ผลของ รีเนียรามัยซิน เอ็ม ต่อการทำงานของ พี-ไกลโคโปรตีน

นางสาวพิมรำไพ แสงอินทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF RENIERAMYCIN M ON P-GLYCOPROTEIN FUNCTION

Miss Phimramphai Saengin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacology
Department of Pharmacology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2007
Copyright of Chulalongkorn University

501832

Thesis Title	EFFECTS OF RENIERAMYCIN M ON P-GLYCOPROTEIN FUNCTION
By	Miss Phimramphai Saengin
Field of study	Pharmacology
Thesis Advisor	Assistant Professor Suree Jianmongkol, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Thitima Pengsuparp, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.

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

..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Assistant Professor Surachai Unchern, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Suree Jianmongkol, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Associate Professor Thitima Pengsuparp, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Witthaya Janthasoot)

.....Member

(Khanit Suwanborirux, Ph.D.)

พิมรำไพ แสงอินทร์: ผลของ รีเนียรามัยซิน เอ็ม ต่อการทำงานของ พี-ไกลโคโปรตีน (EFFECTS OF RENIERAMYCIN M ON P-GLYCOPROTEIN FUNCTION) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. สุรีย์ เจียรณ์มงคล, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. ธิติมา เพ็งสุภาพ และ ผศ. ดร. นนทิมา วรรธนะภูติ, 88 หน้า

สารจากทะเลเป็นแหล่งสำคัญในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคใหม่ๆ โดยเฉพาะสารที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง รีเนียรามัยซิน เอ็มเป็นสารใหม่ในกลุ่มเตตร้าไฮโดรไอโซควิโนลิน ที่สกัดได้จากฟองน้ำทะเลสายพันธุ์ *Xestospongia sp.* จากอ่าวไทย สารชนิดนี้เป็นสารที่มีฤทธิ์แรงในการต้านเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตาม ผลของรีเนียรามัยซิน เอ็มต่อการต้านการดื้อต่อยาหลายขนาน โดยเฉพาะผลต่อการทำงานพี-ไกลโคโปรตีนที่ผิวเซลล์ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการดื้อยามะเร็งยังไม่มีการศึกษา ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาความเป็นพิษของรีเนียรามัยซิน เอ็ม ในเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เซลล์เยื่อบุผิวหนัง (CC2511) เซลล์เยื่อบุไต ($LLC\text{-}PK_1$) เซลล์มะเร็งกระพุ้งแก้ม (KB) เซลล์มะเร็งปอด (H460) และ เซลล์ที่มีการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน ($LLC\text{-}MDR_1$) รวมทั้งยังทำการศึกษาผลของ รีเนียรามัยซิน เอ็ม ต่อการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีน

การศึกษาความเป็นพิษของรีเนียรามัยซิน เอ็ม และลักษณะการตายของเซลล์วิเคราะห์โดยใช้วิธี MTT และ การหลั่งของ LDH ผลของรีเนียรามัยซิน เอ็มต่อการทำงานของ พี-ไกลโคโปรตีน ศึกษาจากผลการให้รีเนียรามัยซิน เอ็มร่วมกับพี-ไกลโคโปรตีน สับสเตรท ได้แก่ vinblastine, puromycin, rhodamine 123 หรือสารยับยั้งการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีน ได้แก่ verapamil นอกจากนี้ยังทำการศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของรีเนียรามัยซิน เอ็มเมื่อให้ร่วมกับ verapamil ต่อการสะสมของ rhodamine 123ในเซลล์

ผลการศึกษาพบว่า รีเนียรามัยซิน เอ็มมีพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่มีการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน มากกว่าเซลล์ปกติ ความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตห้าสิบเปอร์เซนต์ในเซลล์ (IC_{50}) $LLC\text{-}MDR_1$, KB, H460, $LLC\text{-}PK_1$ และ CC2511 เท่ากับ 0.68, 2.19, 2.57, 11.22 และ 20-30 ng/ml ตามลำดับ โดยรีเนียรามัยซิน เอ็มทำให้เซลล์มีการตายแบบ necrosis อย่างไรก็ตามรีเนียรามัยซิน เอ็มไม่มีผลเพิ่มความเป็นพิษของ vinblastine และไม่เพิ่มการสะสมของ rhodamine 123 ในเซลล์ $LLC\text{-}PK_1$ และเซลล์ $LLC\text{-}MDR_1$ แต่มีผลเพิ่มการดื้อยา puromycin ในเซลล์ $LLC\text{-}MDR_1$ นอกจากนี้ยังพบว่า verapamil สามารถเพิ่มความเป็นพิษของรีเนียรามัยซิน เอ็มเมื่อให้ร่วมกัน แต่รีเนียรามัยซิน เอ็มไม่สามารถเสริมฤทธิ์ของ verapamil ในการเพิ่มการสะสมของ rhodamine 123 ในเซลล์ได้

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า รีเนียรามัยซิน เอ็มเป็นสารที่มีฤทธิ์แรงในการต้านเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ที่ดื้อต่อการรักษาด้วยยา นอกจากนี้ยังพบว่ารีเนียรามัยซิน เอ็มมีคุณสมบัติเป็นพี-ไกลโคโปรตีนสับสเตรทและไม่มีผลยับยั้งการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีน เมื่อให้ร่วมกับ vinblastine และ rhodamine 123 แต่อย่างไรก็ตามรีเนียรามัยซิน เอ็มยังสามารถลดความเป็นพิษของ puromycin ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีน อีกด้วย

ภาควิชา.....เภสัชวิทยา.....
สาขาวิชา.....เภสัชวิทยา.....
ปีการศึกษา..... 2550.....

ลายมือชื่อนิสิต.....พิมรำไพ แสงอินทร์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4776588033 MAJOR: PHARMACOLOGY
KEYWORD: RENIERAMYCIN M/ CYTOTOXICITY/ / P-GLYCOPROTEIN

PHIMRAMPHAI SAENGIN: EFFECTS OF RENIERAMYCIN M ON P-GLYCOPROTEIN FUNCTION. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. SUREE JIANMONGKOL, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. THITIMA PENGSUPARP, Ph.D. AND ASST. PROF. NONTIMA VARDHANABHUTI, Ph.D. 88 pp.

Marine natural products are an invaluable source for novel therapeutic potentials including anticancer activity. Renieramycin M (RM) is a new tetrahydroisoquinoline compound which can be isolated from *Xestospongia sp.*, marine sponges found in the Gulf of Thailand. RM has a high potential as cytotoxic and antitumor agent. However, the effects of RM on multidrug resistance (MDR), which is a major problem for a success of chemotherapy, have not been reported. P-glycoprotein (P-gp) is one of the important mechanisms in MDR phenomenon. In this study, RM was tested for its cytotoxicity in difference cells type including, dermal fibroblast (CC2511), renal epithelial cells (LLC-PK_1), buccal carcinoma (KB), lung carcinoma (H460), and an *MDR1*-gene transfected epithelial cell (LLC-MDR_1). In addition, RM was tested for its intrinsic potential ability to modulate P-gp function.

The cytotoxicity and the type of cells death were determined by MTT and LDH release assays. The effects of RM on P-gp function were measured by co-treatment of RM with either P-gp substrates (vinblastine, puromycin, rhodamine 123) or P-gp inhibitor (verapamil). Furthermore, the interaction between RM and verapamil was also tested in the study of rhodamine 123 accumulation.

The results revealed that RM was more toxic and caused more necrotic death in *MDR1*-overexpressed cells and cancerous cell lines than in normal cells. The apparent IC_{50} values (ng/ml) were 0.68 (LLC-MDR_1), 2.19 (KB), 2.57 (H460), 11.22 (LLC-PK_1), and 20-30 (CC2511). RM neither increased VBL-induced cytotoxicity nor rhodamine 123 accumulations in LLC-PK_1 and LLC-MDR_1 cells. But RM enhanced puromycin-resistance in LLC-MDR_1 cells. The effect of RM induced cytotoxicity was enhanced by verapamil in P-gp overexpressing cells. However, RM could not enhance the effect of verapamil on rhodamine 123 accumulations.

In summary, RM has a good potential for anticancer activity with highly selective to *MDR1*-overexpressing and cancer cells. RM could be a substrate of P-gp, but it could not inhibit P-gp function when co-treatment with VBL and rhodamine 123. In addition, RM could decrease puromycin-induced cytotoxicity in P-gp overexpressing cells.

Department.....Pharmacology.....
Field of study.....Pharmacology.....
Academic year.....2007.....

Student's signature.....Phimramphai Saengin
Advisor's signature.....Suree Jianmongkol
Co-advisor's signature.....Thitima Pengsuparp
Co-advisor's signature.....Nontima V.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere appreciation and gratitude to my advisor, Assistant professor Suree Jianmongkol, for her guidance, kindness, encouragement, and understanding throughout this study.

I would also like to thank Associate Professor Thitima Pengsuparp, Ph.D., and Assistant professor Nontima Vardhanabhuti my co-advisor, for her guidance, support, and kindness.

I would also like to thank the thesis committee for their valuable suggestions and helpful discussion.

I am indebted to the Department of Biochemistry for providing research space and equipment for cell culture.

I am deeply thankful to Miss Chompunuch Boonarkart for helpful training in cell culture technique.

My appreciation goes to all my friends in the Pharmacology and other persons whose names have not been mentioned for their friendship and valuable help.

Above all, I would like to express my deepest gratitude to my parents for their unconditional encouragement, care, love, and support given to me throughout the years.

