12 JUL 2000

APOPTOSIS INDUCTION BY VR-3848 ISOLATED FROM *EUPHOBIACEAE* IN HUMAN LUNG CANCER CELL LINE

RUNGKAN POOTRAKRONCHAI

คลินันทนาการ
จาก
มัสมาวิทยาลัย ม.มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (TOXICOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2000

ISBN 974-664-014-3

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

TH
R942a
2000

44653 c.2

3936411 SCTX/M : MAJOR ; TOXICOLOGY; M.Sc. (TOXICOLOGY)
KEY WORDS : APOPTOSIS / VR-3848/ CASPASE-3 / HUMAN LUNG CANCER CELL LINE

RUNGKAN POOTRAKRONCHAI : APOPTOSIS INDUCTION BY VR-3848 ISOLATED FROM *EUPHOBIACEAE* IN A HUMAN LUNG CANCER CELL LINE. THESIS ADVISOR: KULAWEE SUJARIT, PH.D. PAWINEE PIYACHATURAWAT, PH.D., VICHAI REUTRAKUL, PH.D., SONGSAK PETMITR, PH.D. 122 p. ISBN 974-664-014-3.

It has been demonstrated that a variety of anticancer drugs inhibit the growth of carcinoma cells by induction of apoptosis. VR-3848 is a potent-cytotoxic-unknown compound purified from *Euphobiaceae,* a tropical Thai plant. The concentration of VR-3848 that corresponds to half of the viability (GI_{50}) was 10 nM. The ability of VR-3848 to initiate apoptosis was investigated in a human lung (LU-1) cancer cell line. Treatment of cells with VR-3848, GI_{50} (10 nM), 10x GI_{50} (100 nM), and 20x GI_{50} (200 nM) or vinblastine (a positive control), 2xGI_{50} (200 nM) between 3 and 48 hours caused morphological changes consistent with the induction of apoptosis. Apoptosis induced by VR-3848 detected by 4′, 6-Diamino-2-phenylindole (DAPI) staining and visualized by a fluorescence microscope was time- and –dose dependent. The peaks of apoptosis were seen at 48 hours incubation period up to 30% and 40% in cells treated with VR-3848, 100 nM and 200 nM, respectively. In addition, studies by agarose gel electrophoresis, a characteristic ladder of DNA fragments in multiples of 180-200 base pairs, was observed in DNA extracted from cells treated with VR-3848, 200 nM for 48 hours. The results were similar in cells treated with vinblastine 200 nM for 48 hours. To examine whether the cysteine protease, CPP32 (caspase-3), contributes to the VR-3848-induced apoptosis, the expression of mRNA for CPP32 in LU-1 cells was performed by RT-PCR. The results revealed that both control and treated LU-1 cells expressed the almost same levels of mRNA for CPP32. Importantly, at the apoptosis-inducing concentration, VR-3848 also induced the activation of caspase-3 between 3 and 48 hours. Furthermore, 5 μM of a specific inhibitor of caspase-3-like protease, Ac-DEVD-CHO, significantly blocked CPP32 activity. In summary, the findings demonstrate that VR-3848 may induce cell death in LU-1 cell lines via apoptosis which is mediated by the activation of caspase-3.

Copyright © by Mahidol University

3936411 SCTX/M : สาขาวิชา: พิษวิทยา; วท.ม. (พิษวิทยา)

รุ่งกานต์ ภู่ตระกรณ์ชัย: ศึกษากลไกการตายของเซลล์มะเร็งปอดของคน โดยสารบริสุทธิ์ (วีอาร์-3848) ที่สกัดจากต้นยูโฟบีเอซี (APOPTOSIS INDUCTION BY VR-3848 ISOLATED FROM *EUPHOBIACEAE* IN HUMAN LUNG CANCER CELL LINE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: กุลวีณ์ สุจริต, Ph.D., ภาวิณี ปียะจตุรวัฒน์, ปร.ด., วิชัย ริ้วตระกูล, Ph.D., ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร, ปร.ด. 122 หน้า ISBN 974-664-014-3

ได้มีรายงานว่า ยาต้านมะเร็งหลายชนิดออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยผ่านทางกลไกการตายแบบเอปอบโตซิส วีอาร์-3848 เป็นสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากพืชป่าเขตร้อนต้นยูโฟบีเอซี เป็นสารที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่แน่นอน แต่พบว่ามีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงได้ ความเข้มข้นของวีอาร์-3848 ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ครึ่งหนึ่งของจำนวนเซลล์ทั้งหมด มีค่าเท่ากับ 10 นาโนโมลาร์ ได้ทำการศึกษาผลของวีอาร์-3848 ในการชักนำให้เกิดเอปอบโตซิสในเซลล์มะเร็งปอดของคนระหว่างเวลา 3 และ 48 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 200 นาโนโมลาร์ และใช้วินบลาสตินที่ความเข้มข้น 200 นาโนโมลาร์เป็นตัวควบคุมเชิงบวก เซลล์ที่ได้รับสารที่ความเข้มข้นเหล่านี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การตายเนื่อง จากวีอาร์-3848 ถูกทดสอบโดยใช้วิธีย้อมสีนิวเคลียสของเซลล์ด้วยสี DAPI (4,3-Diamino-2-phenylindole) และพบว่าการตายนี้ขึ้นกับเวลาและความเข้มข้นของสารที่ใช้ ค่าเปอร์เซ็นต์สูงสุดของการตายของสารวีอาร์-3848 ที่ 100 นาโนโมลาร์ และ 200 นาโนโมลาร์ หลังจากสัมผัสกับยาเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมงอยู่ที่ประมาณ 30% และ 40% นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของนิวเคลียสของเซลล์ พบลักษณะการเรียงตัวเป็นขั้นบันไดของดีเอ็นเอบนอกาโรสเจล ในเซลล์ที่ได้รับสารวีอาร์-3848 และวินบลาสตินที่ความเข้มข้น 200 นาโนโมลาร์ หลังจากใส่ยาเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาว่าสารวีอาร์-3848 ทำให้เซลล์ตายชนิดเอปอปโตซิสนั้นเกิดจากการทำงานของเอ็นไซม์คาสเพส-3 ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนคาสเพส-3 ที่มาควบคุม โดยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ พบว่าสารที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายแบบเอปอปโตซิส ให้ผลในการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารวีอาร์-3848 อย่างไรก็ตามจากการวัดระดับของเอ็นไซม์คาสเพส-3 พบว่าระดับของคาสเพส-3สูงขึ้นในช่วงเวลาที่เกิดเอปอปโตซิส และถูกยับยั้งได้โดยตัวยับยั้งที่เฉพาะเจาะจงต่อคาสเพส-3 ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า สารวีอาร์-3848 ฆ่าเซลล์โดยผ่านกลไกการตายแบบเอปอบโตซิส ซึ่งอาจเป็นผลจากการทำงานของคาสเพส-3 ซึ่งกลไกการทำงานที่แน่นอนของวีอาร์-3848ต้องทำการศึกษาโดยละเอียดต่อไป

Copyright© by Mahidol University