

Thesis Title	Anti-Proliferative Activity of Nanoparticles Entrapped with the Extracts of Anti-Cancer Thai Medicinal Recipes/ Plants Selected from Thai Medicinal Plant Recipe Database “MANOSROI II”	
Author	Mr. Korawinwich Boonpisuttinant	
Degree	Doctor of Philosophy (Pharmacy)	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Jiradej Manosroi	Advisor
	Prof. Dr. Aranya Manosroi	Co-advisor
	Prof. Dr. Andreas Bernkop-Schnürch	Co-advisor

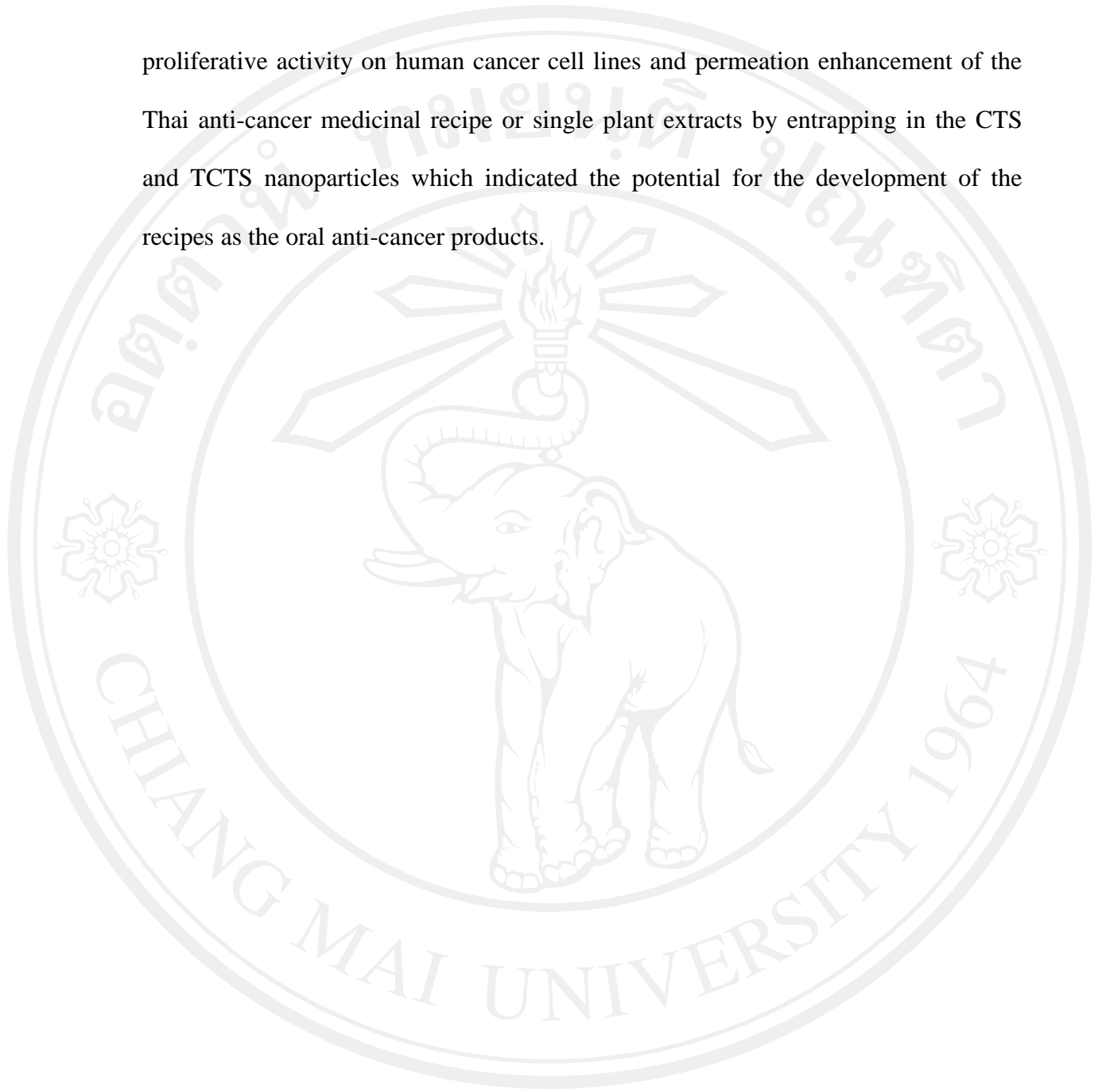
Abstract

Thai medicinal plant recipe database “MANOSROI II” contained the medicinal plant recipes of all regions in Thailand for the treatment of various diseases including anti-cancer medicinal plant recipes. The 112 aqueous extracts of Thai medicinal plant recipes selected from the Thai medicinal plant recipe database “MANOSROI II” were investigated for anti-proliferative activity on four human cancer cell lines including human mouth epidermal carcinoma (KB), human cervical adenocarcinoma (HeLa), human colon adenocarcinoma (HT-29) and human hepatocellular carcinoma (HepG2) by SRB assay. Thirty percentages of the medicinal plant recipes selected from “MANOSROI II” database showed anti-proliferative activity on these cell lines. The extracts of recipes N036, N040, NE028 and S003 gave the highest anti-proliferative activity on HepG2, HeLa, KB and HT-29 cell lines with the IC_{50} of 0.37 ± 0.04 , 0.11 ± 0.03 , 2.48 ± 0.41 and 6.92 ± 0.84 $\mu\text{g/ml}$, respectively ($p < 0.05$). Recipe N036

exhibited higher anti-proliferative activity on HepG2 cells than the standard anti-cancer drugs (doxorubicin, vincristine, cisplatin and 5-FU) of 1.13, 7.76, 14.92 and 3.40, respectively. The Thai medicinal single plants containing in the best recipes in each four cell lines were extracted by boiling with water and also investigated for anti-proliferative activity by the SRB assay. The extracts of *Aegle marmelos*, *Peltophorum pterocarpum*, *Tiliacora triandra* and *Sida rhombifolia*, showed the highest anti-proliferative activity on KB, HeLa, HT-29 and HepG2 with the IC₅₀ values of 54.91 ± 15.59 , 169.63 ± 39.31 , 27.17 ± 15.47 and 268.46 ± 44.31 $\mu\text{g/ml}$, respectively, but lower activity than their recipe extracts ($p < 0.05$). The apoptosis induction by caspase-3 activity, MMP-2 inhibition activity by zymography assay and anti-oxidation activities including free radical scavenging activity, inhibition of lipid peroxidation and metal chelating inhibition activities of the 5 selected aqueous extracts in each cell lines with the total of 20 recipe extracts, which gave the highest anti-proliferative activity were determined. The anti-proliferative activity (A_p) of the 5 selected extracts showed correlation with the caspase-3 activity (C_a), the MMP-2 inhibition activity (M_i) and the free radical scavenging activity (SC_{50}) but no correlation with the Fe^{3+} -chelating (MC_{50}) activities and the lipid peroxidation inhibition (LC_{50}). Most phytochemicals detected in the recipes were alkaloids, flavonoids, tannins and sugar residues of glycosides (glucose and sucrose residues), which were 3, 93, 86 and 79% of total recipes respectively, while anthraquinones, carotenoids, xanthenes and fructose residue of the glycoside were found only in some recipes, which were 0, 14, 50 and 7% of total recipes respectively. Chitosan (CTS) and thiolated-chitosan (TCTS) nanoparticles were prepared by the ionic interaction between CTS or TCTS with the tripolyphosphate (TPP) solution and entrapped with

the aqueous recipe/ plant extracts. The averages sizes, zeta-potentials and polydispersity index (PDI) of the CTS and TCTS nanoparticles entrapped with the medicinal recipe and single plant extracts were in range of 273.10 ± 57.00 to 394.60 ± 71.30 nm, $+1.73 \pm 0.82$ to $+6.40 \pm 0.63$ mV and 0.33 ± 0.06 to 0.56 ± 0.01 ; and 205.10 ± 39.20 to 311.50 ± 51.40 nm, $+1.46 \pm 0.63$ to $+3.99 \pm 0.22$ mV and 0.23 ± 0.07 to 0.40 ± 0.09 , respectively, while the blank CTS and TCTS nanoparticles gave 244.8 ± 48.1 nm, $+3.56 \pm 0.71$ mV and 0.350 ; and 174.2 ± 23.2 nm, $+3.22 \pm 0.85$ mV and 0.207 , respectively. The CTS and TCTS nanoparticles can significantly enhance the anti-proliferative activity of the extracts on the four human cancer cells by MTT assay ($p < 0.05$). The blank CTS and TCTS nanoparticles did not show anti-proliferative activity on the four cell lines. All recipes and plant extracts and their formulations showed no cytotoxicity on the 28th passage human skin fibroblast cells indicating the primary safety in skin cells. The *in vitro* the intestinal membrane permeation of the medicinal recipe and single plant extracts determined as quinazoline and tryptamine using Ussing type chamber across the freshly excised rat intestinal mucosa was similar to the standards quinazoline and tryptamine which were the zero order, whereas the permeation of those entrapped in the CTS and TCTS nanoparticles was conformed to the Higuchi's equation kinetics. Thiolation significantly enhanced the permeation of the CTS nanoparticles with the highest transport enhancement ratio (R) of 1.45 for *P. pterocarpum* extract when determined as quinazoline, and of 3.33 for *A. marmelos* extract when determined as tryptamine ($p < 0.05$). This study has demonstrated that the Thai medicinal recipe extracts selected from MANOSROI II database could be a good candidate with high potential for the further development as an anti-cancer agent. This study has demonstrated the anti-

proliferative activity on human cancer cell lines and permeation enhancement of the Thai anti-cancer medicinal recipe or single plant extracts by entrapping in the CTS and TCTS nanoparticles which indicated the potential for the development of the recipes as the oral anti-cancer products.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดตำรับยา/พืชสมุนไพรไทยต้าน

มะเร็งที่คัดเลือกจากฐานข้อมูล ตำรับยาสมุนไพรไทย มโน

๒ สร้อย” ซึ่งกักเก็บในอนุภาคนาโน

ผู้เขียน

นายกรวินท์วิษญ์ บุญพิสุทธิ

นนท์

ปริญญา

วิทยาศาสตร์สุขภาพบัณฑิต

(เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศาสตราจารย์ ดร. จีระเดช มโนสร้อย

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ศาสตราจารย์ ดร. อรัญญา มโนสร้อย

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

Prof. Dr. Andreas Bernkop-Schnürch

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ฐานข้อมูลตำรับยาสมุนไพรไทย "มโนสร้อย ๒" ประกอบด้วยตำรับยาสมุนไพรจากทุก

ภูมิภาค ของประเทศไทยที่ใช้รักษาโรคต่างๆ รวมถึงโรคมะเร็ง ได้นำสารสกัดจากตำรับพืช

สมุนไพรด้วยน้ำจำนวน 112 ตำรับ ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูล "มโนสร้อย ๒" มาทดสอบฤทธิ์ต้าน

การเจริญของเซลล์มะเร็ง จำนวน 4ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB), เซลล์มะเร็งปากมดลูก

(HeLa), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ด้วยวิธี SRB พบว่า ประมาณ

30 เปอร์เซ็นต์ ของตำรับยาสมุนไพรที่คัดเลือกจากฐานข้อมูล "มโนสร้อย ๒" แสดงฤทธิ์ต้านการ

เจริญของ เซลล์มะเร็งเหล่านี้ สารสกัดจากตำรับ น036, น040, อส028 และ ต003 ให้ฤทธิ์ต้านการ

เจริญของ เซลล์มะเร็ง HepG2, HeLa, KB และ HT-29 สูงสุด ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.37 ± 0.04 , $0.11 \pm$

0.03, 2.48 ± 0.41 และ 6.92 ± 0.84 mg/ml ตามลำดับ ($p < 0.05$) โดยตำรับ น036 แสดงฤทธิ์ ด้านการเจริญในเซลล์มะเร็ง HepG2 ได้สูงกว่ายาต้านมะเร็งมาตรฐาน doxorubicin, vin cristine, cisplatin และ 5FU เป็น 1.13, 7.76, 14.92 และ 3.40 เท่า ตามลำดับ ได้นำพืชสมุนไพรเดี่ยวในตำรับที่ให้ผลดีที่สุด มาสกัดด้วยวิธีการต้มด้วยน้ำและทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี SRB พบว่า สารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยมะตูม (*Aegle marmelos*) สานเงิน (*Peltophorum pterocarpum*) ย่านาง (*Tiliacora triandra*) และหญ้าขี้ฉาง (*Sida rhombifolia*) ให้ฤทธิ์ด้านการเจริญต่อเซลล์มะเร็ง KB, HeLa, HT-29 และ HepG2 มากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 54.91 ± 15.59 , 169.63 ± 39.31 , 27.17 ± 15.47 และ 268.46 ± 44.31 mg/ml ตามลำดับ แต่มีฤทธิ์น้อยกว่าสารสกัดจากตำรับยาสมุนไพร ($p < 0.05$) ได้คัดเลือกสารสกัดตำรับยาสมุนไพรซึ่งมีฤทธิ์ด้านการเจริญสูงสุดที่คัดเลือกมา 5 ตำรับ จากเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดมาทดสอบการเกิดอะพอพโตซิสด้วยวิธีตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์แคสเปส-3, ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์เมทริกเมทัลโลโปรตีนเนส-2 (MMP-2) ด้วยวิธีเจลาติโนไลติกไซโมกราฟี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งได้แก่ ฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระ, การต้านฤทธิ์เปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมัน และ ฤทธิ์ด้านการเกิดคีเลตกับโลหะ พบว่า ฤทธิ์ด้านการเจริญ (anti-proliferative activity: *Ap*) ของสารสกัดที่คัดเลือกมา 5 ตำรับ มีความสัมพันธ์กับ กิจกรรมของเอนไซม์แคสเปส-3 (caspase-3 activity: *Ca*) ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์เมทริกเมทัลโลโปรตีนเนส-2 (MMP-2 inhibition activity: *Mi*) และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (SC_{50}) แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ด้านการเกิด Fe³⁺-chelating (MC_{50}) และการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมัน (lipid peroxidation: LC_{50}) จากการตรวจสอบพบทุกเคมีในตำรับส่วนมากมี alkaloids, flavonoids, tannins, sugar residues ของ glycosides (glucose และ sucrose residues) โดยเท่ากับ 93, 93, 86 และ 79% ของตำรับทั้งหมด ในขณะที่พบบ้างของ antraquinones, carotenoids, xanthrone และ fructose

residue ประมาณ 0, 14, 50 และ 7% ของตำรับทั้งหมด ได้เตรียมอนุภาคขนาดนาโนไคโตซาน (CTS) และ ไทโอเลตไคโตซาน (TCTS) โดยปฏิกิริยา ionic interaction ระหว่าง CTS และ TCTS กับ tripolyphosphate (TPP) แล้วนำมากักเก็บสารสกัดจากตำรับยาและพืชสมุนไพรเดี่ยว พบว่า มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย zeta-potential และ polydispersity index (PDI) อยู่ในช่วง 273.10 ± 57.00 to 394.60 ± 71.30 nm, $+1.73 \pm 0.82$ to $+6.40 \pm 0.63$ mV and 0.33 ± 0.06 to 0.56 ± 0.01 ; and 205.10 ± 39.20 to 311.50 ± 51.40 nm, $+1.46 \pm 0.63$ to $+3.99 \pm 0.22$ mV and 0.23 ± 0.07 to 0.40 ± 0.09 ตามลำดับ ในขณะที่อนุภาคขนาดนาโน CTS และ TCTS ที่ไม่ได้กักเก็บสารสกัด มีค่าเท่ากับ 244.8 ± 48.1 nm, $+3.56 \pm 0.71$ mV and 0.350 ; and 174.2 ± 23.2 nm, $+3.22 \pm 0.85$ mV and 0.207 ตามลำดับ ได้แสดงให้เห็นว่า อนุภาคขนาดนาโนCTS และ TCTS สามารถเพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์ด้านการเจริญในเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด ที่ทดสอบโดยวิธี MTT ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่อนุภาคขนาดนาโน CTS และ TCTS ที่ไม่ได้กักเก็บสารสกัดไม่แสดงฤทธิ์ด้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้สารสกัดจากตำรับและพืชสมุนไพรเดี่ยวที่ไม่ได้กักเก็บและกักเก็บในอนุภาคขนาดนาโน CTS และ TCTS ไม่มีพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human skin fibroblast cells) ที่ passage 28 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าน่าจะปลอดภัยต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ จากการทดลอง *in vitro* membrane permeation ของควินาโซลีน (quinazoline) และ ทริปตามีน (tryptamine) ที่มีในสารสกัดจากตำรับและพืชสมุนไพรเดี่ยว โดยวิธี Ussing type chamber ที่ผ่านลำไส้หนู พบว่า มีการแพร่ผ่านของสารมาตรฐานควินาโซลีนและทริปตามีนเป็นแบบระดับศูนย์ (zero order) ในขณะที่การแพร่ผ่านของสารสกัดที่กักเก็บในอนุภาคขนาดนาโนCTS และ TCTS เป็นแบบสมการ Higuchi โดยปฏิกิริยาไทโอเลชันของอนุภาคนาโนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของอนุภาคขนาดนาโนCTS ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ transport enhancement ration (R) สูงสุดเท่ากับ 1.45 สำหรับสารสกัดจาก P.

pterocarpum เมื่อวัดจากปริมาณของควินาโซลีน และ 3.33 สำหรับสารสกัดจาก *A. marmelos* เมื่อวัดจากปริมาณของทริปตามีน ($p < 0.05$) ผลการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดตำรับยาสมุนไพรไทยที่คัดเลือกจากฐานข้อมูล "มโนสร้อย ๒" เป็นตำรับที่มีประสิทธิภาพสูงในการต้านมะเร็ง ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งได้ นอกจากนี้ยังได้แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มประสิทธิภาพของฤทธิ์ต้านมะเร็งและการแพร่ผ่านของสารสกัดตำรับและสมุนไพรเดี่ยว โดยการกักเก็บในอนุภาคนาโน CTS และ TCTS ซึ่งมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้านมะเร็งใช้รับประทานต่อไป