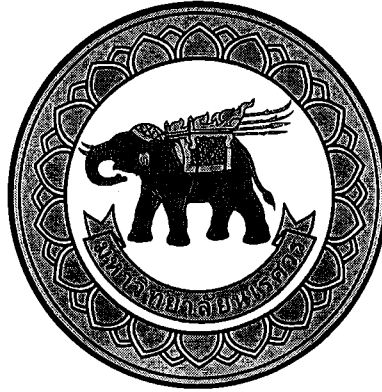


อภิธาน์นาการ



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

สัญญาเลขที่ R2560B068

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) การรบกวนขบวนการสร้างไขมันแบบดีโนโว ผ่านการควบคุมโดยโปรตีนฟอสโฟอินซิทอล ไตรไคนเนส มีผลยับยั้งการเจริญของมะเร็งตับเฮปจิทูในหนูไมส์ โดยสารต้านการขนส่งซิเตรต

(ภาษาอังกฤษ) Interfering of de novo lipogenesis through phosphoinositide-3-kinase signaling protein regulation abrogates HepG2 cancer progression in nude (BALB/cMlac-nu) mice by citrate transporter inhibition

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน..... 3 มี.ค. 2565

เลขทะเบียน..... 1049285

เลขเรียกหนังสือ..... ๑ ๑๒ ๖๐๖

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะรัตน์ ศรีสว่าง

สังกัดภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

๙๗๖

๒๖๓

๒๕๖๓

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2563

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

โครงการ : การรบกวนขบวนการสร้างไขมันแบบดีโนโว ผ่านการควบคุมโดยโปรตีนฟอสโฟอินซิทอล ไตรไคนเนส มีผลยับยั้งการเจริญของมะเร็งตับเฮปิจทูในหนูไมส์ โดยสารต้านการขนส่งซีเตรต

รายงานวิจัย

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การรบกวนขบวนการสร้างไขมันแบบดีโนโว ผ่านการควบคุมโดยโปรตีนฟอสโฟอินซิทอล ไตรไคนเนส มีผลยับยั้งการเจริญของมะเร็งตับเฮปิจทูในหนูไมส์ โดยสารต้านการขนส่งซีเตรต

(ภาษาอังกฤษ) Interfering of de novo lipogenesis through phosphoinositide-3-kinase signaling protein regulation abrogates HepG2 cancer progression in nude (BALB/cMlac-nu) mice by citrate transporter inhibition

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

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

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา : ผศ. พญ. จุลินทร สำราญ.....

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่1 ตุลาคม 2559..... ถึงวันที่30 กันยายน 2563.....



หัวหน้าโครงการ

ดร.ปิยะรัตน์ ศรีสว่าง รับผิดชอบทำการวิจัย 70%
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 ศุกโกศล รับผิดชอบทำการวิจัย 15%
สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
โทร. 05596-4655
Email : kowits@nu.ac.th

คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

de novo lipogenesis (DNL) , apoptosis, plasma membrane citrate transporter (PMCT) inhibitor , mitochondrial citrate transporter (CTP) inhibitor , HepG2, primary hepatocytes, phosphoinositide-3-kinase signaling , nude (BALB/cMlac-nu) mice ขบวนการสร้างไขมันแบบใหม่ , ขบวนการตายแบบเอพอพโทซิส , สารยับยั้งการขนส่งซิเตรทเข้าเซลล์ผ่านทางเซลล์เมมเบรน , สารยับยั้งการขนส่งซิเตรทเข้าเซลล์ผ่านทางไมโทคอนเดรียเมมเบรน เซลล์มะเร็งเฮปจีทู , เซลล์ตับมนุษย์ , โปรตีนฟอสโฟโนซิโตน ไตรโคเนส , หนูไมส์ชนิด BALB/cMlac-nu

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งจัดว่าเป็นโรคที่คุกคามชีวิตของผู้ที่เป็นอย่างมาก อีกทั้งมีแนวโน้มที่อุบัติการณ์การเกิดและการเสียชีวิตจะมากขึ้นเรื่อยๆ การวิจัยและค้นคว้าเพื่อพัฒนาและหาวิธีที่เฉพาะ ที่จะจัดการทำลายเซลล์มะเร็ง หรือยับยั้งการ proliferation, differentiation และ growth ของเซลล์มะเร็ง โดยที่พยายามจะให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์ปกติให้น้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ และเป็นไปอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน 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 ของ

เซลล์มะเร็งคือ มีการขนส่ง glucose เข้าเซลล์ และขบวนการ glucose consumption ในอัตราที่สูงกว่าเซลล์ปกติ แต่พบว่ามี lactate production ในอัตราที่สูงด้วย ถึงแม้ว่าเซลล์จะอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงพอในขบวนการ oxidative glucose consumption ก็ตาม (aerobic respiration) ซึ่งในเซลล์ปกติ การพบ lactate จะเกิดขึ้นในกรณี anerobic respiration หรือขาดออกซิเจนปรากฏการณ์ 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 ภายในเซลล์มะเร็งซึ่งส่งผลต่อ cell proliferation การสูญเสีย cell viability และลด tumor size (Brusselmans K et al., 2005, Hatzivassillou G et al., 2005, Pizer ES et al., 1996) ซึ่งในขณะที่การยับยั้ง lipid biosynthesis นี้ไม่ส่งผลกระทบต่อทั้ง cell proliferation และ viability ของเซลล์ปกติ (Chajes V et al., 2006, Brusselmans K et al., 2005, Pizer ES et al., 1996, Kuhajda FP et al., 1994) นอกจากผลที่กล่าวมาแล้ว การยับยั้ง de novo fatty acid synthesis ยังมีประสิทธิภาพในการลดการเกิด metastasis ด้วย เนื่องจาก metastasis เกิดจากการที่เซลล์มะเร็งเคลื่อนที่จาก primary tumor เข้าสู่กระแสเลือด และเดินทางไปยังอวัยวะต่างๆ metastasis ถือว่าเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิต

ในผู้ที่เป็นมะเร็ง ดังนั้นการยับยั้ง *de novo* fatty acid synthesis 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 และน่าจะมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งสูงเช่นเดียวกันโดยไม่มีผลเสียต่อเซลล์ปกติ และนำไปสู่การทดลองใช้ในสัตว์ทดลอง ทั้งด้านการรักษา ป้องกันมะเร็ง และยับยั้งการ metastasis ของมะเร็ง ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การสร้างยาที่ใช้กับมนุษย์ได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย คือ

เพื่อศึกษาผลของสาร citrate transporter inhibitor ในการรักษาและยับยั้งการเกิดมะเร็ง HepG2 ที่ xenograft เข้าไปในสัตว์ทดลอง nude (BALB/cMlac-nu) mice ทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสม โดยไม่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติต่างๆของสัตว์ทดลอง

วัตถุประสงค์ย่อย ศึกษาผลของสาร

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

ในการลดการเจริญของ tumor ที่เกิดจากมะเร็ง HepG2 cells ที่ xenograft เข้าไปในสัตว์ทดลอง BALB/cMlac-nu

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
8. ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของอวัยวะต่างๆของสัตว์ทดลอง

ขอบเขตการวิจัย

1. การวิจัยนี้ทำใน nude (BALB/cMlac-nu) mice โดยจะมีการทดลองดังนี้
 - 1.1 กลุ่มควบคุมที่ได้รับการ xenograph normal saline และ vehicle
กลุ่มที่ได้รับการให้สาร PMCT
กลุ่มที่ได้รับการให้สาร CTP
กลุ่มที่ได้รับการให้สาร PMCT+CTP
กลุ่มที่ได้รับการให้สาร C75 เป็น positive control
 - 1.2 กลุ่มที่ได้รับการ xenograph HepG2
กลุ่มที่ได้รับการให้สาร PMCT
กลุ่มที่ได้รับการให้สาร CTP
กลุ่มที่ได้รับการให้สาร PMCT+CTP
กลุ่มที่ได้รับการให้สาร C75 เป็น positive control
2. นำ tumor ที่ได้จากสัตว์ทดลอง มาวิเคราะห์
 - การเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis
 - การยับยั้งการ expression และ enzymatic activity ของ intracellular *de novo* lipogenic (DNL) enzymes
 - Intracellular signaling pathways ที่ควบคุม DNL
 - การกระตุ้นการสร้าง intracellular reactive oxygen species (ROS)
 - การกระตุ้น endoplasmic reticulum (ER) stress
 - การสะสมของ intracellular malonyl-CoA
 - การยับยั้ง intracellular carnitine plamitoyl transferase-1 (CPT-1) activity
3. ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของอวัยวะต่างๆของสัตว์ทดลอง ทุกๆกลุ่มทดลอง จะนำอวัยวะต่างๆ คือ ไต ตับ ปอด หัวใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบสืบพันธุ์ และสมอง ส่งไปวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา
4. จำนวนกลุ่มตัวอย่าง ที่นำมาวิเคราะห์ในหลายๆการทดลองข้างต้น จะใช้จำนวนอย่างน้อย 3 ตัวอย่าง

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 เดือนเมื่อ เริ่มวินิจฉัยว่าเป็นแล้ว เนื่องมาจาก liver failure และการทำงานของเซลล์ตับเสียไป ดังนั้นจะเห็นได้ว่าไม่ว่าจะเป็นมะเร็งชนิดใดก็ตาม มะเร็งจัดว่าเป็นโรคที่คุกคามชีวิตของผู้ที่เป็นอย่างมาก อีกทั้งมี แนวโน้มที่อุบัติการณ์การเกิดและการเสียชีวิตจะมากขึ้นเรื่อยๆ การวิจัยและค้นคว้าเพื่อพัฒนาและ ทหารวิธีที่เฉพาะ ที่จะจัดการทำลายเซลล์มะเร็ง หรือยับยั้งการ proliferation, differentiation และ growth ของเซลล์มะเร็ง โดยที่พยายามจะให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์ปกติให้น้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ และเป็นไปอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ในอดีตจนปัจจุบัน วิธีหนึ่งในปัจจุบันนี้ได้รับความสนใจศึกษา มาก คือ ความพยายามลด nutrients ซึ่ง supply การ growth และ differentiation ของเซลล์มะเร็ง วิธีการ

หนึ่ง คือการยับยั้งหรือทำลายการเกิดเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) ที่ไปเลี้ยงกลุ่มเซลล์มะเร็ง (Ribatti D, 2008, He T et al., 2007, Zhong H and Bowen JP, 2006) แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ก็ยังไม่ประสบความสำเร็จดังที่ตั้งจุดประสงค์ไว้ เนื่องมาจากการที่ขบวนการ angiogenesis เป็น physiological process ซึ่งถูกควบคุมด้วยขบวนการและปัจจัยต่างๆที่ซับซ้อน เนื่องจาก angiogenesis จะเกิดเมื่อเกิดความไม่สมดุลกันระหว่าง the proangiogenic factors และ angiogenic inhibitors กลไกการทำงานรวมทั้งการควบคุม angiogenesis ของ proangiogenic factors และ angiogenesis factors ก็ยังมีขบวนการ signaling pathway ที่ค่อนข้างซับซ้อน และยังไม่มีความรู้ที่เพียงพอที่จะอธิบายได้อย่างชัดเจน (Mousa SA et al., 2006)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสำคัญกับอีกวิธีหนึ่งที่มีความเป็นไปได้มากที่สุดที่จะเป็นวิธีที่สามารถลดการ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็งได้ และมีข้อได้เปรียบมากกว่าวิธีอื่นๆ คือ การลดการ growth และ proliferation ที่จำเพาะที่ตัวเซลล์มะเร็ง โดยการลดการนำเข้าของ nutrients ซึ่งจำเป็นในการนำไปใช้การ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็ง โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติอื่นๆของร่างกาย หลักการของวิธีการนี้ มีข้อมูลที่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน คือ เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีอัตราของขบวนการ aerobic glycolysis สูงกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “Warburg effect” ถูกค้นพบโดย Otto Warburg ในปี 1923 ลักษณะที่สำคัญของ Warburg effect ของเซลล์มะเร็งคือ มีการขนส่ง glucose เข้าเซลล์ และขบวนการ glucose consumption ในอัตราที่สูงกว่าเซลล์ปกติ แต่พบว่ามี lactate production ในอัตราที่สูงด้วย ถึงแม้ว่าเซลล์จะอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงพอในขบวนการ oxidative glucose consumption ก็ตาม (aerobic respiration) ซึ่งในเซลล์ปกติ การพบ lactate จะเกิดขึ้นในกรณี anerobic respiration หรือขาดออกซิเจน (Ferreira L.M.R., 2010, DeBerardinis RJ et al., 2008, Meadows AL et al., 2008, (DeBerardinis RJ et al., 2007, Fukuda H et al., 2002) ปรากฏการณ์ Warburg effect นี้ พบว่า mitochondria respiration ลดลง activity ของ enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็น enzyme ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน pyruvate เป็น lactate ซึ่งจะถูกขับออกจากเซลล์เข้าสู่กระแสเลือด ทำให้สิ่งแวดล้อมรอบๆเซลล์มะเร็งมีสภาพที่เป็นกรด นอกจากนี้ยังพบว่า activity ของ enzyme glycogen synthase ลดลง ซึ่งเป็น enzyme ที่ทำหน้าที่สร้าง glycogen จาก glucose และเซลล์มะเร็งจะมีอัตราของ lipogenesis ที่เกิดจาก de novo fatty acid synthesis (endogenous fatty acid synthesis) สูงมากกว่าเซลล์ปกติซึ่งมีค่อนข้างต่ำ ในเซลล์ปกติจะมีการสร้าง lipid จากอาหาร (dietary หรือ exogenous lipid) และจะมี de novo fatty acid ที่ค่อนข้างต่ำ (Mashima T. et al., 2009, Meadows AL et al., 2008, DeBerardinis RJ et al., 2007) การที่เซลล์มะเร็งมี de novo fatty acid synthesis ที่สูง ก็เพื่อใช้ในการสร้าง cell membrane และส่วนประกอบต่างๆของ cell membrane ซึ่งได้แก่ phospholipids, cholesterol, sphingolipids และ lipid rafts ส่วนประกอบต่างๆเหล่านี้รวมเรียกว่า microdomains ซึ่งมีความสำคัญ คือเกี่ยวข้องกับขบวนการ signal transduction, intracellular trafficking, cell

polarization และ cell migration เป็นต้น (Bagnat M and Simons K, 2002, Manes S et al., 1999, Ikonen E and Simons K, 1998) ขบวนการ de novo fatty acid ในเซลล์มะเร็งมีลักษณะที่สำคัญที่แตกต่างจากเซลล์ปกติ คือ ต้องอาศัยสารตั้งต้นภายในเซลล์คือ citrate รวมทั้งการมี lipogenic enzyme expression และ activity ที่เพิ่มขึ้น citrate ซึ่งเป็น key intermediate ในขบวนการ catabolism และ anabolism ของ eukaryotic cells มีแหล่งที่มาทั้งในเซลล์เองและนอกเซลล์ แหล่งที่มาภายในเซลล์ citrate จะถูกสร้างและเก็บอยู่ใน mitochondrial matrix และใช้ในขบวนการ citric acid cycle ในเวลาที่เซลล์ต้องการ energy citrate จะถูก oxidize ได้เป็น NADH และ 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 et al., 2010, Sun J et al., 2010) และจะผ่าน outer membrane โดย anion selective channel ออกสู่ cytoplasm mitochondrial CTP จะทำหน้าที่ exchange tricarboxylates เช่น citrate, isocitrate หรือ dicarboxylate เช่น malate, phosphoenolpyruvate CTP เป็นสมาชิกของกลุ่ม mitochondrial transporter family ซึ่งมีขนาดประมาณ 300 amino acids และมี basic isoelectric point (Kaplan RS, 2001) ส่วนแหล่งภายนอกเซลล์นั้น citrate จะถูก uptake เข้ามาในเซลล์โดย sodium-dependent citrate transporter เป็นหลัก (NaCT) (Inoue K et al., 2002, 2003, Fei YJ et al., 2004) หรือเรียกกลุ่มของ transport proteins นี้ว่า plasma membrane citrate transporters (PMCT) (Sun J et al., 2010) NaCT เป็นสมาชิกของ SLC13 gene family ซึ่งจะมี high affinity ต่อ citrate มากกว่า substrate ตัวอื่นๆ ด้วยค่า Km ประมาณ 0.6-6 mM ในมนุษย์

lipogenic enzyme ที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการ de novo fatty acid synthesis คือ ATP citrate lyase (ACL), acetyl-CoA carboxylase (ACC) และ fatty acid synthase (FASN) ACL จะทำหน้าที่เปลี่ยน cytosolic citrate ให้เป็น acetyl CoA และ oxaloacetate ซึ่ง acetyl CoA จะเป็นแหล่ง immediate carbon source ในการสร้าง fatty acid, triglyceride และ cholesterol acetyl-CoA ส่วน ACC ทำหน้าที่ในการสร้าง malonyl-CoA จาก acetyl CoA และ FASN ทำหน้าที่สร้าง long chain fatty acid

งานวิจัยที่ลดปริมาณ citrate ภายในเซลล์ โดยการลดการ transport citrate จาก mitochondria โดยการทำให้ selectively silencing mitochondrial citrate transport โดยเทคนิค small interfering RNA (siRNA) รวมทั้งการใช้ selective inhibitors รายงานผลว่ามีการลดลงของ lipid biosynthesis ในเซลล์มะเร็งได้ประมาณ 40% (Mizuarai S et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ยับยั้ง enzymes ที่ใช้ในขบวนการ de novo fatty acid synthesis รายงานถึงการลดลงของ fatty acid ภายในเซลล์มะเร็ง ซึ่งส่งผลต่อ cell proliferation การสูญเสีย cell viability และลด tumor size (Brusselmans K et al., 2005, Hatzivassillou G et al., 2005, Pizer ES et al.,

1996) ซึ่งในขณะที่การยับยั้ง lipid biosynthesis นี้ไม่ส่งผลกระทบต่อทั้ง cell proliferation และ viability ของเซลล์ปกติ (Chajes V et al., 2006, Brusselmans K et al., 2005, Pizer ES et al., 1996, Kuhajda FP et al., 1994) นอกจากผลที่กล่าวมาแล้ว การยับยั้ง de novo fatty acid synthesis ยังมีประสิทธิภาพในการลดการเกิด metastasis ด้วย เนื่องจาก metastasis เกิดจากการที่เซลล์มะเร็งเคลื่อนที่จาก primary tumor เข้าสู่กระแสเลือด และเดินทางไปยังอวัยวะต่างๆ metastasis 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 หลายๆชนิดพบว่า มีผลข้างเคียงคือเกิด anorexia และ body weight loss เนื่องจากการกระตุ้น CTP-1 (Puig T et al., 2011) ดังนั้นการวิจัยที่พยายามหาสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง de novo fatty acid synthesis ไม่ว่าจะเป็นการลดปริมาณ citrate รวมทั้ง enzyme ต่างๆในขบวนการนี้ คือ ACL, ACC และ FASN โดยไม่มีผลต่อ CTP-1 จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดอีกวิธีหนึ่งในการรักษามะเร็ง

จากการศึกษาผลของ commercial drugs ต่อการยับยั้งการ transport ของ citrate โดยการ purify plasma membrane citrate transporter PMCT และ mitochondrial inner membrane citrate transport protein CTP จากนั้นจึง incorporate ใน liposome และศึกษาการ transport ของ [1,5-¹⁴C 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 และน่าจะมีผลจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งสูงเช่นเดียวกัน โดยไม่มีผลเสียต่อเซลล์ปกติ และนำไปสู่การทดลองใช้ใน

สัตว์ทดลอง ทั้งด้านการรักษา ป้องกันมะเร็ง และยับยั้งการ metastasis ของมะเร็ง ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การสร้างยาที่ใช้กับมนุษย์ได้ในอนาคตแทนการใช้ chemotherapy

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Bagnat M, Simons K. Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem*. 2002 Oct;383(10):1475-80.
2. Bang JS, Oh da H, Choi HM, Sur BJ, Lim SJ, Kim JY, Yang HI, Yoo MC, Hahm DH, Kim KS. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1beta-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(2):R49.
3. Bode BP, Fuchs BC, Hurley BP, Conroy JL, Suetterlin JE, Tanabe KK, Rhoads DB, Abcouwer SF, Souba WW. Molecular and functional analysis of glutamine uptake in human hepatoma and liver-derived cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Nov;283(5):G1062-73.
4. Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2005 Aug 1;65(15):6719-25.
5. Bungard CI, McGivan JD. Glutamine availability up-regulates expression of the amino acid transporter protein ASCT2 in HepG2 cells and stimulates the ASCT2 promoter. *Biochem J*. 2004 Aug 15;382(Pt 1):27-32.
6. Burckhardt BC, Lorenz J, Kobbe C, Burckhardt G. Substrate specificity of the human renal sodium dicarboxylate cotransporter, hNaDC-3, under voltage-clamp conditions. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Apr;288(4):F792-9.
7. Chajès V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM, Joulin V. Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res*. 2006 May 15;66(10):5287-94.
8. Chen X, Tsukaguchi H, Chen XZ, Berger UV, Hediger MA. Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel rat sodium-dependent dicarboxylate transporter. *J Clin Invest*. 1999 Apr;103(8):1159-68.
9. Chen XZ, Shayakul C, Berger UV, Tian W, Hediger MA. Characterization of a rat Na⁺-dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem*. 1998 Aug 14;273(33):20972-81.
10. Chou CC and Marth EH. Incorporation of [2-¹⁴C] acetate into lipids of Mink (*Mustela vison*) liver and intestine during in vitro and in vivo treatment with aflatoxin B1. *Applied Microbiology* 1975, 30 (6), 946-950.
11. Chu CY, Chang JP, Wang CJ. Modulatory effect of piperine on benzo[a]pyrene cytotoxicity and DNA adduct formation in V-79 lung fibroblast cells. *Food Chem Toxicol*. 1994 Apr;32(4):373-7.
12. Das B, Kundu J, Bachar SC, Uddin MA, Kundu JK. Antitumor and antibacterial activity of ethylacetate extract of *Ludwigia hyssopifolia* linn and its active principle piperine. *Pak J Pharm Sci*. 2007 Apr;20(2):128-31.
13. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 4;104(49):19345-50.
14. Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev*. 2008 Feb;18(1):54-61.

15. Dhuley JN, Raman PH, Mujumdar AM, Naik SR. Inhibition of lipid peroxidation by piperine during experimental inflammation in rats. *Indian J Exp Biol.* 1993 May;31(5):443-5.
[disease/2004_report_update/en/index.html](http://www.ijeb.in/2004_report_update/en/index.html)
16. de Mattos Duarte C, Verli H, de Araújo-Júnior JX, de Medeiros IA, Barreiro EJ, Fraga CA. New optimized piperamide analogues with potent in vivo hypotensive properties. *Eur J Pharm Sci.* 2004 Dec;23(4-5):363-9.
17. Duessel S, Heuertz RM, Ezekiel UR. Growth inhibition of human colon cancer cells by plant compounds. *Clin Lab Sci.* 2008 Summer;21(3):151-7
18. Edinger AL, Thompson CB. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell.* 2002 Jul;13(7):2276-88.
19. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3892-9.
20. Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL and Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular Diabetology.* 2006. 5:4 doi: 10.1186/1475-2840-5-4.
21. Fei YJ, Liu JC, Inoue K, Zhuang L, Miyake K, Miyauchi S, Ganapathy V. Relevance of NAC-2, an Na⁺-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 İ. 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 I kappaB 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. Taqi 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, Priprom A, Tankamnerdthai O. Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. *Food Chem Toxicol.* 2008. Sep;46(9):3106-10.
102. Wieman HL, Wofford JA, Rathmell JC. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol Biol Cell.* 2007 Apr;18(4):1437-46.
103. Woo HM, Kang JH, Kawada T, Yoo H, Sung MK, Yu R. Active spice-derived components can inhibit inflammatory responses of adipose tissue in obesity by suppressing inflammatory actions of macrophages and release of monocyte chemoattractant protein-1 from adipocytes. *Life Sci.* 2007 Feb 13;80(10):926-31.
104. World Health Organization. <http://www.who.int/whosis/whostat/2008/en/index.html>
105. World Health Organization. <http://www.who.int/whosis/whostat/2007/en/index.html>
106. Yamazaki S, Takayama T. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma: evidence-based outcomes. *World J Gastroenterol.* 2008 Feb 7;14(5):685-92.
107. Zhong H, Bowen JP. Antiangiogenesis drug design: multiple pathways targeting tumor vasculature. *Curr Med Chem.* 2006;13(8):849-62.

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

วิธีวิจัย

1. In vivo tumor growth assay โดยใช้ HepG2 tumor model xenograft ใน Nude (BALB/cMlac-nu) mice (Shen KT et al., 2009, and Feng Y et al., 2011)

Nude (BALB/cMlac-nu) mice อายุ 6 ถึง 8 สัปดาห์ เพศผู้ จาก the animal laboratory animal center of Mahidol university Nude (BALB/cMlac-nu) mice housed ประมาณ 5 ตัว ต่อ 1 กรง ที่ $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และ $55 \pm 10\%$ relative humidity และ subjected ที่ a 12-h light/12-h dark cycle

Nude mice จะถูก acclimatized ประมาณ 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง และเลี้ยงด้วย commercial diet (No. CP 082) product of Perfect companion group co. Ltd และ water *ad libitum* (น้ำดื่มจะเป็น RO Water is ซึ่งจะมี chlorinated ที่ concentration of 10-12 ppm เพื่อให้ปราศจาก *Pseudomonas aeruginosa*) Tumors จะถูก induced โดย subcutaneous (s.c.) injection โดย HepG2 cells (1×10^7 cells in 0.1 mL of PBS) ที่ บริเวณ the right flank ประมาณ 25 วันหลัง injection tumors จะมีลักษณะ small nodules ที่บริเวณที่ injection เมื่อวันที่ 30 หลังจาก injection แล้ว กลุ่มของ nude mice จะถูกแบ่งแบบ randomly distributed เป็น 2 กลุ่ม และจะได้รับสารเป็นเวลา 3 ครั้ง / สัปดาห์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยจะแบ่งกลุ่มเป็น

- 1.1 กลุ่มควบคุมที่ได้รับการ xenograph normal saline และ vehicle ซึ่งจะได้รับ low dose และ high dose ของสารต่อไปนี้

กลุ่มที่ได้รับการให้สาร PMCT

กลุ่มที่ได้รับการให้สาร CTP

กลุ่มที่ได้รับการให้สาร PMCT+CTP

กลุ่มที่ได้รับการให้สาร C75 เป็น positive control

- 1.2 กลุ่มที่ได้รับการ xenograph HepG2 ซึ่งจะได้รับ low dose และ high dose ของสารต่อไปนี้

กลุ่มที่ได้รับการให้สาร PMCT

กลุ่มที่ได้รับการให้สาร CTP

กลุ่มที่ได้รับการให้สาร PMCT+CTP

กลุ่มที่ได้รับการให้สาร C75 เป็น positive control

tumor growth จะถูก measured ทุกๆ 2 วัน แล้วทำการวิเคราะห์ tumor size โดย

$\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = \text{larger diameter (mm)} \times \text{small diameter (mm)}^2 / 2$

Tumor จะถูก remove เพื่อนำไปทำการทดลองต่อไป

2. วิเคราะห์การตายของเซลล์ชนิด apoptosis

เพื่อยืนยันผลว่าสารที่มีความเป็นพิษต่อ tumor มีผลทำให้เซลล์ตายชนิด apoptosis หลังจากได้รับสาร โดยใช้ชุด kit วิเคราะห์

1. Bcl2
2. Caspases
3. 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, Blomed 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 [%])

4. 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

5. 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

6. วิเคราะห์ intracellular malonyl CoA โดย HPLC techniques

HepG2 cell ถูก lyze ใน ice-cold 10% trichloroacetic acid และ centrifuge ที่ 13,000 g หลังจากนั้น supernatant จะถูก apply เข้า solid-phase extraction column HPLC เพื่อ detection malonyl CoA โดย elute ใน methanol และ evaporate ด้วย nitrogen และใช้ buffer A (95% 0.1M ammonium formate:5% MeOH) เพื่อ restore the dry Malonyl-CoA แล้วจึง inject ด้วย the analytical HPLC และใช้ Malonyl-CoA lithium salt (Sigma-Aldrich, MO, USA) เป็น standard Sample ที่เตรียมจะ run ผ่าน column (type C18, 5 μ M, 4.6x250 mm) โดย set absorbance ที่ 259 nm และ flow rate ที่ 0.5 mL/min และ binary gradient จะเกิดจาก buffer 2 ชนิด คือ Buffer A ซึ่งประกอบไปด้วย 95% 0.1M ammonium formate:5% MeOH และ buffer B ซึ่งประกอบไปด้วย 50% 0.1M ammonium formate:50%MeOH และ

initial condition จะถูก maintain ด้วย 100% buffer โดย 50% buffer A:50% buffer B เป็นระยะเวลา 20 นาที และ peak area of Malonyl-CoA คำนวณจาก standard curve

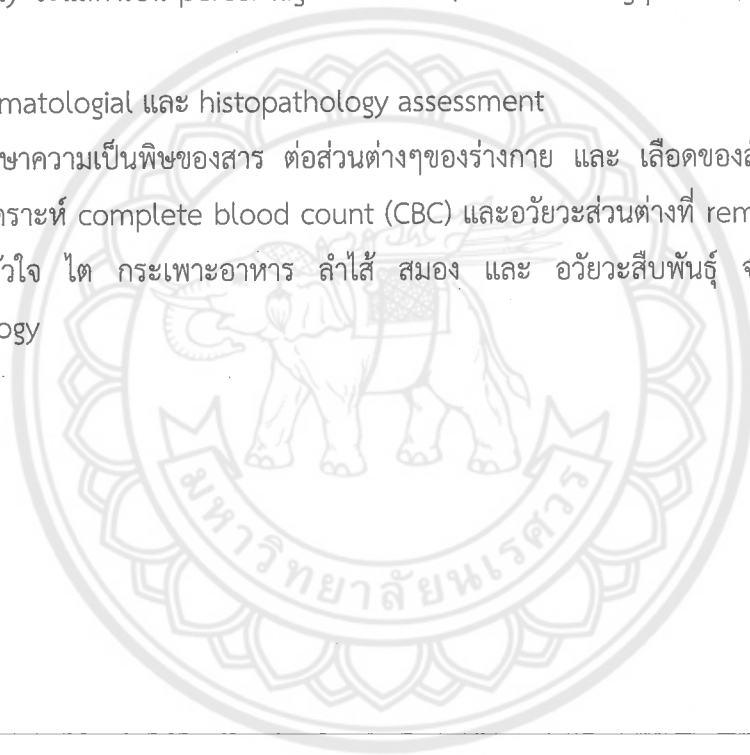
7. วิเคราะห์ CPT-1 activity

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

8. Hematological และ histopathology assessment

เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสาร ต่อส่วนต่างๆของร่างกาย และ เลือดของสัตว์ทดลองจะถูกส่งไปตรวจวิเคราะห์ complete blood count (CBC) และอวัยวะส่วนต่างๆที่ remove ออก ได้แก่ ตับ ปอด หัวใจ ไต กระเพาะอาหาร ลำไส้ สมอง และ อวัยวะสืบพันธุ์ จะส่งไปตรวจทาง histopathology



Epigallocatechin induced apoptosis through blocking the *de novo* lipogenesis pathway in human hepatocellular carcinoma cell line

Phuriwat Khiewkamrop^a, Lysiane Richert^c, Dumrongsak Pekthong^d, Piyarat Srisawang^{a*}

^a*Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 6500*, ^b*Clinical Research Unit Floor 5 His Majesty's 7th Cycle Birthday Anniversary 2, Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000*, ^c*Department of Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Faculte' de Me'decine et de Pharmacie, Universite' de Franche-Comte', Besanc,on, France*,

^d*Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000*

*Corresponding author: E-mail: piyarats@nu.ac.th



Abstract

Impaired regulation of lipid metabolism has been reported to enhance cancer cells overexpressing the *de novo* lipogenesis (DNL) pathway. This pathway is evidence in promoting cancer cell overproliferation and concomitantly suppressing apoptosis. Inhibition of enzyme activities in the DNL pathway can decrease cell proliferation and

increase apoptosis without cytotoxicity in normal cells. The current study focused on the cytotoxic effect of epigallocatechin (EGC), one of the active polyphenol compounds in green tea dried leaf extract. We found that EGC plays a role as a new fatty acid synthase (FASN) inhibitor which promotes an alternative anti-cancer therapy. EGC decreased cell viability and increased apoptosis in HepG2 cells. EGC had no cytotoxic effect on primary human hepatocytes. In addition, the loss of mitochondrial membrane potential is suggested to be correlated with apoptosis. Reduced Bcl2 protein activity is thought to activate the dissipation of mitochondrial-dependent apoptosis. We further showed that EGC decreased expression of enzymes in the DNL pathway which is suggested to enhance apoptosis in HepG2 cells. Herein, we found depleted products of the DNL pathway, including free fatty acid and triglyceride levels following EGC treatment. Moreover, we demonstrate that reduction of fatty acid level provides inhibition of CPT-1 activity contributing to enhanced apoptosis. Furthermore, increased ROS is found to be one of the pro-apoptotic factors that triggers apoptosis in HepG2 cells upon EGC treatment. Thus, altogether, our results suggest potential alternative cancer treatments with EGC that targets the DNL pathway.

Keywords: Epigallocatechin (EGC), Apoptosis, *De novo* lipogenesis, HepG2

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC), a predominant malignancy of hepatocytes (liver cells), is the sixth most common type of fatal cancer and the third most common cancer related to death worldwide [1]. The incident rate of HCC patients is higher in men than women [2]. The prevalence is highest in Asia and Africa where the major risk factors of HCC are raised from chronic hepatitis B and C viral infection, contamination of aflatoxin in food intake, and long-term alcohol consumption [3]. Although, chemotherapy is approved as a common treatment, ineffective potential with various side effects to normal cells has still been reported and limits an encouraging therapy [4]. Therefore, the development of selective anti-cancer treatment is a better approach for HCC patients.

It has been reported that cancer cells exhibit modification of the metabolic feature to substantially depend on ATP synthesis from the *de novo* lipogenesis (DNL) pathway regardless of the lipids supplied by circulation. Overexpression of enzymes in the DNL pathway achieves the high required rate of energy and precursors for sustaining cancer cell proliferation [5]. The newly synthesized fatty acids from the DNL pathway also provide important roles in cellular processes, including intracellular signaling and cell membrane biosynthesis that promote tumor proliferation and

survival. The first catalysis process of *de novo* fatty acid synthesis starts with the activity of ATP citrate lyase (ACLY) which converts cytosolic citrate to acetyl CoA. The consequent steps of the DNL pathway are facilitated by acetyl CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FASN) that catalyze the synthesis of long chain saturated fatty acids (LCFAs) from acetyl CoA combined with malonyl CoA. The desaturation index, the ratio of monounsaturated fatty acids (MUFA) and LCFA level, is known to be catalyzed by stearoyl-CoA-desaturase (SCD1). Interestingly, the DNL pathway in most normal cells is maintained at low activity excepted in lipogenic tissues, including liver and mammary gland of which metabolic demand depend primarily on the oxidative phosphorylation (OXPHOS) pathway [6, 7].

Overexpression of enzymes responsible for the DNL pathway has been recognized as a crucial activating factor of growth, proliferation, and progression of cancers. Several studies have revealed that inhibition of enzymes involved in the DNL pathway has an anticancer effect via suppressing proliferation and triggering apoptosis without generating cytotoxic consequences on normal cells [8, 9]. Decreased fatty acid and cholesterol biosynthesis mediated through suppression of ACC and FASN expression lead to inhibiting cancer cell migration, invasion, and proliferation [10]. The dramatically low level of triglycerides from downregulation of enzymes responsible for the DNL pathway shows an important impact on apoptosis in cancer cells [7]. Previous study has reported that inhibition of ACLY decreases triglyceride and cholesterol levels which trigger apoptosis in cancer cells. ACLY knockdown also deregulates coordination between glucose and lipid metabolism that further leads to promoting tumor suppression [5]. In addition to starvation of fatty acid production, several mechanisms have been proposed for apoptosis induction when DNL inhibition is

mediated via increased ROS formation [11]. Taken together, targeting DNL is proposed to be an emerging anticancer therapeutic mechanism.

Many studies have reported the potential antioxidant and anticancer therapeutic properties of the flavonoid group of polyphenolic compounds from plant sources [12, 13]. Major constituent flavanol components found in green tea (*Camellia sinensis*) leaves, catechins, account for 16-30% of the dried leaves weight. In addition to scavenging of free radicals, catechins possess effective cytotoxic therapy to be considered an apoptotic inducing agent in cancer cells but not in normal cells [12, 13]. Catechin rich extract from cocoa has also been reported to promote cancer cell apoptosis by acting as pro-oxidants that elevate intracellular ROS levels [14]. Catechins are classified into epistructured and nonepistructured flavanols. The former are divided into epicatechin (EC), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin (EGC), and epigallocatechin gallate (EGCG). The latter include catechin (C), catechin gallate (CG), galliccatechin (GC), and galliccatechin gallate (GCG) [15]. The potential antioxidative efficacy of catechins are EGCG>ECG>EGC>CE, which depends on the number of OH based structures [16]. EGCG constitutes the most abundant amount with approximately 40-50% among catechins extracted from dried leaves [15, 17]. Many studies have reported on the biological efficiency of EGCG accomplishing cytotoxicity and manifesting apoptosis induction in a large number of *in vitro* cancer cells and *in vivo* tumor studies through a wide variety of cellular mechanisms. EGCG triggers apoptosis by inducing a direct DNA cleavage mediated by ROS generation [12, 18]. It also possesses an inhibitory action on glycolysis that leads to activation of the onset of the apoptosis process in hepatocellular carcinoma cells. The inhibition of glycolysis results in suppressing the activity of the phosphofructokinase (PFK) enzyme that accounts for regulation of pro-apoptotic factor expression [19]. Study of cisplatin-resistant oral

cancer CAR cells has shown that EGCG induces apoptosis mediated by inhibiting the v-akt murine thymoma viral oncogene homolog (AKT/STAT3) signaling pathway [20]. However, therapeutic effects of other epistructured flavonoids are rarely evaluated. Among 10-20% of polyphenol compounds in green tea consist of EGC and ECG next to EGCG [21]. From previous studies reported that at similarly concentration effect of EGC inhibited proliferation of colon cancer cells more than ECG at 100 μ M [22]. Furthermore, ECG, it was found that less cytotoxicity for induced cell death than EGC in LoVo cells [23]. Flavan-3-ol unit of catechins, EGC, exhibit a potent cytotoxic mechanism [22]. Using the third hydroxyl group of triphenolic compounds in EGC exerts apoptosis with more potent efficiency than EC in breast cancer cells [24]. Apoptosis triggered by EGC has been reported in breast cancer cells with an independency of p53 level [24]. In addition, effect of EGC increased apoptosis in breast cancer cell lines through decreased expression of Bcl2 and increased expression of Bax protein, but not induced cytotoxicity in normal breast epithelium cells [25]. Moreover, comparative effects between EGC and EGCG found that EGC elevated expression of PARP and cleaved-caspase 3 and promoted apoptosis more than EGCG in HCT116 cell lines . Indeed, research has focused on targeting the DNL pathway as a potential cancer therapy; thus EGC targeting on enzymes in this pathway can lead to potential alternative cancer treatments.

The present study aimed to investigate the effect of EGC on apoptosis induction in HepG2 cells. Here, we found that EGC has a more cytotoxic effect with lower IC₅₀ than EGCG and EC in HepG2 cells. This evidence led to EGC being further focused on and evaluated for apoptotic induction mediated through inhibition of the DNL pathway in HepG2 cells.

๒ ๑๒
๖๐๖
-๒๓๖
๒๖๒๑๖
๒๕๖๓
1049285



สำนักงานหอสมุด

Methods

Cell culture

Hepatocellular carcinoma cell lines (HepG2 and HuH-7) were obtained from - 3 มี.ค. 2565 American Type Culture Collection, (ATCC, Manassas, VA, USA) and Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, (JCRB, Osaka, Japan). The culture of HepG2 cells was performed in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) and HuH-7 was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Corning, USA) both of medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin (100 units/ml of penicillin and 10 mg/ml of streptomycin) and incubated in a CO₂ incubator at 37°C in 5% humidifier. Moreover, primary human hepatocytes were obtained from Prof. Dr. Lysiane Richert, KaLy-Cell, 20A rue du Général Leclerc, 67115 Plobsheim, France. Cells were cultured in human hepatocyte maintenance medium (Primacyt, Schwerin, Germany) containing 0.1 M dexamethasone (DEX), 50 mg/l gentamycin, 5% fetal calf serum and 4 mg/l of insulin under 5% CO₂ incubator maintained at 37 °C with humidity.

Cell proliferation determination

The anti-proliferative effects of green tea polyphenols, EGC (CAS Number 970-74-1), ECG (CAS Number 1257-08-5), EC (CAS Number 490-46-0), and EGCG (CAS Number 989-51-5) (Merck Millipore, USA) were investigated in HepG2 cells using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (AMRESCO, Solon, OH, USA). In brief, HepG2 and HuH-7 cells were plated in 96-well plate (SPL Life Sciences, Korea) for 24 h. The green tea polyphenols were freshly prepared by dissolving in 0.1% DMSO. After treatment, MTT solution (0.5 mg/ml in PBS) was added and incubated in a CO₂ incubator at 37°C for 4 h. The mitochondrial reductase enzyme of healthy cells changes from the yellow of MTT to violet of

formazan crystals which is dissolved by DMSO and absorbance detected by a microplate reader (BioTek Instrument, Inc., Winooski, VT, USA) (BioTek) at 595 nm. Percentages of cell viability were calculated and compared with the control by Graph pad prism version 5.

Cells death induction through apoptosis assay

Stages of cell death in the apoptosis processes were determined by double staining with annexin-V and propidium iodine (PI). Annexin-V staining was used to assess an apoptotic early stage of phosphatidylserine (PS) translocation to the extracellular cell membrane compartment while both annexin-V and PI staining detected the apoptotic late stage. HepG2 cells were cultured in 24-well plate for 24 h. Then, both adherent and floating cells were harvested, centrifuged, re-suspend cell pellet with annexin-V binding buffer, and finally stained with Alexar Flour 488 annexin-V and PI by Alexar Flour 488 annexin-V/dead cell apoptosis kit (Life Technologies, Invitrogen, NY, USA). Apoptotic rates were analyzed by FACScalibur flow cytometry using CellQuestPro software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA).

The disruption of mitochondrial membrane permeability ($\Delta\Psi_m$) assay

The level of $\Delta\Psi_m$ in HepG2 cells was examined by flow cytometry 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), a cationic mitochondrial membrane potential fluorescence probe (Invitrogen, USA). 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 decreasing of red dye accumulated in mitochondrial matrix and increasing monomeric green from cytoplasm and emits green fluorescence at 530 nm.

The red/green fluorescence intensity ratio represents a dissipation of $\Delta\Psi_m$ [26]. HepG2 cells were cultured in a 24-well plate and allowed to attach overnight. After treatment, both adherent and floating cells were collected, centrifuged and re-suspend in PBS. 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 incubated with 20 μM of JC-1 in a CO_2 incubator and detected by FACScalibur flow cytometry using excitation at 488 nm and an emission 585/42 filter. Data were analyzed using CellQuestPro software.

Measurement of Bcl2 activation

Bcl2 phosphorylation relative to total Bcl2 expression was assessed by flow cytometry using the Muse Bcl2 Activation Dual Detection Kit (MCH200105; EMD Millipore, Germany). Briefly, cells were seeded in a 36-mm culture dish for 24 h. After treatment, cells were harvested, fixed for 5 min on ice, followed by centrifugation, and finally permeabilized with the permeabilization buffer for 5 min on ice. Cells were mixed in an antibody cocktail (anti-phospho-Bcl-2(Ser70), Alexa Fluor 555, and anti-Bcl2, PECy5) with assay buffer. Bcl-2 levels were detected by Muse Cell Analyzer (Merck Millipore, Germany).

Intracellular ROS generation assay

Induction of intracellular ROS is detected by flow cytometry using a 5-(and-6)-chloromethyl-29, 79-dichlorodihydrofluorescein diacetate fluorescence dye (CM-H2DCFDA), (Molecular probe, USA). HepG2 cells were cultured in a 24-well plate for 24 h. Following treatment, cells were harvested and re-suspend in PBS containing CM-H2DCFDA. ROS was then measured by FACScalibur flow cytometry using excitation and emission filter at 485 nm and 525 nm, respectively. Data were analyzed using CellQuestPro software.

Immonoblotting assay

HepG2 and human primary hepatocytes cells were seeded in a 35-mm culture dish and allowed 24 h to attach before treatment. Intracellular proteins were then collected by M-PER mammalian protein extraction reagent (Thermo Scientific, USA) containing halt proteinase inhibitor cocktail (Thermo Scientific, USA) and concentration quantified by BCA reagent (Thermo Fisher, USA). Equal amounts of protein per lane were separated by 8-12% (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Then, membranes were incubated with RAPID-BLOCK solution (Thermo Scientific, USA) for 20 minutes at room temperature. After blocking, membranes were incubated with anti-FASN (Abcam, USA), anti-ACC (Merck Millipore, USA), and anti-ACLY (Cell Signaling, USA), at 4°C overnight in 2% bovine serum albumin (BSA) and then exposed to horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Life Technologies, Invitrogen). β -actin was used as an internal control (Cell Signaling, USA). Finally, protein bands were visualized by Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore, USA) and detected by a CCD camera (chemiluminescence ImageQuant LAS 4000; GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA).

Intracellular long chain free fatty acid level

To determine an intracellular long chain free fatty acid level, a product from the DNL pathway, was measured by a Free Fatty Acid BioAssay Kit (F0019-94; US Biological; Life Sciences, Salem, MA, USA) as described in the manufacturer's protocol. In the assay, long chain free fatty acids are converted to CoA derivatives and then oxidized with a concomitant generation of a fluorescence signal. Briefly, HepG2 cells were harvested and homogenized with 1% Triton-X 100 in pure chloroform. The supernatant was air dried to remove chloroform and then dissolved in fatty acid assay buffer. Subsequently, the reaction mix in the assay kit, including enzyme mix, enhancer,

and fluorescence probe were added and fatty acid levels were detected by fluorometry at Ex/Em 535/590 nm with a microplate reader. Data were calculated and compared with the control by GraphPad Prism version 5.

Intracellular triglyceride level

The level of triglyceride in cellular extract of HepG2 cells was determined by a Triglyceride Quantification Kit (US, Biological, MA, USA). After treatment, cells were harvested, 5% TritonX-100 was added, and slowly heated from 50°C to 80°C for 10 min and cooled down at room temperature for twice time. After centrifugation at 14,000 rpm, supernatant was collected and incubated with lipase enzyme at room temperature for 20 min. Finally, enzyme mixed and fluorescence probes were added and intensity detected by microplate reader at Ex/Em 535/590 nm. Data were calculated and compared with the control by GraphPad Prism version 5.

Carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT-1) activity assay

The spectrophotometric method was used to determine CPT-1 activity as reported previously [27]. In brief, cells were seeded in 60 mm-petri dish and incubated overnight. Following treatment, cells were harvested and lysed by Tris-HCl buffer (pH 7.8) containing 0.25 M sucrose and 1 mM EDTA to collect mitochondrial proteins. Palmitoyl CoA and L-carnitine were added. The sample was measured for the absorbance by the microplate reader at 412 nm wavelength. Data were calculated and compared with the control by Graph pad prism version 5.

Statistical analysis

The data were shown as mean \pm SD of at least three independent experiments with paired one-way analysis of variance (ANOVA) or student's t test with Turkey's post-hoc analysis used to determine statically significant differences at $p < 0.05$

compared to the mean of the control. Graph Prism Software version 5 was used for analysis of all data.



Results

EGC had the most potent anti-cell viability effect on HepG2 and HuH-7 cells

Characteristics of anti-proliferation are especially presented in green tea polyphenols. We first measured cell viability by MTT assay in HepG2 cells. As shown in figure 1(a-d), EGC and ECG have the most potential cytotoxic effects with IC₅₀ of approximately 1 mM for 24 h in HepG2 cells. In addition, EGC strong inhibited cell proliferation in HepG2 cells more than HuH-7 cells, represent in figure 1e. Moreover, EGC at 1 mM had no cytotoxic effect on primary human hepatocytes, as shown in figure 1f.

EGC induced apoptosis in HepG2 cells

Evaluation of cytotoxic effects of EGC. Inducing cell death via apoptosis pathway was examined. HepG2 cells were treated with 1 mM EGC for 24 h. An important characteristic of apoptotic cell death in the early stage was assessed by positive staining with annexin V conjugated with phosphatidylserine (PS) which is translocated to extracellular membrane and negative staining with PI. In addition, the late stage was assessed by positive staining with both annexin-V and PI, as shown in dot plot in figure 2a and b. EGC increased late stage apoptotic cells to 65.93% from 2.14% of the control. A significant elevation of late apoptotic cells while a reduction of cell viability in the EGC treated group demonstrates the cytotoxic effect of EGC against HepG2 cells through inducing a cell death apoptotic pathway.

EGC promoted mitochondrial dependent apoptosis in HepG2 cells

Further evaluation of the early apoptosis feature of cell death apoptosis was assessed as mitochondrial disruption. Figure 2c and d show increasing green fluorescence intensity and decreasing percentage of red/green fluorescence which indicates a decrease of $\Delta\Psi_m$. Cells treated with EGC at 1 mM for 24 h exhibited

decreased $\Delta\Psi_m$ from 100% of control to 17.69%. Thus, these results provided additional support that mitochondrial disruption accounts for apoptosis cell death induced by EGC.

EGC promoted apoptosis via decreasing Bcl2 activity in HepG2 cells

It is well accepted that the intrinsic apoptosis process is initially accounted for by inhibiting Bcl2 and unregulating Bax protein expression [28]. Figure 3a shows that HepG2 treated with 1 mM of EGC for 24 h reduced activity of Bcl2 from 100% to 45.93%. This result demonstrates that the mechanism of the EGC activating apoptosis process is correlated with the intrinsic apoptosis pathway via suppression of pro-apoptotic Bcl2 activity in HepG2 cells.

EGC increased intracellular ROS production in HepG2 cells

An augmentation of ROS generation has been reported to enhance apoptosis in cancer cells [28]. HepG2 cells treated with EGC resulted in elevation of intracellular ROS production, as shown in figure 3b. EGC at 1 mM treated cells for 24 h enhanced ROS generation from 100% of control to 172.92%. This result suggests a correlation with ROS generation which is responsible for apoptosis induction by EGC in HepG2 cells.

Possible mechanism of EGC inducing apoptosis was involved in the inhibition of the DNL pathway in HepG2 cells

Since reduction of the DNL pathway is known to account for apoptosis in cancer cells, the present study investigated the effect of EGC on expression of proteins in the DNL pathway. Immunoblotting assay in figure 4a shows that treatment of EGC at 1 mM for 24 h decreased the expression of protein ACC but no altered ACLY and FASN expression was observed. In figure 4b, effect of EGC not alter expression of DNL protein in human primary hepatocytes. However, it was found that a reduction of both

free fatty acid and triglyceride levels correlated with reduced protein expressions and activity. EGC showed reduced free fatty acid and triglyceride levels from 100% of control to approximately 30% and 80% in HepG2 cells, respectively, as shown in figure 4c. Collectively, these results provide evidence that inhibition of the DNL pathway be considered a target of EGC to induce apoptosis in HepG2 cells.

EGC exerted an apoptotic effect through suppression of CPT-1 activity following suppression of the DNL pathway in HepG2 cells

Previous studies have reported that reduction of free fatty acid production in the DNL pathway reduces an inhibitory effect on ACC activity, leading to an elevation of malonyl CoA level [29]. A high level of malonyl CoA consequently exerts an inhibition on CPT-1 activity which appears to activate pro-apoptotic factors in cancer cells [29]. In this study, we evaluated the effect of an accumulation of malonyl CoA contributing to apoptosis following downregulation of the DNL pathway by EGC treatment in HepG2 cells. Figure 5a and b show no apoptosis observed in cells treated with a competitive inhibitor of ACC, 5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid (TOFA) at 10 µg/ml for 24 h. However, preincubating cells with TOFA followed by EGC treatment for 24 h significantly ameliorated the apoptotic effect of EGC, suggesting depletion of fatty acid synthesis *per se* is not a major regulator of apoptosis. A consequent elevated malonyl CoA is considered to contribute to apoptosis. These findings, therefore support the aforementioned suggestion that accumulation of malonyl CoA plays a key role as pro-apoptotic mediator in response to fatty acid suppression.

An additional experiment supporting this suggestion shows that suppressed CPT-1 activity as a consequence of fatty acid synthesis depletion may account for the apoptotic effect of enhanced malonyl CoA by EGC treatment in HepG2 cells, as shown in figure 5c.

Discussion

Aberrant metabolism by upregulation of lipogenic enzymes in the DNL pathway has been found to be associated with carcinogenesis development and enhanced cancer cell proliferation [30, 31]. Serum level of FASN is elevated in colorectal cancer patients with overexpression of FASN compared to normal subjects [32]. It has been shown that there is a higher expression level of enzymes in the DNL pathway in cancer cells than in normal cells without dependence on the amount of availability of circulatory lipids and oxygen supply. However, some cancer cells are predominantly dependent on fatty acid synthesized from the DNL pathway while some require equal contribution of the intracellular fatty acid pool derived from DNL and from extracellular uptake to provide energy and substrate building blocks for cellular proliferation and function [33]. For instance, development of human hepatocellular carcinoma is contributed to by sustained DNL pathway in addition to exogenous fatty acid uptake [34]. Approximately 56% of total palmitate synthesis in the mouse C2C12 myoblast cell line is produced from DNL activity while the remaining 44% is provided by the extracellular lipid content. The reliance of palmitate pool from DNL in C2C12 cells has been reported to be similar to that of HepG2 cells [33]. Lipid products of the DNL pathway provide building backbone substrates to facilitate cellular ATP generation, cell membrane composition and fluidity, and cellular signal transduction during a high rate of cell proliferation in cancer cells. LCFA-derived MUFA synthesized in most cancer cells serves as the major component of plasma membrane phospholipids, triglycerides, wax esters, and cholesterol esters. Suppression of DNL enzymes has been postulated as specific targets for anticancer therapeutic development with less cytotoxicity to normal tissues [35].

EGCG, the highest polyphenol catechin constituent in dried leaves of the *Camellia sinensis* plant, has been known to exert various biological activities, including anticancer in various *in vitro* and *in vivo* cancer intervention studies. EGCG exhibits effective induction of apoptosis and antimetastasis in bladder cancer cells without inducing cytotoxicity in normal human bladder cells. The *in vivo* study was in agreement with this finding that EGCG inhibits tumor growth in the cancer xenograft mice model [36]. Previous study also reported anti-proliferative effect of EGCG on colangiocarcinoma cells with no cytotoxicity in normal cells [37]. In contrast to extensive study on EGCG, reports concerning an apoptotic effect of EGC targeting enzymes in the DNL pathway as a potent cancer therapy have been limited. In the present study, EGC showed a more potent cytotoxic effect on HepG2 cells than other epistructured catechins. EGC exhibited apoptosis induction in HepG2 cells and the dissipation of mitochondrial membrane potential was evidence to ascertain mitochondrial dependent apoptosis. We also demonstrate that EGC generates a selective apoptotic effect in cancer cells without causing significant toxic effect in normal cells, where the expression of DNL enzymes is very difficult to detect.

It is well known that Bcl2, a member of pro-survival Bcl2 family proteins, is a key mitochondrial membrane integrity regulator of the apoptosis pathway. The balance of the pro-survival Bcl2 and pro-apoptotic BH-3 protein family has been reported to determine the intrinsic apoptotic pathway. Activation of BH-3 protein family members, such as Bim, Bad, and Nova counteract anti-apoptotic activity of Bcl2 family proteins by occupying the hydrophobic groove on the Bcl2 protein, leading to antagonizing Bax-Bak sequestration and accelerating apoptosis [38]. Treatment of endometrial adenocarcinoma cells with EGCG has been reported to show that downregulation of Bcl2 results in upregulation of Bax, and activation of caspase-3 dependent increased

cleaved PARP formation during apoptosis induction [39]. Consistent with this report, the present study showed decreasing Bcl2 activity after EGC treatment. Thus, we suggest that the underlying mechanism of EGC inducing apoptosis is correlated with a decrease of anti-apoptotic protein Bcl2 activity. Taken together, our result affirms an intrinsic mitochondrial dependent apoptosis induction of EGC in HepG2 cells. However, the mechanism of EGC targeting Bcl2 will need to be further evaluated. The result obtained from bladder cancer cells has demonstrated that downregulated Bcl2 or upregulated Bax protein expression inducing apoptosis of EGCG is mediated by suppression of the transcription factor, nuclear factor-kappa B (NF- κ B) [36]. It was evident that stimulating the signaling pathways of NF- κ B and mitogen activated protein kinase (MAPK) following the binding of tumor necrosis factor (TNF) family members to the TNF receptor-associated factor (TRAF) family adaptors, considered as anti-apoptotic factors through stimulating the expressions of Bcl2 family members.

In addition to depleting Bcl2 activity, we further demonstrate apoptosis induction by EGC is correlated with inhibition of the endogenous DNL pathway. This was affirmed by depleted key enzyme expressions of this pathway, ACLY, ACC, and FASN with an obvious correlation in depletion of product fatty acid and triglyceride levels by EGC treatment. Thus, inhibition of DNL following EGC treatment enhances apoptosis in HepG2 cells. Our suggestion agrees with many previous studies that report suppressed enzyme expression and activity in the DNL pathway exhibit effective and specific apoptosis induction in several types of cancer cells as well as *in vivo* cancer xenograft animal models [30, 40]. Downregulation of ACLY by microRNA-22 (miR-22) in human osteosarcoma (Saos-2), prostate cancer (PC-3), cervical cancer (Hela), and lung cancer (A549) cells have been reported to trigger cancer cell death and suppress cell invasion and metastasis [41]. Suppressing ACLY activity by emodin is

considered a lung cancer stemness inhibitor and apoptosis activator [42]. In addition, impaired mitochondrial ATP production and enhanced glycolysis-produced acidification following knock down of ACC1 and ACC2 has been speculated to participate in triggering apoptosis in glioblastoma cells [40]. Furthermore, silencing the ACC1 α gene in human breast cancer can decrease fatty acid synthesis and promote apoptosis [43]. Thus, EGC targeting the DNL pathway becomes one of the pro-apoptotic anti-cancer agents.

Reduction of fatty acid level is known to cause apoptosis by inhibiting CPT-1 activity. Low level of fatty acid enhances ACC activity that leads to increased malonyl CoA synthesis, which in turn results in inhibiting CPT-1 activity [44]. Inhibition of FASN has been reported to cause inhibition on CPT-1 activity as a result of malonyl-CoA accumulation in cancer cells [45, 46]. Inhibiting CPT-1 activity is suggested to stimulate apoptosis as a consequence [47]. Furthermore, the evidence of ACC inhibition causing both reduction of fatty acid level and activation of apoptosis affirms apoptosis activation of malonyl-CoA accumulation [46]. Treatment with EGC in the present study provided evidence for suppressed CPT-1 activity which is thus suggested to trigger apoptosis in HepG2 cells. Accumulation of malonyl CoA following diminished fatty acid level accounts for inhibiting CPT-1 activity. Previous studies have reported underlying mechanisms of apoptotic activity of CPT-1 depletion. In general, CPT-1 is located on the outer membrane of mitochondria to esterify fatty acyl-CoA to L-carnitine, leading to the generation of acylcarnitine. It is then transferred into mitochondria as substrate for β -oxidation pathway [48]. Once CPT-1 is inhibited, accumulated cytoplasmic fatty acyl CoA is driven into ceramide formation which has been reported to trigger apoptosis and cell cycle arrest [47, 49]. Ceramide is proposed

to activate pro-apoptotic factor, such as Bcl2 interacting protein 3 (BINP3) and tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in cancer cells [50].

We also showed that EGC inducing apoptosis was correlated with elevated ROS level. Consistent results in a previous study suggest that EGC is one of the most potent oxidants inducing DNA degradation in cancer cells [18]. It is known that cancer cells are prone to oxidative damage leading to apoptosis as a result of a high ROS level under physiological conditions [14]. Thus, exposure to elevated ROS observed in EGC treatment suggests an imbalance of ROS and antioxidant machinery, leading to augmentation of cell apoptosis. According to the chemical structure of the phenolic molecule, antioxidant properties occurring via donating electron or hydrogen atoms to neutralize free radicals can also convert themselves to become free radicals leading to stimulation of pro-apoptotic factors and suppression of anti-apoptotic factors [51]. It has been reported that the antioxidant reaction of catechins on the redox reaction of copper (Cu)(II) to Cu(I) increases ROS generation, such as hydroxyl radicals. High Cu(II) levels found in cancer cells permit catechins to elevate this redox reaction, which consequently enhances ROS production [18, 52]. Once generated, ROS behaves as a pro-oxidant that can directly facilitate oxidative DNA breakage, indicating the independence of mitochondria-mediated cytochrome c, releasing the apoptotic pathway and leading to an overwhelming cellular antioxidant capacity [12]. However, ROS production also exerts a direct effect on the mitochondrial apoptosis pathway and facilitates suppression of invasion and metastasis via degradation of extracellular matrix metalloproteinase 2 (MMP2) expressions in cancer cells [14]. Reports from glioblastoma cells also support our suggestion that increased ROS production exposed to ACC inhibition develops mitochondrial-dependent apoptosis due to impairment of mitochondrial ATP production [40].

In conclusion, this research offers the alternative potential therapy of EGC on HepG2 cells. Our study offers the mechanism of how EGC suppresses expression of enzymes in the DNL pathway, leading to increased apoptosis in HepG2 cells. This suppression is correlated with inhibition of CPT-1 activity, contributing to the mitochondrial damaged pathway. Depleted Bcl2 also affirms that EGC enhances mitochondrial-mediated apoptosis in HepG2 cells. Contributing a low abundant level in green tea but high cytotoxic effect in cancer cells, EGC can be acknowledged as a promising candidate with other catechins for cancer therapy.

Reference

1. Dutta, R. and R.I. Mahato, *Recent advances in hepatocellular carcinoma therapy*. Pharmacol Ther, 2017. **173**: p. 106-117.
2. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
3. Balogh, J., et al., *Hepatocellular carcinoma: a review*. J Hepatocell Carcinoma, 2016. **3**: p. 41-53.
4. Lin, S., K. Hoffmann, and P. Schemmer, *Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review*. Liver Cancer, 2012. **1**(3-4): p. 144-58.
5. Xin, M., et al., *miR-22 inhibits tumor growth and metastasis by targeting ATP citrate lyase: evidence in osteosarcoma, prostate cancer, cervical cancer and lung cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(28): p. 44252-44265.
6. Menendez, J.A. and R. Lupu, *Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis*. Nature Reviews Cancer, 2007. **7**(10): p. 763-777.
7. Sun, Y., et al., *SREBP1 regulates tumorigenesis and prognosis of pancreatic cancer through targeting lipid metabolism*. Tumor Biology, 2015. **36**(6): p. 4133-4141.
8. Zong, H.F., et al., *Decreased Warburg effect induced by ATP citrate lyase suppression inhibits tumor growth in pancreatic cancer (Retracted article. See vol. 32, pg. 243, 2015)*. Medical Oncology, 2015. **32**(3).
9. Ma, J.G., et al., *Ginkgolic acid suppresses the development of pancreatic cancer by inhibiting pathways driving lipogenesis*. Oncotarget, 2015. **6**(25): p. 20993-21003.
10. Singh, R., et al., *MicroRNA-195 inhibits proliferation, invasion and metastasis in breast cancer cells by targeting FASN, HMGCR, ACACA and CYP27B1*. Scientific Reports, 2015. **5**.
11. Migita, T., et al., *Inhibition of ATP citrate lyase induces triglyceride accumulation with altered fatty acid composition in cancer cells*. International Journal of Cancer, 2014. **135**(1): p. 37-47.
12. Farhan, M., et al., *Cancer Therapy by Catechins Involves Redox Cycling of Copper Ions and Generation of Reactive Oxygen Species*. Toxins, 2016. **8**(2).

13. Niedzwiecki, A., et al., *Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations*. *Nutrients*, 2016. **8**(9).
14. Taparia, S.S. and A. Khanna, *Procyanidin-rich extract of natural cocoa powder causes ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis and reduction of pro-MMP-2 in epithelial ovarian carcinoma cell lines*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016. **83**: p. 130-140.
15. Tsai, Y.J. and B.H. Chen, *Preparation of catechin extracts and nanoemulsions from green tea leaf waste and their inhibition effect on prostate cancer cell PC-3*. *International Journal of Nanomedicine*, 2016. **11**: p. 1907-1926.
16. Yu, P.L., et al., *Effects of Catechin, Epicatechin and Epigallocatechin Gallate on Testosterone Production in Rat Leydig Cells*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010. **110**(2): p. 333-342.
17. Babich, H., et al., *Differential in vitro cytotoxicity of (-)-epicatechin gallate (ECG) to cancer and normal cells from the human oral cavity*. *Toxicology in Vitro*, 2005. **19**(2): p. 231-242.
18. Farhan, M., et al., *Mobilization of copper ions in human peripheral lymphocytes by catechins leading to oxidative DNA breakage: A structure activity study*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015. **580**: p. 31-40.
19. Li, S.N., 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*. *Scientific Reports*, 2016. **6**.
20. Yuan, C.H., et al., *Epigallocatechin gallate sensitizes cisplatin-resistant oral cancer CAR cell apoptosis and autophagy through stimulating AKT/STAT3 pathway and suppressing multidrug resistance 1 signaling*. *Environmental Toxicology*, 2017. **32**(3): p. 845-855.
21. Yang, G.Y., et al., *Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols*. *Carcinogenesis*, 1998. **19**(4): p. 611-6.
22. Du, G.J., et al., *Epigallocatechin Gallate (EGCG) Is the Most Effective Cancer Chemopreventive Polyphenol in Green Tea*. *Nutrients*, 2012. **4**(11): p. 1679-1691.
23. Tan, X., et al., *Differences of four catechins in cell cycle arrest and induction of apoptosis in LoVo cells*. *Cancer Lett*, 2000. **158**(1): p. 1-6.
24. Vergote, D., et al., *(-)-epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2002. **76**(3): p. 195-201.
25. Vergote, D., et al., *(-)-Epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts*. *Breast Cancer Res Treat*, 2002. **76**(3): p. 195-201.
26. Ly, J.D., D.R. Grubb, and A. Lawen, *The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update*. *Apoptosis*, 2003. **8**(2): p. 115-128.
27. Schmidt, I. and P. Herpin, *Carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) activity and its regulation by malonyl-CoA are modulated by age and cold exposure in skeletal muscle mitochondria from newborn pigs*. *J Nutr*, 1998. **128**(5): p. 886-93.
28. Marvibaigi, M., et al., *Antioxidant Activity and ROS-Dependent Apoptotic Effect of *Scurrula ferruginea* (Jack) Danser Methanol Extract in Human Breast Cancer Cell MDA-MB-231*. *Plos One*, 2016. **11**(7).
29. Thupari, J.N., M.L. Pinn, and F.P. Kuhajda, *Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid*

- oxidation and cytotoxicity*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **285**(2): p. 217-223.
30. Li, L., et al., *Inactivation of fatty acid synthase impairs hepatocarcinogenesis driven by AKT in mice and humans*. Journal of Hepatology, 2016. **64**(2): p. 333-341.
 31. Regula, N., et al., *Malignant lipogenesis defined by 11C-acetate PET/CT predicts prostate cancer-specific survival in patients with biochemical relapse after prostatectomy*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2016. **43**(12): p. 2131-2138.
 32. Park, G.B., et al., *GSK-3 beta-mediated fatty acid synthesis enhances epithelial to mesenchymal transition of TLR4-activated colorectal cancer cells through regulation of TAp63*. International Journal of Oncology, 2016. **49**(5): p. 2163-2172.
 33. Foletta, V.C., et al., *Analysis of Mammalian Cell Proliferation and Macromolecule Synthesis Using Deuterated Water and Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Metabolites, 2016. **6**(4).
 34. Cao, D., et al., *Both de novo synthesized and exogenous fatty acids support the growth of hepatocellular carcinoma cells*. Liver International, 2017. **37**(1): p. 80-89.
 35. Impheng, H., et al., *The Selective Target of Capsaicin on FASN Expression and De Novo Fatty Acid Synthesis Mediated through ROS Generation Triggers Apoptosis in HepG2 Cells*. Plos One, 2014. **9**(9).
 36. Luo, K.W., et al., *EGCG inhibited bladder cancer SW780 cell proliferation and migration both in vitro and in vivo via down-regulation of NF-kappa B and MMP-9*. Journal of Nutritional Biochemistry, 2017. **41**: p. 56-64.
 37. Kwak, T.W., et al., *Anticancer activities of epigallocatechin-3-gallate against cholangiocarcinoma cells*. Oncotargets and Therapy, 2017. **10**: p. 137-144.
 38. Gunda, V., et al., *Inhibition of MAPKinase pathway sensitizes thyroid cancer cells to ABT-737 induced apoptosis*. Cancer Letters, 2017. **395**: p. 1-10.
 39. Manohar, M., et al., *(-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in human endometrial adenocarcinoma cells via ROS generation and p38 MAP kinase activation*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(6): p. 940-7.
 40. Jones, J.E., et al., *Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase 1 (ACC1) and 2 (ACC2) Reduces Proliferation and De Novo Lipogenesis of EGFRvIII Human Glioblastoma Cells*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0169566.
 41. Xin, M., et al., *miR-22 inhibits tumor growth and metastasis by targeting ATP citrate lyase: evidence in osteosarcoma, prostate cancer, cervical cancer and lung cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(28): p. 44252-44265.
 42. Koerner, S.K., et al., *Design and synthesis of emodin derivatives as novel inhibitors of ATP-citrate lyase*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2017. **126**: p. 920-928.
 43. Chajes, V., et al., *Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival*. Cancer Research, 2006. **66**(10): p. 5287-5294.
 44. Puig, T., et al., *Fatty acid metabolism in breast cancer cells: differential inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and C75*. Breast Cancer Research and Treatment, 2008. **109**(3): p. 471-479.
 45. Loftus, T.M., et al., *Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2379-81.
 46. Pizer, E.S., et al., *Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts*. Cancer Res, 2000. **60**(2): p. 213-8.

47. Paumen, M.B., et al., *Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3324-9.
48. Qu, Q., et al., *Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer*. Cell Death & Disease, 2016. **7**.
49. Adan-Gokbulut, A., et al., *Novel agents targeting bioactive sphingolipids for the treatment of cancer*. Curr Med Chem, 2013. **20**(1): p. 108-22.
50. Bandyopadhyay, S., et al., *Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells*. Cancer Research, 2006. **66**(11): p. 5934-5940.
51. Tsao, R., *Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols*. Nutrients, 2010. **2**(12): p. 1231-1246.
52. Zheng, L.F., et al., *DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: Mechanism and structure-activity relationship*. Free Radical Biology and Medicine, 2006. **41**(12): p. 1807-1816.

Legends for illustrations

Figure 1. The effects of green tea polyphenols on HepG2 cell viability and proliferation. (a-d) HepG2 cells were treated with various concentration of EGC, ECG, EC, and EGCG for 24 h. (e) EGC effect on HepG2 cells were compared to HuH-7 cells. (f) Effects of EGC on human primary hepatocytes were compared to HepG2 cells. Cells incubated with 0.1% DMSO were identified as the control. Cell viability was assessed by MTT assay. Data from at least three independent triplicated experiments are presented as mean \pm SD, $p^* < 0.05$.

Figure 2. The effects of EGC on HepG2 apoptosis and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). HepG2 cells were treated with 1 mM EGC for 24 h. Cells incubated with 0.1% DMSO were identified as the control. (a) The population of cells was determined by flow cytometry with double staining of annexin-V and PI and shown as representative dot plot analysis. (b) Quantitative apoptotic analysis shows percentages of distribution of viability, early apoptosis, and late apoptotic cells. (c) The $\Delta\Psi_m$ was investigated by JC-1 dye staining, detected by flow cytometry, and expressed as representative dot plot analysis. (d) The histogram shows percentages of $\Delta\Psi_m$

compared with 100% of the control. Data from at least three independent triplicated experiments are presented as mean \pm SD, $p^* < 0.05$.

Figure 3. Effect of EGC on Bcl2 activity and ROS production in HepG2 cells.

Cells were incubated with 1 mM EGC for 24 h. Controls were treated with 0.1% DMSO. (a) Activity of Bcl2 was determined by MUSE analyzer flow cytometry and calculated percentage of Bcl2 activity compared with 100% of the control. (b) ROS production was determined by CM-H2DCFDA fluorescent dye, detected by flow cytometry, and calculated percentages of ROS product compared with 100% of the control. Quantitative percentages of each cell cycle phase are expressed in a histogram. Data are expressed as mean \pm SD from the least three independent triplicated experiments presented as mean \pm SD, $p^* < 0.05$.

Figure 4. EGC reduced protein expression and fatty acid synthesis in the DNL pathway in HepG2 cells.

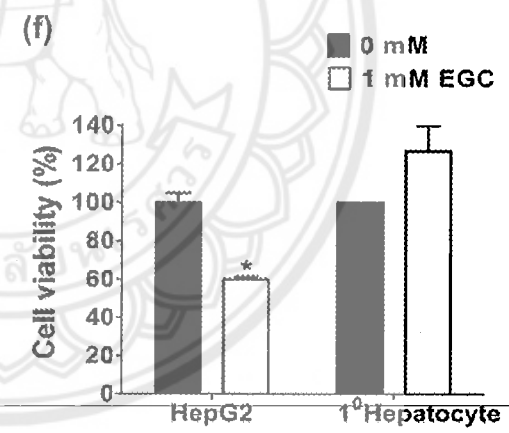
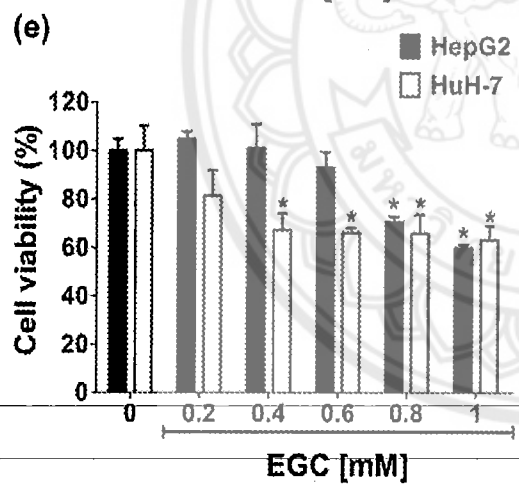
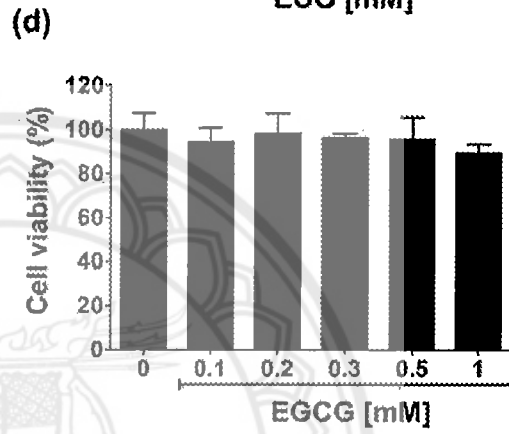
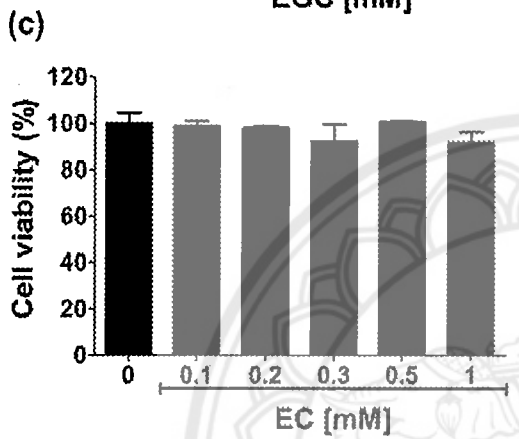
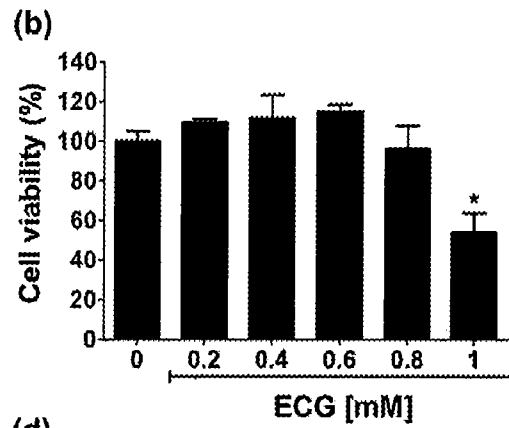
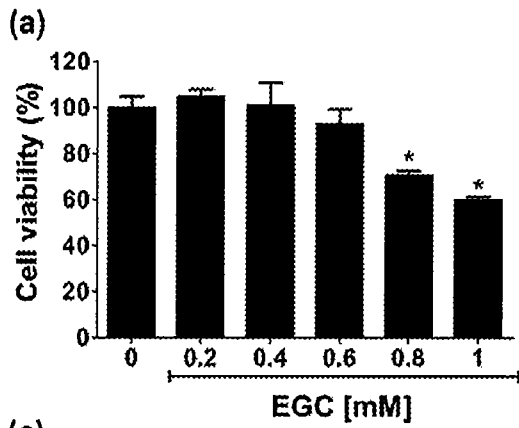
Cells were incubated with EGC at 1 mM for 24 h. Control cells were treated with 0.1% DMSO. (a) Representative immunoblotting assay of protein expression levels in the DNL pathway was visualized from whole cell lysate. An equal amount of total protein extraction in HepG2 and human primary hepatocytes were subjected to detect expression of FASN, ACC, and ACLY proteins. β -actin was used to normalize equal amount and intensity of protein bands. (b) Intracellular fatty acid and triglyceride levels were quantified as described in materials and methods. The result showed mean \pm SD, n=3 from three independent experiments, $*p < 0.05$.

Figure 5. EGC induced apoptosis was mediated by an accumulation of malonyl CoA level and a suppression of the activity of CTP-1 in HepG2 cells.

Cells were treated with 1 mM EGC, 10 μ g/ml TOFA, and preincubated with TOFA prior to treatment with EGC. Cells treated with 0.1% DMSO alone were defined as the vehicle control. Apoptosis was measured by flow cytometry with double staining of annexin-

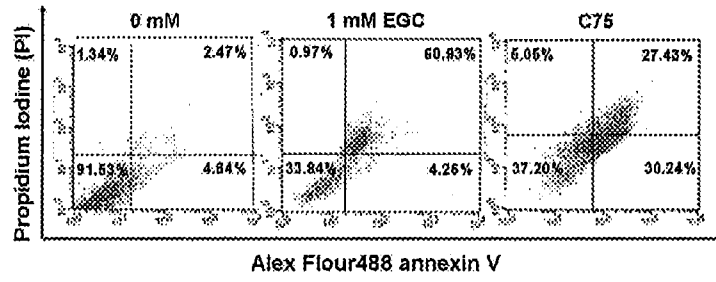
V and PI. (a) Representative dot plot analysis is shown and presented as cell viability along with percentages of early and late apoptotic cells. (b) Graph shows quantitative percentages of cell distribution of viability and summation of early and late apoptotic cells. (c) Percentage of CPT-1 activity was determined in cells treated with EGC at 1 mM for 24 h. Data are presented as mean±SD in three independent experiments, *p < 0.05.

Figure 6. The schematic diagram for propose mechanism of EGC induced apoptosis through blocking DNL pathway in HepG2 cells. EGC decreased activity of enzyme in DNL pathway together with reduction of free fatty acid and triglyceride level. However, EGC not alter expression of enzyme in DNL pathway. Inhibition of activity of enzyme in DNL pathway arise from suppression activity of EGFR and HER-2 receptor leads to decrease activity of PI3K/Akt/mTORC1/SREBP1 axis. After that, reduction of free fatty acid and triglyceride levels promotes suppression of activity of CPT-1, as a regulator for lipid oxidation. Inhibition of CPT-1 can elevate ceramide level in cytosol and trigger expression of pro-apoptotic proteins that is BNIP3. Increment expression of BNIP3 can decrease activity of Bcl2 and increased mitochondrial membrane potential mediated apoptosis in HepG2 cells. Finally, accumulation of ROS is a one cause for promote apoptosis in HepG2 cells.

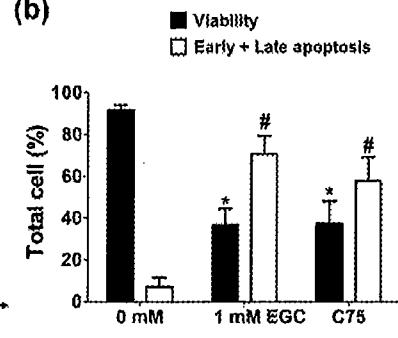




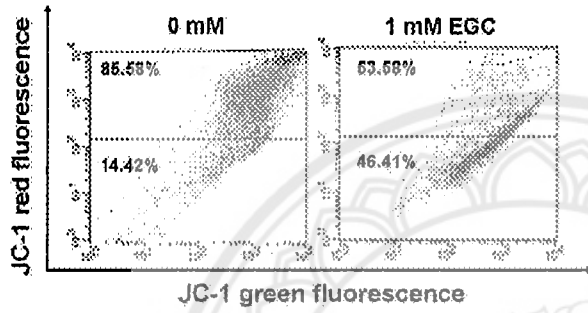
(a)



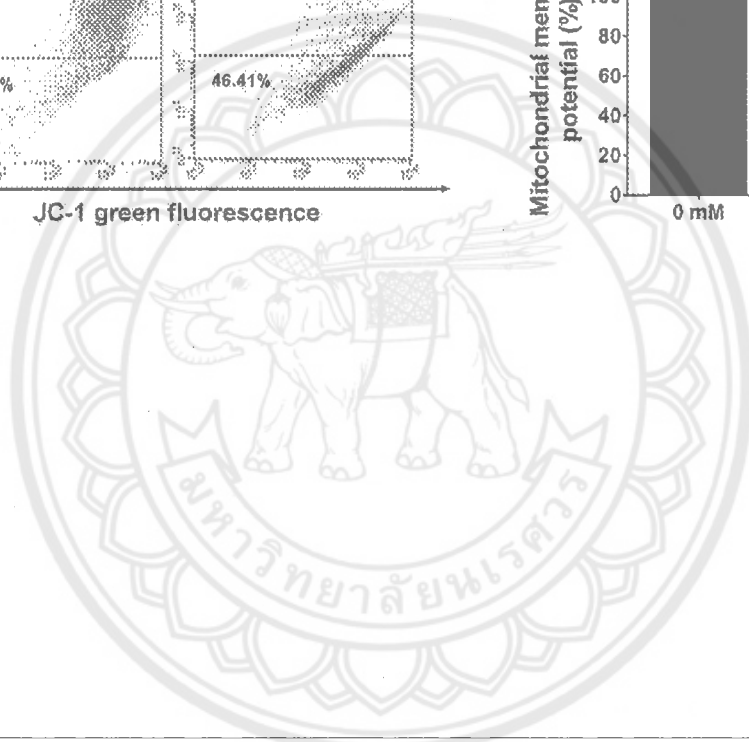
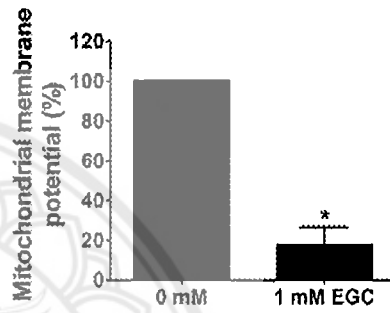
(b)



(c)

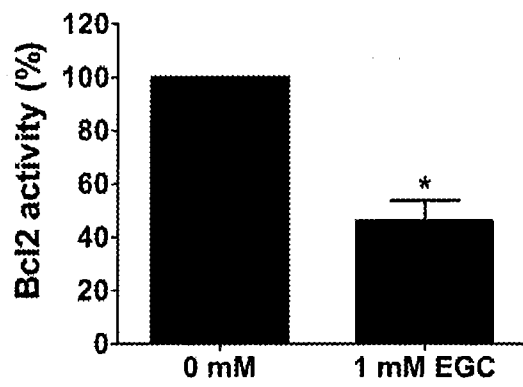


(d)

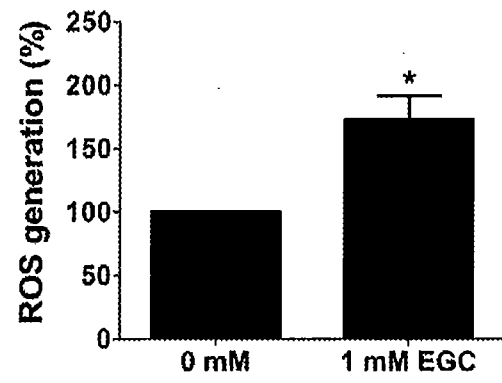




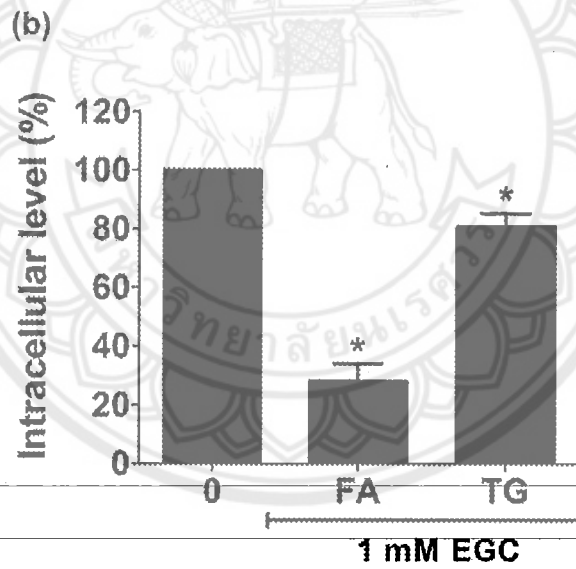
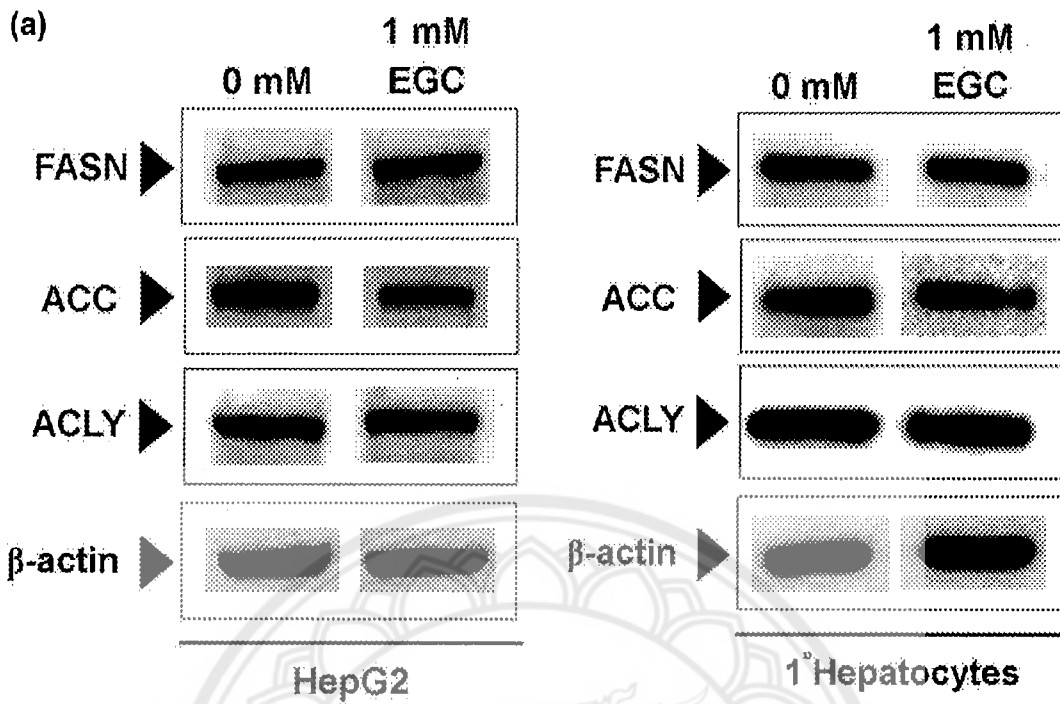
(a)



