

|                     |                                                                                                          |                                                                      |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| หัวข้อคุณสมบัติ     | ผลการเพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัดของครีบาเนียนและแอนะล็อกในเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ที่ดื้อยา                 |                                                                      |
| ผู้เขียน            | นางเมย์ ฐ มอญ                                                                                            |                                                                      |
| ปริญญา              | ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)                                                                              |                                                                      |
| คณะกรรมการที่ปรึกษา | ศาสตราจารย์ ดร.พรงาม เดชเกรียงไกรกุล<br>ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภชัย ยอดศิริ<br>อาจารย์ ดร.พรสิริ พิจการ | อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก<br>อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม<br>อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |

## บทคัดย่อ

มะเร็งรังไข่เป็นสาเหตุที่สำคัญที่สุดของการตายจากมะเร็งในระบบสืบพันธุ์เพศหญิงทั่วโลก วิธีการมาตรฐานสำหรับการรักษามะเร็งรังไข่คือการให้ยาเคมีบำบัดร่วมกัน ระหว่างยาเคมีบำบัดชนิดแพคลิแทกเซลและยาในกลุ่มแพลตตินัมได้แก่ คาร์โบพลาตินและซิสพลาติน โดยยาในกลุ่มแพลตตินัมจะมีกลไกหลักในการออกฤทธิ์โดยจะจับกับดีเอ็นเอเกิดเป็นดีเอ็นเอแอตคัท โดยเฉพาะการเกิดพันธะโคเวเลนต์ในสายสายดีเอ็นเอสายเดียวกัน ทำให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์และเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ถึงแม้ว่าการรักษามะเร็งด้วยการให้ยาเคมีบำบัดในกลุ่มแพลตตินัมจะมีประสิทธิภาพสูงในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ อย่างไรก็ตามการเกิดการดื้อยาและผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยก็ยังคงเป็นข้อจำกัดต่อวิธีการรักษามะเร็งรังไข่ โดยในปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรธรรมชาติที่ช่วยในการเพิ่มความไวของยาเคมีบำบัดและปรับปรุงประสิทธิภาพในการต้านมะเร็ง โดยอาศัยสารสกัดสมุนไพรธรรมชาติในการเป็นตัวช่วยส่งเสริมการรักษามะเร็งอาจจะเป็นวิธีการที่เป็นความหวังสำหรับรักษาและป้องกันแก้ไขการเกิดการดื้อยาได้ การศึกษาที่หลากหลายมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการรุกรานของเซลล์มะเร็งและการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารอัลคาลอยด์ในกลุ่มอะพอฟิน ยกตัวอย่างเช่นการศึกษาครีบาเนียนที่แยกได้จากต้นสมุนไพรในเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามการศึกษาศักยภาพการเพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัดของครีบาเนียนและสารอนุพันธ์ที่แยกได้จากต้นสมุนไพรดังกล่าวยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายจำเพาะเจาะจงในการศึกษาประสิทธิภาพของครีบาเนียน และอนุพันธ์ชนิด โอ-เมทิลบูโบ

แคล์เฟนิน เติตระไฮโดรพาลมาทีน และเอ็น-เมทิลเตตระไฮโดรพาลมาทีนในเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยาเคมีบำบัด

จากการศึกษาพบว่าครีบาโนน และอนุพันธ์ชนิด โอ-เมทิลบูโบแคล์เฟนินสามารถเพิ่มความไวต่อยาเคมีบำบัดชนิดซิสพลาตินได้ในเซลล์มะเร็งรังไข่ที่มีการดื้อยาคีชนิด SKOV3 แต่ไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด A2780 และ A2780/cis แต่เตตระไฮโดรพาลมาทีน และเอ็น-เมทิลเตตระไฮโดรพาลมาทีนไม่มีผลในการเพิ่มความไวของยาซิสพลาตินในเซลล์ทั้ง 3 ชนิด ผลการเพิ่มความไวของยาเคมีบำบัดด้วยครีบาโนนและโอ-เมทิลบูโบแคล์เฟนินในเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด SKOV3 เกี่ยวข้องผ่านกลไกการกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านการทำงานของ เอนไซม์แคสเพส 3 และ 8 และ cleaved PARP และยังมีผลไปยับยั้งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์และโปรตีนที่ยับยั้งการต้านการตายแบบอะพอพโทซิส ได้แก่ survivin, cIAP-2, Bcl-xL และ IL-6 โดยยาเคมีบำบัดซิสพลาตินกระตุ้นการส่งสัญญาณผ่าน Akt และ NF- $\kappa$ B แต่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณผ่าน MAPK, AP-1 และ STAT3 ในเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด SKOV3 และยังมีการยืนยันผลการยับยั้งทางเภสัชวิทยาของการทำงานของ Akt โดยใช้ตัวยับยั้งที่จำเพาะ (LY294002) นำไปสู่การเพิ่มความไวของยาในกลุ่มแพลตตินัมในเซลล์ SKOV3 ที่มีการดื้อยาแบบภายใน ดังนั้นผลที่ได้คือการส่งสัญญาณผ่าน Akt/NF- $\kappa$ B มีบทบาทสำคัญในการดื้อยาในกลุ่มแพลตตินัมของมะเร็งรังไข่ ในการศึกษาปัจจุบันพบว่าครีบาโนนและโอ-เมทิลบูโบแคล์เฟนิน สามารถยับยั้งการส่งสัญญาณผ่าน Akt/NF- $\kappa$ B โดยเฉพาะความไวต่อยาซิสพลาติน

เซลล์มะเร็งกระตุ้นให้มีการหลั่งเคโมไคน์และสารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นสารที่มีผลทั้งในเซลล์ตัวเองและเซลล์ข้างเคียงในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการดื้อยาคีของเซลล์มะเร็ง โดย IL-6 ถือเป็นหนึ่งในสารเคโมไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเกิดมะเร็งรังไข่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่มีการดำเนินไปของการเกิดมะเร็งและการดื้อยา ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าครีบาโนนสามารถลดการหลั่งของไซโตไคน์ชนิด IL-6 ที่จะไปกระตุ้นการเติมฟอสเฟตให้กับ STAT3 และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งและการรุกรานของเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด SKOV3 เพื่อที่จะประเมินความสัมพันธ์ระหว่างการผลิต IL-6 และการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดทางคลินิก ผู้วิจัยจึงได้เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งรังไข่ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยอ้างอิงการติดตามระยะของโรคในผู้ป่วยได้รับยาเคมีบำบัดในกลุ่มแพลตตินัมจำนวน 10 ราย โดยผู้ป่วย 7 ราย (70%) ปรากฏการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดแบบสมบูรณ์และกึ่งสมบูรณ์ ส่วนอีก 3 ราย (30%) แสดงการดำเนินไปของโรคมะเร็งและการดื้อยาในกลุ่มแพลตตินัม โดยในกลุ่มของผู้ป่วยที่ไม่มีการ

ตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดจำนวน 3 รายนี้ พบว่ายาเคมีบำบัดชนิดคาร์โบพลาตินกระตุ้นให้เกิดการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-6 ในผู้ป่วย 2 ราย ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อยาทั้งหมดจะพบระดับของไซโตไคน์ชนิด IL-6 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากที่มีการกระตุ้นเซลล์มะเร็งรังไข่ที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วยยาเคมีบำบัดคาร์โบพลาติน ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้พบว่ายาเคมีบำบัดคาร์โบพลาตินกระตุ้นให้มีการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-6 ความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดที่ลดลงของผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ ( $p=0.016$ ) ยิ่งกว่านั้นการให้คีรีบาโนในเซลล์มะเร็งที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-6 สูง (มากกว่า 2 เท่า) ในการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดชนิดคาร์โบพลาติน ส่งผลต่อการเพิ่มความไวของยาเคมีบำบัดในกลุ่มแพลดัตินัมอีกด้วย

โดยสรุปคือคีรีบาโนที่แยกได้จากต้นสมุนไพรเถาจะสามารถใช้เป็นสารช่วยเสริมประสิทธิภาพการเพิ่มความไวของยาเคมีบำบัดชนิดแพลดัตินัมและลดการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-6 ที่กระตุ้นให้มีการดำเนินไปของการเกิดมะเร็งรังไข่ได้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

|                           |                                                                                                       |            |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Dissertation Title</b> | Chemosensitizing Effects of Crebanine and Its Analogues in Human Drug Resistance Ovarian Cancer Cells |            |
| <b>Author</b>             | Mrs. May Thuu Mon                                                                                     |            |
| <b>Degree</b>             | Doctor of Philosophy (Biochemistry)                                                                   |            |
| <b>Advisory Committee</b> | Prof. Dr. Pornngarm Dejkriengkraikul                                                                  | Advisor    |
|                           | Asst. Prof. Dr. Supachai Yodkeeree                                                                    | Co-advisor |
|                           | Dr. Pornsiri Pitchakarn                                                                               | Co-advisor |

## ABSTRACT

Ovarian cancer is one of the foremost causes of death from gynecologic malignancies worldwide. The standard treatment for advanced ovarian cancer is combination chemotherapy of paclitaxel plus a platinum compound (carboplatin or cisplatin). The main cytotoxic activity of platinum compound is the formation of DNA adducts mainly intra-stranded crosslinks, thus triggering several signal transduction pathways leading to apoptosis. Although platinum based chemotherapy is an effective treatment for majority of ovarian cancer patients, platinum drug resistance and side effects are the major limitation of current therapeutic concepts. Up to date, natural products as chemosensitizers that enhance drug sensitivity and improve antineoplastic effects have been investigated. Using of natural products as adjuvant therapy would be promising way for therapeutic and preventive remedies for drug resistance. Several studies proposed the anti-invasive and anti-proliferative effects of aporphine alkaloids such as crebanine isolated from *Stephania venosa* in human cancer cell lines. Nevertheless, chemosensitizing effect of crebanine and its analogues from *S. venosa* have not been investigated. Therefore, our study dedicated to determine the effect of crebanine, *O*-methylbulbocapnine, tetrahydropalmatine, and *N*-methyl tetrahydropalmatine on human drug resistance ovarian cancer cells.

In the present study, crebanine and *O*-methylbulbocapnine enhanced cisplatin sensitivity in intrinsic cisplatin resistant SKOV3 cells, but not in wild type A2780 cells and its acquired resistance type A2780/cis. Tetrahydropalmatine and *N*-methyl tetrahydropalmatine, had no synergistic effect on cisplatin sensitivity in all three cell lines. Chemosensitizing effects of crebanine and *O*-methylbulbocapnine in SKOV3 cells were mediated via activating apoptosis-induced cell death through caspase-3, -8 and cleaved PARP and via inhibiting survival and anti-apoptotic protein expressions, including survivin, cIAP-2, Bcl-xL and IL-6. Cisplatin induced Akt and NF- $\kappa$ B signaling pathways, but not MAPK, AP-1 and STAT3 in SKOV3 cells. We also confirmed that pharmacological inhibition of Akt activity by its selective inhibitor (LY294002) leads to increased platinum sensitivity in intrinsic cisplatin resistance SKOV3 cells. Therefore, the data suggest that Akt/ NF- $\kappa$ B pathway plays a role in platinum resistance in ovarian cancer. In the present study, crebanine and *O*-methylbulbocapnine can also inhibit Akt/NF- $\kappa$ B signaling, favouring cisplatin sensitivity.

Tumor cells synthesize and secrete various chemokines and growth factors which can act in autocrine or paracrine manner in stimulation of tumor cell proliferation and drug resistance. IL6 appears to be one of the important tumor promoting factors in ovarian carcinoma, particularly in the setting of tumor progression and drug resistance. Our results showed that crebanine could reduce IL-6 mediated augmentation of STAT3 protein phosphorylation and its downstream signaling proteins concerned with tumor cell survival and invasion in SKOV3 cells. In order to determine the relationship between IL-6 production and the responses to chemotherapy in clinical settings, the primary cancer cell culture method was established by using the tumor tissue of ovarian carcinoma patients. According to the follow up data after performing platinum-based chemotherapy on ten ovarian cancer patients, seven (70%) patients presented a complete or partial response to chemotherapy, and three (30%) patients showed progression and resistance to platinum-based chemotherapy. Among 3 nonresponsive patients, carboplatin-induced IL-6 production was found in 2 patients whereas IL-6 level upon exposure to carboplatin in *ex-vivo* studies did not change obviously in all responsive patients. Therefore, the data indicated that carboplatin-induced IL-6 production had a significant association with a

poor clinical response to chemotherapy ( $p=0.016$ ). Moreover, treatment of crebanine to primary cell culture with high IL-6 production (more than two fold) in response to carboplatin resulted in increased sensitivity to platinum drug.

In conclusion, crebanine obtained from *S. venosa* would be an effective adjuvant agent to sensitize the platinum-based chemotherapeutic drugs and to decrease the IL-6 induced ovarian cancer aggressiveness.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved