Abstract

Project code: MRG5080092

Project Title: Screening for Inhibitors of Multidrug Resistance from Marine and Plant Sources using Drug Resistant Cancer Cell Lines

Investigator: Dr. Yodsoi Kanintronkul

E-mail Address: yodsoi@hotmail.com

Project Period: 2 years

The development of drug resistance is one of the major obstacles to effective cancer chemotherapy. In order to understand the mechanism of drug resistance, a resistant lung cancer cell line A549RT-eto were established by continuous exposure of A549 cell line to increasing concentrations of etoposide. This A549RT-eto cell line was approximately 28-fold more resistant to etoposide when compared to parental A549 cell line. Moreover, A549RT-eto resistant cells were cross resistant to doxorubicin but not to taxol and cisplatin. To investigate the drug resistance mechanism, the expression levels of drug resistance-related genes were determined using real-time PCR. Of all the genes investigated, only *mdr1* transcript levels were drastically increased in A549RT-eto cells compared to the parental cells. Since the *mdr1* gene encodes for P-glycoprotein (P-gp), a membrane protein involved in drug efflux pumps, the expression of P-gp and its transport activity were studied. Western blot analysis showed higher P-gp expression in the resistant cells compared to A549 cells. As determined by flow cytometry, the levels of calcein transported in the drug resistant cells were also enhanced, which correlates with the increase in P-gp expression shown in the western blot. Therefore, these studies strongly suggest that expression of *mdr1* induced by etoposide plays a major role in the development of drug resistance in A549RT-eto cell line. In the future, this cell line may be used as an *in vitro model* for the screening of novel P-gp inhibitors to overcome drug resistance in human cancer cells.

Keyword: Multidrug resistance, P-glycoprotein, Flow cytometry, Lung cancer cell

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5080092

ชื่อโครงการ: การหาสารประกอบจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง

ชื่อนักวิจัย: Dr. Yodsoi Kanintronkul

E-mail Address: yodsoi@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

ปัจจุบันนี้ปริมาณผู้เสียชีวิตจากการป่วยเป็นมะเร็งสูงขึ้นทุกปี การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด เป็นทางเลือกหนึ่ง แต่เนื่องจากปัญหาการดื้อยาของเซลล์มะเร็งเป็นอุปสรรคสำคัญต่อประสิทธิภาพการรักษามะเร็งด้วยวิธีนี้ งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะเข้าใจถึงกลไกการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการพัฒนาเซลล์มะเร็งปอดดื้อยา (A549RT-eto) โดยการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด (A549) ในอาหารที่มียา etoposide ในปริมาณต่ำๆ และ ค่อยๆเพิ่มปริมายาขึ้นจนถึง 1.5 ไมโครโมลาร์ หลังจากนั้น นำเซลล์มะเร็งปอดดื้อยา และเซลล์มะเร็งปอด ไปหาค่า IC_{50} ต่อยา etoposide doxorubicin taxol และ cisplatin พบว่า เซลล์มะเร็งปอดดื้อยามีความสามารถต้านทานยาฆ่ามะเร็ง etoposide และ doxorubiciin ได้มากกว่าเซลล์มะเร็งปอดถึง 28 และ 5 เท่า ตามลำดับ เพื่อที่จะศึกษาถึงกลไกการดื้อยาของเซลล์มะเร็งในระดับอาร์เอ็นเอ การทดลองต่อไปจึงได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอของทั้งสองเซลล์ และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง พบว่า เซลล์มะเร็งปอดดื้อยามีการแสดงออกของ ยีน mdr1 สูงกว่าเซลล์มะเร็งปอด ในขณะที่ทั้งสองเซลล์มีการแสดงออกของยีนอื่นๆใกล้เคียงกัน การศึกษาระดับโปรตีน ยีน mdr1 encodeได้พีไกลโคโปรตีน การทดลองขั้นต่อไปจึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกระดับโปรตีนของพีไกลโคโปรตีนในทั้งสองเซลล์ พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนพีไกลโคโปรตีนสูงในเซลล์มะเร็งปอดดื้อยา ซึ่งสอดคล้องการการศึกษาการทำงานของพีไกลโคโปรตีนด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรี เซลล์มะเร็งปอดดื้อยา สามารถขับยาออกจากเซลล์ได้มากกว่า เซลล์มะเร็งปอด การทดลองครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า การดื้อยาของเซลล์มะเร็งปอดดื้อยาเกิดจากการแสดงออกของยีน mdr1 ซึ่งแสดงออกเป็นพีไกลโคโปรตีน และมีหน้าที่ขับยาออกจากเซลล์

Keyword: ดื้อยา, พีไกลโคโปรตีน, โฟลไซโตเมทรี, มะเร็งปอด