

## 山竹醇靶向RPN6抑制蛋白酶体及抗肿瘤活性研究

喻颖, 柯细松\*, 张雪\*

(上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203)

**摘要:** 山竹醇 (garcinol) 是藤黄中提取的苯三酚类化合物, 具有抗肿瘤活性, 但其靶标和分子机制尚不明确。本研究旨在探究山竹醇抗肿瘤作用的靶标及其分子机制。应用药物亲和力反应靶标稳定性实验 (DARTS) 鉴定山竹醇的结合蛋白; 采用酶活实验联合基因沉默技术考察山竹醇对蛋白酶体活性的影响及其对靶蛋白 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 11 (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11, RPN6) 的依赖性; 运用免疫荧光和邻近连接技术观测山竹醇对 RPN6 和泛素蛋白的作用; 利用流式分析技术探究山竹醇对细胞凋亡的影响; 类器官模型研究山竹醇对肿瘤的抑制作用。结果发现: RPN6 是山竹醇的直接结合蛋白; 山竹醇抑制蛋白酶体的水解酶活性并诱导泛素累积, 且其蛋白酶体抑制作用依赖于 RPN6; 进一步研究发现山竹醇诱导 RPN6 发生寡聚并在核内形成颗粒; 最后确证山竹醇诱导肿瘤细胞凋亡, 且显著抑制 APC 杂合突变小鼠小肠腺瘤 (Apc<sup>min/+</sup>) 类器官的生长。以上结果表明, 山竹醇靶向蛋白酶体 RPN6 亚基而抑制蛋白酶体活性, 诱导细胞凋亡并抑制肿瘤生长。

**关键词:** 山竹醇; 蛋白酶体; 19S; 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 11; 肿瘤抑制

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)02-0408-09

## Garcinol inhibits proteasome and suppresses tumor growth via targeting RPN6

YU Ying, KE Xi-song\*, ZHANG Xue\*

(Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Garcinol, a benzenetriol compound extracted from *Garcinia cambogia*, has antitumor activity, however, its antitumor mechanism remains unclear. The aim of this study was to investigate the role and mechanism of garcinol as a novel potential proteasome inhibitor. We applied the drug affinity responsive target stability (DARTS) method coupled to mass spectrometry to determine the binding protein of garcinol; the proteasome activity assay was used to determine the effect of garcinol on its hydrolase activity; immunofluorescence and proximity ligation assay (PLA) were used to detect the effects of garcinol on ubiquitin and RPN6; and flow cytometry were used to determine the effects of garcinol on cell apoptosis; and the anti-cancer effect was studied in organoid models. The results showed that RPN6 was a direct binding protein of garcinol; garcinol inhibited the hydrolase activity of proteasome, and induced the accumulation and aggregation of ubiquitin protein, and its proteasomal inhibitory effect was dependent on RPN6; further studies showed that garcinol induced oligomerization of RPN6 and formation of granules in the nucleus; finally, it was verified that garcinol induced apoptosis of tumor cells, and inhibited the growth of organoids of Apc<sup>min/+</sup> small intestine mice. These results suggest that garcinol is a potential proteasome inhibitor, which inhibits proteasome activity by directly targeting

收稿日期: 2024-10-21; 修回日期: 2024-11-22.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82173845, 82274147, 82204430); 上海市教育委员会科研创新计划重大项目 (2021-01-07-00-10-E00116, 2023-01-07-00-10-E00046).

\*通讯作者 Tel: 86-21-51322419, E-mail: xuezhang@shutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1024

RPN6 on proteasome 19S, which in turn induces cell apoptosis and inhibits tumor growth.

**Key words:** garcinol; proteasome; 19S; 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11; tumor inhibition

蛋白酶体是细胞内最为重要的降解机器, 参与机体内超过 80% 的蛋白质降解, 决定了蛋白质的命运<sup>[1-3]</sup>。蛋白酶体由调控颗粒 (regulate particle) 和核心的 20S 催化颗粒 (core particle) 组装而成<sup>[4]</sup>, 其中调控亚基最为常见的是 19S, 其特异性识别、去泛素化和展开蛋白质底物后<sup>[5]</sup>, 经 20S 裂解底物蛋白成肽段<sup>[6]</sup>。目前, 研究已经证实蛋白酶体是癌症的治疗靶标, 肿瘤细胞对蛋白酶体的抑制更为敏感<sup>[7]</sup>, 靶向蛋白酶体 20S 亚基的抑制剂如硼替佐米、伊沙唑米和卡非佐米等已经用于临床骨髓瘤或地幔细胞淋巴瘤 (mantle-cell lymphoma, MCL) 的治疗<sup>[8,9]</sup>。然而, 当前临床应用的蛋白酶体靶向药物均为 20S 抑制剂<sup>[8,10]</sup>, 但是靶向蛋白酶体核心的催化亚基 20S 往往使得此类药物选择性较低, 药物不良反应严重且易发生耐药性等诸多问题<sup>[11]</sup>, 因此, 发现具有选择性的蛋白酶体抑制剂是近年来靶向蛋白酶体研究抗肿瘤药物的研究趋势<sup>[12]</sup>。

事实上, 19S 被认为是蛋白酶体上具有相对特异性的疾病治疗靶标<sup>[13-15]</sup>。19S 是蛋白质降解的重要限速步骤, 是由盖子 (lid) 和基底 (base) 两个亚复合物共 19 个蛋白组装而成的复合物, 其由泛素受体特异性识别待降解底物, 经进一步剪切泛素链和去折叠蛋白空间结构后, 转运底物进入狭窄水解核心 20S<sup>[6]</sup>。针对 19S 去泛素酶的小分子已有报道, 其能克服肿瘤细胞对 20S 抑制剂的耐受, 有望应用于临床治疗<sup>[14]</sup>。然而, 靶向 19S 其他亚基的小分子鲜见报道。

山竹醇是藤黄中提取的聚酮和异戊烯基特殊结构的具有药用和营养价值的天然产物, 能够抑制胆碱酯酶和乙酰胆碱酯酶<sup>[16,17]</sup>, 具有抗肿瘤、抗炎和抗氧化等广泛生物学活性<sup>[18,19]</sup>。山竹醇通过抑制转移、诱导凋亡等方式<sup>[20]</sup>, 在结直肠癌和肝癌等癌症中发挥抗肿瘤作用, 被视为下一代表观遗传药物的候选药物<sup>[18]</sup>, 但其靶标和药物作用机制尚不明确<sup>[21]</sup>。26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 11 (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11, RPN6) 被认为是连接 19S 和 20S 的形成完全活化的 26S 蛋白酶体所必需的分子钳<sup>[22]</sup>, 其通过表面区域与盖子、基底和 20S 的亚基结合, 维持基底-盖子和 20S-19S 的相互作用, 以保持蛋白酶体的结构完整性。除稳定 26S 外, 许多研究还证实了 RPN6 的其他重要生理功能。RPN6 对果蝇的发育、细胞增殖和形态发生至关重要, 通过增加蛋白酶体的组装和活性显著延长秀丽隐杆线虫的寿命, 并促进酿酒酵母中其他

盖子亚基正确发挥调节作用<sup>[23-26]</sup>。RPN6 功能缺失会导致疾病的发生发展<sup>[27]</sup>, 是蛋白酶体调控细胞稳态的关键蛋白。本研究揭示了山竹醇能够直接结合蛋白酶体 19S 上的 RPN6, 依赖 RPN6 抑制蛋白酶体的水解酶活性, 并引起泛素蛋白积累, 进而发挥抗肿瘤作用。

## 材料与方法

**材料** 人结肠癌细胞 HCT116、人多发性骨髓瘤细胞 MM1S 和人胚胎肾细胞 HEK293、HEK293T 均购自中国科学院细胞库; 山竹醇购自美国 MedChemExpress 生物科技公司; 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂购自上海罗氏制药有限公司; 二甲基亚砜、链霉蛋白酶、ubiquitin 抗体、Duolink® PLA 试剂盒购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司 (Sigma-Aldrich); RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco Life Technologies 生物试剂有限公司; 青链霉-链霉素溶液 (PS) 购自美国英杰生命技术有限公司 (Invitrogen); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、快速银染试剂盒、Hoechst、4% 多聚甲醛溶液、Triton X-100、BSA、TEV 蛋白酶及其缓冲液购自上海碧云天生物技术有限公司; RPN6、GAPDH 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司 (Proteintech Group, Inc); mouse-488 荧光二抗及 rabbit-568 荧光二抗购自 Cell Signaling Technology 公司; HER-山羊抗鼠二抗及 HER-山羊抗兔二抗购自 Jackson ImmunoResearch 公司; 荧光底物 Suc-LLVY-AMC、RPN6 纯化蛋白购自美国 R&D Systems 公司; siRNA 和 siRNA-mate 购自苏州吉玛基因股份有限公司; CCK-8 试剂购自美国 APEX BIO 公司; APC 杂合突变小鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司; 大容量 Neutravidin 琼脂糖树脂购自赛默飞世尔科技公司。

**细胞培养** 所有细胞均在添加 1% (v/v) 青霉素-链霉素和 10% (v/v) 胎牛血清的培养基中生长。HCT116、HEK293 和 MM1S 细胞均在含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中培养。

**Western blot 实验** 用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞, 置于冰上裂解 30 min 后, 放入提前预冷至 4 °C 的离心机中, 14 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min。取蛋白上清液进行 BSA 定量。根据蛋白浓度取适量蛋白加入 5×SDS 上样缓冲液, 放入 100 °C 金属浴中变性 10 min, 制备得到样品。每个样品以 20 μg

蛋白量用 10% SDS 凝胶进行电泳, 并转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 一抗和二抗依次孵育, 化学发光法检测条带, 或电泳后利用快速银染试剂盒染色检测条带。

**药物亲和力反应靶标稳定性实验 (DARTS)** HCT116 细胞用含有蛋白酶抑制剂的 M-PER 裂解液进行裂解, 14 000 ×g 离心 15 min, 定量后用 PBS 将蛋白浓度定量在 4~6 mg·mL<sup>-1</sup>。将蛋白液分装到 EP 管中, 在室温下与药物共同孵育 1 h 后, 再用浓度梯度 pronase 酶进行蛋白水解 30 min, 最后加入蛋白酶抑制剂终止消化。酶切浓度为 1:100 (1 μg pronase/100 μg 蛋白), 最后加入蛋白酶抑制剂终止消化。样品变性后用于 Western blot 实验。

**蛋白酶体催化活性实验** 使用 6 孔板, 每孔接种 3×10<sup>5</sup> 个细胞, 贴壁后, 加入待测药物培养 16 h, 弃去培养基, PBS 洗两遍, 用 IP 裂解液 (加蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂) 温和提取蛋白, 定量至同一浓度, 随后加入荧光底物 Suc-LLVY-AMC (25 μmol·L<sup>-1</sup>), 避光于酶标仪连续 1 h 读取荧光值 (*Ex*: 320, *Em*: 460)。

**蛋白酶体纯化** 参考 Huang 等<sup>[28]</sup> 的实验方案, 通过生物素亲和层析方法纯化 26S 蛋白酶体。hRpn11 (POH1) 位于 26S 蛋白酶体调节颗粒上, 介导底物去泛素和去折叠, 是蛋白酶体重要组成部分, 通过 hRpn11 下拉整个复合物是蛋白酶体亲和纯化的重要手段<sup>[29]</sup>。课题组前期构建了 hRpn11-HTBH 稳转的 HEK293T 细胞, 将稳转细胞培养至一定数量后, 使用裂解缓冲液裂解细胞, 将上清液与高容量 neutravidin 琼脂糖树脂孵育过夜, 通过生物素标签 HTBH 富集蛋白酶体。接着, 通过裂解缓冲液广泛洗去多余的非特异性结合蛋白后, 利用 TEV 蛋白酶切除标签, 用 TEV 蛋白酶缓冲液将蛋白酶体从树脂上洗脱下来。最后, 通过浓缩获得较高浓度的 26S 蛋白酶体。为了监控整个纯化过程, 所有步骤均留样进行考马斯亮蓝染色。

