

BIOLOGICKÉ ÚČINKY TRITERPENOIDŮ: PROTINÁDOROVÁ AKTIVITA

Marián Hajdúch^{1,3}, Petr Džubák¹, Jan Šarek²

¹Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN, Olomouc

²Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze

³Onkologická klinika LF UP a FN v Olomouci

Článek přehledným způsobem uvádí triterpenoidy s popsáním cytotoxickým účinkem, včetně výčtu toho, co bylo zjištěno o mechanismu jejich působení. Jedním z prvních triterpenoidů s popsány protinádorovými účinky byla kyselina betulinová. Nejprve byla zkoumaná ve směsných extraktech z rostlin, později jako purifikovaná sloučenina. Od základního konstatování cytotoxického účinku se v současnosti řeší její mechanismus působení na molekulární úrovni. Také řada dalších sloučenin je extrémně cytotoxická IC₅₀ < 0,03 μM. Nacházíme zde látky měnící expresi proteinů buněčného cyklu (p21, p53), inhibitory topoizomerázy I a II a induktory apoptózy s přímým působením na mitochondrie a s následnou aktivací kaspáz. Některé sloučeniny ovlivňují i aktivitu transkripčních faktorů NF-κB a PPARγ. Kromě těchto toxických účinků mluvíme v souvislosti s triterpenoidy i o účincích chemoprotektivních, antioxidantních, radioprotektivních a protizánětlivých. Popisujeme pokrok v analýze těchto látek, jdoucí ruku v ruce s vývojem nových sloučenin.

Klíčová slova: triterpenoidy, betulinová kyselina (BetA), cytotoxicita, protinádorová aktivita, mitochondrie, buněčný cyklus.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF TRITERPENOIDS: ANTICANCER ACTIVITY

This review article deals with triterpenoids with a recognised cytotoxic activity, and summarizes the knowledge of their mechanisms of action. One of the first such studied triterpenoid is betulinic acid, which was discovered as the active compound in the herb extracts and later as a purified compound. In comparison to the initial property of cytotoxicity, we are now solving the mechanism of action of this compound at a molecular level. Many of the derived triterpenoids are extremely cytotoxic at IC₅₀ < 0,03 μM. Several described triterpenoids change expression of cell cycle proteins (p21, p53), others are changing activity of topoisomerases I and II, and are inducers of apoptosis with a direct effect on the mitochondria with activation of the caspase cascade and there are the compounds modulating the activity of transcription factors NF-κB, PPARγ. Instead of the toxic effects we can now, consequently, speak about the chemoprotective, antioxidative, radioprotective and antiinflammatory effects. We describe the development of the analysis of these compounds plus the development of new drugs.

Key words: triterpenoids, betulinic acid (BetA), cytotoxicity, anti-cancer activity, mitochondria, cell cycle.

Úvod

Terpeny se vyskytují jako běžné látky obsažené v rostlinách, houbách, vzácně jsou akumulovány a metabolizovány bakteriemi a také syntetizovány některými zvířaty. V současnosti je tato skupina zastoupena přibližně 25 000 identifikovanými sloučeninami. Terpeny lze rozdělit dle počtu stavebních molekul izoprenu na monoterpeny, seskvi-, di-, sester-, tri-, tetra-, polyterpeny a spolu se steroly tvoří rozsáhlou skupinu isoprenoidů. V posledním desetiletí se dostala pro své různorodé biologické účinky do popředí zájmu početná skupina cyklických triterpenoidních sloučenin. V současnosti se do ní řadí více než 4 000 různých látek, volných triterpenoidů, triterpenických glykosidů (saponinů), fytosterolů, či jejich prekurzorů. Kromě již zmíněných je zde ještě skupina rostlinných steroidních saponinů strukturně blízká cholesterolu a steroidním hormonům, ačkoliv jejich účinek (per os) není hormonální. Triterpenoidy mají řadu jedinečných a potenciálně využitelných biologických účinků. Zmínky o používání rostlin s vysokým obsahem saponinů, či triterpenoidů můžeme najít již v prvních psaných herbářích. Zde zmiňované rostliny (všehož lé-

kařský – Panax ginseng, ling-zhi – Ganoderma lucidum, jie-geng – Platycodon grandiflorum, indické kadidlo – pryskyřice ze stromu Boswellia serrata), byly vysoce ceněny a řazeny pro své široké spektrum účinků jako panacea na jejich přední místa. Triterpenoidy nacházíme i v řadě běžně se vyskytujících rostlin nebo v ovoci. Jako příklad může sloužit smetánka lékařská (1), jablko, hruška nebo brusinka (2, 3, 4). Řada biologických účinků triterpenoidů byla odvozena z lidové fytotherapeutické praxe a ze zkušeností získaných používáním léčivých rostlin.

Z biologického pohledu jsou nejvýznamnějšími triterpenoidními strukturami oleananové (oleanolová kyselina, boswellolová kyselina), ursanové (ursolová kyselina, α-, β-amyrin), lupanové (lupeol, betulin, betulinová kyselina) a dammaran-eufanové triterpenoidy. Za zmínku stojí i další skeletální typy: skvalenový, fusidan-lanostanový, tetranortriterpenoidy, quassinoidy, hopanový a další. Dokladem intenzivního zájmu o tyto sloučeniny je počet citací v databázi Pubmed, který přesahuje 6 000. Triterpenoidy jsou studovány v souvislosti s účinky protizánětlivými, hepatoprotektivními, analgetickými, hypoglykemickými, hypolipidemickými, anti-

mikrobiálními, antimykotickými, virostatickými, imunomodulačními a tonizujícími. Používají se k léčbě a prevenci hepatitidy, parazitárních a protozoálních infekcí a v centru zájmu jsou i jejich cytostatické účinky. Nevýhodou používání triterpenoidů je jejich toxicita vyplývající z hemolytického, případně cytostatického efektu. Ruku v ruce s pokračující extrakcí a izolací přírodního materiálu probíhá vývoj synteticky modifikovaných derivátů, a to s cílem snížit toxicitu a zvýšit terapeutické možnosti těchto sloučenin. První část článku o triterpenoidech je zaměřena na protinádorové účinky. Druhá část bude pojednávat o dalších farmakologických aktivitách.

Protinádorové účinky triterpenoidů

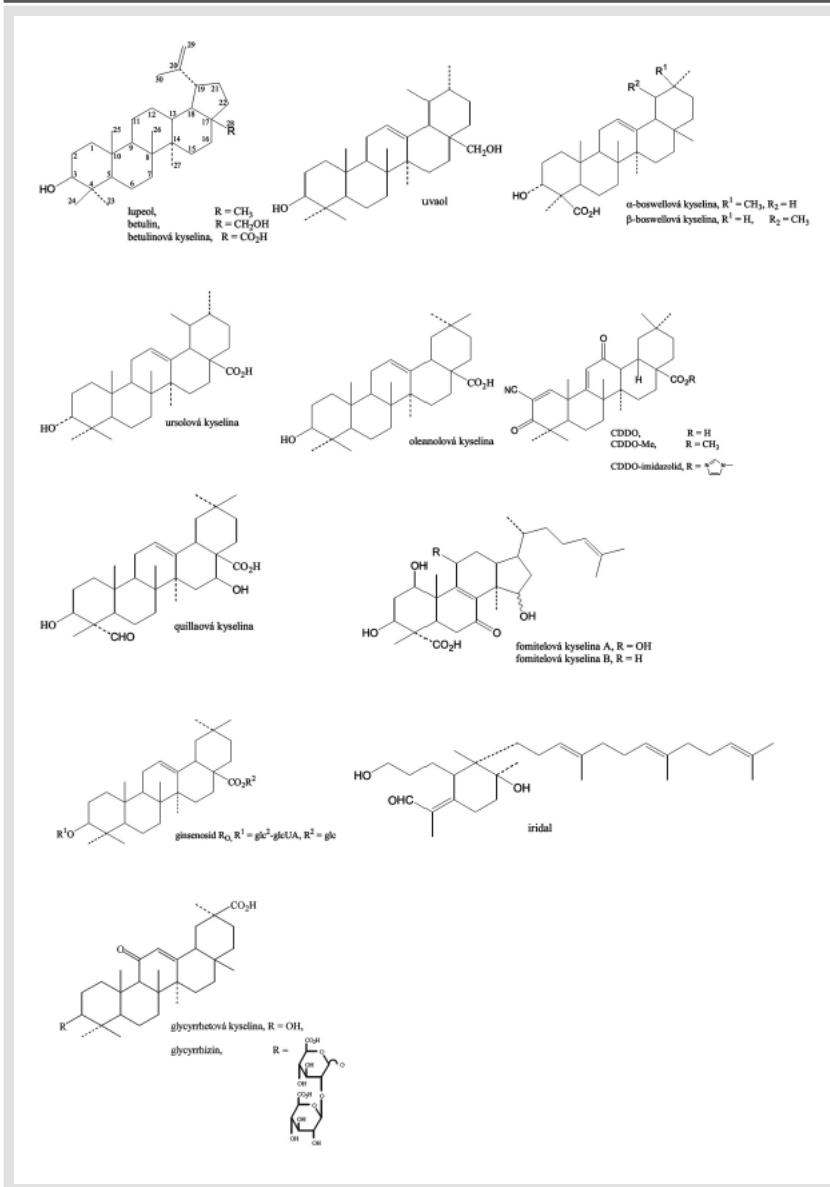
Betulinová kyselina

Již v roce 1976 byla publikována práce Trumbull a spol. (5), která popisovala cytotoxickou aktivitu extraktu z *Vauquelinia corymbosa* vůči lymfocytární leukemické linii P-388. Přitom jako účinné látky byly uvedeny ursolová kyselina a derivát lupanu – betulinová kyselina

(3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-ová kyselina; dále jen BetA) (obrázek 1). Následovala řada dalších prací popisující účinky podobných extrahovaných směsí, které zahrnovaly betulin a BetA (6, 7). Ovšem teprve na přelomu 90. let se objevuje práce, popisující cytostatický účinek BetA jako takové (8). V roce 1995 byla publikovaná stěžejní práce Pisha a spol. (9), kde byl popsán cytotoxický účinek BetA na buněčné linii lidského melanomu. Tato práce vzbudila vlnu zájmu o BetA a její deriváty. Dle této práce se IC₅₀ pro BetA verus linie lidského melanomu MEL-1, 2 a 4 pohybuje v rozmezí 0,5–1,6 μ g/ml. Zároveň byla pozorována dávkově závislá fragmentace DNA s indukcí apoptózy do 24 hodin po podání. Posléze byl prokázán efekt i na linii neuroblastomu s IC₅₀ = 14–17 μ g/ml (10) a dle nejnovější práce (11) se spektrum citlivých linií rozšiřuje i mimo linie neuroektodermálního původu na linie ovariálního karcinomu A2780, OVCAR-5, GROV-1, nemalobuněčného plicního karcinomu H460, karcinomu děložního krčku A431, melanomu Me665/2/21, Me665/2/60, linie malobuněčného plicního karcinomu POGB, POGB/DX (doxorubicin rezistentní), přičemž IC₅₀ se pohybuje v rozmezí 1,5–4,5 μ g/ml, a to jak u linií s mutovaným genem p53, tak i s nemutovanou formou. Ve stejné studii prováděná kontrola na nenádorových lidských buněčných liniích prokazovala výrazně nižší toxicitu BetA vůči HDFC (normální kožní fibroblasty) IC₅₀ = 10,2 \pm 1,5 μ g/ml a PBL (lymfocyty periferní krve) IC₅₀ \geq 50 μ g/ml, ve srovnání s doxorubicinem (HDFC IC₅₀ = 0,38 μ g/ml; PBL IC₅₀ = 0,02 μ g/ml). Na našem pracovišti jsou testovány deriváty BetA, které jsou syntetizovány na Katedře organické a jaderné chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Nejúčinnější z těchto sloučenin mají hodnoty IC₅₀ = 0,2 μ M. Zajímavé je, že tyto sloučeniny jsou účinné pro většinu testovaných nádorových linií, a to i na buňkách p53 negativních, pRb negativních, bez ohledu na jejich histogenetický původ, přičemž vykazují výrazně nižší toxicitu vůči nenádorovým buňkám (12).

Deriváty pro další screening mohou být připravovány nejen chemickou syntézou, ale také biotransformací za pomoci bakterií (*B. megaterium*, ATCC13368) (13). Některé z takto získaných derivátů (3-oxolup-20(29)-en-28-ová kyselina, 11 α -hydroxy-3-oxolup-20(29)-en-28-ová kyselina, 1 β -hydroxy-3-oxolup-20(29)-en-28-ová kyselina) vykazovaly ED₅₀ vůči linii MEL-2 v nižších koncentracích než je ED₅₀ pro BetA a to až 0,1 μ g/ml. Kromě toho, bakteriální model transformace BetA, založený na transformaci pomocí cytochromu P450, pomáhá porozumět metabolizaci těchto látek i v savčím organismu. Dle současných poznatků je mechanismus aktivace apoptózy BetA a jejich derivátů zprostředkovan uvolně-

Obrázek 1. Strukturální vzorce biologicky aktivních triterpenoidů



ním permeability mitochondriální membrány, narušením transmembránového potenciálu, uvolněním cytochromu c a AIF (apoptózu indukující faktor), s následnou aktivací kaspáz 3 a 8, štěpením substrátů a nukleární fragmentací. Inhibice propustnosti mitochondriální membrány zvýšenou expresí proteinů Bcl-2 nebo Bcl-XI, inhibuje aktivaci kaspáz a další projevy apoptózy po působení BetA na buněčné linii neuroektodermálních tumorů (14).

Po působení BetA (24 hodin) vůči liniím lidského gliomu byly stanoveny hodnoty IC₅₀ = 20 μ M pro LN-229, 25 μ M pro U87, MG a T98G, 70 μ M pro LN-18, a 100 μ M pro LN-308. Zároveň byla pozorována zvyšující se hladina proapoptického proteinu Bax u gliomových linií LN-18 a LN-229, včetně indukce tvorby kyslíkových radikálů, která je v tomto případě nezbytná pro aktivaci kaspázy 3 (17). Na druhou stranu, klony těchto buněčných linií exprimující vysoké hladiny Bcl-2, vykazovaly inhibici tvorby kyslíkových radikálů po přidání BetA, a to bez aktivace apop-

tózy. Tento náleží je v souladu se skutečností, že některé antiapoptotické schopnosti Bcl-2 souvisí s jeho antioxidantním mechanismem, což podtrhuje důležitost tvorby kyslíkových radikálů v indukcii apoptózy pomocí BetA. V těchto souvislostech nebyla pozorována zvýšená produkce proteinu p53, který je přímým transaktivátorem genu bax (15), ačkoliv hladina proteinu p21 (inhibitoru cyklin dependentních kináz) byla zvýšena. Nicméně Rieber 1998 (16) popisuje zvýšení poměru p53/p21 po působení BetA u buněčné linie metastazujícího (C8161) i nemetastazujícího (C8161/neo 6,3) lidského melanomu. Jejich pozorování naznačuje, že na cytotoxicitě BetA se musí podílet mechanismy ovlivňující expresi genu bax. Analýza buněčného cyklu u linií T98G a LN-229 neodhalila žádnou změnu, přes zvýšenou hladinu p21, což autoři připisují na vrub poškození kontrolního bodu Rb v důsledku homozygotní delece p16 v obou liniích (17). Další pozorování odhalila trojnásobně zvýšenou expresi antiapoptotic-

kého proteinu Mcl-1 u linií (MES20, MES21, 518A2, A375, Neo-II-tr) po podání BetA (5 µg/ml). Zároveň byl pozorován aditivní efekt záření (2Gy) a BetA (2,5 µg/ml), včetně efektu na tvorbu kolonií, a to i ve vztahu k časovému aplikaci BetA a záření (18).

BetA je zároveň inhibitor enzymu aminopeptidázy N, který se podílí na angioproliferaci a metastatické aktivitě nádoru IC₅₀=7,3 ± 1,4 µM/ml (19). Ovšem nejnovější práce studující antiangioproliferační aktivitu BetA a její vztah k inhibici aminopeptidázy N neprokazují (BetA in vivo neinhibuje aminopeptidázu N v endoteliálních ani nádorových buňkách) a antiangiogenní vliv BetA v koncentracích nižších než cytotoxických, dávají do souvislosti se změny mitochondriálního potenciálu a ovlivněním mitochondriální funkce (20).

Zajímavou a pro klinické použití perspektivní vlastností BetA je její vyšší účinnost v prostředí s nižším pH < 6,8, které je vlastní většině nádorů (21, 22). Zde BetA navozuje citlivost nádorových buněk vůči hypertermii, přičemž citlivost nenádorových buněk zůstává nezměněna (23).

Dále má BetA schopnost měnit koncentraci iontu Ca²⁺, který je také důležitým signálním faktorem a induktorem apoptózy po uvolnění z endoplazmatického retikula. Přibližně za 350 sekund se v buňkách ledvin tubulů inkubovaných s BetA (250 nM) zvýší bazální koncentrace iontu Ca²⁺ trojnásobně (24).

Zajímavou vlastností betulinu je i jeho paradoxně stimulační estrogení efekt v nízkých koncentracích – hodnocený schopností zvýšit proliferaci estrogen dependentní nádorové linie MCF-7, a to již od koncentrace 23 nM (25).

O protinádorových účincích betulinové kyseliny byla publikována řada přehledových prací (26).

Boswellová kyselina

Deriváty boswellové kyseliny (obrázek 1) – jsou triterpenoidy obsažené ve vysoké koncentraci v pryskyřici indického stromu *Boswellia serrata*, běžněji známé jako indické kadidlo. Tato pryskyřice byla již od dob Hippokrata a Dioskurida účinnou složkou ve směsích s protizánětlivým účinkem. Pro své protizánětlivé a antiartritické účinky je hojně používána v indické medicíně jako komerčně připravovaný extrakt – Salai Guggal, který v tomto případě navazuje na tradiční ajurvedickou medicínu. Deriváty

boswellové kyseliny 3α-acetoxy-α-boswellová kyselina (AαBA), 3α-acetoxy-β-boswellová kyselina (AβBA), 3α-acetoxy-11-oxo-β-boswellová kyselina (AKβBA), byly cytotoxické vůči gliomovým liniím U87 MG, U373MG (27) a leukemickým liniím HL-60, CCRF-CEM (28). V experimentu na zvířatech se prokázal zvýšený přechod buněk do apoptózy v závislosti na dávce, inhibice růstu nádoru a prodloužení přežívání po implantaci buněčné linie maligního gliomu C6 (29). Také byla popsána indukce diferenciace leukemických linií HL-60, U937 a ML-1 po působení AαBA a AβBA v koncentraci nižší než 24,2 µM. Cytotoxické hodnoty se přitom pohybovaly kolem koncentrace 38,8 µM. Je zajímavé, že deriváty boswellové kyseliny podobně jako etoposid indukují v nízkých koncentracích diferenciaci leukemických linií a ve vyšších vedou k apoptóze (30). Jejich protinádorové účinky se dávají do souvislosti se schopností inhibovat topoizomerázu I a IIα, jejichž aktivita je klíčová pro proliferaci nádorové buňky. Duální působení je staví na roveň klinicky používaným inhibitorům topoizomeráz (tabulka 1). Boswellová kyselina podobně jako BetA indukuje expresi p21, a to způsobem nezávislým na p53. Indukce p21 se ovšem pro její cytotoxický účinek nezdá rozhodující. Hladiny proteinů Bcl-2 a Bax při indukci apoptózy zůstávají nezměněny (31).

Nemalou výhodou derivátů boswellové kyseliny je i jejich lipofilita umožňující překonání hematoencefalické bariéry a možnost jejich využití pro léčbu malignit CNS. Údaje z in vitro testů naznačují, že inhibiční účinek vůči gliomovým buněčným liniím je vyšší než účinek klinicky používaného camptotecinu, či etoposidu (32, 28). Zjištěné informace vedly k zahájení prvních klinických zkoušek. Protizánětlivý účinek derivátů boswellové kyseliny z nich tvoří vhodná terapie pro paliativní terapii u progresivních nebo relabujících mozkových tumorů, mimo jiné také pro jejich popsany antiedematózní efekt (33). Nezanedbatelné bylo zlepšení subjektivního stavu a minimum nežádoucích účinků u dětských pacientů s inkurabilním tumorem mozku (34).

Lupeol

Lupeol (lup-20(29)-en-3β-ol) (obrázek 1), je sloučenina vyskytující se v řadě ovocných plodů (např. mango) (35) a léčivých rostlin (7). Lupeol vykazuje účinky chemopreventivní, potlačuje kožní toxicitu benzoylperoxidu (BPO)

přes aktivaci řady antioxidantních enzymů inhibovaných BPO, jako je kataláza, glutathionperoxidáza, glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, glutathionreduktáza a glutathion-S-transferáza. Zároveň vykazuje přímé antioxidantní působení. Na základě těchto závěrů autoři navrhuji budoucí využití lupeolu u onemocnění vyvolaných volnými radikály (36).

Další protinádorovou aktivitou lupeolu je antiangiogenní účinek, a to již od 30 µg/ml (37).

Ursolová kyselina

Ursolová kyselina (3β-hydroxyurs-12-en-28-ová kyselina; dále jen UA) (obrázek 1) je široce rozšířená zejména ve vyšších rostlinách, vykazuje inhibiční aktivitu vůči savčí DNA polymeráze α a β, lidské DNA topoizomeráze I a II (tabulka 1). UA také inhibuje bovinní DNA polymerázu α, krysí polymerázu β, slabě i rostlinnou DNA polymerázu II (β-like) a HIV reverzní transkriptázu. Zároveň snižuje transkripci COX-2, a to inhibicí signální dráhy PKC a AP-1. U řady nádorů je exprese PKC a AP-1 zvýšená a uvažuje se o ní jako o jednom z cílů protinádorové terapie (38). UA je in vitro cytotoxická vůči nádorové linii NUGC-3 LD50 = 30 µM (39), HCT-15 ED50 = 3,4 µg/ml, UIISO ED50 = 3,2 µg/ml a OVCAR-5 ED50 = 3,2 µg/ml (40), A549 ED50 = 4,2 µg/ml, SK-OV-3 ED50 = 3,6 µg/ml, SK-MEL-3 ED50 = 4,6 µg/ml, XF498 ED50 = 4,5 µg/ml, HCT15 ED50 = 4,4 µg/ml (41). Podobně jako oleanolová kyselina indukuje diferenciaci teratocarcinomové linie F9 a expresi pro diferenciaci specifických genů lamininu B1 a kolagenu IV (42). Dalším z popsaných účinků je její antiangiogenní aktivita (43). Stejně jako oleanolová kyselina inhibuje nádorový růst v myším modelu, přitom vykazuje podobné radioprotektivní účinky vůči hemato-poetické tkáni. Její vliv je silnější, pokud se jedná o preiradiační aplikaci a pravděpodobně se od oleanolové kyseliny odlišuje i mechanismem účinku (44). Také má inhibiční efekt na aktivaci EBV zprostředkovanou pomocí 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetátu (TPA) (45, 46).

Oleanolová kyselina

Oleanolová kyselina (3β-hydroxyolean-12-en-28-ová kyselina) (obrázek 1) – se vyskytuje ve vysoké koncentraci v kořenech ženšenu (47), společně s ursolovou kyselinou v *Sambucus chinensis* (48) a dále ve více než 120 rostlinných druzích (49). Podobně jako

Tabulka 1. Přehled inhibiční aktivity vybraných triterpenoidů na DNA topoizomerázy a polymerázy

IC ₅₀ [µM]	BetA	UA	FA-A	FA-B	AαBA	AβBA	AKβBA
topoizomeráza I	5	250	60	NT	10	10	30
topoizomeráza II	NT	200	25	NT	3	10	30
DNA α polymeráza	NT	38	58	27	NT	NT	NT
DNA β polymeráza	NT	42	79	53	NT	NT	NT

NT – netestováno

kyselina ursolová i kyselina oleanolová vykazují řadu protinádorových účinků, indukují diferenciaci teratokarcinomové linie F9 (42) a stejně tak i u ní jsou popsány antimutagenní vlastnosti (50) i antiangiogenní aktivita (43). Cytotoxická aktivita byla prokázána u linií A549, SK-OV-3, SK-MEL-3 a HCT15 pro ED50 v rozmezí 12,1 – 18,5 µg/ml (41). Kromě těchto účinků oleanolová kyselina stimuluje uvolnění NO a TNF- α , včetně indukce aktivity iNOS a exprese TNF- α u makrofágů. Tento efekt je zprostředkován schopností aktivovat protein/DNA vazbu vůči transkripčnímu komplexu NF- κ B a tím i jeho transaktivaci (51). Na druhou stranu, semi-syntetické deriváty kyseliny oleanolové mají na transkripční komplex NF- κ B a indukci iNOS opačný účinek (52, 53).

