ABSTRACT

Project Code: BRG5380002

Project Title: Study of inhibition activity by plant extract compounds against mosquito vector cytochrome P450 enzymes

Investigators: Pornpimol Rongnoparut, Ph.D. Principal investigator
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University
Email: pornpimol.ron@mahidol.ac.th
Ekaruth Srisook, Ph.D.
Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University
Songklod Sarapusit, Ph.D.
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University
Nuananong Jirakanjanakit, Ph.D.
Molecular Biosciences, Mahidol University

Project Period: 3 years (June 2010 –May 2013)

Abstract:

Insecticide resistance is a growing problem in the control of mosquito vectors. Increase in insecticide detoxification by heme-containing cytochrome P450 monooxygenases (P450s) in insects has been thought to promote resistance to insecticides, i.e. deltamethrin pyrethroid compound. Plant compounds that have both insecticidal activity and synergistic action with insecticides, due to inhibition of insect detoxification enzymes, could be a source for insect vector control. Previous investigations indicated CYP6AA3 and CYP6P7, isolated from deltamethrin-resistant *Anopheles minimus* malaria mosquito, play role in pyrethroid resistance. Enzymatic assays and 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-y-l)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) cytotoxicity assays support the role of CYP6AA3 and CYP6P7 in metabolisms of pyrethroids. Thus the mosquito enzymes, CYP6AA3 and CYP6P7 could be a model for finding of natural compounds with inhibitory potential against pyrethroid detoxification enzymes. We report development of *in vitro* fluorescence-based and MTT cytotoxicity assays using P450-expressing *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells for rapid screening of inhibitory compounds and synergistic effect of inhibitors with pyrethroid insecticides, respectively. Since there has been no known crystal structure available for insect P450s, we have built homology model of CYP6AA3 in an attempt to increase our understanding of molecular mechanisms underlying binding site toward insecticides and inhibitors. We have screening 7 crude plant extracts including *Calotropis procera*, *Citrus reticulata*, *Stemona spp.*, *Curcuma longa* rhizomes and leaves, *Derris trifoliata*, *Andrographis paniculata* and *Rhinacanthus nasutus*. We found that *C. longa* rhizomes and leaves, *D. trifoliata*, *A. paniculata* and *R. nasutus* contained high inhibitory activities against both enzymes. Due to complexity of compounds in *C. longa*, we could not identify compounds that possess inhibition effects. Nevertheless at least three purified naphthoquinone esters isolated from *R. nasutus* and two polyoxygenated flavones specific to *Andrographis sp.* were found possessing inhibitory effect against mosquito P450 enzymes. These compounds comprising chromane ring acted synergistically with pyrethroid toxicity based on cell-based assays. Moreover preliminary results of larvicidal tests on *Aedes aegypti* mosquitoes of plant extracts were in agreement of inhibitory potency against mosquito detoxification P450 enzymes. Results obtained will thus be beneficial to implement effective resistance management of mosquito vector.

Keywords: cytochrome P450, pyrethroids, inhibition, rhinacanthins, flavones

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: BRG5380002

ชื่อโครงการ: การศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ของยุงพาหะโดยสารสกัดจากพืช

คณะผู้วิจัยและสังกัด

รองศาสตราจารย์ พรพิมล รงค์นพรัตน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์เอกรัฐ ศรีสุข ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
อาจารย์ทรงกลด สารภูษิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ดร นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

