

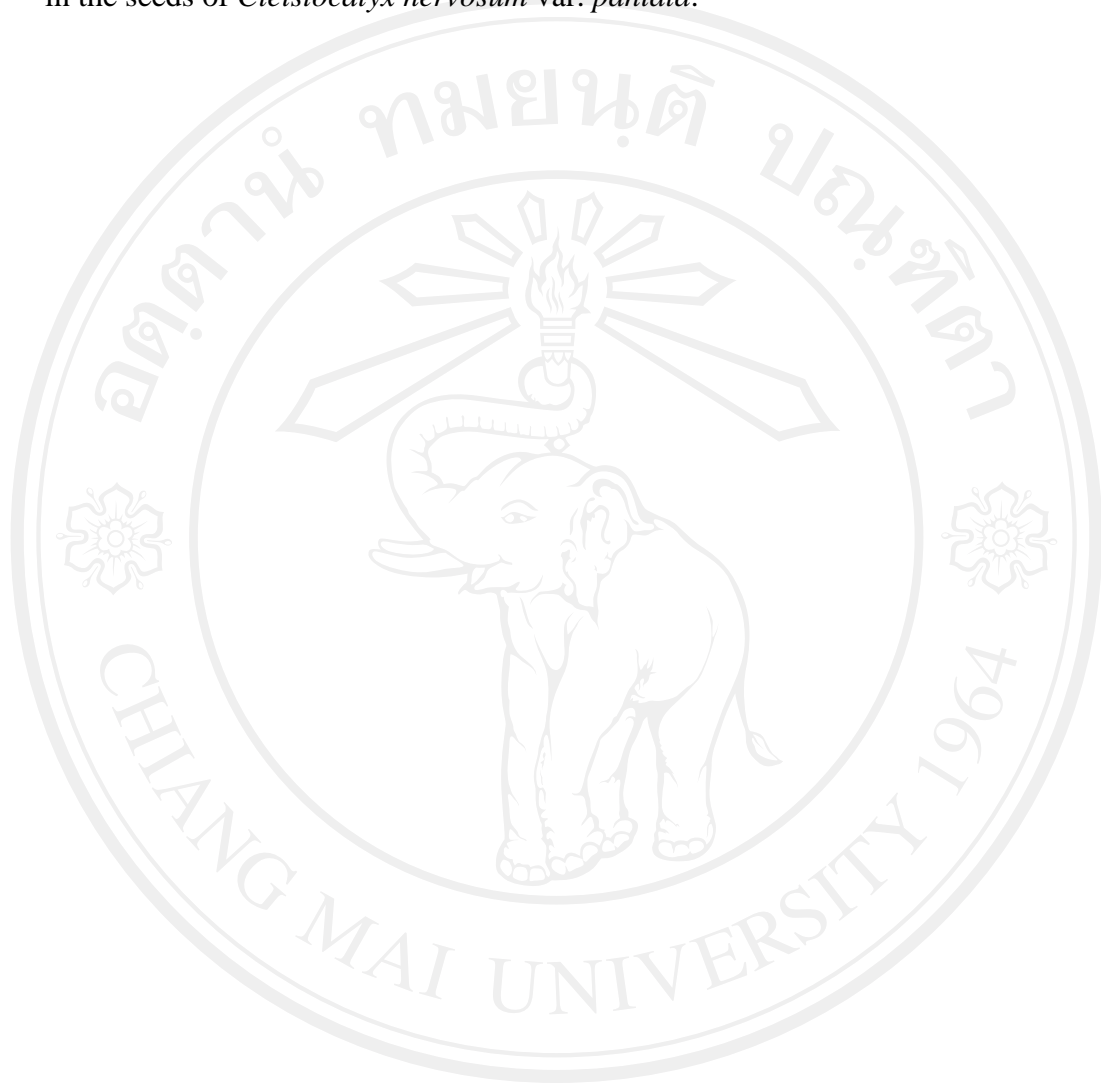
Thesis Title	<i>In Vitro</i> Cytotoxicity and Inhibitory Mechanism on Carcinogenesis in Rats of <i>Cleistocalyx nervosum</i> var. <i>paniala</i> Seed Extract
Author	Miss Arpamas Chariyakornkul
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai Advisor Asst. Prof. Dr. Ariyapong Wongnoppavich Co-advisor

