การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอโซเมอเรส I จากพืชสมุนไพรไทยโดยใช้เซลล์ยีสต์

นางสาวปริณดา อุปธารปรีชา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเวท ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552

TOPOISOMERASE I INHIBITORY ACTIVITY FROM THAI MEDICINAL PLANTS IN YEAST CELL-BASED ASSAY

Miss Parinda Uppatanpreecha

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacognosy
Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Thesis Title	TOPOISOMERASE I INHIBITORY ACTIVITY FROM THAI MEDICINAL PLANTS IN YEAST CELL-BASED ASSAY
By	Miss Parinda Uppatanpreecha
Field of Study	Pharmacognosy
Thesis Advisor	Assistant Professor Suchada Sukrong, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Areerat Laorpaksa

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Pornpen Pramyothin ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

S. Amnuoypol ..... Chairman

(Associate Professor Surattana Amnuoypol, Ph.D.)

Suchada Sukrong ..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Suchada Sukrong, Ph.D.)

Areerat Laorpaksa ..... Thesis Co-Advisor

(Associate Professor Areerat Laorpaksa)

Boonchoo Sritularak ..... Examiner

(Assistant Professor Boonchoo Sritularak, Ph.D.)

Chuenchit Boonchird ..... External Examiner

(Associate Professor Chuenchit Boonchird, Ph.D.)

ปริณดา อุปธารปรีชา: การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอโซเมอเรส I จากพืชสมุนไพรไทยโดยใช้เซลล์ยีสต์. (TOPOISOMERASE I INHIBITORY ACTIVITY FROM THAI MEDICINAL PLANTS IN YEAST CELL-BASED ASSAY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.อารีรัตน์ ลออปักษา, 103 หน้า.

เอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I เป็นเป้าหมายหนึ่งของการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีเคมีบำบัดในปัจจุบัน งานวิจัยนี้จึงมุ่งหมายที่จะค้นหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอโซเมอเรส I จากสมุนไพรไทยที่มีการใช้สืบต่อกันมาโดยภูมิปัญญาชาวบ้านมาก่อนว่ามีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้เซลล์ยีสต์ ยีสต์ที่ใช้ในการคัดกรองเป็นยีสต์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนโทโพไอโซเมอเรส I จากพืช *Arabidopsis thaliana* ซึ่งสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนโทโพไอโซเมอเรส I ได้ จากการคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอโซเมอเรส I ของสมุนไพรไทยจำนวน 27 ชนิด พบว่าสารสกัดเอทานอลจากส่วนของสมุนไพรไทยจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ใบและรากของทองพันชั่ง ต้นพญามุตติ หัวบอระเพ็ด พุงช้าง เหง้าขมิ้นชัน และเหง้าขมิ้นอ้อย มีฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอโซเมอเรส I สารสกัดจากต้นพญามุตติถูกเลือกเพื่อทำการศึกษาต่อให้ทราบถึงสารสำคัญที่มีฤทธิ์ดังกล่าวเนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานถึงฤทธิ์การยับยั้งโทโพไอโซเมอเรส I ของต้นนี้มาก่อน

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของต้นพญามุตติ โดยวิธีคัดเลือกจากสิ่งสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอโซเมอเรส I โดยใช้เซลล์ยีสต์ สามารถแยกสารกลุ่ม sesquiterpene lactone ได้ 2 ชนิด คือ (-)-frullanolide และ (-)-7α- hydroxyfrullanolide การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารทั้งสองอาศัยเทคนิคทางสเปคโตสโคปีร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลจากงานวิจัยที่มีรายงานมาก่อน สารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด KB เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H187 ในหลอดทดลอง ข้อมูลที่ได้เป็นการรายงานครั้งแรกถึงกลไกการออกฤทธิ์ในการเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสำคัญสองชนิดจากต้นพญามุตติ

ภาควิชา.....เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....เภสัชเวท..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา .....2552..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5076613733: MAJOR PHARMACOGNOSY

KEYWORDS: TOPOISOMERASE I / YEAST / CELL-BASED ASSAY / THAI MEDICINAL PLANTS / BIOASSAY-GUIEDED FRACTIONATION

PARINDA UPPATANPREECHA: TOPOISOMERASE I INHIBITORY ACTIVITY FROM THAI MEDICINAL PLANTS IN YEAST CELL-BASED ASSAY. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. SUCHADA SUKRONG, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. AREERAT LAORPAKSA, 103 pp.

Topoisomerase I is an important therapeutic target in cancer chemotherapy. We are interested in the continuing discovery of new topoisomerase I-targeted agents from Thai medicinal plants with previously reported as cytotoxicity by using Yeast cell-based assay. The transformant yeast containing *Arabidopsis thaliana topoisomerase I* gene was developed to achieve controllable expression of the topoisomerase I enzyme. From the screening of 27 Thai medicinal plants, 6 ethanolic plant-part extracts; root and leaf of *Rhinacanthus nasutus*, whole plant of *Grangea maderaspatana*, caudex of *Stephania suberosa*, rhizome of *Curcuma longa* and rhizome of *Curcuma zedoaria*, showed inhibitory activities of enzyme topoisomerase I. The extract of *G. maderaspatana* was selected for further study to determine the bioactive compounds since it has never been reported for its topoisomerase I inhibitory activity before.

Bioassay-guided fractionation from whole plant of *G. maderaspatana* by yeast cell–based assay led to the identification of two bioactive compounds. They are sesquiterpene lactone namely, (-)-frullanolide and (-)-7α-hydroxyfrullanolide. Their structures were determined by spectroscopic methods and compared with previous reports. These compounds exhibited topoisomerase I inhibitory activities by yeast cell-based assay. They also processed *in vitro* anti-cancer activities against human cell lines, KB oral cavity cancer, MCF7 breast cancer, and NC-H187 small lung cancer. This is the first report of cytotoxicity due to topoisomerase I inhibitory mechanism of two compounds from *G. maderaspatana*.

Department : Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany Student's Signature Parinda U.

Field of Study : Pharmacognosy Advisor's Signature Suchada Sukrong

Academic Year : 2009 Co-Advisor's Signature Areerat Laorpaksa

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her gratitude to her thesis advisor, Assistant Professor Dr. Suchada Sukrong of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her valuable advice, useful guidance, endless support, concern, patience and encouragement throughout the course of this study.

The author wishes to express her sincere thanks to Associate Professor Areerat Laorpaksa of the Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, her thesis co-advisor, for her helpful advice, constant help, encouragement and kindness.

The author wishes to express her sincere thanks to Assistant Professor Dr. Boochoo Sritularak of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his helpful advice, constant help in phytochemical part.

The author would like to thank the Thailand Research Fund (TRF) and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund) for granting partial financial support to conduct this investigation.

The author wishes to thank the Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for supplying instruments and laboratory facilities.

The author wishes to express her thanks to the members of thesis committee for their critical perusal and useful advice.

The author would also like to thank all staff members of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for supplying chemicals and facilities.

The author is grateful to all students of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for unforgettable friendship and kindness.

Finally, the author wishes to express her infinite gratitude to her family for their love, understanding and encouragements.

CONTENTS

Page

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

LIST OF SCHEMES

LIST OF ABBREVIATIONS

%	= percent (part per 100); percentage
µg	= microgram(s)
µl	= microliter(s)
µM	= micromolar
/	= per
λ_{max}	= wavelength at maxima absorption
ν_{max}	= wave number at maximum absorption
α	= alpha
β	= beta
ε	= molar absorptivity
$[\alpha]^{20}D$	= specific rotation at 20°C and sodium D line (589 nm)
ATCC	= American Type Culture Collection
br	= broad (for NMR spectra)
C	= concentration
°C	= degree Celsius
$CDCl_3$	= deuterated chloroform
CFU	= colony forming units
CH_2Cl_2	= dichloromethane
cm	= centimeter(s)
^{13}C-NMR	= carbon-13 nuclear magnetic resonance
CPT	= camptothecin
d	= doublet (for NMR spectra)
dd	= doublet of doublet (for NMR spectra)
ddd	= doublet of doublet of doublet (for NMR spectra)
DEPT	= distortionless enhancement by polarization transfer
δ	= chemical shift

DMSO	= dimethylsulfoxide
DNA	= deoxyribonucleic acid
EIMS	= electron impact mass spectrometry
et. al	= et alii
EtOAc	= ethyl acetate
g	= gram(s)
^{1}H-NMR	= proton nuclear magnetic resonance
hr	= hour(s)
Hz	= hertz
IC_{50}	= inhibitory concentration 50%
IR	= infrared
J	= coupling constant
kg	= kilogram(s)
L	= liter(s)
m	= meter(s)
M^+	= molecular ion
mg	= milligram
MHz	= mega hertz
MeOH	= methanol
min	= minute(s)
ml	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimolar
MS	= mass spectrum
MW	= molecular weight
m/z	= mass to charge ratio
O.D.	= optical density
pH	= the negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
ppm	= part per million

q = quartet (for NMR spectra)

R_f = retention factor

s = singlet (for NMR spectra)

S.C. ura$^-$ media = synthetic complete media lacking uracil

t = triplet (for NMR spectra)

TLC = thin layer chromatography

top1 = topoisomerase I

UV = ultraviolet light

v/v = volume/volume (concentration)

w/v = weight/volume (concentration)

w/w = weight/weight (concentration)

YPD media = Yeast Peptone Dextrose media