Thesis Title Effect of Green Tea Flavonoids on P-glycoprotein Function and mdr1 Gene Expression in Human Cervical Carcinoma Cells

Author Miss Warunee Kumsaiyai

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Porn-ngarm Limtrakul	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Amphawan Apisariyakul	Member
Assist. Prof. Dr. Ratana Banjerdpongchai	Member

ABSTRACT

Resistance to multiple chemotherapeutic drugs is one of the main reasons for treatment failure in the chemotherapy of malignant tumors. One of the most studied mechanisms of multidrug resistance (MDR) is the overproduction of P-glycoprotein (Pgp) in the plasma membranes of resistant cells, where the Pgp acts as an energy dependent efflux pump, reducing the intracellular accumulation of chemotherapeutic drugs. Resistance mediated by Pgp is special importance because the exposure of cancer cells to one chemotherapeutic drug results in a resistance not only to the inducer, but also to many other chemically unrelated chemotherapeutic drugs, representing a nonspecific cross resistance.

Extensive studies have been preformed with the aim of developing effective resistance modulators to overcome the MDR of human cancers. Potent Pgp modulators are being investigated in clinical trials. However, clinical application has not been attained to date because of their toxicity and undesirable side effects. In a search for MDR modulators from natural sources, in this study, a series of structurally related compounds of green tea flavonoids which are catechin, epicatechin (EC), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin (EGC) and epigallocatechin gallate (EGCG) were investigated because of their medicinal value in Asian

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

traditional medicine. The green tea flavonoids were tested for their ability to modulate Pgp function, expression and to reverse MDR phenotype.

The antitumor activity of green tea flavonoids were tested and found that catechin and ECG were non toxic to the drug resistance KB-V1 and drug sensitive KB-3-1 cells but EC, EGC and EGCG were toxic to both cell lines which EGCG is the most potent cytotoxic agent to the human cervical carcinoma cell line. To examine the effect of green tea flavonoids on Pgp function, the accumulation and efflux of Rhodamine123 (Rh123) and ^{3}H-vinblastine were performed in the Pgp expressing KB-V1 cells compared with its wild type, KB-3-1. The results showed that ECG and EGCG increased the accumulation and inhibited the efflux of Rh123 and ^{3}H-vinblastine in a dose dependent manner in KB-V1 cells, but did not effect the transport of these drugs in KB-3-1 cells. However, catechin, EC and EGC had no modulating effect on drug transport in neither KB-V1 cells nor KB-3-1 cells. This result confirmed the suggestion from previous study that the gallate group might be important for regulation of Pgp function.

To investigate the effect of green tea flavonoids on Pgp expression, the Pgp levels were determined by western blot analysis and the quantitative analysis at band 170 kDa, representing Pgp by densitometer. After incubation of KB-V1 cells with green tea flavonoids for 48 h, the results showed that treatment with 50 and 100 μM of EC significantly decreased the Pgp level, while treatment with 50 and 100 μM of ECG increased the Pgp level compared to 0.4%DMSO vehicle control. There was no significant difference in Pgp levels on catechin, EGC and EGCG treatment. After incubation KB-V1 cells with 100, 200 and 300 μM of ECG and EGCG for 2 h which equaled to the incubation times used in Pgp functional test, no difference in Pgp levels were observed, indicating that ECG and EGCG increased the intracellular Rh123 and ^{3}H-vinblastine accumulation by modulation of Pgp activity without confering its expression.

The combination treatment of green tea flavonoids with vinblastine for 48 h were tested on KB-V1 and KB-3-1 cell proliferation to determine whether green tea flavonoids potentiate the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs. Only 50 and 100 μM of EGCG which these concentration caused the cell death not more than 20%, desensitized to vinblastine toxicity in a dose dependent manner in both KB-V1 and KB-3-1 cells, the others had no effect on neither KB-V1 nor KB-3-1 cells. Moreover, EGCG not only desensitized KB-V1 cells to vinblastine toxicity, but also to other chemotherapeutic drugs such as paclitaxel, doxorubicine and colchicine. Desensitizing to

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

vinblastine toxicity caused by EGCG could be observed after 24 h incubation. However, pre incubation with EGCG for 48 h and then treated with vinblastine for 48 h caused no effect on cell survival when compared with vehicle control. These data suggested that chemotherapeutic drugs combined with EGCG might modulate other signal transduction that played the protective role against cell death which was probably more pronounced than its effect on Pgp activity, thus KB-V1 and KB-3-1 cells were desensitized especially to vinblastine when EGCG was included in the culture medium.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของสารฟลาโวนอยด์ในใบชาเขียวต่อหน้าที่ของพีไกลโคโปรตีนและการแสดงออกของยีนเอ็มดีอาร์ 1ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์
ผู้เขียน	นางสาววารุณี คำสายใย
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร.พรงาม ลิ้มตระกูล ประธานกรรมการ รศ.ดร.อัมพวัน อภิสริยะกุล กรรมการ ผศ. ดร.รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย กรรมการ

บทคัดย่อ

การดื้อต่อยารักษามะเร็งหลายขนานเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของความล้มเหลวในการรักษาโรคมะเร็งด้วยยาเคมีบำบัด กลไกการเกิดการดื้อยาหลายขนานที่มีการศึกษามากที่สุดคือมีการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีนที่ผิวเซลล์เพิ่มมากขึ้น โดยพีไกลโคโปรตีนจะทำหน้าที่เป็นเหมือนปั๊มในการกระตุ้นการขับยาออกนอกเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาโดยอาศัยพลังงาน เป็นผลให้ลดการสะสมยาเคมีบำบัดภายในเซลล์มะเร็ง การดื้อยาโดยพีไกลโคโปรตีนมีความสำคัญเนื่องจากการให้ยาเคมีบำบัดเพียงขนานเดียวก็สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการดื้อต่อยาขนานอื่นซึ่งมีโครงสร้างที่แตกต่างกันได้

ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางเพื่อพัฒนาสารที่มีประสิทธิในการลดการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง โดยสารที่มีคุณสมบัติในการควบคุมการทำงานของพีไกลโคโปรตีนยังอยู่ในระยะทดลองซึ่งการนำมาใช้จริงทางคลีนิคยังมีข้อจำกัดเนื่องจากความเป็นพิษและการเกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยาดังกล่าว ดังนั้นจึงมีการค้นคว้าหาสารที่มีคุณสมบัติควบคุมการทำงานของพีไกลโคโปรตีนจากแหล่งธรรมชาติ การศึกษาครั้งนี้ศึกษาสารฟลาโวนอยด์ที่พบในชาเขียวได้แก่ เคททิชิน อิพิเคททิชิน อิพิเคททิชินกอลเทล อิพิกอลโลเคททิชิน และอิพิกอลโลเคททิชิน กอลเลท เนื่องจากสารเหล่านี้ในประเทศแถบเอเชียเชื่อว่ามีสรรพคุณในการรักษาโรคต่างๆได้ สารเหล่านี้ถูกนำมาทดสอบหาความสามารถ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการควบคุมการทำงาน การแสดงออกของพีไกลโคโปรตีนและความสามารถในการลดการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง

การทดสอบผลของสารฟลาโวนอยด์ที่พบในชาเขียวต่อคุณสมบัติการเป็นสารต้านมะเร็งพบว่าเดททิชินและอิพิเดททิชินกอลเลทไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดื้อยา KB-V1 และเซลล์ที่ไวต่อยา KB-3-1 แต่พบว่าอิพิเคททิชิน อิพิกอลโลเคททิชินและอิพิกอลโลเคททิชิน กอลเลท มีพิษต่อเซลล์ทั้งสองซึ่งอิพิกอลโลเคททิชิน กอลเลท เป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด การทดสอบผลของสารฟลาโวนอยด์ที่พบในชาเขียวต่อการทำงานของพีไกลโคโปรตีน ทำได้โดยวัดการสะสมและการขับออกของโรดามีนและทริทิเอเท็ด-วินบลาสตินในเซลล์ KB-V1 ซึ่งมีการแสดงออกของพีไกลโคโปรตีนเปรียบเทียบกับเซลล์ KB-3-1 ซึ่งไม่มีการแสดงออกของพีไกลโคโปรตีน พบว่า อิพิเคททิชินกอลเทลและอิพิกอลโลเคททิชิน กอลเลท เพิ่มการสะสมและลดการขับออกของโรดามีนและทริทิเอเท็ด-วินบลาสตินตามความเข้มข้นของสารฟลาโวนอยด์ที่เพิ่มขึ้น โดยไม่มีผลต่อการขนส่งยาทั้งสองชนิดนี้ในเซลล์ KB-3-1 อย่างไรก็ตามพบว่าเคททิชิน อิพิเคททิชินและอิพิกอลโลเคททิชิน ไม่มีผลต่อการขนส่งยาทั้งสองชนิดนี้ทั้งในเซลล์ KB-V1 และ KB-3-1 ผลที่ได้ยืนยันข้อชี้แนะที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ว่าหมู่กอลเทลเป็นส่วนสำคัญในการควบคุมการทำงานของพีไกลโคโปรตีน

การทดสอบผลของสารฟลาโวนอยด์ที่พบในชาเขียวต่อการแสดงออกของพีไกลโคโปรตีนทำได้โดยวัดระดับของพีไกลโคโปรตีนโดยวิธีเวสเทอร์นบอทและวิเคราะห์ปริมาณพีไกลโคโปรตีนด้วยเครื่องวัดความทึบแสง หลังจากการบ่มเซลล์ KB-V1 ด้วยสารฟลาโวนอยด์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการบ่มเซลล์ด้วยอิพิเคททิชินที่ความเข้มข้น 50 และ100 ไมโครโมลาร์ ลดปริมาณพีไกลโคโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการบ่มเซลล์ด้วยอิพิเคททิชินกอลเทลที่ความเข้มข้นเดียวกันกลับช่วยเพิ่มปริมาณพีไกลโคโปรตีนเมื่อเทียบกับชุดควบคุม หากบ่มเซลล์ด้วยเคททิชิน อิพิกอลโลเคททิชิน และอิพิกอลโลเคททิชิน กอลเลท ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณพีไกลโคโปรตีน นอกจากนี้การบ่มเซลล์ด้วยอิพิเคททิชินกอลเทลและอิพิกอลโลเคททิชิน กอลเลท ที่ความเข้มข้น 100,200 และ300 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 2 ชั่วโมงซึ่งเท่ากับเวลาที่ใช้ในการทดสอบผลต่อหน้าที่ของพีไกลโคโปรตีน พบว่าปริมาณพีไกลโคโปรตีนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มการสะสมของโรดามีนและทริทิเอเท็ด-วินบลาสตินโดยอิพิเคททิชินกอลเทลและอิพิกอลโลเคททิชิน กอลเลท เกิดจากการที่สารดังกล่าวไปมีผลต่อการทำงานของพีไกลโคโปรตีนที่มีอยู่แล้วในเซลล์โดยไม่มีการเพิ่มการสังเคราะห์พีไกลโคโปรตีนขึ้นใหม่

การบ่มเซลล์ KB-V1 และ KB-3-1 ด้วยสารฟลาโวนอยด์ที่พบในชาเขียวร่วมกับยาวินบลาสตินเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและวัดการเจริญเติบโตของเซลล์เพื่อทดสอบความสามารถในการลดการดื้อยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของสารฟลาโวนอยด์พบว่ามีเพียงอิพิกอลโลเคททิชิน กอลเลท ที่ความเข้มข้น 50และ100 ไมโครโมลาร์ซึ่งความเข้มข้นนี้ทำให้เซลล์ตายไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์เพิ่มความทนต่อยาวินบลาสตินทั้งในเซลล์ KB-V1 และเซลล์ KB-3-1 นอกจากนี้อิพิกอลโลเคททิชิน กอลเลทยังเพิ่มความทนต่อยาเคมีบำบัดชนิดอื่นอีกด้วยเช่น เพคลิเทคซอล, ด็อกโซรูบิซินและโคลชิซิน การเพิ่มความทนต่อยาวินบลาสตินนั้นสามารถพบได้ตั้งแต่ 24 ชั่งโมงแรกของการบ่มเซลล์ นอกจากนี้เมื่อบ่มเซลล์ก่อนด้วยอิพิกอลโลเคททิชิน กอลเลทเป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วจึงบ่มด้วยวินบลาสตินต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการดื้อยาเมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากข้อมูลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ร่วมกันของอิพิกอลโลเคททิชิน กอลเลทและวินบลาสตินอาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณภายในเซลล์ซึ่งกระตุ้นการอยู่รอดของเซลล์ถึงแม้ว่าอิพิกอลโลเคททิชิน กอลเลทเองจะมีผลต่อการควบคุมการทำงานของพีไกลโคโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved