

РЕФЕРАТИ СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ В «CYTOLOGY AND GENETICS», № 6, 2023 р.

SYNERGISTIC ANTI-CANCER POTENTIAL OF PHENETHYL ISOTHIOCYANATE AND CURCUMIN INDUCES APOPTOSIS AND G2/M CELL CYCLE ARREST IN HER2-POSITIVE BREAST CANCER CELLS

S. SIRIGIRIPETA¹, A. DOKALA^{2,3*}, R. ANUPALLI^{1*}

¹ Dept. of Genetics, Osmania University, Hyderabad, Telangana, India

² Dept. of Medicinal chemistry, School of Pharmacy, Anurag University, Ghatkesar, Hyderabad, India

³ Molecular signaling group, DBT-Centre for DNA finger printing and Diagnostics (CDFD), Uppal, Hyderabad, India

E-mail: prof.rojariananupalli@gmail.com, ajichembioanurag@gmail.com

HER2 expression is associated with 30 % of breast cancer patients with a poor prognosis. Though Trastuzumab is approved for HER2 targeted therapy, its use is limited because of its systemic toxicity and resistance in most patients. This study evaluated the synergistic effects of Phenethyl isothiocyanate (PEITC) and Curcumin (CUR) in HER2 overexpressing SK-BR-3, BT-474, and AU-565 breast cancer cells. The cytotoxic effect of PEITC: CUR against breast cancer cells was evaluated using an MTT assay, and the Loewe additivity model was used to evaluate the synergistic effect. Apoptosis induction and cell cycle arrest over the treatment of PEITC: CUR in breast cancer cells were examined using the flow cytometric annexin-V/Propidium iodide method. Downregulation of HER2-mediated signaling was deduced from protein expression analysis using western-blot. Our results showed that treatment of PEITC: CUR at varying levels of combinations in all three breast cancer cells extensively reduced the survival of the cells with the lowest inhibitory concentrations (IC_{50}). Cytotoxic data revealed that the 3:1 ratio of PEITC: CUR was the best among several (1:1, 3:1, and 1:3) combinations, with the maximum cytotoxicity. PEITC: CUR (3:1) displayed the lowest combination index (CI) against SK-BR-3, and AU-565 cells indicated its potential synergistic effect. At twice the concentration of its IC_{50} , the 3:1 combination elicited 3.5 to 4.5 fold apoptosis in HER2 overexpressing cells, approximately double the effect of the individual drugs alone. In addition, the selected combination induced the G2/M

cell cycle arrest in HER2 expressing cells over the treatment. Western blot protein expression analysis revealed that the PEITC: CUR combination suppressed the HER2/PI3K/Akt signaling, eventually connected to various apoptotic biological events. Our results showed the specificity of PEITC: CUR combination in inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest in HER2-expressing tumor cells in-vitro and enhancing the anti-cancer effect. For a subset of breast cancer patients who overexpress HER2, this combination of PEITC and CUR could be a potential treatment option.

Key words: Phenethyl isothiocyanate, Curcumin, Apoptosis, HER2, breast cancer.

СИНЕРГІЧНИЙ ПРОТИПУХЛІННИЙ ПОТЕНЦІАЛ ФЕНЕТИЛІЗОТІОЦІАНАТУ ТА КУРКУМІНУ ІНДУКУЄ АПОПТОЗ І ЗУПИНКУ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ G2/M В HER2-ПОЗИТИВНИХ КЛІТИНАХ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Експресію HER2 виявляють у 30 % пацієток із раком молочної залози з поганим прогнозом подальшого перебігу захворювання. Хоча трастузумаб схвалено для терапії, спрямованої на HER2, його використання обмежене через системну токсичність і резистентність багатьох пацієнтів. Мета цього дослідження полягала в оцінці синергічного впливу фенетилізотіоціанату (PEITC) та куркуміну (CUR) на клітини раку молочної залози SK-BR-3, BT-474 та AU-565 з надмірною експресією HER2. Цитотоксичний вплив PEITC: CUR на клітини раку молочної залози оцінювали з використанням МТТ-тесту, а модель аддитивності Лоу застосували для оцінки синергічного впливу. Індукцію апоптозу й зупинку клітинного циклу через обробку клітин раку молочної залози за допомогою PEITC: CUR досліджували за використання методу проточної цитометрії з аннексином-V/йодидом пропідію. Висновок щодо негативної регуляції HER2-опосередкованого сигналіngu було зроблено на підставі аналізу експресії білків із використанням Вестерн-блоттінгу. Наші результати показали, що обробка всіх трьох видів клітин раку молочної залози різними поєднаннями PEITC: CUR суттєво знизило рівень виживання клітин із найнижчими інгібіторними концентраціями (IC_{50}). Цитотоксичні дані показали, що співвідношення PEITC: CUR 3:1 було найкращим серед різних (1:1, 3:1 і 1:3) комбінацій, з максимальною цитотоксичністю. Поєднання PEITC: CUR (3:1)

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2023

мало найнижчий показник адитивності (CI) щодо SK-BR-3, а клітини AU-565 показали свій потенційний синергічний ефект. При подвійній концентрації своєї IC₅₀ поєднання 3:1 підвищило рівень апоптозу клітин із надмірною експресією HER2 з 3,5 до 4,5 разів, приблизно подвоївши вплив речовин, застосованих поодиножко. Крім того, завдяки обробці вибране поєднання індукувало зупинку клітинного циклу G2/M в клітинах із надмірною експресією HER2. Вестерн-блоттинг аналіз експресії білків показав, що поєднання PEITC:CUR пригнітило сигналінг HER2/PI3K/Akt, пов'язаний із різними апоптичними біологічними подіями. Наші результати продемонстрували специфічність поєднання PEITC:CUR в індукованні апоптозу й зупинки клітинного циклу G2/M в клітинах пухлин із надмірною експресією HER2 *in vitro* та підвищенні протипухлинного ефекту. Це поєднання PEITC і CUR може бути потенційним варіантом лікування для підгрупи пацієнтів із раком молочної залози, які демонструють надмірну експресію HER2.

Ключові слова: фенетилізотіоціанат, куркумін, апоптоз, HER2, рак молочної залози.

REFERENCES

- Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC et al (2003) Anti-cancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 23:363–398. <https://doi.org/10.23122a:363-98>
- Agrawal S (2014) Late effects of cancer treatment in breast cancer survivors. *South Asian J Can* 3(2):112–115. <http://doi.org/10.4103/2278-330X.130445>
- Aman NA, Doukoure B, Koffi KD et al (2019) HER2 overexpression and correlation with other significant clinicopathologic parameters in Ivorian breast cancer women. *BMC Clin Pathol* 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12907-018-0081-4>
- Boreddy SR, Srivastava SK (2013) Deguelin suppresses pancreatic tumor growth and metastasis by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition in an orthotopic model. *Oncogene* 32(34):3980–3991. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.413>
- Cang S, Ma Y, Chiao JW, Liu D et al (2014) Phenethyl isothiocyanate and paclitaxel synergistically enhanced apoptosis and alpha-tubulin hyperacetylation in breast cancer cells. *Exp Hematol Oncol* 3:5–13. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-3-5>
- Cavell BE, Syed Alwi SS, Donlevy AM, Proud CG, Packham G et al (2012) Natural product-derived anti-tumor compound phenethyl isothiocyanate inhibits mTORC1 activity via TSC2. *J Nat Prod* 75:1051–1057. <https://doi.org/10.1021/np300049b>
- Daniela B, Cinzia G, Francesca DA, Marilena L, Sebastiano A et al (2016) Natural Products as Promising Antitumoral Agents in Breast Cancer: Mechanisms of Action and Molecular Targets. *Mini Rev Med Chem* 16(8):596–604. <https://doi.org/10.2174/1389557515666150709110959>
- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC et al (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300–304. <https://doi.org/10.1038/40901>
- Dubrez DL, Dupoux A, Cartier J (2008) IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle* 7:1036–1046. <https://doi.org/10.4161/cc.7.8.5783>
- Fadus MC, Lau C, Bikhchandani J, Lynch HT et al (2016) Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. *J Tradit Complement Med* 7:339–346. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.08.002>
- Gong A, He M, Krishna VD, Yin P, Karnes RJ, Young CY et al (2009) Phenethyl isothiocyanate inhibits STAT3 activation in prostate cancer cells. *Mol Nutr Food Res* 53(7):878–886. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800253>
- Grogan F, Cobain EF (2022) Breast cancer management in 2021: A primer for the obstetrics and gynecology. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 26(8):1521–1534. <http://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2022.02.004>
- Han X, Deng S, Wang N, Liu Y, Yang X et al (2016) Inhibitory effects and molecular mechanisms of tetrahydrocurcumin against human breast cancer MCF-7 cells. *Food Nutr Res* 60:3061–3066. <https://doi.org/10.3402/fnr.v60.30616>
- Harbeck N, Penault LF, Cortes J, Michael G, Nehmat H, Philip P et al (2019) Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 5(1):66–79. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Henjes F, Bender C, Vonder HS, Braun L, Mannsperger HA, Schmidt C et al (2012) Strong EGFR signaling in cell line models of ERBB2-amplified breast cancer attenuates response towards ERBB2-targeting drugs. *Oncogenesis* 2:1–16. <https://doi.org/10.1038/onsis.2012.16>
- Hu A, Huang JJ, Zhang JF et al (2017) Curcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo* through ATM/Chk2/p53-dependent pathway. *Oncotarget*. 8(31):50747–50760. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17096>
- Hudis CA (2007) Trastuzumab mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 357(1):39–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043186>
- Karunakaran D, Rashmi R, Kumar TR et al (2005) Induction of apoptosis by curcumin and its implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 5(2):117–129. <https://doi.org/10.2174/1568009053202081>
- Lai HW, Chien SY, Kuo SJ, Ling MT, Hui YL, Chin WC (2012) The potential utility of curcumin in the treatment of HER-2-overexpressed breast cancer: an

- in vitro* and *in vivo* comparison study with Herceptin. Evid Based Compl Altern Med 12:486–493. <https://doi.org/10.1155/2012/486568>
- Lederer S, Dijkstra T, Heskes T et al (2018) Additive Dose-Response Models: Explicit Formulation and the Loewe Additivity Consistency Condition. Front Pharmacol 9:31–39. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00031>
- Martinez CM, Villegas SN, Meraz-Rios MA et al (2018) Curcumin differentially affects cell cycle and cell death in acute and chronic myeloid leukemia cells. Oncol Lett 15(5):6777–6783. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8112>
- Mashati P, Esmaili S, Dehghan N, Bashash D, Darvishi M, Gharehbaghian A et al (2019) Methanolic Extract from Aerial Parts of Artemisia Annua L. Induces Cytotoxicity and Enhances Vincristine-Induced Anticancer Effect in Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 13(3):132–139. [https://doi.org/2019-Jul-1-13\(3\):132-139](https://doi.org/2019-Jul-1-13(3):132-139)
- Meric BF, Hung MC (2006) Advances in targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy. Clin Cancer Res 12(21):6326–6330. <https://doi.org/10.3810/hp.2012.10.997>
- Moon YJ, Brazeau DA, Morris ME et al (2011) Dietary phenethyl isothiocyanate alters gene expression in human breast cancer cells. Evid Based Compl Alter Med 20(1):46251–46258. <https://doi.org/10.1155/2011/462525>
- Oh D, Bang Y (2020) HER2-targeted therapies – a role beyond breast cancer. Nat Rev Clin Oncol 17:33–48. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0268-3>
- Ortega MA, Fraile MO, Asúnsolo Á, Buján J, García HN (2020) Coca in Breast Cancer: The Important Role of PI3K/Akt/mTOR. J Oncol 1:125–136. <https://doi.org/10.1155/2020/9258396>
- Park JE, Sun Y, Lim SK et al (2017) Dietary phytochemical PEITC restricts tumor development via modulation of epigenetic writers and erasers. Sci Rep 12(7):405–412. <https://doi.org/10.1038/srep40569>
- Rowe DL, Ozbay T, Regan RM, Rita N et al (2009) Modulation of the BRCA1 protein and induction of apoptosis in triple-negative breast cancer cell lines by the polyphenolic compound curcumin. Breast Cancer (Auckl.) 3:61–75. <https://doi.org/10.4137/bcbr.s3067>
- Sarkars R, Mukherjee S, Roy M et al (2013) Targeting heat shock proteins by phenethyl isothiocyanate results in cell-cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. Nutrit Cancer 65:480–493. <https://doi.org/10.1080/01635581.2013.767366>
- Shao ZM, Shen ZZ, Liu CH, Maryam R, Vay LG, David H et al (2002) Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. Int J Cancer 98:234–240. <https://doi.org/10.1002/ijc.10183>
- Shishodia S, Sethi G, Aggarwal BB et al (2005) Curcumin: Getting back to the roots. Ann NY Acad Sci 1056:206–217. <https://doi.org/10.1196/annals.1352.010>
- Shoaib S, Tufail S, Sherwani MA et al (2021) Phenethyl Isothiocyanate Induces Apoptosis Through ROS Generation and Caspase-3 Activation in Cervical Cancer Cells. Front Pharmacol 12(3):673–682. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.673103>
- Singh AV, Xiao D, Lew KL, Dhir R, Singh et al (2004) Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts *in vivo*. Carcinogenesis 25:83–90. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg178>
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 235(4785):177–182. <https://doi.org/10.1126/science.3798106>
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt, JA, Wong SG, Keith DE et al (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 244(4905):707–712. <https://doi.org/10.1126/science.2470152>
- Subik K, Lee JF, Baxter L, Tamera S, Dawn C, Patti C et al (2010) The Expression Patterns of E.R., PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and A.R. by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. Breast Can (Auckl) 4:35–41. <https://doi.org/10.1177/1178223418806626>
- Syed Alwi SS, Cavell BE, Donlevy A, Packham G et al (2012) Differential induction of apoptosis in human breast cancer cell lines by phenethyl isothiocyanate, a glutathione depleting agent. Cell Stress Chaperon 17: 529–538. <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0329-3>
- Upadhyaya B, Liu Y, Dey M (2019) Phenethyl Isothiocyanate Exposure Promotes Oxidative Stress and Suppresses Sp1 Transcription Factor in Cancer Stem Cells. Inter J Mol Sci 20(5):1027–1034. <https://doi.org/10.3390/ijms20051027>
- Wang J, Xu B (2019) Targeted therapeutic options and future perspectives for HER2-positive breast cancer. Signal Transduct Target Ther 4(34). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0069-2>
- Xiao D, Zeng Y, Choi S, Lew KL, Nelson JB, Singh SV et al (2005) Caspase-dependent apoptosis induction by phenethyl isothiocyanate, a cruciferous vegetable-derived cancer chemopreventive agent, is mediated by Bak and Bax. Clin Cancer Res 11(2670):9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1545>
- Zhang Y (2004) Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. Mutat Res 555:173–190. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.04.017>

Received April 03, 2022

Received June 21, 2022

Accepted November 18, 2023