

งานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นผลของสาร EGCG ต่อการลด cytosolic fatty acid synthesis โดยการยับยั้งการทำงานของ ATP citrate lyase enzyme ซึ่งจะส่งผลยับยั้งหรือลดการ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็ง โดยจะแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น กลุ่มเซลล์ control และกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ EGCG ที่ความเข้มข้น 1-100 μM เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง

ข้อมูลต่างๆที่ต้องตรวจวัดและวิเคราะห์ได้แก่

1. วิเคราะห์ปริมาณของ ATP citrate lyase enzyme
2. วิเคราะห์ cell viability
3. วิเคราะห์การเกิด apoptosis

ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2

Human hepatocellular carcinoma, HepG2 cells ซึ่งสั่งซื้อจาก the American Type Culture Collection (ATCC) จะใช้เป็นเซลล์ทดลองในการทดลองนี้ โดยเซลล์จะเพาะเลี้ยงใน 37°C a humidified incubator with 5% CO₂/95% air atmosphere โดยใช้ media ชนิด DMEM ซึ่ง supplement ด้วย 10% fetal bovine serum, 3 mM L-glutamine, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin and 100 U/ml penicillin. โดยเซลล์จะถูก subculture ประมาณ 2 ครั้ง/สัปดาห์

2. Cell proliferation assay

เพื่อพิสูจน์ผลของสาร EGCG ต่อการยับยั้ง Cell proliferation ของ HepG2 cells ทำการวิเคราะห์โดย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (sigma) assays วิธีการคือ adding 15 μl MTT (5 mg/ml) ในแต่ละ well เป็นเวลา 4 h ที่ room temperature ถึง 37°C Supernatants จะถูก removed หลังจากนั้นการ form ตัวของ formazan จาก tetrazolium salt จะสามารถ solubilized ได้โดยใส่ 100 $\mu\text{l/well}$ dimethyl sulfoxide (DMSO, Amresco) และ shake เป็นเวลา 10 นาที ค่า absorbance value (OD) ของแต่ละ well จะทำการวัดด้วย microplate photometer ที่ 540 nm

ผลการทดลองพบว่า proliferation ของ HepG2 cells จะถูกยับยั้งเมื่อได้รับ EGCG ตั้งแต่ 50 $\mu\text{mole/L}$ จนถึง 1 mmole/L ที่ 24 48 และ 72 ชม. โดยที่ the highest inhibitory rate มีค่าประมาณ 60% เมื่อได้รับ EGCG 1 mmole/L ที่ 48 ชม. ($p < 0.001$) และมีค่าประมาณ 69% เมื่อได้รับ EGCG 1 mmole/L ที่ 72 ชม. ($p < 0.001$) ดังแสดงใน table 1 และ figure 1

Table 1 : Impact of EGCG treatment for 24, 48 and 72 h on HepG2 cell viability analyzed by MTT assay

EGCG ($\mu\text{mol/L}$)	% cell viability		
	24 h	48 h	72 h
0	100 \pm 9.54	100 \pm 6.34	100 \pm 11.47
50	104.39 \pm 13.19	98.35 \pm 5.56	93.45 \pm 6.89
100	112.59 \pm 8.45	93.07 \pm 4.35	83.93 \pm 8.91
200	112.88 \pm 6.62	85.05 \pm 4.16	52.5 \pm 3.08**
300	110.57 \pm 9.23	72.94 \pm 5.76*	45.97 \pm 2.91**
500	96.75 \pm 12.71	59.95 \pm 4.85**	34.84 \pm 2.71**
1000	93.77 \pm 10.86	41.68 \pm 4.11**	30.91 \pm 4.49**

Data are represented as mean \pm SEM, $n=3$.

* $p<0.05$ and ** $p<0.001$, significantly different from control, untreated group.

