รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสาร GM1 และ GM2 จาก *Grangea maderaspatana* (L.) Poir. ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง

(Effect of GM1 and GM2 from *Grangea maderaspatana* (L.) Poir. on breast cancer cell lines)

คณะนักวิจัย
ผศ.ดร. กัญญนัช กนกวิรุฬห์
ผศ.ดร. พจนพร ไกรดิษฐ์

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก เงินรายได้มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ MED560604S

1. ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) ผลของสาร GM1 และ GM2 จาก *Grangea maderaspatana* (L.) Poir. ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง

(ภาษาอังกฤษ) Effect of GM1 and GM2 from *Grangea maderaspatana* (L.) Poir. on breast cancer cell lines

2. ผู้รับผิดชอบ

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. กัญญนัช กนกวิรุฬห์

ผู้ร่วมโครงการ ผศ.ดร. พจนพร ไกรดิษฐ์

ห้องปฏิบัติการวิจัยสู่ความเป็นเลิศด้านชีวโมเลกุลของมะเร็ง

ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

3. กิตติกรรมประกาศ

This work was financially supported by Prince of Songkla University Research Fund contract number MED560604S and by grants from the Faculty of Medicine, Prince of Songkla University contract number REC57-0162-04-2. I would like to thanks Dr. Sittiruk Roytrakul and staffs at Proteomics Research Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency for their assistance and support in proteomics analysis. I also thanks to Dr. Theera Srisawat at Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus for assisting in Flow cytometry techniques throughout the project.

4. บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

มะเร็งเต้านมเป็นโรคที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขโรคหนึ่งที่ส่งผลกระทบมากมายต่อผู้หญิงทั่วโลก และสาเหตุของโรคดังกล่าวมาจากหลายปัจจัยต่างกัน ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ คือ ลักษณะที่แตกต่างกันทางด้านโมเลกุลของเซลล์มะเร็งเต้านมในแต่ละชนิด จึงส่งผลให้มะเร็งเต้านมยังคงเป็นอุปสรรคในการวินิจฉัยและรักษาโรคในปัจจุบัน โดยเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดแบ่งแยกตามลักษณะการแสดงออกของโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับ หรือ Receptor บนผิวเซลล์ ได้แก่ Estrogen receptor (ER), Progesterone receptor (PR) และ Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) ซึ่งเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 มีการแสดงออกของตัวรับบนผิวเซลล์ทั้งชนิด ER และ HER2 แต่มีหรือไม่มีการแสดงของตัวรับบนผิวเซลล์ชนิด PR (ER^{+}, $PR^{+/-}$ และ $HER2^{+}$) สำหรับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-468 และ MDA-MB-231 ไม่มีการแสดงออกของตัวรับดังกล่าวทั้ง 3 ชนิด (ER^{-}, PR^{-} และ $HER2^{-}$) หรือจะเรียกเซลล์ชนิดนี้ว่า “Triple negative” นอกจากนี้เซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด มีการตอบสนองที่ไม่จำเพาะเจาะจง

และยากต่อการรักษาทางเคมีบำบัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด Triple negative และก่อนหน้านี้มีรายงานถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดมาจากพืชพญามุตติ (*Grangea maderaspatana* (L.) Poir.) 2 ชนิด คือ สารจีเอ็มวัน ((-)-frullanolide) และจีเอ็มทู ((-)-7-**α**-hydroxyfrullanolide) โดยสารทั้ง 2 ชนิด สามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงได้หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB, เซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H187 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ด้วย อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ความเป็นพิษของสารดังกล่าวต่อเซลล์มะเร็งเต้านมยังคงน้อยมาก และไม่มีรายงานถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด จึงนำเข้าสู่วัตถุประสงค์ในการการศึกษาครั้งนี้ คือ เพื่อทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษเบื้องต้นของสารจีเอ็มวันและจีเอ็มทูต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7, MDA-MB-468 และ MDA-MB-231 และเพื่ออธิบายถึงความเป็นไปได้ของกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวต่อเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 3 ชนิด โดยดำเนินการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษเบื้องต้นของสารจีเอ็มวันและจีเอ็มทูต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ MCF-7, MDA-MB-468 และ MDA-MB-231 ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay) ต่อมาเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 3 ชนิดที่ทดสอบด้วยสารจีเอ็มวันและจีเอ็มทู ได้นำไปศึกษาและวิเคราะห์ด้วยวิธีโฟลไซโทเมทรี (Flow cytometry) เพื่อดูรูปแบบการตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) โดยการย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์ 2 ชนิด คือ สีฟลูออเรสซีน ไอโซไทโอไซยาเนต (Fluorescein isothiocyanate: FITC) ที่ติดฉลากกับโปรตีนแอนเนคซินไฟว์ (Annexin V) และ สีโพรพิเดียมไอโอไดด์ (Propidium iodide: PI) และดูการกระจายของปริมาณดีเอ็นภายในวัฏจักรของเซลล์ (Cell cycle) ดังกล่าวด้วยการย้อมสีโพรพิเดียมไอโอไดด์ สุดท้ายประเมินการแสดงของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิดที่ทดสอบด้วยสารจีเอ็มวันและจีเอ็มทูเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ด้วยเทคนิค western blotting และ โปรติโอมิกส์ (Proteomics) เพื่ออธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวต่อเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 3 ชนิด สำหรับผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สารจีเอ็มวันและจีเอ็มทูสามารถออกฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 3 ชนิด จัดอยู่ในระดับปานกลางและออกฤทธิ์ได้ดี แสดงด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 5-10 µg/ml และน้อยกว่า 5 µg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้สารทั้งสองออกฤทธิ์เป็นพิษอยู่ในระดับต่ำต่อเซลล์ปกติเพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือ MCF-12A และ L929 ซึ่งแสดงด้วยค่า IC_{50} มากกว่า 10 µg/ml ยกเว้นฤทธิ์ความเป็นพิษของสารจีเอ็มทูต่อเซลล์ปกติเพาะเลี้ยงชนิด MCF-12A ที่จัดอยู่ในระดับปานกลาง เมื่อพิจารณาระดับความปลอดภัยของสารทั้งสองต่อเซลล์ปกติด้วยค่า Selectivity index (SI) พบว่า สารจีเอ็มวันออกฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่าสารจีเอ็มทู แสดงด้วยค่า SI มากกว่า 5 และ อยู่ในช่วงระหว่าง 5 ถึง 10 ตามลำดับ นอกจากนี้ผลจากการวิเคราะห์โฟลไซโทเมทรี พบว่า สารทั้งจีเอ็มวันและจีเอ็มทูสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด ตายแบบอะพอพโทซิส และชะงักการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-468 ใน

