Thesis Title Modulating Effect of *Stemona tuberosa Lour.* Extract on P-glycoprotein and MRP-1 Activities in Multidrug Resistant Cancer Cells

Author Mr. Sikhorn Siwanon

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Porn-ngarm Limtrakul	Chairperson
Asst. Prof. Dr. Ratana Banjerdpongchai	Member

ABSTRACT

Cancer cell resistant is considered to be one of the major reasons for the failure of chemotherapy for the majority of cancer patients. This phenomenon, multidrug resistant (MDR) is the result of overexpression of membrane bound proteins that efflux chemotherapeutic drugs from the cells. Two proteins in particular are members of ATP binding cassette (ABC) transporters, P-glycoprotein (P-gp), a 170 - kDa glycosylated cell surface glycoprotein and multidrug resistant associated protein-1 (MRP-1), a 190 - kDa integral membrane protein. Two proteins efflux anticancer drug out of the cancer cell that decrease intracellular drug accumulation, thereby decreasing the effectiveness of many chemotherapeutic agents. Nowadays the agents that inhibit P-glycoprotein and MRP-1 activities are developed and called MDR modulator(s).

Stemona tuberosa Lour., an effective medicinal Thai plant was used as an anti-tussive drug, but in this research it was investigated for the ability to modulate P-glycoprotein and MRP-1 activities. The effect of *S.tuberosa* extract on P-glycoprotein and MRP-1 activities were studied using P-glycoprotein overexpressing cell lines, KB-V-1 and its counterpart, KB-3-1 and MRP-1 overexpressing cell lines, HEK293/MRP-1 and its counterpart, HEK293/pcDNA,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

respectively. Antiproliferative and chemotherapeutic drugs sensitivity assay were performed by MTT assay and P-glycoprotein mediated transports were displayed by using ^{3}[H]-vinblastine uptake and ^{3}[H]-vinblastine retention assays.

The non-toxic concentrations, 50 and 150 μg/ml of *S.tuberosa* extract significantly activated vinblastine, paclitaxel and colchicine sensitivities by decreasing the IC_{50} of these drugs in KB-V-1 cells in a dose dependent manner but the extract did not affect vinblastine and paclitaxel sensitivities in KB-3-1 cells. Colchicine sensitivity in KB-3-1 was found to increase by the plant extract. The plant extract at concentration of 200-500 μg/ml also significantly caused an increase in intracellular accumulation and retention of ^{3}[H]-vinblastine in KB-V-1 cells, but not KB-3-1 cells. In HEK293/MRP-1 and HEK293/pcDNA the non-toxic concentration at 25 and 50 μg/ml did not influence etoposide sensitivity in both cell lines.

The classification of the phytochemical groups in the plant extract were determined. The only class of phytochemical group found in *S.tuberosa* extract were alkaloids and these compounds may be the main active ingredient that play an important role in P-glycoprotein modulation.

In summary, these findings were the first evidence of P-glycoprotein modulator from *S.tuberosa.* This plant extract modulated P-glycoprotein activity but not MRP-1 activity. The result obtained from this study strongly indicated that *S.tuberosa* extract could be used as a novel modulator of P-glycoprotein multidrug resistant *in vitro* and may be effectively as used in the treatment of multidrug resistant cancers.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลการเปลี่ยนแปลงของสารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากต่อการทำงานของพีกลัยโคโปรตีนและเอ็มอาร์พี1ในเซลล์มะเร็งดื้อยา

ผู้เขียน นาย ศิขร ศิวานนท์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล ประธานกรรมการ

ผศ. ดร. รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย กรรมการ

บทคัดย่อ

การดื้อยาในเซลล์มะเร็งเป็นปัจจัยสำคัญในความล้มเหลวของการรักษามะเร็งด้วยยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยโรคมะเร็งปรากฏการณ์นี้คือการดื้อยาหลายขนานซึ่งเป็นผลมาจากการแสดงออกอย่างมากของโปรตีนที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขับยาออกนอกเซลล์มีสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีนขนส่งที่มีบริเวณสำหรับจับกับเอทีพีได้แก่ พีกลัยโคโปรตีนซึ่งมีขนาด170กิโลดัลตันและโปรตีนช่วยในการดื้อยาหรือเอ็มอาร์พี1ขนาด190กิโลดัลตัน โปรตีนสองชนิดนี้ทำหน้าที่ในการขนส่งยาออกนอกเซลล์เป็นผลให้การสะสมของยาภายในเซลล์ลดลงดังนั้นประสิทธิภาพการทำงานของยาจึงลดลงตามไปด้วยในปัจจุบันได้มีการพัฒนาสารหรือยาที่สามารถทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำหน้าที่ของพีกลัยโคโปรตีนและเอ็มอาร์พี1ซึ่งเรียกสารเหล่านี้ว่าสารช่วยเปลี่ยนแปลงลักษณะการดื้อยา

สมุนไพรไทยพื้นบ้านหนอนตายหยากซึ่งใช้เป็นยาแก้ไอนั้นได้มีการศึกษาถึงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการทำหน้าที่ของพีกลัยโคโปรตีนและเอ็มอาร์พี1 โดยผลของสารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากต่อการทำงานของพีกลัยโคโปรตีน ได้ทำการศึกษาในเซลล์ที่มีการผลิตพีกลัยโคโปรตีนสูงได้แก่ KB-V-1 และเซลล์ที่ไม่มีการผลิตพีกลัยโคโปรตีนได้แก่ KB-3-1 ส่วนผลของสารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากต่อการทำงานของเอ็มอาร์พี1ได้ทำการศึกษาในเซลล์ที่มีการผลิตเอ็มอาร์พี1สูงได้แก่ HEK293/MRP-1 และเซลล์ที่ไม่มีการผลิตเอ็มอาร์พี1ได้แก่ HEK293/p cDNA การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเซลล์และความไวของยาเคมีบำบัดได้ใช้วิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เอ็มทีทีและการศึกษาถึงความสามารถในการขนส่งยารักษามะเร็งวินบลาสตินโดยพีกลัยโคโปรตีนทำได้โดยวัดการสะสมของยา ^{3}[H]-วินบลาสติน และการคงคั่งค้างของยา^{3}[H]-วินบลาสตินในเซลล์

สารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากที่ความเข้มข้น 50 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษสามารถเพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัดชนิด วินบลาสติน แพลกลิเทกเซลและโคลชิซินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถลดค่า IC_{50} ในเซลล์ KB-V-1 ได้แต่ไม่สามารถเพิ่มความไวต่อยาเมีบำบัดวินบลาสตินและแพลกลิเทกเซลในเซลล์ KB-3-1 ส่วนความไวต่อยาเคมีบำบัดโคลชิซินสารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากสามารถเพิ่มความไวต่อยาได้เล็กน้อย เมื่อใช้สารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากที่ความเข้มข้น200ถึง500ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าสารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากสามารถเพิ่มการสะสมของยา ^{3}[H]-วินบลาสตินและยังช่วยให้ยา ^{3}[H]-วินบลาสตินคงคั่งค้างในเซลล์ KB-V-1 มากขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในเซลล์ KB-3-1 สารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากไม่สามารถเพิ่มการสะสมของยา ^{3}[H]-วินบลาสตินและไม่ช่วยให้ยา ^{3}[H]-วินบลาสตินคงคั่งค้างในเซลล์มากขึ้น ในเซลล์ HEK293/MRP-1 และ HEK293/pcDNA สารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์คู่นี้ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงความไวของยาเคมีบำบัดอีโทโปไซด์ในเซลล์คู่นี้ได้

ในการศึกษากลุ่มโครงสร้างของสารเคมีในสารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากพบว่าส่วนใหญ่เป็นพวกอัลกาลอยด์ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสารเคมีหลักในสารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากและซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการยับยั้งการทำหน้าที่ของพีกลัยโคโปรตีน

การศึกษาครั้งนี้เป็นหลักฐานชิ้นแรกที่แสดงถึงการค้นพบสารยับยั้งการทำหน้าที่ของพีกลัยโคโปรตีนในสมุนไพรหนอนตายหยากสารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากสามารถยับยั้งการทำหน้าที่ของพีกลัยโคโปรตีนแต่ไม่สามารถยับยั้งการทำหน้าที่ของเอ็มอาร์พี1จากข้อมูลที่พบทั้งหมดสรุปได้ว่าสารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากเป็นสารยับยั้งการทำหน้าที่ของพีกลัยโคโปรตีนในหลอดทดลองได้และอาจเป็นสมุนไพรที่เหมาะแก่การรับประทานเพื่อลดการดื้อยาในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาหลายขนานได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved