ผลของไตรโคลซานต่อเซลล์มะเร็งปอดมนุษย์ชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก เอช 460 ที่ดื้อต่อการตายแบบอะนอยคิส

นางสาวธิดารัตน์ วินิจธนา

2086487O2

ห้องสมุดคณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5376971633

EFFECTS OF TRICLOSAN ON ANOIKIS-RESISTANT HUMAN NON-SMALL CELL LUNG CANCER H460 CELLS

Miss Thidarat Winitthana

2086487021

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biopharmaceutical Sciences
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	EFFECTS OF TRICLOSAN ON ANOIKIS-RESISTANT HUMAN NON-SMALL CELL LUNG CANCER H460 CELLS
By	Miss Thidarat Winitthana
Field of Study	Biopharmaceutical Sciences
Thesis Advisor	Assistant Professor Pithi Chanvorachote, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Police Lieutenant Colonel Somsong Lawanprasert, Ph.D.

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

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Assistant Professor Rungpetch Sakulbumrungsil, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Assistant Professor Rataya Luechapudiporn, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Assistant Professor Pithi Chanvorachote, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Police Lieutenant Colonel Somsong Lawanprasert, Ph.D.)

.....Examiner
(Associate Professor Mali Wirotesangthong, Ph.D.)

.....Examiner
(Weerapong Prasongchean, Ph.D.)

.....External Examiner
(Hasseri Halim, Ph.D.)

ธิดารัตน์ วินิจธนา : ผลของไตรโคลซานต่อเซลล์มะเร็งปอดมนุษย์ชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก เอช 460 ที่ดื้อต่อการตายแบบอะนอยคิส. (EFFECTS OF TRICLOSAN ON ANOIKIS-RESISTANT HUMAN NON-SMALL CELL LUNG CANCER H460 CELLS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ปิติ จันทร์วรโชติ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. พ.ต.ท.หญิง ดร. สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ, 124 หน้า.

การเปลี่ยนแปลงลักษณะเซลล์จากอีพิธีเลียลเป็นเซลล์มีเซ็นไคมอล (epithelial-to-mesenchymal transition; EMT) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีผลเพิ่มการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง งานวิจัยนี้เป็นการรายงานถึงผลของไตรโคลซาน ซึ่งใช้เป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ EMT ในเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ที่ดื้อต่อการตายแบบอะนอยคิส โดยกระบวนการ EMT เป็นกระบวนการที่ทำให้เซลล์มะเร็งเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่และการรุกราน รวมถึงเพิ่มความสามารถในการสร้างมะเร็งก้อนใหม่อีกด้วย ในงานวิจัยนี้เซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อการตายแบบอะนอยคิสได้รับไตรโคลซานในความเข้มข้นที่สัมพันธ์กับระดับของสารที่พบในร่างกายมนุษย์ จากการศึกษาพบว่าไตรโคลซานมีผลทำให้เซลล์มะเร็งลดการเกาะกันระหว่างเซลล์ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของเซลล์ที่ผ่านกระบวนการ EMT และเมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของไตรโคลซานด้วยวิธีการ western blot analysis พบว่า ไตรโคลซานมีผลทำให้ระดับของ E-cadherin ในเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเพิ่มการแสดงออกของ EMT markers ได้แก่ N-cadherin, vimentin, snail และ slug อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งที่ได้รับไตรโคลซานมีลักษณะเป็นมีเซ็นไคมอลเพิ่มมากขึ้น และเมื่อศึกษาด้วยวิธีการ tumor formation assay พบว่าการเหนี่ยวนำให้เกิด EMT ด้วยไตรโคลซานยังมีผลเพิ่มการสามารถในการสร้างโคโลนีของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้การเหนี่ยวนำให้เกิด EMT ด้วยไตรโคลซานยังมีผลกระตุ้นการทำงานของ focal adhesion kinase/ATP dependent tyrosine kinase (FAK/Akt) และ Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) จึงทำให้เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการเคลื่อนที่และการรุกรานเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงกล่าวโดยสรุปได้ว่าการศึกษานี้เป็นการรายงานถึงผลการเหนี่ยวนำของไตรโคลซานให้เกิด EMT ในเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ที่ดื้อต่อการตายแบบอะนอยคิส ซึ่งมีผลเพิ่มความสามารถในการสร้างโคโลนีของเซลล์มะเร็งและความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง โดยคุณสมบัติที่ได้กล่าวมานี้เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการแพร่กระจายได้มากยิ่งขึ้น ผลการศึกษานี้ทำให้ได้ข้อมูลใหม่ด้านพิษวิทยาของไตรโคลซาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลประกอบการพิจารณาใช้สารนี้ในผู้ป่วยมะเร็งต่อไป

20868702

สาขาวิชา เภสัชศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....
ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5376971633 : MAJOR BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES
KEYWORDS: TRICLOSAN / EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION / LUNG CANCER / CANCER AGGRESSIVENESS

THIDARAT WINITTHANA: EFFECTS OF TRICLOSAN ON ANOIKIS-RESISTANT HUMAN NON-SMALL CELL LUNG CANCER H460 CELLS. ADVISOR: ASST. PROF. PITHI CHANVORACHOTE, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. POL. LT. COL. SOMSONG LAWANPRASERT, Ph.D., 124 pp.

Alteration of epithelial cancer cell toward mesenchymal phenotype (epithelial-to-mesenchymal transition; EMT) has been shown to potentiate tumor aggressiveness by increasing cancer cell metastasis. Herein, the present study demonstrates the effect of triclosan, a widely used antibacterial agent found in many daily products, in enhancing the EMT in aggressive anoikis resistant human lung cancer cells. EMT was long known to increase abilities of cancer cells to increase migration and invasion as well as tumorigenicity of cells. The present study reveals that treatment of the anoikis resistant cells with triclosan at the physiologically-related concentrations significantly decreased cell to cell adhesion which is a dominant characteristic of cell undergoing EMT. Importantly, western blot analysis revealed that triclosan-treated cells exhibited decreased E-cadherin, while the levels of EMT markers, namely N-cadherin, vimentin, snail and slug were found to be significantly up-regulated, indicating mesenchymal phenotype of cells. Also, EMT-induced by triclosan treatment increased the colony number of the cancer cells assessed by tumor formation assay. Furthermore, EMT-induced by triclosan treatment was accompanied by the activation of focal adhesion kinase/ATP dependent tyrosine kinase (FAK/Akt) and Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) which enhanced ability of the cells to migrate and invade. In conclusion, this study demonstrated that triclosan may potentiate tumorigenicity and motility of anoikis resistant human lung cancer cells via the process of EMT. As mentioned capabilities are required for success in metastasis, the present study provides the novel toxicological information and encourages the awareness of triclosan use in cancer patients

2086487O2

Field of Study: Biopharmaceutical Sciences
Academic Year: 2013

Student's Signature Thidarat Winitthana
Advisor's Signature Pithi Chanv
Co-Advisor's Signature Pol. Lt. Col. Somsong Law

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express profound gratitude and appreciation to my advisor, Assistant Professor Pithi Chanvorachote, Ph.D. for his invaluable support, encouragement, supervision, useful suggestions throughout this research work, preparing and presentation of this thesis.

I would like to express appreciation to my co-advisor, Associate Professor Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert, Ph.D. for her valuable advice, guidance and comments for the experimental work and preparing the thesis.

I would like to thank Phisit Khemawoot, Ph.D. for supplying triclosan. I am also highly thankful to Assistant Professor Rataya Luechapudiporn, Ph.D., Assistant Professor Mali Wirotesangthong, Ph.D., Weerapong Prasongchean, Ph.D. and Hasseri Halim, Ph.D. for their valuable comments and suggestions.

I am also thankful to all staff members of the Department of Pharmacology and Physiology and Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for the laboratory facilities and their support throughout this research work.

I am as ever, especially indebted to my parents, Mr. Thanet and Mrs. Unchalee Winitthana for their love and support throughout my life. I also wish to thank all professors of Chulalongkorn Dormitory for their kindness and support while I studied. Moreover, my sincere thanks go to my friends who shared their love and experiences with me.

Finally, I would like to thank The 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund) for support budget of this thesis and Chulalongkorn University Graduate Scholarship to Commemorate the 72nd Anniversary of His Majesty King Bhumibol Adulyadej (Chulalongkorn University) for the financial support.

2085487O2

CONTENTS

20864870

Page

208648702

LIST OF TABLES

Page

208648702

Page

208648702

LIST OF FIGURES

Page

208648702

Page

208648702

LIST OF ABBREVIATIONS

%	= percentage
°C	= degree Celsius
µg	= microgram (s)
µl	= microliter (s)
µM	= micromolar
Akt	= adenosine triphosphate dependent tyrosine kinase
ANOVA	= analysis of variance
APAF	= apoptosis protease activating factor
AR	= androgen receptor
AR cells	= anoikis resistant cells
ATP	= adenosine triphosphate
Bak	= Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	= Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	= B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	= B-cell lymphoma-extra large
bHLH	= basic helix-loop-helix
Bid	= BH3 interacting-domain death agonist
Bim	= Bcl-2-like protein 11
BRCA2	= breast cancer 2
BSA	= bovine serum albumin
Ca^{2+}	= calcium ion
Cdc42	= cell division cycle 42
CO_2	= carbon dioxide
CTCs	= circulating tumor cells
CR	= cytokine receptor
DFF40	= DNA fragmentation factor 40 kDa
DISC	= death-inducing signaling complex
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DNA	= deoxyribonucleic acid
DNMT	= DNA methyltransferases

2086487 02

EC = extracellular cadherin domain
ECM = extracellular matrix
EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid
EGF = epidermal growth factor
EGFR = epidermal growth factor receptor
EMT = epithelial-to-mesenchymal transition
EPA = The US Environmental Protection Agency
ER = estrogen receptors
ERB4 = receptor tyrosine-protein kinase erbB-4
ERK = extracellular-signal-regulated kinase
et al. = et alibi, and other
FADD = Fas-associated death domain protein
FAK = focal adhesion kinase
FasL = Fas Ligand
FBS = fetal bovine serum
FDA = The US Food and Drug Administration
FGF = fibroblast growth factor
g = gram
GAPs = GTPase activating proteins
GDIs = guanine nucleotide dissociation inhibitors
GDM = global DNA methylation
GDP = guanosine diphosphate
GEFs = guanine nucleotide exchange factors
GF = growth factor
GFR = growth factor receptor
GFRKs = growth factor receptor kinases
GPCR = G-protein-coupled receptor
GTP = guanosine triphosphate
h = hour, hours
H^+ = hydrogen ion
HRP = horseradish peroxidase

208648702

IgG = immunoglobulin G
IU = international unit
kDa = kilo dalton
MAPK = mitogen-activated protein kinase
MET = mesenchymal-epithelial transition
MDB = methylated DNA-binding domain
min = minute (s)
mg = milligram (s)
ml = milliliter
mM = millimolar
MMPs = matrix metalloproteinases
mTOR = mammalian target of rapamycin
mTORC1 = mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2 = mammalian target of rapamycin complex 2
MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Na^+ = sodium ion
NaCl = sodium chloride
nm = nanometer (s)
NSCLC = non-small cell lung cancer
OD = optical density
OMM = outer mitochondrial membrane
p53 = cellular tumor antigen p53
PBS = phosphate-buffered saline
pAkt = phosphorylated adenosine triphosphate dependent tyrosine kinase
pFAK = phosphorylated focal adhesion kinase
PDK1 = phosphoinositide-dependent kinase-1
PI = propidium iodide
PI3K = phosphatidylinositol-3 kinase
PIP2 = polyhydroxyl- phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP3 = phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

208648702

PKB = protein kinase B

PPARα = peroxisome proliferator-activated receptor alpha

pro-MMPs = pro-matrix metalloproteinases

PUMA = p53 upregulated modulator of apoptosis

Rac1 = Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RhoA = Ras homolog gene family, member A

Ras = rat sarcoma

RPMI = Roswell Park memorial institute's medium

SCLC = small cell lung cancer

SDS = sodium dodecyl sulfate

SE = standard error

Ser = serine

SF/HGF = scatter factor/hepatocyte growth factor

Src = sarcoma

T3 = triiodothyronine

T4 = thyroxine

t-Bid = truncated form of Bid

TBST = Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20

TCS = 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether

TGF-β = transforming growth factor beta

Tyr = tyrosine

ZEB = zinc finger E-box-binding homeobox

ZO = zonula occludens

208648702