การศึกษาผลของพืชในตระกูลยูโฟรเบียต่อการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสโดยวิธีทางชีวเคมีและอณูชีวโมเลกุล

นาย เอกพจน์ สิงห์สุขสวัสดิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1911-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR STUDY OF MEMBERS OF EUPHORBIACEAE FAMILY FOR TYROSINASE INHIBITORY EFFECT

Mr. Ekapot Singsuksawat

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-53-1911-2

Thesis Title	Biochemical and Molecular Study of Members of Euphorbiaceae Family for Tyrosinase Inhibitory Effect.
By	Mr. Ekapot Singsuksawat
Field of study	Medical Science
Thesis Advisor	Assistant Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Tada Sueblinvong, M.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D., Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Tada Sueblinvong, M.D.)

..... Member

(Assistant Professor Wacharee Limpanasitthikul, Ph.D)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกพจน์ สิงห์สุขสวัสดิ์ : การศึกษาผลของพืชในตระกูลยูโฟรเบียต่อการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสโดยวิธีทางชีวเคมีและอณูชีวโมเลกุล. (BIOCHEMICAL AND MOLECULAR STUDY OF MEMBERS OF EUPHORBIACEAE FAMILY FOR TYROSINASE INHIBITORY EFFECT.) อ.ที่ปรึกษา: ผศ. ดร.พูลลาภ ชีพสุนทร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. พญ.ธาดา สืบหลินวงศ์. 59 หน้า. ISBN 974-53-1911-2.

การสร้างเม็ดสีเมลานิน (Melanin) โดยเซลล์เมลาโนไซด์ (melanocyte cells) ในกระบวนการเมลาโนจีเนซิส (Melanogenesis) จะมีการกระตุ้นของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ชนิดนี้ (Tyrosinase-related protein) โดยมีเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวควบคุมอัตราการสร้างเม็ดสีที่เกิดจากการกระตุ้นของสารหลายชนิดรวมถึงแสงจากดวงอาทิตย์ให้เพิ่มการสร้างเมลานินมากขึ้น การสร้างเม็ดสีที่มากเกินความจำเป็นนำไปสู่การเกิดฝ้า (melasma) ซึ่งสามารถรักษาโดยทำให้จางลงด้วยผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารไฮโดรควินโนน (Hydroquinone) แต่มักมีผลข้างเคียงในการรักษา เช่น ทำให้เกิดการระคายเคืองและอาการไหม้ของผิวหนัง ก่อนหน้านี้ได้มีรายงานว่าสารสกัดจากพืชจากตระกูลยูโฟรเบีย (Euphorbiaceae) สามารถใช้ในการรักษาฝ้าได้ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากพืชในตระกูลนี้2 ชนิดที่พบมากในประเทศไทย ได้แก่ ตะเข้คุมวัง (*Mallotus spodocarpus*) และ กระบือเจ็ดตัว (*Excoecaria bicolor*) ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยการทดสอบปฏิกริยาทางชีวเคมีของสารสกัดที่มีผลต่อเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดมาจากเห็ด ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดกระบือเจ็ดตัวออกฤทธิ์ในการยับยั้งไทโรซิเนสที่สกัดจากเห็ด ได้ดีกว่า สารสกัดตะเข้คุมวังโดยผลการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจาก 0.125 มก./มล.ถึง 2 มก./มล. จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดทั้งสองชนิดในเซลล์เมลาโนไซด์โดยวิธี MTT พบว่าสารสกัดตะเข้คุมวังมีความเป็นพิษสูงมากกว่า สารสกัดจากกระบือเจ็ดตัว ซึ่งมีความเป็นพิษประมาณ 13% ที่ความเข้มข้น 0.125 มก./มล. อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดทั้งสองชนิดมีผลลดการแสดงออกของ RNA ของไทโรซิเนสและMITF ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของไทโรซิเนสในระดับความเข้มข้น10 ไมโครกรัม/มล.และ 100 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ ในการทดลองขั้นต่อไปได้นำสารสกัดกระบือเจ็ดตัวที่ให้ผลในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสและมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า นำมาทดสอบการแสดงออกของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องในการควบคุมปริมาณของไทโรซิเนสผ่านทาง MITF โดยวิธี Western blot ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากกระบือเจ็ดตัวเพิ่มระดับโปรตีนของ Phosphorylated form of ERK ซึ่งเป็นตัวควบคุมหลักในกระบวนการเสื่อมสลายของ MITF ในระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล.และ 100 ไมโครกรัม/มล.ตามลำดับ จากข้อมูลข้างต้นสรุปได้ว่าสารสกัดจากกระบือเจ็ดตัวให้ผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยเกี่ยวข้องกับโมเลกุล ERK ในกระบวนเมลาโนจีเนซิสนำไปสู่การเสื่อมสลายของโปรตีน และ RNA ของ MITF และอาจจะเป็นประโยชน์ในการรักษาฝ้า