ระยะ G_2/M ของวัฏจักรเซลล์ และมีเพียงสารจีเอ็มทูเท่านั้นที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการขับเคลื่อนเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่ระยะ G_2/M สำหรับผลการแสดงออกของโปรตีน Bax, p21 และ p53 ในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง 3 ชนิด ที่ทดสอบด้วยสารจีเอ็มวันและจีเอ็มทู ด้วยวิธี western blotting พบว่า (1) ในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 สารจีเอ็มวันสามารถกระตุ้นการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีน p21 ที่เวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นการแสดงของโปรตีน Bax กลับเพิ่มขึ้นแทน และสารจีเอ็มทูกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน Bax ที่ระยะเวลา 12-48 ชั่วโมง ขณะเดียวกันสารจีเอ็มทูมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน p21 ที่ลดลง และการแสดงออกของโปรตีน p53 ไม่สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงภายในช่วงเวลาดังกล่าว เมื่อทดสอบด้วยสารทั้ง 2 ชนิด (2) ในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-231 ทั้งสารจีเอ็มวันและจีเอ็มทูกระตุ้นการแสดงที่เพิ่มขึ้นของโปรตีน p21 ที่เวลา 12 ชั่วโมง (3) สำหรับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-468 สารจีเอ็มวันสามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน p21 ที่เวลา 12 ชั่วโมง และการแสดงออกของ p53 ด้วย ที่เวลา 12-24 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-468 ที่ทดสอบด้วยสารจีเอ็มทู ถูกเลือกไปศึกษาต่อด้วยวิธีโปรติโอมิกส์ ผลการทดลอง พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน nucling เพิ่มขึ้น 5.47 เท่าในเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสารจีเอ็มทู เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และโปรตีนดังกล่าวน่าจะเป็นตัวกลางที่ดีต่อการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวกับอะพอพโทซิส ได้แก่ Bax, Caspase7, 8, และ 9 และการแสดงออกที่ลดลงของโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ คือ Bcl-2 โดยสรุป สารจีเอ็มวันและจีเอ็มทูออกฤทธิ์ได้ดีอย่างจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด และเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเพาะเลี้ยงน้อย นอกจากนี้สารจีเอ็มวันกระตุ้นการเกิดอะพอพโทซิสโดยไม่ขึ้นกับโปรตีน p53 ในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-468 และ MDA-MB-231 แต่ขึ้นกับโปรตีน p53 ในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MCF-7 และสารจีเอ็มวันสามารถยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ที่ระยะ G_2/M ภายใต้การควบคุมของโปรตีน p21 ในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-468 ด้วย สำหรับความเป็นไปได้ของกลไกการออกฤทธิ์ของสารจีเอ็มทูในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด MDA-MB-468 พบว่าเซลล์หยุดชะงักการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่ระยะ G_2/M ได้ด้วยการควบคุมของโปรตีน p21 และชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสได้ โดยน่าจะผ่านการทำงานของโปรตีน nucling และโปรตีนดังกล่าวส่งสัญญาณไปกระตุ้นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับอะพอพโทซิส (Bax, Caspase 7, 8, และ 9) และยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการอยู่รอดของเซลล์ (Bcl-2)

Breast cancer is a key disease affecting women’s health worldwide and it has many important risk factors. Many of them are associated with the different molecular characteristics that can create several obstacles for diagnosis and treatment. Based on

differentially prominent receptors of cell surfaces, MCF-7 (ER^+, $PR^{+/-}$, $HER2^+$), MDA-MB-468 and MDA-MB-231 (ER^-, PR^-, $HER2^-$; Triple negative) breast cancer cell lines was classified into varied subtypes and mostly associated with poor recognition by molecular targeted-therapeutic approaches, particularly triple negative cells. Previously, anticancer activity of GM1 ((-)-frullanolide) and GM2 ((-)-7-α-hydroxyfrullanolide) from an extract of the plant *Grangea maderaspatana* (L.) Poir. has been used on various types of cancer cell lines including MCF-7 breast cancer cells as well. However, their cytotoxic effect is now a little known as well as their inhibited mechanisms have not been determined against three types of breast cancer cell lines. This study was aimed to examine cytotoxic effect and to elucidate mechanisms of GM1 and GM2 toward MCF-7, MDA-MB-468 and MDA-MB-231 breast cancer cell line. Here, we screened for the cytotoxic activity of compounds against three subtypes of breast cancer cell lines: MCF-7, MDA-MB-468 and MDA-MB-231 by MTT assay. Apoptotic cell pattern (Annexin V-FITC and PI staining) and DNA distribution in cell cycle (PI staining) were investigated by flow cytometry between untreated and treated cells. Furthermore, to identify related-proteins in mechanism cytotoxic inhibition, using proteomic techniques: (1D-PAGE, LC-MS/MS, bioinformatics) and western blotting were used to identify and verify altered protein expressions, compared between treated cells and control. The MTT assay revealed that the GM1 (IC_{50} = 5-10 µg/ml) and GM2 (IC_{50} < 5 µg/ml) had moderately and highly active respective cytotoxicity against MCF-7, MDA-MB-468 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. The IC_{50} values greater than 10 µg/ml were represented as weak cytotoxicity toward two normal cell lines (MCF-12A and L-929), excluded moderately activity of GM2 against MCF-12A. Also, selectivity index (SI) values were here showed to predict safety of the compounds against normal cell lines. The results found that GM1 possessed innocuousness less than GM2 with SI values > 5 and 5-10, respectively. Furthermore, GM1 and GM2 induced cell death via apoptosis in all treated-breast cancer cells in term of dosage dependence. In addition to GM1 and GM2 arrest cell cycle at G_2/M checkpoint in treated-MDA-MB-468 cells in dose-dependent manner, and GM2 merely halted cell transition of G_2/M stage in treated-MCF-7 cells in dose dependent manner. Moreover, Bax, p21 and p53 protein expressions of GM1 and GM2 obtained from western blotting in all treated-cells could be divided into 3 groups, depending on breast cancer cell types. First, in treated-MCF-7 cells, GM1 stimulates p21 expression at 12 h and increases Bax protein after 12 h, and increasing of Bax protein at 12-48 h and a concomitant gradual decrease of p21 alteration by GM2 treatment. In contrary to p53 expression did not detectable by the

compounds treatment in this duration. In treated-MDA-MB-231 cells were then showed that GM1 activates only p21 expression at 12 h as well as GM2 treatment. Finally, detected protein expressions in GM1-treated MDA-MB-468 cells were increased p21 protein at proper 12 h and gradually increased p53 protein at 12-24 h. Nevertheless, GM2 treatment toward MDA-MB-468 cells not only western blotting was performed, but also proteomic analysis. Notably, nucling protein was up-regulated expression at GM2-half-IC_{50} concentration about 5.47 fold difference, compared to control, and this protein may mediate apoptosis by accumulation of Bax expression and active caspase-cascades proteins (Caspase 7, 8 and 9) as well as reduction of pro-survival protein (Bcl-2) expressions as shown in western blotting results. Accordingly, result revealed from western blotting that GM2 triggers p21 protein expression at 12-48 h in treated-MDA-MB-468 cells as well. In conclusion, we have shown that GM1 and GM2 compounds possessed specifically board anticancer property and mostly exhibited selective activity toward normal cells. In addition to, GM1 may trigger p53-independent cellular apoptosis in treated-MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cell lines and p53-dependent apoptosis in treated-MCF-7 cell line. GM1 also may arrest cell cycle at G_2/M checkpoint by p21 protein controlling in treated-MDA-MB-468 cells. Moreover, GM2 induce apoptosis via Bax and p53 stimulation in treated-MCF-7 cell line. The feasibility of inhibited mechanisms of GM2-treated-MDA-MB-468 cell line proposed by halting cell progression at G_2/M stage through p21 regulation, and induction of cell apoptosis may mediated through crucial nucling protein by activation of caspase cascades proteins and suppression of pro-survival proteins.

5. Executive Summary

Introduction

The trend for breast cancer mortality in women has been progressively increasing worldwide, and it now accounts for 29.7% of total cancer-related deaths [1, 2]. Breast cancer is a heterogeneous disease at both the molecular and clinical levels and can be divided into six subtypes by different gene mutations during luminal and basal progenitor cell progression, thus causing an obstacle to breast cancer diagnosis and therapy [3, 4]. The MDA-MB-468 cell line, the basal-like subtype of breast cancer, is widely used as the *in vitro* model for cancer research because of its prominent characteristics, referred to as triple negative or ER^-, PR^-, $HER2^-$, and its low response to targeted cancer therapies [5-7]. Several