

Thesis Title	Effect of Purple Rice (<i>Oryza sativa</i> L. <i>indica</i>) Extract on the Initiation Stage of Colon Carcinogenesis in Rats
Author	Mr. Ratasark Summart
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Teera Chewonarin

ABSTRACT

Purple rice (*Oryza sativa* L. *indica*) has currently become an interesting natural product which is widely used for health promotion. It contains high amounts of hydrophilic phenolic compounds, especially anthocyanins, which have positive health benefits. This study aimed to investigate the effect of purple rice extract (PRE) mixed diet on initiation stage of rat colon carcinogenesis and to elucidate its underlying mechanism of chemopreventive effect. Firstly, to determine the effect of purple rice extract on dimethylhydrazine (DMH)-induced aberrant crypt foci formation in Wistar rats, the experimental groups were fed *ad libitum* with 0.2% or 2% PRE mixed diet for 1 week before administration of DMH (40 mg/kg of body weight once a week for 2 weeks) and 5 weeks along the experimental period. Then, rats were sacrificed and the formation of aberrant crypt foci (ACF) was scored. The result showed that only DMH administrated group exhibited the highest distribution of ACF in the distal part. Rats received either 0.2% or 2% PRE in diet plus DMH showed significant lower numbers of ACF in rat colon compared to the normal diet group treated with DMH. To investigate the mechanism of PRE on DMH-induced colon carcinogenesis, DNA methylation level of colon and liver genome was determined by HPLC analysis of O⁶-methylguanine (O⁶-MeGua) content. The level of O⁶-MeGua was increased in the colonic mucosa of the DMH treated control normal diet group which correlated well with the increased ACF formation. Rat received DMH with 2% PRE in diet demonstrated the reduction of O⁶-MeGua content in the colon genome which significantly differed from the positive control group, whereas this effect was not

observed in the liver genome. Afterward, the activity of xenobiotic metabolism enzymes, glutathione-S-transferase (GST) and UDP-glucuronyltransferase (UDPGT) was measured *in vitro* using the homogenate of rat liver. There was no difference in both activities of GST and UDPGT between the DMH-treated groups administrated with normal diet and that with PRE mixed diet. Interestingly, in rats treated with DMH alone, the activity of β -glucuronidase in rat feces were higher significantly compared to control group. In contrast, dietary consumption of PRE in rats resulted in the lower activity of fecal β -glucuronidase after DMH injection on 1st and 2nd weeks. PRE also contained unknown compound(s) acting as a non-competitive inhibitor against *E. coli* β -glucuronidase, *in vitro*. Therefore, PRE likely modulates the critical process of free methylazoxymethanol (MAM) generation in rat colon. These results suggest a chemopreventive mechanism of PRE by which the inhibition of β -glucuronidase activity by PRE in the colonic lumen reduced the MAM-induced DNA methylation, leading to the low number of ACF formation in rat colon. Thus, food supplementation with purple rice extract possibly prevents the initiation stage of colon carcinogenesis by the alteration of colonic environment. Finally, the health benefits of purple rice may be further applicable to nutraceutical products for colon cancer prevention.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดข้าวกล้องต่อระยะเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูขาว
ผู้เขียน	นายรัฐศักดิ์ สุ่มมาศย์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. ชีระ ชีวรินทร์

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันข้าวกล้องกลายเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่กำลังได้รับความสนใจสำหรับใช้ในการส่งเสริมสุขภาพ ข้าวกล้องประกอบไปด้วยสารประกอบฟีนอล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แอนโทไซยานินในปริมาณสูง ซึ่งมีฤทธิ์บำรุงสุขภาพ การศึกษาครั้งนี้มีเป้าหมายที่จะตรวจสอบฤทธิ์ของอาหารผสมสารสกัดข้าวกล้องต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะเริ่มต้นในหนูขาวและศึกษากลไกการออกฤทธิ์ป้องกันของสารสกัด การทดลองแรกศึกษาผลของสารสกัดข้าวกล้องต่อการสร้างรอยโรคเริ่มต้นของมะเร็งลำไส้ใหญ่ (ACF) ในหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยไดเมทิลไฮโดรคาร์บิน (DMH) โดยกลุ่มทดลองจะได้รับอาหารผสมสารสกัดข้าวกล้องที่ความเข้มข้น 0.2% หรือ 2% เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนการฉีด DMH (40 มก./กก. น้ำหนักตัว ฉีดสัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์) และให้อาหารผสมเป็นเวลา 5 สัปดาห์ตลอดการทดลอง จากนั้นหนูทุกกลุ่มได้รับการทำการุณยฆาตและทำการนับจำนวน ACF ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มควบคุมบวกลที่ได้รับ DMH อย่างเดียวมีการกระจายของจำนวน ACF มากที่สุดในบริเวณลำไส้ใหญ่ส่วน distal หนูที่ได้รับ อาหารผสมสารสกัดข้าวกล้องความเข้มข้น 0.2% และ 2% ร่วมกับ DMH มีจำนวน ACF ในลำไส้ใหญ่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติร่วมกับ DMH สำหรับการศึกษากลไกของสารสกัดข้าวกล้องต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยการเหนี่ยวนำของ DMH โดยการตรวจสอบระดับเมทิลเลชันของดีเอ็นเอ (DNA methylation) ในจีโนมของลำไส้ใหญ่และตับ โดยการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลกวานีน (O^6 -methylguanine, O^6 -MeGua) ด้วย HPLC ผลการทดลองพบว่า ปริมาณ O^6 -MeGua ในเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่เพิ่มขึ้นในหนูที่ได้อาหารปกติร่วมกับ DMH ซึ่งสัมพันธ์กับจำนวน ACF ที่เพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับอาหารผสมสารสกัด

ข้าวกล้า 2% ร่วมกับ DMH มีการลดลงของ O⁶-MeGua ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุมบวก แต่การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่พบในจีโนมตับ ต่อจากนั้นทำการวัดกัมมันตภาพในหลอดทดลองของเอนไซม์ในเมแทบอลิซึมการกำจัดสารพิษในตับคือ กลูตาไทโอน-เอส-ทรานสเฟอเรส (Glutathione-S-transferase) และ ยูดีพี-กลูคูโรนิล ทรานสเฟอเรส (UDP-Glucuronyltransferase) ผลการทดลองไม่พบความแตกต่างของกัมมันตภาพของเอนไซม์ทั้งสองชนิดระหว่างหนูกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดข้าวกล้าและกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติร่วมกับ DMH นอกจากนี้หนูที่ได้รับ DMH อย่างเดียวมีระดับกัมมันตภาพของเบต้า-กลูคูโรนิเดส (β -glucuronidase) ในอุจจาระสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ส่วนหนูที่ได้รับสารสกัดข้าวกล้ามีระดับกัมมันตภาพของ β -glucuronidase ในอุจจาระลดลงภายหลังฉีด DMH ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 สารสกัดข้าวกล้ามีสารประกอบบางชนิดที่เป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขันต่อ β -glucuronidase ของแบคทีเรีย *E. coli* ในหลอดทดลอง ดังนั้นสารสกัดข้าวกล้าอาจควบคุมกระบวนการสร้างเมทิลเอซอกซีเมทานอล (methylazoxymethanol, MAM) อิสระในลำไส้ใหญ่ ผลการทดลองเหล่านี้สนับสนุนกลไกการป้องกันของสารสกัดข้าวกล้าโดยยับยั้ง β -glucuronidase และ DNA methylation ที่เกิดจาก MAM ในเยื่อผนังลำไส้ใหญ่ ส่งผลทำให้มีจำนวน ACF น้อยลงในลำไส้ของหนู ดังนั้น การเสริมอาหารด้วยสารสกัดข้าวกล้าจึงน่าจะป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะเริ่มต้นโดยการเปลี่ยนแปลงสถานะในลำไส้ใหญ่ ท้ายสุดนี้ คุณประโยชน์เชิงสุขภาพของข้าวกล้าอาจจะสามารถนำไปประยุกต์เข้าได้กับผลิตภัณฑ์ด้านโภชนเภสัชสำหรับการป้องกันโรคมะเร็งต่อไป