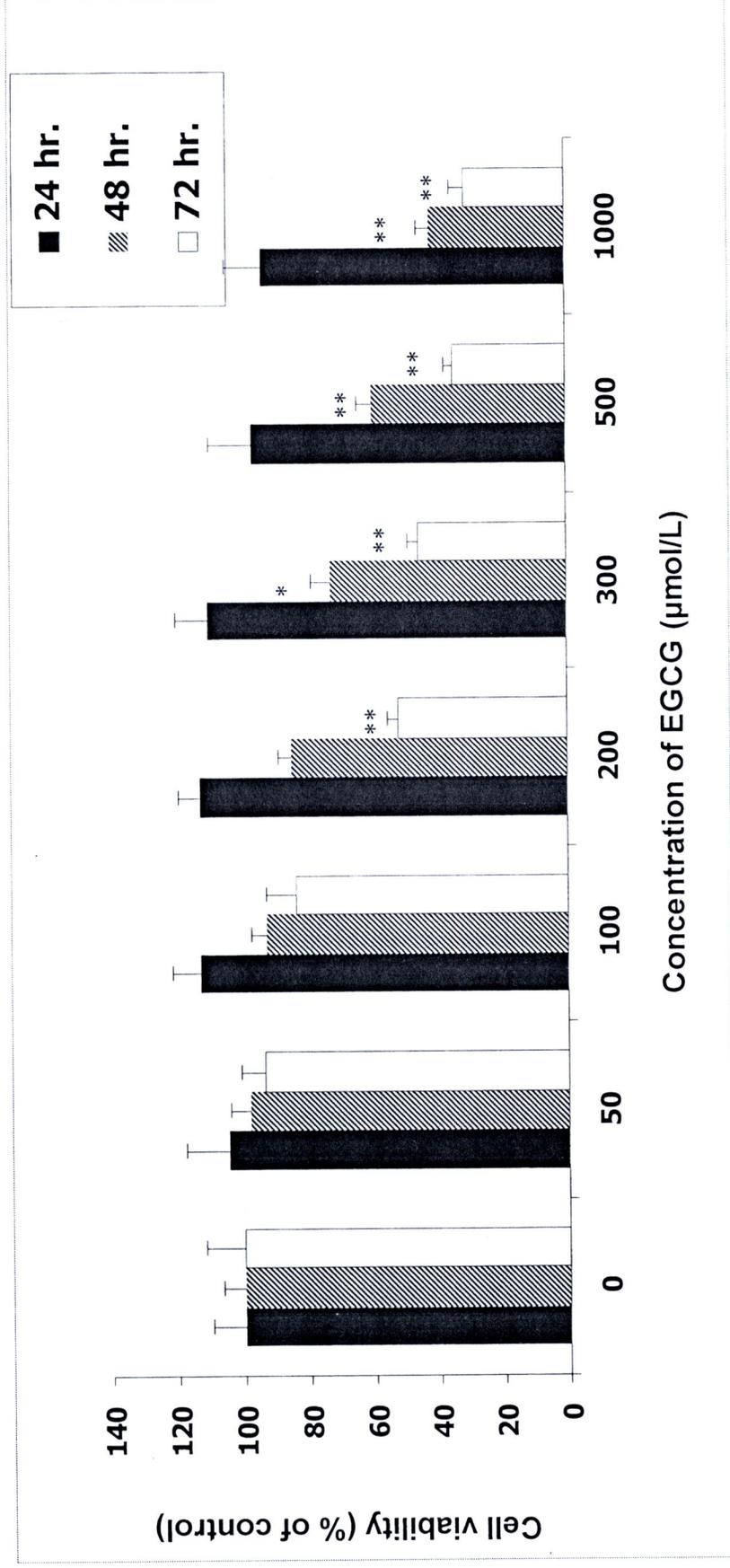


Figure 1 Impact of EGCG treatment for 24, 48 and 72 h on HepG2 cell viability. HepG2 cells were treated with EGCG at 50 to 1000 µmole/L for 24, 48, and 72 h. At the indicated time points after EGCG treatment, cells were analyzed by MTT assay. Data shown are representative for three independent experiments; columns indicate means; bars are the standard error. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$, significantly different from control, untreated group.

6. FASN expression by immunoblot analysis

เตรียม Cell extract โดยใช้ M-PER lysis buffer หลังจากนั้นทำการวัด Protein concentrations โดยการ diluted samples ด้วยวิธีการของ a bicinchoninic acid procedure ตาม protocol (Pierce Biochemical Company, Rockford, IL) ทำ Western analysis โดยใช้ triplicate experiments ทำการ load Equal amounts of protein ให้แยกด้วย NuPage Tris-acetate gel (Invitrogen) และ electrotransferred ไปที่ polyvinylidene difluoride membranes (Roche, Mannheim, Germany) หลังจากนั้น incubate Membranes ด้วย rapid blocking solution (Amresco, USA) และทำการ probed ด้วย antibodies against FASN และ ACL (Abcam) Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody ด้วย Novex® ECL, HRP Chemiluminescent substrate reagent kit (Invitrogen) เพื่อจะ detect the immunoreactive protein ด้วย chemiluminescence (ImageQuant™ LAS 4000, GE Healthcare BIO-Science AB, Sween) วิธีการทดลองนี้ทำเพื่อ determine the effect ของ piperien ต่อการ expression ของ FASN และ ACL protein โดยที่พบว่า การ expression ของ FASN และ ACL protein ในกลุ่มที่ได้รับการ treat ด้วย EGCG โดยเฉพาะที่ EGCG ความเข้มข้น 200, 300, 400, 500 และ 1,000 $\mu\text{mole/L}$ เป็นเวลา 48 ชม. มีผลให้การ expression ของ FASN และ ACL protein ลดลงอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control cells ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า EGCG มีผลต่อการ expression ของ FASN และ ACL protein ซึ่งมีบทบาทในการ regulates intracellular de novo fatty acid synthesis ใน HepG2 cells

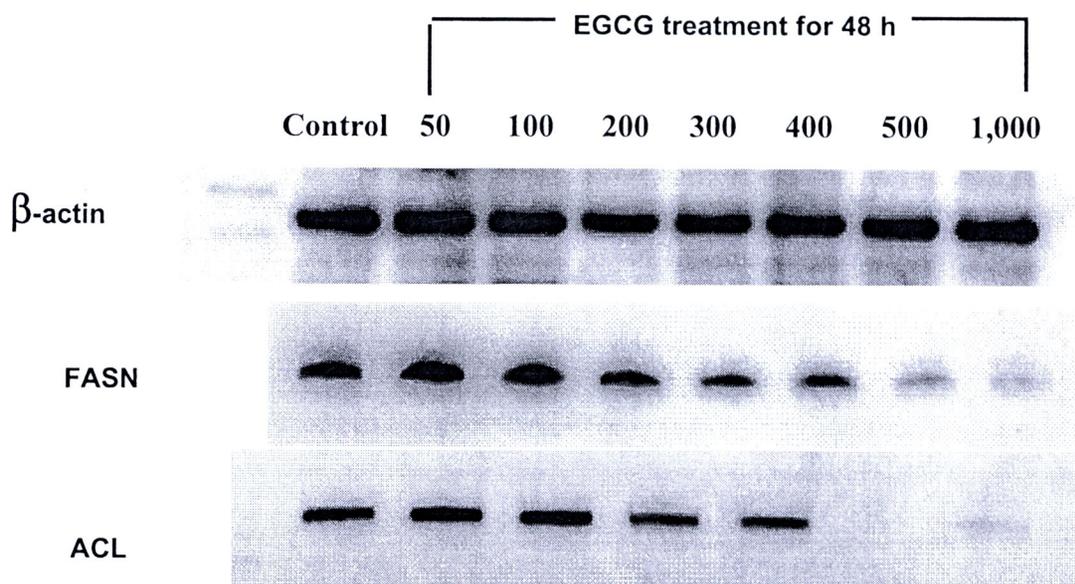


Figure 2 Impact of EGCG on FASN และ ACL protein expression. HepG2 cells were treated with EGCG at 50 to 1000 $\mu\text{mole/L}$ for 48 h. Protein extracts were made and FASN และ ACL protein levels were determined by Western blot analysis. 42 kD β -actin expression was used as internal control.

7. Analysis on externalization of phosphatidylserine (PS) , the early stage of apoptosis

เพื่อศึกษาผลของ EGCG ในด้าน cytotoxic effect ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis, การวิเคราะห์ HepG2 cells apoptosis จะใช้วิธีโดย flow cytometry ซึ่งวิธีการคือ การ stain cells ด้วย Annexin V/propidium iodide เพื่อศึกษาการ externalization ของ phosphatidylserine (PS) ซึ่งเป็นการศึกษาการเกิด early apoptosis The attached และ detached cells จะเก็บจาก culture media ทั้งหมด การศึกษาผลของ EGCG ในการทำให้เกิด apoptosis จะทำการศึกษาโดยใช้ Alexar Flour[®] 488 Annexin V และ propidium iodide (PI) apoptosis detection kit (Invitrogen) ใช้วิธีการตาม manufacturer's instructions โดยการ wash cell หลังจากนั้นใส่ 300 μl ของ 1X binding buffer containing 5 μl ของ Alexar Flour[®] 488 Annexin V และ 10 μl ของ PI และทำการ incubate เป็นเวลา 15 นาทีที่ room temperature ภายใต้ห้องมืด หลังจากนั้น apoptosis จะถูกวิเคราะห์โดย flow cytometer (BD FACSCaliber, BECTON DICKINSON, California, CA) ผลที่ cells ติดสี Annexin V-positive และ PI-negative fraction จะถูกวิเคราะห์ว่าอยู่ในช่วง early apoptotic

จากการศึกษาที่ผ่านมามีพบว่าการเกิด advanced DNA fragmentation มีเหตุการณ์เกิดก่อนคือการเปลี่ยนแปลงของ plasma membrane เช่นการเกิด PS externalization ในช่วง early apoptosis นั้น ความเป็น plasma membrane asymmetry จะสูญเสียไป โดยดูได้จาก การเกิด externalization ของ PS ดังผลการทดลองใน Table และ Figure ข้างล่าง พบว่า untreated cells มีการเกิด early apoptosis ซึ่งพบว่ามี negative ของทั้งการติดสีทั้ง Annexin V และ PI ซึ่งแสดงให้เห็นว่า cell เป็น viable cells จากผลการทดลองพบว่า early apoptotic cells มีค่าประมาณ 11% , 18%, และ 25% เมื่อ incubate cell เป็นเวลา 48 ชม. ที่ความเข้มข้นของ EGCG 50, 300, 500 และ 1,000 $\mu\text{mole/L}$ เป็นที่น่าสังเกตว่า พบมีการเพิ่มขึ้นของ late apoptotic cells จากค่าประมาณ 0.76% เป็น 89% เมื่อ incubate cell ด้วย EGCG ที่ 1 mmole/L เป็นเวลา 48 ชม. ในขณะที่ early apoptotic cells พบว่ามีค่าประมาณ 19% , 20%, และ 12% เมื่อ incubate cell ด้วย EGCG เป็นเวลา 72 ชม. ที่ความเข้มข้น 10, 300, และ 500 $\mu\text{mole/L}$ และพบว่ามีค่าลดลงเป็น 8% ที่ความเข้มข้นของ EGCG ที่ 1,000 $\mu\text{mole/L}$ และยังพบว่า late apoptotic cells มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 8% เป็น

81% เมื่อ incubate cell ที่ความเข้มข้น 1 mmole/L เป็นเวลา 72 ชม. ดังแสดงในตาราง และกราฟข้างล่าง

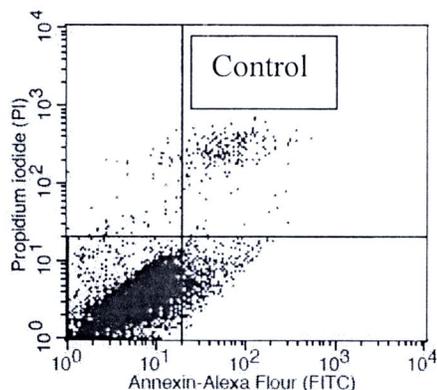
Table 2 : Impact of EGCG treatment for 48 h on HepG2 cell apoptosis analyzed by flow cytometry with an Alexar Flour[®] 488 Annexin V and propidium iodide (PI) staining

	Control	50 µmol/L	300 µmol/L	500 µmol/L	1 mmol/L
Viability	91.99±6.10	79.49±13.10	71.83±12.19	49.34±4.37	3.42±3.03
Early	2.01±0.22	11.03±11.52	18.78±11.57	25.28±10.96	0.76±0.21
Late	4.28±3.97	8.35±2.20	8.58±1.53	24.52±9.27	89.00±4.56

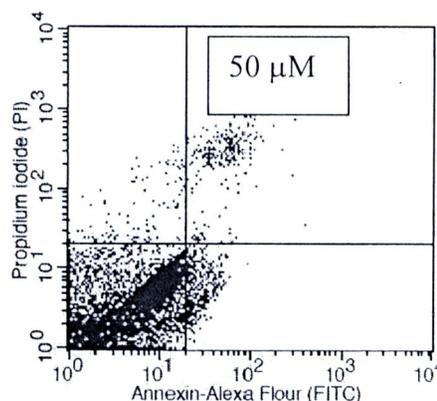
Data are represented as mean ± SEM, n=3.

*p<0.05 and **p<0.001, significantly different from control, untreated group.

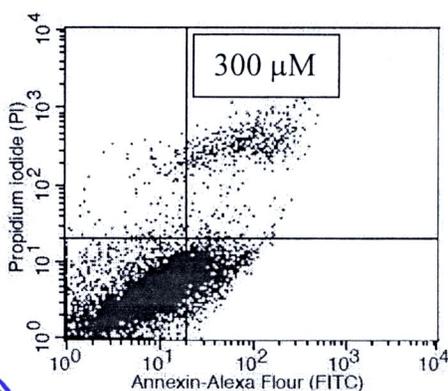
A.



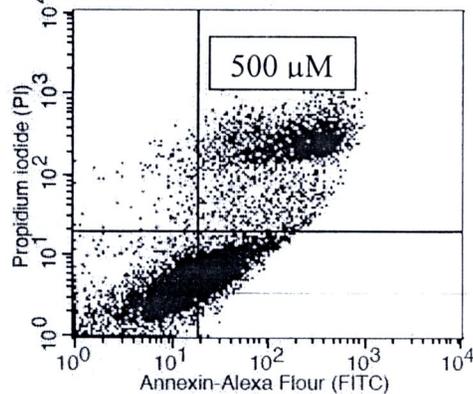
B. EGCG treatment for 48 h



C. EGCG treatment for 48 h



D. EGCG treatment for 48 h



E. EGCG treatment for 48 h

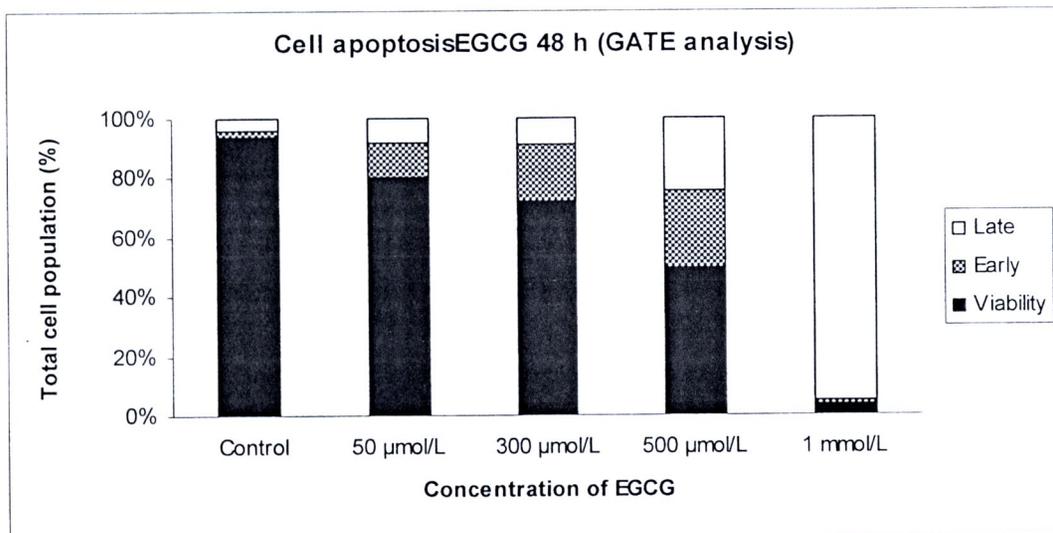
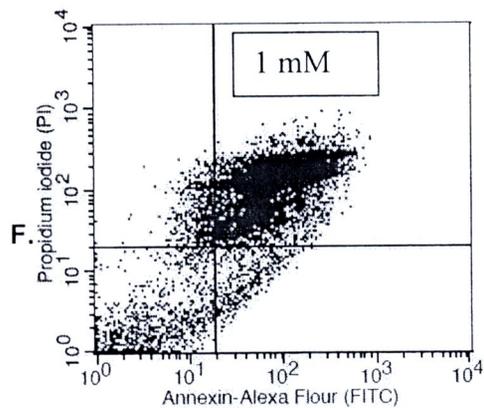


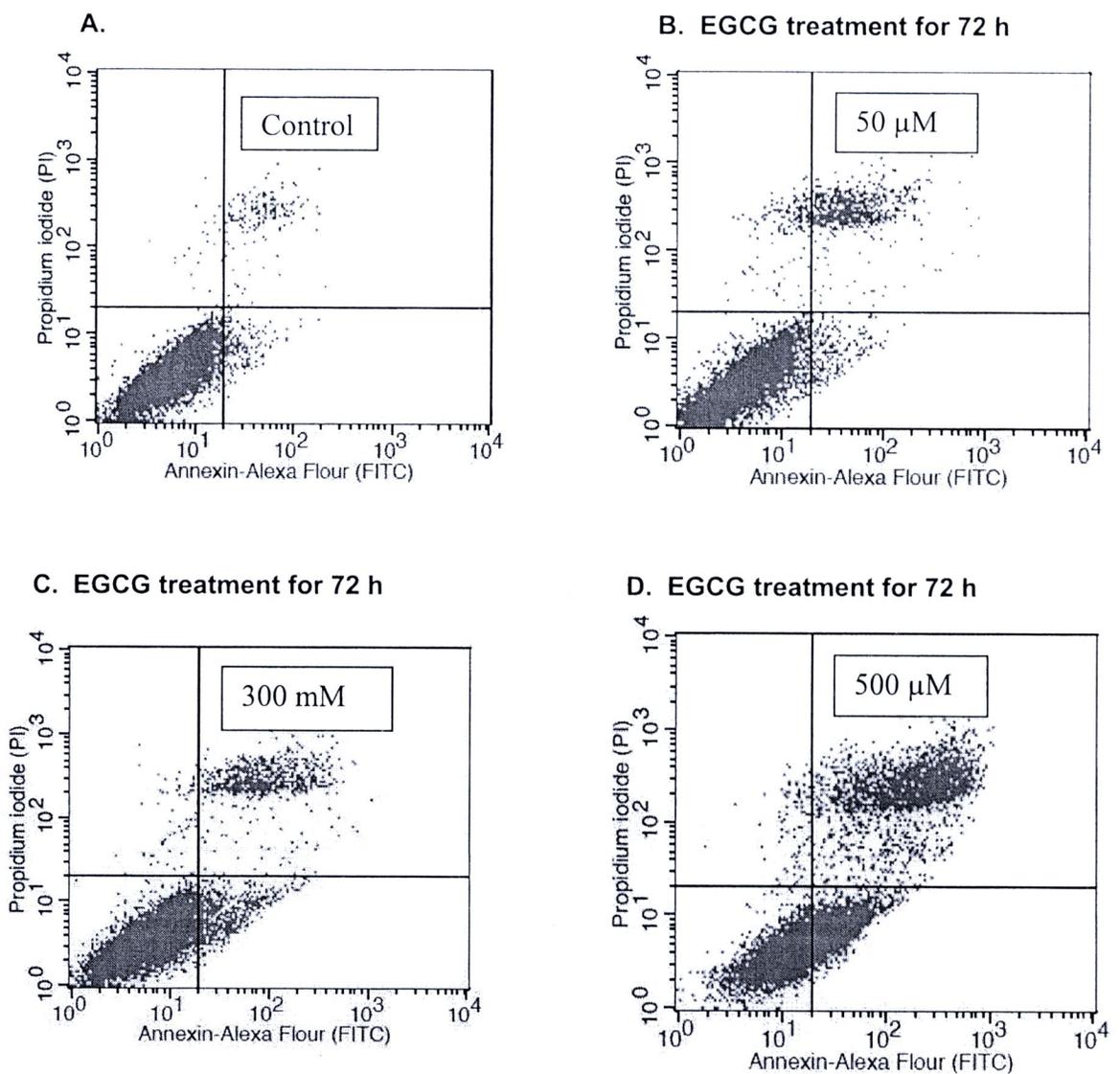
Figure 3 Effect of 48 h EGCG-induced an externalization of PS, the early stage of apoptosis of HepG2 cells. At the indicated time points after treatment, cells were collected and double stained with Alexar Flour[®] 488 Annexin V and propidium iodide and analyzed by flow cytometry as described above (no gated analysis). A. to E. represents dual parametric dot plots of propidium iodide fluorescence (y-axis) versus Alexar Flour[®] 488 Annexin fluorescence (x-axis). D. bar charts showing the proportion of viable, early apoptotic, and late apoptotic cells. Early apoptotic cells were defined as Annexin V-positive, PI-negative cells. Values are mean \pm S.E.M. from three experiments.

Table 3 : Impact of EGCG treatment for 72 h on HepG2 cell apoptosis analyzed by flow cytometry with an Alexar Flour[®] 488 Annexin V and propidium iodide (PI) staining

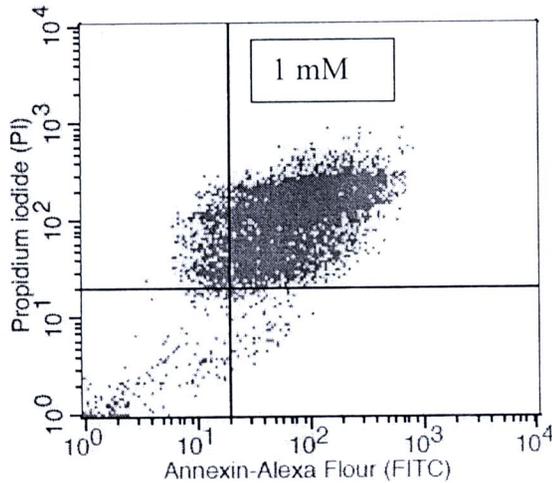
	Control	50 $\mu\text{mol/L}$	300 $\mu\text{mol/L}$	500 $\mu\text{mol/L}$	1 mmol/L
Viability	91.31 \pm 2.7	67.31 \pm 19.13	65.22 \pm 20.89	56.74 \pm 13.09	5.33 \pm 2.11
Early	2.44 \pm 1.32	19.45 \pm 15.88	20.85 \pm 16.15	12.95 \pm 9.89	8.08 \pm 2.68
Late	5.52 \pm 1.93	10.63 \pm 8.29	12.7 \pm 7.70	28.53 \pm 5.06	81.22 \pm 4.14

Data are represented as mean \pm SEM, $n=3$.

* $p<0.05$ and ** $p<0.001$, significantly different from control, untreated group.



E. EGCG treatment for 72 h



F.

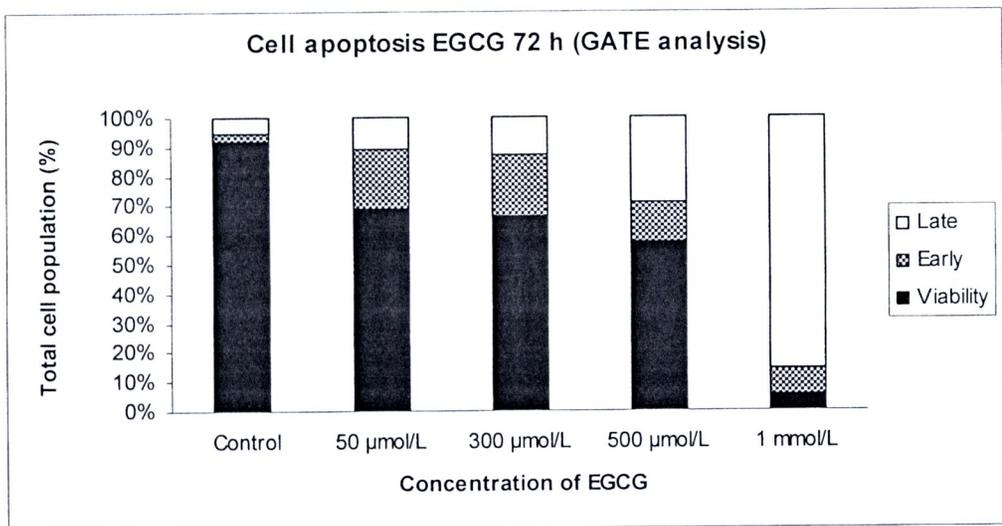


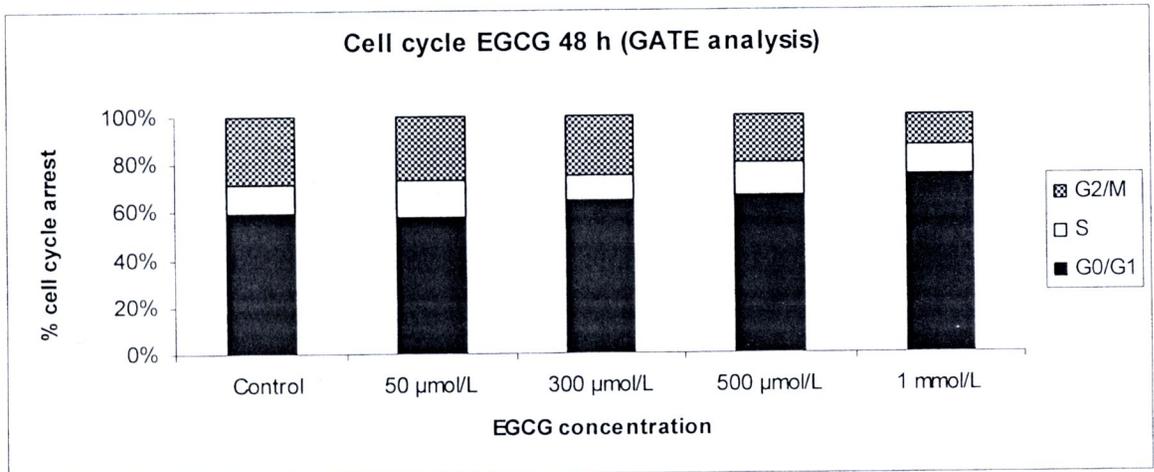
Figure 4 Effect of 72 h EGCG-induced an externalization of PS, the early stage of apoptosis of HepG2 cells. At the indicated time points after treatment, cells were collected and double stained with Alexar Flour[®] 488 Annexin V and propidium iodide and analyzed by flow cytometry as described above (no gated analysis). A. to E. represents dual parametric dot plots of propidium iodide fluorescence (y-axis) versus Alexar Flour[®] 488 Annexin fluorescence (x-axis). D. bar charts showing the propotion of viable, early apoptotic, and late apoptotic cells. Early apoptotic cells were defined as Annexin V-positive, PI-negative cells. Values are mean \pm S.E.M. from three experiments.

8. Cell cycle analysis

การวิเคราะห์ผลของ EGCG ต่อ programmed cell death สามารถวัดโดยการประเมิน cell cycle ซึ่งจะทำการวิเคราะห์โดย flow cytometry analysis หลังจาก incubate cell ด้วย EGCG เป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชม. แล้ว ทำการ trypsinization cell เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้น washed ด้วย ice-cold PBS 2 ครั้ง หลังจากนั้น fixed ด้วย 75% cold ethanol ที่ 4°C overnight เตรียม Propidium iodide (PI) ที่ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ และ RNase A ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ใช้ในการ stain the nuclei เพื่อศึกษา phases ของ cell cycle ซึ่งจะใช้เวลา incubate นาน 6 ชม. การวัด fluorescence ของ DNA-bound PI ภายในเซลล์ จะใช้ flow cytometer (BD FACSCaliber, BECTON DICKINSON, California, CA)

ดัง Figure ข้างล่างนี้, EGCG treatment เป็นเวลา 48 และ 72 h จะพบการเพิ่มขึ้นของ cells ใน G1/G0 phase เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ในกลุ่ม control พบว่ามีเซลล์อยู่ในช่วง G1/G0 phase ประมาณ 59.4%, พบว่ามีเซลล์อยู่ในช่วง S phase 12.87% และพบว่ามีเซลล์อยู่ในช่วง mitosis (M) phase 28.20% หลังจาก incubate cell เป็นเวลา 48 h ด้วย EGCG ที่ความเข้มข้น 300, 500, และ 1,000 $\mu\text{mole/L}$ พบว่า HepG2 cells อยู่ในช่วง G1/G0 phase มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 65.21%, 66.83% และ 74.86% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ที่อยู่ในช่วง S phase มีค่าเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก และยังพบว่าเซลล์ในช่วง M phase มีค่าลดลงเป็น 24.77% , 19.62%, และ 13.35% ที่ EGCG ความเข้มข้น 300, 500, และ 1,000 $\mu\text{mole/L}$ ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่ม control เมื่อ incubate cell เป็นเวลา 72 ชม. พบว่าเซลล์ในช่วง G1/G0 phase มีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่เซลล์ในช่วง S phase ลดลงเป็น 11.05% , 10.67%, และ 9.75% ที่ EGCG ความเข้มข้น 300, 500, และ 1,000 $\mu\text{mole/L}$ ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า EGCG มีผลทำให้เกิดการ arrest ของ HepG2 cells ในช่วง G1/G0 phase

A.



B.

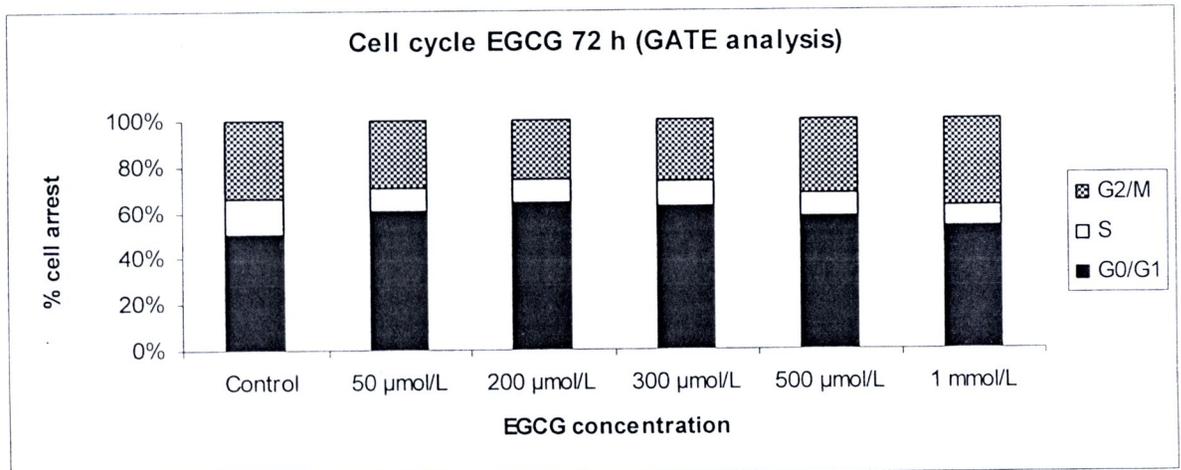


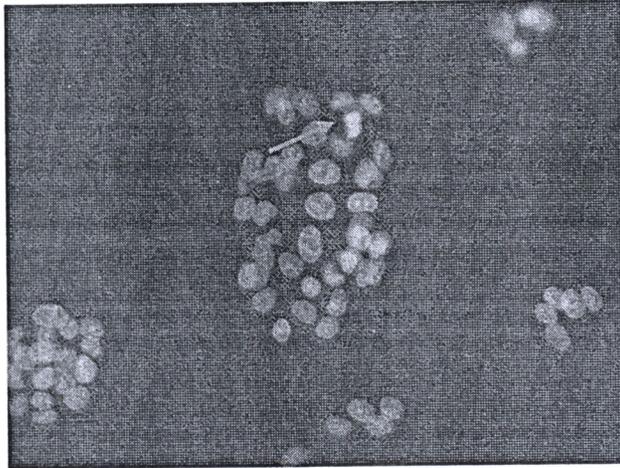
Figure 6 A and B represents the effect of EGCG treatment on cell cycle progression. After 48 and 72 h of treatment, cells were fixed with 75% ethanol overnight and incubated with RNase A and propidium iodide for 6 h. DNA content was assessed by flow cytometry. Each point represents the mean \pm SEM of three independent experiments.

9. Detection of apoptosis by fluorescence microscopy using DAPI apoptosis assay

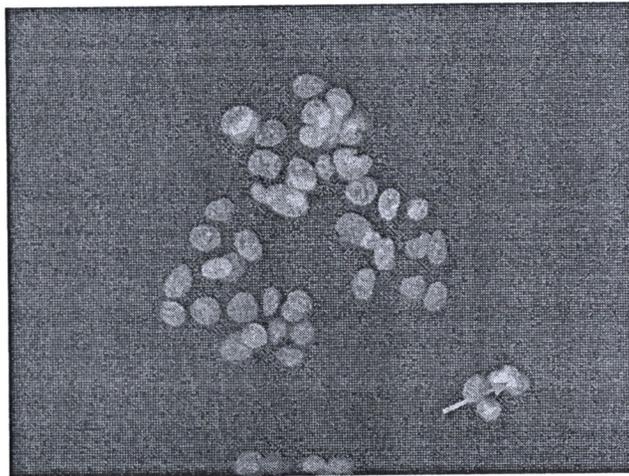
การศึกษาผลของ EGCG ที่มีต่อการเกิด apoptosis สามารถวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ nuclear morphology ในขณะที่เกิด apoptosis ได้ โดยการ stain ด้วย 4',6'-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) เซลล์จะถูก incubate ด้วย EGCG เป็นเวลา 48 และ 48 ชม. เซลล์ทั้งที่ attached และ detached จะเก็บรวมกัน หลังจากนั้นทำการ wash ด้วย PBS และ fixation ใน 75% ethanol ที่ 4°C overnight ต่อมา fixed cells จะถูก wash ด้วย PBS และการเปลี่ยนแปลงของ nuclear morphology ในขณะที่เกิด apoptosis จะถูก stain ด้วย DAPI เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เซลล์ที่มีลักษณะ nuclear breakdown จะถูก capture โดย fluorescence microscopy ซึ่งจะพบการเกิด fragmentation ของ nucleus เป็น oligonucleosomes และ chromatin condensation

การเกิด apoptosis จะมีลักษณะพิเศษทาง morphological features คือ chromatin condensation, nuclear fragmentation, และ membrane blebbing ผลการทดลองดังภาพข้างล่าง พบว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงของ nuclear เมื่อได้รับ EGCG ในขณะที่กลุ่ม ไม่พบการเปลี่ยนแปลง พบว่า the nuclei ยัง intact มีลักษณะ round และ uniformly เมื่อได้รับการ stained ด้วย DAPI

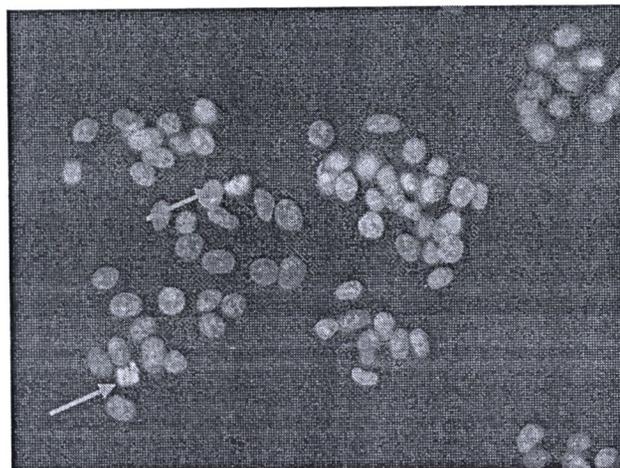
A. Control , untreated cells for 24 h



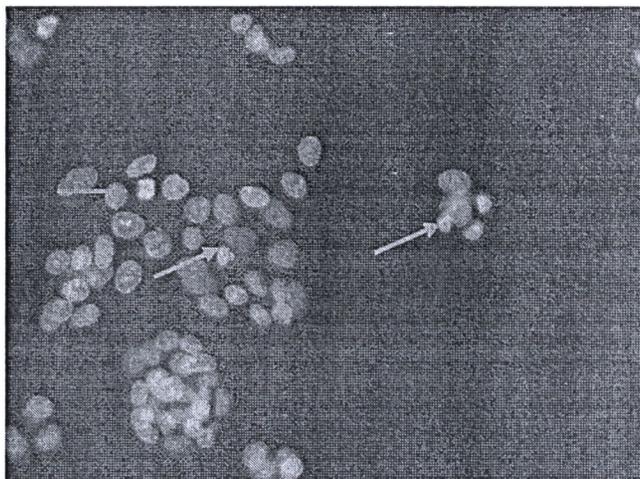
B. EGCG 50 μ mole/L for 24 h treated cells



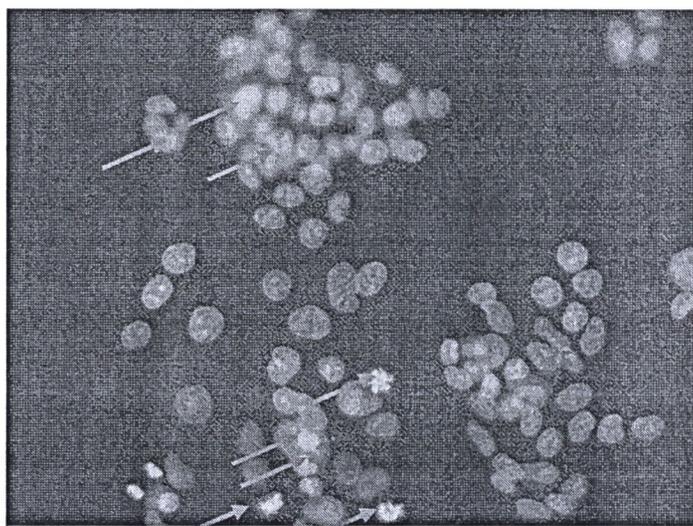
C. EGCG 300 μ mole/L for 24 h treated cells



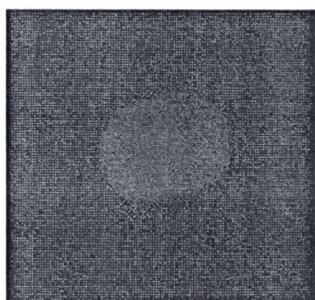
D. EGCG 500 $\mu\text{mole/L}$ for 24 h treated cells



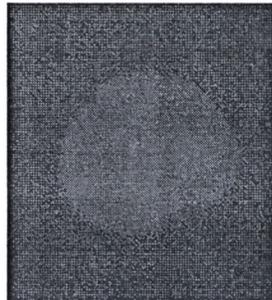
E. EGCG 1,000 $\mu\text{mole/L}$ for 24 h treated cells



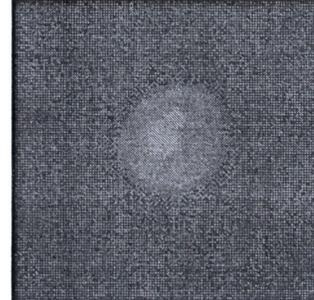
F-1



F-2



F-3



F-4

F-5

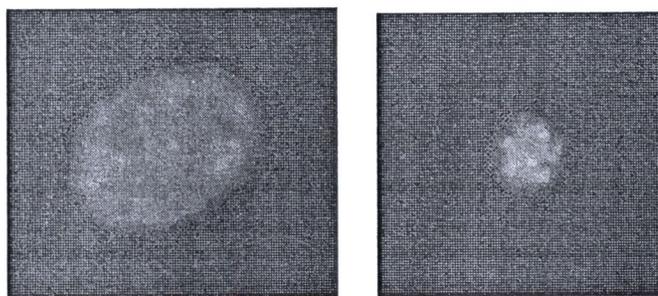


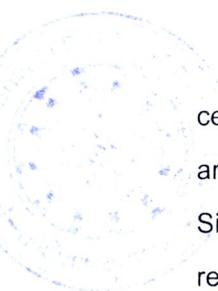
Figure 6 Effect of EGCG on nuclear alterations in HepG2 cells. Cells were stained with DAPI and visualized by fluorescence microscopy. The arrows in A to F indicate nuclear shrinkage, condensation, or fragmentation with 100x magnification.

10. Data analysis

ในทุกๆการทดลอง จะใช้ตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่างเป็นอย่างต่ำ Data จะถูกวิเคราะห์และแสดงเป็นค่า means \pm SEM ค่า data ที่มีความแตกต่างจากกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะใช้วิธีวิเคราะห์โดย Student *t*-test หรือ one-way ANOVA สำหรับกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการเปรียบเทียบมากกว่า 2 กลุ่ม ที่ค่าความเชื่อมั่น $p < 0.05$ หรือ $p < 0.001$

Discussion

Tea is one of the most common beverages consumed worldwide, and its possible beneficial health effects have received a great deal of attention. The inhibitory action of tea against experimental carcinogenesis has been demonstrated in many animal models, including cancer of the lung, skin, esophagus, liver and stomach. About 10% of the dry weight of green tea is flavan-3-ols which include (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG). In recent years, the cancer-therapeutic potential of green tea polyphenols, particularly EGCG has been shown to inhibit cell growth and induce apoptosis of various human cancer cells with little or no effect on normal cells. An understanding of the factors regulating the expression and function of lipid biosynthesis enzymes in cancer cells is importance both from the clinical and toxicological perspectives. In earlier studies have demonstrated that cancer cells display an excessive fatty acid genesis. In contrast, nearly all non-malignant adult tissues have very low lipogenesis (Meadows AL et al., 2008, DeBerardinis RJ et al., 2007). Lipids are required for membrane synthesis as well as the composition of membrane microdomains of cancer cells. Membrane microdomains or lipid rafts including of phospholipids, cholesterol and sphingolipids have been reported to be involved in several



cellular processes such as signal transduction, intracellular trafficking, cell polarization, and cell migration (Bagnat M and Simons K, 2002, Manes S et al., 1999, Ikonen E and Simons K, 1998). Inhibition of enzymes contributing in tumor fatty acid biosynthesis results in decreasing fatty acid accumulation that leads to depressing cell proliferation, loss of cell viability and decreasing tumor size (Brusselmans K et al., 2005, Hatzivassillou G et al., 2005, Pizer ES et al., 1996). However, decreased lipid biosynthesis by inhibition of enzymes of fatty acid synthesis in non-malignant human fibroblast cells does not influence on both cell proliferation and viability (Chajes V et al., 2006, Brusselmans K et al., 2005, Pizer ES et al., 1996, Kuhajda FP et al., 1994).

The present study further examined the effects of EGCG on lipid biosynthesis in HepG2 cells. EGCG at 1 mmole/L for 24 h was incapable of decreasing cell proliferation approximately, while EGCG at 1,000 μ mole/L for 48 h and at 300 μ mole/L for 72 h or more than was capable of reducing cell proliferation more than 50%. The decreasing cell proliferation was shown by apoptosis induction experiments to further determine the cause of cell death. Our data demonstrate EGCG is efficacious in inhibiting the proliferation of HepG2 cells, most likely by induction of apoptosis in a manner that is time- and concentration-dependent. EGCG-induced cytotoxicity was dependent on FASN and ACL expression. We found that FASN and ACL expression were decreased after 48 h of EGCG treatment. The mechanism of action by which EGCG induces inhibition of FASN and ACL expression remains poorly understood, however some possibilities have been proposed. EGCG might affect to decrease cytosolic citrate levels, the substrate provided for acetyl CoA synthesis that leads to an impairment of fatty acid synthesis. The reducing cytosolic citrate levels affects mitochondrial homeostasis and membrane potential, presumably through the decreased availability of mitochondrial citrate for TCA cycle.

More than half a century ago, studies have shown that the majority of fatty acids in cancer cells are derived from de novo fatty acid synthesis whereas most other normal cells acquire the majority of fatty acids from the circulation. This increased lipogenesis is reflected in a significantly elevated expression and activity of lipogenic enzymes, ACL, FASN, and ACC. Enzyme ACL provides the requisite substrate acetyl-CoA for fatty acid synthesis by catalyzing the conversion of citrate to acetyl-CoA. ACL inhibition suppresses the growth and survival of tumor cells, although the mechanisms of ACL inhibition-dependent cell death are still not clear.

Treating cells with EGCG inhibited FASN and ACL expression and induced apoptosis. Several studies reported that inhibition of FASN did not affect growth rate or viability of nonmalignant cells. These data indicate that FASN predominantly plays a role in tumor growth and survival. Although the precise mechanisms of FASN inhibition-induced cell death in cancer cells still remain unknown, several possibilities have been proposed. Initial studies indicate that FASN inhibition accumulates the toxic intermediary metabolites, malonyl CoA, which induces apoptosis, whereas pharmacological inhibition of acetyl-CoA carboxylase (ACC) enzyme by 5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid (TOFA) does not (Pizer ES., et al., 2000). The acute reduction of fatty acid production, palmitate, *per se* was not the major source of cell injury after FASN inhibition. The high levels of malonyl-CoA were a characteristic effect of FASN inhibitors and temporally preceded the other cellular responses, including apoptosis. TOFA rescued cells from FASN inhibition by reducing malonyl-CoA accumulation. These studies suggest that malonyl-CoA accumulation, but not end product fatty acid depletion, could be a critical factor for apoptosis induction. These results also suggested that malonyl-CoA accumulation may not be a significant problem in normal tissues, possibly because fatty acid synthesis pathway activity is normally low, even in the lipogenic organs, such as liver. Physiologically, the elevated levels of malonyl-CoA occurring during fatty acid synthesis reduce fatty acid oxidation, by inhibiting carnitine palmitoyltransferase I at the outer mitochondrial membrane, to prevent a futile cycle of simultaneous fatty acid synthesis and degradation. However, the mechanisms of high levels of malonyl-CoA lead to apoptosis is not yet known, carnitine palmitoyltransferase I, which is regulated by malonyl-CoA, has been shown to interact directly with Bcl-2 at the mitochondrial membrane. Thus, high levels of malonyl-CoA may either induce apoptosis directly or alter mitochondrial mechanism to increase susceptibility to apoptosis from other signals.

However, studies with siRNAs reveals that ACC inhibition triggers apoptosis in some cancer cells, but not in normal cells. Inhibition of ACC expression results in a major decrease in the cellular pool of palmitic acid and apoptosis induction. However, supplementing the culture medium with palmitic acid completely rescues cell from both FASN and ACC-induced apoptosis. These findings confirm the importance of end-product fatty acid starvation to cell death. Moreover, besides the role of FASN-dependent fatty acid synthesis in fatty acid supply for membrane production and energy production through β -oxidation, FASN overexpression is further associated with palmitoylation and lipid modifications of signaling proteins. Thus, interference FASN expression could also

be involved FASN inhibition-induced selective cancer cytotoxicity. Moreover, inhibition of FASN has been shown to induce endoplasmic reticulum stress in tumor cells, and a further mechanism of action may involve cooperation with endoplasmic reticulum stress inducers to enhance apoptosis. In addition, as with FASN inhibition, EGCG blocked the cell cycle in G1/G0 phase. EGCG has recently been shown to be a potent in vitro inhibitor of the FASN-enzyme isolated from chicken liver. In the present study, we show that EGCG also inhibits FASN expression in cultured human liver cancer HepG2 cells and that this inhibition is paralleled by a marked reduction in cell proliferation that is related to apoptosis. Thus, this finding re-emphasizes the essential role of EGCG-induced FASN inhibition associated with cell cycle blockage.