Deriváty kyseliny oleanolové, které jsou formálně odvozeny od 2-kyano-3,12-dioxoleana-1,9(11)-dien-28-ové kyseliny (CDDO) (obrázek 1), vykazují řadu zajímavých účinků. Tato multifunkční molekula vede k monocytární diferenciaci lidských myeloidních buněk (54), CLL B buněk (55), adipogenní diferenciaci myších fibroblastů 3T3-L1, neuronální diferenciaci krysích buněk PC12 a k inhibici proliferace řady lidských nádorových linií. Koncentrace IC50 se přitom pohybují v rozmezí 1 – 0,03 µM. CDDO blokuje de novo syntézu iNOS a COX-2, a to v koncentracích nižších než 1 µM. Současně inhibuje tvorbu produktů jmenovaných enzymů, NO a PGE2, již v koncentracích tak nízkých jako je 1 pM (57, 53). Indukce apoptózy u linií Saos-2, U2OS, U-937 a HL-60 probíhá přes kaspáza-8 dependentní štěpení proteinu Bid, s následným uvolněním cytochromu c z mitochondrií a aktivací kompletní kaskády kaspáz (58, 56). Zatím se diskutuje úloha intracelulárního Ca²⁺ ve vztahu k indukci apoptózy (59). Zajímavým vysvětlením adipogenní diferenciace 3T3-L1 fibroblastů je přímá transaktivace PPAR γ (receptor γ aktivovaný proliferátory peroxizomů) s CDDO. Ten následně vytváří heterodimery s retinoidním receptorem X (RXR) a vede k aktivaci genové transkripce. Vazebné a transaktivační studie ukazují, že CDDO je parciálním agonistou pro PPAR γ . PPAR γ je transkripčně aktivní v řadě humánních nádorových linií. Jeho transaktivaci pomocí CDDO dochází k inhibici proliferace a následně k indukci apoptózy. Poté, co byl cytotoxický účinek ověřen i v modelech mamární karcinogeneze in vivo se CDDO zařadil mezi kandidáty na léčbu karcinomu prsu (60). Metyl-ester CDDO (Met-CDDO) (obrázek 1) je naopak antagonistou PPAR γ čímž se vysvětluje jejich odlišný efekt (61). Met-CDDO vykazuje navíc silný synergismus s ATRA a RXR specifickým ligandem LG100268 v cytotoxicitě a indukci diferenciace myeloidní leukemické linie (62). Met-CDDO je účinný i vůči liniím lidského karcinomu plic v koncentracích

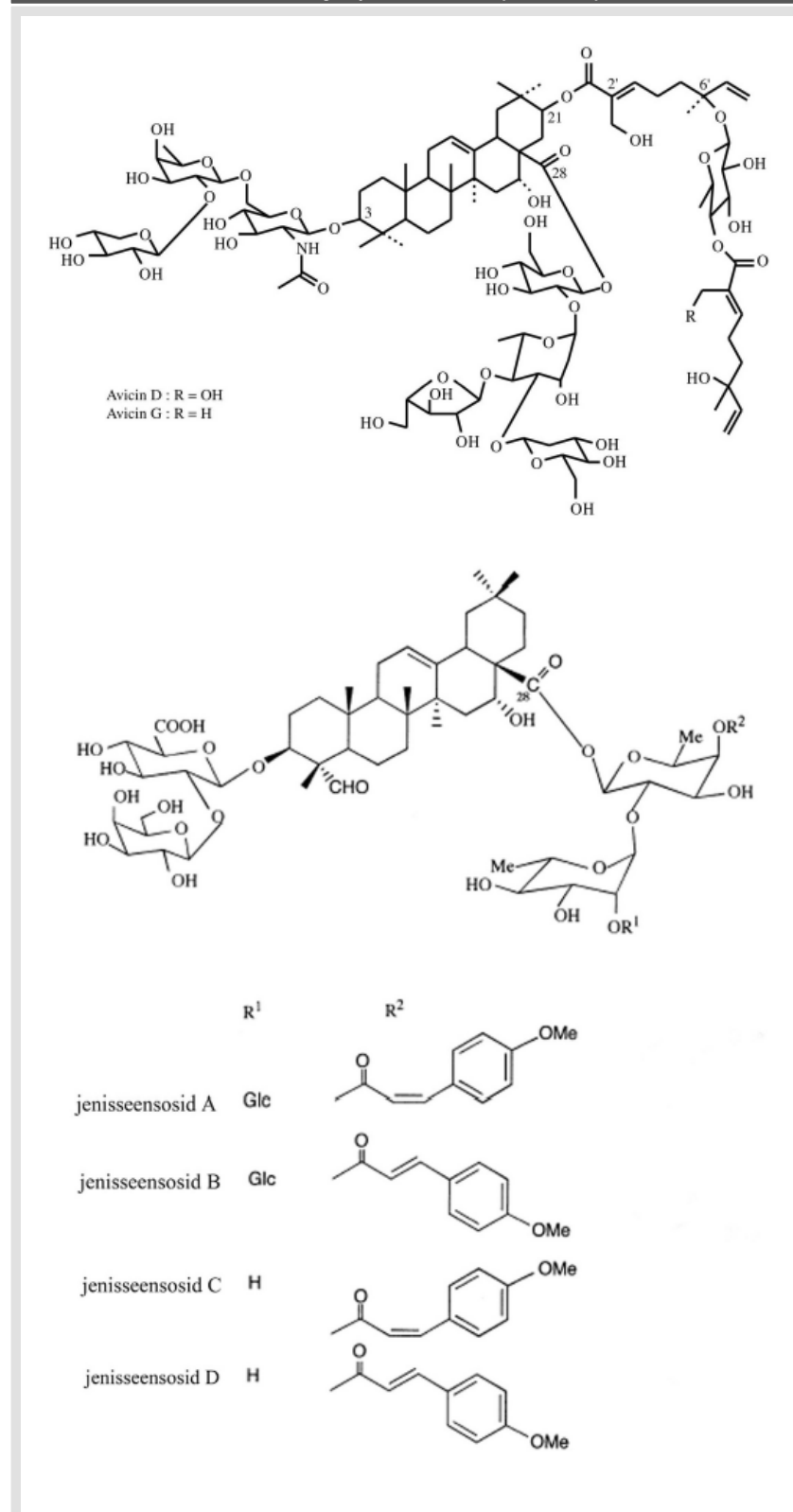
nižších než 0,5 µM. Met-CDDO podobně jako CDDO vede k uvolnění cytochromu c, aktivaci kaspáz 3, 6, 7 a následně k apoptóze nezávislé na expresi Bcl-2 (63). Další derivát CDDO, CD-DO-imidazolid (obrázek 1), indukují apoptózu u linie CLL B v koncentraci 0,5 µM (64). Také byla popsána syntéza A-sekoderivátů oleanolové a ursolové kyseliny. Některé z těchto derivátů inhibovaly růst nemaligních prostatických

buněk NRP152 IC50 = 0,3 – 3,8 µM, čímž se zařadily do skupiny potenciálně chemopreventivních látek (65).

Aviciny

Aviciny D,G (obrázek 2) – triterpenoidní saponiny získané z *Acacia victoriae* mají preventivní účinek, chrání před mutací genu H-ras a změně karyotypu v aneuploidní na

Obrázek 2. Strukturální vzorce biologicky aktivních triterpenoidů – pokračování



modelu chemicky indukované karcinogeneze u myši (66). Kromě protektivních účinků aviciny inhibují aktivaci NF- κ B v linii Jurcat. Tento transkripční faktor reguluje transkripci řady genů zahrnutých v imunitních a zánětlivých drahách, mezi jejichž produkty patří cytokiny, adhezivní molekuly a proteiny podílející se na apoptóze. K dysregulaci těchto drah dochází při různých patologických stavech, jako je septický šok, akutní zánět, virová replikace a některé malignity. Aviciny neovlivňují degradaci I κ B, která je nezbytná pro uvolnění NF- κ B z cytoplazmy, ale snižují jadernou lokalizaci jeho podjednotky 65p a inhibují vazbu NF- κ B na DNA responzivní elementy v jaderném extraktu. Aviciny dependentní inhibici je možné zvrátit pomocí DTT, což naznačuje, že je zprostředkována modifikací sulfhydrylové skupiny, kritické pro aktivaci NF- κ B. Pravděpodobně také v důsledku regulace NF- κ B aviciny snižují hladiny iNOS a COX-2, včetně jejich reaktivních produktů (67). Směs avicinů D a G případně metanolického extraktu *Acacia victoriae* – F094 inhibovala růst linie Jurcat s IC₅₀ = 0,16 – 0,47 μ g/ml. Docházelo k časnému zvýšení koncentrace cytochromu c v cytosolu i v systému s izolovanými mitochondriemi mechanismem nezávislým na kaspáze 3. Uvolnění cytochromu c vedlo následně k její aktivaci a štěpení substrátu PARP. Zajímavé je, že ke změně mitochondriálního potenciálu nedocházelo ihned po uvolnění cytochromu c, ale až po 16 hodinách. Aviciny také překvapivě vedly ke snížení produktů ROS (68). Podobných výsledků dosáhli Mujoo a spol. 2001 (69), přičemž IC₅₀ extraktu F035 pro nádorové linie se pohybuje v rozsahu 0,72–6,5 μ g/ml. Na druhou stranu byly popsány i linie rezistentní vůči jeho působení (69).

Fomitelová kyselina

Fomitelové kyseliny A a B (FA-A a -B) (obrázek 1), produkty basidomycet *Fomitella fraxinea* jsou inhibitory savčí DNA polymerázy α a β , lidské DNA topoizomerázy I a II (tabulka 1). Zároveň FA-A a -B vykazují inhibiční efekt vůči hovězí DNA polymeráze α , krysí polymeráze β , mírnou inhibici rostlinné DNA polymerázy II (β -like), HIV reverzní transkriptázy a také cytotoxický účinek na nádorovou linii NUGC-3, FA-A LD₅₀ = 38 μ M (39, 70, 71).

Dammarany

Mezi nejznámější glykosidy se základní strukturou tetracyklického triterpenoidu dammaranového typu patří sloučeniny vyskytující se ve všehoji lékařském (*Panax ginseng*), označované jako ginsenosidy R(x). Pouze u ginsenosidu Ro (obrázek 1) je strukturální základ oleanového typu. *Panax ginseng* byl

úspěšně testován pro své chemopreventivní účinky, a to v modelu karcinogeneze prsu, tračnicku, jater, děložního krčku a nervového systému, a to na zvířatech, ale také u pacientů s prekancerózami jícnu a endometria (72, 73, 74, 75). Do roku 2003 probíhala studie, která měla za úkol posoudit preventivní aktivitu ginsengu na progresi do hepatocelulárního karcinomu u pacientů s chronickou hepatitidou C (76). Také proběhly tři epidemiologické studie, které prokázaly, že *Panax ginseng* snižuje v dávkové závislosti riziko výskytu většiny nádorů (77). Kromě toho byla provedena řada studií hodnotících účinky extraktů nebo účinných látek na buněčných liniích. Ukázalo se, že extrakty z ginsengu inhibují syntézu DNA, snižují mutační frekvenci vyvolanou methyl-mesylátem a zvyšují reparační aktivitu po mutagenním působení, včetně snížené transformace normálních buněk v neoplastické (78). Byl popsán účinek metanolického extraktu červeného ginsengu na akumulaci a tím i zvýšenou cytotoxicitu mitomycinu C u buněk Ehrlichova karcinomu (79). Doposud bylo identifikováno přes 25 ginsenosidů tvořících charakteristický obsahový základ červeného a bílého ginsengu. Bylo zjištěno, že americký ginseng indukuje expresi p21. Pravděpodobně tímto mechanismem, nezávislým na p53, inhibuje proliferaci buněk MCF-7 a MDA-MB-231 (80). Je popsána inhibiční aktivita ginsenosidu Rh-2 na proliferaci lidských i myších nádorových linií. Také byla publikována aktivace adenylát cyklázy po podání Rh-1 a obnova tvorby melaninu v melanomových buňkách, což může být ve vztahu k jejich diferenciaci. Ginsenosidy byly také testovány ve vztahu ke specifické inhibici nádorové invaze, přičemž nejúčinnější byl ginsenosid Rg-3 (jeden z hlavních ginsenosidů obsažený v tepelně zpracovaném ginsengu). Rg-3 inhibuje také TPA indukovanou expresi prozánětlivého enzymu COX-2 a ornitindekarboxylázy v myší kůži a v lidské prsní epiteliální linii (MCF-10A). Tyto enzymy hrají významnou úlohu při vzniku nádorů. Rg-3 dále inhibuje TPA indukovanou aktivaci NF- κ B a kinázy ERK, která reguluje aktivaci NF- κ B. Tato pozorování ukazují, že protinádorové účinky tepelně zpracovaného ginsengu a Rg-3 jsou pravděpodobně zprostředkovány supresí intracelulární signální kaskády zodpovědné za aktivaci NF- κ B a následnou indukci COX-2. Expresí COX-2 ve vztahu ke karcinogenezi je dobře popsána u nádorů tračnicku a chemopreventivní efekt ginsengu je pravděpodobným důsledkem této aktivity (81, 82). Rovněž byla popsána inhibice nádorové angiogeneze pomocí Rb-2 a po podání Rh-2 inhibice nádorového růstu a lepší přežívání nahé myši s implantovanou ovarální nádorovou linií HRA. V roce 2000 byly na čtv-

tém výročním zasedání Čínské společnosti klinické onkologie prezentovány výsledky II. fáze klinického testování, které hodnotily účinky nového protinádorového léku Rg-3 Shenji Jiaonang, jehož hlavní obsahovou složkou je Rg-3 ginsenosid (95%), s velice slibnými závěry (83). V současnosti na řadě pracovišť probíhá intenzivní výzkum cytotoxických účinků semisyntetických derivátů odvozených od této zajímavé skupiny triterpenoidů (84).

Jenisseensosidy

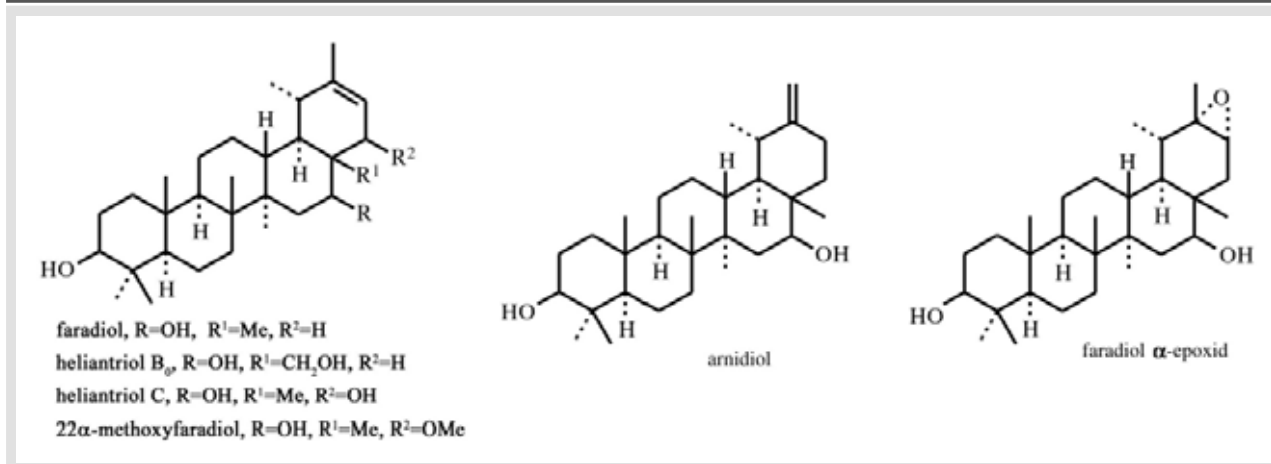
Jenisseensosidy A, B, C, D (obrázek 2) jsou triterpenoidní saponiny (glykosidy quillaové kyseliny) izolované z rostliny *Silene jenisseensis* (A,B) nebo *fortunei* (C,D), které v nízkých koncentracích stimulují proliferaci buněk Jurcat. Ve vyšších dávkách navozují jejich apoptózu (85). Kromě toho potencují toxicitu cisplatinu o 60–65% její zvýšenou akumulací v buněčné linii HT-29 (86).

Iridaly

Iridaly (obrázek 1), triterpenoidy izolované z *Iris germanica*, vykazují cytotoxicitu vůči lidským nádorovým liniím A2780 a K562. Všechny izolované iridaly mají výrazný cytotoxický efekt na obě linie, i když K562 se jeví vůči těmto sloučeninám mnohem citlivější. IC₅₀ pro A2780 se pohybuje v rozsahu 3,59–0,17 μ g/ml a pro K562 0,4–0,09 μ g/ml. Tyto sloučeniny byly méně účinné vůči liniím multidrug rezistentním (MDR). Přesto se IC₅₀ pohybovaly u K562 MDR+ pod 0,95 μ g/ml a u A2780 MDR+ pod 5,17 μ g/ml (87).

Glycyrrhizin a glycyrrhetová kyselina

Glycyrrhizin (GL), 3 β -O-glykosid glycyrrhetové kyseliny (GA) (obrázek 1), tvoří jednu z hlavních obsahových látek lékořice, obecně rodu *Glycyrrhiza*. GL může být hydrolyzován bakteriální glukuronidázou v gastrointestinálním traktu na svůj aglykon (GA), který existuje jako 18 α - a 18 β - isomer, přičemž 18 β - epimer je více bioaktivní. GA je specifickým inhibitorem 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy, která je za normálních podmínek hlavním faktorem zahrnutým do regulace hladiny cirkulujícího kortizolu. GA má také antimutagenní efekt v modelech indukovaných benzo[a]pyrenem, 2-aminofluorenem, aflatoxinem B₁, Trp-P-2, Trp-P-1, 2-acetylaminofluorenem a 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)akrylamidem (88, 89, 90). Tento účinek je pravděpodobně způsoben inhibicí monoxygenázového systému cytochromu P450. Dlouhodobé podávání GL účinně chránilo před rozvojem hepatocelulárního karcinomu u pacientů s chronickou hepatitidou C. K podobným závěrům dospěla i studie hodnotící vliv GL na inhibici hepatální



karcinogeneze po provokaci dietylnitrosaminem v myším modelu (91). Dále bylo zjištěno, že GL inhibuje u myší plicní a jaterní tumorigenezi. Studie sponzorovaná National Cancer Institute (NCI) prokázala chemopreventivní efekt β-GA a carboxolonu (disodná sůl 3β-hemisukcinátu GA). β-GA byla účinná i v modelu karcinogeneze krysí prsní žlázy, krysího tračnicku a myších jater in vivo a u myších orgánových kultur prsu in vitro. GA vykazovala in vitro synergický antiproliferativní efekt v kombinaci s glukokortikoidy na liniích MCF-7 a ZR-75-1, přičemž účinek individuálních látek byl slabý. Nevýhodou používání GL a GA je inhibice 11-β-hydroxysteroid dehydrogenázy (11β-HSD), která vede k nadbytku endogenního kortizolu s následnou hypertenzí, hyperkalémií a supresí renin-aldosteronové osy (hyperaldosteronismus). Podrobněji viz review Wang and Nixon 2001 (92).

Nejnovějším mechanismem objasňujícím antikarcinogenní působení je skutečnost, že GA indukuje mitochondriální bobtnání (swelling), což společně se změnou potenciálu a uvolněním proapoptogenních proteinů vede ke smrti transformovaných buněk (93).

Taraxastany

V nehydrolyzovatelné lipidické frakci extraktu chryzantémy (*Cyanthum morifolium*) byli identifikováni zástupci skupiny taraxastanů: faradiol, heliantriol B₀, heliantriol C, 22α-metoxifaradiol, arniol a faradiol α-epoxid (obrázek 3). Tyto látky inhibovaly aktivaci EBV-EA, která byla srovnatelná s účinkem GA, známého protinádorového promotoru. Ověření cytotoxické aktivity faradiolu, heliantriolu B₀, heliantriolu C, arniolu a faradiolu α-epoxidu na panelu 60 lidských nádorových linií ukázalo, že arniol vykazuje širokou toxicitu. GI₅₀ je s výjimkou dvou linií (RPMI-8226 a SR) pod 10 μM. Nejnižších hodnot dosahoval vůči leukemické linii HL-60 s GI₅₀ = 0,47 μM. Faradiol byl toxický vůči leukemickým liniím CCRF-CEM,

K-582, SR a také vůči linii nemalobuněčného karcinomu plic EKVX. Heliantriol B₀ byl účinný na renální nádorovou linii RXF 393 a linii karcinomu prsu MCF-7 (94).

Závěr

Z literárního pohledu i našich vlastních zkušeností je zřejmé, že přibývá úsilí zaměřeného na pochopení mechanismu účinku triterpenoidů. Efektorová část cytotoxického účinku je u řady sloučenin dobře zmapována. Až na několik výjimek se jedná o aktivaci kaskády kaspáz po uvolnění cytochromu c, případně AIF. Méně je zatím známo o tom, co k uvolnění cytochromu c a AIF vede. Diskutuje se role intracelulárního Ca²⁺, otevření mitochondriálních pórů, produkce kyslíkových radikálů, případně zásah do mitochondriálního respiračního řetězce. Zdá se totiž, že primární cíl těchto sloučenin bude lokalizován v mitochondriích. Napovídají tomu i naše pozorování (12). Triterpenoidní sloučeniny jsou přes dřívější údaje, které hovořily o účinnosti pouze v neuroektodermálních liniích, účinné na nádory různého histogenetického původu. Cytotoxicita není závislá na statutu p53, pRB, ani androgen hormonální dependenci. Publikované experimentální údaje nás vedou k závěru, že klasické mechanismy mnohočetné lékové rezistence se u triterpenoidů neuplatňují a proto tyto sloučeniny mohou být přínosem pro pacienty s chemorezistentním onemocněním. Kromě přímého působení těchto sloučenin na mitochondrie dochází i k aktivaci alternativních apoptotických drah. Indukce buněčné smrti se odehrává důsledkem inhibiční aktivity těchto sloučenin vůči celé řadě esenciálních enzymů (topoizomerázy, DNA polymerázy, COX-2, iNOS), případně ovlivněním aktivity transkripčních faktorů (PPARs). Souhrnem lze říci, že triterpenoidy patří mezi perspektivní molekuly přírodního původu, a to jak šířkou svého působení a vysokou cytotoxicitou vůči nádorovým buňkám, tak i chemoprotektivním

účinkem spojeným s antioxidačním efektem a nízkou systémovou toxicitou.

Poděkování

Práce na tomto projektu je podporována granty MSMT J14/98 151100001, GACR 301/03/1570, IG LF UP 12801108 a grantem FRUŠ 100 11/2004-30. Autoři děkují za spolupráci ing. S. Kuzminovi, J. O. Thomson a personálu Laboratoře experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP.

Seznam zkratk

AαBA – 3α-acetoxy-α-boswellová kyselina, AβBA – 3α-acetoxy-β-boswellová kyselina, AIF – apoptózu indukující faktor, AKβBA – 3α-acetoxy-11-oxo-β-boswellová kyselina, AP-1 – AP-1 transkripční faktor, BetA – betulonová kyselina, BPO – benzoylperoxid, CDDO – 2-kyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-ová kyselina, COX-2 – cyklooxygenáza-2, DTT – dithiotreitol, EBV – virus Ebsteina a Barrové, ED50 – koncentrace látky, která způsobí 50% inhibici buněčné proliferace in vitro, ERK – extracelulárními signály regulované kinázy (synonymum – MAP-kinázy), FA-A a FA-B – fomitelové kyseliny A a B, GA – 3β-O-glykosid glycyrrhetové kyseliny, GI₅₀ – koncentrace, která je ve srovnání s kontrolou potřebná k redukcí růstu ošetřených buněk na polovinu, GL – glycyrrhizin, HDFC – normální kožní fibroblasty, IC50 – koncentrace, která dosáhne 50% účinku (inhibice, smrti) ve srovnání s kontrolou, iNOS – indukovatelná syntáza oxidu dusnatého, LD50 – koncentrace, která usmrtí 50% ošetřených buněk, NF-κB – jaderný transkripční faktor -κB, PBL – lymfocyty periferní krve, PGE2 – prostaglandin E2, PKC – protein kináza C, PPARγ – receptor γ aktivovaný proliferátory peroxizomů, ROS – kyslíkové radikály, RXR – retinoidní receptor X, TNFα – tumor nekrotizující faktor α, TPA – 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetát, UA – ursolová kyselina.

Literatura

- Kristo TS, Terdy PP, Simandi B, et al. Efficiency of supercritical fluid extraction for the production of non-volatile terpenoids from *Taraxaci radix*. *Acta Pharm. Hung.* 2001; 71: 318–324.
- Brieskorn CH, Suss HP. Triterpenoids from the peels of pear and apple (author's transl.) *Arch. Pharm. (Weinheim)* 1974; 307: 949–960.
- Fernandes AMS, Baker EA, Martin JT. Studies on plant cuticle VI. Isolation and fractionation of cuticular waxes. *Ann. appl. Biol.* 1964; 53: 43–58.
- Croteau R, Fagerson IS. The chemical composition of the cuticular wax of cranberry. *Phytochemistry* 1970; 10: 3239–3245.
- Trumbull ER, Bianchi E, Eckert DJ, et al. Tumor inhibitory agents from *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae). *J. Pharm. Sci.* 1976; 65: 1407–1408.
- Ogura M, Cordell GA, Farnsworth R. Potential anticancer agents. IV. Constituents of *Jacaranda caucana* Pittier (Bignoniaceae). *Lloydia* 1977; 40: 157–168.
- Oliveira M, Carvalho M, Silva C, et al. New Biflavonoid and Other Constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). *J. Braz. Chem. Soc.* 2002; 13: 119–123.
- Yasukawa K, Takido M, Matsumoto T, et al. Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. *Oncology* 1991; 48: 72–76.
- Pisha E, Chai H, Lee IS, et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.* 1995; 1: 1046–1051.
- Schmidt ML, Kuzmanoff KL, Ling-Indeck L, et al. Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Eur. J. Cancer* 1997; 33: 2007–2010.
- Zuco V, Supino R, Righetti SC, et al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* 2002; 175: 17–25.
- Šarek J, Klinot J, Džubák P, et al. New lupane derived compounds with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* 2003; 46: 5402–5415.
- Chatterjee P, Kouzi SA, Pezzuto JM, et al. Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 3850–3855.
- Fulda S, Scaffidi C, Susin SA, et al. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 33942–33948.
- Liebermann DA, Hoffman B, Steinman RA. Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. *Oncogene* 1995; 11: 199–210.
- Rieber M, Strasberg Rieber M. Induction of p53 without increase in p21WAF1 in betulinic acid-mediated cell death is preferential for human metastatic melanoma. *DNA Cell. Biol.* 1998; 17: 399–406.
- Wick W, Grimm C, Wagenknecht B, et al. Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 289: 1306–1312.
- Selzer E, Pimentel E, Wacheck V, et al. Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 114: 935–940.
- Melzig MF, Bormann H. Betulinic acid inhibits aminopeptidase N activity. *Planta Med.* 1998; 64: 655–657.
- Kwon HJ, Shim JS, Kim JH, et al. Betulinic Acid Inhibits Growth Factor-induced in vitro Angiogenesis via the Modulation of Mitochondrial Function in Endothelial Cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 2002; 93: 417–425.
- Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR, et al. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol. Med. Today* 2000; 6: 15–19.
- Noda Y, Kaiya T, Kohda K, et al. Enhanced cytotoxicity of some triterpenes toward leukemia L1210 cells cultured in low pH media: possibility of a new mode of cell killing. *Chem. Pharm. Bull.* 1997; 45: 1665–1670.
- Wachsberger PR, Burd R, Wahl ML, et al. Betulinic acid sensitization of low pH adapted human melanoma cells to hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* 2002; 18: 153–164.
- Chou KJ, Fang HC, Chung HM, et al. Effect of betulinic acid on intracellular-free Ca(2+) levels in Madin Darby canine kidney cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 408: 99–106.
- Mellanen P, Petanen T, Lehtimäki J, et al. Wood-derived estrogens: studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996; 136: 381–388.
- Cichewicz RH, Kouzi SA. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med. Res. Rev.* 2004; 24: 90–114.
- Heldt RM. Boswellic acids exhibit cytotoxic effects on brain tumor cells independent from 5-lipoxygenase inhibition. *Arch. Pharmacol.* 1997; 355: R15.
- Hoernlein RF, Orlikowsky T, Zehrer C, et al. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 288: 613–619.
- Winking M, Sarikaya S, Rahmian A, et al. Boswellic acids inhibit glioma growth: a new treatment option? *J. Neurooncol.* 2000; 46: 97–103.
- Jing Y, Nakajo S, Xia L, et al. Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. *Leuk. Res.* 1999; 23: 43–50.
- Glaser T, Winter S, Groscurth P, et al. Boswellic acids and malignant glioma: induction of apoptosis but no modulation of drug sensitivity. *Br. J. Cancer* 1999; 80: 756–765.
- Syrovets T, Buchele B, Gedig E, et al. Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and II α . *Mol. Pharmacol.* 2000; 58: 71–81.
- Streffer JR, Bitzer M, Schabet M, et al. Response of radiochemotherapy-associated cerebral edema to a phytotherapeutic agent, H15. *Neurology* 2001; 56: 1219–1221.
- Jansen G, Bode U, Breu H, et al. Boswellic acids in the palliative therapy of children with progressive or relapsed brain tumours. *Klin. Padiatr.* 2000; 212: 189–195.
- Anjaneyulu V, Prasad KH, Rao GS. Triterpenoids of the leaves of *Mangifera indica*. *Indian J. Pharm. Sci.* 1982; 44: 58–59.
- Saleem M, Alam A, Arifin S, et al. Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin. *Pharmacol. Res.* 2001; 43: 127–134.
- You Y, Nam N, Kim Y, et al. Antiangiogenic activity of Lupeol from *Bombax ceiba*. *Phytother. Res.* 2003; 17: 341–344.
- Subbaramaiah K, Michaluart P, Sporn MB, et al. Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 2399–2404.
- Mizushima Y, Iida A, Ohta K, et al. Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase. *Biochem. J.* 2000; 350: 757–763.
- Rios MY, Gonzalez-Morales A, Villarreal ML. Sterols, triterpenes and biflavonoids of *Viburnum juncundum* and cytotoxic activity of ursolic acid. *Planta Med.* 2001; 67: 683–684.
- Kim YK, Yoon SK, Ryu SY. Cytotoxic triterpenes from stem bark of *Physocarpus intermedium*. *Planta Med.* 2000; 66: 485–486.
- Lee HY, Chung HY, Kim KH, et al. Induction of differentiation in the cultured F9 teratocarcinoma stem cells by triterpene acids. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1994; 120: 513–518.
- Sohn KH, Lee HY, Chung HY, et al. Anti-angiogenic activity of triterpene acids. *Cancer Lett.* 1995; 94: 213–218.
- Hsu HY, Yang JJ, Lin CC. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Lett.* 1997; 111: 7–13.
- Ohigashi H, Takamura H, Koshimizu K, et al. Search for possible antitumor promoters by inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr virus activation; ursolic acid and oleanolic acid from an anti-inflammatory Chinese medicinal plant, *Glechoma hederacea* L. *Cancer Lett.* 1986; 30: 143–151.
- Tokuda H, Ohigashi H, Koshimizu K, et al. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Lett.* 1986; 33: 279–285.
- Shibata S. Saponins with biological and pharmacological activity. In: Wagner H and Wolff P (Eds.) *New natural products and plant drugs with pharmacological and therapeutic activity*. Springer-Verlag 1977; 177–196.
- Ma BL. Hypolipidemic effects of oleanolic acid. *Traditional Medicine and Pharmacology* 1986; 2: 28–29.
- Wang B, Jiang ZH. Studies on oleanolic acid. *Chinese Pharmaceutical Journal* 1992; 27: 393–397.
- Niikawa M, Hayashi H, Sato T, et al. Isolation of substances from glossy privet (*Ligustrum lucidum* Ait.) inhibiting the mutagenicity of benzo[a]pyrene in bacteria. *Mutat. Res.* 1993; 319: 1–9.
- Choi CY, You HJ, Jeong HG. Nitric oxide and tumor necrosis factor- α production by oleanolic acid via nuclear factor- κ B activation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 288: 49–55.
- Suh N, Honda T, Finlay HJ, et al. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res.* 1998; 58: 717–723.
- Suh N, Wang Y, Honda T, et al. A novel synthetic oleanane triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxoleanan-1,9-dien-28-oic acid, with potent differentiating, antiproliferative, and anti-inflammatory activity. *Cancer Res.* 1999; 59: 336–341.
- Honda T, Rounds BV, Bore L, et al. Novel synthetic oleanane triterpenoids: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999; 9: 3429–3434.
- Pedersen IM, Kitada S, Schimmer A, et al. The triterpenoid CDDO induces apoptosis in refractory CLL B cells. *Blood* 2002; 100: 2965–2972.
- Ito Y, Pandey P, Sporn MB, et al. The novel triterpenoid CDDO induces apoptosis and differentiation of human osteosarcoma cells by a caspase-8 dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.* 2001; 59: 1094–1099.
- Honda T, Honda Y, Favaloro FG Jr, et al. A novel dicyanotriterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxoleanan-1,9-dien-28-onitrile, active at picomolar concentrations for inhibition of nitric oxide production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002; 12: 1027–1030.
- Ito Y, Pandey P, Place A, et al. The novel triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxoleanan-1,9-dien-28-oic acid induces apoptosis of human myeloid leukemia cells by a caspase-8-dependent mechanism. *Cell. Growth. Differ.* 2000; 11: 261–267.
- Hail N Jr, Konopleva M, Sporn M, et al. Evidence supporting a role for calcium in apoptosis induction the synthetic triterpenoid 2-Cyano-3,12-dioxoleanan-1,9-dien (CDDO). *J. Biol. Chem.* (Epub ahead of print) 2004.
- Lapillonne H, Konopleva M, Tsao T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma a novel synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxoleanan-1,9-dien 28-oic acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2003; 63: 5926–5939.

61. Wang Y, Porter WW, Suh N, et al. A synthetic triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid (CDDO), is a ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Endocrinol.* 2000; 14: 1550–1556.
62. Konopleva M, Tsao T, Ruvolo P, et al. Novel triterpenoid CDDO-Me is a potent inducer of apoptosis and differentiation in acute myelogenous leukemia. *Blood* 2002; 99: 326–335.
63. Kim KB, Lotan R, Yue P, et al. Identification of a novel synthetic triterpenoid, methyl-2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oate, that potently induces caspase-mediated apoptosis in human lung cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2002; 1: 177–184.
64. Pedersen IM, Zapata JM, Samuel T, et al. The triterpenoid CDDO-Imidazolide induces apoptosis and enhances fludarabine-induced apoptosis of CLL B-cells. *Blood* (Epub ahead of print) 2004.
65. Finlay HJ, Honda T, Gribble GW, et al. Novel A-ring cleaved analogs of oleanolic and ursolic acids which affect growth regulation in NRP.152 prostate cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997; 7: 1769–1772.
66. Hanusek M, Ganesh P, Walaszek Z, et al. Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth), suppress H-ras mutations and aneuploidy in a murine skin carcinogenesis model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 11551–11556.
67. Haridas V, Arntzen CJ, Gutterman JU. Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth), inhibit activation of nuclear factor-kappaB by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 11557–11562.
68. Haridas V, Higuchi M, Jayatilake GS, et al. Avicins: triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 5821–5826.
69. Mujoo K, Haridas V, Hoffmann JJ, et al. Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis. *Cancer Res.* 2001; 61: 5486–5490.
70. Mizushina Y, Tanaka N, Kitamura A, et al. The inhibitory effect of novel triterpenoid compounds, fomitelic acids, on DNA polymerase β . *Biochem. J.* 1998; 330: 1325–1332.
71. Tanaka N, Kitamura A, Mizushina Y, et al. Fomitelic acids, triterpenoid inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a basidiomycete, *Fomitella fraxinea*. *J. Nat. Prod.* 1998; 61: 193–197.
72. Bespalov VG, Alexandrov VA, Limarenko AY, et al. Chemoprevention of mammary, cervix and nervous system carcinogenesis in animals using cultured *Panax ginseng* drugs and preliminary clinical trials in patients with precancerous lesions of the esophagus and endometrium. *J. Korean Med. Sci.* 2001; 16 (Suppl): S42–53.
73. Fukushima S, Wanibuchi H, Li W. Inhibition by ginseng of colon carcinogenesis in rats. *J. Korean Med. Sci.* 2001; 16 (Suppl): S75–80.
74. Nishino H, Tokuda H, Li T, et al. Cancer chemoprevention by ginseng in mouse liver and other organs. *J. Korean Med. Sci.* 2001; 16 (Suppl): S66–69.
75. Wu XG, Zhu DH, Li X. Anticarcinogenic effect of red ginseng on the development of liver cancer induced by diethylnitrosamine in rats. *J. Korean Med. Sci.* 2001; 16 (Suppl): S61–65.
76. No authors listed. Study on chemoprevention of hepatocellular carcinoma by ginseng: an introduction to the protocol. *J. Korean Med. Sci.* 2001; 16 (Suppl): S70–74.
77. Yun TK, Choi SY, Yun HY. Epidemiological study on cancer prevention by ginseng: are all kinds of cancers preventable by ginseng? *J. Korean Med. Sci.* 2001; 16 (Suppl): S19–27.
78. Rhee YH, Ahn JH, Choe J, et al. Inhibition of mutagenesis and transformation by root extracts of *Panax ginseng* in vitro. *Planta Med.* 1991; 57: 125–128.
79. Kubo M, Tong CN, Matsuda H. Influence of the 70% methanolic extract from red ginseng on the lysosome of tumor cells and on the cytotoxic effect of mitomycin C. *Planta Med.* 1992; 58: 424–428.
80. Duda RB, Kang SS, Archer SY, et al. American ginseng transcriptionally activates p21 mRNA in breast cancer cell lines. *J. Korean Med. Sci.* 2001; 16 (Suppl): S54–60.
81. Surh YJ, Na HK, Lee JY, et al. Molecular mechanisms underlying anti-tumor promoting activities of heat-processed *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J. Korean Med. Sci.* 2001; 16 (Suppl): S38–41.
82. Wargovich MJ. Colon cancer chemoprevention with ginseng and other botanicals. *J. Korean Med. Sci.* 2001; 16 (Suppl): S81–86.
83. Shibata S. Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. *J. Korean Med. Sci.* 2001; 16 (Suppl): S28–37.
84. Atopkina LN, Malinovskaya GV, Elyakov GB, et al. Cytotoxicity of natural ginseng glycosides and semisynthetic analogues. *Planta Med.* 1999; 65: 30–34.
85. Gaidi G, Correia M, Chauffert B, et al. Saponins-mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxicity in human colon cancer cells. *Planta Med.* 2002; 68: 70–72.
86. Gaidi G, Miyamoto T, Laurens V, et al. New acylated triterpene saponins from *Silene fortunei* that modulate lymphocyte proliferation. *J. Nat. Prod.* 2002; 65: 1568–1572.
87. Bonfils JP, Pinguet F, Culine S, et al. Cytotoxicity of iridals, triterpenoids from *Iris*, on human tumor cell lines A2780 and K562. *Planta Med.* 2001; 67: 79–81.
88. Zani F, Cuzzoni MT, Daglia M, et al. Inhibition of mutagenicity in *Salmonella typhimurium* by *Glycyrrhiza glabra* extract, glycyrrhizic acid, 18 alpha- and 18 beta-glycyrrhetic acids. *Planta Med.* 1993; 59: 502–507.
89. Wang ZY, Agarwal R, Zhou ZC, et al. Inhibition of mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and skin tumor initiating and tumor promoting activities in SENCAR mice by glycyrrhetic acid: comparison of 18 alpha- and 18 beta-stereoisomers. *Carcinogenesis* 1991; 12: 187–192.
90. Ohtsuka M, Fukuda K, Yano H, et al. Effects of nine active ingredients in Chinese herbal medicine sho-saiko-to on 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide mutagenicity. *Jpn. J. Cancer Res.* 1995; 86: 1131–1135.
91. Shiota G, Harada K, Ishida M, et al. Inhibition of hepatocellular carcinoma by glycyrrhizin in diethylnitrosamine-treated mice. *Carcinogenesis* 1999; 20, 59–63.
92. Wang ZY, Nixon DW. Licorice and cancer. *Nutr. Cancer* 2001; 39: 1–11.
93. Salvi M, Fiore C, Armanini D, et al. Glycyrrhetic acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66: 2375–2379.
94. Ukiya M, Akihisa T, Tokuda H, et al. Constituents of Compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. *Cancer Lett.* 2002; 177: 7–12.