

การสังเคราะห์แอนทราควิโนนที่มีหมู่ไกลคอลและเอมีนซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์  
ความสามารถในการยัดเหนี่ยวดีเอ็นเอและแอฟอพโทซิส



นางสาวสุปราณี แสงทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



SYNTHESIS OF GLYCOL- AND AMINE-CONTAINING ANTHRAQUINONES EXHIBITING  
OF CYTOTOXICITY, DNA-BINDING AFFINITY AND APOPTOSIS

Miss Supranee Sangthong

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title                                   SYNTHESIS OF GLYCOL- AND AMINE-CONTAINING  
ANTHRAQUINONES EXHIBITING OF CYTOTOXICITY, DNA-  
BINDING AFFINITY AND APOPTOSIS

By   Miss Supranee Sangthong

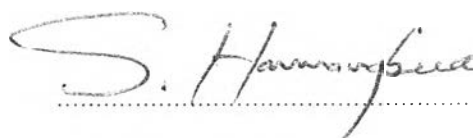
Field of Study                                 Biotechnology

Thesis Advisor                               Associate Professor Nongnuj Muangsin, Ph.D.

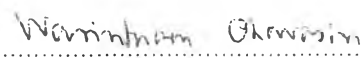
Thesis Co-advisor                           Associate Professor Nattaya Ngamrochanavanich, Ph.D.  
Associate Professor Neamati Nouri, Ph.D.

---

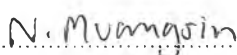
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

 ..... Dean of the Faculty of Science  
(Professor Supot Hannongbua, Ph.D.)

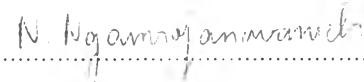
#### THESIS COMMITTEE

 ..... Chairman

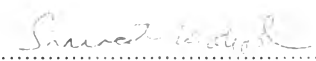
(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)

 ..... Thesis Advisor


(Associate Professor Nongnuj Muangsin, Ph.D.)

 ..... Thesis Co-advisor

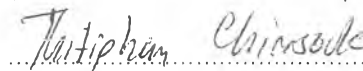
(Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.)

 ..... Examiner

(Associate Professor Sirirat Kokpol, Ph.D.)

 ..... Examiner

(Associate Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.)

 ..... External Examiner

(Thitiphan Chimsook, Ph.D.)

สุปราณี แสงทอง : การสังเคราะห์แอนทราควิโนนที่มีหมู่ไกลคอลและเอมีนซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ความสามารถในการยึดเหนี่ยวดีเอ็นเอและแอฟอพโทซิส. (SYNTHESIS OF GLYCOL- AND AMINE-CONTAINING ANTHRAQUINONES EXHIBITING OF CYTOTOXICITY, DNA-BINDING AFFINITY AND APOPTOSIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. นงนุช เหมือนสิน, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. นาดยา งามโรจนวิชัย, Assoc. Prof. Neamati Nouri, Ph.D., 108 หน้า.

มะเร็งเป็นหนึ่งในสาเหตุการตายหลักทั่วโลก งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ anthracene-9, 10-dione (2-15) สำหรับเคมีบำบัด ซึ่งแบ่งเป็น 2 หมวด คือ (i) เพื่อเพิ่มการออกฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งปากมดลูก เช่น แคลสกี (Ca Ski) สารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุดคือ สารประกอบ 5 (4-(benzylamino)-9,10-dioxo-4a,9,9a,10-tetrahydroanthracen-1-yl 4-ethylbenzenesulfonate) ที่มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.3 ไมโครโมลาร์ ซึ่งต่ำกว่าซิสพลาติน 20 เท่า ( $IC_{50}$  = 8.0 ไมโครโมลาร์) และมีความเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ปกติ (WI-38) ซึ่งมี  $IC_{50}$  มากกว่า 30 ไมโครโมลาร์ กลไกการออกฤทธิ์ของสารประกอบดังกล่าวสามารถยับยั้งการแสดงออกยีน HPV E6 โดยทำให้ p53 เพิ่มขึ้น แต่กีดการทำงานของ Bcl-2 โดยการเหนี่ยวนำในระยะ  $G_2/M$  ของวัฏจักรเซลล์ และหมวดที่ 2 (ii) เพื่อยับยั้งมะเร็งที่ดื้อยา โดยพบว่า สารประกอบ 9 (4-(4-Aminobenzylamino)-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-1-yl-4-methylbenzenesulfonate) สามารถยับยั้งมะเร็งที่ดื้อยา (NCI/ADR-RES) โดยมีค่า  $IC_{50}$  เพียง 0.8 ไมโครโมลาร์ ดีกว่าดอกไซรูบิซินซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุม 20 เท่าเมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ดื้อดอกไซรูบิซิน

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....สุปราณี แสงทอง.....  
 ปีการศึกษา.....2556.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....น. นาดยา งามโรจนวิชัย.....  
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

# # 5273866823: MAJOR PROGRAM IN BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: ANTHRAQUINONES / CYTOTOXIC ACTIVITY / CELL CYCLE / APOPTOSIS

SUPRANEE SANGTHONG: SYNTHESIS OF GLYCOL- AND AMINE-CONTAINING ANTHRAQUINONES EXHIBITING OF CYTOTOXICITY, DNA-BINDING AFFINITY AND APOPTOSIS. ADVISOR: ASSOC. PROF. NONGNUJ MUANGSIN, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF NATTAYA NGAMROJANAVANICH, Ph.D., ASSOC. PROF NEAMATI NOURI, Ph.D. 108 pp.

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. This research focuses on the synthesis of a new series of anthracene-9, 10-dione derivatives (2-15) for cancer chemoprotective therapy, classified into two series (i) increasing cytotoxic activity in human papillomavirus (HPV) positive cancer cell line, Ca Ski. The highest cytotoxicity was achieved by *4-(benzylamino)-9,10-dioxo-4a,9,9a,10-tetrahydroanthracen-1-yl 4-ethylbenzenesulfonate* (5) with the inhibitory concentration 50 ( $IC_{50}$ ) of 0.3  $\mu$ M which is 20 times lower than that of cisplatin (CDDP;  $IC_{50}$  = 8.0  $\mu$ M). The toxicity against non-cancerous cell lines, WI-38, was low with the  $IC_{50}$  > 30  $\mu$ M. The anticancer mechanism of such compound caused decreasing HPV E6 expression. Furthermore, increasing p53 and decreasing Bcl-2 expression was noted. Cell cycle profiles revealed an accumulation of cells in the  $G_2/M$  phase and (ii) overcoming drug resistance with remarkable cytotoxic activity, (*4-(4-Aminobenzylamino)-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-1-yl-4-methylbenzenesulfonate*) (9) has excellent cytotoxicity against doxorubicin-resistant cancer cell lines ( $IC_{50}$  = 0.8  $\mu$ M), 20-fold higher than doxorubicin.

Field of Study :.....Program in Biotechnology..... Student's Signature.....

Academic Year : ..... 2013..... Advisor's Signature.....

Co-advisor's Signature.....

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere thanks to Associate Professor Dr. Nongnui Muangsin, my advisor who offered invaluable assistance, support and guidance. Deepest gratitude is also due to Associate Professor Dr. Nattaya Ngamrachnavanich and Associate Professor Dr. Neamati Nouri as the co-advisors. Special thanks to Associate Professor Dr. Sirirat Kokpol for providing such a great opportunity to do laboratory research in University of Southern California (USC), United States and Associate Professor Dr. Tanapat Palaga, Department of Microbiology. I am also indebted to Helen Ha who always support me, without her knowledge and assistance this research would not have been successful. I would like to acknowledge RGJ for financial supports of my Ph.D study.

## CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF SCHEMES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER	
I    INTRODUCTION.....	1
II   LITERATURE REVIEW.....	6
III  MATERIALS AND METHODS.....	11
IV  RESULTS AND DISCUSSION.....	27
(i)  PART I.....	27
(ii) PART II.....	40
V   CONCLUSION.....	50
REFERENCES.....	53
APPENDIX.....	59
VITA.....	102

## LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
1 Selected crystallographic data for compounds 3, 5 and 7.....	28
2 %Screening inhibition of anthraquinone derivatives (1-7) against five cancer cells compared to cisplatin.....	31
3 IC <sub>50</sub> of compound 5 and cisplatin on five cancer cells and lung normal (WI-38) cells.....	33
3 %Cell proliferation of anthraquinone derivatives (8-15) compared to doxorubicin (DOX).....	42
4 IC <sub>50</sub> of anthraquinone derivatives (8-15) compared to doxorubicin (DOX).....	45



## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1	Schematic diagram showing the effects of cisplatin independent and dependent apoptosis.....2
2	Chemical structure of cisplatin.....3
3	Chemical structure of doxorubicin.....4
4	Chemical structures of (a) anthraquinone and (b) emodin.....5
5	Cell cycle.....8
6	Model of program cell deaths (a) apoptosis and (b) necrosis.....9
7	Crystallgriphic structures of (a) compound 4 (b) compound 5 and (c) compound 7.....37
8	(a)% Cytotoxicity in the screening of compound 5 (10 $\mu$ M) using six human carcinoma cell lines (b) No effect of glutathione on compound 5's activity at 10 $\mu$ M and (c) %cytotoxicity of compound 5 and (d) cisplatin as dose dependences against Ca Ski cells, and profiles are shown representative of those seen from three independent trials..... 40
9	% Cell viability upon treatment of WI38 normal cells with (a) CDDP and (b) compound 5 at 30, 10, 1, 0.1 $\mu$ M, and profiles are shown representative of those seen from three independent trials.....40

FIGURE	PAGE
10	(a) Colony formation in CaSki treated with CDDP or compound 5 at 10, 5, 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{M}$ (b) treatment with compound 5 induces apoptosis in a dose-dependent manner, compared with an untreated cells, DMSO and CDDP (3.0 $\mu\text{M}$ ). Profiles are shown representative of those seen from two independent trials.....42
11	Compound 5 arrest cell in G <sub>2</sub> /M. Cell cycle profiles of Ca Ski cells at 24 h after treatment with compound 5 at 1.5 and 3.0 $\mu\text{M}$ compared to cisplatin at 3 $\mu\text{M}$ . Control cells (Un-treatment and DMSO) shown were measured at 24 h and no significant changes were observed. In all profiles at least two events (cells) were measured, and profiles are shown representative of those seen from two independent trials.....43
12	(a) Total RNA from HPV positive Ca Ski cells was analyzed for mRNA expression by real time RT-PCR, and (b) effect of compound 5 treatment in a does dependent manner (0.3 and 1.5 and 3.0 $\mu\text{M}$ ) on protein expression in Ca Ski cells for 24 h, comparing with cisplatin at 3.0 $\mu\text{M}$ as a positive control. 40 $\mu\text{M}$ of total protein from each sample was analyzed by Western blot, and profiles are shown representative of those seen from two independent trials..... 44
13	Compounds 8-10 inhibit cell proliferation and colony formation (A) representative (of three independent trials) colony formation assays (B) cytotoxicity, as % killed cells of 8-10 against the NCI/ADR-RES cell line assayed after 72 h exposure and shown as the mean $\pm$ 1 SD and are derived from triplicate trials, and (C) complete inhibition of NCI/ADR-RES cells by 9 at 1 $\mu\text{M}$ and profiles are shown representative of those seen from two independent trials..... 46

FIGURE	PAGE
14	(A) Compound 9 arrest cells in G <sub>2</sub> /M of NCI/ADR-RES cells treated with compound 9 at 10 $\mu$ M for 24 h. Control cells were untreated (B) antioxidants have no effect on compound 9-mediated cytotoxicity NCI/ADR-RES cells were pretreated with NAC or GSH prior to 72 h treatment with compound 9.....47
15	Compound 9 does not upregulate p53 in LNCaP cells for 24 h. A total of 30 $\mu$ g protein was loaded per track and analyzed by western blot.....48
16	Schematic diagram showing the effects of anthraquinone to apoptosis in Ca Ski.....51

## LIST OF SCHEMES

SCHEME		PAGE
1	Synthesis of anthraquinone derivatives (compounds 3-7).....	18
2	Synthesis of anthraquinone derivatives (compounds 8-15).....	21

## LIST OF ABBREVIATIONS

%	Percentage
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{L}$	Microliter
$\mu\text{g}$	Microgram
DOX	Doxorubicin
g	Gram
h	Hour
mg	Milligram
mL	Milliliter
pH	Power of hydrogen ion or the negative
$A_{260}$	Absorbance at 260 nanometers
Ab	Antibody
DNA	Deoxyribonucleic acid
cDNA	Complementary DNA
$\text{CO}_2$	Carbon dioxide
DEPC	Diethylpyrocarbonate
Min	Minute
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
AGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffer saline
PBST	Phosphate buffer saline-Tween
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RNA	Ribonucleic acid
Rpm	Round per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
U	Unit
V	Volume

$\alpha$	Alpha
$^{\circ}\text{C}$	Degree Celsius
/	Per
:	Ratio