Thesis Title Identification of Active Compounds in Ginger Extract That Inhibits Telomerase Expression and Activity

Author Miss Navakoon Kaewtunjai

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Wirote Tuntiwechapikul	Advisor
Dr. Arisa Bonness	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Ariyapong Wongnoppavich	Co- advisor

ABSTRACT

Telomerase and c-Myc are attractive molecular targets for anticancer therapy due to its necessity in most cancer cells. Telomerase adds telomeric DNA to telomeres, thus, prevents cells to enter senescence. The c-Myc proteins are well established as the master regulators of genes involved in protein synthesis, cellular proliferation, and carcinogenesis. Recently, our group has reported that the ethyl acetate fraction of ginger (*Zingiber officinale*) extract inhibits human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) and *c-Myc* expression in A549 lung carcinoma cells. In this study, we further purified this fraction in an attempt to search for the active compound. The ethyl acetate fraction was purified by column chromatography to obtain another 4 fractions: E1-E4. Each fraction was fingerprinted by

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

thin layer chromatography and the amount of 6-gingerol in the E1-E4 fractions was quantified by HPLC to be 0.057%, 0.09%, 31.43%, and 44.72%, respectively. The RT-PCR analysis found that the E2 fraction significantly inhibited *hTERT* and *c-Myc* expression in dose-dependent manner. Therefore, we further fractionated this fraction by column chromatography into 4 more subfractions: E2.1, E2.2.1, E2.2.2, and E2.2.3. The results from RT-PCR studies show that each subfraction could down-regulate the expression of *hTERT* and *c-Myc* mRNAs in A549 cells. Western blot analysis results show that c-Myc protein was reduced in a dose-dependent manner after A549 cells were treated with E2.1 and E2.2.1, but not with the E2.2.2 and E2.2.3 subfractions. Telomerase activity in the A549 cells treated with each subfraction was reduced in a dose-dependent manner, coinciding with the reduced *hTERT* mRNA expression. We identified the major compounds in each subfraction by GC/MS and found various paradols in these subfractions. We decided to test 6-paradol and found that this compound could down-regulate *hTERT* and *c-Myc* mRNA expression in A549 treated cells. Therefore, we conclude that the compounds that are responsible for the down-regulation of *hTERT* and *c-Myc* expression are likely to be paradols.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารออกฤทธิ์จากขิงที่ยับยั้งการแสดงออกและการทำงานของ เทโลเมอเรส

ผู้เขียน นางสาว นวคุณ แก้วทันใจ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ ตันติเวชอภิกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
อาจารย์ ดร. อริสา บอนเนซซ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อริยพงษ์ วงษ์นพวิชญ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เทโลเมอเรส และ c-Myc (ซี-มิค) เป็นเป้าหมายที่น่าสนใจสำหรับการรักษามะเร็ง เนื่องจาก โปรตีนเหล่านี้มีความจำเป็นต่อเซลล์มะเร็ง เทโลเมอเรสทำหน้าที่เติมดีเอ็นเอที่ปลายสายของเทโลเมีย เพื่อป้องกันการเข้าสู่ภาวะเสื่อมสภาพ นอกจากนี้เป็นที่ทราบกันแล้วว่า โปรตีน c-Myc เป็นตัวควบคุมหลักในการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์โปรตีน การแบ่งตัวของเซลล์ และการเกิดมะเร็ง จากการศึกษาที่ผ่านมาของกลุ่มงานวิจัย ได้ค้นพบว่าสารสกัดชั้นเอธิลอะซิเตตจากขิง ยับยั้งการแสดงออกของยีน *hTERT* และ *c-Myc* ในเซลล์มะเร็งปอด A549 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว โดยการแยกส่วนบริสุทธิ์ของสารสกัดขิงชั้นเอธิลอะซิเตต โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารกึ่งบริสุทธิ์ 4 ส่วน คือ E1, E2, E3 และ E4 เมื่อทำการตรวจหาองค์ประกอบต่างๆในแต่ละส่วน โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) และหาปริมาณของ 6-gingerol ใน E1-E4 โดยวิธี HPLC พบปริมาณของ 6-gingerol เท่ากับ 0.057%, 0.09%, 31.43% และ 44.72% ตามลำดับ จากนั้นเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าสารสกัด E2 มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน *hTERT* และ *c-Myc* ได้อย่างดีตามปริมาณสารสกัด ดังนั้นสารในส่วนนี้จึงถูกนำไปแยกส่วนต่อไป โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ซึ่งแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ออกมาได้อีก 4 ส่วนย่อยคือ E2.1, E2.2.1, E2.2.2 และ E2.2.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลจากการศึกษาด้วยวิธี RT-PCR และ real-time quantitative RT-PCR พบว่า สารแต่ละส่วนย่อยสามารถลดการแสดงออกยีน *hTERT* และ *c-Myc* การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี western blot พบว่าโปรตีน c-Myc ลดลงตามปริมาณสารในส่วน E2.1 และ E2.2.1 แต่ไม่มีผลในส่วน E2.2.2 และ E2.2.3 การทำงานของเทโลเมอเรสในเซลล์มะเร็งปอด A549 ที่บ่มด้วยสารสกัดย่อยแต่ละส่วน พบว่าสามารถลดการทำงานของเทโลเมอเรสได้ตามปริมาณสาร ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกที่ลดลงของ *hTER*T mRNA เมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดย่อย โดยวิธี GC/MS พบสารกลุ่ม paradol หลายชนิดในสารสกัดย่อยแต่ละส่วน การทดสอบสารบริสุทธิ์ 6-paradol พบว่าสามารถลดการแสดงออกของยีน *hTERT* และ *c-Myc* ในเซลล์มะเร็งปอด A549 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารกลุ่ม paradol น่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ที่ลดการแสดงออกของทั้ง *hTERT* และ *c-Myc* ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved