การเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำและสารสกัดแอลกอฮอล์จากหัวบอระเพ็ดพุงช้าง (*Stephania Venosa* (Bl.) Spreng) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว

นางสาวเมตตา เขียวแสวง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1643-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE COMPARATIVE EFFECTS BETWEEN THE WATER AND THE ETHANOL EXTRACTS FROM *STREPHANIA VENOSA* TUBER ON WHITE BLOOD CELLS

Miss Metta Kheiawsawang

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacology (Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1643-1

Thesis Title	The comparative effects between the water and the ethanol extracts from *Stephania venosa* tuber on white blood cells
By	Miss. Metta Kheiawsawang
Field of study	Pharmacology
Thesis Advisor	Assistant Professor Wacharee Limpanasitthikul, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Professor Tada Sueblinvong, M.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

..... Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Supatra Srichairat, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Wacharee Limpanasitthikul, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Professor Tada Sueblinvong, M.D.)

..... Member
(Assistant Professor Pathama Leewanich, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมตตา เขียวแสวง : การเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำและสารสกัดแอลกอฮอล์จากหัวบอระเพ็ดพุงช้าง (*Stephania Venosa* (Bl.) Spreng) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (THE COMPARATIVE EFFECTS BETWEEN THE WATER AND THE ETHANOL EXTRACTS FROM *STREPHANIA VENOSA* TUBER ON WHITE BLOOD CELLS) อ.ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. วัชรี ลิมปนสิทธิกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ศ. พญ. ธาดา สืบหลินวงศ์ 60 หน้า ISBN 974-53-1643-1

บอระเพ็ดพุงช้าง *(Strephania venosa* (Bl.) Spreng) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทย ซึ่งมีการนำหัวบนดินมาใช้ในการแพทย์แผนไทยสำหรับรักษาโรคต่าง ๆ หลายชนิดรวมทั้งมะเร็ง โดยนำมาต้มน้ำดื่มหรือดองเหล้า การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ การชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโตซิสของสารสกัดน้ำและสารสกัดแอลกอฮอล์ของหัวบอระเพ็ดพุงช้างต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat cells) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวใช้วิธี alamarBlue reduction และ trypan blue dye exclusion ผลการทดลองพบว่าบอระเพ็ดพุงช้างยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ โดยค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดน้ำและสารสกัดแอลกอฮอล์มีค่าเป็น 200 และ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากการใช้วิธี alamarBlue reduction ได้ทำการยืนยันผลการศึกษานี้ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion ต่อมาได้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยวิธี trypan blue dye exclusion พบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำและสารสกัดแอลกอฮอล์ มีค่าเท่ากับ 200 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดทั้งสองชนิดในการยับยั้งการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาวปกติที่ถูกกระตุ้นด้วยวิธี MTT พบว่า สารสกัดแอลกอฮอล์มีฤทธิ์แรงกว่าสารสกัดน้ำในการยับยั้งการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย phytohemagglutinin (PHA), pokeweed mitogen (PWM) และ Staphylococcus protein A (SPA) ในการศึกษาฤทธิ์ชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิส ที่ใช้โดยวิธี fluorescence activated cell sorting (FACS) โดยย้อมเซลล์ด้วยสี Annexin-V และ propidium iodide (PI) พบว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิดชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโตซิส ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดแอลกอฮอล์มีฤทธิ์แรงกว่าสารสกัดน้ำ อะพอพโตซิสเป็นรูปแบบการตายที่ถูกชักนำอย่างเด่นชัดในสารสกัดแอลกอฮอล์ ซึ่งการตายแบบนี้พบในสารสกัดน้ำที่ความเข้มข้นสูงเท่านั้น จากผลการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่าสารสกัดจากหัวบอระเพ็ดพุงช้างอาจออกฤทธิ์เป็นยาต้านมะเร็งโดยมีความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ และชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส ดูเหมือนว่าหัวบอระเพ็ดพุงช้างในรูปดองเหล้าจะมีความแรงกว่ารูปแบบที่ต้มน้ำดื่มเมื่อนำมาใช้ในการรักษามะเร็ง ดังนั้นจึงเป็นข้อควรระวังที่ควรตระหนักเมื่อนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้าน

สาขาวิชา เภสัชวิทยา (สหสาขา) ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4589129720: MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORDS: *STEPHANIA VENOSA* (Bl.) SPRENG / CYTOTOXIC / ATNIPROLIFERATIVE / APOPTOSIS / PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

