LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY
2 8 JUN 2001

INDUCTION OF QUINONE REDUCTASE IN HEPA 1C1C7 MURINE HEPATOMA CELL LINE BY NEEM (*AZADIRACHTA INDICA* A. JUSS VAR. *SIAMENSIS* VALETON) FLOWER CONSTITUENTS

HATHAITIP SRITANAUDOMCHAI

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2001

ISBN 974-665-658-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
H 363 i
2001
c.2

Copyright by Mahidol University

4036430 SCBC/M: MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS : QUINONE REDUCTASE / NEEM FLOWERS /NIMBOLIDE / CHLOROPHYLLS/ β-SITOSTEROL / HEPA 1C1C7

HATHAITIP SRITANAUDOMCHAI : INDUCTION OF QUINONE REDUCTASE IN HEPA 1C1C7 MURINE HEPATOMA CELL LINE BY NEEM (*AZADIRACHTA INDICA* A. JUSS VAR. *SIAMENSIS* VALETON) FLOWER CONSTITUENTS. THESIS ADVISORS : THANIT KUSAMRAN, Ph.D., WANNEE KUSAMRAN, Ph.D., SUMALEE TUNGPRADABKUL, Ph.D.
109 p. ISBN 974-665-658-9

Dietary administration of neem flowers (*Azadirachta indica* A. Juss var. *siamensis* valeton) has been previously demonstrated to reduce aflatoxin-induced tumors in experimental rats with observations of increased glutathione-*S*-transferase (a phase II enzyme) and decreased levels of many phase I enzyme activities (Kusamran WR, Ratanavila A, and Tepsuwan A. Food and Chem Toxicol 1998;36:475-84). A potential mechanism of dietary anticarcinogenesis is believed to involve the induction of detoxifying phase II enzymes, neem flower extracts were fractionated in the study to examine active compounds capable of inducing quinone reductase (QR), an important phase II detoxification enzyme, in murine Hepa 1c1c7 cell culture. Sequential extracts of neem flowers by petroleum-ether and chloroform significantly induced Hepa 1c1c7 QR activity (CD = 6.8 and 2.0 μg/ml, respectively). The last two extracts by ethyl-acetate and methanol showed slight increases of the enzyme activity (CD = 13.0 and 23.3 μg/ml, respectively). Petroleum-ether and chloroform extracts were shown capable of elevating the cell-cultured QR activity without stimulatory effect on the QR activity when added directly into Hepa 1c1c7 cell-free lysate. This indicates that the increase was not due to direct activation of the enzyme activity. Chlorophylls and nimbolide were identified as major components in the chloroform extract and both compounds significantly increased QR activity with CD values = 3.9 μg/ml and 0.40 μM, respectively). β-sitosterol (CD > 60 μM) was found not only in the inactive fraction of petroleum-ether extract, but it also showed no significant effect on the QR activity. QR mRNA levels in the cell culture treated by either petroleum-ether or chloroform extracts significantly increased as measured by Northern blot and QR cDNA hybridization. Chlorophylls and nimbolide also increased QR mRNA levels in the cell culture. The results demonstrated that chlorophylls and nimbolide in neem flowers were capable of increasing QR activity in Hepa 1c1c7 cells by promoting QR mRNA expression. Therefore, these two compounds could be further investigated for their potential uses as chemopreventive agents.

Copyright by Mahidol University

4036430 SCBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

หทัยทิพย์ ศรีธนอุดมชัย : การเหนี่ยวนำเอ็นไซม์ QUINONE REDUCTASE ในเซลล์มะเร็งตับ HEPA 1C1C7 โดยสารประกอบจากดอกสะเดา (INDUCTION OF QUINONE REDUCTASE IN HEPA 1C1C7 MURINE HEPATOMA CELL LINE BY NEEM (*AZADIRACHTA INDICA* A. JUSS VAR. *SIAMENSIS* VALETON) FLOWER CONSTITUENTS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ธนิต คูสำราญ, Ph.D., วรรณี คูสำราญ, Ph.D., สุมาลี ตั้งประดับกุล, Ph.D., 109 หน้า.
ISBN 974-665-658-9

Quinone reductase เป็นเอ็นไซม์สำคัญที่อยู่ในกระบวนการปฏิกิริยาที่เรียกว่า phase II detoxification system ซึ่งมีบทบาทสำคัญช่วยกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย

ได้มีการรายงานว่าการผสมดอกสะเดาในอาหารสามารถลดอัตราการเกิดมะเร็งที่กระตุ้นโดยอะฟลาทอกซินพร้อมทั้งพบการทำงานเพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์ phase II detoxification system ในตับของหนูทดลอง (Kusamran WR, Ratanavila A, and Tepsuwan A. Food and Chem Toxicol 1998;36:475-84). วัตถุประสงค์ในการศึกษาของวิทยานิพนธ์นี้เพื่อวิเคราะห์หาสารเคมีที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวในดอกสะเดาโดยใช้วิธีมาตรฐานที่กระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ quinone reductase ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งตับ (Hepa 1c1c7)

ดอกสะเดาถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ petroleum-ether, chloroform, ethyl-acetate, และ methanol ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าส่วนสกัดของดอกสะเดาโดย petroleum-ether และ chloroform ในลำดับที่ 1 และ 2 มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ quinone reductase ได้ดีกว่าส่วนสกัดของดอกสะเดาโดย ethyl-acetate และ methanol ใน 2 ขั้นตอนสุดท้าย เมื่อเติมส่วนสกัดจากดอกสะเดาทั้ง petroleum-ether และ chloroform ในเซลล์มะเร็งตับ Hepa 1c1c7 ซึ่งถูกทำให้เซลล์แตก พบว่าไม่มีผลกระทบใดๆต่อการทำงานของเอ็นไซม์แสดงว่าสารดังกล่าวมิได้กระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ quinone reductase โดยตรง ในส่วนสกัดของดอกสะเดาโดย petroleum-ether และchloroform พบว่ามีสารประกอบหลักอยู่ 3 ชนิดคือ β-sitosterol, chlorophylls, และ nimbolide การทดสอบโดยใช้สารแยกบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิดพบว่า β-sitosterol ไม่มีผลในการกระตุ้นเอ็นไซม์ quinone reductase ในขณะที่ chlorophylls และ nimbolide ต่างก็มีผลกระตุ้นให้การทำงานของเอ็นไซม์ในเซลล์เพาะเลี้ยงสูงขึ้น ในการวัดการแสดงออกของ mRNA โดยใช้วิธี Northern blot พบว่าสารสกัดดอกสะเดาโดย petroleum-ether, โดย chloroform รวมทั้ง chlorophylls และ nimbolide บริสุทธิ์เพิ่มการสังเคราะห์ปริมาณ mRNA ของเอ็นไซม์ดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า chlorophylls และ nimbolide ซึ่งเป็นสารประกอบในดอกสะเดาสามารถกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ quinone reductase ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งตับ Hepa 1c1c7 โดยกลไกเพิ่มการสังเคราะห์ปริมาณ mRNA ของเอ็นไซม์ จากผลการทดลองดังกล่าวเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไปถึงผลของ chlorophylls และ nimbolide ต่อการกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์อื่นๆในกลุ่ม phase II detoxification system ในสัตว์ทดลอง ซึ่งเป็นกลวิธีเบื้องต้นในการประเมินศักยภาพของสารทั้งสองชนิดนี้ในการป้องกันมะเร็ง

Copyright by Mahidol University