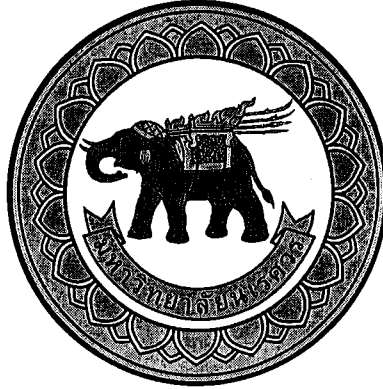


อภิธาน์นทาการ



สำนักหอสมุด



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

สัญญาเลขที่ R2560B069

### ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) ความจำเพาะในการรักษาเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ของสารยับยั้งการขนส่งซีเทรทเข้าเซลล์ ในการเหนี่ยวนำการตายแบบอพอโทซิส ผ่านการควบคุมภายในเซลล์ต่อขบวนการสร้างไขมันแบบดีโนโว การเกิดสารอนุมูลอิสระ และการกระตุ้นความเค้นของร่างแหเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม

(ภาษาอังกฤษ) The selective therapy of HepG2 cell by citrate transporter inhibitors through apoptotic induction targeting intracellular signaling regulation of the *de novo* lipogenesis, production of reactive oxygen species, and activation of ER stress

### ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะรัตน์ ศรีสว่าง

สังกัดภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559 ถึงวันที่ 31 มีนาคม 2562

สนับสนุนโดย ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยนครสวรรค์  
จากงบประมาณแผ่นดิน (แบบปกติ) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

วันลงทะเบียน... 27 เม.ย. 2565

เลขทะเบียน... 1050696

เลขเรียกหนังสือ... 2 RC 848

444

ปี 6225

2562

โครงการ : ความจำเพาะในการรักษาเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ของสารยับยั้งการขนส่งซิเตรทเข้าเซลล์  
ในการเหนี่ยวนำการตายแบบอพอโทซิส ผ่านการควบคุมภายในเซลล์ต่อขบวนการสร้างไขมันแบบ  
ดีโนโว การเกิดสารอนุมูลอิสระ และการกระตุ้นความเค้นของร่างแหเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม

### รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ความจำเพาะในการรักษาเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ของสารยับยั้งการขนส่ง  
ซิเตรทเข้าเซลล์ ในการเหนี่ยวนำการตายแบบอพอโทซิส ผ่านการควบคุมภายใน  
เซลล์ต่อขบวนการสร้างไขมันแบบดีโนโว การเกิดสารอนุมูลอิสระ และการกระตุ้น  
ความเค้นของร่างแหเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม

(ภาษาอังกฤษ) The selective therapy of HepG2 cell by citrate transporter  
inhibitors through apoptotic induction targeting intracellular signaling  
regulation of the *de novo* lipogenesis, production of reactive oxygen  
species, and activation of ER stress

ระยะเวลาโครงการ 1 ตุลาคม 2559 ถึง 30 กันยายน 2560.....

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะรัตน์ ศรีสว่าง.....

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา : รศ.ดร.พญ. สุรชาติพงษ์ พงษ์เจริญ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559 ถึงวันที่ 31 มีนาคม 2562

## ผู้รับผิดชอบ

### หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร.ปิยะรัตน์ ศรีสว่าง รับผิดชอบทำการวิจัย 60%

สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทร. 05596-4655 , 089-768-3739

Email : [piyarats@nu.ac.th](mailto:piyarats@nu.ac.th)

### ผู้ร่วมงานวิจัย

ดร.ดำรงศักดิ์ เป็กทอง รับผิดชอบทำการวิจัย 15%

สังกัด ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทรศัพท์ 055-961820

Email : [dumrongsakp@yahoo.com](mailto:dumrongsakp@yahoo.com)

นพ.โกวิท ศุภโกศล รับผิดชอบทำการวิจัย 25%

สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทร. 05596-4655

Email : [kowits@nu.ac.th](mailto:kowits@nu.ac.th)

### คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

*de novo* lipogenesis (DNL) , apoptosis, plasma membrane citrate transporter (PMCT) inhibitor , mitochondrial citrate transporter (CTP) inhibitor , HepG2, primary hepatocytes, reactive oxygen species (ROS), endoplasmic reticulum (ER) stress

ขบวนการสร้างไขมันแบบใหม่ , ขบวนการตายแบบเอพออโทซิส , สารยับยั้งการขนส่งซิเตรทเข้าเซลล์ผ่านทางเซลล์เมมเบรน , สารยับยั้งการขนส่งซิเตรทเข้าเซลล์ผ่านทางไมโทคอนเดรียเมมเบรน เซลล์มะเร็งเฮปจีทู , เซลล์ตับมนุษย์ , สารอนุมูลอิสระ , ความเค้นของร่างแหเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งจัดว่าเป็นโรคที่คุกคามชีวิตของผู้ที่เป็นอย่างมาก อีกทั้งมีแนวโน้มที่อุบัติการณ์การเกิดและการเสียชีวิตจะมากขึ้นเรื่อยๆ การวิจัยและค้นคว้าเพื่อพัฒนาและหาวิธีที่เฉพาะ ที่จะจัดการทำลายเซลล์มะเร็ง หรือยับยั้งการ proliferation, differentiation และ growth ของเซลล์มะเร็ง โดยที่พยายามจะให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์ปกติให้น้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ และเป็นไปอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ในอดีตจนปัจจุบัน วิธีหนึ่งในปัจจุบันนี้ได้รับความสนใจศึกษามาก คือ ความพยายามลด nutrients ซึ่ง supply การ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็ง โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติอื่นๆ ของร่างกาย

หลักการของวิธีการนี้ มีข้อมูลที่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน คือ เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีอัตราของขบวนการ aerobic glycolysis สูงกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "Warburg

effect” ถูกค้นพบโดย Otto Warburg ในปี 1923 ลักษณะที่สำคัญของ Warburg effect ของเซลล์มะเร็งคือ มีการขนส่ง glucose เข้าเซลล์ และขบวนการ glucose consumption ในอัตราที่สูงกว่าเซลล์ปกติ แต่พบว่ามีการผลิต lactate production ในอัตราที่สูงด้วย ถึงแม้ว่าเซลล์จะอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงพอในขบวนการ oxidative glucose consumption ก็ตาม (aerobic respiration) ซึ่งในเซลล์ปกติ การพบ lactate จะเกิดขึ้นในกรณี anaerobic respiration หรือขาดออกซิเจน

ปรากฏการณ์ Warburg effect นี้ พบว่า mitochondria respiration ลดลง activity ของ enzyme glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็น enzyme ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน pyruvate เป็น lactate ซึ่งจะถูกขับออกจากเซลล์เข้าสู่กระแสเลือด ทำให้สิ่งแวดล้อมรอบๆ เซลล์มะเร็งมีสภาพที่เป็นกรด นอกจากนี้ยังพบว่า activity ของ enzyme glycogen synthase ลดลง ซึ่งเป็น enzyme ที่ทำหน้าที่สร้าง glycogen จาก glucose และเซลล์มะเร็งจะมีอัตราของ lipogenesis ที่เกิดจาก *de novo* fatty acid synthesis (endogenous fatty acid synthesis) สูงมากกว่าเซลล์ปกติซึ่งมีค่อนข้างต่ำ ในเซลล์ปกติจะมีการสร้าง lipid จากอาหาร (dietary หรือ exogenous lipid) และจะมี *de novo* fatty acid ที่ค่อนข้างต่ำ (Mashima T. et al., 2009, Meadows AL et al., 2008, DeBerardinis RJ et al., 2007) การที่เซลล์มะเร็งมี *de novo* fatty acid synthesis ที่สูง ก็เพื่อใช้ในการสร้าง cell membrane และส่วนประกอบต่างๆของ cell membrane ซึ่งได้แก่ phospholipids, cholesterol, sphingolipids และ lipid rafts ส่วนประกอบต่างๆเหล่านี้รวมเรียกว่า microdomains ซึ่งมีความสำคัญ คือเกี่ยวข้องกับขบวนการ signal transduction, intracellular trafficking, cell polarization และ cell migration เป็นต้น (Bagnat M and Simons K, 2002, Manes S et al., 1999, Ikonen E and Simons K, 1998)

lipogenic enzyme ที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการ *de novo* fatty acid synthesis คือ ATP citrate lyase (ACL) , acetyl-CoA carboxylase (ACC) และ fatty acid synthase (FASN) ACL จะทำหน้าที่เปลี่ยน cytosolic citrate ให้เป็น acetyl CoA และ oxaloacetate ซึ่ง acetyl CoA จะเป็นแหล่ง immediate carbon source ในการสร้าง fatty acid , triglyceride และ cholesterol acetyl-CoA ส่วน ACC ทำหน้าที่ในการสร้าง malonyl-CoA จาก acetyl CoA และ FASN ทำหน้าที่สร้าง long chain fatty acid งานวิจัยที่ลดปริมาณ citrate ภายในเซลล์ โดยการลดการ transport citrate จาก mitochondria นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ยับยั้ง enzymes ที่ใช้ในขบวนการ *de novo* fatty acid synthesis รายงานถึงการลดลงของ fatty acid ภายในเซลล์มะเร็ง ซึ่งส่งผลต่อ cell proliferation การสูญเสีย cell viability และลด tumor size (Brusselmans K et al., 2005, Hatzivassillou G et al., 2005, Pizer ES et al., 1996) ซึ่งในขณะที่การยับยั้ง lipid biosynthesis นี้ไม่ส่งผลกระทบต่อทั้ง cell proliferation และ viability ของเซลล์ปกติ (Chajes V et al., 2006, Brusselmans K et al., 2005, Pizer ES et al., 1996, Kuhajda FP et al., 1994) นอกจากผลที่กล่าวมาแล้ว การยับยั้ง *de novo* fatty acid synthesis ยังมีประสิทธิภาพในการลดการเกิด metastasis ด้วย เนื่องจาก metastasis เกิดจากการที่เซลล์มะเร็งเคลื่อนที่จาก primary tumor

เข้าสู่กระแสเลือด และเดินทางไปยังอวัยวะต่างๆ metastasis ถือว่าเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิต ในผู้ที่เป็นมะเร็ง ดังนั้นการยับยั้ง *de novo fatty acid synthesis* สามารถเกิดขึ้นได้กับเซลล์มะเร็ง ทุกเซลล์ทั้งที่ primary tumor และที่ metastasis tissue อีกทั้งยังเป็นวิธีการที่มีความจำเพาะสูงในการยับยั้งการ growth , proliferation และการ metastasis ของเซลล์มะเร็งเท่านั้นโดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติอื่นๆของร่างกาย

นอกเหนือจาก commercial chemicals หรือ chemotherapeutic agents สารที่มีผลยับยั้งการขนส่ง citrate เข้าเซลล์ ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งโดยโดยลด substrate ที่จะเข้าสู่ *de novo lipogenesis pthway* โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ปกติของร่างกาย น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้รักษามะเร็งได้เช่นเดียวกัน

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์มุ่งเน้นไปที่ศึกษาบทบาทของ citrate transporter inhibitor ต่อขบวนการ intracellular *de novo lipogenesis* และ ER stress ที่จะส่งผลเพิ่ม reactive oxygen species ซึ่งจะมีผลต่อการ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็ง การที่เซลล์มะเร็งมีอัตราของ lipogenesis สูงมาก มากกว่าเซลล์ปกติซึ่งมีค่อนข้างต่ำ ประกอบกับการที่ citrate เป็นแหล่งของ substrate ที่จำเป็นและใช้ในขบวนการ lipogenesis ดังนั้นการยับยั้ง citrate ที่เป็น substrate ในขบวนการ *de novo lipogenesis* น่าจะมีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นวิธีที่สามารถลดการ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าวิธีอื่นๆ และน่าจะมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งสูงเช่นเดียวกัน โดยไม่มีผลเสียต่อเซลล์ปกติ และนำไปสู่การทดลองใช้ในสัตว์ทดลอง ทั้งด้านการรักษา ป้องกันมะเร็ง และยับยั้งการ metastasis ของมะเร็ง ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การสร้างยาที่ใช้กับมนุษย์ได้ในอนาคต แทนการใช้ chemotherapy

**วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

วัตถุประสงค์หลัก คือ

เพื่อศึกษาผลของสาร citrate transporter inhibitor ในการรักษาและยับยั้งการเกิดมะเร็ง HepG2 โดยไม่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติต่างๆของมนุษย์

วัตถุประสงค์ย่อย คือ ศึกษาผลของสาร

1. Plasma membrane citrate transporter (PMCT) inhibitor
2. Mitochondrial citrate transporter (CTP) inhibitor
3. PMCT inhibitor ผสมกับ CTP inhibitor

ในการลดการเจริญของมะเร็ง HepG2 cells เปรียบเทียบกับ primary human hepatocytesในด้าน

1. การเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis
2. การยับยั้งการ expression และ enzymatic activity ของ intracellular *de novo lipogenic* (DNL) enzymes
3. Intracellular signaling pathways ที่ควบคุม DNL

4. การกระตุ้นการสร้าง intracellular reactive oxygen species (ROS)
5. การกระตุ้น endoplasmic reticulum (ER) stress
6. การสะสมของ intracellular malonyl-CoA
7. การยับยั้ง intracellular carnitine plamitoyl transferase-1 (CPT-1) activity

#### ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ใน in vitro model ทำการทดลองใน cancer cells และ primary normal human hepatocytes เพื่อเปรียบเทียบผลของสาร PMCT inhibitor และ CTP inhibitor ทั้งขนาดและระยะเวลาที่ได้รับ ในด้าน anticancer activity โดยเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ซึ่งมีกลไกมาจากการควบคุมภายในเซลล์ของขบวนการ DNL pathway การเกิด ROS และการกระตุ้น ER stress

#### ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ความพยายามที่จะยับยั้งการ proliferation , growth และ metastasis ของเซลล์มะเร็ง และเกิดผลกระทบกับเซลล์ปกติให้น้อยที่สุดวิธีหนึ่งในปัจจุบันนี้ได้รับความสนใจศึกษา มาก คือ ความพยายามลด nutrients ซึ่ง supply การ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็ง โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติอื่นๆของร่างกาย เนื่องจากการที่เซลล์มะเร็งมี de novo lipogenesis ที่สูงกว่าเซลล์ปกติ งานวิจัยที่ลดปริมาณ citrate ภายในเซลล์ หรือการยับยั้ง enzymes ที่ใช้ในขบวนการ de novo lipogenesis รายงานถึงการลดลงของ fatty acid ภายในเซลล์มะเร็ง ซึ่งส่งผลลด cell proliferation การสูญเสีย cell viability และลด tumor size และยังมีประสิทธิภาพ ในการลดการเกิด metastasis ด้วย นอกเหนือจาก commercial chemicals หรือ chemotherapeutic agents แล้วสาร citrate transporter inhibitor ซึ่งสามารถลด citrate ที่เป็น substrate ในขบวนการ de novo lipogenesis จึงสามารถยับยั้งการ proliferation ของเซลล์มะเร็ง ได้

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์มุ่งเน้นไปที่ศึกษาบทบาทของ citrate transporter inhibitor ต่อขบวนการ de novo lipogenesis และ ER stress ต่อการ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็ง และน่าจะมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งสูง โดยไม่มีผลเสียต่อเซลล์ปกติ และนำไปสู่ การทดลองใช้ในสัตว์ทดลอง ทั้งด้านการรักษา ป้องกันมะเร็ง และยับยั้งการ metastasis ของมะเร็ง ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การสร้างยาที่ใช้กับมนุษย์ได้ในอนาคตแทนการใช้ chemotherapy การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

จากผลการรายงานของ The World Health Organization ในปี 2008, โรคมะเร็งจัดว่าเป็น หนึ่งในสิบของโรคที่คร่าชีวิตมนุษย์

(<http://www.who.int/whosis/whostat/2008/en/index.html>). เมื่อพิจารณาอุบัติการณ์การเกิด มะเร็งในกลุ่มคนเอเชีย จะพบว่า มะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma (HCC) ซึ่งเป็นมะเร็งที่

เกิดขึ้นที่เซลล์ของตับ (hepatocytes) เป็นชนิดของมะเร็งที่มีอุบัติการณ์การเสียชีวิตเป็นอันดับ 1 ถึง 2 และในขณะเดียวกันก็จัดว่าเป็นชนิดของมะเร็งที่มีอุบัติการณ์การเสียชีวิตเป็นอันดับ 3 ของโลก และอุบัติการณ์เริ่มมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นในทวีปอเมริกาหรือในทวีปยุโรปก็ตาม (Lovet JM et al., 2008, Walzer N and Kulik LM, 2008) โดยทั่วไป ผู้ป่วยที่เป็น HCC จะมีชีวิตอยู่เพียงแค่ 6-20 เดือนเมื่อเริ่มวินิจฉัยว่าเป็นแล้ว เนื่องจาก liver failure และการทำงานของเซลล์ตับเสียไป ดังนั้นจะเห็นได้ว่าไม่ว่าจะเป็นมะเร็งชนิดใดๆก็ตาม มะเร็งจัดว่าเป็นโรคที่คุกคามชีวิตของผู้ที่เป็นอย่างมาก อีกทั้งมีแนวโน้มที่อุบัติการณ์การเกิดและการเสียชีวิตจะมากขึ้นเรื่อยๆ การวิจัยและค้นคว้าเพื่อพัฒนาและหาวิธีที่เฉพาะ ที่จะจัดการทำลายเซลล์มะเร็ง หรือยับยั้งการ proliferation, differentiation และ growth ของเซลล์มะเร็ง โดยที่พยายามจะให้เกิดผลกระทบกับเซลล์ปกติให้น้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ และเป็นไปอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ในอดีตจนปัจจุบัน วิธีหนึ่งในปัจจุบันนี้ได้รับความสนใจศึกษามาก คือ ความพยายามลด nutrients ซึ่ง supply การ growth และ differentiation ของเซลล์มะเร็ง วิธีการหนึ่ง คือการยับยั้งหรือทำลายการเกิดเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) ที่ไปเลี้ยงกลุ่มเซลล์มะเร็ง (Ribatti D, 2008, He T et al., 2007, Zhong H and Bowen JP, 2006) แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ก็ยังไม่ประสบความสำเร็จดังที่ตั้งจุดประสงค์ไว้ เนื่องจากการที่ขบวนการ angiogenesis เป็น physiological process ซึ่งถูกควบคุมด้วยขบวนการและปัจจัยต่างๆที่ซับซ้อน เนื่องจาก angiogenesis จะเกิดเมื่อเกิดความไม่สมดุลกันระหว่าง the proangiogenic factors และ angiogenic inhibitors กลไกการทำงานรวมทั้งการควบคุม angiogenesis ของ proangiogenic factors และ angiogenesis factors ก็ยังมีขบวนการ signaling pathway ที่ค่อนข้างซับซ้อน และยังไม่มีความรู้ที่เพียงพอที่จะอธิบายได้อย่างชัดเจน (Mousa SA et al., 2006)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสำคัญกับอีกวิธีหนึ่งที่มีความเป็นไปได้มากที่สุดที่จะเป็นวิธีที่จะสามารถลดการ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็งได้ และมีข้อได้เปรียบมากกว่าวิธีอื่นๆ คือ การลดการ growth และ proliferation ที่จำเพาะที่ตัวเซลล์มะเร็ง โดยการลดการนำเข้าของ nutrients ซึ่งจำเป็นในการนำไปใช้การ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็ง โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติอื่นๆของร่างกาย หลักการของวิธีการนี้ มีข้อมูลที่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน คือ เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีอัตราของขบวนการ aerobic glycolysis สูงกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “Warburg effect” ถูกค้นพบโดย Otto Warburg ในปี 1923 ลักษณะที่สำคัญของ Warburg effect ของเซลล์มะเร็งคือ มีการขนส่ง glucose เข้าเซลล์ และขบวนการ glucose consumption ในอัตราที่สูงกว่าเซลล์ปกติ แต่พบว่ามี lactate production ในอัตราที่สูงด้วย ถึงแม้ว่าเซลล์จะอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงพอในขบวนการ oxidative glucose consumption ก็ตาม (aerobic respiration) ซึ่งในเซลล์ปกติ การพบ lactate จะเกิดขึ้นในกรณี anerobic respiration หรือขาดออกซิเจน (Ferreira L.M.R., 2010, DeBerardinis RJ et al., 2008, Meadows AL et al., 2008, (DeBerardinis RJ et al., 2007, Fukuda H et al., 2002) ปรากฏการณ์ Warburg effect นี้ พบว่า mitochondria respiration ลดลง activity ของ enzyme glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็น enzyme ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน pyruvate เป็น lactate ซึ่งจะถูกขับออกจากเซลล์เข้าสู่กระแสเลือด ทำให้สิ่งแวดล้อมรอบๆเซลล์มะเร็งมีสภาพที่เป็นกรด นอกจากนี้ยังพบว่า activity ของ enzyme glycogen synthase ลดลง ซึ่งเป็น enzyme ที่ทำหน้าที่สร้าง glycogen จาก glucose และเซลล์มะเร็งจะมีอัตราของ lipogenesis ที่เกิดจาก de novo fatty acid synthesis (endogenous fatty acid synthesis) สูงมากกว่าเซลล์ปกติซึ่งมีค่อนข้างต่ำ ในเซลล์ปกติจะมีการสร้าง lipid จากอาหาร (dietary หรือ exogenous lipid) และจะมี de novo fatty acid ที่ค่อนข้างต่ำ (Mashima T. et al., 2009, Meadows AL et al., 2008, DeBerardinis RJ et al., 2007) การที่เซลล์มะเร็งมี de novo fatty acid synthesis ที่สูง ก็เพื่อใช้ในการสร้าง cell membrane และส่วนประกอบต่างๆของ cell membrane ซึ่งได้แก่ phospholipids, cholesterol, sphingolipids และ lipid rafts ส่วนประกอบต่างๆเหล่านี้รวมเรียกว่า microdomains ซึ่งมีความสำคัญ คือเกี่ยวข้องกับขบวนการ signal transduction, intracellular trafficking, cell polarization และ cell migration เป็นต้น (Bagnat M and Simons K, 2002, Manes S et al., 1999, Ikonen E and Simons K, 1998) ขบวนการ de novo fatty acid ในเซลล์มะเร็งมีลักษณะที่สำคัญที่แตกต่างจากเซลล์ปกติ คือ ต้องอาศัยสารตั้งต้นภายในเซลล์คือ citrate รวมทั้งการมี lipogenic enzyme expression และ activity ที่เพิ่มขึ้น citrate ซึ่งเป็น key intermediate ในขบวนการ catabolism และ anabolism ของ eukaryotic cells มีแหล่งที่มาทั้งในเซลล์เองและนอกเซลล์ แหล่งที่มาภายในเซลล์ citrate จะถูกสร้างและเก็บอยู่ใน mitochondrial matrix และใช้ในขบวนการ citric acid cycle ในเวลาที่เซลล์ต้องการ energy citrate จะถูก oxidize ได้เป็น NADH และ FADH<sub>2</sub> รวมทั้ง ATP แต่เมื่อเวลาที่เซลล์อยู่ในช่วง excess energy citrate จะถูก transport ออกจาก mitochondrial matrix ผ่าน inner mitochondrial membrane โดย mitochondrial citrate transport protein (CTP) (Kaplan RS et al., 1990, Aluvila S et al., 2010, Sun J et al., 2010) และจะผ่าน outer membrane โดย anion selective channel ออกสู่ cytoplasm mitochondrial CTP จะทำหน้าที่ exchange tricarboxylates เช่น citrate, isocitrate หรือ dicarboxylate เช่น malate, phosphoenolpyruvate CTP เป็นสมาชิกของกลุ่ม mitochondrial transporter family ซึ่งมีขนาดประมาณ 300 amino acids และมี basic isoelectric point (Kaplan RS, 2001) ส่วนแหล่งภายนอกเซลล์นั้น citrate จะถูก uptake เข้ามาในเซลล์โดย sodium-dependent citrate transporter เป็นหลัก (NaCT) (Inoue K et al., 2002, 2003, Fei YJ et al., 2004) หรือเรียกกลุ่มของ transport proteins นี้ว่า plasma membrane citrate transporters (PMCT) (Sun J et al., 2010) NaCT เป็นสมาชิกของ SLC13 gene family ซึ่งจะมี high affinity ต่อ citrate มากกว่า substrate ตัวอื่นๆ ด้วยค่า Km ประมาณ 0.6-6 mM ในมนุษย์

lipogenic enzyme ที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการ de novo fatty acid synthesis คือ ATP citrate lyase (ACL), acetyl-CoA carboxylase (ACC) และ fatty acid synthase (FASN)



ACL จะทำหน้าที่เปลี่ยน cytosolic citrate ให้เป็น acetyl CoA และ oxaloacetate ซึ่ง acetyl CoA จะเป็นแหล่ง immediate carbon source ในการสร้าง fatty acid , triglyceride และ cholesterol acetyl-CoA ส่วน ACC ทำหน้าที่ในการสร้าง malonyl-CoA จาก acetyl CoA และ FASN ทำหน้าที่สร้าง long chain fatty acid

งานวิจัยที่ลดปริมาณ citrate ภายในเซลล์ โดยการลดการ transport citrate จาก mitochondria โดยการทำให้ selectively silencing mitochondrial citrate transport โดยเทคนิค small interfering RNA (siRNA) รวมทั้งการใช้ selective inhibitors รายงานผลว่ามีการลดลงของ lipid biosynthesis ในเซลล์มะเร็งได้ประมาณ 40% (Mizuarai S et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ยับยั้ง enzymes ที่ใช้ในขบวนการ de novo fatty acid synthesis รายงานถึงการลดลงของ fatty acid ภายในเซลล์มะเร็ง ซึ่งส่งผลต่อ cell proliferation การสูญเสีย cell viability และลด tumor size (Brusselmans K et al., 2005, Hatzivassillou G et al., 2005, Pizer ES et al., 1996) ซึ่งในขณะที่การยับยั้ง lipid biosynthesis นี้ไม่ส่งผลกระทบต่อทั้ง cell proliferation และ viability ของเซลล์ปกติ (Chajes V et al., 2006, Brusselmans K et al., 2005, Pizer ES et al., 1996, Kuhajda FP et al., 1994) นอกจากผลที่กล่าวมาแล้ว การยับยั้ง de novo fatty acid synthesis ยังมีประสิทธิภาพในการลดการเกิด metastasis ด้วย เนื่องจาก metastasis เกิดจากการที่เซลล์มะเร็งเคลื่อนที่จาก primary tumor เข้าสู่กระแสเลือด และเดินทางไปยังอวัยวะต่างๆ metastasis ถือว่าเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็ง ดังนั้นการยับยั้ง de novo fatty acid synthesis สามารถเกิดขึ้นได้กับเซลล์มะเร็งทุกเซลล์ทั้งที่ primary tumor และที่ metastasis tissue อีกทั้งยังเป็นวิธีการที่มีความจำเพาะสูงในการยับยั้งการ growth , proliferation และการ metastasis ของเซลล์มะเร็งเท่านั้นโดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติอื่นๆของร่างกาย นอกจาก enzyme ACL, ACC และ FASN แล้ว carnitine palmitoyltransferase-1 (CTP-1) ซึ่งควบคุม mitochondrial fatty acid oxidation ยังเป็น enzyme ที่ต้องคำนึงถึง เนื่องจากการศึกษา anticancer drugs หลายชนิดพบว่า มีผลข้างเคียงคือเกิด anorexia และ body weight loss เนื่องจากการกระตุ้น CTP-1 (Puig T et al., 2011) ดังนั้นการวิจัยที่พยายามหาสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง de novo fatty acid synthesis ไม่ว่าจะเป็นการลดปริมาณ citrate รวมทั้ง enzyme ต่างๆในขบวนการนี้ คือ ACL, ACC และ FASN โดยไม่มีผลต่อ CTP-1 จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดอีกวิธีหนึ่งในการรักษามะเร็ง

จากการศึกษาผลของ commercial drugs ต่อการยับยั้งการ transport ของ citrate โดยการ purify plasma membrane citrate transporter PMCT และ mitochondrial inner membrane citrate transport protein CTP จากนั้นจึง incorporate ใน liposome และศึกษาการ transport ของ [1,5-<sup>14</sup>C citrate] ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ตั้งแต่ 0.05 ถึง 0.75 mM และใช้เวลาการ uptake 3-6 นาทีพบว่า ZINC compound 792949 ที่ความเข้มข้น 1 mM มีผลยับยั้ง CTP 85% แต่มีผลต่อ PMCT เพียง 6% ในขณะที่ ZINC 4180643 มีผลยับยั้งทั้ง CTP และ PMCT และ ZINC

39396 มีผลยับยั้งแค่ PMCT เท่านั้น ซึ่งผลของสารทั้งหมดเหล่านี้ยังไม่ได้มีการทดลองในเซลล์หรือในสัตว์ทดลอง ซึ่งคาดว่า inhibitors เหล่านี้จะเป็อีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้เป็นยารักษามะเร็งได้ และมีความจำเพาะสูงต่อเซลล์มะเร็งเท่านั้น

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์มุ่งเน้นไปที่ศึกษาบทบาทของ citrate transporter inhibitor ต่อขบวนการ de novo lipogenesis และ ER stress ต่อการ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็ง การที่เซลล์มะเร็งมีอัตราของ lipogenesis สูงมาก มากกว่าเซลล์ปกติซึ่งมีค่อนข้างต่ำ ประกอบกับการที่ citrate เป็นแหล่งของ substrate ที่จำเป็นและใช้ในขบวนการ lipogenesis ดังนั้นการยับยั้ง citrate ที่เป็น substrate ในขบวนการ de novo lipogenesis น่าจะมีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นวิธีที่สามารถลดการ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าวิธีอื่นๆ และน่าจะมีผลจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งสูงเช่นเดียวกัน โดยไม่มีผลเสียต่อเซลล์ปกติ และนำไปสู่การทดลองใช้ในสัตว์ทดลอง ทั้งด้านการรักษา ป้องกันมะเร็ง และยับยั้งการ metastasis ของมะเร็ง ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การสร้างยาที่ใช้กับมนุษย์ได้ในอนาคตแทนการใช้ chemotherapy

#### เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Bagnat M, Simons K. Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem*. 2002 Oct;383(10):1475-80.
2. Bang JS, Oh da H, Choi HM, Sur BJ, Lim SJ, Kim JY, Yang HI, Yoo MC, Hahm DH, Kim KS. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1beta-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(2):R49.
3. Bode BP, Fuchs BC, Hurley BP, Conroy JL, Suetterlin JE, Tanabe KK, Rhoads DB, Abcouwer SF, Souba WW. Molecular and functional analysis of glutamine uptake in human hepatoma and liver-derived cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Nov;283(5):G1062-73.
4. Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2005 Aug 1;65(15):6719-25.
5. Bungard CI, McGivan JD. Glutamine availability up-regulates expression of the amino acid transporter protein ASCT2 in HepG2 cells and stimulates the ASCT2-promoter. *Biochem J*. 2004 Aug 15;382(Pt 1):27-32.
6. Burckhardt BC, Lorenz J, Kobbe C, Burckhardt G. Substrate specificity of the human renal sodium dicarboxylate cotransporter, hNaDC-3, under voltage-clamp conditions. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Apr;288(4):F792-9.
7. Chajès V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM, Joulin V. Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res*. 2006 May 15;66(10):5287-94.
8. Chen X, Tsukaguchi H, Chen XZ, Berger UV, Hediger MA. Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel rat sodium-dependent dicarboxylate transporter. *J Clin Invest*. 1999 Apr;103(8):1159-68.
9. Chen XZ, Shayakul C, Berger UV, Tian W, Hediger MA. Characterization of a rat Na<sup>+</sup>-dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem*. 1998 Aug 14;273(33):20972-81.

10. Chou CC and Marth EH. Incorporation of [2-14C] acetate into lipids of Mink (*Mustela vison*) liver and intestine during in vitro and in vivo treatment with aflatoxin B1. *Applied Microbiology* 1975, 30 (6), 946-950.
11. Chu CY, Chang JP, Wang CJ. Modulatory effect of piperine on benzo[a]pyrene cytotoxicity and DNA adduct formation in V-79 lung fibroblast cells. *Food Chem Toxicol.* 1994 Apr;32(4):373-7.
12. Das B, Kundu J, Bachar SC, Uddin MA, Kundu JK. Antitumor and antibacterial activity of ethylacetate extract of *Ludwigia hyssopifolia* linn and its active principle piperine. *Pak J Pharm Sci.* 2007 Apr;20(2):128-31.
13. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 4;104(49):19345-50.
14. Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev.* 2008 Feb;18(1):54-61.
15. Dhuley JN, Raman PH, Mujumdar AM, Naik SR. Inhibition of lipid peroxidation by piperine during experimental inflammation in rats. *Indian J Exp Biol.* 1993 May;31(5):443-5.  
[disease/2004\\_report\\_update/en/index.html](http://www.ijeb.in/2004_report_update/en/index.html)
16. de Mattos Duarte C, Verli H, de Araújo-Júnior JX, de Medeiros IA, Barreiro EJ, Fraga CA. New optimized piperamide analogues with potent in vivo hypotensive properties. *Eur J Pharm Sci.* 2004 Dec;23(4-5):363-9.
17. Duessel S, Heuertz RM, Ezekiel UR. Growth inhibition of human colon cancer cells by plant compounds. *Clin Lab Sci.* 2008 Summer;21(3):151-7
18. Edinger AL, Thompson CB. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell.* 2002 Jul;13(7):2276-88.
19. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3892-9.
20. Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL and Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular Diabetology.* 2006. 5:4 doi: 10.1186/1475-2840-5-4.
21. Fei YJ, Liu JC, Inoue K, Zhuang L, Miyake K, Miyauchi S, Ganapathy V. Relevance of NAC-2, an Na<sup>+</sup>-coupled citrate transporter, to life span, body size and fat content in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J.* 2004 Apr 1;379(Pt 1):191-8.
22. Fei YJ, Sugawara M, Nakanishi T, Huang W, Wang H, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V. Primary structure, genomic organization, and functional and electrogenic characteristics of human system N 1, a Na<sup>+</sup>- and H<sup>+</sup>-coupled glutamine transporter. *J Biol Chem.* 2000 Aug 4;275(31):23707-17.
23. Félétou M. and Vanhoutte P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006. 291:985-1002. doi:10.1152/ajpheart.00292.
24. Folch J, Lebaron FN. The isolation from brain tissue of a trypsin-resistant protein fraction containing combined inositol, and its relation to neurokeratin. *J Neurochem.* 1956 Dec;1(2):101-8.

25. Fukuda H, Ebara M, Okuyama M, Sugiura N, Yoshikawa M, Saisho H, Shimizu R, Motoji N, Shigematsu A, Watayo T. Increased metabolizing activities of the tricarboxylic acid cycle and decreased drug metabolism in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2002 Dec;23(12):2019-23.
26. Gori T, Dragoni S, Stolfo G. D, and Forconi S. Endothelium and haemorheology. *Ann Ist Super Sanità*. 2007. Vol. 43, No. 2: 124-129.
27. Gülçin I. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *Int J*
28. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, Hingorani SR, Tuveson DA, Thompson CB. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*. 2005 Oct;8(4):311-21.
29. He T, Xing YQ, Zhao XH, Ai M. Interaction between iNOS and COX-2 in hypoxia-induced retinal neovascularization in mice. *Arch Med Res*. 2007 Nov;38(8):807-15.
30. Hu Y, Guo DH, Liu P, Rahman K, Wang DX, Wang B. Antioxidant effects of a *Rhodobryum roseum* extract and its active components in isoproterenol-induced myocardial injury in rats and cardiac myocytes against oxidative stress-triggered damage. *Pharmazie*. 2009 Jan;64(1):53-7.
31. Hu Y, Liao HB, Liu P, Guo DH, Wang YY. Antidepressant effects of piperine and its neuroprotective mechanism in rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2009. Jul; 7(7):667-70.
32. Ikonen E, Simons K. Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin Cell Dev Biol*. 1998 Oct;9(5):503-9.
33. Inchan A., Promma P, Chintana P, Chootip K. Cardiovascular action of *Piper longum* *Planta Med.*. 2008. 74: 9, P:942.
34. Inchan, A. and Chootip, K. Vascular action and mechanism of action of black pepper (*Piper nigrum* L). *Proceedings of Naresuan Research Conference 2006*. p7-13.
35. Inoue K, Zhuang L, Maddox DM, Smith SB, Ganapathy V. Human sodium-coupled citrate transporter, the orthologue of *Drosophila* Indy, as a novel target for lithium action. *Biochem J*. 2003 Aug 15;374(Pt 1):21-6.
36. Inoue K, Zhuang L, Ganapathy V. Human Na<sup>+</sup>-coupled citrate transporter: primary structure, genomic organization, and transport function. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Dec 6;299(3):465-71.
37. Inoue K, Zhuang L, Maddox DM, Smith SB, Ganapathy V. Structure, function, and expression pattern of a novel sodium-coupled citrate transporter (NaCT) cloned from mammalian brain. *J Biol Chem*. 2002 Oct 18;277(42):39469-76.
38. Iwashita M., Oka N., Ohkubo S., Saito M. and Nakahata N. Piperlongumine, a constituent of *Piper longum* L., inhibits rabbit platelet aggregation as a thromboxane A2 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol*. 2007a. 570, 38-42.
39. Iwashita M., Saito M., Yamaguchi Y., Takagaki R. and Nakahata N. Inhibitory effect of ethanol extract of *Piper longum* L. on rabbit platelet aggregation through antagonizing thromboxane A2 receptor. 2007b. *Biol. Pharm. Bull.* 30 (7), 1221-1225.
40. Jin Z, Borjihan G, Zhao R, Sun Z, Hammond GB, Uryu T. Antihyperlipidemic compounds from the fruit of *Piper longum* L. *Phytother Res*. 2009 Aug;23(8):1194-6.

41. Kaplan RS. Structure and function of mitochondrial anion transport proteins. *J Membr Biol.* 2001 Feb 1;179(3):165-83.
42. Kaplan RS, Mayor JA, Johnston N, Oliveira DL. Purification and characterization of the reconstitutively active tricarboxylate transporter from rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1990 Aug 5;265(22):13379-85.
43. Kapoor IP, Singh B, Singh G, De Heluani CS, De Lampasona MP, Catalan CA. Chemistry and in vitro antioxidant activity of volatile oil and oleoresins of black pepper (*Piper nigrum*). *J Agric Food Chem.* 2009 Jun 24;57(12):5358-64.
44. Kapoor IP, Singh B, Singh G, De Heluani CS, De Lampasona MP, Catalan CA. Chemistry and in vitro antioxidant activity of volatile oil and oleoresins of black pepper (*Piper nigrum*). *J Agric Food Chem.* 2009. Jun 24;57(12):5358-64.
45. Keay S, Grossberg SE. Interferon inhibits the conversion of 3T3-L1 mouse fibroblasts into adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Jul;77(7):4099-103.
46. Khajuria A, Thusu N, Zutshi U, Bedi KL. Piperine modulation of carcinogen induced oxidative stress in intestinal mucosa. *Mol Cell Biochem.* 1998 Dec;189(1-2):113-8.
47. Khazaei M, Moien-afshari F and Laher I. Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology.* 2008. 15: 49-67.
48. Khajuria A, Thusu N, Zutshi U. Piperine modulates permeability characteristics of intestine by inducing alterations in membrane dynamics: influence on brush border membrane fluidity, ultrastructure and enzyme kinetics. *Phytomedicine.* 2002 Apr;9(3):224-31.
49. Koen Brusselmans, Ruth Vrolix, Guido Verhoeven, and Johannes V. Swinnen. Induction of Cancer Cell Apoptosis by Flavonoids Is Associated with Their Ability to Inhibit Fatty Acid Synthase Activity. *J. Biol. Chem.* 2005, February 18, Vol. 280, Issue 7, 5636-5645.
50. Koul I.B. and Kapil A. Evaluation of the liver protective potential of piperine, an active principle of black and long peppers. *Planta. Med.* 1993. 59, 413-417.
51. Krishnakumar N, Manoharan S, Palaniappan PR, Venkatachalam P and Manohar MG. Chemopreventive efficacy of piperine in 7, 12-dimethyl benz [a] anthracene (DMBA) - induced hamster buccal pouch carcinogenesis: An FT-IR study. *Food Chem Toxicol.* 2009.  
doi:10.1016/j.fct.2009.08.017
52. Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, Dick JD, Pasternack GR. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jul 5;91(14):6379-83.
53. Kumar S, Arya P, Mukherjee C, Singh BK, Singh N, Parmar VS, Prasad AK, Ghosh B. Novel aromatic ester from *Piper longum* and its analogues inhibit expression of cell adhesion molecules on endothelial cells. *Biochemistry.* 2005 Dec 6;44(48):15944-52.
54. Kumar S, Singhal V, Roshan R, Sharma A, Rembhotkar GW, Ghosh B. Piperine inhibits TNF- $\alpha$  induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B kinase activation. *Eur J Pharmacol.* 2007 Dec 1;575(1-3):177-86.

55. Lee CS, Han ES, Kim YK. Piperine inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial dysfunction and cell death in PC12 cells. *Eur J Pharmacol.* 2006 May 10;537(1-3):37-44.
56. Lee S.W., Rho M.C., Nam J.Y., Lim E.H., Kwon O.E., Kim Y.H., Lee H.S. and Kim Y.K. Guineensine, an Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitor, from the fruits of *Piper longum*. *Planta Med.* 2004. 70, 678-679.
57. Lee SA, Hong SS, Han XH, Hwang JS, Oh GJ, Lee KS, Lee MK, Hwang BY, and Ro JS. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2005 Jul;53(7):832-5.
58. Li S, Wang C, Li W, Koike K, Nikaido T, Wang MW. Antidepressant-like effects of piperine and its derivative, antiepilepsirine. *J Asian Nat Prod Res.* 2007 Apr-Aug;9(3-5):421-30.
59. Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, Sherman M, Schwartz M, Lotze M, Talwalkar J, Gores GJ; Panel of Experts in HCC-Design Clinical Trials. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2008 May 21;100(10):698-711.
60. Mañes S, Mira E, Gómez-Moutón C, Lacalle RA, Keller P, Labrador JP, Martínez-A C. Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *EMBO J.* 1999 Nov 15;18(22):6211-20.
61. Manoharan S, Balakrishnan S, Menon VP, Alias LM, Reena AR. Chemopreventive efficacy of curcumin and piperine during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med J.* 2009 Feb;50(2):139-46.
62. Mazzaferro V, Chun YS, Poon RT, Schwartz ME, Yao FY, Marsh JW, Bhoori S, Lee SG. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2008 Apr;15(4):1001-7.
63. Meadows AL, Kong B, Berdichevsky M, Roy S, Rosiva R, Blanch HW, Clark DS. Metabolic and morphological differences between rapidly proliferating cancerous and normal breast epithelial cells. *Biotechnol Prog.* 2008 Mar-Apr;24(2):334-41.
64. McCloskey Diane E, Casero Robert A, Woster Patrick M and Davidson Nancy E. Induction of programmed cell death in human breast cancer cells by an unsymmetrically alkylated polyamine analogue. *Cancer Research* 1995, 55, 3233-3236.
65. Mittal Rand Gupta RL. In vitro antioxidant activity of piperine. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2000 Jun;22(5):271-4.
66. Mizuarai Shinji, Miki Satomi, Araki Hiromitsu Takahashi Kazuhiko and Kotani Hidehito. Identification of dicarboxylate carrier Slc25a10 as malate transporter in de novo fatty acid synthesis. *J Biol Chem* 2005, 280, 32434-32441.
67. Mousa SA, O'Connor L, Davis FB, Davis PJ. Proangiogenesis action of the thyroid hormone analog 3,5-diiodothyropropionic acid (DITPA) is initiated at the cell surface and is integrin mediated. *Endocrinology.* 2006 Apr;147(4):1602-7.
68. Mujumdar AM, Dhuley JN, Deshmukh VK, Raman PH, Naik SR. Anti-inflammatory activity of piperine. *Jpn J Med Sci Biol.* 1990 Jun;43(3):95-100.
69. Naidu KA and Thippeswamy NB. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from spices. *Mol Cell Biochem.* 2002 Jan;229(1-2):19-23.

70. Naseri MK and Yahyavi H. Pak J Biol Sci. Antispasmodic effect of Piper nigrum fruit hot water extract on rat ileum. 2008 Jun 1;11(11):1492-6.
71. Ookhtens M, Kannan R, Lyon I, Baker N. Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. Am J Physiol. 1984 Jul;247(1 Pt 2):R146-53.
72. Ononiwu IM, Ibeneme CE, Ebong OO. Effects of piperine on gastric acid secretion in albino rats. Afr J Med Med Sci. 2002 Dec;31(4):293-5.
73. Pajor AM. Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. Pflugers Arch. 2006 Feb;451(5):597-605.
74. Pajor AM. Molecular properties of sodium/dicarboxylate cotransporters. J Membr Biol. 2000 May 1;175(1):1-8.
75. Pajor AM, Sun N. Functional differences between rabbit and human Na(+)-dicarboxylate cotransporters, NaDC-1 and hNaDC-1. Am J Physiol. 1996 Nov;271(5 Pt 2):F1093-9.
76. Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. Pflugers Arch. 2004 Feb;447(5):689-709.
77. Panda S and Kar A. Piperine lowers the serum concentrations of thyroid hormones, glucose and hepatic 5'D activity in adult male mice. Horm Metab Res. 2003 Sep;35(9):523-6.
78. Park BS, Son DJ, Park YH, Kim TW and Lee SE. Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of *Piper longum* L. Phytomed. 2007. 4: 853-855.
79. Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. Cancer Res. 1996 Jun 15;56(12):2745-7.
80. Pizer ES, Wood FD, Pasternack GR and Kuhajda FP. Fatty acid synthase (FAS): A target antimetabolites in HL60 promyelocytic leukemia cells. Cancer research 56 (15), 745-751, 1996.
81. Pradeep CR and Kuttan G. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. Int Immunopharmacol. 2004 Dec 20;4(14):1795-803.
82. Raghavendra RH and Naidu KA. Spice active principles as the inhibitors of human platelet aggregation and thromboxane biosynthesis. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2009 Jul;81(1):73-8.
83. Ribatti D. The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. Angiogenesis. 2008 Jun 21.
84. Selvendiran K, Prince Vijeya SJ. and Sakthisekaran D. In vivo effect of piperine on serum and tissue glycoprotein levels in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics. 2006. 19; 107-111.
85. Singh TU, Kumar D, Tandan SK and Mishra SK. Inhibitory effect of essential oils of *Allium sativum* and *Piper longum* on spontaneous muscular activity of liver fluke, *Fasciola gigantica*. Exp Parasitol. 2009. Aug 11. [Epub ahead of print]
86. Srisawang P, Chatsudthipong A, Chatsudthipong V. Modulation of succinate transport in Hep G2 cell line by PKC. Biochim Biophys Acta. 2007 Jun;1768(6):1378-88.

