

# 中草药来源的 I 类 HDAC 抑制剂筛选

姚晓辉,黎欢,胡阳亮,胡英杰,符林春,沈小玲\*

广州中医药大学热带医学研究所中药新药发现实验室,广州,510405

**摘要:**为从中药来源的化合物中筛选 I 类组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂,采用 HDAC 抑制剂筛选试剂盒从 60 个化合物中筛选出对 HDAC 活性抑制作用较强的化合物,再用 HDAC3/8 抑制剂筛选试剂盒进一步评价其 HDAC 抑制,同时 Western-blot 法检测其对宫颈癌细胞株(HeLa) I 类 HDAC 表达的影响。结果显示:血根碱、胡椒碱、异甘草素、丹酚酸 C 对 HDAC 抑制活性较强;异甘草素和异甘草苷显著抑制 HDAC3/8 活性;血根碱对 HeLa 细胞有明显的增殖抑制作用,对 I 类 HDAC 的表达有明显的抑制作用。本研究提示血根碱、异甘草素和异甘草苷是 I 类 HDAC 的抑制剂,其中血根碱值得进一步深入研究。

**关键词:** I 类 HDAC 抑制剂筛选;天然化合物;血根碱;异甘草素;异甘草苷

中图分类号:R965.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.7.001

## Screening of Class I HDAC Inhibitors from Traditional Chinese Medicine

YAO Xiao-hui, LI Huan, HU Yang-liang, HU Ying-jie, FU Lin-chun, SHEN Xiao-ling \*

Laboratory of New Herbal Drug Discovery, Tropical Medicine Institute,  
Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

**Abstract:** To screen class I HDAC inhibitors of natural origin, in total 60 compounds from traditional Chinese medicine were evaluated the HDAC inhibitory effect by employment of HDAC inhibitor screening kits. Compounds exhibiting higher activity to inhibit HDAC were further investigated the effect on inhibiting HDAC3/8 activity by using HDAC3/8 inhibitor screening kits, and the effect on protein expression of class I HDACs in HeLa cells by Western-blotting. It was found that, Sanguinarine, Piperine, Isoliquiritigenin, Isoliquiritin, Salvianolic acid C were more active than others to inhibit HDAC activity; Isoliquiritigenin and Isoliquiritin significantly inhibited HDAC3/8 activity; In addition, Sanguinarine strongly inhibited cell proliferation and cellular expression of class I HDACs in HeLa cells. Our results showed that Isoliquiritigenin, Isoliquiritin and Sanguinarine are potential inhibitors of class I HDACs. Among them Sanguinarine is worth further studying.

**Key words:** screening of Class I HDAC inhibitors; natural compounds; sanguinarine; isoliquiritigenin; isoliquiritin

组蛋白乙酰化与去乙酰化过程由功能相互拮抗的组蛋白乙酰化酶(Histone Acetyltransferase, HAT)<sup>[1]</sup>和组蛋白去乙酰化酶(Histone Deacetylase, HDAC)<sup>[2]</sup>共同调控<sup>[3]</sup>。目前,哺乳动物体内已发现 18 种 HDAC 亚型,分为四类: I 类 HDAC(HDAC1、HDAC2、HDAC3 和 HDAC8<sup>[4]</sup>)、II 类 HDAC(II a 类 HDAC: HDAC4、HDAC5、HDAC7、HDAC9<sup>[5]</sup>; II b 类 HDAC: HDAC6、HDAC10<sup>[6]</sup>)、III 类 HDAC(SIRT1~7<sup>[7]</sup>)和 IV 类 HDAC(HDAC11<sup>[8]</sup>)。HDAC 参与调控基因转录,在细胞增殖、凋亡和分化等生命历程中发挥着重要作用<sup>[9,10]</sup>,与肿瘤、炎症等疾病的发生

发展密切相关,已成为癌症和炎症相关研究的热门生物学靶标<sup>[11-13]</sup>。

中药中含有大量天然化合物<sup>[14,15]</sup>,以 HDAC 为靶点开发天然 HDAC 抑制剂具有广阔的前景。本文以体外 HDAC 抑制活性为药理学指标,对中药来源的 60 个化合物进行 HDAC 抑制活性评价,并探索其对 HeLa 细胞中 I 类 HDAC 蛋白表达的影响,以期发现天然的高效低毒的 I 类 HDAC 抑制剂。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物和试剂

60 个中药来源的化合物购买于宝鸡市辰光生物科技有限公司和南京春秋生物工程有限公司,用 DMSO 溶解制成 20 mM 浓度储备液备用;HDAC 抑

制剂筛选试剂盒、HDAC3 抑制剂筛选试剂盒和 HDAC8 抑制剂筛选试剂盒 (Biovision, 美国, 货号依次为 K340-100、K363-100、K348-100); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液(强) (上海碧云天生物科技有限公司, 中国, 货号分别为 P0010、P1003B); 细胞计数试剂盒 (CCK-8) (Dojindo, 日本, 货号 CK-04); 胰酶、RPMI 1640 培养基 (BI, 以色列, 货号分别为 03-050-1 ACS、01-100-1 ACS); 南美来源 Gibco 胎牛血清 (Life Technologies 公司, 美国, 货号 10270-106); PVDF 膜 (Milipore, 德国)。

## 1.2 细胞培养

人宫颈癌细胞株 (HeLa) 由香港浸会大学提供。HeLa 细胞用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养。培养环境: 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>。取对数生长期的细胞进行实验。

## 1.3 主要抗体

Anti-HDAC1 抗体 (货号 3601-30) 和 Anti-HDAC2 抗体 (货号 3062-30) 购自美国 Biovision 公司; Anti-HDAC3 抗体 (货号 ab32369)、Anti-HDAC8 抗体 (货号 ab187139)、羊抗鼠 IgG H&L (HRP) 抗体 (货号 ab97040) 和羊抗兔 IgG H&L (HRP) 抗体 (货号 ab6721) 购自美国 Abcam 公司; Anti-GAPDH 抗体 (货号 TA-08) 和 Anti-β-actin 抗体 (货号 TA-09) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

## 1.4 主要仪器

Synergy HT 多功能酶标仪 (BioTek 公司, 美国); Bio-rad 垂直电泳仪 (Bio-rad 公司, 美国); CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (上海力申科技仪器有限公司, 中国); 垂直流超净台 (上海智城分析仪器制造有限公司, 中国); 倒置光学显微镜 (OLYMPUS, 日本); C-DiGit 化学发光成像仪 (Li-Cor 公司, 美国)。

## 1.5 HDAC 与 HDAC3/8 抑制剂筛选

基于荧光的 HDAC 抑制剂筛选试剂盒工作原理在于, 本试剂盒所含 HDAC 底物含有一条乙酰化赖氨酸侧链, 被 HDAC 去乙酰化后的底物可以和赖氨酸 Developer 反应产生荧光团从而被检测到。荧光的强弱反映 HDAC 活性。HDAC 抑制剂存在下产生的荧光越弱, 则说明 HDAC 抑制剂对 HDAC 活性的抑制能力越强。

1.5.1 采用 HDAC 抑制剂筛选试剂盒进行的筛选实验: 将试剂盒和样品储备液平衡至室温, 低速离心 1 min, 用蒸馏水将测试样品储备液稀释至 200 μM (2 × 工作液)。根据说明书操作, 在 96 孔板中分别

加入含测试化合物或试剂盒提供的阳性药物曲古抑菌素 A (TSA) 的工作液 50 μL, 含有 HDAC (HeLa 的核提取物) 和底物的反应液 50 μL, 小心混匀。实验同时设置无药物的阴性对照组。将板用膜封口后, 置于 37 °C 培养箱中反应 45 min。再加入 10 μL 的赖氨酸 Developer 终止反应, 37 °C 显色 30 min 后酶标仪检测荧光强度。设定阳性对照  $RFU_{阳性} = 100\%$ , 计算待测样品对 HDAC 活性的抑制率  $\% = (RFU_{阳性} - RFU_{样品}) / RFU_{阳性} \times 100\%$ 。本实验每组设置两个复孔, 实验结果以“平均值” ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

1.5.2 采用 HDAC3/8 抑制剂筛选试剂盒进行的筛选实验: 将试剂盒和样品储备液平衡至室温, 低速离心 1 min, 用 Buffer 配置将样品储备液稀释至好需要浓度 (4 × 工作液)。原理同前, 根据说明书操作, 酶标仪检测荧光强度,  $R_{BC}$ 、 $R_s$ 、 $R_{EC}$  分别代表空白孔、样品孔或阳性对照孔、酶对照孔。设定  $\Delta RFU_{EC} = 100\%$ , 计算待测样品存在下 HDAC3/8 的抑制率  $\% = (R_{EC} - R_s) / (R_{EC} - R_{BC}) \times 100\%$ 。筛选得到抑制活性较明显的样品进行细胞实验。本实验每组设置三个复孔, 实验结果以“平均值 ± 标准差” ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。本实验试剂盒提供的阳性药物为 SAHA 和 TSA。

## 1.6 CCK-8 法检测细胞增殖实验

胰酶消化收集对数生长期的 HeLa 细胞, 用生长培养基配成  $5 \times 10^4$  个/mL 的单细胞悬液, 按 100 μL/孔接种于 96 孔培养板, 置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 24 h 后, 将培养基更换为含有不同浓度测试药物或阳性对照药物 SAHA 的新鲜培养液。各个药物组分别设等倍稀释的 5 个浓度, 每个浓度设 3 个复孔。实验设置无细胞的空白孔和无药物的细胞对照组。将 96 孔板置于培养箱继续培养 48 h 后取出, 吸出旧培养基, 每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 的新培养基。按 CCK-8 使用说明将板置于培养箱继续培养 2 h 左右后取出, 于酶标仪检测在 450 nm 的吸收值 A。计算不同浓度药物作用下的细胞活力% [细胞活力% =  $(A_{药物} - A_{空白}) / (A_{对照} - A_{空白}) \times 100\%$ ]。实验重复三次, 实验结果以“平均值 ± 标准差” ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

## 1.7 Western-Blot 法检测药物对 HeLa 细胞 I 类 HDAC 蛋白表达的影响

将 HeLa 细胞接种于 10 cm 培养皿 24 h 后, 更换培养液为含有不同浓度测试药物的新鲜培养液后, 继续培养 24 h。采用 RIPA 裂解液裂解细胞提取总蛋白, 根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定

量。取 30  $\mu\text{g}$  蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。100V 转膜。将 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭后,加入用 5% 脱脂奶粉-TBST 稀释的一抗,4  $^{\circ}\text{C}$  摇床孵育过夜。抗体稀释倍数:anti-HDAC1 和 anti-HDAC2 为 1:1 000, anti-HDAC3 为 1:5 000, anti-HDAC8 为 1:50 000, anti- $\beta$ -actin 和 anti-GAPDH 为 1:10 000。TBST 洗膜 3 次,加入用 3% 脱脂奶粉-TBST 稀释的二抗(HRP 山羊抗兔:1:10 000; HRP 山羊抗鼠:1:20 000),室温摇床孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,采用化学发光液进行蛋白显影,C-DiGit 化学发光成像仪记录图像。

## 2 实验结果

### 2.1 采用 HDAC 抑制剂筛选试剂盒初步筛选的结果

表 1 60 个化合物对 HDAC 活性的抑制率(%) ( $n=2$ )

Table 1 Inhibitory effect of 60 compounds on HDAC activity (%) ( $n=2$ )

化合物 Compounds	抑制率 Inhibitory rate (%)	化合物 Compounds	抑制率 Inhibitory rate (%)
大黄素 Emodin	22.0	人参皂苷 Re Ginsenoside Rc	13.9
大黄酸 Rhein	29.7	人参皂苷 Rd Ginsenoside Rd	12.7
丹参素 Danshensu	19.9	人参皂苷 Re Ginsenoside Re	7.7
丹参酮 I Tanshinone I	7.4	人参皂苷 Rf Ginsenoside Rf	6.8
丹参酮 IIA Tanshinone IIA	4.4	人参皂苷 Rg <sub>1</sub> Ginsenoside Rg <sub>1</sub>	13.8
丹酚酸 A Salvianolic acid A	37.7	人参皂苷 Rg <sub>2</sub> Ginsenoside Rg <sub>2</sub>	-
丹酚酸 B Salvianolic acid B	29.1	人参皂苷 Rg <sub>3</sub> Ginsenoside Rg <sub>3</sub>	-
丹酚酸 C Salvianolic acid C	51.0	人参皂甙 Rh <sub>1</sub> Ginsenoside Rh <sub>1</sub>	23.7
隐丹参酮 Cryptotanshinone	7.1	人参皂甙 Rh <sub>2</sub> Ginsenoside Rh <sub>2</sub>	13.0
茯苓酸 Pachymic acid	-	人参皂甙 Rh <sub>3</sub> Ginsenoside Rh <sub>3</sub>	10.2
甘草查而酮 A Licochalcone A	30.3	人参皂苷 RO Ginsenoside RO	14.3
甘草次酸 Enoxolone	-	乙酰乌头碱 Acetylaconitine	20.9
甘草苷 Liquiritin	16.5	苯甲酰乌头原碱 Benzoylaconine	24.5
甘草素 Liquiritigenin	21.4	苯甲酰新乌头原碱 Benzoylmesaconine	30.9
甘草酸铵 Glycyrrhizic acid ammonium salt	7.0	次乌头碱 Hypaconitine	-
异甘草苷 Isoliquiritin	44.7	去甲乌药碱 Higenamine	10.0
异甘草素 Isoliquiritigenin	52.7	乌头碱 Aconitine	22.4
白藜芦醇 Resveratrol	22.0	乌头原碱 Aconine	23.3
虎杖苷 Plydatin	25.9	新乌头碱 Mesaconitine	-
汉黄芩苷 Wogonoside	17.6	印乌头碱 Indaconitone	18.3
汉黄芩素 Wogonin	26.2	宝藜苷 I Baohuoside I	14.2
黄柏碱 Phellodendrine chloride	18.3	朝藜定 A Epimedin A	34.2
黄芩甙 Baicalin	30.7	朝藜定 B Epimedin B	16.5
黄芩素 Baicalein	30.3	刺芒柄花素 Formononetin	0.6

Biovision 公司的 HDAC 抑制剂筛选试剂盒所用的 HDAC 为从 HeLa 核提取物,是一个混合物,包含各种亚型的 HDAC,但其成分比例未知。因此我们采用该试剂盒对 60 个中药来源的化合物进行 HDAC 抑制活性初步筛选,并和 HDAC 抑制剂 TSA 进行比较,结果见表 1。发现在 100  $\mu\text{M}$  工作浓度下,血根碱、胡椒碱、异甘草素、和丹酚酸 C 对 HDAC 活性的抑制作用最明显,抑制率分别 53.1%、53.1%、52.7% 和 51.0%;其次为异槲皮苷(45.1%),异甘草苷(44.7%),盐酸小檗碱(40.0%),丹酚酸 A(37.7%),箭藜苷 A(35.6%),抑制率在 35% 以上。这些化合物的 HDAC 抑制活性都较 TSA 弱,TSA 在 20  $\mu\text{M}$  时对 HDAC 活性的抑制率为 73.3%。

续表 1 (Continued Tab. 1)

化合物 Compounds	抑制率 Inhibitory rate (%)	化合物 Compounds	抑制率 Inhibitory rate (%)
盐酸小檗碱 Berberine chloride hydrate	40.0	水合淫羊藿素 Oxypeucedanin hydrate	-
血根碱 Sanguinarine	53.1	胡椒碱 Piperine	53.1
野黄芩苷 Scutellarin	32.8	箭藿苷 A Sagittatoside A	35.6
人参皂苷 Rb1 Ginsenoside Rb1	6.7	箭藿苷 B Sagittatoside B	32.2
人参皂苷 Rb2 Ginsenoside Rb2	-	脱水淫羊藿素 Anhydroicaritin	9.1
人参皂苷 Rb3 Ginsenoside Rb3	14.6	异槲皮苷 Isoquercitrin	45.1
TSA (20 $\mu\text{M}$ )	73.3		

注: -, 未检测出抑制活性。

Note: -, No inhibitory activity detected.

## 2.2 采用 HDAC3/8 抑制剂筛选试剂盒进一步筛选的结果

本研究采用的 HDAC 抑制剂筛选试剂盒, 其 HDACs 来自于 HeLa 细胞的核提取物, 所含 HDACs 包含各种分类和亚型。筛选的结果不能完全体现测试药物对 I 类 HDAC 的抑制作用。为进一步确定待测药物对 I 类 HDACs 不同亚型的影响, 我们选择对 HDAC 抑制作用较明显的 7 个化合物血根碱、胡椒碱、异甘草素、异甘草苷、异槲皮苷、丹酚酸 A 和丹酚酸 C 进一步进行了 HDAC3/8 活性抑制评价, 并和阳性药物 SAHA<sup>[16]</sup> 和 TSA<sup>[17,18]</sup> 进行了比较。结

果发现, 异甘草苷和异甘草素在其工作浓度下对 HDAC3 表现出了很强的抑制活性, 100  $\mu\text{M}$  时的抑制率分别为 99.5% 和 98.3%, 接近阳性药物 SAHA 在 50  $\mu\text{M}$  时的作用效果; 异甘草苷和异甘草素对 HDAC8 也表现出较好的抑制活性, 工作浓度 100  $\mu\text{M}$  时抑制率分别为 63.0% 和 68.6%, 但作用较阳性药物 SAHA 和 TSA 弱。血根碱、异槲皮苷和丹酚酸 A 作用次之。胡椒碱和丹酚酸 C 在 100  $\mu\text{M}$  时对 HDAC3、HDAC8 活性未表现出有明显抑制作用。具体结果见表 2。

表 2 测试化合物对 HDAC3/8 活性的抑制率 (%) ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )Table 2 Inhibitory effect of test compounds on HDAC3/8 activity (%) ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

样品 Sample	工作浓度 Working concentration ( $\mu\text{M}$ )	HDAC3 抑制率 HDAC3 inhibition rate (%)	HDAC8 抑制率 HDAC8 inhibition rate (%)
异甘草素 Isoliquiritigenin	100	98.3 $\pm$ 2.1	68.6 $\pm$ 1.3
	50	65.1 $\pm$ 1.8	46.0 $\pm$ 1.3
异甘草苷 Isoliquiritin	100	99.5 $\pm$ 0.8	63.0 $\pm$ 1.3
	50	67.2 $\pm$ 3.7	36.2 $\pm$ 0.2
血根碱 Sanguinarine	100	56.4 $\pm$ 1.4	46.2 $\pm$ 9.9
	50	42.8 $\pm$ 0.7	40.5 $\pm$ 0.3
异槲皮苷 Isoquercitrin	100	76.0 $\pm$ 0.6	47.3 $\pm$ 1.8
	50	41.5 $\pm$ 1.1	29.0 $\pm$ 0.3
丹酚酸 A Salvianolic acid A	100	43.5 $\pm$ 1.9	52.7 $\pm$ 1.3
	50	25.1 $\pm$ 0.4	38.7 $\pm$ 1.2
丹酚酸 C Salvianolic acid C	100	-	-
	50	-	-
胡椒碱 Piperine	100	7.5 $\pm$ 2.87	-4.6 $\pm$ 0.9
	50	5.9 $\pm$ 2.1	-2.94 $\pm$ 2.2
SAHA	50	88.5 $\pm$ 6.2	92.3 $\pm$ 0.5
TSA	1.25	96.5 $\pm$ 0.7	101.5 $\pm$ 0.5

注: "-" 未检测出抑制活性。

Note: "-" No inhibitory activity detected.

