Thesis Title Effect of Turmeric Curcuminoids on *MDR1* Promoter Activity and P-glycoprotein Functions in Human Cervical Carcinoma Cells

Author Mr. Songyot Anuchapreeda

Ph.D. Biochemistry

Examining committee

Assoc. Prof. Dr. Porn-ngarm Limtrakul	Chairman
Prof. Dr. Prapon Wilairat	Member
Asst. Prof. Dr. Pranee Leechanachai	Member
Assoc. Prof. Dr. Luksana Makonkawkeyoon	Member
Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Member

ABSTRACT

Multidrug resistance is a phenomenon that is often associated with decreased intracellular drug accumulation in patient's tumor cells resulting from enhanced drug efflux. Cancer chemotherapy is one of the major factors that can induce the development of multidrug resistance in human. The MDR phenotype is generally acquired after chemotherapy in some carcinomas, including ovarian, cervix and breast. It is related to the overexpression of membrane protein, P-glycoprotein (Pgp), on the surface of tumor cells, thereby reducing their cytotoxicity. A variety of studies have tried to find potent multidrug resistance (MDR) modulators which increase drug

accumulation in cancer cells. Thus, I'm interested in a type of Thai herb extract, curcuminoids, the turmeric extract that exhibits characteristics of a MDR modulator. In this study, turmeric curcuminoid was tested for its ability to modulate Pgp expression and Pgp function in multidrug resistant human cervical carcinoma cell line (KB-V1).

A mixture of curcuminoids, which includes curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, is important for its anti-inflammatory, antiulcer, anticancer, antimutagen and wound healing activity. Purification of curcuminoids is essential for testing the properties of individual curcuminoid components for their biological action. Turmeric curcuminoids was separated and purified from turmeric grown in Phrao district, Chiang Mai, Thailand. Turmeric powder was extracted by ethanol followed with petroleum ether precipitation and isopropanol washing. The results of four independent experiments showed three types of curcuminoids (curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin), after isopropanol step, present in a ratio of 86:13:1, 88:11:1, 87:11:2, and 86:12:2, respectively, by HPLC analysis. The curcuminoid component was further purified by silica gel 60 column chromatography. The purity of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxy-curcumin was in the range of 95-100%. In summary, It was found that the separation method was very efficient for separating curcuminoids from turmeric, and the ratio of curcuminoids in locally grown turmeric was similar to those of commercial curcuminoids from GNC, Jarrow and Nature's Way.

Treatment of drug resistant KB-V1 cells with 0.37, 1.8 and 3.7 μg/mL (approximately 1, 5 and 10 μM) commercial grade curcuminoids (Sigma-Aldrich) up to 72 h was able to significantly lower Pgp expression in a dose-dependent manner. Comparison among 3 curcuminoids from both Kalsec curcuminoids and laboratory prepared curcuminoids showed that bisdemethoxycurcumin significantly decreased both Pgp and its mRNA levels.

Knowing the regulatory mechanisms involved in *MDR1* gene expression is important to our understanding of multidrug resistance in tumor cells. The *MDR1* gene encoding Pgp, and containing promoter sequence from -84 to –65, GGCTGATTGGCTGGGCAGGA, was employed in this investigation. DNA-binding analyses suggested that the *MDR1* gene promoter specifically interacted with a nuclear protein (transcription factor). The nuclear protein was identified by competitive electrophoretic mobility shift assay using unlabeled SP1, AP1, AP2, OCT1, $NF_{\kappa}B$ and CREB oligomers. The results demonstrated that CREB consensus sequence could compete with the nuclear factor that binds to the labeled probe better than other unlabeled probes. Therefore, it indicated that CREB is the transcription factor that binds to the *MDR1* gene promoter at residues -84 to -65, and this result was confirmed by supershift assay using anti-CREB antibody. Additional studies showed that pretreatment of KB-V1 cells with commercial grade curcuminoids (Sigma-Aldrich) significantly decreased the activity of *MDR1* gene promoter, and bisdemethoxycurcumin produced the maximum inhibitory effect. These results indicated that bisdemthoxycurcumin is the most active of the three curcuminoids present in turmeric for modulation of *MDR1* gene expression.

The effect of curcuminoids on Pgp function was demonstrated by rhodamine123 (Rh123) accumulation and efflux in Pgp-expressing KB-V1 cells. Curcuminoid mixture increased Rh123 accumulation in a dose-dependent manner (1.8-20.3 μg/mL or approximately 5-55 μM) and inhibited the efflux of Rh123, but did not affect efflux of Rh123 in wild type drug-sensitive KB-3-1 cells. When curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin were tested for their effects on Pgp function, result indicated that curcumin increased Rh123 accumulation in a dose-dependent manner (1.8-20.3 μg/mL or approximately 5-55 μM). Curcuminoid mixture exhibited a similar function 3 fold that of curcumin. Treatment of drug-resistant KB-V1 cells with curcuminoid mixture and curcumin increased their

sensitivity to vinblastine, consistent their ability to increase intracellular accumulation of Rh123.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันต่อการทำงานโปรโมเตอร์ของ ยีนเอ็มดีอาร์1 และหน้าที่ของพี-กลัยโคโปรตีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์

ชื่อผู้เขียน นายทรงยศ อนุชปรีดา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล	ประธานกรรมการ
ศ. ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์	กรรมการ
ผศ. ดร. ปรานี ลี้ชนะชัย	กรรมการ
รศ. ดร. ลักษณา มกรแก้วเกยูร	กรรมการ
รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	กรรมการ

บทคัดย่อ

การดื้อยาเป็นปรากฏการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการลดลงของยารักษามะเร็งภายในเซลล์มะเร็งในผู้ป่วยโรคมะเร็ง ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากเซลล์มะเร็งมีการขับไล่ยาเคมีบำบัดออกสู่ภายนอกเซลล์มากขึ้น การรักษามะเร็งโดยเคมีบำบัดเป็นปัจจัยอันหนึ่งที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาในเซลล์มะเร็งของมนุษย์ การแสดงออกของการดื้อยาซึ่งพบหลังจากมีการรักษาด้วยเคมีบำบัดสามารถพบกับมะเร็งชนิด carcinomas บางชนิด รวมไปถึงมะเร็งรังไข่ มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งเต้านม ซึ่งเกิดการดื้อยานี้จะมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีน (P-glycoprotein, Pgp) ที่บริเวณผิวของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถลดความเป็นพิษของยารักษามะเร็งลงได้ด้วยตัวเอง จากการทดลองหลายๆการทดลองที่ผ่านมาได้พยายามหายาที่มีคุณสมบัติในการปรับเปลี่ยนลักษณะการดื้อยาของเซลล์มะเร็งที่เรียกว่า multidrug resistance (MDR) modulators ทำให้สามารถช่วยเพิ่มการสะสมยาภายในเซลล์มะเร็งมากขึ้น

ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะนำสารสกัดจากสมุนไพรไทย ซึ่งก็คือเคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoid) เป็นสารสกัดที่ได้มาจากขมิ้นชัน ที่แสดงคุณสมบัติที่เป็น MDR modulator จากการศึกษานี้ เคอร์คิวมินอยด์ถูกนำมาทดสอบเพื่อที่จะใช้เป็นตัวปรับเปลี่ยนการแสดงออกและการทำงานของพี-กลัยโคโปรตีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่ดื้อยา (KB-V1)

เคอร์คิวมินอยด์ประกอบด้วย เคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน มีคุณสมบัติที่สำคัญหลายประการเช่น ต้านการอักเสบ ต้านแผลมีหนอง ต้านมะเร็ง ต้านการกลายพันธุ์ และมีคุณสมบัติเป็นยาสมานแผล ในการแยกเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดออกจากกันมีความจำเป็นในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิด การศึกษานี้ได้ทำการแยกเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิดให้บริสุทธิ์ โดยขมิ้นชันที่นำมาใช้ได้ทำการปลูกที่อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย ผงขมิ้นที่ได้ทำการสกัดโดยใช้เอทธานอล หลังจากนั้นตกตะกอนด้วยปิโตรเลี่ยมอีเธอร์ แล้วล้างด้วยไอโซโพรพานอล ผลการสกัดแยกทั้ง 4 ครั้งพบว่า เคอร์คิวมินอยด์ 3 ชนิด (เคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน) หลังขั้นตอนการล้างด้วยไอโซโพรพานอลมีสัดส่วนคือ 86:13:1, 88:11:1, 87:11:2 และ 86:12:2 ตามลำดับ โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC ส่วนประกอบของเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิดแยกโดยใช้ซิลิกาเจล 60 คอลัมน์โครมาโตกราฟฟี พบว่าเคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินมีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 95-100% ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า วิธีการที่ใช้มีประสิทธิภาพในการใช้สกัดและแยกเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชัน และสัดส่วนของเคอร์คิวมินอยด์ที่แยกได้คล้ายกับเคอร์คิวมินอยด์ทางการค้าคือ บริษัทจีเอ็นซี (GNC) แจร์โร (Jarrow) และเนเจอร์เวย์ (Nature's way)

เมื่อทำการทดสอบเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาด้วยเคอร์คิวมินอยด์รวมจากบริษัท (ซิกม่า-อัลดริช) ที่ระดับความเข้มข้น 0.37, 1.8 และ 3.7 μg/mL (ประมาณ 1, 5 และ 10 μM) เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดระดับของพี-กลัยโคโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการลดลงของพี-กลัยโคโปรตีน จะเป็นแบบลดลงตามระดับความเข้มข้นของเคอร์คิวมินอยด์รวม (dose-dependent manner) เมื่อเปรียบเทียบผลของเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดต่อระดับของพี-กลัยโคโปรตีนและ MDR1 mRNA พบว่าบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินที่ได้จากบริษัท Kalsec และจากการสกัดเองในห้องปฏิบัติการให้ผลการทดลองที่เหมือนกันคือ ลดทั้งระดับ พี-กลัยโคโปรตีนและ mRNA

การศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *MDR1* จำเป็นต้องศึกษาเพื่อความเข้าใจถึงกลไกการดื้อยาในเซลล์มะเร็ง โดยยีน *MDR1* เป็นยีนที่สร้างพี-กลัยโคโปรตีน และมีส่วนของโปรโมเตอร์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้อยู่ที่ตำแหน่ง -84 ถึง -65 ประกอบด้วยลำดับเบสคือ GGCTGATTGGCTGGGCAGGA การจับกันของดีเอ็นเอกับโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการทดลองทำให้ทราบว่า บริเวณโปรโมเตอร์ที่ศึกษานี้มีความจำเพาะต่อการจับของโปรตีนจากนิวเคลียส (ทรานสคริบชั่นแฟกเตอร์) จากนั้นทำการศึกษาชนิดของโปรตีนจากนิวเคลียส โดยวิธีการที่เรียกว่า competitive electrophoresis mobility shift assay โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้ติดฉลากด้วยสารรังสี คือ SP1, AP1, AP2, OCT1, $NF_{\kappa}B$ และ CREB ผลการทดลองพบว่า CREB สามารถแย่งจับกับทรานสคริบชั่นแฟกเตอร์ ชนิดที่สามารถจับได้ดีกับตัวติดตามที่ติดฉลากดีกว่าโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้ติดฉลากด้วยสารรังสี ดังนั้นการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า CREB เป็นทรานสคริบชั่นแฟกเตอร์ที่จับกับโปรโมเตอร์ของยีน *MDR1* ที่ตำแหน่ง -65 ถึง -84 และผลการทดลองนี้ได้ทำการทดลองยืนยันอีกครั้งด้วยวิธีการ supershift โดยใช้แอนติบอดีต่อ CREB นอกจากนี้ได้ทำการทดลองทดสอบผลของเคอร์คิวมินอยด์จากบริษัท (ซิกม่า-อัลดริช) ต่อการยับยั้งการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *MDR1* ผลการทดลองพบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *MDR1*ได้ และเมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบกับบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน พบว่าบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินให้ผลในการยับยั้งที่ดีที่สุด การทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินให้ผลดีที่สุดในการปรับเปลี่ยนการแสดงออกของยีน *MDR1*

ส่วนผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการทำงานของพี-กลัยโคโปรตีน ทำการศึกษาโดยการดูการสะสมและการขับไล่ rhodamine123 (Rh123) ของเซลล์ KB-V1 พบว่า เคอร์คิวมินอยด์รวมมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของการสะสม Rh123 เป็นแบบเพิ่มการสะสมขึ้นตามระดับความเข้มข้นของเคอร์คิวมินอยด์รวม (1.8-20.3 μg/mL หรือ ประมาณ 5-55 μM) และสามารถยับยั้งการขับไล่ Rh123 ออกนอกเซลล์ด้วย แต่ไม่มีผลต่อการขับไล่ยาในเซลล์มะเร็งที่ไวต่อยา คือ KB-3-1 จากการศึกษาผลของ เคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินต่อการทำงานของพี-กลัยโคโปรตีนพบว่าเคอร์คิวมินเพิ่มการสะสม Rh123 เป็นแบบเพิ่มการสะสมขึ้นตามระดับความเข้มข้นของเคอร์คิวมิน (1.8-20.3 μg/mL หรือ ประมาณ 5-55 μM) แต่จากการศึกษายังพบว่าเคอร์คิวมินอยด์รวมก็สามารถนำมาใช้อย่างมีประสิทธิภาพได้เช่นกัน ซึ่งทำได้โดยการเพิ่มความ

เข้มข้นของเคอร์คิวมินอยด์รวมเป็น 3 เท่าของเคอร์คิวมิน จากการศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อความไวต่อการเป็นพิษของยาวินบลาสติน พบว่าทั้งเคอร์คิวมินอยด์รวมและเคอร์คิวมิน สามารถเพิ่มความไวต่อการเป็นพิษของยาวินบลาสติน ซึ่งมีผลของการทดลองที่ไปในทางเดียวกันกับผลของการสะสมของ Rh123

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University