ABSTRACT

Cleistocalyx nervosum var. *paniala* is a local fruit mainly cultivated in the Northern Thailand. Our previous studies revealed that the dichloromethane extract of *C. nervosum* seed presented antimutagenicity and anticlastogenicity. Moreover, 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone (DMC) isolated from *C. nervosum* seeds had a strong antimutagenicity against several mutagens using Ames test. This study focused on anticarcinogenicity of *C. nervosum* seeds extract both in *in vitro* and animal models and their possible cancer chemopreventive mechanism in rats. Six partially purified fractions (MK1-6), pure compounds (DMC and hariganetin) and their parent dichloromethane extract were investigated cytotoxic effects on several cancer cell lines including lung (A549), liver (HepG2), colon (SW620) compared to normal fibroblast (MRC5). Crude extract showed potent cytotoxic effect on A549, while MK4 presented the strongest cytotoxicity on HepG2 and SW620 as well as MRC5 cell. DMC exhibited the most potent cytotoxicity on A549 and SW620 cells. The total growth inhibition (TGI) values of crude extract, MK4, and DMC also presented strong cytotoxicity on all cell lines compared to other fractions. TGI concentration of these extracts in SW620 cells were lesser than the other cell lines. These results indicated that the crude extract, MK4 and DMC were effective compounds which inhibit cancer cell growth especially colon cancer. Moreover, *C. nervosum* seed extracts have a selective toxicity on colon cancer cell. Furthermore, we evaluated NAD(P)H quinone oxidoreductase (NQO) induction activity of *C. nervosum* seeds in Hepa1c1c7 cell, a marker for screening

anticarcinogenic enzyme activity. The results showed the crude extract and MK5 were effective NQO activity inducers which the values of concentration required to double NQO induction activity were 3.47 and 3.23 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Therefore, the DMC was further examined the carcinogenicity and anticarcinogenicity compared to crude extract in animal model. Male Wistar rats were injected by diethylnitrosamine (DEN) to initiate hepatocarcinogenesis and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) to initiate colorectal carcinogenesis. After 1 week of the last injection, 200 and 400 mg/kg bw of crude extracts and 20 mg/kg bw of DMC were orally administrated for 10 consecutive weeks. Glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) positive foci and aberrant crypt foci (ACF) were used as the end point markers for preneoplastic lesions of hepatocarcinogenesis and colorectal carcinogenesis, respectively. The *C. nervosum* seed extract did neither produce GST-P nor ACF in liver and colon of rats. DMC and crude extract of *C. nervosum* seeds did not modulate the number of GST-P positive foci in the livers of DEN and DMH-treated rats. The treatment of crude extract at low dose and DMC during post-initiation phase statistically reduced the number of ACF in the colon of carcinogens-treated rats but did not affect on ACF size. Furthermore, the crude extract and DMC also significantly reduced the number of PCNA positive cells in the colon of carcinogens treated rats. DMC also significantly decreased the frequency of β -catenin accumulated crypts (BCAC) in the colon of carcinogens-injected rats. However, the numbers of TUNEL-positive cells in the colon of crude extract and DMC-treated groups were not different from the positive control. Moreover, the effects of crude extract and DMC on phase I and II of xenobiotic metabolizing enzymes including cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), UDP-glucuronyl transferase (UGT), glutathione *S*-transferase (GST) and NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO-1) were investigated. The high dose of crude extract and DMC significantly increased hepatic GST activity, while the low and high doses of crude extract statistically increased hepatic NQO-1 activity. However, the treatment of crude extract and DMC did not affect on the activity of UGT and the expression of CYP2E1 in the liver of carcinogens treated rats. The *Cleistanthus nervosum* seeds presented chemopreventive effect on the early stages of colon carcinogenesis in rats induced by diethylnitrosamine and dimethylhydrazine. The cytotoxic activity and phase II xenobiotic metabolizing enzyme induction properties of *C. nervosum* seeds might suppress cancer cell

proliferation leading to reduction of preneoplastic lesions in rat colon. The 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone might be one candidate anticarcinogen in the seeds of *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองและกลไกยับยั้ง
การเกิดมะเร็งในหนูทดลองของสารสกัดจากเมล็ด
มะเขี๋ยง

ผู้เขียน

นางสาวอาภามาส จริยากรกุล

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. รวีวรรณ วงศ์ภูมิชัย อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ. ดร. อริยพงษ์ วงษ์นพวิชัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

มะเขี๋ยง (*Cleistocalyx nevosum* var. *paniala*) เป็นผลไม้พื้นเมืองที่ปลูกมากในเขตภาคเหนือของประเทศไทย กลุ่มวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากเมล็ดมะเขี๋ยงมีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ และด้านการทำลายโครโมโซม นอกจากนี้ 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone (DMC) ที่แยกบริสุทธิ์ได้จากเมล็ดมะเขี๋ยง มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์สูงสุดต่อสารก่อกลายพันธุ์ชนิดต่างๆเมื่อทดสอบด้วยวิธีของเฮมส์ งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ด้านมะเร็งของเมล็ดมะเขี๋ยงทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองรวมทั้งกลไกป้องกันการเกิดมะเร็งในหนูทดลองจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบ สารกึ่งบริสุทธิ์ 6 ส่วน และสารบริสุทธิ์ DMC และ hariganetin จากเมล็ดมะเขี๋ยงต่อเซลล์มะเร็งปอด (A549) เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620) เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ (MRC5) พบว่า สารสกัดหยาบยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดได้ดีที่สุด ในขณะที่สารกึ่งบริสุทธิ์ส่วนที่ 4 ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และเซลล์ปกติได้สูงสุด สารบริสุทธิ์ DMC มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ดีที่สุด จากค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ทั้งหมด (TGI value) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบ สารกึ่งบริสุทธิ์ส่วนที่ 4 และ DMC มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์สูงเมื่อเทียบกับสารสกัดส่วนอื่น และมีค่าที่ต่ำในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เมื่อเทียบกับเซลล์ชนิดอื่น จึงอาจสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบ สารกึ่ง

บริสุทธิ์ส่วนที่ 4 และ DMC มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และสารสกัดจากเมล็ดมะเขือยังมีความจำเพาะในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มากกว่าเซลล์มะเร็งชนิดอื่น นอกจากนี้การทดสอบฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ NAD(P)H quinone oxidoreductase (NQO) ในเซลล์มะเร็งตับ hep1c1c7 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ฤทธิ์เอนไซม์ต้านมะเร็ง พบว่าสารสกัดหยาบ และสารกึ่งบริสุทธิ์ส่วนที่ 5 มีฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ NQO ได้ดีกว่าสารสกัดส่วนอื่น ซึ่งความเข้มข้นของสารที่เหนี่ยวนำกัมมันตภาพเอนไซม์เป็นสองเท่า คือ 3.47 และ 3.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้สารบริสุทธิ์ DMC เทียบกับสารสกัดหยาบในการศึกษาฤทธิ์ก่อมะเร็งและต้านมะเร็งในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งตับด้วยไดเอทิลไนโตรซามีน และมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยไดเมทิลไฮดรอะซีน หลังจากการฉีดสารก่อมะเร็งครั้งสุดท้าย 1 สัปดาห์ ทำการป้อนสารสกัดหยาบความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และสารบริสุทธิ์ DMC ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวทางปากเป็นเวลา 10 สัปดาห์ แล้วทำการตรวจวัด glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) positive foci ซึ่งเป็นรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งตับ และ aberrant crypt foci (ACF) ซึ่งเป็นรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะเขือไม่มีฤทธิ์ก่อมะเร็งทั้ง 2 อยัวะ สารสกัดหยาบและ DMC ไม่สามารถลดจำนวน GST-P positive foci ในตับหนูที่เหนี่ยวนำด้วยไดเอทิลไนโตรซามีนและไดเมทิลไฮดรอะซีน แต่สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่ำและ DMC สามารถลดจำนวน ACF ในลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ไม่มีผลต่อขนาดของ ACF นอกจากนี้สารทั้ง 2 ชนิดยังสามารถลดจำนวน PCNA positive cell ในลำไส้ใหญ่หนูที่เหนี่ยวนำด้วยไดเอทิลไนโตรซามีนและไดเมทิลไฮดรอะซีนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารบริสุทธิ์ DMC ยังสามารถลดการเกิด β -catenin accumulated crypts (BCAC) ในลำไส้ใหญ่ที่ได้รับสารก่อมะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามสารทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลต่อจำนวน TUNEL-positive cell ในลำไส้ใหญ่เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก จากการศึกษาร่วมถึงผลของสารสกัดหยาบและ DMC ต่อเอนไซม์กำจัดสารพิษระยะที่ 1 และ 2 ได้แก่ cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), UDP-glucuronyl transferase (UGT), glutathione *S*-transferase (GST) และ NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO-1) พบว่าสารสกัดหยาบความเข้มข้นสูงและ DMC เหนี่ยวนำกัมมันตภาพของเอนไซม์ GST ในตับได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดหยาบความเข้มข้นต่ำและความเข้มข้นสูงเหนี่ยวนำกัมมันตภาพของเอนไซม์

NQO-1 ในตับได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการสารถักหยาบทั้งความเข้มข้นต่ำและสูง รวมทั้ง DMC ไม่มีผลต่อกัมมันตภาพของเอนไซม์ UGT และการแสดงออกของโปรตีน CYP2E1 ในตับหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็ง จากงานวิจัยทั้งหมดอาจสรุปได้ว่าสารสารถักหยาบไดคลอโรมีเทนจากเมล็ดมะเขือเทศมีฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะเริ่มต้นในหนูที่เหนียวน้ำด้วยไดเอทิลไนโตรซามีนและไดเมทิลไฮดรอกซีไนโตรซามีน โดยอาจเป็นผลจากฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งและฤทธิ์เหนียวน้ำเอนไซม์กำจัดสารพิษระยะที่ 2 ของสารสารถักหยาบเมล็ดมะเขือเทศที่มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ทำให้ลดการเกิดรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่หนู และ 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone (DMC) อาจเป็นสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งที่สำคัญชนิดหนึ่งในเมล็ดมะเขือเทศ