

**A POTENTIAL ANTI-BREAST CANCER MECHANISM OF THE  
CYCLIC PEPTIDE VR-3848, EXTRACTED FROM  
*EUPHOBIA*CEAE**

**PROMSIN MASRINOUL**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2006**

**ISBN 974-04-7632-5**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การศึกษา gene responses ของเซลล์มะเร็งเต้านมต่อ cyclic peptide ซึ่งสกัดจากพืชในสกุล *Euphobiaceae* (A POTENTIAL ANTI-BREAST CANCER MECHANISM OF THE CYCLIC PEPTIDE VR-3848, EXTRACTED FROM *EUPHOBIA*)

พร้อมสิน มาศรีนวล 4736165 SCMI/D

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศุขธิดา อูบล, Ph.D., สมัยศึก โสภาสรรค์, Ph.D., จีรยุทธ ไชยจาวุฒิชัย, Ph.D.

#### บทคัดย่อ

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารวีโออาร์ 3848 ที่สกัดจากพืชในสกุล *Euphobiaceae* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองหลายชนิดที่ระดับความเข้มข้นนาโนโมลาร์ อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของสารนี้ได้มีการศึกษาเพียงบางส่วน ดังนั้นการวิจัยนี้มุ่งศึกษาถึงเป้าหมายของยา และกระบวนการยับยั้งการเจริญเติบโตในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 โดยศึกษาการตอบสนองของยีนในเซลล์ MCF-7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารวีโออาร์ 3848 ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้เทคนิค DNA microarray analysis ซึ่งวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนด้วยวิธี significance analysis of microarray (SAM) ที่อัตราการพบความผิดพลาด (false discovery rate) 5% และ two fold difference analysis ผลการทดลองพบว่า 4,075 ยีนมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการจัดกลุ่มตามการแสดงออกของยีนโดย k-mean clustering analysis พบว่าวีโออาร์ 3848 ยับยั้งยีนในกลุ่มเมตาบอลิซึมและวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle) และกระตุ้นยีนในกลุ่ม apoptosis และกลุ่มยีนยั้งวงจรชีวิตของเซลล์ นอกจากนี้พบว่า 155 ยีนมีตอบสนองโดยเร็ว (early response genes) ต่อสารวีโออาร์ 3848 โดยมีการเปลี่ยนแปลงที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังจากกระตุ้น ซึ่งยีนที่เปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม transcription และ translation ในที่นี้พบว่ายีน SRCAP ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ steroid receptor mediated transcription มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เวลา 30 นาทีหลังจากการกระตุ้น ดังนั้นการกระตุ้นของสารดังกล่าวผ่านทาง steroid mediated pathway จึงควรได้รับการศึกษาต่อไป

เมื่อทำการศึกษาการตอบสนองการแสดงออกของยีนที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นพบว่าสารวีโออาร์ 3848 สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis โดยพบการเปลี่ยนแปลงของยีนทั้งในกลุ่มการกระตุ้นการตายผ่านตัวรับสัญญาณบนผิวเซลล์ กระตุ้นการตายผ่านทางไมโทคอนเดรีย กระตุ้นการตายผ่านทาง endoplasmic reticulum และการยับยั้งวงจรชีวิตของเซลล์ ในการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นถึงกลไกของสารวีโออาร์ 3848 ในการกระตุ้นการตายของเซลล์ MCF-7 ผ่านทาง inhibin mediated pathway โดยพบการเพิ่มการแสดงออกของยีนในกลุ่ม inhibin signaling ได้แก่ INHBA, GADD45 $\beta$ , GADD153, ATF4 และ ARTS จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารวีโออาร์ 3848 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งการขัดขวางวงจรชีวิตของเซลล์และกระตุ้นผ่านกลไกการตายแบบ apoptosis ในหลายรูปแบบ

A POTENTIAL ANTI-BREAST CANCER MECHANISM OF THE CYCLIC PEPTIDE VR-3848, EXTRACTED FROM *EUPHOBIA*CEAE

PROMSIN MASRINOUL 4736165 SCMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: SUKATHIDA UBOL, Ph.D., SAMAISUKH SOPHASAN, Ph.D., JEERAYUT CHAIJARUWANICH, Ph.D.

**ABSTRACT**

The 7-mer cyclic peptide VR-3848, a natural compound extracted from the Thai tropical plant *Euphobiaceae*, has the ability to kill several cancerous cell types at nanomolar concentrations. However, the target and mechanism corresponding to the action of this compound has only been partially elucidated. To investigate the target and mechanism of VR-3848, the MCF-7 breast cancer cell was chosen as a model. The gene expression pattern at various time points during the treatment of MCF-7 cells with VR-3848 were obtained by using human whole genome microarray analysis. The VR-3848 treated cells were analyzed by using Significance Analysis of Microarray (SAM) at estimating 5% false discovery rate and using two-fold analysis. 4,075 genes whose expression significantly altered during treatment were identified. These genes were further analyzed by k-means clustering analysis. Most of the down-regulated genes functioned metabolically and controlled cell proliferation whereas most of the up-regulated genes regulated apoptosis and cell proliferation negatively. To identify the early gene response, the significantly altered genes were analyzed at one hour of treatment. The results showed that 155 genes were significantly altered. Among these genes, 52 genes had known cellular functions. Transcription and translation genes were major groups that early responded to VR-3848 treatment. Only the SRCAP gene was significantly altered at 30 minutes after treatment. It has been identified as a coactivator for steroid mediated transcription. The study did not reveal whether or not VR-3848 can interact with steroid receptor. Unfortunately, approximately 66% of gene expression at one hour of treatment revealed unknown functions. It is suggested that VR-3848 may induce cell death by an unexplored pathway.

Elucidating the anti-cancer mechanism, gene expression from the microarray analysis revealed that VR-3848 stimulated apoptosis-related genes including receptors, mitochondria and ER stress mediated pathways and suppressed cell cycle related genes. One possible anti-cancer mechanism, an inhibin mediated pathway was found. The strong up-regulation of INHBA and signaling cascade genes such as GADD45 $\beta$ , GADD153, ATF4 and ARTS suggest that the inhibin stimulated pathway is one among various death pathways stimulated by VR-3848. The finding indicates that VR-3848 exerts a potent anti-breast cancer activity by stimulation of multiple apoptotic pathways and suppression of cell cycle progression.

**KEYWORDS:** VR-3848/ CYCLIC PEPTIDE/ MCF-7 CELL/ MICROARRAY/ APOPTOSIS/ CELL CYCLE/ INHIBIN

116 P. ISBN 974-04-7632-5