Project Code: MRG5680080

Project Title: Anticancer activities of crude extracts from Annonaceae family on some human cancer cell lines

Investigator: Mr. Pathrapol Lithanatudom, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

E-mail Address: pathrapol_li@hotmail.com

Project Period: 3 years

Abstract

The aim of this study was to test the anticancer effect of the crude extracts from leaves and stems of 4 species of Annonaceae plants (*Uvaria longipes, Dasymaschalon* sp*., Artabotrys burmanicus,* and *Marsypopetalum modestum*). The first step was to test the ability of crude extracts to induce cancer cell death of 8 cancer cell lines (HeLa, SiHa, CaSki, HepG2, Hep3B, K562, U937, and RAJI). This was examined via Annexin V-FITC and Propidium Iodine (PI) double-staining for identifying the type of cell death which can be either necrosis or apoptosis. The results are shown as two parameter dot plot and the percentages of each type of stained cells were identified from particular quadrants indicating different stages and types of cell death. The anti-cancer activity of each crude extract was determined by combining percentages of early and late apoptotic cell death. The crude extract from the stem of *Uvaria longipes* could induce apoptosis in all cancer cell lines examined. On the other hand, crude extract from leaves of *Uvaria longipes*, crude extracts from stems and leaves of *Dasymaschalon* sp., *Artabotrys burmanicus* and *Marsypopetalum modestum* had particular effects varying among cancer cell lines suggesting a cell type specific manner. Crude extracts from stems of *Uvaria longipes* and leaves of *Marsypopetalum modestum* were subjected to cell cycle analysis. The investigation was achieved by PI staining the DNA content within cells at various phases of the cell cycle. Results showed that while crude extract from stems of *Uvaria longipes* arrested cell proliferation of some cancer cell lines (HeLa, CaSki, HepG2, K562, U937, and RAJI) and led to accumulation of cells in Sub-G1 phase, crude extracts from leaves of *Marsypopetalum modestum* also showed cell cycle arrest and increased percentages of cell in Sub-G1 in some cancer cell lines (HeLa, CaSki, HepG2, K562, U937, and RAJI) but with weaker activity as compared with those from *Uvaria longipes.* However, these results are preliminary screening, phytochemical studies are needed to identify active compounds primarily involved with anti-cancer activity to guarantee the therapeutic application against cancer.

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบจากส่วนใบและส่วนลำต้นของพืชวงศ์กระดังงา 4 ชนิดซึ่งประกอบด้วย *Uvaria longipes Dasymaschalon* sp. *Artabotrys burmanicus* และ *Marsypopetalum modestum*โดยขั้นตอนแรกเป็นการทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบในการเหนี่ยวนำเซลล์เชื้อสายมะเร็ง 8 ชนิด (HeLa SiHa CaSki HepG2 Hep3B K562 U937 และ RAJI) ให้เกิดการตาย ซึ่งตรวจสอบโดยการย้อมเซลล์ดังกล่าวด้วยสี Annexin V-FITC ร่วมกับ Propidium Iodine (PI) เพื่อระบุชนิดการตายของเซลล์ว่าเป็นเนโครซิสหรืออะพอพโทซิส โดยสามารถวิเคราะห์จากรูปแบบการติดสีย้อมดังกล่าว ด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ ผลที่ได้จะแสดงในรูปของ two parameter dot plot และค่าร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสีในแต่ละรูปแบบ การตัดสินความสามารถในการต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบมาจากค่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสซึ่งมาจากผลรวมของค่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะแรกและเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะสุดท้าย จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากลำต้นของ *Uvaria longipes* สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เชื้อสายมะเร็งทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองมีการตายแบบอะพอพโทซิส ซึ่งต่างจากสารสกัดหยาบชนิดอื่นๆ อาทิเช่น สารสกัดหยาบจากใบ *Uvaria longipes* สารสกัดหยาบจากลำต้นและใบของ *Dasymaschalon* sp. สารสกัดหยาบจากลำต้นและใบของ *Artabotrys burmanicus* และสารสกัดหยาบจากลำต้นและใบของ *Marsypopetalum modestum* ซึ่งมีผลต่อเซลล์เชื้อสายมะเร็งบางชนิดเท่านั้น จากนั้นสารสกัดหยาบจากลำต้นของ *Uvaria longipes*และ สารสกัดหยาบจากใบของ *Marsypopetalum modestum* ซึ่งออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด ถูกเลือกนำไปศึกษาผลการแทรกแซงวัฏจักรเซลล์ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งตรวจสอบด้วยการย้อมเซลล์ด้วยสี PI เพื่อดูระยะต่างๆ ของเซลล์ผ่านปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์ พบว่า สารสกัดหยาบจากลำต้นของ *Uvaria longipes* สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HeLa CaSki HepG2 K562 U937 และ RAJI หยุดการแบ่งตัวและเหนี่ยวนำเซลล์เข้าสู่ระยะ Sub-G1 เช่นเดียวกับ สารสกัดหยาบจากใบของ *Marsypopetalum modestum* สามารถชักนำให้ HeLa CaSki HepG2 K562 U937 และ RAJIหยุดการแบ่งตัวและเหนี่ยวนำเซลล์เข้าสู่ระยะ Sub-G1ได้ แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าสารสกัดหยาบจากลำต้นของ *Uvaria longipes* อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้ยังเป็นแค่การทดสอบเบื้องต้น ดังนั้นการศึกษาต่อยอดจึงมีความจำเป็นเพื่อค้นหาองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อไป