

**Thesis Title** Induction of Cell Cycle Arrest for Enhancing Anti-Tumor Activity of *Centella asiatica* Extract in Colon Adenocarcinoma Cells

**Author** Miss Piyawan Bunpo

**Degree** Doctor of Philosophy (Biochemistry)

**Thesis Advisory Committee**

Assoc.Prof.Dr. Usanee Vinitketkumnuen Chairperson

Assist. Prof. Dr. Pranee Leechanachai Member

Prof. Dr. Yoshinari Ohnishi Member

**ABSTRACT**

*Centella asiatica* is a traditional medicinal plant frequently employed in Thai folk medicine practices. Effects of the water extract of *C. asiatica* Linn. on mutagenicity of known mutagens, formation of azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) and intestinal tumorigenesis in male F344 rats were investigated. Treatment with the extract significantly decreased the number of larger ACF (with four or more crypts per focus) in the large intestine in the early stage, while the number of methylated DNA adducts was not decreased compared with that in the AOM-treated group. In the post-initiation stage, the extract significantly decreased the total number of ACF and the number of larger ACF, accompanied by a decrease in the 5-bromo-2'-deoxyuridine-labeling index and an increase in the induction of apoptotic cells in the colonic mucosa. The incidences of neoplasms, the numbers of adenocarcinomas in the small intestines and entire intestines, and sizes of neoplasms in the entire intestines in rats fed *C. asiatica* extract at a dose of 10 mg/kg were smaller than those in rats given AOM alone ( $p < 0.05$ ). The extract at a dose of 100 mg/kg significantly reduced the multiplicity of neoplasms in the small intestine ( $p < 0.05$ ). These results suggest that inhibition of the formation of AOM-induced ACF by *C.*

*asiatica* extract is associated with modification of cell proliferation and induction of apoptosis in colonic crypts and that the extract has a chemopreventive effect on colon tumorigenesis.

The effects of *C. asiatica* on cell proliferation, cell cycle phase distribution and cyclin B1 expression was studied on HT-29 and Caco-2 cells *in vitro*. *C. asiatica* extract reduced the proliferation and altered the morphology of both HT-29 and Caco-2 cells in a dose- and time-dependent manner. The mechanism of cancer cell growth inhibition was shown to occur via cell cycle arrest. The extract induced G<sub>2</sub>-M arrest in HT-29 cells whereas appearing S and G<sub>2</sub>-M arrest in Caco-2 cells accompanied with apoptosis induction. Furthermore, the cell cycle arrest induced by *C. asiatica* extract appeared the morphology of binucleated cells. These appearances indicated that some arrest cells come to an end after chromosomal dividing. The extract also increased the accumulation of cyclin B1 protein that is a key regulatory protein during mitotic phase progression in both HT-29 and Caco-2 cells. These findings indicate that *C. asiatica* extract inhibited cell proliferation of HT-29 and Caco-2 cells through modification of the cell cycle events and that this cell cycle arrest is associated, at least in part, with increased accumulation of cyclin B1 protein.

Asiatic acid is a compound of pentacyclic triterpenes that are naturally present in *C. asiatica*. Asiatic acid dose-dependently showed cytotoxicity in the human colon adenocarcinoma cell lines HT-29 and Caco-2. To investigate causes of the cytotoxicity, DNA fragmentation in HT-29 and Caco-2 cells was studied. Asiatic acid treatment resulted in a dose- and time-dependent induction of DNA ladder formation in both HT-29 and Caco-2 cells. Pretreatment of cells with Z-Asp-Glu-Val-Asp-FMK, a caspase-3 inhibitor, suppressed the DNA ladder formation in response to asiatic acid in a concentration-dependent manner. Early apoptotic cells appeared in 33.0% of HT-29 and 29.5% of Caco-2 cells when the cells were treated with 25 and 50 µg/ml of asiatic acid, respectively, for 24 h. Asiatic acid induced release of cytochrome c from mitochondria into the cytosol with decrease of Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> and increase in the amount of the pro-apoptotic protein Bad. Moreover, asiatic acid induced caspase-3 activation in a dose-dependent manner, and this induction correlated with the appearance of p17 subunit of caspase-3. These results suggest that asiatic acid induces apoptosis in colon adenocarcinoma cell lines via a mitochondrial pathway.

In conclusion, asiatic acid found in *Centella asiatica* was able to induce apoptosis of cancer cell lines. Most interesting is the capacity of the extract to induce cell cycle arrest in HT-29 and Caco-2 cells. The results add to the evidence that asiatic acid may be used as cancer chemopreventive agent. Our results suggest that induction of apoptosis and cell cycle arrest may be important mechanisms of *in vivo* proliferation inhibition of colorectal cancer and other cancer cells by *Centella asiatica* extract.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การเหนี่ยวนำการหยุดชะงักวัฏจักรของเซลล์เพื่อเสริมฤทธิ์การต้านมะเร็งของสารสกัดบัวบกในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

**ผู้เขียน** นางสาวปิยะวรรณ บุญโพธิ์

**ปริญญา** วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต (ชีวเคมี)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

รศ. ดร. อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ปราณิ ลิขณะชัย	กรรมการ
Prof. Dr. Yoshinari Ohnishi	กรรมการ

#### บทคัดย่อ

บัวบกจัดเป็นพืชสมุนไพรซึ่งนำมาใช้กันมากในทางการแพทย์แผนโบราณของไทย การศึกษาผลของสารสกัดน้ำบัวบกต่อสารก่อกลายพันธุ์ การเกิดรอยโรคของมะเร็งลำไส้ใหญ่ Aberrant crypt foci (ACF) ที่กระตุ้นโดยสารก่อมะเร็ง Azoxymethane (AOM) และการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ ในหนูขาวพบว่าในระยะเริ่มต้นของการเกิด ACF สารสกัดสามารถลดจำนวนของ ACF ขนาดใหญ่ในลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ระดับของ DNA adduct ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเพียง AOM ในระยะ post-initiation สารสกัดสามารถลดจำนวนของ ACF และ ACF ที่มีขนาดใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญรวมทั้งลดการแบ่งตัวของเซลล์และกระตุ้นการตายของเซลล์ใน colonic mucosa ให้เพิ่มขึ้น สารสกัดบัวบกที่ความเข้มข้น 10 mg/kg bw ลดจำนวนของการเกิดเนื้องอก เนื้อเยื่อชนิด adenocarcinomas ในลำไส้เล็กและลำไส้ทั้งหมดได้อย่างมีนัยสำคัญและลดขนาดของเนื้องอกในลำไส้ทั้งหมดเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับเพียง AOM ( $p < 0.05$ ) หนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนสารสกัด 100 mg/kg มีระดับของ tumor multiplicity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าการยับยั้งการเกิดรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่กระตุ้น โดย AOM ของสารสกัดบัวบกมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์และการกระตุ้นให้มีการตายของเซลล์ใน colonic crypts ฉะนั้นสารสกัดบัวบกจึงมีฤทธิ์ในการเป็นตัวยับยั้งการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

เมื่อศึกษาผลของสารสกัดบัวบกต่อการแบ่งตัวของเซลล์ การกระจายตัวของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์และการแสดงออกของโปรตีน cyclin B1 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 และ

Caco-2 ในหลอดทดลองพบว่าสารสกัดบับกสามารถลดปริมาณการแบ่งตัวของเซลล์แปรผันตรงตามความเข้มข้นและเวลาและสามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด พบว่ากลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยสารสกัดบับกนี้เกี่ยวข้องกับการหยุดวัฏจักรเซลล์มะเร็งไว้ที่ระยะ G<sub>2</sub>-M ในเซลล์ HT-29 และที่ระยะ S และ G<sub>2</sub>-M ในเซลล์ Caco-2 นอกจากนี้ยังพบว่า การหยุดวัฏจักรเซลล์ไว้ที่ระยะ G<sub>2</sub>-M โดยสารสกัดบับกพบลักษณะของเซลล์ที่มีสองนิวเคลียส ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าเซลล์บางส่วนที่ถูกหยุดการเจริญไว้ที่ระยะนี้สิ้นสุดหลังจากการแบ่งนิวเคลียส ผลของระดับโปรตีน cyclin B1 ซึ่งจัดเป็นโปรตีนควบคุมวัฏจักรเซลล์ในระยะ mitotic โดยการกระตุ้นด้วยสารสกัดบับกมีระดับเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเกิดการหยุดวัฏจักรเซลล์ทั้งในเซลล์ชนิด HT-29 และ Caco-2 ฉะนั้นการศึกษานี้จึงกล่าวได้ว่าสารสกัดบับกมีฤทธิ์ลดการแบ่งตัวของเซลล์ชนิด HT-29 และ Caco-2 ผ่านทางการเปลี่ยนแปลงของวัฏจักรเซลล์ซึ่งบ่งบอกถึงการมีฤทธิ์ด้านการเกิดมะเร็ง

Asiatic acid จัดเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างแบบ pentacyclic triterpenes พบได้ในบับก asiatic acid มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 และ Caco-2 แปรผันตรงตามความเข้มข้น เพื่อทดสอบหาสาเหตุที่ความเป็นพิษจึงตรวจหาการเกิด DNA fragmentation ในเซลล์ HT-29 และ Caco-2 พบว่า asiatic acid เหนี่ยวนำให้เกิด DNA fragmentation แปรผันตรงตามความเข้มข้นและเวลาในเซลล์ทั้งสองชนิด พบว่าการเกิด DNA fragmentation ซึ่งเหนี่ยวนำด้วย asiatic acid ถูกยับยั้งด้วย caspase-3 inhibitor แปรผันตรงตามความเข้มข้น พร้อมทั้งพบ early apoptotic cells 33% และ 29.5% ใน HT-29 และ Caco-2 ตามลำดับที่ความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml ตามลำดับที่เวลา 24 ชั่วโมง asiatic acid เหนี่ยวนำให้มีการปลดปล่อย cytochrome c ออกจากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโตซอลร่วมกับการลดระดับของโปรตีน Bcl-2 และ Bcl-x<sub>L</sub> และการเพิ่มขึ้นของโปรตีน Bad นอกจากนี้ asiatic acid ยังสามารถกระตุ้นให้มีการเหนี่ยวนำเอนไซม์ caspase-3 เพิ่มขึ้นแปรผันตามความเข้มข้น และมีความเกี่ยวข้องกับการตรวจพบ p17 subunit ของเอนไซม์ caspase-3 จากผลการศึกษานี้จึงกล่าวได้ว่า asiatic acid ในบับกมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ผ่านทางวิถีของไมโทคอนเดรีย

โดยสรุป asiatic acid ซึ่งพบได้ในบับก สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งและที่น่าสนใจคือความสามารถของสารสกัดบับกในการเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวัฏจักรเซลล์ในเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 และ Caco-2 ซึ่งผลการศึกษานี้เห็นได้ชัดว่า asiatic acid อาจจะสามารถนำมาใช้เป็นสารป้องกันการเกิดมะเร็งได้ ผลการศึกษาของเราได้บ่งบอกว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์และการหยุดวัฏจักรเซลล์อาจจะเป็นกลไกสำคัญของฤทธิ์การยับยั้งการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่หรือมะเร็งอื่นๆ โดยสารสกัดบับก