

Abstract

Breast cancer is found to be the number one cancer observed in women worldwide. Despite good impact obtained from current breast cancer therapies, many concerns and downsides such as serious side effects and developing of drug resistance still remain. Therefore, the search for novel chemotherapeutic compounds is necessitating. Medicinal plants are an importance source for novel drug development. *Andrographis paniculata* (Burm) NEES, commonly known in Thai as Fa Tha Lai Jon, is a well-known traditional medicine in several countries including Thailand. This herbal has been used for treatment of common cold, fever, and non-infectious diarrhea. It has been reported that andrographolide (AP1) the major active compounds isolated from this plant inhibit growth of several cancer cell lines. Here, we investigated the anticancer mechanisms of AP1 and the other two diterpene compounds from *A. paniculata*: 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (AP3) and neoandrographolide (AP4). Estrogen-independent MDA-MB-231 and estrogen-dependent T47D human breast cancer cells were used for study the anticancer of either individual AP compound or in combination. All AP treatments induced growth suppression with the order of potency of combination > AP1 > AP3 > AP4. MDA-MB-231 cells exhibit higher sensitivity to growth inhibitory effect of AP compounds than T47D cells. Our results showed that AP compounds induced cell cycle arrest via down-regulation of cyclin D1, cyclin E, cyclin A, and cdk2 and by up-regulation of p21 and p27. AP compounds also induced cell death by apoptosis that was associated with increase of pro-apoptotic Bax and Bad, decrease of anti-apoptotic Bcl-xL protein levels, release of cytochrome C from mitochondria to cytosol. These results indicted that apoptosis induced by AP compounds is via mitochondria-mediated pathway. Moreover, proteolysis of DNA repair enzyme PARP was observed after combination, AP1, and AP4 treatments which suggested that caspase-3 or caspase-6 may participate in apoptosis induced by AP compounds.

In addition to cell cycle and apoptosis, growth of cancer cells can be controlled by MAPK signaling system. Our results showed that growth of both breast cancer cell lines used in this study is in part under controlled of this signaling system. Growth inhibitory effect of AP1 can be intensified by inhibitors of MEK. Additionally, the three AP compounds induced activation of p38MAPK as evidenced by increase in levels of an active phosphorylated p38MAPK protein which can lead to induction of apoptosis. Taken together, our study showed that AP compounds inhibit growth of breast cancer cells by mechanisms via cell cycle arrest, and induction of apoptosis. Although, the mechanisms involved appear to be similar, the most significant effects occurred with AP1. However, greater effects can be achieved after combination treatment. In conclusion, compound from *A. paniculata* especially AP1 and combination of AP1+AP3+AP4 have potential to be used for breast cancer therapy.

บทคัดย่อ

จากสถิติทั่วโลกมะเร็งเต้านมเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของผู้ป่วยมะเร็งเพศหญิง แม้ว่าในปัจจุบันจะมียาหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพการรักษาบำบัดมะเร็งเต้านม แต่ความต้องการยาชนิดใหม่ยังคงมีอยู่เนื่องจากปัญหาของอาการแทรกซ้อนและการดื้อยา สมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารเคมีหลากหลายชนิดที่อาจมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่าง ๆ รวมถึงโรคมะเร็ง ประเทศไทยมีทรัพยากรสมุนไพรอยู่มากมาย จึงควรจะได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาทรัพยากรดังกล่าวให้เป็นประโยชน์สูงสุด ฟาโทะลายโจรเป็นสมุนไพรไทยที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการลดไข้ มีรายงานวสารสกัด andrographolide (AP1) จากสมุนไพรดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งเต้านม แต่ทั้งนี้ยังไม่มีการวิจัยถึงกลไกในการต้านมะเร็งของ AP1 งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษากลไกระดับโมเลกุลในการต้านมะเร็งเต้านมของสาร AP1 และสารในกลุ่ม diterpene อีกสองชนิดคือ 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (AP3), และ neoandrographolide (AP4) งานวิจัยครอบคลุมการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้งสารเดี่ยวและสารผสม โดยศึกษาในมะเร็งเต้านมชนิดที่การเจริญไม่ขึ้นกับฮอร์โมนเอสโตรเจนคือเซลล์ MDA-MB-231 และชนิดที่การเจริญขึ้นกับฮอร์โมนคือเซลล์ T47D ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดจากฟาโทะลายโจรทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมทั้งสองชนิดได้ โดยมีลำดับความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งแตกต่างกันคือ สารผสม>AP1>AP3>AP4 โดยเซลล์ชนิดMDA-MB-231ตอบสนองต่อฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดีกว่าเซลล์ชนิดT47D สารสกัดที่ทดสอบมีกลไกต้านมะเร็งโดยยับยั้งวงจรชีวิตของเซลล์จากระยะ G1ไปยังระยะ S โดยมีกลไกผ่านการลดปริมาณโปรตีน cyclin D1, cyclin E, cyclin A และ ลดปริมาณเอนไซม์ cdk2 แต่กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน p21 และ p27 นอกจากนี้ผลการทดลองโดยวิธีย้อมเซลล์ด้วย annexin V-FITC แล้วตรวจสอบโดยเทคนิค Flow cytometry พบว่าสารสกัดทั้งสามกระตุ้นให้เกิดเซลล์ตายแบบอะพอโทซิส โดยมีกลไกผ่านการเพิ่มปริมาณโปรตีนกลุ่มที่กระตุ้นการเกิดอะพอโทซิสคือ Bax และ Bad และลดปริมาณโปรตีนที่ต้านอะพอโทซิสคือ Bcl-xL โดยไม่มีผลต่อโปรตีนชนิด Bcl-2 นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดที่ทำการทดสอบกระตุ้นให้มีการหลุดออกของcytochrome C จากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ cytosol ซึ่งกลไกดังกล่าวแสดงว่าอะพอโทซิสที่ถูกกระตุ้นโดยสารสกัดAPเป็นชนิดที่ผ่านทางไมโทคอนเดรีย การศึกษาายังพบว่าสารสกัดAP และ AP3 มีผลต่อโปรตีน PARP ซึ่งมีบทบาทในการซ่อมแซม DNA โดยสาร AP กระตุ้นการย่อย PARP ทำให้ PARP หมดประสิทธิภาพ โดยผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าสาร AP1 และ AP3 น่าจะกระตุ้นการทำงานของ capase-3 หรือ caspase-7 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อย PARP

อนึ่งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งนอกจากจะถูกควบคุมผ่านวงจรชีวิตของเซลล์และการตายแบบอะพอโทซิสแล้ว ผลการวิจัยพบว่าระบบสัญญาณ MAPK มีบทบาทควบคุมการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิดเช่นกันโดยตัวยับยั้งของMEKสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าตัวยับยั้งของMEKสามารถเสริมฤทธิ์ของ AP1 ได้แสดงว่าAP1อาจมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านทางระบบMAPK ผลการทดลองพบว่าสาร AP ทั้งสามกระตุ้นการเกิด phosphorylation ของโปรตีน p38MAPK ซึ่งมีบทบาทในการกระตุ้นอะพอโทซิส จากผลการวิจัยสรุปได้ว่าสารสกัดจากฟาโทะลายโจรโดยเฉพาะ สาร AP1 และสารผสมของ AP1+AP3+AP4 มีศักยภาพที่จะนำมาศึกษาวิจัยต่อไปในระดับสัตว์ทดลองและคลินิกเพื่อพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งเต้านมต่อไป