ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47260

GENETIC POLYMORPHISM OF NAD(P)H-QUINONE OXIDOREDUCTASE-1 IN THAIS AND ITS ASSOCIATION WITH CHOLANGIOCARCINOMA

MISS PORNSIN ZEEKPUDSA

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
KHON KAEN UNIVERSITY
2009

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47260
b00254205

GENETIC POLYMORPHISM OF NAD(P)H-QUINONE OXIDOREDUCTASE-1 IN THAIS AND ITS ASSOCIATION WITH CHOLANGIOCARCINOMA

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

MISS PORNSIN ZEEKPUDSA

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
KHON KAEN UNIVERSITY
2009

GENETIC POLYMORPHISM OF NAD(P)H-QUINONE OXIDOREDUCTASE-1 IN THAIS AND ITS ASSOCIATION WITH CHOLANGIOCARCINOMA

MISS PORNSIN ZEEKPUDSA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN PHARMACOLOGY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY
2009

THESIS APPROVAL

KHON KAEN UNIVERSITY

FOR

MASTER OF SCIENCES

IN PHARMACOLOGY

Thesis Title: Genetic polymorphism of NAD(P)H-quinone oxidoreductase-1 in Thais and its association with cholangiocarcinoma

Author: Miss Pornsin Zeekpudsa

Thesis committee:	Assoc. Prof. Dr. Pornpen Pramyothin	Chairperson
	Dr. Auemduan Prawan	Member
	Assoc. Prof. Dr. Veerapol Kukongviriyapan	Member
	Assoc. Prof. Chawalit Pairojkul	Member

Thesis Advisors:

.....Advisor

(Dr. Auemduan Prawan)

.....Co-advisor

(Assoc. Prof. Dr. Veerapol Kukongviriyapan)

.....

(Assoc.Prof.Dr. Lampang Manmart)

Dean, Graduate School

.....

(Prof. Wiroon Laupattarakasem)

Dean, Faculty of medicine

Copyright of Khon Kaen University

พรศิลป์ ซีกพุดซา. 2552. **ลักษณะทางพันธุกรรมของเอนไซม์ NAD(P)H-quinone oxidoreductase-1 ในประชากรไทยและความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งท่อน้ำดี.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ดร. เอื้อมเดือน ประวาฬ,
รศ.ดร.วีรพล คู่คงวิริยะพันธุ์

บทคัดย่อ

E47260

NAD(P)H-quinone oxidoreductase-1 (NQO1) เป็นเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่กำจัดสารพิษและต้านออกซิเดชัน จึงมีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำโดยสารจำพวก quinones และ quinonoids ทั้งนี้โดยป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระออกซิเจนและเร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารต่างๆ อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ NOQ1 ก็มีบทบาทในการเพิ่มฤทธิ์ของสารต้านมะเร็งกลุ่ม quinones ผ่านปฏิกิริยารีดักชันแบบจ่ายสองอิเล็กตรอนได้เช่นกัน การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของจีน *NQO1* ในมนุษย์พบว่าการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จากไซโทซีน (C) ไปเป็นไทมีน (T) ที่ตำแหน่ง 609 (ตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ 187) ของ *NQO1* cDNA มีผลทำให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ NQO1 ลดลง จึงส่งผลให้ความสามารถในการปกป้องเซลล์ของเอนไซม์ NQO1 ลดลงด้วย แม้ว่าจะมีรายงานการศึกษาหลายฉบับที่กล่าวถึงความผิดแผกทางพันธุกรรมของจีน *NQO1* กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง แต่ยังไม่มีรายงานถึงบทบาทของความผิดแผกทางพันธุกรรมของจีนนี้ในมะเร็งท่อน้ำดี (มะเร็งชนิดนี้พบมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย) การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาลักษณะของความผิดแผกทางพันธุกรรมของจีน *NQO1* ในประชากรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของจีนดังกล่าวกับมะเร็งท่อน้ำดี

การศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี 189 ราย และผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 210 ราย โดยทำการวิเคราะห์จีโนไทป์ของจีน *NQO1* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ผลการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดีชาวไทยอีสาน พบว่าความถี่อัลลีลแบบ *NQO1*1* wild-type มีค่าเท่ากับ 59% และอัลลีลแบบ *NQO1*2* (เป็นอัลลีลซึ่งเอนไซม์ NQO1 ที่ได้มีความสามารถในการทำงานลดลง) มีความถี่เท่ากับ 41% โดยทั้งนี้พบความถี่ของจีโนไทป์แบบ *NQO1*1/*1* เท่ากับ 32%, แบบ *NQO1*1/*2* เท่ากับ 53% และแบบ *NQO1*2/*2* เท่ากับ 15% จากการเปรียบเทียบการกระจายความถี่จีโนไทป์ของจีน *NQO1* ของประชากรไทย พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับประชากรเอเชียตะวันออก และพบความแตกต่างระหว่างแบบแผนความถี่อัลลีลของจีน *NQO1* ในคนไทยกับประชากรกลุ่มคอเคเชียนและกลุ่มแอฟริกัน-อเมริกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.0001$)

การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีความถี่อัลลีลแบบ *NQO1*1* สูงกว่าในกลุ่มคนปกติ ส่วนการหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของจีน *NQO1* กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี โดยอาศัยการวิเคราะห์ตัวแปรพหุ (multivariate analysis) พบว่าในบุคคลที่มีจีโนไทป์แบบ *NQO1*1/*1* จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อควบคุมผลกระทบของปัจจัย คือ อายุ, เพศ และ

E47260

การสูบบุหรี่ (odds ratio เท่ากับ 1.57; 95% CI: 1.03-2.40; p = 0.03) อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ *NQO1* กับค่าอัตราปลอดเหตุการณ์ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงบ่งชี้ว่าในแต่ละเชื้อชาติมีความถี่ของอัลลีลแบบ *NQO1*2* ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน รวมถึงเป็นรายงานครั้งแรกที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจี-โนไทป์แบบ wild-type กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

Pornsin Zeekpudsa. 2009. **Genetic Polymorphism of NAD(P)H-quinone oxidoreductase-1 in Thais and Its Association with Cholangiocarcinoma.** Master of Science Thesis in Pharmacology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Dr. Auemduan Prawan,
Assoc. Prof. Dr. Veerapol Kukongviriyapan

ABSTRACT

E47260

NAD(P)H-quinone oxidoreductase-1 (NQO1) is a detoxifying/antioxidant enzyme that plays an important role in cellular protection against quinones, quinonoids and certain environmental carcinogens induced oxidative stress, by preventing the subsequent generation of toxic reactive oxygen species and reduction. Antitumor quinones, however, can be bioactivated by this two electron reduction, and in these cases NQO1 serves as an activating enzyme. A genetic polymorphism C to T transversion at nucleotide position 609 (amino acid codon 187) of the human *NQO1* cDNA was clearly shown to reduce NQO1 enzyme activity, which may diminish the protection provided by NQO1. Although, a number of epidemiological studies have suggested the possible link between NQO1 polymorphism and cancer susceptibility, the role of NQO1 polymorphism in relation to carcinogensis of cholangiocarcinoma (CCA), the most common liver cancer in the Northeast of Thailand, is currently unknown. The aims of this study were to investigate the genetic polymorphism of NQO1 enzyme in Northeastern Thai population, and to evaluate the relationship of NQO1 polymorphism and CCA.

A total of 189 control subjects and 210 CCA patients were enrolled in this study and the *NQO1* genotyping were determined by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. Among the Northeastern Thai healthy controls, the *NQO1*1* wild type allele was present at a frequency of 59%, and the *NQO1*2* null enzyme activity allele was 41%. Of these subjects, 32% were *NQO1*1/*1*, 53% were *NQO1*1/*2*, and 15% were *NQO1*2/*2*. In addition, the distribution of *NQO1* genotypes in Thais was of similar patterns to

E 47260

other East Asian (Oriental) populations, but significantly differed from those observed in Caucasian and African-American ($p<0.0001$).

A comparative study between control subjects and CCA patients showed that, overall, CCA patients were more likely to carry two copies of *NQO1*1* allele compared with controls. Multivariate analyses indicated a significant association of the *NQO1*1/*1* genotype with CCA after controlling for the effects of age, sex, and smoking status (odds ratio, 1.57; 95% CI: 1.03-2.40; $p = 0.03$). However, there was no relation between NQO1 genotypes and survival time in these CCA patients. These results indicate a significant ethnic variation in the occurrence of *NQO1*2* and present as the first observation reporting an association of the wild type genotype with CCA.

The present thesis is dedicated for

my parents and my teachers

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to express my deepest and sincere gratitude to my supervisor, Dr. Auemduan Prawan for providing me a good opportunity to study in this field, her kind supervisor, laboratory facilities support, encouragement, invaluable guidance and criticism throughout the course of study. I deeply appreciate the time she spared me during the preparation of this thesis.

Deep admiration and appreciation are extended to Associate Professor Dr. Veerapol Kukongviriyapan for his kindness; to serve as the advisory committee as well as valuable advises guidance and constructive comments.

I would like to thank Prof. Pornpen Pramyothin and Associate Professor Chawalit Pairojkul for their valuable comments and for their kindness to serve as members of the examination committee.

I wish to express my sincere appreciation to Associate Professor Vajarabhongsa Bhudhisawasdi (M.D.) for screening CCA patients and Assistant Professor Banchob Sripa for the liver tissues of CCA patients and histological examination reports. I would also like to express my gratitude for fruitful collaboration to Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University.

I will always be grateful to all my teachers for their instructions and encouragement during the course of my studies and to all members of the department of Pharmacology and Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, for their co operations, practical help, providing the valuable knowledge, wonderful environment and friendship during the time of this study. My special thanks are also extended to all my friends and to whom my study may concern without being mentioned in this thesis.

Finally, I would to express my deepest appreciation and sincere gratitude to my parents for their love, understanding and encouragement throughout my study.

Pornsin Zeekpudsa

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iii
DEDICATION	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
TABLE OF CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF ABBREVIATIONS	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1. Rational and Background	1
2. Hypothesis of the Study	3
3. Aims of the Study	4
4. Specific Objectives	4
5. Scope of Thesis	4
6. Conceptual Framework	5
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS	7
1. Quinones, Redox cycling and Oxidative stress	7
2. NAD(P)H-quinone oxidoreductase-1 (NQO1)	8
2.1 NQO1 substrate specificity	8
2.2 Function of NQO1 enzyme	9
2.3 Bioactivation by NQO1 in chemotherapy: Enzyme-directed antitumor agents	12
2.4 NQO1 regulation	14
2.5 NQO1 expression	18
2.6 NQO1 polymorphism	18
3. Cholangiocarcinoma (CCA)	26
3.1 Definition and Classification	26
3.2 Epidemiology	27

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
3.3 Etiology	27
3.4 Pathology	28
3.5 Mechanism of Cholangiocarcinogenesis	28
3.6 Treatment of Cholangiocarcinoma	29
CHAPTER III RESEARCH METHODOLOGY	31
1. Chemicals	31
2. Research design	31
3. Subject population	32
3.1 Sample size and study power	33
4. DNA preparation	33
4.1 Genomic DNA extraction method using guanidine thiocyanate	33
4.2 Measurement of DNA concentration	34
5. NQO1 genotyping by using polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP)	34
6. Statistical analysis	35
7. Location of research condition	35
CHAPTER IV RESULTS	36
1. Characteristics of the healthy Thais	36
2. Distribution of *NQO1* genotype and allelic frequencies in Thai population	36
3. Demographic characteristics of the CCA patients	41
4. Distribution of *NQO1* genotype and allelic frequencies in CCA patients	41
5. Risk for NQO1 polymorphism in CCA patients	45
6. Association of survival time and *NQO1* genotypes	49
6.1 Analysis of independent factors on survival time	50

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
CHAPTER V DISCUSSION	58
REFERENCES	62
APPENDICES	73
APPENDIX A REAGENTS	74
APPENDIX B LIST OF COMMUNICATIONS	76
LETTER OF COMMENDATION FOR POSTER PRESENTATION AWARD	81
CURRICULUM VITAE	83

LIST OF TABLES

		Page
Table 1	Percentage of individuals in different populations with the *NQO1*2/*2* genotype	20
Table 2	NQO1 polymorphism and cancer susceptibility	23
Table 3	NQO1 polymorphism and low risk of cancer	24
Table 4	The sequence of PCR primers for human *NQO1* gene	34
Table 5	Demographic characteristics of healthy controls	37
Table 6	Genotype and allele frequencies of NQO1 polymorphism in Thai population	39
Table 7	Comparison of *NQO1 609T* allele frequency in different ethnic group	40
Table 8	Demographic characteristics of CCA patients	42
Table 9	Genotype and allele frequencies of NQO1 polymorphism in CCA	43
Table 10	Association of *NQO1* genotype and allele with risk of CCA risk	44
Table 11	CCA cancer risk estimates for NQO1 polymorphism	46
Table 12	Case-control studies reporting the association between NQO1 polymorphism and cancer risk	48
Table 13	Summary of CCA survival data by *NQO1* genotype	49
Table 14	Results of Cox regression analysis for the CCA patients	56

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	The conceptual framework of inflammatory on NQO1 activity, expression and impact of NQO1 polymorphism in CCA	6
Figure 2	Structures of some substrates and inhibitors of NQO1	9
Figure 3	Activation and deactivation resulting from NQO1-mediated reduction of quinines	10
Figure 4	The role of NQO1 in regeneration of antioxidant forms of ubiquinone and vitamin E	11
Figure 5	Schematic representation of ubiquitin-dependent and independent mechanisms for proteasomal protein degradation	12
Figure 6	Quinones and other compounds considered as NQO1-directed antitumor agents	13
Figure 7	*NQO1* gene structure and promoter elements. Structure of human *NQO1* gene; E1-E6 Exons; ARE, antioxidant response element, AP-2, AP-2 binding site	15
Figure 8	Transcription factors recruited to the NQO1-ARE under homeostatic conditions or during oxidative stress	17
Figure 9	Human *NQO1* gene polymorphism	19
Figure 10	The term CCA refers to tumors involving the entire (ie, intrahepatic and extrahepatic) biliary tree	26
Figure 11	Mechanisms of cholangiocarcinoma	30
Figure 12	Experimental design of CCA and control subjects	32
Figure 13	Agarose gel electrophoresis patterns of the NQO1 polymorphism identified by PCR-RFLP analysis using restriction enzyme *Hin*fI	38
Figure 14	Survival after surgery, stratified by three *NQO1* genotypes (as *NQO1*1/*1, NQO1*1/*2*, and *NQO1*2/*2*), *p*-value= 0.24	51
Figure 15	Survival after surgery, stratified by two groups of *NQO1* genotype (*NQO1*1/*1* versus *NQO1*1/*2+*2/*2*), *p*-value= 0.09	52

LIST OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 16	Survival after surgery, stratified by smoking status (as never smoked, ex-smoke, and current smoke), *p*-value= 0.79	53
Figure 17	Survival after surgery, stratified by smoking status (as < 14 pack-years (by median value in control group) and ≥ 14 pack-years), *p*-value= 0.91	54
Figure 18	Survival after surgery, stratified by histopathology (papillary versus non-papillary), *p*-value < 0.001	55

LIST OF ABBREVIATIONS

ARE	antioxidant response element
bp	base pair
CCA	cholangiocarcinoma
CI	confidence interval
CMLB	cell membrane lysis buffer
gDNA	genomic deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EpRE	electrophilic response element
GSTs	glutathione *S*-transferases
HR	hazard ratio
mg	Miligram(s)
mL	Milliliter(s)
MMC	mitomycin C
MW	molecular weight
NaCl	sodium chloride
NQO1	NAD(P)H-quinone oxidoreductase-1
Nrf2	NF-E2-related factor2
OR	odds ratio
p53	tumor suppressor gene
PCR	polymerase chain reaction
RFLP	restriction fragment length polymorphism
ROS	reactive oxygen species
SNPs	single nucleotide polymorphism
uL	Microlitter(s)
XRE	xenobiotic response element