Thesis Title Biochemical Mechanisms of Alkaloids Isolated from *Stemona aphylla* Craib and *S. burkillii* Prain on P-glycoprotein Activity and Expression in Multidrug Resistant Cancer Cells

Author Miss Wisinee Chanmahasathien

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Dejkriengkraikul	Advisor
Asst. Prof. Dr. Chadarat Ampasavate	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Songyot Anuchapreeda	Co-advisor

ABSTRACT

The resistance to chemotherapeutic drugs by cancer cells is considered to be one of the major obstacles for success in the treatment of cancers. A major mechanism underlying this multidrug resistance is the overexpression of P-glycoprotein (P-gp), resulting in insufficient drug delivery to the tumor sites. This study was designed to investigate the effect of *Stemona* alkaloids, isolated from the roots of *Stemona curtisii* and *S. burkillii*, to modulate cancer multidrug resistance (MDR). Through bioassay-guided fractionation, active *Stemona* alkaloids were isolated by repetitive chromatographic techniques. The chemical structures of isolated alkaloids were confirmed by HPLC, LC-MS, and NMR as stemocurtisine and oxystemokerrine from *S. curtisii*, and stemofoline from *S. burkillii*. The isolated alkaloids were evaluated a synergistic growth inhibitory effect with cancer chemotherapeutic agents including vinblastine, paclitaxel, and doxorubicin in KB-V1 cells (MDR human cervical carcinoma with P-gp expression), but not in KB-3-1 cells (drug sensitive human cervical carcinoma, which lack P-gp expression). Verapamil was employed as a comparative agent. The results showed that among these three isolated alkaloids; stemofoline exhibited the most potent effect *in vitro* in the reversal

of P-gp-mediated MDR. Treatment with stemofoline and stemocurtisine at the various concentrations up to 72 h was able to significantly increase sensitivity of anticancer drugs including vinblastine, paclitaxel, and doxorubicin in dose- and time-dependent manner in KB-V1 cells. To understand biochemical mechanisms of modulation of P-gp by *Stemona* alkaloids, stemofoline, and stemocurtisine, in a multidrug resistant human cervical carcinoma cell line (KB-V1), the effects of stemoline and stemocurtisine on a radiolabeled drug, [^{3}H]-vinblastine, and fluorescent P-gp substrates, rhodamine 123, and calcein-AM accumulation or retention were investigated to confirm this finding. Both stemofoline (1-20 μM) and stemocurtisine (50-200 μM) could increase the accumulation or retention of radiolabeled drugs or fluorescent P-gp substrates in a dose-dependent manner. For additional studies on drug-P-gp binding, P-gp ATPase activity was stimulated by stemofoline (ED_{50} = 12.6 ± 6.1 μM) and stemocurtisine (ED_{50} = 106.3 ± 10.75 μM) in a concentration-dependent manner. More evidence was offered that stemofoline (IC_{50} = 6.7 ± 0.8 μM) and stemocurtisine (IC_{50} = 94.1 ± 6.5 μM) inhibits the effect on photoaffinity labeling of P-gp with [^{125}I]-iodoarylazidoprazosin in a concentration-dependent manner. These data indicate that stemofoline and stemocurtisine may interact directly with P-gp and inhibit P-gp activity, whereas stemofoline (1-10 μM) and stemocurtisine (25-200 μM) has no effect on P-gp expression. Comparing the potency of these two *Stemona* alkaloids, stemofoline showed a higher potency than stemocurtisine. Taken together, the results exhibit that stemofoline possesses an effective MDR modulator, and may be used in combination with conventional chemotherapeutic drugs to reverse MDR in cancer cells**.**

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ กลไกทางชีวเคมีของอัลคาลอยด์ที่แยกได้จากหนอนตายหยากต่อการทำงานและการแสดงออกของพีไกลโคโปรตีนในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาหลายขนาน

ผู้เขียน นางสาว วิสินี จันทร์มหเสถียร

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. พรงาม เดชเกรียงไกรกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ. ดร. ชฎารัตน์ อัมพะเศวต	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การดื้อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็ง เป็นปัญหาอุปสรรคสำคัญประการหนึ่งของการรักษาโรคมะเร็งโดยกลไกหลักที่มักพบในการดื้อยาของเซลล์มะเร็งคือ การแสดงออกที่มากกว่าปกติของโปรตีนขับไล่ยาพีกลัยโคโปรตีน จะทำให้ระดับความเข้มข้นของยาเคมีบำบัดต่ำกว่าระดับที่จะมีผลต้านมะเร็ง ในการศึกษานี้ ได้มุ่งเน้นศึกษาผลของอัลคาลอยด์ที่แยกได้จากรากของหนอนตายหยากสองสายพันธุ์ คือ *Stemona curtisii* และ *S. burkillii* ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการดื้อยาของมะเร็ง การแยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์ดังกล่าวจากรากหนอนตายหยากโดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ซึ่งได้ติดตามส่วนของสารสกัดที่มีฤทธิ์ จนกระทั่งแยกได้สารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์เปลี่ยนแปลงการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง จากนั้นได้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้โดยเทคนิค HPLC และทำการศึกษาเพื่อพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยเทคนิคสเปคโตรสโคปี อันได้แก่ LC-MS และ NMR พบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ สตีโมเคอติซีน (stemocurtisine) และออกซีสตีโมเคอรีน (oxystemokerrine) จาก *S. curtisii* และสตีโมโฟลีน (stemofoline) จาก *S.*

burkillii เมื่อทำการทดสอบผลการเปลี่ยนแปลงการดื้อยาเคมีบำบัดของอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ที่แยกในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่ดื้อยาหลายขนาน (KB-V1) พบว่าอัลคาลอยด์ที่แยกได้จากรากหนอนตายหยากมีผลต่อความไวของยาเคมีบำบัดเมื่อให้ร่วมกับยาวินบลาสติน แพคลิแทคเซล และด็อกโซรูบิซิน แต่ไม่ทำให้ความไวของยาเคมีบำบัดต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก KB-3-1 เปลี่ยนแปลง โดยที่สตีโมโฟลีนมีความแรงสูงสุดในการเปลี่ยนแปลงการดื้อยาของพีกลัยโคโปรตีน จากการทดลองพบว่า สตีโมโฟลีน หรือ สตีโมเคอติซีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะเพิ่มความไวของยาเคมีบำบัดวินบลาสติน แพคลิแทคเซล และด็อกโซรูบิซิน ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่ดื้อยาหลายขนาน (KB-V1) อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีผลแปรผันตามความเข้มข้นของอัลคาลอยด์และช่วงเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และเพื่อให้ทราบถึงกลไกทางชีวเคมีของสตีโมโฟลีนและสตีโม-เคอติซีน ต่อการทำงานและการแสดงออกของพีกลัยโคโปรตีน ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่ดื้อยาหลายขนาน (KB-V1) จึงได้ทำการศึกษาผลของสตีโมโฟลีน และ สตีโมเคอติซีนต่อการสะสมและการหลงเหลือของยาที่ติดฉลากด้วยสารรังสี [^{3}H]-vinblastine และสารเรืองแสงที่สามารถถูกขับออกโดยพีกลัยโคโปรตีน อันได้แก่ rhodamine 123 และ calcein-AM พบว่า สตีโมโฟลีน ที่ความเข้มข้น 1-20 μM และ สตีโมเคอติซีน ที่ความเข้มข้น 50-200 μM สามารถเพิ่มการสะสมและการคั่งค้างของ [^{3}H]-vinblastine, rhodamine123 และ calcein-AM โดยแปรผันตามความเข้มข้นของอัลคาลอยด์ดังกล่าว นอกจากนี้ ยังได้ทำการศึกษาการจับของสตีโมโฟลีนและสตีโมเคอติซีนกับพีกลัยโคโปรตีน พบว่า สตีโมโฟลีนและสตีโมเคอติซีนจับกับพีกลัยโคโปรตีน และไปกระตุ้นการทำงานของ P-gp ให้ทำงานในหน้าที่ ATPase โดยแปรผันตามความเข้มข้นของสตีโมโฟลีนและสตีโมเคอติซีน และมีค่า ED_{50} = 12.6 ± 6.1 μM และ ED_{50} = 106.3 ± 10.75 μM ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น สตีโมโฟลีนและสตีโมเคอติซีนมีผลต่อการยับยั้ง photoaffinity labeling ของ P-gp โดย [^{125}I]-iodoarylazidoprazosin โดยแปรผันตามความเข้มข้นของสตีโมโฟลีนและสตีโมเคอติซีน และมีค่า IC_{50} = 6.7 ± 0.8 μM และ IC_{50} = 94.1 ± 6.5 μM ตามลำดับ ซึ่งจากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สตีโมโฟลีนและสตีโมเคอติซีนมีผลต่อการทำงานของพีกลัยโคโปรตีนโดยจับกับพีกลัยโค-โปรตีนโดยตรง และเมื่อทำการศึกษาถึงผลของสตีโมโฟลีนและสตีโมเคอติซีนต่อการแสดงออกของพีกลัยโคโปรตีนในระดับโปรตีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่ดื้อยาหลายขนาน (KB-V1) พบว่า เมื่อให้สตีโมโฟลีนที่ความเข้มข้น 1-10 μM และสตีโมเคอติซีนที่ความเข้มข้น 25-200

μM เป็นเวลา 72 ชั่งโมง ทั้งสตีโมโฟลีนและสตีโมเคอติซีนไม่มีผลต่อการแสดงออกของพีกลัยโค-โปรตีนในระดับโปรตีน จากผลการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า สตีโมโฟลีนและสตีโมเคอติซีนมีคุณสมบัติการในการเปลี่ยนแปลงการทำงานของพีกลัยโคโปรตีน (MDR modulator) ได้ โดยสตี-โมโฟลีนมีฤทธิ์แรงกว่าสตีโมเคอติซีน อย่างสอดคล้องกันทั้งในการเพิ่มความไวของยาเคมีบำบัดและผลต่อการทำงานของพีกลัยโคโปรตีน ดังนั้น สตีโมโฟลีนจึงเป็นสารที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดสำหรับการรักษาโรคมะเร็งต่อไป