

## บทคัดย่อ

เคมีบำบัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการดื้อยาในผู้ป่วยโรคมะเร็ง ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การเพิ่มปริมาณของโปรตีนชนิดหนึ่งที่ผิวของเซลล์มะเร็ง มีชื่อว่า พี-กลัยโคโปรตีน (P-glycoprotein) ดังนั้นเป็นผลให้ยาที่ใช้รักษามะเร็งไม่สามารถสะสมภายในเซลล์และฆ่าเซลล์มะเร็งได้ในที่สุด จากการศึกษาที่ผ่านมา ได้พยายามศึกษาหาวิธีทำหน้าที่ยปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของการดื้อยาที่มีชื่อเรียกว่า เอ็มดีอาร์โมดูเลเตอร์ (MDR modulators) ซึ่งเป็นยาที่ทำให้ยารักษามะเร็งเกิดการสะสมภายในเซลล์ มะเร็งมากขึ้น ในการวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยสนใจสมุนไพรไทย คือ ขมิ้นชัน (turmeric) มาสกัดเอาส่วน ออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ เคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids) ซึ่งประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ 3 ชนิดด้วยกันคือ เคอร์คิวมิน (curcumin) ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน (demethoxycurcumin) และ บีสดีเมตทอกซีเคอร์คิว มิน (bisdemethoxycurcumin) มาศึกษาเพื่อใช้เป็นเอ็มดีอาร์โมดูเลเตอร์ ในส่วนของการสกัดแยก เคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าสามารถสกัดแยกเคอร์คิวมินอยด์ที่มีความบริสุทธิ์สูง (100%) ตรวจ สอบโดย HPLC จากการศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดต่อการแสดงออกของยีนเอ็มดีอาร์1 ในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา KB-V1 โดยวิธี Western blot และ RT-PCR พบว่าเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนเอ็มดีอาร์ 1 และพบว่าบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน เป็นเคอร์คิวมิ นอยด์ที่ให้ผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนเอ็มดีอาร์1 ดีที่สุด จากการศึกษากลไกการควบคุมการ ทำงานของยีนเอ็มดีอาร์1 โดย transcription factor ในเซลล์ KB-V1 ใช้โปรโมเตอร์ช่วง -84 ถึง -65 มี sequence คือ GGCTGATTGGCTGGGCAGGA ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค electrophoretic mobility shift assay (EMSA) และใช้ competitive EMSA โดยใช้ unlabeled SP1, AP1, AP2, OCT1, NF $\kappa$ B และ CREB oligomers ที่ความเข้มข้น 200-molar excess เพื่อศึกษาชนิดของ transcription factor ผลการศึกษาพบว่า unlabeled CREB สามารถแย่งจับกับ nuclear transcription factor ที่จับกับ labeled probe ได้ดีกว่า consensus sequence ชนิดอื่น และ การทดลองได้ยืนยันชนิดของ transcription factor อีกครั้งหนึ่งด้วยวิธี supershift โดยใช้ anti-CREB การทดลองสามารถสรุปผลได้ว่า เคอร์คิวมินอยด์รวมและบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินสามารถลดการทำงานของ โปรโมเตอร์ของยีนเอ็มดีอาร์1 ได้ และ บีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินเป็นเคอร์คิวมินอยด์ที่ดีที่สุดใน การลดการทำงานของโปรโมเตอร์และการแสดงออกของยีนเอ็มดีอาร์1

## ABSTRACT

Cancer chemotherapy is one of major factors that can induce the development of multidrug resistance (MDR) in human. It is related to the overexpression of membrane protein, P-glycoprotein (Pgp), on the surface of tumor cells, thereby reducing their cytotoxicity. A variety of studies have tried to find potent MDR modulators which increase drug accumulation in cancer cells. In this study, we interested in turmeric curcuminoids (curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin) for potential ability to modulate the human *MDR1* gene expression. Curcuminoids after purification showed 100% purity which were analyzed by HPLC. Western blot analysis and RT-PCR showed that all the three curcuminoids inhibited *MDR1* gene expression and bisdemethoxycurcumin produced maximum effect. Revealing the regulatory mechanisms involved in *MDR1* gene expression is important to our understanding of multidrug resistance in tumor cells. The *MDR1* gene encoding P-glycoprotein contained a promoter sequence (-84 to -65; GGCTGATTGGCTGGGCAGGA) was investigated. DNA-binding analyses suggest that the *MDR1* promoter (-84 to -65) specifically interacted with a nuclear protein. The nuclear protein was identified by competitive electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using unlabeled SP1, AP1, AP2, OCT1, NF $\kappa$ B and CREB oligomers (200-molar excess). The result demonstrated that CREB consensus sequence can completely compete with the nuclear factor that binds to the labeled probe (*MDR1* promoter -84 to -65 DNA fragment) better than other unlabeled probes. Therefore, it indicated that CREB is the transcription factor that binds to the *MDR1* promoter in residue -84 to -65 and this result was confirmed by supershift assay using anti-CREB antibody. In additional studies we found that pretreatment of KB-V1 cells with curcuminoids significantly decreased the activity of *MDR1* promoter and bisdemethoxycurcumin produced maximum inhibitory effect. These results indicate that bisdemthoxycurcumin is the most active of the curcuminoids present in turmeric for modulation of *MDR1* gene expression.