ระยะเวลาโครงการ: มิถุนายน 2553 – พฤษภาคม 2556

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการดื้อยาฆ่าแมลงในยุงพาหะเป็นปัญหาสำคัญต่อการควบคุมประชากรของยุง เนื่องจากยุงมีการแสดงออกของเอนไซม์ Cytochrome P450 monooxygenase (P450s) ที่กำจัดยาฆ่าแมลงจากยุงเพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้ยุงเกิดการดื้อต่อยาฆ่าแมลง เช่น สารเดลต้าเมทริน (deltamethrin) และ สารไพรีทรอยด์ (pyrethroid) การใช้สารประกอบจากพืชซึ่งมีฤทธิ์เป็นทั้งยาฆ่าแมลง และมีฤทธิ์ในการเพิ่มประสิทธิภาพแก่ยาฆ่าแมลง สามารถใช้ในการควบคุมยุงที่ดื้อต่อยาฆ่าแมลงโดยสารเหล่านี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษออกจากแมลง ดังนั้น สารประกอบเหล่านี้สามารถนำมาใช้ในการควบคุมยุงที่ดื้อต่อยาฆ่าแมลงได้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ระบุว่า เอนไซม์ CYP6AA3 และ CYP6P7 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ได้จากยุงก้นปล่อง (*Anopheles minimus*) พาหะนำโรคมาลาเรียที่ดื้อต่อยาฆ่าแมลงเดลต้าเมทรินเกี่ยวข้องกับการดื้อยาฆ่าแมลงในยุง นอกจากนี้ยังมีข้อมูลที่ได้จากการศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์ทั้งสอง และผลจาก 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-y-l)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) cytotoxicity assays สนับสนุนหน้าที่ของเอนไซม์ CYP6AA3 และ CYP6P7 ในการกำจัดไพรีทรอยด์ จากข้อมูลข้างต้น เอนไซม์ CYP6AA3 และ CYP6P7 จึงสามารถนำมาเป็นต้นแบบในการศึกษากลไกการกำจัดสารพิษ และค้นหาสารประกอบจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดไพรีทรอยด์ เทคนิคในการค้นหาสารประกอบจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ได้ถูกพัฒนาขึ้น 2 วิธีคือใช้เทคนิค in vitro fluorescence-based ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และเทคนิคในการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของตัวยับยั้งร่วมกับไพรีทรอยด์ ด้วยเทคนิค MTT cytotoxicity assay โดยใช้เซลล์ *Spodoptera frugiperda* (Sf9) ซึ่งเป็นเซลล์ของแมลงที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ P450s เป็นต้นแบบในการศึกษา เนื่องจากไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของเอนไซม์ P450s ของแมลง ดังนั้นแบบจำลองของ CYP6AA3 และ CYP6P7 จึงได้ถูกสร้างขึ้น เพื่อศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์ในการกำจัดยาฆ่าแมลง ตลอดจนศึกษากลไกการยับยั้งการทำงานของตัวยับยั้งต่อเอนไซม์ นอกจากนี้ การศึกษานี้ได้ทำการค้นหาสารประกอบซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของทั้ง 2 เอนไซม์จากสารสกัดของพืช 7 ชนิด ได้แก่ ต้นรัก (*Calotropis procera*), ส้มโชกุน (*Citrus reticulate*), หนอนตายอยาก (*Stemona spp.*), ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ในส่วนของเหง้า และใบ, ถอบแถบ (*Derris trifoliata*), ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และ ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) จากการศึกษาพบว่า สารสกัดจากเหง้าและใบของขมิ้นชัน, ถอบแถบ, ฟ้าทะลายโจร และทองพันชั่ง ประกอบไปด้วยสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของทั้งสองเอนไซม์ ผลจากการศึกษานี้ทำให้ได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ P450s ในยุงได้สารอย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ naphthoquinone esters ซึ่งแยกได้จากทองพันชั่ง และpolyoxygenated flavones ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความจำเพาะกับพืชตระกูล *Andrographis* สารเหล่านี้ประกอบด้วย chromane ring ซึ่งทำหน้าที่ในการเสริมฤทธิ์ให้กับไพรีทรอยด์ เนื่องจากขมิ้นชันประกอบด้วยสารประกอบที่ซับซ้อน จึงไม่สามารถระบุโครงสร้างของสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองได้ นอกจากนี้ ผลการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำของยุงลาย (*Aedes aegypti*) ด้วยสารสกัดจากพืชสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการกำจัดสารพิษของเอนไซม์ P450s ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการควบคุมยุงที่ดื้อต่อยาฆ่าแมลงต่อไป

คำหลัก *ไซโตโครมพี* 450 *ไพรีทรอยด์ การยับยั้งเอนไซม์* ไรน่าแคนทิน ฟลาโวน