

## ABSTRACT

Phytoestrogens are very popular as ‘alternative’ medicine for many kinds of diseases. The apoptotic effects of 9 phytoestrogens, i.e., baicalein (BAI), bisphenol A (BPA), naringenin (NAR), zearalenone (ZEA), puerarin (PUE), daidzein (DAI), genistein (GEN) and biochannin A (BCA) and apigenin (API) on human leukemic HL-60, U937 cells and peripheral blood mononuclear cells were aimed to be studied, including the mechanisms, such as their effects on reactive oxygen species (ROS) production and cell cycle characteristics. Cytotoxicity test was performed using MTT assay and IC<sub>50</sub> levels of the phytoestrogens were determined. Mitochondrial transmembrane potential (MTP) of apoptotic cells was evaluated employing 3, 3'-dihexyloxycarbocyanine iodide and flow cytometry. ROS-producing capacity was measured using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate and flow cytometry. Cell cycle characteristics were studied by propidium iodide staining and flow cytometry. To identify the molecular mechanisms, determination of the caspase-3 and -8 activities was performed using fluorescence-tagged substrates and fluorescence plate reader. The two dimensional gel electrophoresis of cytosolic and membrane proteins was evaluated to compare the protein expression in control and ZEA-treated cells. Immunoblotting of cytochrome c, Bax, Bcl-2 and Bcl-xL was performed. Analysis of cytosolic and mitochondrial calcium ion levels was also performed to evaluate the involvement of mitochondria. Determination calreticulin (ER stress protein) on cell membrane with anti-calreticulin and flow cytometry.

It was found that PBMCs were more resistant to the phytochemicals than both transformed cells. All phytochemicals were cytotoxic to HL-60 and U937 cells in a dose dependent manner, except PUE. All phytochemicals induced apoptosis of U937 and HL-60 cells as evidenced by a decrease in transmembrane potential, except PUE. In U937 cells, BAI (20 µg/ml), BPA (20 µg/ml), NAR (50 µg/ml), BCA (10 µg/ml) and ZEA (10 µM), induced ROS generation. In HL-60 cells, NAR (250 µg/ml), ZEA (20 µg/ml) and PUE (50 µg/ml) produced peroxide radicals. In U937 cells, BIS, NAR and ZEA caused cell cycle arrest at G2/M phase and induced DNA fragmentation as evidenced by the presence of subdiploid peak in flow cytometry. Similarly in HL-60 cells, BAI (50 µg/ml), BPA (50 µg/ml), NAR (250 µg/ml), ZEA (50 µg/ml), GEN (50 µg/ml), API (50 µg/ml), and BCA (50 µg/ml) caused G2/M arrest but ZEA at a lower dose (10 µg/ml) produced G0/G1 arrest. Caspase-3 activity was high in a dose-dependent manner in HL-60 cell apoptosis induced by BCA, NAR, BPA and ZEA while stimulated by BAI, BCA, NAR, BPA and ZEA in U937 cell apoptosis.

Zearalenone (ZEA) is a phytoestrogen produced by several *Fusarium* species, such as *F. graminearum*. ZEA had IC<sub>50</sub> values of cell cytotoxicity using MTT assay in HL-60, U937 and peripheral blood mononuclear cells, as 44, 5.1 and >80 µg/ml, respectively. ZEA-treated human leukemic cells had a typical morphology of apoptotic cells after staining with propidium iodide and examining under fluorescence microscope. ZEA caused a decrease in mitochondrial outer membrane potential in a dose response manner, and cytochrome c release indicating the involvement of mitochondria. Caspase-3 activity increased in a dose-related manner, whereas caspase-8 responded time dependently. Two dimensional PAGE of U937 cells treated with ZEA showed 3 proteins of difference, i.e., fructose biphosphate aldolase A, muscle type, lung cancer antigen NY LU 1; glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase and deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial precursor. Proteomics of 24 hour-ZEA-treated HL-60 cells showed 23 membrane

proteins of difference including the ER stress proteins, which were 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78), heat shock protein 90 and calreticulin. ZEA also induced an enhancement of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in mitochondria and cytosol. No translocation of calreticulin, an endoplasmic reticulum (ER) protein, from ER to the cell membrane at 1 h of ZEA treatment. Bax was upregulated time-dependently and there was downregulation of Bcl-xL expression in immunoblotting. PI3-K inhibitor (wortmannin) and MEK inhibitor (PD98059) showed synergistic effect on ZEA-induced apoptosis. Vinblastine (a chemotherapeutic drug) also enhanced ZEA-mediated cell apoptosis by the reduction of MTP.

