

Thesis Title	Effect of Methoxyflavone Derivatives on Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Human Leukemic Cell Apoptosis
Author	Miss Benjawan Wudtiwai
Degree	Master of Science Biochemistry
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Ratana Banjerdpongchai

ABSTRACT

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptotic cell death in various tumor cells. Yet, it does not affect normal cells and leukemic cells such as adult T-leukemia/lymphoma MOLT-4 cells, and human leukemic monocytic U937 cells. Thus, these two leukemic cells are relatively resistant to TRAIL.

Kaempferia parviflora is a Thai medicinal herb that has an anticancer activity. One of the major flavonoids present in the rhizome of *K. parviflora* is methoxyflavone. The aims of this study were to examine the synergistic effect of methoxyflavone derivatives on TRAIL-induced apoptosis in MOLT-4 and U937 cells, and to investigate the mechanism of their action in MOLT-4 cells. In this study, three flavonoids extracted from the rhizome of *K. parviflora* were 5,7-dimethoxyflavone (DMF), 5,7,4'-trimethoxyflavone (TMF) and 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PMF).

In addition, synthetic flavonoids including 5 methoxyflavone (5-MF) and 2'-methoxyflavone (2'-MF) were chosen for testing in this study.

The cytotoxic effect of five methoxyflavone derivatives in MOLT-4, U937 and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was analyzed by MTT assay. Next, the inhibitory concentration at 20% (IC_{20}) was used for further experiments. The induction of apoptosis and the reduction of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) were detected using flow cytometry technique via staining with annexin V, fluorescein isothiocyanate (FITC) with propidium iodide (PI), and 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6), respectively. Production of reactive oxygen species (ROS) was determined by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDC) and processed by flow cytometer. Protein expression of DR4, DR5, cFLIP, Mcl-1, BAX and Bid was analyzed by immunoblotting, and activities of caspase-3 and -8 by fluorometric assay using substrates DEVD-AFC and IETD-AFC, respectively.

All five methoxyflavone derivatives were cytotoxic to MOLT-4 and U937 cells and induced their apoptosis while DMF, TMF and PMF were not toxic to PBMC. When combined with TRAIL, all derivatives reduced a number of U937 early apoptotic cells, but increased that of late apoptotic cells. In MOLT-4 cells, the methoxyflavone derivatives from *K. parviflora* could synergistically enhance the TRAIL-induced early apoptosis whereas the synthetic compounds increased the late apoptosis. Percentage of MOLT-4 cells with $\Delta\psi_m$ was increased by all methoxyflavone derivatives in the presence of TRAIL, but no such alteration was observed in U937 cells.

5-MF enhanced the ROS production and the TRAIL-induced apoptotic cell death through the up-regulation of both DRs and the down-regulation of cFLIP and Mcl-1. The cleavage of Bid and up-regulation of BAX were also demonstrated, followed by the activation of both caspases. In addition, 2'-MF gave similar results but it was less effective than 5-MF.

In conclusion, methoxyflavone derivatives from *K. parviflora* and synthetic compounds synergized the effect of TRAIL on apoptotic induction in human leukemic MOLT-4 and U937 cells. 5-MF and 2'-MF exerted their apoptotic effect in MOLT-4 cell by a mechanism via both death receptor and mitochondrial pathways.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของอนุพันธ์เมทอกซีเฟลโวนต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยลิแกนด์เหนี่ยวนำอะพอพโทซิสที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยการตายเฉพาะส่วนของเนื้องอก
ผู้เขียน	นางสาวเบญจวรรณ วุฒิวัย
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. รัตนา บรรณเจดพงษ์ชัย

บทคัดย่อ

ลิแกนด์เหนี่ยวนำอะพอพโทซิสที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยการตายเฉพาะส่วนของเนื้องอก (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) เหนี่ยวนำการตายแบบ อะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งหลายชนิดแต่ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ได้แก่ Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) เป็นกลุ่มของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เช่น MOLT-4 และเซลล์ human leukemic monocytic U937 ซึ่งมีการติดต่อกับ TRAIL

Kaempferia parviflora (กระชายดำ) เป็นสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ฟลาโวนอยด์ 3 ชนิดที่สกัดได้จาก เหง้ากระชายดำจัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ 5,7-dimethoxyflavone, 5,7,4'-trimethoxyflavone and 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone นอกจากนี้สารสังเคราะห์ที่รวมอยู่ในการศึกษานี้คือ 5-methoxyflavone และ 2'-methoxyflavone. การศึกษานี้มีจุดประสงค์ในการทดลองนี้เพื่อตรวจสอบฤทธิ์เสริมของสารอนุพันธ์เมทอกซีเฟลโวน ร่วมกับ TRAIL ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด MOLT-4 และศึกษากลไกของสารอนุพันธ์ของเมทอกซีเฟลโวนและ TRAIL ต่อการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด MOLT-4 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

การศึกษาความเป็นพิษของสารอนุพันธ์ของเมทอกซีเฟลโวน (2'-methoxyflavone, 5-methoxyflavone, 5,7-dimethoxyflavone, 5,7,4'-tetramethoxyflavone and 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone) ร่วมกับ TRAIL สามารถกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสในมะเร็งเม็ดเลือดขาว MOLT-4, U937 และเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยวิธี MTT assay จากการทดลองนี้จะเลือกใช้ความเข้มข้นของอนุพันธ์เมทอกซีเฟลโวนที่ IC_{20} (ที่ทำให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตลดลงยี่สิบเปอร์เซ็นต์) ในการทดลองต่อไป ในการตรวจสอบการตายแบบอะพอพโทซิสใช้สารอนุพันธ์เมทอกซีเฟลโวนร่วมกับ TRAIL และดูการสูญเสีย mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$)

ด้วยการย้อมด้วย annexinV FITC ร่วมกับ propidium iodide (PI) และ 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6) ตามลำดับ ซึ่งตรวจสอบโดยโฟลโลไซโตมิเตอร์

จากการทดลองพบว่าสารอนุพันธ์เมทอกซีเฟลโวนไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว และ อนุพันธ์เมทอกซีเฟลโวนร่วมกับ TRAIL ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 แต่มีกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ MOLT-4 และพบว่า 5-MF เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านทางกระตุ้นการแสดงออกของ DRs เพิ่มขึ้น และลดการแสดงออกของ cFLIP และ Mcl-1 ซึ่งส่งผลให้ caspase-8 ผ่านทาง extrinsic pathway และส่งไปไปตัดโปรตีน BH3 interacting domain death agonist (BID) ให้เป็น truncated Bid และกระตุ้นการทำงานของ BAX. นอกจากนี้ caspase-8 ที่กระตุ้นการตายผ่านทางภายนอกและยังไปกระตุ้น caspase-3 ซึ่งอาจผ่านทาง BAX ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผิวของไมโทคอนเดรีย ทำให้เกิด mitochondria outer membrane permeabilization ชักนำให้เกิดการสูญเสีย mitochondrial transmembrane potential. การตายแบบ mitochondrial pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นผ่านเอนไซม์ caspase-3 ROS ที่ถูกสร้างมาอาจเป็นสาเหตุในการกระตุ้นการตายผ่านทางไมโทคอนเดรียหรือเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณการตายผ่านทางไมโทคอนเดรียมากขึ้น ซึ่ง 2'-MF ให้ผลคล้ายกับ 5-MF แต่มีผลน้อยกว่า

โดยสรุปสารอนุพันธ์เมทอกซีเฟลโวนซึ่งพบในเหง้ากระชายดำและสารสังเคราะห์ร่วมกับ TRAIL สามารถเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็ง MOLT-4 ที่น่าสนใจคือความสามารถของสารอนุพันธ์เมทอกซีเฟลโวนในการเหนี่ยวนำให้เกิดการลดการแสดงออกของโปรตีนยับยั้งของ TRAIL และเพิ่มการแสดงออกของ death receptor