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

###457 52878 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORDS : MELANOGENESIS / EUPHORBIACEOUS PLANTS / *MALLOTUS SPODOCARPUS* / *EXCOECARIA BICOLOR* EKAPOT SINGSUKSAWAT: BIOCHEMICAL AND MOLECULAR STUDY OF MEMBERS OF EUPHORBIACEAE FAMILY FOR TYROSINASE INHIBITORY EFFECT. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. POONLARP CHEEPSUNTHORN PH.D.., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. TADA SUEBLINVONG, M.D. 59 pp. ISBN 974-53-1911-2.

The synthesis of the visible pigment melanin by melanocytes is the basis of human pigmentary called melanogenesis. During this process, the expression of tyrosinase and tyrosinase-related proteins is up-regulated. The rate-limiting step in this pathway is controlled by the enzyme tyrosinase. A variety of physiological factors including sunlight can stimulate differentiation of melanocytes to increase pigmentation. Overproduction of melanin leads to the development of melasma, which can be treated by hydroquinone compound presented in some skin care products, but with some side effects e.g. an allergic reaction or skin burning. Previously, the extracts from plant in Euphorbiaceae family have been claimed to treat melasma. Therefore, we screened the extracts from two euphorbiaceous members found mainly in Thailand namely *Mallotus spodocarpus* and *Excoecaria bicolor* for their anti-tyrosinase propertiy using cell-free mushroom tyrosinase and melanocyte cell-based assays. The results demonstrated that the crude extract from *E. bicolor* was more effective in mushroom tyrosinase inhibitory assay than that of the extract from *M. spodocarpus* in a does-dependent manner (0.125 mg/ml-2 mg/ml). Using melanocyte cell culture system and by means of MTT cytotoxic assay, the result was found that the extract from *M. spodocarpus* possessed a very potent cytotoxic effect, compare to that of the extract from *E. bicolor*, which had an approximately 13% cytotoxicity at the concentration of 0.125 mg/ml. However, the result was shown by means of RT-PCR assay that both extracts reduced RNA expression level of tyrosinase and its transcription factor, MITF, in a does-dependent manner (10 µg/ml and 100 µg/ml). Therefore, the extract from *E. bicolor* was selected for further examination on the signaling cascades leading to MITF-mediated tyrosinase expression by means of western blot analysis. The results demonstrated that the *E. bicolor* extract increased protein expression level of phosphorylated form of ERK, a key regulator for MITF degradation, in a does-dependent manner (10 µg/ml and 100 µg/ml). In summary, the findings indicated that the extract from *E. bicolor* possesed anti-tyrosinase property and its mechanism of action was involved ERK-mediated MITF protein degradation, as well as and a down-regulation of the MITF RNA. Therefore, *E. bicolor* extract could be cosmetically useful for targeting melasma.

Field of study Medical Science

Academic year 2004

Student's signature Ekapot Singsuksawat

Advisor's signature Poonlarp Cheepsunthorn

Coadvisor's signature Tada Sueblinvong

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and profound appreciation to Assistant Professor Poonlarp Cheepsuntorn, Ph.D. my thesis advisor for his valuable advice, guidance, helpfulness, understanding and intelligential motivation throughout my study and during the preparation of this thesis. I also would like to express my gratefulness to my co-advisor, Associate Professor Tada Sueblinvong, M.D. for her valuable suggestions and encouragement. My grateful appreciation is extended to Associate Professor Vilai Chentanez, M.D., Ph.D., Assistant Professor Wacharee Limpanasitthikul, Ph.D, my thesis committees, for their valuable discussion and suggestions.

I feel profoundly indebted to Chula MRC Research Center at 10th floor Aor Por Ror building, Faculty of medicine, Chulalongkorn University for allowing me to use the laboratory equipments includings tissue culture facilities during the time I did my thesis and to the Department of Radiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for allowing me to use X-ray film facilities. Specials thanks to Dr. Anothai at Dr. Saroj's Research Lab Co., Ltd for providing me all information about the plant extracts used in my thesis work, my trainer Miss Nootchanat Mairuae, Miss Aunchalee Tonsomboon for their suggestion and encouragemant, Noi, Aom and my friends for their help, sincerity and friendship.