Taken together, 9 phytoestrogens could induced human human leukemic cell apoptosis via mitochondria and caspase-3. Moreover, the molecular mechanism of ZEA-inhuced human leukemic apoptotic cell death involved caspase-8 activity, ER stress pathway, thus, demonstrating the involvement of the intrinsic (mitochondria), extrinsic and ER stress pathways in apoptotic cell death.

**Keywords:** HL-60 cell, U937 cell, phytoestrogen, apoptosis, zearalenone, mitochondrial pathway, ER stress

## บทคัดย่อ

สารไฟโตเอสโตรเจนเป็นที่นิยมในการรักษาแพทย์ทางเลือกสำหรับโรคหลายชนิด วัตถุประสงค์ของโครงการคือ ศึกษาผลการตายแบบอะพอพโทซิสของสารไฟโตเอสโตรเจน 9 ชนิด ได้แก่ ไบคาเลน, บิสฟีนอล เอ, นารินเจนนิน, ซีราลีโนน, เพอวาริน, ไดอิดเซอิน, เจนนิสทีน, ไบโอแซนนิน เอ และ เอพิจเนน ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์ HL-60 และ U937 และเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ รวมทั้งกลไกการทำให้ตาย ได้แก่ ผลของสารไฟโตเอสโตรเจนต่อการผลิตสารอนุมูลอิสระ และลักษณะวัฏจักรเซลล์ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ใช้การวัดด้วย MTT หาค่าความเข้มข้นของสารไฟโตเอสโตรเจนที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) และวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของอะพอพโทติกเซลล์โดยใช้สาร 3, 3'-dihexyloxacarbocyanine iodide ด้วยเทคนิคโฟลไซโตมิเตอร์ การวัดความสามารถในการผลิตสารอนุมูลอิสระโดยใช้ 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate ด้วยเทคนิคโฟลไซโตมิเตอร์ ศึกษาลักษณะวัฏจักรเซลล์โดยย้อมเซลล์ด้วยโพรพิเดียมไอโอไดด์และเทคนิคโฟลไซโตเมทรี ศึกษาการกลไกในระดับโมเลกุลโดยวัดการทำงานของเอนไซม์แคสเพส-3 และ -8 โดยใช้สับสเตรทที่ติดด้วยสารเรืองแสง เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนโดยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ของเซลล์กลุ่มควบคุมและเซลล์ที่ให้อาหารซีราลีโนน ทำอิมมูโนบลอตของโปรตีน cytochrome c, Bax, Bcl-2 และ Bcl-xL วัดระดับแคลเซียมในไมโทคอนเดรียและไซโตซอลเพื่อดูความสัมพันธ์ของไมโทคอนเดรียด้วย ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียดออกซิเดชันที่ผิวเซลล์ด้วยแอนติบอดีต่อแคลเรติคูลิน

ผลการทดลองพบว่า เซลล์ PBMCs ด้านต่อการกระตุ้นให้ตายจากสารไฟโตเอสโตรเจนมากกว่าเซลล์มะเร็ง สารไฟโตเอสโตรเจนทั้งหมดทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์ HL-60 และ U937 ตาย ยกเว้นสารเพอวาริน สารไฟโตเอสโตรเจนทั้งหมดทำให้ศักย์ไฟฟ้าของไมโทคอนเดรียลดลงในเซลล์ U937 และ HL-60 ยกเว้นเพอวาริน ในเซลล์ U937 ไบคาเลน (20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) บิสฟีนอลเอ (20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นารินเจนนิน (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ไบโอแซนนิน (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และซีราลีโนน (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระ ส่วนในเซลล์ HL-60 สารนารินเจนนิน (250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ซีราลีโนน (20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และเพอวาริน (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ผลิตสารอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ U937 บิสฟีนอล นารินเจนนิน และ ซีราลีโนนทำให้วัฏจักรหยุดที่เฟส G2/M และก่อให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอโดยการปรากฏของ subdiploid peak ในเทคนิคโฟลไซโตเมทรี ในทำนองเดียวกัน ในเซลล์ HL-60 ไบคาเลน (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) บิสฟีนอลเอ (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นารินเจนนิน (250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ซีราลีโนน (50 ไมโครกรัม/ลิตร) เจนนิสทีน (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เอพิจเนน (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ ไบโอแซนนินเอ (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ทำให้หยุดที่ G2M แต่ซีราลีโนนที่ความเข้มข้นต่ำกว่า (10 ไมโครกรัม/

มิลลิเมตร) ทำให้วัฏจักรเซลล์หยุดที่ G0/G1 การทำงานของเอนไซม์คาสเพส-3 สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไฟโตเอสโตรเจนเพิ่มขึ้นในเซลล์ HL-60 เมื่อกระตุ้นด้วย ไบคาเลน นารินเจนิน บิสฟีนอลเอ และ ซีราลีโนน ส่วนในการตายอะพอพโทซิสของเซลล์ U937 เอนไซม์คาสเพส-3 เพิ่มขึ้นเป็นไปตาม dose response เมื่อกระตุ้นด้วย ไบคาเลน ไบโอแซนินเอ นารินเจนิน บิสฟีนอลเอ และซีราลีโนน

ซีราลีโนนเป็นไฟโตเอสโตรเจนที่สร้างจากเชื้อราในสายพันธุ์ *Fusarium* เช่น *F. graminearum* ค่าเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50 ของซีราลีโนนในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60, U937 และเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติเท่ากับ 44, 5.1 และมากกว่า 80 ไมโครกรัม/มิลลิเมตรตามลำดับ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเมื่อได้รับสารไฟโตเอสโตรเจนซีราลีโนนจะมีรูปร่างเซลล์เข้าได้กับอะพอพโทติกเซลล์หลังจากย้อมด้วยพรอพิเดียมไอโอไดด์ และดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนส์ ซีราลีโนนทำให้ศักย์ไฟฟ้าของไมโทคอนเดรียลดตาม dose response และก่อให้เกิดการหลั่ง cytochrome c ไปที่ไซโตซอล แสดงถึงความสัมพันธ์กับไมโทคอนเดรีย การทำงานของเอนไซม์คาสเพส-3 เพิ่มขึ้นเป็น dose response ขณะที่การทำงานของคาสเพส-8 เป็นแบบ time dependent จากการศึกษาโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ 2 มิติหรือโปรตีโอมิกส์ เซลล์ U937 ที่ได้รับซีราลีโนนมีโปรตีนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ fructose biphosphate aldolase A, muscle type, lung cancer antigen NY LU 1; glyeraldehyde 3-phosphate dehydrogenase และ deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial precursor ส่วนโปรตีโอมิกส์ของเซลล์ HL-60 เมื่อให้ซีราลีโนนนาน 24 ชั่วโมง แสดงโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน 23 ชนิด ได้แก่ โปรตีนในภาวะเครียดอีอาร์ คือ 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78), heat shock protein 90 และ แคลเรติคูลิน ซีราลีโนนกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมไอออนในไมโทคอนเดรียและไซโตซอล ไม่มีการเคลื่อนย้ายของแคลเรติคูลิน (โปรตีนของภาวะเครียดอีอาร์) จากอีอาร์ไปที่เซลล์เมมเบรนที่ 1 ชั่วโมงของการให้สารซีราลีโนน การแสดงออกของโปรตีน Bax เพิ่มขึ้นตามเวลา และการแสดงออกของ Bcl-xL ลดลงเมื่อทำอิมมูโนบล็อต สาร wortmannin และ MEK inhibitor (PD98059) มีฤทธิ์เสริมกับซีราลีโนนในการกระตุ้นเซลล์มะเร็งมนุษย์ให้ตายแบบอะพอพโทซิส ยาเคมีบำบัดวินบลาสตินมีฤทธิ์เสริมในการทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายแบบอะพอพโทซิสโดยไปลดศักย์ไฟฟ้าของไมโทคอนเดรียลเมมเบรน

โดยสรุป ไฟโตเอสโตรเจนทั้ง 9 ตัวสามารถทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายแบบอะพอพโทซิสโดยไปลดศักย์ไฟฟ้าของไมโทคอนเดรียลเมมเบรน และคาสเพส-3 นอกจากนี้ กลไกในระดับโมเลกุลของการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเมื่อกระตุ้นด้วยซีราลีโนน สัมพันธ์กับการทำงานของคาสเพส-8 ภาวะเครียดอีอาร์ ดังนั้น แสดงว่า วิธีการตายเกี่ยวข้องกับวิถีภายใน (ไมโทคอนเดรีย) วิถีภายนอกและภาวะเครียดอีอาร์

**คำสำคัญ:** เซลล์ HL-60 cell, เซลล์ U937, สารไฟโตเอสโตรเจน, การตายอะพอพโทซิส, ซีราลีโนน, วิตามินเคคอนเดรีย, ภาวะเครียดออกซิเดชัน