

**EFFECT OF NITRIC OXIDE ON CYTOKINE-INDUCED
APOPTOSIS IN LEUKEMIA**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MEDICAL TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2009**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

EFFECT OF NITRIC OXIDE ON CYTOKINE-INDUCED APOPTOSIS IN LEUKEMIA

DARIN SIRIPIN 4936159 MTMT/M

M.Sc. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: DALINA TANYONG, Ph.D., PIMPICHA PATMASIRIWAT, Ph.D., NUTTAPONG WONGJINDANON, Ph.D.

ABSTRACT

Leukemia is a malignant disease and characterized by the uncontrolled accumulation of white blood cells. The goal of leukemia treatment is to destroy the leukemic cells and induce normal cell differentiation. Immunotherapy is one of the strategies in therapeutic development. The purpose of this study is to investigate the effect of cytokines on the apoptosis induction of leukemic cell lines. In this study, myeloid leukemic cell lines (K-562, HL-60, MV4-11) and lymphoid leukemic cell line (Molt-4) in serum-free culture were treated with cytokines interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and interferon- γ in various concentrations for 24 and 48hr. The results showed that cytokines caused a time and dose-dependent apoptosis induction in leukemic cell, as determined by cell growth inhibition, cell apoptosis, and caspase-3 activation. However, 2 ng/ml of IFN- γ treated cell for 48 hrs was a suitable concentration and time incubation to induce apoptosis for all four leukemic cell lines. In addition, the possible involvement of nitric oxide (NO) in apoptotic pathways was investigated by measuring nitric oxide production and iNOS mRNA expression using Griess method and Real-time PCR. Apoptosis in leukemic cells induced by cytokines resulted in a 3-fold induction of iNOS mRNA and in the release of large amounts of NO. Moreover, apoptosis was reduced after the addition of an inducible nitric oxide synthase inhibitor, SMT. In conclusion, cytokines, particularly, IFN- γ were able to induce apoptosis in leukemic cell lines and NO might be mediated in apoptotic signaling pathway.

KEYWORDS: CYTOKINE/ APOPTOSIS/ LEUKEMIA/ NITRIC OXIDE

142 pages.

ผลของไนตริกออกไซด์ต่อการกระตุ้นให้เกิดอะพอพโตซิสโดยสารไซโตคายน์ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ดาริน ศิริปิ่น 4936159 MTMT/M

วท.ม. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ดลิตา ตันหยง, Ph.D., พิมพิชมา ปัทมสิริวัฒน์, Ph.D.,
ณัฐพงษ์ วงศ์จินดานนท์, Ph.D.

บทคัดย่อ

มะเร็งเม็ดเลือดขาวคือโรคมะเร็งชนิดหนึ่งซึ่งเกี่ยวกับความผิดปกติของการผลิตเม็ดเลือดขาว ดังนั้นการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดจึงมุ่งเน้นที่การทำลายเซลล์มะเร็งและการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาเซลล์ให้เข้าสู่ภาวะปกติ การรักษาโดยการเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเป็นการพัฒนาแนวทางใหม่ในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว จุดประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้จึงทำการศึกษาการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีผลมาจากการตอบสนองการกระตุ้นโดยไซโตคายน์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K-562, HL-60, MV4-11 และ Molt-4 แล้วนำไปทดสอบกับไซโตคายน์ชนิด interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , และ interferon- γ ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าไซโตคายน์สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายในมะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยแปรผันตรงกับเวลาและความเข้มข้นของสารนั้นๆ ซึ่งจะเห็นได้จาก การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ปริมาณเซลล์ตาย และการตรวจวัดปริมาณ caspase 3 โดยพบว่ากระตุ้นด้วยสาร IFN- γ ที่ปริมาณ 2 นาโนกรัม/มล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เป็นความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาถึงความเกี่ยวข้องของ nitric oxide ในการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์โดยสารไซโตคายน์ โดยทำการตรวจวัดปริมาณของ nitric oxide โดยวิธี Griess assay และศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS โดยวิธี real-time PCR พบว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิด apoptosis โดยไซโตคายน์มีการแสดงออกของยีน iNOS มากขึ้น 3 เท่า และสามารถผลิต nitric oxide เพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้เมื่อได้ทดลองใช้ iNOS inhibitor พบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้ด้วย จึงสามารถสรุปได้ว่าสารไซโตคายน์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง IFN- γ สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายได้และ nitric oxide น่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสื่อสารสัญญาณกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ดังกล่าว