Finally, I will not forget to give special thanks to my parents and every member in my family for support during my graduate study and their kindness, understanding all the time; thank you very much.

This work was supported by Dr. Saroj's Research Lab Co., Ltd budget to Assistant Professor Poonlarp Cheepsuntorn, Ph.D.

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

TABLE OF CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....x

LIST OF ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I INTRODUCTION

- Background and Rationale.....1
- Research Questions.....2
- Objectives of the Study.....2
- Hypothesis.....3
- Key Words.....3
- Expected Benefits and Applications.....3

II REVIEW LITERATURE.....4

III MATERIALS AND METHODS

- Mushroom Tyrosinase Inhibition Assay.....14
- Cultures and treatments of melanocytes.....14
- RNA isolation.....15
- Reverse transcription.....16
- Polymerase Chain Reaction.....16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Page

- MTT Cell Proliferation Assay.....18
- Western blot 18
- Statistical analysis 19

IV RESULTS

- Tyrosinase inhibitory activity of the crude extracts from *Mallotus spodocarpus* and *Excoecaria bicolor*.....20
- Cytotoxic effect of the crude extracts in melanocyte cell-based assay.....21
- The crude extracts from from *Mallotus spodocarpus* and *Excoecaria bicolor* inhibit the expression of the tyrosinase and MITF RNAs.....21
- *Excoecaria bicolor* crude extract increases the phosphorylation of ERK in a dose-dependent manner.....22

V DISCUSSION AND CONCLUSION.....30

REFERENCES.....33

APPENDICES.....43

BIOGRAPHY.....59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table **Page**

1. Euphorbiaceous plants and their diverse range of application.....12
2. Showing specific primer for humanTyrosinase, MITF and Beta-actin.....17
3. Preparation of the reaction mix for cDNA synthesis.....51
4. Preparation of the reaction mix for PCR.....52

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1. Melanin biosynthetic pathway (Melanogenesis)....5
2. Characteristics of Melasma....6
3. Structures of the Microphthalmia-associated Transcription Factor isoforms....9
4. Model of signaling pathways involved in cAMP-induced melanogenesis. 11
5. Botanical picture of *Mallotus Spp.* (Left) and *Excoecaria bicolor* (Right)....13
6. The mushroom tyrosinase inhibitory activity of Kojic acid....23
7. The mushroom tyrosinase inhibitory activity of *Mallotus spodocarpus* crude extract....24
8. The mushroom tyrosinase inhibitory activity of *Excoecaria bicolor* crude extract....25
9. Cytotoxicity of *Mallotus spodocarpus* crude extract in melanocyte cell line....26
10. Cytotoxicity of *Excoecaria bicolor* crude extract in melanocyte cell line....27
11. *Mallotus spodocarpus* and *Excoecaria bicolor* crude extract induces gene expressions of Tyrosinase and MITF in melanocyte cells....28
12. *Excoecaria bicolor* crude extract induced Phorpho-ERK protein expression in melanocyte cell line....29
13. Hemocytometer slide....49
14. Finger print of *Mallotus spodocarpus*....57
15. Finger print of *Excoecaria bicolor*....58

LIST OF ABBREVIATIONS

ANOVA	analysis of variance
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
^{o}C	degree celsius
cm	centimeter
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CREB	cAMP response element-binding
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DOPA	3,4-dihydroxyphenylalanine
dH_2O	distilled water
dNTPs	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
ERK	p42/44 MAPKinase
FBS	fetal bovine serum
g	gram
GSK3β	glycogen synthase kinase 3beta
h	hour
HRP	horseradish peroxidase
mg	milligram
min	minute
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
ml	millilitre
mM	millimolar
MSH	melanocyte-stimulating hormone
ng	nanogram

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

nm	nanometer
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
PKA	protein kinase A
PVDF	polyvinylidene difluoride
RNase	ribonuclease
RT	reverse transcription
SDS	sodium dodecyl sulphate
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard errors of mean
TBE	tris borate
Tris-HCl	tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
TRP	tyrosinase-related protein
Tyr	Tyrosinase
UV	ultraviolet
µg	microgram
µl	microlitre

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย