



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การส่งเสริมความไวต่อเคมีบำบัดของมะเร็งท่อน้ำดี
โดยมุ่งเป้าหมายที่เอนไซม์ NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1”

โดย ผศ.ดร.เอื้อมเดือน ประวาพ และคณะ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

มกราคม 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การส่งเสริมความไวต่อเคมีบำบัดของมะเร็งท่อน้ำดี
โดยมุ่งเป้าหมายที่เอนไซม์ NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1”
“Enhanced chemosensitivity of cholangiocarcinoma
by targeting at NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1”

ผศ.ดร.เอี่ยมเดือน ประวาฬ และคณะ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ม.ขอนแก่น)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการ “การส่งเสริมความไวต่อเคมีบำบัดของมะเร็งท่อน้ำดี โดยมุ่งเป้าหมายที่เอนไซม์ NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1” สำเร็จลุล่วงได้นั้น ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และมหาวิทยาลัยขอนแก่น (ม.ขอนแก่น) ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการทำงานงานวิจัยครั้งนี้อย่างต่อเนื่อง

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ ม.ขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนนักวิจัย สถานที่และอุปกรณ์ในการวิจัย ขอขอบคุณผู้วิจัยร่วม คือ รศ.ดร.วีรพล คู่คงวิริยพันธ์ ผศ.ลัดดาวัลย์ เสี่ยงกัน-ไพโรภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นางสาวพรศิลป์ ชีกพุดซา นักศึกษาปริญญาเอก สาขาเภสัชวิทยา ทุนโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อการผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา และนักวิจัยต่างประเทศ Prof. Daret K. St. Clair มหาวิทยาลัย University of Kentucky ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่มีส่วนร่วมในการทำงานวิจัยจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผศ.ดร.เอี่ยมเดือน ประวาพ

มกราคม 2557

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
ภาษาไทย	II
ภาษาอังกฤษ	II
1. บทนำ	1
2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
4. วิธีการดำเนินงานวิจัย	5
4.1 ขอบเขตการวิจัย	5
4.2 วิธีการศึกษาวิจัย	7
4.3 สถานที่ทำการวิจัย	9
5. ผลการศึกษา	
5.1 การแสดงออกของ NQO1 mRNA, NQO1 protein และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงและเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ	9
5.2 ผลการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดและการตายของเซลล์ และการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง	9
5.3 ผลการเพิ่มการทำงานของ NQO1 ด้วยการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดและการตายของเซลล์ และการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง	10
5.4 ผลการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA และผลการเพิ่มการทำงานของ NQO1 ด้วยการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ ต่อกลไกการตายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง	11
5.5 ผลการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 และโปรตีน p53 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA และ p53 siRNA ต่อการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง	11
5.6 การศึกษาผลของยาเคมีบำบัดต่อการแสดงออกของ NQO1 mRNA และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ในเซลล์มะเร็ง และเนื้อเยื่อตับและลำไส้ใหญ่ของหนูที่ได้รับยาเคมีบำบัด	12

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.7 การศึกษาความสัมพันธ์และบทบาทของโปรตีน p53 ต่อการทำงานของเอนไซม์ NQO1	13
5.8 การศึกษายืนยันการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ในการส่งเสริมการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งได้ โดยเซลล์จะถูกยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA และการใช้ dicoumarol	13
6. บทสรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	14
7. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	15
8. เอกสารอ้างอิง	16

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ

ภาคผนวก ก. Suppression of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 enhanced the susceptibility of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents

ภาคผนวก ข. Chemosensitization by targeting NQO1 is p53-mediated mechanism

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU5380027

ชื่อโครงการ : การส่งเสริมความไวต่อเคมีบำบัดของมะเร็งท่อน้ำดี โดยมุ่งเป้าหมายที่เอนไซม์

NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.เอื้อมเดือน ประวาท มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address : peuamd@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (มิถุนายน 2553 – มิถุนายน 2556)

คำหลัก : มะเร็งท่อน้ำดี, ความไวต่อเคมีบำบัด, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1

การศึกษาครั้งนี้เพื่อพิสูจน์บทบาทของ NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) ในการออกฤทธิ์ของยาเคมีบำบัด โดยใช้เทคนิค NQO1 siRNA ยับยั้งเอนไซม์ NQO1 พบว่าสามารถเพิ่มการตายของเซลล์แบบ apoptosis และเพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัด (5-fluorouracil (5-FU), gemcitabine (Gem) และ doxorubicin (Doxo)) ในขณะที่ยังไม่พบว่าการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ พบว่าสามารถลดการตายของเซลล์จากยาเคมีบำบัด ผลการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดที่เพิ่มขึ้นของเซลล์ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 นั้น มีความสัมพันธ์กับการทำงานของ p53 และ p21 การยับยั้ง p53 ด้วย siRNA ทำให้สูญเสียความสามารถในการเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดด้วยการยับยั้ง NQO1 ผลการศึกษาแสดงว่าการยับยั้ง NQO1 ทำให้เพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีผ่านการกระตุ้น p53

การศึกษาความสัมพันธ์การทำงานระหว่าง NQO1 และ p53 การศึกษาในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง พบว่าการให้ยาเคมีบำบัด 5-FU และ Doxo ส่งผลเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน p53 ในขณะที่มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NQO1 แต่ไม่เกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีน การศึกษาโดยวิธี immunoprecipitation แสดงว่ามี การจับกันระหว่างโปรตีน NQO1 และโปรตีน p53 โดยการจับกันระหว่างโปรตีนทั้งสองส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ทั้งนี้ ความสัมพันธ์ดังกล่าวจะพบในเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีน p53 เท่านั้น ดังนั้นกลไกการตายของเซลล์จากการให้ยาเคมีบำบัด ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากการทำงานของโปรตีน p53 ที่ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NQO1

โดยสรุป NQO1 มีบทบาทสำคัญต่อการปกป้องตนเองของมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับยาเคมีบำบัด การเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 ทำให้เซลล์ดื้อต่อยาเคมีบำบัด ขณะที่การยับยั้ง NQO1 จะชักนำให้เซลล์เพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัดผ่าน p53 การเสริมการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดโดยมุ่งเป้าหมายยับยั้ง NQO1 จึงเป็นกลยุทธ์ในการแก้ไขปัญหามะเร็งท่อน้ำดีด้วยยาเคมีบำบัด และมะเร็งชนิดอื่นที่มีการทำงานของเอนไซม์ NQO1

Abstract

Project Code : RMU5380027

Project Title : Enhanced chemosensitivity of cholangiocarcinoma by targeting at NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1

Investigator : Asst. Prof. Dr. Auemduan Prawan Khon Kaen University

E-mail Address : peuamd@kku.ac.th

Project Period : 3 years (June 2010 – June 2013)

Keywords : cholangiocarcinoma, chemosensitivity, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1

The present study was to verify the role of NQO1 on chemotherapeutic response. By suppression of NQO1 using the NQO1 siRNA, it was shown that suppression of NQO1 induced apoptosis and enhanced chemotherapeutic agents (5-fluorouracil (5-FU), gemcitabine (Gem) and doxorubicin (Doxo)) -induced cytotoxicity. In contrast, induction of NQO1 protein expression by NQO1 overexpression vector decreased the drug sensitivity. Nevertheless, the modulatory effects of NQO1 siRNA required the human tumor suppressor gene p53 were associated the increase of p53 and p21 expression. Inhibition of p53 expression by siRNA diminished the chemosensitizing effect of NQO1 siRNA. The result suggested that the chemosensitizing effect was mediated via p53 activation. The association of NQO1 and p53 on chemosensitivity was explored. The present study showed that the treatment of 5-FU and Doxo increased p53 protein while the NQO1 enzyme activity but not the protein was depressed *in vitro* and *in vivo*. By the immunoprecipitation assay, NQO1 was found to physically interact with p53, suggesting a protein-protein interaction between p53 and NQO1 leading to suppressed NQO1 activity. The NQO1 inhibition enhanced p53-mediated cell death was decreased only in p53-expressing cancer cells. It was, therefore, suppression of NQO1 activity by drug's-induced p53 may be partly responsible for chemosensitivity effect.

In summary, NQO1 plays a critical role in cytoprotection against chemotherapeutic agents in CCA cells. NQO1 overexpression decreased the drug sensitivity, while inhibition of NQO1 confers the chemosensitizing via p53. Enhanced chemosensitivity by targeting at NQO1 may be a novel treatment strategy to overcome drug resistance in bile duct cancer and other cancers with high NQO1 activity.

การส่งเสริมความไวต่อเคมีบำบัดของมะเร็งท่อน้ำดี

โดยมุ่งเป้าหมายที่เอนไซม์ NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1

1. บทนำ

มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma, CCA) มีอุบัติการณ์การเกิดโรคต่ำมากในประชากรยุโรป ประเทศแถบตะวันตกและเอเชียส่วนใหญ่ ขณะที่อุบัติการณ์ของโรคมะเร็งชนิดนี้สูงมากในประชากรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือและพื้นที่จังหวัดขอนแก่น การรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้ผลดีที่สุดในปัจจุบัน คือการผ่าตัด ซึ่งจะให้ประสิทธิภาพสูงสุดในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีระยะแรก อย่างไรก็ตาม การผ่าตัดสามารถทำได้กับผู้ป่วยจำนวนน้อยมาก เนื่องจากผู้ป่วยมาพบแพทย์ในระยะที่โรคลุกลามแล้ว จึงไม่สามารถเข้ารับการผ่าตัดแบบหายขาดได้ (curative resection) ความล้มเหลวในการรักษาและการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีในมะเร็งท่อน้ำดี ทำให้ผู้ป่วยส่วนใหญ่เสียชีวิตในระยะเวลาสั้น จุดด้อยสำคัญประการหนึ่งคือโรคนี้ยังไม่มีแผนการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดที่เป็นมาตรฐานสากล อาจเนื่องจากมะเร็งชนิดนี้ตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในอัตราที่ต่ำ (จัดเป็นมะเร็งดื้อต่อยาเคมีบำบัด (Tepsiri et al., 2005)) และโรคสามารถกลับมาเป็นซ้ำใหม่ได้ ข้อมูลที่ผ่านมา การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดมักก่อผลข้างเคียงและทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ลดลง ดังนั้น การศึกษาหากลไกที่เกี่ยวข้องกับความไว/การตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด จึงเป็นงานวิจัยที่มีความเร่งด่วน เพื่อแสวงหาแนวทางใหม่ในการเสริมรักษา และ/หรือ เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและพัฒนาคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

มะเร็งท่อน้ำดีอาจดื้อต่อยาเคมีบำบัดด้วยกลไกที่หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มกลไกการปกป้องตัวเองและการเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์มะเร็ง เอนไซม์ NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, EC 1.6.99.2) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดสารภายนอก ร่างกายและช่วยต้านอนุมูลอิสระ มีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์จากสารจำพวก quinines, quinonoids และสารก่อมะเร็งหรือยาที่เป็นพิษทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระออกซิเจนและเร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารต่างๆ เอนไซม์ NQO1 มีหน้าที่รีดิวซ์โดยการส่งอิเล็กตรอน-พร้อมกันจำนวน 2 ตัว แก่ซับสเตรตพวกสารประกอบ quinone nitro หรือ azo compounds ทำให้กลายเป็นเมแทบอไลต์ที่หมดฤทธิ์ นอกจากนี้ NQO1 ยังมีบทบาทสำคัญในการนำวิตามินอีและ coenzyme Q กลับมาใช้ใหม่ (regenerate) และมีบทบาทในการป้องกันไม่ให้ tumor suppressor p53 ถูกสลายโดยง่ายด้วย proteasome

มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ว่ามะเร็งหลายชนิดมีการทำงานของ NQO1 เพิ่มขึ้น เช่น มะเร็งตับอ่อน มะเร็งลำไส้ มะเร็งเต้านม และมะเร็งปอด (Belinsky and Jaiswal, 1993, Awadallah et al., 2008) ซึ่งสนับสนุนว่าเอนไซม์ NQO1 น่าจะมีบทบาทในการป้องกันตัวเองของเซลล์มะเร็ง ช่วยให้เซลล์มะเร็งอยู่รอดได้ดีขึ้น และมีความเป็นไปได้สูงที่มะเร็งเหล่านี้ อาจใช้

ประโยชน์จากการทำงานของเอนไซม์นี้เพื่อป้องกันตนเองจากยาเคมีบำบัด สำหรับมะเร็งท่อน้ำดีนั้น มีข้อมูลว่าการทำงานของ NQO1 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี และสัมพันธ์กับระยะเวลารอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี รวมทั้งเป็นปัจจัยการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี และมีความเป็นไปได้ว่าการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 จะเป็นแนวทางใหม่ที่จะช่วยส่งเสริมการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis ส่งผลให้มีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามบทบาทของ NQO1 ในมะเร็งท่อน้ำดียังมีข้อมูลจำกัด และบทบาทของ NQO1 ต่อการออกฤทธิ์ของยาเคมีบำบัดนั้น ยังต้องพิสูจน์ให้แน่ชัด

ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงมุ่งศึกษาเพื่อพิสูจน์บทบาทของ NQO1 ในเซลล์มะเร็ง และศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ NQO1 เป็นเป้าหมายในการร่วมรักษา/ส่งเสริมความไวต่อเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี รวมถึงศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้ง NQO1 เมื่อให้ร่วมกับยาเคมีบำบัด

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) พิสูจน์ความสำคัญของ NQO1 ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดและการตายของเซลล์ และการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

1.1 ศึกษาการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ถูกยับยั้งเอนไซม์ NQO1 โดยใช้เทคนิค NQO1 siRNA เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งต้นฉบับ

1.2 ศึกษาการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งต้นฉบับ

2) ศึกษากลไกการตายที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ NQO1 และการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด

2.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ โดยเฉพาะวิถีโปรตีน p53 เมื่อให้ยาเคมีบำบัดแก่เซลล์มะเร็งที่ถูกยับยั้งเอนไซม์ NQO1 โดยใช้เทคนิค NQO1 siRNA เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งต้นฉบับ

2.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ โดยเฉพาะวิถีโปรตีน p53 เมื่อให้ยาเคมีบำบัดแก่เซลล์มะเร็งที่เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งต้นฉบับ

3) พิสูจน์ความสำคัญของวิถีโปรตีน p53 ในการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งที่ถูกยับยั้งเอนไซม์ NQO1 โดยใช้เทคนิค NQO1 siRNA เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งต้นฉบับ

4) พิสูจน์ยืนยันความสำคัญของ NQO1 ต่อการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 (p53 +/+) และ เซลล์มะเร็งต่อม

ลูทหมาก PC3 (p53 -/-) โดยใช้เทคนิค NQO1 siRNA และการใช้ dicoumarol (potent NQO1 inhibitor)

3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1) บทบาทหน้าที่ของเอนไซม์ NQO1

เอนไซม์ NQO1 ทำหน้าที่กำจัดสารภายนอกในร่างกายและช่วยต้านอนุมูลอิสระ พบใน ส่วน cytosol ของเซลล์ ทำหน้าที่กำจัดพิษโดยการรีดิวซ์ สารกลุ่มอนุพันธ์ของ quinones ให้ กลายเป็น hydroquinones ที่มีพิษลดลง เอนไซม์ NQO1 ยังสามารถรีดิวซ์ coenzyme Q และ α -tocopherol ให้กลับอยู่ในรูปรีดิวซ์เพื่อใช้งานใหม่ เนื่องจาก coenzyme Q และ α -tocopherol ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในชั้นลิพิดเมมเบรน ดังนั้น NQO1 จึงมี บทบาทช่วยเพิ่มการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้โดยตรงให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ NQO1 ยังสามารถจับกับ 20S proteasome ป้องกันการย่อยสลายของ โปรตีนที่มี half-life สั้นๆ เช่น tumor suppressor p53 และ p73 ซึ่งจะถูก ubiquitination ก่อนถูกสลายด้วยเอนไซม์(Ross et al., 2000, Ross and Siegel, 2004)

ยีน NQO1 อยู่บนโครโมโซมที่ 16 ประกอบด้วย 6 exon และ 5 intron ที่บริเวณ promoter region ประกอบด้วย consensus sequence ที่เรียกว่า antioxidant response element (ARE) หรือ electrophile response element (EpRE) การกระตุ้น ARE จะมีผล ชักนำให้เพิ่มการแสดงออกของยีน NQO1 โดย transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) สามารถจับกับ ARE และชักนำการแสดงออกของยีนที่เป็น down-stream ของ ARE (ได้แก่ NQO1, HO-1, glutathione S-transferase และ g-glutamylcysteine ligase เป็นต้น) โดยการทำงานของ Nrf2 ถูกกระตุ้นได้ด้วยภาวะ oxidative stress จากสิ่งกระตุ้นต่างๆ เช่น H_2O_2 , endotoxin, UV และ proinflammatory cytokines รวมทั้ง สารเคมี เช่น curcumin, isothiocyanates และ BHT เป็นต้น

2) เอนไซม์ NQO1 กับมะเร็งชนิดต่าง ๆ

การแสดงออกและการทำงานของ NQO1 นั้น ถูกควบคุมทั้งจากลักษณะทางพันธุกรรม ที่มีความหลากหลาย (polymorphism) และปัจจัยสิ่งแวดล้อม (enzyme inducer/inhibitor) ปฏิกริยาต่อกันระหว่าง 2 ปัจจัยนี้ มีผลต่อบทบาทและการทำงานของ NQO1 ทั้งในเซลล์ปกติ และเซลล์มะเร็ง แม้จะทราบดีว่าการเพิ่มการทำงานของ NQO1 จะป้องกันเซลล์บาดเจ็บและ อาจส่งผลป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง แต่การศึกษาในมะเร็งหลายชนิด กลับพบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งมี การทำงานของ NQO1 เพิ่มขึ้นผิดปกติ เช่น มะเร็งตับอ่อน มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ และมะเร็ง เต้านม(Belinsky and Jaiswal, 1993, Awadallah et al., 2008) และมีการศึกษาที่แสดงถึง บทบาทของ NQO1 ต่อการก่อโรคมะเร็งและพัฒนาการของโรคมะเร็ง มีข้อมูลว่าเอนไซม์ NQO1 เกี่ยวข้องกับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด โดยพบว่าการยับยั้งการทำงานของ NQO1

ด้วยการให้ dicoumarol (สารยับยั้งเอนไซม์ NQO1, NQO1 inhibitor) หรือการยับยั้งการแสดงออกของ NQO1 mRNA สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งไวต่อฤทธิ์ของสารเคมีและยาเคมีบำบัด เช่น arsenic หรือ cisplatin โดยเพิ่มการชักนำให้เกิด apoptosis มากยิ่งขึ้น (Cullen et al., 2003) จึงเกิดข้อสันนิษฐานว่าเอนไซม์ NQO1 มีผลป้องกันเซลล์มะเร็ง และการยับยั้งการทำงานของ NQO1 อาจเป็นแนวทางเสริมการรักษามะเร็งด้วยยาเคมีบำบัดให้ได้ผลดียิ่งขึ้น ข้อเสนอถึง NQO1 ในแง่เป็นเป้าหมายในการเพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัดได้รับการยืนยันในเซลล์มะเร็งอีกหลายชนิด ตัวอย่างเช่น dicoumarol ช่วยเพิ่มความไวหรือฤทธิ์ของ doxorubicin ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง urothelial cancer cells (Matsui et al., 2009)

3) เอนไซม์ NQO1 กับมะเร็งท่อน้ำดี

รายงานก่อนหน้าของคณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่าการทำงานของ NQO1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงถูกยับยั้งในสภาวะอักเสบเลียนแบบ (inflammatory cytokine combination) และอาจส่งผลปรับเปลี่ยนการตอบสนองของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อสารต่างๆ (Prawan et al., 2009) นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีการทำงาน NQO1 สูงกว่า HeLa Chang cells (เซลล์ตับปกติ) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้า (Strassburg et al., 2002) ที่น่าสนใจคือ การศึกษาล่าสุดของคณะผู้วิจัย พบว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกและการทำงานของ NQO1 สูงกว่าเนื้อเยื่อปกติที่อยู่ข้างเคียง และสัมพันธ์กับระยะเวลารอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี รวมทั้ง การทำงานของ NQO1 ที่เพิ่มขึ้นยังเป็นปัจจัยการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่า NQO1 น่าจะมีความสำคัญต่อการเจริญและอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง เป็นที่น่าสนใจว่าการยับยั้ง NQO1 น่าจะเหนี่ยวนำให้เกิดการตายหรือส่งเสริมความไวของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีให้ดีขึ้น ที่สำคัญคือคณะผู้วิจัยได้รายงานผลของการให้ dicoumarol (ขนาดยาต่ำที่ไม่มีพิษต่อเซลล์) ร่วมกับยาเคมีบำบัดพบว่าสามารถส่งเสริมความไวต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ อย่างไรก็ตาม ยังจำเป็นต้องพิสูจน์เพิ่มเติมถึงบทบาทของ NQO1 ต่อการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยการยับยั้งการแสดงออกของ NQO1 mRNA อย่างจำเพาะ รวมถึงการพิสูจน์บทบาทของ NQO1 ต่อการเกิด chemoresistance โดยการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ และการศึกษาความเป็นไปได้ที่จะทำการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 เพื่อเป็นแนวทางใหม่ที่ช่วยส่งเสริมการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis ส่งผลให้มีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดเพิ่มขึ้น

4. วิธีการดำเนินงานวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ ใช้รูปแบบการทดลอง ประกอบด้วยการศึกษาที่ใช้เซลล์มนุษย์เพาะเลี้ยงเป็นแบบจำลอง (*in vitro* experiment) และการศึกษาที่ใช้สัตว์ทดลองเป็นแบบจำลอง (*in vivo* experiment)

