Thesis Title Effect of Bioflavonoids on P-glycoprotein Function and Expression in Human Cervical Carcinoma Cells

Author Miss Orawan Khantamat

M.S. Biochemistry

Examining committee

Assoc. Prof. Dr. Porn-ngarm Limtrakul	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Usanee Vinitketkumnuen	Member
Asst. Prof. Dr. Ratana Banjerdpongchai	Member
Dr. Somdet Srichairatanakool	Member

ABSTRACT

Resistance of cancer cells to multiple chemotherapeutic agents, a mechanism termed MDR, is a major obstacle to the success of cancer chemotherapy and has been closely associated with treatment failure. One of the most studied mechanisms of drug resistance is that characterized by reduced drug accumulation resulting from overexpression of the 170 kDa plasma membrane P-glycoprotein, Pgp. The available evidence strongly suggests that Pgp is a pump that catalyzes the efflux of drugs from the cells, reducing drug accumulation and hence the access of cytotoxic drugs to their targets. Since Pgp can confer MDR on cancer cells, the development of agents which inhibit the Pgp-mediated efflux of drugs, and thus reverse MDR, has been intensively pursued.

As bioflavonoids are abundant in plant foods and have the advantage of being natural dietary compounds that are nontoxic in animals, this study considered whether some bioflavonoids from vegetables and fruits such as quercetin, kaempferol, genistein, genistin and daidzein could influence Pgp function and its expression *in vitro*. Many reports have been published concerning the Pgp modulation of bioflavonoids, but the results of these compounds on Pgp modulation from various groups are complicated. Each result depended on the MDR cell models and the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

chemotherapeutic drugs used in the experiments. In this study, the bioflavonoids were tested for their ability to modulate Pgp function and expression in multidrug resistant human cervical carcinoma cell line (KB-V1) compared with drug sensitive cell line (KB-3-1), which lacks Pgp.

To examine the effect of bioflavonoids on Pgp function, the experiments were evaluated in two ways: (1) their ability to potentiate four anticancer drugs, vinblastine, paclitaxel, doxorubicin and colchicine, cytotoxicity on KB-V1 cells after incubated for 48 h by MTT assay; and (2) ability to restore the intracellular accumulation of rhodamine 123 (Rh123), ^{3}[H]vinblastine and ^{14}[C]doxorubicin in KB-V1 cells. Many bioflavonoids stimulated the vinblastine/paclitaxel sensitivity of KB-V1 cells, i.e., quercetin, kaempferol, genistein and daidzein, revealed that the IC_{50} of vinblastine or paclitaxel are decreased markedly in the presence of 10 and 30 μM bioflavonoids in dose-dependent manner. These bioflavonoids did not affect drugs sensitivity of KB-3-1 cells. Moreover, none of bioflavonoids had any effect on neither doxorubicin nor colchicine cytotoxicity on KB-V1 cells.

The flavonols (quercetin and kaempferol) and isoflavones (genistein and daidzein) also caused an increase intracellular accumulation, and reduced the efflux, of Rh123 and ^{3}[H]vinblastine in KB-V1 cells, but not KB-3-1 cells. These results appeared opposite to those observed on ^{14}[C]doxorubicin retention. However, the only isoflavone, genistin, was shown to have no modulatory effect on any anticancer drugs cytotoxicity and drugs transport in neither KB-V1 cells nor KB-3-1 cells. This result indicated that glucose moiety at the 7 position of genistin might affect the steric conformation and had important implications in regulation of Pgp activity.

To investigate the effect of bioflavonoids on P-gp expression, the Pgp levels were determined by Western blot analysis and ECL detection after incubation of KB-V1 cells with bioflavonoids for 2 and 48 h and the quantitative analysis by densitometry at a band of 170 kDa. The results showed that only treatment with 10 and 30 μM of flavonols (quercetin and kaempferol) up to 48 h was able to significantly decrease the Pgp expression in a dose-dependent manner in KB-V1 cells. While there was no statistically difference in Pgp levels on isoflavones (genistein, genistin and daidzein) treatment in KB-V1 cells as compared to vehicle control. The Pgp expression was not affected by treating cells with both flavonols and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

isoflavones at the concentration range 10 to 200 μM for 2 h. These data indicate that the hydroxylation at the 3 position and desaturation of 2,3 bond, both of which are characteristic of flavonols, might play roles in regulation of Pgp expression.

This findings provide evidence that flavonols (quercetin and kaempferol) reduce Pgp expression and regulate the apparent activity of Pgp in drug resistant human cervical carcinoma cells, KB-V1, but isoflavones (genistein and daidzein) modulate intracellular drug levels by inhibiting Pgp activity. Isoflavone in glycoside form, genistin, had no modulatory effect on both Pgp function and its expression. The bioflavonoids may also modulate differently the transport of putative Pgp substrates in KB-V1 cells. In conclusion, these results suggest that bioflavonoids could have a chemosensitizing effect on the MDR phenotype because of its ability to modulate both function and expression of Pgp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสารไบโอฟลาโวนอยด์ ต่อการทำงานและการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีน ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์

ชื่อผู้เขียน นางสาวอรวรรณ ค้นธมาทน์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ	กรรมการ
ผศ. ดร. รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย	กรรมการ
ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกูล	กรรมการ

บทคัดย่อ

ความทนต่อยารักษามะเร็งหลายชนิดของเซลล์มะเร็ง ที่เรียกว่าการดื้อยาหลายขนาน เป็นสาเหตุหลักของการขัดขวางการรักษาโรคมะเร็งด้วยยาเคมีบำบัด และทำให้การรักษาโรคมะเร็งล้มเหลว กลไกสำคัญของการดื้อยาคือ มีการสะสมของยารักษามะเร็งลดลง เนื่องจากมีการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวเซลล์ชนิดพี-กลัยโคโปรตีนขนาด 170 กิโลดาลตันมากกว่าปกติ พี-กลัยโคโปรตีนจะทำหน้าที่เหมือนปั๊มกระตุ้นการขับยาออกนอกเซลล์มะเร็ง ทำให้ลดการสะสมยาภายในเซลล์ และยาไปทำลายเป้าหมายภายในเซลล์ลดลง เมื่อพี-กลัยโคโปรตีนแสดงความสัมพันธ์ถึงการดื้อยาที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็ง จึงได้มีการพัฒนาอย่างจริงจัง เพื่อค้นหาสารซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการขับยาออกนอกเซลล์ที่เกิดจากการทำงานของพี-กลัยโคโปรตีน เพื่อลดการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง

ไบโอฟลาโวนอยด์พบได้มากในอาหารหลายชนิดที่ได้จากพืช และเป็นสารอาหารจากธรรมชาติที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษในสัตว์ งานวิจัยนี้สนใจศึกษาสารไบโอฟลาโวนอยด์บางชนิดที่ได้จากผักและผลไม้เช่น เคอร์ซิติน, เคมเฟอรอล, เจนิสทีอิน, เจนิสติน และไดซีอีน ถึงความสามารถในการแสดงผลรบกวนการทำงานและการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีนในหลอดทดลอง ซึ่งได้มีผลการทดลองเกี่ยวกับสารไบโอฟลาโวนอยด์เหล่านี้ต่อการเปลี่ยนแปลงของพี-กลัยโคโปรตีนจากผู้ศึกษาหลายกลุ่มที่ให้ผลค่อนข้างซับซ้อน และผลการทดลองแต่ละกลุ่มจะขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์มะเร็งดื้อยาแต่ละชนิด รวมทั้งชนิดของยารักษามะเร็งที่ใช้ในการทดลอง ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบผลของสารไบโอฟลาโวนอยด์ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงาน และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ชนิดดื้อยา KB-V1 เปรียบเทียบกับเซลล์ชนิดที่ไวต่อยา KB-3-1 ซึ่งไม่มีพี-กลัยโคโปรตีน

การวัดผลกระทบที่เกิดจากสารไบโอฟลาโวนอยด์ต่อการทำงานของพี-กลัยโคโปรตีน แบ่งการศึกษาออกเป็นสองทาง คือ (1) ศึกษาถึงความสามารถของสารไบโอฟลาโวนอยด์ต่อการทำให้ยารักษามะเร็งสี่ชนิดคือ วินบลาสติน, แพลกซิเทกเซล, ดอกโซรูบิซิน และโคซิซิน เกิดความเป็นพิษเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็ง KB-V1 หลังการบ่มเซลล์ร่วมกับสารไบโอฟลาโวนอยด์ และยารักษามะเร็งเป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วทดสอบด้วยวิธีเอ็มทีที และ (2) ศึกษาถึงความสามารถในการสะสมโรดามีน123, ^{3}[H]-วินบลาสติน และ ^{14}[C]-ดอกโซรูบิซิน ในเซลล์มะเร็ง KB-V1 สารไบโอฟลาโวนอยด์หลายชนิดได้แก่ เคอร์ซิติน, เคมเฟอรอล, เจนิสทีอิน และไดซีอีน กระตุ้นให้เซลล์ KB-V1 มีความไวต่อยาวินบลาสติน/แพลกซิเทกเซล เพิ่มขึ้นและแสดงให้เห็นค่า IC_{50} ของยาวินบลาสตินหรือยาแพลกซิเทกเซล ที่ลดลงตามความเข้มข้นของสารไบโอฟลาโวนอยด์ที่เพิ่มเป็น 10 และ 30 ไมโครโมลาร์ สารไบโอฟลาโวนอยด์ดังกล่าวไม่แสดงผลกระทบต่อความไวต่อยาดังกล่าวในเซลล์ KB-3-1 และไม่มีสารไบโอฟลาโวนอยด์ชนิดใดเลยที่แสดงผลกระทบต่อความเป็นพิษของยาดอกโซรูบิซิน และยาโคซิซินในเซลล์ KB-V1

สารฟลาโวนอลได้แก่ เคอร์ซิติน, เคมเฟอรอล และไอโซฟลาโวนได้แก่ เจนิสทีอิน, ไดซีอีน ยังสามารถเพิ่มการสะสม และลดการขับออกของโรดามีน123 และ ^{3}[H]-วินบลาสติน ภายในเซลล์ KB-V1 โดยไม่มีผลต่อเซลล์ KB-3-1 ซึ่งผลการทดลองนี้จะตรงข้ามกับการศึกษาการคงเหลือสะสมของ ^{14}[C]-ดอกโซรูบิซิน อย่างไรก็ตามสารไอโซฟลาโวนเพียงชนิดเดียวคือ เจนิสติน ไม่แสดงผลใด ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นพิษของยาต้านมะเร็งชนิดต่าง ๆ หรือเปลี่ยนแปลงลักษณะการขนส่งยาทั้งในเซลล์ KB-V1 และ KB-3-1 จากผลการทดลองนี้แสดงว่า โมเลกุลกลูโคสซึ่งเกาะอยู่ที่ตำแหน่งที่ 7 ของเจนิสตินอาจมีผลให้เกิดความเกะกะของโครงสร้าง และน่าจะมีความสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของพี-กลัยโคโปรตีน

การศึกษาถึงผลกระทบของสารไบโอฟลาโวนอยด์ต่อการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีน ระดับของพี-กลัยโคโปรตีนจะถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีเวสเทอร์นบลอท และตรวจวัดด้วยอีซีแอลภายหลังการบ่มเซลล์ KB-V1 ร่วมกับสารไบโอฟลาโวนอยด์เป็นเวลา 2 และ 48 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณพี-กลัยโคโปรตีนด้วยเครื่องวัดความทึบแสงที่ตำแหน่ง 170 กิโลดาลตัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเฉพาะการบ่มเซลล์ KB-V1 ร่วมกับสารฟลาโวนอลได้แก่ เคอร์ซิติน, เคมเฟอรอล ที่ความเข้มข้น 10 และ 30 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเท่านั้น ที่ทำให้มีการลดลงของการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ระดับพี-กลัยโคโปรตีนในการทดลองกับสารไอโซฟลาโวนได้แก่ เจนิสทีอิน, เจนิสติน และไดซีอีน ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีนไม่มีผลกระทบเมื่อบ่มเซลล์ร่วมกับทั้งสารฟลาโวนอลและไอโซฟลาโวนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ถึง 200 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่าการเกิดไฮดรอกซีเลชั่นที่ตำแหน่งที่ 3 และความไม่อิ่มตัวของพันธะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระหว่าง 2,3 ของโครงสร้างฟลาโวนอยด์ ซึ่งก็คือลักษณะของกลุ่มสารฟลาโวนอลน่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีน

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารฟลาโวนอลได้แก่ เคอร์ซิติน, เคมเฟอรอล สามารถลดการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีน และควบคุมการทำงานของพี-กลัยโคโปรตีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ชนิดดื้อยา KB-V1 ได้ แต่สารไอโซฟลาโวนได้แก่ เจนิสทีอิน, ไดซีอีน จะแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับยาภายในเซลล์โดยการยับยั้งการทำงานของพี-กลัยโคโปรตีน ส่วนไอโซฟลาโวนที่อยู่ในรูปไกลโคซิเลเตด คือเจนิสติน ไม่แสดงผลใด ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงาน และการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีน โดยสารไบโอฟลาโวนอยด์ทั้งหลายจะสามารถแสดงผลการเปลี่ยนแปลงการขนส่งสับสเตรตของพี-กลัยโคโปรตีนแต่ละชนิดแตกต่างกัน ในเซลล์ KB-V1 ผลการทดลองแสดงว่าสารไบโอฟลาโวนอยด์สามารถแสดงผลกระทบต่อการแสดงออกของการดื้อยาโดยทำให้เซลล์มีความไวต่อยาเคมีเพิ่มขึ้น เพราะสารไบโอฟลาโวนอยด์จะแสดงคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงการทำงาน และการแสดงออกของพี-กลัยโคโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved