



Indirubin-3'-monoxime Causes Apoptosis and Paraptosis in Hep3B Hepatocellular Carcinoma Cells by Activating the p53-mediated p21-Reactive Oxygen Species Axis

Matharage G. DILSHARA ¹ #, Ilandarage M.N. MOLAGODA ^{1,2} #, Yung H. CHOI ³,
Cheol PARK ⁴, Rajapaksha G.P.T. JAYASOORIYA ⁵ & Gi-Young KIM ^{1,2} *

¹ Department of Marine Life Science, ² Research Institute for Basic Sciences,
Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

³ Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine,
Dong-Eui University, Busan 47227, Republic of Korea

⁴ Division of Basic Sciences, College of Liberal Studies,
Dong-Eui University, Busan 47340, Republic of Korea

⁵ Department of Food Technology, Faculty of Technology,
Rajarata University of Sri Lanka, Mihintale 50300, Sri Lanka

SUMMARY. Herein, we aimed to determine whether indirubin-3'-monoxime (I3M), the active component of Danggui-Long-Hui-Wan, induces apoptosis and paraptosis by activating the p53-p21-reactive oxygen species (ROS) axis. In this study, we found that I3M significantly decreased the cell viability of Hep3B hepatocellular carcinoma (HCC) cells; pretreatment with a pan-caspase inhibitor partially prevented I3M-induced cytotoxicity. Small ER- and mitochondria-derived vesicles, hallmarks of paraptosis, were visible in I3M-treated cells. Transient knockdown of p53 using specific siRNA inhibited I3M-induced cytotoxicity by downregulating p21 expression, suggesting that p53 plays a crucial role in I3M-induced cytotoxicity via p21 expression. Treatment with I3M enhanced ROS production, and pretreatment with ROS scavengers significantly inhibited I3M-induced cytotoxicity. Furthermore, transient knockdown of p21 downregulated I3M-induced ROS production and subsequent cytotoxicity, indicating that I3M triggers cytotoxicity via p21-mediated ROS production. This study revealed that I3M simultaneously induces apoptosis and paraptosis in Hep3B HCC cells by activating the p53-p21-ROS axis, suggesting the potential of I3M as an anticancer drug.

RESUMEN. Nuestro objetivo fue determinar si la indirubina-3'-monoxima (I3M), el componente activo de Danggui-Long-Hui-Wan, induce la apoptosis y la paraptosis mediante la activación del eje de especies de oxígeno reactivas (ROS) p53-p21. En este estudio, encontramos que I3M disminuyó significativamente la viabilidad celular de las células del carcinoma hepatocelular (HCC) Hep3B; el pretratamiento con un inhibidor de pan-caspasa previno parcialmente la citotoxicidad inducida por I3M. Pequeñas vesículas derivadas de ER y mitocondrias, características de la paraptosis, fueron visibles en las células tratadas con I3M. La caída transitoria de p53 usando ARNi específico inhibió la citotoxicidad inducida por I3M regulando negativamente la expresión de p21, lo que sugiere que p53 juega un papel crucial en la citotoxicidad inducida por I3M a través de la expresión de p21. El tratamiento con I3M mejoró la producción de ROS y el pretratamiento con captadores de ROS inhibió significativamente la citotoxicidad inducida por I3M. Además, la caída transitoria de p21 redujo la producción de ROS inducida por I3M y la subsiguiente citotoxicidad, lo que indica que I3M desencadena la citotoxicidad a través de la producción de ROS mediada por p21. Este estudio reveló que I3M induce simultáneamente apoptosis y paraptosis en células HCC Hep3B activando el eje p53-p21-ROS, lo que sugiere el potencial de I3M como fármaco contra el cáncer.

KEY WORDS: apoptosis, indirubin-3'-oxime, paraptosis; p21, p53, reactive oxygen species.

These authors contributed equally in this work.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: immunkim@jejunu.ac.kr (G.-Y.K.)