

**MECHANISMS OF CATIONIC LIPOSOMES-INDUCED APOPTOSIS AND ITS PROTECTION BY ANTIOXIDANTS**

LALANA KONGKANERAMIT 4738645 PYPT/D

Ph.D.(PHARMACEUTICS)

THESIS ADVISORY COMMITTEE : NARONG SARISUTA, Ph.D., YON ROJANASAKUL, Ph.D.,  
RAMIDA WATANAPOKASIN, Ph.D.**ABSTRACT**

Cationic liposomes, nonviral gene delivery vectors, have advantages such as opportunities for chemical or physical manipulation and large scale production. Although they are widely used, their disadvantages are cytotoxicity and low transfection efficiency. Lipofectamine<sup>TM</sup> (LF), a commercial cationic liposome, has been reported for its cytotoxicity involving reactive oxygen species (ROS) but the underlying mechanism is still unclear. The aims of this study carried out in human lung epithelial cancer cells (H460 cells) were to determine the mechanism, to identify specific ROS involved, and to reduce its cytotoxicity by various antioxidants such as chemicals, enzymes, or herbal extracts.

The results showed that LF-induced apoptosis of H460 cells occurred through a mechanism involving caspase activation and ROS generation. Inhibition of caspase activity by caspase inhibitors (pan-caspase, caspase-8 or caspase-9 inhibitors) could restrain the apoptotic effect of LF. Overexpression of FLICE-inhibitory protein (FLIP) or B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein, which are known as inhibitors of the extrinsic and intrinsic death pathway, respectively, could additionally inhibit apoptosis by LF. Induction of apoptosis by LF was shown to require ROS generation since its inhibition by ROS scavengers or by ectopic expression of antioxidant enzyme superoxide dismutase and glutathione peroxidase strongly inhibited the apoptotic effect of LF. The primary ROS that was responsible for LF-induced apoptosis was found to be superoxide. The mechanism by which ROS mediated the apoptotic effect of LF involved down-regulation of FLIP. Apart from ROS scavengers or antioxidant enzymes, herbal root extracts from *Asparagus racemosus* was shown to exhibit protective effect against LF-induced apoptosis in H460 cells. Due to the fact that LF death signaling pathway was elucidated, the use of antioxidant was advised and the promising protective herbal extract from such cytotoxicity was proposed. Consequently, a novel mechanism of apoptosis regulation in LF death signaling may be exploited to decrease cytotoxicity and increase gene transfection efficiency of cationic liposomes.

**KEY WORDS:** CATIONIC LIPOSOMES / APOPTOSIS / REACTIVE OXYGEN SPECIES / FLIP /  
*ASPARAGUS RACEMOSUS*

121 pages

กลไกการตายของเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยไลโปโซมประจุบวก และการป้องกันโดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระ  
MECHANISMS OF CATIONIC LIPOSOMES-INDUCED APOPTOSIS AND ITS PROTECTION BY  
ANTIOXIDANTS

ลลนา คงานรมิตร 4738645 PYPT/D

ปร.ด. (เภสัชการ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ณรงค์ สาริสุต, Ph.D., YON ROJANASAKUL, Ph.D., รมีดา วัฒน โกลาสิน, Ph.D.

บทคัดย่อ

มีการใช้ไลโปโซมประจุบวกเป็นตัวนำส่งยีนชนิดไม่ใช่วิรัส ซึ่งมีข้อดี เช่น สามารถปรับให้เหมาะสมทางเคมีและกายภาพได้ และสามารถผลิตในปริมาณมากได้ ถึงแม้ว่าการใช้ไลโปโซมประจุบวกนี้ยังกว้างขวาง แต่ก็มีข้อด้อย เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีประสิทธิภาพต่ำในการนำส่งยีน มีรายงานเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์ของ ไลโปเฟคตามีน (Lipofectamine™, LF) ซึ่งเป็นไลโปโซมประจุบวกที่มีจำหน่าย โดยสัมพันธ์กับ reactive oxygen species (ROS) และยังไม่ทราบถึงกลไกที่ชัดเจน การศึกษานี้ทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งปอด (H460 cells) เพื่อต้องการค้นหากลไกดังกล่าว และระบุถึงชนิดของ ROS ที่เกี่ยวข้อง และต้องการลดความเป็นพิษโดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ เช่น สารเคมี เอนไซม์ หรือสารสกัดจากพืช

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า LF เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis เนื่องจากมีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ caspase และพบว่ามีการสร้าง ROS ขึ้นด้วย เมื่อยับยั้งการทำงานของ caspase โดยใช้ตัวยับยั้ง caspase (caspase inhibitors) หลายชนิด พบว่าการตายที่เหนี่ยวนำจาก LF ถูกยับยั้งได้ เมื่อทำให้มีปริมาณของโปรตีน FLICE-inhibitory protein (FLIP) และ B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein เพิ่มขึ้นในเซลล์ (เป็นที่ทราบว่าโปรตีนทั้งสองนี้สามารถยับยั้งวิธีการตายแบบ extrinsic และ intrinsic ได้ตามลำดับ) พบว่าการตายที่เหนี่ยวนำจาก LF ถูกยับยั้งได้ นอกจากนี้ การเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายโดย LF นี้ต้องการ ROS ร่วมด้วย เพราะเมื่อใช้ ROS scavenger หรือเมื่อมีปริมาณเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (superoxide dismutase and glutathione peroxidase) เพิ่มขึ้นในเซลล์ พบว่าสามารถยับยั้งการตายที่เหนี่ยวนำจาก LF ได้ ส่วน ROS หลักที่สัมพันธ์กับการตายนี้คือ superoxide และการสลายของ ROS เมื่อเซลล์ตายจาก LF นี้มีกลไกเกี่ยวข้องกับการทำให้ FLIP ลดลง นอกเหนือจาก ROS scavenger และเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว การใช้สารสกัดจากรากพืช คือ รากสามสิบ หรือ สามร้อยราก (*Asparagus racemosus*) มีฤทธิ์ในการป้องกันการตายที่เหนี่ยวนำจาก LF ใน H460 cells ได้ การศึกษาทั้งหมดนี้แสดงถึงวิธีการนำสัญญาณการตายที่เหนี่ยวนำโดย LF แสดงถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ป้องกัน และนำเสนอสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ปกป้องความเป็นพิษ ดังนั้น กลไกการตายที่เกี่ยวข้องกับสัญญาณการตายที่เหนี่ยวนำโดย LF ที่ค้นพบนี้ อาจใช้ประโยชน์ในการช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์ และเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยีนของไลโปโซมประจุบวกได้