รหัสโครงการ PHA580237S

เรื่อง สารไซคลิกไดเทอร์ปีนที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบและฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์จากเปล้าน้อย

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกสารกลุ่มไซคลิกไดเทอร์ปีน จากใบและลำต้นของเปล้าน้อย และประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบและฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์จากเปล้าน้อยโดยใช้วิธีการตรวจจากเซลล์

สารที่แยกได้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีจากใบและต้นเปล้าน้อย รวม 9 ชนิด ได้แก่ อะไซคลิกไดเทอร์ปีน (เปลาโนทอล), ฟูราโนไดเทอร์ปีน 3 ชนิด (เปลานอล เอ, เปลานอล อี และเปลานอล เอฟ), ฟลาโวนอย์ 3 ชนิด (ไวเทกซิน, ลูทีโอลิน-7-เบต้า-ดี-กลูโคลไซด์, ลูทีโอลิน-4′-เบต้า-กลูโคไพราโนไซด์, ไฟโตสเตอรอล (สารผสมระหว่าง เบต้า-ซิโตสเตอรอลและสติกมาสเตอรอล) และ เบต้า-ซิโตสเตอรอล-3-เบต้า-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ ตรวจลักษณะโครงสร้างทางเคมีด้วย UV, IR, MS and ^{1}H-, ^{13}C-NMR สเปคโตรสโคปี ในการศึกษานี้เฉพาะสารไดเทอร์ปีนเท่านั้นที่จะนำมาประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบและฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ สำหรับการตรวจฤทธิ์ต้านอักเสบ ได้เลือกเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 มาศึกษาคุณสมบัติต้านอักเสบ โดยประเมินจากคุณสมบัติการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ เปลาโนทอล เปลานอล อี และเปลานอล เอฟ มีคุณสมบัติต้านอักเสบภายใต้โมเดล RAW264.7 และมีกลไกยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ อินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (*iNOS*) ไซโคลออกซิจีเนส-1 (*COX-1*) และไซโคลออกซิจีเนส-2 (*COX-2*) ส่วนการศึกษานี้ สารเปลานอล เอ มีฤทธิ์ต้านอักเสบโดยยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ ด้วยค่าการยับยั้งที่ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ IC_{50} ที่ 11.69 ไมโครโมลาร์ และที่เปลานอล เอ ที่ 30 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน *iNOS* และ *COX-2* คิดเป็น 77 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ยามาตรฐานอินโดเมทาซิน ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ยับยั้งการแสดงออกของยีน 37 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เปลานอล เอ มีคุณสมบัติต้านอักเสบเช่นเดียวกับ เปลานอล อี และ เปลานอล เอฟ

เมื่อนำสารเปลาโนทอล, เปลานอล เอ, เปลานอล อี, เปลานอล เอฟ มาทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ ต่อเซลล์มะเร็งจากมนุษย์ ชนิดเซลล์ HeLa, HT-29, MCF-7 และ KB ผลการทดลองพบว่า เปลานอล เอฟ ไม่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ (ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) ในทุกชนิดของเซลล์ ส่วนสาร เปลาโนทอล, เปลานอล เอ และ เปลานอล อี มีคุณสมบัติยับยั้งการแบ่งเซลล์ทุกชนิดที่ทดสอบ ด้วยค่าการยับยั้งอยู่ในระดับปานกลาง เมื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารดังกล่าวโดยประเมินผลยับยั้งต่อวงจรการเจริญเติบโตของเซลล์ และการตายของเซลล์ พบว่าสารเปลาโนทอลมีกลไกสำคัญผ่านวงจรการตายของเซลล์ ชนิดผ่านวิถี death receptor และ mitochondrial dependent โดยกระตุ้นการแสดงออกของยีน *TNF-*α*, Bcl-2*, *Bax* และ *Bak* และเมื่อทดสอบสาร เปลานอล เอ และเปลานอล อี ก็พบว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ผ่านวงจร และวิถีเช่นเดียวกับสารเปลาโนทอล และเมื่อวิเคราะห์กลไกการออกฤทธิ์ของสาร เปลานอล อี ต่อเอนไซม์คาสเปส-3, -8 และ -9 ด้วยวิธีการวัดสีที่เกิดขึ้นภายหลังจากการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่า เปลานอล อี กระตุ้นการทำงานของ คาสเปส ทั้งสามชนิด ณ ความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 50 ไมโครโมลาร์ และ 100 ไมโครโมลาร์

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าสารเปลาโนทอล เปลานอล เอ เปลานอล อี และเปลานอล เอฟ มีฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 โดยยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องได้แก่ *iNOS*, *COX-1* และ *COX-2* ส่วนฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ หรือฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ ในเซลล์ที่ทดสอบ คือ เซลล์มะเร็งทั้งสี่ชนิด พบว่า เปลาโนทอล เปลานอล เอ และเปลานอล เอฟ มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ผ่านวงจรการเจริญเติบโตของเซลล์ และวงจรการตายของเซลล์ ผ่านวิถี death receptor และ mitochondrial dependent

Project i.d. PHA580237S

Anti-inflammatory and cytotoxic cyclic diterpenes from *Croton stellatopilosus* Ohba

ABSTRACT

The present study, we aim to isolate the cyclic diterpenes from leaves and stems of plaunoi or *Croton stellatopilosus* Ohba [Euphorbiaceae] and evaluated for anti-inflammatory and cytotoxicities of those compounds using the cell-based assays.

Nine compounds including acyclic diterpene (plaunotol), three furanoditerpene (plaunol A, plaunol E and plaunol F), three flavonoids (vitexin, luteolin-7-O-β-D-glucoside, luteolin-4′-O-β-glucopyranoside), phytosterols (mixture of β-sitosterol and stigmasterol) and β-sitosterol-3-O-β-D-glucopyranoside are isolated from leaves and stems of plaunoi. Their chemical structures were fully elucidated by means of UV, IR, MS and ^{1}H-, ^{13}C-NMR spectroscopy. Only diterpenes were further evaluated for anti-inflammatory and cytotoxic activities. Using RAW264.7 cells macrophage model, the anti-inflammatory activity was estimated from the inhibition of nitric oxide production. Previously, we reported the anti-inflammatory activity of plaunotol, plaunol E and plaunol F and had mechanism on inducible nitric oxide synthase (*iNOS*), cyclooxygenase 1 (*COX-1*), cyclooxygenase 2 (*COX-2*). In this study, plaunol A was shown to exhibit the anti-inflammation by inhibition of nitric oxide production with an IC_{50} of 11.69 μM. Plaunol A at 30 μM inhibited the expressions of *iNOS* and *COX-2* with % inhibition of 77% and 85%, respectively while indomethacin at 30 μM inhibited with 37% and 65%, respectively. This confirmed that plaunol A also has anti-inflammatory activity like plaunol E and plaunol F. Evaluation of cytotoxicity of plaunotol, plaunol A, plaunol E and plaunol F on HeLa, HT-29, MCF-7 and KB cells revealed that plaunol F has no cytotoxic activity in all types of cancer cells. However, plaunotol, plaunol A and plaunol E have anti-proliferative activity with moderate cytotoxic effect. Analyses the effects of those cyclic diterpenes on cell cycles and apoptosis, the results suggested that they possess the effects on cycles and apoptotic event with different manner. Plaunotol played an important role of apoptosis on death receptor and mitochondrial dependent pathways by stimulations of *TNF-α*, *Bcl-2*, *Bax* and *Bak* mRNA levels as same as plaunol A and plaunol E. Evaluation of plaunol E on caspase activity using colorimetry assay, the result showed that plaunol E stimulated caspase-3, -8 and -9 at 50 μM and 100 μM. This evidence confirmed that plaunotol, plaunol A and plaunol E have anti-proliferative effects and apoptsis via death receptor/NF-κB signaling and mitochondrial dependent pathway on four types of cancer cell lines.

ACKNOWLEDGEMENT

This research work was supported by the Annual Government Statement of Expenditure, Prince of Songkla University (PSU) (grant No. PHA580237S; FY2015-2016). This grant supported the research expenses for the Ph.D. student (Mr. Charoenwong Premprasert). All facilities were kindly provided from the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences and the Scientific Equipment Center, Prince of Songkla University.

Juraithip Wungsintaweekul

February 2017

CONTENT

	page
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
Acknowledgement	iii
Content	iv
List of tables	vii
List of figures	viii
CHAPTER 1 INTRODUCTION	
1. Botanical aspect	1
2. Traditional indications	2
3. Phytochemistry	2
4. Purification of plaunotol	4
5. Plaunotol containing in some *Croton* species	7
6. Pharmacological activities	8
7. Safety evaluation in animals	11
8. Clinical studies	12
Objectives of the study	12
CHAPTER 2 Phytochemical isolation from *C. stellatopilosus* leaves and stems	
2.1 Plant materials	14
2.2 Extractions, isolations and purification of *C. stellatopilosus*	14
2.3 Elucidation of the structures	17
References	26
CHAPTER 3 Inhibitory activity of nitric oxide production of plaunol A	
Abstract	29
Introduction	29
Experimentals	30
Plant material	30
General	30
Extraction and isolation	30
Evaluation of anti-inflammatory activity in murine macrophage RAW264.7 cells	
1. Murine macrophage RAW264.7 cells	31
2. Treatment of RAW264.7 cells	31
3. Nitrite determination	32
4. MTT assay for cell viability	33
5. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)	33

5.1 Primers 33
5.2 Treatment of RAW264.7 cells 33
5.3 Isolation of total RNA 34
5.4 qRT-PCR 34
6. Statistical analysis 35
Results and discussion 35
References 39
CHAPTER 4 Plaunotol inhibit cell growth and induces apoptosis
Abstract 40
Introduction 40
Materials and mthods 42
1. Isolation of plaunotol 42
2. Chemicals 42
3. Cell lines 42
4. Cell viability assay (MTT assay) 42
5. Annexin V and 7-AAD double staining (apoptosis detection) 43
6. Cell cycle analysis by flow cytometry 43
7. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 43
7.1 Primers used in this study 43
7.2 Treatments the cancer cell lines with plaunotol 44
7.3 Isolation of total RNA 44
7.4 qRT-PCR 44
8. Statistic analysis 45
Results 45
1. Antiproliferaive activity 45
2. Effect of plaunotol on cell division 46
3. Effect of plaunotol on apoptosis in cancer cells 48
4. Plaunotol caused apoptosis in both extrinsic and intrinsic pathways 50
References 51
CHAPTER 5 Antiproliferative activity of cyclic diterpenes from *Croton stellatopilosus*
Abstract 53
Introduction 53
Materials and methods 55
Cell lines and reagents 55
Isolation of cyclic diterpenes from *C. stellatopilosus* 55
Cell culture and treatment 56

Cell viability assay 56
Flow cytometry analysis 56
Cell cycle analysis 56
Apoptosis assay 56
Transcription profile of apoptotic regulators using qRT-PCR 57
Primer designs 57
Cell treatments and RNA extraction 58
qRT-PCR 58
Determinations of caspase-3, -8 and -9 activities 58
Apoptosis induction 58
Protein extraction 59
Determination of total protein 59
Caspase assays 59
Statistical analysis 59
Results and discussion 60
Cytotoxic activity 60
Effect on cell cycle progression 60
Effect on apoptotic pathway 63
Involvement of apoptotic-associated genes 67
Effect of plaunol E on caspase-3, -8 and -9 activitties 69
Discussion 69
References 73

LIST OF TABLE

page

CHAPTER 1

Table 1.1 Characteristic of collected *Croton* spp. 2

Table 1.2 LD_{50} value (µl/kg) of plaunotol, observed after single administration for 2 weeks 11

CHAPTER 2

Table 2.1 ^{1}H and ^{13}C-NMR spectral data of CS-PNT (500 MHz for ^{1}H; $CDCl_3$) 18

Table 2.2 ^{1}H and ^{13}C-NMR spectral data of CS-A1 (500 MHz for 1H; CDCl3) 19

Table 2.3 ^{1}H and ^{13}C-NMR spectral data of CS-A2 (500 MHz for ^{1}H; C_3D_6O) 20

Table 2.4 ^{1}H and ^{13}C-NMR spectral data of CS-A3 (500 MHz for ^{1}H; C_3D_6O) 21

Table 2.5 ^{1}H and ^{13}C-NMR spectral data of CS-EtO1 (500 MHz for ^{1}H; C_2D_6SO) 22

Table 2.6 ^{1}H and ^{13}C-NMR spectral data of CS-EtO2 (500 MHz for ^{1}H; C_2D_6SO) 23

Table 2.7 ^{1}H and ^{13}C-NMR spectral data of CS-EtO3 (500 MHz for ^{1}H; CD_3OH) 24

CHAPTER 3

Table 3.1 Primers used in this study 33

Table 3.2 % Inhibition of NO production after treatment with extract and plaunol A 35

Table 3.3 Summary of the inhibitory activity on NO production of cyclic diterpenes 36

Table 3.4 % Inhibition of plaunol A on the RAW264.7 cells calculated from qRT-PCR 37

CHAPTER 4

Table 4.1 Primers used for qRT-PCR 44

Table 4.2 The IC_{50} values of plaunotol in all tested human cancer cell lines (n = 3) 46

CHAPTER 5

Table 5.1 Primers for qRT-PCR experiments 57

Table 5.2 IC_{50} values of plaunol A, plaunol E and plaunol F on cancer and normal cell lines 60

Table 5.3 Comparison of IC_{50} values of diterpenes from *C. oblongifolius* on tumor cell lines 70

LIST OF FIGURES

page

CHAPTER 1

Figure 1.1 Chemical structures of diterpenes and diterpenes derivatives in *Croton stellatopilosus* Ohba 3

Figure 1.2 The procedure to obtain plaunotol and furanoditerpenes 5

Figure 1.3 Plaunotol isolation: method 1 6

Figure 1.4 Plaunotol isolation: method 3 7

Figure 1.5 Thin layer chromatograms of the extracts 8

Figure 1.6 Cumulative healing rate (modify from Ogiso et al. 1985) 12

CHAPTER 2

Figure 2.1 Purification scheme of fractions from plaunoi leaves 15

Figure 2.2 Purification scheme of fractions from plaunoi stems 16

Figure 2.3 Chemical structures of nine compounds, isolated from leaves and stems of plaunoi 17

Figure 2.4 ^{1}H-NMR sepectrum of sterol mixture (CS-BD) 25

Figure 2.5 1H-NMR spectrum of CS-CBD 25

CHAPTER 3

Figure 3.1 Plots of relative expression and % gene inhibition of plaunol A in the RAW264.7 cells. * $P < 0.05$ indicates significant difference from control group (LPS-induced cells). 38

CHAPTER 4 45

Figure 4.1 Cell viability (%) of human cancer cell lines estimated by MTT assay after treatment with plaunotol; samples were performed in triplicate. 46

Figure 4.2 Percent of cell population of human cancer cell lines after treatment with different concentrations of plaunotol. Data were expressed as mean ± S.D. of triplicate experiments and was analyzed by ANOVA followed by Dunnett's post test when ** was at $P < 0.001$ and * was at $P < 0.05$ when compared to control. 47

Figure 4.3 Histograms of DNA content profiles in the HeLa, HT-29, MCF7 and KB cells after treatment at 75 µM and 100 µM plaunotol in comparison with control and paclitaxel treatments for 48 h and cells were stained with propiodium iodide and analyzed by flow cytometry. 48

Figure 4.4A Dot plots indicate amount of stained cells in each quadrant: live, early apoptosis, live cells, late apoptosis and dead cells, respectively in HeLa, HT-29, MCF7 and KB cells. Percentage of each quadrant indicates the population of cells obtained from gating. 49

Figure 4.4B Summary of the percent population of cells after treatment with plaunotol at 75 μM and 150 μM in different type of cancel cells in comparison with control (0.2% DMSO) and paclitaxel at 1 nM. The experiment was performed in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by Dunnett's post-test (*, ** indicate *P* value < 0.05 and < 0.001, respectively). 49

Figure 4.5 The relative expression levels of apoptotic-associate genes in the human cancer cell lines and the RQ ratios of RQ_{Bcl-2} and RQ_{Bax} 50

CHAPTER 5

Figure 5.1 Chemical structure of cyclic diterpenes 55

Figure 5.2A Histograms of DNA content profiles in the HeLa, HT-29, MCF7 and KB cells after treatment at 75 μM and 150 μM plaunol A in comparison with control and paclitaxel treatments for 48 h and cells were stained with propiodium iodide and analyzed by flow cytometry. 61

Figure 5.2B The relationship of percent of cell population and cell cycle after treatments the HeLa, HT-29, MCF-7 and KB cells with plaunol A for 48 h. The results were analyzed by Muse™ Cell Analyzer. *, ** indicate the significance with *P* < 0.05 and *P* < 0.01, respectively. 61

Figure 5.3A Histograms of DNA content profiles in the HeLa, HT-29, MCF7 and KB cells after treatment at 150 μM plaunol E in comparison with control and paclitaxel treatments for 48 h and cells were stained with propiodium iodide and analyzed by flow cytometry. 62

Figure 5.3B The relationship of percent of cell population and cell cycle after treatments the HeLa, HT-29, MCF-7 and KB cells with plaunol E for 48 h. The results were analyzed by Muse™ Cell Analyzer. *, ** indicate the significance with *P* < 0.05 and *P* < 0.01, respectively. 62

Figure 5.4A Detection of apoptosis after treatments the cancer cells [HeLa, HT-29, MCF-7 and KB] with plaunol A for 48 h. Dot plots of apoptosis profile show percentage of cell population after measurement with Muse™ Cell Analyzer. 63

Figure 5.4B Percentage of cells after treatments with 75 μM and 150 μM of plaunol A for 48 h in different types of cell lines. *, ** indicate the significance with *P* < 0.05 and *P* < 0.01, respectively. Samples were analyzed in triplicate. 64

Figure 5.5A Detection of apoptosis after treatments the cancer cells [HeLa, HT-29, MCF-7 and KB] with plaunol E for 48 h. Dot plots of apoptosis profile show percentage of cell population after measurement with Muse™ Cell Analyzer. 65

Figure 5.5B Percentage of cells after treatments with 75 μM and 150 μM of plaunol E for 48 h in different types of cell lines. *, ** indicate the significance with *P* < 0.05 and *P* < 66

0.01, respectively. Samples were analyzed in triplicate.
Figure 5.6 Relative quantitation of apoptotic-associate genes after treatment HeLa, HT-29, MCF-7 and KB cells with plaunol E at concentrations of 50 μM and 75 μM. 68
Figure 5.7 Caspase activities in MCF-7 cells after treatment with plaunol E for 48 h. The caspase activtity was measured using colorimetry, measuring at 405 nm. The data were presented as fold of control (untreated group). Samples were done in triplicate. 69