**免疫荧光实验** 将 HEK293 和 HCT116 细胞以 1×10<sup>4</sup> 个/450 μL 的密度接种到共聚焦皿中, 细胞贴壁后给药。细胞用 4% 多聚甲醛固定, 0.1% Triton X-100 通透, 5% BSA 溶液封闭。再用一抗和二抗依次孵育, 用 Hoechst 染液染细胞核。使用共聚焦显微镜进行拍照。

**邻位连接技术 (PLA)** 将 HEK293 细胞以 1×10<sup>4</sup> 个/450 μL 的密度接种到共聚焦皿中, 细胞贴壁后给药。细胞用 4% 多聚甲醛固定, 0.1% Triton X-100 通透, 接着用 Duolink® PLA 封闭缓冲液 37 °C 封闭 1 h。4 °C 孵育一抗过夜, 洗涤后按照 Duolink® PLA 荧光实验方案进行 Duolink® PLA 实验。所有孔加入 Duolink® 抗兔

PLUS 和抗兔 MINUS 探针孵育, 使用 Duolink® 原位检测试剂生成 PLA 信号。用 Hoechst 染液染细胞核。使用共聚焦显微镜进行拍照。

**siRNA 敲低实验** 将 HEK293 细胞接种至 12 孔板中, 次日待细胞密度为 50% 时, 将 siRNA 与 siRNA-mate 在基础培养基中共孵育后, 均匀滴加至细胞中, 转染 60 h 后提取蛋白进行后续检测。敲低 RPN6 的 siRNA 序列如下: 5'-UAGUAAGUUAUCAUACAACUUG-GCC-3'。

**CCK-8 实验** 将 HCT116 和 MM1S 细胞以 5 000 个孔的密度接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后进行给药处理。给药 72 h 后, 每孔按培养基:CCK-8 = 10:1 的比例加入 CCK-8 试剂, 37 °C 孵育约 1 h, 用酶标仪在波长 450 nm 下测定吸光度 (*A*) 值, 抑制率 =  $A_{\text{Garcinol}}/A_{\text{DMSO}}$  值。

**FITC-PI 染色-流式细胞术** 将 HCT116、HEK293 细胞以 2.5×10<sup>5</sup> 个/孔密度接种到 12 孔板上, 将 MM1S 细胞以 4×10<sup>5</sup> 个/孔密度接种到 12 孔板上, 贴壁后给药处理 48 h, 然后用不含 EDTA 的胰蛋白酶对细胞进行消化, 收集孔中所有细胞, 用 PBS 洗 2 遍, 用碧云天 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒染色, 然后用 CytoFLEX S 流式细胞分析仪检测细胞凋亡情况。

**类器官实验** 按 bioGenous™ Mouse Intestinal Organoid Kit Plus (bioGenous, K2001P-MI) 试剂盒流程提取 APC 突变 C57BL/6J 鼠类器官。通过手术获取的 Apc<sup>min/+</sup> 小鼠组织小肠样本, 用无菌剪刀切割成 2 cm 组织块, 肠隐窝分离溶液分离小鼠隐窝后, 隐窝回收液洗涤, 重悬, 离心去上清。随后, 组织沉淀与 Organoid Culture ECM (bioGenous™, M315066) 按大约 1:3 的比例在冰上均匀混合, 并迅速地分布在 24 孔板上, 形成半球状滴珠。在 37 °C 下孵化 15 min 以促使滴珠凝固后, 每个孔中加入适量的培养基 (mouse intestinal organoid medium, bioGenous K2001P), 每 3 天更换 1 次培养基。

**统计学分析** 应用 GraphPad Prism 10 软件对数据进行统计分析, 多组间进行定量比较分析。P < 0.05 为数据差异有统计学意义。

## 结果

### 1 山竹醇靶向蛋白酶体 19S 亚基 RPN6

首先通过 DARTS 联用质谱 (DARTS-MS) 鉴定山竹醇的直接结合蛋白。DARTS 基于药物与蛋白质结合后稳定目标蛋白质的结构, 使其对蛋白酶的敏感性发生变化<sup>[30]</sup>, 同时联用质谱精准检测差异蛋白, 从而确定药物的具体靶点, 是药物靶标鉴定的经典手段。结果发现, 山竹醇经链霉蛋白酶处理后, 与对照组相比,

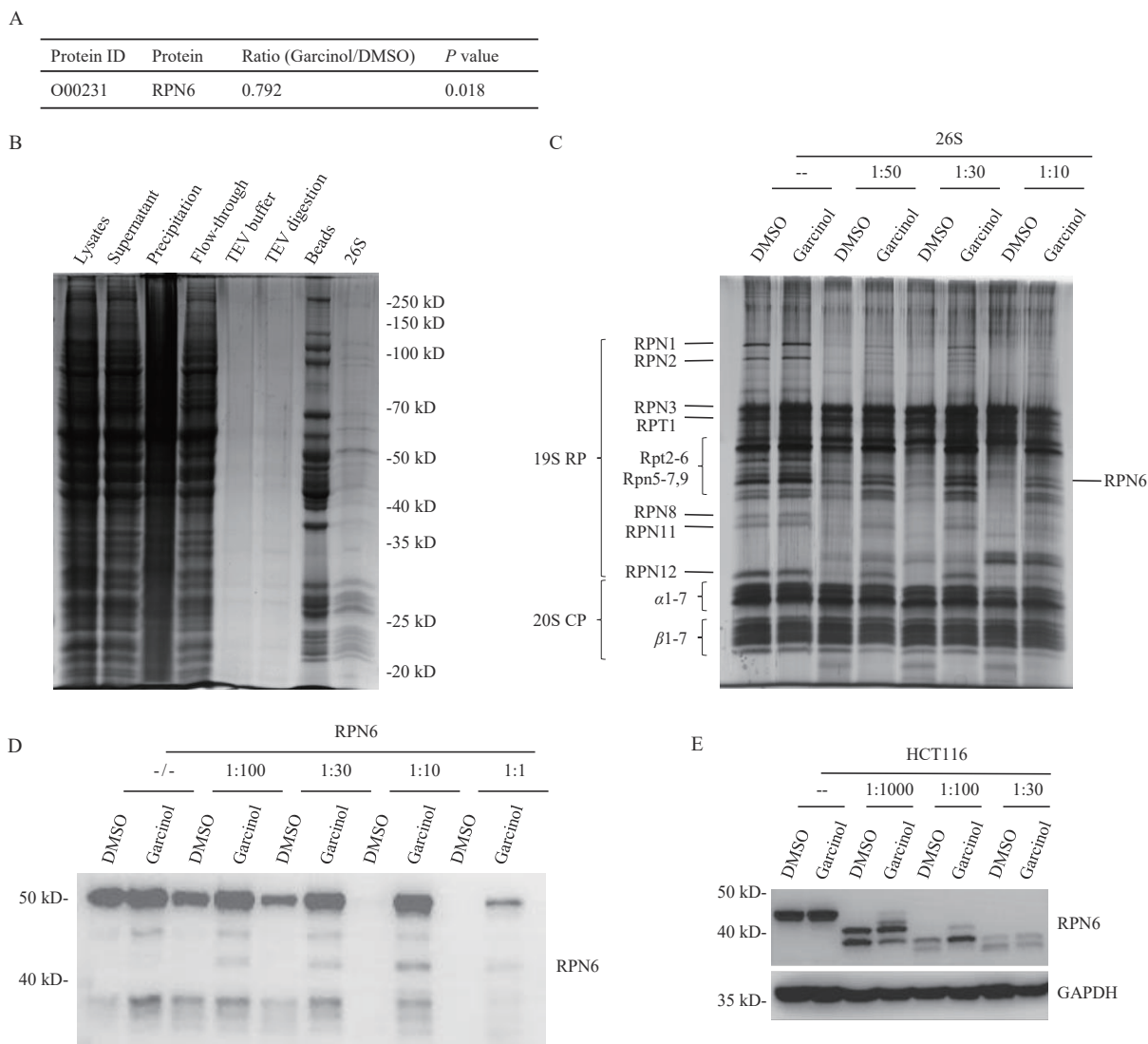
能够显著下调 RPN6 的蛋白水平, 提示 RPN6 为其潜在靶点 (图 1A)。RPN6 是蛋白酶体 19S 上的一个关键亚基蛋白, 介导蛋白酶体构象变化, 促进 19S 和 20S 组装<sup>[3,23]</sup>, 对于蛋白酶体行使功能进而维持细胞稳态具有至关重要的作用。

本研究通过生物素亲和层析方法纯化得到 26S 蛋白酶体 (图 1B), 进而将山竹醇与 26S 蛋白酶体进行孵育, DARTS 实验结果表明山竹醇在链霉蛋白酶酶切条件下能够明显稳定 26S 各亚基蛋白 (图 1C), 表明了山竹醇作用于蛋白酶体。本研究进一步利用 RPN6 纯化蛋白, 经链霉蛋白酶酶解后考察了山竹醇的作用; 结果显示在 1:100 的酶切条件下山竹醇即能稳定 RPN6 的条带, 在 1:30 和 1:10 时该稳定作用非常显著 (图 1D)。

此外, 在 HCT116 细胞裂解液中同样观察到山竹醇能够明显改变 RPN6 对酶的耐受性 (图 1E)。由此, 本研究证实了山竹醇与 RPN6 的直接结合。

## 2 山竹醇依赖 RPN6 抑制蛋白酶体活性

本研究在 HEK293 和 MM1S 细胞系中检测山竹醇对蛋白酶体水解酶活性的作用。HEK293 是无致癌突变的人胚胎肾细胞, MM1S 是浆细胞来源的血液系统恶性多发性骨髓瘤细胞。采用蛋白酶体催化活性实验, 在 MM1S 和 HEK293 细胞中经山竹醇处理后, 提取蛋白后定量至同一浓度, 加入蛋白酶体特异性荧光底物 Suc-LLVY-AMC, 于酶标仪连续读取荧光值 1 h。结果显示, 山竹醇在 HEK293、MM1S 细胞系中对蛋白酶体水解酶活性均具有抑制作用 (图 2A)。给药 2.5 和



**Figure 1** Garcinol binds with RPN6 on the proteasome. A: TMT-labeled mass spectrometry profiling identifies RPN6 as a direct binding protein of garcinol; B: Coomassie brilliant blue staining to detect residual samples at each step of purification process. Analysis with 10% SDS-PAGE gels; C: Drug affinity responsive target stability (DARTS) to examine the binding of garcinol ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) to RPN6 in purified 26S. Silver stain to detect; D: DARTS to examine the binding of garcinol ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) to RPN6 in purified RPN6; E: DARTS to examine the binding of garcinol ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) to RPN6 in HCT116 cell lysate

5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,山竹醇对于HEK293并无明显酶活抑制作用,给药10和20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能观察到对 $\beta 5$ 的水解酶活性抑制(图2A)。值得注意的是,在MM1S细胞系中,2.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 药物处理就能观测到蛋白酶体水解酶活性抑制作用,20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能抑制蛋白水解酶活性超过50%(图2A)。

由于山竹醇与RPN6直接结合,因此,本研究进一步探究RPN6是否为山竹醇发挥蛋白酶体抑制作用的功能靶标。在HEK293细胞中,通过转染特异性siRNA敲低RPN6,药物处理后测定蛋白酶体水解酶活性,结果显示敲低RPN6显著缓解了山竹醇引起的水解酶活性抑制作用(图2B),表明山竹醇抑制蛋白酶体依赖于RPN6,RPN6是山竹醇不可或缺的功能靶点。

### 3 山竹醇诱导RPN6寡聚而形成颗粒并引起泛素蛋白积累

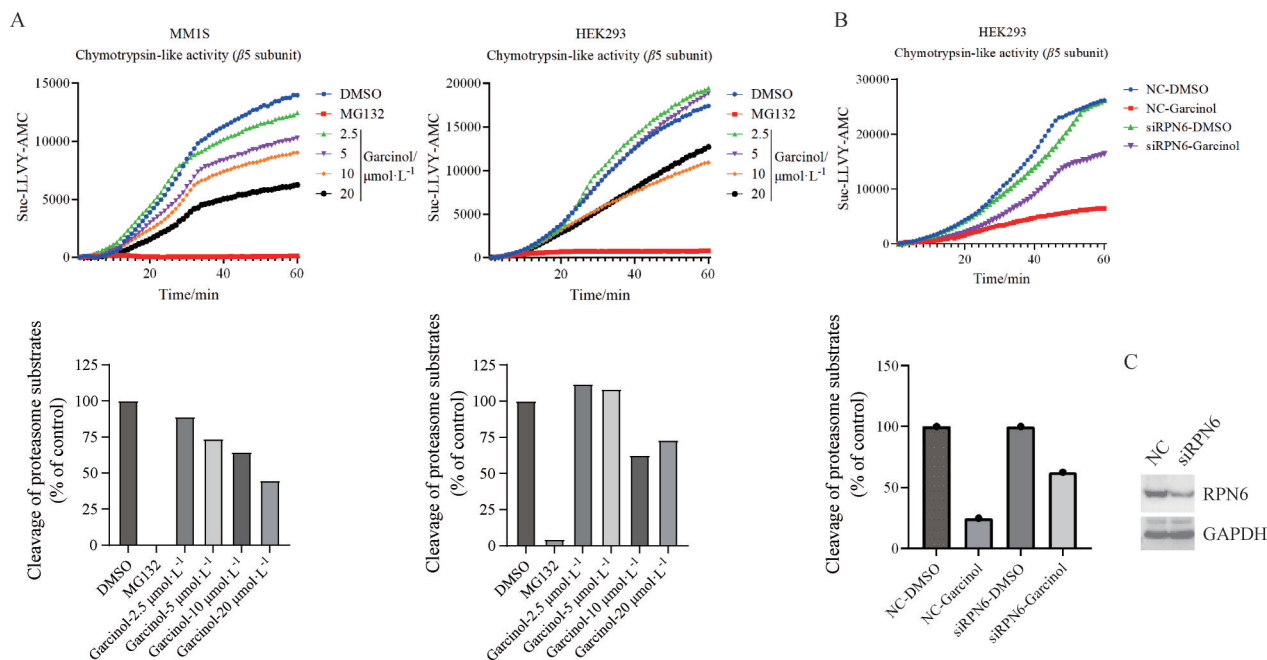
已经证实RPN6为山竹醇的功能靶标,本研究进一步探究山竹醇对RPN6的调控机制。运用免疫荧光实验观测山竹醇对RPN6的影响,发现药物处理12 h后RPN6的荧光强度增强,并在核内形成点状颗粒(图3A),24 h颗粒直径变大(图3A),亮度增强。又通过PLA实验测定山竹醇对RPN6蛋白自身寡聚的作用。PLA技术使用了一对DNA邻位探针,当蛋白质间存在相互作用时,由于其邻近效应而产生点状信号<sup>[31]</sup>,该技

术可以用于观测单一蛋白的自身寡聚<sup>[32]</sup>。结果显示,与空白组的微弱信号相比,山竹醇处理12 h使RPN6产生大量PLA信号(图3B),表明山竹醇诱导RPN6形成自身寡聚。

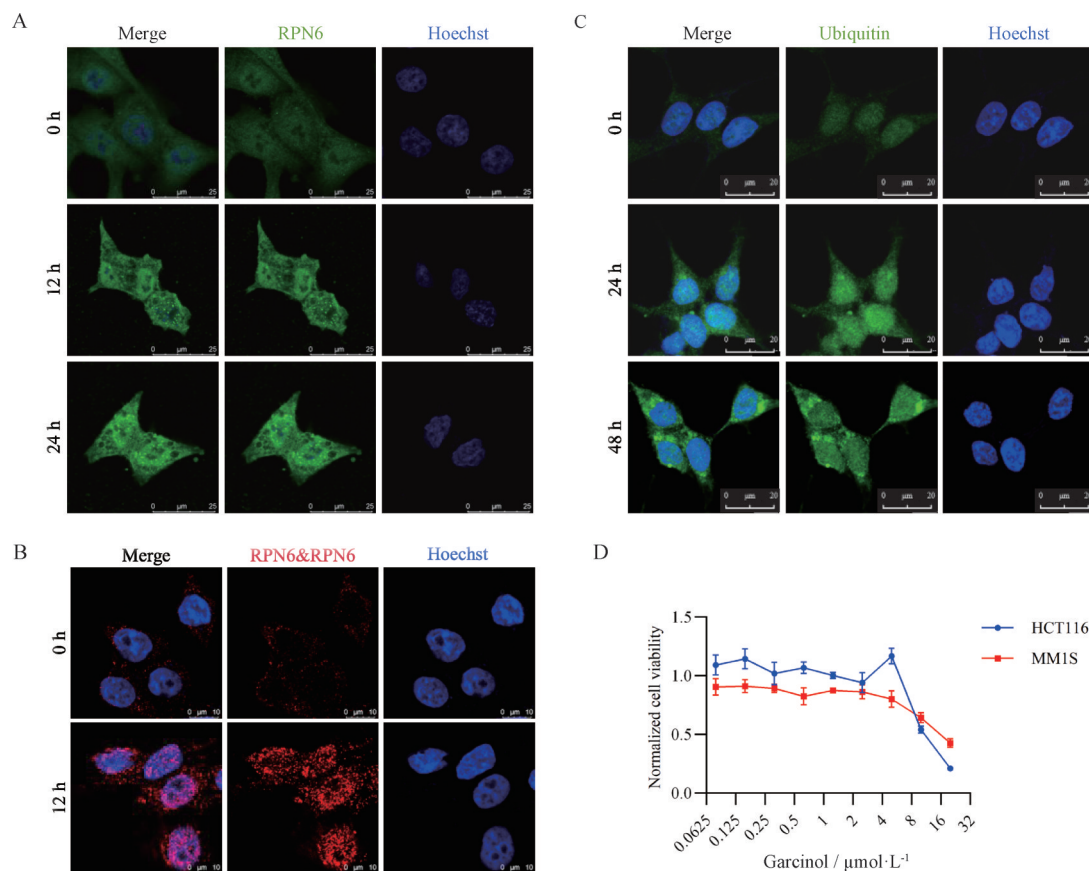
同时,运用免疫荧光实验观测山竹醇对泛素蛋白的改变,在HEK293细胞中经10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 药物处理,在24和48 h分别观测泛素蛋白在细胞内的变化,发现药物处理24 h能够引起泛素蛋白的积累,并在胞质内形成聚集,48 h该聚集作用显著增强(图3C)。

### 4 山竹醇促进肿瘤细胞凋亡并抑制肿瘤类器官生长

本研究运用CCK-8实验测定山竹醇对肿瘤细胞增殖的影响,结果显示山竹醇在HCT116和MM1S细胞中2.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 即有肿瘤细胞抑制作用,在10和20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制效果明显增强(图3D),表明山竹醇对肿瘤细胞增殖的抑制作用。由此,进一步运用流式实验检测山竹醇引起的细胞凋亡。分别在MM1S、HCT116和HEK293细胞中给药10和20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,用Annexin V-FITC凋亡试剂盒在流式细胞仪上检测了山竹醇引起的细胞凋亡,蛋白酶体抑制剂MG132作为阳性对照<sup>[33,34]</sup>。实验结果表明,山竹醇引起MM1S细胞凋亡与药物浓度梯度成正比,且10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时就具有显著作用(图4A)。在HCT116细胞中,细胞凋亡同样与药物浓度梯度成正比,20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 药物处理引起超



**Figure 2** Garcinol inhibits hydrolase activity of the proteasome, and this inhibition is dependent on RPN6. A: Proteasomal catalytic activity assay with MM1S and HEK293 cells treated for 16 h with garcinol and MG132, or vehicle control. Chymotrypsin-like activities was analyzed with Suc-LLVY-AMC. Quantitative analysis of statistical charts; B: Proteasomal catalytic activity assay with HEK293 cells transfected with siRNA to knockdown RPN6 and treated with garcinol and vehicle control for 16 h. Chymotrypsin-like activities was analyzed using Suc-LLVY-AMC. Quantitative analysis of statistical charts; C: Western blot analysis to detect the knockdown efficiency of RPN6



**Figure 3** Garcinol effects on RPN6, ubiquitin and tumor growth. A: Immunofluorescence staining to observe RPN6 with garcinol ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and vehicle control treated for 12 and 24 h in HCT116 cells. Scale bar: 25  $\mu\text{m}$ ; B: Proximity ligation assay to survey RPN6 oligomerization with garcinol ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and vehicle control treated for 12 h in HEK293. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ ; C: Immunofluorescence staining to observe ubiquitin with garcinol ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and vehicle control treated for 24 and 48 h in HEK293 cells. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ ; D: CCK-8 assay to determine the effect of garcinol (72 h) on tumor cell proliferation

过 95% 细胞凋亡 (图 4A)。而在 HEK293 细胞系,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  药物处理几乎不引起细胞凋亡,  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时引起轻微凋亡作用 (图 4A)。与正常细胞 HEK293 相比较, 结肠癌细胞系 HCT116 和多发性骨髓瘤细胞系 MM1S 细胞对山竹醇引起的细胞凋亡呈现出高敏感性, 提示了山竹醇对肿瘤细胞的选择性, 以及肿瘤细胞对山竹醇的高敏感性。

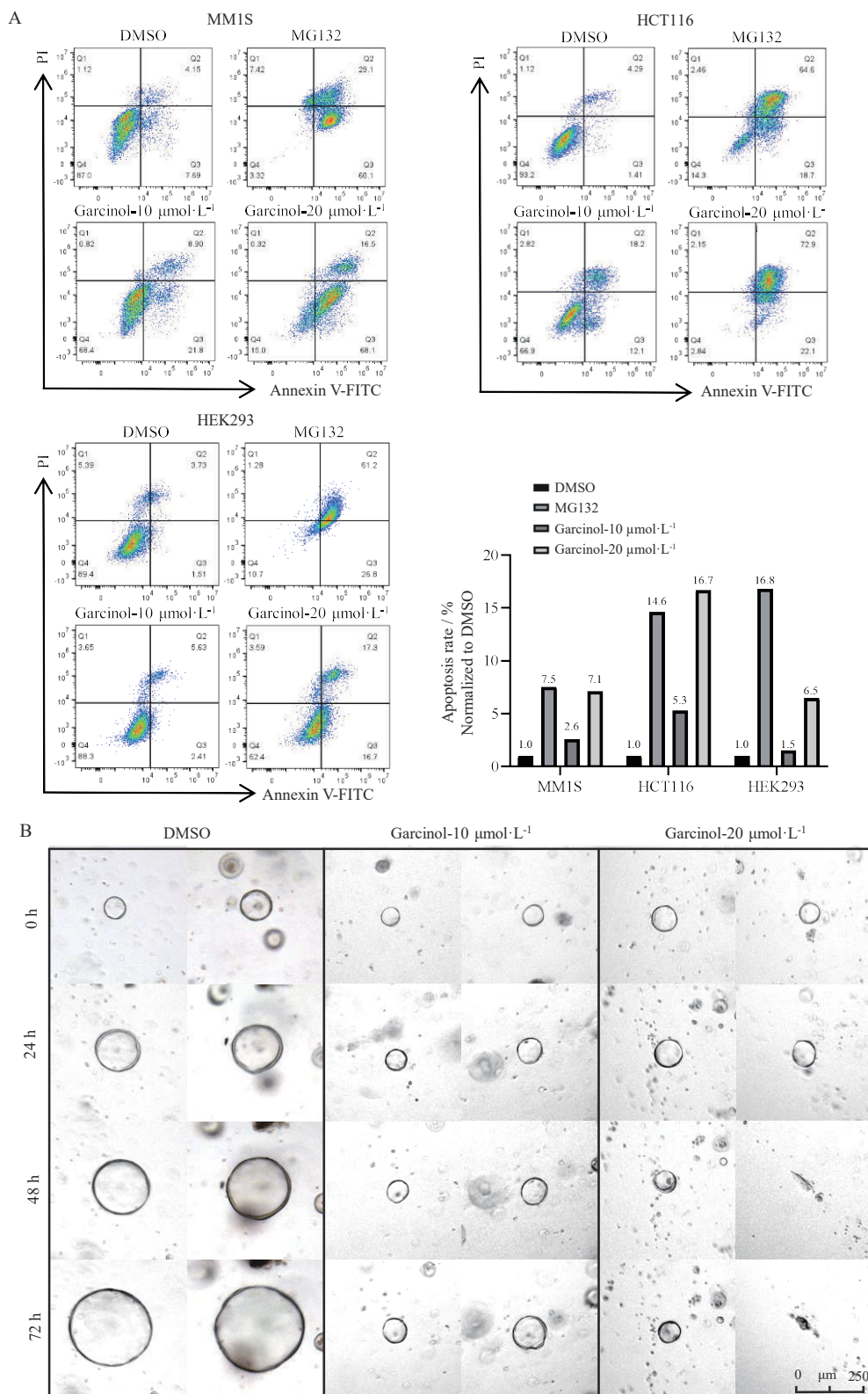
类器官 (organoid) 是来源于干细胞或器官祖细胞的三维细胞聚集体, 可分化和自组织形成具有人体相应器官的部分特定功能和结构<sup>[35]</sup>, 其具有近生理性, 可模拟器官发育和形成, 并在体外长期扩增中具有基因组稳定性, 是研究和治疗癌症的优越体外模型<sup>[36,37]</sup>。因此, 本研究进一步构建了 APC 杂合突变小鼠小肠腺瘤 (Apc<sup>min/+</sup>) 类器官模型, 结果发现, 溶剂对照组中的类器官能够随时间快速生长 (图 4B), 而山竹醇给药后, 类器官生长非常缓慢。 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  药物处理时抑制作用更为显著, 48 及 72 h 观察到类器官几乎不生长, 且山竹醇能够引起部分类器官死亡 (图 4B)。以上

结果表明, 山竹醇在低浓度时就具有良好的抗肿瘤活性。

## 讨论

山竹醇是藤黄中提取的具有聚酮和异戊烯基特殊结构的天然产物, 其生物学活性和肿瘤药理作用被广泛报道<sup>[18,19]</sup>, 在肿瘤治疗中具有重要的应用前景, 但其分子靶标和抗肿瘤作用机制还需进一步研究。本研究通过 DARTS-MS 实验发现山竹醇的潜在作用靶标为蛋白酶体 19S 上的 RPN6。

RPN6 是蛋白酶体 19S 上一个关键的蛋白, 能够调节蛋白酶体的组装及其活性<sup>[3,25]</sup>, 对于蛋白酶体行使功能进而维持细胞稳态有着至关重要的作用。并被认为调节肿瘤代谢相关途径<sup>[38,39]</sup>, 参与肿瘤的发展, 但其作用机制尚未明确, 且目前尚无靶向 RPN6 的生物活性分子。本研究经 DARTS, 在纯化的蛋白酶体、纯化的 RPN6 以及细胞裂解液中, 证实了山竹醇的靶标蛋白是 RPN6。



**Figure 4** Anti-tumor effects of garcinol. A: Flow cytometry analysis of cell apoptosis after the treatment with garcinol 48 h in MM1S, HCT116 and HEK293. Column graphs quantified the apoptosis rate; B: *Apc<sup>min/+</sup>* organoid models to observe the effects of garcinol on tumor growth with same single organoid for three consecutive days

在蛋白酶体催化活性实验中发现, 山竹醇对 MM1S 和 HEK293 均有水解酶活性抑制作用, 是一种

新型蛋白酶体抑制剂。蛋白酶体抑制剂是多发性骨髓瘤治疗中有效的药物之一, 因多发性骨髓瘤细胞具有

遗传不稳定和快速增殖的特点,其更依赖于蛋白酶体,以去除错误折叠或损伤的蛋白质,由此多发性骨髓瘤对于蛋白酶体抑制剂高度敏感<sup>[11,40]</sup>。因而相较于正常组织细胞中的蛋白酶体,山竹醇对MM1S的酶活抑制作用更强。敲低RPN6大部分阻断了山竹醇引起的酶活性抑制作用,表明RPN6是山竹醇抑制蛋白酶体的功能靶点。通过免疫荧光实验观测山竹醇对RPN6的改变,发现山竹醇引起RPN6在核内形成点状明亮颗粒,并随时间增加增强。以及通过PLA观测到山竹醇诱导RPN6的寡聚,推测山竹醇诱导RPN6寡聚后形成颗粒,使蛋白酶体功能失衡,水解酶活性降低。进一步利用免疫荧光实验观测到山竹醇引起泛素蛋白在胞质积累并形成聚集物。

研究通过FITC-PI染色-流式细胞术探究了山竹醇引起的细胞凋亡作用在肿瘤细胞MM1S和HCT116中尤为显著,与CCK8实验中山竹醇抑制肿瘤细胞增殖作用一致。肿瘤细胞因其抵抗细胞死亡、无限增殖等特点<sup>[41]</sup>,其体内蛋白酶体含量更多,功能更强大,因而对蛋白酶体抑制剂也更加敏感,对于山竹醇引起的细胞凋亡响应更积极。本研究在Apc<sup>min/+</sup>小鼠小肠类器官中发现,山竹醇在10 μmol·L<sup>-1</sup>时就能显著抑制腺瘤类器官的生长,证实了山竹醇的抗肿瘤活性。

综上所述,研究结果表明山竹醇通过靶向19S上的RPN6亚基蛋白,诱导RPN6寡聚并形成颗粒,致使蛋白酶体功能紊乱而抑制其水解酶活性,导致泛素蛋白的大量积累,进而引起肿瘤细胞的凋亡,从而发挥良好的抗肿瘤作用。本研究发现了具有高效蛋白酶体抑制活性及良好抗肿瘤作用的中药活性小分子山竹醇,阐明了分子作用机制,并提示其靶点RPN6有望成为一个新的肿瘤治疗靶标。

**作者贡献:** 柯细松和喻颖负责课题总体设计;喻颖负责完成实验的具体实施;张雪和喻颖负责实验数据分析、文章撰写;柯细松和张雪对课题进行及论文撰写进行指导。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Pohl C, Dikic I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy [J]. *Science*, 2019, 366: 818-822.
- [2] Han D, Wang L, Jiang S, et al. The ubiquitin-proteasome system in breast cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2023, 29: 599-621.
- [3] Pathare GR, Nagy I, Bohn S, et al. The proteasomal subunit RPN6 is a molecular clamp holding the core and regulatory subcomplexes together [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 149-154.
- [4] Rousseau A, Bertolotti A. Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 697-712.
- [5] Bard JAM, Goodall EA, Green ER, et al. Structure and function of the 26S proteasome [J]. *Annu Rev Biochem*, 2018, 87: 697-724.
- [6] Collin GA, Goldber AL. The logic of the 26S proteasome [J]. *Cell*, 2017, 169: 792-806.
- [7] Manasanch EE, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors in cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14: 417-433.
- [8] Fricker LD. Proteasome inhibitor drugs [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2020, 60: 457-476.
- [9] Cheah CY, Seymour JF, Wang ML. Mantle cell lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34: 1256-1269.
- [10] Thibaudeau TA, Smith DM. A practical review of proteasome pharmacology [J]. *Pharmacol Rev*, 2019, 71: 170-197.
- [11] Kubick T, Bednare K, Kostrzewska-Poczeka M, et al. Bortezomib- and carfilzomib-resistant myeloma cells show increased activity of all three arms of the unfolded protein response [J]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12: 3280-3293.
- [12] He L, Yu C, Qin S, et al. The proteasome component PSMD14 drives myelomagenesis through a histone deubiquitinase activity [J]. *Mol Cell*, 2023, 83: 4000-4016.e6.
- [13] Bashore C, Prakas S, Johnson MC, et al. Targeted degradation via direct 26S proteasome recruitment [J]. *Nat Chem Biol*, 2023, 19: 55-63.
- [14] Wang X, Meu T, Meiner S. Exploring the proteasome system: a novel concept of proteasome inhibition and regulation [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 211: 107526.
- [15] Brat C, Huynh Phuoc HP, Awad O, et al. Endogenous anti-tumorigenic nitro-fatty acids inhibit the ubiquitin-proteasome system by directly targeting the 26S proteasome [J]. *Cell Chem Biol*, 2023, 30: 1277-1294.e12.
- [16] Li F, Shanmuga MK, Chen L, et al. Garcinol, a polyisoprenylated benzophenone modulates multiple proinflammatory signaling cascades leading to the suppression of growth and survival of head and neck carcinoma [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2013, 6: 843-854.
- [17] Ciocchin R, Grossna RB. Polycyclic polyisoprenylated acylphloroglucinols [J]. *Chem Rev*, 2006, 106: 3963-3986.
- [18] Kopytko P, Piotrowska K, Janisiak J, et al. Garcinol-a natural histone acetyltransferase inhibitor and new anti-cancer epigenetic drug [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 2828.
- [19] Deb S, Phukan BC, Mazumder MK, et al. Garcinol, a multifaceted sword for the treatment of Parkinson's disease [J]. *Neurochem Int*, 2019, 128: 50-57.
- [20] Patw N, Chauha R, Chauhan A, et al. Garcinol in gastrointestinal cancer prevention: recent advances and future prospects [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2024, 150: 370.
- [21] Aggarwal V, Tuli HS, Kaur J, et al. Garcinol exhibits anti-neoplastic effects by targeting diverse oncogenic factors in tumor

- cells [J]. *Biomedicines*, 2020, 8: 103.
- [22] Cresti JR, Manfredonia AJ, Braganca CE, et al. Proteasomal conformation controls unfolding ability [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2101004118.
- [23] Yang L, Parajuli N, Wu P, et al. S14-phosphorylated RPN6 mediates proteasome activation by PKA and alleviates proteinopathy [J]. *Circ Res*, 2023, 133: 572-587.
- [24] Vilche D, Boyer L, Morant I, et al. Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11 [J]. *Nature*, 2012, 489: 304-308.
- [25] Ahamme MS, Wang X. Promoting proteostasis by cAMP/PKA and cGMP/PKG [J]. *Trends Mol Med*, 2024. DOI: 10.1016/j.molmed.2024.10.006.
- [26] Dai Z, An Y, Chen Y, et al. Target fishing reveals a novel mechanism of 1,2,4-oxadiazole derivatives targeting RPN6, a subunit of 26S proteasome [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 5029-5043.
- [27] Deb W, Rosenfelt C, Vignard V, et al. PSMD11 loss-of-function variants correlate with a neurobehavioral phenotype, obesity, and increased interferon response [J]. *Am J Hum Genet*, 2024, 111: 1352-1369.
- [28] Huang X, Luan B, Wu J, et al. An atomic structure of the human 26S proteasome [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23: 778-785.
- [29] Schauer NJ, Maagin RS, Liu X, et al. Advances in discovering deubiquitinating enzyme (DUB) inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 2731-2750.
- [30] Lomenick B, Hao R, Jonai N, et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 21984-21989.
- [31] Alam MS. Proximity ligation assay (PLA) [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2018, 123: e58.
- [32] Wu YH, Lai MZ. Measuring NLR oligomerization V: *in situ* proximity ligation assay [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1417: 185-195.
- [33] Guo N, Peng Z. MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2013, 9: 6-11.
- [34] Uhl E, Wolff F, Manga S, et al. Light-controlled cell-cycle arrest and apoptosis [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60: 1187-1196.
- [35] Yu D, Cao H, Wang X. Advances and applications of organoids: a review [J]. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)*, 2021, 37: 3961-3974.
- [36] Yuan J, Li X, Yu S. Cancer organoid co-culture model system: novel approach to guide precision medicine [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1061388.
- [37] Lee SH, Hu W, Matulay JT, et al. Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer [J]. *Cell*, 2018, 173: 515-528.e17.
- [38] Zhang C, Xu T, Ji K, et al. An integrative analysis reveals the prognostic value and potential functions of PSMD11 in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Carcinog*, 2023, 62: 1355-1368.
- [39] Wang L, Zhao L, Wei G, et al. Homoharringtonine could induce quick protein synthesis of PSMD11 through activating MEK1/ERK1/2 signaling pathway in pancreatic cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119: 6644-6656.
- [40] Haertle L, Barrio S, Munawar U, et al. Single-nucleotide variants and epimutations induce proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma [J]. *Clin Cancer Res*, 2023, 2: 279-288.
- [41] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 14: 646-674.