



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลกระทบของสารสำคัญจากส่องฟ้าต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตาย
ของเซลล์มะเร็งลำไส้ด้วยเทรล

โดย

ผศ.ดร.พรทิพย์ ไวกูม

มิถุนายน 2559

สัญญาเลขที่ TRG5780035

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลกระทบของสารสำคัญจากส่องฟ้าต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตาย
ของเซลล์มะเร็งลำไส้ด้วยเทรล

ผศ.ดร.พรทิพย์ ไวกูม

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5780035
 ชื่อโครงการ: ผลกระตุ้นของสารสำคัญจากสองฟ้าต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ด้วยเทรล
 ชื่อนักวิจัย: ผศ.ดร.พรทิพย์ ไวกูณ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
 E-mail Address : pwaiwut79@yahoo.com, porntip.w@ubu.ac.th
 ระยะเวลาโครงการ : 2 มิถุนายน พ.ศ. 2557 ถึงวันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2559

เทรล (TRAIL, TNF-related apoptosis inducing ligand) เป็นไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสอย่างจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งแต่ไม่ทำลายเซลล์ปกติ ดังนั้นจึงมีการนำเทรลมาใช้ศึกษาวิจัยในการรักษามะเร็ง อย่างไรก็ตามพบว่ายังมีเซลล์มะเร็งหลายชนิดที่ต่อต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายด้วยเทรล เพื่อหาแนวทางในการพัฒนายาต้านมะเร็งที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสำคัญจากพืชสมุนไพรพื้นบ้าน คือ สองฟ้า (*Clausena harmandiana*) โดยใช้สารสำคัญสองกลุ่มคือ คูมาริน ได้แก่ dentatin และ nordentatin และสารกลุ่ม คาร์บาโซล ได้แก่ heptaphyllin และ 7-methoxyheptaphylline ต่อการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT29) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเทรล การทดสอบผลของสารสำคัญต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ HT29 และ เซลล์ลำไส้ปกติ (FHC colon normal cells) วัดด้วยวิธี MTT assay หลังจากนั้นศึกษารูปร่างเซลล์และลักษณะการตายของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast microscope มียา doxorubicin เป็นสารมาตรฐาน สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของสารสำคัญได้มีการวัดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสด้วยวิธี Western blotting และศึกษาการแสดงออกของ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR และ Real time RT-PCR ผลการทดลองพบว่าสารสำคัญ dentatin nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งลำไส้ HT29 ได้ตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นโดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (FHC cells) ในขณะที่ heptaphyllin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติแต่ทำให้เซลล์ตายต่ำกว่าร้อยละห้าสิบของเซลล์ที่มีชีวิต และจากการทดลองพบว่า heptaphyllin ในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ผ่าน intrinsic pathway เมื่อทำการทดลองโดยใช้ dentatin และ heptaphyllin ร่วม TRAIL ในการเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งลำไส้ให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส พบว่า dentatin และ heptaphyllin ไม่มีผลที่มีนัยสำคัญต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของ HT29 ด้วย TRAIL แต่เมื่อเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งลำไส้ด้วย nordentatin และ 7-methoxyheptaphyllin ร่วมกับ TRAIL พบว่าสามารถเพิ่มการตายของเซลล์มะเร็งด้วยการเพิ่มการกระตุ้น cleavage ของ caspase-3 และ PARP-1 ซึ่งเป็น marker ของ apoptosis มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในการศึกษากลไกของ nordentatin และ 7-methoxyheptaphyllin ร่วมกับ TRAIL ต่อการตายของ HT-29 cells พบว่า nordentatin และ 7-methoxyheptaphyllin สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ TRAIL receptor หรือ death receptor 5 (DR5) mRNA และ protein สูงขึ้นโดยมีกลไกผ่านวิถีของ JNK งานวิจัยนี้ค้นพบว่าสารสำคัญจากสองฟ้าคือ 7-methoxyheptaphyllin และ nordentatin มีฤทธิ์ในการเพิ่มความไวของเซลล์มะเร็งลำไส้ต่อการเหนี่ยวนำด้วย TRAIL ด้วยการกระตุ้นการแสดงออกของ DR5 โดยมีกลไกผ่านวิถี JNK

Keywords: สองฟ้า เทรล ดีอาร์-5 คูมาริน คาร์บาโซล

Abstract

Project Code : TRG5780035

Project Title : Sensitizing Effects of Active Constituents of *Clausena harmandiana* on TRAIL-mediated Colorectal Adenocarcinoma Cells Death

Investigator : Pornthip Waiwut, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University

E-mail Address : pwaiwut79@yahoo.com, porntip.w@ubu.ac.th

Project Period : 2 June 2014 to 1 June 2016

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) is a cytokine that can selectively induce apoptosis in cancer cells without damaging normal cells. Regarding current research finding, a number of cancer cells are resistant to TRAIL-induced apoptosis. This study was designed to investigate the molecular mechanisms of antitumor activity of active constituents of Songfa (*Clausena harmandiana*), including two coumarin based compounds (dentatin and nordentatin) and two carbazole based compounds (heptaphyllin and 7-methoxyheptaphylline). The molecular mechanisms of antitumor activities of these compounds in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) were investigated in HT29 colorectal adenocarcinoma cells. The quantification of cell viability was performed by using cell proliferation assay (MTT assay) and the cell morphology was investigated by phase contrast microscope. The molecular mechanisms were studied by Western blotting, RT-PCR and Real time RT-PCR. The results showed that dentatine, nordentatine and 7-methoxyheptaphylline induced cancer cell death in concentration dependent manner without cytotoxic effect to normal colon FHC cells, while heptaphylline showed cytotoxicity to normal cells but not lower than 50% cell viability. Heptaphylline alone induced apoptosis of cancer cells via intrinsic pathway. In combination with TRAIL, dentatin and heptaphylline had no significantly effects to TRAIL-induced HT-29 cell death. While, the cleavage of caspase-3 and PARP-1 were increased when combined nordentatin and 7-methoxyheptaphylline with TRAIL. The investigation of mechanism of nordentatin and 7-methoxyheptaphylline combined with TRAIL on HT-29 cells found that nordentatin and 7-methoxyheptaphylline increased TRAIL receptor, death receptor 5 (DR5) mRNA and protein through JNK pathway. The findings suggested that 7-methoxyheptaphylline and nordentatin of Songfa (*Clausena harmandiana*) sensitized TRAIL-induced human colon adenocarcinoma cell death by increasing expression of DR5 via the JNK pathway.

Keywords: *Clausena harmandiana*, TRAIL, DR-5, coumarin, carbazole

1. บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ปัจจุบันมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในโลกและในทุกภูมิภาคของประเทศไทยเนื่องจากเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยและการตายในอันดับต้นๆ และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ มะเร็งเกิดจากการเจริญเติบโตอย่างไร้การควบคุมของเซลล์ส่งผลทำให้เซลล์เจริญอย่างรวดเร็วและขยายจำนวนจนสามารถรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นได้ ยารักษามะเร็งที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายชนิดที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แต่ยังมีข้อเสียคือเกิดผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติ การคิดค้นยาต้านมะเร็งที่มีฤทธิ์จำเพาะกับเซลล์มะเร็งโดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการหาแนวทางการรักษามะเร็งให้ประสบความสำเร็จ มีรายงานพบว่า เทรล (TRAIL, TNF-related apoptosis inducing ligand) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่สามารถออกฤทธิ์จำเพาะกับเซลล์มะเร็งโดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ เนื่องจากบนผิวเซลล์มะเร็งมีตัวรับที่จำเพาะกับ TRAIL คือ DR5 (death receptor 5) ซึ่งจะแสดงออกเฉพาะในเซลล์มะเร็งแต่ไม่แสดงออกในเซลล์ปกติ อย่างไรก็ตามพบว่ายังมีเซลล์มะเร็งอีกหลายชนิดที่ต่อต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ด้วย TRAIL ดังนั้นการหาสารที่ช่วยทำให้เซลล์มะเร็งไวต่อการเหนี่ยวนำด้วย TRAIL จึงมีความสำคัญในการหาหาที่ใช้ร่วมกับเทรลเพื่อเพิ่มเพิ่มฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายอย่างจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง รายงานวิจัยหลายเรื่องพบว่าพืชสมุนไพรหลายชนิดเป็นแหล่งของยาต้านมะเร็งที่สำคัญ

สองฟ้า (*Clausena harmandiana*) เป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณทางยาหลายชนิด เช่น แก้ปวดหัว แก้ปวดท้อง และแก้ไข้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา คือต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อรา ต้าน HIV และต้านมะเร็ง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากสองฟ้าต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งด้วย TRAIL ในขั้นแรกของการทดลองเป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญจากสองฟ้า (สารกลุ่ม coumarin ได้แก่ dentatin และ nordentatin และสารกลุ่ม carbazole ได้แก่ heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline) ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ลำไส้ปกติ (FHC colon normal cells) และศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญจากสองฟ้าต่อการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT29) และเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเทรล (TRAIL) ผลการวิจัยพบว่า เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสำคัญจากสองฟ้าทั้ง 4 ชนิดใน FHC colon normal cell สาร dentatin nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ในขณะที่ heptaphylline แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติแต่ไม่ทำให้เซลล์ตายเกิน 50 % สำหรับผลการทดลองในเซลล์มะเร็งพบว่าสารกลุ่ม coumarin ทั้ง dentatine และ nordentatine มีผลทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ตายตามความเข้มข้นที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับสารกลุ่ม carbazole ได้แก่ heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline พบว่าทั้ง heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline แสดงเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้โดย heptaphylline มีฤทธิ์สูงกว่า 7-methoxyheptaphylline แต่เมื่อใช้ร่วมกับ TRAIL พบว่า dentatin และ heptaphylline ไม่มีผลเสริมฤทธิ์ TRAIL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ ในขณะที่ nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline สามารถเพิ่มอัตราการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้อย่างชัดเจนและมีนัยสำคัญเมื่อใช้ร่วมกับ TRAIL ในการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากสองฟ้าในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ถูกเหนี่ยวนำ ด้วย TRAIL ผลการศึกษาสารกลุ่ม coumarin พบว่าเมื่อบ่มเซลล์ด้วย nordentatin ร่วมกับ TRAIL มีผลเพิ่มการกระตุ้นการตัดโปรตีน caspase-3 และ PARP-1 ซึ่งเป็นสัญญาณที่สำคัญของกระบวนการอะพอพโทซิส ผ่านการกระตุ้นโปรตีน Bid และยับยั้ง c-FLIP ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็น inhibitor ของ DR5 สำหรับ dentatin พบว่าไม่มีผลต่อ caspase-3 และ PARP-1 สำหรับสารกลุ่ม carbazole พบว่าเมื่อบ่มเซลล์ด้วย heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline เพียงอย่างเดียว มีผลกระตุ้นการตัดโปรตีน caspase-3 ได้โดย heptaphylline มีฤทธิ์ดีกว่า 7-methoxyheptaphylline และเมื่อศึกษาการออกฤทธิ์เพิ่มเติมพบว่า heptaphylline ทำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสของเซลล์ผ่าน intrinsic pathway โดยการกระตุ้นโปรตีน Bid และยับยั้งการส่งสัญญาณผ่าน Akt และ NF-KB (p65) และเมื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของของสาร nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ด้วย TRAIL พบว่าสารทั้งสองชนิดมีผลเหนี่ยวนำการแสดงออกของตัวรับของ TRAIL คือ DR5 ทั้ง mRNA และโปรตีนผ่านวิถี JNK จึงสรุปได้ว่าสารสำคัญจากสองฟ้าคือ nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline มีผลในการเพิ่มฤทธิ์ของ TRAIL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง HT-29 ด้วยการกระตุ้นการแสดงออกของ DR5 ผ่านวิถี JNK

2. บทนำ

โรคมะเร็งสามารถเกิดขึ้นได้กับทุกอวัยวะในร่างกาย โดยเซลล์มะเร็งจะมีลักษณะพิเศษที่แตกต่างจากเซลล์ปกติทั่วไป คือมีการเจริญเติบโตที่ไม่สามารถควบคุมได้ (Uncontrolled growth) ทำให้มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและ และการยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) การเจริญนี้มักลุกลามไปยังเนื้อเยื่อที่อยู่บริเวณข้างเคียง (Tissue invasion) หรือสามารถแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆที่อยู่ไกลออกไป (Metastasis) นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังมีความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) เพื่อนำสารอาหารมาเลี้ยงเซลล์อีกด้วย ปัจจุบันโรคมะเร็งถือเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญระดับโลก ซึ่งจากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก พบว่ามีผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่สูงถึง 14.1 ล้านคนในปี 2555 และในปีเดียวกันมีผู้ป่วยสูงถึง 8.2 ล้านคนที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง สำหรับประเทศไทยพบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุอันดับหนึ่งของการเสียชีวิตในประชากรเมื่อปี พ.ศ. 2553 ถึง ปี 2555 และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆในแต่ละปี (สำนักนโยบายและแผนยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข, 2556) การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธี ไม่ว่าจะเป็นการผ่าตัด การฉายรังสี การใช้ฮอร์โมน หรือการใช้ยาเคมีบำบัดในการรักษา ซึ่งยาเคมีบำบัดที่ใช้ในปัจจุบันนั้นมีด้วยกันหลายประเภท แต่ไม่ว่าประเภทใดก็ตาม ยาเหล่านี้มีข้อจำกัดในการใช้ที่คล้ายกันคือนอกจากยาจะมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งแล้วยังสามารถทำลายเซลล์ปกติได้ ส่งผลให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์อื่นๆ ตามมา เช่น ยากดการทำงานของไขกระดูก เป็นต้น ดังนั้นแนวโน้มการพัฒนาเคมีบำบัดในปัจจุบันจึงมุ่งไปที่การคิดค้นยาใหม่หรือพัฒนาเคมีบำบัดเดิมให้มีความจำเพาะเจาะจงในการทำลายเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้นโดยไม่ทำลายเซลล์ปกติ โดยมีเป้าหมายการรักษาในวิธีการส่งสัญญาณในกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ เพื่อยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์และเร่งกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ สารที่สามารถกระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิสจึงเป็นที่สนใจในการนำมาใช้ทดแทนยาต้านมะเร็ง (Hanahan D, Weinberg RA., 2000, Hanahan D, Weinberg RA., 2011)

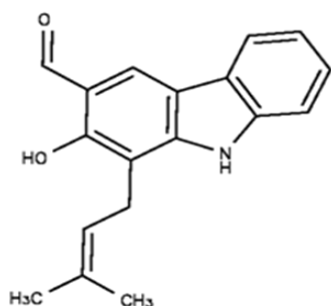
ในกระบวนการอะพอพโทซิสมีกลไกที่สำคัญคือ กลไกที่ผ่านตัวรับบนผิวเซลล์ (Extrinsic pathway) และกลไกที่ผ่านไมโทคอนเดรียหรือกลไกภายในเซลล์ (intrinsic pathway) ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสผ่าน intrinsic pathway การส่งสัญญาณภายในเซลล์จะทำให้เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้มีการขับ cytochrome C ออกมา ส่งผลให้มีการกระตุ้น procaspase-9 และ caspase 3 และทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในที่สุด (Fulda S, Debatin KM., 2006) ในกระบวนการ extrinsic pathway เริ่มจากเมื่อ death ligands จับกับ death receptors ได้แก่ Fas tumor necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) และ TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor DR4/5 จะสามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ผ่าน death receptors ได้

เทรล (TRAIL, TNF-related apoptosis inducing ligand) เป็นไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งหลายชนิดผ่านตัวรับที่สำคัญ 2 ชนิด คือ DR4 และ DR5 ซึ่งจะกระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิสผ่านโปรตีนในกลุ่ม Bcl-2 family เช่น Bid สำหรับโปรตีน Bid เป็นจุดเชื่อมต่อทั้ง mitochondrial pathway และ death receptor pathway โดยการกระตุ้นไมโทคอนเดรียผ่านโปรตีน Bax หรือ Bak ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย Bid ในไซโทพลาสซึมจะถูกกระตุ้นโดย caspase-8 กลายเป็น truncated form of Bid (tBid) ส่งผลทำให้ cytochrome c ถูกขับออกมาจากไมโทคอนเดรียและส่งสัญญาณให้โปรตีนตัวถัดไป คือ caspases เช่น caspase-3 และทำให้เกิดอะพอพโทซิสในที่สุด (Kantari C, Walczak H., 2011, Chen X., et. al., 2006, Perez D, White E., 2000, Stevenson HS., et. al., 2007, Pei Y., et. al., 2007) และโปรตีน Pro-caspase-3 สามารถถูกกระตุ้นโดย caspase-8 โดยตรงได้เช่นกัน ผลจากการกระตุ้นโปรตีน caspases นี้จะส่งผลให้โปรตีน caspases ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในเซลล์ไปกระตุ้นโปรตีนที่เป็นเป้าหมาย เช่น poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) ซึ่งเป็น DNA repair protein ทำให้ถูกตัดชิ้นส่วนไม่สามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอได้ (Alvarez S., et. al., 2011) ในการส่งสัญญาณของ Caspase cascade สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย anti-apoptosis proteins เช่น cIAP1/2 Bcl-xl Mcl-1 Survivin และ XIAP (Thorburn A., et. al., 2008) ในการกระตุ้นการตายของเซลล์ด้วย TRAIL พบว่า TRAIL มีคุณสมบัติต้านมะเร็งที่น่าสนใจเนื่องจากสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งโดยไม่เกิดพิษต่อเซลล์ปกติโดยมีการออกฤทธิ์ผ่านกลไกที่สำคัญคือการกระตุ้นการตายของเซลล์ผ่าน death receptor คือ DR5 ซึ่งพบในเซลล์มะเร็งแต่ไม่พบในเซลล์ปกติ (Allen JE et. al., 2012, Ashkenazi A et al., 1999) อย่างไรก็ตามการนำ TRAIL ไปใช้ในทางคลินิกยังมีข้อจำกัดเนื่องจากเซลล์มะเร็งเกิดการ

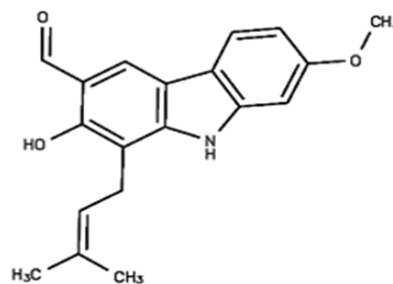
ดื้อต่อเทรล (Krammer PH, 1999) ดังนั้นการค้นหาวีธีการหรือกลไกที่สามารถทำให้เซลล์มะเร็งไวต่อเทรลได้จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการนำ TRAIL ไปใช้ในการรักษามะเร็ง การใช้ TRAIL ร่วมกับยาต้านมะเร็ง เช่น doxorubicin และ 5-fluorouracil ส่งผลเสริมฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (Gliniak B., et. al., 1999 and Keane MM., et. al., 1999) การค้นคว้าวิจัยเพื่อหาสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อนำไปใช้โดยมีเป้าหมายคือวิธีการออกฤทธิ์ของเทรลและการทำความเข้าใจกลไกการออกฤทธิ์จึงมีความสำคัญในการค้นคว้าหายาด้านมะเร็ง (Gliniak B., et. al., 1999 และ Keane MM., et. al., 1999) เป็นที่ทราบกันว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นแหล่งที่สำคัญของยาที่มนุษย์นำไปใช้รักษาโรคต่างๆรวมถึงโรคมะเร็ง ส่องฟ้าแดงหรือ *Clausena harmandiana* (รูปที่ 1) เป็นพืชสมุนไพรไทยในตระกูล Rutaceae ในประเทศไทยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีสรรพคุณทางยา คือ ใช้ในการรักษาอาการเจ็บป่วย เช่น แก้ไข้ ปวดท้อง และปวดหัว เป็นต้น (Aouacheria A., et. al., 2002) โดยส่วนรากของพืชชนิดนี้ประกอบด้วยสาร alkaloids กลุ่ม carbazole และ coumarins ในปริมาณมาก (Thongthoom T., et. al., 2010) และออกฤทธิ์ได้กว้างขวางรวมถึงฤทธิ์ต้านมะเร็ง ด้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ด้านมาลาเรีย ด้านการอักเสบ ด้าน HIV และ ด้านเชื้อรา (Ito C., et. al., 2000, Yenjai C., et. al., 2000, Tanticharoen M., 2011, Songsiang U., et. al., 2011, Wu TS., 1999) ล่าสุดมีรายงานว่าสารกลุ่มอนุพันธ์ของ carbazole 13 ชนิด จาก 16 ชนิด และ coumarin 2 ชนิดจาก 3 ชนิด ที่สกัดจากรากของส่องฟ้าแดงสามารถออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้โดยทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ NCI-H187 cell line และในกลุ่มอนุพันธ์ของ carbazole พบว่า heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline (รูปที่ 2) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงสุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.32 และ 1.67 μM ตามลำดับ



รูปที่ 1 ต้นส่องฟ้า (*Clausena harmandiana*)



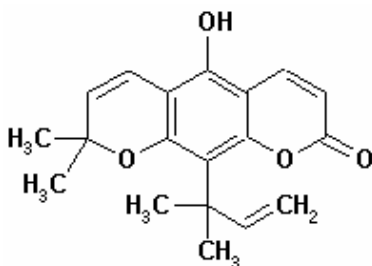
Heptaphylline



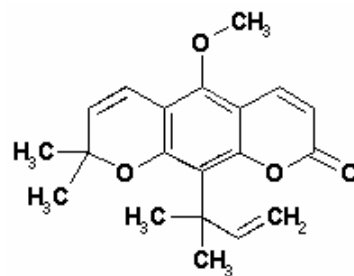
7-methoxy-heptaphylline

รูปที่ 2. โครงสร้างของ heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline

ในกลุ่มของ coumarins พบว่า dentatin และ nordentatin (รูปที่ 3) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ NCI-H187 cell line โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 45.41 และ 11.81 μM ตามลำดับ



Dentatin



Nordentatin

รูปที่ 3. โครงสร้างของ dentatin และ nordentatin

สารทั้งสี่ชนิดมีความเป็นพิษต่ำในเซลล์ปกติ (Vero cells) (Thongthoom T., et.al., 2011)จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารกลุ่ม carbazole (heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline) และ สารกลุ่ม coumarin (dentatin และ nordentatin) ที่สกัดจากสอ่งฟ้าแดง *Clausena harmandiana* จะสามารถ sensitize เซลล์มะเร็งต่อ TRAIL ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษากลไกระดับโมเลกุลในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสำคัญจากสอ่งฟ้าแดงต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29 colorectal adenocarcinoma cells) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อ TRAIL โดยศึกษา ผลของสารสำคัญดังกล่าวต่อ TRAIL-induced apoptotic pathways เพื่อพัฒนาในการใช้ร่วมกับเทรลและ sensitize เซลล์มะเร็งต่อเทรล และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของสารสำคัญจากสอ่งฟ้าแดงต่อการส่งสัญญาณของเทรลต่อตัวรับบนผิวเซลล์มะเร็งคือ DR5 (death receptor 5) ในวิถีอะพอพโทซิส เพื่อวิจัยหาสารต้านมะเร็งที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งโดยไม่ส่งผลต่อเซลล์ปกติ

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาผลกระตุ้นของสารสำคัญจากสอ่งฟ้า (สารกลุ่ม coumarin ได้แก่ dentatin และ nordentatin และสารกลุ่ม carbazole ได้แก่ heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline) ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT29)

2. เพื่อศึกษาผลกระตุ้นของสารสำคัญจากสองฟ้า (สารกลุ่ม coumarin ได้แก่ dentatin และ nordentatin และสารกลุ่ม carbazole ได้แก่ heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline) ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT29) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL
3. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลในการการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสำคัญจากสองฟ้าต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ HT29
4. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลในการการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสำคัญจากสองฟ้าต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL
5. เพื่อให้ได้ new molecular basis ในการพัฒนายาต้านมะเร็งจากสารสกัดจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

4. วิธีการทดลอง

1. **สารทดสอบ:** สารสำคัญจากสองฟ้าแดง (*Clausena harmandiana*) สารกลุ่ม coumarin ได้แก่ dentatin และ nordentatin และสารกลุ่ม carbazole ได้แก่ heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline ตัวกระตุ้นอะพอพโทซิส ได้แก่ TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)(Peprotech Recombinant Human sTRAIL/Apo2L) สารที่ใช้เป็น positive control ได้แก่ doxorubicin (Sigma-Aldrich)

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ลำไส้ปกติ FHC normal colon cells (ATCC[®] CRL-1831[™]) และเซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29 cells ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (high glucose) ที่มี 10% fetal calf serum penicillin 100 units/ml และ streptomycin 100 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ที่มี 5% CO₂ การวัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ใช้วิธี MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay โดยนำเซลล์ HT-29 cells มาเพาะเลี้ยงใน 96-well microplates ในความเข้มข้นของเซลล์ 6x10³ cells/wells หลังจากนั้นบ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ผลต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ HT29 และเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL.

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity) ด้วยวิธี MTT assay

เตรียมสารทดสอบ dentatin, nordentatin, heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline ด้วยการละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) หลังจากนั้นบ่มเซลล์ด้วยสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ (1, 10, 100 µM) สารมาตรฐาน (doxorubicin 10 µg/ml) และ 1 % DMSO (กลุ่มควบคุม) ลงไปในเซลล์ HT29 ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับกลุ่มเซลล์ HT29 ที่เหนี่ยวนำด้วย TRAIL เติมสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ สารมาตรฐาน และ DMSO เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม TRAIL 200 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ทดสอบด้วยการเติม MTT Reagent (5 mg/ml) 10 µL นำเซลล์ทดสอบไปบ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 2 ถึง 4 ชั่วโมง จนสามารถมองเห็นตะกอนเซลล์สีม่วง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย DMSO 100 µl/ well หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{Absorbance of treated cells}}{\text{Absorbance of control (untreated cells)}} \times 100$$

Absorbance of control (untreated cells)

สังเกตรูปร่างของเซลล์ (cell morphology) และถ่ายภาพโดยใช้ Phase contrast microscope.

4. ผลต่อวิถีอะพอพโทซิสในเซลล์ HT29 และเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL

4.1 การสกัดส่วนประกอบจากเซลล์

ในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารต่อวิถีการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL เตรียมเซลล์ HT29 นำมาบ่มด้วยสารทดสอบในความเข้มข้น 1 10 และ 100 μ M และสารมาตรฐาน (doxorubicin) หลังจากนั้นเติม TRAIL 200 ng/ml เลี้ยงไว้ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์มาสกัดด้วย buffer (25 mM HEPES pH 7.7, 0.3 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 10% Triton X-100, 20 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM dithiothreitol (DTT), 10 μ g/ml aprotinin, and 10 μ g/ml leupeptin) เก็บตัวอย่างนำ whole cell lysate ไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บ cell lysate จากส่วน supernatant

4.2 ศึกษาโปรตีนในวิถีอะพอพโทซิสด้วยวิธี Immunoblotting

นำ cell lysate ที่ได้จากการสกัดเซลล์มาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE หลังจากนั้น transfer โปรตีนสู่ Immobilon-P-nylon membrane (Millipore) นำ membrane ที่ได้มาบ่มด้วย BlockAce (Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd, Suita, Japan) และตรวจสอบโปรตีนด้วย primary antibodies (anti-caspase-8, caspase-3, caspase-9, PARP, BCL-XL, BID, MCL-1, survivin, XIAP, DR5 และ anti-actin antibodies) หลังจากนั้นบ่มด้วย horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-mouse, และ anti-goat IgG (DAKO, Glostrup, Denmark) และแสดงผลโดยใช้ enhanced chemiluminescence system (Amersham Biosciences)

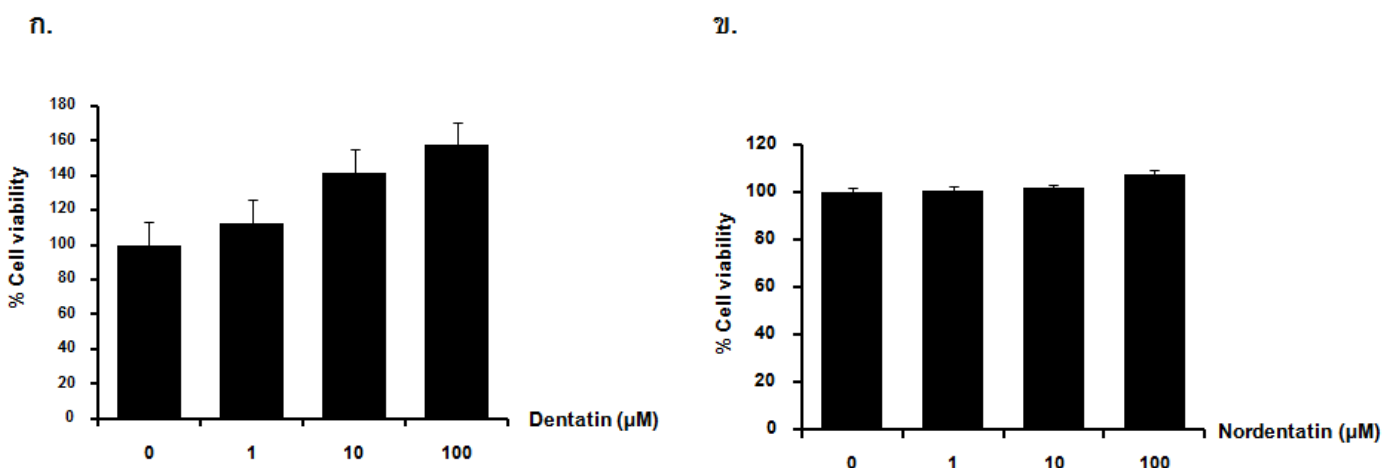
4.3. ศึกษา mRNA expression โดยใช้วิธี RT-PCR และ Realtime RT-PCR

เพื่อศึกษาว่าสารทดสอบสามารถเพิ่มการแสดงออกของ death receptors (DR5) mRNA หรือไม่ นำเซลล์ HT29 มาบ่มด้วยสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย TRAIL 200 ng/ml เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และวัดการแสดงออกของ DR5 mRNA ด้วยวิธี real-time PCR โดยนำเซลล์ทดลองมาสกัด nuclear extracts (Sakurai H., et. al., 2003) มีขั้นตอนโดยสรุป คือ นำเซลล์ทดลองมาเติม buffer A (10 mM HEPES (pH 7.9) 420 μ l, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 20 mM β -glycerophosphate, 0.1 mM sodium orthovanadate, 10 μ g/ml aprotinin and 10 μ g/ml leupeptin) 420 μ l หลังจากนั้นนำมาแช่แข็งเป็นเวลา 15 นาที เติม 10% Nonidet P-40 25 μ l นำไป vortexed เบาๆ 10 วินาที ละลาย nuclear pellets ด้วย buffer B (20 mM HEPES (pH 7.9), 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 20 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10 μ g/ml aprotinin and 10 μ g/ml leupeptin) 50 μ l เก็บส่วนผสมในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 min พร้อมกับเขย่า เตรียม nuclear extracts โดยนำส่วนผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เตรียม Total RNA โดยใช้ Mini kit (Qiagen) สังเคราะห์สาย cDNA ด้วย SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) เพิ่มจำนวน cDNA ด้วย Premix Ex Taq (Chemoscience) โดยใช้ primers ดังนี้: DR5 sense: 5'-GCACCACGACCAGAAA-3'; antisense: 5'-CACCGACCTTGACCAT-3' ตรวจสอบ PCR products ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และ วัดปริมาณ Real-time RT-PCR โดยใช้ ABI Prism 7300 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) โดยใช้ GAPDH mRNA เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ

5. ผลการวิจัย

5.1 ผลของสารกลุ่ม coumarin (dentatin และ norentatin) ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ลำไส้ปกติ (FHC colon normal cells)

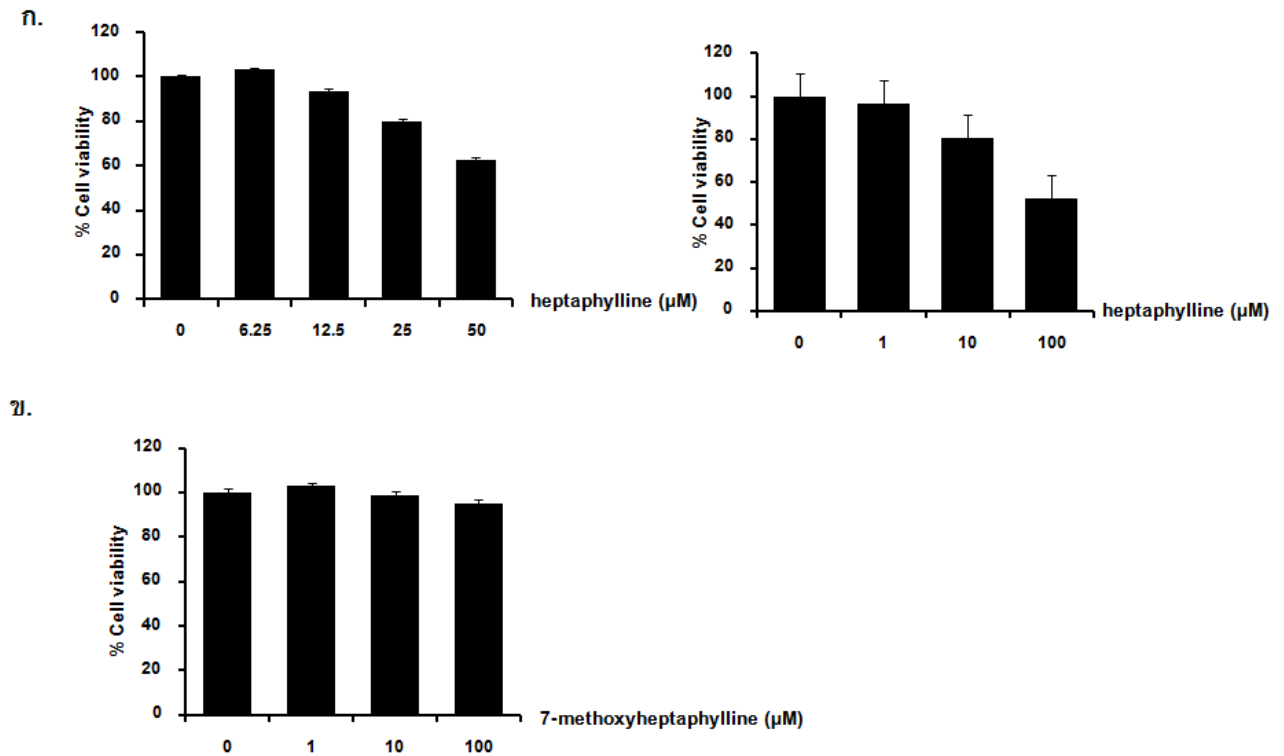
เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสำคัญจากสองฟักกลุ่ม coumarin ต่อเซลล์ลำไส้ปกติ จึงได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่สาร dentatin และ norentatin ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 0 ถึง 100 μM ลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงบ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้ววัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ผลการทดลองพบว่า dentatin และ norentatin ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ลำไส้ปกติ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ผลของ dentatin (ก) และ norentatin (ข) ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ FHC colon normal cells

5.2 ผลของสารกลุ่ม carbazole (heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline) ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ลำไส้ปกติ (FHC colon normal cells)

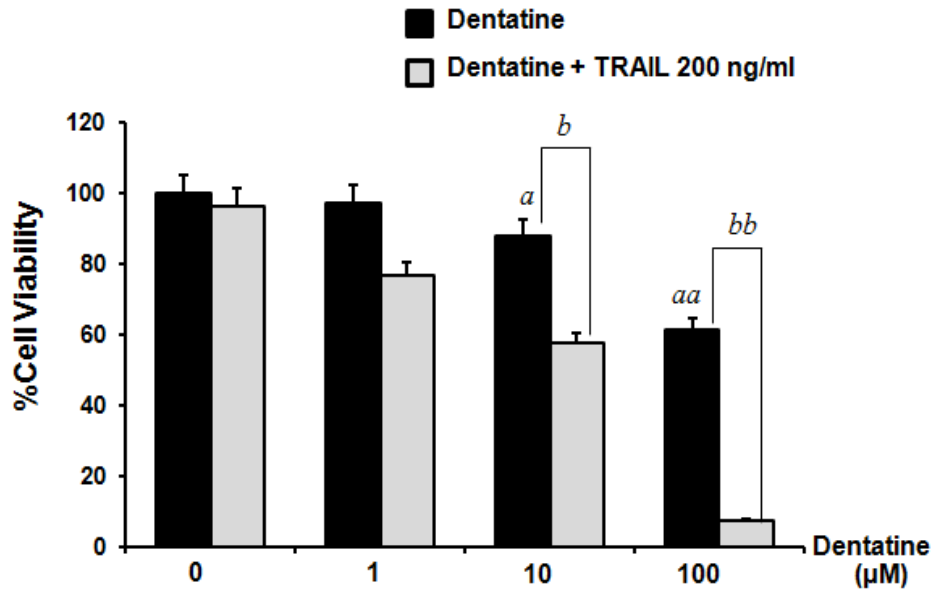
เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสำคัญจากสองฟักกลุ่ม carbazole ต่อเซลล์ลำไส้ปกติ จึงได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่สาร heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 0 ถึง 100 μM ลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงบ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้ววัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ผลการทดลองพบว่า 7-methoxyheptaphylline ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และ heptaphylline แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติแต่ไม่ทำให้อัตราการมีชีวิตต่ำกว่า 50 % (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ผลของ heptaphylline (ก) และ 7-methoxyheptaphylline (ข)
ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ FHC colon normal cells

5.3 ผลของสารกลุ่ม coumarin (dentatin และ nordentatin) ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ HT29 และเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL

เพื่อศึกษาผลของ dentatin และ nordentatin ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง HT29 เปรียบเทียบกับเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL การทดลองเริ่มจากการบ่มเซลล์ด้วย dentatin หรือ nordentatin ความเข้มข้น 1 10 และ 100 µM โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่บ่มด้วยสารอย่างเดียวและกลุ่มที่บ่มสารร่วมกับ TRAIL ความเข้มข้น 200 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT และศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์โดยใช้กล้อง phase contrast microscope ผลการทดลองพบว่า dentatin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT29 ตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น และบ่มเซลล์ด้วย dentatin เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม TRAIL และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า dentatin ความเข้มข้น 10 และ 100 µM เสริมฤทธิ์ TRAIL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ dentatin ชนิดเดียว (p -value < 0.05 และ 0.01 ตามลำดับ) (รูปที่ 6) สำหรับ nordentatin พบว่ามีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ HT29 ตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น และที่ความเข้มข้น 100 µM nordentatin เสริมฤทธิ์ TRAIL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.01) (รูปที่ 7)

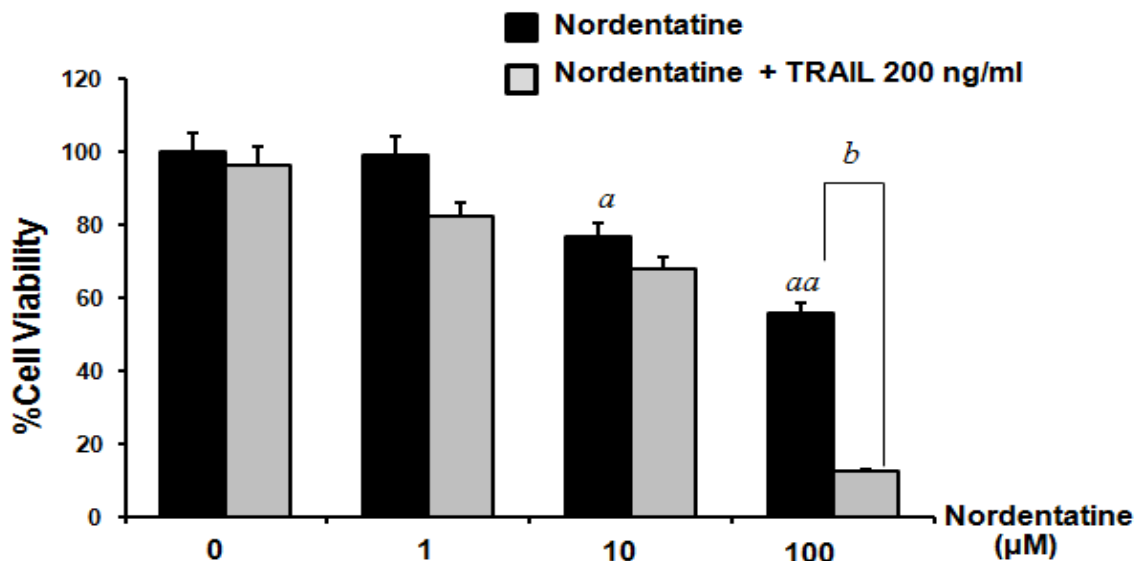


รูปที่ 6 ผลของ dentatin ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ HT29 และเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL

แสดงข้อมูลด้วยค่า mean±SD (n = 3), ^{a, b} $p < 0.05$, ^{aa, bb} $p < 0.01$

^a = เปรียบเทียบกลุ่มที่ใส่สารกับกลุ่มควบคุม

^b = เปรียบเทียบกลุ่มที่ใส่สารอย่างเดียวกับกลุ่มใส่สารร่วมกับ TRAIL



รูปที่ 7 ผลของ nordentatin ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ HT29 และเซลล์ HT29 ที่ได้รับ TRAIL

แสดงข้อมูลด้วยค่า mean±SD (n = 3), ^a $p < 0.05$, ^{aa, b} $p < 0.01$

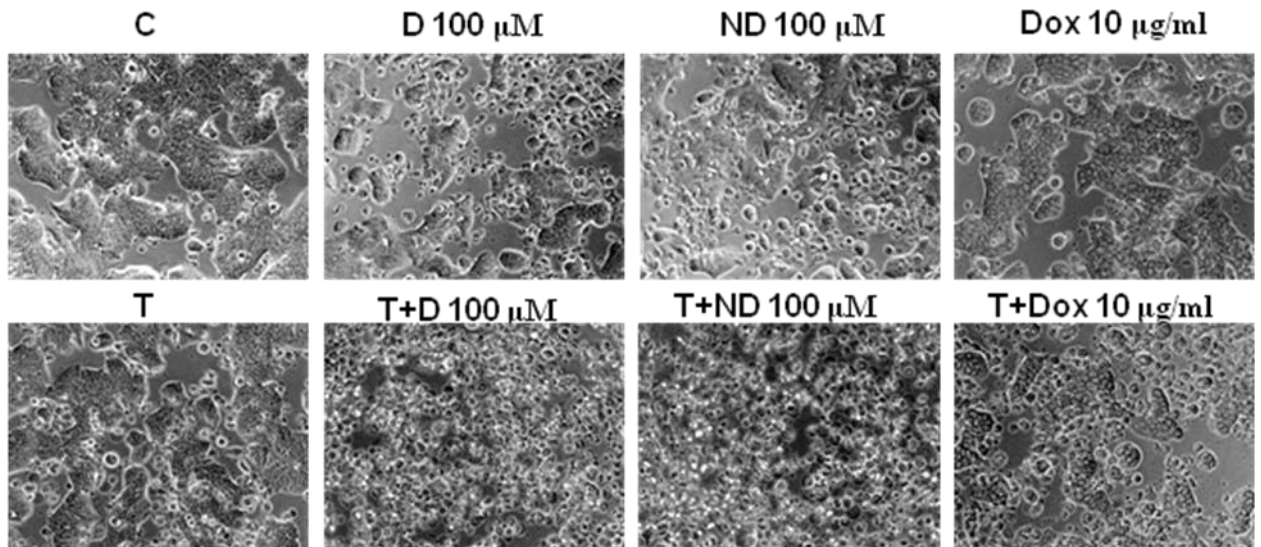
^a = เปรียบเทียบกลุ่มที่ใส่สารกับกลุ่มควบคุม

^b = เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่สารอย่างเดียวกับกลุ่มใส่สารร่วมกับ TRAIL

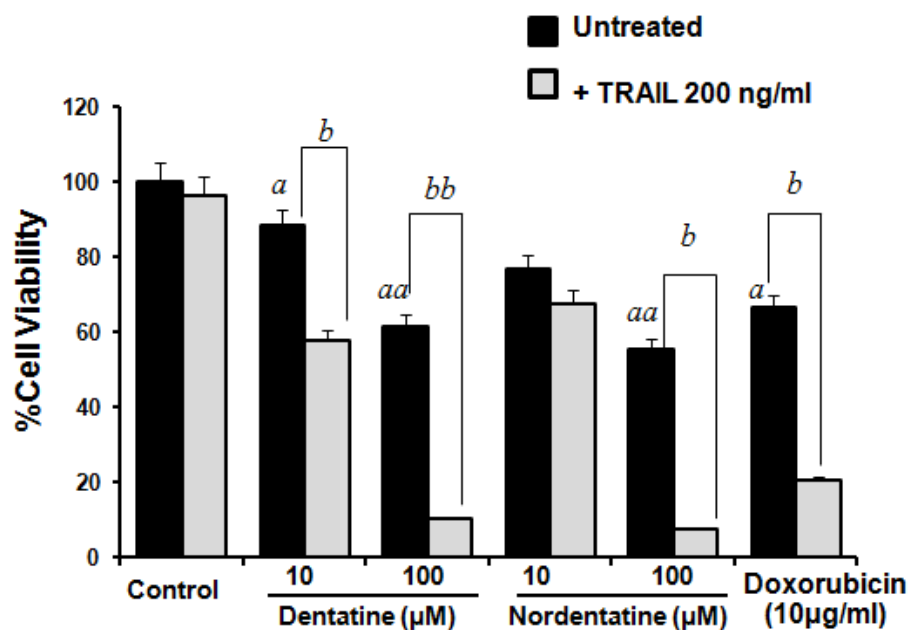
เมื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ระหว่าง dentatin และ nordentatin พบว่า dentatin ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 10 และ 100 µM ในขณะที่ nordentatin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 100 µM (รูปที่ 8 ข) และมีผลทำให้เซลล์มะเร็งฝ่อเล็กลงและมีรูปร่างกลม หลุดลอยและไม่ยึดเกาะ

ภาชนะเพาะเลี้ยง (รูปที่ 8 ก แถวบน) และเมื่อใช้ร่วมกับ TRAIL พบว่าทั้ง dentatin และ nordentatin 100 μ M มีผลเสริมฤทธิ์ TRAIL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญใน (รูปที่ 8 ข และ รูปที่ 8 ก แถวล่าง) ดังนั้นจึงแสดงว่า dentatin มีฤทธิ์ดีกว่า nordentatin

ก.



ข.



รูปที่ 8 ผลเปรียบเทียบระหว่าง dentatin และ nordentatin ต่อการตายของเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL

ก. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จากการศึกษาด้วยวิธี phase contrast microscopy

C: control, T: TRAIL 200 ng/ml, D: dentatin, ND: nordentatin, Dox: doxorubicin

ข. อัตราการมีชีวิตของเซลล์จากการศึกษาด้วยวิธี MTT

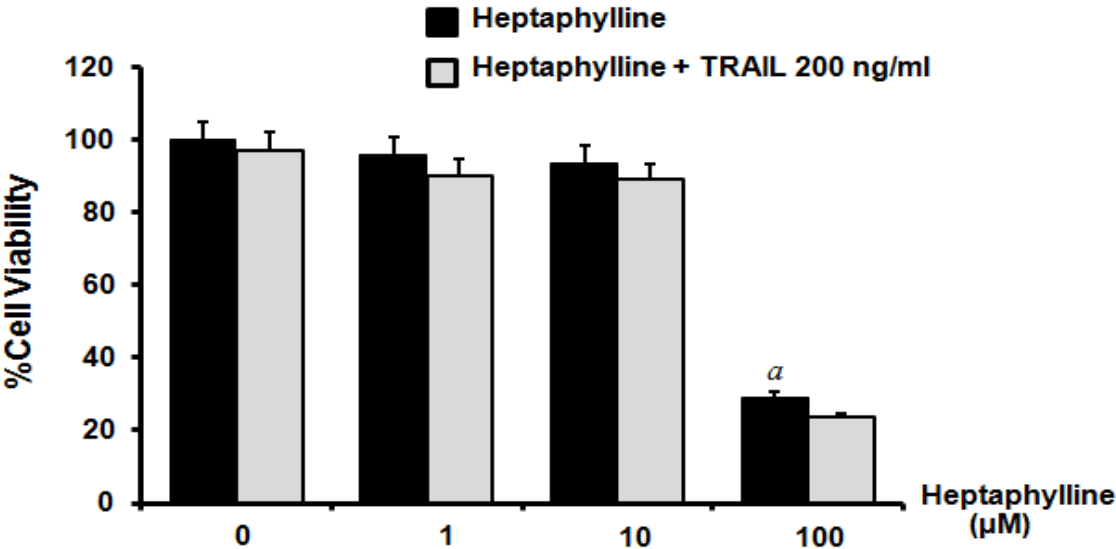
แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n = 3), ^a $p < 0.05$, ^{aa, b} $p < 0.01$

(^a = เปรียบเทียบกลุ่มที่ใส่สารกับกลุ่มควบคุม, ^b = เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่สารอย่างเดียวกับกลุ่มใส่สารร่วมกับ TRAIL)

5.4 ผลของสารกลุ่ม carbazole (heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline) ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ HT29 และเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL.

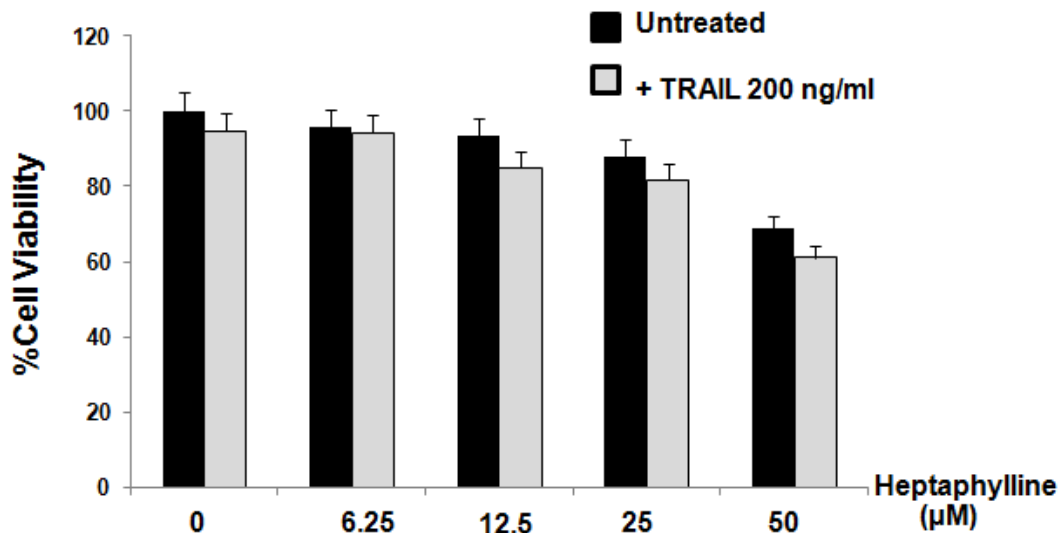
ในการศึกษาผลของ heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline ต่อการตายของเซลล์มะเร็ง HT29 เปรียบเทียบกับ เซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL การทดลองเริ่มจากการบ่มเซลล์ด้วย heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline ความเข้มข้น 1 10 และ 100 μM โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่บ่มด้วยสารอย่างเดียวและกลุ่มที่บ่มสารร่วมกับ TRAIL ความเข้มข้น 200 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT และศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ โดยใช้กล้อง phase contrast microscope ผลการทดลองพบว่า heptaphylline มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ HT29 อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 100 μM และเมื่อใช้ร่วมกับ TRAIL พบว่า heptaphylline ไม่มีผลเสริมฤทธิ์ TRAIL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ heptaphylline อย่างเดียว (รูปที่ 9 ก) แต่มีความเป็นไปได้ว่าเซลล์อาจเกิดการตายเนื่องจากฤทธิ์ของสารเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้นจึงไม่เห็นผลของการใช้ร่วมกับ TRAIL ดังนั้นเพื่อทดสอบฤทธิ์ของ heptaphylline ในการเสริมฤทธิ์ TRAIL โดยปรับใช้ heptaphylline ความเข้มข้นที่ต่ำลง คือ 6.25 12.5 25 และ 50 μM ร่วมกับ TRAIL ความเข้มข้น 200 ng/ml อย่างไรก็ตามพบว่า heptaphylline ไม่มีผลเสริมฤทธิ์ TRAIL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (รูปที่ 9 ข) สำหรับผลของ 7-methoxyheptaphylline พบว่ามีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ HT29 เพิ่มตามความเข้มข้นที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและที่ความเข้มข้น 10 และ 100 μM สาร 7-methoxyheptaphylline มีผลเสริมฤทธิ์ TRAIL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 10)

ก.

