

Exploring the Anticancer Properties of Sakuranin Flavanone in Human Oropharyngeal Squamous Carcinoma Cells by Studying its Effects on Caspase-Driven Apoptosis, Mitochondrial Membrane Potential (MMP) Loss, Cell Migratory and Invasiveness and M-TOR/PI3K/AKT Signalling Pathway.

Fanyong KONG 1, Jie ZHAI 1, Yueyue SHI 2, Jiaqi XU 2, Haiyang LI 2, Shiyuan ZHANG 2, Boxuan HAN 2, Qian SHI 2, Yunxia LI 2, Xixi SHEN 2 & Shizhi HE 2 *

¹ *Department of Otorhinolaryngology, Beijing Shunyi District Hospital; Shunyi Teaching Hospital of Capital Medical University, Beijing, 101300 China.*

² *Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, No.1, Dongjiaominxiang Street, Dongcheng District, Beijing 100730, PR China.*

SUMMARY. Sakuranin is a flavanone which is a class of flavonoids found abundantly in *Prunus* species. Flavonoids have been long known for their anticancer properties against a range of human cancers. However, there are no previous reports on the anticancer effects of sakuranin flavanone molecule. This study was designed to study the anticancer effects of sakuranin against human oropharyngeal carcinoma cells along with investigating its effects on caspase-mediated apoptosis, mitochondrial membrane potential (MMP) loss, cell migration and invasion and m-TOR/PI3K/AKT signalling pathway. MTT assay was used to study effects on cell viability. The apoptotic studies were carried out through AO/EB staining, annexin V/FITC staining, comet assay and western blotting assay. Transwell chambers assay was used to study effects on cell migration and invasion. Flow cytometry was used to study effects of Sakuranin on mitochondrial membrane potential loss (MMP). Finally, western blotting was used to investigate m-TOR/PI3K/AKT signalling pathway. Results indicated that Sakuranin led to potent cell proliferation inhibition in a dose-dependent manner. Sakuranin also induced apoptotic cell death as indicated by fluorescence microscopy and annexin V/FITC staining assays. The apoptotic induction was mediated via activation of caspase-3, caspase-9, and Bax while as it led to downregulation of Bcl-2. Sakuranin also caused inhibition of cell migration and cell invasion along with causing significant decrease in MMP. Sakuranin also caused inhibition of expressions of proteins related with m-TOR/PI3K/AKT signalling pathway. In conclusion, the current findings clearly indicate anticancer effects of Sakuranin flavanone in human oropharyngeal cancer cells and are mediated via caspase activated apoptosis, inhibition of cell migration and invasion, loss of mitochondrial membrane potential and targeting m-TOR/PI3K/AKT signalling pathway.

RESUMEN. Sakuranin es una flavanona que es una clase de flavonoides que se encuentran abundantemente en las especies de *Prunus*. Los flavonoides son conocidos desde hace mucho tiempo por sus propiedades anticancerígenas contra una variedad de cánceres humanos. Sin embargo, no hay informes previos sobre los efectos anticancerígenos de la molécula de flavanona sakuranina. Este estudio fue diseñado para estudiar los efectos anticancerígenos de la sakuranina contra las células del carcinoma orofaríngeo humano junto con la investigación de sus efectos sobre la apoptosis mediada por caspasa, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (MMP), la migración e invasión celular y la vía de señalización m-TOR/PI3K/AKT. Se utilizó el ensayo MTT para estudiar los efectos sobre la viabilidad celular. Los estudios apoptóticos se llevaron a cabo mediante tinción AO/EB, tinción con anexina V/FITC, ensayo de cometa y ensayo de transferencia Western. Se utilizó el ensayo de cámaras Transwell para estudiar los efectos sobre la migración e invasión celular. Se utilizó citometría de flujo para estudiar los efectos de Sakuranin sobre la pérdida de potencial de membrana mitocondrial (MMP). Finalmente, se utilizó la transferencia Western para investigar la vía de señalización m-TOR/PI3K/AKT. Los resultados indicaron que Sakuranin conducía a una potente inhibición de la proliferación celular de forma dosis-dependiente. Sakuranin también indujo la muerte celular

KEY WORDS: cell invasion, cell migration, flow cytometry, oropharyngeal cancer, sakuranin.

* Author to whom correspondence should be addressed. *E-mail:* hsz_bjtr@mail.cmu.edu.cn

apoptótica como lo indican los ensayos de microscopía de fluorescencia y tinción con anexina V/FITC. La inducción apoptótica estuvo mediada por la activación de caspasa-3, caspasa-9 y Bax, mientras que condujo a una regulación negativa de Bcl-2. Sakuranin también provocó la inhibición de la migración celular y la invasión celular, además de provocar una disminución significativa de MMP. Sakuranin también provocó la inhibición de la expresión de proteínas relacionadas con la vía de señalización m-TOR/PI3K/AKT. En conclusión, los hallazgos actuales indican claramente los efectos anticancerígenos de la flavanona sakuranina en células cancerosas de orofaringe humanas y están mediados por la apoptosis activada por caspasa, la inhibición de la migración e invasión celular, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la orientación de la vía de señalización m-TOR/PI3K/AKT.