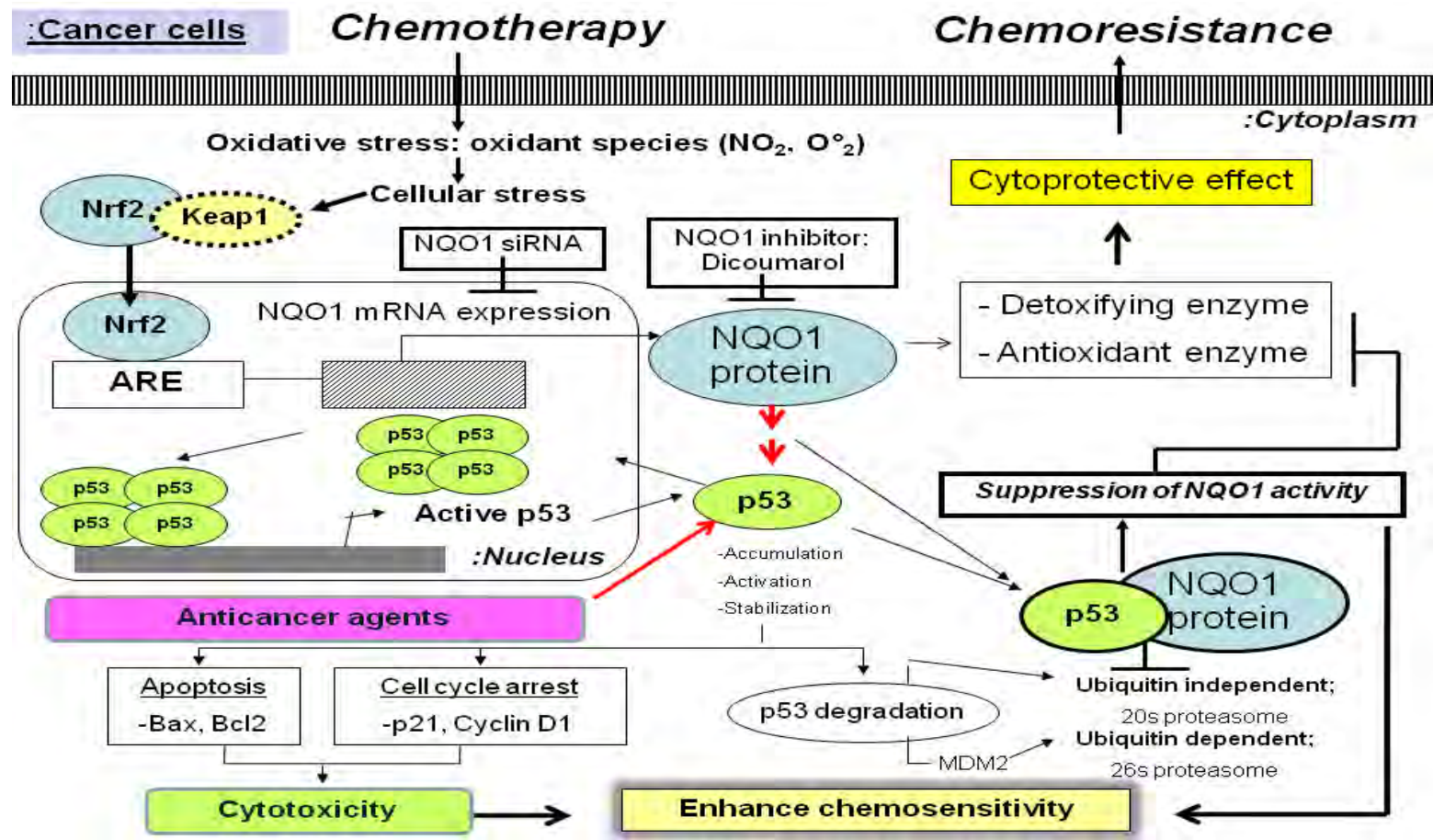
4.1 ขอบเขตการวิจัย

เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ใช้ในการศึกษา “Suppression of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 enhanced the susceptibility of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents” คือ เซลล์ KKU-100 (เซลล์มนุษย์เพาะเลี้ยงที่มีแหล่งกำเนิดจาก intrahepatic bile duct มีลักษณะเป็น poorly differentiated cell) และ เซลล์ KKU-M214 (เซลล์มนุษย์เพาะเลี้ยงที่มีแหล่งกำเนิดจาก intrahepatic bile duct มีลักษณะเป็น well differentiated cell) โดยเซลล์ปกติที่ใช้เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี คือ เซลล์ Liver Chang cell และ เซลล์ MMNK1 cell (normal bile duct epithelial cell)

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษา “Chemosensitization by targeting NQO1 is p53-mediated mechanism” คือ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ human colon carcinoma HCT116 ซึ่งมีการแสดงออกของ p53 แบบปกติ (wild-type p53 (p53 +/+)) และ เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก human prostate cancer cell PC3 ซึ่งไม่มีการแสดงออกของ p53 (null p53 (p53 -/-)) สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษา คือ หนูเม้าส์เพศผู้สายพันธุ์ C57BL/6 ซึ่งมีการแสดงออกของ p53 แบบปกติ (wild-type p53 mice) สถาบันผู้ผลิตสัตว์ทดลอง คือ Center for Cancer Research and Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA ทั้งนี้ การศึกษาในสัตว์ทดลองได้รับความเห็นชอบของ the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Kentucky, Texas, USA

การพิสูจน์ความสำคัญของ NQO1 ต่อการเพิ่มจำนวน การอยู่รอดและการตาย และการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง แบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ การเพิ่มการทำงานของ NQO1 ซึ่งอาศัยการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใส่ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ ขณะที่การยับยั้งเอนไซม์ NQO1 อาศัยเทคนิคการใส่ NQO1 siRNA เข้าในเซลล์ แล้วทำการเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์ที่ถูกปรับเปลี่ยนการทำงานของ NQO1 กับเซลล์มะเร็งต้นฉบับ

ยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ 5-fluorouracil (5-FU), doxorubicin (Doxo) และ gemcitabine (Gem) ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดหลักที่ใช้บ่อยในการรักษามะเร็งท่อน้ำดี มะเร็งทางเดินอาหาร และมะเร็งชนิด solid tumor



กรอบแนวความคิดของเรื่อง ความสำคัญของ NQO1 ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดและการตายของเซลล์ และการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง

4.2 วิธีการศึกษาวิจัย

1) การยับยั้งเอนไซม์ *NQO1* ด้วยเทคนิค *NQO1 siRNA*

NQO1 siRNA (siGENOME SMARTpool siRNA #M-005133-02-0020), p53 siRNA (siGENOME SMARTpool siRNA #M-003329-03-0005) และ control siRNA (siGENOME non-targeting siRNA #D-001210-02-20) ที่ใช้เป็นชนิด pooled of pre-designed siRNAs ซึ่งประกอบไปด้วย different sequences of siRNA จำนวน 4 สาย ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อยีนที่สนใจ ศึกษา การนำ siRNA เข้าเซลล์ จะใช้สาร LipofectamineTM 2000 (Invitrogen) เป็น transfection reagent และใช้ระยะเวลา transfection เท่ากับ 24-48 ชั่วโมง จากนั้นทำการประเมินผลยับยั้งเอนไซม์ *NQO1* โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ *NQO1*, การแสดงออกของ *NQO1* mRNA และ *NQO1* protein

2) การเพิ่มการทำงานของ *NQO1* ด้วยการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ *NQO1* โดยใช้ *NQO1 overexpression vector* เข้าในเซลล์

NQO1 overexpression vector (Origene Technologies #SC119599) ที่ใช้เป็นชนิด pCMV6-XL5 plasmid (ขนาด 4,707 bp) ซึ่งจะมี *NQO1* cDNA (ขนาด 1,120 bp) ที่เป็น complete wild-type *NQO1* coding sequence (NM_000903.2) อยู่ภายใน และใช้ pCMV6-XL5 ที่ไม่มียีน *NQO1* เป็น negative control vector การนำ *NQO1* overexpression vector เข้าเซลล์ จะใช้สาร transfection reagent คือ LipofectamineTM LTX and PlusTM reagent (Invitrogen) และใช้ระยะเวลา transfection เท่ากับ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการประเมินผลการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ *NQO1* โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ *NQO1*, การแสดงออกของ *NQO1* mRNA และ *NQO1* protein

3) การวัดการทำงานของเอนไซม์ *NQO1* ด้วยเทคนิค *NQO1 enzyme activity assay*

ทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ *NQO1* ด้วยเทคนิค *NQO1 enzyme activity assay* ดังปรากฏในรายงานก่อนหน้าของเบญจพร บุราณรัตน์และคณะ (Buranrat et al., 2010) โดยความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ *NQO1* จะถูกตรวจวัดด้วยวิธี dicoumarol-suppressible rate-kinetic assay โดยเอนไซม์ *NQO1* จะทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงสับสเตรท menadione ให้เป็น blue formazan metabolite ด้วยปฏิกิริยา reduction จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณ metabolite ที่เกิดขึ้น โดยวัดอัตราการดูดกลืนแสงของสาร metabolite ที่ความยาวคลื่น 620 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ค่าที่ได้จะถูกนำไปคำนวณเป็นอัตราการความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ *NQO1* มีหน่วยการทำงานของเอนไซม์ คือ nmol/min/mg protein

4) การวัดการตายของเซลล์ (cytotoxicity) ด้วยเทคนิค *SRB assay*

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีใน 96-well culture plate จากนั้นเติมยาเคมีบำบัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมสารละลาย trichloroacetic acid เพื่อ fixed เซลล์ ก่อนที่จะเติมสารละลาย sulforhodamine B (SRB) และทำการเติม Tris

base buffer เพื่อละลายสาร SRB เกิดเป็นสารละลายสีม่วง ซึ่งสามารถวัดสัญญาณหรือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย SRB ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 nm จากนั้นค่าที่ได้จะถูกนำไปคำนวณเป็นอัตราการตายของเซลล์ เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับยาเคมีบำบัด ซึ่งจะมีค่าการตายของเซลล์ (cytotoxicity) เท่ากับ 0%

5) การวัดแสดงออกของ NQO1 mRNA ด้วยเทคนิค real-time polymerase chain reaction (real-time PCR or qPCR)

ทำการวัดระดับการแสดงออกของ NQO1 mRNA ด้วยเทคนิค reverse transcription และ real time-polymerase chain reaction โดย total RNA ที่สกัดได้จากเซลล์มะเร็งท้องน้ำดีจะถูกเปลี่ยนด้วยปฏิกิริยา reverse transcription ให้เป็น cDNA template จากนั้นทำการตรวจหาปริมาณการแสดงออกของ NQO1 ด้วยปฏิกิริยา real time-PCR โดยใช้ SYBR Green staining dye เป็น detection probe และมี β -actin เป็นยีนอ้างอิง

6) การวัดการแสดงออกของโปรตีน ด้วยเทคนิค Western blot analysis

ทำการแตกเซลล์เพื่อให้ได้โปรตีน โดยใช้ lysis buffer นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกเก็บส่วน soluble protein จากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน 10% SDS-polyacrylamide gel ซึ่งจะแยกโปรตีนออกจากกันตามขนาดโมเลกุล จากนั้นทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนที่แยกได้จาก SDS-polyacrylamide gel ไปยัง PVDF membrane นำเมมเบรนไป incubate ใน specific primary antibody นาน 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมมเบรนไป incubate ใน secondary antibody ที่เหมาะสม นาน 2-4 ชั่วโมง ในขั้นตอนสุดท้าย ทำการเติม ECL substrate solution ลงบนเมมเบรนและวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนโดยการถ่ายภาพด้วยเครื่อง ImageQuant™ LAS4000 (GE Healthcare)

7) การวัดการจับกันระหว่างโปรตีน ด้วยเทคนิค immunoprecipitation

ทำการแตกเซลล์เพื่อให้ได้โปรตีน โดยใช้ lysis buffer นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกเก็บส่วน soluble protein จากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้ไป incubate ใน specific primary antibody นาน 12 ชั่วโมง แล้วจึงเติม protein A/G (Santa Cruz Biotechnology) ลงไปใน cellular protein and primary antibody mixture นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกเก็บส่วน immunoprecipitates ซึ่งจะถูกนำไป run บน 10% SDS-polyacrylamide gel และตรวจวัดการจับกันระหว่างโปรตีน ด้วยเทคนิค Western blot analysis ต่อไป

8) การศึกษาผลของ doxorubicin ต่อการแสดงออกของ NQO1 mRNA และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ในเนื้อเยื่อตับและลำไส้ใหญ่

ทำการให้ยา doxorubicin ด้วยการฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) ขนาด 20 mg/kg ครั้งเดียว แก่หนูเมาส์เพศผู้สายพันธุ์ C57BL/6 ซึ่งมีการแสดงออกของ p53 แบบปกติ (wild-type p53 mice) สามวันหลังให้ยา doxorubicin หนูเมาส์ถูกทำให้ตายโดยการให้ยาสลบขนาดสูง (Nembutal/sodium solution ขนาด 65 mg/kg body weight) และทำการผ่าตัดเพื่อเก็บเนื้อเยื่อตับและลำไส้ เพื่อศึกษาผลของ doxorubicin ต่อการแสดงออกของ NQO1 protein และการทำงานของ

เอนไซม์ NQO1 ทั้งนี้ การศึกษาในสัตว์ทดลองได้รับความเห็นชอบของ the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Kentucky, Texas, USA

9) การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ทั้งหมดนำเสนอเป็นค่า mean $\pm$ SEM จาก triplicate assays ของการทดลองจำนวน 3 ครั้ง และทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบโดยใช้สถิติ An analysis of variance with repeated measurement ทั้งนี้ ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้กำหนดค่าที่ $p < 0.05$

4.3 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ
ห้องปฏิบัติการวิจัย Department of Toxicology, Graduates School of Medicine, University of Kentucky, Texas, USA

5. ผลการศึกษา

5.1 การแสดงออกของ NQO1 mRNA, NQO1 protein และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงและเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของ NQO1 mRNA, NQO1 protein และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ พบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ใช้ในการศึกษา คือ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKKU-100 มีการแสดงออกของ NQO1 mRNA, NQO1 protein และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 สูงที่สุด โดยสูงกว่าทั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKKU-M214 และเซลล์ปกติที่ใช้เปรียบเทียบในการศึกษานี้ คือ เซลล์ Liver Chang cell และ เซลล์ MMNK1 cell (normal bile duct epithelial cell) (ดังปรากฏในรูปที่ 1 ภาคผนวก ก.) ดังนั้น ในการศึกษาลำดับต่อไป เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKKU-100 จึงใช้เป็นแบบจำลองศึกษาผลการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดและการตายของเซลล์ และการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง ขณะที่ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKKU-M214 จะใช้เป็นแบบจำลองเพื่อศึกษาผลการเพิ่มการทำงานของ NQO1 ด้วยการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดและการตายของเซลล์ และการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง

5.2 ผลการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดและการตายของเซลล์ และการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง

เมื่อทำการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA ในเซลล์ KKKU-100 เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สามารถลดการแสดงออกของ NQO1 mRNA, NQO1 protein และการทำงานของ

เอนไซม์ NQO1 อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่เวลา 48 ชั่วโมง NQO1 siRNA สามารถลดการแสดงออกของ NQO1 mRNA, NQO1 protein และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ได้มากกว่า 85% เมื่อเทียบกับ เซลล์ต้นฉบับ (ดังปรากฏในรูปที่ 2 ภาคผนวก ก.) ดังนั้น ในการศึกษาลำดับต่อไป เซลล์ KKU-100 จะถูกยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนได้รับยาเคมีบำบัด เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งและศึกษากลไกการตายที่เกี่ยวข้อง

เมื่อศึกษาผลการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA ต่อการเพิ่มจำนวนของ เซลล์ การอยู่รอดและการตายของเซลล์ และการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง พบว่า การยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA มีผลชะลอการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ในการทดสอบ cell proliferation ด้วยเทคนิค clonogenic assay (unpublished data, อยู่ระหว่างการ ศึกษาและรวบรวมข้อมูลเพื่อตีพิมพ์) มีผลชะลอการเคลื่อนที่ของเซลล์ ในการทดสอบ cell migration ด้วยเทคนิค wound-healing assay (unpublished data, การศึกษาและรวบรวมข้อมูล เพื่อตีพิมพ์) และยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ ในการทดสอบ cell cycle regulation ด้วยเทคนิค FACs analysis (unpublished data, การศึกษาและรวบรวมข้อมูลเพื่อตีพิมพ์) เมื่อเทียบกับเซลล์ต้นฉบับ

แม้ว่าการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 เพียงอย่างเดียว จะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการอยู่รอดและการ ตายของเซลล์ เมื่อเทียบกับเซลล์ต้นฉบับ ในการทดสอบ cytotoxicity ด้วยเทคนิค SRB assay แต่ พบว่าเซลล์ KKU-100 ที่ได้รับ NQO1 siRNA ร่วมกับยาเคมีบำบัด (ได้แก่ 5-fluorouracil (5-FU), doxorubicin (Doxo) และ gemcitabine (Gem)) จะมีความไวต่อการออกฤทธิ์ของยาเคมีบำบัด ดี ยิ่งขึ้น ไม่ว่าจะทดสอบการให้ NQO1 siRNA ร่วมกับตัวยาคีเคมีบำบัดชนิดใดก็ตาม (ดังปรากฏในรูป ที่ 2 ภาคผนวก ก.)

5.3 ผลการเพิ่มการทำงานของ NQO1 ด้วยการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของ เอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ ต่อการเพิ่มจำนวนของ เซลล์ การอยู่รอดและการตายของเซลล์ และการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง

เมื่อทำการเพิ่มการทำงานของ NQO1 ด้วยการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ KKU-M214 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถ เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน NQO1 และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเพิ่ม การแสดงออกของโปรตีน NQO1 และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ได้มากกว่า 2.5 เท่า เมื่อเทียบ กับเซลล์ต้นฉบับ (ดังปรากฏในรูปที่ 4 ภาคผนวก ก.) ดังนั้น ในการศึกษาลำดับต่อไป เซลล์ KKU-M214 จะถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ KKU-M214 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับยาเคมีบำบัด เพื่อศึกษาการตอบสนอง ต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งและศึกษากลไกการตายที่เกี่ยวข้อง

เมื่อศึกษาผลการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ KKU-M214 พบว่าการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของ เอนไซม์ NQO1 เพียงอย่างเดียวอาจไม่เปลี่ยนแปลงการอยู่รอดและการตายของเซลล์ ในการ

ทดสอบ cytotoxicity ด้วยเทคนิค SRB assay ในทางตรงข้าม เซลล์ KKU-M214 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ เมื่อเซลล์นี้ได้รับยาเคมีบำบัด (ได้แก่ 5-fluorouracil (5-FU), doxorubicin (Doxo) และ gemcitabine (Gem)) จะมีความไวต่อการออกฤทธิ์ของยาเคมีบำบัดทุกชนิดลดลง (ดังปรากฏในรูปที่ 4 ภาคผนวก ก.)

5.4 ผลการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA และผลการเพิ่มการทำงานของ NQO1 ด้วยการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ ต่อกลไกการตายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง

จากผลการศึกษาที่พบว่าเซลล์ KKU-100 ที่ได้รับ NQO1 siRNA ร่วมกับยาเคมีบำบัดมีความไวต่อการออกฤทธิ์ของยาเคมีบำบัดดีขึ้น ดังนั้น การศึกษาลำดับต่อไป จึงทำการศึกษากลไกการตายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง โดยศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับควบคุมการตายและการเจริญของเซลล์ ได้แก่ โปรตีน p53, p21, cyclin D1 และ Bax ด้วยเทคนิค Western blot analysis

ผลการศึกษาที่ได้ พบว่ายาเคมีบำบัดมีผลเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน p53, p21 และ Bax ในเซลล์ KKU-100 ขณะที่เซลล์ KKU-100 ที่ได้รับ NQO1 siRNA ร่วมกับยาเคมีบำบัด จะยิ่งเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนเหล่านั้นมากยิ่งขึ้น (ดังปรากฏในรูปที่ 3 ภาคผนวก ก.) ในทางตรงกันข้าม เมื่อทำการเพิ่มการทำงานของ NQO1 ด้วยการเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ KKU-M214 กลับพบว่าการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 ในเซลล์ KKU-M214 ทำให้เซลล์นั้นมีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดที่ลดลง โดยสัมพันธ์กับการลดลงของการแสดงออกของโปรตีน p53, p21 และ Bax เมื่อเทียบกับเซลล์ KKU-M214 ที่ได้รับยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว (ดังปรากฏในรูปที่ 5 ภาคผนวก ก.) ดังนั้น ผลการศึกษานี้ ทำให้คาดการณ์ได้ว่าการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ถูกยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA น่าจะเกี่ยวข้องกับวิธีการทำงานของโปรตีน p53 ซึ่งจะทำให้การพิสูจน์ในลำดับต่อไป

5.5 ผลการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 และโปรตีน p53 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA และ p53 siRNA ต่อการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง

เพื่อพิสูจน์ความเกี่ยวข้องของวิธีการทำงานของโปรตีน p53 กับการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์ที่ถูกยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA จึงทำการศึกษการยับยั้งโปรตีน p53 ด้วยเทคนิค p53 siRNA ในเซลล์ KKU-100 ผลการศึกษาพบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง p53 siRNA สามารถลดการแสดงออกของ p53 mRNA และ p53 protein อย่างมีนัยสำคัญ และการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 และโปรตีน p53 พร้อมกันด้วยเทคนิค co-transfection เพื่อนำ NQO1 siRNA และ p53 siRNA เข้าเซลล์พร้อมกัน พบว่า การทำ co-transfection เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถลด

การแสดงออกของ p53 mRNA และ NQO1 mRNA ได้มากกว่า 85% เมื่อเทียบกับเซลล์ต้นแบบ (ดังปรากฏในรูปที่ 5 ภาคผนวก ก.) ดังนั้น ในการศึกษาลำดับต่อไป เซลล์ KKU-100 จะถูกยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA หรือ ถูกยับยั้งโปรตีน p53 ด้วยเทคนิค p53 siRNA หรือจะถูกยับยั้งเอนไซม์ NQO1 และโปรตีน p53 พร้อมกันด้วยเทคนิค co-transfection เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับยาเคมีบำบัด (ดังปรากฏในรูปที่ 6 ภาคผนวก ก.) เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง

ผลการศึกษาที่ได้ พบว่าเซลล์ที่ถูกยับยั้งเอนไซม์ NQO1 และโปรตีน p53 พร้อมกันด้วยเทคนิค co-transfection จะมีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด เมื่อทดสอบ cytotoxicity ด้วยเทคนิค SRB assay น้อยกว่าเซลล์ที่ถูกยับยั้งเอนไซม์ NQO1 เพียงอย่างเดียว และน้อยกว่าเซลล์ที่ถูกยับยั้งโปรตีน p53 เพียงอย่างเดียว โดยรูปแบบการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดที่พบจะคล้ายคลึงกัน ไม่ว่าเซลล์จะได้รับยาเคมีบำบัดชนิดใดก็ตาม (ดังปรากฏในรูปที่ 6 ภาคผนวก ก.)

5.6 การศึกษาผลของยาเคมีบำบัดต่อการแสดงออกของ NQO1 mRNA และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ในเซลล์มะเร็ง และเนื้อเยื่อตับและลำไส้ใหญ่ของหนูที่ได้รับยาเคมีบำบัด

เนื่องจากยาเคมีบำบัดส่วนใหญ่มักทำให้เซลล์เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ขณะที่ยาเคมีบำบัดหลายชนิดใช้กลไกกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระในการฆ่าเซลล์เป็นกลไกหลัก จึงน่าสนใจว่าคือภาวะเครียดออกซิเดชันจากยาเคมีบำบัดจะมีผลทำให้เซลล์มะเร็งตอบสนองโดยเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ต้านออกซิเดชันได้หรือไม่ ดังนั้น จึงทำการศึกษาผลของยาเคมีบำบัดต่อการแสดงออกของ NQO1 mRNA และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ในเซลล์มะเร็ง ซึ่งผลการศึกษาพบว่า การได้รับ gemcitabine และ doxorubicin ทำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน NQO1 (ดังปรากฏในรูปที่ 1 ภาคผนวก ก.) ขณะที่การได้รับ doxorubicin และ 5-fluorouracil ทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ซึ่งมีการแสดงออกของ p53 แบบปกติ เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน NQO1 และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 (ดังปรากฏในรูปที่ 1 ภาคผนวก ข.) อย่างไรก็ตาม ผลการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ NQO1 mRNA และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ของ doxorubicin จะพบเฉพาะในเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ p53 แบบปกติ (wild-type p53; p53 +/+) แต่ไม่พบผลดังกล่าวเมื่อให้ยา doxorubicin แก่เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC3 ซึ่งไม่มีการแสดงออกของ p53 (null p53; p53 -/-) (ดังปรากฏในรูปที่ 3 ภาคผนวก ข.)

ที่น่าสนใจ คือ ผลการศึกษาที่พบในเซลล์มีความสอดคล้องกับผลการทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลองเป็นแบบจำลอง ซึ่งพบว่า การให้ยา doxorubicin โดยการฉีดเข้าช่องท้องแก่หนูเมาส์เพศผู้สายพันธุ์ C57BL/6 ที่มีการแสดงออกของ p53 แบบปกติ (wild-type p53 mice) ทำให้หนูที่ได้รับยา doxorubicin มีการแสดงออกของโปรตีน NQO1 และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 เพิ่มขึ้นทั้งในเนื้อเยื่อตับและลำไส้ใหญ่ (ดังปรากฏในรูปที่ 2 ภาคผนวก ข.)

5.7 การศึกษาความสัมพันธ์และบทบาทของโปรตีน p53 ต่อการทำงานของเอนไซม์

NQO1

เพื่อพิสูจน์ความเกี่ยวข้องของวิธีการทำงานของโปรตีน p53 และการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่ จึงทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการแสดงออกของโปรตีน p53 โดยใช้ p53 overexpression vector เข้าในเซลล์ PC3 ซึ่งเดิมเป็นเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ p53 (null p53; p53 -/-) แล้ววัดการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ในเซลล์ PC3 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน p53 เทียบกับเซลล์ในภาวะปกติ ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ PC3 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน p53 จะมีการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ที่ลดลง ในลักษณะแปรผกผันกับปริมาณโปรตีน p53 ที่เหนี่ยวนำให้เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์ PC3 ที่ถูกเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน p53 เมื่อได้รับยา doxorubicin จะมีการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ที่ลดลงตามขนาดของยา doxorubicin (ดังปรากฏในรูปที่ 3 ภาคผนวก ข.)

เพื่อพิสูจน์ว่าโปรตีน p53 และ NQO1 มีสัมพันธ์กันอย่างไร จึงทำการศึกษาการจับกันระหว่างของโปรตีน (protein binding) ระหว่าง p53 และ NQO1 ด้วยเทคนิค immunoprecipitation พบว่าเซลล์ HCT116 ที่ได้รับยา doxorubicin เพื่อเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน p53 และ NQO1 จะพบการจับกันระหว่างโปรตีน p53 และ NQO1 ซึ่งการจับกันของโปรตีนทั้งสองจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณการแสดงออกของโปรตีน นอกจากนี้ ยังพบการจับกันระหว่างโปรตีน p53 และ MDM2 ในลักษณะ inverse interaction แต่ไม่พบว่ามี การจับกันระหว่างโปรตีน MDM2 และ NQO1 (ดังปรากฏในรูปที่ 4 ภาคผนวก ข.)

5.8 การศึกษายืนยันการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 สามารถส่งเสริมการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งได้ โดยเซลล์จะถูกยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA และการใช้ dicoumarol (NQO1 inhibitor)

เพื่อพิสูจน์ยืนยันว่า NQO1 สามารถเป็นเป้าหมายเพื่อส่งเสริมความไวต่อยาเคมีบำบัดได้ และผลดังกล่าวน่าจะเกิดขึ้นผ่านวิธีการทำงานของโปรตีน p53 จึงได้ทดสอบยืนยันแนวคิดดังกล่าวโดยทำการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA และการใช้ dicoumarol ร่วมกับยา doxorubicin ซึ่งพบว่าการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA และการใช้ dicoumarol สามารถส่งเสริมความไวต่อยา doxorubicin ของเซลล์ HCT116 ในการทดสอบ cell survival ด้วยเทคนิค clonogenic assay และการทดสอบ cell viability ด้วยเทคนิค trypan blue dye exclusion assay ซึ่งผลการศึกษาที่พบในเซลล์ HCT116 จะคล้ายคลึงกับผลการศึกษาในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ข้อมูลที่น่าสนใจ คือ การยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ด้วยเทคนิค NQO1 siRNA และการใช้ dicoumarol ที่ช่วยส่งเสริมความไวต่อยาเคมีบำบัด จะพบเฉพาะในเซลล์ HCT116 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน p53 (p53 +/+) แต่กลับไม่พบผลส่งเสริมความไวต่อยาเคมีบำบัดในเซลล์ PC3 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน p53 (p53 -/-) (ดังปรากฏในรูปที่ 5 ภาคผนวก ข.)

6. บทสรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การดื้อต่อยาเคมีบำบัดเป็นสาเหตุสำคัญของความล้มเหลวในการรักษาและการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีในมะเร็งท่อน้ำดี ทั้งนี้ มะเร็งท่อน้ำดีอาจดื้อต่อยาเคมีบำบัดด้วยกลไกที่หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็น การเพิ่มกลไกการปกป้องตัวเองและการเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์มะเร็ง เนื่องจากเอนไซม์ NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1, EC 1.6.99.2) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดสารภายนอกในร่างกายและช่วยต้านอนุมูลอิสระ และมีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์จากสารจำพวก quinines, quinonoids และสารก่อมะเร็งหรือยาที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยทำหน้าที่ป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระออกซิเจนและเร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารต่างๆ การที่มะเร็งท่อน้ำดีเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ NQO1 อาจเกี่ยวข้องกับบทบาทในการปกป้องเซลล์มะเร็ง และเป็นสาเหตุให้เกิดการดื้อต่อยาเคมีบำบัด จึงเป็นไปได้ว่าการยับยั้งเอนไซม์ NQO1 จะเป็นแนวทางใหม่ที่จะช่วยส่งเสริมการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis ส่งผลให้มีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดเพิ่มขึ้น

การศึกษานี้เพื่อพิสูจน์บทบาทของ NQO1 ในการออกฤทธิ์ของยาเคมีบำบัด โดยใช้เทคนิค NQO1 siRNA ยับยั้งเอนไซม์ NQO1 ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มการตายของเซลล์แบบ apoptosis และเพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัด (chemosensitivity) ขณะที่การเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 โดยใช้ NQO1 overexpression vector เข้าในเซลล์ พบว่าสามารถลดการตายของเซลล์จากยาเคมีบำบัด ซึ่งสื่อถึงบทบาทของ NQO1 ในการปกป้องเซลล์มะเร็งจากยาเคมีบำบัด (chemoresistance) ผลการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดที่เพิ่มขึ้นของเซลล์ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 นั้น พบว่ามีความสัมพันธ์กับวิถีการทำงานของโปรตีน p53 และ p21 เนื่องจากเซลล์ที่ถูกยับยั้ง p53 ด้วย siRNA จะทำให้สูญเสียความสามารถในการเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดด้วยการยับยั้ง NQO1 ผลการศึกษาโดยสรุปแสดงว่าการยับยั้ง NQO1 ทำให้เพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีผ่านการกระตุ้น p53

การศึกษาความสัมพันธ์การทำงานระหว่าง NQO1 และ p53 การศึกษาในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง พบว่าการให้ยาเคมีบำบัด 5-FU และ Doxo ส่งผลเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน p53 ในขณะที่พบว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NQO1 โดยไม่เกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีน NQO1 การศึกษาโดยวิธี immunoprecipitation แสดงว่ามีการจับกันระหว่างโปรตีน NQO1 และโปรตีน p53 โดยการจับกันระหว่างโปรตีนทั้งสองส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ทั้งนี้ ความสัมพันธ์ดังกล่าวจะพบในเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีน p53 เท่านั้น ดังนั้นกลไกการตายของเซลล์จากการใช้ยาเคมีบำบัด ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากการทำงานของโปรตีน p53 ที่ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NQO1

โดยสรุป NQO1 มีบทบาทสำคัญต่อการปกป้องตนเองของมะเร็งท่อน้ำดี การยับยั้ง NQO1 จะชักนำให้เซลล์เพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัดผ่าน p53 ดังนั้น การเสริมการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดโดยมุ่งเป้าหมายยับยั้ง NQO1 จึงเป็นกลยุทธ์หนึ่งในการแก้ไขปัญหามะเร็งท่อน้ำดีดื้อยาเคมีบำบัด รวมทั้ง อาจประยุกต์ใช้แนวคิดนี้ ในมะเร็งชนิดอื่นที่มีการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ได้

7. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

การศึกษครั้งนี้ ได้แสดงบทบาทของเอนไซม์ NQO1 ต่อการปกป้องตนเองของมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งพบว่าการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ NQO1 ทำให้เซลล์ดื้อต่อยาเคมีบำบัด ขณะที่การยับยั้ง NQO1 จะชักนำให้เซลล์เพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัดผ่าน p53 ดังนั้น ผลการศึกษาที่ได้จัดเป็นข้อมูลพื้นฐานทางโมเลกุลในการพัฒนาวิธีการเสริมเพื่อให้เซลล์มะเร็งมีความไวต่อยาเคมีบำบัดที่ดีขึ้น โดยกลยุทธ์ที่มุ่งเป้าหมายที่เอนไซม์ NQO1 อาจเป็นวิธีทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาของมะเร็งท่อน้ำดีที่ดื้อยาเคมีบำบัด ซึ่งการยับยั้ง NQO1 เพื่อเสริมการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดน่าจะได้ประโยชน์สำหรับมะเร็งชนิดอื่นที่การทำงานของเอนไซม์ NQO1 มาก สำหรับงานวิจัยที่จำเป็นในอนาคต คือการศึกษาผลของการยับยั้ง NQO1 ร่วมกับยาเคมีบำบัด ด้วยแบบจำลองสัตว์ทดลอง เพื่อพิสูจน์ยืนยันผลการศึกษา ก่อนที่ทำการศึกษาวิจัยในมนุษย์ต่อไป

8. เอกสารอ้างอิง

- Awadallah NS, Dehn D, Shah RJ, Russell Nash S, Chen YK, Ross D, Bentz JS, Shroyer KR (NQO1 expression in pancreatic cancer and its potential use as a biomarker. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 16:24-31.2008).
- Belinsky M, Jaiswal AK (NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev* 12:103-117.1993).
- Buranrat B, Prawan A, Kukongviriyapan U, Kongpetch S, Kukongviriyapan V (Dicoumarol enhances gemcitabine-induced cytotoxicity in high NQO1-expressing cholangiocarcinoma cells. *World J Gastroenterol* 16:2362-2370.2010).
- Cullen JJ, Hinkhouse MM, Grady M, Gaut AW, Liu J, Zhang YP, Weydert CJ, Domann FE, Oberley LW (Dicoumarol inhibition of NADPH:quinone oxidoreductase induces growth inhibition of pancreatic cancer via a superoxide-mediated mechanism. *Cancer Res* 63:5513-5520.2003).
- Matsui Y, Watanabe J, Ding S, Nishizawa K, Kajita Y, Ichioka K, Saito R, Kobayashi T, Ogawa O, Nishiyama H (Dicoumarol enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in p53 wild-type urothelial cancer cells through p38 activation. *BJU Int*.2009).
- Prawan A, Buranrat B, Kukongviriyapan U, Sripa B, Kukongviriyapan V (Inflammatory cytokines suppress NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 and induce oxidative stress in cholangiocarcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 135:515-522.2009).
- Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact* 129:77-97.2000).
- Ross D, Siegel D (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods Enzymol* 382:115-144.2004).
- Strassburg A, Strassburg CP, Manns MP, Tukey RH (Differential gene expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase and NRH:quinone oxidoreductase in human hepatocellular and biliary tissue. *Mol Pharmacol* 61:320-325.2002).
- Tepsiri N, Chaturat L, Sripa B, Namwat W, Wongkham S, Bhudhisawasdi V, Tassaneeyakul W (Drug sensitivity and drug resistance profiles of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 11:2748-2753.2005).

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง คือ

1.1 Ponsilp Zeekpudsa, Veerapol Kukongviriyapan, Laddawan Senggunprai, Banchob Sripa and Auemduan Prawan*. Suppression of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 enhanced the susceptibility of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2014, 33:11 (doi:10.1186/1756-9966-33-11) Published: 24 January 2014 [Impact factor 2012 = 3.07]

1.2 Ponsilp Zeekpudsa, Sanjit Kumar Dhar, Veerapol Kukongviriyapan, Laddawan Senggunpra, Daret K. St. Clair and Auemduan Prawan*. Chemosensitization by targeting NQO1 is p53-mediated mechanism. [Manuscript in preparation]

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เชิงวิชาการ โครงการวิจัยนี้ได้มีส่วนร่วมในการพัฒนาการเรียนการสอนในระดับบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยได้ทำการถ่ายทอดเทคนิคในงานวิจัยบางส่วนแก่นักศึกษาสาขาวิชาเภสัชวิทยา

โครงการวิจัยนี้ได้มีการผลิตนักวิจัยใหม่/บัณฑิตระดับปริญญาเอก จำนวน 1 คน และระดับปริญญาโท จำนวน 1 คน

3. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์อื่น ๆ

3.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ จำนวน 1 เรื่อง คือ

3.1.1 Prawan A, Kukongviriyapan V. Novel Targets for Cancer Chemoprevention in Cholangiocarcinoma. *Srinagarind Med J* 2012; 27 suppl (Cholangiocarcinoma): 397-404.

3.2 การนำเสนอผลงานในที่ประชุมระดับนานาชาติ จำนวน 3 เรื่อง คือ

3.2.1 "Inhibition of NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 (NQO1) enhances anticancer drug-induced cytotoxicity in cholangiocarcinoma cells" *The 2nd Asian conference on environmental mutagens harmonize gene & environmental asian health promotion*. Pattaya, Thailand; December 15-18, 2010. [Poster presentation]

3.2.2 "RNAi-mediated silencing of NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 gene enhances chemosensitivity of cholangiocarcinoma cell" *The Society for Free Radical Research (SFRR)-Europe 2011 Meeting*; Istanbul, Turkey; Sep 7-10, 2011. [Poster presentation]

3.3.3 "Suppression of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 enhances chemosensitivity by p53 mediated response" *The 6th Biennial Meeting of Society for Free*

Radical Research (SFRR)-Asia. Chang gung university, Tao-Yuan, Taiwan; October 16-19, 2013. [Poster presentation]

3.3 การนำเสนอผลงานในที่ประชุมระดับชาติ จำนวน 4 เรื่อง คือ

3.3.1 “Genetic deletion of NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 (NQO1) as a strategy to enhance chemosensitivity of cholangiocarcinoma cells” *The 33rd Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting*. Had Yai, Songhhla, Thailand; March 17-19, 2011. [Poster presentation]

3.3.2 “The Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and Cytoprotection in Regulating Chemotherapy Resistance of Cholangiocarcinoma Cell lines” *The 34th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting*. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; March 17-19, 2012. [Poster presentation]

3.3.3 “Blockade of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 Expression Enhanced Chemosensitivity of Cholangiocarcinoma” การประชุมวิชาการประจำปี “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 12; 10-12 ต.ค. 2555 โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี [Oral presentation]

3.3.4 “Suppression of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) sensitizes cholangiocarcinoma cells to anticancer agents by p53-related mechanism” *The 35th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting*. Phitsanulok, Thailand; March 20-22, 2013. [Poster presentation]

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

Suppression of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 enhanced the susceptibility of
cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents

Ponsilp Zeekpudsa, Veerapol Kukongviriyapan, Laddawan Senggunprai, Banchob Sripa and
Auemduan Prawan*

Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2014, **33**:11

doi:10.1186/1756-9966-33-11

Published: 24 January 2014



RESEARCH

Open Access

Suppression of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 enhanced the susceptibility of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents

Ponsilp Zeekpudsa^{1,3}, Veerapol Kukongviriyapan^{1,3}, Laddawan Senggunprai^{1,3}, Banchob Sripana^{2,3} and Auemduan Prawan^{1,3*}

Abstract

Background: Cholangiocarcinoma (CCA) is highly resistant to most of the known chemotherapeutic treatments. NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) is an antioxidant/detoxifying enzyme recently recognized as an important contributor to chemoresistance in some human cancers. However, the contribution of NQO1 to chemotherapy resistance in CCA is unknown.

Methods: Two CCA cell lines, KKU-100 and KKU-M214, with high and low NQO1 expression levels, respectively, were used to evaluate the sensitivity to chemotherapeutic agents: 5-fluorouracil (5-FU), doxorubicin (Doxo), and gemcitabine (Gem). NQO1 and/or p53 expression in KKU-100 cells were knocked down by siRNA. NQO1 was over-expressed in KKU-M214 cells by transfection with pCMV6-XL5-NQO1 expression vector. CCA cells with modulated NQO1 and/or p53 expression were treated with chemotherapeutic agents, and the cytotoxicity was assessed by SRB assay. The mechanism of enhanced chemosensitivity was evaluated by Western blot analysis.

Results: When NQO1 was knocked down, KKU-100 cells became more susceptible to all chemotherapeutic agents. Conversely, with over-expression of NQO1 made KKU-M214 cells more resistant to chemotherapeutic agents. Western blot analysis suggested that enhanced chemosensitivity was probably due to the activation of p53-mediated cell death. Enhanced susceptibility to chemotherapeutic agents by NQO1 silencing was abolished by knockdown of p53.

Conclusions: These results suggest that inhibition of NQO1 could enhance the susceptibility of CCA to an array of chemotherapeutic agents.

Keywords: NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1), Cholangiocarcinoma (CCA), 5-fluorouracil (5-FU), Doxorubicin (Doxo), Gemcitabine (Gem), p53

Background

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignant cancer arising from neoplastic transformation of cholangiocytes, the epithelial cells lining of intrahepatic and extrahepatic bile duct [1,2]. The incidence of CCA is extremely high in northeastern Thailand [3,4]. The most important risk factor is the liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infection [5,6]. Several lines of studies have shown that the

incidence and mortality rates of intrahepatic CCA are increasing worldwide [2,7]. The prognosis is generally poor because most patients present at advanced disease and early diagnosis is difficult [7]. Curative surgical resection is considered the most effective treatment, but most cases are inoperable at the time of diagnosis [7]. Unfortunately, chemotherapeutic agents are modestly effective on CCA and drug resistance is the major obstacle in the treatment. Multiple mechanisms are assumed to be involved in drug resistance; e.g., alteration of drug metabolizing enzymes, efflux transporters, cytoprotective enzymes or derangement of intracellular signaling system [8]. It is an urgent need to search for novel treatments for CCA.

* Correspondence: peuamd@kku.ac.th

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Full list of author information is available at the end of the article

NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1 or DT-diaphorase, EC 1.6.99.2) is a drug metabolizing enzyme. Its over-expression has been observed in many cancers of the liver, thyroid, breast, colon, and pancreas [9,10]. NQO1 is a flavoprotein mainly expressed in cytosol, catalyzing an obligate two-electron reduction of a broad range of substrates, particularly quinines, quinone-imines, nitro and azo compounds as the most efficient substrates [11-15]. NQO1 has several functions including xenobiotic detoxification, superoxide scavenging, and modulation of p53 proteasomal degradation [12]. Chronic inflammation suppresses NQO1 expression [16] and may increase susceptibility to cell injury. Increasing number of evidences suggest that up-regulation of NQO1 at the early process of carcinogenesis may provide cancer cells a growth advantage [17,18]. Since NQO1 is also an antioxidant enzyme, it may protect cancer cells by removing free radicals and making cells more resistant to anticancer agents, particularly to oxidative stress inducers.

Recently, a role of NQO1 in cancer chemotherapy has been demonstrated by several groups. Inhibition of NQO1 by a pharmacological inhibitor, dicoumarol, suppressed urogenital and pancreatic cancer cell growth and also potentiated cytotoxicity of cisplatin and doxorubicin [19,20]. Significant association was observed between high NQO1 expression in CCA tissue and short survival [21]. We have recently demonstrated that dicoumarol potentiated gemcitabine-induced cytotoxicity on CCA cells with high NQO1 activity [22]. The chemosensitizing effect was associated with oxidative stress and induction of p53 protein [20]. However, dicoumarol could exert several effects apart from inhibition of NQO1, such as suppression of JNK and NF- κ B pathways, and potentiation of apoptosis induced by TNF- α in HeLa cells [23]. The exact mechanism of the chemosensitizing effect conferred by suppression of NQO1 still remains unclear. The importance of NQO1 on modulation of p53 is also conflicting [22,24].

In the present study, we validate the role of NQO1 in cytoprotection, and then demonstrate that suppression of NQO1 potentiates antitumor activity of chemotherapeutic agents. These results suggest the crucial role of NQO1 in cancer cells. NQO1 may be a potential target molecule to enhance the susceptibility of tumor cells to chemotherapeutic agents.

Methods

Human cell line cultures and chemotherapeutic agents

Two human CCA cell lines, KKU-100 and KKU-M214, were developed from tumor tissues of CCA patients at the Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University. Liver Chang cells and normal bile duct epithelial cells, MMNK1, were also used in this study. CCA cells and normal cells were routinely cultured

in Ham's F12 media, supplemented with 4 mmol/L L-glutamine, 12.5 mmol/L N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), at pH 7.4, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, and 10% fetal bovine serum (FBS) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. The media was renewed every 2–3 days. After the cells became confluent, cells were trypsinized with 0.25% trypsin-EDTA and subcultured in the same media. Some aliquots of cells were transferred to freezing medium containing 10% DMSO and stored at -80°C for subsequent use.

Chemotherapeutic agents were selected on the basis of the frequent usage for CCA, gastrointestinal tract cancers and solid tumors. These included 5-fluorouracil (5-FU) dissolved in DMSO (100 mM), doxorubicin HCl (Boryung Pharm, Seoul, South Korea: Doxo) dissolved in DMSO (100 mM), and gemcitabine (Gemzar, Eli Lilly, IN, USA: Gem) dissolved in phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4). They were added to the culture media without FBS to make final concentrations indicated in the "Results" section and incubated for a designated period of time.

Transient transfection of NQO1 and/or p53 small interfering RNA (NQO1 and/or p53 siRNA)

Pre-designed NQO1 siRNA (siGENOME SMARTpool siRNA #M-005133-02-0020), p53 siRNA (siGENOME SMARTpool siRNA #M-003329-03-0005), and control siRNA (siGENOME non-targeting siRNA #D-001210-02-20) were purchased from Thermo Scientific. In this study, NQO1 siRNA and p53 siRNA were the pooled siRNAs, each is composed of four different sequences of siRNA, targeting for NQO1 and p53, respectively. For transfection of the siRNA, 1.5 $\times$ 10⁵ KKU-100 cells were plated in 6-well plates and grown in Ham's F12 medium supplemented with FBS, without antibiotics. The cells were transfected with 50 or 100 pmole of the siRNA for 6 hr using 0.4 or 2 μ L of Lipofectamine™ 2000 reagent (Invitrogen, Calsbad, CA, USA) in 500 μ L of Ham's F12 medium without FBS and antibiotics. After transfection, the cells were added with 1.5 mL of Ham's F12 medium supplemented with FBS, without antibiotics, and incubated further for 24–48 hr. The efficiency of the NQO1 knockdown by transient transfection was determined by gene expression with reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) using specific primers, NQO1 activity assay, and Western blotting analysis.

For cytotoxicity assay, CCA cells were seeded onto 96-well cultured plates with FBS, without antibiotics at a density of 5 $\times$ 10³ cells/well for an overnight. The cells were transfected with 3 pmole of the siRNA for 6 hr using 0.06 μ L of Lipofectamine™ 2000 reagent in 100 μ L of Ham's F12 medium without FBS and antibiotics. After

6 hr, the cells were added 100 μ L of Ham's F12 medium supplemented with FBS, without antibiotics, and incubated for 48 hr. The cells were then incubated with chemotherapeutic agents in serum free medium for additional 24 hr.

Transfection of NQO1 vector into CCA cells

A plasmid encoding human wild-type NQO1 in pCMV6-XL5 (4,707 bp) was purchased from Origene Technologies (#SC119599; Rockville, MD). The insert cDNA (1,120 bp) contained the complete NQO1 coding sequence (NM_000903.2). For transfection of the pCMV6-XL5-NQO1 or pCMV6-XL5, as a negative control vector, KKU-M214 at a density of 5×10^5 cells were plated in 6-well plates and grown overnight. At 70-80% confluent condition, cells were transfected with 2.5 μ g of pCMV6-XL5-NQO1 or pCMV6-XL5 for 24 hr using Lipofectamine[®] LTX and Plus[™] reagent (Invitrogen) protocol as directed by the manufacturer in 2 mL of Ham's F12 medium without FBS and antibiotics. Then the cells were collected for Western blot analysis and enzymatic assay. The empty vector control was prepared by cutting the NQO1 insert site from pCMV6-XL5-NQO1 plasmid at the *Eco*RI and *Xba*II site. The bearing vector was ligated with oligonucleotide (non-coding sequence) and cloned into *E. coli* (JM109). The empty vector control was purified and the presence of vector was confirmed by restriction digestion and run it on 2% agarose gel.

For cytotoxicity assay, KKU-M214 cells were seeded onto 96-well cultured plates at a density of 7.5×10^3 cells/well for an overnight, the cells were transfected with 100 ng of pCMV6-XL5-NQO1 or pCMV6-XL5 using Lipofectamine[®] LTX and Plus[™] reagent for 24 hr. The cells were then incubated with chemotherapeutic agents in serum free medium for additional 24 hr (Doxo) or 48 hr (5-FU and Gem), since it was the optimal incubation time for each drug.

NQO1 enzyme activity assay

NQO1 assay was performed according to the method described previously [20]. Cells were seeded at 7.5×10^3 cells/well in flat-bottomed 96-well cultured plates overnight. After cells were cultured for the designated time, cells were lysed with 50 μ L solution containing 0.8% digitonin and agitated on a shaker at room temperature for 10 min. Twenty-five microliter of 0.55% dicoumarol was added into culture wells designated as baseline activity, while the corresponding paired wells were added with distilled water (DW) designated as the test activity wells. After that, all wells were added with 200 μ L of reaction mixture (the following stock solution was prepared for each set of assay: 7.5 mL of 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 100 mg of bovine serum albumin (BSA), 1 mL of 1.5% Tween-20 solution, 0.1 mL of 7.5 mM FAD, 1 mL of

150 mM glucose-6-phosphate, 100 μ L of 50 mM β -NADP, 275 unit of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, 45 mg of MTT, and DW to a final volume of 150 mL and menadione (1 μ L of 50 mM menadione dissolved in acetonitrile per milliliter of reaction mixture) was added just before the mixture is dispensed into the microtiter plates. A blue color developed and the plates were placed into a microplate reader with filter wavelength of 620 nm and readings were made at 0.5 min interval for about 10 min. The rate of increase of the optical readings with times represents the activity of the reaction. Using the extinction coefficient of MTT formazan of $11,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 610 nm and correction for the light path of the microplate, NQO1 activity was expressed as nmol/min/mg protein.

Cytotoxicity or SRB assay

Cytotoxicity testing is used to evaluate the effects of chemotherapeutic agents. In brief, CCA cells were seeded onto 96-well cultured plates at a density of 7.5×10^3 cells/well overnight, then media was renewed with fresh media containing test compound and further incubated for the indicated times. Assay was performed at the endpoint of treatment to determine amount of protein remaining in each well. Media was discarded and replaced with 100 μ L of ice-cold 10% trichloroacetic acid (TCA) and placed in 4°C for at least 1 hr. Then TCA was removed and wells were carefully rinsed with deionized (DI) water for 5 times. After 10 min of air drying, 50 μ L of 0.4% sulforhodamine B (SRB) in 1% acetic acid was added for 30 min. Cells were rinsed 3–4 times with 1% acetic acid and air dried for 1 hr at room temperature. Finally, adhered cells were solubilized with 200 μ L of 10 mM Tris base and plates were shaken for 20 min before absorbance reading with a microplate reader with filter wavelength of 540 nm.

Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR or qPCR)

CCA cells were seeded in 6-well plates at the density of 1.5×10^5 cells/well. Total RNA was extracted from CCA cell lines using TRIzol[®] reagent following the manufacturer's instructions (Invitrogen). Total RNA was isolated using a previously described method [20]. Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed in a 20 μ L reaction mixture, containing 0.5 μ g of oligo(dT)15 primer, 20 U of RNasin[®] ribonuclease inhibitor, and 200 U of ImProm-II[™] reverse transcriptase in 1 $\times$ PCR buffer, 3 mmol/L MgCl_2 , and 1 mmol/L dNTPs. The first-strand cDNA was synthesized at conditions of 42°C for 60 min. The reverse transcription products served as templates for real-time PCR. PCR amplification was performed using specific primers for the NQO1, wild type p53 and the internal control using β -actin. The primer sequences were

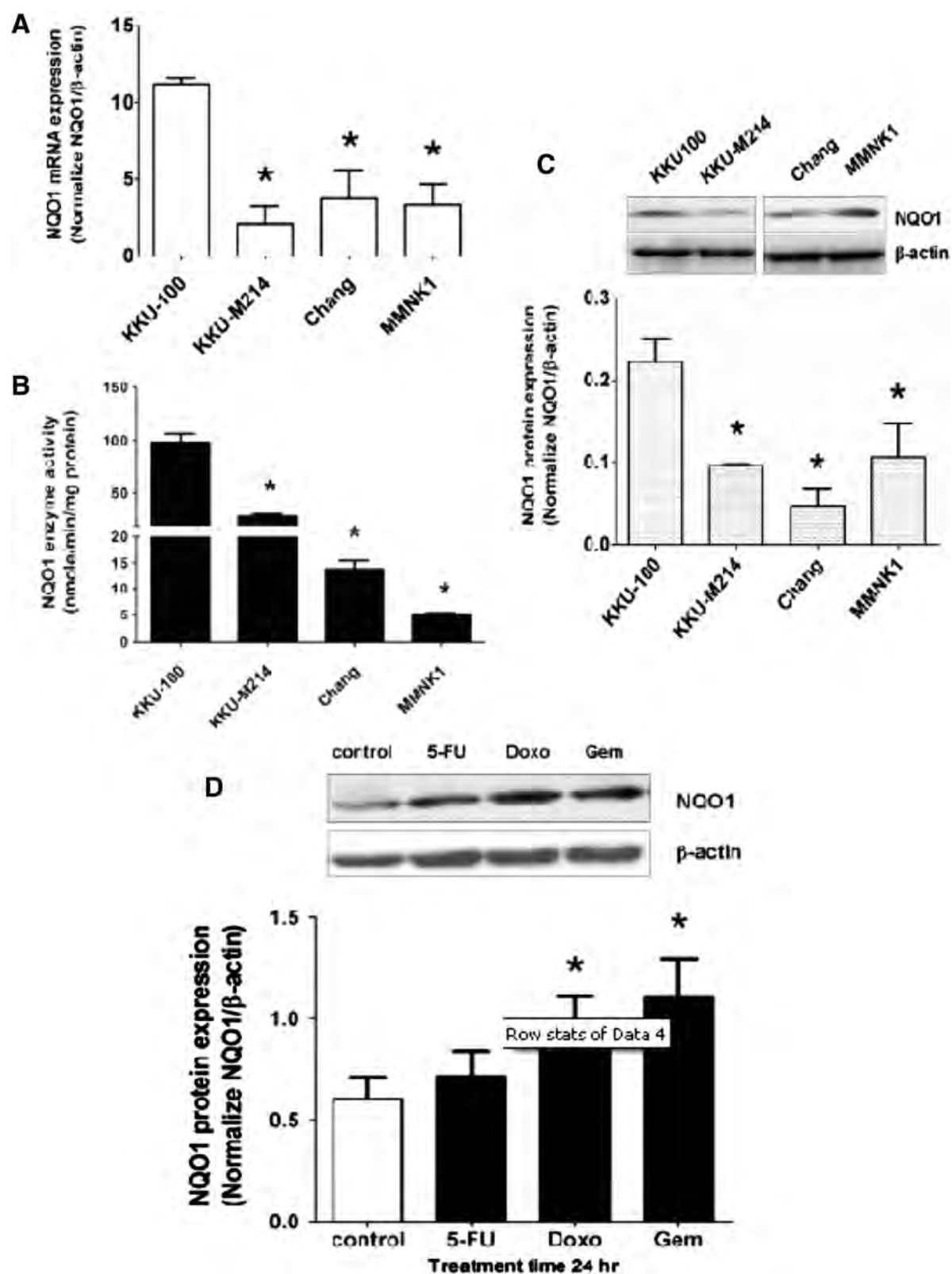


Figure 1 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 1 Basal level of NQO1 mRNA, protein expression, and enzyme activity of CCA cells and NQO1 protein induction by chemotherapeutic agents (5-FU, Doxo, and Gem). (A) Basal NQO1 mRNA expression in CCA cell lines (KKU-100 and KKU-M214) and two other cell lines (Chang and MMNK1 cells) analyzed by qPCR. The bars represent relative mRNA expression of NQO1 normalized with β -actin as internal control. * $p < 0.05$ vs KKU-100 cells. (B) Basal NQO1 enzyme activity analyzed by enzymatic methods. * $p < 0.05$ vs KKU-100 cells. (C) Basal NQO1 protein expression analyzed by Western Blot analysis using β -actin as internal control. Representative images of NQO1 and β -actin are shown in the top panel of the figure. * $p < 0.05$ vs KKU-100 cells. (D) Effect of chemotherapeutic agents on NQO1 protein expression in KKU-100 cells. Cells were exposed to 5-FU (3 μ M), Doxo (0.1 μ M), and Gem (0.1 μ M) for 24 hr. Data represent mean $\pm$ SEM, each from three separated experiments. * $p < 0.05$ vs the untreated control.

as follows: 1) NQO1 (NM_000903.2): forward primer 5'-GGCAGAAGAGCACTGATCGTA-3' and reverse primer 5'-TGATGGGATTGAAGTTCATGGC-3'; 2) wild type p53 (NM_005256778.1) [25]: forward primer 5'-ATG-GAGGAGCCGCACTCAGATCC-3' and reverse primer 5'-TTCTGTCTTCCCGGACTGAGTCTGACT-3'; 3) β -actin: forward primer 5'-TGCCATCCTAAAAGCCAC-3' and reverse primer 5'-TCAACTGGTCTCAAGTCAGTG-3'. The real-time fluorescence PCR, based on EvaGreen[®] dye, was carried out in a final volume of 20 μ L containing 1x SsoFast[™] EvaGreen[®] supermix (#172-5200; Bio-Rad, CA, USA), 0.5 μ mol/L of each NQO1 or wild type p53, and 0.25 μ mol/L of β -actin primer. Thermal cycling was performed for each gene in duplicate on cDNA samples in 96-well reaction plates using the ABI 7500 Sequence Detection system (Applied Biosystems). A negative control was also included in the experimental runs. The negative control was set up by substituting the template with DI water. Real-time PCR was conducted with the following cycling conditions: 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 31 s. To verify the purity of the products, a melting curve analysis was performed after each run. Upon completion of 40 PCR amplification cycles, there was a dissociation step of ramping temperature from 60°C to 95°C steadily for 20 min, while the fluorescence signal was continually monitored for melting curve analysis. The concentration of PCR product was calculated on the basis of established standard curve derived from serial dilutions of the positive control for NQO1, wild type p53 and β -actin in the CCA cell lines.

Western blot analysis

After treatment with chemotherapeutic agents, CCA cells were washed with PBS, collected, and lysed at 4°C with 1x cell lysis buffer with 1 mmol/L dithiothreitol and 0.1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) with vigorous shaking. After centrifugation at 12,000 g for 30 min, supernatant was collected and stored at -80°C until use. Thirty microgram of the protein samples were mixed with 5x loading-dye buffer, heated at 90°C for 10 min, and proteins were then separated by electrophoresis in 10% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes at

180 mA for 1 hr. The PVDF membranes were blocked for 1 hr at room temperature with 5% (w/v) skim milk powder in PBS with 0.1% Tween-20. PVDF membrane was incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted with PBS/Tween-20. The antibodies purchased from Santa Cruz BioTechnology, Inc. (California, USA) were: rabbit polyclonal IgG Bax (1:2500) (#sc-493), rabbit polyclonal IgG cyclin D1 (1:1000) (#sc-718), rabbit polyclonal IgG p21 (1:500) (#sc-56335), mouse polyclonal IgG p53 (1:500) (#sc-98), and mouse monoclonal IgG β -actin (1:2500) (#sc-1616). The rabbit polyclonal IgG NQO1 (1:2500) (#ab34173) was purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA). The primary antibody was then removed and the blots were extensively washed with PBS/Tween-20. Blots were then incubated for 2 hr at room temperature with the secondary antibody horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG (#sc-2005) or goat anti-rabbit IgG (#sc-2004) at 1:5000 dilutions in PBS. After removal of the secondary antibody and extensive washing in PBS/Tween-20, the blots were incubated in the ECL substrate solution (Amersham[™] ECL[™] prime Western Blotting detection reagent; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Densities of the specific bands of Bax, cyclin D1, p21, p53, NQO1 and β -actin were visualized and captured by ImageQuant[™] LAS4000 (GE Healthcare).

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ SEM of triplicate assays from three independent experiments. An analysis of variance with repeated measurement was used to determine significant differences between each experimental group. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

NQO1 expression in CCA cells is constitutively high and increased further by chemotherapeutic agents

We first examined the NQO1 expression in two CCA cell lines, KKU-100 and KKU-M214, and two other cell lines (liver Chang cells and bile duct epithelial MMNK1 cells). KKU-100 cells showed the highest expression in NQO1 mRNA, protein and enzymatic activity (Figure 1A-C). Chang and MMNK1 cell lines showed relatively low

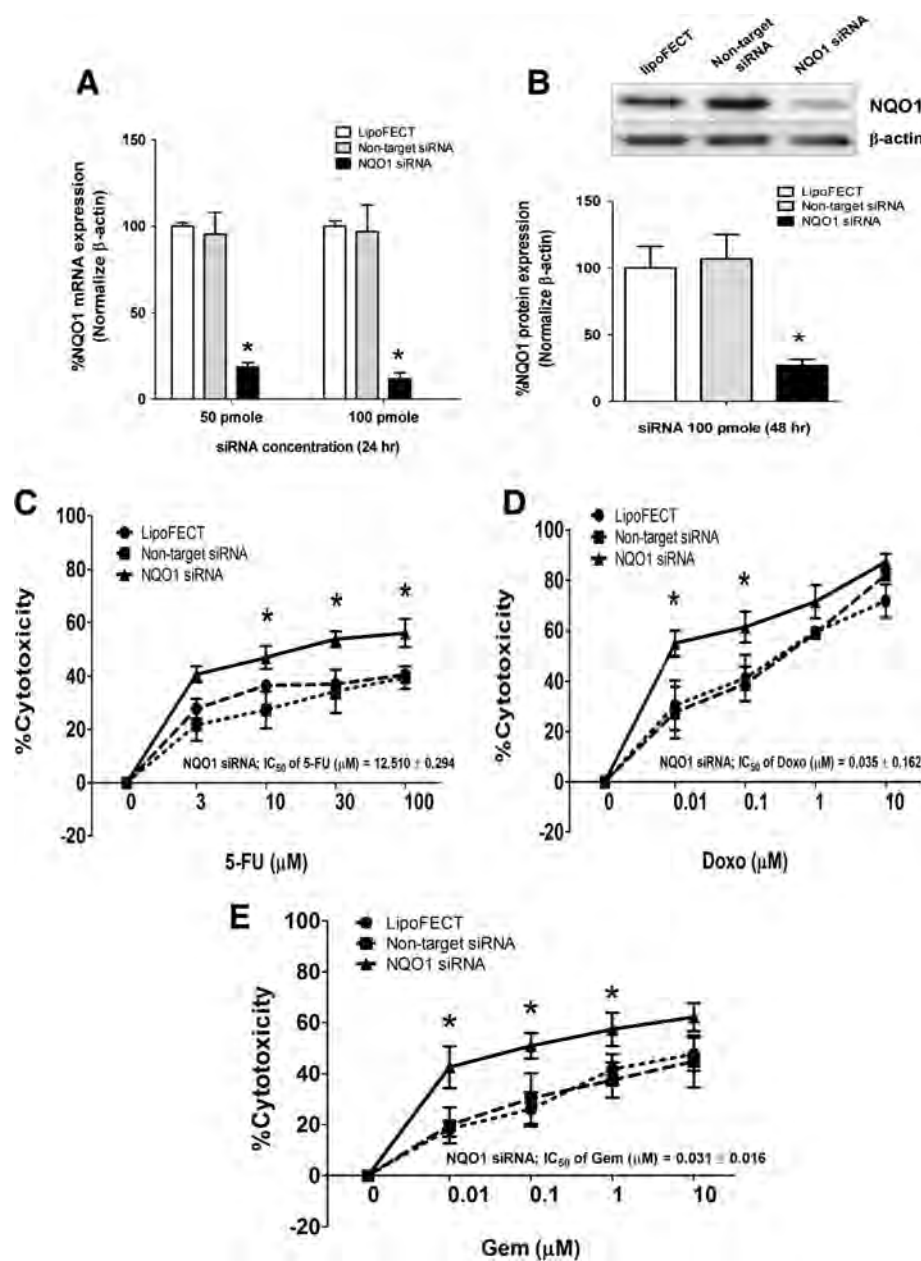


Figure 2 Knockdown of NQO1 by siRNA sensitized KKU-100 cells to chemotherapeutic agents. (A-B) Effect of NQO1 siRNA on mRNA and protein levels of NQO1 in KKU-100 cells. Cells were transfected with the pooled siRNA against NQO1 gene for 24 hr and 48 hr. Data represent mean ± SEM, each from three separated experiments. **p* < 0.05 vs the non-targeting siRNA transfected cells. (C-E) Cytotoxicity of chemotherapeutic agents on NQO1 siRNA transfected KKU-100 cells. Forty-eight hour after transfection, cells were treated with varied concentration of chemotherapeutic agents; 5-FU, Doxo, and Gem for another 24 hr as described in the “Methods” section. The cytotoxicity was evaluated by SRB assay. Data represent mean ± SEM, each from three separated experiments. **p* < 0.05 vs the non-targeting siRNA transfected cells.

enzymatic activity. KKU-100 and KKU-M214 cells were used in the subsequent study as the representative of the high and low NQO1 expressing cells, respectively. To examine whether chemotherapeutic agents could induce the antioxidative stress response by induction of NQO1, KKU-100 was treated with 3 μM of 5-FU, 0.1 μM of Doxo, and 0.1 μM of Gem for 24 hr. The results showed that

NQO1 protein expression was increased after treatment with Doxo and Gem, but not 5-FU (Figure 1D).

NQO1 gene silencing sensitizes CCA cells to chemotherapeutic agents

To verify the possibility that NQO1 can modulate the susceptibility of CCA cells to chemotherapeutic agents,

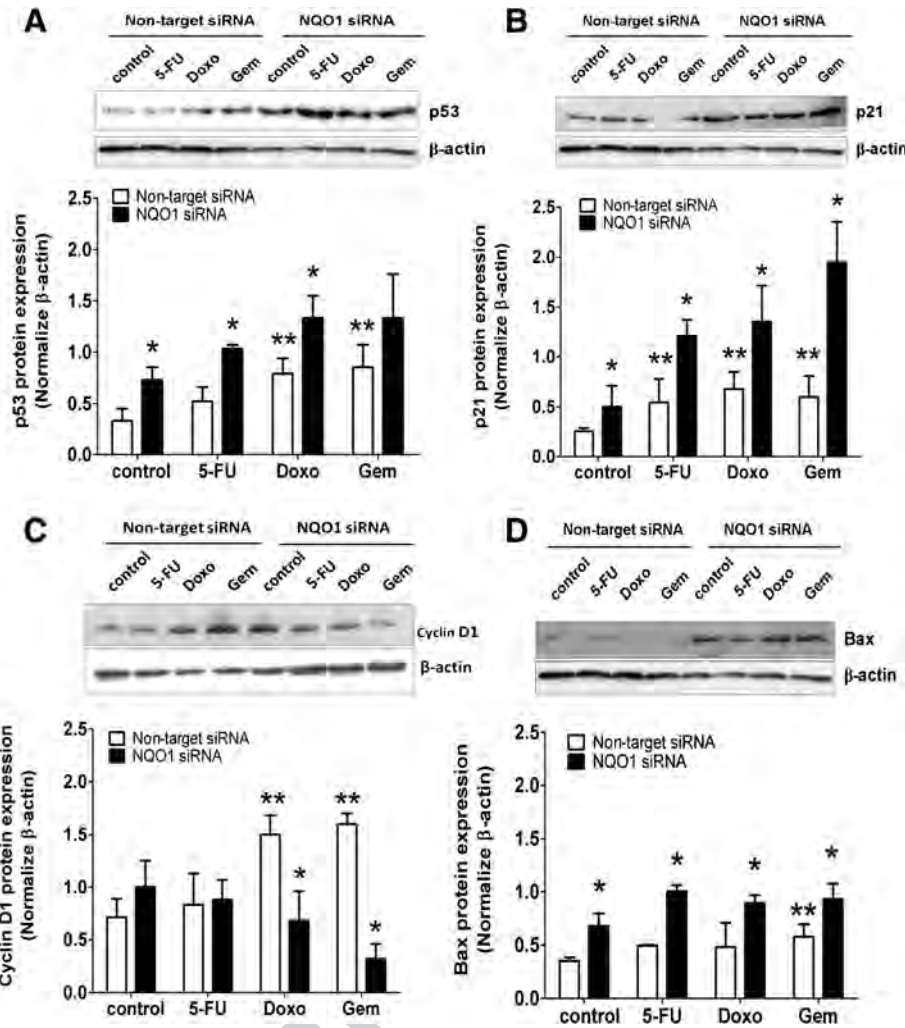


Figure 3 Altered expressions of proteins related to cell proliferation and apoptosis pathways. **A-D**, Expressions of proteins related to cell proliferation and apoptosis pathways. KKU-100 with NQO1 knocked down cells were exposed to chemotherapeutic agents; 5-FU (3 μM), Doxo (0.1 μM), and Gem (0.1 μM) for 24 hr. Whole cell lysates were prepared after indicated treatment and Western blot analysis was conducted using anti-p53 (**A**), -p21 (**B**), -cyclin D1 (**C**), -Bax (**D**) and β-actin antibodies. The relative bars that were normalized with β-actin as a loading control of each band is shown below the Western blot images. Data represent mean ± SEM, each from three separated experiments. **p* < 0.05 vs the treated non-targeting knocked down cells. ***p* < 0.05 vs the untreated non-targeting knocked down cells.

357 NQO1 expression was knocked down by using a siRNA
358 method. KKU-100 cells were used in the study, because the
359 recent study has shown that the high NQO1 expressing
360 cells, KKU-100 cells, are sensitized by dicoumarol to the
361 cytotoxicity of chemotherapeutic agents, while the low ex-
362 pressing cells are not [22]. The results showed that NQO1
363 mRNA expression was suppressed by siRNA more than
F2 364 80% at 24 hr (Figure 2A). The protein expression levels
365 (Figure 2B) and enzymatic activity (data not shown) were
366 also suppressed moderately at 24 hr (data not shown) and
367 about 80% at 48 hr after the siRNA transfection. The fur-
368 ther experiment was performed after transfection for 48 hr.
369 Then, we examined the susceptibility of NQO1-
370 knockdown-KKU-100 cells to various chemotherapeutic
371 agents. NQO1 siRNA treatment alone did not alter

372 significantly the cell viability compared with that of KKU- 372
100 cells treated with non-target siRNA. By NQO1- 373
knockdown, KKU-100 cells became more sensitive to the 373
cytotoxic effect of 5-FU, Doxo, and Gem (Figure 2C-E). 374
The chemosensitizing effect was remarkable especially at 375
the low concentrations of the chemotherapeutic agents. 376
377

NQO1-knockdown and chemotherapeutic agent 378
treatment induce p53 and altered expression of cell 379
death pathway proteins 380

To explore the possible mechanisms of chemosensitizing 381
effect of NQO1-knockdown, we examined the expression 382
levels of cell death-related proteins in NQO1-knockdown- 383
KKU-100 cells. Western blot analyses revealed that Doxo 384
and Gem treatment alone increased p53 levels (Figure 3A). 385 F3

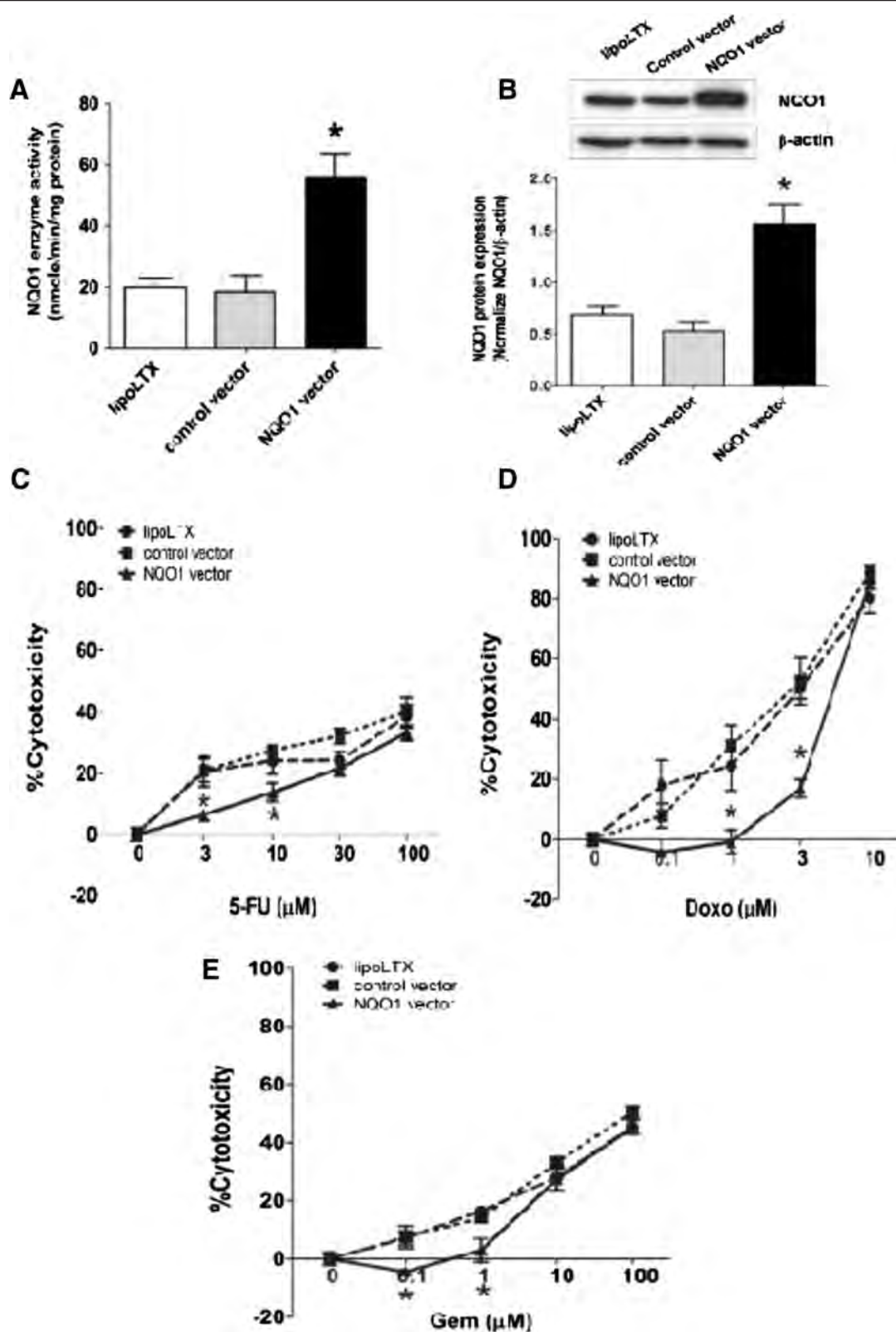


Figure 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 4 Effects of NQO1 over-expression on the susceptibility of KKK-M214 cells to chemotherapeutic agents (5-FU, Doxo, and Gem).

A-B, Effect of NQO1 over-expression on mRNA and protein levels of NQO1 in KKK-M214 cells. The pCMV6-XL5-NQO1 (wild type NQO1) or pCMV6-XL5 (control vector) was transfected to KKK-M214 for 24 hr. The whole cells were collected for NQO1 enzyme activity assay (**A**) and Western blot analysis (**B**). The data represent mean $\pm$ SEM, each from three experiments. * $p < 0.05$ vs the control vector transfected cells. (**C-E**) Cytotoxicity of chemotherapeutic agents on NQO1 over-expressed KKK-M214 cells. Twenty-four hour after transfection, cells were incubated with chemotherapeutic agents for additional 24 hr (Doxo) and 48 hr (5-FU and Gem). The cytotoxicity was evaluated by SRB assay. Data represent mean $\pm$ SEM, each from three separated experiments. * $p < 0.05$ vs the control vector transfected cells.

When NQO1-knockdown-KKK-100 cells were treated with chemotherapeutic agents, p53 level was enhanced further by all 3 agents (Figure 3A). Then, we examined the expression levels of some p53 downstream proteins, i.e. p21, cyclin D1, and Bax protein. Similar to p53, p21 and Bax were over-expressed by the drug treatments (Figure 3B, 3D). In contrast, in the NQO1 knockdown cells, treatment with chemotherapeutic agents strongly suppressed the cyclin D1 level (Figure 3C). In the non-target siRNA transfected KKK-100 cells, Doxo and Gem, but not 5-FU, treatments increased cyclin D1 expression (Figure 3C).

Over-expression of NQO1 in CCA cells induces drug resistance against chemotherapeutic agents

Since KKK-M214 cells naturally express relatively low level of NQO1, effects of NQO1 over-expression by transient transfection with NQO1 expression vector on the susceptibility of cells to chemotherapeutic agents was evaluated. After transfection, the NQO1 enzyme activity in the transfected cells was elevated approximately 2.5-fold and the NQO1 protein level was 2.25-fold higher than the control vector (Figure 4A-B), indicating that NQO1 construct was efficiently expressed in KKK-M214 cells. Then, NQO1-over-expressed KKK-M214 cells were exposed to 5-FU and Gem for 48 hr, and to Doxo for 24 hr. The results showed that the cytotoxicity of 5-FU, Doxo, and Gem were markedly decreased for NQO1-over-expressed KKK-M214 cells (Figure 4C-E), indicating the protective effect of NQO1.

Over-expression of NQO1 suppresses chemotherapeutic agents-induced p53 and protein expression in the cell death pathway

Previous experiment showed that NQO1-knockdown increased p53 and apoptogenic protein expression. The results of this experiment showed that over-expression of NQO1 in KKK-M214 cells strongly suppressed the chemotherapeutic agents-induced increased expression of p53, p21, and Bax (Figure 5A-B & D). On the other hand, over-expression of NQO1 enhanced Doxo- and Gem-induced cyclin D1 expression (Figure 5C).

Knockdown of p53 abolishes the chemosensitizing effect of NQO1 silencing Since the results given above showed that the knockdown and over-expression of

NQO1 enhanced and suppressed, respectively, the chemotherapeutic agent-mediated cytotoxicity in association with the altered expression of p53, p53 apparently play a role in the expression of the cytotoxic effect of those anti-cancer agents. To validate the role of p53, we prepared the double knockdown of NQO1 and p53 in KKK-100 cells. The efficiency of NQO1 and p53 knockdown was more than 80% (Figure 6A). As is shown above, NQO1-knockdown increased the susceptibility of KKK-100 cells to chemotherapeutic agents. Conversely, p53-knockdown markedly reduced cytotoxic effect of all tested chemotherapeutic agents compared with chemotherapeutic agents alone (Figure 6B-D). Interestingly, in the double knockdown experiment, the cytotoxic potentiation effect of NQO1 gene silencing was totally diminished by the simultaneous knockdown of p53. The cytotoxic effects of chemotherapeutic agents on double knockdown cells were similar to those on p53 knockdown cells. These results strongly suggest that the cytotoxic effects of all 3 chemotherapeutic agents on CCA cells were dependent on p53 expression and NQO1 is probably the upstream modulator of p53.

Discussion

We previously showed that the survival time of CCA patients with high NQO1 mRNA expression was shorter than patients having CCA with low NQO1 expression [21], suggesting the possible role of NQO1 in CCA progression. We also demonstrated that inhibition of NQO1 in high NQO1 expressing cell line, KKK-100, enhanced the cytotoxic effect of chemotherapeutic agents, but not in the low NQO1 expressing cells, i.e. KKK-M214 [22]. In the present study, the role of NQO1 was validated by knockdown of NQO1 expression in KKK-100 cells and over-expression of NQO1 in KKK-M214 cells. Knockdown of NQO1 enhanced the cytotoxic effect of 5-FU, Doxo and Gem, whereas over-expression of NQO1 protected the cells from chemotherapeutic agents. The suppression of NQO1 expression was associated with up-regulation of p53, p21, and Bax proteins, while over-expression was associated with down-regulation of those proteins. The role of NQO1 in cell viability became significant when NQO1 knockdown KKK-100 cells exposed to chemotherapeutic agents. It should be noted that NQO1 plays an important role in cell viability especially at severe stress

F4

F5

F6

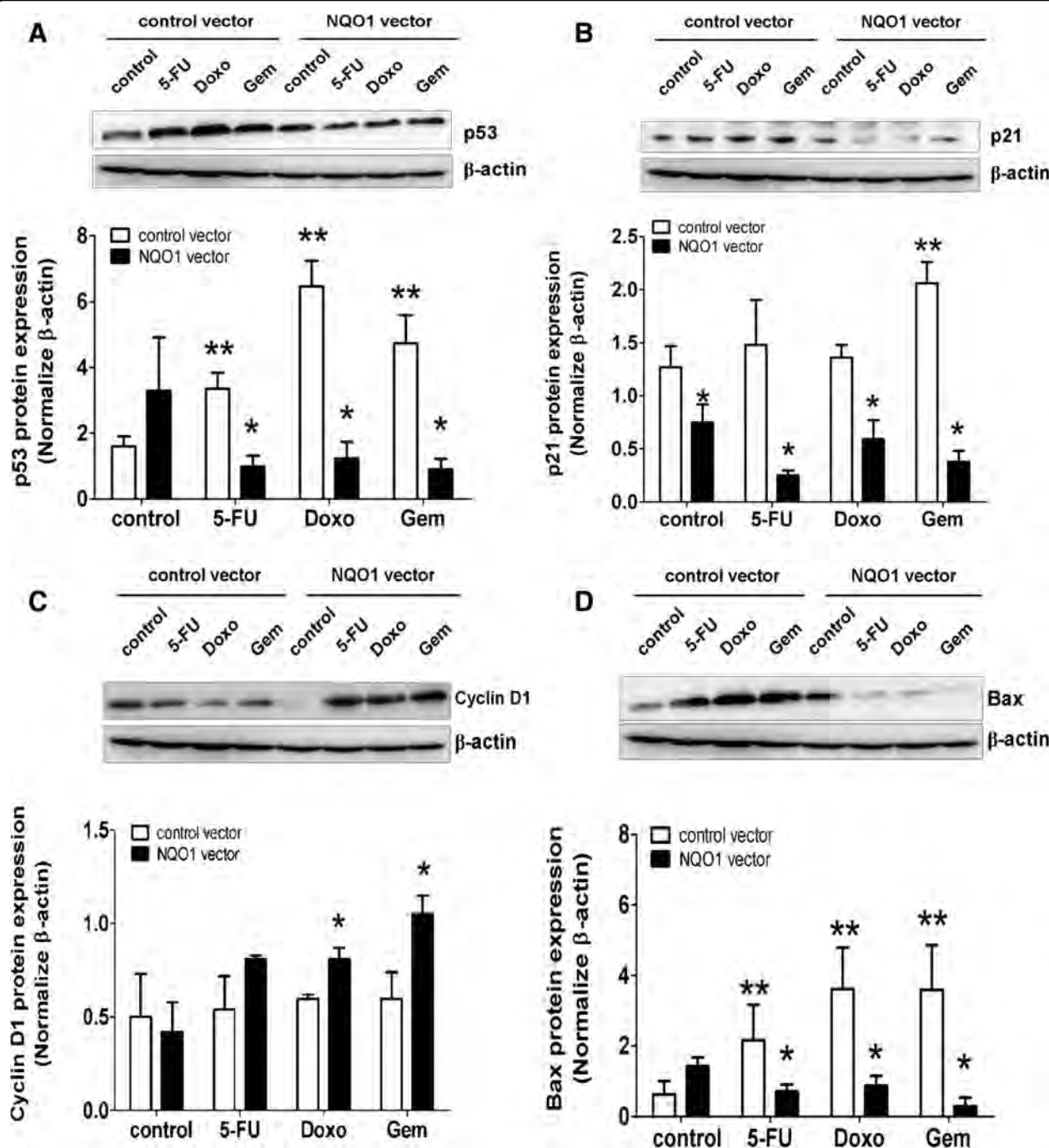


Figure 5 NQO1 over-expression attenuates the p53 pathway in K KU-M214 cells. **A-D**, Western blots of p53 (**A**), p21 (**B**), cyclin D1 (**C**), and Bax (**D**) protein in K KU-M214-NQO1 over-expressed cells after treatment with 5-FU 3 μ M (48 hr), Doxo 0.1 μ M (24 hr), and Gem 0.1 μ M (48 hr). The relative bars that were normalized with β -actin of each band are shown below the Western blot images. * $p < 0.05$ vs the treated control vector transfected cells. ** $p < 0.05$ vs the untreated control vector transfected cells.

condition in CCA cells. The role of p53 was verified by p53 and NQO1 gene silencing with siRNA. The potentiation effect of NQO1 gene silencing on the cytotoxicity of chemotherapeutic agents was inhibited by p53 knock-down. Thus, the sensitizing effect of NQO1 is likely to be mediated via p53.

Inhibition of NQO1 by dicoumarol suppressed cancer cell growth and potentiated the cytotoxicity of chemotherapeutic agents [19,20]. Chemotherapeutic agents such as Doxo and Gem induced over-expression of NQO1 in CCA cells. This may be a cellular adaptive response to oxidative stress and cytotoxicity [13] and may confer the

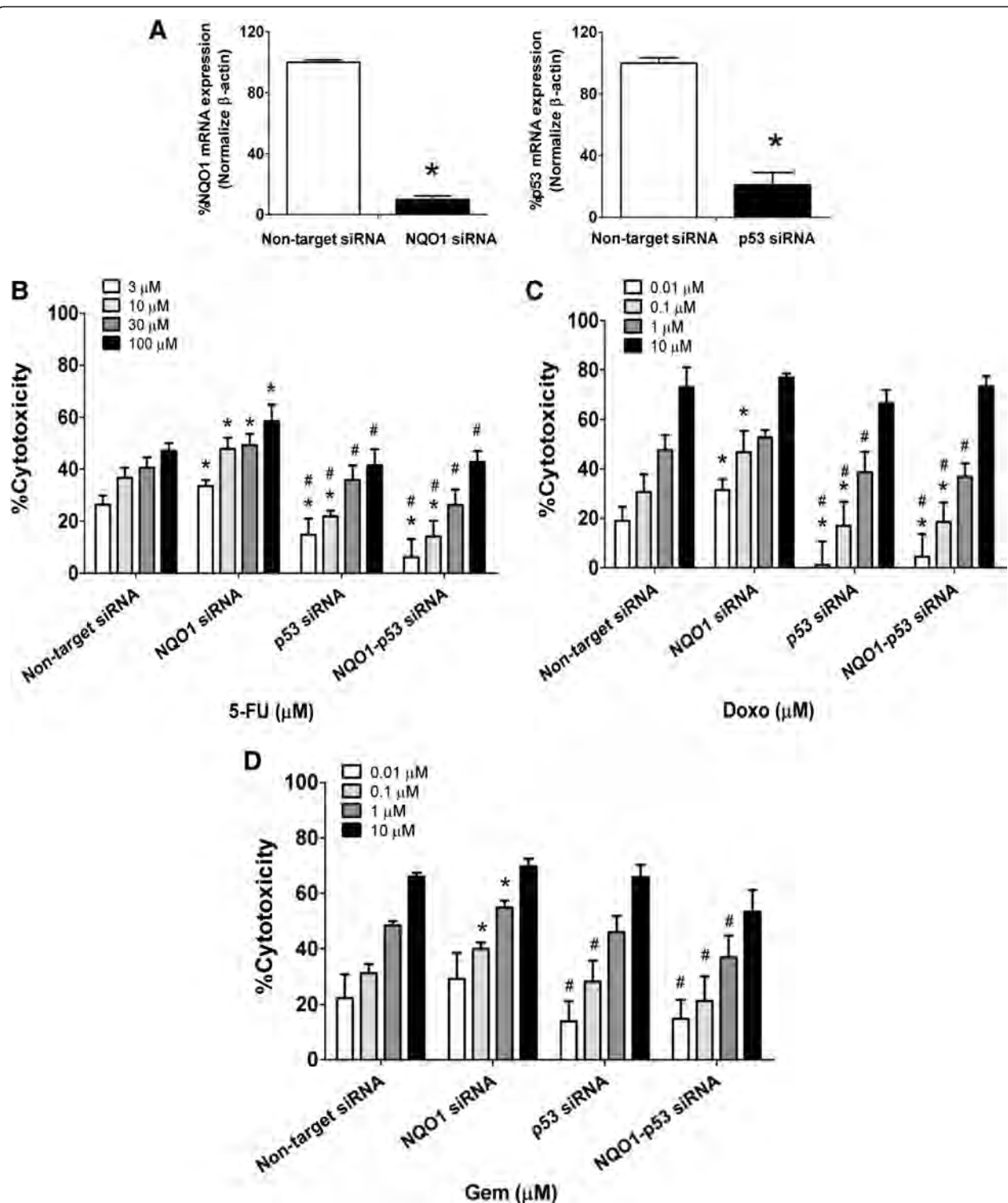


Figure 6 Double knockdown of NQO1 and p53 by siRNA altered KKU-100 cells to chemotherapeutic agents. (A) Effect of co-transfected NQO1 and p53 siRNA in KKU-100 cells. Cells were transfected with the pooled siRNA against NQO1 and p53 for 24 hr. The bars represent relative expression of NQO1 and p53 normalized with β-actin as internal control. **(B-D)** After co-transfection, cells were treated with varied concentrations of chemotherapeutic agents; 5-FU, Doxo, and Gem for another 24 hr as described in the "Methods" section. The cytotoxicity was evaluated by SRB assay. Data represent mean ± SEM, each from three separated experiments. * $p < 0.05$ vs the non-targeting knocked down cells and # $p < 0.05$ vs NQO1 knocked down cells.

cytoprotective effect to the cells. The biological role of NQO1 in CCA was validated in this study and found to be consistent with our recent report in that suppression of NQO1 enhances the cytotoxic effect of many chemotherapeutic agents and the activation of mitochondrial death pathway [22]. On the other hand, over-expression of NQO1 in KKU-M214 cells suppressed the cytotoxic effect of chemotherapeutic agents. The results indicated the protective effect of NQO1 from chemotherapy in CCA. Taken together, this may provide a possibility to combine NQO1 inhibitor together with chemotherapy as a novel treatment strategy for CCA. However, to apply this information to CCA patients, several critical studies are requested to confirm the *in vivo* relevance of these findings. For example, the synergistic role of NQO1 inhibition in chemotherapy of CCA should be further validated in animal models. This could be carried out in our future study.

The mechanism of NQO1-mediated chemosensitization was further explored. Previous reports suggested that NQO1 modulates p53 expression by interfering with 20S proteasome-mediated degradation of p53 [24]. Inhibition of NQO1 by dicoumarol suppressed p53 protein levels and induced cell death [24]. In contrast, dicoumarol at non-cytotoxic concentrations, but sufficient to inhibit NQO1 enzyme activity, enhanced p53 protein levels [22]. Present results show that the suppression of NQO1 increased p53 expression.

Tumor protein p53 and Bcl family proteins regulate mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) [26]. Our results showed that the increase of p53 was associated with increased p21 and Bax levels. Both p21 and Bax are p53-dependent downstream gene products. The p21 is a potent cyclin-dependent kinase inhibitor and its expression is associated with the strong antiproliferative effect as was seen in the present study. Bax is a multidomain proapoptotic Bcl2 family. It translocates into the mitochondrial outer membrane and forms Bax pores leading to the release of proapoptotic proteins and ensuing cell death [27]. p53 is a tumor suppressor gene that responded to DNA damage or oxidative stress by inducing growth arrest or apoptotic cell death [28,29]. Our results showed that knockdown of p53 inhibited the chemosensitizing effect, which was induced by knockdown of NQO1 in KKU-100 cells. This indicates that the sensitizing effect of NQO1 knockdown is mediated via p53 pathway. It is also noted that KKU-100 cells expressed both the wild type full length p53 as well as the splicing variant of truncated p53 protein [30]. Interestingly, our results showed that the potentiation effect of NQO1 gene silencing on the cytotoxicity of chemotherapeutic agents can occur even in cancer cells with high expression ratio of mutant p53/wild type p53. It is yet to determine the chemosensitizing effect of NQO1 suppression on cells expressing the other mutated p53. As

some CCA patients express high NQO1 [20], targeting the NQO1 by suppressing the activity or expression could be a strategy to overcome drug resistance of cancer and enhancing the efficacy of chemotherapeutic agents.

Conclusions

In summary, NQO1 plays an important role in cytoprotection of cancer cells and modulates the sensitivity of chemotherapeutic agents, particularly in the high NQO1 expressing CCA cells. NQO1 is a potential molecular target for enhancing the antitumor activity of chemotherapeutic agents.

Abbreviations

NQO1: NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1; CCA: Cholangiocarcinoma; 5-FU: 5-fluorouracil; Doxo: Doxorubicin; Gem: Gemcitabine; siRNA: Small interfering RNA; SRB: Sulforhodamine B; p53: Tumor protein 53.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

Conceived and designed: PZ AP VK. Performed the experiments: PZ AP LS BS. Analyzed the data: PZ AP VK. Wrote the paper: PZ AP VK. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by the Thailand Research Fund (RMU5380027), the National Research University Project and the Office of Higher Education Commission through SHeP-GMS of Khon Kaen University, the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, grant-in-aid from Faculty of Medicine (I 56108), Khon Kaen University, and a scholarship from the Office of the Higher Education Commission to Ponsilp Zeekpudsa. Valuable suggestions on the manuscript of Prof. Yukifumi Nawa of Faculty of Medicine, Khon Kaen University are gratefully acknowledged.

Author details

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. ²Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. ³Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

Received: 24 September 2013 Accepted: 21 January 2014

Published: 24 January 2014

References

- Lazaridis KN, Gores GJ: Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2005, **128**:1655–1667.
- Patel T: Cholangiocarcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006, **3**:33–42.
- Sripa B, Pairojkul C: Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol* 2008, **24**:349–356.
- Sriplung H, Sontipong S, Martin N, Wiangnon S, Vootiprux V, Cheirsilpa A, Kanchanabat C, Kluhaphrema T: Cancer incidence in Thailand, 1995–1997. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005, **6**:276–281.
- Kurathong S, Lerdverasirikul P, Wongpaitoon V, Pramoolsinsap C, Kanjanapitak A, Varavithya W, Phuapradit P, Bunyaratvej S, Upatham ES, Brockelman WY: Opisthorchis viverrini infection and cholangiocarcinoma. A prospective, case-controlled study. *Gastroenterology* 1985, **89**:151–156.
- Thamavit W, Bhamarapravati N, Sahaphong S, Vajrasthira S, Angsubhakorn S: Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in Opisthorchis viverrini-infected Syrian golden hamsters. *Cancer Res* 1978, **38**:4634–4639.
- Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD: Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2005, **366**:1303–1314.

- 597 8. Fodale V, Pierobon M, Liotta L, Petricoin E: **Mechanism of cell adaptation:**
598 **when and how do cancer cells develop chemoresistance?** *Cancer J* 2011,
599 17:89–95. 666
- 600 9. Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, Arumugam T, Greenon JK, Giordano
601 TJ, Misek DE, Kuick R, Hanash S: **Molecular profiling of pancreatic**
602 **adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes**
603 **differentially regulated in pancreatic cancer.** *Cancer Res* 2003,
604 63:2649–2657. 667
- 605 10. Siegel D, Ross D: **Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase**
606 **1 (NQO1) in human tissues.** *Free Radic Biol Med* 2000, 29:246–253. 668
- 607 11. Chao C, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P, Hashibe M: **NAD(P)H:quinone**
608 **oxidoreductase 1 (NQO1) Pro187Ser polymorphism and the risk of lung,**
609 **bladder, and colorectal cancers: a meta-analysis.** *Cancer Epidemiol*
610 *Biomarkers Prev* 2006, 15:979–987. 669
- 611 12. Cullen JJ, Hinkhouse MM, Grady M, Gaut AW, Liu J, Zhang YP, Weydert CJ,
612 Domann FE, Oberley LW: **Dicumarol inhibition of NADPH: quinone**
613 **oxidoreductase induces growth inhibition of pancreatic cancer via a**
614 **superoxide-mediated mechanism.** *Cancer Res* 2003, 63:5513–5520. 670
- 615 13. Jaiswal AK: **Regulation of genes encoding NAD(P)H: quinone**
616 **oxidoreductases.** *Free Radic Biol Med* 2000, 29:254–262. 671
- 617 14. Long DJ 2nd, Waikel RL, Wang XJ, Perlaky L, Roop DR, Jaiswal AK: **NAD(P)**
618 **H: quinone oxidoreductase 1 deficiency increases susceptibility to**
619 **benzo(a)pyrene-induced mouse skin carcinogenesis.** *Cancer Res* 2000,
620 60:5913–5915. 672
- 621 15. Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D: **NAD(P)H: quinone**
622 **oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene**
623 **regulation and genetic polymorphisms.** *Chem Biol Interact* 2000, 129:77–97. 673
- 624 16. Prawan A, Buranrat B, Kukongviriyapan U, Srija B, Kukongviriyapan V:
625 **Inflammatory cytokines suppress NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1**
626 **and induce oxidative stress in cholangiocarcinoma cells.** *J Cancer Res Clin*
627 *Oncol* 2009, 135:515–522. 674
- 628 17. Kolesar JM, Pritchard SC, Kerr KM, Kim K, Nicolson MC, McLeod H:
629 **Evaluation of NQO1 gene expression and variant allele in human NSCLC**
630 **tumors and matched normal lung tissue.** *Int J Oncol* 2002, 21:1119–1124. 675
- 631 18. Cresteil T, Jaiswal AK: **High levels of expression of the NAD(P)H: quinone**
632 **oxidoreductase (NQO1) gene in tumor cells compared to normal cells of**
633 **the same origin.** *Biochem Pharmacol* 1991, 42:1021–1027. 676
- 634 19. Matsui Y, Watanabe J, Ding S, Nishizawa K, Kajita Y, Ichioka K, Saito R,
635 Kobayashi T, Ogawa O, Nishiyama H: **Dicoumarol enhances doxorubicin-**
636 **induced cytotoxicity in p53 wild-type urothelial cancer cells through p38**
637 **activation.** *BJU Int* 2010, 105:558–564. 677
- 638 20. Watanabe J, Nishiyama H, Matsui Y, Ito M, Kawanishi H, Kamoto T, Ogawa O:
639 **Dicoumarol potentiates cisplatin-induced apoptosis mediated by c-Jun**
640 **N-terminal kinase in p53 wild-type urogenital cancer cell lines.** *Oncogene*
641 2006, 25:2500–2508. 678
- 642 21. Buranrat B, Chau-In S, Prawan A, Puapairoj A, Zeekpudsa P, Kukongviriyapan
643 V: **NQO1 expression correlates with cholangiocarcinoma prognosis.** *Asian*
644 *Pac J Cancer Prev* 2012, 13(Suppl):131–136. 679
- 645 22. Buranrat B, Prawan A, Kukongviriyapan U, Kongpetch S, Kukongviriyapan V:
646 **Dicoumarol enhances gemcitabine-induced cytotoxicity in high NQO1-**
647 **expressing cholangiocarcinoma cells.** *World J Gastroenterol* 2010,
648 16:2362–2370. 680
- 649 23. Cross JV, Deak JC, Rich EA, Qian Y, Lewis M, Parrott LA, Mochida K,
650 Gustafson D, Vande Pol S, Templeton DJ: **Quinone reductase inhibitors**
651 **block SAPK/JNK and NFkappaB pathways and potentiate apoptosis.** *J Biol*
652 *Chem* 1999, 274:31150–31154. 681
- 653 24. Asher G, Lotem J, Cohen B, Sachs L, Shaul Y: **Regulation of p53 stability**
654 **and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1.** *Proc*
655 *Natl Acad Sci USA* 2001, 98:1188–1193. 682
- 656 25. Dhar SK, Xu Y, Chen Y, St Clair DK: **Specificity protein 1-dependent p53-**
657 **mediated suppression of human manganese superoxide dismutase gene**
658 **expression.** *J Biol Chem* 2006, 281:21698–21709. 683
- 659 26. Chao DT, Korsmeyer SJ: **BCL-2 family: regulators of cell death.** *Annu Rev*
660 *Immunol* 1998, 16:395–419. 684
- 661 27. Chipuk JE, Fisher JC, Dillon CP, Kriwacki RW, Kuwana T, Green DR:
662 **Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic**
663 **BCL-2 proteins.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:20327–20332. 685
- 664 28. Chipuk JE, Green DR: **Dissecting p53-dependent apoptosis.** *Cell Death*
665 *Differ* 2006, 13:994–1002. 686
29. Zheng C, Jia W, Tang Y, Zhao H, Jiang Y, Sun S: **Mesothelin regulates**
growth and apoptosis in pancreatic cancer cells through p53-dependent
and -independent signal pathway. *J Exp Clin Cancer Res* 2012, 31:84. 667
30. Nutthasirikul N, Limpiboon T, Leelayuwat C, Patrakitkomjorn S,
Jearanaikoon P: **Ratio disruption of the 133p53 and TAp53 isoform**
equilibrium correlates with poor clinical outcome in intrahepatic
cholangiocarcinoma. *Int J Oncol* 2013, 42:1181–1188. 668

doi:10.1186/1756-9966-33-11

Cite this article as: Zeekpudsa et al.: **Suppression of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 enhanced the susceptibility of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2014 33:11. 673

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ภาคผนวก ข.

Chemosensitization by targeting NQO1 is p53-mediated mechanism

Ponsilp Zeekpudsa, Sanjit Kumar Dhar, Auemduan Prawan*, Veerapol Kukongviriyapan,
Laddawan Senggunpra and Daret K. St. Clair

Manuscript in preparation

Chemosensitization by targeting NQO1 is p53-mediated mechanism

Ponsilp Zeekpudsa^{1,2}, Sanjit Kumar Dhar¹, Veerapol Kukongviriyapan², Laddawan Senggunpra², Daret K. St. Clair¹, Auemduan Prawan^{2,*}

¹Graduate Center for Toxicology, University of Kentucky, Lexington, Kentucky 40536

²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University, Thailand

*Corresponding author

Auemduan Prawan, Ph.D.

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

123 Mittraparp Highway, Muang District,

Khon Kaen 40002, Thailand

Tel/Fax: +66 (0) 43 348397 ext 15

E-mail: peuamd@kku.ac.th

Email addresses:

PZ : pornsinsin.z@gmail.com

SD : sanjit.dhar@uky.edu

AP : peuamd@kku.ac.th

VK : veerapol@kku.ac.th

LS : laddas@kku.ac.th

DC : dstcl00@uky.edu

Abstract

NQO1 (NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1) serves as a two electron reductase for detoxification of quinones and antioxidant activity. Inhibition of NQO1 could sensitize cancer cells to anticancer agents. The sensitizing effect of NQO1 has been shown to be associated with p53. How anticancer agent and NQO1 interact with p53 is unclear. We demonstrated that the treatment of doxorubicin (Doxo) and 5-fluorouracil (5-FU) in HCT116 cells increased the NQO1 and p53 protein levels, but the NQO1 enzymatic activity was paradoxically suppressed. To understand the link between the increase of p53 and suppression of NQO1 activity, the immunoprecipitation was performed. The p53 proteins were found to physically interact with NQO1 which probably interferes with NQO1 activity. The role of p53 on NQO1 was explored further. Treatment of Doxo to p53-null PC3 cells did not alter NQO1 activity, whereas over-expression of p53 by transient transfection with p53 expression vector suppressed NQO1 activity. Moreover, suppression of NQO1 by dicoumarol did not potentiate anticancer activity of Doxo in PC3 cells, while dicoumarol potentiated Doxo in p53 wild-type HCT116 cells. The effect of NQO1 suppression by dicoumarol was further validated by NQO1 siRNA. Our study suggested that anticancer agents increased expression of p53 and NQO1, whilst p53 may physically interfere with NQO1 activity. The inhibition of NQO1 activity by p53 is whether contributed to chemosensitizing effect is not certain. However, an inhibitor of NQO1 activity, as well as the presence of p53 is required to exhibit chemosensitizing effect. Our study demonstrates an intricate relationship between the positive and negative control of p53 expression.

Keywords:

NQO1; p53; 5-fluorouracil; doxorubicin

Introduction

NQO1 is a ubiquitous flavoprotein that functions as an antioxidant enzyme. Under normal physiologic condition, the enzyme catalyzes two electron reductions of quinones to hydroquinones, thus avoids an one electron reduction and associated redox cycling which generates ROS (Ross et al., 2000; Ross and Siegel, 2004; Siegel et al., 2004). It is conceivable that NQO1 plays an important role in protecting normal cells against oxidative injury and carcinogenesis. The expressions of NQO1 and antioxidant enzymes are recognized as an adaptive response to chemical stress (Wang et al., 2008). On the other hand, analysis of several solid tumors found an over-expression of the NQO1 gene in cancers of the liver, thyroid, breast, colon, lung and pancreas (Danson et al., 2004). Recently, significant association was observed between high NQO1 expression in cholangiocarcinoma (CCA) tissue and short survival (Buranrat et al., 2012). Under these circumstances, NQO1 probably functions to protect cancer cells by eliminating oxidant species and making cells resistant to chemotherapeutic agents that induce oxidative injury.

Recently, NQO1 is one of the attractive targets in development of chemotherapy. Inhibition of NQO1 activity with dicoumarol suppressed urogenital, pancreatic and cholangiocarcinoma (CCA) cell growth and potentiated cytotoxicity of cisplatin and doxorubicin (Buranrat et al., 2010; Matsui et al., 2010). Dicoumarol could exert several effects apart from inhibition of NQO1, such as suppression of JNK and NF- κ B pathways, and potentiation of apoptosis induced by TNF- α in HeLa cells (Cross et al., 1999). The combination of dicoumarol with gemcitabine induced cytotoxicity on CCA cells with high NQO1 activity by enhanced p53 and decreased Bcl-xl expression (Buranrat et al., 2010). The treatment of cancer based on targeting NQO1 has been shown to be a potential strategy to overcome the chemoresistance.

p53 is a tumor suppressor protein that is active in response to genotoxic stress, anticancer drugs typically resulting in cell cycle arrest growth inhibition and apoptosis. Many studies have shown chemotherapy enhance p53 expression by modulating the expression of pro- and anti-apoptotic genes members of the Bcl-2 protein such as Bax, Puma and p21 or directly by acting on the mitochondria and modulating mitochondrial integrity (Chappell et al., 2012; Chee et al., 2012; Velez et al., 2011). Thereby, p53 prevents proliferation of genetically abnormal cells and thus cancer formation.

Although the effects of chemotherapy on p53 functions in cancer cells are well documented, the mechanism by which NQO1 inhibition modulates p53 is still uncertain. In the present study, we investigated the interplay of NQO1 and p53. The study revealed that anticancer agent treatment induced expression of NQO1 and p53, thereby, p53 physically interfered with NQO1 activity, however, inhibition of NQO1 and presence of p53 were required for the chemosensitizing effect.

Materials and methods

Cell Culture

The human colon carcinoma cell line p53 wild-type HCT116 (p53 +/+) and human prostate cancer cell line p53-null PC3 (p53 -/-) were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA). HCT116 cells were grown in media consisting of modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (HyClone, Logan, UT), 200 μ M L-glutamine (Invitrogen, Grand Island, NY), and 1% penicillin-streptomycin-neomycin (PSN) antibiotic (Invitrogen). PC3 cells were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 1% penicillin and streptomycin mixture, 1 mmol/L sodium pyruvate, 10 mmol/L HEPES, 1% NEAA mixture (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD), 1% MEM vitamin mixture (Mediatech-Cellgro, Herndon, VA), and 2 mmol/L of L-glutamine. All Cells were grown in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

Anticancer agents

Doxorubicin (Doxo) was purchased from Bedford Laboratories (Bedford, OH). Dicoumarol (Dic) and 5-fluorouracil (5-FU) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Cells were incubated with Doxo (0.1, 0.34, 1, and 5 μ M for various times (1, 3, 6, 12, and 24 hr) or 5-FU (25, 50, and 100 μ M) for 24 hr. In order to study the effect of Doxo on protein degradation by proteasome, cells were pre-incubated with a proteasome inhibitor MG132 (0.1, 0.5, and 1 μ M; Calbiochem, San Diego, CA) for 30 min before addition of Doxo.

Reagents

Unless otherwise stated, all antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Rabbit polyclonal NQO1 antibody was

purchased from Abcam (Cambridge, MA). Mouse monoclonal β -actin antibody was purchased from Sigma. Control siRNA was purchased from Santa Cruz Biotechnology. The NQO1 siRNA was purchased from Thermo scientific Dharmacon. (Chicago, IL, USA). The p53 expression vector (pcDNA/p53) was purchased from Invitrogen.

Transient transfection

To study effect of NQO1 gene silencing, HCT116 cells were transfected with NQO1 siRNA or control siRNA. The siRNA sequences targeting NQO1 gene (siGENOME SMARTpool siRNA #M-005133-02-0020) were as follows: strand 1, 5'-G-AAAGGACAUCACAGGUAA-3'; strand 2, 5'-GAAGGACCCUGC-GAACUUU-3'; strand 3, 5'-GCAAGUCCAU-CCCAACUGA-3'; and strand 4, 5'-CCGAGUCUGUU-CUGG-CUUA-3'. The control siRNA used in this study were pooled of three different non-targeted small RNA fragments (sc-37007, Santa Cruz BioTechnology).

To study effect of p53 over-expression, PC3 cells were grown for 24 hr in RPMI 1640 medium supplemented with FBS, sodium pyruvate, HEPES, NEAA mixture, MEM vitamin mixture, and L-glutamine without antibiotics. Cells were transfected with p53 expression vector (0.1, 1, and 5 μ g of p53 cDNA constructed in pcDNA plasmid) or control (-p53) pcDNA vector using Lipofectamine[®]2000 transfection protocol as directed by the manufacturer (Invitrogen). Twenty-four hours after transfection, the cells were washed twice with PBS and incubated in fresh medium for another 24 hr before Doxo treatment. One or twenty-four hours post-treatment, the cells were washed with PBS and processed for Western blot analysis and NQO1 enzymatic activity assay.

Western blot analysis

Total cell extracts were prepared by collecting attached and floating cells in 1X cell lysis buffer with phosphatase inhibitor cocktail and protease inhibitor cocktail kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Protein concentration was determined by using the Bradford reagent kit (Bio-Rad) with bovine serum albumin (BSA) as standard. For Western blot analysis, 50 μ g of protein was denatured by heating at 95°C for 5 min in 10% SDS sample buffer, loaded onto 10% SDS-

polyacrylamide gels, and then electrically transferred to a nitrocellulose membrane. The transfer efficiency was assessed by incubation with 0.1% Ponceau solution. The membrane was washed with distilled water until the dye disappeared completely. The membrane was blocked in 5% w/v nonfat dried milk in TBS-T buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 150 mM NaCl, and 0.05% v/v Tween 20) for at least 1 hr at room temperature. After a short washing with TBS-T buffer, the membranes were incubated in the primary antibody for at least 2 hr at room temperature or overnight at 4°C. The primary antibodies were diluted in 5% w/v nonfat dried milk in TBS-T buffer at a dilution range of 1,000-5,000. The primary antibodies were: anti-MDM2, anti-p53, anti-GADPH and anti-β-actin (Santa Cruz Biotechnology), and anti-NQO1 (Abcam). The membranes were then washed three times with TBS-T buffer and then further incubated with the secondary antibody at a dilution range of 2,000-10,000 for 1-2 hr at room temperature. The membranes were washed twice with TBS-T buffer and once with PBS. Anti-β-actin antibody was used to show equal loading of the protein in the Western blot analyses. Protein bands were detected using the ECL[®] system (Amersham Biosciences). The Quantity Image-Pro Plus analyzer software program was used for quantitative densitometric analysis.

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation studies were performed on HCT116 cells with radioimmune precipitation buffer (9.1mM Na₂HPO₄, 1.7mM NaH₂PO₄, 150mM NaCl, pH 7.4, 1% v/v Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 µg/mL phenylmethylsulfonylfluoride, and 1 µg/mL aprotinin). The antibodies used for immunoprecipitation were mouse anti-p53 (FL), rabbit anti-NQO1, and mouse anti-MDM2. One mg of cellular protein was incubated overnight at 4 °C with 2 µg of corresponding antibodies. Then, 20 µL of protein A/G (Santa Cruz Biotechnology) was added to the reaction mixture and the mixture was incubated and rotated for another 2 hr at 4 °C. Immunoprecipitates were collected by centrifugation at 2,500 x g for 5 min, followed by washing three times with radioimmune precipitation buffer. Following the final wash, supernatant was removed. The precipitated samples were then resuspended in the 1X Laemmli buffer, boiled, and subjected to 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis. After electrically transferred to a nitrocellulose membrane, the immunoprecipitated proteins were then detected by Western blotting.

NQO1 activity assay

NQO1 enzymatic activity assay is performed essentially according to a previously described method (Buranrat et al., 2010). Cells were seeded at 7.5×10^3 cells per well in flat-bottomed 96-well cultured plates overnight. After cultured for the designated time, cells were lysed with 50 μ L of 0.8% digitonin and agitated on shaker at room temperature for 10 min. 25 μ L of 0.55% dicoumarol was added into culture wells designated as baseline activity wells while the corresponding paired wells were added with distilled water (DW). After that, all wells were added with 200 μ L of reaction mixture (the following stock solution was prepared for each set of assay: 7.5 mL of 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 100 mg of BSA, 1 mL of 1.5% Tween-20 solution, 0.1 mL of 7.5 mM FAD, 1 mL of 150 mM glucose-6-phosphate, 100 μ L of 50 mM β -NADP, 275 unit of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, 45 mg MTT, and DW to a final volume of 150 mL) containing menadione (1 μ L of 50 mM menadione dissolved in acetonitrile per 1 mL of reaction mixture) was added just before the addition of the reaction mixture into the microtiter plates. A blue color developed and the plates were placed into a microplate reader with filter wavelength of 620 nm and readings were made at 0.5 min interval for about 10 min. The slope of the optical readings with times represents the activity of the reaction. NQO1 activity is the activity of sample subtracted with activity of the corresponding baseline activity. Using the extinction coefficient of MTT formazan of $11,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 610 nm and correction for the light path of the microplate, activity of NQO1 is expressed as $\mu\text{mol/min/mg protein}$.

Cell survival assay

To monitor the clonogenic survival of cells, the clonogenic assay or colony formation assay was used. Briefly, HCT116 cells were trypsinized and plated in triplicate into 6-well plates at density of 100–500 cells/well for overnight. Then, cells were treated with Dic or Doxo or combination for 24 hr. After remove the treatments, cells were further incubated for 15 days. On the last day, cells were washed and stained with crystal violet, and the colonies containing more than 50 cells were counted. Plating efficiency was calculated by dividing the average number of cell colonies per well by the amount of cells plated. Surviving fractions were calculated by normalization to the plating efficiency of appropriate control groups.

To monitor cell viability, trypan blue dye exclusion assay was used. PC3 cells were plated at a density of 10^5 per well in 96-well culture plate for overnight. Then, cells were treated with Dic or Doxo or combination for 24 hr. After treatment, the cells were cultured for another 5 days, stained with a 0.4% trypan blue dye and counted using a counting chamber.

Animals

p53 wild-type mice are in the C57BL/6 background and were initially generated in the laboratory of Dr. Tyler Jacks at the Center for Cancer Research and Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA. Male mice between 10 and 12 weeks old were used in this study. All animal experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Kentucky.

Doxorubicin treatment and tissue collection

Mice were treated with a single dose of 20 mg/kg of Doxorubicin-Adriamycin (Bedford Laboratories, Inc., Bedford, OH) or saline via intraperitoneal injection (IP). Three days after treatment, mice were anesthetized using Nembutal/sodium solution (65 mg/kg) (Abbott Laboratories, North Chicago, IL). The colon and liver were excised and immediately frozen in liquid nitrogen. The Western blot analysis and NQO1 enzymatic activity were determined from the crude homogenates of colon and liver tissue.

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ SEM of three separated experiments. An analysis of variance was used to determine significant differences between each experimental group. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Chemotherapeutic agents induced NQO1 and p53 protein levels with modulating NQO1 enzyme activity

The treatments of chemotherapeutic agents (Doxo and 5-FU) were shown to induce expression of NQO1 and p53 levels in dose-dependent manner, while the MDM2, a negative regulator of p53 were correspondingly decreased. The enzyme activity of NQO1 was increased along with the increase of NQO1 protein levels by Western blotting up to certain levels where the activity was paradoxically decreased. The decreasing activity of NQO1 was associated with the increase of p53 levels. The effect was observed as early as in the first hour and was still present up to 24 h (Figure 1A-C)

Anticancer agents induced p53 and inactivated NQO1 enzyme activity *in vivo*

The effect of Doxo in induction of NQO1, p53 and modulating NQO1 activity were supported by *in vivo* study. P53 wild-type mice were intraperitoneally injected with Doxo (20 mg/kg body weight). Three-days after the treatment, the liver and colon were collected for Western blot analysis and NQO1 activity assay. Doxo increased p53 and NQO1 protein levels, but decreased the specific activity of NQO1 in both liver and colon tissues (Figure 2A-B). These results confirm that chemotherapeutic agent induced p53 and NQO1 protein expression but suppressed the NQO1 enzyme activity both *in vitro* and *in vivo*.

p53 modulated NQO1 enzyme activity

To determine the possible inhibitory effect of p53 on NQO1 enzyme activity, p53-null (p53 $-/-$) PC3 cells were treated with Doxo (0.01, 0.34, 1, and 5 μ M) for 1 and 24 hr (Figure 3A). The result showed that NQO1 enzyme activity was not difference when compared with controls. The important role of p53 in the inhibition

of NQO1 activity was investigated by transduction of p53 expression vectors at variable doses (0.1, 1, and 5 μ g) into PC3 cells. The protein expression of p53 and also NQO1 was examined by Western blot analysis. Expression of p53 cDNA in PC3 cells induced inactivation of NQO1 enzyme activity and the activity was negatively correlated with the amount of p53 cDNA vector (Figure 3B-C). Furthermore, the NQO1 enzyme activity was further suppressed by the treatment with Doxo in PC3 transduced with p53-vector (Figure 3D-E). These results demonstrated that p53 is important for the suppression of NQO1 activity.

Immunoprecipitation of p53 with NQO1

We previously showed that the presence of p53 is essential for suppression NQO1 activity. To investigate the mechanism underlying the inhibitory effects of p53 on NQO1 activity, the immunoprecipitation of proteins of interest were performed in HCT116 cells. Following the immunoprecipitation with NQO1 antibody, there was no presence of MDM2, detected by Western blotting (Figure 4A(a)). This is implied there is no direct physical interaction between MDM2 and NQO1. On the other hand, by using p53 antibody, there was NQO1 and MDM2 co-precipitated with p53 protein (Figure 4A (b)). This suggests an inverse interaction of NQO1 and MDM2 with p53. However, the treatment with Doxo decreased MDM2 co-precipitated with p53, while increased the levels of NQO1.

Furthermore, we tested whether the NQO1 activity inactivation is mediated by p53 expression but not related to MDM2 function. For this purpose, HCT116 cells were pre-treated with MG132 for 30 min and then co-treated with Doxo. The results showed that treatment with MG132 alone increased MDM2 and p53 protein levels by Western blot analysis, however it did not alter NQO1 activity (Figure 4B). Combined MG132 and Doxo caused more increase of p53 protein levels without change of MDM2. At high concentration of MG132, the presence of Doxo suppressed NQO1 activity (Figure 4B).

To further confirm the effect of MDM2 is not mediated NQO1 inactivation, we used immunoprecipitation using antibody against MDM2 followed by Western blot analysis. The results show that MDM2 antibody is not able to immunoprecipitate NQO1 in both treatments; MG132 treated alone and co-treated

with Doxo 1 μ M (Figure 4B (a)). These results suggest that the presence or absence of MDM2 does not contribute significantly to the suppression of NQO1 activity.

Suppression of NQO1 activity required p53 for sensitizing cancer cells to anticancer agents

To verify the role of suppression of NQO1 activity on p53-mediated cell death, cells with p53 wild-type HCT116 and p53-null PC3 cells were treated with combination of NQO1 inhibitor, dicoumarol (Dic; 0.01, 0.1, 1, and 10 μ M) and Doxo (0.1 and 1 μ M) for 24 hr. The NQO1 activity in both cell lines was inhibited by Dic in dose-dependent manner. The concentrations of Dic and Doxo in the study caused only a slightly cytotoxic effect. Combination of Doxo and Dic produced a markedly enhanced cytotoxic effect only in p53 wild-type cells by dose-dependent but not in p53-null cells (Figure 5A (a), 5B (a)).

To further confirmed the essential function of p53 for NQO1-targeting chemosensitization, a NQO1 siRNA transfection was performed in HCT116 cells and PC3 cells. As shown in Figure 5A (b) and 5B (b), NQO1 siRNA suppressed NQO1 protein and enzyme activity in both cell lines. Combination of NQO1 knockdown and Doxo enhanced cell death resulting in decrease of cell viability only in HCT 116 cells but not in PC3 cells (Figure 5A (c), 5B (c))

Discussion

NQO1 is an important survival factor essential for protecting the cells from cytotoxicity via its enzymatic activity. Many cancer cells exhibit high level of NQO1 which protects the cells from apoptotic death. Inhibition of NQO1 results in potentiation of cytotoxic effect of various anticancer agents (Buranrat et al., 2010; Madari et al., 2003; Matsui et al., 2010; Nolan et al., 2010). The chemosensitizing effect by inhibition of NQO1 has been suggested to be associated with increased p53 expression (Buranrat et al., 2010). Our results suggest that anticancer agents induced NQO1 as well as p53 protein expression. The increasing p53 levels were inversely inhibited NQO1 activity. However, suppression of NQO1 by pharmacological inhibitor or by knockdown of NQO1 expression as well as the presence of p53 are required to obtain chemosensitizing effect.

Treatment with stressors such as anticancer agents, Doxo and 5-FU, induce NQO1 expression as a part of adaptive for survival response to cope with stress conditions (Han et al., 2008; Tew et al., 1998; Zhu et al., 2009). Expression of p53 is also well known as a response to DNA and cell damage (Asharani et al., 2010; Luo and Levenson, 2005; Sharpless and DePinho, 2002; Shen and White, 2001). However, the intrigue is while NQO1 protein levels detected by Western blotting were increased by dose of Doxo, the specific activity of NQO1 was paradoxically decreased. Moreover, the decreased NQO1 activity was associated with the increase of p53 levels. This phenomenon is not unique to Doxo, as 5-FU could also induce the same effect. We did not examine whether the induced NQO1 protein has any structural change resulting in decrease of enzyme specific activity.

MDM2 is a negative regulator of p53 by interacting with p53 and mediated p53 ubiquitination and proteasomal degradation (Bianco et al., 2005; Pei et al., 2012; Zhao et al., 2006; Zheleva et al., 2003). DNA damage induces phosphorylation of p53 and MDM2, thereby preventing their interaction and stabilizing p53 (Colman et al., 2000; Jabbur et al., 2000; Unger et al., 1999). Our finding is consistent with that MDM2 was decreased while p53 was increased. The association of p53 with NQO1 activity was verified by transduction of p53 expression vector in p53-null PC3 cells. It is quite clear that the presence of p53 is causally related to suppression of NQO1 activity, whereas the increasing amount of p53 is directly related to more suppression of NQO1 activity.

The association of p53 and NQO1 was further examined by immunoprecipitation assay. It is apparent that NQO1 physically interacts with p53, where there was no direct interaction between NQO1 and MDM2. It is probable that the physical interaction of NQO1 and p53 resulting in suppression of NQO1 activity. In this context, it is apparent that DNA damage induces increased levels of NQO1 and p53 partly by mutual stabilizing each other by the physical interaction. Previous studies had shown that NQO1 plays important role to stabilize p53, as inhibition of NQO1 decreased p53 levels (Asher et al., 2001; Asher et al., 2002). However, our recent study using dicoumarol and current study using siRNA revealed that inhibition of NQO1 activity was associated with increased p53 levels. Importantly, the almost complete inhibition of NQO1 was carried out by Dic at subcytotoxic concentrations (Buranrat et al., 2010). Current study suggests that p53 and NQO1 could be co-existed by induction of anticancer agents.

Present study is clearly demonstrated that p53 is mandatory for the chemosensitizing effect by NQO1 inhibition, as there was no chemosensitizing effect in p53-null PC3 cells, no matter the inhibition of NQO1 was performed by Dic or by NQO1 knockdown using siRNA. The downstream effects of p53 activation leading to cell death are multifaceted (Bhushan et al., 2009; Kurata et al., 2008; Weller, 1998). P53 mediated via Bcl2 protein in mitochondria and in cytosol with induction of intrinsic and extrinsic cell death. Inhibition of cell cycle progression is also mediated by p53 via various proteins such as p21 (Bhushan et al., 2009; Jabbur et al., 2000). Moreover, the increased levels of p53 after treatment with cytotoxic agents which causes suppression of NQO1 activity may partly contribute to enhance the cytotoxic effect of anticancer agents, in that, p53 inhibits the adaptive for survival response of NQO1.

In summary, the treatment of anticancer agents induces NQO1 and p53 protein expression. The increased p53 protein is physically interacted with NQO1 and probably inhibits NQO1 activity. Since NQO1 plays role in cytoprotective effect in the cells, the inhibited NQO1 activity by p53 may contribute to the enhanced cytotoxicity. Inhibition of NQO1 and presence of p53 were required for the chemosensitizing effect.

Conclusions

In summary, NQO1 plays an important role in cytoprotection of cancer cells and modulates the sensitivity of chemotherapeutic agents, particularly in the high NQO1 expressing CCA cells. NQO1 is a potential molecular target for enhancing the antitumor activity of chemotherapeutic agents.

Figures

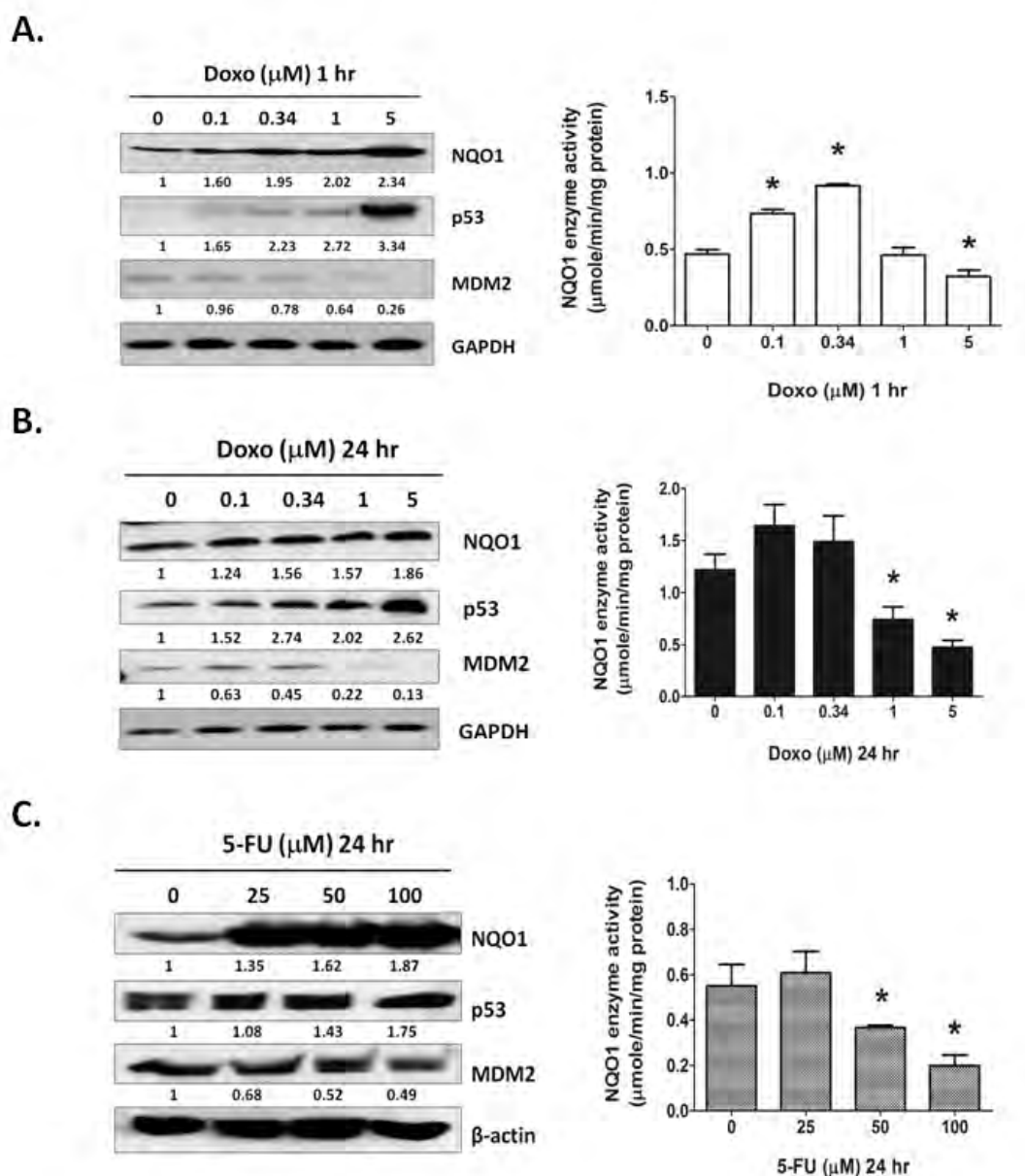


Figure 1 Chemotherapeutic agents induced NQO1 and p53 protein levels and modulated NQO1 enzyme activity. A-B, Effect of Doxo (0.1, 0.34, 1, and 5 μM) on expression of NQO1, p53, and MDM2 protein in HCT116 cells for 1 (A) and 24 hr (B). Protein expression was determined by Western blot analysis using GAPDH as a loading control. C, Effect of 5-FU (25, 50, and 100 μM) on expression of NQO1, p53, MDM2, and β -actin (as a loading control) protein levels and NQO1 enzyme activity. at 24 hr. The NQO1 enzyme activity was analyzed by enzymatic methods. Data represent mean $\pm$ SEM, each from three experiments * $p < 0.05$ vs. the untreated control.

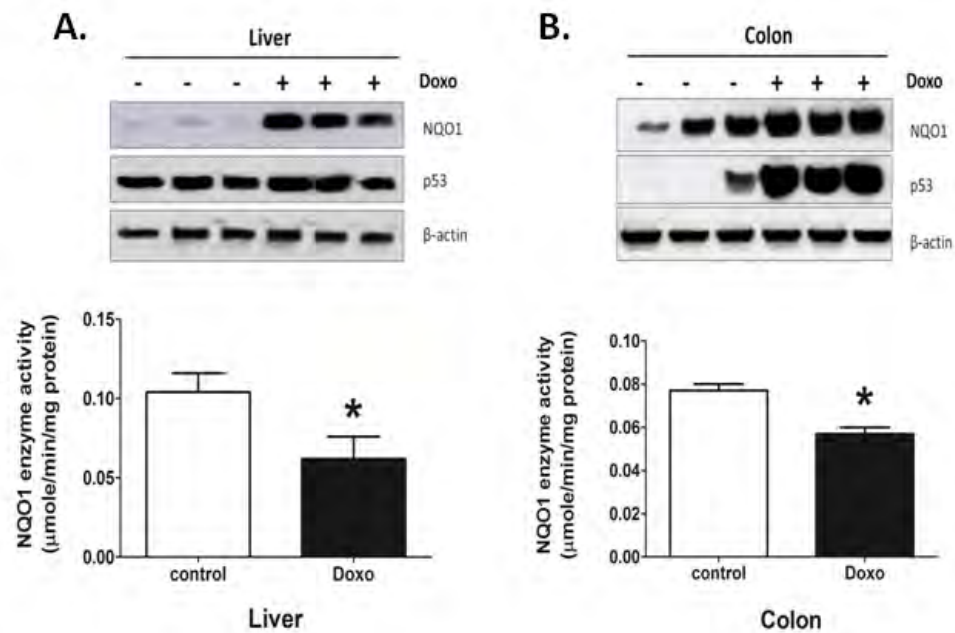


Figure 2 *In vivo* effects of Doxo on NQO1, p53 protein expression and NQO1 enzyme activity. p53 wild-type mice were treated with a single dose of 20 mg/kg of Doxo. Three-days after treatment, the liver (A) and colon (B) were collected. NQO1, p53, and β-actin protein levels were determined by Western blot analysis and NQO1 enzyme activity was analyzed by enzymatic method. Data represent mean ± SEM of three animals in each group. * $p < 0.05$ vs. the untreated control.

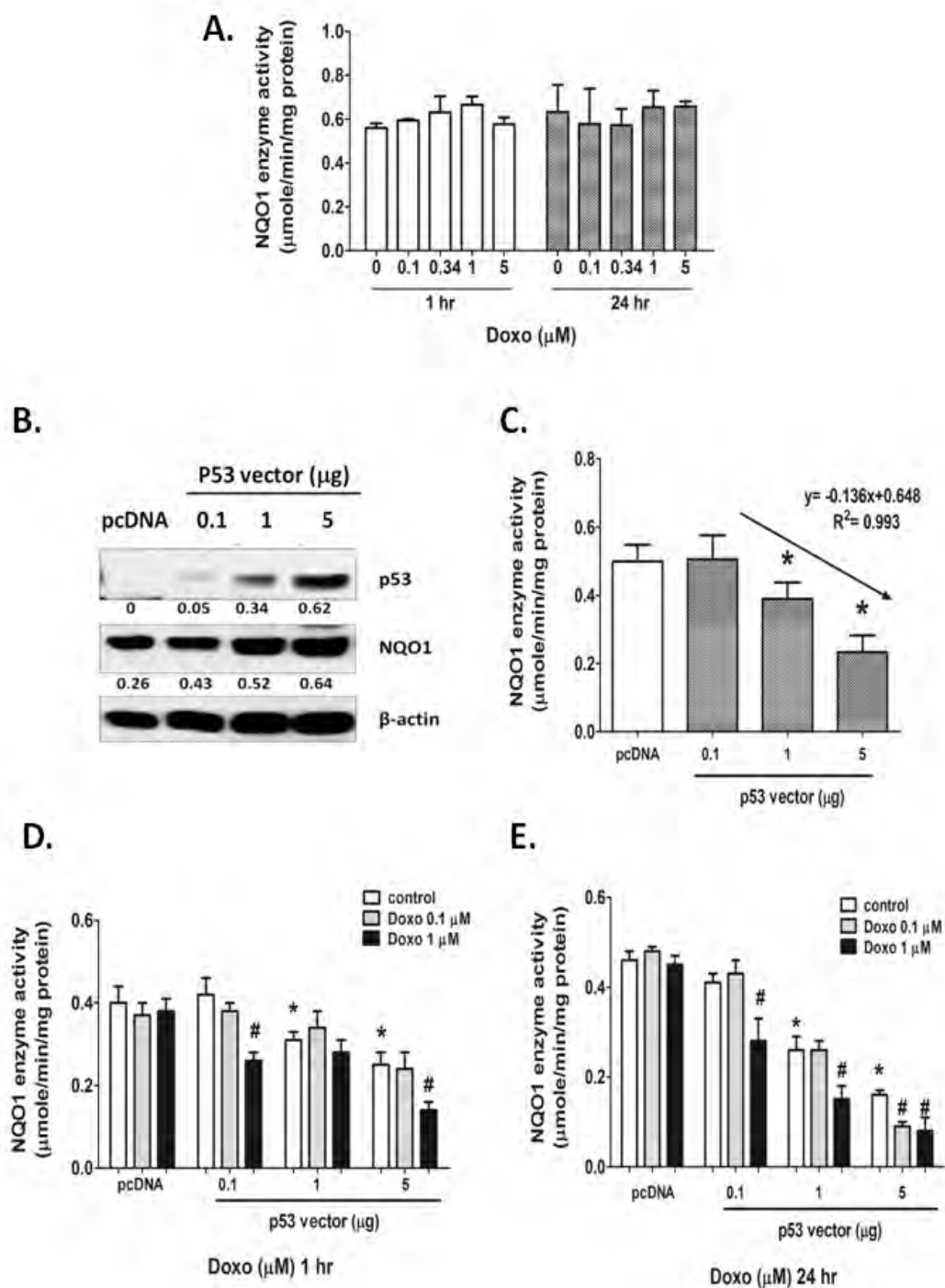


Figure 3 A, Effect of Doxo on NQO1 enzyme activity in p53-null PC3 cells. Cells were exposed to Doxo (0.1, 0.34, 1, and 5 μM) for 1 and 24 hr. The NQO1 activity was evaluated by enzymatic assay. B-C, Effect of over-expression of p53 on NQO1 enzyme activity. p53 vector (0.1, 1, and 5 μg) or pcDNA as a control vector was transfected to PC3 cells for 24 hr using lipofectamineTM 2000. After transfection, the whole cells were collected for Western blot analysis and NQO1 enzyme activity.

D-E, Effect of Doxo on NQO1 enzyme activity in p53 transfected PC3 cells. After transfection, PC3 cells were treated with Doxo (0.1 or 1 μ M) for 1 and 24 hr. Data represent mean $\pm$ SEM, each from three experiments. * p <0.05 vs. the untreated control; # p <0.05 vs. the corresponding treated control.

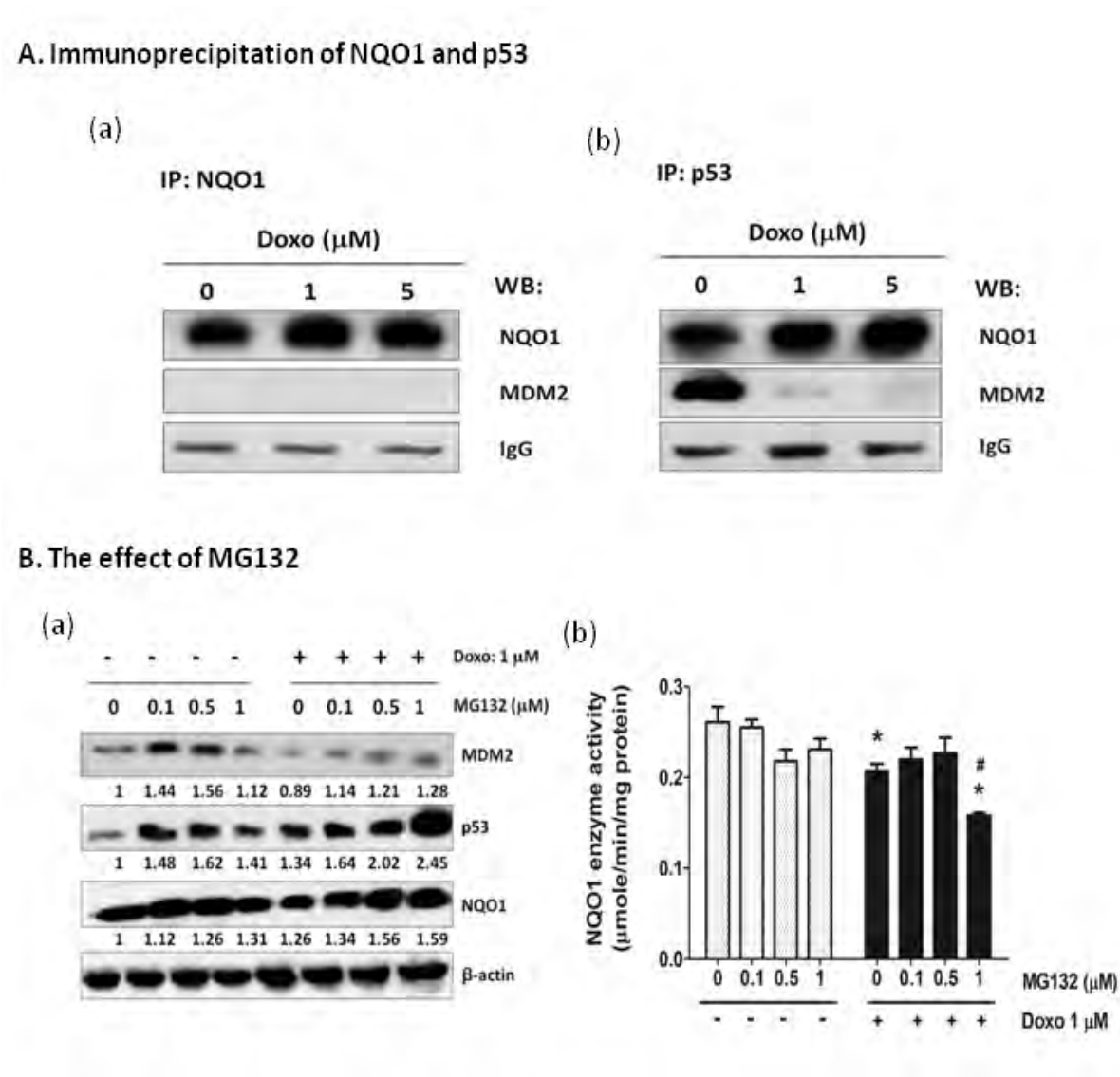
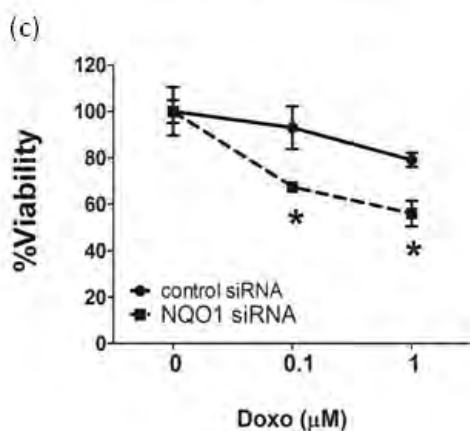
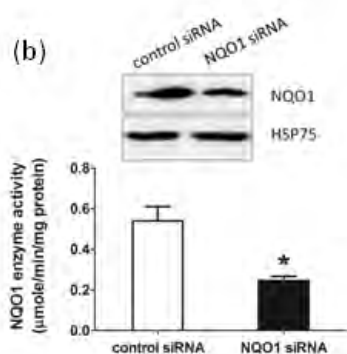
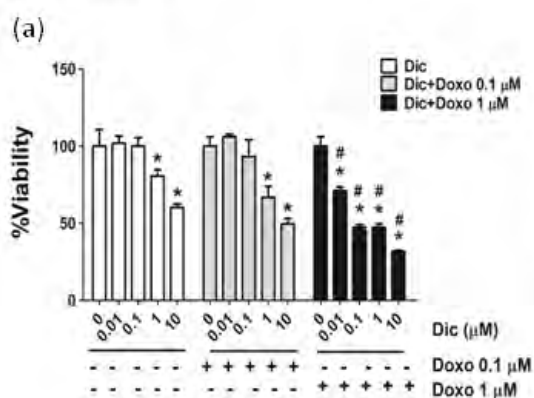


Figure 4 A, There was no direct physical interaction between MDM2 and NQO1 (a) while NQO1 and MDM2 were co-precipitated with p53 protein (b). HCT116 cells were treated with Doxo (1 and 5 μ M) for 1 hr. Immunoprecipitation analysis was used to detect interaction of p53, MDM2 and NQO1 protein. Immunoprecipitation with IgG was shown as control. B, Effect of proteasome inhibitor (MG132) on p53, MDM2, and NQO1 protein and NQO1 enzyme activity.

HCT116 cells were pre-treated with MG132 (0.1, 0.5, and 1 μ M) for 30 min and then co-treated with Doxo 1 μ M. Twenty-four hours after treatment, cells were collected for Western blot analysis of MDM2, p53, NQO1, and β -actin (as a loading control) protein. Cells were also determined for NQO1 enzyme activity. Data represent mean $\pm$ SEM, each from three experiments. * p <0.05 vs. the control; # p <0.05 vs. the corresponding treated control.

A. HCT116 cells



B. PC3 cells

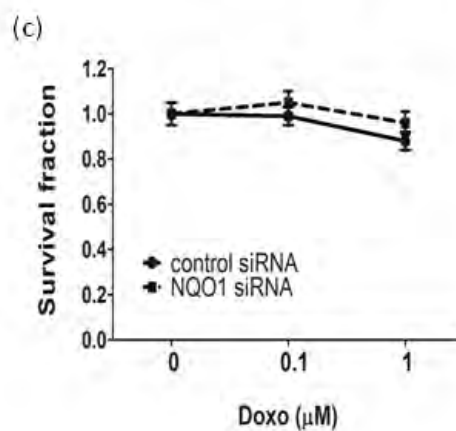
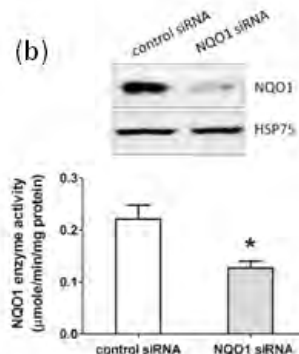
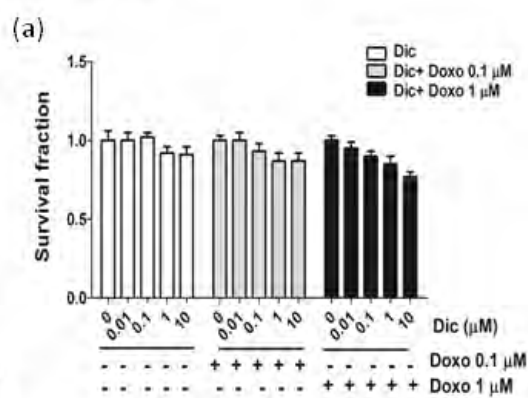


Figure 5 Suppression of NQO1 activity needed p53 to sensitize cell death. A, Suppression of NQO1 enhanced cytotoxic effect of Doxo in p53 wild-type HCT116 cells. (a), HCT116 cells were treated with Dic (0.01, 0.1, 1, and 10 μ M) or combined Dic and Doxo (0.1 and 1 μ M) for 24 hr. Clonogenic survival of cells was evaluated by colony formation assay. (b-c), HCT116 cells were transfected with either control siRNA (0.4 nM) or NQO1 siRNA (0.4 nM) for 48 hr followed by Doxo treatment (0.1 and 1 μ M). Efficiency of siRNA transfection was confirmed by Western blot analysis and NQO1 enzymatic assay (b). Twenty-four hours after Doxo treatment, the clonogenic survival of cells was evaluated by colony formation assay (c). B, Suppression of NQO1 did not enhance cytotoxic effect of Doxo in p53-null PC3 cells. (a), PC3 cells were treated with Dic or combined Dic and Doxo similar to HCT116 cells. The cell viability was evaluated by trypan blue dye exclusion assay. (b-c), similar siRNA transfection experiments were performed in p53-null PC3 cells. PC3 cells were transfected with either control siRNA or NQO1 siRNA followed by Doxo treatment. Efficiency of siRNA transfection was confirmed by Western blot analysis and NQO1 enzymatic assay (b). Twenty-four hours after Doxo treatment, the cell viability was evaluated by trypan blue dye exclusion assay (c). Data represent mean $\pm$ SEM, each from three experiments. * p <0.05 vs. the control; # p <0.05 vs. the corresponding treated control.

Abbreviations

NQO1: NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1; CCA: Cholangiocarcinoma; 5-FU: 5-fluorouracil; Doxo: doxorubicin; Gem: gemcitabine; siRNA: small interfering RNA; SRB: sulforhodamine B; p53: tumor protein 53.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

Conceived and designed: PZ AP VK. Performed the experiments: PZ AP LS BS. Analyzed the data: PZ AP VK. Wrote the paper: PZ AP VK.

Acknowledgments

This work was supported by the Thailand Research Fund (RMU5380027), the National Research University Project and the Office of Higher Education Commission through SHeP-GMS of Khon Kaen University, the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, grant-in-aid from Faculty of Medicine (I 56108), Khon Kaen University, and a scholarship from the Office of the Higher Education Commission to Ponsilp Zeekpudsa. Valuable suggestions on the manuscript of Prof. Yukifumi Nawa of Faculty of Medicine, Khon Kaen University are gratefully acknowledged.

References

1. Ross, D., Kepa, J. K., Winski, S. L., Beall, H. D., Anwar, A., and Siegel, D. (2000) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact* **129**, 77-97.
2. Ross, D., and Siegel, D. (2004) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods Enzymol* **382**, 115-144.
3. Siegel, D., Gustafson, D. L., Dehn, D. L., Han, J. Y., Boonchoong, P., Berliner, L. J., and Ross, D. (2004) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol* **65**, 1238-1247.
4. Begleiter, A., Hewitt, D., Maksymiuk, A. W., Ross, D. A., and Bird, R. P. (2006) A NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 polymorphism is a risk factor for human colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**, 2422-2426.
5. Siegel, D., Yan, C., and Ross, D. (2012) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem Pharmacol* **83**, 1033-1040.
6. Sutton, K. M., Doucette, C. D., and Hoskin, D. W. (2012) NADPH quinone oxidoreductase 1 mediates breast cancer cell resistance to thymoquinone-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **426**, 421-426.
7. Wang, X. J., Sun, Z., Villeneuve, N. F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X., Zheng, W., Wondrak, G. T., Wong, P. K., and Zhang, D. D. (2008)

Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* **29**, 1235-1243.

8. Danson, S., Ward, T. H., Butler, J., and Ranson, M. (2004) DT-diaphorase: a target for new anticancer drugs. *Cancer Treat Rev* **30**, 437-449.
9. Buranrat, B., Chau-In, S., Prawan, A., Puapairoj, A., Zeekpudsa, P., and Kukongviriyapan, V. (2012) NQO1 Expression Correlates with Cholangiocarcinoma Prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev* **13 Suppl**, 131-136.
10. Buranrat, B., Prawan, A., Kukongviriyapan, U., Kongpetch, S., and Kukongviriyapan, V. (2010) Dicoumarol enhances gemcitabine-induced cytotoxicity in high NQO1-expressing cholangiocarcinoma cells. *World J Gastroenterol* **16**, 2362-2370.
11. Matsui, Y., Watanabe, J., Ding, S., Nishizawa, K., Kajita, Y., Ichioka, K., Saito, R., Kobayashi, T., Ogawa, O., and Nishiyama, H. (2010) Dicoumarol enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in p53 wild-type urothelial cancer cells through p38 activation. *BJU Int* **105**, 558-564.
12. Cross, J. V., Deak, J. C., Rich, E. A., Qian, Y., Lewis, M., Parrott, L. A., Mochida, K., Gustafson, D., Vande Pol, S., and Templeton, D. J. (1999) Quinone reductase inhibitors block SAPK/JNK and NFkappaB pathways and potentiate apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 31150-31154.
13. Chappell, W. H., Lehmann, B. D., Terrian, D. M., Abrams, S. L., Steelman, L. S., and McCubrey, J. A. (2012) p53 expression controls prostate cancer sensitivity to chemotherapy and the MDM2 inhibitor Nutlin-3. *Cell Cycle* **11**, 4579-4588.
14. Chee, J. L., Saidin, S., Lane, D. P., Leong, S. M., Noll, J. E., Neilsen, P. M., Phua, Y. T., Gabra, H., and Lim, T. M. (2012) Wild-type and mutant p53 mediate cisplatin resistance through interaction and inhibition of active caspase-9. *Cell Cycle* **12**, 278-288.
15. Velez, J. M., Miriyala, S., Nithipongvanitch, R., Noel, T., Plabplueng, C. D., Oberley, T., Jungsuwadee, P., Van Remmen, H., Vore, M., and St Clair, D. K. (2011) p53 Regulates oxidative stress-mediated retrograde signaling: a novel mechanism for chemotherapy-induced cardiac injury. *PLoS One* **6**, e18005.
16. Madari, H., Panda, D., Wilson, L., and Jacobs, R. S. (2003) Dicoumarol: a unique microtubule stabilizing natural product that is synergistic with Taxol. *Cancer Res* **63**, 1214-1220.

17. Nolan, K. A., Scott, K. A., Barnes, J., Doncaster, J., Whitehead, R. C., and Stratford, I. J. (2010) Pharmacological inhibitors of NAD(P)H quinone oxidoreductase, NQO1: structure/activity relationships and functional activity in tumour cells. *Biochem Pharmacol* **80**, 977-981.
18. Zhu, H., Jia, Z., Zhou, K., Misra, H. P., Santo, A., Gabrielson, K. L., and Li, Y. (2009) Cruciferous dithiolethione-mediated coordinated induction of total cellular and mitochondrial antioxidants and phase 2 enzymes in human primary cardiomyocytes: cytoprotection against oxidative/electrophilic stress and doxorubicin toxicity. *Exp Biol Med (Maywood)* **234**, 418-429.
19. Han, X., Pan, J., Ren, D., Cheng, Y., Fan, P., and Lou, H. (2008) Naringenin-7-O-glucoside protects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by induction of endogenous antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol* **46**, 3140-3146.
20. Tew, K. D., O'Brien, M., Laing, N. M., and Shen, H. (1998) Coordinate changes in expression of protective genes in drug-resistant cells. *Chem Biol Interact* **111-112**, 199-211.
21. Asharani, P. V., Xinyi, N., Hande, M. P., and Valiyaveetil, S. (2010) DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* **5**, 51-64.
22. Luo, Y., and Levenson, J. D. (2005) New opportunities in chemosensitization and radiosensitization: modulating the DNA-damage response. *Expert Rev Anticancer Ther* **5**, 333-342.
23. Sharpless, N. E., and DePinho, R. A. (2002) p53: good cop/bad cop. *Cell* **110**, 9-12.
24. Shen, Y., and White, E. (2001) p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res* **82**, 55-84.
25. Pei, D., Zhang, Y., and Zheng, J. (2012) Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx. *Oncotarget* **3**, 228-235.
26. Zhao, B. X., Chen, H. Z., Lei, N. Z., Li, G. D., Zhao, W. X., Zhan, Y. Y., Liu, B., Lin, S. C., and Wu, Q. (2006) p53 mediates the negative regulation of MDM2 by orphan receptor TR3. *EMBO J* **25**, 5703-5715.
27. Bianco, R., Ciardiello, F., and Tortora, G. (2005) Chemosensitization by antisense oligonucleotides targeting MDM2. *Curr Cancer Drug Targets* **5**, 51-56.

28. Zheleva, D. I., Lane, D. P., and Fischer, P. M. (2003) The p53-Mdm2 pathway: targets for the development of new anticancer therapeutics. *Mini Rev Med Chem* **3**, 257-270.
29. Jabbur, J. R., Huang, P., and Zhang, W. (2000) DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and Mdm-2 induction in vivo. *Oncogene* **19**, 6203-6208.
30. Colman, M. S., Afshari, C. A., and Barrett, J. C. (2000) Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat Res* **462**, 179-188.
31. Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E., Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M., and Haupt, Y. (1999) Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J* **18**, 1805-1814.
32. Asher, G., Lotem, J., Cohen, B., Sachs, L., and Shaul, Y. (2001) Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1188-1193.
33. Asher, G., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L., and Shaul, Y. (2002) NQO1 stabilizes p53 through a distinct pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3099-3104.
34. Bhushan, S., Malik, F., Kumar, A., Isher, H. K., Kaur, I. P., Taneja, S. C., and Singh, J. (2009) Activation of p53/p21/PUMA alliance and disruption of PI-3/Akt in multimodal targeting of apoptotic signaling cascades in cervical cancer cells by a pentacyclic triterpenediol from *Boswellia serrata*. *Mol Carcinog* **48**, 1093-1108.
35. Kurata, K., Yanagisawa, R., Ohira, M., Kitagawa, M., Nakagawara, A., and Kamijo, T. (2008) Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa upregulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. *Oncogene* **27**, 741-754.
36. Weller, M. (1998) Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. *Cell Tissue Res* **292**, 435-445.