Thesis Title Biochemical Mechanism of Modulation of ABC Transporters: P-glycoprotein (P-gp, ABCB1), Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1) and Mitoxantrone Resistance Protein (MXR, ABCG2) by Curcuminoids

Author Miss Wanida Chearwae

Degree Doctor of Philosophy

Thesis Advisory Comittee

Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Limtrakul	Chairperson
Dr. Suresh V. Ambudkar	Member
Asst. Prof. Dr. Chadarat Duangrat	Member

ABSTRACT

Multidrug resistance (MDR) is a phenomenon by which cancer cells develop reduced sensitivity to anticancer drugs, which often leads to the failure of cancer chemotherapy. A prominent mechanism of MDR is the overexpression on the cell surface of the multidrug efflux pumps such as P-glycoprotein (P-gp, ABCB1), the multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) and mitoxantrone resistance protein (MXR, ABCG2), that decrease the intracellular accumulation of many anticancer drugs, leading to increased tumor growth. Extensive efforts are under way to develop effective modulators to overcome the MDR in cancer cells. Many dietary herbs have been reported to be potentially effective MDR- modulators with the advantage of being dietary compounds that are less toxic to animals, plentiful and inexpensive. Previously, it has been reported that a curcumin mixture containing three major curcuminoids (77% curcumin I, 17% curcumin II and 3 % curcumin III) could modulate the function of P-gp. This study focuses on the effect of the three major pure forms of curcuminoids isolated from turmeric, curcumin I, II and III, in comparison with curcumin mixture on the modulation of P-gp, MRP1 and MXR function.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

In the first part of the study, curcumin mixture, curcumin I, II, and III were tested for their ability to modulate the function of P-gp by using P-gp overexpressing cells, a multidrug resistant human cervical carcinoma cell line (KB-V1). The similar IC_{50} values for cytotoxicity of curcuminoids of KB-V1 and KB-3-1 (parental drug sensitive cell lines) suggest that these curcuminoids may not be substrates for P-gp. Treating the cells with non-toxic doses of curcuminoids increased their sensitivity to vinblastine only in the P-gp expressing drug resistant cell line KB-V1; and curcumin I retained the drug in KB-V1 cells more effectively than curcumin II and III, respectively. Effects of each curcuminoid on rhodamine123, calcein-AM, and bodipy-vinblastine accumulation confirm these findings. Curcumin I, II and III increased the accumulation of fluorescent substrates in a dose-dependent manner, and at 10 μM, curcumin I was the most effective to inhibit the efflux function of P-gp. The inhibitory effects in a concentration–dependent manner of curcuminoids on verapamil-stimulated P-gp ATPase activity and photoaffinity labeling of P-gp with the [^{125}I]-Iodoarylazidoprazosin offered additional support; curcumin I was the most potent modulator. Therefore, the first part of the study suggests strongly that curcumin I is the most potent modulator among curcuminoids to modulate the function of P-gp.

In the second part of the study, curcumin mixture and three major curcuminoids (curcumin I, II, and III) were studied for their ability to modulate the function and expression of MRP1 using HEK293 cells stably transfected with MRP1-pcDNA3.1 and pcDNA3.1 vector alone. The IC_{50} of curcuminoids in these cell lines ranged from 14.5 - 39.3 μM. Upon treating the cells with etoposide, in the presence of 5 and 10 μM curcuminoids, the sensitivity to etoposide was increased by several folds only in MRP1 expressing and not in pcDNA3.1-HEK 293 cells. Western blot analysis showed that the total cellular level of MRP1 protein was not affected by treatment with 10 μM curcuminoids for three days. The modulatory effect of curcuminoids on MRP1 function was confirmed by the inhibition of efflux of two fluorescent substrates, calcein-AM and fluo4-AM. Although all three curcuminoids increased the accumulation of fluorescent substrates in a concentration-dependent manner, curcumin I was the most effective inhibitor. In addition, curcuminoids did not affect 8azido[α-^{32}P]ATP binding, however; they did stimulate the basal ATPase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

activity and inhibited the quercetin-stimulated ATP hydrolysis of MRP1 indicating that these curcuminoids interact most likely at the substrate-binding site(s) not the ATP binding site(s). Thus, these results demonstrate that curcuminoids effectively inhibit MRP1-mediated transport, and, among curcuminoids, curcumin I, a major constituent of curcumin mixture, is the best modulator for MRP1.

The effect of curcuminoids on MXR has been evaluated by investigating the potency of curcumin mixture and the three pure forms of curcumin I, II and III to modulate the activity of the wild-type (482R) expressed in HEK 293 cells and mutant (R482T) expressed in MCF-7AdrVp cells. The cytotoxicity assay demonstrated that the IC_{50} of curcuminoids in pcDNA3.1- and MXR-HEK293 cells are in the range of 19-29 μM, whereas; in MCF-7 and MCF-7AdrVp are in the range of 30.5-50.7 μM. The concentrations at 3, 5 and 10 μM were selected to study MDR reversing properties in wild type MXR. It showed that curcumin mixture, and curcumin I, II and III, were able to sensitize the MXR transfected HEK293 cells to mitoxantrone, topotecan and SN-38 in a concentration-dependent manner. Similar result was observed in MXR mutant R482T; 10 μM of curcuminoids increased the sensitivity of doxorubicin and mitoxantrone. However, the protein level of MXR was not affected after treatment of the MCF-7AdrVp with 3 and 10 μM of curcuminoids for three days. This result implies that curcuminoids inhibited the function of MXR but not expression. The inhibitory effect of curcuminoids on MXR was confirmed by the findings that curcuminoids inhibit the efflux of MXR fluorescent substrates (bodipy-prazosin, mitoxantrone and rhodamine 123) in the drug resistant cells resulting in the accumulation of those substrates inside the cells. This inhibition was comparable to the inhibition of MXR by fumitremorgin C (FTC), a specific inhibitor of MXR, indicating a potent inhibitory effect of curcuminoids on MXR function. The direct interaction of curcuminoids with the MXR transporter was affirmed by the effect of the curcuminoids on the ATP hydrolysis of MXR. Curcumin mixture, as well as curcumin I, II and III, stimulated the MXR ATPase activity in a concentration-dependent manner. The concentration of curcuminoids required for 50% stimulation of MXR ATPase activity was in the range of 4.89- 7.76 nM. Taken together, the data from this part of the study suggest that the curcuminoids inhibit the functions

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

mediated by MXR and, similar with the previous results, curcumin I exhibits the most effective form to modulate the function of MXR transporter.

In conclusion, the results in this study shows that all three forms of curcuminoids, curcumin I, II and III can inhibit P-gp, MRP1 and MXR function. Curcumin exhibits the most active form. Further studies with the curcumin I or curcumin mixture in animal models, and eventually in humans will have to be carried out to reap the benefits of the studies presented in this thesis.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ กลไกชีวเคมีในการควบคุมตัวขนส่งเอบีซีชนิดพี-ไกลโคโปรตีน(เอบีซีบีหนึ่ง) เอ็มอาร์พีหนึ่ง (เอบีซีซีหนึ่ง) และเอ็มเอ็กซ์อาร์(เอบีซีจีสอง)โดยสารเคอร์คิวมินอยด์

ผู้เขียน นางสาว วนิดา เจะอาแว

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล	ประธานกรรมการ
ดร. สุเรช แอมบัดการ์	กรรมการ
ผศ. ดร. ชฎารัตน์ ดวงรัตน์	กรรมการ

