# ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดใบหม่อนซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทสิส ของเซลล์มะเร็งตับเฮปจี2

นางสาว วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเวชเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4676961333

# ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF MULBERRY LEAF EXTRACT CAPABLE OF INDUCING APOPTOSIS IN HepG2 CELLS

Miss Wanlaya Naowaratwattana

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biomedicinal Chemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

502127

| | |
|---|---|
| Thesis Title | ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF MULBERRY LEAF EXTRACT CAPABLE OF INDUCING APOPTOSIS IN HepG2 CELLS |
| By | Miss Wanlaya Naowaratwattana |
| Field of Study | Biomedicinal Chemistry |
| Thesis Advisor | Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D. |

---

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

Pornpen Pramyothin ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

D. Meksuriyen ..... Chairman
(Associate Professor Duangdeun Meksuriyen, Ph.D.)

Wanchai De-Eknamkul ..... Thesis Advisor
(Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.)

S. Jesadanont ..... Member
(Associate Professor Sukanya Jesadanont, Ph.D.)

Sunanta Pongsamart ..... Member
(Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.)

P. Surinrut ..... Member
(Associate Professor Piyawan Surinrut, Ph.D.)

Vimolmas Lipipun ..... Member
(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา: ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดใบหม่อนซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทสิสของเซลล์มะเร็งตับเฮปจี2 (ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF MULBERRY LEAF EXTRACT CAPABLE OF INDUCING APOPTOSIS IN HepG2 CELLS). อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. วันชัย ดีเอกนามกูล, 99 หน้า

สารสกัดจากใบหม่อน (*Morus alba* L.) ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์แผนตะวันออกมานานเพื่อรักษาความผิดปกติของร่างกายรวมทั้งโรคมะเร็ง การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) จำแนกองค์ประกอบสารบางส่วนและหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากใบหม่อน (2) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบหม่อนซึ่งเตรียมจาก 100% เมทานอล, 50% เมทานอล, บิวทานอล และน้ำร้อน ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับเฮปจี2 จากผลการวิเคราะห์โดย high performance liquid chromatography ต่อพ่วงกับเครื่องตรวจ photodiode array และ mass spectrometry (HPLC-PDA-MS) พบว่า สารสกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์ ประกอบด้วยสารประเภท rutin, isoquercetin, kaempferol 3-rhanopyranosyl-glucopyranoside, quercetin 3-(6-malonylglucoside), astragalin และ kaempferol 3-(6-malonylglucoside) ส่วนสารสกัดจากน้ำร้อนมีสารประกอบประเภท chlorogenic acid และอนุพันธ์ของ caffeoyl quinic acid และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของสารสกัดต่างๆ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteau พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 1.80-3.52, 0.86-2.78, 0.46-1.50 กรัมสมมูลย์ ต่อ 100 กรัมของใบแห้ง ของ chlorogenic acid, rutin และ gallic acid ตามลำดับ สารสกัดทั้งสี่ชนิดสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), superoxide radical, hydroxyl radical และ lipid peroxidation ได้อย่างมีนัยสำคัญแบบแปรผันตามปริมาณที่ใช้ สารสกัดทั้งสี่ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยพบว่าสารสกัดจากเมทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับเฮปจี2 มากกว่าเซลล์ตับปกติ สำหรับการศึกษาการกระจายตัวของวัฏจักรเซลล์ และ การตายแบบอะพอพโทสิส โดยวิธี flow cytometry พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์เป็นสาเหตุทำให้เซลล์มะเร็งตับเฮปจี2 หยุดการเจริญไว้ที่ระยะ G2/M และเหนี่ยวนำการส่งต่อของเอนไซม์คาสเพส (caspases cascade) ในการตายแบบอะพอพโทสิส ในขณะที่สารสกัดจากน้ำร้อนมีผลดังกล่าวน้อยมาก สำหรับโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการควบคุมวัฏจักรเซลล์นั้นพบว่า สารสกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์มีฤทธิ์ลดระดับการทำงานของเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรส IIα และเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีน $p27^{Kip1}$ แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกโปรตีน $p21^{Cip1/Waf1}$ ผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่า สารสกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์ของใบหม่อน ซึ่งมีสารฟีนอลิคอยู่หลายชนิด สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งตับเฮปจี2 ที่ระยะ G2/M ผ่านทาง (i) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรส IIα (ii) เหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทสิส (iii) กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน $p27^{Kip1}$ ดังนั้นสารสกัดจากใบหม่อนที่เตรียมโดยตัวทำละลายอินทรีย์จึงมีศักยภาพในการต้านมะเร็งตับ

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....ชีวเวชเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2550.....

## 4676961333: MAJOR BIOMEDICINAL CHEMISTRY
KEY WORDS: *MORUS ALBA* L. / HEPG2 CELLS / PHENOLIC COMPOUNDS / ANTIOXIDANT CAPACITY / CELL CYCLE / APOPTOSIS / TOPOISOMERASE II

WANLAYA NAOWARATWATTANA: ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF MULBERRY LEAF EXTRACT CAPABLE OF INDUCING APOPTOSIS IN HepG2 CELLS, THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL Ph.D., 99 PAGES.

The extracts from the leaves of mulberry (*Morus alba* L.) have been used in the oriental medicine to treat various disorders including cancer. The objectives of this study were (1) to partially characterize and determine the total phenolic content and antioxidant capacity of mulberry leaf extracts and (2) to investigate the effect of the extracts prepared from different four solvents (100% methanol, 50% aqueous methanol, 1-butanol and hot water) on cytotoxicity effect of human hepatoma HepG2 cells. High performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection and mass spectrometry (HPLC-PDA-MS) were used. The organic extracts were found to contain compound of rutin, isoquercetin, kaempferol 3-rhanopyranosyl-glucopyranoside, quercetin 3-(6-malonylglucoside), astragalin and kaempferol 3-(6-malonylglucoside), and the hot water extract contained chlorogenic acid and caffeoyl quinic acid derivatives. The total phenolic contents of various extracts, measured by Folin-Ciocalteau assay were appeared to be in the range 1.80-3.52, 0.86-2.78, 0.46-1.50 g/100g dried leaves which were equivalent of chlorogenic acid, rutin, and gallic acid, respectively. All of the extracts inhibited 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), superoxide radical, hydroxyl radical and lipid peroxidation significantly in a dose-dependent manner. All the extracts had showed strong inhibition of cell proliferation of HepG2 cells. The 100% methanol extract appeared to possess higher cytotoxic effect to HepG2 cells than that of the normal human liver cells. Cell cycle distribution analysis and apoptosis, determined by flow cytometry, showed that the organic extracts caused cell cycle G2/M arrest and induced the caspases cascade for apoptosis. The hot water extract, on the other hand, showed very low effect. Among the proteins involved in the regulatory of cell cycle, the organic extracts reduced the enzyme level of topoisomerase IIα and increased that of $p27^{Kip1}$ with no significant effect on $p21^{Cip1/waf1}$. These results suggests that the phenolic-containing organic extracts of the mulberry leaves can inhibit HepG2 hepatoma cell population growth at G2/M phase through (i) inhibiting topoisomerase IIα, (ii) induced apoptosis processes, and (iii) induced the expression of $p27^{Kip1}$. The mulberry leaf extracts, prepared from organic solvents, therefore, have anticancer potential to suppress liver cancer.

Department .....Biochemistry.....Student's signature....Wanlaya.....
Field of study.....Biomedicinal Chemistry....Advisor's signature Wanchai De-Ek
Academic year.....2007.....

# ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank my advisor, Associate Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul and my co-supervisor, Associate Professor Dr. Elvira de Mejia whose help given me a great advice and helped me develop as a scientist, stimulating suggestions and encouragement helped me in all the time of research and writing of this thesis.

I want to thank the Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for giving me permission to commence this thesis in the first instance and to do the necessary research work.

I have furthermore to thank the entire group of Assistant Professor Dr. Elvira de Mejia and her staffs while I was under her supervision in 228 Edward R. Madigan Laboratory, Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois at Urbana-Champaign, IL USA, including friends in Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their friendship, cheerfulness and moral support.

I would like to express thanks Dr. Vallaya Suttikum in Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Mahasarakham University, for her arrangement providing the mulberry leaves samples that enabled this work to be done.

I am highly indebted to my parents, husband and daughter who are always with me, for their selfless love, affection and caring that helped me achieved my educational objectives.

I would like to express my gratitude to all those who gave me the possibility to complete this thesis. This work was kindly supported by grant of Cooperative Research Network (CRN) of Commission Higher Education, Thailand.

# CONTENTS

Page

ABSTRACT (Thai)..... iv

ABSTARCT (English)..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF TABLES..... x

LIST OF FIGURES..... xi

LIST OF ABBREVIATIONS..... xiii

CHAPTER I INTRODUCTION..... 1

Rationale of the Study..... 3

Objectives..... 5

CHAPTER II LITERATURE REVIEW..... 6

Liver Cancer or Hepatocellular Carcinoma..... 6

Oxidative Stress-Induced Cancer..... 9

Polyphenol Compounds..... 12

Cell Cycle and Tumor Development..... 16

Apoptosis and It Potential Pharmacological Target of Caspases..... 19

Topoisomerases as Biomarkers Screening for Chemopreventive Agents..... 22

*Morus alba*. L..... 25

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS..... 28

Chemicals and Materials..... 28

Methods..... 29

**Page**

Plant Material ..... 29

HepG2 Culture and Incubation Conditions ..... 29

Preparation of Aqueous and Organic Extracts of Mulberry leaves ..... 30

Total Polyphenol Content ..... 30

Characterization of Phenolic Compounds by HPLC-MS Analysis ..... 31

DPPH Radical Scavenging Activity ..... 32

Antioxidant Capacity Assay ..... 32

Superoxide Radical Scavenging Activity ..... 33

Hydroxyl Radical Scavenging Activity ..... 34

Lipid Peroxidation Assay ..... 35

Cell Viability ..... 36

Cell Cytotoxicity Assay ..... 36

Cell Cycle Analysis ..... 37

Assessment of Apoptosis ..... 38

Human Topoisomerase II Catalytic Activity ..... 39

SDS-PAGE and Western Blot Analysis of the Levels of Topoisomerase IIα, $p21^{Cip1}$/Waf and $p27^{Kip1}$ ..... 40

Statistical Analysis ..... 42

CHAPTER IV RESULTS ..... 43

Yield of Solvent Extracts, Total Polyphenol Contents and Phenolic Profiles ..... 43

Antioxidant Capacity ..... 49

**Page**

Inhibition of Cell Proliferation on HepG2 and Normal Human Liver Cells ..... 51

Effect on Cell Cycle Progression ..... 54

Apoptotic Induction ..... 56

Inhibition of human topoisomerase IIα ..... 58

The Expression of topoisomerase IIα , $p21^{Cip1/Waf1}$ and $p27^{Kip1}$ Proteins in HepG2 Cells ..... 62

CHAPTER VDISCUSSION AND CONCLUSION ..... 64

REFFERENCES ..... 76

APPENDICES ..... 92

CURRICUM VITAE ..... 99

# LIST OF TABLES

**Page**

Table 1 Extract Yields and Total Polyphenol Contents of Different Solvents Extracts of Mulberry Leaves.....46

Table 2 LC-DAD-MS Characteristics of Phenols Identified in the 100% Methanol Extract of Mulberry Leaves.....48

Table 3 Antiradical Capacity of Different Solvents Extracts of Mulberry Leaves. .....50

# LIST OF FIGURES

**Page**


Figure 1 Leading cancer in four registries in Thailand. ..... 7

Figure 2 Molecular model for hepatocarcinogenesis. ..... 9

Figure 3 The stages model of carcinogenesis and the level of carcinogenic effect vs. level of free radicals ..... 10

Figure 4 Representative structures of selected classes of dietary polyphenols. ..... 14

Figure 5 Molecular targets of dietary agents. ..... 15

Figure 6 The mammalian cell cycle. ..... 18

Figure 7 Caspase signaling and its modulation. ..... 21

Figure 8 Human DNA topoisomerases and their expression throughout the cell cycle. ..... 23

Figure 9 HPLC chomatogram at 260 nm of various mulberry tea extracts. ..... 47

Figure 10 Inhibition of cell proliferation (%) of HepG2 cells. ..... 52

Figure 11 Cell viability of HepG2 and normal human liver cells ..... 53

Figure 12 The effect of the various mulberry leaf extracts on cell cycle distribution of HepG2 cells ..... 55

Figure 13 Quantitative analysis of apoptosis cells on HepG2 cells. ..... 57

Figure 14 Representative relaxation assay for determining the inhibition of catalytic activity on human topoisomerase IIα. ..... 60

Figure 15 Anti-topoisomerase IIα activity effected by concentrations of various of mulberry leaf extracts.. ..... 61

**Page**

Figure 16 The expression of topoisomerase IIα, $p21^{Cip1/Waf1}$ and $p27^{Kip1}$ proteins in HepG2 cells treated with 100% methanol extract of mulberry leaves ..... 63

# LIST OF ABBREVIATIONS

| | |
|---|---|
| cm | centimetre(s) |
| °C | degree Celsius |
| g | gram(s) |
| h | hour(s) |
| L | liter(s) |
| mAU | milli absorbance units |
| mg | milligram(s) |
| mL | millilitre(s) |
| mm | millimetre(s) |
| min | minute(s) |
| nm | nanometre(s) |
| % (v/v) | percentage volume for volume |
| % (w/w) | percentage weight for weight |
| µL | microlitre(s) |
| µm | micrometre(s) |
| µM | micromolar (s) |
| UV/VIS | ultraviolet/visible |
| AFB | aflatoxin B1 |
| ANOVA | analysis of variance |
| ASR | age-standardized incidence rate |
| CA | chlorogenic acid |
| CCK-8 | cell counting kit-8 |
| CV | coefficient of variation |
| DAD | diode array detection |
| DE | dried extract (s) |
| DL | dried leaf |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| DPPH | 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl |
| EMEM | Eagle's Minimum Essential Medium |

| | |
|---|---|
| $ESI^+$ | positive electrospay ionization |
| FBS | fetal bovine serum |
| FLICA | a fluorescent inhibitor of caspases |
| FMK | a fluoromethyl ketone |
| GA | gallic acid |
| HBV | hepatitis B virus |
| HCC | hepatocellular carcinoma |
| HCV | hepatitis C virus |
| HPLC | high performance liquid chromatography |
| %IA | the percentage inhibitory activity |
| $IC_{50}$ | Inhibitory concentration 50% |
| LSD | least significant difference |
| MS | mass spectra |
| PBS | phosphate buffer saline |
| PDA | photodiode array |
| PI | propidium iodide |
| SD | standard deviation |
| SE | solid extract (s) |
| SEM | standard error of measurement or mean |
| TEAC | trolox equivalent antioxidant capacity |
| US | United States (of America) |
| UV | ultraviolet |
| VAD | valine-alanine-aspartic ac |