

การชักนำให้เกิดเอพอพโตซิสและการยับยั้งวัฏจักรเซลล์ของสิ่งสกัดจากหัสคุณ
(*Micromelum hirsutum*) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์



นายสาริต รอดภักดีกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



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

522294

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

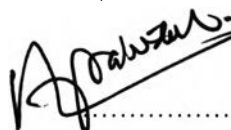
By Mr. Satit Rodphukdeekul

Field of Study Medical Science (Pharmacology)

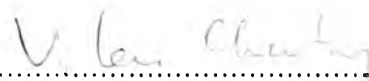
Thesis Advisor Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D.

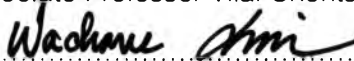
Thesis Co-Advisor Professor Tada Sueblinvong, M.D.
Associate Professor Nijisiri Ruangrunsi, Ph.D.

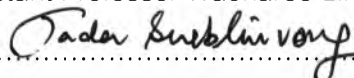
Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

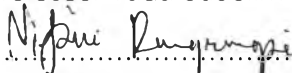

.....Dean of the Faculty of Medicine
(Professor Adisorn Patradul, M.D.)

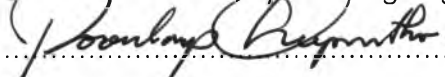
THESIS COMMITTEE



..... 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 Nijisiri Ruangrunsi, Ph.D.)


..... Examiner
(Associate Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.)


..... External Examiner
(Assistant Professor Pathama Leewanich, Ph.D.)

สาธิต รอดมักดีกุล : การชักนำให้เกิดเอพอพอโตซิสและการยับยั้งวัฏจักรเซลล์ของสิ่งสกัดจาก
หัตถ์คุณ (*Micromelum hirsutum*) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์. (APOPTOSIS
INDUCTION AND CELL CYCLE ARREST OF *MICROMELUM HIRSUTUM* EXTRACTS IN
HUMAN B-LYMPHOMA CELLS.) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรวิ
ลิมนิสัทธกุล, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์, รอง
ศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรังษี, 111 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยตัวทำลายชนิดต่างๆจากกิ่งและใบ
ของ *Micromelum hirsutum* ต่อ เซลล์รามาอสซึ่งเป็นเซลล์ลิมโฟมาของมนุษย์ มีการนำสิ่งสกัดจากโคคลอโรมีเทน เฮ
กเซน และเมธานอล จากกิ่งและใบของ *M. hirsutum* มาทำการทดสอบเบื้องต้นถึงความเป็นพิษต่อเซลล์รามาอส พบว่า
สิ่งสกัดโคคลอโรมีเทนและเฮกเซนจากกิ่งและใบของพืชมีความเป็นพิษต่อรามาอสเซลล์มากกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวจาก
คนปกติ นำสิ่งสกัดโคคลอโรมีเทนและเฮกเซนจากกิ่งและใบของ *M. hirsutum* มาศึกษาต่อไปเกี่ยวกับการชักนำให้เซลล์
รามาอสตายแบบเอพอพอโตซิส พบว่า สิ่งสกัดโคคลอโรมีเทนและเฮกเซนจากกิ่งของ *M. hirsutum* ทำให้เซลล์รามาอสตาย
ในลักษณะเอพอพอโตซิสเป็นส่วนใหญ่เมื่อได้รับสิ่งสกัดนาน 12 ชั่วโมง และการตายแบบเอพอพอโตซิสขึ้นกับความเข้มข้น
ของสิ่งสกัดที่ใช้ ส่วนสิ่งสกัดโคคลอโรมีเทนและเฮกเซนจากใบของ *M. hirsutum* ทำให้เซลล์รามาอสตายในลักษณะเอ
พอพอโตซิสเป็นส่วนใหญ่เมื่อได้รับสิ่งสกัดนาน 12 ชั่วโมงโดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ นำสิ่งสกัดโคคลอโรมีเทน
และเฮกเซนจากกิ่งของ *M. hirsutum* มาศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์รามาอส พบว่า สิ่งสกัดทั้งสองชนิดทำให้เซลล์
รามาอสเกิด เอพอพอโตซิสโดยการกระตุ้นเอนไซม์แคสเปสเป็นหลัก สาร Z-VAD-FMK ที่ยับยั้งเอนไซม์แคสเปสได้หลายตัว
สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของสิ่งสกัดทั้งสองได้เกือบสมบูรณ์ มีโอกาสเป็นไปได้ว่าสิ่งสกัดทั้งสองทำให้เซลล์รามาอสเกิด
เอพอพอโตซิสผ่านทาง intrinsic pathway เนื่องจากการใช้แอนติบอดีต่อ Fas ligand เพื่อยับยั้งการจับกันของ Fas-Fas
ligand ที่เป็นการกระตุ้นแบบ extrinsic pathway ในเซลล์ลิมโฟไซตีไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสิ่งสกัดทั้งสอง แต่พบว่า
สิ่งสกัดทั้งสองมีผลต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของโปรตีนกลุ่ม BCL-2 ซึ่งควบคุมการเกิดเอพอพอโตซิสผ่านทาง
intrinsic pathway สิ่งสกัดโคคลอโรมีเทนยับยั้งการแสดงออกของ BCL-2, BCL-XL และเพิ่มการแสดงออกของ Bax
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่สิ่งสกัดเฮกเซนมีผลคล้ายคลึงกับสิ่งสกัดโคคลอโรมีเทนแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติ การศึกษานี้ได้ศึกษาผลของสิ่งสกัดทั้งสองต่อลักษณะของวัฏจักรเซลล์ของเซลล์รามาอส พบว่า สิ่ง
สกัดเฮกเซนไม่มีผลเปลี่ยนแปลงลักษณะของวัฏจักรเซลล์ ส่วนสิ่งสกัดโคคลอโรมีเทนมีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงลักษณะของวัฏ
จักรเซลล์ของเซลล์รามาอส โดยทำให้เซลล์สะสมอยู่ในระยะ S และ G2/M จากการศึกษารายละเอียดโมเลกุลของสิ่งสกัด
โคคลอโรมีเทนต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวัฏจักรเซลล์ พบว่า สิ่งสกัดลดการแสดงออกในระดับ
mRNA ของ cyclin D1 ลงได้มาก และลดการแสดงออกของ cyclin E ได้เล็กน้อย แต่พบว่าสิ่งสกัดนี้มีผลลดการ
แสดงออกของ p53 และ p21 ที่ยับยั้งวัฏจักรเซลล์เช่นกัน ผลจากการศึกษานี้สรุปได้ว่า สิ่งสกัดเฮกเซนและโคคลอโร
มีเทนจากกิ่งของ *M. hirsutum* มีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งให้ตายแบบเอพอพอโตซิสเป็นหลัก

สาขาวิชา นิเทศศาสตร์การแพทย์. 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.....

Academic Year : 2009.....

Student's Signature Satit Rodphukdeekul

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. Nijisiri 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 90th 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
<i>Micromelum hirsutum</i>	29
Chemical constituents from plants in the genus <i>Micromelum</i> 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 <i>Micromelum hirsutum</i>	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 <i>M. hirsutum</i> extracts.....	36
2.2 Preparation of human peripheral blood- mononuclear cells (PBMCs).....	36
2.3 Determination of cytotoxicity activity of the <i>M. hirsutum</i> extracts.....	37
2.3.1 Preliminary determination of cytotoxicity activities of the extracts.....	37
2.3.2 Determination of cytotoxic activities at IC ₅₀ '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 <i>M. hirsutum</i> (BD) on Ramos cells death.....	52
4. The effect of the hexane extract from branches of <i>M. hirsutum</i> (BH) on Ramos cells death.....	53
5. The effect of the dichloromethane extract from leaves of <i>M. hirsutum</i> (LD) on Ramos cells death.....	54
6. The effect of the hexane extract from leaves of <i>M. hirsutum</i> (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 <i>M. hirsutum</i> 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	49
The comparison of cytotoxicities of A) BD, B) BH, C) LD, and D) LH on Ramos cells between 24 and 48 h of exposure.....	
22	51
A representative pattern of Ramos cell death induced by the extracts of <i>M. hirsutum</i>	
23	56
Effect of the dichloromethane and the hexane extracts from branches and leaves of <i>M. hirsutum</i> on Ramos cell death after 12 h exposure	
24	59
The effect of BD on the mRNA expression of p53 and BCL-2 family proteins.....	
25	60
The effect of BH on the mRNA expression of p53 and BCL-2 family proteins.....	
26	61
The involvement of Fas-FasL interaction on <i>M. hirsutum</i> extracts induced Ramos cells apoptosis.....	
27	62
The involvement of caspase activation on <i>M. hirsutum</i> extracts induced Ramos cells apoptosis.....	
28	64
Representative cell cycle patterns of Ramos cells treated with BD.....	
29	65
Representative cell cycle patterns of Ramos cells treated with BH.....	
30	66
A representative of the mRNA expression of p21, p53 and cyclins in BD-treated Ramos cells.....	

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- κ B	nuclear factor κ B
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
$^{\circ}$ C	degree Celsius
μ g	microgram(s)
$\Delta\psi_m$	mitochondrial membrane potential