### 2.3 细胞增殖实验

为了进一步检测待测化合物对细胞内 HDAC 表达的影响,以 HeLa 细胞为模型,100  $\mu\text{M}$  为起始浓度,检测药物作用 48 h 对细胞增殖活力的影响,以确定细胞实验的作用浓度。结果发现,血根碱对细胞的增殖表现出明显的抑制作用,其半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )为 3.63  $\mu\text{M}$  (图 1)。因此后续试验选择了 1、2、3、4  $\mu\text{M}$  四个工作浓度。其他化合物对 HeLa 细胞增殖的抑制作用见表 3,其中,异甘草素和阳性对照 SAHA 对细胞增殖的抑制作用相对较强,100  $\mu\text{M}$  作用 48 h 后的细胞活力低于 50%,其  $\text{IC}_{50}$  分别为 54.22 和 62.90  $\mu\text{M}$ ,故取 50  $\mu\text{M}$  和 25  $\mu\text{M}$  两个浓度为药物浓度;100  $\mu\text{M}$  异槲皮苷作用 48 h 后的

细胞活力在 80% 左右;丹酚酸 A、丹酚酸 C、异甘草苷毒性较轻,100  $\mu\text{M}$  作用 48 h 后的细胞活力高于 80%。余四药取 100  $\mu\text{M}$  和 50  $\mu\text{M}$  两个药物浓度。

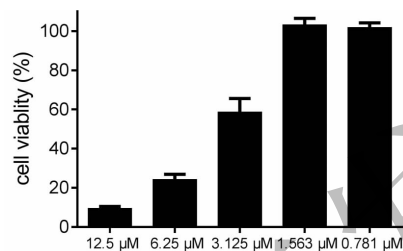


图 1 血根碱对 HeLa 细胞增殖活力的影响

Fig. 1 Effect of Sanguinarine on the proliferation activity of HeLa cells

表 3 测试化合物对 HeLa 细胞活力的影响 (%) ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of test compounds on viability of HeLa cells (%) ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

化合物 Compounds	100 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	12.5 $\mu\text{M}$	6.25 $\mu\text{M}$
胡椒碱 Piperine	66.21 $\pm$ 2.59	89.52 $\pm$ 2.26	95.37 $\pm$ 2.67	102.55 $\pm$ 0.61	99.72 $\pm$ 0.71
异甘草素 Isoliquiritigenin	25.41 $\pm$ 1.55	59.57 $\pm$ 1.81	74.58 $\pm$ 1.47	90.70 $\pm$ 2.55	96.95 $\pm$ 0.14
异甘草苷 Isoliquiritin	80.35 $\pm$ 3.16	88.78 $\pm$ 1.02	96.29 $\pm$ 3.91	100.68 $\pm$ 1.93	97.80 $\pm$ 2.00
丹酚酸 A Salvianolic acid A	85.47 $\pm$ 0.77	96.62 $\pm$ 3.37	92.63 $\pm$ 1.10	95.94 $\pm$ 1.06	95.75 $\pm$ 3.94
丹酚酸 C Salvianolic acid C	82.18 $\pm$ 0.47	93.50 $\pm$ 0.08	96.69 $\pm$ 0.94	100.19 $\pm$ 0.90	99.89 $\pm$ 1.11
异槲皮苷 Isoquercitrin	79.47 $\pm$ 1.48	86.28 $\pm$ 2.03	92.59 $\pm$ 2.43	95.23 $\pm$ 2.75	95.64 $\pm$ 1.29
SAHA	40.38 $\pm$ 7.01	57.52 $\pm$ 0.38	61.62 $\pm$ 2.13	72.69 $\pm$ 2.15	76.84 $\pm$ 1.86

### 2.4 药物对 HeLa 细胞 I 类 HDAC 蛋白表达的影响

检测了血根碱、胡椒碱、丹酚酸 A、丹酚酸 C、异甘草苷、异槲皮苷、异甘草素在选择工作浓度下作用于 HeLa 细胞 24 h 后细胞内 I 类 HDAC 的表达,HDAC 抑制剂 SAHA 为阳性对照,结果如图 2 所示。HDAC 抑制剂 SAHA (50、25  $\mu\text{M}$ ) 能剂量依赖地抑制 HDAC3 和 HDAC8 的表达;血根碱 (1 ~ 4  $\mu\text{M}$ ) 剂量依赖地抑制 HDAC1、HDAC3 和 HDAC8 的表达,但对 HDAC3 表达的抑制作用最强;丹酚酸 A (100

$\mu\text{M}$ ) 能明显减少 HDAC3 和 HDAC8 的表达;异甘草苷 (100、50  $\mu\text{M}$ ) 能明显减少 HDAC3 的表达,但不能抑制 HDAC8 的表达;异甘草素 (50  $\mu\text{M}$ ) 能一定程度减少 HDAC3 和 HDAC8 的表达;异槲皮苷 (100  $\mu\text{M}$ ) 仅能一定程度抑制 HDAC8 的表达;胡椒碱、丹酚酸 C 在其工作浓度 (100、50  $\mu\text{M}$ ) 对全部 I 类 HDAC 表达都无明显抑制作用。所有化合物对 HDAC2 的表达都没有明显影响,除血根碱外的其他化合物对 HDAC1 的表达无明显抑制作用。

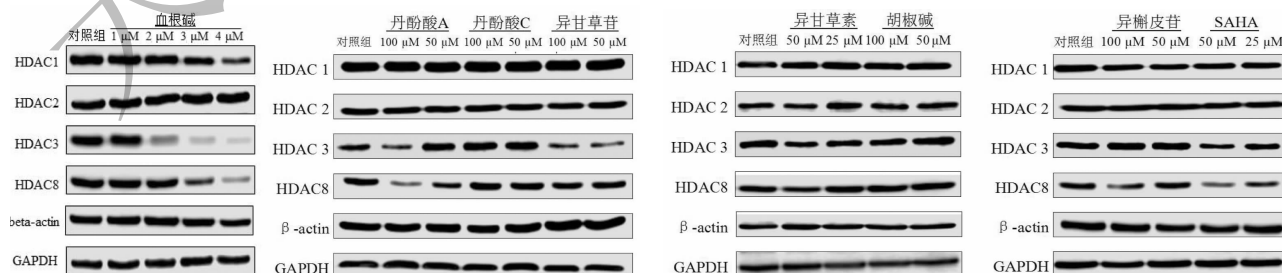


图 2 测试化合物对 HeLa 细胞 I 类 HDAC 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of test compounds on the expression of Class I HDAC proteins in HeLa cells

### 3 结论

本实验从中药来源的化合物中筛选出抑制活性较明显的天然 HDAC 抑制剂,并进一步研究其对 I 类 HDAC 中 HDAC3 和 HDAC8 的抑制活性,但由于缺少合适的试剂盒,未能分析其对 HDAC1 和 HDAC2 活性的抑制效果。我们的研究发现异甘草素、异甘草苷能明显抑制 HDAC3/8 活性,对 HDAC3 和 HDAC8 的表达也表现出了抑制作用;丹酚酸 A 对 HDAC3/8 活性及表达的抑制作用良好;丹酚酸 C 能明显抑制 HDAC 活性;异槲皮苷能明显抑制 HDAC3/8 的活性,且对 HDAC8 的表达有一定程度抑制作用。

本研究中,具有一定 HDAC 抑制活性的胡椒碱和丹酚酸 C 并不能抑制 HDAC3/8 的活性,也不能抑制 HeLa 细胞内 I 类 HDAC 蛋白的表达,说明不是 I 类 HDAC 的抑制剂。工作浓度的丹酚酸 A 尽管能抑制 HeLa 细胞内 HDAC3/8 蛋白的表达,但对细胞的增殖抑制能力较弱。与此同时,异甘草苷对 HDAC3/8 活性的抑制作用和异甘草素相当,其对 HeLa 细胞内 HDAC3 的表达抑制作用甚至还强于异甘草素,但异甘草苷对 HeLa 细胞的抑制作用却没有异甘草素强。这些结果说明 HDAC3/8 可能不是影响细胞增殖的重要因素。

值得关注的是,血根碱尽管在试剂盒筛选时对 HDAC3/8 活性的抑制作用不如异甘草素和异甘草苷明显,但在 HeLa 细胞模型上对 HDAC3/8 表达的抑制作用是所有化合物中最强,对细胞增殖的抑制作用也最强,因此血根碱对 HDAC 的抑制作用更多体现在抑制蛋白在细胞内的表达,而不是抑制蛋白的生物活性。

#### 参考文献

- 1 Kadoch C. Lifting up the HAT: synthetic lethal screening reveals a novel vulnerability at the CBP-p300 axis [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6: 350-352.
- 2 Schäfer C, Göder A, Beyer M, et al. Class I histone deacetylases regulate p53/NF- $\kappa$ B crosstalk in cancer cells [J]. *Cell Signal*, 2017, 29: 218-225.
- 3 Spange S, Wagner T, Heinzl T, et al. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41: 185-198.
- 4 Pflum MK, Tong JK, Lane WS, et al. Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 47733-47741.
- 5 Bottomley J, Lo SP, Digiovine P, et al. Structural and func-

- 6 tional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural Zinc-binding domain [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 26694-26704.
- 7 Tong JJ, Liu J, Bertos NR, et al. Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 1114-1123.
- 8 Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273: 793-798.
- 9 Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, et al. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 25748-25755.
- 10 Shen Y, Wei W, Zhou DX. Histone acetylation enzymes coordinate metabolism and gene expression [J]. *Trends Plant Sci*, 2015, 20: 614-621.
- 11 Vancurova I, Uddin MM, Zou Y, et al. Combination therapies targeting HDAC and IKK in solid tumors [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39: 295-306.
- 12 Zhou H (周慧), Zhou WQ (周伟强). SAHA affects cell cycle of MCF-7 breast cancer cells by regulating acetylated levels of p21WAF1/CIP1 promoter [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2017, 33: 1421-1425.
- 13 Shi YH (史业辉), Zhao WP (赵伟鹏), Chen XY (陈星宇), et al. Histone deacetylase inhibitor down-regulated the expression of HER-2 in breast cancer through the changes in miRNA [J]. *Chin J Clin Oncol* (中国肿瘤临床), 2017, 13: 644-648.
- 14 Khan NM, Haqqi TM. Epigenetics in osteoarthritis: potential of HDAC inhibitors as therapeutics [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 128: 73-79.
- 15 Han YT (韩雨桐), Li XY (李兴玉), Long CL (龙春林). Research advance in chemical constituents and pharmacological activities of *Garcinia oblongifolia* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30: 325-331.
- 16 Zheng XH (郑新恒), Chen F (陈芳), Liang QP (梁秋萍), et al. Amide constituents from the root of *Lycium yunnanense* Kuang and their anti-inflammatory activity [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30: 603-609.
- 17 Woo HJ, Lee SJ, Choi BT, et al. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, in human leukemic U937 cells [J]. *Exp Mol Pathol*, 2007, 82(1): 77-84.
- 18 Richon VM, Emiliani S, Verdin E, et al. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3003-3007.
- 19 Seidel C, Schnekenburger M, Dicato M, et al. Histone deacetylase modulators provided by Mother Nature [J]. *Genes Nutr*, 2012, 7: 357-367.