Thesis Title Cytotoxic Mechanism of 5,3'-dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone Isolated from *Gardenia obtusifolia* Roxb. in Human Leukemia Cells

Author Mr. Wittawas Sajjapong

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Porn-ngarm Limtrakul	Chairperson
Asst. Prof. Dr. Chadarat Duangrat	Member
Dr. Songyot Anuchapreeda	Member

ABSTRACT

Leukemia is a disease manifested by the failure of cell death, or inability of hematopoietic cells to differentiate into functional mature cells. Induction of differentiation or cell death in immature hematopoietic cells has been applied for leukemia prevention or therapy. Leukemia cell lines, such as HL-60, U937, and K562 are unique *in vitro* models for screening potent anti-leukemia agents. Apoptosis is a programmed cell death that is characterized by cell shrinkage, membrane blebbing, chromatin condensation and DNA fragmentation , and it is typically accompanied by the activation of a class of death proteases (caspases). 5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone (GO1), a pale yellow powder isolated from leaves of *Gardenia obtusifolia* were showed significant cytotoxic activities in MCF-7 (Human breast cancer cells) and KB-3-1 (Human cervix carcinoma cells). In this study, we investigated the anti-tumor effects of GO1 on HL-60, U937 and K562 human leukemia cell lines. GO1 induced cytotoxicity of human leukemic cells was monitored by the MTT assay. The apoptosis was determined by (a) apoptotic morphology in microscopy; (b) DNA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

fragmentation in electrophoresis and FACS analysis; and (c) activation of caspase-3 and poly-ADP-ribose polymerase (PARP) cleavage assay. The results demonstrated the cytotoxicity activation of GO1 in U937, HL-60 and K562 human leukemic cell were increased in a concentration-dependent manner with IC_{50} at 0.05, 0.15, and 75 μM, respectively. GO1 caused the cell shrinkage, cell membrane blebbing, apoptotic body, chromatin condensation and DNA fragmentation. Result from Annexin V/PI double staining analyzed by flow cytometry indicated that GO1 increased early and late apoptotic cell population. GO1-induced apoptosis is accompanied by the activation of caspase-3 and the specific proteolytic cleavage of PARP. Our finding provides evidence that GO1 could be a candidate as an anti-leukemic agent through apoptosis of cancer cells.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ กลไกความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร 5,3'-ไดไฮดรอกซี-3,6,7,8,4'-เพนตะ-เมทอกซีฟลาโวนที่แยกได้จากต้นกระมอบในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์

ผู้เขียน นายวิทวัส สัจจาพงศ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล	ประธานกรรมการ
ผศ.ดร. ชฎารัตน์ ดวงรัตน์	กรรมการ
ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา	กรรมการ

บทคัดย่อ

ลิวคีเมียเป็นภาวะที่เกิดขึ้นจากการควบคุมการตายของเซลล์ที่ล้มเหลว หรือเกิดจากความผิดปกติของการพัฒนาการของเม็ดเลือดไปเป็นตัวแก่ที่สมบูรณ์ การเหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาหรือการตายของเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่สมบูรณ์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาหรือป้องกันการเกิดลิวคีเมียได้ ในการศึกษานี้ได้ใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 HL-60 และ K562 เพื่อนำมาใช้เป็นแบบอย่างในการทดลองเบื้องต้นในหลอดทดลอง ในการหาสารที่จะนำมาใช้ในการยับยั้งเซลล์ลิวคีเมีย อะพอพโตซีสเป็นการตายของเซลล์ที่ถูกโปรแกรมหรือกำหนดไว้ ซึ่งมีลักษณะเซลล์เหี่ยว มีการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ซึ่งมีลักษณะคล้ายกระเปาะ มีการขดแน่นของเส้นใยโครมาติน การแตกหักของดีเอ็นเอ และเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเอนไซม์ในกลุ่มโปรทิเอส (แคสเปส) การศึกษานี้ได้นำ 5,3'-ไดไฮดรอกซี-3,6,7,8,4'-เพนตะเมทอกซีฟลาโวน (จีโอ1) ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากใบของต้นกระมอบ (*Gardenia obtusifolia*) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีคุณสมบัติที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 (มะเร็งเต้านม) และเซลล์ KB-3-1 (มะเร็งปากมดลูก) ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ จีโอ1 ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งในเม็ดเลือดขาว 3 ชนิดคือ HL-60 U937 และ K562 จากการทดลองพบว่า จีโอ1 สามารถเหนี่ยวนำในเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทั้งสามชนิด ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT และศึกษาการเกิดอะพอพโตซีสของเซลล์โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัญฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนการตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอทำการศึกษาด้วยวิธีอิเล็กโตโฟริซิสและโฟลไซโตเมทรี นอกจากนี้ได้ศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนแคสเปส-3 และพีเออาร์พี ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า จีโอ1 มีความเป็นพิษตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 3 ชนิดคือ U937, HL-60 และ K562 โดยค่าความเข้มข้นที่สามารถยั้บยั้งการเจริญของเซลล์ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 0.05, 0.15 และ 75 μM ตามลำดับ จากการทดลองทำให้ทราบว่า จีโอ1 เป็นสาเหตุทำให้เซลล์มีลักษณะเหี่ยวและมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของผนังเซลล์ โดยมีลักษณะคล้ายกระเปราะ เกิดอะพอพโตติกบอดี้ มีการขดแน่นของเส้นใยโครมาติน และพบการแตกหักของดีเอ็นเอ ซึ่งจากการทดลองที่ย้อมด้วย Annexin V และ PI แล้ววิเคราะห์ด้วยโฟลไซโตเมทรีพบว่า จีโอ1 สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดอะพอพโตซีส ทั้งในระยะเริ่มแรกและระยะท้ายของการเกิดอะพอพโตซีส นอกจากนั้นแล้ว จีโอ1 ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของแคสเปส-3 และยั้บยั้งการทำงานของพีเออาร์พี จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า จีโอ1 สามารถนำมาใช้เพื่อเป็นสารต่อต้านมะเร็งได้โดยพบว่าทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบเกิดอะพอพโตซีสได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved