การชักนำให้เกิดเอพอพโตซิสและการยับยั้งวัฏจักรเซลล์ของสิ่งสกัดจากหัสคุณ *(Micromelum hirsutum)* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายสาธิต รอดภักดีกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5074838230

APOPTOSIS INDUCTION AND CELL CYCLE ARREST OF *MICROMELUM HIRSUTUM* EXTRACTS IN HUMAN B-LYMPHOMA CELLS.

Mr. Satit Rodphukdeekul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

522234

Thesis Title	APOPTOSIS INDUCTION AND CELL CYCLE ARREST OF *MICROMELUM HIRSUTUM* EXTRACTS IN HUMAN B-LYMPHOMA CELLS
By	Mr. Satit Rodphukdeekul
Field of Study	Medical Science (Pharmacology)
Thesis Advisor	Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Professor Tada Sueblinvong, M.D.
	Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Medicine

(Professor Adisorn Patradul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D., Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor

(Professor Tada Sueblinvong, M.D.)

..... Thesis Co-Advisor

(Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi, Ph.D.)

..... Examiner

(Associate Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.)

..... External Examiner

(Assistant Professor Pathama Leewanich, Ph.D.)

สาธิต รอดภักดีกุล : การชักนำให้เกิดเอพอพโตซิสและการยับยั้งวัฏจักรเซลล์ของสิ่งสกัดจากหัสคุณ *(Micromelum hirsutum)* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์. (APOPTOSIS INDUCTION AND CELL CYCLE ARREST OF *MICROMELUM HIRSUTUM* EXTRACTS IN HUMAN B-LYMPHOMA CELLS.) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรี ลิมปนสิทธิกุล, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์, รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรังษี, 111 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆจากกิ่งและใบของ *Micromelum hirsutum* ต่อ เซลล์รามอสซึ่งเป็นเซลล์ลิมโฟมาของมนุษย์ มีการนำสิ่งสกัดจากไดคลอโรมีเทน เฮกเซน และเมธานอล จากกิ่งและใบของ *M hirsutum* มาทำการทดสอบเบื้องต้นถึงความเป็นพิษต่อเซลล์รามอส พบว่าสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนจากกิ่งและใบของพืชมีความเป็นพิษต่อรามอสเซลล์มากกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวจากคนปกติ นำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนจากกิ่งและใบของ *M. hirsutum* มาศึกษาต่อไปเกี่ยวกับการชักนำให้เซลล์รามอสตายแบบเอพอพโตซิส พบว่า สิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนจากกิ่งของ *M. hirsutum* ทำให้เซลล์รามอสตายในลักษณะเอพอพโตซิสเป็นส่วนใหญ่เมื่อได้รับสิ่งสกัดนาน 12 ชั่วโมง และการตายแบบเอพอพโตซิสขึ้นกับความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ ส่วนสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนจากใบของ *M. hirsutum* ทำให้เซลล์รามอสตายในลักษณะเอพอพโตซิสเป็นส่วนใหญ่เมื่อได้รับสิ่งสกัดนาน 12 ชั่วโมงโดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ นำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนจากกิ่งของ *M. hirsutum* มาศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์รามอส พบว่า สิ่งสกัดทั้งสองชนิดทำให้เซลล์รามอสเกิด เอพอพโตซิสโดยการกระตุ้นเอนไซม์คาสเปสเป็นหลัก สาร Z-VAD-FMK ที่ยับยั้งเอนไซม์คาสเปสได้หลายตัวสามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของสิ่งสกัดทั้งสองได้เกือบสมบูรณ์ มีโอกาสเป็นไปได้ว่าสิ่งสกัดทั้งสองทำให้เซลล์รามอสเกิดเอพอพโตซิสผ่านทาง intrinsic pathway เนื่องจากการใช้แอนติบอดีต่อ Fas ligand เพื่อยับยั้งการจับกันของ Fas-Fas ligand ที่เป็นการกระตุ้นแบบ extrinsic pathway ในเซลล์ลิมโฟไซต์ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสิ่งสกัดทั้งสอง แต่พบว่าสิ่งสกัดทั้งสองมีผลต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของโปรตีนกลุ่ม BCL-2 ซึ่งควบคุมการเกิดเอพอพโตซิสผ่านทาง intrinsic pathway สิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนยับยั้งการแสดงออกของ BCL-2, BCL-XL และเพิ่มการแสดงออกของ Bax อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่สิ่งสกัดเฮกเซนมีผลคล้ายคลึงกับสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษานี้ได้ศึกษาผลของสิ่งสกัดทั้งสองต่อลักษณะของวัฏจักรเซลล์ของเซลล์รามอส พบว่า สิ่งสกัดเฮกเซนไม่มีผลเปลี่ยนแปลงลักษณะของวัฏจักรเซลล์ ส่วนสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงลักษณะของวัฏจักรเซลล์ของเซลล์รามอส โดยทำให้เซลล์สะสมอยู่ในระยะ S และ G2/M จากการศึกษาผลในระดับโมเลกุลของสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวัฏจักรเซลล์ พบว่า สิ่งสกัดลดการแสดงออกระดับ mRNA ของ cyclin D1 ลงได้มาก และลดการแสดงออกของ cyclin E ได้เล็กน้อย แต่พบว่าสิ่งสกัดนี้มีผลลดการแสดงออกของ p53 และ p21 ที่ยับยั้งวัฏจักรเซลล์เช่นกัน ผลจากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สิ่งสกัดเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนจากกิ่งของ *M hirsutum* มีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งให้ตายแบบเอพอพโตซิสเป็นหลัก

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2552..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5074838230 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : *MICROMELUM HIRSUTUM* / CYTOTOXICITY / APOPTOSIS / CELL CYCLE REGULATION

SATIT RODPHUKDEEKUL: APOPTOSIS INDUCTION AND CELL CYCLE ARREST OF *MICROMELUM HIRSUTUM* EXTRACTS IN HUMAN B-LYMPHOMA CELLS. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. WACHAREE LIMPANASITHIKUL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: PROF. TADA SUEBLINVONG, M.D., ASSOC. PROF. NIJSIRI RAUNGRUNGSRI, Ph.D., 111 pp.

This study aimed to evaluate cytotoxic activity of *Micromelum hirsutum* solvent extracts on human B-lymphoma cells, Ramos cells. The dichloromethane, hexane, and methanol extracts from branches (BD, BH, and BM) and leaves (LD, LH, and LM) of *M. hirsutum* were primarily screened for their cytotoxicities against Ramos cells. The dichloromethane and the hexane extracts from both branches (BD and BH) and leaves (LD and LH) of the plant demonstrated cytotoxic effects on Ramos cells higher than on normal human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). These extract were further evaluated for their apoptotic induction activities on Ramos cells. BD and BH induced Ramos cell death mainly by apoptosis in a concentration dependent manner after 12 h exposure. LD and LH also induced Ramos cell death mainly by apoptosis after 12 h exposure, but their effects were concentration independent. BD and BH were further studied for their mechanisms of cytotoxic actions. They induced Ramos cell apoptosis mainly by caspase activation. A pan caspase inhibitor, Z-VAD-FMK, almost completely blocked the effects of BD and BH. It is possible that these extracts induce apoptosis via the intrinsic pathway. Anti-Fas ligand antibody which blocks Fas-Fas ligand interaction of the extrinsic pathway in lymphocytes did not inhibit their apoptotic effects. BD and BH had effects on the expression of Bcl-2 family proteins which involve in the intrinsic pathway of apoptosis. BD significantly inhibited the mRNA expression of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Bcl-xl and significantly increased the mRNA expression of pro-apoptotic protein, BAX. BH also had similar effects on the mRNA expression of these Bcl-2 family proteins but its effect was statistically nonsignificant. The effects of BD and BH on the cell cycle of Ramos cells were also investigated. BH induced cell death without changing the cell cycle pattern of Ramos cell. BD changed the cell cycle pattern of the cancer cells. It caused the cells accumulation in the S and G2-M phases. The molecular effects of BD on several proteins involve in the cell cycle progression were also evaluated. BD profoundly inhibited the mRNA expression of the cyclin D1, slightly inhibited the cyclin E. Both cyclins play positive role in the cell cycle progression. However, BD also inhibited the mRNA expression of p53 and p21 which negatively regulated the cell cycle. These results demonstrate that dichloromethane and hexane extracts from branches of *M. hirsutum* (BD and BH) contain active compounds which potentially induce cancer cell death mainly by apoptosis.

Field of Study : Medical Science ..... Student's Signature ..... Satit Rodphukdeekul

Academic Year : 2009 ..... Advisor's Signature ..... Wacharee Limpanasithikul

Co-Advisor's Signature ..... Tada Sueblinvong

Co-Advisor's Signature ..... Nijsiri Raungrungsri

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincere gratitude to my advisor, Asst. Prof. Dr. Wacharee Limpanasithikul, whose encouraging guidance and open-mindedness to discuss anything at anytime during the long working process. This enable me to accomplish the thesis, I am grateful for her help, valuable suggestion and all of her dedications, all of which also provide the good direction for my future.

I would like to express my appreciation and grateful thanks to my co-advisor Prof. Dr. Tada Sueblinvong, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine for her valuable suggestion and kindness. Assoc. Prof. Dr. Nijsiri Ruangrungsi, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, for his support and kindly providing many herb extracts in this study.

I would also express my sincere appreciation to the committee of this thesis examination; Assoc. Prof. Vilai Chentanez, Assoc. Prof. Dr. Poonlarp Cheepsunthorn, Department of Anatomy, Faculty of Medicine and Asst. Prof. Pathama Leewanich, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for their constructive comments and suggestions.

I would like to thank the National Blood Bank, Thai Red Cross Society for providing samples of whole blood from healthy donors for this study.

I would like to give my special thanks to Mr. Chatikorn Bunkrai and Mr. Chaisak Chansriniyom for their help, guiding and data support.

I would like to give my special thanks to the staff members of Immunology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine for assisting of FACs analysis technique. I wish to thank all staff members of the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and also to all of my friends for their assistance and encouragement.

This project was partly supported by the 90^{th} Anniversary of Chulalongkorn University fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund), Graduate School, Chulalongkorn University.

Above all, I would like to eternally thanks to my parents and my big family for their encouragement, love, understanding and continued support during the long course of my education.

CONTENTS

	Page
Abstract (Thai)	iv
Abstract (English)	v
Acknowledgements	vi
Contents	vii
List of Tables	x
List of Figures	xi
List of Abbreviations	xiii
Chapter	
1 Introduction	1
Background and Rationale	1
Objective	3
Hypothesis	3
Expected benefits and applications	3
Keywords	3
2 Literatures Reviews	4
Programmed cell death by apoptosis	5
Caspases	7
Caspase signaling in apoptosis	10
Caspase activation pathways	12
The extrinsic pathway of apoptosis	13
Signaling by Fas/FasL	13
The mitochondrial/intrinsic pathway of apoptosis	15
The proteins in the Bcl-2 family	17
The granzyme B-mediated pathway of apoptosis	19
The cell cycle	21
Key element of the cell cycle regulation	21

Chapter Page

Cell cycle progression..... 27
Micromelum hirsutum..... 29
Chemical constituents from plants in
the genus *Micromelum* and their pharmacological properties..... 29
Coumarins..... 30
Flavonoids (polyphenolic compound)..... 31
Quinolone alkaloid..... 31
Cabazole alkaloids..... 32
3 Materials and Methods..... 33
1. Materials..... 33
1.1 Extracts of *Micromelum hirsutum*..... 33
1.2 Cells..... 34
1.3 Equipments and Instruments..... 34
1.4 Reagents..... 35
2. Methods..... 36
2.1 Preparation of the stock solutions of *M. hirsutum* extracts..... 36
2.2 Preparation of human peripheral blood-
mononuclear cells (PBMCs)..... 36
2.3 Determination of cytotoxicity activity
of the *M. hirsutum* extracts..... 37
2.3.1 Preliminary determination
of cytotoxicity activities of the extracts..... 37
2.3.2 Determination of cytotoxic activities at IC50's
of the extracts..... 37
2.4 Determination of apoptotic induction 38
2.5 Determination of apoptotic induction mechanism 39
2.5.1 Determination of the effect of the solvent extracts
through caspase activation..... 39

Chapter Page

2.5.2 Determination of effect of the solvent extracts through Fas-Fas ligand interaction..... 39
2.5.3 Determination of the expression of proteins involving in mitochondrial dependent pathway..... 39
2.6 Determination of the effect of the solvent extracts on Ramos cell cycle..... 42
2.7. Determination of the effect of solvent extracts on the mRNA expression of regulatory proteins in the cell cycle..... 43
2.8 Statistical analysis..... 44
4 Results..... 45
5 Discussions and Conclusion..... 67
References..... 73
Appendices..... 84
Appendix A..... 85
Appendix B..... 88
Appendix C..... 90
Biography..... 111

LIST OF TABLES

Table Page

1. Primers for RT–PCR and their annealing temperatures..... 42
2. Primers for RT–PCR and their annealing temperatures..... 44
3. The effect of the dichloromethane extract from branches of *M. hirsutum* (BD) on Ramos cells death..... 52
4. The effect of the hexane extract from branches of *M. hirsutum* (BH) on Ramos cells death..... 53
5. The effect of the dichloromethane extract from leaves of *M. hirsutum* (LD) on Ramos cells death..... 54
6. The effect of the hexane extract from leaves of *M. hirsutum* (LH) on Ramos cells death..... 55

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Characteristics of cell death by apoptosis	6
2	A schematic representation of structural features of mammalian caspases	8
3	Three major groups of mammalian caspases	9
4	Effector caspases function in demolition of several cellular structures and organelles	11
5	Caspase activation pathways	12
6	The Fas-FasL signaling pathway of apoptosis	15
7	The intrinsic pathway of apoptosis	17
8	The Bcl-2 family of proteins	19
9	Granzyme B-mediated apoptosis pathway	20
10	The stages of the cell cycle and checkpoints	21
11	Activity of mammalian cyclin-CDK complexes through the cell cycle	22
12	Concentration changes in cyclins during the cell cycle	23
13	Processes influencing cyclin concentration.	24
14	The cell cycle inhibitory proteins (CKI)	26
15	Chemical structure of coumarin	30
16	Chemical structure of flavonoid	31
17	Chemical structure of carbazole alkaloid	32
18	The cytotoxic effects of solvent extracts from branches and leaves of *M. hirsutum* on Ramos cells	46
19	The cytotoxic effects of A) BD, B) BH, C) LD and D) LH on Ramos cells and human PBMCs	47
20	The cytotoxic effects of A) BD, B) BH, C) LD and D) LH on Ramos cells and human PBMCs	48

Figure		Page
21	The comparison of cytotoxicities of A) BD, B) BH, C) LD, and D) LH on Ramos cells between 24 and 48 h of exposure.....	49
22	A representative pattern of Ramos cell death induced by the extracts of *M. hirsutum*.....	51
23	Effect of the dichloromethane and the hexane extracts from branches and leaves of *M. hirsutum* on Ramos cell death after 12 h exposure	56
24	The effect of BD on the mRNA expression of p53 and BCL-2 family proteins.....	59
25	The effect of BH on the mRNA expression of p53 and BCL-2 family proteins.....	60
26	The involvement of Fas-FasL interaction on *M. hirsutum* extracts induced Ramos cells apoptosis.....	61
27	The involvement of caspase activation on *M. hirsutum* extracts induced Ramos cells apoptosis.....	62
28	Representative cell cycle patterns of Ramos cells treated with BD.....	64
29	Representative cell cycle patterns of Ramos cells treated with BH.....	65
30	A representative of the mRNA expression of p21, p53 and cyclins in BD-treated Ramos cells.....	66

LIST OF ABBREVIATIONS

AIF	apoptosis-inducing factor
Apaf-1	apoptosis protease-activating factor 1
APC	anaphase promoting complex
ATCC	American Type Cell Culture
ATP	adenosine triphosphate
BAD	BCL-2 antagonist of cell death
BAK	BCL-2-antagonist/killer-1
BAX	BCL-2 associated x protein
BCL-2	B-cell CLL/Lymphoma 2
BCL-XL	BCL-2 related gene, long isoform
BH	BCL-2 homology domain
BH3	BCL-2 homology 3 domain
BID	BH3 interacting domain death agonist
BIK	BCL-2-interacting killer
BIM	BCL-2-like-11
BIR	baculovirus IAP repeat
BMF	BCL-2 modifying factor
CAD	caspase-activated DNase
CARD	caspase recruitment domains
Cdc	cell-division-cycle gene
CDK	cyclin-dependent kinases
Cip/Kip	CDK inhibitory Protein/Kinase Inhibitor protein
CKI	CDK inhibitors
CO_2	carbon dioxide
CR	complement receptor
CRD	cysteine-rich domain
CTL	cytotoxic T lymphocytes
DAMP	danger-associated molecular pattern
DD	death domain

DED	death effector domain
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DISC	death inducing signaling complex
DNA	deoxyribonucleic acid
DRs	death receptors
eIF	eukaryotic initiation factor
EndoG	endonuclease G
ER	endoplasmic reticulum
FADD	Fas associated death domain
FasL	Fas ligand
FBS	fetal bovine serum
FLIP	FLICE-inhibitory protein
FLIPL	FLICE-inhibitory protein long form
FLIPS	FLICE-inhibitory protein short form
h	hour
HCl	hydrochloric acid
HMGB1	high mobility group protein B1
Htra2	high temperature requirement A2
IAPs	inhibitors of apoptosis protein
ICAD	inhibitor of caspase-activated DNase
INK4	inhibitors of CDK4
mg	milligram(s)
ml	milliliter(s)
M	molar (mole per liter)
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCL-1	Myeloid cell leukemia 1
MFG-E8	milk fat globule–EGF factor-8 protein
MMP	mitochondrial membrane permeabilization
MPF	mitosis promoting factor
MPT	mitochondrial permeability transition
ng	nanogram(s)

NaCl	sodium chloride
NAIP	neuronal apoptosis inhibitory protein
NF-κB	nuclear factor κB
NK	Natural killer cells
NO	nitric oxide
ox-LDL	oxidized low-density lipoprotein
PBS	phosphate buffer saline solution
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PS	phosphatidylserine
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
pH	the negative logarithm of hydrogen ion concentration
Rb	retinoblastoma protein
rpm	revolution per minute
SCF	Skp1, cullin, F-box protein
S.E.	standard error
Smac	second mitochondria-derived activator of caspases
SR-A	scavenger receptor A
TGF-β	transforming growth factor β
TM	transmembrane domain
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
XIAP	X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein
^{0}C	degree Celsius
μg	microgram(s)
$\Delta\psi_m$	mitochondrial membrane potential