METTA KKEIAWSAWANG: THE COMPARATIVE EFFECTS BETWEEN THE WATER AND THE ETHANOL EXTRACTS FROM *STREPHANIA VENOSA* TUBER ON WHITE BLOOD CELLS. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. WACHAREE LIMPANASITTHIKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR: PROF. TADA SUEBLINVONG, M.D. 60 pp. ISBN 974-53-1643-1

Strephania venosa (Bl.) Spreng (*S.venosa*), a Thai folk medicinal plant, has been used as a Thai traditional medicine in various diseases including cancer, by boiling in water or soaking in alcohol. This study aimed to compare cytotoxic, antiproliferarive and apoptotic effects of the water and the ethanol extracts of *S.venosa* tuber on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and T-cell leukemia (Jurkat cells). Cytotoxicity test was determined using alamarBlue reduction and trypan blue dye exclusion methods. Both extracts significantly exhibited cytotoxic effects on PBMCs in a concentration-dependent manner. The concentration at 50% inhibition (IC_{50}) of the water and the ethanol extracts were 200 and 40 μg/ml, respectively, as determined by alamarBlue reduction assay. This result was further confirmed by trypan blue dye exclusion assay. Further study, cytotoxicity effect of *S.venosa* tuber extracts on Jurkat cells was determined by trypan blue dye exclusion assay. The IC_{50} of the water and ethanol extracts were 200 and 100 μg/ml, respectively. The antiproliferative effect on mitogen-stimulated PBMCs were also compared between both extracts using MTT assay. The ethanol extract was more potent than the water extract in inhibiting phytohemagglutinin (PHA), pokeweed mitogen (PWM), and Staphylococcus protein A (SPA) stimulated PBMCs proliferation. Then, the extract-induced apoptosis was investigated by fluorescence activated cell sorting (FACS) using annexin V and propidium iodide staining. Both extracts significantly induced apoptotic cell death in PBMCs. The ethanol extract had higher potency than the water extract. Apoptosis was the predominant pattern of cell death induced by the ethanol extract. This pattern was only observed at a high concentration of the water extract These results suggested that *S. venosa* tuber extracts may possess anticancer action through its cytotoxicity, antiproliferation, and apoptotic induction. The ethanol extract had higher potency than the water extract in all effects. Furthermore, the ethanolic soaking solution of *S. venosa* appears to be more potent than the boiling water preperation when it was used in antitumor remedy. So, the caution should be addressed when it prescribed in traditional medicine.

Field of study Pharmacology (Inter-department)

Academic year 2004

Student's signature..... Metta Khaiawsawang

Advisor's signature..... Wacharee Limpanasitthikul

Co-advisor's signature..... Tada Sueblinvong

ACKNOWLIDGEMENTS

For the success of this thesis, I would like to give my sincere thanks to many persons involving my study. First of all, I would like to express my deepest gratitude and appreciation to my advisor Asst.Prof. Dr. Wacharee Limpanasitthikul, Department of Pharmacology, and my co-advisor Prof Dr. Tada Sueblinvong, Department of Biochemistry for valuable advices, attention and encouragement throughout this study.

I am also very grateful to Asst Prof Dr. Pathama Leewanich, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for kindly provided the water and the ethanol extracts of *S.venosa* compound and her precious recommendation. I would like to thank the members of my thesis committee Asst. Prof. Dr. Poonlarp Cheepsunthorn, Department of Anatomy and Assoc. Prof. Dr. Supatra Srichairat, Faculty of Veterinary Science for the valuable advice and contributions.

I would like to express my appreciation to Assoc. Prof. Dr. Supaluk Prachayasittikul, Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University for kindly identified NMR and IR spectra. I also would like to give my special thank for Asst. Prof.Dr. Chintana Chirathaworn, Department of microbiology for FACS analysis technique.

I also would like to thank Mrs. Nongnuch Thaworn, Miss. Tipsuda Plumchai, Miss. Aunchalee Tonsomboon, and Mr. Atinop Pongpanichfor for considerate guidance and instructions on the laboratory techniques.

I would like to express my sincere thanks to The National Blood Bank, Thai Red Cross Society for their helps and allowing me to use their facilities.

I would like to thank all members in inter-Department of Pharmacology, Faculty of Graduate School, Chulalongkorn University for their helps and friendly relationships.

This study was supported by the Ministry of University Affairs, the Chulalongkorn University Graduate School Thesis Grant and Government budget (2002).

Finally, I would like to give all my heart to my family, my lovely mother and father, for their endless love, understanding and encouragement throughout my life. Both of them are always in support of me.

TABLE OF CONTENTS

Page

Abstract (Thai) iv

Abstract (English) v

Acknowledgements vi

Table of Contents vii

List of Tables x

List of Figures xi

List of Abbreviations xii

Chapter

1 Introduction 1

Background and Rationale 1

Objectives 2

Key words 2

2 Literatures Review 3

Causes of cancer 3

Chemotherapy 4

Problem of cancer therapeutic 7

Stephania venosa (Bl.) Spreng 8

Methods for anticancer evaluation 11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Chapter Page

Cell viability assessment methods....11

Cell proliferation assessment methods....12

Apoptosis assessment methods....14

Conceptual framework....16

3 Materials and Methods....17

Materials....17

Stephania venosa (Bl.) Spreng....17

Samples....17

Equipments and Laboratory supplies....18

Reagents....19

Methods....20

The PBMCs preparation....20

Cytotoxicity assay....21

Trypan blue dye exclusion test....21

AlamarBlue reduction assay....22

Proliferation assay by MTT reduction colorimetric assay....23

Apoptotic assay by annexin V straining assay....24

Statistical analysis....25

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Chapter Page

4. Results 26

5. Discussion and Conclusion 41

References 44

Appendices 53

Appendix A 54

Appendix B 57

Appendix C 59

Biography 60

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

1. Apoptotic effects of the water extract of *S.venosa* tuber on PBMCs. The percentages of cell death were determined by FACS analysis.....37
2. Apoptotic effect of the ethanol extract of *S.venosa* tuber on PBMCs. The percentage of cell death were determined by FACS analysis.....37
3. The percentages of each cell death pattern induced by the water extract of *S.venosa* tuber on PBMCs.....38
4. The percentages of each cell death pattern induced by the ethanol extract of *S.venosa* tuber on PBMCs.....38
5. Cytotoxic effect of the DMSO at various concentrations by alamarBlue reduction assay on PBMCs.....59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. *Stephania venosa* (Bl.) Spreng tuber 9
2. Loss of membrane asymmetry is a very early even in apoptosis.....18
3. The cytotoxicity effect of the water and the ethanol extracts of *S.venosa* tuber at various concentration by alarmar blue reduction method on PBMCs 28
4. The cytotoxicity effect of the water and the ethanol extracts of *S.venosa* tuber at various concentration by trypan blue dye exclusion methods on PBMCs.....29
5. The cytotoxicity effect of the water and the ethanol extracts of *S.venosa* tuber at various concentration by trypan blue dye exclusion methods on Jurkat cell lines.....30
6. The antiproliferative effect of the water and the ethanol of *S.venosa* on PBMCs after being stimulated with PHA and treated with various concentration of the extracts by MTT reduction colorimetric method.....33
7. The antiproliferative effect of the water and the ethanol of *S.venosa* on PBMCs after being stimulated with SPA and treated with various concentration of the extracts by MTT reduction colorimetric method.....34
8. The antiproliferative effect of the water and the ethanol of S.venosa on PBMCs after being stimulated with PWM and treated with various concentration of the extracts by MTT reduction colorimetric method.....35
9. Contour diagram of Annexin V-FITC/PI flow cytomety of PBMCs.....37
10. The apoptotic effect of the water extract of S.venosa on PBMCs after treated with various concentrations by FACS analysis.....39
11. Apoptotic effect of the ethanol extract of *S.venosa* on PBMCs after treated with various concentrations by FACS analysis.....40
12. ^{1}H NMR of the water extract of *S.venosa* 55
13. IR of the water extract of *S.venosa* 55
14. ^{1}H NMR of the ethanol extract of *S.venosa*..... 56
15. IR of the ethanol extract of *S.venosa* 56

LIST OF ABBREVIATIONS

AchE	Acetylcholinesterase
bp	Base pair
BrdU	Bromodeoxyuridine
^{o}C	Degree Celsius
CFDA	Carboxyfluorescein diacetate
c.p.m.	Count per minute
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethyl sulfloxide
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescence isothiocyanate-conjugated
HBSS	Hanks' balanced salts solution
IC_{50}	50% inhibit concentration
IR	Infrared spectra
LDH	Lactate dehydrogenase
µg	Microgram
mg	Milligam
ml	Millilitre
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyp)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimethylethiazol-2-yl) 2, 5 diphenylttrazolium bromide
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer saline
pH	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
PHA	Phytohemagglutinin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PI	Propidium iodine
PWM	Pokeweed mitogen
r.p.m.	Revolution per minute
RNA	Ribonucleic acid
SPA	Staphylococcal protein A
TdT	TdT – mediated dUTP nick end labeling
TNF	Tumor necrosis factor
TUNEL	TdT – mediated dUTP nick end labeling
XTT	Sodium 3'-(1-phenylamino)-carbonyl]-3,4 tetrazolium-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย