INDUCTION OF APOPTOSIS BY THE FLAVONE ISOLATED FROM *GARDENIA OBTUSIFOLIA*: AN ANTIMITOTIC AGENT

PRAPINPAN SUNDARARJUN

หนังสือเล่มนี้ได้รับ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

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

ISBN 974-664-015-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
P899i
2000

14874 ค.2

4036389 SCPS/M : MAJOR ; PHYSIOLOGY ; M.Sc. (PHYSIOLOGY)
KEY WORDS : APOPTOSIS / FLAVONE / PHOSPHORYLATION OF BCL-2 / HUMAN LUNG CANCER CELL LINE
PRAPINPAN SUNDARARJUN : INDUCTION OF APOPTOSIS BY THE FLAVONE ISOLATED FROM GARDENIA OBTUSIFOLIA: AN ANTIMITOTIC AGENT. THESIS ADVISORS: KULAWEE SUJARIT Ph.D., SAMAISUKH SOPHASAN Ph.D., SUKATHIDA UBOL Ph.D. 126 p. ISBN 974-664-015-1

Apoptosis, also known as programmed cell death, has been reported to be a major mechanism of action of various anticancer drugs. Recent evidence suggests that inactivation of the antiapoptotic function of Bcl-2 by phosphorylation occurs after treatment with the microtubule-damaging anticancer agents, such as taxol, vinblastine, and colchicine or the phosphatase inhibitor okadaic acid. During the screening of cytotoxic agents, 5,3′- dihydroxy-3,6,7,8,4′-pentamethoxyflavone (DPF) was purified from the extracts of *Gardenia obtusifolia*. This compound showed selective inhibition on the growth of various human cell lines. In addition, the cytotoxic effect of VR-3623 has proved to be due to disrupting microtubule formation. Further, it has been shown that this flavone bound to tubulin at colchicine binding site. Therefore, in the present study, induction of apoptosis by VR-3623 was investigated in the human lung (LU-1) cancer cell line. Treatment of LU-1 cells for 3-72 hours with three doses of DPF, GI_{50} (0.4 μM), $5xGI_{50}$ (2.0 μM), and $10xGI_{50}$ (4.0 μM) or colchicine, $5xGI_{50}$ (0.2 μM) used as a positive control, caused morphological changes characterized as nuclear condensation and apoptotic bodies formation detected by phase contrast microscope and 4′,6-Diamino-2-phenylindole (DAPI) staining consistent with the induction of apoptosis. The percentage of apoptosis induced by DPF was found to be dose-and time-dependent. The peaks of apoptosis seen after an addition of colchicine and DPF, $10xGI_{50}$, for 24 hours were approximately 59% and 51%, respectively. Furthermore, DNA strand breakage and fragmentation of the DNA into oligonucleosome-sized fragments was also clearly demonstrated by agarose gel electrophoresis after exposing cells to colchicine and DPF, $10xGI_{50}$, for 48 hours. Moreover, western blotting and analysis with monoclonal-Bcl-2 antibody demonstrated the expression of the phosphorylated form of Bcl-2 protein seen as the slower-migrating form of Bcl-2 ($\simeq$ 26 kDa) in cells treated with colchicine, $5xGI_{50}$ since 24 hours after incubation, but not in those cells treated with any dose of DPF studied. These data suggest that DPF may inhibit the growth of cancer cells by induction of apoptosis. Apoptosis induced by DPF in LU-1 cells is unlikely caused by phosphorylation of Bcl-2 as found in cells treated with colchicine. Therefore, this antimitotic agent initiates apoptosis by a different mechanism from colchicine. The exact mechanism is still not known. Further investigation is needed to identify this mechanism.

4036389 SCPS/M : สาขาวิชา: สรีรวิทยา; วท.ม. (สรีรวิทยา)

ประพิณพันธ์ สุนทรารชุน: กลไกการฆ่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอดของมนุษย์โดยสารฟลาโวน ซึ่งสกัดจาก GARDENIA OBTUSIFOLIA (INDUCTION OF APOPTOSIS BY THE FLAVONE ISOLATED FROM GARDENIA OBTUSIFOLIA : AN ANTIMITOTIC AGENT) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: กุลวีณ์ สุจริต, Ph.D., สมัยศึก โสภาสรรค์, Ph.D., ศุขธิดา อุบล, Ph.D., 126 หน้า ISBN 974-664-015-1

ได้มีรายงานว่า ยาต้านมะเร็งส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยใช้กลไกเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis นอกจากนี้สารที่ออกฤทธิ์ผ่านไมโครทิวบูลเท่านั้นที่จะฆ่าเซลล์มะเร็งโดยไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนบีซีแอล-ทู ในขณะที่ทำการค้นคว้าหาสารที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งจากสารสกัดจากพืชเมืองร้อน ได้พบสารบริสุทธิ์ วีอาร์-3623 หรือ 5,3′-ไดไฮดรอกซี-3,6,7,8,4′ เพนตะเมทธอกซีฟลาโวน ซึ่งสกัดจากส่วนของใบและกิ่งของต้นการ์ดีเนีย ออบทูซิโฟเลีย สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของคนแบบจำเพาะ โดยพบว่าสารนี้จับบนทิวบูลินที่ตำแหน่งเดียวกับโคลชีซีนทำให้ขัดขวางกลไกการสร้างสายไมโครทิวบูลที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ จุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาถึงกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารวีอาร์-3623 ว่าผ่านกระบวนการ apoptosis หรือไม่ โดยใช้เซลล์มะเร็งปอดของคนเป็นต้นแบบ เซลล์มะเร็งได้รับ วีอาร์-3623 ที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 เท่า ของ ค่า GI_{50} เป็นเวลา 3-72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์มะเร็งที่ได้รับยาโคลชีซีนที่ความเข้มข้น 5 เท่าของค่า GI_{50} เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ลักษณะเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis หลังจากได้รับยาสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายใต้กล้องจุลทัศน์และจากการย้อมนิวเคลียสด้วยดีเอพีไอ พบว่าโคชีซีนและ วีอาร์-3623 ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของค่า GI_{50} สามารถทำให้เซลล์มะเร็งปอดตายแบบ apoptosis ได้ โดยมีการตายสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง หลังจากได้รับสารคิดเป็นร้อยละ 59 และ 51 ตามลำดับ และทำให้เกิดการแตกของดีเอ็นเอซึ่งเห็นเป็นลักษณะของขั้นบันไดบน agarose gel ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังจากได้รับสาร นอกจากนี้ผลการศึกษาโปรตีนบีซีแอล-ทู ด้วยเวสเทอร์นบรอต พบว่า โคลชีซีนที่ความเข้มข้น 5 เท่าของค่า GI_{50} สามารถทำให้เกิดฟอสโฟรีเลชั่นของโปรตีนบีซีแอล-ทูได้ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับสาร แต่สารวีอาร์-3623 ไม่ทำให้เกิดฟอสโฟรีเลชั่นของโปรตีนบีซีแอล-ทู ที่ทุกความเข้มข้นของสารและเวลาที่ใช้ทดลอง ผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงอาจสรุปได้ว่า วีอาร์-3623 สามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอดตายแบบ apoptosis ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของสารที่ใช้และเวลาที่ทำการทดลอง แต่เป็นกลไกที่ต่างจากโคลชีซีน ซึ่งกลไกการเกิด apoptosis ที่แน่นอนโดยสารนี้ยังไม่สามารถทราบได้จากการทดลองนี้ ต้องทำการศึกษาและวิจัยต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย