

ผลของเดนโตรพอลโคเนีรอล เอ ต่อการตายแบบอะนอยคิสในเซลล์มะเร็งปอด เอช 460

นางสาวเปรมกมล เฟ็งแพ่ง



ห้องสมุดคณะเภสัชศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5576214433

3498109956

EFFECT OF DENDROFALCONEROL A ON H460 LUNG CANCER CELL ANOIKIS

Miss Premkamol Pengpaeng



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacology  
Department of Pharmacology and Physiology  
Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2013  
Copyright of Chulalongkorn University



เปรมกมล เพ็งแพ่ง : ผลของเดนโตรฟอลโคเนอรอล เอ ต่อการตายแบบอะนอยคิสในเซลล์มะเร็งปอด เอช 460. (EFFECT OF DENDROFALCONEROL A ON H460 LUNG CANCER CELL ANOIKIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ปิติ จันทรรวัชโชติ, 112 หน้า.

การดีต่อการตายแบบอะนอยคิส, การเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ และการเจริญเติบโตของเซลล์ในสภาวะที่ไร้การยึดเกาะ เป็นลักษณะสำคัญของเซลล์มะเร็งที่มีการแพร่กระจายสูง งานวิจัยนี้ได้อธิบายถึงฤทธิ์ของสารเดนโตรฟอลโคเนอรอล เอ หรือ ดีเอฟ เอ ในแง่ของการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดอะนอยคิส การยับยั้งการเคลื่อนที่ รวมถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารดีเอฟ เอ ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด เอช 460 ซึ่งสารดีเอฟ เอ นั้นจัดเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม bis(bibenzyl) ที่สกัดได้จากลำต้นของกล้วยไม้สกุล Dendrobium falconeri วงศ์ Orchidaceae ผลการวิจัยพบว่า สารดีเอฟ เอ ในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์นั้น สามารถเพิ่มการตอบสนองต่อการเกิดอะนอยคิสในเซลล์มะเร็งปอดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ผิวหนัง keratinocyte ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ นอกจากนี้สารดีเอฟ เอ ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในสภาวะที่ไร้การยึดเกาะได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน เพื่อศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ต่อการเกิดอะนอยคิสของสารดีเอฟ เอ โดยใช้ western blot analysis พบว่า สารดีเอฟ เอ นั้น สามารถกระตุ้นการเกิดอะนอยคิสผ่านการกดการส่งสัญญาณการรอดชีวิตของเซลล์ คือ activated protein kinase B (Akt) ร่วมกับการกดการแสดงออกของโปรตีนที่ยับยั้งการตายของเซลล์ คือ Bcl-2 อย่างไรก็ตามสารดีเอฟ เอ ไม่มีผลต่อโปรตีนที่เร่งการตายของเซลล์ชนิด Bax และไม่มีผลต่อโปรตีนที่ยับยั้งการตายของเซลล์ชนิด Mcl-1 นอกจากนี้ สารดีเอฟ เอ สามารถลดระดับของโปรตีน Caveolin-1 (Cav-1) ได้เช่นกัน สำหรับฤทธิ์ของสารดีเอฟ เอ ในแง่ของการเคลื่อนที่พบว่า สารดีเอฟ เอ ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดได้ผ่านทางกลไกการกดการแสดงออกของ pFAK และ Rho-GTP นอกจากนี้ การวิจัยนี้ยังได้ศึกษาผลของสารดีเอฟ เอ ต่อความไวของเซลล์มะเร็งในการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด โดยพบว่า สารดีเอฟ เอ ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของยา cisplatin และ etoposide ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดดังกล่าว กล่าวได้ว่า การศึกษานี้ แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของสารดีเอฟ เอ ต่อการกระตุ้นให้เกิดอะนอยคิส และยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งอาจพัฒนาต่อไป เพื่อใช้ในการรักษามะเร็งปอดได้

3498109856



ภาควิชา เกษษวิทยาและสรวิทยา

ลายมือชื่อนิสิต เสงี่ยมมล เสงี่ยมว

สาขาวิชา เกษษวิทยา

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556

# # 5576214433 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS: DENDROFALCONEROL A / SENSITIZE / ANOIKIS / INHIBIT / MIGRATION / LUNG CANCER

PREMKAMOL PENGPAENG: EFFECT OF DENDROFALCONEROL A ON H460 LUNG CANCER CELL ANOIKIS. ADVISOR: ASST. PROF. PITHI CHANVORACHOTE, Ph.D., 112 pp.

Resistance to anoikis, enhance cell motility, and growth in anchorage-independent condition are hallmarks of highly metastatic cancer cells. The present study demonstrates anoikis sensitizing and anti-migration activities of Dendrofalconerol A (DF-A), a pure bis(bibenzyls) isolated from stem of *Dendrobium falconeri* (Orchidaceae), and its underlying mechanisms in human lung cancer H460 cells. DF-A at non-toxic concentrations significantly increased anoikis response of the cancer cells, but caused no toxic effect on normal keratinocytes. In addition, DF-A significantly inhibited the growth of lung cancer cells in anchorage-independent condition. Western blot analysis revealed that anoikis sensitizing effect of such compound involves its ability to suppress survival signals as well as anti-apoptotic proteins, namely, activated protein kinase B (Akt) and Bcl-2. Furthermore, DF-A significantly decreased the level of Caveolin-1 (Cav-1) proteins while has no effect on pro-apoptotic Bax protein and anti-apoptotic Mcl-1 protein. In case of cancer cell motility, we found that DF-A exhibited strong anti-migration activity with the underlying mechanism involves the effect of compound to suppress pFAK and Rho-GTP in lung cancer cells. Finally, we tested the effect of DF-A on chemotherapeutic agent. DF-A exerts no significant effects on susceptibility of cancer cells to cisplatin and etoposide. Taken together, DF-A possesses anoikis sensitizing activity along with anti-migration effect which may be developed as a novel active compounds used for cancer treatment.

Department: Pharmacology and  
Physiology

Field of Study: Pharmacology

Academic Year: 2013

Student's Signature Premkamol Pengpaeng

Advisor's Signature Pithi Chanvorachote



## ACKNOWLEDGEMENTS

It is impossible to accomplish without the kindness and help for my study. Foremost, I would like to express my sincere gratitude and heartfelt to my advisor, Assistant Professor Dr. Pithi Chanvorachote. Thank you for his tremendous mentor, great understanding, encouraging and supporting, which has been given to me until my research study was completed. Also, I would like to thank Dr. Varisa Pongrakhananon for valuable advice to me.

Besides, I would like to send my appreciation to Associate Professor Dr. Boonchoo Sritularak, professor of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for dendrofalconerol A, which was used in this study.

Furthermore, I would also like to acknowledge with appreciation to Associate Professor Police Lieutenant Colonel Dr. Somsong Lawanprasert and Assistant Professor Dr. Pornpimol Kisanayotin for the great opportunity to study in the Department of Pharmacology and Physiology, Chulalongkorn University.

I would especially like to thank members in my laboratory; Dr. Predakorn Chunhacha, Dr. Chatchai Choatham, Miss Thidarat Winitthana, Miss Chuanpit Ninsontia, Miss Chayanin Kiratipaiboon, Miss Thitita Unahabhokha who always solve many problems together with me.

My special thank is also expressed to my friends and all persons in the Department of Pharmacology and Physiology, Chulalongkorn University. All of you have been there to support me and given a great time together.

My extremely gratitude is also also expressed to THE 90TH ANIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund), Chulalongkorn University for their financial support granted throughout my study.

Eventually, thank to my family. I will be grateful forever for their love and support.



## CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT .....	iv
ENGLISH ABSTRACT .....	v
ACKNOWLEDGEMENTS .....	vi
CONTENTS .....	vii
LIST OF TABLE .....	ix
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS .....	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS .....	4
Lung cancer .....	4
Metastasis.....	5
Migration.....	6
Focal adhesion kinase (FAK).....	8
Rho-family protein.....	10
Anoikis.....	13
Apoptosis.....	14
Anoikis pathway .....	15
The intrinsic apoptotic pathway.....	16
The extrinsic apoptotic pathway.....	18
Bcl-2.....	19
Bax .....	19
Mcl-1.....	20
Caveolin-1 (Cav-1) .....	21
Protein kinase B (Akt).....	23
Protein kinase B and apoptotic pathway.....	24
Protein kinase B and Cav-1 .....	25
Chemotherapeutic agents .....	25



	Page
Cisplatin .....	25
DNA-adduct formation.....	26
ROS induction.....	27
Etoposide.....	27
Dendrofalconerol A.....	30
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS .....	32
CHAPTER IV RESULTS .....	48
CHAPTER V DISCUSSION AND CONCLUSION .....	72
REFERENCES .....	75
APPENDIX.....	91
VITA.....	112





## LIST OF TABLE

	Page
Table 1 Distinct modalities of apoptosis and necrosis.....	15
Table 2 The percentage of H460 cell viability was determined by MTT assay after treatment with various concentrations of DF-A (0-100 $\mu$ M) for 24 h (concentration- dependency).....	85
Table 3 The percentage of HaCat cell viability was determined by MTT assay after treatment with various concentrations of DF-A (0-100 $\mu$ M) for 24 h (concentration-dependency).....	86
Table 4 The percentage of apoptotic H460 cells was determined by MTT assay after treatment with various concentrations of DF-A (0-100 $\mu$ M) for 24 h (concentration-dependency).....	87
Table 5 The percentage of apoptotic HaCat cells was determined by MTT assay after treatment with various concentrations of DF-A (0-100 $\mu$ M) for 24 h (concentration-dependency).....	88
Table 6 The percentage of H460 cell viability was determined by MTT assay after treatment with various non-concentrations of DF-A (0-5 $\mu$ M) for 0, 6, 9, 12 or 24 h (time- and concentration-dependency) .....	89
Table 7 The percentage of apoptotic H460 cells was determined by MTT assay after treatment with various non-concentrations of DF-A (0-5 $\mu$ M) for 24 h (concentration-dependency) .....	90



Table 8 The percentage of HaCat cell viability was determined by MTT assay after treatment with various non-concentrations of DF-A (0-5 $\mu$ M) for 0, 6, 9, 12 or 24 h (time- and concentration-dependency) .....	91
Table 9 Relative sub $G_0$ fraction of H460 cells was determined by PI staining and flow cytometry after treatment with various non-concentrations of DF-A (0-5 $\mu$ M) for 24 h (concentration-dependency) .....	92
Table 10 The percentage of Colony size of H460 cells was determined by image analyzer after treatment with various non-concentrations of DF-A (0-5 $\mu$ M) for 2 weeks (concentration-dependency) .....	93
Table 11 The percentage of Colony number of H460 cells was determined by image analyzer after treatment with various non-concentrations of DF-A (0-5 $\mu$ M) for 2 weeks (concentration-dependency) .....	94
Table 12 The relative protein of pAkt/Akt was determined by Western blot analysis after untreated or treated cells with DF-A 5 $\mu$ M for 0, 6, 12 or 24 h (time-dependency) .....	95
Table 13 The relative protein of Mcl-1 was determined by Western blot analysis after untreated or treated cells with DF-A 5 $\mu$ M for 0, 6, 12 or 24 h (time-dependency) .....	96
Table 14 The relative protein of Bax was determined by Western blot analysis after untreated or treated cells with DF-A 5 $\mu$ M for 0, 6, 12 or 24 h (time-dependency) .....	97
Table 15 The relative protein of Cav-1 was determined by Western blot analysis after untreated or treated cells with DF-A 5 $\mu$ M for 0, 6, 12 or 24 h (time-dependency) .....	98



Table 16 The relative protein of Bcl-2 was determined by Western blot analysis after untreated or treated cells with DF-A 5 $\mu$ M for 0, 6, 12 or 24 h (time-dependency) .....	99
Table 17 The percentage of H460 cells proliferation was determined by MTT assay after treatment with various non-concentrations of DF-A (0-5 $\mu$ M) for 0-72 h at various time points. ....	100
Table 18 Relative cell migration (wound closure) of H460 cells was determined by wound healing assay after treatment with various non-concentrations of DF-A (0-5 $\mu$ M) for 24 h.....	100
Table 19 Relative cell migration (wound closure) of H460 cells was determined by wound healing assay after treatment with various non-concentrations of DF-A (0-5 $\mu$ M) for 24, 48 or 72 h.....	101
Table 20 The relative protein of p-FAK/FAK, Rho-GTP and Rac-GTP were determined by western blot analysis after treatment with various non-concentrations of DF-A (0-5 $\mu$ M) for 24 h (concentration-dependency) .....	102
Table 21 The percentage of H460 cell viability was determined by MTT assay after pretreatment with various non-concentration of DF-A (0-5 $\mu$ M) prior to cisplatin treatment.....	103
Table 22 The percentage of H460 cell viability was determined by MTT assay after pretreatment with various non-concentration of DF-A (0-5 $\mu$ M) prior to etoposide treatment.....	104



## LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1 Metastasis process.....	6
Figure 2 Schematic of cell migration.....	7
Figure 3 Signaling pathway of FAK and its downstream.....	8
Figure 4 Structure of FAK and phosphorylation site.....	9
Figure 5 Regulation of Rho family proteins.....	11
Figure 6 Step to move in cell migration.....	12
Figure 7 Anoikis and anoikis resistant.....	13
Figure 8 Bcl-2 family of pro- and anti-apoptosis protein.....	16
Figure 9 Intrinsic pathway and extrinsic pathway.....	17
Figure 10 The structure of caveolar and caveolin .....	21
Figure 11 The level and role of Cav-1 in tumor progression.....	23
Figure 12 Structure of cisplatin.....	25
Figure 13 DNA-adduct formation of cisplatin.....	27
Figure 14 Structure of etoposide.....	28
Figure 15. The mechanism of etoposide.....	29
Figure 16. Chemical structure e of Dendrofalconerol A.....	30
Figure 17 Conceptual framework.....	40
Figure 18 Experimental designs.....	41
Figure 19. The cytotoxic effects of DF-A on lung cancer H460 cells and keratinocyte HaCat cells.....	48



Figure 20 Nuclear morphology of H460 cells and HaCat cells.....	49
Figure 21 Anoikis sensitizing effect of DF-A on H460 cells.....	52
Figure 22 Anoikis sensitizing effect of DF-A on HaCat cells.....	53
Figure 23 Nuclear morphology of anoikis nuclei of H460 cells .....	54
Figure 24 Percentage of apoptosis in response to DF-A treatment.....	55
Figure 25 Sub-G <sub>0</sub> fraction of DF-A.....	56
Figure 26 DF-A inhibits anchorage-independent growth .....	58
Figure 27 Colony size and number.....	59
Figure 28 Effects of DF-A on anoikis regulatory proteins.....	61
Figure 29 Effect of DF-A on H460 lung cancer cell proliferation .....	64
Figure 30 Effect of DF-A on H460 lung cancer cell migration.....	65
Figure 31 DF-A suppresses the expression of pFAK and Rho-GTP in H460 cells.....	67
Figure 32 Effect of DF-A on anti-cancer drugs-induced cell death.....	70



## LIST OF ABBREVIATIONS

%	= percentage
°c	= degree Celsius
µg	= microgram (s)
µl	= microliter (s)
Akt	= adenosine triphosphate dependent tyrosine kinase
ANOVA	= analysis of variance
Bcl-2	= B-cell lymphoma 2
Cav-1	= caveolin-1
Cdc42	= cell division cycle 42
CO <sub>2</sub>	= carbon dioxide
CSD	= caveolin scaffolding domain
DISC	= death-inducing signaling complex
DMSO	= dimethyl sulfoxide
DNA	= deoxyribonucleic acid
ECM	= extracellular matrix
EDTA	= Ethylenediaminetetraacetic acid
et al.	= et alibi, and other
EtOH	= ethanol
FAK	= focal adhesion kinase
FAs	= focal adhesions
FAT	= focal adhesion targeting-domain
FBS	= fetal bovine serum



FERM	= protein 4.1, ezrin, radixin, and moesin homology
g	= gram
GAPs	= GTPase activating proteins
GEFs	= guanine nucleotide exchange factors
GDIs	= guanine nucleotide dissociation inhibitors
h	= hour, hours
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	= hydrogen peroxide
H460	= large cell lung carcinoma cell line
Hacat	= human skin: keratinocyte
IC <sub>50</sub>	= 50% inhibitory concentration
IC <sub>70</sub>	= 70% inhibitory concentration
kDA	= kilo dalton
L	= litre (s)
Mcl-1	= myeloid cell leukemia sequence 1
MeOH	= methanol
Min	= minute (s)
Mg	= milligram (s)
ml	= milliliter
mM	= millimolar
MTT	= 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaCl	= sodium chloride
NSCLC	= non-small cell lung cancer
OD	= optical density
PAGE	= polyacrylamide gel electrophoresis



PBS	= phosphate-buffered saline
pFAK	= active focal adhesion kinase
PI	= propidium iodide
PI3K	= phosphatidylinositol-3 kinase
Poly-HEMA	= Polyhydroxyl- ethylmethacrylate
ROS	= reactive oxygen species
RPMI	= Roswell Park memorial institute's medium
SCLC	= small cell lung cancer
SDS	= sodium dodecyl sulfate
SE	= standard error
Ser	= serine
TBST	= tris-buffered saline, 0.1% Tween 20
TOP-II	= topoisomerase 2
Tyr	= tyrosine
XTT	= 2,3-b-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide salt

