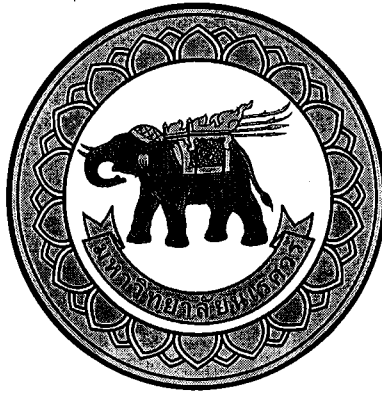


อภิธาน์นทาการ



สำนักหอสมุด



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

สัญญาเลขที่ R2560B069

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) ความจำเพาะในการรักษาเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ของสารยับยั้งการขนส่งซิเตรตเข้าเซลล์ 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

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน... 3 มีค. 2565

เลขทะเบียน... 1049๖๕๘

เลขเรียกหนังสือ... RC

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะรัตน์ ศรีสว่าง

สังกัดภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2563

สนับสนุนโดย ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร

จากงบประมาณแผ่นดิน (แบบปกติ) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

๒๖๔
๗
ปี ๒๕๖๕
๒๕๖๓

โครงการ : ความจำเพาะในการรักษาเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ของสารยับยั้งการขนส่งซิเตรทเข้าเซลล์
ในการเหนี่ยวนำการตายแบบอพอโทซิส ผ่านการควบคุมภายในเซลล์ต่อขบวนการสร้างไขมันแบบ
ดีโนโว การเกิดสารอนุมูลอิสระ และการกระตุ้นความเค้นของร่างแหเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ความจำเพาะในการรักษาเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ของสารยับยั้งการขนส่ง
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. สุรชาติพย์ พงษ์เจริญ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2563

ผู้รับผิดชอบ

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร.ปิยะรัตน์ ศรีสว่าง รับผิดชอบทำการวิจัย 60%

สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทร. 05596-4655 , 089-768-3739

Email : piyarats@nu.ac.th

ผู้ร่วมงานวิจัย

ดร.ดำรงศักดิ์ เป็กทอง รับผิดชอบทำการวิจัย 15%

สังกัดภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทรศัพท์ 055-961820

Email : dumrongsakp@yahoo.com

นพ.โกวิทย์ ศุภโกศล รับผิดชอบทำการวิจัย 25%

สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทร. 05596-4655

Email : kowits@nu.ac.th

1. 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

2. 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 แต่พบว่ามี lactate production ในอัตราที่สูงด้วย ถึงแม้ว่าเซลล์จะอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงพอในขบวนการ oxidative glucose consumption ก็ตาม (aerobic respiration) ซึ่งในเซลล์ปกติ การพบ lactate จะเกิดขึ้นในกรณี anerobic 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 ถือว่าเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตในผู้ที่เป็นมะเร็ง ดังนั้นการยับยั้ง *de novo fatty acid synthesis* สามารถเกิดขึ้นได้กับเซลล์มะเร็งทุกเซลล์ทั้งที่ primary tumor และที่ metastasis tissue อีกทั้งยังเป็นวิธีการที่มีความจำเพาะสูงในการยับยั้งการ growth , proliferation และการ metastasis ของเซลล์มะเร็งเท่านั้นโดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติอื่นๆของร่างกาย

นอกเหนือจาก commercial chemicals หรือ chemotherapeutic agents สารที่มีผลยับยั้งการขนส่ง citrate เข้าเซลล์ ที่ความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งโดยโดยลด substrate ที่จะเข้าสู่ *de novo lipogenesis pathway* 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 ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การสร้างยาที่เข้ากับมนุษย์ได้ในอนาคต แทนการใช้ chemotherapy

3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์หลัก คือ

เพื่อศึกษาผลของสาร citrate transporter inhibitor ในการรักษาและยับยั้งการเกิดมะเร็ง HepG2 โดยไม่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ตับปกติต่างๆของมนุษย์

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

4. 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

5. 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 ซึ่งส่งผลกระทบต่อ 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 (Llovet JM et al., 2008, Walzer N and Kulik LM, 2008) โดยทั่วไป ผู้ป่วยที่เป็น HCC จะมีชีวิตอยู่เพียงแค่ 6-20 เดือนเมื่อเริ่มวินิจฉัยว่าเป็นแล้ว เนื่องมาจาก liver failure และการทำงานของเซลล์ตับเสียไป ดังนั้นจะเห็นได้ว่าไม่ว่าจะเป็นมะเร็งชนิดใดก็ตาม มะเร็งจัดว่าเป็นโรคที่คุกคามชีวิตของผู้ที่เป็นอย่างมาก อีกทั้งมีแนวโน้มที่อุบัติการณ์การเกิดและการเสียชีวิตจะมากขึ้นเรื่อยๆ การวิจัยและค้นคว้าเพื่อพัฒนาและหาวิธีที่เฉพาะ ที่จะจัดการทำลายเซลล์มะเร็ง หรือยับยั้งการ proliferation, differentiation และ growth ของเซลล์มะเร็ง โดยที่พยายามจะให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์ปกติให้น้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ 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 เนื่องมาจากการที่กระบวนการ angiogenesis เป็น physiological process ซึ่งถูกควบคุมด้วยกระบวนการและปัจจัยต่างๆที่ซับซ้อน เนื่องจาก angiogenesis จะเกิดเมื่อเกิดความไม่สมดุลกันระหว่าง the proangiogenic factors และ angiogenic inhibitors กลไกการทำงานรวมทั้งการควบคุม angiogenesis ของ proangiogenic factors และ angiogenesis factors ก็ยังมีกระบวนการ signaling pathway ที่ค่อนข้างซับซ้อน และยังไม่มีความรู้ที่เพียงพอที่จะอธิบายได้อย่างชัดเจน (Mousa SA et al., 2006)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสำคัญกับอีกวิธีหนึ่งที่มีความเป็นไปได้มากที่สุดที่จะเป็นวิธีที่สามารถลดการ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็งได้ และมีข้อได้เปรียบมากกว่าวิธีอื่นๆ คือ การลดการ growth และ proliferation ที่จำเพาะที่ตัวเซลล์มะเร็ง โดยการลดการนำเข้าของ nutrients ซึ่งจำเป็นในการนำไปใช้การ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็ง โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติอื่นๆของร่างกาย หลักการของวิธีการนี้ มีข้อมูลที่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน คือ เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีอัตราของกระบวนการ aerobic glycolysis สูงกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “Warburg effect” ถูกค้นพบโดย Otto Warburg ในปี 1923 ลักษณะที่สำคัญของ Warburg effect ของเซลล์มะเร็งคือ มีการขนส่ง glucose เข้าเซลล์ และกระบวนการ glucose consumption ในอัตราที่สูงกว่าเซลล์ปกติ แต่พบว่ามี lactate production ในอัตราที่สูงด้วย ถึงแม้ว่าเซลล์จะอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงพอในกระบวนการ 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 FADH₂ 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 eal., 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 ถือว่าเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตในผู้ที่เป็นมะเร็ง 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 เนื่องจากมีการกระตุ้น 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 [1,5-¹⁴C 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 เหล่านี้จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้เป็นยารักษามะเร็งได้ 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 และน่าจะมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งสูงเช่นเดียวกัน โดยไม่มีผลเสียต่อเซลล์ปกติ และนำไปสู่การทดลองใช้ในสัตว์ทดลอง ทั้งด้านการรักษา ป้องกันมะเร็ง และยับยั้งการ metastasis ของมะเร็ง ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การสร้างยาที่ใช้กับมนุษย์ได้ในอนาคตแทนการใช้ chemotherapy

6. 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⁺-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
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⁺-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⁺- and H⁺-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⁺-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-kappaB and IkappaB 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, Foufelle 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.

7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. การวิจัยระยะแรก ในช่วงปีที่ 1-2 : ผลของ citrate transporter inhibitor ที่มีผลด้านการควบคุมภายในเซลล์ต่อการสร้าง de novo lipogenesis การเกิด ROS และ ER stress ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง และนำไปสู่การศึกษาผลของสารในการฆ่า tumor ที่เกิดจากการ xenograft HepG2 เข้าไปทาง subcutaneous และการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ เพื่อเหนี่ยวนำการเกิด metastasis ในสัตว์ทดลอง โดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติและอวัยวะปกติของสัตว์ทดลอง
 - นำผลงานวิจัยเผยแพร่ต่อสาธารณชนในรูปแบบของ การตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ รวมทั้งการนำเสนอผลการวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ
 - เป็นการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ โดยโครงการวิจัยนี้จะให้สิทธิระดับปริญญาโทได้มีส่วนร่วมในการดำเนินการวิจัย อีกทั้งยังส่งเสริมให้บัณฑิตศึกษาได้มีผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ รวมทั้งการนำเสนอผลการวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ
 2. การวิจัยและพัฒนาในระยะต่อมา ในช่วงปีที่ 3-4 เป็นกรต่อยอดผลสำเร็จจากผลการวิจัยคือการดำเนินการวิจัย หรือร่วมทำการวิจัยกับกลุ่มเป้าหมายที่จะได้รับประโยชน์ ได้แก่ หน่วยงานต่าง ๆ เช่น กระทรวงสาธารณสุข องค์การเภสัชกรรม สำนักงานอาหารและยา หรือหน่วยที่มีนักวิจัยในสาขาที่เกี่ยวข้อง เช่น ในมหาวิทยาลัย หรือสถาบันวิจัยต่างๆ หรือหน่วยงานเอกชน เช่น บริษัทผลิตยา เป็นต้น เพื่อศึกษาผลทางด้านเภสัชวิทยา และพิษวิทยาในมนุษย์ และนำไปใช้ในทางการแพทย์ได้จริง สามารถใช้เป็นยาอีกทางเลือกในทางการแพทย์ที่ใช้รักษามะเร็งแทนการใช้ chemotherapeutic drugs
- ผลกระทบที่เกิดขึ้นกับกลุ่มเป้าหมาย คือ
1. สามารถใช้ป้องกันการเกิดมะเร็งและการ metastasis ของผู้ป่วยมะเร็งได้ ลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งและอัตราการเสียชีวิตจากมะเร็งในผู้ป่วย

2. ลดอาการข้างเคียงที่เกิดขึ้นกับเซลล์ปกติอันจะเป็นสิ่งที่ก่อให้เกิดผลกระทบทั้งทางด้านร่างกายและจิตใจแก่ผู้ป่วย และเป็นอุปสรรคอย่างหนึ่งของการรักษามะเร็งในปัจจุบัน

8. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

กลุ่มเป้าหมายที่จะได้รับประโยชน์ ได้แก่ นิสิตบัณฑิตศึกษา หน่วยงานต่าง ๆ เช่น กระทรวงสาธารณสุข องค์การเภสัชกรรม สำนักงานอาหารและยา หรือหน่วยที่มีนักวิจัยในสาขาที่เกี่ยวข้อง เช่น ในมหาวิทยาลัย หรือสถาบันวิจัยต่างๆ หรือหน่วยงานเอกชน เช่น บริษัทผลิตยา เป็นต้น เพื่อศึกษาผลทางด้านเภสัชวิทยา และพิษวิทยาในมนุษย์ และนำไปใช้ในทางการแพทย์ได้จริง สามารถใช้เป็นยาอีกทางเลือกในทางการแพทย์ที่ใช้รักษามะเร็งแทนการใช้ chemotherapeutic drugs การดำเนินการวิจัย หรือร่วมทำการวิจัยกัน

9. 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% CO₂/95% 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 1×10^5 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 1×10^6 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 °C จนกว่าจะ analysis

2. ก่อนทำการ analysis เซลล์จะถูก washed twice ด้วย PBS และ incubated โดย phosphate-citrate buffer (0.192 M Na₂HPO₄, 4 mM citric acid, pH 7.8) ซึ่งมี 0.25 mg/mL heat-inactivated ribonuclease A and 33 µg/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 2.5×10⁴ 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 (~529 nm) เป็น red (~590 nm) Mitochondrial depolarization หรือการเสีย potential ของ mitochondria จะสามารถวัดได้โดยการลดลงของ the red/green fluorescence intensity ratio จากการลดการเข้าของ JC-1 สู่ภายใน 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 จะถูก extracted โดย M-PER[®] 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[®] 7-Minute Blotting System using 8 minutes for transferring (Life technology, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) หลังจากนั้น Membranes จะนำมา incubated primary antibody โดยการใช้ β -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 β -actin band intensity ใน blot แผ่นดซเดียวกัน (FASN/ β -actin [%])

สำนักหอสมุด

- 3 มี.ค. 2565

ว. PC
269
.7
ป 6215
2563

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, Biomed 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-H₂DCFDA) (Molecular probe, Oregon, USA) ซึ่งเป็น chloromethyl derivative of H₂DCFDA โดยสารนี้จะแพร่เข้าเซลล์ acetate group จะถูก cleave โดย intracellular esterase ได้เป็น H₂DCF แล้ว ROS จะ oxidize H₂DCF เป็น DCF (2',7' dichlorodihydrofluorescein) สามารถนำไปวัด fluorescence ได้ วิธีการคือ เซลล์ จะ culture ใน dish ที่ 5x10⁵ 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 μ M CM-H₂DCFDA ใน CO₂ 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))

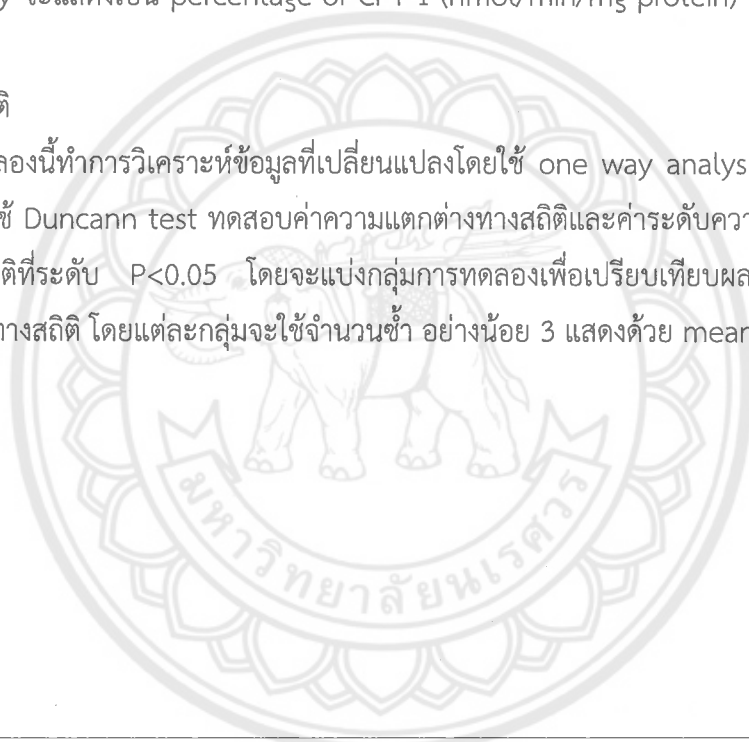
10. วิเคราะห์ CPT-1 activity

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 ทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติและค่าระดับความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ โดยจะแบ่งกลุ่มการทดลองเพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยแต่ละกลุ่มจะใช้จำนวนซ้ำ อย่างน้อย 3 แสดงด้วย mean \pm SEM or SD



Suppression of the *de novo* lipogenesis triggered apoptosis by epigallocatechin gallate in colorectal carcinoma cells

Phuriwat Khiewkamrop¹, Damratsamon Surangkul², Metawee Srikummool², Lysiane Richert^{3,4}, Dumrongsak Pekthong⁵, Supawadee Parhira⁶, Julintorn Samran⁷, Piyarat Srisawang^{1*}

¹Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

²Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

³KaLy-Cell, 20A rue du Général Leclerc, 67115 Plobsheim, France

⁴Université de Bourgogne Franche-Comté, EA 4267 PEPITE, France

⁵Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

⁶Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

⁷Department of Pathology, Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

Correspondence

Piyarat Srisawang, Ph.D., Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

Tel: 66-55964655, Fax: 66-5596470, E-mail: piyarats@nu.ac.th

Keywords

de novo lipogenesis pathway, apoptosis, PI3K/Akt/mTOR/SREBP-1c signaling pathway, ERK pathway, epigallocatechin gallate (EGCG), colorectal cancer HCT116 cells, HT-29 cells

List of abbreviations

EGCG, epigallocatechin gallate; DNL, de novo lipogenesis; CRC, colorectal cancer; 5FU, 5-fluorouracil; OXPHOS, oxidative phosphorylation; ACLY, ATP-citrate lyase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; FASN, fatty acid synthase; LCFAs, saturated long chain fatty acids; SREBP-1c, sterol regulatory element-binding protein 1c; PI3K, phosphatidyl-inositol-3 kinase; Akt, v-akt murine thymoma viral oncogene homolog; mTOR, mammalian target of Rapamycin; MAPK, mitogen-activated protein kinase; HIF-1 α , hypoxic inducible factor-1 α ; AMPK, AMP-activated protein kinase

Running title

KHIEWKAMROP et al: ANTI-CANCER EFFECT OF EGCG TARGETS THE DE NOVO LIPOGENESIS PATHWAY

Abstract

One of the special characteristics of metabolic reprogramming in various cancer cells is upregulated expression of the de novo lipogenesis (DNL) pathway which is recognized as a progressive and aggressive cancer regulator. The reduction of key enzymes in the DNL pathway activates apoptosis in cancerous cells. Epigallocatechin gallate (EGCG) has a strong anti-proliferation activity in multi-types of cancer cells without producing cytotoxicity to normal tissues. We aimed to investigate the effects of EGCG in promoting apoptosis associated with inhibiting the *de novo* lipogenesis (DNL) pathway in cancer cells both *in vitro* and *in vivo* studies. Two colorectal cancer cells (HCT116 and HT-29) responded highly to the cytotoxic effect of EGCG in 24 h more than hepatoma cells, including HepG2 and HuH7. EGCG decreased cell viability, increased mitochondrial damage-triggered apoptosis, and promoted pro-apoptotic protein expression in both HCT116 and HT-29 cancer cells with IC50 values of 0.5 and 0.8 mM, respectively. Then, HCT116 was selected for evaluation of the apoptotic effects by EGCG on the *in vivo* cancer xenograft mice model treated with EGCG at 30 and 50 mg/kg via IP injection for 7 days. The detection of ATP and fatty acid levels was performed. EGCG increased apoptosis and decreased fatty acid levels associated with reducing ATP production both *in vitro* and *in vivo* HCT116 xenograft mice model. Moreover, EGCG did not alter expression of the total abundance of PI3K/Akt/mTOR/SREBP1 and ERK signaling pathways in tumor xenograft tissue. There was no cytotoxic effect of EGCG on noncancerous organs of animals. The results suggest an impact of EGCG on inhibiting fatty acid synthesis which may contribute to suppressing ATP synthesis. Thus, we proposed a promising anticancer candidate of EGCG targeting inhibition of the DNL pathway of colorectal cancer cells.

Introduction

Nowadays, many unpredictable incidents from cancer therapy, such as recurrence, metastasis, invasiveness, multi-drug resistance, and cytotoxic side effects are still a barrier to enhancing successful clinical cures in colorectal cancer (CRC)

patients. Thus, effective new therapeutic agents for CRC are challenges as alternative approaches to improve effective clinical research.

Aberrant regulation of the metabolic pathways is one specific cancer characteristic which promotes cell overproliferation and resistance to cell death stimulations. Warburg's hypothesis has been reported where increased glucose uptake elevates glycolysis and activates excess levels of pyruvates to be metabolized to lactate rather than through mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) without depending on a sufficient oxygen supply [1]. In addition, as a result of a high proliferative signal, intermediates from OXPHOS are shunted to the *de novo* lipogenesis (DNL) pathway contributing to providing precursors for ATP generation, cell membrane synthesis, and multiple-signaling pathways for cancer growth and metastasis [2].

Fatty acid synthase (FASN), one of the key enzymes in the DNL pathway for saturated long chain fatty acids (LCFAs) synthesis, expresses low levels in normal cells, but an upregulating level is reported in various cancer cells. Potential therapeutic effects via suppressing fatty acid synthesis in the DNL pathway indicate a vital association of the DNL pathway with cancer progression, poor prognosis, and therapeutic outcomes [3]. Well-known FASN inhibitors, such as cerulenin, C75, and orlistat suggests the DNL pathway as one of the attractive targets for cancer therapies [4, 5]. Many studies have reported that the expression of FASN is regulated by sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c), a down-stream signaling pathway of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB, or Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) axis, mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, and hypoxic inducible factor-1 α (HIF-1 α) [6, 7]. Inhibiting the expression of these pathways decreases the expression of FASN that leads to inhibiting cell proliferation and promoting apoptosis both *in vitro* and *in vivo* cancer models [6, 8]. Thus, these findings confirm the important role of the DNL pathway in operating cancer survival and becoming a proposed target therapy for cancer.

Camellia sinensis or green tea from its dry leaves is comprised of approximately 40% polyphenol where epigallocatechin gallate (EGCG) is the major component of the catechins group [9]. EGCG promotes apoptosis and inhibits migration in many cancer cells through various pathways [10, 11]. These effects are proposed through inhibition of the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-9, and PI3K/Akt axis [12]. Treatment of hepatocellular carcinoma cells with EGCG exerts an inhibition on

expression and activity of phosphofructokinase (PFK) and anti-apoptotic protein Bcl2, which facilitates apoptosis [11]. An anticancer role of EGCG in promoting apoptosis has been reported to be correlated with suppressing the DNL pathway in various cancer cells with a negative effect on normal cells [10]. In contrast to other fatty acid synthesis inhibitors, catechins from green tea enhance the antitumor effect without weight loss or anorexia side-effects on *in vivo* models [13], suggesting EGCG as a satisfactory anticancer agent.

In the current study, we investigated the effects of EGCG on inhibiting the DNL pathway that corresponded to apoptosis in colorectal carcinoma HCT116 cells and a tumor xenografted animal model without exhibiting undesirable toxicity to normal organs of tumor bearing animals. We found a correlation between apoptosis and depletions of fatty acid and ATP synthesis. These depletions were not reliant on the total abundant expression of upstream PI3K/Akt/mTOR/SREBP-1c (sterol regulatory element binding proteins) and ERK pathways. EGCG had no undesirable side effects on the normal organs of the host bearing tumor, we thus suggest that the EGCG targeting reduction of fatty acid synthesis governing ATP synthesis may be safe for administrating as an anticancer therapy.

Materials and Methods

Cell cultures

Human colorectal carcinoma cell lines, HCT116 (ATCC CCL-247) and HT-29 (ATCC HTB-38) were kindly provided from Assistant Professor Dr. Damratsamon Surangkul and Assistant Professor Dr. Metawee Srikummool, 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% CO₂ humidifier incubator. In addition, human hepatocellular cell lines, HepG2 (JCRB1054) and HuH-7 (JCRB0403), obtained from Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB Cell Bank, Osaka, Japan) were cultured in DMEM medium (Corning, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA). The culture media were replaced every 3 days. Complete growth media were prepared freshly every week. Approximately 80 to 90% of cell confluence was subcultured. Cell morphology and numbers were recorded for every subculture, avoiding the use of cells exceeding ten

subculture passages to verify the normal growth of cells and ensure reliable and consistent of results. Cultures were detected for contamination of mycoplasma by staining DNA with DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) (D1306, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, USA) and visualized with a fluorescence microscope (Axio Observer A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany).

Determination of cell viability by MTT assay

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (AMRESCO, OH, USA) assay was used to evaluate cancer cell viability after treatment. Cells were plated in 96-well plates for 24 h. Then, cells were incubated with EGCG (CAS Number 989-51-5, Merck Millipore, USA) with various concentrations for 24 h. The vehicle control cells were incubated with 0.1% DMSO only. After 24 h of treatment, MTT solution (10 mg/ml) was added in harvested cells and incubated for 4 h in a CO₂ incubator. Formazan violet crystals of MTT were dissolved by DMSO and detected for absorbance at 595 nm wavelength by a microplate reader (BioTek instrument, Inc., Winooski, VT, USA). Percentages of cell viability were calculated and compared with the control by GraphPad Prism, version 5.

Evaluation stages of apoptosis by Annexin V/PI staining

Apoptosis assay was performed using double staining dyes, including Alexa Fluor 488 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. Cells were seeded in 24-well plates and incubated overnight. Cells were collected after 24 h of treatment and stained with 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 the center and initiator of apoptosis in various cancer cells. 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 positive 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 a

decreasing of dye accumulated in the mitochondrial matrix and an increasing of monomeric form in the cytoplasm which emits green fluorescence at 530 nm. The decreasing of the red/green fluorescence intensity ratio represents a dissipation of $\Delta\Psi_m$. Cells were cultured in a 24-well plate for 24 h of seeding period. Cells were harvested after 24 h of treatment. CCCP at a final concentration of 50 μM was used as a positive control to verify the depolarization state of $\Delta\Psi_m$. Cells were subjected to 20 μM of JC-1 in a CO_2 incubator for 45 minutes and detected by FACScalibur flow cytometry using excitation at 488 nm and an emission 585/42 filter. Data were analyzed using CellQuestPro software.

Xenograft nude mice experiment

All experimental procedures of animals complied with the standard research protocol of animal care and use established under the ethical guidelines and policies of the National Research Council of Thailand (NRCT) were approved by Naresuan University Animal Care and Use Committee (NUACUC). Male BALB/CAJcl-NU/NU 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, (NUCAR), Thailand. HCT116 cells at a density 1×10^7 cells were injected subcutaneously at the right flank area of mice. Tumor volume was measured every two days using this formula: tumor volume = length \times width²/2. After a tumor reached 100-150 mm³ within 7 days after injection, mice were randomly divided into 4 groups which were treated with 1) 0.1% DMSO as a vehicle, 2) 30 mg/kg body weight EGCG (low dose), 3) 50 mg/kg body weight EGCG (high dose), and 4) 20 mg/kg body weight 5FU (Sigma, Millipore, USA) acting as a positive control. Vehicles, EGCG and 5FU were administered via an intraperitoneal (IP) injection every day for seven days. Tumor size and body weight were measured every day. At the end of the experiment, all experimental animals were sacrificed using sodium thiopental at 100 mg/kg IP injection to induce deep anesthesia under the assistance of a veterinarian and then tumor and internal organs were immediately collected. Reflexes of anesthetic level were checked to make sure animals were in deep anesthesia before any organ collection. Tumor weight was measured and percentages of tumor volume, tumor size, and body weight were calculated compared with the control by GraphPad Prism, version 5.

Measurement of protein level in cell and tumor tissue by immunoblotting assay

Cells were trypsinized and lysed with lysis buffer (M-PER mammalian protein extraction reagent), containing 1% protease inhibitors (Thermo Scientific, USA). Tumor tissues were homogenized in RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 containing 100 mM sodium chloride, 0.1% SDS, 0.1% Triton-X, 0.5% sodium deoxycholate and 1 mM EDTA) buffer containing 2% phosphatase inhibitor and 1% proteinase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific,). Concentration of protein was measured by BCA assay reagent (Thermo Fisher Scientific, USA). Aliquots of 50 µg lysate were separated by 8-12% SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to the PVDF membrane. Then, non-specific proteins on the membrane were blocked using RAPID-BLOCK solution (Thermo Fisher Scientific, USA). The membrane was then probed with specific primary antibodies: PI3K (09-481), ERK1/2 (MABS827), p-ERK1/2 (05-797R), and ACLY (ABC426) (Merck Millipore, USA) at 1:1000 dilution; mTOR (2972S), Akt (9272S), p-Akt (9271S), ACC (3662S), Bak (3814S), and β-actin (4970S) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) at 1:500 dilution; p-mTOR (ab109268), SREBP-1c (ab28481), FASN (ab99359), and BNIP3 (ab10433) (Abcam, USA) at 1:500 dilution; cleaved-caspase3 (PA5-36746) (Thermo Fisher Scientific, USA) at 1:400 dilution. Consequently, a specific protein was conjugated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology) or anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA) at 1:7000 dilution. Finally, Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore) was added for visualizing the protein band which was then detected by chemiluminescence western blot detection (Chemiluminescence Image Quant LAS 4000; GE Healthcare Life Sciences, PA, USA). Protein bands were calculated as percentage of relative expression level of protein/actin and compared with the control by ImageJ software version 1.46.

Immunohistochemistry (IHC) and histological assays

The tumor tissue specimens were fixed in 10% neutral formaldehyde, embedded and sectioned at 2-3 µm thickness. Tumor slides were performed for IHC following the standard protocol. Consequently, protein expression in tissue slides was detected by incubating with specific primary antibodies for 4h at 4°C overnight and conjugated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Cell Signaling Technology) or anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology) secondary antibodies. Finally, the expression levels of proteins were developed by 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) substrate (Dako North America, Inc., USA), counter stained by hematoxylin, and visualized by light microscope (BX53 model, OLYMPUS Corporation, Japan).

The cytotoxicity effect of EGCG on tumor tissues and internal organs of the xenografted host was investigated using hematoxylin and eosin staining. The morphological changes were visualized under light microscopy.

Fatty acid assay kit

The level of free fatty acid was investigated using the Free Fatty Acid Quantification Kits (US, Biological, MA, USA). Cells and tissues were homogenized in 1% Triton-X in chloroform and centrifuged at 15,000 g for 10 min. The lower phase of homogenized fatty acid was collected by vacuum dried chloroform for 30 min at 60°C. Next, dried lipids were collected, and the level of free fatty acid was detected by microplate reader at Ex/Em 535/590 nm. Calculated percentages of free fatty acid level were compared with the control by GraphPad Prism, version 5.

ATP assay kit

Adenosine triphosphate (ATP) level was detected using ATP Quantification Kits (US, Biological, MA, USA). Cells and tumor tissues were extracted in ATP assay buffer and centrifuged at 13,000 g for 5 min. Then, supernatant was harvested and the level of ATP was measured by microplate reader at Ex/Em 535/587 nm. Percentage of ATP level was calculated by GraphPad Prism, version 5.

Statistical analysis

All statistical analyses were conducted using GraphPad Prism Software, version 5. All data were analyzed and shown as mean \pm SEM using either the unpaired Student's *t*-test or one-way ANOVA with Turkey's post-hoc analysis. At least 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 cells

Cell lines including HCT116, HT-29, HepG2, and HuH-7 were incubated with EGCG 0.2-1 mM for 24 h and cell viability was evaluated by MTT assay. As shown in Fig 1, EGCG inhibited cell proliferation in HCT116 and HT-29 cells in a dose dependent manner with an inhibitory concentration at 50% (IC₅₀) approximately 0.5 and 0.8 mM, respectively (Fig. 1A). In contrast, HepG2 and HuH-7 cells showed less effect to EGCG with IC₅₀ of more than 1 mM for 24 h of incubation period (Fig. 1B). With the conventional and effective chemotherapeutic drugs as positive controls, 0.2

mM 5FU treated in colorectal cancer HCT116 and HT-29 cells [14] and 20 μ M sorafenib treated in hepatocellular carcinoma HepG2 and Huh-7 cells [15] significantly inhibited cell viability compared with the control cells treated with DMSO.

Apoptotic cell death effect of EGCG in colorectal cancer cells

We next evaluated the inhibitory effect on cancer cell proliferation of EGCG mediating through triggering apoptosis cell death. Following treatment of EGCG at IC50 values, 0.5 and 0.8 mM for 24 h on HCT116 and HT-29 cells, respectively, cancer cells turned into the early and late stages of apoptosis (Fig. 2A-2C). 5FU at 0.2 mM also caused apoptosis in HCT116 cells while HT-29 cells had no apoptosis following 5FU treatment in 24 h. This is consistent with other reports that 0.2 mM 5FU increased apoptosis in HCT116 cells while HT-29 developed resistance to 5FU after 24 h incubation [16].

Disruption of MMP is one of the central regulations of cytochrome C released into cytoplasm, leading to activating effector caspases to induce an apoptosis cell death pathway. Fig. 2D and 2E show the expression of Bak and cleaved caspase3 in both HCT116 and HT-29 cells was enhanced by EGCG treatment after treatment of EGCG for 24 h. MMP in HCT116 and HT-29 cells was significantly decreased compared with control cells, indicating a mitochondrial dependent apoptosis effect following EGCG treatment in colorectal cancer cells (Fig. 2F).

EGCG decreased the DNL and ATP in colorectal cancer cells.

Downregulation of DNL is considered a potent mediator of apoptosis in cancer cells. A consequent deprivation of ATP level following the DNL suppression plays a role in activating apoptosis [6]. The present study evaluated the expression of the DNL proteins after 24 h of EGCG incubation in HCT116 and HT-29 cells. Our results demonstrated an obvious expression of the DNL proteins in HCT116 and HT-29 cells, confirming the important role of DNL in colorectal cancer metabolism. After 24 h of treatment, 0.5 mM and 0.8 mM EGCG showed a significant inhibition on ACC expression in both HCT116 and HT-29 cells, respectively. No change in levels of ACLY and FASN proteins was observed by EGCG (Fig. 3A and 3B). We also found that EGCG had an effective inhibition on fatty acid synthesis in HCT116 and HT-29 cells (Fig. 3C), suggesting the targeted DNL enzyme activity of EGCG. The inhibition of DNL is controlled by an upstream signaling pathway, AMPK, which requires ATP/ADP to signal its phosphorylation status [17]. We found that EGCG induced a decrease of ATP level in both colorectal cancer cells (Fig. 3D). Thus, it is suggested

that depletion of lipogenesis in the DNL pathway correlating with suppression of ATP participates in the apoptotic effect of EGCG on colorectal cancer cells.

The antiproliferative activity of EGCG and 5FU reduced tumor progression in xenograft nude mice.

HCT116 having a lower IC50 value than that of HT-29 was selected for the next evaluation of the apoptotic effects of EGCG on the *in vivo* cancer xenograft mice model. EGCG treated at 30 and 50 mg/kg body weight via IP injection for 7 days showed a similar level of suppression effect to the growth rate of HCT116-tumors by decreasing tumor volume and tumor weight significantly compared with the vehicle control (Fig. 4A-4B, and 4D). Notably, the body weight of the animal was not influenced by EGCG (Fig. 4C). Our data is consistent with the previous report that EGCG generates an antitumor effect without cytotoxic effects on body weight loss as noticed in nude mice bearing bladder T24 tumors upon everyday injection of EGCG at 50 and 100 mg/kg for 28 days [12]. Also, catechins have been reported to display a safe antitumor effect without weight loss or anorexia side-effects in contrast to other fatty acid synthesis inhibitors [13]. In addition, our study showed that this antitumor effect of EGCG was similar to that of the effect of 5FU at 20 mg/kg body weight. 5FU did not cause weight loss compared with other groups, which is consistent with the previous report [18]. These results demonstrate the consistency of the anticancer effect of EGCG, both *in vitro* and *in vivo* models. We suggest that EGCG is safe for administrating as an antitumor therapy.

EGCG increased apoptosis in tumors of xenograft nude mice.

Next, we evaluated the apoptotic induction effect of EGCG on tumors of animals. We found increased DNA breaking features and cleaved caspase3 protein expression levels in tumors of EGCG and 5FU treated animals with the highest rate found in the EGCG 50 mg/kg body weight group (Fig. 5A). The high-dose EGCG and 5FU groups enhanced significant expression of BNIP3, Bak, and cleaved caspase3 while Bcl2 was suppressed (Fig. 5B and 5C). Although, a higher dose of EGCG exhibited a greater apoptotic protein expression level than that found in a lower dose group, all of these results demonstrate apoptosis induction of EGCG in tumors of animals.

EGCG decreased the DNL pathway and ATP level in tumors of xenograft nude mice.

Based on *in vitro* suggestion, we observed that reduction of the DNL potentially enhanced apoptosis in tumors. This *in vivo* tumor data supported our *in vitro* suggestion. A high concentration of EGCG treatment decreased tumor free fatty acid levels without changing the protein levels in the DNL pathway (Fig. 6A-6D). In addition, reduction of ATP levels was found in tumors of the EGCG treated groups (Fig. 6E). Thus, in agreement with the *in vitro* suggestion, depletion of lipogenesis in the DNL pathway correlated with suppression of ATP, contributing to the apoptotic effect of EGCG in tumors of HCT116 xenograft mice.

EGCG decreased the expression of signaling pathway proteins regulating the DNL in tumors of xenograft nude mice.

The expression of enzymes in the DNL pathway is generally regulated by the PI3K/Akt/mTOR modulating SREBP-1c and ERK signaling pathways [19]. In the present study, we found that EGCG treatments showed reduction effects on the expression level of phospho-Akt (p-Akt) and phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2). 5FU caused a reduction of p-ERK1/2 level only (Fig. 7). No alteration of other protein expression was observed following EGCG treatment.

No cytotoxic effect of EGCG on internal organs in mice bearing HCT116 tumor xenografts

Finally, in Fig. 8, histology of internal organs of each group showed no cellular damages or morphological changes when receiving EGCG and 5FU for 7 days. Thus, consistent with lack of body weight loss, EGCG treatment exerts a safe and efficient antitumor therapy to the host-bearing tumor.

Discussion

EGCG is the most abundant polyphenolic compound in dried green tea leaf extracts. Previous studies have reported that EGCG inhibits cell proliferation, metastasis, and invasion, correlating with promoting apoptosis in various cancer cell types [10, 12]. This is consistent with what we found where EGCG diminished cell viability and increased mitochondrial damage-induced apoptosis in colorectal cancer cells. A reduction of the DNL pathway is hypothesized to contribute to apoptosis in these cancer cells. Our results confirmed that EGCG suppressed fatty acid synthesis which correlated with alteration of ACC protein expression in the DNL pathway. In addition, reduction of fatty acid inducing apoptosis was associated with a reduced ATP

level both *in vitro* and *in vivo* studies. According to regulation of the DNL pathway by Akt/mTOR axis and ERK pathway, EGCG suppressed p-Akt and p-ERK1/2 expression in tumors of animals.

It is known that abnormally high expression of enzymes in the lipogenesis pathway is one of the most important metabolic features in malignant cancer cells [15]. Reduction of key enzymes in the DNL pathway exhibits reduction of fatty acid product [10] and fatty acid oxidation (FAO) [6], leading to decreasing cell proliferation, ability of metastasis, and invasion in cancer cells. The mechanism of the anticancer effect of EGCG has been demonstrated to occur through targeting the fatty acid biosynthesis pathway. EGCG decreased activity of FASN and free fatty acid levels without altering protein expression in cancer cells [10, 20]. We found consistent results where EGCG suppressed fatty acid synthesis without affecting the abundance of protein expression in the DNL pathway in tumors of the animal model. A consequence of decreasing fatty acid level to facilitate apoptosis has been suggested to involve an increased expression of proapoptotic proteins mediated through induction of ER stress-induced ceramide levels as reported in pancreatic cancer cells [21]. Study in breast cancer cells has revealed that elevation of ceramide after suppression of FASN can activate the expression of the proapoptotic protein, BNIP3 [22]. Thus, we suggest BNIP3 as a mediator of apoptosis induction following EGCG suppressing the DNL pathway. An increase in the expression of BNIP3 after concanavalin A treatment has been previously reported to inhibit the expression of Bcl2/Bax ratio to trigger mitochondrial dysfunction, leading finally to activating caspase dependent apoptosis. A decreased expression of Bcl2 triggers a translocation of Bak from cytosol to the mitochondrial, resulting in promotion of apoptosis in hepatocellular cells [11].

Besides enhanced proapoptotic expression following fatty acid suppression, a reduction of fatty acid oxidation (FAO) has been found as a consequence of suppressing the expression of ACC- α in hepatocellular carcinoma cells [23]. A mitochondrial FAO generates NADH, FADH₂, and acetyl coenzyme A (CoA) in each round from shortening of fatty acids (two carbons per cycle). NADH and FADH₂ from FAO enter the electron transport chain to produce ATP [24]. It is known that carnitine palmitoyl transferases-1 (CPT-1) translocated on the outer membrane of mitochondria catalyzes the rate-limiting step of the FAO process. FAO inhibition reported in Etomoxir, a CPT-1 inhibitor that irreversibly suppresses FAO, promotes apoptosis in cancer cells [24]. A

study in HepG2 cells has reported that EGCG can inhibit the activity of CPT-1, leading to decreasing ATP production [10]. Thus, in agreement with previous studies, our results suggest an impact of EGCG on inhibiting fatty acid synthesis which contributes to suppressing FAO and leads to reducing ATP synthesis. In the present study, we demonstrate that a decreased free fatty level contributing a diminished ATP level participates in apoptosis following EGCG treatment in colon cancer cells. In addition, suppressing FAO-ATP synthesis by EGCG may, at least in part, involve inhibition of CPT-1 activity.

In addition to reduction of ATP synthesis, inhibition of fatty acid synthesis also suppresses p-Akt and p-ERK with no alteration of total protein synthesis levels in non-small cell lung cancers. This inhibition of the Akt/ERK pathway downregulates ATP generation from glucose metabolism, leading to antiproliferative and antitumor efficiencies [25]. Results reported from inhibition of EGFR and HER-2 by EGCG in cancer cells showed an inhibition on phosphorylation of the Akt pathway but not the expression of total protein abundance [26]. Also, 28 days of EGCG treatment has an anticancer effect independent of the expression of total PI3K and Akt in tumor bearing bladder cancer cells [12]. Consistent with our findings, we thus demonstrate that suppression of fatty acid synthesis by EGCG can regulate its downstream PI3K/Akt and ERK activity pathways, generating an important role in regulating ATP synthesis from glucose metabolism in cancer cells. Accordingly, a reduction of ATP causing an accumulation of ADP or AMP levels has been proven to activate AMPK in cancer cells. More importantly, activated AMPK results in inhibiting glycogen, fatty acid, and protein synthesis. Activation of AMPK consequently inhibits ACC activity via enhancing phosphorylated ACC levels [27] and also suppresses FASN activity in hepatoma cells [17, 28]. In line with previous reports, we suggest a positive correlation of ATP level and ACC expression level in colon cancer cells. Thus, following inhibition of fatty acid synthesis in the DNL pathway by EGCG, a decrease of ATP and enhanced AMPK activity in turn suppress activities of proteins involving the fatty acid synthesis pathway in colon cancer cells.

In the present study, notably, the expression of DNL proteins in tumors of xenografted mice was not altered after 7 days of EGCG treatment, suggesting a time-dependent and additional contributing signaling pathway of protein synthesis regulation in the *in vivo* model. Previous study has demonstrated that enhanced p-AMPK by EGCG contributes to inhibition of mTOR/4E-BP1 activity in hepatoma cells.

Consequently, the downstream signaling protein SREBP-1c is interfered, leading to inhibiting activities of enzymes responsible for fatty acid biosynthesis and lipid accumulation participating in cancer proliferation [28]. However, in our *in vivo* study, in addition to stable PI3K/Akt and ERK pathways, we also found no alteration of the abundant expression of the total mTOR/SREBP-1c pathway following EGCG treatment for 7 days in animals, suggesting a complexity of signaling circuit regulation with a time-dependence in the *in vivo* model. Thus, all these findings support our assumption that inhibition of ATP upon fatty acid depletion may suppress activities of signaling proteins beyond AMPK activation to control fatty acid synthesis of the DNL pathway in colon cancer cells. Notably, 5FU treatment had a similar pattern of protein expressions with EGCG treatment, consistent with the report in 5FU injection in an orthotopic xenograft of human gastric cancer cells in the stomach of nude mice showing small changes of the expression of protein PI3K/Akt/mTOR pathway [29]. A schematic diagram summarizing the anticancer effect of EGCG on colon cancer cells is demonstrated in Fig. 9. More importantly, without causing undesirable side effects to normal organs of the host bearing tumor, EGCG may be safe for administrating as an anticancer therapy.

In conclusion, our results demonstrate that EGCG inhibited fatty acid synthesis resulting in a depletion of ATP which is considered a regulator of the synthesis of fatty acid, contributing to apoptosis induction for both *in vitro* and *in vivo* colon cancer cells. This study provides a reasonable research rationale for further study of EGCG targeting the DNL pathway as a new clinical approach for treatment of colorectal cancer cells. Further additional experimental systems are required to elucidate strategic signaling mechanisms that regulate the DNL pathway upon the anticancer therapy of EGCG.

Acknowledgements

We acknowledge Assoc. Prof. Mary Sarawit, Distinguished Specialist for Language and Accreditation, Faculty of Business, Economics, and Communications (BEC), Naresuan University, Thailand for improving the use of English in the manuscript.

Funding

PS receives research support from the 2017 annual government statement of the expenditure support budget in research, Naresuan University, Thailand.

Authors' contributions

Conceptualization: PK PS
Data curation: PK PS
Formal analysis: PK PS
Funding acquisition: PS.
Investigation: PK DS MS DP SP JS PS
Methodology: PK JS PS
Project administration: DS MS DP SP JS PS
Resources: PK DS MS LR DP SP JS PS
Supervision: PS
Validation: PK PS
Visualization: PK PS
Writing ± original draft: PK PS
Writing ± review & editing: PK DS MS LR DP SP JS PS

Competing interests

Not applicable

References

1. Cantor, J.R. and D.M. Sabatini, *Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces*. *Cancer Discov*, 2012. **2**(10): p. 881-98.
2. Biswas, S., J. Lunec, and K. Bartlett, *Non-glucose metabolism in cancer cells- is it all in the fat?* *Cancer Metastasis Rev*, 2012. **31**(3-4): p. 689-98.
3. Wright, C., et al., *Anti-Tumorigenic Potential of a Novel Orlistat-AICAR Combination in Prostate Cancer Cells*. *J Cell Biochem*, 2017. **118**(11): p. 3834-3845.
4. Tan, W., et al., *Berberine Regulated Lipid Metabolism in the Presence of C75, Compound C, and TOFA in Breast Cancer Cell Line MCF-7*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
5. Ni, T., et al., *Oroxylin A suppresses the development and growth of colorectal cancer through reprogram of HIF1alpha-modulated fatty acid metabolism*. *Cell Death Dis*, 2017. **8**(6): p. e2865.

6. Wen, Y.A., et al., *Downregulation of SREBP inhibits tumor growth and initiation by altering cellular metabolism in colon cancer*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(3): p. 265.
7. Hsieh, J.T., et al., *Epigallocatechin Gallate Attenuates Partial Bladder Outlet Obstruction-induced Bladder Injury via Suppression of Endoplasmic Reticulum Stress-related Apoptosis-In Vivo Study*. *Urology*, 2016. **91**: p. 242 e1-9.
8. Li, N., et al., *Inhibition of the sterol regulatory element-binding protein pathway suppresses hepatocellular carcinoma by repressing inflammation in mice*. *Hepatology*, 2017. **65**(6): p. 1936-1947.
9. Yang, C.S. and X. Wang, *Green tea and cancer prevention*. *Nutr Cancer*, 2010. **62**(7): p. 931-7.
10. Khiewkamrop, P., et al., *Epistructured catechins, EGCG and EC facilitate apoptosis induction through targeting de novo lipogenesis pathway in HepG2 cells*. *Cancer Cell International*, 2018. **18**.
11. Li, S., et al., *In vitro and in vivo study of epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis in aerobic glycolytic hepatocellular carcinoma cells involving inhibition of phosphofructokinase activity*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 28479.
12. Luo, K.W., et al., *EGCG inhibited bladder cancer T24 and 5637 cell proliferation and migration via PI3K/AKT pathway*. *Oncotarget*, 2018. **9**(15): p. 12261-12272.
13. Puig, T., et al., *Green tea catechin inhibits fatty acid synthase without stimulating carnitine palmitoyltransferase-1 or inducing weight loss in experimental animals*. *Anticancer Res*, 2008. **28**(6A): p. 3671-6.

14. Munker, S., et al., *Chemotherapy for metastatic colon cancer: No effect on survival when the dose is reduced due to side effects*. *BMC Cancer*, 2018. **18**(1): p. 455.
15. Qiu, Y., et al., *Reversal of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: epigenetically regulated disruption of 14-3-3eta/hypoxia-inducible factor-1alpha*. *Cell Death Discov*, 2019. **5**: p. 120.
16. Iovine, B., et al., *L-carnosine dipeptide overcomes acquired resistance to 5-fluorouracil in HT29 human colon cancer cells via downregulation of HIF1-alpha and induction of apoptosis*. *Biochimie*, 2016. **127**: p. 196-204.

17. Huang, C.H., et al., *EGCG inhibits protein synthesis, lipogenesis, and cell cycle progression through activation of AMPK in p53 positive and negative human hepatoma cells*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009. **53**(9): p. 1156-1165.
18. Wang, W., et al., *Pretreatment with Gemcitabine/5-Fluorouracil Enhances the Cytotoxicity of Trastuzumab to HER2-Negative Human Gallbladder Cancer Cells In Vitro and In Vivo*. *Biomed Res Int*, 2019. **2019**: p. 9205851.
19. Ricoult, S.J.H., et al., *Oncogenic PI3K and K-Ras stimulate de novo lipid synthesis through mTORC1 and SREBP*. *Oncogene*, 2016. **35**(10): p. 1250-1260.
20. Zaytseva, Y.Y., et al., *Inhibition of fatty acid synthase attenuates CD44-associated signaling and reduces metastasis in colorectal cancer*. *Cancer Res*, 2012. **72**(6): p. 1504-17.
21. Tadros, S., et al., *De Novo Lipid Synthesis Facilitates Gemcitabine Resistance through Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Cancer*. *Cancer Research*, 2017. **77**(20): p. 5503-5517.
22. Bandyopadhyay, S., et al., *Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2006. **66**(11): p. 5934-40.
23. Wang, M.D., et al., *Acetyl-coenzyme A carboxylase alpha promotion of glucose-mediated fatty acid synthesis enhances survival of hepatocellular carcinoma in mice and patients*. *Hepatology*, 2016. **63**(4): p. 1272-86.
24. Qu, Q., et al., *Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer*. *Cell Death Dis*, 2016. **7**: p. e2226.
25. Chang, L., et al., *Inhibition of FASN suppresses the malignant biological behavior of non-small cell lung cancer cells via deregulating glucose metabolism and AKT/ERK pathway*. *Lipids Health Dis*, 2019. **18**(1): p. 118.
26. Puig, T., et al., *Fatty acid metabolism in breast cancer cells: differential inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and C75*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **109**(3): p. 471-9.
27. Park, Y.K., et al., *AZD1208, a pan-Pim kinase inhibitor, inhibits adipogenesis and induces lipolysis in 3T3-L1 adipocytes*. *J Cell Mol Med*, 2018. **22**(4): p. 2488-2497.

28. Huang, L.H., H.Y. Chung, and H.M. Su, *Docosahexaenoic acid reduces sterol regulatory element binding protein-1 and fatty acid synthase expression and inhibits cell proliferation by inhibiting pAkt signaling in a human breast cancer MCF-7 cell line*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 890.
29. Ishida, K., et al., *Inhibition of PI3K suppresses propagation of drug-tolerant cancer cell subpopulations enriched by 5-fluorouracil*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2262.



Figure legend

Fig. 1. The inhibitory effect of EGCG on cell viability of HCT116, HT-29, HepG2, and HuH-7 cancer cells. Cells were incubated with EGCG for 24 h and subjected to MTT assay. Percentage of cell viability (A) (HCT116 and HT-29) and (B) (HepG2 and HuH-7) following treatment was compared with 100% of the vehicle control group. Data from at least three independent triplicated experiments are presented as mean \pm SD, $n=9$, $*p < 0.05$, as compared with the control.

Fig. 2. EGCG induced apoptosis cell death in both HCT-116 and HT-29 cancer cells. (A) Cells were incubated with EGCG at IC50 concentration and 0.2 mM 5FU for 24 h and then evaluated by AnnexinV/PI staining. The quantitative bar graphs show percentages of viability, early apoptotic, and late apoptotic cells of (B) HCT116 and (C) HT-29 cells. (D) The effect of EGCG on expression of Bak and cleaved caspase 3 in both cell lines was determined by immunoblotting assay. (E) The histogram showed relative expression of apoptotic proteins. (F) EGCG induced mitochondrial damage was investigated by JC-1 staining assay. The histograms show percentages of the red and green fluorescent intensity ratio. Data from at least three independent triplicated experiments are presented as mean \pm SD, $n=3$, $*p < 0.05$ and $^{\#}p < 0.05$ as compared with the control of each cell.

Fig. 3. The effect of EGCG on expression of enzymes in the DNL pathway, free fatty acid and ATP levels in both colorectal cancer cells. Cells were incubated with EGCG at IC50 concentration for 24 h. (A) The expression of enzymes in the DNL pathway was evaluated by immunoblotting assay. (B) Relative protein expression compared with β -actin is presented in a histogram. (C) The histogram represents free fatty acid and (D) ATP levels compared with the vehicle control. Data are expressed as mean \pm SD from at least a triplicate of $n = 3$, $*p < 0.05$ and $^{\#}p < 0.05$ as compared with the control of each cell.

Fig. 4. EGCG suppressed HCT116 tumor proliferation in xenograft nude mice models. HCT116 cells were injected subcutaneously at the back area of nude mice. (A) Representative images show tumor formation and tumor nodules in nude mice. (B) Tumor volume and (C) body weigh were measured every day for 7 days and (D) tumor

weight was measured at the end of the experiment. Representative data used 5-6 tumors in each group, presented as mean \pm SD, $*p < 0.05$ as compared with the control.

Fig. 5. The effect of EGCG increased morphology of the apoptotic feature and expression of proapoptotic proteins in tumor tissues. (A) Representative image of tumor H & E staining presents the morphology of apoptosis (arrow marks) and IHC (scale bar =40 μ m) shows the intensity of cleaved caspase3 expression in tumor tissues following indicated dose of EGCG treatment. (B) Representative immunoblotting assay shows anti-apoptotic and proapoptotic protein expression in tumor tissue and (C) the quantitative protein expression/ β -actin level is shown in a histogram. Representative data used 3-4 tumors in each group, presented as mean \pm SD, $*p < 0.05$ as compared with the control.

Fig. 6. The effect of EGCG on enzyme expression in the DNL pathway, free fatty acid, and ATP levels in the tumors of xenograft mice models. (A) Representative image of tumor IHC staining (scale bar =40 μ m) shows expression of enzymes in the DNL pathway. (B) Expression of ACLY, ACC, and FASN was measured by immunoblotting assay and (C) quantitated in a histogram compared with 100% of the control group. (D) The histogram represents free fatty acid and (E) ATP levels. Representative data used 3-4 tumors in each group, presented as mean \pm SD, $*p < 0.05$ as compared with the control.

Fig. 7. The effect of EGCG on upstream signaling PI3K/Akt/mTOR/SREBP-1c and ERK pathways in HCT116 tumor xenograft mice models. (A) Representative immunoblotting shows expression proteins which (B) were quantitated to a histogram compared with 100% of the control group.

Fig. 8. Investigation of EGCG effects on internal organs of HCT116 tumor xenograft mice models. Representative image of H & E staining shows morphology of internal organs (scale bar =40 μ m) after receiving indicated treatments using a positive control 5FU. Representative data used 3-4 tumors in each group, presented as mean \pm SD, $*p < 0.05$ as compared with the control.

Fig. 9. The schematic diagram for the mechanism of EGCG inducing apoptosis through suppressing the DNL pathway in colorectal cancer cells.





Figure 1

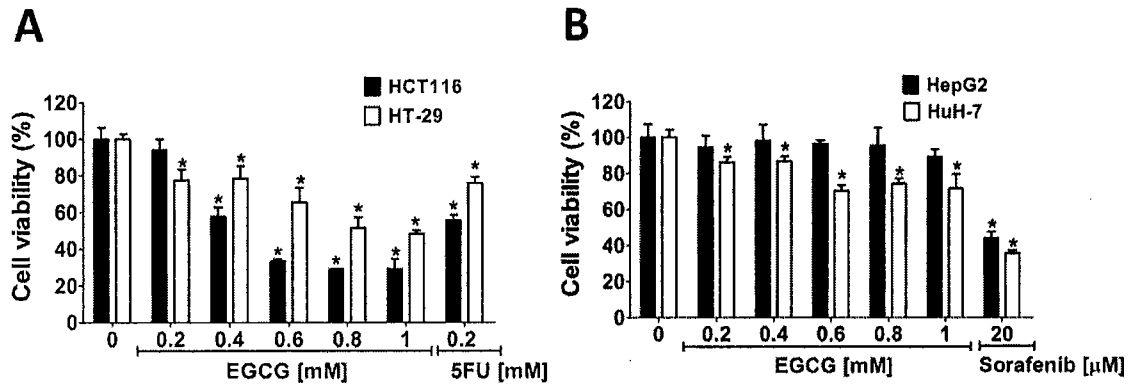


Figure 2

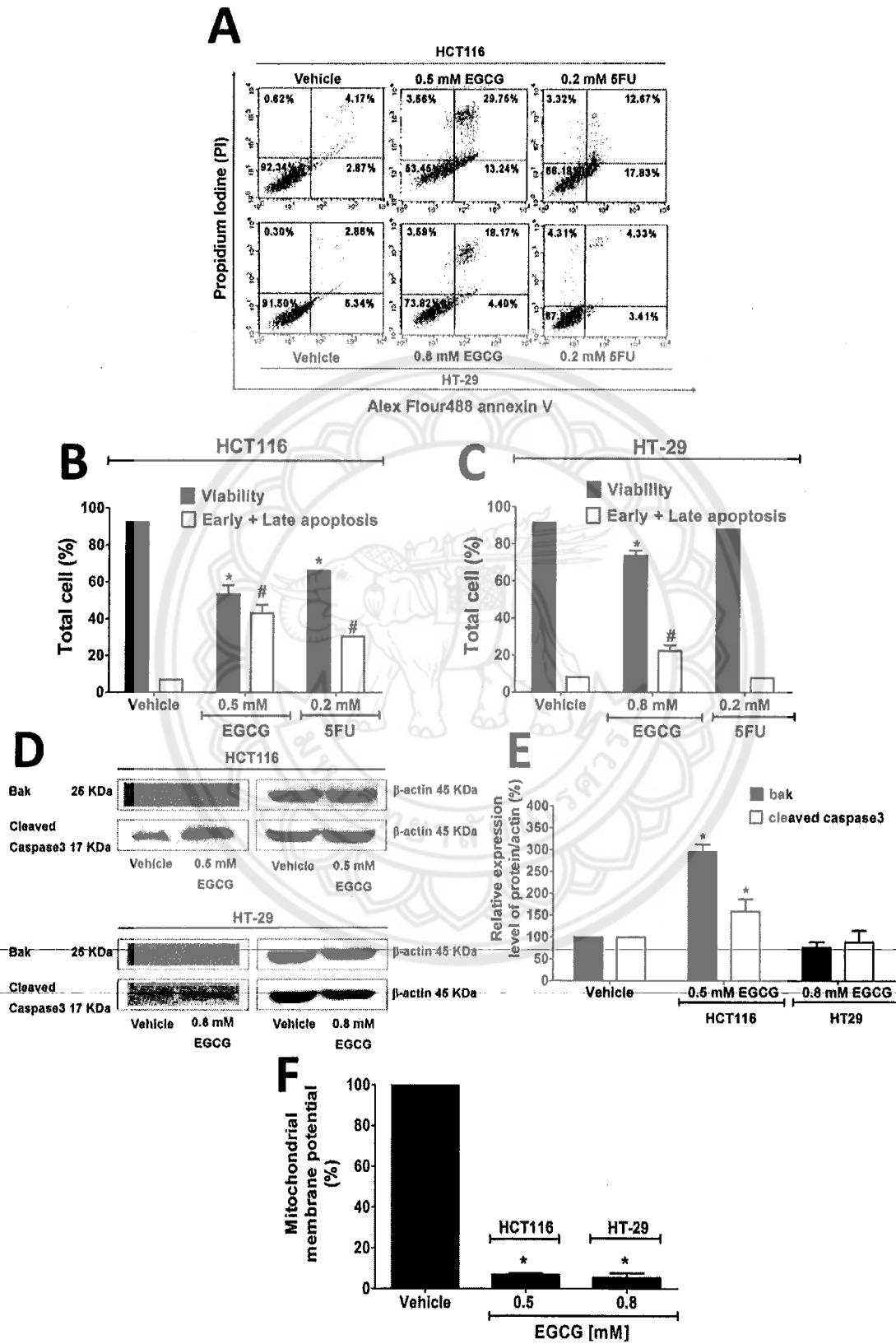


Figure 3

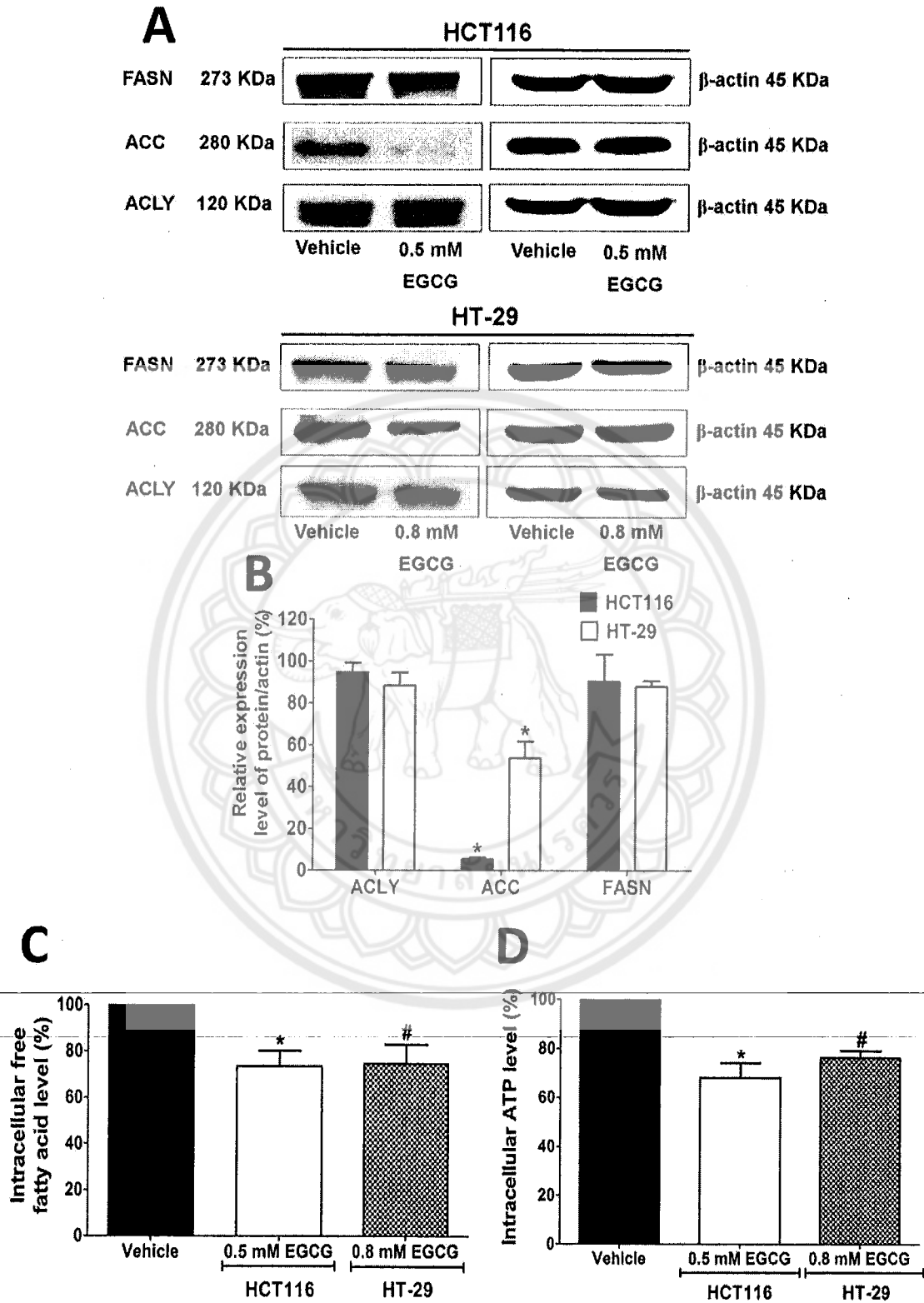


Figure 4

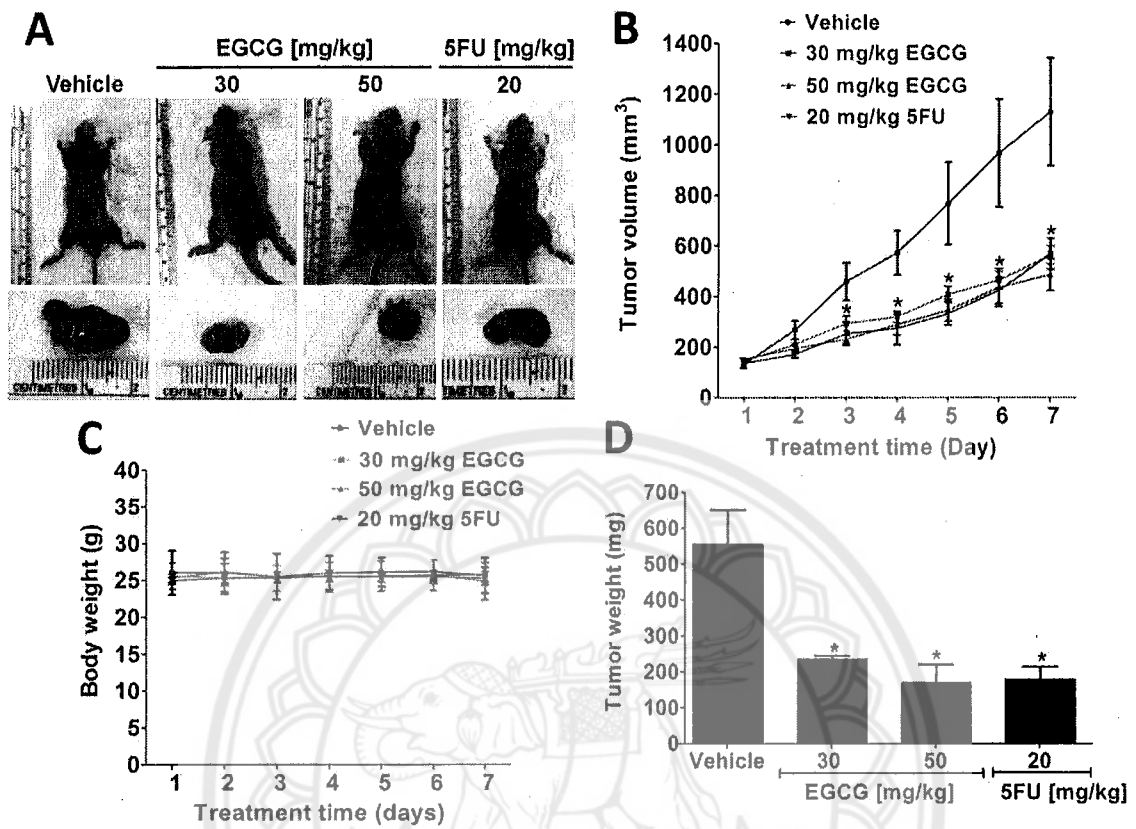


Figure 5

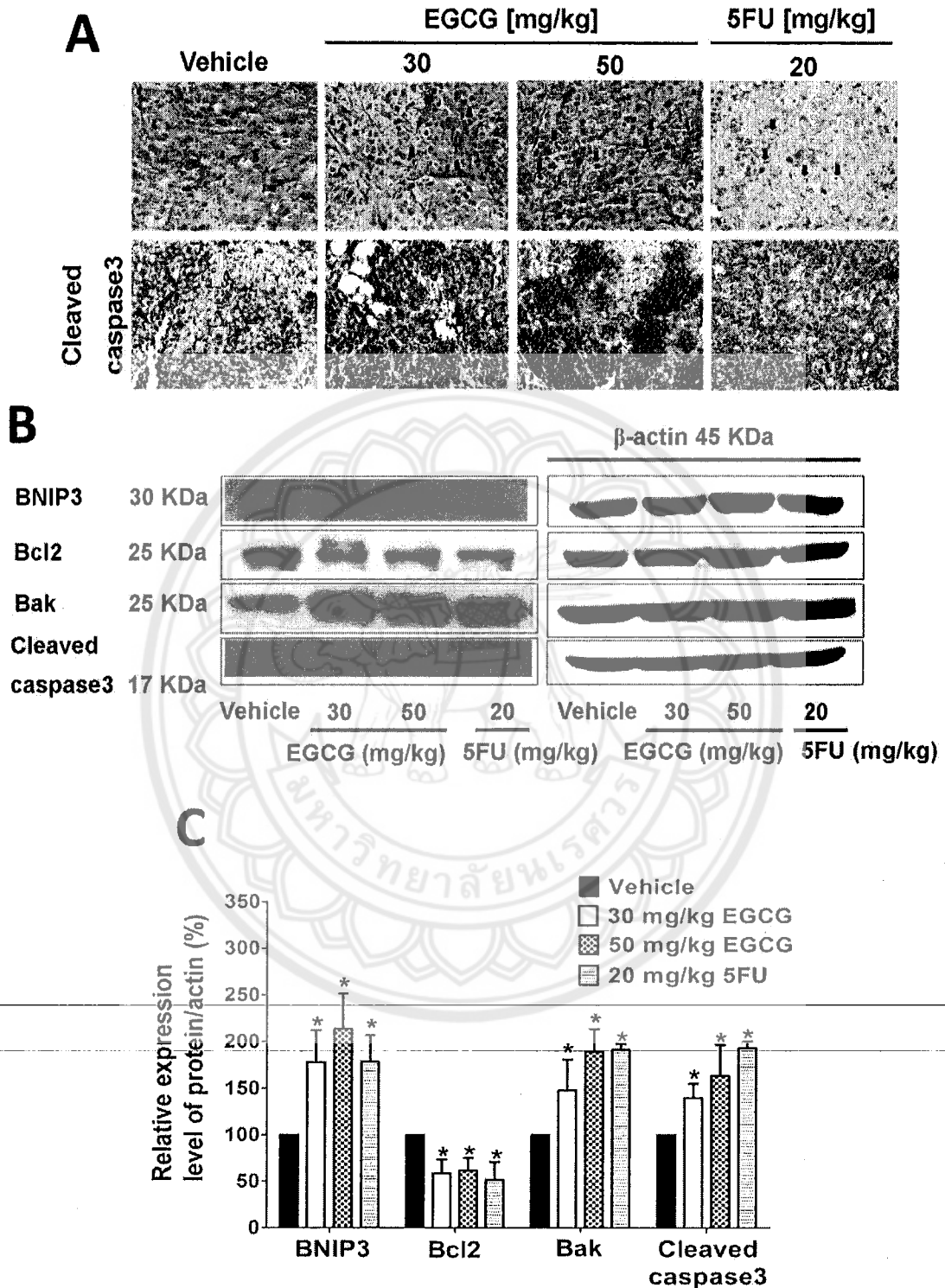


Figure 6

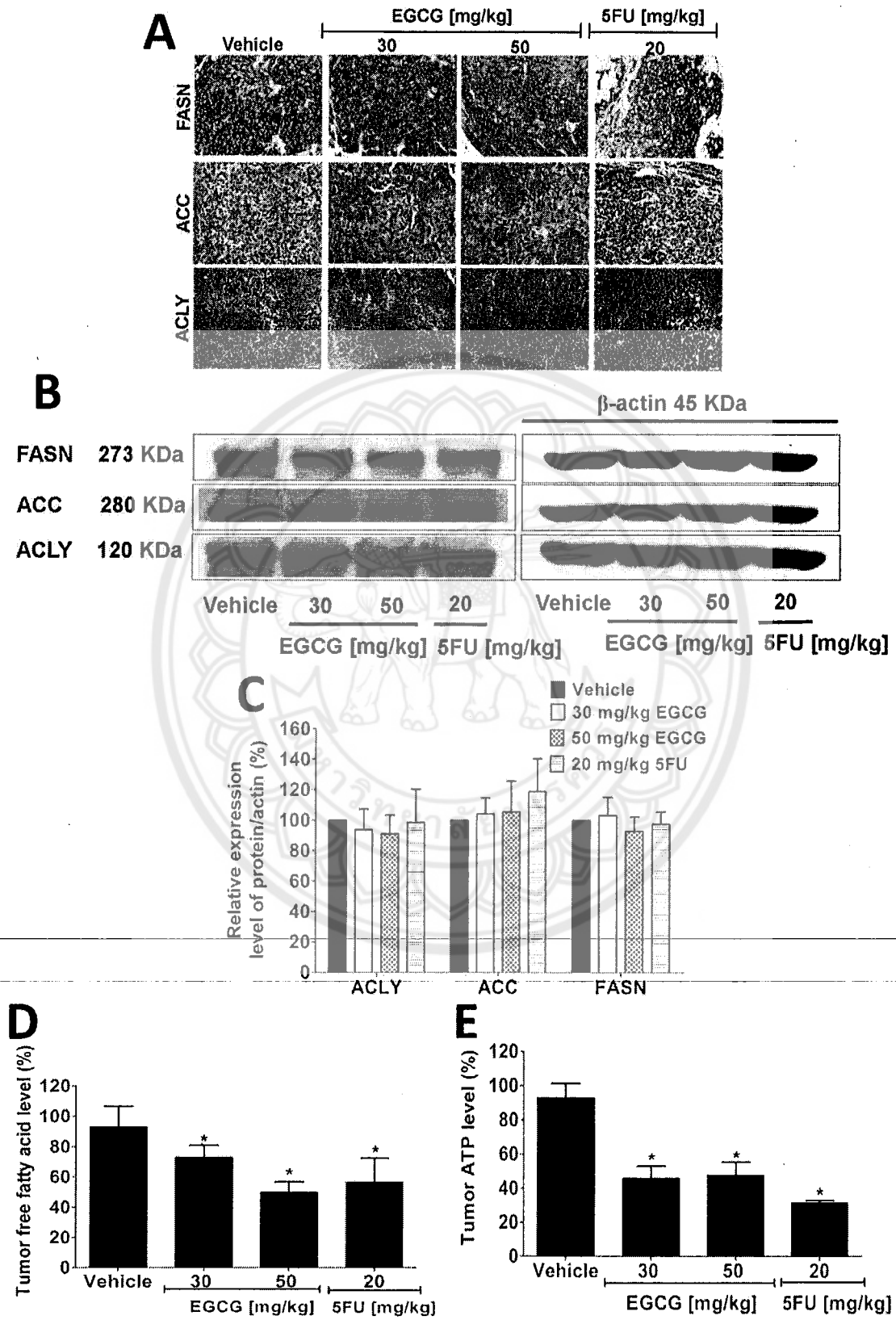


Figure 7

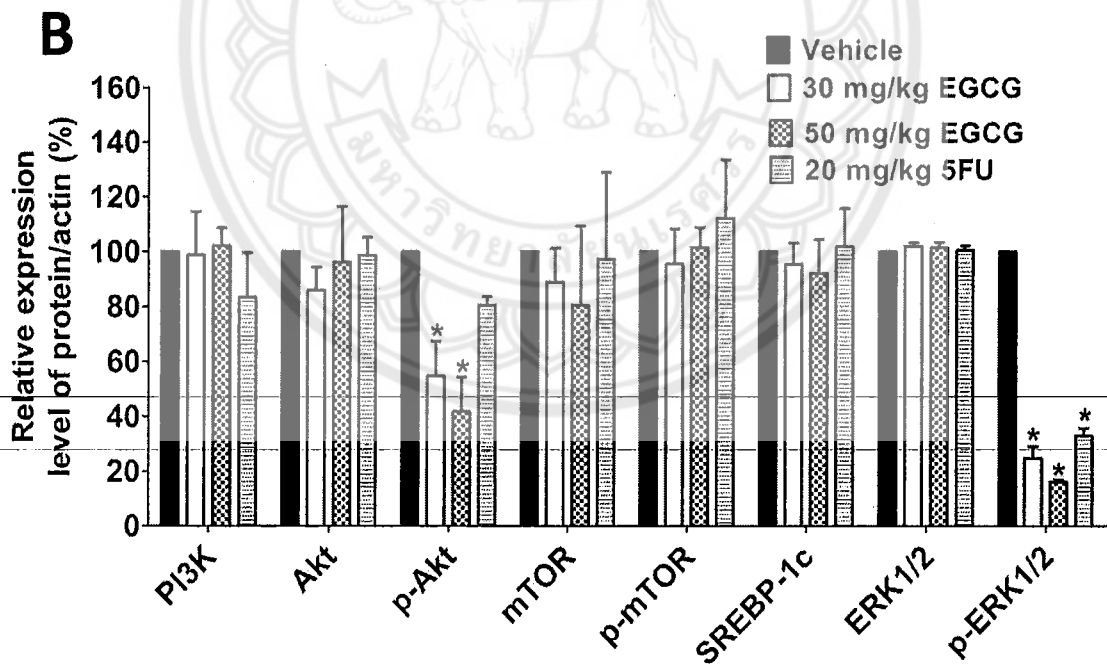
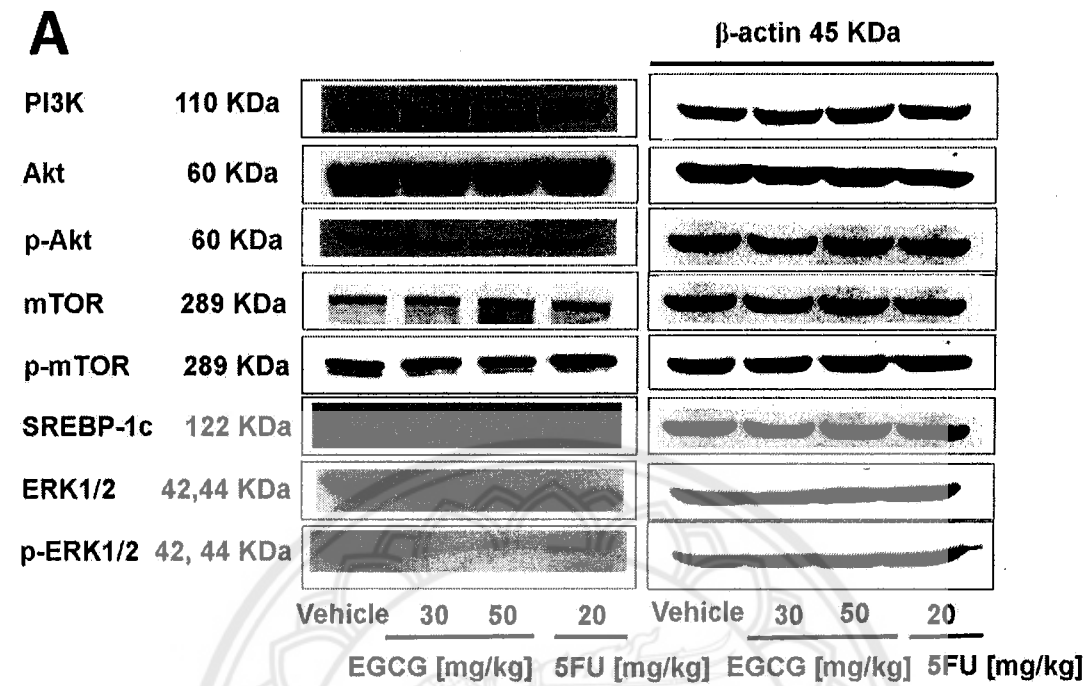


Figure 8

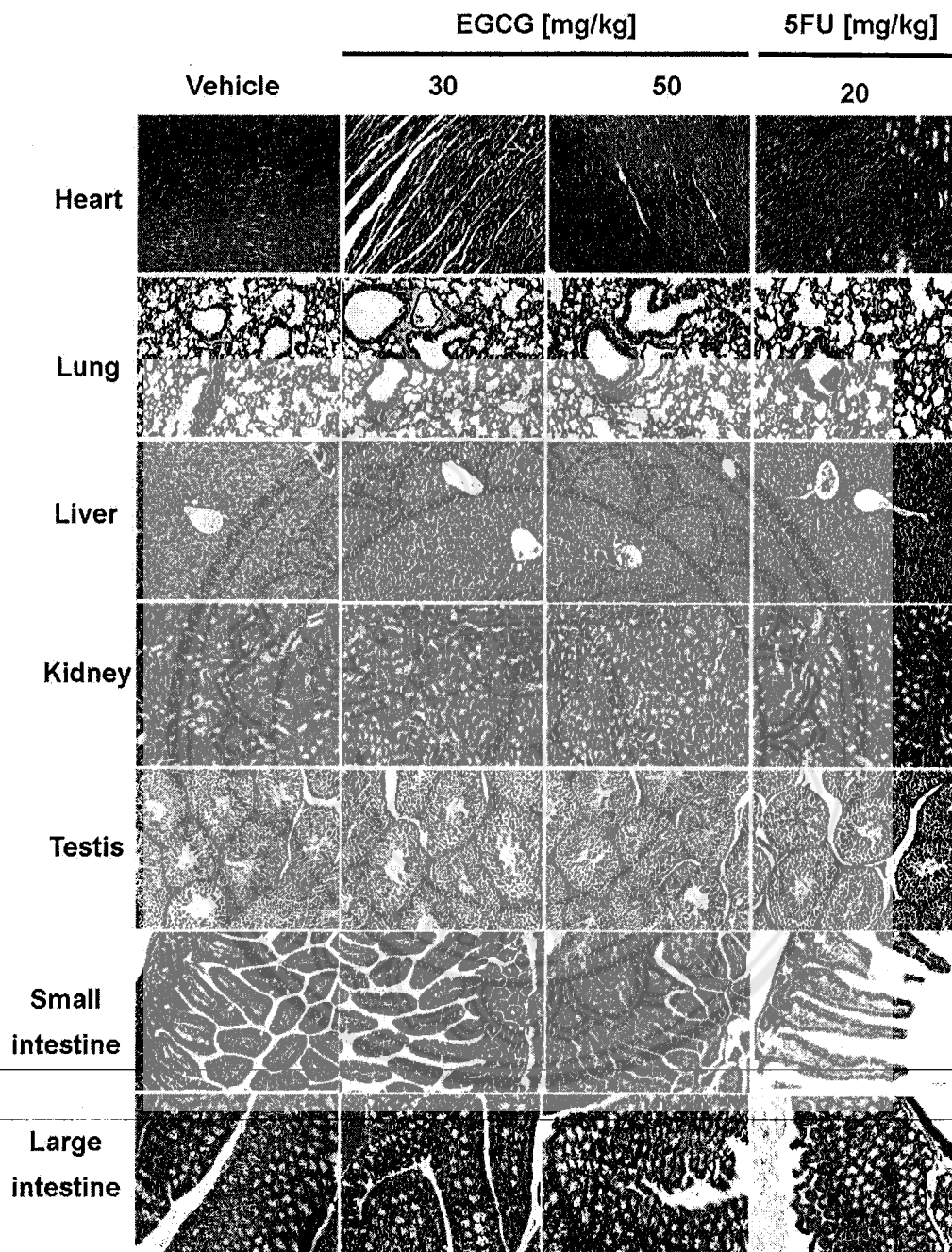
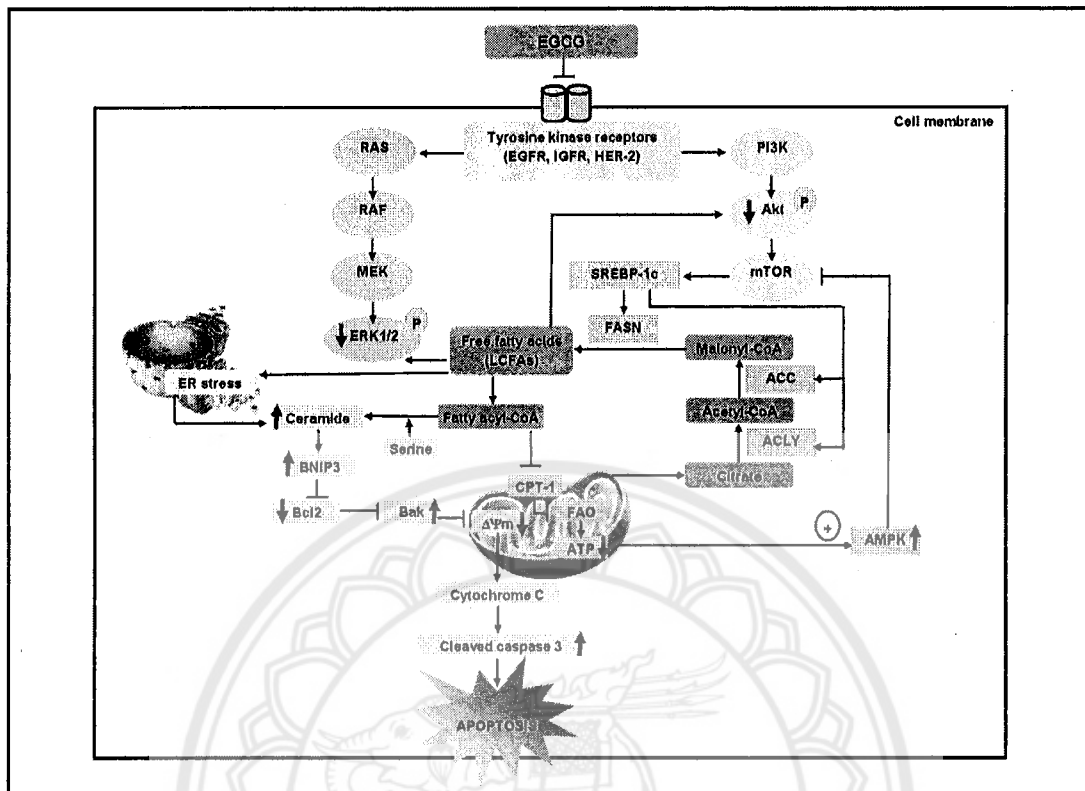


Figure 9







ผลของ citrate transporter inhibitor ต่อการยับยั้งขบวนการ *de novo* lipogenesis

และเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งด้วย HCT116

Effect of citrate transporter inhibitor suppress *de novo* lipogenesis

and induces apoptosis in HCT116 xenograft nude mice models

นารินทร์ ภักดีโต¹, สมฤดี สุวรรณกุลานันท์¹, วันอังคาร พูลศรี¹, ดามรัสมน สุรางกูร², เมธวี ศรีคำมูล²,
จุลินทร สำราญ³, จิราภรณ์ โตจรัส⁴, และ ปิยะรัตน์ ศรีสว่าง^{1*}

Narinthorn Phakdeeto¹, Somrudee Suwankulanant¹, Wan-angkan Poolsri¹, Damratsamon Surangkul²,
Metawee Srikummool², Julintorn Somran³, Jiraporn Tocharus⁴, and Piyarat Srisawang^{1*}

¹ภาควิชาสรีรวิทยา, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์, มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก, ประเทศไทย, 65000

²ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์, มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก, ประเทศไทย, 65000

³ภาควิชาพยาธิวิทยา, คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก, ประเทศไทย, 65000

⁴ภาควิชาสรีรวิทยา, คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, ประเทศไทย, 50200

¹Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, 65000

²Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, 65000

³Department of Pathology, Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, 65000

⁴Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, 50200

Corresponding author: piyarats@nu.ac.th

Abstract

The increasing of *de novo* lipogenesis (DNL) pathway is a characteristic of various cancer cells promoting to cells growth and survival of cancer cells. Citrate is an important substrate in DNL pathway, is catalyzed to generate long chain fatty acids (LCFAs) which play key roles in the formation of biosynthesis of cell membrane during cellular proliferation processes. Citrate is transported from two sources including the mitochondrial citrate transport protein (CTP) and plasma membrane citrate transporter (PMCT). This study aimed investigate effects of a combined CTP inhibitor (CTPi) and PMCT inhibitor (PMCTi) on inhibition of DNL pathway and on apoptosis process. In vitro studies, colorectal cancer HCT116 cells were treated with the combination of CTPi and PMCTi to determine cell viability. The results showed that the combined CTPi and PMCTi has stronger effect than individual inhibitor used on cell cytotoxicity in HCT116 cell line. Moreover, induction of apoptosis was seen after combined treatment. Furthermore, cytotoxic effect of combined CTPi and PMCTi were also observed on HCT116 transplanted in nude mice. The results shown that the combined treatment suppression of tumor volume in tumor tissue. Moreover, the combination treatment of CTPi and PMCTi decreased intracellular fatty acid from reducing of DNL pathway. We also confirmed that suppression of DNL pathway following combination treatment resulted in apoptosis through increased levels of proteins Bak and cleaved caspase-3 and decreased levels of protein Bcl-2



of HCT116 tumor tissues in transplanted animals. In conclusion, our results demonstrate that combination of CTPI and PMCTi is a potential anticancer therapeutic drug employing mechanism through suppression of DNL pathway.

Keywords: Citrate transporter, *de novo* lipogenesis, apoptosis, colorectal carcinoma (HCT116) cell line

บทคัดย่อ

การเพิ่มขึ้นของขบวนการ *de novo* lipogenesis (DNL) ในเซลล์เป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์มะเร็งหลายชนิด มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง โดยในขบวนการนี้มี citrate เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ long chain fatty acids (LCFAs) ซึ่งมีความสำคัญต่อการสร้างผนังเซลล์และให้พลังงานกับเซลล์มะเร็ง โดย citrate ถูกขนส่งเข้าเซลล์ผ่านสองบริเวณคือทาง mitochondrial citrate transport protein (CTP) และ plasma membrane citrate transporter (PMCT) ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาผลการทำงานร่วมกันของ CTP inhibitor (CTPI) และ PMCT inhibitor (PMCTi) ต่อการยับยั้ง DNL และการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งโดยใช้เซลล์ colorectal cancer HCT116 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อให้สาร CTPI ร่วมกับ PMCTi ที่ความเข้มข้นต่ำสุด สามารถยับยั้งการเกิด cell viability ได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับการให้สารยับยั้งที่ความเข้มข้นอื่นๆ นอกจากนี้การให้สาร CTPI ร่วมกับ PMCTi ยังเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ HCT116 โดยเกิดจากการยับยั้งขบวนการ DNL ในเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสาร CTPI ร่วมกับ PMCTi ในหนูปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HCT116 ผลการทดลองพบว่าเมื่อให้สาร CTPI ร่วมกับ PMCTi สามารถลดระดับการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้ และพบว่าสาร CTPI ร่วมกับ PMCTi มีผลลดระดับของ fatty acid ซึ่งเกิดจากการลดลงของขบวนการ DNL และเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis โดยยืนยันผลการเกิด apoptosis ได้จากเทคนิค immunoblotting พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน Bak และ cleaved caspase-3 ซึ่งเป็น pro-apoptotic protein และมีการลดลงของโปรตีน Bcl-2 ซึ่งเป็น anti-apoptotic protein ในก้อนมะเร็งของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งด้วย HCT116 cell line ซึ่งสรุปได้ว่าการทำงานร่วมกันของสาร CTPI และ PMCTi สามารถใช้เส้นทางเลือกหนึ่งในการยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: Citrate transporter, *de novo* lipogenesis, apoptosis, colorectal carcinoma (HCT116) cell line

บทนำ

การเพิ่มขึ้นของขบวนการ *de novo* lipogenesis (DNL) มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เช่น มะเร็งตับ มะเร็งลำคอ มะเร็งเต้านม (Jones, & Thompson, 2009) ซึ่งสาเหตุที่มีการเพิ่มขึ้นของขบวนการ DNL เนื่องจากในเซลล์มะเร็งมักมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เกิดเป็นก้อนเนื้อออกขนาดใหญ่ส่งผลให้มีปริมาณเลือดมาหล่อเลี้ยงเซลล์ไม่เพียงพอ ทำให้เกิดภาวะการขาดออกซิเจนของเซลล์หรือที่เรียกว่า hypoxia ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของ hypoxia inducible factor 1 (HIF1) ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการสร้างพลังงานโดยเซลล์มะเร็ง จะหันมาใช้พลังงานจาก aerobic glycolysis หรือที่เรียกว่า Warburg effect มากขึ้น (Masoud, & Li, 2015) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการสร้างพลังงานนี้ มีผลกระตุ้นขบวนการ DNL ทำให้เซลล์ได้พลังงานเพียงพอต่อการเจริญเติบโต ซึ่งขบวนการนี้จะสังเคราะห์ long chain fatty acids (LCFAs) ซึ่งมีความสำคัญต่อการสร้างผนังเซลล์และให้พลังงานกับเซลล์มะเร็ง (Baenke, Peck, Miess, & Schulze, 2013)



DNL ใช้ citrate เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการ โดย citrate จะเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA ด้วยเอนไซม์ ATP-citrate lyase (ACLY) หลังจากนั้น acetyl-CoA จะเปลี่ยนเป็น malonyl-CoA โดยอาศัยเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase (ACC) สุดท้าย malonyl-CoA จะถูกเปลี่ยนเป็น long-chain fatty acid (LCFA) ด้วยเอนไซม์ fatty acid synthase (FASN) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ LCFA นี้ จะถูกนำไปใช้เป็นพลังงานให้กับเซลล์โดยผ่านทาง β -oxidation และยังสามารเปลี่ยนไปเป็น monounsaturated fatty acids (MUFAs) ด้วยเอนไซม์ stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น (Sadowski et al., 2014)

Citrate ในกระบวนการ DNL นี้ มีตัวขนส่ง 2 บริเวณ คือที่ inner mitochondria มีชื่อว่า mitochondria citrate transport protein (CTP) และบริเวณ plasma membrane มีชื่อว่า plasma membrane citrate transport protein (PMCT) (Sun et al., 2010) บริเวณแรก CTP หรือ citrate carrier (CIC) หรือ SLC25A1 จะขนส่ง citrate จากภายใน mitochondria เข้าสู่ cytoplasm โดยแลกเปลี่ยนกับ malate ใน cytoplasm เข้าสู่ mitochondria โดยจะพบตัวขนส่งนี้มากใน pancreas และ lipogenic tissue เช่น liver และ renal cortex และพบน้อยใน brain, heart, skeletal muscle, placenta และ lungs (Palmieri et al., 2015) ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้าพบว่าในเซลล์มะเร็งหลายๆชนิด จะมีการขนส่ง citrate จาก mitochondria เข้าสู่ cytoplasm มากขึ้น ทร้บตัวขนส่งคือ PMCT หรือเรียกว่า Na^+ /citrate co-transporter หรือ NaCT จะทำหน้าที่ขนส่ง citrate จาก plasma เข้าสู่ cytoplasm โดยจะขนส่งเข้ามาพร้อมกับ Na^+ 4 โมเลกุล ซึ่งจะพบตัวขนส่งชนิดนี้มากใน plasma membrane ของ mammalian liver และพบน้อยใน brain และ testis (Bhutia, Kopel, Lawrence, Neugebauer, & Ganapathy, 2017) มีงานวิจัยก่อนหน้าพบว่าการลดลงของ SLC13A5 จะลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง human hepatocellular carcinoma โดยกระตุ้นการทำงานของ AMP-activated protein kinase (AMPK) และยับยั้งการทำงานของ mammalian target ของ rapamycin (mTOR) (Li et al., 2017)

ในเซลล์มะเร็งหลายๆ ชนิด พบว่า มีระดับการแสดงออกของ transporter ทั้งสองชนิดเพิ่มมากขึ้น เช่น breast cancer, non-small cell lung cancer และ ovarian carcinoma cells และมีหลายงานวิจัยที่พบว่าเมื่อให้สารยับยั้งหรือลดการแสดงออกของตัวขนส่งนี้ มีผลยับยั้ง tumor growth ลดการเกิดการ proliferation และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ซึ่งในการศึกษานี้ผู้วิจัยสนใจศึกษามลการยับยั้งตัวขนส่งทั้งสองบริเวณ โดยใช้สาร citrate transporter inhibitor (CTPi) เป็นสาร ZINC Compound 792949 มีสูตรโมเลกุล คือ $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{C}_{11}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ และสาร plasma membrane citrate transporter (PMCT) inhibitor เป็นสาร ZINC Compound 36396 มีสูตร โมเลกุลคือ $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ ต่อการลดระดับของ citrate ภายในเซลล์ และผลต่อการลด cell proliferation และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในหนูปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HCT116

อุปกรณ์และวิธีการ / วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์

Human colorectal cancer (CRC) cell lines: HCT116 (HB-8065; ATCC, Manassas, VA, USA) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. ตามรัตน์ สุรางกูร และดร.เมธวี ศรีคำมูล อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เซลล์จะถูกเลี้ยงใน McCoy's 5A media (Corning, MA, USA) ซึ่งประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, MA, USA) และ 1% antibiotic-antimycotic (100x) (Gibco, MA, USA) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2



การศึกษาการเติบโตของเซลล์ด้วย MTT

HCT116 จะถูกเลี้ยงใน 96-well culture plates ที่ความหนาแน่น 3×10^4 cells/well และปมเป็นเวลา 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นเซลล์จะถูกปมด้วยอาหาร McCoy's 5A ที่ประกอบด้วย CTPI, PMCTi และ CTPI ร่วมกับ PMCTi เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและเติม MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Amresco, USA) solution ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml นำไปปมเป็นเวลา 4 ชม. ที่ 37°C และ $5\% \text{CO}_2$. ทำการละลายผลึกformazan ด้วย DMSO และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm โดยใช้ microplate reader (Synergy HT Multi-Mode, BioTek Instruments, Inc)

การศึกษาการเกิด apoptosis ของเซลล์โดย flow cytometry

Apoptosis เป็นขบวนการที่ทำให้ลักษณะของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปและเกิดการตาย การศึกษา Apoptosis ของเซลล์สามารถวัดได้โดยใช้ Alexa Fluor 488 Annexin V/dead cell apoptosis kit (Life Technologies, Invitrogen, NY, USA) Annexin V จะย้อมติด phosphatidylserine (PS) ในระยะ early apoptosis ในขณะที่ทั้ง annexin V และ propidium iodide (PI) จะย้อมติด apoptotic cells ในระยะ late apoptosis HCT 116 cells จะถูกเลี้ยงใน 48-well culture plates ที่ความหนาแน่น 1.5×10^5 cells/well เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นเซลล์จะปมกับสาร CTPI ร่วมกับ PMCTi เป็นเวลา 24 ชม. โดยพิจารณาเลือกความเข้มข้นจากผล MTT assay หลังจากนั้นเก็บเซลล์ใน annexin binding buffer และย้อมสีด้วย Alexa Fluor 488 annexin V และ PI โดยจะวิเคราะห์ผล apoptotic cells ด้วย FACSCalibur flow cytometry และคำนวณผลด้วย CellQusetPro software (Mac OS 9, BD Biosciences, USA)

การศึกษาในสัตว์ทดลอง

ในการศึกษาใช้หนูเพศผู้สายพันธุ์ BALB/CAJcl-Nu/Nu (athymic nude mice) อายุประมาณ 4-8 สัปดาห์ มีน้ำหนักตัวประมาณ 20-25 g สั่งซื้อจาก Nomura Siam International Co, Ltd., ประเทศไทย สัตว์ทดลองทุกตัวจะถูกเลี้ยงในสภาวะ specific pathogen-free (SPF) ที่ Center for Animal Research, Naresuan University, Thailand ที่อุณหภูมิ $22 \pm 1^\circ\text{C}$ และความชื้น $55 \pm 10\%$, กับ 12 h light/dark cycle การทดลองในสัตว์ได้รับการอนุมัติโดย Animal Ethics Committee at Center for Animal Research, Naresuan University, Thailand (เลขที่เอกสารอ้างอิง 60 01 009) และดำเนินการตาม Guide for Care of Laboratory Animals as detailed by the ethics committee for animal used of Naresuan University Center for animal research Thailand.

หนูเพศผู้สายพันธุ์ BALB/CAJcl-Nu/Nu นำมาเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งด้วย HCT116 cell line 1×10^7 cells ใน 300 μl McCoy's media โดยฉีดเซลล์บริเวณใต้ผิวหนังหลังจากนั้นสังเกตการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งภายใน 1 สัปดาห์ หลังจากฉีดเซลล์ วัดขนาดของก้อนมะเร็งทุกวัน โดยใช้ external caliper และชั่งน้ำหนักหนูทุกๆ 2 วัน ขนาดของก้อนมะเร็ง (tumor volume) จะใช้สูตรคำนวณคือ $\text{Tumor volume} = (A \times B^2)/2$ โดย A คือด้านที่ยาวที่สุดของก้อนมะเร็ง และ B คือ ด้านที่สั้นที่สุดของก้อนมะเร็งในแนวตั้งฉากกันเมื่อก้อนมะเร็งมีขนาดประมาณ 100 mm^3 จะแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่มแบบสุ่ม กลุ่มละ 7-10 ตัวกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม หนูจะได้รับสาร vehicle, กลุ่มที่ 2 และ 3 เป็น



กลุ่มทดสอบ หนูจะได้รับการ CTPI ร่วมกับ PMCTI ที่ความเข้มข้นจากน้อยไปมากตามลำดับ และกลุ่มที่ 4 หนูจะได้รับการ 5-fluorouracil (5-FU) (Sigma-Aldrich Co. LLC.) ที่ 20 mg/kg/BW โดยทั้ง 4 กลุ่มจะได้รับการต่างๆในปริมาณ 300 μ l ฉีดสารบริเวณใต้ผิวหนังรอบๆ ก้อนมะเร็ง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อจบการศึกษาหนูทุกตัวจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบด้วย สาร sodium pentobarbital anesthesia ในปริมาณ 50-70 mg/kg/BW ผ่านทางการฉีดเข้าช่องท้องและเก็บก้อนมะเร็ง ไปศึกษาต่อไป

การศึกษาระดับของ fatty acid

ก้อนมะเร็งน้ำหนัก 10 mg นำมาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันใน 200 μ l ของ chloroform/Triton X-100 (1% Triton X-100 ใน pure chloroform) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ที่ 14,000 g, 4 °C. หลังจากนั้นเก็บส่วน organic phase (lower phase) นำมาละลาย chloroform 50 °C เป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างที่ได้มาละลายใน 200 μ l ของ fatty acid assay buffer หลังจากนั้นนำตัวอย่างใส่ใน 96 well plate แล้วใส่ acyl-CoA synthetase (ACS) 2 μ l นำไปป่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาใส่ reaction mix 50 μ l (44 μ l assay buffer, 2 μ l fatty acid probe, 2 μ l enzyme mix, 2 μ l enhancer) นำไปป่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างไปวัดโดยใช้ fluorescence ที่ Ex/En = 535/590 nm ด้วย microplatreader (Synergy HT Multi-Mode, BioTek Instruments, Inc)

การศึกษากการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค immunoblotting assay

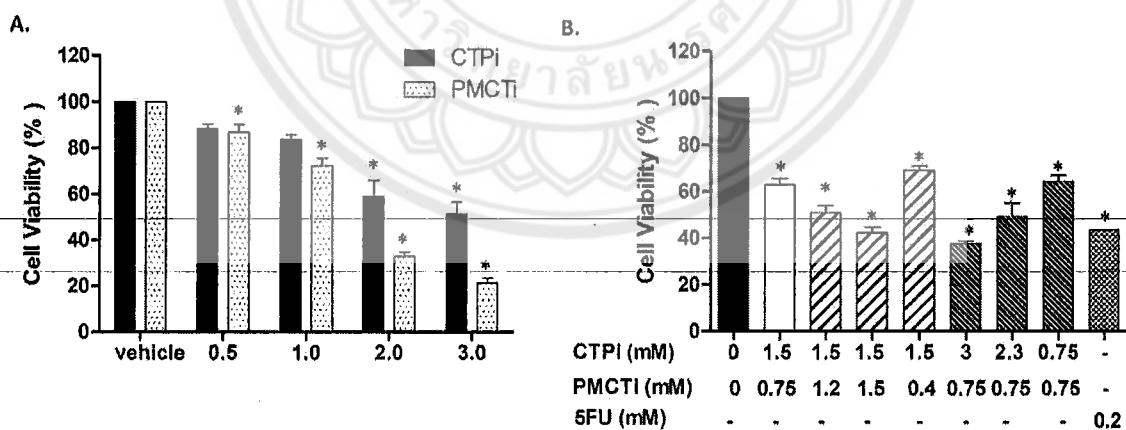
นำ tumor tissue มาสกัดโปรตีนด้วย RIPA Buffer (150 mMNaCl, 50 mMTris (pH 7.5), 0.1% SDS, 1% Triton x-100, 0.5% Sodium deoxycholate, 1 mM EDTA) กับ 1% protease inhibitor. นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 14,000 x g ที่ อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นเก็บ supernatant ไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วย BCA protein assay reagent (Bicinchoninic acid; Thermo Scientific, Rock ford, IL, USA). หลังจากนั้นทำการแยกขนาดโปรตีนโดยใช้ 8-12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ด้วยไฟฟ้าที่ 90 volt, นาน 120 นาที ย้ายโปรตีนจากเจลสู่ PVDF membranes ด้วยไฟฟ้า 25 volt , นาน 45 นาที blocked non-specific bindings ด้วย 1X rapid block solution (AMRESCO, Solon, OH, USA) นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง, และป่ม membranes กับ primary antibodies: anti-Bak, anti-cleave-caspase3, anti-Bcl-2, and Anti- β -actin ที่ 4°C ซ้ำมคืน แล้วล้าง membrane ด้วย-phosphate-buffer-saline (PBS) กับ 0.2% Tween-20 จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที แล้วป่ม membrane กับ HRP-conjugated secondary antibodies อัตราส่วน 1:7000 ใน 5% skim milk กับ PBS ที่ 4°C นาน 2 ชม จากนั้นวัดผลการแสดงออกของโปรตีนด้วย Luminata forte western HRP substrate โดยเครื่อง CCD camera (ImageQuant LAS 4000; GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA)



ผลการวิจัย

Citrate transport protein inhibitor มีผลให้มีการลดการเติบโตของเซลล์ HCT116

ผลการทำงานของสาร CTPI, PMCTi และการทำงานร่วมกันของ CTPI และ PMCTi ต่อการเติบโตของ HCT116 cells โดยใช้ MTT assay เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มี CTPI ร่วมกับ PMCTi ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม พบว่าสารทั้งสองชนิดสามารถลดการเติบโตของเซลล์ได้ โดยสาร CTPI มีค่า IC_{50} อยู่ที่ 3 mM และสาร PMCTi มีค่า IC_{50} อยู่ที่ 1.5 mM จากผลการศึกษาข้างต้นเราได้ทำการศึกษาผลของการทำงานร่วมกันของ CTPI และ PMCTi โดยเลือกความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่งจากค่า IC_{50} ของแต่ละสาร พบว่าเมื่อ CTPI ที่ความเข้มข้น 1.5 mM ร่วมกับสาร PMCTi ที่ความเข้มข้น 0.75 mM สามารถลดการเติบโตของเซลล์ได้เหลือ 64% ซึ่งให้ผลลดการเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่าการให้สารเดี่ยวๆ นอกจากนี้เรายังศึกษาการทำงานร่วมกันของ CTPI และ PMCTi ในความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาความเข้มข้นที่ดีที่สุดเพื่อลดการเจริญของเซลล์ โดยทำการให้สาร PMCTi ที่ 0.75 mM ร่วมกับการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของสาร CTPI พบว่าสามารถเพิ่มหรือลดการเติบโตของเซลล์ได้ตามความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงไป เช่นเดียวกับการให้สาร CTPI ที่ 1.5 mM ร่วมกับการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของสาร PMCTi สามารถเพิ่มหรือลดการเติบโตของเซลล์ได้ตามความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงไปได้เช่นกัน ซึ่งจากการศึกษาพบว่า CTPI ที่ความเข้มข้น 0.75 mM และ PMCTi ที่ความเข้มข้น 0.75 mM แสดงการลดการเติบโตของเซลล์เหลือ 64% ซึ่งเหมือนกับผลของความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของค่า IC_{50} จากผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าการทำงานร่วมกันของทั้งสองสารสามารถลดการเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่าการให้สารใดสารหนึ่งเดี่ยวๆ และยังลดปริมาณการใช้สารได้อีกด้วย



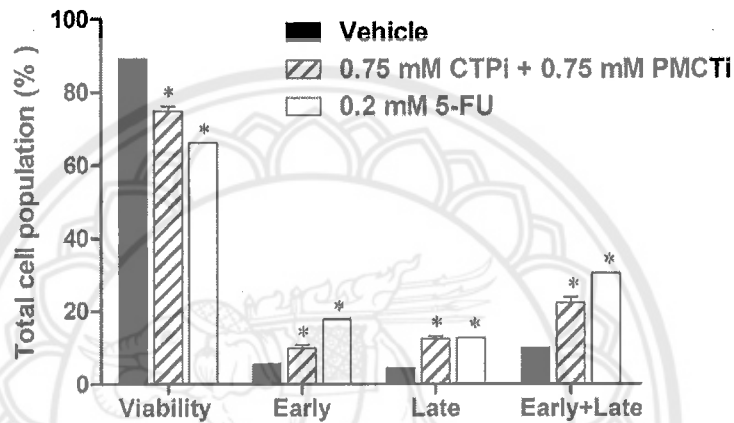
ภาพที่ 1 แสดงผลของ CTPI และ PMCTi ต่อการเติบโตของเซลล์ HCT116 โดย MTT assay

ภาพ A แสดงผลการเติบโตของเซลล์ในความเข้มข้นต่างๆ เมื่อให้สาร CTPI และ PMCTi, ภาพ B แสดงผลการเติบโตของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อให้สารร่วมกันระหว่าง CTPI และ PMCTi เป็นเวลา 24 ชม.



Citrate transport protein inhibitor มีผลเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ HCT116

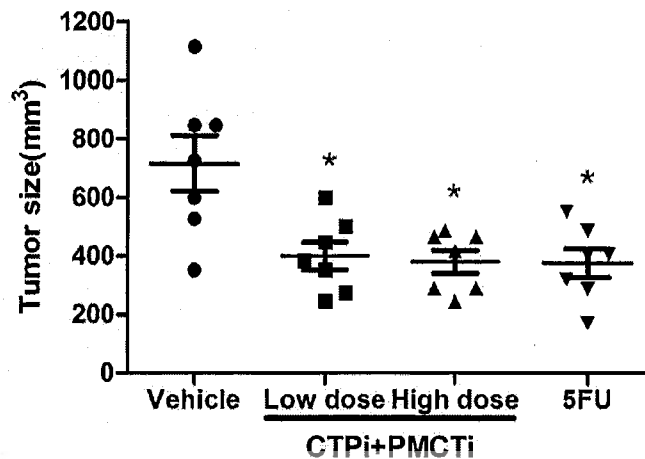
การทำงานร่วมกันของสาร CTPI กับ PMCTi เป็นสาเหตุให้เกิด apoptosis ของเซลล์ วิเคราะห์โดยเทคนิค flow cytometry พบว่า เมื่อ HCT116 cells ได้รับสาร CTPI 0.75 mM ร่วมกับ PMCTi 0.75 mM สามารถลดการเติบโตได้ประมาณ 72.70% และเพิ่มการเกิด apoptotic ทั้งในระยะ early และ late stage ถึง 24.65% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการเติบโตของเซลล์ถึง 89.04% และมีการเกิด apoptosis 9.99% นอกจากนี้ผลการทำงานของทั้งสองสารยังให้ผลเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ได้ใกล้เคียงกับการให้สาร 5-FU อีกด้วย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการให้สารร่วมกันระหว่าง CTPI และ PMCTi มีผลเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ได้ในเซลล์ HCT116



ภาพที่ 2 แสดงผลของการทำงานร่วมกันของสาร CTPI และ PMCTi ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ HCT116

Citrate transport protein inhibitor มีผลยับยั้งการเติบโตของมะเร็งในหนูปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HCT116

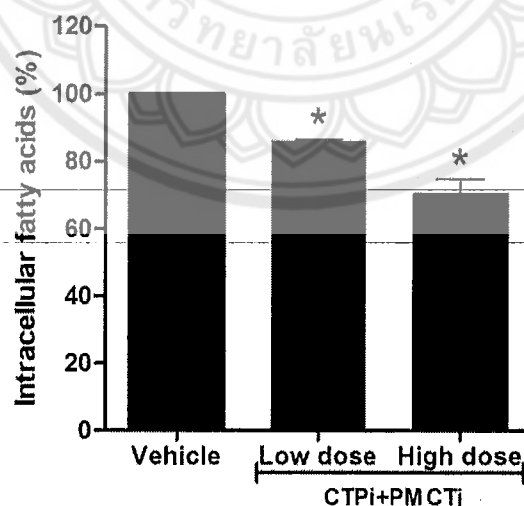
เพื่อศึกษาการทำงานร่วมกันของ CTPI และ PMCTi ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลอง หนู nude mice จะได้รับปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งด้วย HCT116 cell หลังจากนั้นเมื่อพบการเกิดของก้อนมะเร็ง จะทำการให้สาร CTPI ร่วมกับ PMCTi ที่ความเข้มข้นต่ำ (Low-dose 4 mg/kg CTPI ร่วมกับ 4 mg/kg PMCTi) และความเข้มข้นสูง (High dose 8 mg/kg CTPI ร่วมกับ 8 mg/kg PMCTi) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเมื่อให้สารทั้งสองความเข้มข้นไม่ส่งผลต่อน้ำหนักตัวของหนู และสามารถลดการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งสองความเข้มข้นยังให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีผลลดการเติบโตของมะเร็งเหมือนกับการให้สาร 5-FU ที่เป็นสารในการรักษามะเร็งในปัจจุบันดังนั้นสรุปได้ว่าสาร CTPI ร่วมกับ PMCTi มีศักยภาพในลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้



ภาพที่ 3 แสดงผลของการทำงานร่วมกันของสาร CTPI และ PMCTi ต่อการยับยั้งการเติบโตของมะเร็งในหนูปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HCT116

Citrate transport protein inhibitor มีผลลดการระดับ fatty acid ในหนูปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HCT116

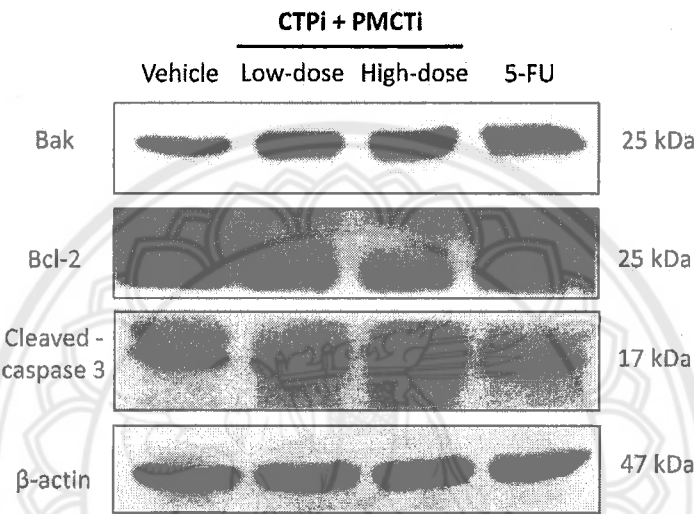
เพื่อศึกษาการลดลงของระดับ fatty acid ในขบวนการ DNL จากการในสาร citrate transport protein inhibitor จากการศึกษพบว่า เมื่อให้สาร CTPI ร่วมกับ PMCTi มีผลลดระดับ fatty acid ในก้อนมะเร็งของหนูที่หนูปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HCT116 cell ทั้งสองความเข้มข้นเหลือ 85% และ 70% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 100% และทั้งสองความเข้มข้นยังให้ผลแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาสรุปได้เห็นว่า สาร citrate transport protein inhibitor มีผลลดระดับของ fatty acid ซึ่งคาดว่ามามีผลจากการยับยั้งการทำงานของขบวนการ DNL



ภาพที่ 4 แสดงผลของการทำงานร่วมกันของสาร CTPI และ PMCTi ต่อการลดลงของระดับ fatty acid ในหนูปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HCT116

Citrate transport protein Inhibitor มีผลเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ของมะเร็งในหนูปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HCT116

เพื่อศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของการทำงานร่วมกันของสาร CTPI และ PMCTi ต่อการลดลงของขบวนการ DNL และเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในหนูปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HCT116 จากการศึกษาพบว่าเมื่อให้สาร CTPI ร่วมกับ PMCTi มีผลในการเพิ่มระดับของ pro-apoptotic protein ได้แก่ Bak และ cleave-caspase3 และยังลดระดับของ anti-apoptotic protein Bcl-2 ให้กับมะเร็งของหนูที่เหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งด้วย HCT116 cells จากผลสรุปได้ว่าการทำงานร่วมกันของ CTPI และ PMCTi มีผลเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งได้



ภาพที่ 5 แสดงผลของการทำงานร่วมกันของสาร CTPI และ PMCTi ต่อการแสดงออกของโปรตีนในขบวนการเกิด apoptosis .ในหนูปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HCT116

วิจารณ์ผลการวิจัย

เซลล์มะเร็งหลายๆ ชนิดใช้พลังงานผ่าน aerobic glycolysis ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของขบวนการ *de novo* lipogenesis (DNL) เพื่อให้พลังงานที่เพียงพอกับเซลล์ ในระหว่างที่เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (Biswas, Lunec, & Bartlett, 2012) citrate เป็นสารตั้งต้นหลักที่สำคัญในขบวนการ DNL สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ LCFAs โดย citrate นั้นจะถูกขนส่งเข้ามาในเซลล์ผ่านตัวขนส่ง 2 บริเวณคือ mitochondrial citrate transport protein (CTP) และ plasma membrane citrate transporter (PMCT) (Sun et al., 2010) ซึ่ง LCFAs มีบทบาทสำคัญต่อเซลล์มะเร็งในช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโต (Mashima, Seimiya, & Tsuruo, 2009; Sanders & Griffin, 2016) ในรายงานวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า citrate transporter proteins เป็นหนึ่งในเป้าหมายสำคัญที่จะใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง

ในการศึกษานี้ ทำการศึกษาผลของการทำงานร่วมกันระหว่าง CTPI และ PMCTi ต่อยับยั้งการเติบโตของเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ HCT116 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเมื่อให้สาร CTPI ร่วมกับ PMCTi จะมีผลในการลดการเติบโตของเซลล์ HCT116 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่าการให้สาร CTPI ร่วมกับสาร PMCTi มีผลเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ HCT116 อีกด้วย ซึ่งการเกิด apoptosis นี้ยืนยันได้



โดยการยับยั้ง annexin-V ซึ่งจะจับกับ phosphatidyl serine ที่เคลื่อนย้ายไปที่บริเวณ outer plasma membrane ซึ่งการติดสีเช่นนี้จะเป็นตัวบ่งชี้สำคัญในการแสดงการเกิด apoptosis ของเซลล์ (Roy et al., 2017) ซึ่งเราคาดว่ากลไกในการยับยั้งการทำงานของ citrate transport protein มีส่วนในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด apoptosis เป็นผลมาจากการยับยั้งการทำงานของขบวนการ DNL โดยการลดลงของขบวนการ DNL จากการศึกษาก่อนหน้าจากผลของการยับยั้ง CTP เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis มีการศึกษาให้เห็นในหลายๆเซลล์มะเร็งตัวอย่างเช่น ในการศึกษาในเซลล์ MCF-7 และ MD-MB-231 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cell lines) พบว่าการยับยั้งการทำงานของ citrate transport protein มีผลลดระดับ citrate ภายในเซลล์ ส่งผลให้มีการแสดงออกของ ACLY ลดลงในขบวนการ DNL ซึ่งการลดลงนี้มีผลลดการเติบโตและเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็ง (Ozkaya, Ak, Atay, & Aydin, 2015) และยังมีรายงานว่า การยับยั้งการทำงานของ PMCT มีผลลดระดับ citrate ภายในเซลล์ และยังยับยั้งการแสดงออกของเอ็นไซม์ ACLY ส่งผลทำให้ ลดการเจริญเติบโตของ human hepatocellular carcinoma cell line (Li et al., 2017) นอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ในขบวนการ DNL ยังเป็นที่รู้กันดีว่าสามารถเพิ่มการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งหลายๆ ชนิด โดยมีการรายงานว่า การยับยั้งการทำงานของ FASN ด้วยสาร triclosan (TCS), orlistat หรือสาร cerulenin มีผลเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (Rossato et al., 2014; Sadowski et al., 2014) และนอกจาก FASN แล้ว การยับยั้งการแสดงออกของเอ็นไซม์ ACC โดยสาร ND-646 มีผลลดการสังเคราะห์ไขมันในเซลล์ ทำให้มีผลทั้งในการลดการเติบโตของเซลล์ในการทดลองแบบ *in vitro* และลดการเจริญของก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลองใน non-small cell lung cancer (NSCLC) cells (Svensson et al., 2016)

ในการศึกษานี้ เราายังได้แสดงผลการศึกษาการทำงานร่วมกันของสาร CTPI และ PMCTi ในหนูปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HCT116 จากผลการศึกษาผลของสาร CTPI ร่วมกับ PMCTi ต่อการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งในหนูปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HCT116 พบว่าเมื่อให้สาร CTPI ร่วมกับ PMCTi มีผลให้ลดขนาดของก้อนมะเร็ง ซึ่งแสดงว่าสารที่ให้ไปสามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งมีผลสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์ HCT116 ที่คาดว่า การลดลงของขบวนการ DNL จากการยับยั้ง citrate transport protein มีผลลดการเติบโตและเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ได้ในเซลล์มะเร็ง ส่งผลให้ก้อนมะเร็งมีขนาดลดลงและเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในหนูปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HCT116 เพื่อยืนยันการเกิด apoptosis ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อให้สาร CTPI ร่วมกับ PMCTi สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ pro-apoptotic protein ได้แก่ Bak และ cleave-caspase 3 และยังมีผลในการยับยั้งการแสดงออกของ anti-apoptotic protein Bcl-2 อีกด้วย ซึ่งจากผลการศึกษาพบอีกได้ว่าสาร citrate transport protein inhibitor สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ได้ ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้ากล่าวไว้ว่าการยับยั้งการทำงานของขบวนการ DNL เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของ carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) จากการเกิดการสะสมของระดับ malonyl-CoA ในเซลล์ ซึ่งพบว่าการลดลงของเอ็นไซม์ต่างๆในขบวนการ DNL ทำให้การสังเคราะห์ LCFA ลดลง ส่งผลเพิ่มการสะสมของ malonyl-CoA ดังนั้นเมื่อมี malonyl-CoA เพิ่มสูงขึ้น จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของ CPT-1 ทำให้มีผลยับยั้งการเกิด oxidation ของกรดไขมัน (Wakil & Abu-Elheiga, 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การลดลงของ LCFA ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ PPAR α ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของ CPT-1 (Migita et al., 2014) ในการศึกษาครั้งนี้คาดว่า การเกิด apoptosis ของเซลล์เกิดจากการยับยั้งการสังเคราะห์ LCFA ในขบวนการ DNL จากผลของสาร citrate transport protein inhibitors อาจมีผลลดการทำงานของ CPT-1 ทั้งจากการเพิ่มการสะสมของ malonyl-CoA และการลดลงของระดับ PPAR α ที่ควบคุมลดการทำงานของ CPT-1 นอกจากนี้การที่ CPT-1 ทำงานลดลงมีผลต่อการลดการ oxidation ของกรดไขมันใน mitochondria ส่งผลให้มีการสะสมของ LCFA ขึ้นมาเพื่อ



เปลี่ยนไปเป็น ceramide (Aon, Bhatt, & Cortassa, 2014) มีหลายการศึกษาพบว่า การเพิ่มขึ้นของระดับ ceramide มีผลกระทบทำให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็ง โดยการเหนี่ยวนำเพิ่มการแสดงออกของ pro-apoptotic protein BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3), the tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), และ the death-associated protein kinase 2 (DAPK2) (Bandyopadhyay et al., 2006) ซึ่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้ มีผลทำให้โปรตีน Bak, Bcl-2 และ caspase ในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงและมีผลเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ได้ในที่สุด

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า การทำงานร่วมกันของสาร CTPI และ PMCTI มีผลลด cell viability ในเซลล์มะเร็ง ซึ่งเกิดจากการยับยั้งการทำงานของขบวนการ DNL มีผลลดการสังเคราะห์ของกรดไขมันหรือ LCFAs และเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis จากผลที่กล่าวมาอาจพิจารณาได้ว่า สาร CTPI ร่วมกับ PMCTI สามารถใช้เป็นรูปแบบหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็ง การเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ที่อาศัยผ่านทางกลไกการยับยั้งขบวนการ DNL จากการผลิตระดับภายในเซลล์มีศักยภาพที่ดีสำหรับยาที่มีเป้าหมายในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษานี้ขอขอบคุณนางสาวบัวทมพร พูลสมบุญรณ์ ผู้ช่วยวิจัยของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะรัตน์ ศรีสว่าง ที่ได้ให้ความรู้ต่างๆรวมถึงแนวทางในการทำวิจัยแก่ข้าพเจ้าเสมอมาและขอขอบคุณภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษาและให้ความอนุเคราะห์ในการทำวิจัยแก่ข้าพเจ้าและขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือในงานวิจัยกระทั่งงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี



เอกสารอ้างอิง

- Aon, M. A., Bhatt, N., & Cortassa, S. C. (2014) Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. *Frontiers in Physiology*, 5, .282doi: /10.3389/fphys.2014.00282
- Baenke, F., Peck, B., Miess, H., & Schulze, A. (2013) Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease Models & Mechanisms*, 6(6) , .1363–1353 doi: /10.1242/dmm.011338
- Bandyopadhyay, S., Zhan, R., Wang, Y., Pai, S. K., Hirota, S., Hosobe, S., & Watabe, K. (2006) Mechanism of Apoptosis Induced by the Inhibition of Fatty Acid Synthase in Breast Cancer Cells. *Cancer Research*, 66(11), .665934
- Bhutia, Y. D., Kopel, J. J., Lawrence, J. J., Neugebauer, V., & Ganapathy, V. (2017) Plasma Membrane Na(+)-Coupled Citrate Transporter (SLC13A 5) and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *Molecules*, 22(3) , E378. doi: /10.3390/molecules22030378
- Biswas, S., Lunec, J., & Bartlett, K. (2012) Non-glucose metabolism in cancer cells—is it all in the fat? *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3), .698–689doi: /10.1007/s6–9384–012–10555
- Catalina-Rodriguez, O., Kolukula, V. K., Tomita, Y., Preet, A., Palmieri, F., Wellstein, A., & Avantaggiati, M. L. (2012) The mitochondrial citrate transporter, CIC, is essential for mitochondrial homeostasis. *Oncotarget*, 3(10), .1235–1220
- Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009) Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & Development*, 22(5), .548–537doi: /10.1101/gad.1756509
- Li, Z., Li, D., Choi, E. Y., Lapidus, R., Zhang, L., Huang, S.-M., & Wang, H. (2017) Silencing of solute carrier family 13 member 5 disrupts energy homeostasis and inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(33), .13901–13890doi: /10.1074/jbc.M117.783860
- Mashima, T., Seimiya, H., & Tsuruo, T. (2009) De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 100(9), .1372–1369doi: /10.1038/sj.bjc.6605007
- Masoud, G. N., & Li, W. (2015) HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 5(5) , .389–378doi: /10.1016/j.apsb.2015.05.007
- Migita, T., Okabe, S., Ikeda, K., Igarashi, S., Sugawara, S., Tomida, A., & Seimiya, H. (2014) Inhibition of ATP citrate lyase induces triglyceride accumulation with altered fatty acid composition in cancer cells. *International Journal of Cancer*, 135(1), .47–37doi: /10.1002/ijc.28652
- Ozkaya, A., Ak, H., Atay, S., & Aydin, H. (2015) Targeting Mitochondrial Citrate Transport in Breast Cancer Cell Lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 15(3), .381–374 doi: 1871520615666141216150659/10.2174



- Palmieri, E. M., Spera, I., Menga, A., Infantino, V., Porcelli, V., Iacobazzi, V., & Castegna, A. (.2015Acetylation of human mitochondrial citrate carrier modulates mitochondrial citrate/malate exchange activity to sustain NADPH production during macrophage activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1847(8), .738–729doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2015.04.009>
- Rossato, F. A., Zecchin, K. G., La Guardia, P. G., Ortega, R. M., Alberici, L. C., Costa, R. A. P., & Vercesi, A. E. (.2014Fatty Acid Synthase Inhibitors Induce Apoptosis in Non-Tumorigenic Melan-A Cells Associated with Inhibition of Mitochondrial Respiration. *PLoS ONE*, 9(6), e .101060doi: /10.1371/journal.pone.0101060
- Roy, S., Rawat, A. K., Sammi, S. R., Devi, U., Singh, M., Gautam, S., & Kaithwas, G. (.2017Alpha-linolenic acid stabilizes HIF- 1 α and downregulates FASN to promote mitochondrial apoptosis for mammary gland chemoprevention. *Oncotarget*, 8(41), .70071–70049doi: /10.18632/oncotarget.19551
- Sadowski, M. C., Pouwer, R. H., Gunter, J. H., Lubik, A. A., Quinn, R. J., & Nelson, C. C. (.2014The fatty acid synthase inhibitor triclosan: repurposing an anti-microbial agent for targeting prostate cancer. *Oncotarget*, 5(19), .9381–9362
- Sanders, F. W. B., & Griffin, J. L. (.2016De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 91(2), .468–452 doi: /10.1111/brv.12178
- Sun, J., Aluvila, S., Kotaria, R., Mayor, J. A., Walters, D. E., & Kaplan, R. S. (.2010Mitochondrial and Plasma Membrane Citrate Transporters: Discovery of Selective Inhibitors and Application to Structure/Function Analysis. *Molecular and cellular pharmacology*, 2(3), .110–101
- Svensson, R. U., Parker, S. J., Eichner, L. J., Kolar, M. J., Wallace, M., Brun, S. N., & Shaw, R. J. (.2016 Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small cell lung cancer in preclinical models. *Nature medicine*, 22(10), .1119–108doi: /10.1038/nm.4181
- Wakil, S. J., & Abu-Elheiga, L. A. (.2009Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *Journal of Lipid Research*, 50Suppl., S–138S .143doi: /10.1194/jlr.R-800079JLR200