Thesis Title Effects of Crude Extracts of Some Medicinal Plants in Family Annonaceae on HeLa Cells and Human Amniotic Fluid Cell Lines

Author Mr. Kamol Dasa

Degree Master of Science (Biology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Weerah Wongkham	Chairperson
Asst. Prof. Prisna Chariyavidhayawat	Member

ABSTRACT

The basic characteristics of the two cell lines, the AMC-K46 (human amniocytic cell line) and the HeLa (human cervical adenocarcinoma cell line), have been studied. There are three types of cells in the cultures of AMC-K46; epitheloids, fibroblastoids and giant cells. The growth patterns of the cell line have been studied with the exponential phase from the 1st to the 4th day and the plateau phase after the 5th day of seeding. The aneuploidies with the chromosome number ranging between 46 to 136 have been shown in the cultures with the mosaicism and chromosome aberations. Several unknown chromosome markers have been identified. The proportions dividing and non-dividing cells were determined from the results of the experiments.

The HeLa has been studied on the necessary basic characteristics for the cytotoxicity assay.The cell expresses the homogeneity of cell type with the typical growth pattern of 3 phases; the lag phase of 24-48 hours, the exponential phase of 5-6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

days and the plateau phase after the 8th day of seeding.The proportions of the dividing and non-dividing cells were then specified.

Five species of the medicinal annonaceous plants consistrd of *Annona reticulata* (bark, leaves and young fruits), *Annona squamosa* (leaves, and young fruit), *Cananga odorata* (leaves), *Cananga odorata* var. *fruticosa* (leaves) and *Melodorum fruticosum* (leaves) have been extracted by ethanol. The extracts have been screened by the MTT assay for the cytotoxic activities using the desired dividing and non-dividing densities of the above mentioned cell lines. The extracts showing the highest cytotoxicity have been studied for mutagenesis. The highest active extract to the AMC-K46 was from *M. fruticosum* with the MTT_{50} of 10.48 and 439.00 μg/ml for the dividing and non-dividing cells respectively. However, this extract exhibits the non selective activity between the dividing and non-dividing cells with the selectivity index of < 1. The moderated cytotoxic effect has been observed from *A. squamosa* (young fruit) while all the other extracts have been classified as no activity with the MTT_{50} > 100 μg/ml. For HeLa, the highest effect has been identified from the extract of *A. reticulata* (young fruit) with the MTT_{50} of 0.86 and 21.0 μg/ml for the dividings and non-dividings respectively. This extract is also more selective to kill the dividings than the non-dividings with the selectivity index < 0.1. The highly selective effect of the extract from *A. squamosa* (young fruit) to HeLa has also been classified (MTT_{50} = 5.25 μg/ml) with very low selectivity index (0.089).

From the above results, three extracts have been chosen to be used in the mutagenesis assay on AMC-K46; *A. reticulata* (young fruit), *A. squamosa* (young fruit) and *M. fruticosum* (leaves). The extracts from *A. reticulata* and *A. squamosa* inhibit the mitotic division of the cells with MI of 0.75 and 0.93 respectively. These two extracts also exhibit higher P.D.M.I. than that of the controlled cells significantly. The extract from *M. fruticosum* expresses no effect on the mitotic division of the cells.

The karyotype has also been studied on the AMC-K46 being exposed to those three extracts. The metaphases with the highest frequency of chromosome (67 and 68) have been chosen as the modal chromosome number. All of the extracts exhibit non-significant genotoxicity to the cells with the percentage of aberrant metaphase of 0.82, 1.68 and 6.32 for *A. reticulata*, *A. squamosa* and *M. fruticosum* respectively. However, four types of chromosomal aberration have been observed in

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

the cells exposing to those extracts *i.e.*, acentric fragment (ace), chromatid break (ctb), chromatid deletion (ctd) and chromatid gap (ctg). In conclusion, any usage of these extracts in the indigenous medical treatment should be with precautions and great care, particularly with topical application.

***Key words*:** *Annonaceae*, Amniocyte, HeLa, Cytotoxicity, Chromosomal aberration

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสารสกัดหยาบของพืชสมุนไพรบางชนิดในวงศ์กระดังงา ต่อเซลล์เฮลาและเซลล์เชื้อสายจากน้ำคร่ำมนุษย์

ผู้เขียน นาย กมล ดาสา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. วีระ วงศ์คำ	ประธานกรรมการ
ผศ. ปริศนา จริยาวิทยาวัฒน์	กรรมการ

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาลักษณะเฉพาะพื้นฐานของเซลล์ทั้ง 2 เชื้อสาย AMC-K46 (เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำมนุษย์) และเฮลา(HeLa: เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก) โดยในการเพาะเลี้ยง AMC-K46 พบเซลล์ 3 ลักษณะคือเซลล์เยื่อบุผิว เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์กลมใหญ่ โดยแสดงแบบแผนของการเจริญเติบโตเพียง 2 ขั้นคือ log phase ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 4 และเข้าสู่ขั้น plateau phase ภายหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยงได้ 5 วัน AMC-K46 มีความแปรผันทางจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 46-136 แท่ง โดยพบความผิดปกติทางจำนวนและรูปร่างภายในเลขโครโมโซมเดียวกัน (mosaicism) และยังพบความผิดปกติของ marker chromosome ที่ระบุไม่ได้หลายแบบ และได้มีการทดลองที่กำหนดความหนาแน่นเซลล์ที่แบ่งตัวและไม่แบ่งตัวด้วย

ส่วนการศึกษาลักษณะเฉพาะพื้นฐานของเซลล์เฮลาที่จะใช้ในการทดสอบด้านความเป็นพิษระดับเซลล์ โดยเซลล์ดังกล่าวแสดงลักษณะความเป็นเอกภาพทางรูปแบบของเซลล์และมีแบบแผนการเจริญ 3 ขั้นคือ lag phase 24-48 ชั่วโมง log phase 5 ถึง 6 วัน และเข้าสู่การเจริญแบบ plateau phase ในวันที่ 8 ภายหลังการเริ่มเพาะเลี้ยง ความหนาแน่นของเซลล์ที่แบ่งตัวและไม่แบ่งตัวได้ถูกกำหนดขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พืชสมุนไพร 5 ชนิดในวงศ์กระดังงาคือ น้อยโหน่ง(เปลือกต้น ใบและผลอ่อน) น้อยหน่า (ใบและผลอ่อน) กระดังงาไทย(ใบ) กระดังงาสงขลา(ใบ) และ ลำดวน(ใบ) ถูกนำมาสกัดโดยเอธานอล เพื่อใช้ศึกษาทางด้านความเป็นพิษระดับเซลล์ในเซลล์ที่แบ่งตัวและไม่แบ่งตัวที่กำหนดขึ้นในเซลล์ทั้ง 2 เชื้อสายโดยวิธี MTT assay สารสกัดที่ออกฤทธิ์สูงสุดจะถูกนำไปศึกษาผลต่อการกลายพันธุ์ต่อไป สารสกัดจากลำดวนมีผลสูงสุดต่อ AMC-K46 โดยที่ค่า MTT_{50} ของเซลล์ที่แบ่งตัวและไม่แบ่งตัวเท่ากับ 10.48 และ 439.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีประสิทธิผลในการเลือกส่งผลระหว่างเซลล์ที่แบ่งตัวและไม่แบ่งตัว เนื่องจาก selective index มากกว่า 1 ส่วนสารสกัดจากผลอ่อนของน้อยโหน่งส่งผลในระดับปานกลาง และสารสกัดอื่นๆ ไม่มีผลเนื่องจาก MTT_{50} มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของเฮลาพบว่าสารสกัดจากผลอ่อนของน้อยโหน่งมีผลสูงสุดที่ MTT_{50} เท่ากับ 0.86 และ 21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเซลล์ที่แบ่งตัวและไม่แบ่งตัวตามลำดับ และสารสกัดนี้เองมีความสามารถในการเลือกฆ่าเซลล์ที่แบ่งตัวมากกว่าเซลล์ที่ไม่แบ่งตัว ด้วยค่า selective index น้อยกว่า 1 ในขณะที่สารสกัดจากผลอ่อนน้อยหน่าส่งผลเฮลาในระดับสูงเช่นกัน (MTT_{50} = 5.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยให้ค่า selective index อยู่ในระดับต่ำมาก(0.089)

จากการประเมินค่าที่ได้ข้างต้นสารสกัด 3 ชนิดจึงถูกเลือกเพื่อนำมาใช้ศึกษาผลต่อการกลายพันธุ์ใน AMC-K46 คือ สารสกัดหยาบจาก น้อยโหน่ง(ผลอ่อน) น้อยหน่า(ผลอ่อน) และลำดวน(ใบ) พบว่าสารสกัดจากน้อยโหน่งและน้อยหน่ายับยั้งการแบ่งเซลล์ โดยให้ค่าดัชนีการแบ่งเซลล์เท่ากับ 0.75 และ 0.93 ตามลำดับ โดยสารสกัดทั้ง 2 ชนิดควบคุมการแบ่งตัว และทำให้ดัชนีการแบ่งตัวลดลงจากปกติ ส่วนสารสกัดจากลำดวนไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์

ในการศึกษาผลของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิดข้างต้นต่อโครโมโซมของ AMC-K46 ใช้ metaphase ที่มีความถี่ของจำนวนโครโมโซมในเซลล์เดียวสูงสุด (67 และ 68 แท่ง) เป็น modal chromosome number ซึ่งพบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีความเป็นพิษต่อ สารพันธุกรรมเพียงเล็กน้อย โดยพบความผิดปกติเพียง 0.82 1.68 และ 6.32 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นผลจากสารสกัดของน้อยโหน่ง น้อยหน่าและลำดวนตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ในการทดลองพบความผิดปกติทางโครงสร้าง 4 แบบ คือ acentric fragment (ace), chromatid break (ctb), chromatid deletion (ctd) และ chromatid gap (ctg) ดังนั้นในการใช้สารสกัดนี้ตามรูปแบบตำหรับแพทย์สมุนไพรพื้นเมืองควรมีการตรวจสอบให้ชัดเจนและบริโภคด้วยความระมัดระวัง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เฉพาะแห่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved