给药时间的增加而加强 (图 4b).

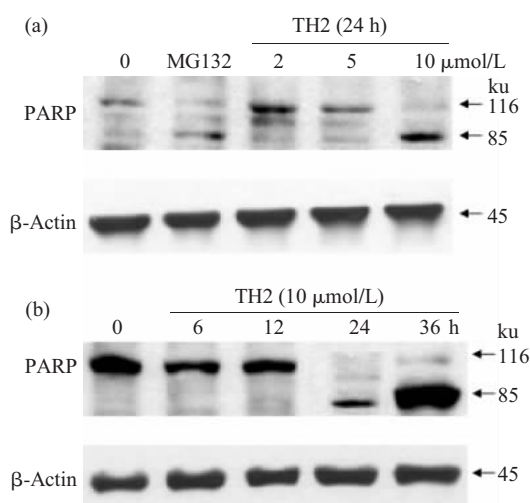


Fig. 4 Effect of the TH2 treatment on PARP processing
Bel-7402 cells were exposed at 37°C to either increasing concentrations of TH2 for 24 h (a) or 10 $\mu\text{mol/L}$ TH2 for indicated times (b). Aliquots of each solubilized cell lysate were subjected to electrophoretic separation and electro-blotting for the immunodetection of PARP. Full length PARP (p116) and the cleavage product (p85) are indicated. β -actin was used to control equal loading, and proteasome inhibitor MG132 was used as positive control.

2.4 藤黄新酸对体外 20 S 蛋白酶体活性的影响

本实验采用特异性荧光底物来检测藤黄新酸对体外 20 S 蛋白酶体 CT-L、T-L 和 PGPH 活性的影响. 16 $\mu\text{mol/L}$ 的藤黄新酸作用于从人红细胞中纯化的 20 S 蛋白酶体 1 h, 其对蛋白酶体的 CT-L、T-L 和 PGPH 活性的抑制率分别达到了 52.8%、55.3% 和 56.2%, 并且这种作用随浓度的增加而逐

渐加强 (图 5). 阳性对照 MG132 是醛肽类蛋白酶体抑制剂, 能够可逆性地抑制蛋白酶体的活性. 当浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时, MG132 显著抑制了 CT-L 活性, 其抑制率达 82.8%. 但在相同浓度条件下, MG132 对 T-L 和 PGPH 活性没有影响.

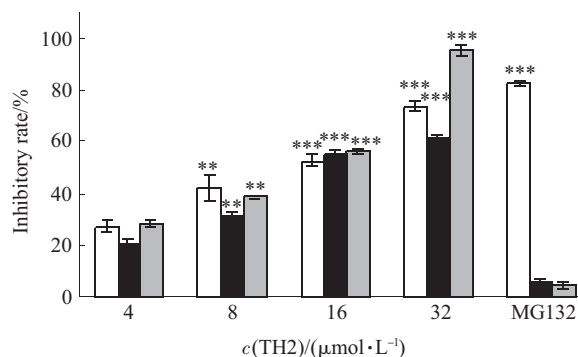


Fig. 5 Effect of TH2 on different proteolytic activities of 20 S purified proteasomes

20 S proteasome purified from human erythrocytes was incubated with indicated concentrations of TH2 and the fluorogenic substrates (Suc-Leu-leu-Val-Tyr-AMC for chymotrypsin-like activity (open band); Z-Ala-Arg-Arg-AMC for trypsin-like activity (solid band)) in 100 μl 200 $\mu\text{mol/L}$ Tris-HCl (pH 8.0). Release of the fluorescent groups was measured with a spectrofluorometer after 1 h reaction at 37°C. Activities are expressed relative to no compounds treatment, equal to 0% inhibition. Data was given as mean of triplicate values $\pm$ s. Significant difference from value of 0.1% DMSO solvent control; *** P < 0.001; ** P < 0.01. $\square$: Chymotrypsin-like; $\blacksquare$: Trypsin-like; $\blacksquare$: PGPH.

2.5 藤黄新酸对 p53 蛋白表达的影响

为了考察藤黄新酸对细胞内蛋白酶体功能的影响, 首先检测了不同浓度的藤黄新酸作用于

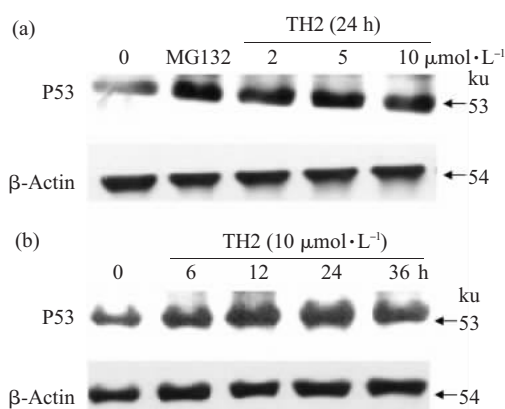


Fig. 6 Effects of TH2 treatment on the accumulations of proteasomal degradation-related proteins p53 in Bel-7402 cells

Bel-7402 cells were exposed to either increasing concentrations of TH2 for 24 h (a) or 10 $\mu\text{mol/L}$ TH2 for indicated times (b). Cell lysates were electrophoresed on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels for P53 and blotting on to a nitrocellulose membrane. Membrane was probed with antibodies to P53 and actin. Actin was used to control equal loading, and proteasome inhibitor MG132 was used as positive control.

Bel-7402细胞对 p53 蛋白表达的影响. 图 6 显示, 2 $\mu\text{mol/L}$ 的藤黄新酸作用 24 h 就可显著增加 p53 蛋白的表达. 在短时间刺激细胞的情况下 (6 h), 10 $\mu\text{mol/L}$ 的藤黄新酸可导致 p53 蛋白的累积.

3 讨 论

中药藤黄在肿瘤防治中的研究报道始见于 20 世纪 80 年代, 后有学者进一步确定了其主要的有效成分是以藤黄酸和新藤黄酸为代表的桥环吡酮类化合物^[12]. 研究表明, 这两种化合物均能抑制多种肿瘤细胞的生长, 阻断细胞周期于 G2 期, 同时诱导细胞产生凋亡^[12]. 体外和体内的裸鼠试验结果显示, 藤黄酸能够抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 的生长^[15], 其机制可能与端粒酶活性抑制、凋亡相关基因表达改变有关^[16]. 藤黄新酸与藤黄酸具有相似的化学结构, 只是前者 C1 位上的醚键被打开, 形成了羟基. 我们的实验结果表明, 藤黄新酸同样具有很强的抑制肝癌细胞生长的作用. 当藤黄新酸的浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h, 可诱导大量肿瘤细胞产生凋亡, 并且使 PARP 蛋白完全裂解, 进一步说明了藤黄新酸的抗增殖活性可能与其诱导细胞凋亡有关.

众所周知, 蛋白酶体的活性与细胞周期调控、基因转录和凋亡等有着密切联系^[17]. 目前, 蛋白酶体抑制剂以肽类化合物为主, 能和蛋白酶体 β 亚基上的活性位点形成共价或非共价结合, 主要抑制其 CT-L 活性, 同时也会轻微影响 T-L 和 PGPH 活性^[5]. MG132 是一个醛肽类的抑制剂, 它可以和蛋白酶体的 $\beta 5$ 活性亚基的苏氨酸残基末端形成非共价结合, 从而有效抑制其 CT-L 活性. 只有在高浓度时 MG132 才对另外 2 个酶活性有影响. 我们的结果显示, 藤黄新酸对蛋白酶体的 3 种酶活性具有相似的抑制作用, 提示该化合物可能和蛋白酶体的 3 个催化亚基都有结合, 或者是通过和其他亚基结合而发挥效应. 有证据表明, 化合物可以与非催化亚基结合, 通过变构效应影响蛋白酶体对底物的降解^[18]. 藤黄新酸是否也是通过该途径而抑制蛋白酶体活性及其深入的机制还有待进一步证实.

在蛋白质降解过程中蛋白酶体的 CT-L 活性起着决定性作用. 一旦该活性被抑制, 细胞内的蛋白质降解将受到阻滞, 细胞的正常生命活动 (如增殖、周期调控等) 也会被破坏. 为了进一步考察藤黄新酸对细胞内蛋白酶体功能的影响, 我们还检测

了藤黄新酸作用于人肝癌细胞后抑癌基因 p53 蛋白的表达. p53 是一个重要的抑癌基因, 是细胞周期阻滞和细胞凋亡的关键介质. P53 蛋白的过度表达, 既可以通过 p21waf1 途径影响细胞周期, 也可以通过改变凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 的表达, 引起 DNA 损伤和凋亡^[21]; 同时, p53 蛋白也是泛素蛋白酶体通路的酶解底物^[22]. 在肿瘤细胞中, p53 表达下降与蛋白酶体活性增强而导致其降解增加有关. 然而, 蛋白酶体抑制剂可以通过影响蛋白酶体活性来阻碍 p53 的降解, 引起细胞凋亡^[23]. 研究显示, 藤黄新酸作用于 Bel-7402 细胞导致 p53 蛋白表达增加. 由此推测, 藤黄新酸可能是通过影响蛋白酶体的活性来阻碍细胞内蛋白质的降解, 致使 p53 发生累积, 从而引起细胞产生凋亡.

总之, 中药藤黄提取物藤黄新酸具有抑制人肝癌 Bel-7402 细胞生长、诱导细胞凋亡的作用, 可能的分子机制与其抑制细胞内蛋白酶体活性、导致 p53 蛋白降解受阻有关. 该化合物对其他肿瘤细胞及对荷瘤小鼠的抗癌作用研究正在进行之中.

参 考 文 献

- 1 Rock K L, Goldberg A L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol*, 1999, **17**: 739~79
- 2 Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, *et al.* The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure (Camb)*, 2002, **10** (5): 609~618
- 3 Groll M, Ditzel L, Lowe J, *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 1997, **386** (6624): 463~471
- 4 Adams J. Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trends Mol Med*, 2002, **8** (4 Suppl): S49~54
- 5 Kisselev A F, Goldberg A L. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol*, 2001, **8** (8): 739~758
- 6 Richardson P G, Mitsiades C. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Future Oncol*, 2005, **1** (2): 161~171
- 7 Schmidtke G, Holzthutter H G, Bogoy M, *et al.* How an inhibitor of the HIV-1 protease modulates proteasome activity. *J Biol Chem*, 1999, **274** (50): 35734~35740
- 8 Kiyomiya K, Kurebe M, Nakagawa H, *et al.* The role of the proteasome in apoptosis induced by anthracycline anticancer agents. *International J Oncology*, 2002, **20** (6): 1205~1209
- 9 Piccinini M, Tazartes O, Mezzatesta C, *et al.* Proteasomes are a target of the anti-tumour drug vinblastine. *Biochem J*, 2001, **356** (Pt 3): 835~841
- 10 王 鸣, 冯 煦, 赵友谊, 等. 中药藤黄的研究和应用. *中国野生植物资源*, 2003, **22** (1): 1~3
- Wang M, Feng X, Zhao Y Y, *et al.* Chinese Wild Plant Resource, 2003, **22** (1): 1~3

- 11 雷秋模, 刘金妹. 藤黄(总体)抗癌实验与临床研究报告. 江西医药, 1982, **3**: 1~5
Lei Q M, Liu J M. Jiangxi Med, 1982, **3**: 1~5
- 12 雷秋模, 刘金妹. 藤黄抗癌作用研究的回顾与展望. 肿瘤防治杂志, 2003, **10** (2): 216~219
Lei Q M, Liu J M. China J Cancer Prev Treat, 2003, **10** (2): 216~219
- 13 Wu Z Q, Guo Q L, You Q D, *et al.* Growth inhibitory effect of GGAs on experimental tumor in mice and human cell cultured *in vitro*. Chin J Nat Med, 2003, **1** (2): 99~102
- 14 Xu B, Monsarrat B, Gairin J E, *et al.* Effect of ajoene, a natural antitumor small molecule, on human 20S proteasome activity *in vitro* and in human leukemic HL60 cells. Fundam Clin Pharmacol, 2004, **18** (2): 171~180
- 15 Guo Q L, You Q D, Wu Z Q, *et al.* General gambogic acids inhibited growth of human hepatoma SMMC-7721 cells *in vitro* and in nude mice. Acta Pharmacologica Sinica, 2004, **25** (6): 769~774
- 16 Guo Q L, Lin S S, You Q D, *et al.* Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by gambogic acid in human hepatoma SMMC-7721 cells. Life Sciences, 2006, **78** (11): 1238~1245
- 17 Almond J B, Cohen G M. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. Leukemia, 2002, **16** (4): 433~443
- 18 Myung J, Kim K B, Lindsten K, *et al.* Lack of proteasome active site allosterity as revealed by subunit-specific inhibitors. Mol Cell, 2001, **7** (2): 411~420
- 19 Vinitzky A, Michaud C, Powers J C, *et al.* Inhibition of the chymotrypsin-like activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex. Biochemistry, 1992, **31** (39): 9421~9428
- 20 Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. Embo J, 1998, **17** (24): 7151~7160
- 21 Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. Biochem Biophys Res Comm, 2005, **331** (3): 851~858
- 22 Michael D, Oren M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. Seminar in Cancer Biology, 2003, **13** (1): 49~58
- 23 Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, *et al.* Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. Blood, 2003, **101** (4): 1530~1534

Inhibitory Effects of TH2 on Human Epithelial Hepatoma Cancer Cells*

XU Bo, XING Cheng, LI Min, GUO Wei, CUI Jing-Rong**

(State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract It has been well known that apoptosis induction and cell cycle arrest are typical biological effects observed in cancer cells after proteasome inhibition. TH2 is a new natural xanthone analogue isolated from the resin of *Garcinia hurburyi* tree. Here, the cell growth inhibition of TH2 on human hepatocellular carcinoma cell line (Bel-7402) was evaluated *in vitro* using SRB assay. The treatment of 10 $\mu\text{mol/L}$ TH2 reduced the surviving fraction from 86% (12 h) to 17.2% (48 h). To assess whether TH2 induce apoptosis, the appearance of sub-G1 peak, a specific fraction for apoptosis was detected by flow cytometry analysis. Progressive increase in the percentage of apoptotic population was observed in a dose-and time-dependent manner. Furthermore, a cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), a marker of early apoptosis, was observed clearly when the cells exposed to 10 $\mu\text{mol/L}$ of TH2 for 24 h by immunoblotting analysis. *In vitro* activities of 20 S proteasome purified from human erythrocytes on fluorogenic peptide substrates revealed that TH2 inhibited the trypsin-like, chymotrypsin-like and peptidylglutamyl peptide hydrolyzing activities in dose-dependent manner. Moreover, the turnover of tumor suppressor p53, a sign of deregulation of cell cycle progression and apoptosis induction by classical proteasome inhibitors, was disrupted in Bel-7402 cells. All these data indicate that TH2 had inhibitory effect on the proliferation of Bel-7402 cells and induction of apoptosis, which might be related to its inhibition of proteasome.

Key words TH2, proteasome, Bel-7402 cell line, apoptosis, p53

*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China (2004AA2Z3783).

**Corresponding author. Tel: 86-10-82802467, E-mail: jrcui@bjmu.edu.cn

Received: November 6, 2006 Accepted: December 6, 2006