Special thanks are extended to the support and grants from the Department of Pharmacology, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, the Graduate School, Chulalongkorn University, the Development of herbal extract for treatment of CNS stimulant addicts, research project, Chulalongkorn University, and the Siriraj Hospital.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... iv
ENGLISH ABSTRACT..... v
ACKNOWLEDGMENTS..... vi
CONTENTS..... vii
LIST OF FIGURES..... ix
LIST OF TABLES..... xi
ABBREVIATION..... xiv
CHAPTER
I INTRODUCTION..... 1
II LITERATURE REVIEW..... 5
1. Cancer Chemotherapy..... 5
2. Resistance to Cytotoxic Drugs..... 7
3. P-glycoprotein (P-gp)..... 9
4. Natural products as potential P-gp inhibitors..... 17
5. Assessment of P-gp interaction..... 23
6. LLC-PK_1 and LLC-MDR_1 cell lines..... 25
III MATERIALS AND METHODS..... 27
1. Cell cultures..... 27
2. Chemicals..... 27
3. Cytotoxicity studies..... 28
4. P-gp interaction studies..... 29
5. Statistical analysis..... 31
IV RESULTS..... 32
Part A: Differential cytotoxicity of Renieramycin M on normal and cancerous cell lines..... 32
1. Cytotoxicity of RM..... 32
2. Type of cell death caused by RM in LLC-PK_1 and LLC-MDR_1 cell lines..... 35

CHAPTER

Part B: Effects of Renieramycin M on P- gp function..... 37

1. Characterization of P-gp activity in LLC- PK_1 and LLC- MDR_1 cells..... 37

2. Effects of RM on P-gp substrate accumulation..... 39

3. Effects of P-gp inhibitor on the accumulation of RM 50

V DISCUSSION AND CONCLUSIONS..... 55

REFERENCES..... 60

APPENDICES..... 70

VITA..... 88

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Role of ABC transporter in the development of MDR phenotype in cancer cells.....	8
2	Topological map and domain organization of P-glycoprotein.....	9
3	Models proposed to explain the mechanism of drug efflux by P- gp...	11
4	Some structures of MDR reversing agents.....	16
5	Inhibitors of the multidrug transporters and their possible models of action.....	17
6	Structure of quinine and quinoline derivatives.....	18
7	General structure of tetrahydroisoquinoline	19
8	Examples of saframycins, renieramycins and ecteinascidins.....	20
9	Structure of Renieramycins	21
10	Structure of Renieramycin M.....	22
11	The cytotoxicity of RM in KB, H460, and CC2511 cells, using MTT reduction as the endpoint.....	32
12	The cytotoxicity of RM in LLC-PK_1 and LLC-MDR_1 cells, using MTT reduction as the endpoint.....	34
13	Effects of RM on cell viability as measured by MTT assay (A) and LDH release (B) in LLC-PK_1 cells and LLC-MDR_1 cells after 24- h treatment.....	36
14	VBL-induced cytotoxicity in LLC-PK_1 and LLC-MDR_1 cells as determined by the MTT assay.....	37
15	Effects of RM on VBL-induced cytotoxicity in LLC-PK_1 cells (A) and LLC-MDR_1 cells (B) when pre-treatment RM 24 hours.....	40
16	Effects of RM on VBL-induced cytotoxicity in LLC-PK_1 cells (A) and LLC-MDR_1 cells (B) when co-treatment RM 72 hours	43
17	Effects of RM on puromycin-induced cytotoxicity in LLC-MDR_1 cells, as determined by the MTT assay.....	45
18	Accumulation of Rh123 in LLC-PK_1 and LLC-MDR_1 cells being cultured in various conditions.....	47

19 Effects of RM on the accumulation of Rh123 in LLC-PK_1 and LLC-MDR_1 cells..... 48

20 Effects of verapamil on RM induced cytotoxicity in LLC-PK_1 cells (A) and LLC-MDR_1 cells (B)..... 50

21 Effects of RM co-treatment with verapamil on the accumulation of Rh123 in LLC-PK_1 and LLC-MDR_1 cells..... 53

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Structural basis of anticancer drugs.....	6
2	Cytotoxic agents known as P-gp substrates	12
3	Examples of MDR reversing agents.....	15
4	The anti-tumor activity of ET743 against several tumor cell lines.....	20
5	Activity of Renieramycin M against several tumor cell lines.....	22
6	Examples of P-gp studies using LLC-PK_1 and LLC-MDR_1 cells.....	26
7	The apparent IC_{50} values of RM on KB, H460, and CC2511 cell lines, as determined by an MTT assay.....	33
8	The apparent IC_{50} values of RM on LLC-PK1 and LLC-MDR1 cell lines, as determined by an MTT assay.....	34
9	The apparent IC_{50} values of VBL in the presence and absence of verapamil in LLC-PK_1 and LLC-MDR_1 cells.....	38
10	The apparent IC_{50} values of VBL in pre-treatment with or without RM at the non-toxic concentrations for 24 hours in LLC-PK1 and LLC-MDR1 cell lines.....	41
11	The apparent IC_{50} values of VBL in the absence and presence of RM in LLC-PK1 and LLC-MDR1 cell lines.....	44
12	The apparent IC_{50} values of puromycin in LLC-MDR_1. The values were determined in the co-treatment with RM or verapamil.....	46
13	The apparent IC_{50} values of RM in co-treatment experiments with or without verapamil.....	52
14	Results MTT assay of RM 72-hours treatment in KB cell lines.....	74
15	Results MTT assay of RM 72-hours treatment in H460 cell lines.....	74

16 Results MTT assay of RM 72-hours treatment in CC2511 cell lines..... 75

17 Results MTT assay of RM 72-hours treatment in LLC-PK_1 cell lines..... 75

18 Results MTT assay of RM 72-hours treatment in LLC-MDR_1 cell lines..... 76

19 Results LDH release assay of RM 24-hours treatment in LLC-PK_1 and LLC-MDR_1 cell lines..... 77

20 Results MTT assay of RM 24-hours treatment in LLC-PK_1 and LLC-MDR_1 cell lines..... 77

21 Results MTT assay of treatment VBL and VBL co-treatment with verapamil 72 hours in LLC-PK_1 cell lines..... 78

22 Results MTT assay of treatment VBL and VBL co-treatment with verapamil 72 hours in LLC-MDR_1 cell lines..... 78

23 Results MTT assay of pre-treatment with RM 24 hours prior treatment VBL 72 hours in LLC-PK_1 cell lines..... 79

24 Results MTT assay of pre-treatment with RM 24 hours prior treatment VBL 72 hours when in LLC-MDR_1 cell lines..... 80

25 Results MTT assay of co-treatment VBL and RM 72 hours in LLC-PK_1 cell lines..... 81

26 Results MTT assay of co-treatment VBL and RM 72 hours in LLC-MDR_1 cell lines..... 82

27 Results MTT assay of co-treatment puromycin and RM 72 hours in LLC-MDR_1 cell lines..... 83

28 Results of RM on Rhodamine 123 accumulation in LLC-PK_1 cell lines..... 84

29 Results of RM on Rhodamine 123 accumulation in LLC-MDR_1 cell lines..... 84

30 Results MTT assay of co-treatment verapamil and RM 72 hours in LLC-PK_1 cell lines..... 85

31 Results MTT assay of co-treatment verapamil and RM 72 hours in LLC-PK_1 cell lines..... 85

32 Results of RM co-treatment with verapamil on Rhodamine 123 accumulation in LLC-PK_1 cell lines..... 86

33 Results of RM co-treatment with verapamil on Rhodamine 123 accumulation in LLC-$MDR1_1$ cell lines..... 87

LIST OF ABBREVIATIONS

%	=	percent or part per hundred
°C	=	degree Celsius
µg	=	microgram
µL	=	microliter
ABC	=	ATP-binding cassette
ATP	=	adenosine tri-phosphate
BSA	=	Bovine serum albumin
cAMP	=	cyclic adenosine mono-phosphate
CC2511	=	human dermal fibroblast cell
CO_2	=	carbon dioxide
DMSO	=	dimethylsulfoxide
ET743	=	ecteinascidin 743
FBS	=	fetal bovine serum
GI	=	gastrointestinal tract
GSH	=	glutathione
H460	=	lung carcinoma
h	=	hour
IC_{50}	=	50% inhibition concentration
KB	=	buccal carcinoma cell
kDa	=	kilo Dalton
LDH	=	lactate dehydrogenase
LLC-PK_1	=	renal epithelial cell
LLC-MDR_1	=	*MDR1* gene-transfected epithelial cell
M	=	molar
M199	=	medium 199
MDR	=	multidrug resistance
MEM	=	minimum essential medium
mg	=	milligram
MIC	=	minimum inhibition concentration
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
MRP	=	multidrug resistance-associated protein

MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MXR	=	mitoxantrone resistance
NADH	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAD	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NBD	=	nucleotide- binding domain
nm	=	nanometer
nM	=	nanomolar
O_2	=	oxygen
OD	=	optical density
PBS	=	phosphate buffered saline
P-gp	=	P-glycoprotein
PI	=	propidium iodide
PKC	=	protein kinase C
PKCIs	=	protein kinase C inhibitor
Rhodamine123	=	Rh123
RM	=	reneiramycin M
SAR	=	structure activity relationship
Sec	=	second
S.E.	=	standard error
sp.	=	species
UV	=	ultraviolet
VBL	=	vinblastine
ver	=	verapamil