Thesis Title **Effect of Curcumin on TPA-induced *mdr1* and *c-fos* Genes Expression in Human Keratinocytes**

Author **Miss Sasisopin Luekumharn**

M.S. **Biochemistry**

Examination committee

Associate Professor	**Dr. Porn-ngam Limtrakul**	**Chairman**
Associate Professor	**Dr. Luksana Makonkawkeyoon**	**Member**
Dr. Udompun	**Khansuwan**	**Member**

Abstract

Multi-drug resistance (MDR) is the phenomenon in which chemotherapeutic treatment of human cacer fail to respond to chemotherapeutic agents. This phenomenon has been shown to be caused by the overexpression of a membrane-associated protein called P-glycoprotein, Pgp, which acts as a drug efflux pump. Pgp not only cause an increase in drug excretion from cells, but also a decrease in intracellular drug accumulation, thereby reducing the intracellular drug contents and resulting in a decrease in its cytotoxicity. A variety of studies have tried to find potent MDR modulators, which increase drug accumulation in cancer cells. Most of chemotherapeutic agents are synthetic compounds. Therefore, this study is interested in introducing a natural product, curcumin, as an adjuvant in cancer treatment.

Curcumin is a phenolic compound in the rhizome of *Curcuma longa*, and is endowed with beneficial biological activities, including antioxidant, antiinflammatory, anti-mutagenic and anti-carcigenic. The aims of this study were to examine the effect of curcumin on TPA-induced *mdr1* and *c-fos* genes expression in human keratinocytes. KB-V0 cervical carcinoma cells were also used as a positive control. The membrane and nuclear proteins were isolated and analyzed by Western blot analysis.

The first aim of this study was to determine the effect of TPA-induced *mdr1* and *c-fos* genes expression. Human keratinocytes were incubated with 160 nM TPA for 0.5, 1, 2, 4 and 18 h. The result showed that TPA induced c-fos protein expression maximally at 2 h. After that, it was decreased to low level and down-regulated at 18 h. In contrast to c-fos protein, TPA could not induce Pgp expression in human keratinocytes through the observation time. The KB-V0 cells were exposed to 160 nM TPA at the same incubation time as in the case of human keratinocytes. The result showed that TPA induced Pgp expression maximally at 1 h and c-*fos* expression maximally at 2 h.

The second aim of this study was to futher investigate the effects of curcumin on TPA-induced *mdr1* and c-*fos* genes expression. For determination of c-*fos* expression in human keratinocytes, the cells were pretreated 1 h with 20, 40 and 50 μ M curcumin followed by 2 h treatment with TPA. For determination of *mdr1* and c-fos genes expression in KB-V0 cells, the cells were pretreated 1 h with curcumin 40, 60 and 80 μM followed by 1 h treatment with TPA for Pgp and 2 h treatment with TPA for *c-fos* gene. The results showed that curcumin inhibited TPA -induced *mdr1* and *c-fos* expression in a dose-dependent manner.

This work suggests molecular mechanism of the Pgp expression through *c-fos* as follows: (i) in KB-V0 cell lines, the increased expression of *c-fos* leading to the increased formation of the AP-1 complex and increased binding of AP-1 to the AP-1 binding site affects the increased Pgp expression (ii) in human keratinocytes, the increased *c-fos* expression act as a strong negative regulation which supressed Pgp expression, and curcumin inhibited these mechanisms resulting in decreased Pgp expression.

In conclusion, TPA can induce Pgp expression through *c-fos* in cancer cells and differently-from normal cell. Moreover, it has been shown that curcumin can inhibit Pgp expression; therefore, curcumin could be used as an MDR reversing agent to inhibit Pgp expression.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	**ผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของยีนดื้อยาและยีนซีฟอสซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วยสารทีพีเอในเซลล์ผิวหนังของมนุษย์**
ชื่อผู้เขียน	**นางสาว ศศิโศภิณ ลือคำหาญ**
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	**สาขาวิชาชีวเคมี**
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	

รศ.ดร. พรงาม	**อิ้มตระกูล**	**ประธานกรรมการ**
รศ.ดร ลักษณา	**มครแก้วเกยูร**	**กรรมการ**
ดร.อุดมภัณฑ์	**ขาลสุวรรณ**	**กรรมการ**

บทคัดย่อ

การดื้อยาเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง โดยผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัด ไม่สามารถตอบสนองต่อยาเคมีที่รักษา เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีโปรตีนที่เรียกว่า P-glycoprotein (Pgp) อยู่ที่ผิวเซลล์เป็นจำนวนมาก และทำหน้าที่สำคัญในการนำยาออกสู่นอกเซลล์ ดังนั้นจึงทำให้ยาที่ใช้ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ จากการศึกษาที่ผ่านมา ได้มีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาถึงยาที่มีคุณสมบัติในการปรับเปลี่ยนลักษณะการดื้อยาของเซลล์มะเร็งทำให้สามารถช่วยเพิ่มการสะสมยาภายในเซลล์มะเร็งมากขึ้น ในปัจจุบันยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งมักเป็นยาที่ได้มาจากการสังเคราะห์ขึ้นมาทางวิทยาศาสตร์ ดังนั้นจึงมีความสนใจสารสกัดจากธรรมชาติที่จะนำมาใช้ในการรักษามะเร็ง

เคอร์คิวมินเป็นสารพวกฟีนอลิกที่สกัดได้จากรากเหง้าของขมิ้น มีคุณสมบัติเป็นตัวต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ต้านการอักเสบ ต้านการกลายพันธุ์ และต้านการเกิดมะเร็ง การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของยีนดื้อยาและยีนซีฟอส ซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วยสารทีพีเอในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ในระดับการแปลข้อความด้วยวิธีการ Western blotโดยใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูกเป็นตัวเปรียบเทียบ

วัตถุประสงค์ข้อแรกศึกษาการแสดงออกของยีนดื้อยาและยีนซีฟอสเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยสารทีพีเอ จากการศึกษาพบว่าการกระตุ้นเซลล์ผิวหนังมนุษย์ด้วยสารทีพีเอ 160 nM เป็นเวลา 0.5, 1, 2 และ4 ชั่วโมง สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนซีฟอสได้สูงสุดที่เวลา 2 ชั่วโมง และเกิดการควบคุมเชิงลบเมื่อกระตุ้นเซลล์เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่วนโปรตีนที่ถูกถอดรหัสโดยยีนดื้อยา Pgp เมื่อกระตุ้นด้วยสารทีพีเอ 160 nM เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4 และ 18 ชั่วโมง ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ Pgp ได้ แต่เมื่อนำเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ดื้อยา vinblastine, KB-V0, ที่มีระดับการแสดงออกของ Pgp อยู่แล้วมากระตุ้นด้วยสารทีพีเอ ในปริมาณและเวลาที่เท่ากัน พบว่าสารทีพีเอสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ Pgp ได้สูงสุดที่เวลา 1 ชั่วโมง และสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนซีฟอสได้สูงสุดที่เวลา 2 ชั่วโมง

วัตถุประสงค์ข้อที่สองของการศึกษานี้ศึกษาผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของยีนดื้อยาและยีนซีฟอสเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยสารทีพีเอ โดยยีนซีฟอสในเซลล์ผิวหนังมนุษย์นั้น บ่มเซลล์ผิวหนังมนุษย์ด้วยเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 50 μM หลังจากนั้นนำเซลล์มากระตุ้นด้วยสารทีพีเอ 2 ชั่วโมง ส่วนยีนดื้อยาและยีนซีฟอสในเซลล์ KB-V0 บ่มเซลล์ KB-V0 ด้วยเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 40, 60 และ 80 μM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์มากระตุ้นด้วยสารทีพีเอเป็นเวลา 1 ชั่วโมงสำหรับยีนดื้อยาและ 2 ชั่วโมงสำหรับยีนซีฟอส พบว่าเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นต่างๆกันนี้สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองนี้ได้ โดยการยับยั้งเป็นไปในลักษณะแปรผันตามความเข้มข้น

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้เสนอกลไกการแสดงออกของ Pgp ผ่าน c-fos ดังนี้ (1) ในเซลล์มะเร็ง c-fos expression ที่เพิ่มขึ้นทำให้เกิด AP-1 complex เพิ่มขึ้น และ ไปจับที่ AP-1 binding site กระตุ้นให้มีการแสดงออกของ Pgp สูงขึ้น (2)ในเซลล์ผิวหนังมนุษย์การแสดงออกของ c-fos ที่เพิ่มขึ้น ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมทางลบ (negative regulation) คือ กดการแสดงออกของ Pgp ทำให้ไม่พบการแสดงออกของมัน และเคอร์คิวมินยับยั้งการแสดงออกของกลไกเหล่านั้น เป็นผลให้ลดการแสดงออกของ Pgp

กล่าวโดยสรุป การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า สารทีพีเอสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ Pgp ผ่าน c-fos ในเซลล์มะเร็งและแตกต่างจากเซลล์ปกติ และพบว่าเคอร์คิวมินเป็นสารจากธรรมชาติตัวหนึ่งที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนดื้อยาและยีนซีฟอสในเซลล์มะเร็งปากมดลูกและยีนซีฟอสในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ได้