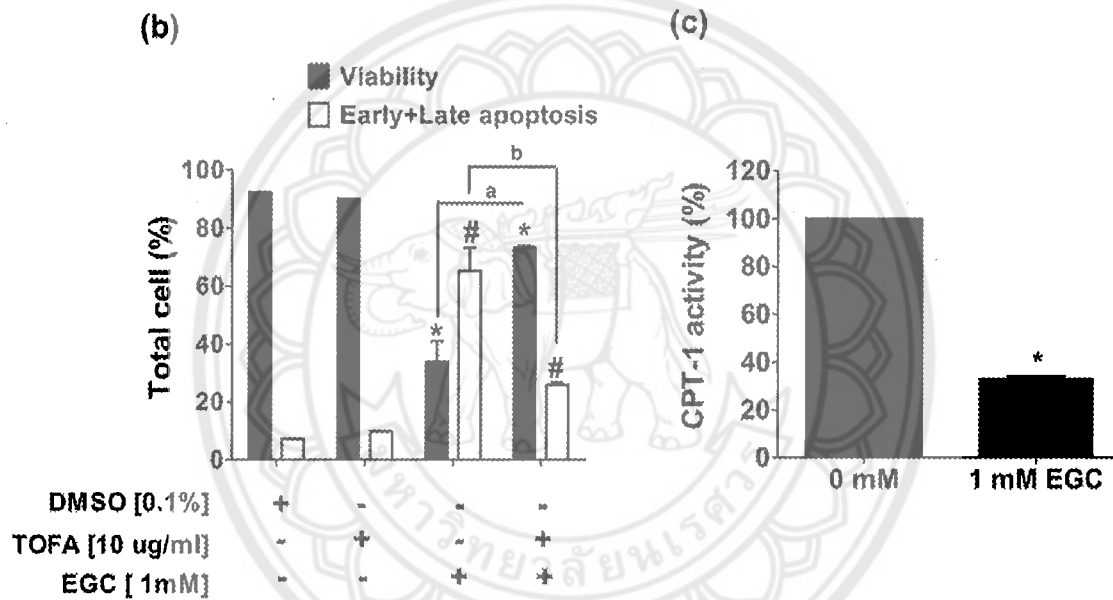
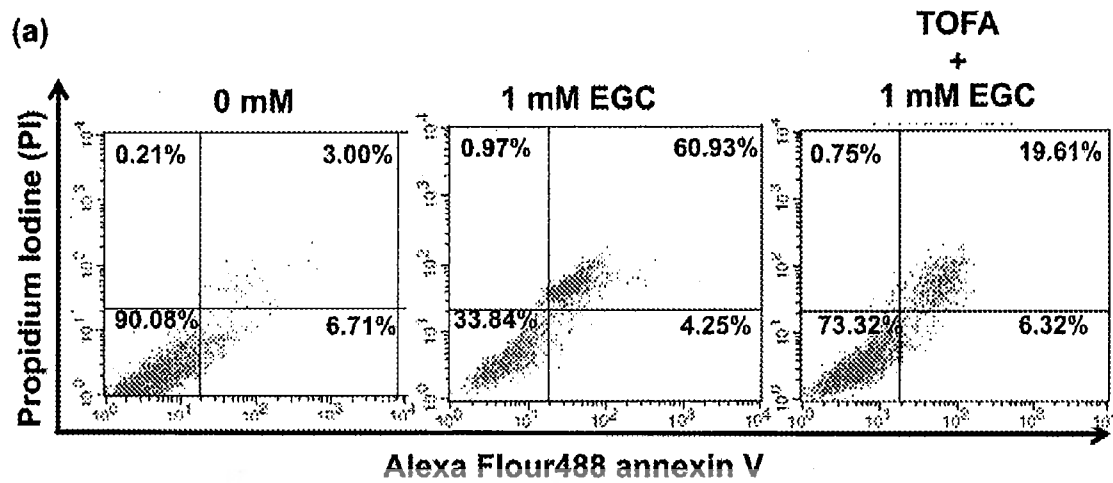
(b)



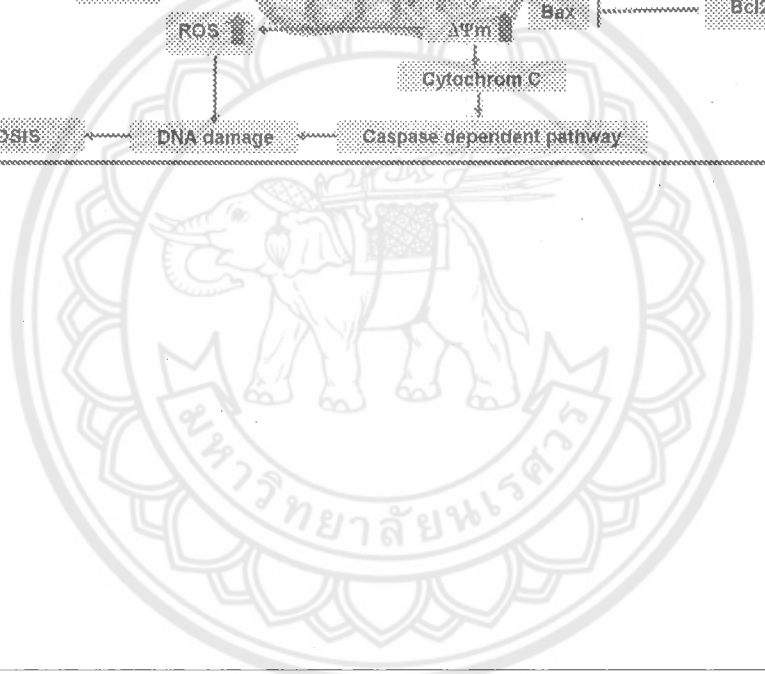
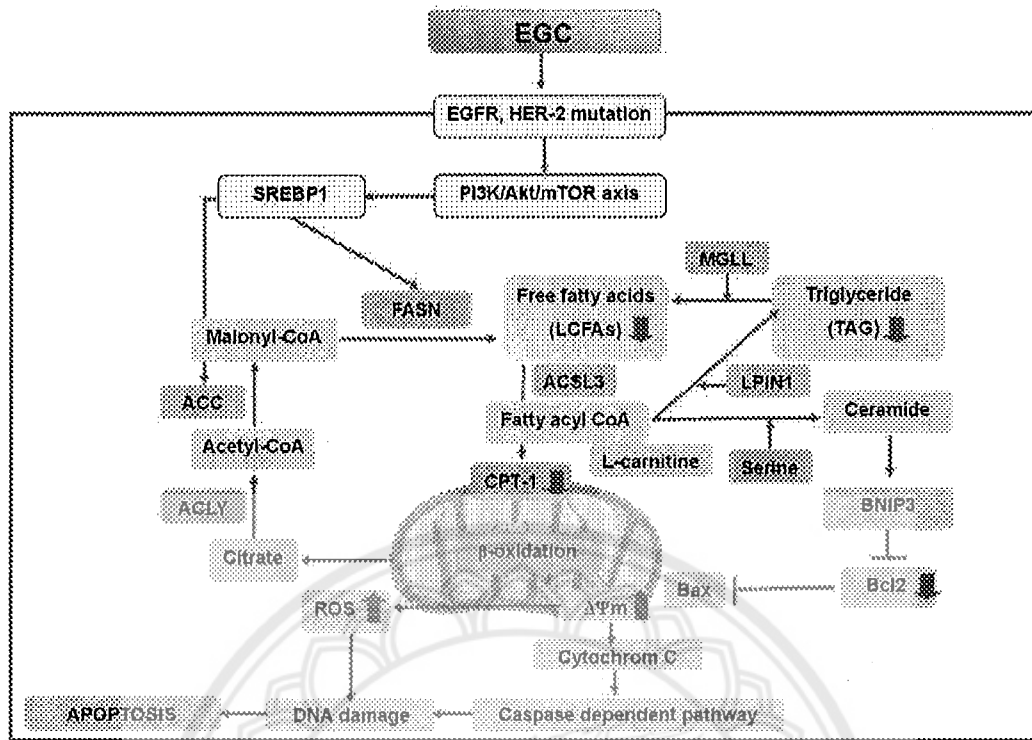
















ผลของสารยับยั้ง citrate transporter ต่อการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ผ่านการยับยั้งขบวนการสร้างไขมันชนิด *de novo*

Citrate transporter inhibitors induce apoptosis in colon cancer cells through inhibiting of *de novo* lipogenesis pathway

สมฤดี สุวรรณกุลานันท์¹, นารินทร์ ภักดีโต¹, วันอังการ พูลศรี¹, ดามรัศมณ สุรางกุล², เมธวี ศรีคำมูล², จุลินทร สำราญ³, จิราภรณ์ โตจรัส⁴ และ ปิยะรัตน์ ศรีสว่าง^{1*}

Somrudee Suwankulanant¹, Narinthorn Phakdeeto¹, Wan-angkan Poolsri¹, Damratsamon Surangkul², Metawee Srikumool², Julintorn Somran³, Jiraporn Tocharus⁴ and Piyarat Srisawang^{1*}

¹ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย 65000

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

² ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย 65000

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

³ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย 65000

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

⁴ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย 50200

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

* Corresponding author: pilyrats@nu.ac.th

Abstract

Previous studies have reported that *de novo* lipogenesis (DNL) pathway plays an important role in cancer cells for enhanced cell growth and proliferation. Citrate is an important substrate in DNL pathway and derived from two sources, plasma membrane citrate transporter (PMCT) and mitochondrial citrate transport protein (CTP). This study aimed to investigate the effect of PMCT inhibitor (PMCTi) and CTP inhibitor (CTPi) on suppression of DNL pathway that triggers apoptosis in colon cancer cell lines, HCT116 and HT29. Cells were treated with PMCTi, CTPi and the combination of PMCTi and CTPi for 24 h and examined cell viability by MTT assay. Cell treatment with combination of 0.75 mM PMCTi and 0.75 mM CTPi caused reduction in cell viability to 64% in HCT116 cells and combination of 1.0 mM PMCTi and 0.5 mM CTPi reduced cell viability to 76% in HT29 cells. After that, effect of PMCTi combined with CTPi on cell apoptosis was measured by flow cytometry. The results showed that combination of PMCTi and CTPi significantly inhibited cell proliferation to 72.70% and increased apoptosis to 24.65% in HCT116 cells, while apoptosis in HT29 cells was not observed. Moreover, we investigated intracellular citrate and fatty acid level using assay kits and found that PMCTi combined with CTPi reduced citrate and fatty acid level to 47.62% and 76.21% in HCT116 cells, suggesting this combined inhibitor targets DNL pathway. Taken together, these findings conclude that inhibition of citrate transport by treatment



with combination of PMCTi and CTPI leads to apoptosis induction in HCT116 cells through suppression of DNL pathway.

Keywords: Citrate transporter, apoptosis, colon cancer, *de novo* lipogenesis

บทคัดย่อ

การศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานว่ายับยั้งการสร้างไขมันชนิด *de novo* (DNL) มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งให้สูงขึ้น citrate เป็นสารตั้งต้นสำคัญในขบวนการ DNL และมีการขนส่งผ่านสองบริเวณ คือ plasma membrane citrate transporter (PMCT) และ mitochondrial citrate transport protein (CTP) การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ PMCT inhibitor (PMCTi) และ CTP inhibitor (CTPI) ในการยับยั้งขบวนการ DNL และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งได้แก่เซลล์ HCT116 และ HT29 เซลล์จะได้รับสาร PMCTi, CTPI และ PMCTi ร่วมกับ CTPI เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay เมื่อให้สาร PMCTi ที่ความเข้มข้น 0.75 mM ร่วมกับ CTPI ที่ความเข้มข้น 0.75 mM พบว่าสามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 64% ในเซลล์ HCT116 และเมื่อให้สาร PMCTi 1.0 mM ร่วมกับสาร CTPI 0.5 mM ลดการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 76% ในเซลล์ HT29 หลังจากนั้นจึงใช้ PMCTi ร่วมกับ CTPI แล้ววัดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ด้วยเทคนิค flow cytometry ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า PMCTi ร่วมกับ CTPI ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 72.70% และเพิ่มการตายแบบ apoptosis ได้ 24.65% ในเซลล์ HCT116 ในขณะที่ไม่พบการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ HT29 นอกจากนี้ได้ทำการตรวจสอบระดับของ citrate และกรดไขมันภายในเซลล์โดยใช้ assay kits พบว่า PMCTi ร่วมกับ CTPI ลดระดับ citrate และกรดไขมันลงได้ 47.62% และ 76.21% ตามลำดับในเซลล์ HCT116 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารยับยั้งทั้งสองมีผลจำเพาะต่อขบวนการ DNL จากผลการทดลองทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าการยับยั้งการขนส่ง citrate โดยการรวมกันของ PMCTi และ CTPI สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ HCT116 ได้ผ่านการยับยั้งขบวนการ DNL

คำสำคัญ: Citrate transporter, apoptosis, มะเร็งลำไส้ใหญ่, ขบวนการสร้างไขมันชนิด *de novo*

บทนำ

การศึกษาก่อนหน้ารายงานว่า การเจริญเติบโตที่ผิดปกติของเซลล์มะเร็งมีความสัมพันธ์กับกระบวนการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ในการแสดงออกของยีน ซึ่งยีน hypoxia inducible factor 1A (HIF1A) ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นเป้าหมายหนึ่งที่นำคาดหวังในการรักษาโรคมะเร็ง (R. C. Sun & Denko, 2014) ในเซลล์ปกติ ความต้องการออกซิเจนและพลังงานจะมีผลต่ออัตราการผลิต ATP จากกระบวนการ glycolysis และ oxidative phosphorylation (OXPHOS) ใน mitochondria แต่ในเซลล์มะเร็งจะเกิดการขาดเลือดและสารอาหารมาหล่อเลี้ยงทำให้ยีน HIF มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นและสามารถไปควบคุมการทำงานของกระบวนการ glycolysis และ OXPHOS ได้ (Biswas, Lunec, & Bartlett, 2012) ซึ่งมีการศึกษาพบว่ากระบวนการ glycolysis ที่เพิ่มขึ้นมีผลเพิ่มการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสและการสร้างกรดแลคติกภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Warburg effect หรือ aerobic glycolysis (Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009) นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังได้พลังงานจากขบวนการสร้างไขมันชนิด *de novo* (DNL) ซึ่งใช้สาร metabolites ต่าง ๆ จากกระบวนการ OXPHOS โดยการเพิ่มขึ้นของขบวนการ DNL ในการสังเคราะห์ long chain fatty acids (LCFAs) ทำให้



เซลล์มะเร็งสามารถสร้างเยื่อหุ้มเซลล์และพลังงานได้ผ่าน β -oxidation และการตัดแปลงไขมัน (Mashima, Seimiya, & Tsuruo, 2009) ทำให้ขบวนการ DNL เป็นแหล่งพลังงานหลักที่เซลล์มะเร็งใช้ในการเจริญเติบโต

Citrate เป็นสารตั้งต้นหลักในขบวนการ DNL โดย citrate จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA และ oxaloacetate (OAA) ด้วยเอนไซม์ ATP-citrate lyase (ACLY) (Hatzivassiliou et al., 2005) จากนั้นเปลี่ยนเป็น Malonyl-CoA ด้วยเอนไซม์ Acetyl-CoA carboxylase (ACC) และจะเปลี่ยนเป็น LCFAs ด้วยเอนไซม์ Fatty acid synthase (FASN) (Currie, Schulze, Zechner, Walther, & Farese, 2013) หลังจากนั้น LCFAs จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Mono unsaturated fatty acids, MUFAs) ด้วยเอนไซม์ Stearoyl-CoA desaturase (SCD-1) เพื่อนำไปใช้ในการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ LCFAs ยังถูกเปลี่ยนเป็น Fatty acyl-CoA ด้วยการทำงานของเอนไซม์ Acyl-CoA synthase (ACS) และจะถูกขนส่งเข้าสู่ mitochondria ผ่านทาง Carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT-1) และเข้าสู่กระบวนการ β -oxidation เพื่อใช้ในการสร้างพลังงานให้กับเซลล์มะเร็งต่อไป (Biswas et al., 2012)

การศึกษาก่อนหน้ารายงานว่าในเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของ FASN เพิ่มขึ้น (Mashima et al., 2009) ซึ่งคาดว่า PI3K/Akt/mTOR signaling pathway เป็นหนึ่งในกระบวนการหลักที่ควบคุมการแสดงออกของ FASN ให้เพิ่มมากขึ้น (Van de Sande, De Schrijver, Heyns, Verhoeven, & Swinnen, 2002) การให้สารยับยั้ง FASN หรือ siRNAs ต่อการแสดงออกของ FASN ช่วยเพิ่มการตายของเซลล์มะเร็งและการตายแบบ apoptosis (Nicot et al., 2004; Zhao et al., 2006) นอกจากนี้การยับยั้งการแสดงออกของ FASN ยังช่วยเพิ่มระดับของ ceramide ซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานของ BNIP3 (Bandyopadhyay et al., 2006) และยับยั้งการทำงานของ Bcl-2 ทำให้ Bak สามารถเคลื่อนย้ายไปที่ mitochondria และกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ขึ้น (S. Li et al., 2016) ดังนั้นการยับยั้งขบวนการ DNL จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษามะเร็ง

Citrate มีตัวขนส่งอยู่สองบริเวณด้วยกัน ได้แก่ plasma membrane citrate transporter (PMCT) และ mitochondrial citrate transport protein (CTP) ซึ่ง PMCT เป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณ plasma membrane ทำหน้าที่ขนส่ง citrate จาก plasma เข้าสู่ cytosol ร่วมกับ Na^+ โมเลกุล โดย PMCT ถูกค้นพบครั้งแรกในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) มีชื่อเรียกว่า INDY (I'm not dead yet) และในหนอนตัวกลม (*Caenorhabditis elegans*) เรียกว่า Na^+ /citrate co-transporter (ceNAC-2) (J. Sun et al., 2010) ซึ่ง INDY มีการแสดงออกมากใน fat body ซึ่งทำหน้าที่ในการกักเก็บไขมัน (Rogers & Rogina, 2015) Li และคณะ (2015) พบว่าการ knockdown PMCT มีผลทำให้การสร้างไขมันในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ลดลง (L. Li et al., 2015), เพิ่มความไวในการทำงานของอินซูลินและป้องกันการเกิด non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) จากการบริโภคในหนู Mice (Brachs et al., 2016) นอกจากนี้การยับยั้ง PMCT ยังช่วยลดการเติบโตของเนื้องอกในคนที่เป็นมะเร็งตับโดยการกระตุ้น AMPK signaling pathway (Z. Li et al., 2017) ดังนั้น PMCT จึงถือเป็นเป้าหมายสำคัญอีกทางหนึ่งในการรักษามะเร็ง ตัวขนส่งที่สองคือ CTP เป็นโปรตีนที่พบได้ในบริเวณ inner mitochondrial membrane ทำหน้าที่ในการขนส่ง citrate จาก mitochondria ออกสู่ cytosol แลกเปลี่ยนกับการขนส่ง malate เข้าสู่ mitochondria (J. Sun et al., 2010) มีรายงานว่า การยับยั้งการแสดงออกของ CTP ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อ mitochondria และลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด HCT1299 (Catalina-Rodriguez et al., 2012) ขณะที่การเพิ่มการทำงานของ CTP โดย p53 ที่เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์มะเร็งปอดจะเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (Kolukula et al., 2014) จึงมีข้อเสนอแนะว่า CTP มีบทบาทสำคัญในการอยู่รอดและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการยับยั้งทั้ง PMCT และ CTP จึงสามารถยับยั้งการทำงานของขบวนการ DNL ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้



การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบผลของ PMCT inhibitor (PMCTi) และ CTP inhibitor (CTPI) ต่อการยับยั้งการขนส่ง citrate ที่นำไปสู่การยับยั้งขบวนการ DNL และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116 และ HT29)

อุปกรณ์และวิธีการ / วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่: HCT116 (p53 wild type) (CCL-247, ATCC, VA, USA) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. ตามรัตน์ สุรางกูร และ ดร. เมธิ ศรีคำมูล อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ประเทศไทย และ HT29 (p53 mutant) (HTB-38, ATCC, VA, USA) ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิราภรณ์ ไตจรัส อาจารย์ประจำภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ใน McCoy's 5A media (Corning, MA, USA) ซึ่งประกอบด้วย 10% Fetal Bovine Serum (FBS) และ 1% antibiotic-antimycotic (100x) (Gibco, MA, USA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C, คาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้น 95%

ทดสอบอัตราการอยู่รอดของเซลล์โดยใช้เทคนิค MTT assay

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 และ HT29 ใน 96-well culture plate (SPL Life Sciences Inc., Korea) ที่ความหนาแน่น 3×10^4 เซลล์/150 μ l/well เมื่อครบ 24 ชั่วโมงจึงให้สาร PMCTi (ST056138, TimTec, DE, USA), CTPI (#6652048, Chembridge, CA, USA) และสาร PMCTi ร่วมกับ CTPI ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใส่สาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Amresco, OH, USA) ที่ละลายด้วย phosphate-buffered saline (PBS) ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C สาร MTT จะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลึกคริสตัลสีม่วงเมื่อละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, MO, USA) และสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ที่ 595 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (Synergy HT Multi-Mode, BioTek Instruments, Inc., USA)

ตรวจสอบการตายแบบ apoptosis โดยใช้เทคนิค flow cytometry

ตรวจสอบเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis โดยใช้ชุดทดสอบ Alexa Fluor 488 Annexin V/dead cell apoptosis kit (Invitrogen, NY, USA) สี annexin V จะย้อมติดบริเวณ phosphatidylserine (PS) เมื่อเซลล์เกิดการตายแบบ-apoptosis ในระยะแรก ส่วน apoptosis ระยะสุดท้ายจะย้อมติดทั้งสี annexin V และ propidium iodide (PI) หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ใน 48-well culture plate ที่ความหนาแน่น 1.5×10^5 เซลล์/well ครบ 24 ชั่วโมงแล้วจึงให้สาร PMCTi ร่วมกับ CTPI แก่เซลล์โดยเลือกใช้ความเข้มข้นที่ได้จากการวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ หลังจากให้สารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงทำการเก็บเซลล์ ละลายด้วย annexin binding buffer แล้วจึงย้อมสี Alexa Fluor 488 Annexin V และ PI จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง FACSCalibur flow cytometry และคำนวณโดยใช้ CellQuSetPro software (Mac OS 9, BD Biosciences, USA)

ตรวจสอบระดับของ citrate ภายในเซลล์ด้วย assay kit

การตรวจสอบระดับ citrate ภายในเซลล์โดยใช้ citrate bioassay kit (C5802, Life Sciences, Salem, MA, USA) เซลล์ HCT116 1×10^6 เซลล์ ที่เพาะเลี้ยงใน culture dish ขนาด 35 mm³ จะได้รับสาร PMCTi ร่วมกับ CTPI เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์ ใส่ citrate assay buffer และ homogenized แล้วจึงใส่สาร reaction mix



ในแต่ละตัวอย่าง citrate จะถูกเปลี่ยนเป็น oxaloacetate, malate, และได้เป็น pyruvate ในท้ายที่สุด ค่าการเรืองแสงของ pyruvate สามารถวัดได้ที่ Excitation/Emission (Ex/Em) = 535/590 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader

ตรวจสอบระดับของกรดไขมันภายในเซลล์ด้วย assay kit

กรดไขมันเป็นผลิตภัณฑ์สำคัญในขบวนการ DNL การเปลี่ยนรูปของกรดไขมันไปเป็น acyl-CoA สามารถวัดได้โดยใช้ free fatty acid bioassay kit (FO019-94, Life Sciences, Salem, MA, USA) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HCT116 ใน culture dish ขนาด 35 mm² ที่ความหนาแน่น 1×10⁶ เซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากเซลล์ได้รับสาร PMCTi ร่วมกับ CTPI ครบ 24 ชั่วโมงแล้วจึงทำการเก็บเซลล์ ใส่ 1% Triton-X 100 ใน pure chloroform และ homogenized. หลังจากขจัด chloroform แล้วจึงละลาย organic phase ด้วย fatty acid assay buffer และใส่สาร reaction mix ในแต่ละตัวอย่าง วัดค่าการเรืองแสงของ acyl-CoA ที่ Ex/Em = 535/590 nm ด้วยเครื่อง microplate reader

ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค immunoblotting assay

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HCT116 ที่ความหนาแน่น 1×10⁶ เซลล์ ใน culture dish ขนาด 35 mm² แล้วจึงให้สาร PMCTi ร่วมกับ CTPI เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บโปรตีนโดยใช้ mammalian protein extraction reagent (MPER) (Thermo Scientific, IL, USA) ที่มีส่วนผสมของ 1% protease inhibitor cocktail (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) และวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, USA) จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ไปแยกขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และเคลื่อนย้ายโปรตีนลง membrane แซ่ membrane ใน rapid block solution (Amresco, OH, USA) เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องเพื่อ block โปรตีนที่ไม่ต้องการ แล้วจึงบ่ม membrane ด้วย primary antibodies: anti-ACLY (Merck Millipore, Germany), anti-ACC (Cell signaling Technology, MA, USA) หรือ anti-FASN (Abcam, MA, USA) ใน bovine serum albumin (BSA) ละลายด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำคืน โดยใช้ β-actin (Cell signaling Technology, USA) เป็น internal control จากนั้นใส่ HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Invitrogen, MA, USA) อัตราส่วน 1:7000 ใน 5% skim milk ละลายด้วย PBS ผสมกับ 0.2% Tween20 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงใส่ Luminata Forte Western HRP substrate (Merck Millipore, Germany) และนำไปวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่อง CCD camera (chemiluminescence Image Quant LAS 4000; GE healthcare Life science, PA, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ GraphPad Prism Software version 5 และคำนวณค่าทางสถิติโดยใช้ Student's t-test ในกรณีที่มีข้อมูลเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมมากกว่าหนึ่งกลุ่มจะใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และ Turkey's post-hoc analysis ในการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยจะพิจารณาว่ามีความสำคัญทางสถิติเมื่อ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

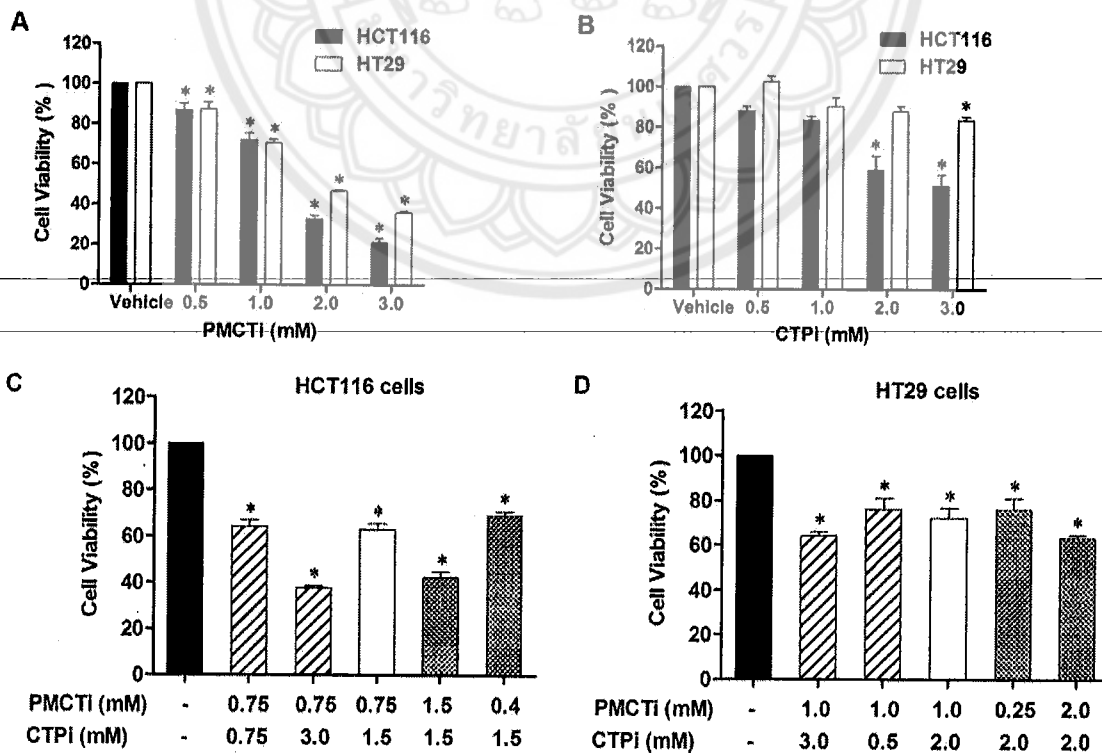
PMCTi, CTPI และ PMCTi ร่วมกับ CTPI ช่วยลดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 และ HT29 ได้รับสาร PMCTi หรือ CTPI เป็นเวลา 24 ชั่วโมงส่งผลให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์ลดลง โดยค่า IC₅₀ ของสาร PMCTi คือ 1.5 mM ในเซลล์ HCT116 และ 2.0 mM ในเซลล์ HT29 ตามลำดับ (ภาพที่ 1A) ส่วน CTPI ที่ได้รับในเซลล์ HCT116 มีค่า IC₅₀ ที่ 3.0 mM และมากกว่า 3.0 mM ในเซลล์ HT29 (ภาพที่ 1B) ซึ่งครึ่งหนึ่งของ IC₅₀ ของสารยับยั้งแต่ละสารจะถูกนำมาใช้ร่วมกันเพื่อประเมินผลของความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในเซลล์ HCT116 และ HT29



เมื่อทดสอบเซลล์ HCT116 ด้วย PMCTI 0.75 mM ร่วมกับ CTPI 1.5 mM มีผลให้การอยู่รอดของเซลล์ลงประมาณ 63% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม PMCTI 0.75 mM ร่วมกับความเข้มข้นของ CTPI ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงมีผลทำให้เพิ่มหรือลดการเจริญเติบโตของเซลล์ตามสัดส่วนของสารยับยั้งที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารยับยั้งเพียงสารเดียวในเซลล์ HCT116 ในทำนองเดียวกันผลความเป็นพิษที่พบในเซลล์ HCT116 เมื่อได้รับสาร CTPI 1.5 mM คงที่ร่วมกับการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของ PMCTI ก็พบว่าเซลล์มีการเติบโตเพิ่มขึ้นและลดลงตามสัดส่วนของปริมาณสารยับยั้งที่ใช้ ผลความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อได้รับสาร PMCTI 0.75 mM ร่วมกับสาร CTPI 0.75 mM มีความสามารถในการลดการอยู่รอดของเซลล์ประมาณ 64% ซึ่งใกล้เคียงกับการได้รับ PMCTI 0.75 mM ร่วมกับ CTPI 1.5 mM และ PMCTI 0.4 mM ร่วมกับ CTPI 1.5 mM ในเซลล์ HCT116 ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าทั้ง PMCTI และ CTPI มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ร่วมกันในเซลล์ HCT116 ซึ่งได้เลือกใช้ PMCTI ที่ความเข้มข้น 0.75 mM ร่วมกับ CTPI 0.75 mM ในการศึกษาต่อไป (ภาพที่ 1C)

ในเซลล์ HT29 ก็แสดงผลที่คล้ายคลึงกันดังแสดงในภาพที่ 1D PMCTI 1.0 mM ร่วมกับ CTPI 2.0 mM ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงประมาณ 72% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การให้สาร PMCTI ที่ความเข้มข้น 1.0 mM ร่วมกับการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของ CTPI ทำให้การอยู่รอดของเซลล์เพิ่มขึ้นหรือลดลงตามสัดส่วนของสารยับยั้งที่ได้รับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารยับยั้ง PMCTI หรือ CTPI เพียงสารเดียว เช่นเดียวกัน เมื่อให้สาร CTPI 2.0 mM คงที่ร่วมกับการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของ PMCTI ทำให้อัตราการเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นหรือลดลงตามสัดส่วนของสารที่ได้รับ ดังนั้นทั้ง PMCTI และ CTPI จึงมีผลเป็นพิษต่อเซลล์ HT29 ผลของ PMCTI 1.0 mM ร่วมกับ CTPI 0.5 mM สามารถลดการรอดชีวิตของเซลล์ได้ประมาณ 76% ซึ่งใกล้เคียงกับผลที่พบใน PMCTI 1.0 mM ร่วมกับ CTPI 2.0 mM ด้วยเหตุนี้ในการทดลองต่อไปจึงได้เลือกใช้ PMCTI 1.0 mM ร่วมกับ CTPI 0.5 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่เป็นพิษต่อเซลล์ HT29



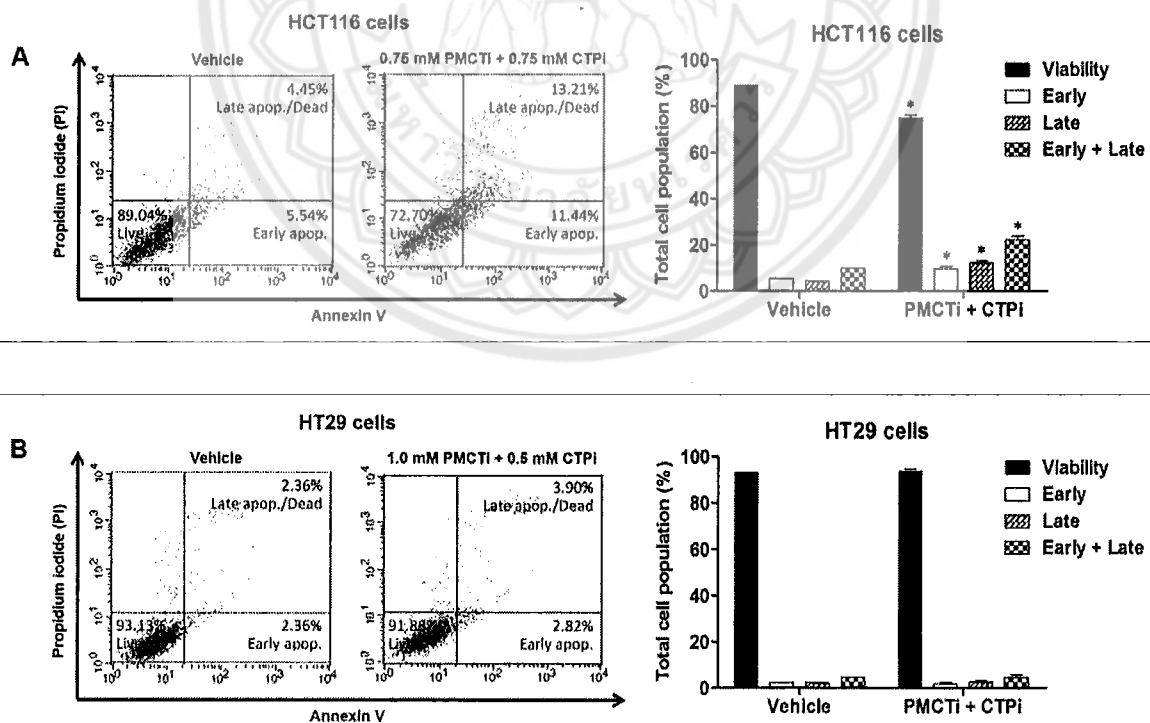


ภาพที่ 1 ผลของ PMCTi, CTPI และ PMCTi ร่วมกับ CTPI ต่อการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

เซลล์ HCT116 และ HT29 จะได้รับสาร PMCTi หรือ CTPI ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (A) การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เมื่อได้รับ PMCTi และ (B) การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เมื่อได้รับ CTPI เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (C) การอยู่รอดของเซลล์ HCT116 เมื่อได้รับสาร PMCTi ร่วมกับ CTPI และ (D) การอยู่รอดของเซลล์ HT29 เมื่อได้รับสาร PMCTi ร่วมกับ CTPI เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay และแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบกับ 100% ของกลุ่มควบคุมที่ได้รับ 0.2% DMSO การวิเคราะห์ทางสถิติแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM โดยใช้ข้อมูล 3 ซ้ำ * หมายถึง ผลการทดลองแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

PMCTi ร่วมกับ CTPI เหนียวน้ำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ HCT116

การศึกษาผลของสาร PMCTi ร่วมกับ CTPI ในการเหนียวน้ำให้เกิดการตายแบบ apoptosis โดยใช้เทคนิค flow cytometry ผลการทดลองแสดงให้เห็นในภาพที่ 2A การรวมกันของสาร PMCTi และ CTPI ที่ความเข้มข้น 0.75 mM สามารถลดการอยู่รอดของเซลล์ HCT116 ได้ 72.70% และเพิ่มการตายแบบ apoptosis (รวมระยะแรกและระยะสุดท้าย) ได้ 24.65% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการอยู่รอดของเซลล์ 89.04% และเกิดการตายแบบ apoptosis เพียง 9.99% โดยผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดสอบความเป็นพิษของสารยับยั้งต่อเซลล์ HCT116 ที่ได้ศึกษาก่อนหน้า แตกต่างจากผลการศึกษาในเซลล์ HT29 ที่พบว่า PMCTi 1.0 mM ร่วมกับ CTPI 0.5 mM ไม่สามารถเหนียวน้ำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 2B) กลไกในการเหนียวน้ำให้เกิดการตายแบบ apoptosis จากการรวมกันของสาร PMCTi และ CTPI ในเซลล์ HCT116 จึงถูกตรวจสอบในการศึกษาต่อไป



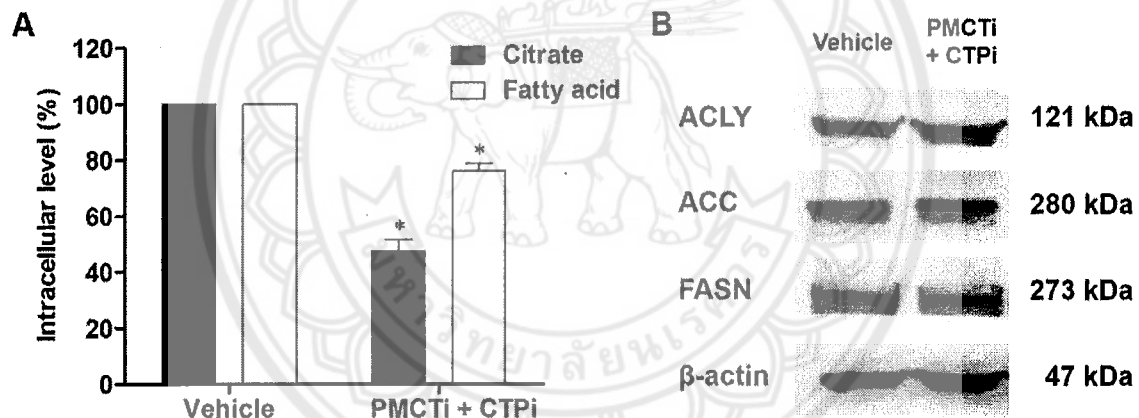
ภาพที่ 2 ผลของ PMCTi ร่วมกับ CTPI ต่อการเกิด apoptosis ในเซลล์ HCT116 (A) และ HT29 (B)



เซลล์ HCT116 จะได้รับสาร PMCTi และ CTPI ร่วมกันที่ความเข้มข้น 0.75 mM, เซลล์ HT29 จะได้รับ PMCTi 1.0 mM ร่วมกับ CTPI 0.5 mM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มควบคุมจะได้รับ 0.2% DMSO (A-B) แสดงผลการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ HCT116 และ HT29 ตามลำดับ การวิเคราะห์ทางสถิติแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM โดยใช้ข้อมูลอย่างน้อย 3 ซ้ำ * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

PMCTi ร่วมกับ CTPI ลดระดับ citrate และกรดไขมันแต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ lipogenic proteins ในขบวนการ DNL ในเซลล์ HCT116

หลังจากที่เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ได้รับสาร PMCTi 0.75 mM ร่วมกับ CTPI 0.75 mM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาผลการร่วมกันของ PMCTi และ CTPI ต่อระดับของ citrate และกรดไขมันในขบวนการ DNL โดยใช้ assay kits ดังแสดงในภาพที่ 3A ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับของ citrate และกรดไขมันลดลงถึง 47.62% และ 76.21% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ 100% ของกลุ่มควบคุม ต่อมาจึงทำการศึกษาการแสดงออกของ lipogenic proteins ที่สำคัญในขบวนการ DNL ได้แก่ ACLY, ACC และ FASN ด้วยเทคนิค immunoblotting assay ดังแสดงในภาพที่ 3B จากผลการทดลองพบว่าสารให้สาร PMCTi ร่วมกับ CTPI ไม่มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ ACLY, ACC, และ FASN เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในเซลล์ HCT116 จึงสรุปได้ว่าการร่วมกันของ PMCTi และ CTPI มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ผ่านการลดระดับ citrate และกรดไขมันในขบวนการ DNL



ภาพที่ 3 ผลของ PMCTi ร่วมกับ CTPI ต่อระดับของ citrate, กรดไขมัน, และการแสดงออกของ lipogenic proteins ในขบวนการ DNL ในเซลล์ HCT116

เซลล์ HCT116 จะได้รับสาร PMCTi และ CTPI ร่วมกันที่ความเข้มข้น 0.75 mM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มควบคุมจะได้รับ 0.2% DMSO (A) ระดับของ citrate และระดับของกรดไขมันภายในเซลล์ (B) การแสดงออกของ lipogenic proteins โดยมี β -actin เป็น internal control การวิเคราะห์ทางสถิติแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM โดยใช้ข้อมูลอย่างน้อย 3 ซ้ำ * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

วิจารณ์ผลการวิจัย

การสังเคราะห์กรดไขมันจากขบวนการ DNL เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Mashima et al., 2009) การยับยั้งการขนส่ง citrate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของขบวนการ DNL ผ่านการ



ยับยั้งการแสดงออกของ PMCT สามารถลดการเจริญเติบโตของเนื้องอกที่พบในเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (Z. Li et al., 2017) ในทำนองเดียวกัน การยับยั้งการแสดงออกของ CTP ช่วยลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอด (HT1299) ชนิดที่เซลล์มีขนาดไม่เล็ก (non-small lung cancer) ได้ (Catalina-Rodriguez et al., 2012) ดังนั้นจึงคาดว่า การยับยั้ง PMCT และ CTP ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116 และ HT29) การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การยับยั้งขบวนการ DNL ที่มีการแสดงออกมากในเซลล์มะเร็งส่งผลให้เกิดการตายแบบ apoptosis เฉพาะในเซลล์มะเร็งโดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษในเซลล์ปกติซึ่งใช้พลังงานจากกระบวนการ OXPHOS เป็นหลัก และมีการแสดงออกของขบวนการ DNL น้อยมาก (Resendis-Antonio, Checca, & Encarnación, 2010) ดังนั้นการวิจัยในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นไปที่การรักษามะเร็งที่มีประสิทธิภาพและมีผลข้างเคียงน้อยลง การยับยั้งขบวนการ DNL ผ่านการยับยั้งโปรตีนขนส่ง citrate จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการรักษามะเร็ง

ในการศึกษาดังนี้พบว่า PMCTi ร่วมกับ CTPI สามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์ HCT116 และ HT29 ได้ โดยการรวมกันของความเข้มข้นต่ำสุดของสารยับยั้งแต่ละสารมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งซึ่งมีศักยภาพมากกว่าการให้สารยับยั้งเพียงสารเดียว เมื่อศึกษาการตายแบบ apoptosis โดยอาศัยการพลิกกลับของ phosphatidyl serine ในการเกิด apoptosis ระยะเริ่มต้นและระยะสุดท้าย (Farooqui, Khan, Khan, & Ansari, 2018) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในเวลา 24 ชั่วโมง PMCTi ร่วมกับ CTPI สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ HCT116 ได้ แต่เป็นที่น่าประหลาดใจที่ไม่พบการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ HT29 หลังจากการยับยั้ง citrate transporter เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ยืนยันถึงผลของสารยับยั้งที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการขนส่ง citrate ในเซลล์ HT29 โดยคาดว่าอาจเกิดการตายแบบ autophagy ก่อนเกิดการตายแบบ apoptosis ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า alisertib ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ Aurora kinase A ทำให้เซลล์มะเร็งตับ Hep3B เกิด autophagy ภายใน 24 ชั่วโมง ในขณะที่กระบวนการเกิด apoptosis เกิดขึ้นภายใน 36 ชั่วโมงหลังจากได้รับสารยับยั้ง (Zhu et al., 2017) อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาผลของสารยับยั้ง citrate transporter ต่อการเกิดการตายแบบ autophagy ในเซลล์ HT29 เพิ่มเติมต่อไป

การยับยั้งการสร้างกรดไขมันเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานพบว่า lipogenic proteins ในขบวนการ DNL ได้แก่ ACLY, ACC และ FASN มีบทบาทสำคัญในมะเร็งหลายชนิด การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การยับยั้งการแสดงออกของ ACC ทำให้ลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (Brusselmans, De Schrijver, Verhoeven, & Swinnen, 2005) และการยับยั้งการแสดงออกของ FASN เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (Thupari, Pinn, & Kuhajda, 2001) จึงนำไปสู่การศึกษาผลของ PMCTi ร่วมกับ CTPI ต่อขบวนการ DNL ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การรวมกันของ PMCTi และ CTPI ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ lipogenic proteins แต่อย่างไรก็ตาม การยับยั้งการขนส่ง citrate ผ่าน PMCT และ CTP สามารถลดระดับของ citrate และกรดไขมันในขบวนการ DNL ในเซลล์ HCT116 ได้ ซึ่งการสังเคราะห์กรดไขมันลดลงนั้นส่งผลให้ระดับของ ceramide เพิ่มขึ้นซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานของ BNIP3 (Bandyopadhyay et al., 2006) และยับยั้งการทำงานของ Bcl-2 กระตุ้น Bak และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ขึ้น (S. Li et al., 2016) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า การยับยั้งการทำงานของขบวนการ DNL มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการสร้าง reactive oxygen species (ROS) (Cui et al., 2017; Migita et al., 2014) รวมถึงการสะสมของ citrate ภายใน mitochondria ทำให้การทำงานของ complex II หรือ succinate-ubiquinone oxidoreductase ในกระบวนการ electron transport chain ลดลง (Zorov, Juhaszova, & Sollott, 2014) ส่งผลให้ระดับ ROS เพิ่มขึ้นทำให้เกิด apoptosis ได้ผ่านการกระตุ้นการหลั่งของ cytochrome c จาก mitochondrial interspace กระตุ้น caspase-9 และ



caspase-3 (Kang et al., 2010) จากผลการทดลองทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่าการยับยั้งขบวนการ DNL โดยสาร PMCTi ร่วมกับสาร CTPI ทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าสาร PMCTi และ CTPI มีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยยับยั้งการทำงานของขบวนการ DNL อย่างจำเพาะผ่านการยับยั้งการขนส่ง citrate และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ได้ นอกจากนี้ผลการวิจัยยังแสดงให้เห็นว่าการรวมกันของ PMCTi และ CTPI ทั้งสองสารในความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่มีศักยภาพมากกว่าการได้รับสารยับยั้งเพียงตัวเดียวซึ่งอาจนำไปสู่การรักษามะเร็งที่ปลอดภัยในขนาด

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษานี้ต้องขอขอบคุณ นางสาวปัทมาพร พูลสมบุญรณ์ ผู้ช่วยวิจัยของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะรัตน์ ศรีสว่าง ที่ได้ให้ความรู้ต่าง ๆ รวมถึงแนวทางในการทำวิจัยแก่ข้าพเจ้าเสมอมา และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษาและให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือในงานวิจัย กระทั่งงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- 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), 5934–5940. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-3197
- 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), 689–698. doi: 10.1007/s10555-012-9384-6
- Brachs, S., Winkel, A. F., Tang, H., Birkenfeld, A. L., Brunner, B., Jahn-Hofmann, K., . . . Spranger, J. (2016). Inhibition of citrate cotransporter Slc13a5/mINDY by RNAi improves hepatic insulin sensitivity and prevents diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Molecular Metabolism*, 5(11), 1072–1082. doi: 10.1016/j.molmet.2016.08.004
- Brusselmans, K., De Schrijver, E., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2005). RNA Interference-Mediated Silencing of the *Acetyl-CoA-Carboxylase- α* Gene Induces Growth Inhibition and Apoptosis of Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 65(15), 6719–6725. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-0571
- 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), 1220–1235.



- Cui, Y., Xing, P., Wang, Y., Liu, M., Qiu, L., Ying, G., & Li, B. (2017). NADPH accumulation is responsible for apoptosis in breast cancer cells induced by fatty acid synthase inhibition. *Oncotarget*, *8*(20), 32576–32585. doi: 10.18632/oncotarget.15936
- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C., & Farese, R. V. (2013). Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell metabolism*, *18*(2), 153–161. doi: 10.1016/j.cmet.2013.05.017
- Farooqui, A., Khan, F., Khan, I., & Ansari, I. A. (2018). Glycyrrhizin induces reactive oxygen species–dependent apoptosis and cell cycle arrest at G0/G1 in HPV18+ human cervical cancer HeLa cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *97*, 752–764. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.147>
- Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D. E., Andreadis, C., Shaw, A. N., Dhanak, D., . . . Thompson, C. B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*, *8*(4), 311–321. doi: 10.1016/j.ccr.2005.09.008
- Kang, N., Zhang, J.–H., Qiu, F., Tashiro, S.–i., Onodera, S., & Ikejima, T. (2010). Inhibition of EGFR signaling augments oridonin–induced apoptosis in human laryngeal cancer cells via enhancing oxidative stress coincident with activation of both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Cancer Letters*, *294*(2), 147–158. doi: 10.1016/j.canlet.2010.01.032
- Kolukula, V. K., Sahu, G., Wellstein, A., Rodriguez, O. C., Preet, A., Iacobazzi, V., . . . Avantaggiati, M. L. (2014). SLC25A1, or CIC, is a novel transcriptional target of mutant p53 and a negative tumor prognostic marker. *Oncotarget*, *5*(5), 1212–1225.
- Li, L., Li, H., Garzel, B., Yang, H., Sueyoshi, T., Li, Q., . . . Wang, H. (2015). SLC13A5 Is a Novel Transcriptional Target of the Pregnane X Receptor and Sensitizes Drug–Induced Steatosis in Human Liver. *Molecular Pharmacology*, *87*(4), 674–682. doi: 10.1124/mol.114.097287
- Li, S., Xia, Y., Chen, K., Li, J., Liu, T., Wang, F., . . . Guo, C. (2016). Epigallocatechin–3–gallate attenuates apoptosis and autophagy in concanavalin A–induced hepatitis by inhibiting BNIP3. *Drug Design, Development and Therapy*, *10*, 631–647. doi: 10.2147/DDDT.S99420
- 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), 13890–13901. doi: 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), 1369–1372. doi: 10.1038/sj.bjc.6605007
- 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), 37–47. doi: doi:10.1002/ijc.28652
- Nicot, C., Napal, L., Relat, J., González, S., Llebarria, A., Woldegiorgis, G., . . . Haro, D. (2004). C75 activates malonyl–CoA sensitive and insensitive components of the CPT system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *325*(3), 660–664. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.085>



- Resendis-Antonio, O., Checa, A., & Encarnación, S. (2010). Modeling Core Metabolism in Cancer Cells: Surveying the Topology Underlying the Warburg Effect. *PLOS ONE*, 5(8), e12383. doi: 10.1371/journal.pone.0012383
- Rogers, R. P., & Rogina, B. (2015). The role of INDY in metabolism, health and longevity. *Frontiers in Genetics*, 6, 204. doi: 10.3389/fgene.2015.00204
- Sun, J., Aluvila, S., Kotaria, R., Mayor, J. A., Walters, D. E., & Kaplan, R. S. (2010). Mitochondrial and Plasma Membrane Citrate Transporters: Discovery of Selective Inhibitors and Application to Structure/Function Analysis. *Molecular and cellular pharmacology*, 2(3), 101-110.
- Sun, R. C., & Denko, N. C. (2014). Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth. *Cell metabolism*, 19(2), 285-292. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.022
- Thupari, J. N., Pinn, M. L., & Kuhajda, F. P. (2001). Fatty Acid Synthase Inhibition in Human Breast Cancer Cells Leads to Malonyl-CoA-Induced Inhibition of Fatty Acid Oxidation and Cytotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(2), 217-223. doi: https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5146
- Van de Sande, T., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2002). Role of the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/PTEN/Akt Kinase Pathway in the Overexpression of Fatty Acid Synthase in LNCaP Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 62(3), 642-646.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029-1033. doi: 10.1126/science.1160809
- Zhao, W., Kridel, S., Thorburn, A., Kooshki, M., Little, J., Hebbar, S., & Robbins, M. (2006). Fatty acid synthase: a novel target for antiglioma therapy. *British Journal of Cancer*, 95(7), 869-878. doi: 10.1038/sj.bjc.6603350
- Zhu, Q., Luo, M., Zhou, C., Zhou, Z., He, Z., Yu, X., & Zhou, S. (2017). A proteomics-based investigation on the anticancer activity of alisertib, an Aurora kinase A inhibitor, in hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *American Journal of Translational Research*, 9(8), 3558-3572.
-
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, 94(3), 909-950. doi: 10.1152/physrev.00026.2013