87. Sunila ES and Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. *J Ethnopharmacol.* 2004 Feb;90(2-3):339-46.
88. Swinnen JV, Beckers A, Brusselmans K, Organe S, Segers J, Timmermans L, Vanderhoydonc F, Deboel L, Derua R, Waelkens E, De Schrijver E, Van de Sande T, Noël A, Fougelle F, Verhoeven G. Mimicry of a cellular low energy status blocks tumor cell anabolism and suppresses the malignant phenotype. *Cancer Res.* 2005 Mar 15;65(6):2441-8.
89. Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006 Jul;9(4):358-65.
90. Swinnen JV, Heemers H, Van De Sande T, De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G. Androgens, lipogenesis and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 Nov;92(4):273-9.
91. Swinnen JV, Veldhoven Paul P, Esquenet Murielle, Heyns Walter and Verhoeven Guido. Androgens markedly stimulate the accumulation of neutral lipids in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Endocrinology* 137 (10), 4468-4474, 1996.
92. Taqvi SI, Shah AJ, Gilani AH. Blood pressure lowering and vasomodulator effects of piperine. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008 Nov;52(5):452-8.
93. Thomas M, Sujatha KS and George S. Protective effect of Piper longum Linn. on monosodium glutamate induced oxidative stress in rats. *Indian J Exp Biol.* 2009 Mar;47(3):186-92.
94. Unchern S, Nagata K, Saito H, Fukuda J. Piperine, a pungent alkaloid, is cytotoxic to cultured neurons from the embryonic rat brain. *Biol Pharm Bull* 1994, Mar 17(3): 403-6
95. Unnikrishnan MC and Kuttan R, Tumor reducing and anticarcinogenic activity of selected spices. *Cancer Lett.* 1990. 51; 85-89
96. Vijayakumar RS and Nalini N. Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent from Piper nigrum on erythrocyte antioxidant status in high fat diet and antithyroid drug induced hyperlipidemic rats. *Cell Biochem Funct.* 2006a. 24(6):491-8.
97. Vijayakumar RS and Nalini N. Piperine, an active principle from Piper nigrum, modulates hormonal and apo lipoprotein profiles in hyperlipidemic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2006b. 17(2):71-86.
98. Vijayakumar RS, Surya D, Nalini N. Antioxidant efficacy of black pepper (Piper nigrum L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Rep.* 2004;9(2):105-10.
99. Walzer N, Kulik LM. Hepatocellular carcinoma: latest developments. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008 May;24(3):312-9.
100. Wang H, Fei YJ, Kekuda R, Yang-Feng TL, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V. Structure, function, and genomic organization of human Na(+)-dependent high-affinity dicarboxylate transporter. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 May;278(5):C1019-30.
101. Wattanathorn J, Chonpathompikunlert P, Muchimapura S, Priprem A, Tankamnerdthai O. Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. *Food Chem Toxicol.* 2008. Sep;46(9):3106-10.
102. Wieman HL, Wofford JA, Rathmell JC. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol Biol Cell.* 2007 Apr;18(4):1437-46.



103. Woo HM, Kang JH, Kawada T, Yoo H, Sung MK, Yu R. Active spice-derived components can inhibit inflammatory responses of adipose tissue in obesity by suppressing inflammatory actions of macrophages and release of monocyte chemoattractant protein-1 from adipocytes. *Life Sci.* 2007 Feb 13;80(10):926-31.
104. World Health Organization. <http://www.who.int/whosis/whostat/2008/en/index.html>
105. World Health Organization. <http://www.who.int/whosis/whostat/2007/en/index.html>
106. Yamazaki S, Takayama T. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma: evidence-based outcomes. *World J Gastroenterol.* 2008 Feb 7;14(5):685-92.
107. Zhong H, Bowen JP. Antiangiogenesis drug design: multiple pathways targeting tumor vasculature. *Curr Med Chem.* 2006;13(8):849-62.

## วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

### ระเบียบวิธีวิจัย

#### 1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2

Human hepatocellular carcinoma, HepG2 cells ซึ่งสั่งซื้อจาก the American Type Culture Collection (ATCC) โดยเซลล์จะเพาะเลี้ยงใน 37°C a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere โดยใช้ media ชนิด DMEM ซึ่ง supplement ด้วย 10% fetal bovine serum, 3 mM L-glutamine, 100 µg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin. โดยเซลล์จะถูก subculture ประมาณ 2 ครั้ง/สัปดาห์

ส่วน Primary human hepatocytes สั่งซื้อจาก Prof. Dr. Lysiane Richert, Scientific director KaLy-Cell, 20A, rue du Général Leclerc, 67115 Plobsheim – France

#### 2. วิเคราะห์ผลของสารต่อ cell viability และ proliferation

เพื่อศึกษาผลของสาร ต่อ cell viability และ proliferation cell จะถูกวิเคราะห์โดย trypan blue staining และ MTT assay โดย cells เพาะเลี้ยงใน 96-well plates ที่ density of  $1 \times 10^5$  cells/100 µL/well สามารถวิเคราะห์โดยใช้ trypan blue staining และ counted ใน hemocytometer ส่วน cell proliferation จะวิเคราะห์โดยใช้ 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ซึ่งจะ seed เซลล์ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  cells/well ใน 96 well plate เมื่อ incubate ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆด้วยสารสกัด แล้ว นำ MTT ที่ ละลายใน PBS ใส่ในเซลล์ ที่ความเข้มข้น 0.5mg/mL และ incubate ที่ 37°C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะ add formazan ที่ละลายใน DMSO ในปริมาณ 150 µL/well และวัดค่า absorbance โดย Synergy HT Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA) ที่ 540 nm โดยใช้ DMSO เป็น blank และคำนวณ Inhibition rate (%) = (blank control OD-drug treated OD)/blank control OD × 100 โดยใช้ Graph Pad Prism version 5

### 3. วิเคราะห์การตายของเซลล์ชนิด apoptosis

เพื่อยืนยันผลว่าสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ มีผลทำให้เซลล์ตายชนิด apoptosis หลังจาก 24 h growth, cells จะถูก treated ด้วย concentrations และระยะเวลาที่ต่างกันของสาร และนำมา stain ด้วย Alexa Fluor® 488 annexin V/ propidium iodide (PI) Dead Cell Apoptosis Kit (Life technology, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) และวัดอัตราการเกิด apoptotic โดย flow cytometry analysis ด้วยเครื่อง FACScalibur flow cytometry (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) และคำนวณอัตราการเกิดด้วย CellQuestPro software (BD)

### 4. วิเคราะห์ Cell cycle analysis โดย Flow Cytometry

เพื่อศึกษาผลของสารต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ จะใช้วิธีวัด cell cycle arrest ตามหลักการดังนี้

การวิเคราะห์เซลล์ cell cycle parameters และ percentage ของ cells ที่เป็น hypodiploid DNA content (apoptotic cells) สามารถทำได้โดย means of flow cytometry โดยอาศัยหลักการของ propidium iodide (PI) staining. ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. หลังจาก 24 h growth, cells จะถูก treated ด้วย concentrations และระยะเวลาที่ต่างกันของสาร เซลล์จะถูก trypsinization , washed ด้วย ice-cold PBS และ fix โดย 70% ice-cold ethanol aqueous solution เป็นระยะเวลา 1 ชม. on ice และเก็บไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะ analysis

2. ก่อนทำการ analysis เซลล์จะถูก washed twice ด้วย PBS และ incubated โดย phosphate-citrate buffer (0.192 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 4 mM citric acid, pH 7.8) ซึ่งมี 0.25 mg/mL heat-inactivated ribonuclease A and 33  $\mu\text{g}/\text{mL}$  propidium iodide เป็นเวลา 1 h ที่ room temperature โดยไม่มีแสง

3. หลังจาก incubation, cell DNA content จะถูกวิเคราะห์โดย fluorescence intensity โดย flow cytometer FACScalibur flow cytometry ด้วย CellQuestPro software และ at least  $2.5 \times 10^4$  events จะถูกบันทึก และ numbers of cells in each part of the histogram แสดงถึง  $<2N$ ,  $2N$ ,  $2N-4N$ , and  $4N$  DNA content โดยใช้ CXP software

### 5. วิเคราะห์การ disruption ของ mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )

การเสีย  $\Delta\Psi_m$  ของ HepG2 cells จะสามารถวิเคราะห์ได้โดย the membrane-permeant JC-1 Dye-Mitochondrial Membrane Potential Probe (Life Technologies) และ analyzed โดย FACScalibur flow cytometry ใช้ CellQuestPro software ในสถานะที่ mitochondria ปกติ จะพบการสะสมของ positively charged JC-1 ที่ electronegative ภายใน mitochondria และจะให้ fluorescence emission shifted จาก green ( $\sim 529$  nm) เป็น red ( $\sim 590$  nm) Mitochondrial depolarization หรือการเสีย potential ของ mitochondria จะสามารถวัดได้โดย

การลดลงของ the red/green fluorescence intensity ratio จากการลดการเข้าของ JC-1 สู่ ภายใน mitochondria

6. วิเคราะห์การแสดงออกของ protein ในขบวนการสร้าง de novo lipogenesis คือ

FASN

ACC

ACLY

SCID

วิเคราะห์การแสดงออกของ protein intracellular signaling pathway ที่ควบคุม de novo lipogenesis คือ

PI3K

AKT

ERK

mTORC

SREBPs

วิเคราะห์การแสดงออกของ ER stress protein คือ

transcription factor 4 (ATF4)

transcription factor 6 (ATF6)

X-box binding proteins 1 (XBP-1)

C/EBP homologous protein (CHOP)

โดย Western blotting techniques ซึ่งมีวิธีการคือ Total cytosolic protein จะ ถูก extracted โดย M-PER<sup>®</sup> mammalian protein extraction reagent และ quantified โดย BCA protein assay reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) โดยใช้ Synergy HT Microplate Reader ด้วย Gen5 Data Analysis software Cytosolic proteins จะถูกแยกโดย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ transferred ลง PVDF membranes (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) ด้วยเครื่อง iBlot<sup>®</sup> 7-Minute Blotting System using 8 minutes for transferring (Life technology, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) หลังจากนั้น Membranes จะนำมา incubated primary antibody โดยการใช้  $\beta$ -actin (Abcam, Biomed Diagnostics Co.,Ltd, Thailand) เป็น internal standard เพื่อยืนยัน integrity และ equal protein loading. หลังจากนั้น protein band จะสามารถ developed โดยใช้ Lunimata Crescendo Western HRP chemiluminescence detection reagents (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) โดยที่ intensity ของ protein bands สามารถวัดโดยเครื่อง CCD camera (ImageQuant

LAS 4000; GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) ปริมาณ Protein expression สามารถวัดค่าโดย ImageJ software version 1.46 และแสดงผลเป็น ratio ของ FASN, ACC and ACLY band intensity เปรียบเทียบกับ  $\beta$ -actin band intensity ใน blot แผ่นดซเดียวกัน (FASN/ $\beta$ -actin [%])

#### 7. วิเคราะห์ FASN activity

FASN activity สามารถวิเคราะห์ได้โดยอาศัยหลักการของ spectrophotometric method โดย Kant S et al. [25,26]. extracted protein ที่ได้ จะนำมาผสมกับ reaction mixture ที่ประกอบด้วย potassium phosphate buffer, EDTA, dithiothreitol, acetyl-CoA, และ NADPH และนำมาวัดค่า Absorbance ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 nm โดย Synergy HT Microplate Reader เป็นระยะเวลา 30 นาที เพื่อวัดค่า NADPH oxidation หลังจากนั้น Malonyl-CoA ที่ความเข้มข้น 50 mM จะถูกเติมเข้ามาใน reaction mixture วัดค่า Absorbance ต่ออีก 10 นาที เพื่อวัดค่า FASN-dependent oxidation of NADPH FASN activity สามารถแสดงเป็นค่า nmol NADPH oxidized/min/mg protein

#### 8. วิเคราะห์ intracellular long chain free fatty acid quantification assay

FASN activity สามารถวิเคราะห์ ได้โดยการวัดปริมาณของ long chain free fatty acid synthesis โดยการใช้ Free fatty acid quantification kit (Abcam, Blomed Diagnostics Co., Ltd, Thailand) [26] ซึ่งหลักการ คือ การเปลี่ยน long chain free fatty acid ที่ extracted มาจาก cytosol เป็น CoA derivatives และใส่ fluorescent probe ลงไป หลังจากนั้นนำไปวัดค่า ด้วยเครื่อง fluorometric ที่ Ex/Em 535/590 nm โดยใช้ Synergy HT Microplate Reader ด้วย Gen5 Data Analysis software ค่าของปริมาณ long chain fatty acid จะแสดงเป็น percentage of intracellular long chain fatty acid เมื่อเปรียบเทียบกับ control

#### 9. การวิเคราะห์การเกิด ROS ภายในเซลล์

โดยใช้สาร fluorescent dye 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) (Molecular probe, Oregon, USA) ซึ่งเป็น chloromethyl derivative of H<sub>2</sub>DCFDA โดยสารนี้จะแพร่เข้าเซลล์ acetate group จะถูก cleave โดย intracellular esterase ได้เป็น H<sub>2</sub>DCF แล้ว ROS จะ oxidize H<sub>2</sub>DCF เป็น DCF (2',7' dichlorodihydrofluorescein) สามารถนำไปวัด fluorescence ได้ วิธีการคือ เซลล์ จะ culture ใน dish ที่  $5 \times 10^5$  cells เมื่อ 24 ชม เซลล์จะถูก treated ด้วย 2.5mM PMCT inhibitor ใน 0.2% DMSO โดยมี 0.1mM C75 เป็น positive control เป็นเวลา 24 ชม หลังจากนั้นนำเซลล์มา incubate ด้วย 10 $\mu$ M CM-H<sub>2</sub>DCFDA ใน CO<sub>2</sub> incubator เป็นเวลา 45 นาที ภายใต้ภาวะไม่มีแสง และนำไป incubate ด้วย EMEM (10% FBS) เป็นเวลา 20 นาที ที่ 37 °C เซลล์จะถูกนำไป analyze ด้วย flow cytometry ที่ Ex/Em ~492–495/517–527 nm (CellQuestPro software (BD))

#### 10. วิเคราะห์ CPT-1 activity

CPT-1 activity สามารถวัดได้โดย mitochondrial fraction ที่สกัดแยกด้วย Mitochondria/Cytosol/Fractionation kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) จะนำมาผสมกับ Tris-buffer that contains of EDTA, Triton X-100, DTNB, palmitoyl-CoA และนำไปวัด

ค่า Absorbance 412 nm เป็นเวลา 5 นาที โดย Synergy HT Microplate Reader หลังจากนั้น L-Carnitine จะถูกใส่ลงไปใน reaction mix วัดค่า Absorbance ต่ออีก 5 นาที ค่าของปริมาณ CPT-1 activity จะแสดงเป็น percentage of CPT-1 (nmol/min/mg protein) เมื่อเปรียบเทียบกับ control

#### 11. สถิติ

การทดลองนี้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่เปลี่ยนแปลงโดยใช้ one way analysis of variance (ANOVA) และใช้ Duncann test ทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติและค่าระดับความเชื่อมั่นอย่างน้อยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $P < 0.05$  โดยจะแบ่งกลุ่มการทดลองเพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยแต่ละกลุ่มจะใช้จำนวนซ้ำ อย่างน้อย 3 แสดงด้วย mean  $\pm$  SEM or SD



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell cultures**

Human colorectal carcinoma cell lines, HCT116 (ATCC CCL-247™) and HT29 (ATCC HTB-38™) were kindly provided from Assistance Professor Dr. Damratsamon Surangkul and Assistance Professor Dr. Metawee Srikammul, Department of biochemistry, Narasuan University, Thailand. Cells were cultured in McCoy's medium (Corning, USA) containing 10% fetal bovine serum (Gibco, Thermo fisher scientific, USA) and 1% antibiotic (Gibco, Thermo fisher scientific, USA) and incubated in 37 °C at 5% CO<sub>2</sub> humidifier incubator. In addition, human hepatocellular cell line, HepG2 (JCRB1054) and HuH-7 (JCRB0403) cells were obtained from JCRB Cell Bank (Osaka, Japan). HepG2 and HuH-7 cells were cultured in DMEM medium (Corning, USA) consist of 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Thermo fisher scientific, USA).

### **Determination of cell viability by MTT assay**

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (AMRESCO, Solon, OH, USA) assay was used to evaluate cancer cell viability after treatment. Cells were plated in 96-well plates for 24 h. After 24 h, cells were incubated with EGCG (CAS Number 989-51-5) (Merck Millipore, USA) with various concentrations for 24 h. The control cells were incubated with 0.1% DMSO only. After 24 h of treatment, cells were added MTT solution (10 mg/ml) and incubated for 4 h in a CO<sub>2</sub> incubator. Formazan violet crystals of MTT were dissolved by DMSO and detected absorbance at 595 nm wavelength by a microplate reader (BioTek instrument, Inc., Winooski, VT, USA) (BioTek). In addition, percentages of cell viability were calculated and compared with the control by Graph pad prism version 5.

### **Evaluation stages of apoptosis by Annexin V/PI staining**

Apoptosis assay was performed using double staining including Annexin V and Propidium Iodine (PI) (Life science, Thermo fisher scientific, USA) which conjugate with phosphatidyl serine (PS) at the outer membrane of cells to indicate an early state of apoptosis and DNA content in the nucleus to indicate a late stage of apoptosis, respectively (30). Cells were seeded in 24-well plates and incubated overnight. Cells were collected after 24 h of treatment and stained with annexin binding buffer containing Alexa Fluor 488 annexin V and PI at room temperature under light

protection. Apoptotic rates were analyzed by FACScalibur flow cytometry using CellQuestPro software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA).

### **Investigation of mitochondrial membrane potential (MMP) by JC-1 staining**

Mitochondrial membrane potential (MMP,  $\Delta\Psi_m$ ) damage is a center and initiator of apoptosis in various cancer cells (31). Cells were stained using 5,6-dichloro-2-[3-(5,6-dichloro-1,3-diethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-ylidene)-1-propenyl]-1,3-diethyl-, iodide (JC-1) (Invitrogen, USA), a cationic mitochondrial membrane potential fluorescence probe. A high polarization state of  $\Delta\Psi_m$  presents the positively charges of JC-1 accumulated in the electronegative interior of the mitochondrial matrix and exhibits red fluorescence emission at 590 nm, while disruption of  $\Delta\Psi_m$  shows decreasing of dye accumulated in mitochondrial matrix and increasing of monomeric form in the cytoplasm which emits green fluorescence at 530 nm. The decreasing of red/green fluorescence intensity ratio represents a dissipation of  $\Delta\Psi_m$  (32). Cells were cultured in 24-well plate for 24 h of seeding period. Cells were harvested after 24 h of treatment. CCCP at a final concentration of 50  $\mu\text{M}$  was used as a positive control to verify the depolarization state of  $\Delta\Psi_m$ . Cells were subjected to 20  $\mu\text{M}$  of JC-1 in  $\text{CO}_2$  incubator for 45 minutes and detected by FACScalibur flow cytometry using excitation at 488 nm and emission 585/42 filter. Data were analyzed using CellQuestPro software.

### **Xenograft nude mice models**

All experimental procedures of animal were complied with the standard research protocol of animal care and use established under the ethical guidelines and policies of Naresuan University and Office of the National Research Council of Thailand (NRCT) and the Act. Animals for scientific purposes B.E. 2558 and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of Naresuan University of Thailand. Male BALB/c nude mice (aging 4-8 weeks) were purchased from Nomura Siam international, Thailand. Mice were acclimatized and housed in pathogen-free conditions (sterile food and water) in air-controlled rooms with a 12-h light/dark cycle at the Center for Animal Research, Naresuan University, Thailand. HCT116 cells at density  $1 \times 10^7$  cells were injected subcutaneously at the right flank area of mice. After tumor reaching of 100-150  $\text{mm}^3$ , mice were randomly divided into 4 groups which were treated with 1) 0.1% DMSO (Vehicle), 2) 30 mg/kg EGCG (Low dose), 3) 50 mg/kg EGCG (High dose), and 4) 20 mg 5-fluorouracil (5-FU) (Sigma, Millipore, USA) acting as a positive control (33, 34). Vehicle, EGCG and 5-FU were administered

1050696



intraperitoneal injection every day for 7 days. Tumor size and body weight were measured every day. At the end of experiment, all experimental animals were euthanized to collect tumor and internal organs. Tumor weight was also measured. Percentages of tumor volume, tumor size, and body weight were calculated and compared with the control by Graph pad prism version 5.

27 เม.ย. 2565

#### **Measurement of protein level by immunoblotting assay**

Both colorectal cell line at  $1 \times 10^6$  cells/35-mm<sup>3</sup> dish and Fresh tumor tissue at 50 mg were homogenized in M-PER (Thermo Fisher Scientific, USA) and RIPA buffer containing 2% phosphatase inhibitor and 1% proteinase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, USA), respectively. Concentration of protein was measured by BCA assay reagent (Thermo Fisher Scientific, USA). Aliquots of 50  $\mu$ g lysate were separated by 8-12% (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes. Then, non-specific proteins on membrane were blocked using RAPID-BLOCK solution (Thermo Fisher Scientific, USA). Membrane was then probed with specific primary antibodies: PI3K, P70S6K, p-P70S6K, ERK1/2, p-ERK1/2, ACLY, DAPK2, and Bcl2 (Merck Millipore, USA) at 1:1000 dilution; mTOR, Akt, p-Akt, 4EBP1, ACC, Bak, and  $\beta$ -actin (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) at 1 : 500 dilution; p-mTOR, SREBP1C, FASN, and BNIP3 (Abcam, USA) at 1:500 dilution; caspase8 and caspase3 (Thermo Fisher Scientific, USA) at 1:400 dilution. Consequently, specific protein was conjugated with anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) or anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology) at 1:7000 dilution. Finally, LuminataTM Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore, USA) was added for visualizing proteinband which was then detected by CCD camera (Chemiluminescence Image Quant LAS 4000; GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA). Protein bands were calculated into percentage of relative expression level of protein/actin compared with the control by Image J software version 1.46.

#### **Immunohistochemistry (IHC) and histological assays**

The tumor tissue specimens were fixed in 10% neutral formaldehyde, embedded and sectioned at 3  $\mu$ m thick slides. Tumor slides were performed antigen retrieval by sodium citrate buffer, Block endogenous peroxidase activity by 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and permeabilized by 4% FBS. Consequently, each slides were incubated with specific primary antibodies for 4 h at 4 °C overnight. Then, tissue slides were conjugated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Cell Signaling Technology,



Beverly, MA, USA) or anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology) secondary antibodies. Finally, specific proteins were developed intensity of brown color by 3,3'-Diaminobenzidine(DAB) substrate (Dako North America, Inc, USA), counter stained by hematoxylin, and visualized by light microscope ()

Cytotoxicity effect of EGCG on tumor tissues and internal organs was investigated using hematoxylin and eosin staining. A whole tissue of every animal in each group were sectioned and examined. Paraffin-embedded tissue specimens were sectioned at 3  $\mu$ M thick and mounted on coat glass slides. The tissue section was deparaffinized by xylene and rehydrated by serial concentration of alcohol from 100% to 70%. Then, slides were stained by hematoxylin for 6-7 min followed by eosin staining approximately for 1 min. Finally, morphology changes of cell in tissue section was visualized under light microscopy ()

#### **Fatty acid assay kit**

Level of free fatty acid in tumor tissue was investigated using the Free Fatty acid Quantification Kits (US, Biological, MA, USA). Tumor tissue at 10 mg was homogenized in 1% Triton-X in Chloroform and centrifuge at 15,000 g for 10 min. The lower phase of homogenized fatty acid was collect by vacuum dried chloroform for 30 min at 60°C. Next, dried lipids were dissolved in free fatty acid buffer and then Acyl-CoA synthase (ACS) was added. Reaction mix was added into lipid sample and incubated at 37°C for 30 min. Finally, level of free fatty acid was detected by microplate reader at Ex/Em 535/590 nm and calculated percentages of free fatty acid level compared with the control by Graph pad prism version 5.

#### **ATP assay kit**

Adenosine triphosphate (ATP) level was detected using ATP Quantification Kits (US, Biological, MA, USA). Tumor tissue at 10 mg was extracted in ATP assay buffer and centrifuged at 13,000 g for 5 min. Then, supernatant was harvested, reaction mix was added and incubated for 30 min at room temperature. Finally, the level of ATP was measured by microplate reader at Ex/Em 535/587 nm and percentage of ATP level was calculated by Graph prism version 5.

#### **Statistical analysis**

All statistical analyses were conducted using Graph Prism Software version 5. All data were analyzed and shown as mean  $\pm$  SEM using unpaired Student's t test with Turkey's post-hoc analysis or one-way analysis of variance (ANOVA). At least three

with triplicated samples were analyzed and compared with the control to consider statistically significant differences at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### **The inhibitory effect of EGCG on cell proliferation of Colorectal and Hepatoma cell lines**

Cell lines including HCT116, HT29 and HepG2, HuH-7 were incubated with EGCG 0.2-1 mM for 24 h and cell viability was evaluated by MTT assay. As shown in figure 1, EGCG inhibited cell proliferation in HCT116 and HT29 cell lines in a dose dependent manner with inhibitory concentration at 50% (IC<sub>50</sub>) approximately 0.56, 0.89 mM, respectively. In contrast, HepG2 and HuH-7 cell lines showed less efficiency to EGCG with IC<sub>50</sub> more than 1 mM for 24 h of incubation period. Taken together, all of these results demonstrated that EGCG treatment for 24 h has the highest capacity to suppress cell proliferation in HCT116 cell line.

### **Apoptotic cell death effect of EGCG in colon cancer cell lines**

We next evaluated the inhibitory effect on cancer cell proliferation of EGCG mediating through triggering apoptosis cell death. Following treatment of EGCG at 0.5 and 0.8 mM for 24 h on HCT116 and HT29 cell line, respectively, cancer cells undergoing early stage and late stage of apoptosis at 42.9% and 22.4% respectively (in figure 2). This result defined that effect of EGCG could induce apoptosis cell death on both colon cancer cell lines following IC<sub>50</sub> concentration.

### **The effect of EGCG decreased mitochondrial membrane potential (MMP) in colon cancer cell lines**

Disruption of MMP is a one of characteristic of mitochondrial dysfunction leading to releasing cytochrome C to cytoplasm and activating effector caspase mediated apoptosis cell death. In above figure 3, red fluorescence present JC-1 dye of high aggregated within mitochondria and emitted fluorescence at 590 nm, while JC-1 in decreased MMP becomes monomeric forms in cytoplasm and presents green fluorescence emission at 530 nm. After treatment of EGCG compared with control cells, most cancer cell increased intensity of green fluorescence from 9.47% to 93.74% and show decreased ratio between red and green fluorescence from 9.37% to 95.16% indicated that loss of MMP. In this result suggested that effect of EGCG increased

mitochondrial dysfunction leading to apoptosis cell death in both colon cancer cell lines.

### **The antiproliferation activity of EGCG and 5FU reduced tumor progression in xenograft nude mice model**

As above figure 4b-d, we evaluated the effects of EGCG and 5FU in HCT116 xenograft model of nude mice. EGCG concentrations of 30, 50 mg/kg and 20 mg/kg of 5FU suppressed growth rate of HCT116 tumor and decreased tumor volume, tumor weight significantly. In addition, EGCG not had influence on bodyweight in each group of animal experiment. Finally, these results demonstrated that effect of EGCG suppressed proliferation of HCT116 tumor xenograft nude mice.

### **EGCG increased apoptotic morphology and expression of apoptosis protein in tumor tissue**

In further study, we observed effect of EGCG on feature of DNA braking represent apoptotic morphology in tumor tissue of all animal experiment groups. The results show that EGCG concentration at 50 mg/kg found DNA braking more than low dose and 5FU group. In addition, we evaluated protein expression in apoptosis pathway, found that in high dose and 5FU group can increased BNIP3, DAPK2, Bak, Caspase 8, and Caspase 3 expression. In the meantime, expression of Bcl2 was decreased. However, in low dose not altered all protein expression when compared with control, as show in figure 5b. All of these results demonstrated that effect of EGCG can increase expression of BNIP3 and DAPK2 lead to inhibit expression of Bcl2. Moreover, reduction of Bcl2 and Increment of DAPK2 expression can promote expression of Bak and caspase8, respectively. Finally, elevating expression of caspase 3 and promote apoptosis in tumor tissue. All of these results demonstrated that EGCG at high dose increased apoptosis in tumor tissue more than 5FU group.

### **EGCG decreased expression of enzyme and product in DNL pathway together with energy of tumor tissue**

Overexpression of enzyme in DNL pathway can elevate free fatty acid level in cancer cells, resulted in promoted cell proliferation and suppressed apoptosis. The resulted found that at high dose group decreased expression of ACC and FASN when compared with control group, respectively. In contrast, at low dose and 5FU group not affect with expression of ACLY. In addition, all of experiment group show that reduced free fatty acid level, as show in figure 6a-c. Moreover, reduction of free fatty acid level leads to decrease translocation of free fatty acids to mitochondria, resulted in decreased

ATP level from  $\beta$ -oxidation. Following figure 6d, the results show that EGCG and 5-FU decreased ATP level significantly. In all, the results show that EGCG decreased expression and product of DNL pathway leads to reduce ATP level in tumor tissue.

### EGCG decreased expression of proteins involve in cellular signaling pathway in tumor tissue

Increment of enzyme in DNL pathway arise from overexpression of SREBP1C, is a transcription factor of lipogenic enzyme, which modulated through two signaling pathway including PI3K/Akt/mTOR and MAPK signaling pathway, respectively. In this present study, we found that effect of EGCG not altered total from expression of PI3K/Akt/mTOR and ERK1/2. However, effect of EGCG decreased active form of p-Akt, p-mTOR and p-ERK1/2 resulted in reduced expression of p-P70S6K and SREBP1C more than 5-FU group. Moreover, EGCG not show affect with expression of p70S6K and 4EBP1, as show in figure 7. Thus, all of these results demonstrated that effects of EGCG decreased expression of cellular signaling pathway protein, is important for overexpression of enzyme in DNL pathway.

### EGCG not induced cytotoxic effects on internal organ of animal model

Finally, we determine effect of EGCG and 5FU on various internal organ of animal experiment. In figure 8, Histology of internal organ of each group not show cellular damage or morphology change when received EGCG and 5FU for 1 week.

Figure 1.

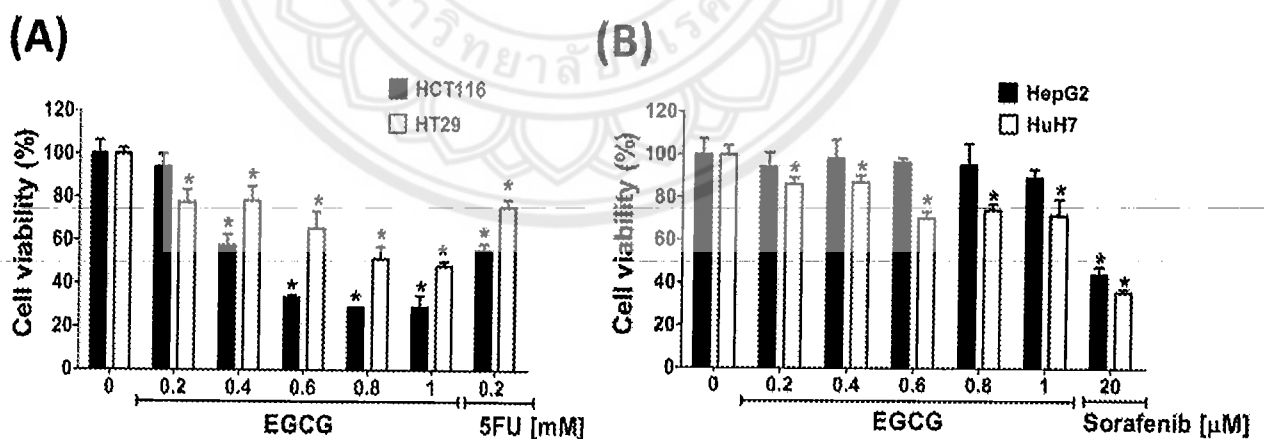
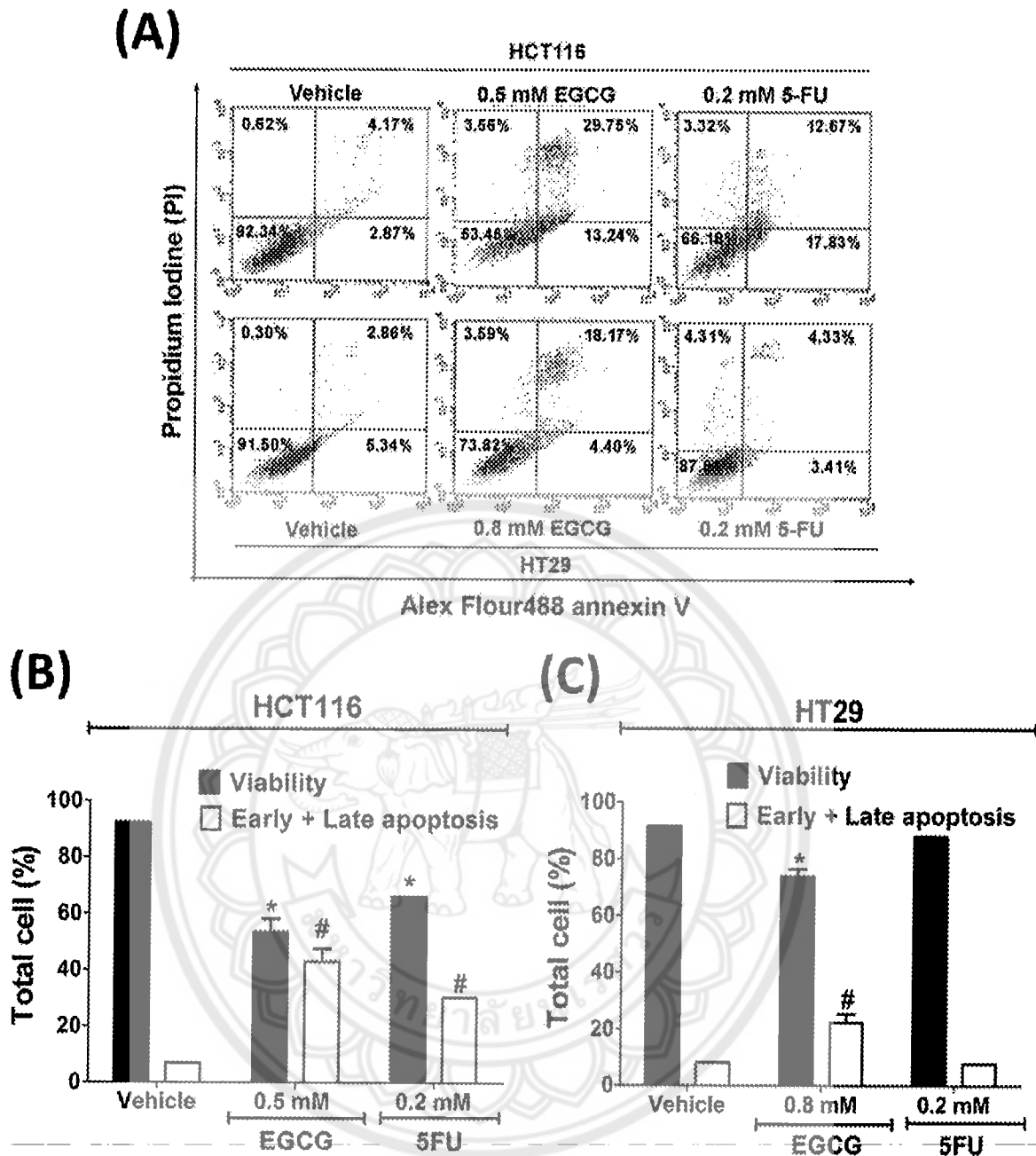


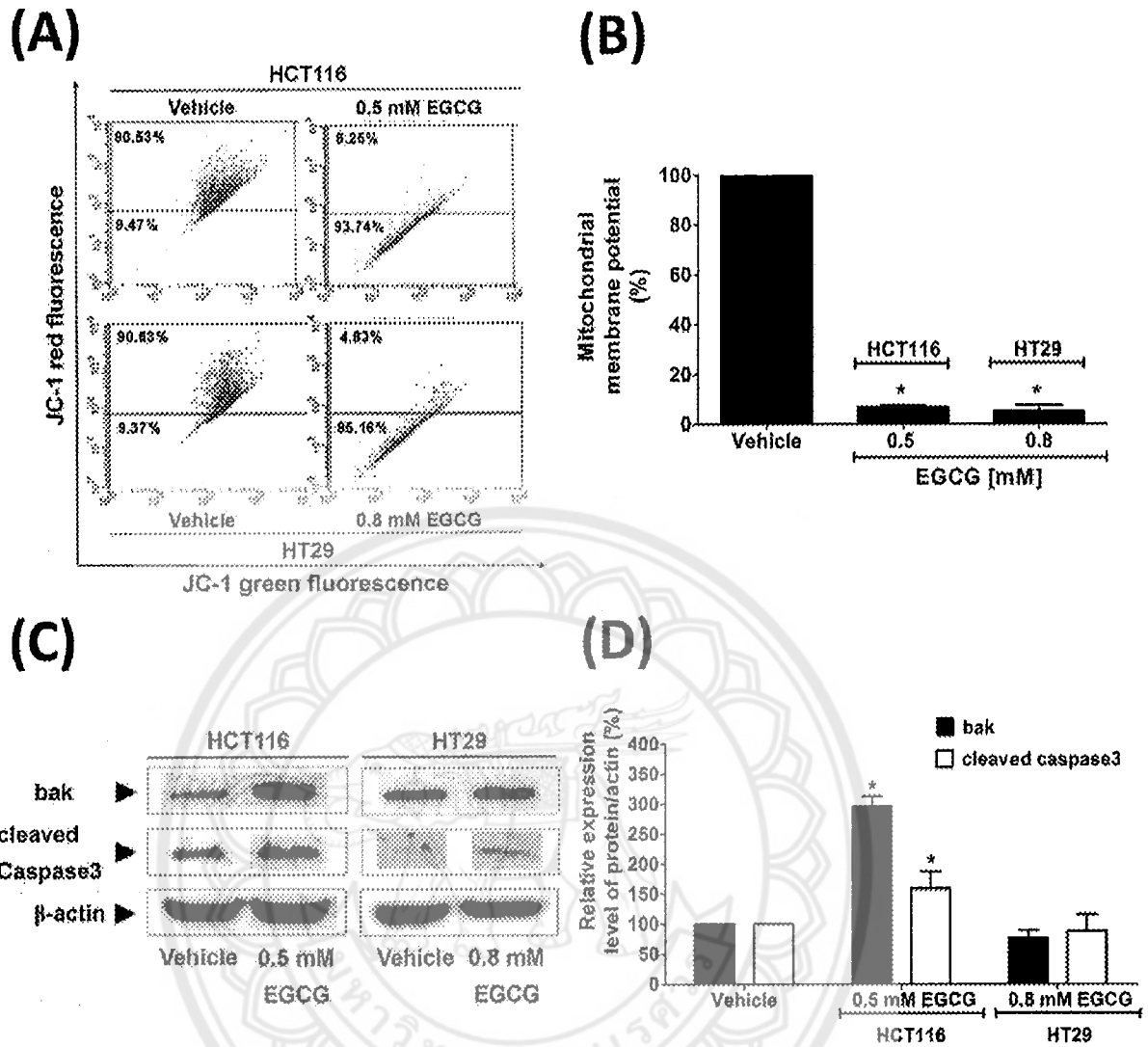
Figure 1. The inhibitory effect of EGCG on cell viability of (A) HCT116 and HT29 (B) HepG2 and HuH-7 cell lines. Cells were incubated with EGCG for 24 h and subjected to MTT assay to evaluate cell viability. Percentage of cell viability following treatment was compared to 100% of the vehicle control group. 5FU and sorafenib were used as anticancer therapy for colorectal and hepatocellular carcinoma cells,

respectively. Data from at least three independent with triplicated experiments are presented as mean  $\pm$  SEM, n=9,  $p^* < 0.05$ .

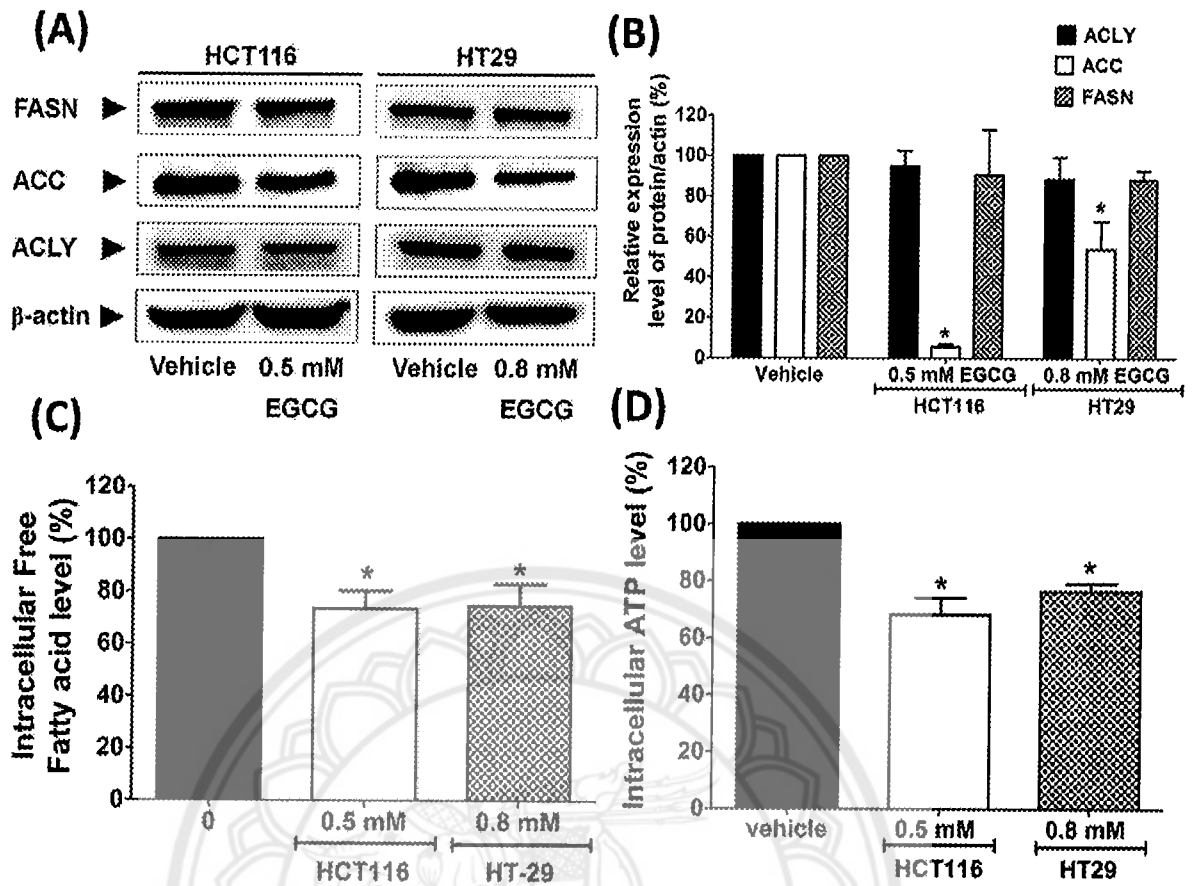




**Figure 2. EGCG induced apoptosis cell death in both HCT116 and HT29 cancer cell lines.** (A) Cells were incubated with EGCG at IC50 concentration for 24 h in HCT116 and HT29 and then evaluated apoptosis by AnnexinV/PI staining with flow cytometry. (B-C) The quantitative bar graphs show percentages of viability, early apoptotic, and late apoptotic cells compared with the vehicle control group. Data from at least three independent with triplicated experiments are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n=3$ ,  $p^*$  and  $p^\# < 0.05$  are significant different of viability and early+late apoptosis of the treated group compared with their own control group.

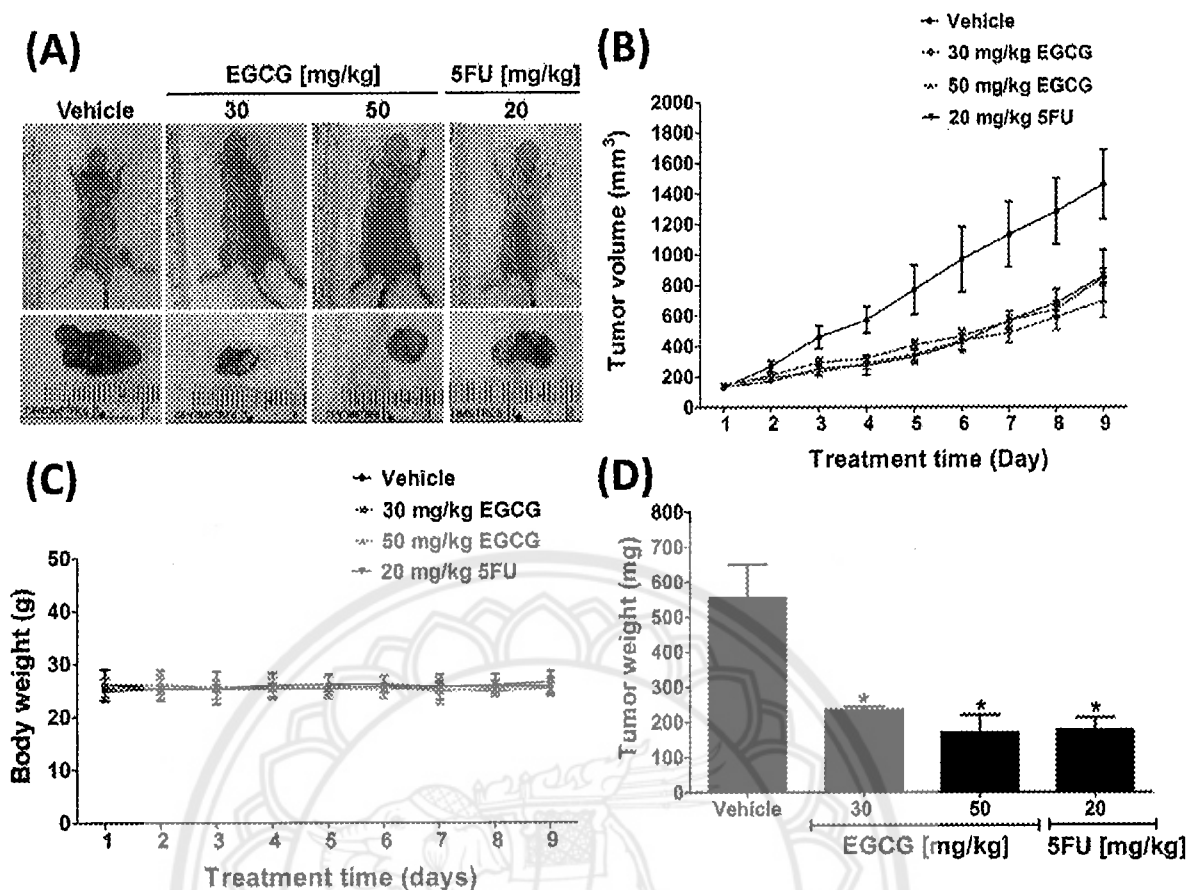


**Figure 3. EGCG exhibited mitochondrial membrane damage in both HCT116 and HT29 cell lines.** (A) Mitochondrial membrane potential was investigated by JC-1 staining assay with flow cytometry after EGCG at IC50 concentration incubated for 24 h in HCT116 and HT29 cell lines. (B) The histogram showed percentages of decreasing mitochondrial membrane potential compared with 100% of the vehicle control. (C) The effect of EGCG on the expression of apoptotic proteins Bak and cleaved caspase3 was determined by immunoblotting. (D) Quantitative protein expression levels are expressed in histogram. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM from at least triplicate experiments of  $n=3$ .  $p^* < 0.05$ .

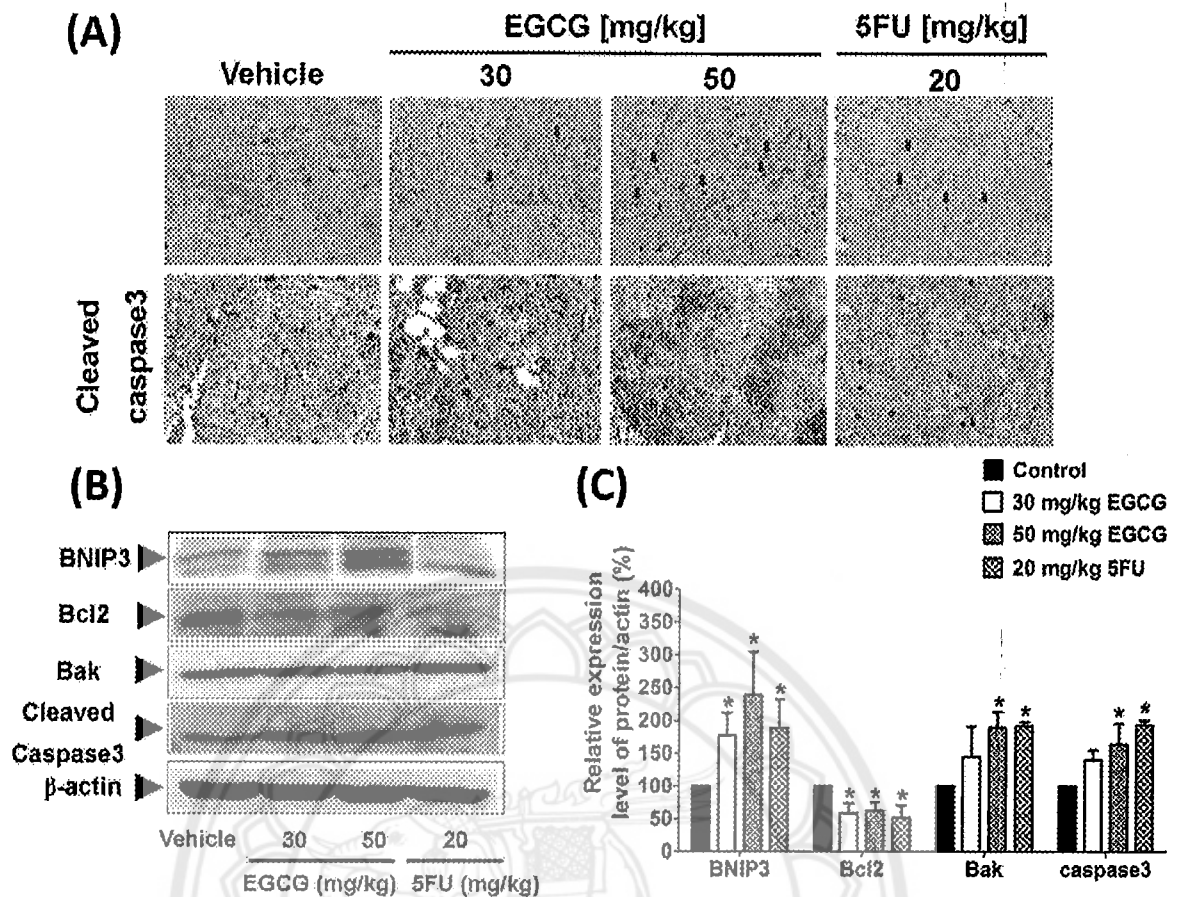


**Figure 4.** EGCG decreased the DNL in both HCT116 and HT29 cell lines. (A) The expression of DNL proteins, ACLY, ACC, and FASN were measured by immunoblotting and (B) quantitated in percentage of relative protein/ $\beta$ -actin expression after incubation of EGCG at IC<sub>50</sub> concentration for 24 h in HCT116 and HT29 cell lines was compared with 100% of the vehicle control. (C) Intracellular fatty acid and (D) ATP levels were evaluated and expressed in percentages compared with 100% of the vehicle control. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM from at least triplicate experiments of  $n=3$ .  $p < 0.05$ .

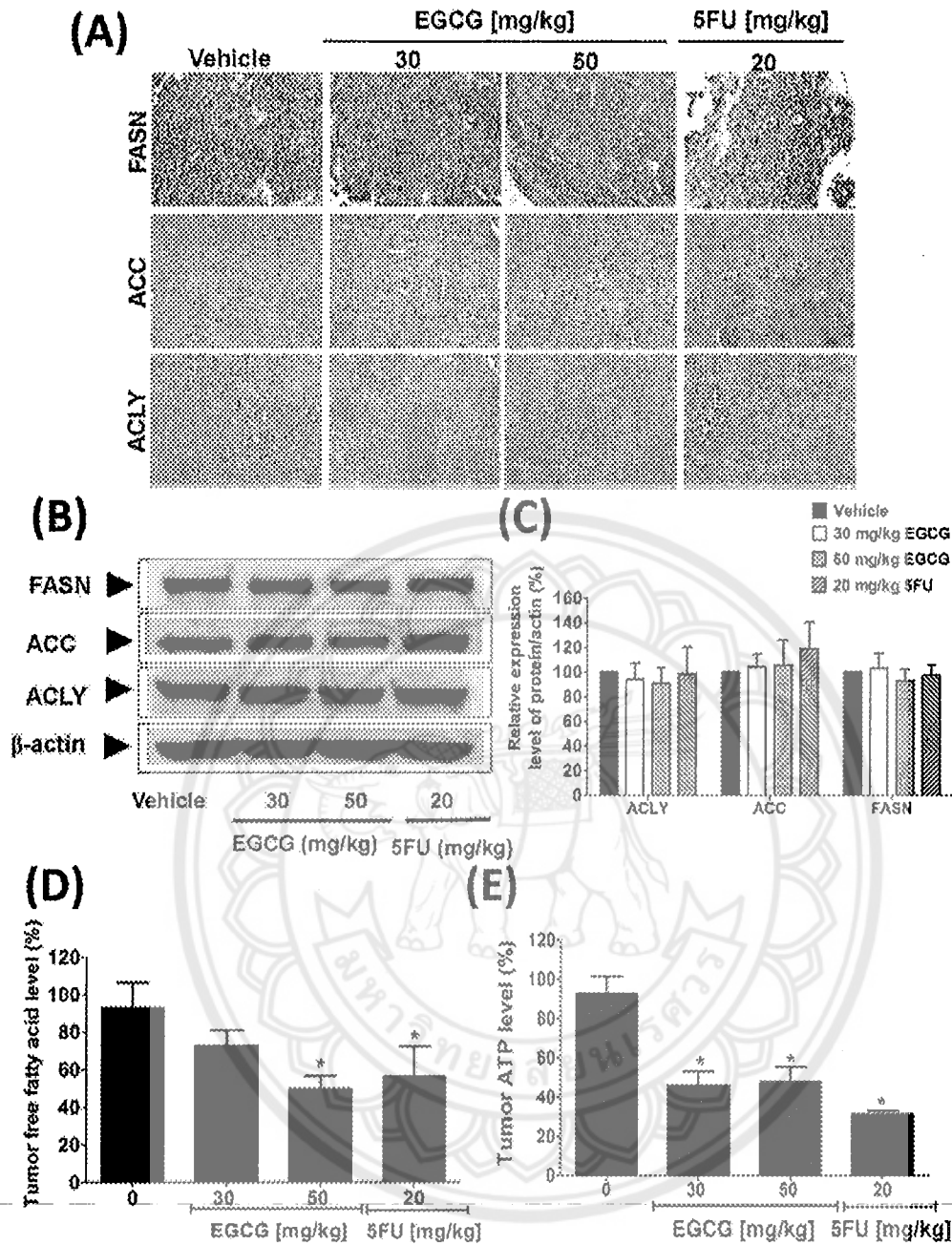




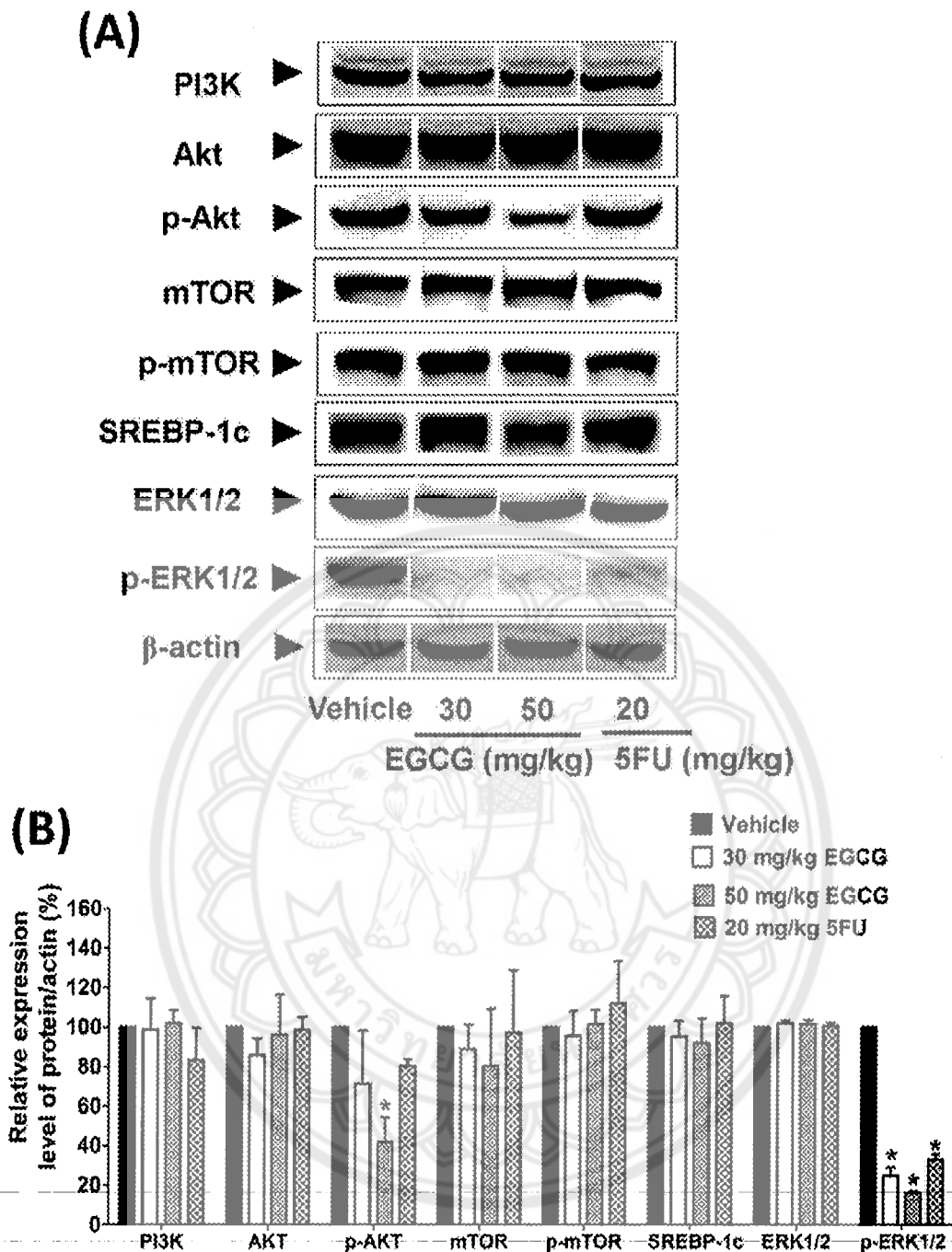
**Figure 5. EGCG suppressed HCT116 tumor proliferation in xenografted nude mice.** (A) HCT116 cells were subcutaneously xenografted at the back area of nude mice. After tumor reached 100-150 mm<sup>3</sup>, mice were consecutively injected with 0.1% DMSO (vehicle), 30 mg/kg EGCG, 50 mg/kg EGCG, and 20 mg 5FU for 7 days at subcutaneous nearby the tumor area. (B) Tumor volume and (C) body weight were measured every day. (D) Tumor weight at the sacrificed day (the 7<sup>th</sup> day) of experiment was measured. Representative data from 5-7 mice in each group are presented as mean  $\pm$  SEM,  $p^* < 0.05$ .



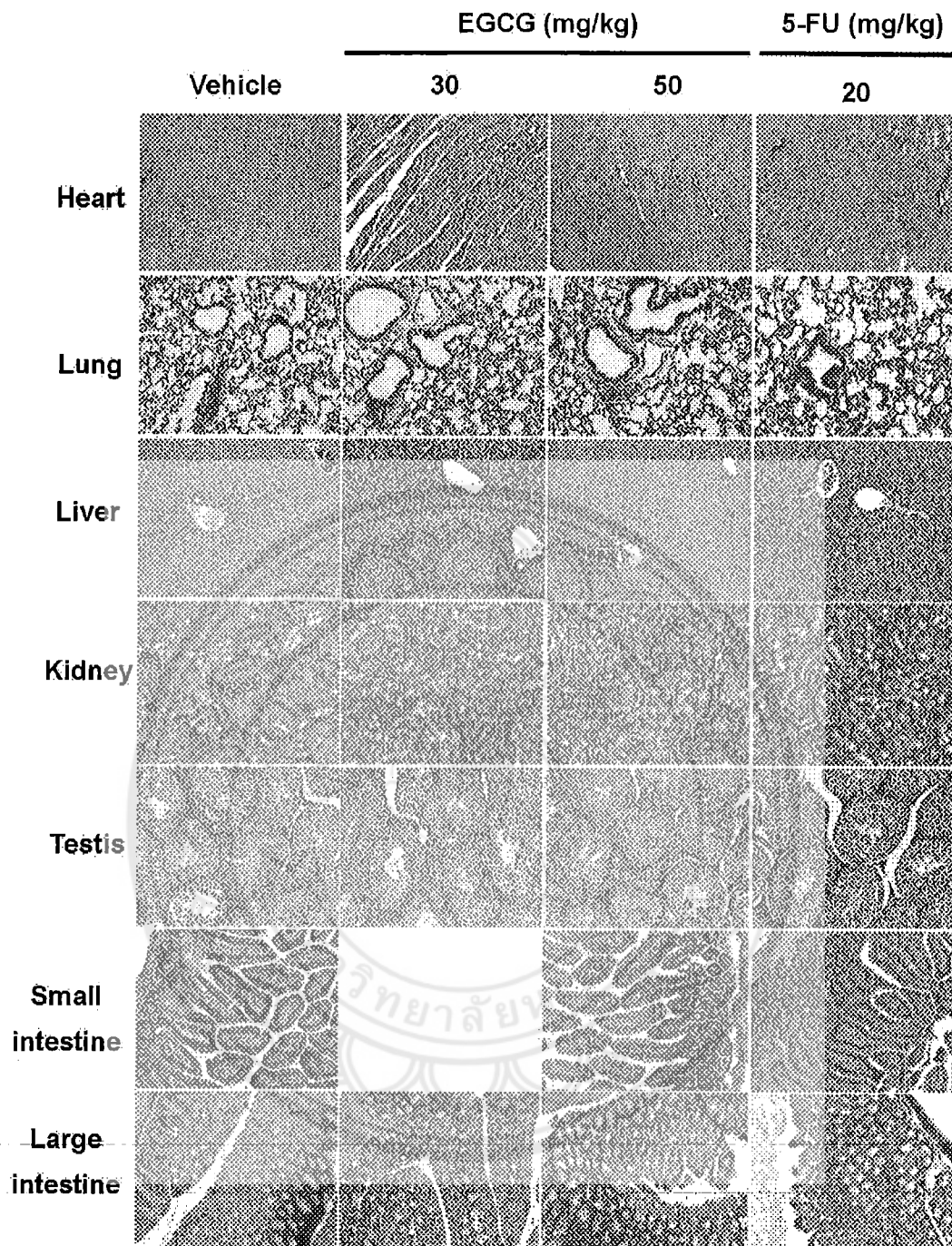
**Figure 6.** EGCG promoted apoptotic bodies and expression of pro-apoptotic proteins in tumor of HCT116 xenografted mice. After tumor reached 100-150 mm<sup>3</sup>, mice were consecutively injected with 0.1% DMSO (vehicle), 30 mg/kg EGCG, 50 mg/kg EGCG, and 20 mg/kg 5FU for 7 days at subcutaneous nearby the tumor area. (A) EGCG increased apoptosis bodies showed in red arrows and cleaved caspase3 expression in tumor slides measured by H&E staining and immunohistochemistry assay, respectively and visualized by light microscope. (B) The expression of apoptotic proteins in tumor were measured by immunoblotting and (C) quantitated in percentage of relative protein/ $\beta$ -actin compared with the vehicle control. Representative data from 5-7 mice in each group are presented as mean  $\pm$  SEM,  $p^* < 0.05$ .



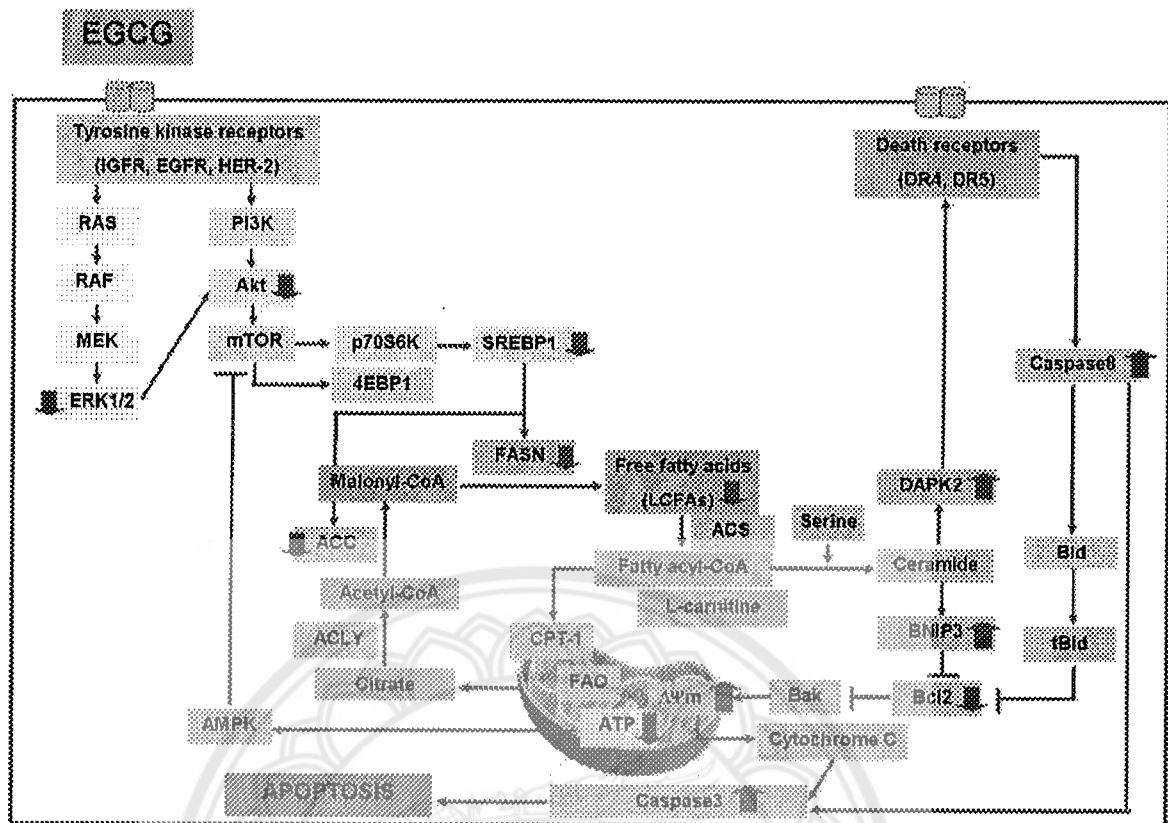
**Figure 7. EGCG suppressed the DNL in tumor of HCT116 xenografted mice.** After tumor reached 100-150 mm<sup>3</sup>, mice were consecutively injected with 0.1% DMSO (vehicle), 30 mg/kg EGCG, 50 mg/kg EGCG, and 20 mg/kg 5FU for 7 days at subcutaneous nearby the tumor area. Lipogenic protein expressions in tumor were measured by (A) immunohistochemistry visualized by light microscope and (B) immunoblotting assays. (C) Quantitative percentage of relative protein/ $\beta$ -actin is expressed in histogram compared with the vehicle control. (D) Free fatty acid and ATP levels in tumor were measured. Representative data from 5-7 mice in each group are presented as mean  $\pm$  SEM,  $p < 0.05$ .



**Figure 8. EGCG decreased p-AKT and p-ERK1/2 levels in tumor of HCT116 xenograft mice.** After tumor reached 100-150 mm<sup>3</sup>, mice were consecutively injected with 0.1% DMSO (vehicle), 30 mg/kg EGCG, 50 mg/kg EGCG, and 20 mg 5FU for 7 days at subcutaneous nearby the tumor area. Signaling protein expressions in tumor were measured by (A) immunoblotting and (B) quantitative percentage of relative protein/ $\beta$ -actin is expressed in histogram compared with the vehicle control. Representative data from 5-7 mice in each group are presented as mean  $\pm$  SD,  $p < 0.05$ .



**Figure 9. No cytotoxic effect of EGCG on internal organs of HCT116 xenografted mice.** After tumor reached 100-150 mm<sup>3</sup>, mice were consecutively injected with 0.1% DMSO (vehicle), 30 mg/kg EGCG, 50 mg/kg EGCG, and 20 mg 5FU for 7 days at subcutaneous nearby the tumor area. The morphology of internal organs was determined by H&E staining and visualized by light microscope compared with the vehicle control. Representative data from 5-7 mice in each group.



## Discussion

EGCG is a high anti-oxidant activity and most abundant active polyphenol compounds in green tea dry leaves extract. Numerous previous studies have been reported that effects of EGCG can inhibit proliferation of cancer cells through suppressed various signaling pathways (27, 32, 34). In present studies, we demonstrated that effects of EGCG decreased cell viability and increased apoptosis in colon cancer cell lines. Consequently, Increment of mitochondria membrane potential is related with apoptosis after treatment EGCG in both colorectal cancer cell lines. Next, we used *in vivo* study for investigate molecular mechanism pathways of EGCG inhibited HCT-116 xenograft models. Notably, the effect of EGCG suppressed rate of tumor growth, which observed from tumor volume and weight but not change body weight of mice. From previous studies, enzyme in DNL pathway is highly expression in various cancer cells which can promote cells proliferation and resistance to apoptosis. In addition, mutation of tyrosine kinase receptors can elevate expression of two signaling pathway including PI3K/Akt/mTORC1/SREBP1C axis and MAPK pathway, leads to increase expression of enzyme in DNL pathways. In current studies, we found that EGCG decreased

enzyme expression in DNL pathways and reduced expression of SREBP1C through decreased active form of p-Akt, p-mTOR, p-P70S6K and p-ERK1/2 but not change total form of PI3K/Akt/mTORC1 axis and MAPK pathway. Moreover, we suggested that depletion of free fatty acid levels which arise from decreasing of enzyme expression in DNL pathway maybe inhibit activity of CPT-1, leads to decrease ATP levels and increase apoptosis in HCT116 tumor tissue. From previous studies, increment of BNIP3 and DAPK2 expression, is a pro-apoptotic proteins, are induced through inhibited expression of FASN and reduction of free fatty acid levels. Here we show that effect of EGCG inhibited enzyme and product in DNL pathways, leads to increase expression of BNIP3 and DAPk2, respectively. Thus, elevation of BNIP3 and DAPk2 expression decreased ratio of Bcl2/Bax expression after treatment EGCG and promote mitochondria membrane potential together with expression of Caspase 8 and Caspase 3 in HCT116 tumor tissue, respectively. Finally, all of this results demonstrated that effects of EGCG increased apoptosis in tumor tissue through down regulation of DNL, PI3K/Akt/mTOR, and MAPK pathways.

From previous studies has been reported that in various cancer cells are highly required energy for supported cell proliferation through aerobic glycolysis. In contrast, non-differentiated cells rely on primarily source from OXPHOS in mitochondria for generated energy (7). Increment of high rate of glucose metabolism in cancer cells leads to elevate pyruvate level, which the most part convert to lactate resulted in generated acid environment and promoted invasion in cancer cells (9). In addition, reduction of pyruvate level is translocated to mitochondria, leads to diminish energy through TCA cycle and OXPHOS in cancer (7). To modify proliferation of cancer cells arise from decreasing of energy production and microenvironment stress, DNL pathway is alternative source of energy and up-regulated for supported substrate in cancer cells (9). Over expression of key enzyme in DNL pathway that is ACC and FASN, are highly expressions and promoted proliferation in various cancer cells. In contrast, in normal tissue has lowest expression of enzyme in DNL pathway or undetectable excepted lipogenic tissue including mammary breast and liver tissue (9). From previous studies has been reported that in colorectal carcinoma cells, ACACA and FASN expression was elevated and promoted proliferation of cells (16). In addition, Increment of mRNA expression of FASN can promote HCC-development in liver tissue of mice (21). In recent studies have been reported that alleviated expression of ACC and FASN can suppressed growth rate of cell proliferation and tumor development in various cancer

cells (35, 36). In current studies, we found that effect of EGCG decreased expressions of ACC and FASN in HCC-xenograft nude mice meanwhile expression of ACLY not alter from control. Following previous studies have been reported that effects of EGCG can decrease expression of FASN through inhibits phosphorylation of EGFR related PI3K/Akt/mTOR axis in lung adenocarcinoma cells (37). Moreover, Increment of phosphorylation of AMPK expression after treatment EGCG leads to decrease expression of mTOR/4EBP1 resulted in suppressed expression of ACC and FASN in HepG2 cells (38).

Reduction of expression of ACC and FASN resulted in diminish level of free fatty acid and triglyceride level in colon cancer cells together with decreased tumor volume in colon xenograft mice models (16). In recent studies have been suggested that effects of Oroxylin A can decreased expression of FASN and decreased free fatty acid level through inhibited expression of HIF-1 $\alpha$  resulted in decreased proliferation of HCT116 cell line (35). Moreover, inhibition of ACC and FASN resulted in decreased glycolysis and ATP level from OXPHOS and fatty acid oxidation (FAO) in Pt130 cells (16). In current study, we shown that effects of EGCG alleviated expression of lipogenic enzymes related decreasing of free fatty acid levels and ATP production in HCT116-xenograft nude mice. Similarly previous studies has been demonstrated that effect of EGCG inhibited expression of ACC and FASN resulted in decreased free fatty acid levels in HepG2 cells (26). Moreover, downregulation of SREBP-1 and SREBP-2 can suppressed mRNA levels of ACC and FASN leads to decrease fatty acid  $\beta$ -oxidation in DLD1 and Pt130 cells (16). Interestingly, from previous studies have been reported that FASN inhibitor (C75) can inhibited expression of FASN leads to decrease free fatty acid and cell number of SKOV3 cell lines through accumulation of malonyl-CoA levels. In the meantime, used ACC inhibitor for reduced levels of malonyl-CoA resulted in rescued cell number of ovarian cancer cell lines (39). Thus, Increment of malonyl-CoA is a caused of cell death via inhibited expression of FASN in cancer cells after treatment with EGCG.

Malonyl-CoA is an inhibitor of carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1) located on outer membrane of mitochondria (40). Following previous studies have been reported that effects of [6]-gingeral can inhibited expression of FASN leads to decrease activity of CPT-1 and promoted apoptosis in HepG2 cells (41). Suppression of CPT-1 after knockdown FASN expression leads to accumulate of ceramide levels and promoted expression of pro-apoptotic enzymes including Bcl2 which interacts with



protein 3 (BNIP3) and Death-associated protein kinase 2 (DAPK2) in breast cancer cells (42). In addition, effect of resveratrol can inhibit expression of FASN together with lipid content and promoted expression of BNIP3 and DAPK2 both in vitro and in vivo studies of breast cancer cell lines(43). In this study we found that effect of EGCG inhibited expression of FASN together with reduced levels of free fatty acids which influence suppressed CPT-1 activity through increased malonyl-CoA levels. In addition, effects of EGCG increased expression of BNIP3 and DAPK2 in HCT116 xenograft models and decreased proliferation rate of HCT116 xenograft models. Following previous studies have been demonstrated that concanavalin A can increase expression of BNIP3 leads to decrease expression of Bcl2 resulted in promoted apoptosis in hepatitis mice models. In the meantime, combination effects of EGCG and concanavalin A can inhibit expression of BNIP3 and promoted expression of Bcl2 leads to attenuate apoptosis in hepatitis mice (11). Moreover, effects of EGCG can elevated expression of DAPK2 following dose dependent manner and decreased cell viability of acute myeloid leukaemia cells (44). Taken together, effects of EGCG promoted apoptosis in HCT116 xenograft models through inhibited expression and product of DNL pathway and mediated expression of pro-apoptotic protein that is BNIP3 and DAPK2 expression.

Elevation of both pro-apoptotic protein including BNIP3 and DAPK2 after inhibit FASN expression can promote apoptosis in breast cancer cells (42, 43). Up-regulation of expression of BNIP3 can decrease expression of anti-apoptotic protein such as Bcl2 and promoted expression of Bax mediated apoptosis in hepatitis mice (11). From previous studies have been suggested that decreased expression of bcl2 can promote pro-apoptotic protein family including Bak and Bax in hepatocellular cell lines leads to decrease mitochondria membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) mediated apoptosis (45). In this study, we found that effects of EGCG inhibited expression of Bcl2 and promoted expression of Bak protein resulted in decreased  $\Delta\Psi_m$  and promoted apoptosis in colorectal cancer cells line. In addition, effects of EGCG increased expression of cleaved-caspase 3 leads to decrease proliferation rate of tumor in mice models. Numerous previous studies have been reported that effects of EGCG can suppress expression of Bcl2 and increased expression of bak resulted in decreased  $\Delta\Psi_m$  mediated expression of caspase3 through inhibited phosphofructokinase (PFK) in hepatocellular carcinoma cells (45). Moreover, effects of EGCG can inhibit expression of Bcl2 and promoted Bax expression leads to increased expression of caspase3 through

inhibited Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in colon cancer stem cells (46). All of these results suggested that effect of EGCG promoted apoptosis in colon cancer cell lines via inhibited expression of Bcl2 and promoted expression of Bax mediated loss of  $\Delta\Psi_m$ .

In various type of malignant cancer abnormally high expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) can promote cell proliferation via activate downstream signaling pathway including PI3K/Akt/mTORC1 and MAPK pathways (47). In addition, from previous studies has been demonstrated that in colorectal cancer found elevation of platelet-derived growth factor (PDGF) and vascular endothelial growth factor (VEGE) expression more than normal mucosa which can promote expression of PI3K/Akt pathway and increased cell proliferation (48). Moreover, downstream of mTORC1 can promote expression of p70S6K/RPS6 and 4-EBP1/eIF4E cascade which is regulator of cell proliferation, metabolism and control cap-dependent translation in cancer cell, respectively (11). Thus inhibition of activity of PI3K/Akt/mTOR pathway along with MAPK pathway resulted in suppressed expression of p70S6K and 4EBP1 may decrease cell proliferation of HCT116-xenograft nude mice. In these present study, from the results shown that effect of EGCG at high dose decreased expression of phosphorylation downstream signaling pathway including p-Akt, p-mTORC1 and p-ERK which not alter expression of total from of PI3K/Akt/mTORC1 and p70S6K/4EBP1 together with MAPK pathways. Following previous studies reported that effect of EGCG can down-regulate expression of EGFR and HER2 expression leads to decrease PI3K/Akt/mTOR and ERK expression which suppressed colon cancer development (47). In the meantime, *In vitro* and *In vivo* studies have been demonstrated that effects of EGCG inhibited cell proliferation of bladder cancer cell lines through up-regulated expression of PTEN, leads to decrease phosphorylation of PI3K/Akt pathway and Caspase3/PARP expression (30). In generally, overexpression of PI3K/Akt/mTORC1 and MAPK pathway from genetic mutation leads to activate expression of SREBP1 which regulate expression of lipogenic gene in various aggressive cancer cells.

SREBP1 is a transcription factor of lipogenic enzyme in DNL pathway including ACC, FASN, and SCD-1. Previous studies have been reported that overexpression of ACC and FASN arise from over activation of SREBP1 in colon cancer cells. Thus, reduction of expression of SREBP1 leads to reduce expression of DNL enzyme and product which promote apoptosis in cancer cells. In current study, the results shown that effects of EGCG suppressed expression of SREBP-1 leads to

decrease expression of lipogenic enzymes and free fatty acid levels. In addition, reduction of amount of free fatty acids resulted in decrease of ATP from reduced lipid uptake to mitochondria for generate energy through FAO. In the recent studies have been reported that effect of EGCG can inhibit expression of SREBP1 through activating expression of AMPK, leads to decrease expression of lipogenic enzymes in cancer cells.

