Thesis Title Pharmacological Characterization of *Coscinium fenestratum*, *Tinospora crispa* and *Tinospora cordifolia*

Author Miss Rudeewan Tungpradit

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul	Advisor
Prof. Dr. Shui-Tein Chen	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Weerah Wongkham	Co-advisor
Dr. Supachok Sinchaikul	Co-advisor

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the pharmacological characterization of active compounds from *Coscinium fenestratum, Tinospora crispa* and *Tinospora cordifolia* for anti-cancer, hypoglycemia and immunostimulation. Firstly, the effect of water and methanol extracts from the stem of these herbs on cancer cell viability were investigated by MTT or WST method. Both extracts from *C. fenestratum* exhibited IC_{50} lower than 500 µg/ml, but IC_{50} of the extracts from *T. crispa* and *T. cordifolia* were higher than 500 µg/ml. The methanol extract of *C. fenestratum* exhibited the most cytotoxic activity. This extract was fractionated by C-18 column chromatography and purified by reverse phase HPLC. Finally, the active compound

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

was identified as berberine by NMR. This isolation method was very simple and offer high yield of berberine (3.68% w/w).

The cytotoxic effect of berberine was evaluated against ten cancer cell lines (HL-60, NCI-H838, NPC-TW01, NCI-H1876, NCI-H661, MES-SA, SW900, MKN-45, HCT-116 and A498) and two normal cells (PMBC and HUV-EC-C). Berberine exhibited effective cytotoxic activity to cancer cell lines especially in HL-60 and NCI-H838 cell lines. But it exhibited low cytotoxic activity to the normal cell. The selective index value indicated that berberine was more toxic to cancer than normal cells. The amount of berberine uptake by cancer cell correlated with cytotoxic activity. Berberine could induce apoptosis in both HL-60 and NCI-H838 cells when investigated by DAPI or Annexin V-FITC staining. The effect of berberine on apoptotic proteins and cell cycle arrest was further studied using NCI-H838 cell. In berberine treated cell, the cell was arrested in G2/M phase when detected by flow cytometry. From western blotting, procaspase 3, 6, 7, 8 and Bcl-2 protein expressions were decreased. The target organelle of berberine was investigated by fluorescence microscopy but the specific target was not found. Because berberine in organelles around nuclei, nuclei and cytoplasm were observed. The structure of berberine was modified to enhance cytotoxic activity and structure activity relationship (SAR) was studied. Berberine, jatrorrhizine, palmatine and canadine were compared for cytotoxic activity and evaluated SAR. Just only berberine exhibited the most effective activity. This finding indicated that N^+ and Ring A had effect to the activity. Then, benzyl substituted berberines (compounds **3**-**7**) were synthesized by introduction of a benzyl group at the 9-O and 13-C position. The 9-O benzyl substituted derivative exhibited higher cytotoxicity than 13-C benzyl substituted

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

derivative. A series of 9-O-alkyl substituted berberine derivatives (compounds **8**-**17**) were also synthesized. All of the derivatives showed cytotoxic activity higher than berberine and also could induce apoptosis in HL-60. With respect to halide ions, the cytotoxicities of the bromide and chloride berberine derivatives were nearly the same. This indicated that the type of alkaline salt (Br^- or Cl^-) had no effect on cytotoxicity *in vitro*. Interestingly, the lipophilicity of the compound in both benzyl and alkyl substituted berberines was correlated with the cytotoxicity and apoptotic effects. The alkyl derivatives uptakes by HL-60 and NCI-H838 cells were determined by fluorescence microscopy, spectrophotometry, flow cytometry and HPLC. The alkyl derivatives were taken up by the cells higher than berberine and they did not bind to cell membrane but it was actually transferred into the cell. The uptake ability was positively correlated with cytotoxic activity. Thus, these berberine derivatives are potential candidates for anticancer drugs.

Additionally, *C. fenestratum* also showed glucose lowering ability via berberine by increasing glucose consumption in both normal and cancer cells. The immuno stimulating properties from the water extract of *C. fenestratum, T. crispa* and *T. cordifolia* were evaluated. All of the water extracts could induce CD69 in PBMC and the extract from *C. fenestratum* demonstrated the most effective activity. Crude polysaccharide was separated from this extract and determined as the active immuno stimulating compound. These results post the need for further identification of the active components. These finding would support and promote many ongoing clinical trails of *C. fenestratum*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของแห้ม บอระเพ็ด และชิงช้าชาลี

ผู้เขียน นางสาวฤดีวรรณ ตั้งประดิษฐ์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. สุรีย์ ฟูตระกูล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ. ดร. สุ่ย เทียน เฉิน	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. วีระ วงศ์คำ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. ศุภโชค สินไชยกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของแห้ม บอระเพ็ด และชิงช้าชาลี ต่อมะเร็ง เบาหวาน และการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ขั้นแรกได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากลำต้นด้วยน้ำและเมธานอล โดยวิธี MTT หรือ WST พบว่าค่า IC_{50} ของทั้งสารสกัดแห้มด้วยน้ำและเมธานอลมีค่าต่ำกว่า 500 ไมโครกรัม/มล. ส่วนค่า IC_{50} ของสารสกัดบอระเพ็ดและชิงช้าชาลีด้วยน้ำและเมธานอลมีค่าสูงกว่า 500 ไมโครกรัม/มล. สารสกัดแห้มด้วยเมธานอลสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด เมื่อนำสารสกัดนี้มาแยกส่วนโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พบว่าสารหลักที่ออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งคือ berberine วิธีนี้สามารถแยก berberine จากต้นแห้มได้ร้อยละ 3.68 (โดยน้ำหนัก)

เมื่อทดสอบความเป็นพิษของ berberine ต่อเซลล์มะเร็ง 10 ชนิด (HL-60, NCI-H838, NPC-TW01, NCI-H1876, NCI-H661, MES-SA, SW900, MKN-45, HCT-116 และ A498) และ เซลล์ปกติ 2 ชนิด (PMBC และ HUV-EC-C) พบว่า berberine ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะเซลล์ HL-60 และ NCI-H838 แต่มีผลเพียงเล็กน้อยต่อเซลล์ปกติ จากค่า SI พบว่า berberine เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์ HL-60 และ NCI-H838 เมื่อตรวจสอบโดยการย้อมด้วย DAPI หรือ Annexin V-FITC ได้ทำการตรวจสอบการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์ NCI-H838โดย flow cytometry พบว่า berberine สามารถหยุด cell cycle ให้อยู่ที่ระยะ G2/M phase นอกจากนี้ berberine ยังสามารถลดปริมาณของโปรตีน procaspase 3, 6, 7, 8 และ Bcl-2 เมื่อตรวจสอบโดย western blotting ได้ทำการศึกษาหา organelle ที่เป็นเป้าหมายของ berberine โดยกล้องฟลูออเรสเซนต์ แต่ไม่สามารถบ่งชี้ได้ เนื่องจากพบ berberine ทั้งใน organelle รอบๆนิวเคลียส นิวเคลียส และไซโตพลาสซึม จากนั้นได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและความเป็นพิษต่อเซลล์ใน berberine, jatrorrhizine, palmatine และ canadine พบว่า berberine มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด ดังนั้นโครงสร้าง N^+ และ Ring A มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ หลังจากนั้นได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ berberineโดยการเติมหมู่เบนซีนเข้าไปในตำแหน่งที่ 9-O และ 13-C (อนุพันธ์ **3-7**) พบว่าอนุพันธ์เบนซีนในตำแหน่งที่ 9-O มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าอนุพันธ์เบนซีนในตำแหน่งที่ 13-C และได้ทำการสังเคราะห์ชุดอนุพันธ์ของ berberineโดยการเติม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมู่อัลคีนเข้าไปในตำแหน่งที่ 9-O (อนุพันธ์ **8-17**) อนุพันธ์ทั้งหมดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่า berberine และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์ HL-60 อนุพันธ์ ของ berberine ในรูปเกลือ คลอไรด์และโบรไมด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ใกล้เคียงกัน แสดงว่าชนิดของเกลือ (Br^- or Cl^-) ไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ในหลอดทดลอง ระดับ lipophilicity ของอนุพันธ์มีความสัมพันธ์กับความเป็นพิษต่อเซลล์และการตายแบบอะพอพโตซิส และเมื่อทำการหาปริมาณอนุพันธ์ที่เซลล์ได้รับโดย fluorescence, microscopy, spectrophotometry, flow cytometry และ HPLC พบว่าอนุพันธ์สามารถเข้าไปในเซลล์ได้มากกว่า berberine ความสามารถในการผ่านเข้าเซลล์แปรผันตามความเป็นพิษต่อเซลล์และการตายแบบอะพอพโตซิส ดังนั้นอนุพันธ์ของ berberine ที่สังเคราะห์นี้มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเพื่อเป็นยาต้านมะเร็งต่อไป

นอกจากนี้แห้มยังสามารถลดปริมาณน้ำตาลในเลือดได้โดย berberine ที่อยู่ในแห้ม สามารถเพิ่มความสามารถในการใช้น้ำตาลของทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ เมื่อทำการประเมินความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสารสกัดจากแห้ม บอระเพ็ด และชิงช้าชาลีด้วยน้ำ พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรทั้งหมดสามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาว PBMC สร้าง CD69 และสารสกัดจากแห้มสามารถกระตุ้นได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงได้นำสารสกัดจากแห้มมาแยกโพลีแซคคาไรด์ พบว่าโพลีแซคคาไรด์ที่ได้นี้เป็นสารหลักที่ออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน แต่ยังต้องทำการแยกสารโพลีแซคคาไรด์นี้ให้บริสุทธิ์และบ่งชี้ชนิดและโครงสร้างของสารออกฤทธิ์นี้ต่อไปในอนาคต ผลการศึกษาทั้งหมดในครั้งนี้น่าจะเป็นข้อมูลสำคัญที่จะสนับสนุนให้นำแห้มไปใช้ในการศึกษาวิจัยทางคลินิกต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved