

<b>Thesis Title</b>	Anticancer Activities of Alkaloids Isolated from <i>Stephania venosa</i> (Bl.) Spreng	
<b>Author</b>	Miss Pattama Wongsirisin	
<b>Degree</b>	Master of Science (Biochemistry)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Dr. Supachai Yodkeeree	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Dejkriengkraikul	Co-advisor

### ABSTRACT

Current strategy for the evaluation of anticancer phytochemicals is based in part on cancer progression including regulation of cell cycle, apoptosis regulation and metastasis. *Stephania venosa* is a medicinal plant has been used as a Thai folk remedies and known to be a rich source of alkaloids. In this study, I focused the effects of four alkaloids isolated from the tuber of *Stephania venosa* including tetrahydropalmatine, crebanine, *O*-methylbulbocapnine and *N*-methyltetrahydropalmatine on ant-cancer activity in human cancer cells. The alkaloids were investigated *in vitro* for their potential cytotoxic activity on HL-60, K562, and U937 human leukemic cell lines using the MTT assay. Among four alkaloids, crebanine had shown the most active to inhibit the proliferation of human leukemic cells HL-60, U937 and K562 by which HL-60 cells were the most sensitive to its treatment. Moreover, our results demonstrated that crebanine mediated cell cycle arrest at G0/G1 phase and this was associated with down-regulation of cyclin A, D and PCNA. In addition, crebanine induced apoptosis, which was detected by observation of the membrane phospholipid exposure in flow cytometry. Its induction of apoptosis was accompanied by an increase in cleavage of caspase-3, 8, 9 and poly

(ADP-ribose) polymerase (PARP). Moreover, the augmentation of Bax/Bcl-2, Bcl-x1 proteins levels were observed. Crebanine also decreased mitochondrial membrane potential. Taken together, crebanine exerts anti-proliferative effects on human cancer cells through the induction of cell cycle arrest at the G1 phases and apoptosis. In addition, the alkaloids from *Stephania venosa* have not been investigated whether they exhibit antimetastatic activity. Therefore, the effect of the alkaloids on chemoinvasion of HT1080 was investigated. Moreover the expression and the activity of ECM degradation enzymes (MMP-2, MMP-9, uPA, MT1-MMP) were determined. The results from Boyden chamber assay indicated that crebanine and *O*-methylbulbocapnine significantly inhibited HT1080 cells invasion, whereas the cell migration was not affected. Zymography analysis exhibited that crebanine and *O*-methylbulbocapnine significantly decrease uPA, MMP-2, and MMP-9 secretion from HT1080 cells in a dose-dependent manner, and they also reduce the expression level of MT1-MMP in HT1080 cells. However, four alkaloids had no effects on the activity of MMP-2, MMP-9 and collagenase. Taken together, these data demonstrated that crebanine could significantly inhibit cell cycle progression and cause cell death via apoptosis. Moreover, crebanine and *O*-methylbulbocapnine exerts antimetastasis potency by down-regulation of ECM degradation enzymes. The results suggest that crebanine and *O*-methylbulbocapnine is a promising new candidate as a chemotherapeutic agent for cancer therapy.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ต้านมะเร็งของอัลคาลอยด์ที่สกัดจากกระท่อมเลือด	
ผู้เขียน	นางสาวปัทมา วงศ์ศิริศิลป์	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์		
	อาจารย์ ดร.ศุภชัย ยอดคีรี	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รองศาสตราจารย์ ดร.พรงาม เดชเกรียงไกรกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

#### บทคัดย่อ

ในปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารพฤกษเคมี (phytochemical) ที่แสดงผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง กระท่อมเลือดหรือบอระเพ็ดพู่ช้าง (*Stephania venosa*) เป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยโดยส่วนหัวของสมุนไพรถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรหลายชนิดซึ่งสารสำคัญที่พบได้ในพืชชนิดนี้คือสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารอัลคาลอยด์สี่ชนิดที่สกัดได้จากหัวของต้นกระท่อมเลือด ได้แก่ เตตระไฮโดรปาลมาทีน, ครีบาเนียน, โอ - เมทิลบัล โบแคปนีน และ เอ็น - เมทิลเตตระไฮโดรปาลมาทีน โดยทำการทดสอบฤทธิ์ของอัลคาลอยด์ทั้งสี่ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60, K562, และ U937 ด้วยวิธี MTT assay พบว่า ครีบาเนียนสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60, U937 และ K562 ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารอัลคาลอยด์อีกสามชนิดและเซลล์ HL-60 มีการตอบสนองดีที่สุด นอกจากนั้นครีบาเนียนยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวให้อยู่ในระยะ G0/G1 โดยมีกลไกในการลดการแสดงออกของโปรตีน cyclin A, cyclin D และ PCNA และเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของครีบาเนียนต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส โดยวิธี flow cytometry พบว่าครีบาเนียนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสซึ่งสัมพันธ์กับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนที่สนับสนุนการตายของเซลล์

แบบอะพอพโทสิสได้แก่ caspase-3, 8, 9 และ poly (ADP-ribose) polymerase และทำให้สมดุลของโปรตีน Bax และ Bcl-2, Bcl-x1 เสียไป รวมทั้งยังสามารถลดความต่างศักย์ของผนังไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ในการเกิดการตายแบบอะพอพโทสิสจากปัจจัยภายใน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของอัลคาลอยด์ทั้งสี่ชนิดต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งชนิด HT1080 และศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ MMP-2, MMP-9, MT1-MMP และ uPA โดยผลการศึกษาพบว่า ครีบาโนนและ โอ - เมทิลบิลโบแคปนินสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ HT1080 ได้แต่ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง ในขณะที่อัลคาลอยด์อีกสองชนิดไม่มีผลยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เมื่อศึกษาการหลั่งของเอนไซม์ uPA, MMP-2 และ MMP-9 ออกจากเซลล์ HT1080 โดยวิธี zymography พบว่า ครีบาโนนและ โอ - เมทิลบิลโบแคปนินสามารถยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ uPA, MMP-2 และ MMP-9 จากนั้นยังพบว่า ครีบาโนนและ โอ-เมทิลบิลโบแคปนินยังสามารถลดการแสดงออกของ MT1-MMP ในเซลล์มะเร็งชนิด HT1080 แต่อย่างไรก็ตามอัลคาลอยด์ทั้งสี่ชนิดไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ MMP-2, MMP-9 และ collagenase ทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ครีบาโนนสามารถยับยั้งการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทสิส นอกจากนี้ ทั้งครีบาโนนและ โอ-เมทิลบิลโบแคปนินยังแสดงฤทธิ์ในการต้านการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผ่านการลดระดับของเอนไซม์ที่ใช้ในการสลายส่วนประกอบนอกเซลล์ ดังนั้นในการค้นพบครั้งนี้จึงเป็นอีกหนึ่งข้อมูลที่จะนำเอา ครีบาโนนและ โอ - เมทิลบิลโบแคปนินไปใช้ศึกษาวิจัยทางคลินิกต่อ เพื่อเป้าหมายในการนำเอาสารสกัดจากธรรมชาติไปใช้ในการรักษายับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง