



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์และกลไกของไนตริกออกไซด์ต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด

โดย อาจารย์ เกสัชกร ดร. ปิติ จันทรรวัชโรติ และคณะ

กรกฎาคม พ.ศ. 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์และกลไกของไนตริกออกไซด์ต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด

ผู้วิจัย

สังกัด

- อ.ภก.ดร. ปิติ จันทรรวโชติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- รศ.ภญ.ดร. อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MG5080134

(รหัสโครงการ)

Project Title: ฤทธิ์และกลไกของไนตริกออกไซด์ต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด

(ชื่อโครงการ) (Roles and mechanisms of nitric oxide on lung cancer cell metastasis)

Investigator : อาจารย์ เกษัชกร ดร. ปิติ จันทรรพโชค

(ชื่อนักวิจัย)

E-mail Address : pithi_chan@yahoo.com

Project Period : 2 ปี

(ระยะเวลาโครงการ)

Abstract:

(บทคัดย่อ)

กระบวนการตายของเซลล์แบบ anoikis หรือการตายของเซลล์แบบ apoptosis ชนิดหนึ่งที่ถูกกระตุ้นเมื่อเซลล์หลุดจากการยึดเกาะ เป็นกระบวนการที่สำคัญในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การติดต่อการตายชนิดนี้พบได้มากในมะเร็งปอดและส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอันเป็นสาเหตุสำคัญอันดับต้นๆของการตายของผู้ป่วย ข้อมูลงานวิจัยในปัจจุบันบ่งชี้ว่าโปรตีน caveolin-1 (Cav-1) และไนตริกออกไซด์มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามบทบาทรวมไปถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารและโปรตีนดังกล่าวต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าไนตริกออกไซด์ส่งผลในการยับยั้งการตายแบบ anoikis ของเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 โดยเมื่อเพิ่มระดับไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์โดยใช้สารให้ไนตริกออกไซด์ คือ sodium nitroprusside (SNP) และ diethylenetriamine (DETA) NONOate จะพบการตายของเซลล์หลังการหลุดจากการยึดเกาะลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่สารที่ลดปริมาณไนตริกออกไซด์คือ aminoguanidine และ 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetra-methylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (c-PTIO) จะส่งผลตรงข้ามโดยเพิ่มการตายของเซลล์ นอกจากนี้การวิจัยนี้ ยังพบว่าการติดต่อการตายแบบ anoikis ในเซลล์นี้ขึ้นกับเกิดจากการทำงานของโปรตีน Cav-1 ซึ่งระดับของโปรตีนนี้จะลดลงเมื่อเซลล์หลุดจากการยึดเกาะ พบว่าไนตริ

ออกไซด์จะยับยั้งการลดลงของโปรตีน Cav-1 โดยไนตริกออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับโปรตีนด้วยกระบวนการ S-nitrosylation และการเกิด S-nitrosylation นี้ก็จะยับยั้งการทำลายของโปรตีน Cav-1 โดย proteasome การยับยั้งการทำลายโปรตีน Cav-1 ดังกล่าวนั้นเองเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้ระดับโปรตีน Cav-1 ในเซลล์เพิ่มมากขึ้นและลดการตายที่เกิดจากการหลุดออกของเซลล์ การวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงกลไกใหม่ที่ยังไม่ได้รับการเปิดเผยมาก่อน ในการที่ไนตริกออกไซด์ควบคุมการต่อการตายแบบ anoikis ในเซลล์มะเร็งปอด

คำหลัก : ไนตริกออกไซด์ การตายของเซลล์ อะนอยคิส อะพอพโทซิส

Anoikis, a detachment-induced apoptosis, is a principle mechanism in inhibition of tumor cell metastasis. Tumor cell acquiring anoikis-resistance, as frequently observed in human lung cancer, becomes an important obstacle of efficient cancer therapy. Recently, signaling mediators such as caveolin-1 (Cav-1) protein and nitric oxide (NO) have garnered attention in metastasis research; however, their roles and the underlying mechanisms of metastasis regulation are largely unknown. Here, we show that NO impairs the apoptotic function of the human lung carcinoma H460 cells after detachment. The NO donors sodium nitroprusside (SNP) and diethylenetriamine (DETA)-NONOate inhibit detachment-induced apoptosis, whereas the NO inhibitors aminoguanidine and 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetra-methylimidazole-1-oxyl-3-oxide (c-PTIO) promote this effect. Resistance to anoikis in H460 cells is mediated by Cav-1, which is significantly downregulated after cell detachment through a process that involves protein S-nitrosylation, which prevents its proteasomal degradation and induction of anoikis by cell detachment. These findings indicate a novel pathway for NO regulation of Cav-1, which could be a key mechanism of anoikis resistance in tumor cells.

Keywords : nitric oxide, anoikis, apoptosis, caveolin-1

เนื้อหางานวิจัย

1. บทคัดย่อ

บทคัดย่อภาษาไทย

กระบวนการตายของเซลล์แบบ anoikis หรือการตายของเซลล์แบบ apoptosis ชนิดหนึ่งที่ถูกกระตุ้นเมื่อเซลล์หลุดจากการยึดเกาะ เป็นกระบวนการที่สำคัญในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การต่อต้านการตายชนิดนี้พบได้มากในมะเร็งปอดและส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอันเป็นสาเหตุสำคัญอันดับต้นๆของการตายของผู้ป่วย ข้อมูลงานวิจัยในปัจจุบันบ่งชี้ว่าโปรตีน caveolin-1 (Cav-1) และไนตริกออกไซด์มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามบทบาทรวมไปถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารและโปรตีนดังกล่าวต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าไนตริกออกไซด์ส่งผลในการยับยั้งการตายแบบ anoikis ของเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 โดยเมื่อเพิ่มระดับไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์โดยใช้สารให้ไนตริกออกไซด์ คือ sodium nitroprusside (SNP) และ diethylenetriamine (DETA) NONOate จะพบการตายของเซลล์หลังการหลุดจากการยึดเกาะลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่สารที่ลดปริมาณไนตริกออกไซด์คือ aminoguanidine และ 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetra-methylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (c-PTIO) จะส่งผลตรงข้าม โดยเพิ่มการตายของเซลล์ นอกจากนี้การวิจัยนี้ ยังพบว่าการต่อต้านการตายแบบ anoikis ในเซลล์นี้เกิดจากการทำงานของโปรตีน Cav-1 ซึ่งระดับของโปรตีนนี้จะลดลงเมื่อเซลล์หลุดจากการยึดเกาะ พบว่าไนตริกออกไซด์จะยับยั้งการลดลงของโปรตีน Cav-1 โดยไนตริกออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับโปรตีนด้วยกระบวนการ S-nitrosylation และการเกิด S-nitrosylation นี้ก็จะยับยั้งการทำลายของโปรตีน Cav-1 โดย proteasome การยับยั้งการทำลายโปรตีน Cav-1 ดังกล่าวนั้นเองเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้ระดับโปรตีน Cav-1 ในเซลล์เพิ่มมากขึ้นและลดการตายที่เกิดจากการหลุดออกของเซลล์ การวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงกลไกใหม่ที่ยังไม่ได้รับการเปิดเผยมาก่อน ในการที่ไนตริกออกไซด์ควบคุมการต่อต้านการตายแบบ anoikis ในเซลล์มะเร็งปอด

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Anoikis, a detachment-induced apoptosis, is a principle mechanism in inhibition of tumor cell metastasis. Tumor cell acquiring anoikis-resistance, as frequently observed in human lung cancer, becomes an important obstacle of efficient cancer therapy. Recently, signaling mediators such as caveolin-1 (Cav-1) protein and nitric oxide (NO) have garnered attention in metastasis research; however, their roles and the underlying mechanisms of metastasis regulation are largely unknown. Here, we show that NO impairs the apoptotic function of the human lung carcinoma H460 cells after detachment. The NO donors sodium nitroprusside (SNP) and diethylenetriamine (DETA)-NONOate inhibit detachment-induced apoptosis, whereas the NO inhibitors aminoguanidine and 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetra-methylimidazole-1-oxyl-3-oxide (c-PTIO) promote this effect. Resistance to anoikis in H460 cells is mediated by Cav-1, which is significantly downregulated after cell detachment through a process that involves protein S-nitrosylation, which prevents its proteasomal degradation and induction of anoikis by cell detachment. These findings indicate a novel pathway for NO regulation of Cav-1, which could be a key mechanism of anoikis resistance in tumor cells.

2. Executive summary

มะเร็งปอดเป็นโรคที่ก่อให้เกิดการตายของผู้ป่วยสูงที่สุดเมื่อเทียบกับโรคมะเร็งประเภทอื่นๆ ปัจจัยสำคัญที่ทำให้อัตราการตายของผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดนี้สูงมากนั้นเกี่ยวข้องกับ การแพร่กระจายของ เซลล์มะเร็ง และการดื้อต่อยาต้านมะเร็ง โครงการวิจัยนี้จึงเป็นไปเพื่อการศึกษา การศึกษาผลของไนตริกออกไซด์ต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด เพื่อให้ทราบถึงบทบาทและกลไกของไนตริกออกไซด์ในการควบคุมการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยอาจจะนำความรู้ที่ได้เชื่อมโยงไปถึงการพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ๆ เพื่อยับยั้งหรือลดการแพร่กระจายของโรคมะเร็งปอดในอนาคตได้ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังส่วนอื่นๆ ของร่างกาย (metastasis) นั้นเป็นกระบวนการที่สำคัญที่จะลดประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งลงอย่างมาก อีกทั้งเป็นสาเหตุหลักของการตายของผู้ป่วยโรคมะเร็ง จากการวิจัยนี้ทำให้ทราบว่า เซลล์มะเร็งปอดชนิด non-small-cell lung carcinoma H460 มีกลไกภายในเซลล์ในการยับยั้งการเกิด anoikis ซึ่งเป็นการตายของเซลล์แบบ apoptosis ที่เกิดขึ้นทันทีที่เซลล์หลุดจากการยึดเกาะ ซึ่ง anoikis นี้เองที่จัดเป็นกระบวนการของร่างกายที่สำคัญในการป้องกันการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง กลไกในการยับยั้งการตายของเซลล์มะเร็งนั้นจะทำให้เซลล์มะเร็งสามารถมีชีวิตรอดในกระแสเลือดหรือน้ำเหลืองได้ จนกระทั่งสามารถไปถึงและเกาะติดกับบริเวณใหม่และโตเป็นก้อนมะเร็งใหม่ได้ กลไกในการยับยั้งการเกิด anoikis นั้นเกี่ยวกับสารไนตริกออกไซด์ โดยไนตริกออกไซด์ ทำปฏิกิริยาโดยตรงต่อโปรตีน caveolin-1 (Cav-1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์และจากการวิจัยนี้พบว่าเมื่อเหนี่ยวนำให้ระดับโปรตีน Cav-1 สูงขึ้นในเซลล์จะพบว่าเซลล์นั้นดื้อต่อการตายแบบ anoikis อย่างมากแสดงให้เห็นว่าโปรตีนนี้เป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถยับยั้งกระบวนการตายหลังจากการหลุดจากการยึดเกาะได้ ไนตริกออกไซด์จะยับยั้งการทำลายโปรตีนนี้ ส่งผลให้ปริมาณโปรตีน Cav-1 สูงขึ้นในภายในเซลล์และยับยั้งการตายของเซลล์แบบ anoikis และส่งเสริมการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ งานวิจัยนี้จะเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทและกลไกของไนตริกออกไซด์ ซึ่งเป็นสารที่พบได้ทั่วไปในร่างกาย สามารถสร้างขึ้นได้ด้วยเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์บุหลอดเลือด เซลล์ประสาท เซลล์เม็ดเลือดขาว และพบว่าในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ นั้นจะมีการสร้างไนตริกออกไซด์เพิ่มมากขึ้นอย่างมาก การเข้าใจบทบาทของสารไนตริกออกไซด์ต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งดังกล่าวจะช่วยทำให้สามารถเข้าใจในกระบวนการและกลไกการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ดียิ่งขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีการรักษาโรคต่อไปในอนาคต

นอกเหนือจากนี้จากทฤษฎีที่ได้รับผู้วิจัยสามารถศึกษาผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ในเรื่อง ผลของ สารเคอร์คูมินในการลดการดื้อต่อยาต้านมะเร็งซิสพลาติน (cisplatin) ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ได้ เนื่องจากการดื้อต่อยาต้านมะเร็งก็เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อัตราการตายของผู้ป่วยโรคมะเร็งสูงอย่างมาก งานวิจัยนี้จึงเป็นไปเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสำคัญรวมถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวในการกระตุ้น ให้เซลล์มะเร็งที่ดื้อยา มีการตอบสนองต่อยาต้านมะเร็งได้ดีขึ้น ผลงานวิจัยแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ที่จะ พัฒนาสารเคอร์คูมินที่เป็นสารสำคัญหลัก ที่พบในขมิ้นชันมาใช้ในการลดการดื้อต่อยาต้านมะเร็ง การวิจัย พบว่าเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ดื้อต่อยาต้านมะเร็งซิสพลาตินได้โดยกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง โปรตีน Bcl-2 โปรตีน Bcl-2 นั้นเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการตายของเซลล์ และพบว่ามีเกี่ยวข้องอย่างมาก ต่อการดื้อต่อยาต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งหลายชนิด สารเคอร์คูมินนั้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดการลดลงของโปรตีน Bcl-2 และทำให้การดื้อต่อยาลดลงในเซลล์ดังกล่าวได้ นอกจากนี้งานวิจัยยังแสดงให้เห็นถึงกลไกระดับเซลล์ ในการทำงานของสารเคอร์คูมิน โดยพบว่าสารเคอร์คูมินจะเร่งให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระออกซิเจนชนิด superoxide anion ซึ่งสารนี้เองจะไปเร่งกระบวนการทำลายโปรตีน Bcl-2 ผ่านกระบวนการ ubiquitin-proteasomal degradation pathway และส่งผลลดปริมาณโปรตีนดังกล่าวและเหนี่ยวนำให้เซลล์ตอบสนองต่อ ยาต้านมะเร็งได้มากขึ้นตามลำดับ จากงานวิจัยดังกล่าวทำให้ทราบความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาสารเคอร์คูมิน เพื่อใช้ในกระบวนการรักษามะเร็ง และนอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นถึงกลไกใหม่ที่ไม่ได้รับการรายงานมาก่อน ในการควบคุมโปรตีน Bcl-2 ของเคอร์คูมินอีกด้วย

1. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อศึกษากลไกของไนตริกออกไซด์ในการควบคุมการทำหน้าที่ของโปรตีน ต่างๆที่ควบคุมการตายของเซลล์มะเร็งระหว่างการแพร่กระจาย

2. วิธีทดลอง

1. เซลล์เพาะเลี้ยง Cell Culture

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองในการวิจัยนี้เป็นเซลล์ human lung epithelial cell line ชื่อ NCI-H460 ซึ่งซื้อมาจาก American Type Culture Collection และเพาะเลี้ยงในอาหาร เลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีส่วนผสมเพิ่มเติมเป็น

- 5% fetal bovine serum
- 2 mmol/L L-glutamine
- 100 units/ml penicillin/streptomycin

เซลล์จะถูกเลี้ยงใน 5% CO₂ ที่อุณหภูมิควบคุมไว้ที่ 37°C

2. การวัดระดับของไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์

การตรวจวัดระดับของไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์ทำโดยใช้ flow cytometry และ fluorescence microscope โดยใช้สีย้อมที่เฉพาะเจาะจงต่อไนตริกออกไซด์คือ DAF-DA การทดลองทำโดย ภายหลังชุดเซลล์ออกจาก การยึดเกาะ เซลล์ประมาณ 1,000,000 เซลล์จะถูกนำมาใส่ 10 µmol/L ของสาร DAF-DA นาน 30 นาทีที่ 37°C หลังจากครบกำหนดเวลาจะล้างเซลล์ด้วย phosphate-buffered saline และนำเซลล์เข้าเครื่อง FACSCaliber flow cytometry เพื่อวิเคราะห์หาค่าความเข้ม fluorescence intensity หรือนำไปส่องดูและถ่ายภาพโดย fluorescence microscopy สัญญาณที่ได้จะ ตรวจจับที่ 538-nm

3. การทำ Cav-1 Stable Transfection

Plasmid ชนิด Cav-1 plasmids (pEX_Cav-1-YFP) สั่งซื้อมาจาก American Type Culture Collection (ATCC) หลังจากนั้นนำมาทำ Stable transfectants โดยการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด H460 cells ใน six-well plate จนกระทั่งได้เซลล์ความหนาแน่นประมาณ 60% confluence หลังจากนั้นใช้ 1 microgram ของ cytomegalovirus-neo vector และ 15 μ l ของน้ำยา Lipofectamine reagent ร่วมกับ 2 μ g ของ Cav-1 plasmid หรือ control pcDNA3 plasmid

โดยผสมส่วนผสมดังกล่าวและใส่เข้าสู่เซลล์ เลี้ยงเซลล์ต่อนาน 12 ชม. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ หลังการ transfection นาน 36 ชม. เซลล์จะถูกนำมาคัดเลือกโดย neomycin (600 μ g/ml) นาน 28 วัน เซลล์ที่ได้จะถูกนำมาตรวจสอบหาปริมาณโปรตีน Cav-1 โดย Western blot analysis และจะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี neomycin อย่างน้อย 2 passages ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

4. การศึกษาการตายของเซลล์

4.1 Anoikis Assay

นำเซลล์มะเร็งปอด H460 cells 1×10^5 cells/ml มาเพาะเลี้ยงในสภาวะ suspension ใน 12-well tissue culture plates ซึ่งเคลือบด้วยสาร poly-(2-hydroxyethyl methacrylate) (poly-HEME; Sigma) ในปริมาณ 200 μ l (6 mg/ml in 95% ethanol) หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C ที่เวลาต่าง ๆ กัน (0-24 ชั่วโมง) เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำเซลล์มาล้างด้วย phosphate-buffered saline ย้อมด้วย annexin V-FITC (Sigma) และนำไปวิเคราะห์หาค่าความเข้ม fluorescence intensity ด้วย FACSCaliber flow cytometry (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ) หรือนำไปส่องดูและถ่ายภาพโดย fluorescence microscopy (Carl Zeiss Axiovert, Göttingen, Germany)

4.2 Hoechst33342 assay

การตายของเซลล์แบบ apoptosis หลังจากการถูกกระตุ้นเมื่อเซลล์หลุดจากการยึดเกาะ ศึกษาโดยนำเซลล์มะเร็งปอด H460 cells มาบ่มกับสาร Hoechst 33342 เป็นเวลา 30 นาทีที่ 37°C หลังจากนั้นนำไปส่องดูลักษณะการตายแบบ apoptosis โดย fluorescence microscopy (Carl Zeiss Axiovert, Göttingen, Germany) อันได้แก่ การรวมกลุ่มของโครมาติน และ/หรือ การแตกหักของสายของสารพันธุกรรม

4.3 XTT assay

สำหรับเซลล์ที่มีชีวิตอยู่หลังจากการถูกกระตุ้นเมื่อเซลล์หลุดจากการยึดเกาะ ศึกษาโดยนำเซลล์มาบ่มกับสาร Sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) 20 $\mu\text{mol/L}$ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่ 37 °C หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ optical density (OD) ด้วย V-max photometer (Molecular Devices, Inc., Menlo Park, CA) ที่ความยาวคลื่นแสง 450 nm

5. การศึกษาปริมาณโปรตีนด้วย Western Blot Analysis

นำเซลล์มาสกัดโปรตีนด้วย lysis buffer ซึ่งประกอบด้วย 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 150 mmol/L sodium chloride, 10% glycerol, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 50 mmol/L sodium fluoride, 100 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, และ commercial protease inhibitor mixture (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Switzerland) เป็นเวลา 30 นาทีที่ 4°C หลังจากนั้นหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างโดย Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) แล้วนำสารละลายโปรตีนมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สนใจ โดยนำสารละลายโปรตีนของแต่ละตัวอย่างที่มีปริมาณ 40 μg เท่าๆกัน มาแยกด้วย 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และถ่ายสู่ 0.45- μm nitrocellulose membrane (Pierce) หลังจากนั้นนำแผ่น nitrocellulose membrane มาแช่ด้วย 5% nonfat dry milk ใน Tris-buffered saline/Tween 20 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 125 mmol/L NaCl, and 0.05% Tween 20) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วย primary antibodies เป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่ 4°C เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำ nitrocellulose membrane มาล้างด้วย Tris-buffered saline/Tween 20 เป็นเวลา 10 นาที และบ่มกับ peroxidase-labeled isotype-specific secondary antibodies เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง peroxidase บน secondary antibodies และ chemiluminescence (Supersignal West Pico; Pierce) โดยการถ่ายภาพแล้วหาความหนาแน่นปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนด้วย analyst/PC densitometry software (Bio-Rad, Richmond, CA) จากนั้นนำค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของแต่ละการทดลองนำมาเทียบกับกลุ่มควบคุมและแสดงในค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. โดย Student's t test.

6. การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน (immunoprecipitation)

นำเซลล์ที่บ่มกับสารที่ให้หรือลดไนตริกออกไซด์มาสกัดโปรตีนด้วย lysis buffer เป็นเวลา 30 นาทีที่ 4°C แล้วนำมาหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดของแต่ละตัวอย่าง หลังจากนั้นนำสารสกัดที่มีปริมาณโปรตีน 60 μg มาบ่มกับ

anti-Cav-1 antibody เป็นเวลา 6 hours ที่ 4 °C นำสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จากปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับ anti-Cav-1 antibody มาล้างด้วย lysis buffer และละลายด้วย 2X Laemmli sample buffer จากนั้นนำมาต้มที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายของสารประกอบเชิงซ้อนมาแยกด้วย 10% SDS-PAGE และวิเคราะห์ปริมาณปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนด้วย Western blot ดังกล่าวข้างต้น

3. ผลการทดลอง

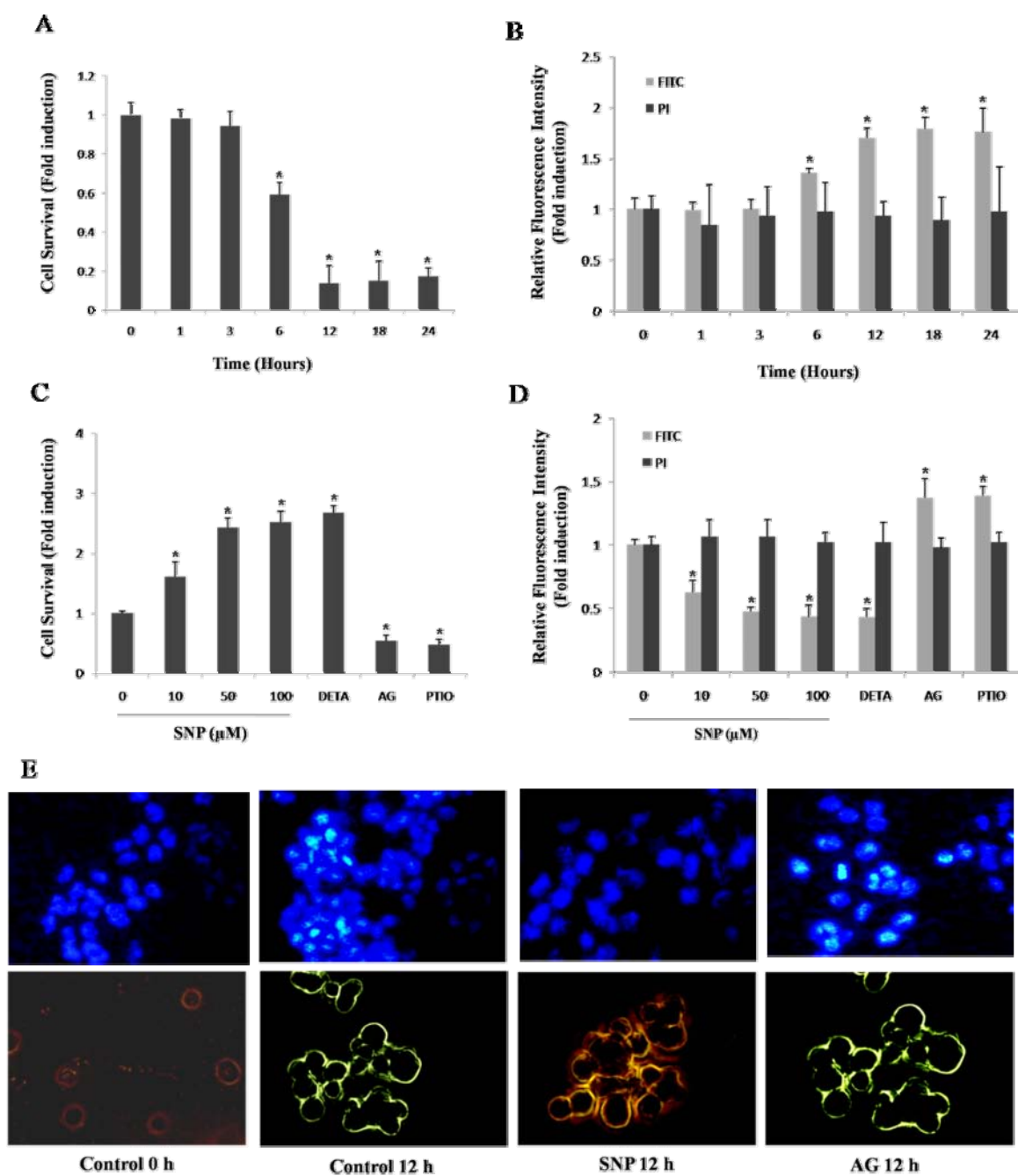
1. ไนตริกออกไซด์ยับยั้งการตายแบบ anoikis ของเซลล์มะเร็งปอด H460

เนื่องการตายแบบ anoikis เป็นกระบวนการที่มีความสำคัญต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามความเกี่ยวข้องของไนตริกออกไซด์ต่อการตายแบบ anoikis ยังไม่มีการศึกษา ในขั้นแรกได้ศึกษาการตอบสนองของเซลล์ H460 ต่อการตายแบบ anoikis หลังจากถูกกระตุ้นเมื่อเซลล์หลุดจากการยึดเกาะ โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ใน tissue culture plates ซึ่งเคลือบด้วยสาร poly-(2-hydroxyethyl methacrylate) (poly-HEMA; Sigma) ตามเวลาต่างๆ แล้วหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วย XTT assay เปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน tissue culture plates ปกติ ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ที่หลุดจากการยึดเกาะมีปริมาณเซลล์รอดชีวิตลดลงเริ่มตั้งแต่วันที่ 6 และมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยที่สุดที่วันที่ 12 (รูป 1A) เช่นเดียวกันกับปริมาณเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis หลังจากวิเคราะห์โดย anoikis assay ด้วย flow cytometry (รูป 1B and D) และการถ่ายภาพด้วย fluorescence microscope (รูป 1E) เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะมีการเปลี่ยนแปลงที่ cell membrane โดยมีการย้ายของ phosphatidylserine (PS) จากด้านในของ cell membrane สู่ด้านนอกของผิว cell membrane ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วย annexin V-FITC ในขณะที่เซลล์ที่ตายแบบ necrosis จะพบการย้อมติดสีของ PI ที่ nucleus จากรูป 1 B แสดงให้เห็นว่าไม่พบการตายแบบ necrosis แต่พบการตายแบบ apoptosis ที่วันที่ 6-24 หลังจากเซลล์หลุดจากการยึดเกาะอย่างมีนัยสำคัญ การตายแบบ apoptosis จึงเป็นแนวทางหลักในการศึกษานี้ เพื่อเป็นการสนับสนุนการตอบสนองการตายแบบ anoikis เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ได้ตรวจวัดโดย Hoechst 33342 staining assays ที่วันที่ 12 หลังจากการหลุดจากการยึดเกาะ (รูป 1E)

เนื่องจากไนตริกออกไซด์เป็นตัวการหลักในการควบคุมการตายแบบ apoptosis และจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าไนตริกออกไซด์มีส่วนในการควบคุมการตายแบบ apoptosis จากการถูกกระตุ้นด้วย cisplatin และ FasL (Chanvorachote et al., 2005 และ 2006) ดังนั้นในครั้งนี้จึงศึกษาผลของไนตริกออกไซด์ต่อการตายแบบ anoikis ของเซลล์มะเร็งปอด H460 โดยนำเซลล์มะเร็งปอดมาบ่มกับสารให้ไนตริกออกไซด์ (SNP และ DETANONOate) หรือ สารยับยั้งไนตริกออกไซด์ (AG and c-PTIO) ภายใต้สภาวะ suspension เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตโดย XTT assay พบว่า สารให้ไนตริกออกไซด์ SNP (10-100 $\mu\text{mol/L}$) สามารถยับยั้ง anoikis ตามปริมาณ SNP อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูป 1C

and D) เช่นเดียวกับ DETANONOate (50 $\mu\text{mol/L}$) ในทางตรงกันข้าม สารยับยั้งไนตริกออกไซด์ (AG and c-PTIO) สามารถเพิ่มการตายแบบ anoikis (รูป 1C and D) รวมทั้งจากการศึกษาพบว่าสารให้ไนตริกออกไซด์และสารยับยั้งไนตริกออกไซด์ ไม่มีผลต่อเซลล์ที่มีการยึดเกาะในสภาวะปกติ (ไม่ได้ใส่รูปแสดงผล) เพื่อเป็นการยืนยันการตายแบบ anoikis ได้มีการตรวจสอบเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis โดย anoikis assay ด้วย flow cytometry พบว่าปริมาณเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis มีความสอดคล้องในทางตรงกันข้ามกับปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตจาก

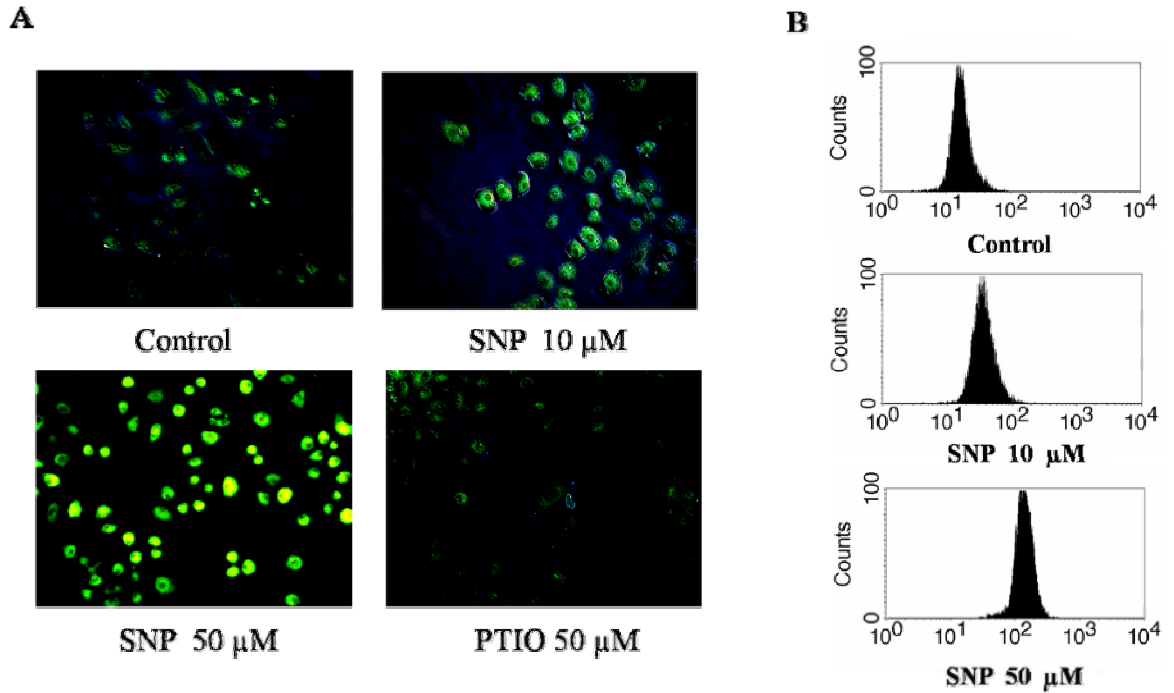
cell survival assay จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า สารให้ไนตริกออกไซด์ (SNP and DETA NONOate) สามารถยับยั้ง anoikis ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และไม่มีผลต่อการตายแบบ necrosis ในขณะที่สารยับยั้งไนตริกออกไซด์ (AG and c-PTIO) สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ anoikis (รูป 1 D and E) นอกจากนั้นจาก Hoechst33342 assay พบว่ามีการเรืองแสงที่ nucleus และมีการรวมกลุ่มของโครมาตินที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งสามารถยับยั้งได้โดย สารให้ไนตริกออกไซด์ SNP ในขณะที่ สารยับยั้งไนตริกออกไซด์ ให้ผลในทางตรงกันข้าม (รูป 1E แถวบน)



รูปที่ 1 ไนตริกออกไซด์สามารถยับยั้ง anoikis ในเซลล์มะเร็งปอด H460 การตอบสนองการตายหลังจากการถูกกระตุ้นให้หลุดจากการยึดเกาะในเวลาต่างๆ (0-24 hours) โดย (A) XTT assay, (B) ย้อมด้วย annexin V-FITC probe และ propidium iodide (PI) และวัดปริมาณความเข้ม fluorescence intensity ด้วย flowcytometer, (C) ผลของสารให้ไนตริกออกไซด์และสารยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่อ anoikis เซลล์มะเร็งปอด บ่มกับ sodium nitroprusside (SNP; 0-100 $\mu\text{mol/L}$), diethylenetriamine (DETA) NONOate (50 $\mu\text{mol/L}$), aminoguanidine (AG; 300 $\mu\text{mol/L}$) และ c-PTIO (50 $\mu\text{mol/L}$) ภายใต้สภาวะ suspension เป็นเวลา 12

ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตด้วย XTT assay, (D) ผลของสารให้ไนตริกออกไซด์และสารยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่อการตายแบบ apoptosis และ necrosis เซลล์มะเร็งปอดบ่มกับ สารให้ไนตริกออกไซด์ (SNP and DETANONOate) หรือ สารยับยั้งไนตริกออกไซด์ (AG and c-PTIO) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ภายใต้สภาวะ suspension เป็นเวลา 12 hours หลังจากนั้นตรวจสอบการตายแบบ apoptosis และ necrosis โดยย้อม annexin V-FITC probe และ PI และวัดปริมาณความเข้ม fluorescence intensity ด้วย flowcytometer, (E) แถวบน ผลของสารให้ไนตริกออกไซด์และสารยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่อการตายแบบ apoptosis โดย Hoechst 33342 assays แถวล่าง ผลของสารให้ไนตริกออกไซด์และสารยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่อ anoikis โดย annexin V-FITC probe และ PI แล้วส่องด้วย fluorescence microscope. ค่าผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยมีนัยสำคัญที่ *, $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากนั้นได้มีการศึกษาผลของสารให้ไนตริกออกไซด์และสารยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่อระดับไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์โดยนำเซลล์มะเร็งปอดมาบ่มกับสารให้ไนตริกออกไซด์และสารยับยั้งไนตริกออกไซด์ แล้วย้อมด้วย NO-specific probe DAF-DA และวัดระดับไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์โดยใช้ flow cytometer และ fluorescence microscope จากรูปที่ 2 แสดงให้เห็นว่าสารให้ไนตริกออกไซด์สามารถเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์ ในขณะที่สารยับยั้งไนตริกออกไซด์ c-PTIO ลดปริมาณไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ

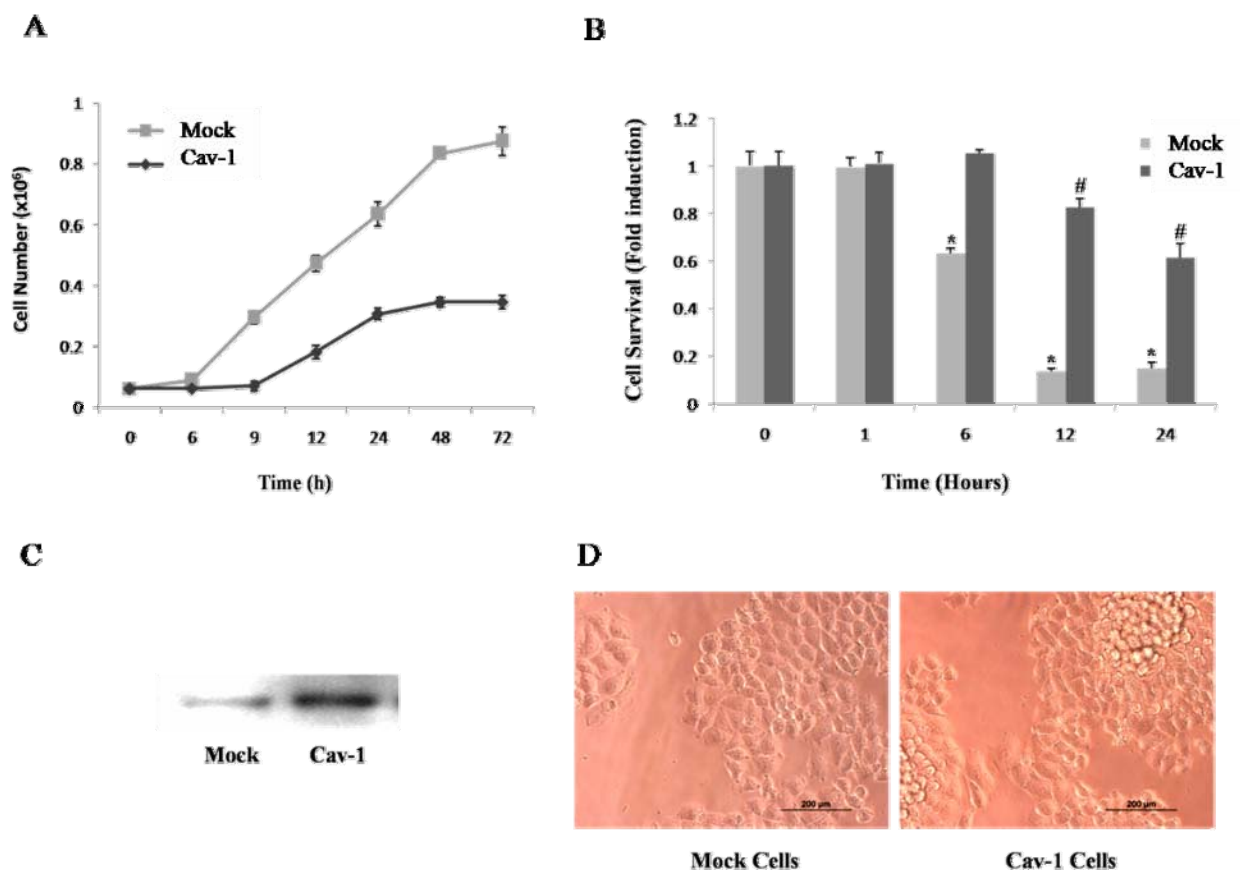


รูปที่ 2 ผลของสารให้ไนตริกออกไซด์และสารยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่อระดับไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์เซลล์มะเร็งปอด H460 บ่มกับ sodium nitroprusside (SNP; 0-50 $\mu\text{mol/L}$) และ c-PTIO (50 $\mu\text{mol/L}$) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และวัดระดับไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์โดยย้อมด้วย NO probe DAF-DA (A) ภาพถ่ายเซลล์ที่เรืองแสงด้วย fluorescence microscope, (B) วัดระดับไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์โดยวิเคราะห์ fluorescence intensity ด้วย flow cytometry

2. โปรตีน Caveolin-1 ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด H460 anoikis

เนื่องจากบทบาทของโปรตีน caveolin-1 ต่อการควบคุม anoikis ยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นจึงทำการ transfect เซลล์มะเร็งปอดด้วย Cav-1 plasmid และศึกษาหน้าที่ของโปรตีน caveolin-1 ในเซลล์ นำเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย Cav-1 plasmid และกลุ่มทดลองที่ transfect ด้วย mock plasmid มาเพาะเลี้ยงใน tissue culture plate ที่เคลือบด้วย poly-HEMA หลังจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตในเวลาต่างๆกัน (0-24 hours) โดย XTT assay จากรูปที่ 3B แสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่ถูก transfect ด้วย Cav-1 plasmid มีปริมาณเซลล์ anoikis น้อยกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย mock plasmid อย่างมีนัยสำคัญในเวลาบ่มต่างๆกันภายใต้สภาวะ suspension จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน caveolin-1 พบว่า เซลล์ที่ถูก transfect ด้วย Cav-1 plasmid มีปริมาณโปรตีน caveolin-1 มากกว่าเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย mock plasmid (รูป 3C) จึงแสดงให้เห็นว่า โปรตีน caveolin-1 มีบทบาทในการยับยั้ง anoikis

จากการศึกษาพบว่าโปรตีน caveolin-1 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย mock plasmid ภายใต light microscope มีลักษณะเป็นชั้นเดียวซึ่งไม่ต่างจากเซลล์ที่ไม่ถูก transfect ด้วย plasmid ใดๆ ในทางตรงกันข้ามพบว่าเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย Cav-1 plasmid มีลักษณะการเจริญเติบโตหลายชั้น มีการรวมตัวของเซลล์ในลักษณะหนูนอก (รูป 3D) การเจริญเติบโตลักษณะนี้สามารถยืนยันได้ด้วยการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ระหว่างเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย Cav-1 plasmid และเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย mock plasmid จากรูป 3A แสดงให้เห็นว่า หลังจากการเจริญเติบโตในระยะ lag phase เซลล์ที่ถูก transfect ด้วย Cav-1 plasmid มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่าเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย mock plasmid ยิ่งกว่านั้นเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย Cav-1 plasmid มีระยะเวลาช่วง lag time ลดลงจาก 9 ชั่วโมงเป็น 6 ชั่วโมง จากการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทการส่งเสริมการเป็นมะเร็งของโปรตีน caveolin-1 ในเซลล์มะเร็งปอด โดยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับการลดระยะ lag time



รูปที่ 3 โปรตีน caveolin-1 มีบทบาทเพิ่มการต่อต้านการตายแบบ anoikis และเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (A) อัตราการเจริญเติบโตของ เซลล์ที่ถูก transfect ด้วย Cav-1 plasmid และ

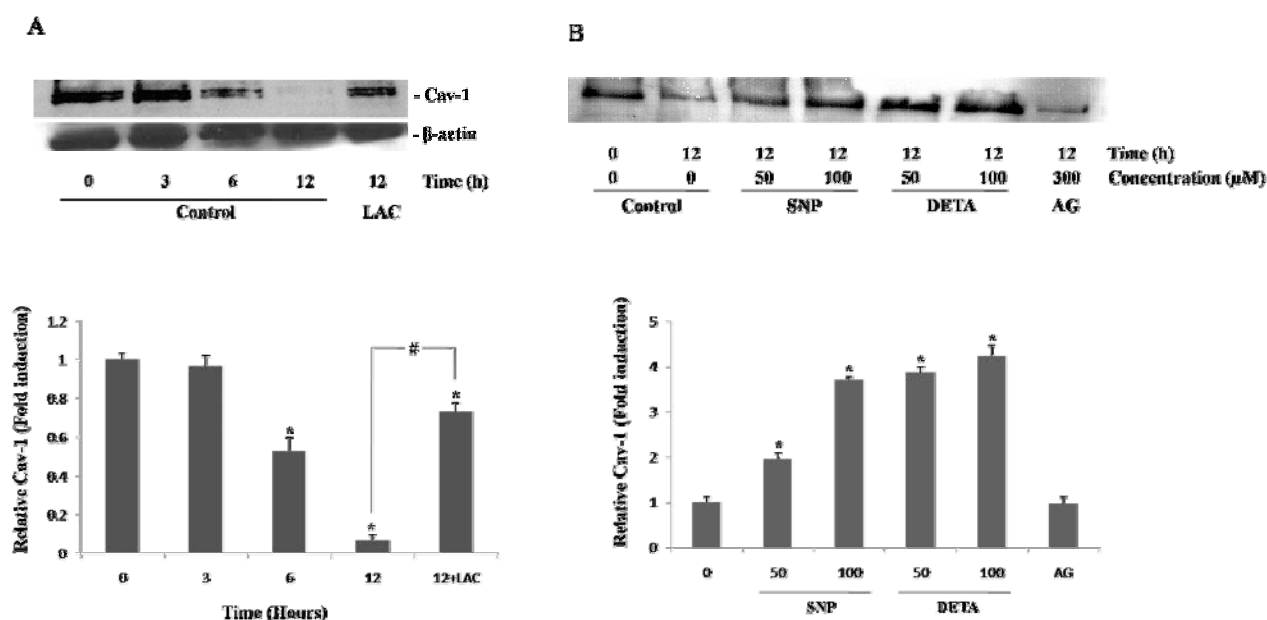
เซลล์ที่ถูก transfect ด้วย mock plasmid นำเซลล์ 6×10^4 cells/well มาเลี้ยงใน tissue culture plates และนับจำนวนเซลล์ในแต่ละ well ตามเวลาต่างๆด้วย hemocytometer, (B) วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตด้วย XTT assay โดยมีนัยสำคัญที่ *, $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ถูก transfect ด้วย mock plasmid #, $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ถูก transfect ด้วย Cav-1 plasmid ค่าผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (C) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน caveolin-1 จากเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย Cav-1 plasmid และเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย mock plasmid ด้วย Western Bolt analysis, (D) ลักษณะเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย Cav-1 plasmid และเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย mock plasmid

3. เซลล์ที่หลุดจากการยึดเกาะมีการเพิ่มการทำลายโปรตีน caveolin-1 ผ่าน proteasomal pathway

การเพิ่มปริมาณของโปรตีน caveolin-1 มีความเกี่ยวข้องกับการ differentiation ของเซลล์ต่างๆกัน ในขณะที่การลดปริมาณโปรตีน caveolin-1 พบในเซลล์ขณะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง (Razani et al., 2001, Liscovitch et al., 2005) ยิ่งกว่านั้นการแสดงออกต่างๆกันของโปรตีนชนิดนี้สามารถยับยั้ง mitogenic signaling pathways ยับยั้งการแสดงออกของ cyclin D1 และการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Razani et al., 2001, Liscovitch et al., 2005) อย่างไรก็ตามการแสดงออกของ โปรตีน caveolin-1 ระหว่างการหลุดของเซลล์จากการยึดเกาะและ anoikis ยังไม่ได้มีการศึกษา ดังนั้นการศึกษานี้ได้แสดงบทบาทของโปรตีน caveolin-1 ในการยับยั้ง anoikis ในเซลล์มะเร็งปอด H460 โดยศึกษาการตอบสนองต่อ anoikis หลังจากถูกกระตุ้นเมื่อเซลล์หลุดจากการยึดเกาะ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ใน tissue culture plates ซึ่งเคลือบด้วยสาร poly-(2-hydroxyethyl methacrylate) (poly-HEMA; Sigma) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน caveolin-1 ด้วย immunoblotting จากรูปที่ 4A แสดงการลดลงของโปรตีน caveolin-1 ตามเวลาต่างๆกันภายใต้สภาวะ suspension โดยการลดปริมาณโปรตีนนี้เริ่มที่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากเซลล์หลุดจากการยึดเกาะ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่เซลล์เริ่มมีการ anoikis ที่ชั่วโมงที่ 6

เนื่องจาก ubiquitin-proteasomal pathway เป็นที่ยอมรับว่าเป็น pathway หลักในการทำลายโปรตีนในเซลล์หลายๆชนิด (Naujokat et al., 2002, Rock et al., 2002, Krüger et al., 2003, Wolf et al., 2004, and Goldberg, 2003) และเกี่ยวข้องกับการลดระดับปริมาณโปรตีนในเซลล์หลายๆชนิดในเวลาสั้น เช่นกัน อาทิ เช่น Bcl-2 (Chanvorachote et al., 2006) และ FLICE inhibitory protein (FLIP) (Chanvorachote, 2005) ดังนั้นขั้นตอนต่อไปจึงศึกษาว่าการลดลงของโปรตีน caveolin-1 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากเซลล์หลุดจากการยึดเกาะเป็นผลมาจากการกระตุ้นการทำลายโปรตีนของ pathway นี้ เป็นที่น่าสนใจว่า สาร lactacystin ซึ่ง

ยับยั้งการทำงานของ proteasome สามารถยับยั้งการลดระดับ caveolin-1 ในเซลล์หลังจากหลุดจากการยึดเกาะได้ จากการศึกษาที่แสดงถึงบทบาทของการทำลายโปรตีนผ่านทาง proteasomal ซึ่งมีความเกี่ยวข้องต่อการลดปริมาณโปรตีน caveolin-1 ในเซลล์ (รูป 4A)



รูปที่ 4 เซลล์ที่หลุดจากการยึดเกาะเหนี่ยวนำการทำลายโปรตีน caveolin-1 ผ่าน proteosomal pathway และถูกยับยั้งโดย proteasome inhibitor และไนตริกออกไซด์ (A) นำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีหรือไม่มี lactacystin บน tissue culture plate ที่เคลือบด้วย poly-HEMA เป็นเวลาต่าง ๆ กัน (0-12 ชั่วโมง) หลังจากนั้นสกัดโปรตีนมาวิเคราะห์ปริมาณ caveolin-1 ด้วย immunoblotting (B) ไนตริกออกไซด์ยับยั้งการลดปริมาณโปรตีน caveolin-1 จากการถูกกระตุ้นให้หลุดจากการยึดเกาะ นำเซลล์ภายใต้สภาวะ suspension มาบ่มกับสารที่ให้ไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (50-100 μmol/L of SNP และ 50-100 μmol/L DETANONOate) หรือสารยับยั้งไนตริกออกไซด์ (AG; 300 μmol/L) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาสกัดโปรตีนและวิเคราะห์ปริมาณ caveolin-1 โดย Western blotting ค่าแสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยมีนัยสำคัญที่ *, $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปกติ #, $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะ suspension เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4. ไนตริกออกไซด์ ป้องกันการลดปริมาณโปรตีน caveolin-1 ในเซลล์ที่หลุดจากการยึดเกาะ

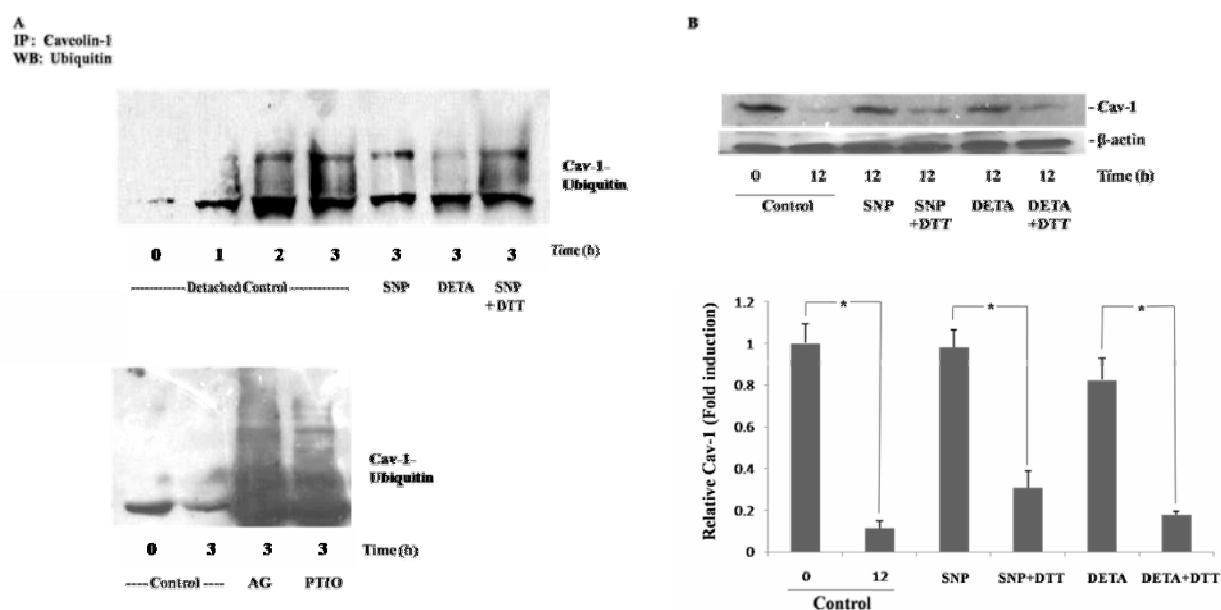
ขั้นตอนต่อไปเป็นการศึกษาบทบาทของไนตริกออกไซด์ในการควบคุมปริมาณ caveolin-1 โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงบน tissue culture plate ที่เคลือบด้วย poly-HEMA ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีหรือไม่มีสารให้ไนตริกออก

ออกไซด์และ/หรือสารยับยั้งไนตริกออกไซด์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดระดับปริมาณโปรตีน caveolin-1 โดย immunoblotting จากรูป 4B แสดงการลดระดับโปรตีน caveolin-1 ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ suspension เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งสามารถป้องกันได้โดยการเติมสารให้ไนตริกออกไซด์ (SNP and DETA NONOate) การนำเซลล์บ่มกับสารให้ไนตริกออกไซด์ (50-100 $\mu\text{mol/L}$) สามารถป้องกันการลดระดับโปรตีน caveolin-1 ตามปริมาณความเข้มข้นของสารให้ไนตริกออกไซด์ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ DETANONOate (50-100 $\mu\text{mol/L}$) ในทางตรงกันข้ามการนำเซลล์บ่มกับสารยับยั้งไนตริกออกไซด์ (AG; 300 $\mu\text{mol/L}$) ให้ผลไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม

5. ไนตริกออกไซด์ยับยั้งกระบวนการ Cav-1 ubiquitination จากการหลุดจากการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งปอด

จากการศึกษาข้างต้นพบว่าการลดระดับโปรตีน caveolin-1 ในเซลล์ที่หลุดจากการยึดเกาะสามารถยับยั้งได้ด้วยสารที่ยับยั้งการทำงานของ proteasome (lactacystin) ซึ่งแสดงถึงบทบาทของ ubiquitin-proteasomal degradation pathway ในการทำลายโปรตีนในเซลล์ ในการศึกษาขั้นตอนต่อไปเป็นการศึกษาหากลไกของไนตริกออกไซด์ในการป้องกันการลดระดับโปรตีน caveolin-1 โดยศึกษากระบวนการ ubiquitination ของโปรตีน caveolin-1 และไนตริกออกไซด์ด้วย Immunoprecipitation โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีและไม่มีสารให้หรือสารยับยั้งไนตริกออกไซด์ บน tissue culture plate ที่เคลือบด้วย poly-HEMA เป็นเวลาต่าง ๆ กัน (0-3 ชั่วโมง) หลังจากนั้นนำมาสกัดโปรตีนและวิเคราะห์ด้วย immunoprecipitation โดยใช้ antibodies ต่อโปรตีน caveolin-1 สารประกอบเชิงซ้อนที่ได้นำมาตรวจสอบ ubiquitin โดย Western blotting การ Ubiquitination ของโปรตีน caveolin-1 ถูกตรวจพบได้ตั้งแต่ชั่วโมงแรกและสูงสุดในชั่วโมงที่ 3 หลังหลุดจากการยึดเกาะ การเติมสารให้ไนตริกออกไซด์ SNP (50 $\mu\text{mol/L}$) และ DETA NONOate (50 $\mu\text{mol/L}$) สามารถยับยั้งการ ubiquitination ของโปรตีนที่ชั่วโมงที่ 3 หลังหลุดจากการยึดเกาะ ในขณะที่สารยับยั้งไนตริกออกไซด์ AG (300 $\mu\text{mol/L}$) และ c-PTIO (50 $\mu\text{mol/L}$) สามารถเพิ่มสารประกอบเชิงซ้อนของ Cav-1-ubiquitin อย่างมีนัยสำคัญ (รูป 5A) เนื่องจากการ S-nitrosylation โดยไนตริกออกไซด์มีผลต่อหน้าที่ของโปรตีนซึ่งได้มีการศึกษาและยอมรับอย่างแพร่หลาย (Li et al., 1997 and Kim et al., 1997) ดังนั้นขั้นตอนต่อไปจึงศึกษาว่าการ S-nitrosylation โดยไนตริกออกไซด์สามารถป้องกันการเกิด ubiquitination ของโปรตีน caveolin-1 หรือไม่ โดยนำเซลล์มาบ่มกับสารให้ไนตริกออกไซด์และสาร reducing agent DTT (1 mmol/L) เพื่อป้องกันการ S-nitrosylation (Ryua et al., 2004, and Moon et al., 2005) จากผลการศึกษาพบว่าการ

เติมสาร DTT สามารถยับยั้งผลของไนตริกออกไซด์ในการป้องกันการ ubiquitination ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูป 5A) จากผลการศึกษาแสดงว่าโปรตีน caveolin-1 ถูกทำลายผ่านทาง ubiquitin-proteasomal pathway และไนตริกออกไซด์สามารถยับยั้งการทำลายโปรตีนนี้โดยการยับยั้งกระบวนการ Cav-1 ubiquitination ยิ่งกว่านั้นยังพบว่ากลไกของไนตริกออกไซด์ในการยับยั้ง Cav-1 ubiquitination เกี่ยวข้องกับ S-nitrosylation ขั้นตอนต่อไปเป็นการศึกษาการ S-nitrosylation ของไนตริกออกไซด์ว่ามีบทบาทต่อการป้องกันการลดระดับโปรตีน caveolin-1 อย่างไร โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีหรือไม่มีสารให้ไนตริกออกไซด์และ DTT บน tissue culture plate ที่เคลือบด้วย poly-HEMA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจวัดระดับโปรตีน caveolin-1 โดย immunoblotting ผลการศึกษาพบว่าหลังเซลล์หลุดจากการยึดเกาะเป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีการลดระดับโปรตีน caveolin-1 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสามารถป้องกันได้โดยการเติมสารให้ไนตริกออกไซด์ SNP (50 $\mu\text{mol/L}$) และ DETA NONOate (50 $\mu\text{mol/L}$) ในขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มี 1 mmol/L DTT พบว่าไนตริกออกไซด์ไม่สามารถป้องกันการลดระดับโปรตีน caveolin-1 ในเซลล์ที่หลุดจากการยึดเกาะ (รูป 5B) จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการ S-nitrosylation อาจเป็นกลไกสำคัญที่ไนตริกออกไซด์ควบคุมระดับปริมาณโปรตีน caveolin-1 ในเซลล์มะเร็ง



รูปที่ 5 ผลของสารให้และสารยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่อกระบวนการ Cav-1 ubiquitination (A) นำเซลล์มะเร็งเรื้อรังปอดมาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ suspension เป็นเวลาต่าง ๆ กัน (0-3 hours) ในอาหารที่มีและไม่มีสารให้ไนตริกออกไซด์ (50 $\mu\text{mol/L}$ of SNP หรือ 50 $\mu\text{mol/L}$ of DETANONOate) และ DTT (1 mmol/L) หรือสารยับยั้งไนตริกออกไซด์ (300 $\mu\text{mol/L}$ of AG และ 50 $\mu\text{mol/L}$ of c-PTIO) และตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน caveolin-1 และ ubiquitin โดย immunoprecipitation และ Western blotting, (B) ผลของสารยับยั้ง

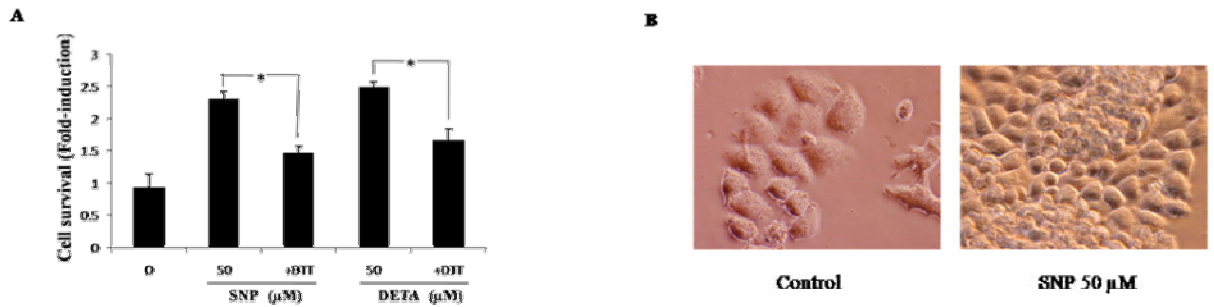
กระบวนการ S-nitrosylation inhibitor ต่อดัชนีโปรตีน caveolin-1 นำเซลล์มาบ่มกับสารให้ไนตริกออกไซด์ (SNP and DETANONOate) ในอาหารที่มีหรือไม่มีสารยับยั้ง S-nitrosylation (DTT) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ระดับโปรตีน caveolin-1 โดย Western blotting ค่าแสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยมีนัยสำคัญที่ *, $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการบ่มกับสารใดๆ, กลุ่มควบคุมที่บ่มกับ SNP และ กลุ่มควบคุมที่บ่มกับ DETA

6. S-nitrosylation เป็นกลไกสำคัญที่ไนตริกออกไซด์สามารถป้องกัน anoikis ในเซลล์มะเร็งปอด H460

จากสมมติฐานว่า S-nitrosylation เป็นกลไกสำคัญของไนตริกออกไซด์ในการป้องกัน anoikis ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์สมมติฐานนี้ จึงนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารให้ไนตริกออกไซด์และสารยับยั้ง S-nitrosylation (DTT) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตโดย XTT assay จากรูปที่ 6A แสดงให้เห็นว่าการเติม DTT สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ในการป้องกัน anoikis อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นการยืนยันถึงบทบาทสำคัญของ S-nitrosylation ในการควบคุม anoikis

7. ไนตริกออกไซด์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งปอดเจริญเติบโตเป็น multilayer

จากผลการศึกษาข้างต้นพบว่าเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย Cav-1 plasmid มีการเจริญเติบโตหลายชั้น ขั้นตอนต่อไปจึงศึกษาว่าไนตริกออกไซด์ มีผลต่อลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดหรือไม่ โดยนำเซลล์ 6×10^4 cells/well มาเพาะเลี้ยงบน 6-well plates เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นศึกษาลักษณะเซลล์ด้วย light microscope จากรูป 6B แสดงถึงการเจริญเติบโตหลายชั้นของ epithelial cells เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีสารให้ไนตริกออกไซด์ SNP จากการศึกษาเป็นการยืนยันผลของไนตริกออกไซด์ต่อดัชนีโปรตีน caveolin-1 และการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์



รูปที่ 6 ผลของสารยับยั้ง S-nitrosylation ต่อการต่อต้าน anoikis โดยไนตริกออกไซด์ (A) นำเซลล์มาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ suspension เป็นเวลา 12 ชั่วโมงในอาหารที่มีและไม่มีสารให้ไนตริกออกไซด์ (50 μ mol/L of SNP หรือ 50 μ mol/L of DETANONOate) หรือบ่มรวมกันกับ DTT จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตโดย XTT assay ค่าแสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยมีนัยสำคัญที่ *, $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่บ่มกับ SNP และ DETANONOate, (B) ลักษณะเซลล์ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่บ่มกับ SNP เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของไนตริกออกไซด์ ซึ่งเป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นได้ด้วยเซลล์ของร่างกายหลายชนิด เช่น เซลล์บุหลอดเลือด เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ประสาท และเซลล์มะเร็ง โดยปกติสารไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่หลากหลายในกระบวนการต่างๆของร่างกาย ในภาวะโรคนี้จะพบระดับของไนตริกออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมากในปอดของคนไข้มะเร็งปอดเมื่อเทียบกับปอดคนปกติ และตัวเซลล์มะเร็งปอดเองก็จะพบระดับของไนตริกออกไซด์ที่สูงขึ้นมากเช่นกัน การศึกษาวิจัยนี้จึงเป็นไปเพื่อการศึกษากลไกระดับเซลล์ในการที่ไนตริกออกไซด์จะควบคุมการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งนั้นเกี่ยวข้องกับหลายกลไกที่สำคัญ ได้แก่การหลุดออกจากการยึดเกาะ การมีชีวิตรอดในกระแสเลือด และน้ำเหลือง และการเกาะติดและรุกรานเข้าสู่อวัยวะใหม่เป็นต้น ในกระบวนการเหล่านี้ขั้นต้นการมีชีวิตรอดหลังการหลุดของเซลล์ดูเหมือนจะเป็นขั้นตอนสำคัญที่จะกำหนดความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เนื่องจากเซลล์โดยทั่วไปจะตายแบบ apoptosis เมื่อหลุดออกจากการยึดเกาะ หรือเรียกการตายดังกล่าวว่าการตายของเซลล์แบบ anoikis ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่า anoikis เป็นกลไกสำคัญที่จะป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

งานวิจัยนี้พบว่า ไนตริกออกไซด์สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งปอดเกิดการติดต่อกับ anoikis ได้โดยการทำปฏิกิริยาโดยตรงระหว่างโปรตีน Caveolin-1 และไนตริกออกไซด์ โดยเกิด S-nitrosylation และการเกิด S-nitrosylation นี้เองจะไปขัดขวางการทำลายโปรตีน ซึ่งปกติโปรตีน Caveolin-1 นี้จะถูกทำลายผ่านกระบวนการ Proteasomal degradation pathway การเกิดปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์ดังกล่าวจึงเป็นการยับยั้งการทำลายโปรตีนและทำให้ระดับของโปรตีนดังกล่าวเพิ่มสูงขึ้นในเซลล์ เนื่องจากงานวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นบทบาทของโปรตีน Caveolin-1 นี้ในการส่งเสริมการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และงานวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งปอดที่มีการเพิ่มระดับของโปรตีนดังกล่าวให้สูงขึ้นโดยกระบวนการ overexpression นั้นจะทำให้เซลล์มะเร็งปอดเกิดการติดต่อการตายแบบ anoikis อย่างมาก โดยสรุปงานวิจัยนี้เป็นการแสดงให้เห็นถึงกลไกและบทบาทใหม่ของไนตริกออกไซด์ในการควบคุมการติดต่อการตายแบบ anoikis ซึ่งจะส่งเสริมให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดได้ งานวิจัยนี้จึงจะเป็นประโยชน์ต่อองค์ความรู้พื้นฐานในการอธิบายบทบาทของสารชีวโมเลกุลดังกล่าวต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอันจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการรักษาโรคในอนาคตได้

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากในสภาวะแวดล้อมของเซลล์มะเร็งก่อนการแพร่กระจายนั้นยังมีสารอื่นๆ อีกมากมายเช่น สารอนุมูลอิสระออกซิเจน (Reactive Oxygen Species; ROS) สาร cytokines ต่างๆเป็นต้น การศึกษาเพิ่มเติมเรื่องบทบาทและกลไกของสารต่างๆเหล่านี้ ต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาวิธีการรักษาโรคนี้ต่อไป

6. ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

1.1 ตีพิมพ์งานวิจัยในวารสารระดับนานาชาติ วารสาร Cancer Investigation (Impact factor 2.106) ในหัวข้อ

Curcumin Sensitizes Lung Cancer Cells to Cisplatin-Induced Apoptosis through Superoxide Anion Mediated Bcl-2 Degradation

ชื่อผู้แต่ง :

Pithi Chanvorachote; Varisa Pongrakhananon; Sumalee Wannachaiyasit; Sudjit Luanpitpong; Yon Rojanasakul; Ubonthip Nimmannit

วารสาร Cancer Investigation, 1532-4192, Volume 27, Issue 6, First published 2009, Pages 624 – 635

รายละเอียดตามเอกสารแนบภาคผนวก

1.2 ผลงานตีพิมพ์วารสารระดับนานาชาติ (อยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อตีพิมพ์) วารสาร Journal of Biological Chemistry (Impact factor 5.808 ปี 2006)

ชื่อผลงานวิจัย Nitric Oxide Regulates Lung Carcinoma Cell Anoikis through Inhibition of Ubiquitin-Proteasomal Degradation of Caveolin-1

ชื่อผู้แต่ง :

Pithi Chanvorachote; Ubonthip Nimmannit; Bing-Hua Jiang; Yon Rojanasakul.

รายละเอียดตามเอกสารแนบภาคผนวก

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
ไม่มี
- เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
ไม่มี
- เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
ไม่มี
- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการเรียนการสอนในระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาเอก) โดยมี
นิสิตระดับปริญญาเอก ในหลักสูตร เทคโนโลยีเภสัชกรรม (นานาชาติ) จำนวน 2 คน คือ

1. นางสาว สุธจิต ล้วนพิชญ์พงศ์
 2. นางสาว วริษา พงศ์เรขานนท์
- เป็นผู้ช่วยวิจัยในงานวิจัย และมีชื่อร่วมอยู่ในผลงานตีพิมพ์

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุม
วิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

3.1 นำงานวิจัยจากโครงการฯ ไปเสนอในรูปแบบโปสเตอร์

ในงานประชุม World Conference of Medicinal and Aromatic Compounds

ในหัวข้อเรื่อง Curcumin sensitized lung cancer cells to cisplatin-induced apoptosis
through superoxide anion induction and Bcl-2 down-regulation.

ที่ประเทศ แอฟริกาใต้ระหว่างวันที่ 9-14 พฤศจิกายน 2551

3.2 เสนอผลงานรูปแบบ oral presentation และตีพิมพ์ผลงานใน Proceedings ของการประชุม
หัวข้อเรื่อง Reversal Effect of Curcumin in Bcl-2-mediated Cisplatin Resistance in Lung
Cancer Cells

งานประชุม The Eighth Joint Seminar “ Innovative Research in Natural Products for
Sustainable Development.

วันที่ 3-4 ธันวาคม พ.ศ. 2551 ณ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
กรุงเทพมหานคร

3.4 เสนอผลงานรูปแบบ oral presentation

หัวข้อเรื่อง

งานประชุม นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโสสกว. ครั้งที่8

วันที่ 16-18 ตุลาคม พ.ศ. 2551

This article was downloaded by: [Chanvorachote, Pithi]

On: 29 June 2009

Access details: Access Details: [subscription number 912695672]

Publisher Informa Healthcare

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Cancer Investigation

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713597231>

Curcumin Sensitizes Lung Cancer Cells to Cisplatin-Induced Apoptosis Through Superoxide Anion-Mediated Bcl-2 Degradation

Pithi Chanvorachote ^a; Varisa Pongrakhananon ^b; Sumalee Wannachaiyasit ^c; Sudjit Luanpitpong ^b; Yon Rojanasakul ^d; Ubonthip Nimmannit ^b

^a Department of Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, Thailand ^b Pharmaceutical Technology (International) Program, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, Thailand ^c Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakorn Pathom, Thailand ^d Department of Pharmaceutical Sciences, West Virginia University, Morgantown, West Virginia, USA

First Published: July 2009

To cite this Article Chanvorachote, Pithi, Pongrakhananon, Varisa, Wannachaiyasit, Sumalee, Luanpitpong, Sudjit, Rojanasakul, Yon and Nimmannit, Ubonthip(2009)'Curcumin Sensitizes Lung Cancer Cells to Cisplatin-Induced Apoptosis Through Superoxide Anion-Mediated Bcl-2 Degradation', *Cancer Investigation*, 27:6, 624 — 635

To link to this Article: DOI: 10.1080/07357900802653472

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/07357900802653472>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

ORIGINAL ARTICLE
Cellular and Molecular Biology

Curcumin Sensitizes Lung Cancer Cells to Cisplatin-Induced Apoptosis Through Superoxide Anion-Mediated Bcl-2 Degradation

Pithi Chanvorachote,¹ Varisa Pongrakhananon,² Sumalee Wannachaiyasit,³ Sudjit Luanpitpong,² Yon Rojanasakul,⁴ and Ubonthip Nimmannit²

Department of Physiology¹ and Pharmaceutical Technology (International) Program,² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, Thailand, Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakorn Pathom, Thailand,³ Department of Pharmaceutical Sciences, West Virginia University, Morgantown, West Virginia, USA⁴

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the sensitizing effect of curcumin on cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) H460 cells. Curcumin was shown to induce superoxide anion generation, down-regulate anti-apoptotic Bcl-2 protein, and subsequently sensitize cells to cisplatin-induced apoptosis. Co-treatment of the cells with curcumin and cisplatin resulted in increased apoptosis and reversal of Bcl-2-mediated cisplatin resistance. The mechanism by which curcumin down-regulates Bcl-2 and sensitizes cells to cisplatin-induced apoptosis involves proteasomal degradation of Bcl-2. These findings indicate a novel pathway for curcumin regulation of Bcl-2, which could benefit the development of a cisplatin sensitizing agent.

INTRODUCTION

Cisplatin-based chemotherapy has been widely used for the treatment of many solid tumors including those in small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). However, the efficacy of this chemotherapy is frequently attenuated due to *de novo* drug resistance in the advanced stage of cancer or in cancer cells acquiring cisplatin resistance during therapy (1–4). The chemotherapeutic resistance and late detection of lung cancer are considered as major causes of high mortality in this cancer (5). Since NSCLC is the most diagnosed type of lung cancer and approximately half of which being at an

advanced stage at the time of diagnosis, strategy of chemotherapeutic sensitization may improve the therapy and benefit clinical outcome.

Several mechanisms of cisplatin resistance have been proposed, including increased intracellular antioxidant activity and decreased drug accumulation (6–8). Recently, we and others reported that the anti-apoptotic B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein plays an important role in the development of cisplatin resistance in many cancer cells (9–14). Bcl-2 is overexpressed in many forms of tumor, including SCLC and NSCLC. This increase in Bcl-2 expression impairs the mitochondrial apoptotic function by neutralizing the proapoptotic Bcl-2 family members such as Bax and Bak (15, 16). The expression level of Bcl-2 has been reported to be regulated by several processes, including transcription, posttranslational modifications, dimerization, and degradation. Previous studies showed that several apoptotic stimuli, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), reactive oxygen species (ROS), lipopolysaccharide, amyloid- β , and ischemia, regulate Bcl-2 primarily through proteasome-mediated degradation (14, 17, 18).

Curcumin [1, 7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenol)-1,6-heptadiene-3,5-dione], a main component obtained from the rhizome of *Curcuma longa*, has been reported for long to

Keywords: Curcumin, Cisplatin, Apoptosis, Lung cancer, Bcl-2 degradation

Correspondence to:

Pithi Chanvorachote, PhD

Department of Physiology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Pathumwan, Bangkok

10330, Thailand

email: pithi.chan@yahoo.com

exhibit several promising pharmacological activities, including anti-inflammatory (19, 20), antioxidant (21), anti-cancer (22), and chemopreventive activities (23, 24). Some studies also indicate that curcumin possesses ROS-inducing or prooxidant activity (25–27).

Since cellular oxidative stress induced by cisplatin has been shown to contribute to its cytotoxic activity and the increased antioxidant mechanisms of cancer cells attenuate cisplatin-induced apoptosis (3, 28), prooxidant property of curcumin may be used to sensitize cancer cells to cisplatin-induced apoptosis and may increase the effectiveness of cancer treatment through combination therapy.

In the present study, we determined the effect of curcumin on cisplatin-induced apoptosis in human lung cancer cells and elucidated the underlying mechanisms using pharmacologic and gene manipulation approaches. Our results showed that curcumin was able to promote the apoptosis-inducing effect of cisplatin through down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 protein. The mechanism by which curcumin down-regulates Bcl-2 involves induction of superoxide anion and subsequent activation of proteasome-mediated degradation of Bcl-2. The down-regulation of Bcl-2 by curcumin strongly sensitized cells to cisplatin-induced apoptosis. Curcumin was also shown to reverse cisplatin resistance in cells overexpressing ectopic Bcl-2, supporting the role of Bcl-2 in cisplatin resistance and its reversal by curcumin.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and reagents

Human non-small cell lung cancer (NCI-H460) cells were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cells were cultured in RPMI-1640 medium containing 5% fetal bovine serum, 2 mmol/L L-glutamine, and 100 units/mL penicillin/streptomycin in a 5% CO₂ environment at 37°C. *N*-acetylcysteine (NAC), dithiothreitol (DTT), benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe) fluoromethyl ketone (zVAD-fmk), *cis*-diamminedichloroplatinum (cisplatin), 1, 7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenol)-1, 6-heptadiene-3, 5-dione (curcumin), 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), antibody for ubiquitin, and antibody for β -actin were obtained from Sigma Chemical, Inc. (St. Louis, MO). Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), Hoechst 33342, and LipofectAMINE transfecting agent were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). Antibodies for Bcl-2, peroxidase-labeled secondary antibodies, and protein-A Sepharose were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Bcl-2 plasmid preparation and transfection

The Bcl-2 plasmid was generously provided by Dr. Christian Stehlik (Northwestern University, Chicago, IL). The open reading frame of Bcl-2 was amplified by high-fidelity PCR (Stratagene, La Jolla, CA) from corresponding expressed sequence tags and cloned into pcDNA3 expression vectors containing the NH₂-terminal myc epitope tag. Authenticity of all constructs was ver-

ified by DNA sequencing. Transient transfection was performed using LipofectAMINE reagent, according to the manufacturer's instructions. The amount of DNA was normalized in all transfection experiments with pcDNA3. Expression of proteins was verified by Western blot assay.

Generation of Bcl-2 overexpressing cells

Bcl-2 overexpressing cells were generated as previously described (14). Briefly, subconfluent (70%) cultures of H460 cells were transfected with cytomegalovirus-neo vector and myc-tagged Bcl-2 plasmid using LipofectAMINE reagent in the absence of serum. After 10 hr, the medium was replaced with culture medium containing 5% fetal bovine serum. Cells were trypsinized 36 hr after the transfection, and the cell suspensions were plated onto 75-mL culture flasks and cultured for 24 to 28 days with G418 selection (400 μ g/mL). The pooled stable transfectant was identified by Western blot analysis of Bcl-2 and cultured in G418-free RPMI medium for at least two passages before each experiment.

Apoptosis and cytotoxicity assays

Apoptosis was determined by Hoechst 33342 assay (Invitrogen). After treatment, H460 cells were incubated with 10 μ g/mL Hoechst 33342 for 30 min and scoring the percentage of cells having intensely condensed chromatin and/or fragmented nuclei by fluorescence microscopy (Leica Microsystems, Bannockburn, IL). Cytotoxicity was determined by MTT colorimetric assay. Cells in 96 well plates were incubated with 500 μ g/mL of MTT for 4 hr at 37°C. The intensity of the MTT product was measured at 550 nm using a microplate reader. The relative percentage of cell survival was calculated by dividing the absorbance of treated cells by that of the control in each experiment.

ROS detection

Intracellular ROS generation was determined by flow cytometric analysis using the oxidative probe DCF-DA (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were incubated with the probe (10 μ mol/L) for 30 min at 37°C, after which they were washed, trypsinized, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) (1×10^6 cells/mL), and immediately analyzed for fluorescence intensity by flow cytometry using a 488-nm excitation beam and a 538-nm band-pass filter (FACSort, Becton Dickinson, Rutherford, NJ) with CellQuest software (Becton Dickinson).

Western blot analysis

After specific treatments, cells were incubated in lysis buffer containing 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 10% glycerol, 1 mmol/L Na₃VO₄, 50 mmol/L NaF, 100 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, and a commercial protease inhibitor mixture (Roche Molecular Biochemicals) for 20 min on ice. After insoluble debris was pelleted by centrifugation at $14,000 \times g$ for 15 min at 4°C, the