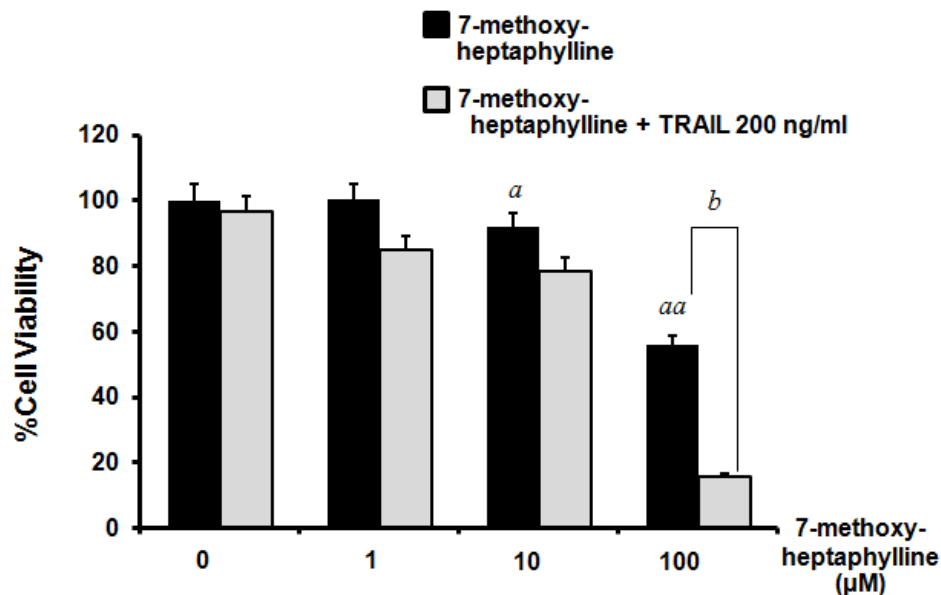


รูปที่ 9 ผลของ heptaphylline ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ HT29 และเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n = 3), ^a p < 0.001
(^a = เปรียบเทียบกลุ่มที่ใส่สารกับกลุ่มควบคุม)

ข.



รูปที่ 9 (ต่อ) ผลของ heptaphylline ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ HT29 และเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n = 3)



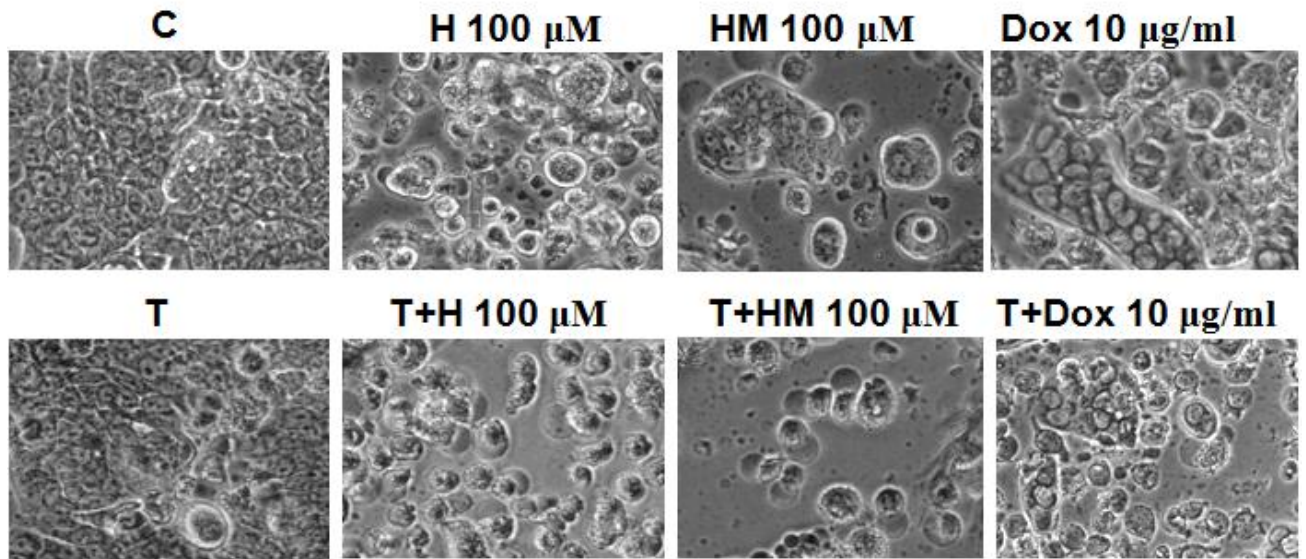
รูปที่ 10 ผลของ 7-methoxyheptaphylline ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ HT29 และเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL (แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n = 3), ^a $p < 0.01$, ^{aa, b} $p < 0.001$)

^a = เปรียบเทียบกลุ่มที่ใส่สารกับกลุ่มควบคุม

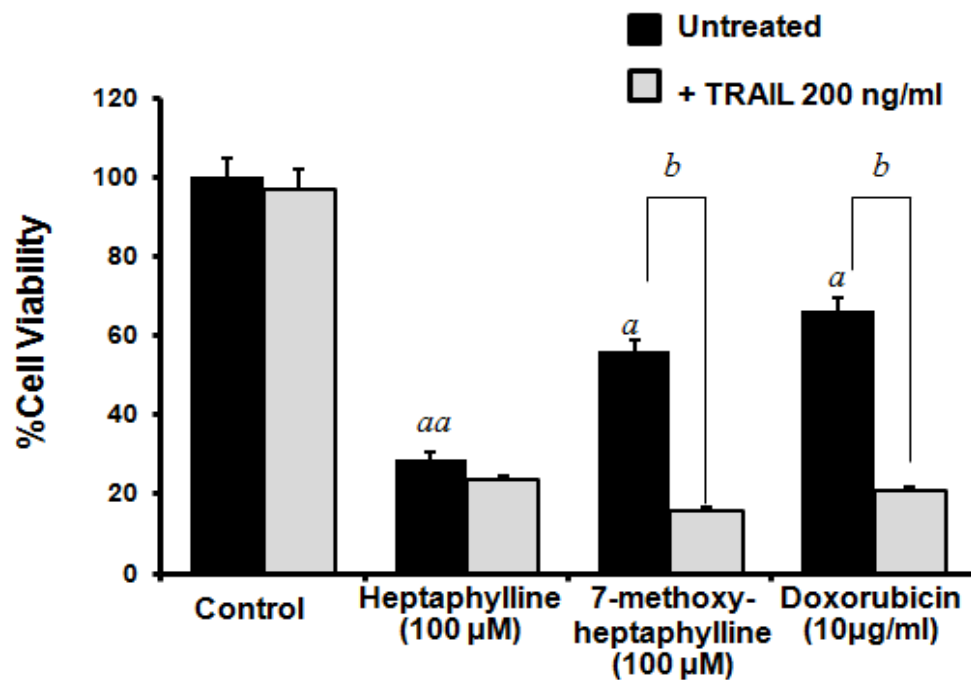
^b = เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่สารอย่างเดียวกับกลุ่มใส่สารร่วมกับ TRAIL

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ระหว่าง heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline พบว่า ทั้ง heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline ที่ความเข้มข้น 100 μM ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 11 ข) และมีผลทำให้เซลล์มะเร็งฝ่อเล็กลงและมีรูปร่างกลม หลุดลอยและไม่ยึดเกาะภาชนะเพาะเลี้ยง (รูปที่ 11 ก แถวบน) โดย heptaphylline มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า 7-methoxyheptaphylline และเมื่อใช้ร่วมกับ TRAIL พบว่า 7-methoxyheptaphylline มีผลเสริมฤทธิ์ TRAIL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ heptaphylline ไม่มีผลเสริมฤทธิ์ TRAIL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ (รูปที่ 11 ข และ รูปที่ 11 ก แถวล่าง)

ก.



ข.



รูปที่ 11 ผลเปรียบเทียบระหว่าง heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline ต่อการตายของเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ก. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จากการศึกษาด้วยวิธี phase contrast microscopy

C: control, T: TRAIL 200 ng/ml, H: heptaphylline, HM: 7-methoxyheptaphylline, Dox: doxorubicin

ข. อัตราการมีชีวิตของเซลล์จากการศึกษาด้วยวิธี MTT

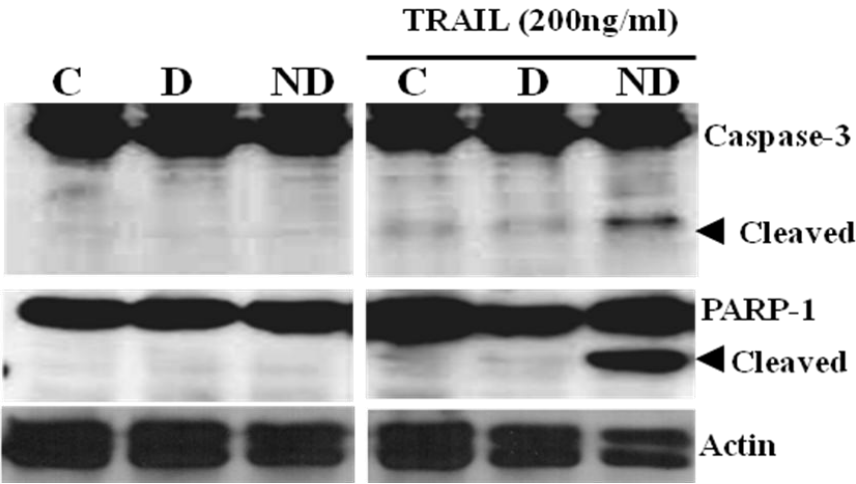
แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n = 3), ^a $p < 0.05$, ^{aa, b} $p < 0.01$

^a = เปรียบเทียบกลุ่มที่ใส่สารกับกลุ่มควบคุม

^b = เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่สารอย่างเดียวกับกลุ่มใส่สารร่วมกับ TRAIL

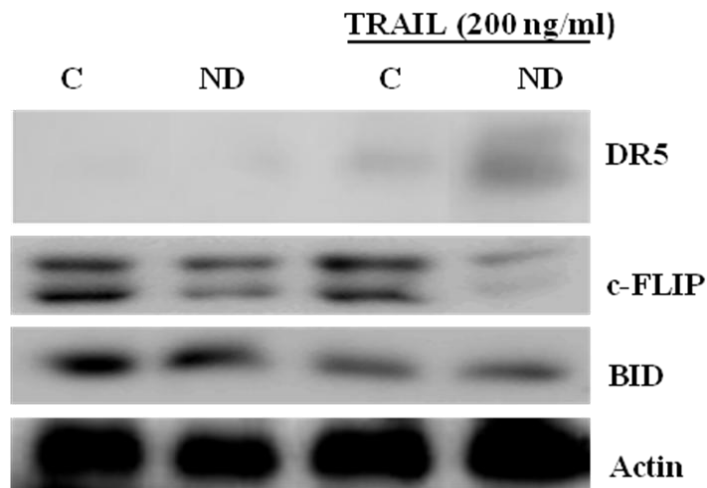
5.5 กลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของสารกลุ่ม coumarin (dentatin และ nordentatin) ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL

เพื่อศึกษา กลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่ม coumarin ซึ่งได้แก่ dentatin และ nordentatin ต่อเซลล์มะเร็ง HT29 และเซลล์ HT29 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL จึงนำเซลล์มาบ่มด้วย dentatin และ nordentatin ความเข้มข้น 100 μ M เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่บ่มด้วยสารสำคัญเพียงอย่างเดียวและบ่มด้วยสารสำคัญร่วมกับ TRAIL ความเข้มข้น TRAIL 200 ng/ml TRAIL 200 ng/ml หลังจากนั้นสังเกตการกระตุ้นเอนไซม์ caspase 3 และโปรตีน PARP-1 ด้วยวิธี Western blot ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 12 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (lane 1) พบว่าเซลล์ที่บ่มด้วย dentatin และ nordentatin ความเข้มข้น 100 μ M อย่างเดียว (lane 2 และ 3) ไม่มีผลในการกระตุ้น caspase-3 และ PARP-1 สำหรับในกลุ่มเซลล์ที่บ่มด้วย dentatin และ nordentatin ความเข้มข้น 100 μ M ร่วมกับ TRAIL 200 ng/ml พบว่า เซลล์ที่ได้รับ TRAIL 200 ng/ml เพียงอย่างเดียว มีผลกระตุ้น caspase 3 และ PARP-1 เล็กน้อยโดยดูได้จากชิ้นส่วนของโปรตีน caspase-3 และ PARP-1 (cleaved) ที่ถูกตัดบางๆ (lane 4) ในขณะที่ nordentatin มีผลเพิ่มการกระตุ้นการเกิด cleavage ของ caspase-3 และ PARP-1 อย่างชัดเจนในเซลล์ที่ได้รับ TRAIL (lane 6) ส่วนผลของ dentatin ร่วมกับ TRIAL ต่อการเกิด cleavage ของ caspase-3 และ PARP-1 (lane 5) พบว่าไม่แตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ TRIAL เพียงอย่างเดียว ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า nordentatin มีผลเพิ่มการกระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งด้วย TRAIL



รูปที่ 12 ผลของ dentatin และ nordentatin ต่อ caspase-3 และ PARP-1 ในเซลล์ HT29 ที่ได้รับ TRAIL
Lane 1 (C)= control, Lane 2 (D)= dentatin 100 μ M, Lane 3(ND) = nordentatin 100 μ M, Lane 4 = TRAIL 200 ng/ml, Lane 5 = dentatin 100 μ M ร่วมกับ TRAIL 200 ng/ml และ Lane 6 = nordentatin 100 μ M ร่วมกับ TRAIL 200 ng/ml

เนื่องจากผลการทดลองในรูปที่ 12 ที่แสดงว่า การใช้ nordentatin ร่วมกับ TRAIL มีผลเพิ่มการกระตุ้น caspase-3 และ PARP-1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในวิถีของกระบวนการอะพอพโทซิส ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงเป็นการศึกษาผลของ nordentatin ร่วมกับ TRAIL ต่อโปรตีนในวิถีการเกิดอะพอพโทซิสของ TRAIL ได้แก่ DR5 (death receptor 5) c-FLIP (cellular-FLICE inhibitory protein) และ Bid (BH3 interacting-domain death agonist) ด้วยวิธี Western blot ผลการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เซลล์ที่ได้รับ nordentatin เพียงอย่างเดียวมีผลในการเพิ่มปริมาณโปรตีน DR5 และลดปริมาณโปรตีน c-FLIP และ Bid เล็กน้อย (lane 2 vs. lane 1) เซลล์ที่ได้รับ TRAIL เพียงอย่างเดียว พบว่ามีระดับของ DR-5 เพิ่มขึ้นและสูงกว่าเซลล์ที่ได้รับ nordentatin อย่างเดียว สำหรับเซลล์ที่ได้รับ nordentatin ร่วมกับ TRAIL พบว่าการเพิ่มขึ้นของ DR5 อย่างชัดเจนและมีระดับโปรตีน c-FLIP และ Bid ลดลงชัดเจนเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ nordentatin หรือ TRAIL เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 13 lane 4 vs. lane 2/3) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า nordentatin เมื่อใช้ร่วมกับ TRAIL ช่วยเพิ่มการกระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิสผ่านโปรตีนที่อยู่ในวิถีอะพอพโทซิสของ TRAIL

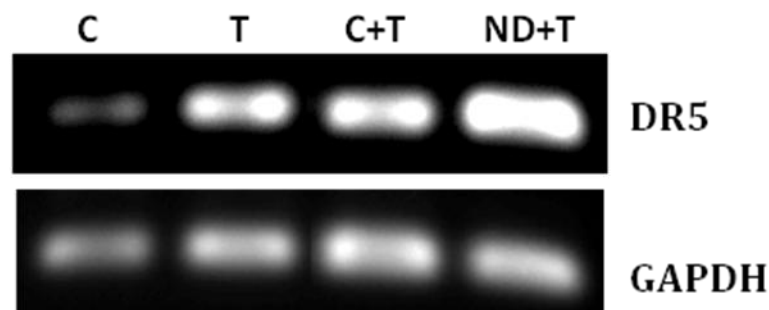


รูปที่ 13 ผลของการใช้ nortendatin ร่วมกับ TRAIL ต่อโปรตีนในวิถีอะพอพโทซิสในเซลล์ HT29

Lane 1 (C) = control, Lane 2 (ND) = nortendatin 100 μM, Lane 3= TRAIL 200 ng/ml

และ Lane 4 = nortendatin 100 μM ร่วมกับ TRAIL 200 ng/ml

จากการพบว่า nortendatin เพิ่มการกระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิสด้วย TRAIL ผ่านโปรตีนที่เป็นตัวรับของ TRAIL คือ DR5 การทดลองนี้จึงศึกษาถึงผล nortendatin ต่อการแสดงออกของยีน DR5 ในเซลล์ด้วยวิธี reverse transcription PCR ผลการทดลองพบว่า nortendatin หรือ TRAIL เพียงอย่างเดียวมีผลในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน DR5 และมีการแสดงออกของยีน DR5 สูงขึ้นอย่างชัดเจนในกลุ่มที่ใช้ nortendatin ร่วมกับ TRAIL (รูปที่ 14) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า nortendatin เพิ่มการกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์ด้วย TRAIL ผ่านการกระตุ้นการแสดงออกของยีน DR5 ซึ่งมีผลทำให้มีการแสดงออกของตัวรับ DR 5 เพิ่มขึ้น



รูปที่ 14 ผลของ nortendatin ต่อ DR5 mRNA ของเซลล์ HT29 ที่ได้รับ TRAIL 3 ชั่วโมง

Lane 1= control (C), Lane 2= TRAIL 200 ng/ml (T), Lane 3= nortendatin 100 μM (ND)

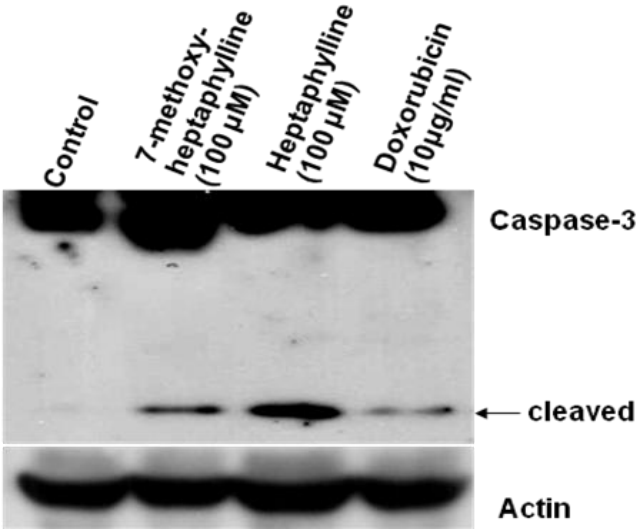
และ Lane 4= nortendatin 100 μM ร่วมกับ TRAIL 200 ng/ml (ND+T)

5.6 กลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของสารกลุ่ม carbazole (heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline) ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ HT29

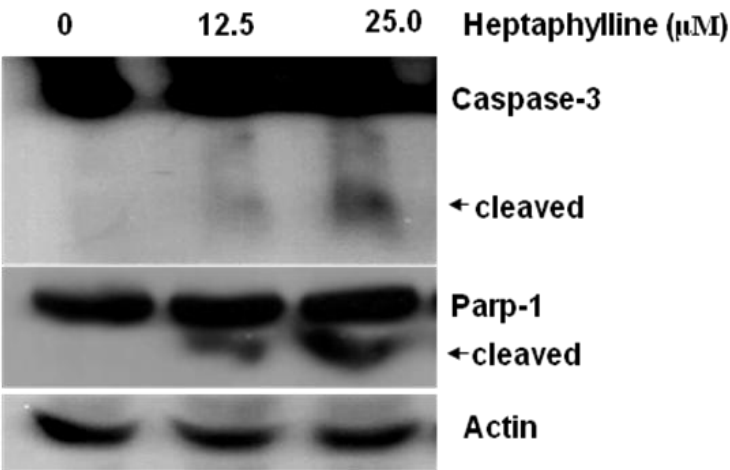
5.6.1 ผลของ heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline ต่อกระบวนการอะพอพโทซิสของเซลล์ HT-29

จากผลการทดลองในภาพที่ 4 ซึ่งแสดงว่า heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline มีฤทธิ์ในการทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง HT29 โดย heptaphylline มีฤทธิ์ดีกว่า 7-methoxyheptaphylline ดังนั้นเพื่อทดสอบผลของสารสำคัญต่อโปรตีนที่เป็น marker ที่สำคัญของกระบวนการอะพอพโทซิส จึงทำการวัดโปรตีน caspase-3 และ PARP-1

ด้วยวิธี Western blot ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 15 พบว่า hetaphylline 7-methoxyheptaphylline และ positive control คือ doxorubicin สามารถกระตุ้นการตัดโปรตีน caspase-3 และ PARP-1 โดย heptaphylline มีฤทธิ์ดีที่สุด หลังจากนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองจึงบ่มเซลล์ด้วย heptaphylline ความเข้มข้น 0 12.5 และ 25 μ M พบว่า heptaphylline กระตุ้นการเกิด cleavage ของ caspase-3 และ PARP-1 ได้ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 16) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า hetaphylline และ 7-methoxyheptaphylline เหนียวนาให้เกิดการตายของเซลล์ผ่านกระบวนการอะพอพโทซิส



รูปที่ 15 ผลของสารกลุ่ม carbazole (hetaphylline และ 7-methoxyheptaphylline) ต่อ caspase-3 และ PARP-1 ในเซลล์ HT29



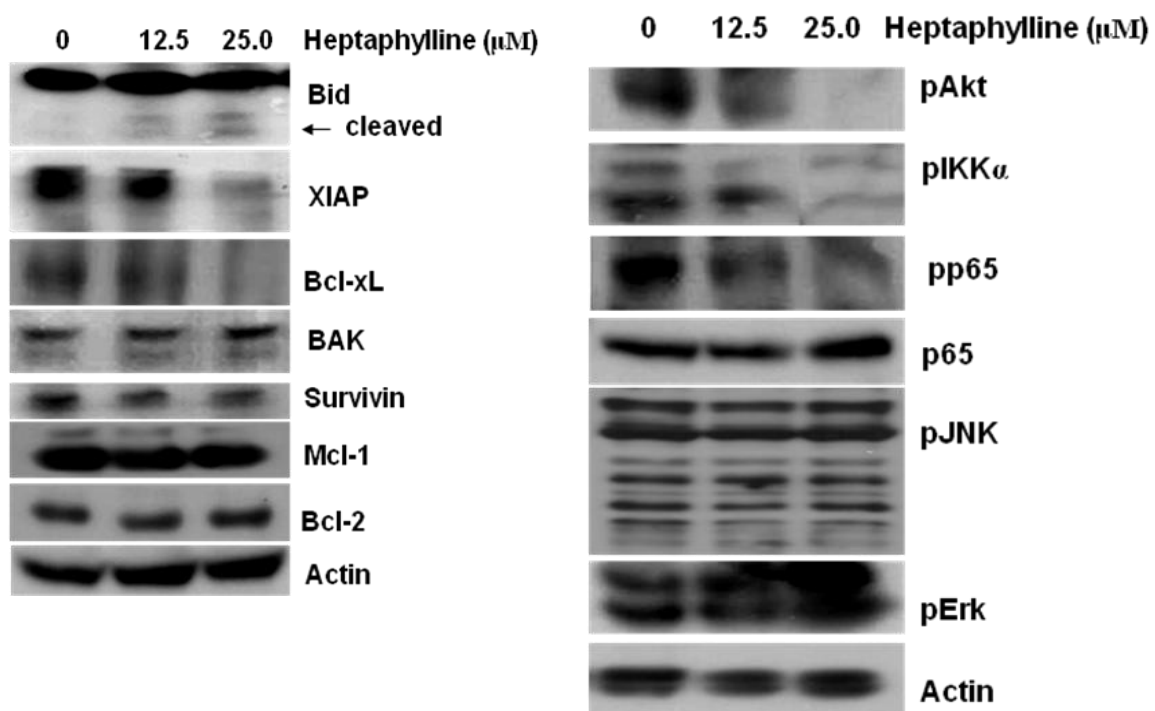
รูปที่ 16 Hetaphylline กระตุ้น caspase-3 และ PARP-1 ในวิถีอะพอพโทซิส

5.6.2 ผลของ heptaphylline ต่อโปรตีนในวิถีการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส

จากผลการทดลองข้างต้น เนื่องจาก heptaphylline มีฤทธิ์ดีที่สุดในการกระตุ้นกระบวนการอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปเพื่อเป็นการหากลไกการออกฤทธิ์ของ heptaphylline ในวิถีอะพอพโทซิส จึงตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในวิถีอะพอพโทซิส ได้แก่ Bid Bak Bcl-2 Bcl-xL Mcl-1 XIAP และ survivin ด้วยวิธี Western blot ผลการทดลองรูปที่ 17 ก พบว่า heptaphylline ความเข้มข้น 25 μM ทำให้เกิดการตัดโปรตีน Bid และสัมพันธ์กับการเพิ่มปริมาณโปรตีนของโปรตีน Bak ในทางตรงกันข้าม heptaphylline มีผลทำให้การแสดงออกของ antiapoptotic proteins ได้แก่ XIAP Bcl-xL และ survivin ลดลงแต่ไม่มีผลต่อ Bcl-2 และ Mcl-1 ในวิถีอะพอพโทซิส NF-KB/p65 (rel) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ apoptotic proteins หลายชนิด เช่น Bcl-xL survivin และ XIAP ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงเป็นการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการส่งสัญญาณผ่าน p65 ด้วยการเติมฟอสเฟต ได้แก่ Akt IKK α JNK และ Erk ผลการทดลองพบว่า heptaphylline มีผลยับยั้งการเติมฟอสเฟตของ Akt IKK α และ p65 ตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น แต่ไม่ส่งผลต่อการเติมฟอสเฟตของ JNK และ Erk (รูปที่ 17 ข) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า heptaphylline เหนี่ยวนาให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสผ่านวิถี Bid และ Akt/NF-KB (p65)

ก.

ข.



รูปที่ 17 ผลของ heptaphylline ต่อโปรตีนในวิถีอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง HT29

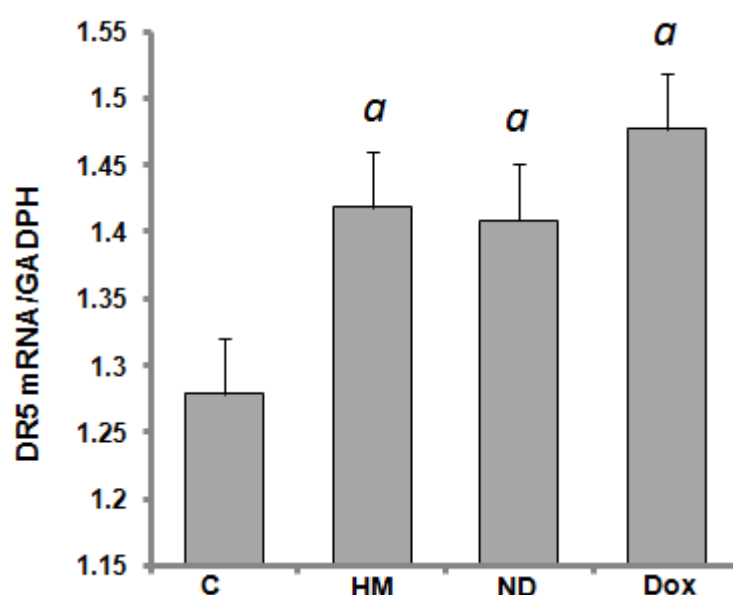
ก. ผลของ heptaphylline ต่อการแสดงออกของ apoptotic proteins

ข. ผลของ heptaphylline ต่อการส่งสัญญาณของโปรตีน

ที่ควบคุมการแสดงออกของ apoptotic proteins

5.7 ผลของ nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline ต่อ TRAIL receptor (DR5) ในการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ HT29 (ผลการวิจัยในช่วง 13-18 เดือน)

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารกลุ่ม carbazole และ coumarin พบว่าสารสำคัญที่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีความไวต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดย TRAIL มี 2 ชนิด ได้แก่ nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงเป็นการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุล โดยศึกษาผลของสารสำคัญทั้งสองชนิดต่อการแสดงออกของ DR5 ซึ่งเป็น TRAIL receptor ตลอดจนวิธีการควบคุมการแสดงออกของ DR5 โดยสารสำคัญทั้งสองชนิด ในขั้นแรกเป็นการศึกษาผลของ nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline ความเข้มข้น 10 μ M ต่อการแสดงออกของ DR5 mRNA expression โดยใช้วิธี Real time RT-PCR ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 18 แสดงค่า relative DR5 mRNA expression พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control สารสำคัญ nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด DR5 mRNA expression ได้โดยมี positive control คือ doxorubicin 17 μ M

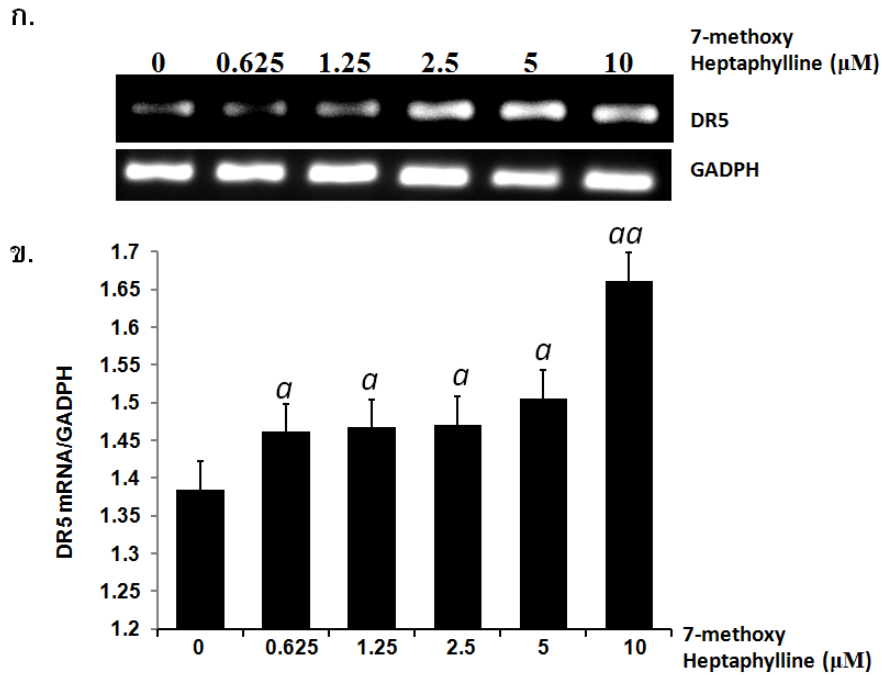


รูปที่ 18 ผลของ nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline ต่อการแสดงออกของ DR5 mRNA

C=Control, HM=7-methoxyheptaphylline, ND=Nordentatin, Dox=Doxorubicin

แสดงข้อมูลด้วยค่า mean ± SD (n = 3), ^a p < 0.05

เมื่อทำการบ่มเซลล์ด้วย 7-methoxyheptaphylline ความเข้มข้นต่างๆ แล้ววัดปริมาณ DR5 mRNA expression ด้วยวิธี RT-PCR (19 ก) และ Real time RT-PCR (19 ข) พบว่า 7-methoxyheptaphylline สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ DR5 mRNA ตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น สรุปได้ว่า 7-methoxyheptaphylline สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ DR5 ได้

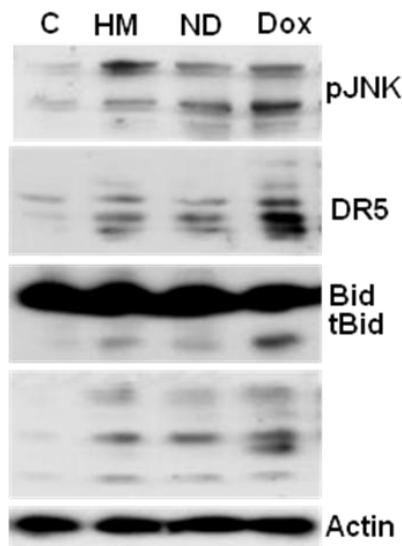


รูปที่ 19 ผลของ 7-methoxyheptaphylline ต่อการแสดงออกของ DR5 mRNA

ก. ผลจาก RT-PCR ข.ผลจาก Real time RT-PCR

แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n = 3), ^a $p < 0.05$, ^{aa} $p < 0.01$

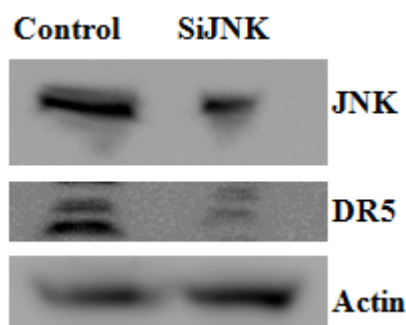
หลังจากนั้นเป็นการทดสอบผลของ nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline ต่อการแสดงออกของ DR5 protein และโปรตีนในวิถีของ DR5 ได้แก่ Phospho-JNK (pJNK), Bid, และ cleaved caspase-3 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 20 พบว่า nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline สามารถเหนี่ยวนำให้มี DR5 protein expression สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดโดยเปรียบเทียบกับ positive control คือ doxorubicin และผลสอดคล้องกับ DR5 mRNA expression นอกจากนี้ยังพบว่า nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline สามารถกระตุ้นโปรตีนในวิถีของ DR5 คือ Bid ให้กลายเป็น tBid ส่งผลให้เกิด cleaved caspase-3 และเกิด cancer cell apoptosis ตามมา และที่สำคัญสารทั้งสองชนิดสามารถกระตุ้นการเติมฟอสเฟตให้โปรตีน JNK ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline สามารถเพิ่ม DR expression ผ่านวิถี JNK



รูปที่ 20 ผลของ nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline ต่อการแสดงออกของ DR5 และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง

C=Control, HM=7-methoxyheptaphylline, ND=Nordentatin, Dox=Doxorubicin

ในขั้นตอนต่อไปจึงทำการ knock-down JNK gene ในเซลล์มะเร็ง HT-29 ด้วย Si-RNA ต่อ JNK (SiJNK) หลังจากนั้น ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน JNK และ DR5 ผลในรูปที่ 21 แสดงให้เห็นว่า SiJNK สามารถลดการแสดงออกของ JNK ได้ซึ่งสอดคล้องกับการลดการแสดงออกของ DR5 แสดงว่าการแสดงออกของ DR5 เกี่ยวข้องกับวิถี JNK ผลการทดลองนี้แสดงว่า nortentatin และ 7-methoxyheptaphylline กระตุ้นกระบวนการ apoptosis โดยเพิ่มปริมาณ DR5 และผ่านวิถี JNK



รูปที่ 21 ผลของ SiJNK ต่อการแสดงออกของ DR5 และ JNK

6. สรุปผลการวิจัย

1. สารกลุ่ม coumarin ทั้ง dentatine และ nortentatine มีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ HT29 โดย dentatine มีฤทธิ์ดีกว่า nortentatine โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ลำไส้ปกติ (FHC colon normal cells)
2. สารกลุ่ม carbazole ทั้ง heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline แสดงเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ โดย heptaphylline มีฤทธิ์ดีกว่า 7-methoxyheptaphylline 7-methoxyheptaphylline ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ในขณะที่ heptaphylline แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติแต่ไม่ทำให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ต่ำกว่า 50 % ที่ความเข้มข้นสูงสุด (100 μ M) และในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (25 μ M) พบว่า heptaphylline ทำให้สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญและมีกลไกผ่าน intrinsic pathway
3. สารกลุ่ม coumarin ทั้ง dentatine และ nortentatine มีผลเสริมฤทธิ์ TRAIL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้อย่างชัดเจน โดย dentatine มีฤทธิ์ดีกว่า nortentatine
4. สารกลุ่ม carbazole ทั้ง heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline เมื่อใช้ร่วมกับ TRAIL สาร heptaphylline ไม่มีผลเสริมฤทธิ์ TRAIL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ ในขณะที่ 7-methoxyheptaphylline เมื่อใช้ร่วมกับ TRAIL สามารถเพิ่มอัตราการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้อย่างชัดเจน
5. สารสำคัญ nortentatin และ 7-methoxyheptaphylline เพิ่ม DR5 expression ได้โดยมีกลไกผ่านวิถี JNK

ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญทั้ง 4 ชนิดจากสองฟ้าได้แก่ dentatin, nortentatin, heptaphylline และ 7 - methoxyheptaphylline ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คือ doxorubicin ที่มีรายงานว่าสามารถเสริมฤทธิ์ TRAIL ในการทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งได้ พบว่าสารทดสอบที่สามารถเสริมฤทธิ์ TRAIL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของมะเร็งลำไส้ได้มี 3 ชนิด คือ dentatin, nortentatin และ 7 - methoxyheptaphylline โดย dentatine มีฤทธิ์ดีที่สุด

ในการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารทั้งสองกลุ่มในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ และเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TRAIL โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ signaling proteins ใน apoptotic pathways ด้วยวิธี Western blot พบว่า nortentatin ออกฤทธิ์ร่วมกับ TRAIL ในการทำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง HT29 ผ่านการเพิ่มการแสดงออกของ TRAIL receptor คือ DR5 กระตุ้นโปรตีน Bid และยับยั้ง c-FLIP ซึ่งส่งผลให้เกิดการกระตุ้น caspase-3 และ PARP-1 ในขณะที่ nortentatin ไม่มีผลในวิธีดังกล่าว

สำหรับ heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline พบว่าสารสำคัญทั้งสองชนิดมีผลกระตุ้น caspase-3 และ PARP-1 โดย heptaphylline มีฤทธิ์ดีกว่า 7-methoxyheptaphylline โดย heptaphylline กระตุ้น caspase-3 และ PARP-1 ผ่านวิถี Bid และ Akt/NF- κ B (p65) ซึ่งส่งผลให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ HT29 ในที่สุด

สารสำคัญจากสองพืชที่สามารถออกฤทธิ์เพิ่มความไวของเซลล์มะเร็งต่อการกระตุ้นให้เกิดการตายด้วย TRAIL ได้แก่ nortentatin และ 7-methoxyheptaphylline พบว่าสารทั้งสองชนิดสามารถเพิ่มปริมาณ TRAIL receptor คือ DR5 expression ได้โดยมีกลไกผ่านวิถี JNK

7.เอกสารอ้างอิง

สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข. สรุปสถิติที่สำคัญ พ.ศ.2556. สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข. 2556. 71-72.

Allen JE, El-Deiry WS: Regulation of the human TRAIL gene. *Cancer Biol. Ther.* 13: 1143–1151, 2012.

Alvarez S, Blanco A, Fresno M and Muñoz-Fernández MÁ: TNF- α Contributes to Caspase-3 Independent Apoptosis in Neuroblastoma Cells: Role of NFAT. *PLoS One* 6:e16100, 2011.

Aouacheria A, Néel B, Bouaziz ZR, Dominique N, Walchshofer J, Paris H, Fillion G, Gillet: Carbazolequinone induction of caspase-dependent cell death in Src-overexpressing cells. *Biochemical pharmacology*.64: 1605-1616, 2002.

Ashkenazi A: Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* 104: 155–162 , 1999.

Chen X, Ding WX, Ni HM, Gao W, Shi YH, Gambotto AA, Fan J, Beg AA, Yin XM: Bid-independent mitochondrial activation in tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis and liver injury. *Mol Cell Biol* 27: 541-53, 2006.

Debatin KM, Krammer PH: Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*. 23: 2950–66, 2004.

Dimberg LY, Anderson CK, Camidge R, Behbakht K, Thorburn A, and Ford HL. On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene* 32: 1341-1350, 2013.

Evan GI, Vousden KH: Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342–348, 2001.

Fulda S, Debatin KM: Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. *Cancer Detect Prev* 30: 217-23, 2006.

Gliniak B, and Le T: Tumor necrosis factor – related apoptosis - inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT- 11. *Cancer Res* 59: 6153 – 6158, 1999.

Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57 - 70, 2000.

Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674, 2011.

Irene GM, Thomas EW, Alex AA: Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin* 55:178-194, 2005.

Ito C, Itoigawa M, Katsuno S, Omura M, Tokuda H, Nishino H, Furukawa H: Chemical constituents of *Clausena excavata*: isolation and structure elucidation of novel furanone-coumarins with inhibitory effects for tumor-promotion. *J Nat Prod*. 63:1218-1224. 2000.

Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Russell EK, and Lipkowitz S: Chemotherapy augments TRAIL - induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* 59: 734 – 741, 1999.

Kantari C and Walczak H. Caspase-8 and Bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1813: 558-63, 2011

Krammer PH: CD95 (Apo - 1 / Fas) – mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 71: 163 – 210, 1999.

Luk SC, Siu SW, Lai CK, Wu YJ, Pang SF: Cell Cycle Arrest by a Natural Product via G2/M Checkpoint. *Int J Med Sci* 2: 64-69, 2005.

Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, de Jong S, and Samali A. TRAIL receptor signalling and modulation: are we on the right TRAIL?. *Cancer Treat Res* 35: 280-288, 2009.

Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4: 592-603. 2004.

Pei Y, Xing D, Gao X, Liu L and Chen T : Real-time monitoring full length bid interacting with Bax during TNF-alpha-induced apoptosis. *Apoptosis* 12: 1681-90, 2007.

Perez D, White E: TNF-alpha signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B 19K. *Mol Cell* 6:53-63, 2000.

Songsiang U, Thongthoom T, Boonyarat C, Yenjai C: Claurailas A-D, cytotoxic carbazole alkaloids from the roots of *Clausena harmandiana*. *J Nat Prod* 74: 208-212, 2011.

Stevenson HS, Fu SW, Pinzone JJ, Rhee J, Simmens SJ, and Berg PE: BP1 transcriptionally activates bcl-2 and inhibits TNFalpha-induced cell death in MCF7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 9: R60, 2007.

Thongthoom T, Promsuwan P, Yenjai C. Synthesis and cytotoxic activity of the heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline series. *Eur J Med Chem* 9: 3755-3761, 2011.

Thongthoom T, Songsiang U, Phaosiri C, Yenjai C, *Arch. Pharm. Res.* 33 : 675-680, 2010.

Thorburn A, Behbakht K and Ford H: TRAIL receptor-targeted therapeutics: resistance mechanisms and strategies to avoid them. *Drug Resist Updat* 11:17–24, 2008.

Ye Y, Hui Wang, Jian-Hong Chu, Gui-Xin Chou, Si-Bao Chen, Huanbiao Mo, Wang-Fun Fong, Zhi-Ling Yu: Atractylenolide II induces G1 cell-cycle arrest and apoptosis in B16 melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology* 136: 279-282, 2011.

Yenjai C, Sripontan S, Sriprajun P, Kittakoo P, Jintasirikul A, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y: Coumarins and carbazoles with antiplasmodial activity from *Clausena harmandiana*. *Planta Med.* 66: 277-279, 2000.

8. Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

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

Boonyarat C, Yenjai C, Vajragupta O, Waiwut P. Heptaphylline Induces Apoptosis in Human Colon Adenocarcinoma Cells through Bid and Akt/NF-kappa B (p65) Pathways. *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION*, 2014, 15 (23), 10483-10487.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

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

มีการนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการเรียนการสอนวิชาชีวเคมีและอนุชีววิทยา 2 เรื่อง วัฏจักรของเซลล์ อะพอพโทซิส และพันธุศาสตร์มะเร็งและยีนมะเร็ง และนำข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลในการศึกษาสำหรับนักศึกษาในวิชา สารนิพนธ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

1. Heptaphylline induced colon adenocarcinoma cell death by regulation apoptotic proteins.

The Joint 7th AOHUPO Congress and 9th International Symposium of the Protein Society of Thailand (7th AOHUPO/9th PST). The Protein Society of Thailand and The Chulabhorn Research Institute, Miracle Grand Convention Hotel, Bangkok, Thailand, 6-8 August, 2014

2. Synergistic Effect of Coumarin Compounds from *Clausena hamandiana* on TRAIL-Induced Colon Adenocarcinoma Cell Death. The 7th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2015 "Challenges and Opportunities of the Pharmacy Profession in Post-Millennium Development Agenda". คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 7-8 มีนาคม 2558

3. Carbazole Compounds of *Clausena hamandiana* Sensitized TRAIL-Induced Colon Adenocarcinoma Cell Death. The 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6). Pullman Raja Orchid Hotel, Khon Kaen, Thailand, 21st - 23rd January, 2016.

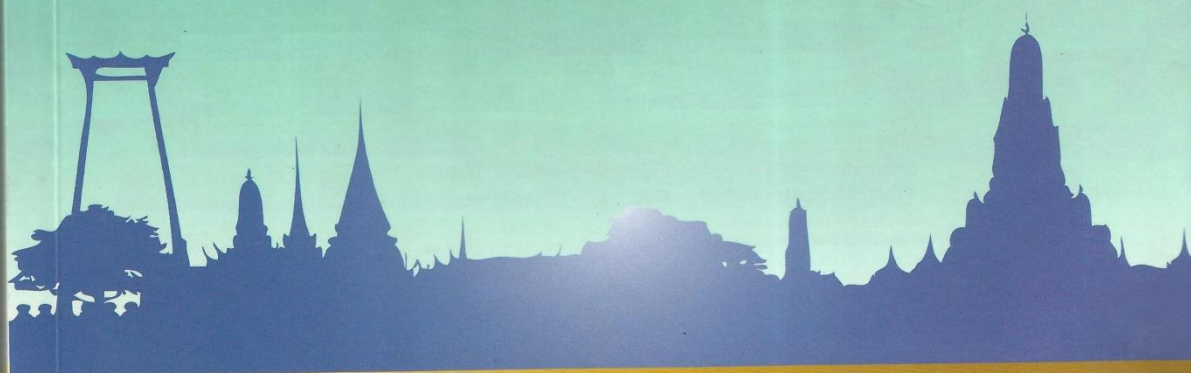
ภาคผนวก



7th AOHUPPO Congress and 9th International Symposium of the Protein Society of Thailand

Frontiers in Protein and Proteomic Research

**August 6-8, 2014
Miracle Grand Covention Hotel
Bangkok, Thailand**



www.aohupo2014.com | www.proteinsocthai.net

Abstract PP283-125 Helena Řehulková Quantitative proteomic analysis of hypertrophic cardiomyopathy plasma samples.....	193
Abstract PP287-126 Zhu Yunping PhosphoDistiller: A workflow of the phosphorylation quality control based on the tandem mass spectrometry data.....	194
Abstract PP288-127 Pornthip Waiwut Heptaphylline induces human colon adenocarcinoma cell death by regulating apoptotic proteins.....	195
Abstract PP291-128 Zhaoyu Qin Transcriptomics, proteomics and metabolomics research revealed TKT plays an important role in hepatocellular carcinoma.....	196
Abstract PP293-129 Lili Cai SUMOyprot: a database of SUMOylated proteins.....	197
Abstract PP295-130 Pitak Chuawong Overproduction, biochemical characterization, and NMR study of the N-terminal anticodon-binding domain of the non-discriminating aspartyl-tRNA synthetase from the human pathogen <i>Helicobacter pylori</i>	198
Abstract PP296-131 Jian Wang Identification of GIT2 as a regulator to protect against colitis by functional research of a protein-protein interaction network.....	199
Abstract PP297-132 Juthamath Komvongsa Single point mutations at tryptophan residue 243 increase Os9BGlu31 transglucosidase activity on hydroxyl groups of kaempferol	200
Abstract PP303-133 Adisak Romsang Iron-sulfur cluster: a key prosthetic group modulates regulatory mechanisms of transcriptional regulator ISCR in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	201
Abstract PP304-134 Sameh Magdeldin New proteomic insights on the role of NPR-A in regulating self-renewal of embryonic stem cells.....	202
Abstract PP307-135 Apanchanid Thepouyporn Characterization and cloning of anti-HIV-1 protein from <i>Canna indica</i> l. leaves....	203
Abstract PP321-136 Piengchai Kupradinun Effect of methanolic extract of neem flowers on mouse colon proteome during apoptosis in aom/dss-induced carcinogenesis.....	204
Abstract PP334-137 Ubon Cha'on Proteomic analysis of the kidney in monosodium glutamate treated rats.....	205

Abstract PP288-127

Heptaphylline induces human colon adenocarcinoma cell death by regulating apoptotic proteins

Chantana Boonyarat¹, Chavi Yenjai², Opa Vajragupta³, Prasert Reubroycharoen⁴ and Pornthip Waiwut⁵

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Natural Products Research Unit, Center for Innovation in Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Center of Excellence for Innovation in Drug Design and Discovery, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

⁴ Department of Chemical Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁵ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand, Tel: +66-45-353632; Fax: +66-45-288384

E-mail: phpornwa@ubu.ac.th

ABSTRACT

Heptaphylline is a carbazole in *Clausena harmandiana*, known as "Song Fa" in Thai, a health-promoting herb. It is used for treatment of illness, stomachache, and headache. In this study, we investigated the effects of heptaphylline on apoptosis of human colon adenocarcinoma cells (HT-29 cell line). The quantification of cell viability was performed by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Protein expression was observed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and visualized by immunoblotting. The results indicated that heptaphylline significantly induced HT-29 cell death through activated BH3 interacting-domain death agonist (Bid), a pro-apoptotic protein, and suppressed X-linked inhibitor-of-apoptosis protein (XIAP), the inhibitor of apoptosis protein. These actions resulted in the activation of caspase-3 and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1). All results demonstrated that heptaphylline induced human colon adenocarcinoma cell death by regulating Bid and XIAP proteins.

Supported by the Thailand Research Fund



ISSN: 1905-0852

IJPS

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน
Isan Journal of Pharmaceutical Sciences

Volume 11 (Supplement) March 2015

The 7th Northeast Pharmacy Research Conference of 2015

"Challenges and Opportunities of the Pharmacy Profession
in Post-Millennium Development Agenda"

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand

March 7-8, 2015

Research Article and Abstract

Oral Presentation

Poster Presentation



002-UBU-Oral-PS-Abstract

Synergistic Effect of Nimbolide on TNF- α - Induced Human Colon Adenocarcinoma Cell Death

Thanadit Kanabut¹, Chittarin Chuasong¹, Chavi Yenjai²,
Chantana Boonyarat³, Pornthip Walwut^{1,*}

Introduction: Tumor necrosis factor (TNF- α) is an inflammatory cytokine that plays an important role in the control of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. TNF- α has previously been used in anti-cancer therapy. However, the therapeutic application of TNF- α was largely limited due to its general toxicity and anti-apoptosis. To overcome this problem, the present study investigated the effect of four active constituents isolated from the medicinal plants, on TNF- α -induced apoptosis in human colon adenocarcinoma (HT-29) cells. **Materials and Method:** Four active constituents from medicinal plants, including duardin and violanone from *Dalbergia parviflora*, nimbolide from *Azadirachta indica* and zerumbone from *Zingiber zerubet*, were evaluated for cytotoxicity by using methyl tetrazolium 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and phase contrast microscopy. The effect of test compounds on apoptotic signaling proteins was investigated by using Western blot analysis. **Results:** The results exhibited that nimbolide showed the highest cytotoxicity towards HT-29 cell that was significantly different from the control group ($p < 0.01$). HT-29 cells were treated with nimbolide at various concentrations; 0, 0.1, 1, and 10 μ M, in the combination with TNF- α 80 ng/ml comparing with nimbolide alone. Nimbolide at concentration 10 μ M significantly induced cell death ($p < 0.01$). In combination group, nimbolide significantly enhanced TNF- α -induced cell death. In apoptotic pathway, nimbolide activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation and BH3 interacting-domain death agonist (Bid). In combination group, nimbolide markedly sensitized TNF- α -induced JNK, Bid and caspase-3 activation. **Conclusion:** As a result of all findings, our findings indicated that nimbolide showed the synergistic effect with TNF- α on cellular proliferation inhibition through enhancing cell apoptosis of HT-29 cells via JNK pathway.

Keywords: TNF- α , apoptosis, HT-29, Nimbolide, JNK pathway

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand.

²Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

* **Corresponding author:** Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand 34190 Tel 045-353632 e-mail: pwaiwut79@yahoo.com, phpornwa@mail2.ubu.ac.th

005-UBU-Oral-PS-Abstract

Synergistic Effect of Coumarin Compounds from *Clausena hamandiana* on TRAIL-Induced Colon Adenocarcinoma Cell Death

Binsukhon Nuthammachol¹, Kwankamon Buranakit¹, Chavi Yenjai²,
Chantana Boonyarat³, Pornthip Walwut^{1,*}

Introduction: TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) is a cytokine that can selectively induce apoptosis in cancer cells without damaging normal cells but a number of cancer cells are resistant to TRAIL-induced apoptosis. This study aimed to investigate a synergistic effect and a mechanism of coumarins from *Clausena hamandiana* on TRAIL-induced colon adenocarcinoma cell death. **Materials and methods:** The percent cell viability of HT-29 colon adenocarcinoma grade II cell line treated by coumarins combined with or without TRAIL was measured using MTT assay and the cell morphology was investigated by phase contrast microscope. The synergistic mechanism was studied by western blotting and reverse transcription PCR. **Results:** Dentatin and nordentatin at 100 μ M combined with TRAIL showed cytotoxicity in MTT assay (p -value < 0.01 and 0.001 , respectively). The cleavage of caspase-3 and PARP-1 were presented when 100 μ M of Nordentatin was combined with TRAIL. Cell viability of nordentatin at 10 μ M alone and combination with TRAIL were not different from the control group. The study of synergistic mechanism of nordentatin at 100 μ M combined with TRAIL showed the presentation of DR5 and the reduction of c-FLIP and Bid protein. The expression of DR5 was strongest when nordentatin was combined with TRAIL. **Conclusion:** Nordentatin enhances TRAIL-induced HT-29 colon adenocarcinoma apoptosis by increasing DR5 receptor expression.

Keywords: Dentatin, Nordentatin, TRAIL, DR5, Apoptosis

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand.

²Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

* **Corresponding author:** Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand 34190 Tel 045-353632 e-mail: pwaiwut79@yahoo.com, phpornwa@mail2.ubu.ac.th



The 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6)
January 21-23, 2016
Organized by Khon Kaen University

P181

Carbazole compounds of *Clausena hamandiana* sensitized TRAIL-induced colon adenocarcinoma cell death

Chantana Boonyarat^a, Chavi Yenjai^b, Opa Vajragutac, Pornthip Waiwut^{d,*}

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, Thailand,

^b Center of Natural Products Research Unit, Center for Innovation in Chemistry,
Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, Thailand,

^c Center for Excellence for Innovation in Drug Design and Discovery, Faculty of Pharmacy,
Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand,

^d Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University,
Ubon Ratchathani 34190, Thailand

* phpornwa@mail2.ubu.ac.th

phone +66-45353632

fax +66-45288384

ABSTRACT

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) is a cytokine that can selectively induce apoptosis in cancer cells without damaging normal cells. Regarding current research findings, a number of cancer cells are resistant to TRAIL-induced apoptosis. This study aimed to investigate the effect of carbazole derivatives, including heptaphylling and 7-methoxyheptaphylline from *Clausena hamandiana* on TRAIL-induced colon adenocarcinoma cell death. The percent cell viability of HT-29 colon adenocarcinoma grade II cell line, treated by carbazoles, and combined with or without TRAIL, was measured using MTT assay. The cell morphology was investigated by phase contrast microscope. The sensitizing mechanism was studied by Western blotting and Real-Time qRT-PCR (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR). The results showed that heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline at 100 μ M in combination with TRAIL showed cytotoxicity on HT-29 cells correlating with the presence of the cleavage of caspase-3 and PARP-1 by 7-methoxyheptaphylline was more potent than heptaphylline. The study of sensitizing mechanism of 7-methoxyheptaphylline at 10 μ M on TRAIL-induced HT-29 cell showed that 7-methoxyheptaphylline increased the TRAIL receptor (death receptor 5, DR5) expression. This study indicated that 7-methoxyheptaphylline, a carbazole derivative enhanced TRAIL-induced HT-29 colon adenocarcinoma apoptosis through DR5 up-regulation.

Keywords: Carbazole, *Clausena hamandiana*, TRAIL, DR-5, apoptosis, cancer

WEB OF SCIENCE™



Search

My Tools ▾ | Search History | Marked List

Full Text Options ▾ |  Look Up Full Text |  | Save to EndNote online | Add to Marked List

1 of 1

Heptaphylline Induces Apoptosis in Human Colon Adenocarcinoma Cells through Bid and Akt/NF-kappa B (p65) Pathways

By: Boonyarat, C (Boonyarat, Chantana)^[1]; Yenjai, C (Yenjai, Chavi)^[2]; Vajragupta, O (Vajragupta, Opa)^[3]; Waiwut, P (Waiwut, Pomthip)^[4]

ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION
Volume: 15 Issue: 23 Pages: 10483-10487
DOI: 10.7314/APJCP.2014.15.23.10483
Published: 2014
[View Journal Information](#)

Abstract

Heptaphylline derivatives are carbazoles in Clausena harmandiana, a medicinal plant that is utilized for headache, stomach ache, and other treatments of illness. The present study examined the effects of heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline on apoptosis of human colon adenocarcinoma cells (HT-29 cell line). Quantification of cell viability was performed using cell proliferation assay (MTT assay) and of protein expression through immunoblotting. The results showed that only heptaphylline, but not 7-methoxyheptaphylline, significantly activated cleaved of caspase-3 and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) which resulted in HT-29 cell death. We found that heptaphylline activated BH3 interacting-domain death agonist (Bid) and Bak, proapoptotic proteins. In contrast, it suppressed X-linked inhibitor-of-apoptosis protein (XIAP), Bcl-xL and survivin, inhibitors of apoptosis. In addition, heptaphylline inhibited activation of NF-kappa B/p65 (rel), a regulator of apoptotic regulating proteins by suppressing the activation of Akt and IKK alpha, upstream regulators of p65. The findings suggested that heptaphylline induces apoptosis in human colon adenocarcinoma cells

Keywords

Author Keywords: Heptaphylline; colon adenocarcinoma cells; Bid; XIAP; Bcl-xL; Akt; p65
KeyWords Plus: ALPHA-INDUCED APOPTOSIS; CHEMICAL-CONSTITUENTS; CLAUSENA-HARMANDIANA; CANCER; DEATH; CHEMOTHERAPY; PROGRESSION; ACTIVATION; COUMARINS; HALLMARKS

Author Information

Reprint Address: Waiwut, P (reprint author)
 Ubon Ratchathani Univ, Fac Pharmaceut Sci, Ubon Ratchathani, Thailand.

Addresses:

-  [1] Khon Kaen Univ, Fac Pharmaceut Sci, Khon Kaen, Thailand
-  [2] Khon Kaen Univ, Ctr Nat Prod Res Unit, Ctr Innovat Chem, Dept Chem,Fac Sci, Khon Kaen, Thailand
-  [3] Mahidol Univ, Fac Pharm, Ctr Excellence Innovat Drug Design & Discovery, Bangkok 10700, Thailand
-  [4] Ubon Ratchathani Univ, Fac Pharmaceut Sci, Ubon Ratchathani, Thailand

E-mail Addresses: pwaiwut79@yahoo.com

Funding

Funding Agency	Grant Number
Thailand Research Fund	TRG5780035

[View funding text](#)

Citation Network

0 Times Cited

29 Cited References

[View Related Records](#)

 [View Citation Map](#)

 [Create Citation Alert](#)

(data from Web of Science™ Core Collection)

All Times Cited Counts

1 in All Databases

0 in Web of Science Core Collection

0 in BIOSIS Citation Index

1 in Chinese Science Citation Database

0 in Data Citation Index

0 in Russian Science Citation Index

0 in SciELO Citation Index

Usage Count

Last 180 Days: 4

Since 2013: 4

[Learn more](#)

This record is from:

Web of Science™ Core Collection

Suggest a correction

If you would like to improve the quality of the data in this record, please [suggest a correction](#).

...webofknowledge.com/InboundServi...

1/2

Publisher

ASIAN PACIFIC ORGANIZATION CANCER PREVENTION, APJCP HEAD OFFICE, KOREAN NATL
CANCER CENTER, 323 ILAN -RO, ILSANDONG-GU, GOYANG-SI, GYEONGGI-DO, 410-769, SOUTH
KOREA

Categories / Classification

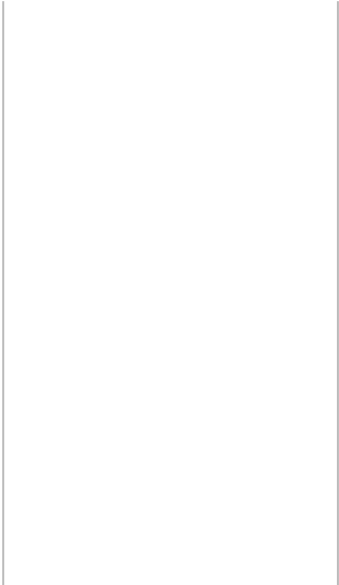
Research Areas: Oncology
Web of Science Categories: Oncology

Document Information

Document Type: Article
Language: English
Accession Number: WOS:000351058400074
PubMed ID: 25556496
ISSN: 1513-7368

Other Information

IDS Number: CD4MZ
Cited References in Web of Science Core Collection: 29
Times Cited in Web of Science Core Collection: 0



RESEARCH ARTICLE

Heptaphylline Induces Apoptosis in Human Colon Adenocarcinoma Cells through Bid and Akt/NF- κ B (p65) Pathways

Chantana Boonyarat¹, Chavi Yenjai², Opa Vajragupta³, Pornthip Waiwut^{4*}

Abstract

Heptaphylline derivatives are carbazoles in *Clausena harmandiana*, a medicinal plant that is utilized for headache, stomach ache, and other treatments of illness. The present study examined the effects of heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline on apoptosis of human colon adenocarcinoma cells (HT-29 cell line). Quantification of cell viability was performed using cell proliferation assay (MTT assay) and of protein expression through immunoblotting. The results showed that only heptaphylline, but not 7-methoxyheptaphylline, significantly activated cleavage of caspase-3 and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) which resulted in HT-29 cell death. We found that heptaphylline activated BH3 interacting-domain death agonist (Bid) and Bak, proapoptotic proteins. In contrast, it suppressed X-linked inhibitor-of-apoptosis protein (XIAP), Bcl-xL and survivin, inhibitors of apoptosis. In addition, heptaphylline inhibited activation of NF- κ B/p65 (rel), a regulator of apoptotic regulating proteins by suppressing the activation of Akt and IKK α , upstream regulators of p65. The findings suggested that heptaphylline induces apoptosis in human colon adenocarcinoma cells.

Keywords: Heptaphylline - colon adenocarcinoma cells - Bid - XIAP - Bcl-xL - Akt - p65

Asian Pac J Cancer Prev, 15 (23), 10483-10487

Introduction

Cancer is a disease of deregulated cell proliferation and inhibition of apoptosis. The deregulated growth found in cancer cells is frequently attributed to the loss of control in proliferation and program cell death processing (Evan and Vousden, 2001). The treatment of cancers has broadly been unsuccessful because of its uncontrolled growth. Therefore, it is highly required for the improvement of novel and effective chemotherapeutic agents, which contains a capacity to target various signaling pathways to interfere cell growth signaling, to promote the death of cancer cells.

Apoptosis is a programmed cell death that occurs during multiple important physiological conditions, for example, embryonic development, tissue remodeling, the maintenance of homeostasis, and immune repertoires. The deregulation of apoptosis is the cause of diseases, including cancers, autoimmune diseases and neurodegenerative disorders (Okada and Mak, 2004; Sankari et al., 2012). Apoptosis is also considered the basis for cancer treatment to target cancerous cells but not normal cells in order to limit the cytotoxicity from chemotherapy (Debatin et al., 2004; Irene et al., 2005; Millimouno et al., 2014).

Induction of apoptosis causes the activation of Bid protein and Bid can activate mitochondria via direct interaction with Bax or Bak. Cytosolic Bid is cleaved at the amino terminus to generate a truncated form of Bid (tBid) that mediates cytochrome C release from mitochondria, which serves as an amplification signal by activating downstream effectors, including caspase-3 lead to cleaving of cellular proteins, such as poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) (Perez and White, 2000; Chen et al., 2006; Stevenson et al., 2007; Pei et al., 2007; Alenzi et al., 2010; Kantari and Walczak, 2011; Alshammari et al., 2014). Caspase cascade can be blocked by antiapoptotic proteins, for instance, cIAP1/2, Bcl-xL, Mcl-1, survivin and XIAP (Thorburn et al., 2008). One mechanism of cancer cells to escape apoptosis is overexpression of antiapoptotic proteins. The efficacy of many chemotherapeutics is due to their capacity to induce the death of tumor cells by apoptosis. Apoptosis-inducing compounds are commonly regarded as candidate anticancer agents (Hanahan and Weinberg, 2000; Debatin and Krammer, 2004; Hanahan and Weinberg, 2011; Meiyanto et al., 2012; Pan et al., 2014).

Clausena harmandiana, known as "Song Fa" in Thai, belongs to the Rutaceae family widely distributed in Southeast Asia. In Thailand, especially in the northeastern

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, ²Center of Natural Products Research Unit, Center for Innovation in Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, ³Center for Excellence for Innovation in Drug Design and Discovery, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, ⁴Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand *For correspondence: pwaiwut79@yahoo.com, phpornmwa@ubu.ac.th

part, the young leaves are accounted as a vegetable in Thai traditional foods and as ruminants feed. *C. harmandiana* is regarded as the herb for health and it is utilized for the headache, stomachache, and illness treatment. It had been reported that the roots of this plant included plenty of carbazole alkaloids together with coumarins (Aouacheria et al., 2002; Thongthoom et al., 2010). Carbazoles and coumarins have been isolated and evaluated for antimalarial, antifungal, and anti-TB. Carbazole alkaloids were a main component of the *Clausena* genus, especially *Clausena excavata*, *Clausena anisata* and *Clausena harmandiana*. It had been found that carbazole alkaloids showed various pharmacological properties, consisting of anticancer, antiplatelet aggregation and vasorelaxing, antimycobacterial, anti HIV-1, antiplasmodial, antimicrobial, anti-inflammatory, and cytotoxicity against the leukemia cell line, through inhibiting topoisomerase II and antidiabetes activity (Ito et al., 2000; Yenjai et al., 2000; Songsiang et al., 2011). The major carbazole components in *C. harmandiana* were heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline (Figure 1A), which showed cytotoxicity against the NCI-H187 cell line (Thongthoom et al., 2001). This study investigates the apoptotic effects of heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline from *C. harmandiana* on HT29 colorectal adenocarcinoma cells.

Materials and Methods

Cell culture

HT-29 cells are maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (high glucose) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin and

100 µg/ml streptomycin at 37°C in 5% CO₂. The quantification of cell viability is performed by using the cell proliferation reagent MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). HT-29 cells are plated in 96-well microplates at 6x10³ cells/wells, and then incubated for 24h.

Cell cytotoxicity assay

Cells are treated with heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline (Yenjai, 2000) at different concentrations and reference compound (doxorubicin) for 24 and 48h. Add 10 µl MTT Reagent (5mg/ml). They are incubated for 2 to 4 hours until purple precipitate is visible. The absorbance at 570 nm is measured. Percentage calculation of cell viability uses the following formula;

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{Absorbance of treated cells}}{\text{Absorbance of control (untreated cells)}} \times 100$$

Cell morphology is examined by Phase contrast microscope.

Preparation of cell extracts

In order to investigate the mechanism of the compounds on apoptotic pathway in HT29 cells, cells are treated with the test compounds at different concentrations for 4h. Whole cell lysates are prepared with lysis buffer (25mM HEPES pH7.7, 0.3mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 10% Triton X-100, 20mM β-glycerophosphate, 1mM sodium orthovanadate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1mM dithiothreitol (DTT), 10 µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml leupeptin). Cell lysate is collected from supernatant after centrifugation at 14,000 rpm for 10min.

Immunoblotting

Cell lysate is resolved by SDS-PAGE and transferred to an Immobilon-P-nylon membrane (Millipore). The membrane is treated with BlockAce (Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd, Suita, Japan) and probed with primary antibodies (anti-caspase-3, PARP-1, phosphor-P65, P65, Bcl-2, BID, survivin, XIAP, and anti-actin antibodies). The antibodies are detected by the use of horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-mouse, and anti-goat IgG (DAKO, Glostrup, Denmark), and visualized by the enhanced chemiluminescence system (Amersham Biosciences).

Results

Effects of heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline on viability of HT-29 cells

To examine whether carbazole extract of *C. harmandiana* inhibited viability of HT-29 cells, the cells were treated with 100 µM heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline and 10 µg/ml doxorubicin (reference compound) for 24 and 48h then cell viabilities were determined by MTT assay. Both heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline showed cytotoxicity on HT-29 cells by heptaphylline showed more stronger than 7-methoxyheptaphylline. Cell viability at 24h was decreased to 59.92% with 7-methoxyheptaphylline and 23.37% with heptaphylline. In addition, heptaphylline caused significantly decreased

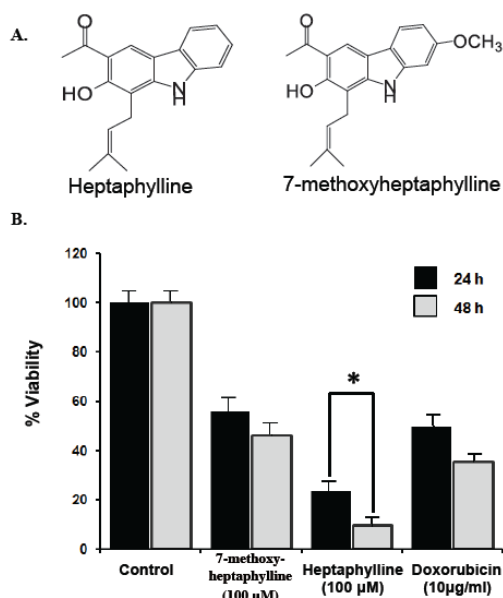


Figure 1. Effects of Heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline on Viability of HT-29 Cells. A) Chemical structure of heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline. B) HT-29 cells were treated with 100 µM, heptaphylline 7-methoxyheptaphylline and 10 µg/ml doxorubicin (reference compound) for 24 and 48h. Cell proliferation was determined by MTT assay. *p<0.001

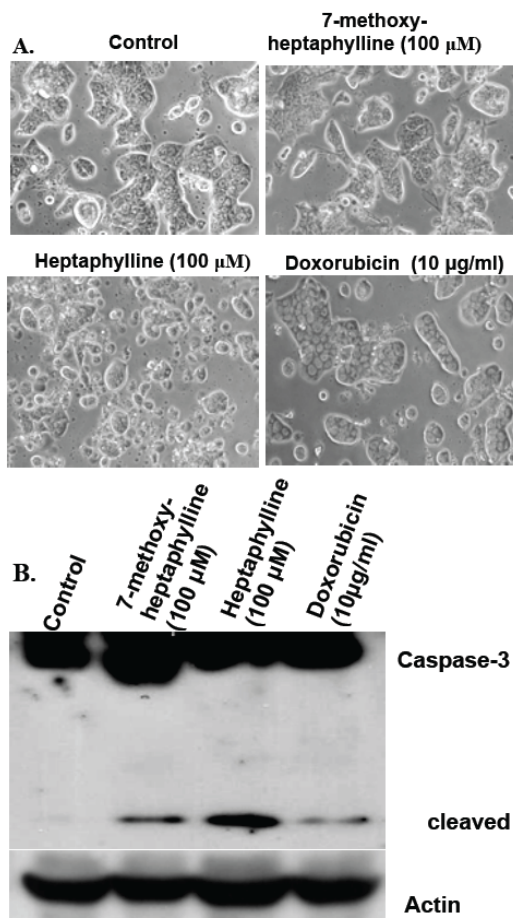


Figure 2. Effects of Hetaphylline and 7-methoxyheptaphylline on HT-29 Cell Apoptosis. A) Cells were treated with 100 μ M, heptaphylline 7-methoxyheptaphylline and 10 μ g/ml doxorubicin (reference compound) for 24 h. Cell morphology was investigated by phase contrast microscope. B) Whole cell extract was prepared, and analyzed by Western blotting using anti-caspase-3 and β -actin antibodies. Arrows indicate cleaved forms of caspase-3 in cell number at 48h (Figure 1B). This result indicated that heptaphylline strongly induced death of HT-29 cancer cells.

Effects of hetaphylline and 7-methoxyheptaphylline on apoptotic responses of HT-29 cells.

To test the effect of the compounds on HT-29 cell morphology, cells were treated with 100 μ M of hetaphylline and 7-methoxyheptaphylline or doxorubicin (positive control) for 24h and morphological changes were observed by phase contrast microscopy. The result showed that hetaphylline, 7-methoxyheptaphylline and doxorubicin induced morphology change of cell death consisting of rounding and shrinkage of cells by heptaphylline exhibited strongest effect on HT-29 cells (Figure 2A). The result indicated that heptaphylline markedly induced cell death morphological changes. As shown in Figure 2B, heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline and doxorubicin induced cleavage of caspase-3, cellular pro-apoptotic responses by heptaphylline showed strongest apoptosis-promoting activity in HT-29 cells. To confirm the effects of heptaphylline on HT-29 cell proliferation, cells were

treated with various concentrations of heptaphylline for 24 and 48h and the cell viability were examined by MTT assay. Heptaphylline significantly inhibited cell growth at concentrations 25, 50 and 100 μ M in a dose- and time-dependent manner with 50 % growth inhibitory concentration (IC_{50}) value of 60.67 μ M at 24h and 46.72 μ M at 48h respectively (Figure 3A). The apoptotic effects of heptaphylline were investigated by determining the cleavage of caspase-3 and PARP-1 using Western blot analysis. The result in Figure 3B showed that heptaphylline markedly induced the cleavage of caspase-3 and PARP-1 in a concentration-dependent manner. The results indicated that heptaphylline has apoptotic effect to HT-29 cells.

Heptaphylline induced bid activation and inhibited phosphorylation of Akt/NF- κ B(p65) pathway

To understand the mechanism by which heptaphylline exerts its apoptotic effects, we next examined the effect of heptaphylline on the expression of key proteins involved in apoptosis regulation including Bid, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, XIAP, and survivin by using immunoblotting assay. The results in Figure 4A showed that heptaphylline at concentration 25 μ M markedly induced cleavage of Bid correlation with increasing in Bak protein. In contrast, the expression of XIAP, Bcl-xL and survivin, but not Bcl-2 and Mcl-1 was inhibited. It has been reported that the nuclear transcription factor, NF- κ B/p65 (rel) has important role to control expression of many anti-apoptotic proteins consisting of Bcl-xL, survivin and XIAP. Therefore, we further observed the proteins involved in p65 signaling

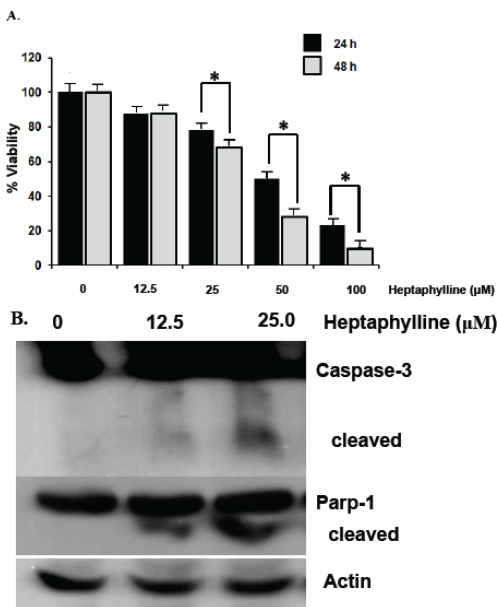


Figure 3. Apoptotic Effect of Hetaphylline in HT-29 Cells. A) HT-29 cells were treated with various concentrations of heptaphylline for 24 and 48h. Cell proliferation was determined by MTT assay. B) Cells were treated with various concentrations of heptaphylline for 4 h. Whole cell extract was prepared, and analyzed by Western blotting using anti-caspase-3, PARP-1 and β -actin antibodies. Arrows indicate cleaved forms of caspase-3 and PARP. * p <0.01

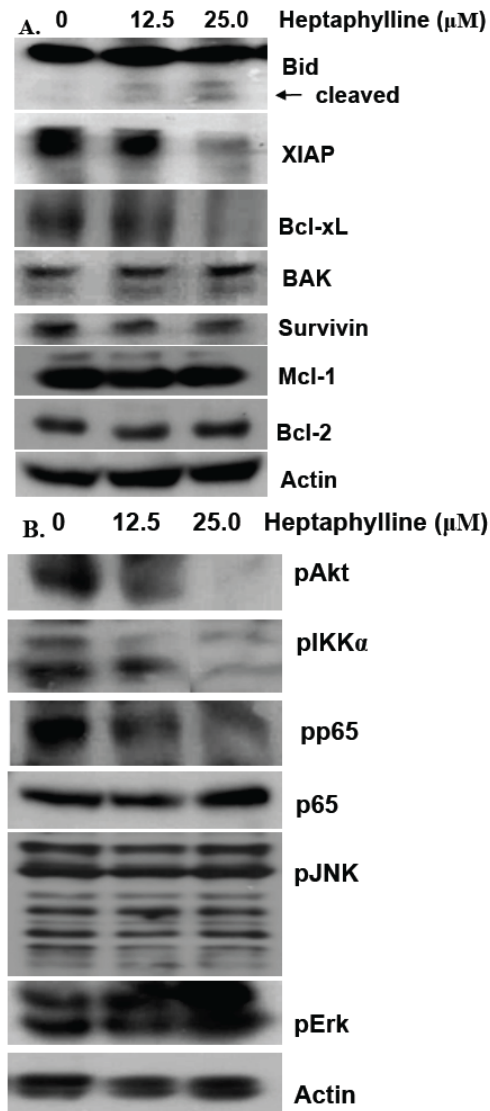


Figure 4. Heptaphylline induced Bid Activation and Inhibited Akt/NF- κ B (p65) Pathway in HT-29 Cells.

Cells were treated with various concentrations of heptaphylline for 4h. Whole cell extract was prepared, and analyzed by Western blotting utilizing Bid, Bak, Mcl-1, Bcl-xL, survivin, XIAP, Bcl-2, phospho-p65, IKK α , Akt, JNK, Erk and β -actin antibodies. A) Effect of heptaphylline on apoptotic regulating proteins. B) Effect of heptaphylline on Akt, IKK α , p65, JNK and Erk phosphorylation

pathways and found that heptaphylline suppressed Akt, IKK α and p65 phosphorylation in the dose dependent manner but it has no effect to JNK and Erk phosphorylation (Figure 4B). This result indicated that heptaphylline induced apoptosis by induced Bid activation and inhibited Akt/NF- κ B (p65) pathway.

Discussion

Heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline are a carbarzole isolated from the roots of *Clausena harmandiana* which exhibited cytotoxicity against NCI-H187 (human small cell lung cancer cells) and KB cells (human epidermoid carcinoma of oral cavity cell

lines) (Ito et al., 2000; Yenjai et al., 2000; Thongthoom et al., 2011; Wangboonskul and Yenjai., 2012). In this study we test the apoptotic effects of heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline on human colon adenocarcinoma cell line (HT-29). Heptaphylline showed more stronger apoptotic effects than 7-methoxyheptaphylline by induced cell death morphology change of HT-29 colon adenocarcinoma cells. In order to control cell proliferation or in response to stimuli, cells undergo death through a process called apoptosis or programmed cell death. The understanding of apoptosis has provided the basis for new targeted therapies that can induce death in cancer cells. Most of the cytotoxic anticancer agents in present use have been shown to induce apoptosis in cancer cells such as etoposide, capsaicin, berberine, gomisins N and doxorubicin (Ghobrial et al., 2005; Wong, 2011). The anti-cancer drug etoposide is able to induce caspase-8 processing and apoptosis in cancer cells, capsaicin induces apoptosis through cellular stress, involving mitochondria and endoplasmic reticulum in several human cancer cells, berberine, an isoquinoline alkaloid, has several pharmacological properties and can affect in different levels the mitochondrial functions, gomisins N, a dibenzocyclooctadiene lignan, isolated from *Schizandra chinensis* Baill induced apoptosis of human leukemia U937 cells and doxorubicin also induces apoptosis in many cancer cells (Kim et al., 2010; Liu et al., 2011; IP et al., 2012). In apoptotic pathways, the Bcl-2 family of proteins are significant regulators of apoptosis and include both anti-apoptotic members (such as Bcl-2, Mcl-1, survivin and Bcl-xL) and pro-apoptotic members (for example, Bax, Bak, Bad, Bid, and Bik) (Wong, 2011). Antiapoptotic proteins acts as suppressors of apoptosis by blocking the activation of cytochrome-C and caspase-3, whereas proapoptotic members act as apoptosis promoters and are overexpressed in massive malignancies. In response to apoptotic stimuli, proapoptotic proteins undergo posttranslational modifications that include dephosphorylation and cleavage resulting in activation of Bid, which oligomerizes Bak or Bax into pores that result in the release of cytochrome C. Cytochrome C, once released in the cytosol, interacts with Apaf-1, leading to the activation of caspase-9 proenzymes. Active caspase-9 then activates caspase-3, which subsequently activates the cleavage of PARP-1 and leads to apoptosis. Increased expression of antiapoptotic proteins causes resistance to chemotherapeutic drugs, while decreasing antiapoptotic proteins expression may promote apoptotic responses to anticancer drugs. In this study, heptaphylline activated cleavage of caspase-3, PARP-1 and proapoptotic proteins, Bid, Bak. In contrast, it inhibits antiapoptotic proteins including Bcl-xL, XIAP and survivin (Korsmeyer et al., 2000; Thorburn, Behbakht and Ford, 2008). It has been reported that the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are regulated by proteins, for instance, the p53 and NF- κ B pathways. NF- κ B is a nuclear transcription factor that regulates expression of many genes involved in the regulation of apoptosis, the activation of NF- κ B induces resistance to apoptotic stimuli through the activation of a number of complex proteins including Bcl-xL, survivin, and X-linked IAP (XIAP). Moreover, previous reports

have shown that NF- κ B also suppressed Bid activation through increase TRAF resulting in inhibition of Bid activation via TRAF expression induction (Shukla, et al., 2004; Dai, et al., 2005; Mendoza, et al., 2005; Namba et al., 2007). To investigate the role of NF- κ B in heptaphylline-mediated apoptotic regulators regulation, we treated cells with heptaphylline in various concentrations and assessed Akt, IKK α and NF- κ B/p65 (rel) phosphorylation. We found that heptaphylline acts as Akt/NF- κ B (p65) pathway inhibitor in concentration-dependent manner. According to all of above, heptaphylline activates proapoptotic proteins (Bid and Bak) and suppresses expression of antiapoptotic proteins including Bcl-xL, XIAP and survivin that lead to apoptosis of HT-29 cancer cells and the regulation may involve in Akt/NF- κ B (p65) pathway. Indicating that heptaphylline acts as apoptotic inducing agent which could be developed to be a potential anticancer agent.

Acknowledgements

This study was supported by Thailand Research Fund (No. TRG5780035)

References

- Aouacheria A, Neel B, Bouaziz ZR, et al (2002). Carbazolequinone induction of caspase-dependent cell death in Src-overexpressing cells. *Biochem Pharmacol*, **64**, 1605-16.
- Chen X, Ding WX, Ni HM, et al (2006). Bid-independent mitochondrial activation in tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis and liver injury. *Mol Cell Biol*, **27**, 541-53.
- Dai Y, Rahmani M, Dent P, et al (2005). Kinase 1 Activation Downregulation, and c-Jun N-terminal mediated by oxidative damage, XIAP leukemia cells through a process NF- κ B activation potentiates apoptosis in inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and blockade. *Mol Cell Biol*, **25**, 5429.
- Debatin KM, Krammer PH (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*, **23**, 2950-66.
- Evan GI, Vousden KH (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, **411**, 342-8.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, **55**, 178-94.
- Hanahan D and Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646-74.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Ip SW, Lan SH, Lu HF, et al (2012). Capsaicin mediates apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW 039 cells through mitochondrial depolarization and endoplasmic reticulum stress. *Hum Exp Toxicol*, **31**, 539-49.
- Ito C, Itoigawa M, Katsuno S, et al (2000). Chemical constituents of *Clausena excavata*: isolation and structure elucidation of novel furanone-coumarins with inhibitory effects for tumor-promotion. *J Nat Prod*, **63**, 1218-24.
- Kantari C, Walczak H (2011) Caspase-8 and Bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **1813**, 558-63.
- Kim JH, Choi YW, Park C, et al (2010). Apoptosis induction of human leukemia U937 cells by gomisin N, a dibenzocyclooctadiene lignan, isolated from *Schizandra chinensis* Baill. *Food Chem Toxicol*, **48**, 807-13.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, et al (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome C. *Cell Death Differ*, **7**, 1166-73.
- Liu J, Uematsu H, Tsuchida N, et al (2011). Essential role of caspase-8 in p53/p73-dependent apoptosis induced by etoposide in head and neck carcinoma cells. *Mol Cancer*, **31**, 95.
- Mendoza FJ, Espino PS, Cann KL, et al (2005). Anti-tumor chemotherapy utilizing peptide-based approaches- apoptotic pathways, kinases, and proteasome as targets. *Arch Immunol Ther Exp*, **53**, 47-60.
- Millimouno FM, Dong J, Yang L, Li J, Li X (2014). Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. *Cancer Prev Res*, **7**, 1081-107.
- Namba H, Saenko V, Yamashita S (2007). Nuclear factor- κ B in thyroid carcinogenesis and progression: a novel therapeutic target for advanced thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metab*, **51**, 843-51.
- Okada H, Mak TW (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, **4**, 592-603.
- Pei Y, Xing D, Gao X, Liu L, Chen T (2007) Real-time monitoring full length bid interacting with Bax during TNF-alpha-induced apoptosis. *Apoptosis*, **12**, 1681-90.
- Perez D, White E (2000). TNF-alpha signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B 19K. *Mol Cell*, **6**, 53-63.
- Shukla S, MacLennan GT, Fu P, et al (2004). Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression. *Neoplasia*, **6**, 390-400.
- Songsiang U, Thongthoom T, Boonyarat C, Yenjai C (2011). Claurailas A-D, cytotoxic carbazole alkaloids from the roots of *Clausena harmandiana*. *J Nat Prod*, **74**, 208-12.
- Stevenson HS, Fu SW, Pinzone JJ, et al (2007). BP1 transcriptionally activates bcl-2 and inhibits TNF-alpha-induced cell death in MCF7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, **9**, 60.
- Thongthoom T, Songsiang U, Phaosiri C, Yenjai C (2010). Biological activity of chemical constituents from *Clausena harmandiana*. *Arch Pharm Res*, **33**, 675-80.
- Thongthoom T, Promsuwan P, Yenjai C (2011). Synthesis and cytotoxic activity of the heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline series. *Eur J Med Chem*, **9**, 3755-61.
- Thorburn A, Behbakht K, Ford H (2008). TRAIL receptor-targeted therapies: resistance mechanisms and strategies to avoid them. *Drug Resist Updat*, **11**, 17-24.
- Wangboonskul J, Yenjai C (2012). Antioxidant activity and cytotoxicity against cholangiocarcinoma of carbazoles and coumarins from *Clausena harmandiana*. *Science Asia*, **38**, 75-81.
- Wong RS (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment 1-14. *J Exp Clin Cancer Res*, **30**, 87.
- Yenjai C, Sripontan S, Sripajun P, et al (2000). Coumarins and carbazoles with antiplasmodial activity from *Clausena harmandiana*. *Planta Med*, **66**, 277-9.