บทคัดย่อ

การดื้อยาหลายขนานเป็นปรากฏการณ์ที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีความไวต่อยาต้านมะเร็งลดลง ซึ่งมักเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้การรักษามะเร็งด้วยยาเคมีบำบัดประสบความล้มเหลว กลไกหนึ่งที่เด่นชัดของการดื้อยาหลายขนานคือการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของโปรตีนบนผิวเซลล์ที่ทำหน้าที่ขับไล่ยาชนิดพี-ไกลโคโปรตีน เอ็มอาร์พีหนึ่งและเอ็มเอ็กซ์อาร์ ส่งผลให้การสะสมของยาต้านมะเร็งหลายๆชนิดภายในเซลล์ลดลงและอยู่ในระดับที่ไม่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ และทำให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นในที่สุด มีการศึกษาเพื่อพัฒนาสารที่สามารถควบคุมหรือลดการดื้อยาในเซลล์มะเร็งอย่างกว้างขวาง พืชสมุนไพรหลายชนิดอยู่ในความสนใจของหลาย ๆกลุ่มวิจัยเนื่องจากเป็นสารที่สามารถบริโภคได้ ให้ผลข้างเคียงต่ำราคาถูกและหาได้ง่ายในท้องตลาด สารเคอร์คิวมินจากขมิ้นเป็นสารตัวหนึ่งที่น่าสนใจ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าส่วนผสมของสารเคอร์คิวมินซึ่งมีสารเคอร์คิวมินหนึ่ง (77%), เคอร์คิวมินสอง (17%) และเคอร์คิวมินสาม (3%)เป็นองค์ประกอบสามารถควบคุมการทำหน้าที่ของโปรตีนขับไล่ยาชนิดพี-ไกลโคโปรตีนได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานทั้งในรูปแบบผสมและที่แยกบริสุทธิ์ของสารเคอร์คิวมินอยด์ต่อทั้งการทำหน้าที่ของโปรตีนขับไล่ยาชนิดเอ็มอาร์พีหนึ่งและเอ็มเอ็กซ์อาร์ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาถึงผลของสารเคอร์คิวมินรูปผสมและสารเคอร์คิวมินหนึ่งสองและสามที่แยกบริสุทธิ์ได้จากขมิ้นชันต่อการทำหน้าที่ของโปรตีนขับไล่ยาทั้งสามชนิดคือ พี-ไกลโคโปรตีน เอ็มอาร์พีหนึ่งและเอ็มเอ็กซ์อาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนแรกของการศึกษาได้ทดสอบความสามารถของสารเคอร์คิวมินในรูปผสม สารเคอร์คิวมินหนึ่ง สองและสามในการควบคุมการทำหน้าที่ของพี-ไกลโคโปรตีน โดยทำการทดสอบในเซลล์มะเร็งปากมดลูก KB-V-1 ที่มีการแสดงออกของ พี-ไกลโคโปรตีนมากบนผิวเซลล์ จากการศึกษาความเป็นพิษพบว่าค่า IC_{50} ของสารเคอร์คิวมินอยด์ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ดื้อยา KB-V-1 และไม่ดื้อยา KB-3-1 มีค่าใกล้เคียงกัน ชี้ให้เห็นว่าสารเคอร์มินอยด์อาจไม่ใช่สับเสตรทหรือไม่ถูกขับออกนอกเซลล์โดยพี-ไกลโคโปรตีน และเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มียาต้านมะเร็งวินบลาสตินร่วมกับสารเคอร์คิวมินอยด์ ณ ความเข้มข้นของสารเคอร์คิวมินอยด์ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์พบว่าสามารถเพิ่มความไวของเซลล์ต่อยาวินบลาสตินได้ โดยผลดังกล่าวพบเฉพาะในเซลล์ KB-V-1ซึ่งมีการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้นเท่านั้น และ KB-V-1 สามารถกักเก็บยาในสภาวะที่มีสารเคอร์คิวมินหนึ่งได้ดีกว่าสภาวะที่มีสารเคอร์คิวมินสองหรือสาม เมื่อศึกษาผลของสารเคอร์คิวมินอยด์ต่อการสะสมของสารเรืองแสงสามชนิดคือโรดามีนหนึ่งสองสาม แคลซีนเอเอ็มและบอดีพี-วินบลาสติน พบว่าผลการทดลองยืนยันผลดังกล่าวข้างต้นกล่าวคือสารเคอร์คิวมินทั้งสามรูปแบบและสารเคอร์คิวมินรูปผสม สามารถเพิ่มการสะสมของสารเรืองแสงภายในเซลล์ให้มากขึ้นแบบ concentration dependent และพบว่าสารเคอร์คิวมินหนึ่งให้ผลการสะสมของสารเรืองแสงมากที่สุด ซึ่งแสดงถึงผลการยับยั้งการทำหน้าที่ขับไล่สารโดยพี-ไกลโคโปรตีนได้ดีที่สุด นอกจากนี้สารเคอร์คิวมินอยด์ยังให้ผลยับยั้ง verapamil stimulated ATPase activity และ IAAP photoaffinity labeling ของพี-ไกลโคโปรตีนอีกด้วย ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการจับกันได้จริงของสารเคอร์คิวมินอยด์กับพี-ไกลโคโปรตีน โดยอาจจับบริเวณเดียวกับบริเวณจับของสาร verapamil หรือ prazosin ซึ่งเป็นสาร analog ของ IAAP ดังนั้นผลการศึกษาในส่วนแรกนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิดพี-ไกลโคโปรตีนโดยสารเคอร์คิวมินอยด์ได้ และสารเคอร์คิวมินหนึ่งแสดงผลการยับยั้งดีที่สุด

การศึกษาในส่วนที่สองเป็นการศึกษาผลของสารเคอร์คิวมินในรูปผสมและสารเคอร์มินอยด์ทั้งสามรูปแบบต่อความสามารถในการควบคุมการทำหน้าที่ของโปรตีนขับไล่ยาชนิดเอ็มอาร์พีหนึ่ง เซลล์ที่ใช้คือเซลล์ HEK293 ที่ทรานส์เฟคด้วย MRP1-pcDNA3.1และ pcDNA3.1vector ซึ่งเป็นเซลล์ที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาเรียก MRP1-HEK293 และ pcDNA3.1-HEK293 ตามลำดับ ค่าความเป็นพิษของสารเคอร์คิวมินอยด์ในเซลล์ดังกล่าวอยู่ในช่วง 14.5-39.3 μM และเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มียาอีโทโปไซด์พบว่าสารเคอร์คิวมินอยด์สามารถทำให้เซลล์มีความไวต่อยาอีโทโปไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญ และผลดังกล่าวพบเฉพาะในเซลล์ดื้อยา MRP1-HEK293 เท่านั้นไม่พบในเซลล์ที่ไม่ดื้อยา pcDNA3.1-HEK293 จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอ็มอาร์พีหนึ่งโดยวิธี Western blot พบว่าหลังจากบ่มเซลล์ MRP1-HEK293 ด้วยสารเคอร์คิวมินอยด์ที่ความเข้มข้น 10μM เป็นระยะเวลา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สามวันระดับโปรตีนของเอ็มอาร์พีหนึ่งไม่เปลี่ยนแปลง ชี้ให้เห็นว่าการยับยั้งของสารเคอร์คิวมินอยด์เกิดขึ้นในระดับการทำหน้าที่ของโปรตีนเอ็มอาร์พีหนึ่งเท่านั้นและไม่มีผลในระดับการแสดงออก ผลการยับยั้งของสารเคอร์คิวมินอยด์ต่อการทำหน้าที่ของโปรตีนเอ็มอาร์พีหนึ่งยืนยันโดยผลการยับยั้งการขับออกของสารเรืองแสงสองชนิดคือแคลซีน-เอเอ็มและฟลูโอโฟร์-เอเอ็มโดยโปรตีนเอ็มอาร์พีหนึ่ง พบว่าสารเคอร์คิวมินอยด์ทั้งสามรูปแบบสามารถเพิ่มการสะสมของสารเรืองแสงแบบ concentration dependent และสารเคอร์คิวมินหนึ่งให้ผลการยับยั้งดีที่สุด นอกจากนี้พบว่าสารเคอร์คิวมินอยด์ไม่มีผลต่อการจับของ azidobinding [α-^{32}P]ATP กับบริเวณจับบนโปรตีนเอ็มอาร์พีหนึ่ง แต่ให้ผลกระตุ้น basal ATPase activity ของเอ็มอาร์พีหนึ่งและยับยั้ง quercetin-stimulated ATPase activity ได้ ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นว่าบริเวณจับของสารเคอร์คิวมินอยด์กับโปรตีนเอ็มอาร์พีหนึ่งน่าจะเป็นบริเวณจับของสับเสตรท (substrate binding site) มากกว่าจะเป็นบริเวณจับสำหรับเอทีพี (ATP binding site) ดังนั้นผลการทดลองในส่วนนี้จึงกล่าวได้ว่าสารเคอร์คิวนอยด์นอกจากจะยับยั้งการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนแล้วยังสามารถยับยั้งการทำหน้าที่ขับไล่ยาของโปรตีนเอ็มอาร์พีหนึ่งอีกด้วยโดยอาจเข้าไปแย่งจับบริเวณเดียวกับสับเสตรทของเอ็มอาร์พีหนึ่งส่งผลให้สารเหล่านั้นถูกขับไล่ออกนอกเซลล์ได้ลดลง นอกจากนี้ทำนองเดียวกับที่พบในกรณีของพี-ไกลโคโปรตีน สารเคอร์คิวมินหนึ่งให้ผลควบคุมโปรตีนขับไล่ยาเอ็มอาร์พีหนึ่งดีที่สุด

สำหรับผลของสารเคอร์คิวมินอยด์ต่อโปรตีนขับไล่ยาเอ็มเอ็กซ์อาร์นั้นเซลล์ที่ใช้คือ HEK 293 ที่ทรานส์เฟคด้วยเอ็มเอ็กซ์อาร์ จากการศึกษาค่าความเป็นพิษของสารเคอร์คิวนอยด์ต่อเซลล์ชนิดนี้พบว่าค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 19-29 μM และเมื่อนำสารเคอร์คิวมินอยด์ที่ความเข้มข้น 3, 5 และ 10 μM มาศึกษาคุณสมบัติในการลดการดื้อยาพบว่าสารเคอร์คิวมินอยด์ทำให้เซลล์ที่ดื้อยามีความไวต่อยาไมโทแซนโทรน โทโพทีแคน และ เอสเอ็น-38 เพิ่มขึ้นแบบ concentration dependent และไม่มีผลต่อเซลล์ที่ไม่ดื้อยา อย่างไรก็ตามระดับของโปรตีนเอ็มเอ็กซ์อาร์ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อทำการบ่มด้วยสารเคอร์คิวมินอยด์ที่ความเข้มข้น 3 และ 5 μM เป็นระยะเวลาสามวัน ดังนั้นแล้วเช่นเดียวกับกรณีที่พบในโปรตีนเอ็มอาร์พีหนึ่ง สารเคอร์คิวมินอยด์ยับยั้งโปรตีนขับไล่ยาชนิดเอ็มเอ็กซ์อาร์ในระดับการทำหน้าที่เท่านั้นโดยไม่มีผลไปลดการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ ผลการยับยั้งการทำหน้าที่ขับไล่ยาออกโดยโปรตีนเอ็มเอ็กซ์อาร์ของสารเคอร์คิวมินอยด์ยืนยันได้จากผลการยับยั้งการขับออกของสารเรืองแสงที่เป็นสับเสตรทของเอ็มเอ็กซ์อาร์ในเซลล์ที่ดื้อยาและไม่มีผลต่อเซลล์ที่ไม่ดื้อยา ส่งผลให้มีการสะสมของสารเรืองแสงภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น โดยความสามารถในการยับยั้งใกล้เคียงกับสารฟูมิทรีมอร์กิน ซี หรือชื่อย่อว่า เอฟทีซี ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำหน้าที่อย่างจำเพาะของโปรตีนเอ็มเอ็กซ์อาร์ นอกจากนี้สารเคอร์คิวมินอยด์สามารถเข้าจับกับโปรตีนเอ็มเอ็กซ์อาร์ได้จริงซึ่งเห็นได้จากผลการกระตุ้น MXR ATPase activityของสารเคอร์คิวมินอยด์ โดยความเข้มข้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ของสารเคอร์คิวมินอยด์ที่สามารถกระตุ้น ATPase activity ของโปรตีนเอ็มเอ็กซ์อาร์ได้ 50% นั้นอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 4.89 - 7.76 nM จึงสรุปได้ว่าสารเคอร์คิวมินอยด์สามารถยับยั้งการขับไล่ยาของโปรตีนเอ็มเอ็กซ์อาร์ได้และเคอร์คิวมินหนึ่งให้ผลการยับยั้งได้ดีที่สุด

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารเคอร์คิวมินอยด์สามารถยับยั้งการทำหน้าที่ของโปรตีนขับไล่ยาชนิดพี-ไกลโคโปรตีน เอ็มอาร์พีหนึ่งและเอ็มเอ็กซ์อาร์ได้ ส่งผลให้เซลล์ดื้อยามีการดื้อยาที่ลดลงหรือมีความไวต่อยาต้านมะเร็งเพิ่มขึ้นโดยสารเคอร์คิวมินหนึ่งแสดงผลการยับยั้งดีที่สุด อย่างไรก็ตามผลการยับยั้งดังกล่าวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสารเคอร์คิวมินรูปผสมซึ่งมีสารเคอร์คิวมินหนึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก จึงสามารถกล่าวได้ว่าสารหลักที่ให้ผลการยับยั้งในเคอร์คิวมินรูปผสมคือสารเคอร์คิวมินหนึ่งและสารเคอร์คิวมินสองและสามซึ่งเป็นองค์ประกอบรองและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งน้อยกว่า และไม่มีผลหักล้าง (antagonize) การทำงานของสารเคอร์คิวมินหนึ่ง ดังนั้นเพื่อให้ผลที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้เกิดประสิทธิผลสูงสุดจึงควรส่งเสริมให้มีการศึกษาในอนาคตต่อไปในสัตว์ทดลองถึงผลของสารเคอร์คิวมินอยด์โดยเฉพาะสารเคอร์คิวมินหนึ่งหรือรูปผสมเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถนำสารเคอร์คิวมินอยด์มาใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดเพื่อลดการดื้อยาในผู้ป่วยมะเร็งต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved