

Thesis Title	Effect of Terpinen-4-ol on Apoptotic- and Autophagic Death-Induction in Human Leukemic Cells
Author	Mr. Patompong Khaw-on
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Ratana Banjerdpongchai, M.D.

ABSTRACT

Terpinen-4-ol, a monoterpene, is found as the main component of essential oil extracts from many plants. In this study the apoptogenic and autophagic activities and mechanisms of cell death induced by terpinen-4-ol were investigated in human leukemic MOLT-4 as p53 wild-type and HL-60 as p53-null cell line models. Terpinen-4-ol exhibited cytotoxicity in both human leukemic cells, which showed characteristic morphology of apoptosis in MOLT-4 cells and autophagy in HL-60 cells by Wright's staining and transmission electron micrographic examination. The mode of cell death in MOLT-4 cells was confirmed to be apoptosis by flow cytometric analysis after staining with annexin V-FITC/propidium iodide and the increase of caspase-3 activity. Terpinen-4-ol induced-MOLT-4 cell apoptosis was mediated through mitochondrial intrinsic pathway involving the loss of mitochondrial transmembrane potential (MTP) and release of cytochrome c into the cytosol. In addition, terpinen-4-ol also induced apoptosis via extrinsic pathway by caspase-8 activation resulting in the cleavage of cytosolic Bid. Truncated-Bid (tBid) translocated to mitochondria and activated mitochondrial pathway in conjunction with

the down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL proteins and activation of Bax protein expression.

Nevertheless, the development of autophagic features in HL-60 cells following exposure to terpinen-4-ol was observed with the increased formation of autophagosomes. At the molecular levels, the results from Western blot analysis showed that terpinen-4-ol significantly induced accumulation of LC3-I/II, ATG5 and Beclin-1, the regulatory proteins required for autophagy in mammalian cells. The dynamic effect of apoptotic response in HL-60 cells to terpinen-4-ol was the release of cytochrome c from mitochondria and the cleavage of Bid protein without caspase-3 activation. There was no alteration of Bcl-2 and Bax protein expression but slightly decrease of Bcl-xL protein level by immunoblot. Autophagic cell death occurred after terpinen-4-ol exposure in HL-60 cells and amplified the terpinen-4-ol-mediated apoptotic-related program. An alternative mechanistic death pathway through autophagic cell death and apoptosis induced by terpinen-4-ol as a potential way of cancer treatment was proposed to enhance cancer cell death. The relationship of both types of cell death, viz. apoptosis and autophagic cell death, in human leukemic cells requires further study, such as the role of p53.

In conclusion, terpinen-4-ol induced-human leukemic p53-wild type MOLT-4 cell apoptosis was via both intrinsic and extrinsic pathways and treated-human leukemic p53-null HL-60 cells underwent autophagic and apoptotic cell death. This study not only reported terpinen-4-ol-induced modes of cell death regulators but also highlighted the existent relationship of apoptosis-related mechanism and autophagy in p53 models of human leukemic cells

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของสารเทอร์พินิน-4-อล ต่อการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสและออโตฟาจีในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์
ผู้เขียน	นายปฐมพงศ์ ขาวอ่อน
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. พญ. รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย

บทคัดย่อ

สารเทอร์พินิน-4-อลเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มโมโนเทอร์พิน พบได้ในน้ำมันที่สกัดจากพืชหลายชนิด การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์เหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส และออโตฟาจี ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์ชนิด MOLT-4 ที่มีการแสดงออกของ p53 และ ชนิด HL-60 ที่ไม่มีการแสดงออกของ p53 พบว่าสารเทอร์พินิน-4-อลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์ทั้งสองชนิด โดยเซลล์ชนิด MOLT-4 ตายแบบอะพอพโทซิส และเซลล์ชนิด HL-60 ตายแบบออโตฟาจีโดยวิธีการย้อมสี Wright และรูปภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การตรวจโดยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์หลังจากย้อมเซลล์ด้วย annexin V ร่วมกับโปรพีเดียมไอโอไดด์ และการทำงานของเอนไซม์แคสเปส-3 ที่เพิ่มมากขึ้น ยืนยันผลการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ชนิด MOLT-4 สารเทอร์พินิน-4-อลเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ MOLT-4 ผ่านวิถีภายใน(ทางไมโทคอนเดรีย) เกิดการสูญเสียความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย และมีการหลั่งของโปรตีนไซโตโครมซีออกมาซึ่งไซโทพลาซึม นอกจากนี้ สารเทอร์พินิน-4-อลยังสามารถเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านวิถีภายนอก โดยกระตุ้นเอนไซม์แคสเปส-8 มีผลทำให้โปรตีน Bid ถูกตัดกลายเป็น โปรตีน tBid เคลื่อนย้ายมาที่ไมโทคอนเดรีย และกระตุ้นวิถีไมโทคอนเดรีย ลดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bcl-xL และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bax

อย่างไรก็ตาม พบการตายแบบออโตฟาจีในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์ชนิด HL-60 ที่เหนี่ยวนำด้วยสารเทอร์พินิน-4-อล สังเกตเห็นออโตฟาโกโซมเพิ่มขึ้น ผลจาก Western blot แสดงกลไกในระดับโมเลกุลพบว่า สารเทอร์พินิน-4-อลสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของโปรตีน LC3-II, ATG5 และ Beclin-1 ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมกระบวนการออโตฟาจี

ที่สำคัญในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ผลกระทบแบบพลวัตส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งชนิด H-60 เกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสร่วมด้วย จากหลักฐานพบว่ามี การหลั่งไซโตโครมซีและการตัดโปรตีน Bid โดยไม่มีการกระตุ้นของเอนไซม์แคสเปส-3 จากอิมมูโนบลอตพบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีน Bcl-2 และ Bax แต่ระดับโปรตีน Bcl-xL ลดลงเล็กน้อย สารเทอร์พินิน-4-อลทำให้เซลล์ชนิด HL-60 เกิดการตายแบบอโตฟาจี และเกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสที่มีการโปรแกรมไว้ วิธีการตายที่มีกลไกทางเลือกผ่านทางอโตฟาจีและอะพอพโทซิส ทำให้เพิ่มศักยภาพของการรักษาโรคมะเร็งในการทำให้เซลล์มะเร็งตาย ความสัมพันธ์ของการตายทั้งสองชนิด กล่าวคือ การตายแบบอะพอพโทซิส และอโตฟาจีในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์ ยังต้องมีการศึกษาต่อไป เช่น บทบาทของ p53

โดยสรุป สารเทอร์พินิน-4-อลเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์ชนิด MOLT-4 ที่มีการแสดงออก p53 เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ผ่านทั้งวิถีภายใน และภายนอก และเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์ชนิด HL-60 ที่ไม่มีการแสดงออก p53 เกิดการตายแบบอโตฟาจี และอะพอพโทซิส การศึกษานี้ไม่เพียงแต่รายงานชนิดของการตายและตัวควบคุมชนิดการตายที่เหนี่ยวนำโดยสารเทอร์พินิน-4-อล แต่ยังอธิบายถึงความสัมพันธ์ของการตายแบบอะพอพโทซิส และการตายแบบอโตฟาจี ที่มี p53 เป็นตัวแปรในแบบจำลองในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์