

**EXPRESSION OF CYTOKERATIN 19 GENE IN BREAST  
CANCER CELL LINES AFTER EXPOSURE TO  $\alpha$ -MANGOSTIN  
FROM *GARCINIA MANGOSTANA***

**UMAPORN UAWISETWATHANA**

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

**2007**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การแสดงออกของยีน CYTOKERATIN 19 ในเซลล์มะเร็งเต้านม ภายหลังจากเหนี่ยวนำด้วยสาร  $\alpha$ -MANGOSTIN จากเปลือกมังคุด (EXPRESSION OF CYTOKERATIN 19 GENE IN BREAST CANCER CELL LINES AFTER EXPOSURE TO  $\alpha$ -MANGOSTIN FROM *GARCINIA MANGOSTANA*)

อุมพร เอื้อวิเศษวัฒนา 4636354 PYBS/M

วท.ม. (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ปรีมณีนชน มุ่งการดี, Dr.rer.nat. (Immunology),

นีโบล เนื่องตัน, M.D. (Thai Board of Pediatrics)

#### บทคัดย่อ

มะเร็งจัดอยู่ในอันดับที่สามของสาเหตุการตายในประเทศไทย และชนิดของมะเร็งที่พบมากที่สุดและผู้หญิงคือ มะเร็งเต้านม การตรวจวินิจฉัยโรคที่ช้า และ การขาดประสิทธิภาพในการรักษา นำมาซึ่งอัตราการตายที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยทั่วโลก ในการศึกษาครั้งนี้ ได้นำ 2 แนวทางที่จะลดอัตราการตายลง คือ การประเมินการแสดงออกของยีน CK19 เพื่อที่จะใช้เป็นตัวตรวจวินิจฉัยโรค และการพิจารณาฤทธิ์ของสาร  $\alpha$ -mangostin และ สารสกัดเมทาบอล จากเปลือกมังคุด ต่อการแสดงออกของยีน CK19 ทั้งในหลอดทดลอง และ ในสัตว์ทดลอง เพื่อพัฒนาเป็นยาใหม่ต่อไป

การศึกษาการแสดงออกของยีน CK19 ในเซลล์มะเร็งเต้านมของคน 3 ชนิด ได้แก่ SKBR3, BT549 และ BT474 โดยใช้เทคนิค RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ คือ hCK19/1 และ hCK19/2 การแสดงออกของยีน CK19 ต่อไพรเมอร์ hCK19/1 พบที่ขนาด 215 คู่เบส และ hCK19/2 พบที่ขนาด 384 คู่เบส ในเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 3 ชนิด ขณะที่ในเซลล์เม็ดเลือดจากคนปกติ (PBMC) และ เซลล์มาโครฟาจจากหนู (RAW264.7) นั้นตรวจไม่พบ ในด้านความไวมีการวัดการแสดงออกอยู่ 2 วิธี คือ การทำการเจือจางของ cDNA และการผสมเซลล์มะเร็งที่ระดับการเจือจางต่างๆ ด้วยเลือดคนปกติ จากการศึกษาพบว่า คู่ไพรเมอร์ hCK19/2 ให้ระดับความไวในการตรวจยีน CK19 มากกว่าคู่ไพรเมอร์ hCK19/1 ดังนั้น ผลที่ได้จากไพรเมอร์ hCK19/2 พบว่า ระดับความไวที่วัดจากการทำการเจือจางของ cDNA ตรวจพบการแสดงออกของยีน CK19 ที่ 400, 40 และ 40 เซลล์ ในเซลล์ SKBR3, BT549 และ BT474 ตามลำดับ และ ตรวจพบได้ที่ 1/10,000, 1/100,000 และ 1/1,000,000 จากการศึกษาผสมเซลล์มะเร็งเต้านมที่ระดับการเจือจางต่างๆ กับเซลล์เม็ดเลือดจากคนปกติตามลำดับ นอกจากนี้ การแสดงออกของยีน CK19 ยังให้ความแตกต่างกันระหว่างชนิดของเซลล์ที่นำมาศึกษา กล่าวคือ CK19 มีการแสดงออกในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด invasive ที่มี ER (BT474) มากกว่าเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด invasive ที่ไม่มี ER (BT549) และ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด adenocarcinoma ที่ไม่มี ER (SKBR3) ตามลำดับ.

ในการศึกษาบทบาทของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน CK19 ได้เริ่มจากการนำสาร  $\alpha$ -mangostin จากเปลือกมังคุด จำนวน 2 ชุดของการสกัด มาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม ด้วยวิธี MTT พบว่า ค่า ED<sub>50</sub> ของสาร  $\alpha$ -mangostin จากการสกัดครั้งแรก, ครั้งที่สอง และ paclitaxel (ตัวควบคุมเชิงบวก) ต่อ เซลล์ SKBR3 มีค่า 17.0, 15.5 และ 7.0  $\mu$ M ในเซลล์ BT549 มีค่า 19.5, 17.0 และ 5.5  $\mu$ M และ ในเซลล์ BT474 มีค่า 8.5, 11.0 และ 12.5  $\mu$ M ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญในเซลล์มะเร็งเต้านมของ  $\alpha$ -mangostin นั้นมีประสิทธิภาพต่อเซลล์ BT474 มาก ในขณะที่ paclitaxel มีประสิทธิภาพต่อเซลล์ BT474 น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อื่นที่นำมาศึกษา

ผลกระทบของการแสดงออกของยีน CK19 ต่อเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร  $\alpha$ -mangostin พบว่า การแสดงออกของยีนลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเริ่มที่ความเข้มข้น 25 ถึง 50  $\mu$ M เช่นเดียวกับ paclitaxel โดยเริ่มที่ความเข้มข้น 10 ถึง 25  $\mu$ M นอกจากนี้ ตัวอย่างหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยเซลล์มะเร็งเต้านมที่เหนี่ยวนำด้วยสารสกัดเมทาบอล จากเปลือกมังคุด ที่ได้รับจาก นายันัฐวุฒิ และคณะ ได้ทำการศึกษาผลกระทบของการแสดงออกของยีน CK19 พบว่า การแสดงออกของยีนลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเริ่มที่ความเข้มข้น 50 ถึง 200 mg/kg

ผลการทดลองทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่ายีน CK19 ควรมีการพัฒนาให้เป็นตัวตรวจสอบในการวินิจฉัยมะเร็งเต้านมหรือสำหรับการติดตามผลการรักษา นอกจากนี้ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสาร  $\alpha$ -mangostin จากเปลือกมังคุด อาจนำมาใช้เป็นยาต้านมะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งเต้านม หรือ อาจนำมาใช้รักษา ร่วมกับยาด้านมะเร็ง paclitaxel เพื่อเสริมฤทธิ์ในการรักษา การศึกษานี้ อาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านมได้

**EXPRESSION OF CYTOKERATIN 19 GENE IN BREAST CANCER CELL LINES AFTER EXPOSURE TO  $\alpha$ -MANGOSTIN FROM *GARCINIA MANGOSTANA***

UMAPORN UAWISETWATHANA 4636354 PYBS/M

M.Sc. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)

THESIS ADVISORS : PRIMCHANIEN MOONGKARNDI, Dr.rer.nat. (Immunology),  
NEELOBOL NEUNGTON, M.D. (Thai Board of Pediatrics)**ABSTRACT**

Cancer is ranked among the top three causes of death in Thailand. Breast cancer is in the first rank of common cancers in females. Late diagnosis and ineffective treatment cause a high mortality rate for patients all over the world. In this study, two approaches were investigated to improve the survival outcome, i.e., the evaluation of CK19 expression as a promising biomarker for diagnosis and the determination of the effect of  $\alpha$ -mangostin and crude methanolic extract from *G. mangostana* on CK19 expression in *in vitro* and *in vivo* study as a novel chemotherapeutic agent.

CK19 expression was studied in three human breast cancer cell lines, SKBR3, BT549, and BT474 using RT-PCR. Two primer sets were used to evaluate CK19 expression. In these breast cancer cells, primer set I (hCK19/1) and primer set II (hCK19/2) amplified the CK19 gene at a 215 bp and 384 bp respectively whereas PBMC and RAW264.7 (mouse macrophage) was not be detected. The sensitivity of two methods, cDNA dilution (the dilution of cDNA from RNA of breast cancer cells) and cell dilution (the dilution of breast cancer cells in PBMC) was measured. hCK19/2 was more sensitive than hCK19/1. In cDNA dilution, the lower limits of primer set II for detection were 400, 40 and 40 cells in SKBR3, BT549 and BT474 cells respectively and 1/10,000, 1/1,000,000 and 1/100,000 cells respectively in cell dilution. CK19 was expressed in tumor cell of different origin, showing higher expression in invasive breast cancer with ER<sup>+</sup> (BT474) than invasive breast cancer with ER<sup>-</sup> (BT549) and breast adenocarcinoma with ER<sup>-</sup> (SKBR3).

To study the role of medicinal plants in CK19 expression, two preparations of  $\alpha$ -mangostin from *G. mangostana* were determined. The antiproliferative effects by MTT assay in three breast cancer cell lines were firstly confirmed in  $\alpha$ -mangostin. The ED<sub>50</sub> of  $\alpha$ -mangostin lot 1, lot 2 and paclitaxel as positive control were 17.0, 15.5 and 7.0  $\mu$ M for SKBR3, 19.5, 17.0, and 5.5  $\mu$ M for BT549 and 8.5, 11.0 and 12.5  $\mu$ M for BT474. The antiproliferative effect of  $\alpha$ -mangostin was highly effect in BT474 cells whereas paclitaxel was less effect when comparing among the cells studied.

The effects of CK19 expression in cells treated with two preparations of  $\alpha$ -mangostin were significantly down-regulated in dose dependent manner starting at 25 to 50  $\mu$ M and the same patterns applied to paclitaxel starting at 10 to 25  $\mu$ M. In *in vivo* experiment, Kosem N. et al. demonstrated antitumor formation of crude methanolic extract from mangosteen in mice previously injected with colon cancer at footpads. Tumor footpads from mice were obtained and isolated RNA for CK19 detection. CK19 expression was also significantly down-regulated in dose dependent manner starting at 50 to 200 mg/kg.

This study suggests that CK19 expression in mRNA should be developed as a marker for breast cancer diagnosis or monitoring therapy. Moreover, the antiproliferative effects of  $\alpha$ -mangostin from *G. mangostana* indicate its potential as a source for novel breast cancer chemotherapeutic drugs either used alone or in combination with paclitaxel for synergistic effects. The discovery of a new natural product to fight cancer would be alternative in oncology which could improve survival outcomes of breast cancer patients.

**KEY WORDS:** BREAST CANCER / *GARCINIA MANGOSTANA* /  $\alpha$ -MANGOSTIN / CYTOKERATIN 19 / EXPRESSION / RT-PCR.

144 P.