

Anticancer and Apoptotic Effects of Sclareol in Human Gastric Cancer Cells Involves its Impact on Cancer Cell Migration, Cell Invasion and Cell Cycle Phase Distribution

Changxu ZHANG¹ #, Shunqing PENG² #, Xuelian BAI³, Yuewen ZHANG⁴, & Yun WU^{3*}

¹ Department of Gastroenterology, Wuhan Third Hospital · Tongren Hospital Affiliated to Wuhan University, Wuhan Hubei, 430060, China.

² Clinical Laboratory of Ezhou Central Hospital of Hubei Province, Ezhou Hubei, 436000, China.

³ Department of Oncology, Baotou Central Hospital, Baotou Inner Mongolia, 014040, China.

⁴ Department of General Surgery, Yan'An Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming Yunnan, 650000, China.

SUMMARY. Natural products have been a key in modern drug discovery and development. Similarly, the sclareol molecule has been reported to show a huge number of biological applications. Because of sclareol's biological activity, we decided to test it as a potential drug candidate for treating gastric cancer *in vitro*. Proliferation and colony studies were performed with MTT and clonogenic assays. Apoptotic studies were performed with phase-contrast microscopy, Annexin-V/PI staining, DAPI staining, and western blotting. Phase distribution was tested with flowcytometry. Transwell assays were used to detect migration and invasion. Results discovered that sclareol possess time and dose reliant antiproliferative and anticolonogenic effects on SNU-1 cells ($p < 0.05$). The cellular and nuclear morphological investigations evidenced apoptotic cell death as they reported membrane blebbing, loss in integrity, chromatin condensation, nuclear shrinkage, apoptotic body formation and cytoplasmic shrinkage. Further, with the detection of enhanced activities of caspases-3, 8 and 9 and Bax and downregulated activity of Bcl-2, it was concluded that sclareol induced apoptosis in SNU-1 cells. Phase distribution of cell cycle showed blockade at G0/G1 phase in treatment group. The antimetastatic effects of sclareol were detected in SNU-1 cells as it inhibited their ability to migrate and invade. Overall, sclareol targeted multiple aspects of gastric cancer, including cell morphology, apoptosis, cell migration, invasion, and cell cycle.

RESUMEN. Los productos naturales han sido clave en el descubrimiento y desarrollo de fármacos modernos. De manera similar, se ha informado que la molécula de esclareol muestra una gran cantidad de aplicaciones biológicas. Debido a la actividad biológica del esclareol, decidimos probarlo como posible candidato a fármaco para tratar el cáncer gástrico *in vitro*. Se realizaron estudios de proliferación y colonias con MTT y ensayos clonogénicos. Los estudios de apoptosis se realizaron con microscopía de contraste de fase, tinción con anexina-V/PI, tinción con DAPI y transferencia Western. La distribución de fases se probó con citometría de flujo. Se utilizaron ensayos Transwell para detectar la migración y la invasión. Los resultados descubrieron que el esclareol posee efectos antiproliferativos y anticolonogénicos que dependen del tiempo y la dosis en las células SNU-1 ($p < 0,05$). Las investigaciones morfológicas celulares y nucleares evidenciaron muerte celular apoptótica ya que informaron formación de ampollas en la membrana, pérdida de integridad, condensación de cromatina, contracción nuclear, formación de cuerpos apoptóticos y contracción citoplasmática. Además, con la detección de actividades mejoradas de caspasas-3, 8 y 9 y Bax y la actividad regulada a la baja de Bcl-2, se concluyó que el esclareol inducía la apoptosis en células SNU-1. La distribución de fases del ciclo celular mostró bloqueo en la fase G0/G1 en el grupo de tratamiento. Los efectos antimetastáticos del esclareol se detectaron en células SNU-1, ya que inhibía su capacidad de migrar e invadir. En general, el esclareol apuntó a múltiples aspectos del cáncer gástrico, incluida la morfología celular, la apoptosis, la migración celular, la invasión y el ciclo celular.

KEY WORDS: apoptosis, Bcl-2 family, caspases, migration and invasion, natural products, phase distribution, sclareol.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: yunwu9906@hotmail.com

These authors contributed equally.