



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กลไกระดับโมเลกุลของสารสกัดบริสุทธิ์จากฟ้าทะลายโจร
เพื่อการรักษามะเร็ง

**Cancer Therapeutic Molecular Mechanisms of Pure
Compounds Isolated from *Andrographis paniculata***

โดย

ดร. อภิญา เทียนธนะวัฒน์ และคณะ

มิถุนายน พ.ศ. 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กลไกระดับโมเลกุลของสารสกัดบริสุทธิ์จากฟ้าทะลายโจร
เพื่อการรักษามะเร็ง

Cancer Therapeutic Molecular Mechanisms of Pure
Compounds Isolated from *Andrographis paniculata*

คณะผู้วิจัย

1. ดร. อภิญา เทียนธนะวัฒน์
2. รศ. ดร.จุฑามาศ สัตยวิวัฒน์

สังกัด

สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

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 แต่ความต้องการยารชนิดใหม่ยังคงมีอยู่เนื่องจากปัญหาของอาการแทรกซ้อนและการดื้อยา สมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารเคมีหลากหลายชนิดที่อาจมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่างๆรวมถึงโรคมะเร็ง ประเทศไทยมีทรัพยากรสมุนไพรอยู่มากมาย จึงควรจะได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาทรัพยากรดังกล่าวให้เป็นประโยชน์สูงสุด ฟัทะลายโจรเป็นสมุนไพรไทยที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการลดไข้ มีรายงานวสารสกัด andrographolide (AP1) จากสมุนไพรดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งเต้านม แต่ทั้งนี้ยังไม่มีการวิจัยถึงกลไกในการต้านมะเร็งของ AP1 งานวิจัยนี้จึงการศึกษากลไกระดับโมเลกุลในการต้านมะเร็งเต้านมของสาร AP1 และสารในกลุ่ม diterpene อีกสองชนิดคือ 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (AP3), และ neoandrographolide (AP4) งานวิจัยครอบคลุมการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้งสารเดี่ยวและสารผสม โดยศึกษาในมะเร็งเต้านมชนิดที่การเจริญไม่ขึ้นกับฮอร์โมนเอสโตรเจนคือเซลล์ MDA-MB-231 และชนิดที่การเจริญขึ้นกับฮอร์โมนคือเซลล์ T47D ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดจากฟัทะลายโจรทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมทั้งสองชนิดได้ โดยมีลำดับความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งแตกต่างกันคือ สารผสม>AP1>AP3>AP4 โดยเซลล์ MDA-MB-231ตอบสนองต่อฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดีกว่าเซลล์ชนิด T47D 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 การศึกษายังพบว่าสารสกัดAP และ AP3 มีผลต่อโปรตีน PARP ซึ่งมีบทบาทในการซ่อมแซม DNA โดยสาร AP กระตุ้นการย่อย PARP ทำให้ PARP หมดประสิทธิภาพ โดยผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าสาร AP1 และ AP3 น่าจะกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 หรือ caspase-7 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อย PARP

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

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) กลไกระดับโมเลกุลของสารสกัดบริสุทธิ์จากฟ้าทะลายโจรเพื่อการรักษามะเร็ง
(ภาษาอังกฤษ) Cancer Therapeutic Molecular Mechanisms of Pure Compounds
Isolated from *Andrographis paniculata*

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. อภิญา เทียนธนะวัฒน์ Dr. Apinya Thiantanawat

สถานที่ทำงาน ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยา สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

54 หมู่ 4 ถนนวิภาวดีรังสิต

หลักสี่ กรุงเทพฯ 10210

โทรศัพท์ 0-2574-0622 ถึง -33 ต่อ 3403

โทรสาร 0-2574-2027

e-mail apinya@cri.or.th

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันมะเร็งเป็นสาเหตุโรคอันดับหนึ่งของการตายของประชากรโลกและประชากรชาวไทย โดยแต่ละปีประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่ถึงปีละกว่าหนึ่งแสนคน และมีผู้เสียชีวิตจำนวนกว่า 45,000 ราย แม้ว่าในปัจจุบันจะมียาต้านมะเร็งหลายกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการรักษาหรือยับยั้งการกระจายของเซลล์มะเร็งแต่ยารักษามะเร็งเหล่านั้นมักก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงปรารถนาและที่สำคัญ เซลล์มะเร็งมักจะดื้อต่อยาเมื่อใช้ในเวลาติดต่อกัน สืบเนื่องจากเหตุผลเหล่านี้ ความพยายามในการหายาต้านมะเร็งชนิดใหม่ๆจึงมีอยู่อย่างต่อเนื่อง สมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารที่มีศักยภาพเป็นยารักษาโรคต่างๆรวมถึงโรคมะเร็ง ประเทศไทยได้เปรียบหลายประเทศเพราะเรามีสมุนไพรอยู่มากมายหลายชนิด ถึงแม้ว่าจะมีสมุนไพรไทยหลายตัวที่มีการบันทึกในตำหรับแพทย์แผนไทยว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งแต่การวิจัยศึกษาเพื่อยืนยันผลทางวิทยาศาสตร์และทางคลินิกยังมีไม่เพียงพอ

ในแต่ละปีประเทศไทยต้องเสียเงินสำหรับยารักษามะเร็งจากต่างประเทศเป็นจำนวนมหาศาล การส่งเสริมการศึกษาวิจัยทางเภสัชวิทยาในแง่กลไกของสารสกัดบริสุทธิ์ที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ งานวิจัยเพื่อให้ทราบถึงกลไกระดับโมเลกุลในการต้านมะเร็งของสารสกัดมีความสำคัญและจำเป็นต่อการศึกษาวิจัยต่อเนื่องในการพัฒนาเป็นยา และ การศึกษาต่อในระดับคลินิก เนื่องจากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นโครงการวิจัยที่ดำเนินการในครั้งนี้นำมาซึ่งการศึกษากลไกระดับโมเลกุลของสารสกัดบริสุทธิ์ในกลุ่ม diterpenoid สามชนิดคือ andrographolide (AP1), 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide (AP3), และ neoandrographolide (AP4) จากใบของต้นฟ้าทะลายโจรต่อการต้านมะเร็งเต้านม โครงการวิจัยนี้เน้นศึกษาในมะเร็งเต้านมเนื่องจาก ตามรายงาน

ของ World Health Organization แสดงว่ามะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับหนึ่งในผู้หญิงที่ป่วยเป็นมะเร็งทั่วโรคและจัดเป็นอันดับสองของมะเร็งในผู้หญิงในประเทศไทย

มะเร็งเต้านมต่างจากมะเร็งชนิดอื่นโดยส่วนมาก กล่าวคือเซลล์มะเร็งมีทั้งชนิดที่ตอบสนองต่อฮอร์โมน (hormone-dependent) และชนิดที่ไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมน (hormone-independent) ซึ่งทำให้การตอบสนองต่อยาที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านมทั้งสองชนิดนี้แตกต่างกัน นอกจากนี้การดื้อยาของมะเร็งเต้านมยังเป็นปัญหาที่สำคัญ

แม้ว่าจะมีรายงานวิจัยถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรมาก่อนหน้านี้ แต่งานวิจัยส่วนใหญ่ทำการศึกษาเน้นเฉพาะในสาร AP1 และโดยมากเป็นการศึกษาความเป็นพิษในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ โดยมีได้ศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุล ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงทำการศึกษาถึงกลไกต้านมะเร็งเต้านมของสารสกัดบริสุทธิ์ทั้งสามชนิดทั้งสารเดี่ยวและสารผสม โดยได้ศึกษาได้ครอบคลุมในระบบที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการตายของเซลล์คือ ระบบวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle machinery) ระบบการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส (apoptotic cell death) และระบบสัญญาณ MAPK (MAPK signaling pathway) ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงกลไกในระดับโมเลกุลของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรในการต้านมะเร็งเต้านม ซึ่งเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยต่อเนื่องในการพัฒนาเป็นยาและการศึกษาในระดับคลินิกต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาในมะเร็งชนิดอื่นๆ ได้อีก

2. วัตถุประสงค์

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาให้ทราบถึงกลไกระดับโมเลกุลในการต้านมะเร็งของสารสกัดบริสุทธิ์ diterpenoid สามชนิดจากใบของพืชสมุนไพรฟ้าทะลายโจร คือ andrographolide (AP1), 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (AP3), และ neoandrographolide (AP4) โดยมีเป้าหมายที่จะให้ข้อมูลความรู้ที่ได้จากการวิจัยนี้เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรเพื่อใช้เป็นยาด้านมะเร็งต่อไป โครงการวิจัยนี้ทำการศึกษาโดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ทั้งชนิด hormone-dependent และ hormone-independent เพื่อให้ทราบว่าฤทธิ์และกลไกต้านมะเร็งจากสารสกัดที่ทำการทดสอบมีความเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร ทั้งนี้การวิจัยกลไกต้านมะเร็งได้ครอบคลุมในสามระบบที่มีความสำคัญต่อการควบคุมการเจริญเติบโตและการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง โดยทำการศึกษาวิจัยเพื่อให้บรรลุตามจุดมุ่งหมาย ดังนี้

- 1) เพื่อให้ทราบถึงผลของสารสกัดบริสุทธิ์ทั้งสามชนิดต่อระบบควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์
- 2) เพื่อตรวจสอบบทบาทของขบวนการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิสต่อฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดบริสุทธิ์ทั้งสามชนิด รวมทั้งศึกษาขั้นตอนการส่งสัญญาณที่ทำให้เกิดการตายแบบอะพอโทซิส
- 3) เพื่อให้ทราบถึงความเกี่ยวข้องของระบบการส่งสัญญาณ Mitogen-activated protein kinase (MAPK signaling pathway) ต่อฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดบริสุทธิ์ diterpenoid ทั้งสามชนิด

3. ผลการวิจัยโดยสรุป

1. สารสกัดบริสุทธิ์ AP1, AP3, และ AP4 มีฤทธิ์ยับยั้งและลดการเจริญเติบโตในหลอดทดลองของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งชนิด MDA-MB-231 (hormone-independent) และชนิด T47D (hormone-dependent) โดยมีระดับความแรงในการต้านมะเร็งต่างกันคือ $AP1 > AP3 > AP4$

2. การใช้สารร่วมกันมากกว่าหนึ่งชนิดสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ โดยการให้สารร่วม AP1+AP3+AP4 ให้ผลสูงสุด

3. เซลล์มะเร็งชนิด MDA-MB-231 มีการตอบสนองต่อสารสกัด AP ดีกว่าเซลล์ชนิด T47D

4. สาร AP ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ทำการทดสอบโดยรบกวนระบบวงจรชีวิตของเซลล์โดยมีกลไกผ่านทางลดโปรตีนในกลุ่ม cyclins คือ cyclin D1, cyclin A, และ cyclin E และ ลดปริมาณโปรตีน cdk2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการทำงานของ cyclin โปรตีนเหล่านี้เป็นที่ยอมรับกันว่ามีความสำคัญในการกระตุ้นการเคลื่อนของเซลล์จากระยะพักที่ 1 (Gap1 หรือ G1) ไประยะการสร้างดีเอ็นเอ (Synthesis หรือ S) ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ ทั้งนี้การลดลงของโปรตีนดังกล่าวข้างต้นน่าจะเป็นเหตุผลและกลไกของสาร AP ในการต้านการเจริญของเซลล์ โดยยับยั้งการเคลื่อนเข้าสู่ระยะ S ในวงจรชีวิตของเซลล์

5. สาร AP กระตุ้นการเพิ่มปริมาณของโปรตีน p21 และ p27 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cdk2

6. การตรวจสอบโดยใช้ flow cytometer โดยวิธี annexin V พบว่าสาร AP กระตุ้นการตายแบบอะพอโทซิส โดยมีระดับความแรงในการกระตุ้นการตายของเซลล์ คือ combination > AP1 > AP3 > AP4 ในเซลล์มะเร็งที่ทำการทดสอบทั้งสองชนิด

6. สาร AP กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม Bcl-2 ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบการตายแบบอะพอโทซิส โดยเพิ่มปริมาณของโปรตีนที่กระตุ้นอะพอโทซิส ได้แก่ Bax และ Bad และลดปริมาณของโปรตีนชนิดที่ต่อต้านอะพอโทซิส ได้แก่ Bcl-xL

7. สาร AP กระตุ้นให้มีการหลั่งของสาร cytochrome c ออกจาก mitochondria และทำลายประสิทธิภาพของเอนไซม์ PARP ที่มีความสำคัญในกระบวนการซ่อมแซมสารพันธุกรรม ซึ่งเป็นกลไกที่ทำให้เซลล์ตายแบบอะพอโทซิส

8. สาร PD98059 และ U0126 ซึ่งเป็น ตัวยับยั้งของ MEK สามารถลดการเจริญของเซลล์ T47D และ MDA-MB-231 ได้ แสดงว่า ระบบสัญญาณ MAPK มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ทั้งสองชนิด

9. สาร PD98059 และ U0126 สามารถเสริมฤทธิ์ของสาร AP ในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดได้

10. การศึกษาผลของสาร AP ต่อระบบ MAPK โดยเน้นที่โปรตีนสองชนิดที่มีความสำคัญคือ p38 MAPK ซึ่งเมื่ออยู่ใน phosphorylated form (pp38) จะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการตายแบบอะพอโทซิส โปรตีนอีกชนิดหนึ่งคือ ERK1/2 ซึ่งจะถูกระตุ้นให้อยู่ใน active form คือ phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) เมื่อมีสัญญาณกระตุ้นการเจริญเติบโต (mitogenic signal) ผลการวิจัยพบว่ากลไกของสาร AP1, AP3, และ AP4 ต่อระบบสัญญาณ MAPK ในเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันบางส่วน แต่มีความแตกต่างกันในบางส่วน กล่าวคือ

- AP1 เพิ่มปริมาณโปรตีน phospho-p38MAPK (pp38MAPK) ซึ่งเป็นactive form ของโปรตีน p38 โดยสามารถกระตุ้นในเซลล์ทั้งสองชนิด โดยรูปแบบการเพิ่มขึ้นของ pp38 เป็นช่วงสั้นๆและกลับสู่ระดับปกติ ทั้งนี้AP1 ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับของ p38 ซึ่งเป็น inactive form ของโปรตีนชนิดนี้
- AP1 ลดปริมาณ phosphoERK1/2 (pERK1/2) โปรตีนในเซลล์ทั้งสองชนิด
- AP3 เพิ่มปริมาณ pp38MAPK และลดปริมาณ pERK1/2 โปรตีนเฉพาะในเซลล์มะเร็งชนิด MDA-MB-231
- AP4 เพิ่มปริมาณ pERK1/2 โปรตีน ในเซลล์ทั้งสองชนิด และเพิ่มปริมาณ pp38MAPK เฉพาะในเซลล์ T47D
- การให้สาร AP1+AP3+AP4 ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการเพิ่มปริมาณของ pp38MAPK โปรตีน และทำให้ระยะเวลาการเพิ่มปริมาณ pp38MAPK อยู่ได้ยาวนานขึ้น
- AP1+AP3+AP4 มีผลเพิ่มปริมาณ pERK1/2 ในเซลล์ MDA-MB-231 แต่ลดปริมาณโปรตีนดังกล่าวในเซลล์ T47D

4. ผลงานที่ได้จากงานวิจัย

เสนอบทคัดย่อและเผยแพร่ผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์

Thiantanawat, A., Watcharasit, P., Ruchirawat, S., Ruchirawat, M., Mahidol, C., and Satayavivad, J. Molecular mechanisms of pure compounds from *Andrographis paniculata* for breast cancer therapy. The Thailand Research Fund Annual Meeting 2006. Oct 12-14, 2006. Petchaburee, Thailand.

จัดเตรียมบทความเพื่อส่งเข้ารับการพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Thiantanawat, A., Watcharasit, P., Ruchirawat, S., Ruchirawat, M., Mahidol, C., Satayavivad, J. Induction of Apoptosis and Alteration of Cell Cycle Regulators in Estrogen-Independent and -Dependent Human Breast Cancer Cells by Three Andrographolide Compounds. (manuscript prepared for submission)

5. ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย

1) เพิ่มความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้สารสกัดบริสุทธิ์จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในการรักษามะเร็งเต้านม จากผลการวิจัยพบว่าสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาด้านมะเร็งเต้านม โดยขณะนี้มียางานจากประเทศอินเดียว่าได้มีการทำวิจัยต่อเนื่องในระดับสัตว์ทดลอง โดยมีการปรับโครงสร้างทางเคมีของสาร AP1 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสาร และจากผลการทดลองในโครงการวิจัยนี้ ซึ่งถึงแม้ว่าจะเป็นการศึกษาในระดับเซลล์ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง แต่เนื่องจากได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดถึงสามตัวคือ AP1, AP3, และ AP4 รวมทั้งฤทธิ์การใช้ร่วมกันของสารสกัดทั้งสามซึ่งพบว่าสารสกัดแต่ละตัวมีศักยภาพด้านมะเร็งแตกต่างกัน และจากการศึกษากลไกในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับทั้งระบบ apoptosis, cell cycle และ MAPK pathway ทำให้เราได้ภาพรวมของกลไกการทำงานของสารสกัดทั้งสารเดี่ยวและสารผสม รวมทั้งการวิจัยได้ทำการเปรียบเทียบในเซลล์มะเร็งสองชนิดซึ่งแม้จะเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมเหมือนกัน แต่มีกลไกการควบคุม

การเจริญของเซลล์แตกต่างกันซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิจัยต่อไปในระดับสัตว์ทดลอง และระดับคลินิกเพื่อพัฒนาสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรเป็นยาต้านมะเร็งต่อไป

2) เผยแพร่ผลงานวิจัยโดยเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการในประเทศและส่งผลงานวิจัยเข้าตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

3) คาดว่าผลงานวิจัยนี้จะได้รับการพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้

รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

สัญญาเลขที่ TRG4880002

โครงการ: กลไกระดับโมเลกุลของสารสกัดบริสุทธิ์จากฟ้าทะลายโจรเพื่อการรักษามะเร็ง

Cancer Therapeutic Mechanisms of Pure Compounds Isolated from

Andrographis paniculata

Background and Significance

Cancer is a leading cause of death that claims the lives of more than six million people globally each year, of which 100,000 new cases is reported in Thailand each year. Among all types of cancer, breast cancer is found to be the number one cancer observed in women worldwide and is the second most common cause of cancer death among Thai women. Despite good impact obtained from current breast cancer therapies, many concerns and downsides still remained. For example, an increase in the incidence of endometrium carcinoma in long-term tamoxifen treated patients due to the partial antagonistic effect of drug (Fornander et.al 1993). Moreover, resistance was found to develop after standard treatments. Therefore, the search for novel chemotherapeutic compounds is still a need. Medicinal plants are an importance source for novel drug development. The use of pure compounds or extracts from plants as substitution or combination with modern medicine might improve the efficacy and/or decrease the side effects of conventional compounds.

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. Twenty-three compounds in the group of diterpenes, flavanoids, and steroids have been isolated and characterized from the whole plant, of which diterpene lactones are the major components (Siripong et al., 1992; Rao et al., 2004). Collective evidences reveal that the extracts possess a variety of beneficial activities such as anti-inflammatory (Shen et al., 2002), antiviral (Calabrese et al., 2000), antithrombotic (Shao and Fang, 1991), immunostimulatory (Kumar et al., 2004), hypoglycaemic (Zhang and Tan, 2000), hypotensive (Zhang and Tan, 1996), and anticancer (Matsuda et al., 1994; Kumar et al., 2004). Most therapeutic activities of this plant are attributed to andrographolide (AP1) and its related diterpene compounds such as 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (AP3), and neoandrographolide (AP4) (Fig 1). AP1 has board antiproliferative effect on a panel of human cancer cell lines (Siripong et al., 1992; Kumar et al., 2004; Satyanarayana et al., 2004) and this compound inhibit growth of MCF-7

breast cancer cells by causing cell cycle arrest at G0/G1 phase (Rajagopal et.al., 2003). There was no report for anticancer mechanism of AP3 and AP4.

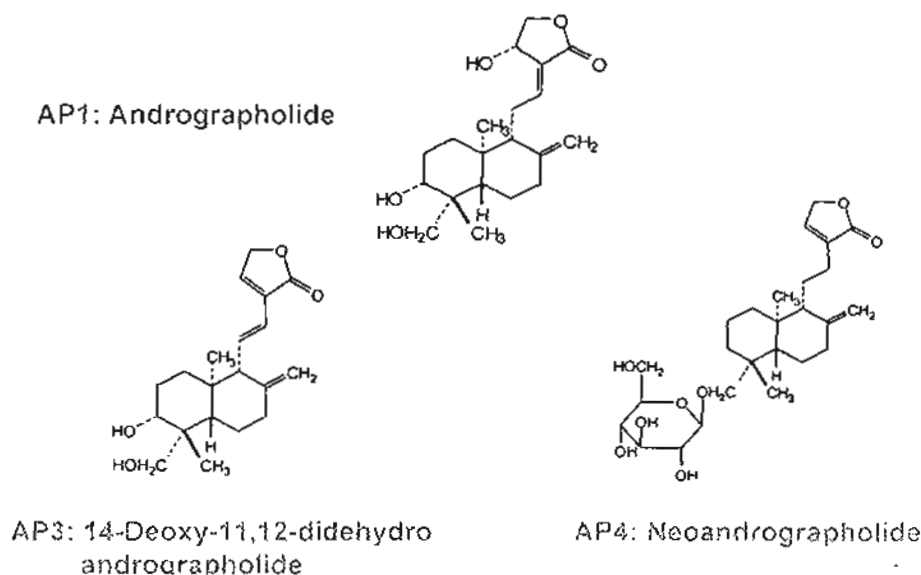


Figure 1 The three active diterpenoids from *Andrographis paniculata*

Tissue homeostasis is controlled by balance between cell growth and cell death. Cell cycle machinery consists of regulatory proteins which play critical role in controlling cell growth. Apoptosis is a morphologically and biochemically distinct form of cell death. Deregulation of the balance between cell growth and apoptosis lead to tumor development. Because of their pivotal roles, apoptosis and cell cycle are being the important targets for anticancer drug development. Previous study has showed that cell cycle arrest and induction of apoptosis are the molecular mechanisms for anticancer activity of aromatase inhibitors and antiestrogens; the two groups of breast cancer hormonal therapy currently available (Thiantanawat et al., 2003). Although the anticancer efficacy of AP1 has been reported, no study has fully investigated for responsible molecular mechanisms. Likewise, there is no intensive study for anticancer activity of AP3 and AP4. Traditionally, medicinal plants are used as crude extract composed of more than one active compound. Indeed, many times these combinations bring out the better therapeutic effect. Therefore, much remain to be study for the cellular and molecular mechanisms of the effects of the three active diterpenoids AP1, AP3, and AP4 and their combinations when used in breast and other types of cancer. In this application, we set up the study to investigate anticancer molecular mechanisms of AP1, AP3, AP4, and their combinations by targeting their effect on cell cycle machinery and apoptosis

signaling pathway. Our studies specifically accentuate on their anti-cancer therapeutic effect on both hormone-independent and hormone-dependent breast cancers. We utilized two different breast cancer cell lines MDA-MB-231 and T47D to represent hormone-independent and hormone-dependent breast cancer cells, respectively.

In addition to cell cycle and apoptosis, tissue homeostasis is also under influence of molecules in the mitogen-activated protein kinases (MAPK) signal transduction network. This network comprise of highly interactive series of protein kinases. These proteins are serine/threonine protein kinases that convey, amplify, and integrate signals from diverse stimuli such as growth factors, neurotransmitters, and cellular stresses. The net result includes array of cellular responses such as proliferation, differentiation, development, inflammation, or apoptosis (Dong and Bode, 2003). Several studies suggest an important role of MAPK signaling pathway in breast cell proliferation and development of drug resistance in breast cancer (Kato et al., 1995; Saten et al., 2002; Jelovac et al., 2005). Therefore, this study is also examine the effects of the three diterpenoids and combinations on the MAPK signaling which will provide the better and inclusive understanding of molecular mechanisms of the tested compounds.

Specific Aims

The ultimate goal of this project is to gain knowledge about the anticancer molecular mechanisms of the three diterpenoids from *A. paniculata*.

The specific aims of this project are:

Specific Aim 1: To determine the effects of the three diterpenoids (AP1, AP3, and AP4) and combination on cell cycle machinery.

Specific Aim 2: To examine the role of apoptotic cell death for anticancer activity of the three diterpenoids and identify the signaling pathway induced by the three diterpenoids.

Specific Aim 3: To investigate the involvement of MAPK signaling pathway in antiproliferative effect of the three diterpenoids.

Materials and Methods

Materials

Plant Material and Active Diterpenoids Preparation

Leaves and stems of *A. paniculata* plant were collected, air-dried, and powdered. The diterpenoids AP1, AP3, and AP4 were isolated and purified by Laboratory of Pharmacology and Laboratory of Medicinal Chemistry, Chulabhorn Research Institute using column chromatography and identified by UV, IR, and NMR spectra data following method by Matsuda *et al.* (1994).

Cell Lines

MDA-MB-231 hormone-independent and T47D hormone-dependent human breast cancer cells were obtained from American Type Culture Collection. MDA-MB-231 cells were maintained in a standard medium of DMEM with 2 mM L-glutamine, non-essential amino acid, 4.5 g/L glucose, and 10% fetal bovine serum (FBS). The hormone-dependent T47D cells were maintained in RPMI 1640 medium with 2 mM L-glutamine, 4.5 g/L glucose, 10 mM HEPES, 1.0 mM sodium pyruvate, 0.2 Units/ml bovine insulin (90%), and 10% FBS. Cells were cultured at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air.

Methods

Cell Growth Assay

Plates of 80% confluent cells were harvested by trypsinization. Cells were seeded in triplicate into 24-wells plates at 5,000 cells/well (for MDA-MB-231 cells) or 10,000 cells / well (for T47D cells) and were allowed to attach overnight. The medium is replaced with fresh medium containing the pure compounds AP1, AP3, or AP4 (single or in combination) at various concentrations as indicated to test for their effects on the cell growth. Control cells were treated with vehicle (0.2% DMSO). After 48 hours of treatment, cells were harvested by trypsinization and total cell number in each well was determined using a Coulter Counter model Z-1. Concentrations of each compound and their combinations that yield 50% cell number (IC₅₀) compared to control were calculated using linear equation.

Detection of Apoptosis by Annexin V/Propidium Iodide (PI) Assay

Apoptosis was assessed by measuring membrane translocation of phosphatidylserine using an annexin V-FITC apoptosis detection kit I (BD PharmingenTM, BD Biosciences USA). According to the manufacturer's protocol, after treatments, cells were collected and washed twice with cold PBS, resuspended in binding buffer at a concentration of 1x10⁶ cells/ml. Then 100 µl of the solution was transferred to new tube before added with 5 µl of FITC-conjugated annexin V antibody and 5 µl of PI (250 µg/ml stock solution). After incubation at room

temperature for 15 min, 400 μ l of binding buffer were added and cells were analyzed by flow cytometry. The percentage of cells undergoing apoptosis was determined by three independent experiments.

Preparation of Total Cell Lysates

Adherent and floating cells were harvested after treatment. The floating cells were collected by centrifugation at 500xg (4°C) for 15 min, and the cells that remained attached to the culture plate were detached by scraping. Both the floating and attached cells were mixed together, centrifuged, and washed in 10 ml of ice-cold DPBS. The cell pellet was resuspended in chilled cell lysis buffer [0.1 M Tris HCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor mixture (Complete TM; Boehringer, Indianapolis, IN) with or without phosphatase inhibitors (1 mM Na_3VO_4 , 100 mM NaF, and 100 μ M PMSF) and sonicated for 20 sec. The homogenates were transferred to new Eppendorf tubes and were incubated on ice for 30 min. The homogenates were spun at 10,000xg (4°C) for 30 min, and supernatants were separated and stored at -80°C. Protein concentrations were determined by Bradford method using a Bio-Rad kit (Bio-Rad, Hercules, CA).

Cytosolic Fractionation

Cells were incubated with extraction buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0.02% digitonin, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 1 mM PMSF, and protease inhibitor cocktail) for 10 min on ice. The cell extract was centrifuged at 700 x g for 10 min at 4°C, resulting in a pellet (P1) containing nuclei and supernatant (S1) retaining mitochondria and cytosol. The S1 supernatant was recentrifuged at 16,000 x g for 30 min at 4°C. The resulting supernatant (S2) was further centrifuged at 100,000 x g at 4°C for 1 h to obtain the supernatant cytosolic fraction. Protein concentrations were determined by Bradford method using a Bio-Rad kit. Ten μ g of fractionated cytosolic protein extract was subjected to SDS-polyacrylamide gels, and transferred to nitrocellulose membranes, and the protein levels of cytochrome C (cyt C), F1-ATPase, and actin were measured by Western immunoblot analysis.

Gel Electrophoresis and Western Blotting

Equal amount of total protein (20-30 μ g) were subjected to SDS-PAGE (20 mA/gel), using the mini-Protean3 electrophoresis modules assembly (Bio-Rad) and transferred (100 V, 1 h) to nitrocellulose membranes (Hybond ECL; Amersham, UK). Immunodetections were performed using mouse monoclonal antibodies against human cyclin D1, p21, p38 MAPK, phospho-p44/42 MAPK (Cell Signaling Technology, USA), Cdk2, cyclin A, cyclin E (BD Transduction Laboratories, USA), Bcl-2 (Upstate, USA), cytochrome C, β -actin (Sigma, USA) or rabbit polyclonal antibodies against Bad, Bax, Bcl-xL, PARP, p27, phospho-p38 MAPK, p44/42 MAPK (Cell Signaling Technology, USA). Immunoreactive bands were visualized using the enhanced chemiluminescence detection reagents (Amersham Corp., Arlington Heights, IL)

according to the manufacturer's instructions and quantitated by densitometry using Bio-Rad software (Quantity One).

Statistical Analysis

The statistical differences were analyzed using the student's *t* test. All statistical tests were two sided and differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

Results

Effect of AP1, AP3, AP4 and their combinations on *in vitro* growth of human breast cancer cells

The first experiment is to examine antiproliferative effects of the three diterpenoids from *Andrographis paniculata* (AP1, AP3, and AP4). Two human breast cancer cell lines MDA-MB-231 (hormone-independent, ER -ve) and T47D (hormone-dependent, ER +ve) were utilized. In addition to effect of individual compound, the combinatory effect of AP1+AP3, AP1+AP4, AP3+AP4, and AP1+AP3+AP4 were also studied. Our results showed that the three diterpenoids compounds decreased *in vitro* growth of both cell lines. Among the three compounds, AP1 was the most potent growth inhibitor for with the IC_{50} values of 4.39 ± 0.11 μ M and 22.62 ± 4.41 μ M for MDA-MB-231 and T47D cells, respectively. AP4 was a less effective growth inhibitor with the $IC_{50} > 100$ μ M. As shown in Table 1, combination treatments induced a slight increase in growth inhibitory effect compared to single compound. This was except for AP3+AP4 combination which IC_{50} value was markedly reduced to 46.93 μ M compare to 80.72 μ M in AP3 or >100 μ M in AP4 alone. Interestingly, the hormone dependent T47D cells exhibited lesser sensitivity (3 to 5 fold) than the hormone independent MDA-MB-231 breast cancer cells.

Effect of the three diterpenoids on cell cycle machinery

Cell cycle machinery is known to play a pivotal role in the regulation of cellular proliferation. In attempt to investigate whether antiproliferative effect of AP compounds and their combinations observed in both cell lines are related to cell cycle control, several key cell cycle regulatory proteins cyclins, cyclin-dependent kinases (cdk), and inhibitors of cdk (CKI) are studied. As demonstrated in figure 2 and 3, expression of cyclin D1 the key protein that regulates driving of cell from G1 to S phase in the cell cycle is significantly down-regulated in AP1 treated cells. Levels of cyclin D1 protein after cells were treated with AP1 25 μ M for 24 hours were decreased to 0.08 fold and 0.47 fold of control in MDA-MB-231 and T47D cells, respectively. There is a slight decrease in expression levels of this protein in AP 3 and AP4 treated cells. However, greater down-regulatory effects on cyclin D1 protein expression are observed after AP combination (AP1+AP3+AP4) treatment. This profile of cyclin D1 expression after AP treatments is similar for both cell lines.

Decreases in cyclin D1 protein levels observed after AP treatment indicate that AP compounds interfere with cell cycle control at G1/S phase. In addition to cyclin D, other cyclins which are cyclin E and cyclin A have also been shown to regulate move of cell from G1 to S phase of the cell cycle. These cyclin proteins work with their partner proteins called cyclin-dependent kinases (cdks) to drive cells through cell cycle (Sherr, 2000). Therefore, the

effect of AP compounds on expression of cyclin E, cyclin A, and their partner cdk2 proteins are also studied.

Table 1 IC_{50} values of AP1, AP3, AP4, and their combinations in MDA-MB-231 and T47D cells

Treatments	IC_{50} (μ M)	
	MDA-MB-231	T47D
AP1	4.39 ± 0.11	22.62 ± 4.41
AP3	15.67 ± 1.06	80.72 ± 9.02
AP4	> 100	> 100
AP1+AP3	3.26 ± 0.54	14.09 ± 0.76
AP1+AP4	3.22 ± 0.10	16.24 ± 0.52
AP3+AP4	16.05 ± 0.87	46.93 ± 2.53
AP1+AP3+AP4	2.62 ± 0.84	14.19 ± 0.93

MDA-MB-231 cells (5×10^3 cells/well) or T47D cells (1×10^4 cells/well) were cultured in 24 wells plate. The day later, media were refreshed and triplicate wells were treated with the indicated treatments of AP1, AP3, AP4, or their combinations at concentrations of 1, 5, 10, 25, 50, and 100 μ M. At 48 hours of treatments, numbers of cell in each well were determined using Coulter Counter Model Z-1. Cell growth inhibition was calculated as percentage of control cells grew in vehicle (0.2%DMSO). Linear equation was utilized for IC_{50} values determination. Results are expressed in the mean $\pm$ SE of triplicate independent experiments.

There was no alteration in levels of cyclin A protein in T47D cells after AP1, AP3, or AP4 single compound treatment. However, the maximum of 80 percent decrease in cyclin A protein levels were evidenced in cells treated with AP1+AP3+AP4 when compared to the control vehicle-treated cells (figure 3). In addition to cyclin D1 and cyclin A, expression levels of cyclin E protein are slightly decreased (0.9 to 0.7 fold of control) after AP treatments.

Moreover, AP treatments caused decreases in expression levels of cdk2 protein which can be observed in both MDA-MB-231 and T47D cells (figure 2 and figure 3, respectively). There are decreases of 20 to 30 percent in cdk2 protein expression levels in MDA-MB-231 cells while no change of cdk2 protein expression are evidenced in T47D cells after AP1, AP3, or AP4 single compound treatment. However, there is a significant decrease in cdk2 protein expression levels of 50 to 70 percent reduction in MDA-MB-231 cells (figure 2) and 30 to 40 percent reduction in T47D cells (figure 3) after the AP combination treatments.

In addition to cyclins and their kinase enzyme partner cdk2, control of cell cycle machinery is also regulated by the inhibitor of cyclin-dependent kinase such as p16, p18, p21, and p27 proteins (Vidal and Koff, 2000). These proteins can inhibit kinase activity of the cdk2 which will lead to arrest of cells at G1/S phase. Therefore after seeing that AP treatments induced decrease in expression levels of cyclins and cdk2, we then further investigate whether AP treatments cause any effect on the cyclin-dependent kinase inhibitors. As expected, up-regulation in expression levels of p21 protein a cyclin-dependent kinase inhibitor are evidenced in all AP treatments in T47D cells (figure 3). However, we could not detect p21 protein expression in MDA-MB-231 cells. It has been reported that the tumor suppressor gene p53 is mutated at the DNA binding domain in both MDA-MB-231 and T47D cells on R280K and L194F, respectively (Runnebaum et al., 1991). Transcription of p21 can be induced by p53. Mutation at R280K on DNA binding domain of p53 in MDA-MB-231 cell may affects transcription of p21 protein and may be the reason for no detection of p21 protein in this cell line. Unable to detect p21 protein in MDA-MB-231 cells we then turn to p27 another cdk inhibitor. As shown in figure1, expression levels of p27 protein are slightly up-regulated (1.1 to 1.42 fold of control) in MDA-MB-231 cells after AP combination treatments.

Our results demonstrate that AP compounds from *A. paniculata* possess inhibitory effect on *in vitro* growth of MDA-MB-231 and T47D cells in part by interfere with the cell cycle machinery. The mechanism is via down-regulate the expression of cyclin D1, cyclin A, and cyclin E protein and induce a reduction of their enzyme partner cdk2 protein level. Moreover, AP compounds also induced up-regulation of cdk inhibitors p21 and p27 protein expression.

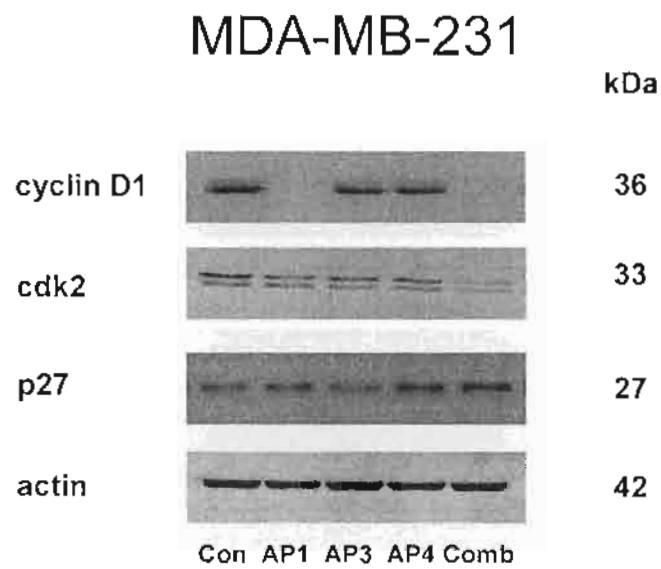


Figure 2 Western immunoblotting analysis of whole cell lysates from MDA-MB-231 cells cultured *in vitro* for cyclin D1, cdk2 and p27 protein expression. Cells were treated with 25 μ M of AP1, AP3, AP4, or combination (AP1+AP3+AP4) for 24 hr. Control (Con) lane is lysate from cells treated with vehicle (0.2% DMSO) for the same period of time. Blots were stripped and probed for β -actin to verify that equal amounts of protein were loaded in each lane.

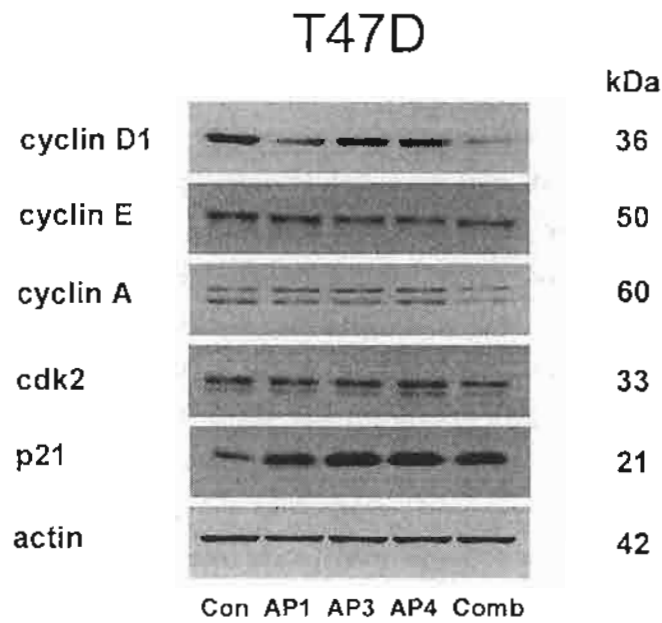


Figure 3 Western immunoblotting analysis of whole cell lysates from T47D cells cultured *in vitro* for cyclin D1, cyclin E, cyclin A, cdk2 and p21 protein expression. Cells were treated with 25 μ M of AP1, AP3, AP4, or combination (AP1+AP3+AP4) for 24 hr. Control (Con) lane is lysate from cells treated with vehicle (0.2% DMSO) for the same period of time. Blots were stripped and probed for β -actin to verify that equal amounts of protein were loaded in each lane.

AP compounds induce apoptosis in MDA-MB-231 and T47D cells

Net cell number is the result of the balance between cell proliferation and cell death. In addition to their effects on cell cycle progression, the reduction in cell number observed after AP treatments could be the result of induction of cell death. To investigate whether AP1, AP3, and AP4 induce apoptosis in the tested cell lines, the annexin V assay to detect cell death via apoptosis was performed by flow cytometry analysis. This assay detect membrane translocation of phosphatidylserine (from inner to outer) which is occur in early stage of cell undergoing apoptosis.

In the hormone-independent MDA-MB-231 breast cancer cells, percentage of apoptotic cell was increased to 23.3 ± 5 , 18.5 ± 6 , and 14.1 ± 2.5 after 48 hr treated with 25 μ M of AP1, AP3, and AP4, respectively. The induction of apoptosis observed in these treatments were statistically significance ($p < 0.05$) when compared to 7.1 ± 2.1 percent of apoptosis detect in control vehicle-treated cells (figure 4 and 5). Treatment with AP combination induced 39.7 ± 4.8 percent cell death by apoptosis which is significantly greater than the effect of each single compound ($p < 0.05$).

The same profile was observed in T47D cells that all the three compounds induced apoptosis which the potency in apoptosis induction of AP1 > AP3 > AP4. In T47D cells, AP1 induced apoptosis by 36.7 percent compared to 7.6 percent of the control cells (figure 6 and 7). AP3 and AP4 treatments induced apoptosis in T47D cells by 20.3 and 15.5 percent, respectively. As in MDA-MB-231 cells, treatment with combination of AP1+AP3+AP4 in T47D cells also resulted in more potent apoptosis induction effect. The percentage of apoptotic cells was increase to 45.7 percent after combination treatment.

Previously, cell growth study showed that the IC_{50} values of all AP treatments were higher in hormone-dependent T47D breast cancer cells than those in MDA-MB-231 cells. In agreement with the cell growth study, concentration 50 μ M of AP compounds was needed in T47D cells to induce the same levels of apoptosis by 25 μ M of AP compounds in MDA-MB-231 cells. The profiles of apoptotic induction observed in annexin V assay in both MDA-MB-231 and T47D cells were correlated well with the profile of cell growth inhibiting and IC_{50} values obtained in previous study (table 1).

Taken together, these results indicated that the growth inhibiting effects of AP1, AP3, and AP4 on MDA-MB-231 and T47D cells are mediated via disrupting cell cycle progression and by inducing apoptotic cell death.

MDA-MB-231

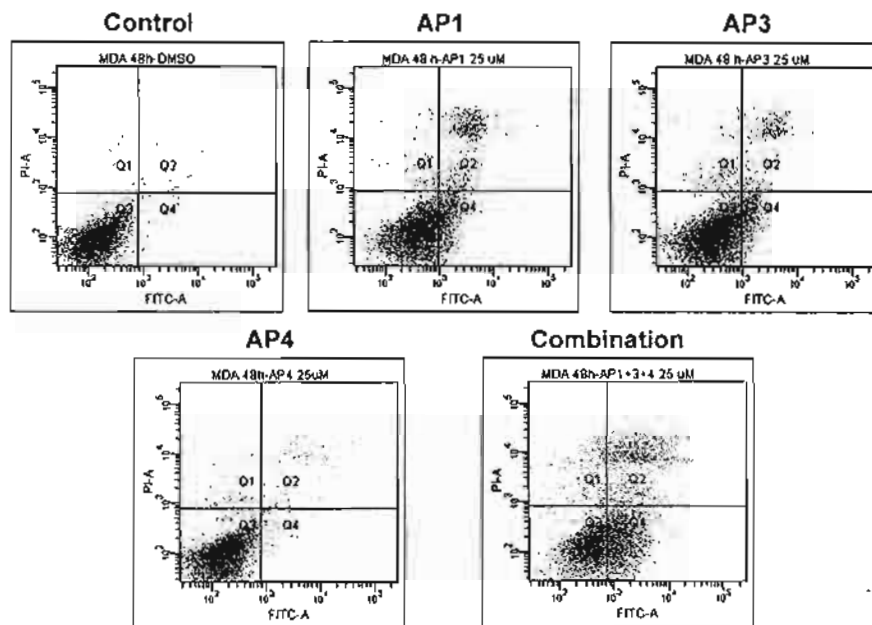


Figure 4 Histograms from flow cytometry analysis of apoptosis in MDA-MB-231 cells as determined by annexin V assay. MDA-MB-231 cells were treated with 25 μ M of AP1, AP3, AP4, AP1+AP3+AP4 (comb), or vehicle 0.2%DMSO (control). After 48 hours of treatments, cells were harvested and subjected to annexin V flow cytometry analysis as described in "Materials and Methods". Cells in Q3 and Q4 were early and late apoptotic cells, respectively.

MDA-MB-231

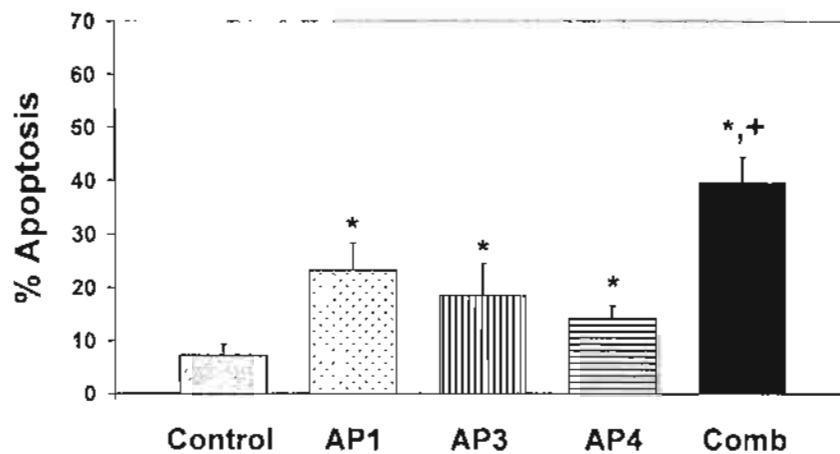


Figure 5 Induction of apoptosis in MDA-MB-231 cells as determined by annexin V assay. MDA-MB-231 cells were treated with 25 μ M of AP1, AP3, AP4, AP1+AP3+AP4 (comb), or vehicle 0.2%DMSO (control). After 48 hours of treatments, cells were harvested and subjected to annexin V flow cytometry analysis as described in "Materials and Methods". Percentages of apoptotic cells were quantitated from three independent experiments. Data are presented as mean $\pm$ SE. *, statistically significant ($P < 0.05$) versus control; +, statistically significant ($P < 0.05$) versus AP1.

T47D

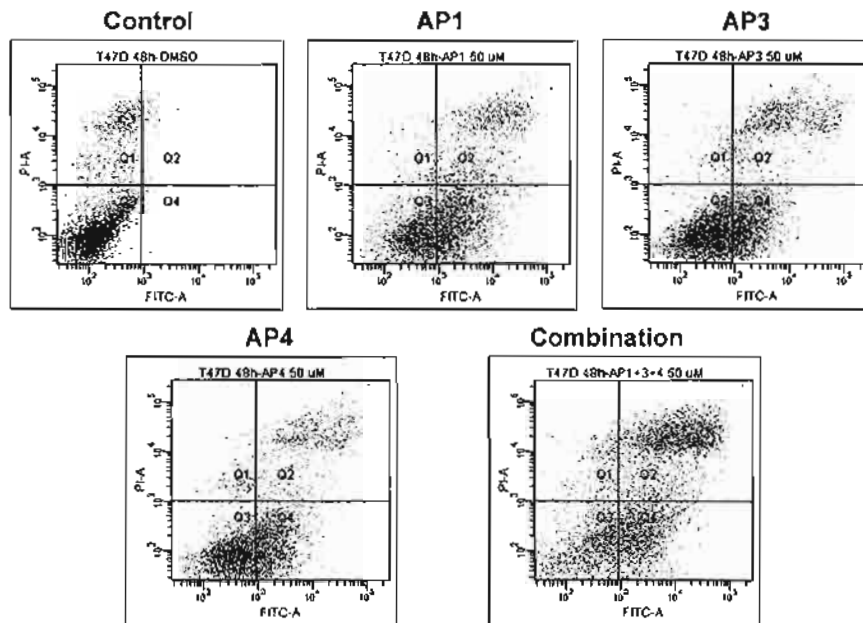


Figure 6 Histograms from flow cytometry analysis of apoptosis in T47D cells as determined by annexin V assay. T47D cells were treated with 50 μ M of AP1, AP3, AP4, AP1+AP3+AP4 (comb), or vehicle 0.2%DMSO (control). After 48 hours of treatments, cells were harvested and subjected to annexin V flow cytometry analysis as described in "Materials and Methods". Cells in Q3 and Q4 were early and late apoptotic cells, respectively.

T47D

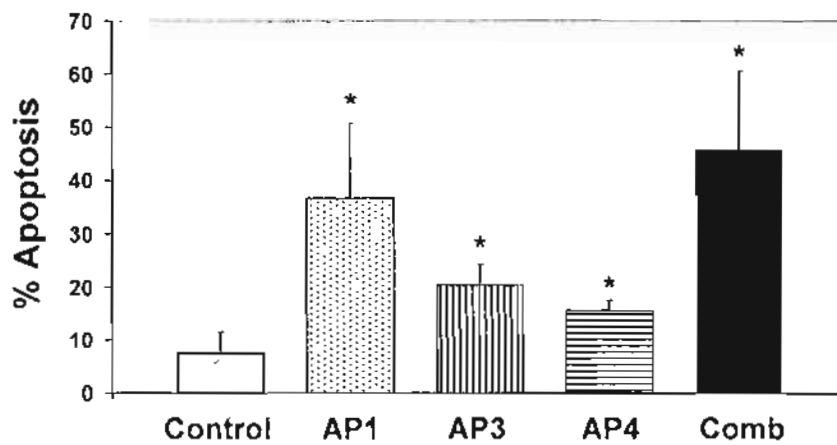


Figure 7 Induction of apoptosis in T47D cells as determined by annexin V assay. T47D cells were treated with 50 μ M of AP1, AP3, AP4, AP1+AP3+AP4 (comb), or vehicle 0.2%DMSO (control). After 48 hours of treatments, cells were harvested and subjected to annexin V flow cytometry analysis as described in "Materials and Methods". Percentages of apoptotic cells were quantitated from three independent experiments. Data are presented as mean $\pm$ SE. *, statistically significant ($P < 0.05$) versus control.

Mechanism of apoptosis activated by the three diterpenoids

a) Involvement of Bcl-2 family of protein in apoptosis activated by AP compound treatments

After observing induction of apoptosis by AP1, AP3, and AP4, we further examine the mechanisms involved. We first investigated the effect of the three compounds and their combination on protein members in Bcl-2 family. The Bcl-2 family of proteins is known to play key roles in the regulation of apoptosis by several stimuli (Dagovich et al., 1998). In this study, effects of the three diterpenoids and their combination on expression of protein in Bcl-2 family members both pro-apoptotic (Bax and Bad) and anti-apoptotic (Bcl-2 and Bcl-xL) proteins were examined.

As shown in figure 8, the expression levels of pro-apoptotic Bax and Bad proteins were increased in MDA-MB-231 cells treated with AP compounds at the concentration of 10 μ M for 6 hours. Among the three compounds AP1 induced greatest induction in expression of Bax and Bad proteins (1.87 and 2.38 fold of control, respectively). AP3 and AP4 also induced up-regulations in Bax and Bad proteins but at a lesser extent. Treatment with combination of AP1+AP3+AP4 increased expression levels of Bax and Bad protein to 1.95 and 1.96 fold of control, respectively. However, the combination treatment did not exhibit additive effect compared to that observed from AP1 alone (figure 8).

In the hormone-dependent T47D breast cancer cells, the significant up-regulation in expression of Bax and Bad proteins were evidenced in all treatments. As shown in figure 9, expression levels of Bax protein in T47D cells were increased to 4.49, 3.96, and 2.26 fold of control after treated with AP1, AP3, and AP4, respectively. Unlike MDA-MB-231 cells, a potentiated effect in induction of Bax protein expression was exhibited in T47D cells after combination treatment. Twenty four hours after cells were treated with combination of AP1+AP3+AP4, the levels of Bax protein was elevated to 6.19 fold when compared to the levels in vehicle treated cells.

In addition to Bax protein, effect of AP compounds on expression levels of another pro-apoptotic molecule Bad in T47D cells was also investigated. All treatments significantly induced up-regulation in expression of Bad protein at 4.2, 4.55, 3.18, and 4.72 fold of control in AP1, AP3, AP4, and combination treatments, respectively (figure 9).

In MDA-MB-231 cells, although up-regulations of pro-apoptosis proteins Bax and Bad were evidenced, no alteration in expression levels of the anti-apoptotic Bcl-2 were observed after treatment with AP compounds (figure 8). Similarly, AP compounds also have no effect on Bcl-xL which is another anti-apoptotic molecule. However, a forty percent reduction in expression levels of Bcl-xL was detected after treatment with combination of three compounds (figure 8).

In contrast to MDA-MB-231 cells, treatment with AP1 and combination (AP1+AP3+AP4) in T47D cells significantly decreased the levels of anti-apoptotic Bcl-2 protein to forty and thirty percent of control, respectively (figure 9). A slight down-regulation in expression of Bcl-2 protein was induced by AP3 and AP4 with the decrease of fifteen percent from control levels in both treatments.

In conclusion, our results showed that the three tested AP compounds up-regulate expression of pro-apoptotic proteins Bax and Bad in both MDA-MB-231 and T47D cells. The potency in inducing Bax and Bad protein expression was combination > AP1 > AP3 > AP4 in both cell lines. In contrast, AP compounds have lesser effect on anti-apoptotic members of Bcl-2 family of protein. However, combination treatment significantly induced down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL in T47D and MDA-MB-231, respectively. The relative levels of pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins function as a "rheostat" regulating the apoptotic threshold of the cell (Yang and Korsmeyer, 1996). Therefore, a markedly increase in expression levels of pro-apoptotic proteins with a slight decrease in expression levels of anti-apoptotic proteins observed after AP compounds treatment should affect the regulation of apoptotic threshold of the cells leading to apoptosis.

b) Induction of cytochrome C release and PARP cleavage by AP compound treatments

The involvement of Bax, Bad, Bcl-xL, and Bcl-2 implied that apoptosis induced by AP compounds might be via the mitochondria-mediated apoptotic pathway. Several studies have reported that the key function of Bcl-2 family members is to regulate the release of pro-apoptotic factors, in particular cytochrome c, from the mitochondrial intermembrane compartment into cytosol (Yang et al., 1995; Vander Heiden et al., 1997). Over expression of either Bcl-2 or Bcl-xL inhibits cytochrome c release whereas over expression of Bax resulted in dissipation of mitochondrial membrane potential and release of cytochrome c (Rosse et al., 1998). Therefore, the next question was whether AP compounds induced cytochrome C release from mitochondria into cytosol. To assess this question cell fractionation was performed. Because AP1 and combination treatment were the most effective in inducing apoptosis in MDA-MB-231 and T47D cells, we tested effect of these two treatments on release of cytochrome C. Twenty-five μ M of AP1 significantly induced release of cytochrome C into cytosol. This was evidenced in both cell lines as early as 3 hours (data not show) with the maximum release at 6 hours after treatment (figure 10). In MDA-MB-231 cells, a markedly increase in levels of cytochrome c release into cytosol was detected in AP combination treatment. Quantitative analysis revealed 5.7 and 10.7 fold increase of cytochrome c release in AP1 and AP combination treatment when compared to control vehicle-treated cells (figure 10). Release of cytochrome c was also observed in hormone-dependent breast cancer T47D

cells. However, levels of cytochrome c release after treatments with 25 μ M of AP1 or AP combination were in the same range of 2.9 fold of control (figure 10).

The hallmark characteristic of apoptosis is DNA fragmentation. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is a key protein involved in DNA-repair system. Proteolysis of PARP is common in cell undergoing apoptosis induced by various stimuli (Lazebnik et al., 1994). Therefore, we investigated whether mechanism of apoptosis induced by the three AP compounds involved PARP proteolysis. Our previous experiments in determination of IC_{50} values and annexin V assay for apoptotic index of the three AP compounds and their combination were performed after 48 hours of treatments. However, alteration in members of Bcl-2 protein family and cytochrome c release induced by our treatments can be observed earlier at 3 and 6 hours. Therefore, we set up a time course assay (3, 6, and 24 hr) to determine the effect of AP1, AP3, AP4, or AP combination on PARP protein expression. Western immunoblotting for the PARP protein revealed an elevation in the levels of the proteolytic form in both cell lines after treatments. The profile of PARP proteolytic activated by AP compounds was in agreement with the IC_{50} value and apoptotic index data obtained from previous experiments.

As showed in figure 11 and 12, the levels of proteolytic form of PARP were increased significantly ($p < 0.05$) in MDA-MB-231 and T47D cells after treated with all treatments. Treatment with combination of the three compounds activated more PARP cleavage than that induced by each compound alone. Induction of PARP proteolytic can be observed as early as 3 hours after treatments and the levels of cleaved PARP were increased along the time courses of experiment.

Taken together, these data indicate that the growth inhibiting effect of AP compounds on MDA-MB-231 and T47D cells are mediated by inducing apoptosis. The mechanism involved up-regulation of pro-apoptotic Bax and Bad and down-regulation of anti-apoptotic Bcl-xL protein expression, induction of mitochondria cytochrome c release and proteolytic of PARP protein. Among the three AP compounds tested, the andrographolide (AP1) exhibit the greatest effect. Treatment with combination of the three compounds resulted in significant additional effect when compared to each compound alone.

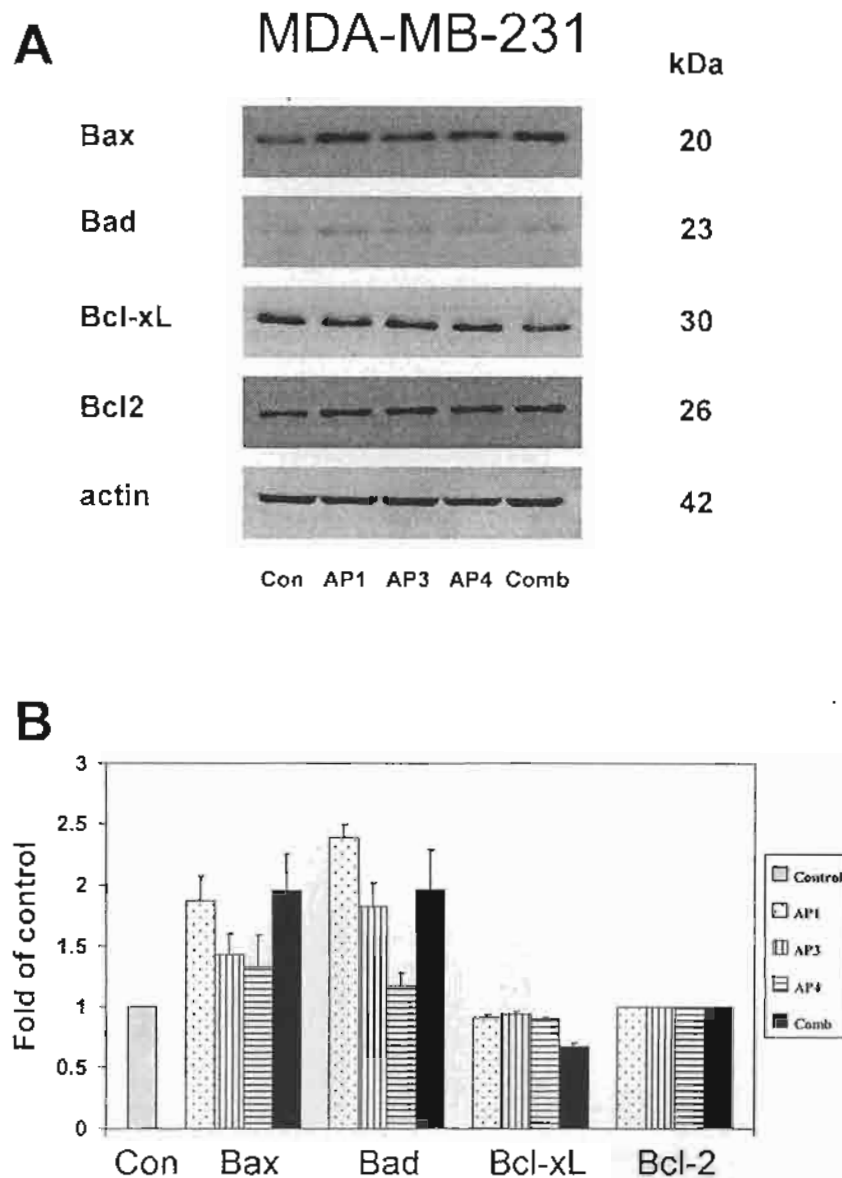


Figure 8 Western immunoblotting analysis of whole cell lysates from MDA-MB-231 cells cultured *in vitro* for Bax, Bad, Bcl-xL and Bcl-2 protein expressions. Cells were treated with 25 μ M of AP1, AP3, AP4, or combination (AP1+AP3+AP4) for 24 hr. Control (Con) lane is lysate from cells treated with vehicle (0.2% DMSO) for the same period of time. Blots were stripped and probed for β -actin (bottom panel) to verify that equal amounts of protein were loaded in each lane. A. Blots of Bax, Bad, Bcl-xL, Bcl-2, and actin. B. Quantitative analysis from three independent experiments. Results represent fold of control; bars, $\pm$ S.E.

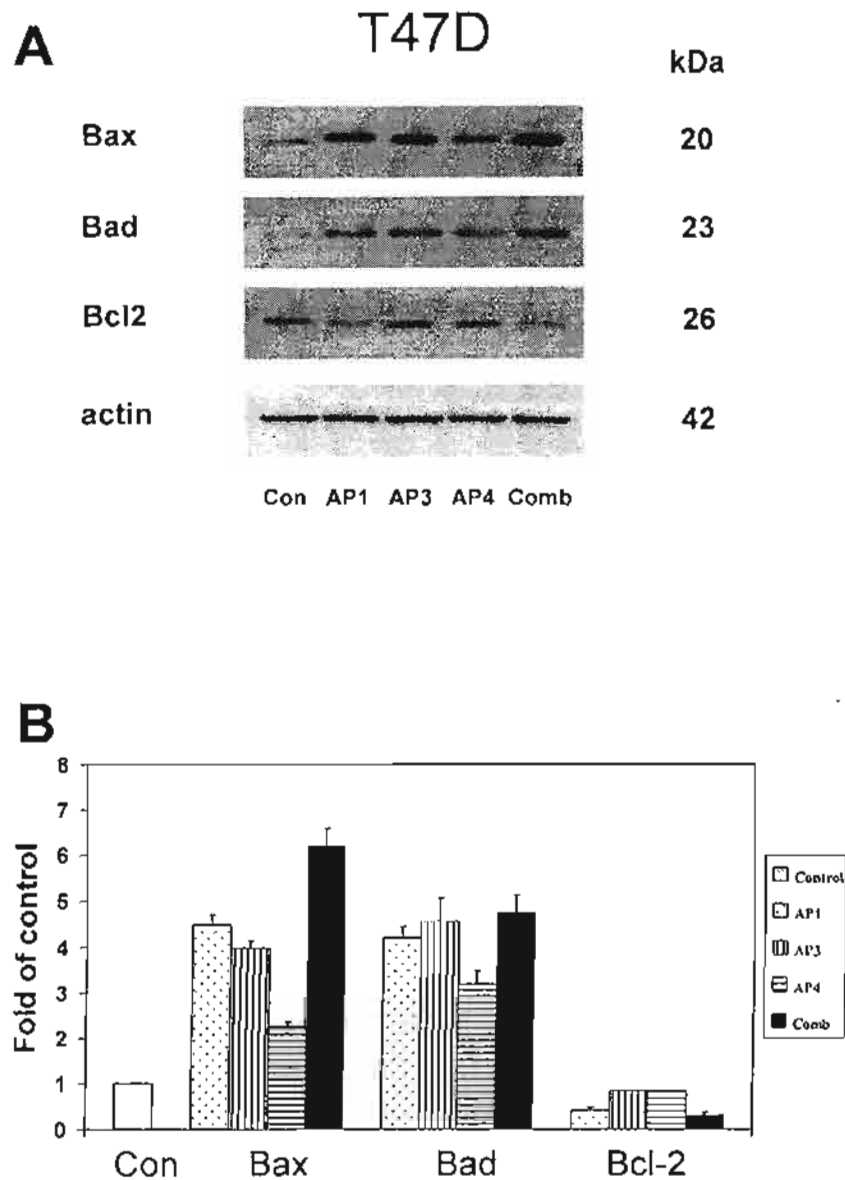


Figure 9 Western immunoblotting analysis of whole cell lysates from T47D cells cultured *in vitro* for Bax, Bad, and Bcl-2 protein expressions. Cells were treated with 25 μ M of AP1, AP3, AP4, or combination (AP1+AP3+AP4) for 24 hr. Control (Con) lane is lysate from cells treated with vehicle (0.2% DMSO) for the same period of time. Blots were stripped and probed for β -actin (bottom panel) to verify that equal amounts of protein were loaded in each lane. A. Blots of Bax, Bad, Bcl-2, and actin. B. Quantitative analysis from three independent experiments. Results represent fold of control; bars, $\pm$ S.E.

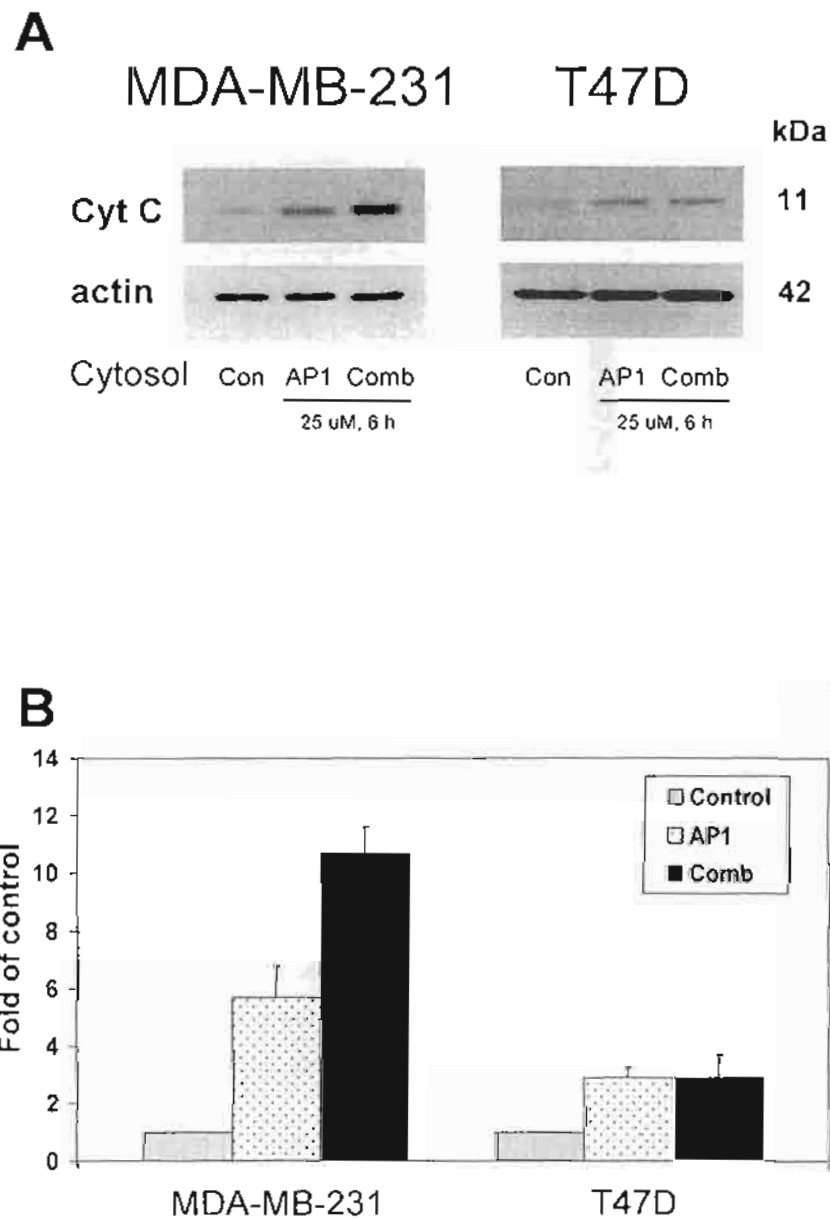


Figure 10 Western immunoblotting analysis of cytosolic fraction from MDA-MB-231 cells and T47D cells cultured *in vitro* for cytochrome c protein. Cells were treated with 25 μ M of AP1, or combination (AP1+AP3+AP4) for 6 hr. Control (Con) lane is cytosolic fraction of cells treated with vehicle (0.2% DMSO) for the same period of time. Blots were stripped and probed for β -actin (bottom panel) to verify that equal amounts of protein were loaded in each lane. A. Blots of cytochrome c and actin. B. Quantitative analysis from three independent experiments. Results represent fold of control; bars, $\pm$ S.E.

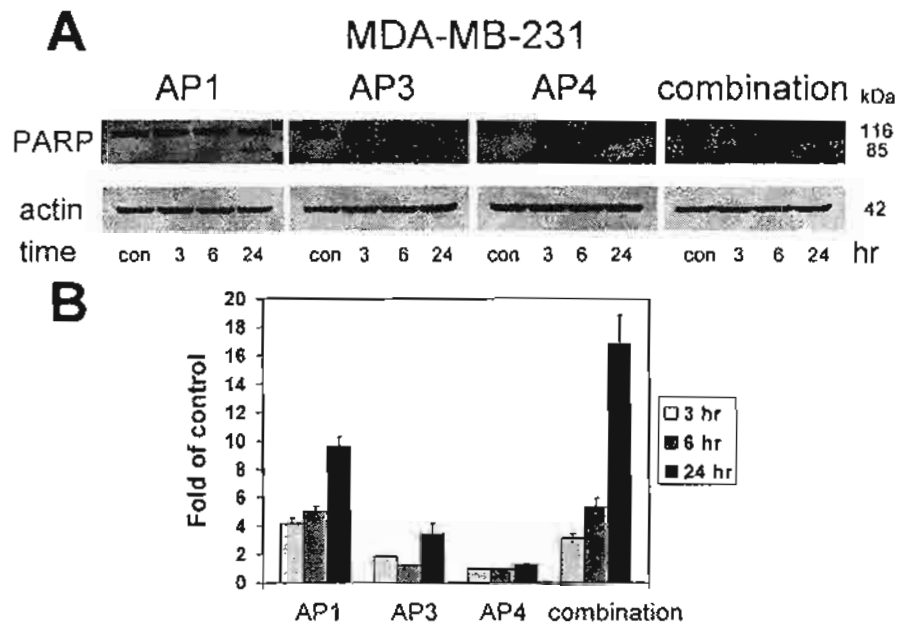


Figure 11 Induction of proteolysis of PARP in MDA-MB-231 cells. Western immunoblotting analysis of whole cell lysates from MDA-MB-231 cells cultured *in vitro* for PARP protein expression. Cells were treated with 25 μ M of AP1, AP3, AP4, or combination (AP1+AP3+AP4) for 3, 6, and 24 hr. Control (Con) lane is lysate from cells treated with vehicle (0.2% DMSO) for 3 hr. Blots were probed with anti-PARP antibodies that recognized both intact PARP at M_r 116 kDa and proteolytic PARP at M_r 85 kDa. Blot were stripped and probed for β -actin (bottom panel) to verify that equal amounts of protein were loaded in each lane. A. Blots of PARP and actin. B. Quantitative analysis from three independent experiments. Results represent fold of control; bars, $\pm$ S.E.

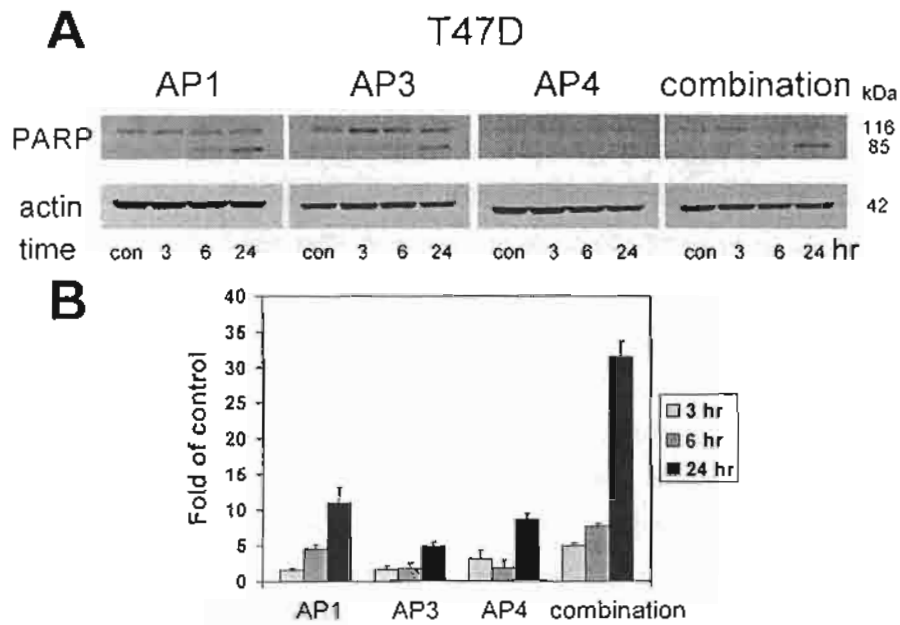


Figure 12 Induction of proteolysis of PARP in T47D cells. Western immunoblotting analysis of whole cell lysates from T47D cells cultured *in vitro* for PARP protein expression. Cells were treated with 25 μ M of AP1, AP3, AP4, or combination (AP1+AP3+AP4) for 3, 6, and 24 hr. Control (Con) lane is lysate from cells treated with vehicle (0.2% DMSO) for 3 hr. Blots were probed with anti-PARP antibodies that recognized both intact PARP at M, 116 kDa and proteolytic PARP at M, 85 kDa. Blot were stripped and probed for β -actin (bottom panel) to verify that equal amounts of protein were loaded in each lane. A. Blots of PARP and actin. B. Quantitative analysis from three independent experiments. Results represent fold of control; bars, $\pm$ S.E.

Involvement of MAPK signaling pathway in antiproliferative effects of andrographolides

Proliferation of breast cancer cells can be promoted via a MAPK-dependent pathway. MAPK phosphorylates Ser-118 in the estrogen receptor (ER), leading to ligand-independent ER activation (Kato et al., 1995). Moreover, it has been reported that MAPK is over activity in tamoxifen resistant breast cancer cells (Kurokawa et al., 2000; Saten et al., 2002). These findings suggest an important role of MAPK signaling pathway in breast cell proliferation.

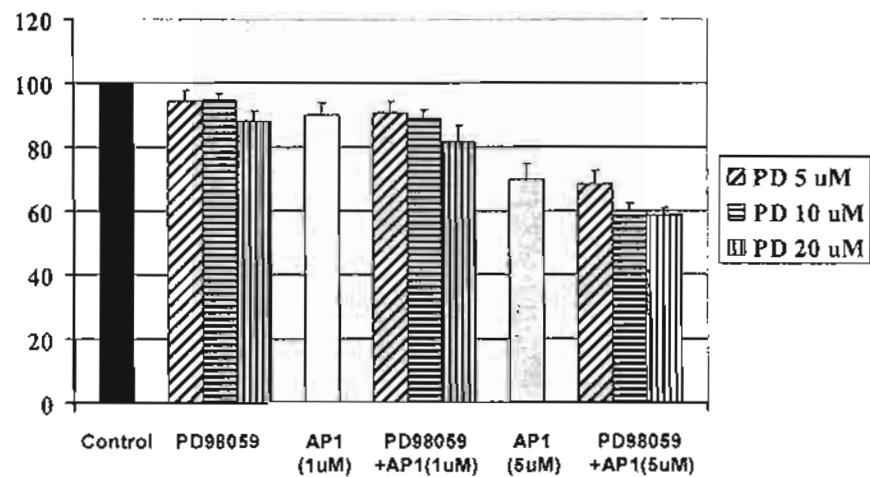
To investigate whether proliferation of T47D and MDA-MB-231 cells was associated with MAPK signaling, we utilized two different inhibitors PD98059 (a specific inhibitor of MEK1) and U0126 (an inhibitor of MEK1 and MEK2). Our results show that PD98059 at concentrations of 5, 10, and 20 μ M have a slight inhibitory effect on growth of MDA-MB-231 cells (figure 13 A) whereas U0126 exhibits a greater effect in inhibiting growth of MDA-MB-231 cells and the effect was evidenced in a dose-dependent manner (figure 13 B). Similar growth inhibitory profile was observed in T47D cells as shown in figure 14 A and B. These data indicated that ERK1/2 involves in proliferating of these two cell lines and that their proliferation required activity of both MEK 1 and MEK 2 protein.

In order to explore whether growth inhibitory effect of AP compounds related to the activation of MAPK or not, additional experiments were designed. We hypothesized that AP compounds may exert their growth inhibitory effect in part via alteration of the ERK1/2 activity. Therefore treatments of AP compound with the inhibitors of MEK an upstream activator of ERK were performed.

As the most potent compound, AP1 at low concentration of 1 μ M and at IC_{50} concentration of 5 μ M were selected. There was no significant change in growth inhibiting effect of AP1 at low concentration of 1 μ M when combine with PD98059 or U0126 in both cell lines. However, a significant additive growth inhibiting effect was detected when cells were treated with AP1 at concentration of 5 μ M together with PD98059 or U0126 at concentration of 20 μ M. These results indicated that the antiproliferative activity of AP1 may involve inhibiting of ERK activity.

A. MDA-MB-231: MEK1 Inhibitor

Cell No. (%control)



B. MDA-MB-231: MEK1/2 Inhibitor

Cell No. (%control)

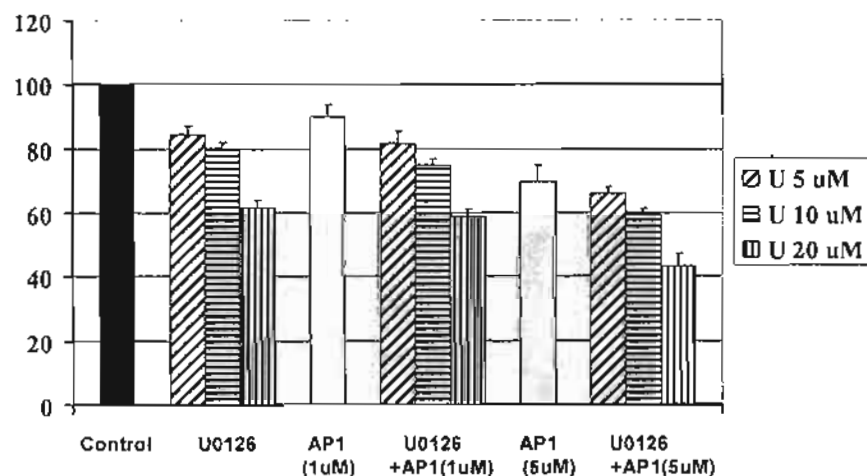
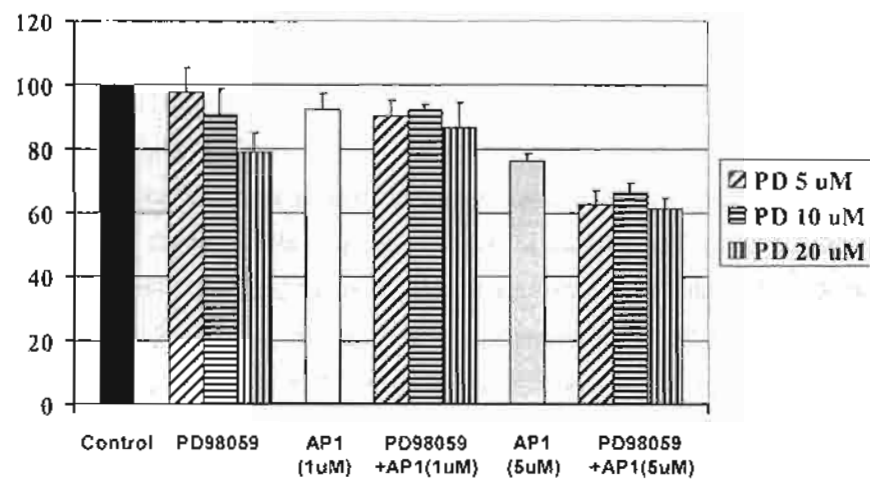


Figure 13 Effect of MEK inhibitors (PD98059 and U0126) and their combination with AP1 compound (1 or 5 μ M) on *in vitro* growth of MDA-MB-231 cells. * statistically significant difference ($P < 0.05$) to AP1 and PD at the same dose.

A. T47D: MEK1 Inhibitor

Cell No. (%control)



B. T47D: MEK1/2 Inhibitor

Cell No. (%control)

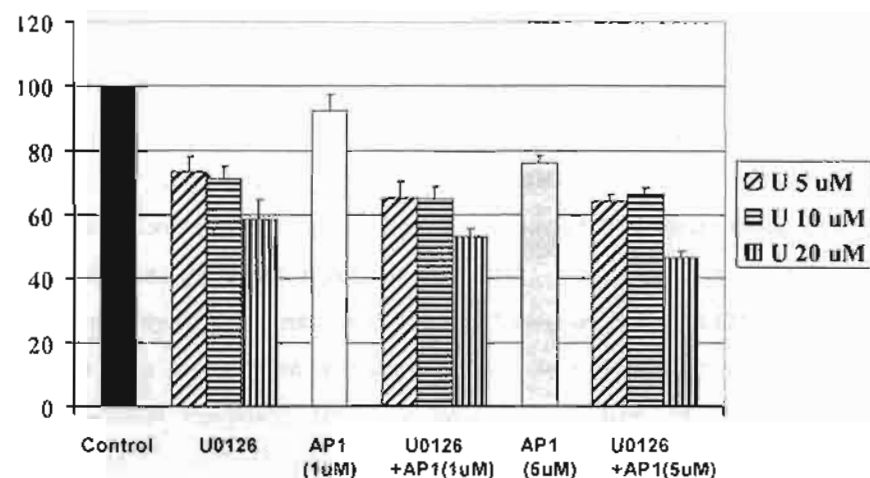


Figure 14 Effect of MEK inhibitors (PD98059 and U0126) and their combination with AP1 compound (1 or 5 μ M) on *in vitro* growth of T47D cells. * statistically significant difference ($P < 0.05$) to AP1 and PD at the same dose.

After found that growth of MDA-MB-231 and T47D cells were regulated in part via the MAPK signaling, we then determined the effect of AP compounds on MAPK signaling. This signal transduction network comprises of a highly interactive series of serine/threonine protein kinases which convey, amplify, and integrate signals from diverse stimuli. The net result is an array of cellular responses such as proliferation, differentiation, inflammation, or apoptosis. Two subgroups of the MAPK family; the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and the p38 family of protein kinases, were well characterized. Therefore, the ERK1/2 and p38MAPK proteins the key molecule of these pathways were selected to study.

The levels of ERK1/2, p38 and their active phosphorylated pERK1/2 and pp38 proteins were monitored at 3, 6, and 24 hours after treatments with 25 μ M of AP1, AP3, AP4, or AP combination (figure 15, 16, 17, and 18, respectively). In MDA-MB-231 cells, no alterations in expression levels of p38 protein were observed in all treatments. However, expression levels of pp38 which is an active form of p38 were increased in all treatments except AP4 treatment (figure 17). Our time-course study revealed that AP1 induce p38 activation at 6 hours after treatment (figure 15) while an activation induced by AP3 was evidenced at earlier time course of 3 hours after treatment (figure 16). Activation of p38 by AP1 and AP3 was in a transient manner.

In T47D cells, activation of p38 was detected after AP1 and AP4 treatment. As observed in MDA-MB-231 cells, induction of p38MAPK phosphorylation by AP1 and AP4 compounds in T47D cells were also short-lived. A significant increase in expression levels of pp38 can be observed at 24 hours after AP1 treatment (figure 15) and at 3 hours after AP4 treatment (figure 17). Albeit a slight increase in pp38 protein levels observed at 3 and 6 hours after AP3 treatment, significance p38 activation was not in consider since total form of p38 at those time courses were also increased (figure 16).

As showed in figure 18, combination treatment induced p38 activation with the same pattern in both cell lines. A significant increase in pp38 protein expression was evidenced at 6 hours after combination treatment. Unlike a transient activation as observed in single compound treatments, p38 activation induced by combination treatment was sustained for the duration of treatment. Moreover, levels of pp38 protein were further increased at 24 hours after treatment.

Our results as showed in figure 13 and 14 suggested that ERK1/2 may involve in growth inhibitory effect of AP compounds. Therefore, the expression of ERK1/2 and their active phosphorylated pERK1/2 proteins were examined. As showed in figure 15, AP1 induced a significant decrease in pERK1/2 protein levels in both cell lines at 24 hours after treatment. Decrease in pERK1/2 was detected in MDA-MB-231 cells at 24 hours after AP3 treatment whereas an increase in pERK1/2 was observed in T47D cells at 3 and 6 hours before went back to the control levels at 24 hours (figure 16).

Levels of pERK1/2 proteins were also increased after AP4 treatment in both cell lines. The activation was detected at 3 hours after treatment before it return to the control level at 24 hours (figure 17).

Surprisingly, despite the most potent condition for anti-growth effect, combination treatment did not inhibit activation of ERK1/2 in MDA-MB-231 cells. In contrast an induction in ERK1/2 activation was observed as the levels of pERK1/2 proteins were increased at 3 and 6 hours (figure 18). However, decrease in expression levels of pERK1/2 proteins were detected in T47D cells at 3 hours after combination treatment before return to the control levels at 6 hours.

In conclusion, these results indicate that the three AP compounds caused different effect on activation of p38 and ERK1/2 proteins. AP1 induced activation of p38 and reduced activation of pERK1/2 in both cell lines. AP3 induced activation of p38 and reduce activation of pERK1/2 in MDA-MB-231 cells but not in T47D cells. Transient activation of pERK1/2 in both cell lines and a transient activation of p38 in T47D cells were observed after AP4 treatment. Combination treatment induced a prolong activation of p38 in both cell lines.

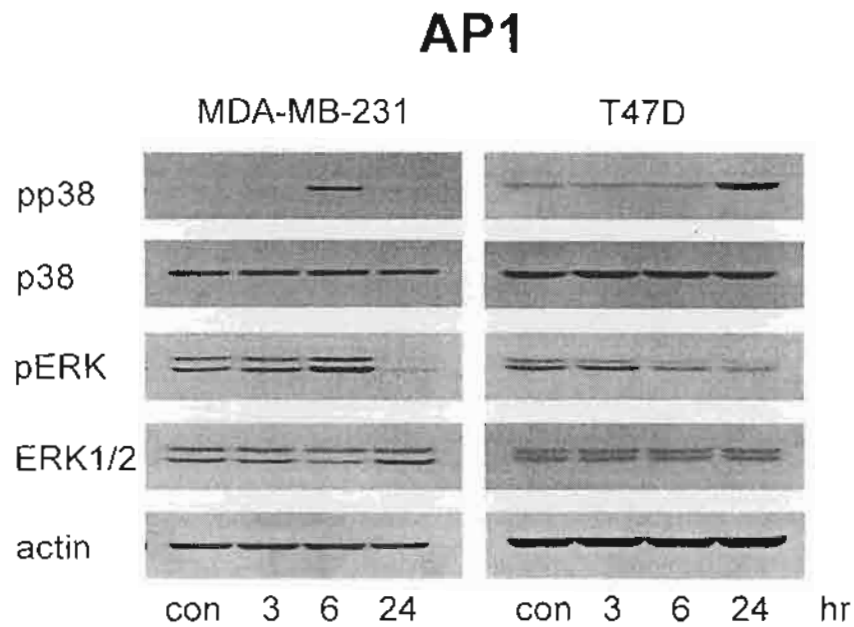


Figure 15 Western immunoblotting analysis of whole cell lysates from MDA-MB-231 and T47D cells cultured *in vitro* for pp38, p38, pERK1/2, ERK1/2 protein expression. Cells were treated with 25 μ M of AP1 for 3, 6, and 24 hr. Control (Con) lane is lysate from cells treated with vehicle (0.2% DMSO). Blot were stripped and probed for β -actin (bottom panel) to verify that equal amounts of protein were loaded in each lane. Results are shown from a single representative of three independent experiments.