

หัวข้อคุณิพนธ์	ฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านการรุกรานต่อเซลล์มะเร็งของสารพฤกษเคมีในข้าวหอมมะลิแดง	
ผู้เขียน	นายคมศักดิ์ พิริยะ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรคุณิบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.พรงาม เดชเกรียงไกรกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสินี จันทรมหเสถียร อาจารย์ ดร.ศุภชัย ยอดคีรี	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

กระบวนการรุกรานและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นต่อเนื่องภายในเซลล์ซึ่งประกอบด้วย การยึดเกาะกับเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ การรุกรานของเซลล์ และการสร้างหลอดเลือดใหม่ กระบวนการย่อยสลายเมทริกซ์ภายนอกเซลล์เป็นขั้นตอนสำคัญในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยอาศัยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มหลักของเอนไซม์เมทริกซ์เมทาโลโปรตีนเนส (MMPs) และยูโรโคเนสพลาสมิโนเจนแอคติเวเตอร์ (uPA) ดังนั้นการควบคุมการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ในปัจจุบันการใช้สารพฤกษเคมีเพื่อต้านมะเร็ง เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ส่งผลต่อการยับยั้งการแพร่กระจายและการรุกรานของเซลล์มะเร็ง

ข้าว (*Oryza sativa* Linn.) เป็นอาหารหลักของประเทศในกลุ่มเอเชียรวมทั้งประเทศไทย ข้าวมีหลายชนิดได้แก่ ข้าวสีน้ำตาล สีดำและสีแดง ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการสูง จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่าสารสกัดข้าวแดงมีสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้แก่ กรดฟีนอลิก ออร์ซานอล โทโคไตรอินอล และโทโคเฟอรอลซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเจริญของมะเร็งได้

ในส่วนแรกของการศึกษานี้ คือการศึกษาฤทธิ์ต้านการรุกรานของส่วนสกัดข้าวแดงต่อเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดรุกราน (HT1080 และ MDA-MB-231) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรของส่วนสกัดเอทานอล (CEE) เฮกเซน (Hex) ไคคลอโรมีเทน (DCM) และน้ำ สามารถยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับส่วนสกัดเอทิลอะซิ

เตหมีแวนโน้มนั้บยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งได้เล็กน้อย นอกจากนี้ส่วนสกัดเฮกเซน ไคคลอโรมีเทนและน้ำ สามารถลดการหลั่งและการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ -9 อย่างชัดเจน ในขณะที่ส่วนสกัดไคคลอโรมีเทนมีแวนโน้มนั้บยั้งการหลั่งและการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวได้เล็กน้อย สำหรับการศึกษาศัพท์ด้านการอักเสบพบว่าส่วนสกัดเอทานอล เฮกเซน ไคคลอโรมีเทนและน้ำ (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ยกเว้นส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) อินเตอร์ลิวคินชนิดที่ 1 เบต้า (IL-1 β) และอินเตอร์ลิวคินชนิดที่ 6 (IL-6) ในเซลล์มาโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

จากการศึกษาที่ผ่านมามีพบว่า โพรแอนโธไซยานิดิน แกมมาออริซานอล และแกมมาโทโคไตรอีนอลสามารถยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งได้ โดยพบว่าแกมมาออริซานอล และแกมมาโทโคไตรอีนอลสามารถวิเคราะห์พบในส่วนสกัดเฮกเซน ไคคลอโรมีเทนและน้ำ ในขณะที่โพรแอนโธไซยานิดินวิเคราะห์พบในส่วนสกัดเอทานอลและน้ำ จากผลดังกล่าวคาดว่าสารกลุ่มนี้เป็นสารที่พบในข้าวแดงที่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ในการต้านการรุกรานของเซลล์มะเร็ง

สำหรับการศึกษาในส่วนที่สอง ได้ศึกษาผลของส่วนสกัดที่อุดมด้วยโพรแอนโธไซยานิดิน (PRFR) ที่แยกได้จากข้าวแดงต่อการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งเต้านมมนุษย์ชนิด MDA-MB-231 จากการศึกษามีพบว่า โพรแอนโธไซยานิดินและโพรเคลฟิโนดินคาดว่าเป็นกลุ่มอนุพันธ์หลักของโพรแอนโธไซยานิดินที่พบใน PRFR เมื่อทำการบ่มเซลล์ร่วมกับ PRFR พบว่าสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ได้แก่ MMP-9 MT1-MMP uPA uPAR และ PAI-1 ได้ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสกลุ่มที่ 4 และ MMP-9 ได้ ยิ่งกว่านั้น PRFR สามารถลดการแสดงออกของ ICAM-1 และ IL-6 ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งอีกด้วย เป็นที่น่าสนใจว่า PRFR สามารถลดการจับกันระหว่าง NF- κ B กับดีเอ็นเอที่จำเพาะได้ ซึ่ง NF- κ B ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิดที่ทำหน้าที่ควบคุมการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้

จากการศึกษานี้สามารถกล่าวได้ว่า ส่วนสกัดที่อุดมด้วยโพรแอนโธไซยานิดินที่แยกได้จากข้าวแดงสามารถส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการรุกรานของเซลล์มะเร็งผ่านเป้าหมายการควบคุมทาง NF- κ B ที่ส่งผลต่อการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งเต้านมมนุษย์ชนิด MDA-MB-231 ได้

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดข้าวแดงสามารถส่งผลกระทบต่อการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง จากการศึกษานี้คาดว่าสารสกัดข้าวแดง โดยเฉพาะ PRFR มีศักยภาพที่จะสามารถพัฒนาเป็นสารป้องกันการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมมนุษย์หรือใช้เป็นเป้าหมายในการรักษาร่วมกับยาต้านมะเร็งในอนาคตได้ อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งในสัตว์ทดลองและทางคลินิกสำหรับการพัฒนา PRFR เพื่อใช้ในผู้ป่วยมะเร็งในอนาคตต่อไป



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Dissertation Title Anti-Inflammatory and Anti-Invasive Activities Against Cancer Cells of Phytochemicals in Red Jasmine Rice (*Oryza sativa* L.)

Author Mr. Komsak Pintha

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Dejkriengkraikul Advisor
Asst. Prof. Dr. Wisinee Chanmahasathien Co-advisor
Dr. Supachai Yodkeeree Co-advisor

ABSTRACT

The cancer metastasis process is a complex cascade of events, which comprise cells adhesion, invasion, and angiogenesis. Degradation of extracellular matrix (ECM) is crucial steps in tumor metastasis by proteolytic enzymes, which are consist mainly of the matrix metalloproteinases (MMPs) and urokinase plasminogen activator (uPA). Therefore, regulating the expression and activity of the enzymes are considered as the potential target for therapeutic applications. Currently, several phytochemicals could be promising compounds that inhibit cancer cell invasion and metastasis.

Rice (*Oryza sativa* Linn.) is the main staple food in many Asian countries including Thailand. There are varieties of colored rice including brown, black and red rice that have a high nutritive value. Recently, red rice extract has been demonstrated to contain pharmacological substances including phenolics, γ -oryzanol, tocotrienols and tocopherols and exhibit antioxidants and anti-tumor growth abilities.

In the first part of this dissertation, the anti-invasive properties of red rice extract fractions on human invasive cancer cells (HT1080 and MDA-MB-231 cell lines) were evaluated. The results showed that invasion of HT1080 and MDA-MB-231 cells was significantly inhibited by 100 μ g/ml of crude ethanolic extract (CEE), hexane (Hex), dichloromethane (DCM) and water fractions, whereas an ethyl acetate fraction (EtOAc)

had slightly effect. Besides, Hex, DCM and water fractions markedly decreased the secretion and activity of MMP-2 and MMP-9, while the DCM fraction exhibited slightly effects. Anti-inflammation study found that CEE, HEX, DCM and water fractions (100 µg/ml), but not EtOAc effectively inhibits nitric oxide (NO), interleukin 1 beta (IL-1 β), and interleukin 6 (IL-6) production in LPS-stimulated macrophage cells.

Proanthocyanidin, γ -oryzanol and γ -tocotrienol have been reported to have anti-invasive properties. It was found that γ -oryzanol and γ -tocotrienol could be detectable in the Hex, DCM and CEE fractions. While proanthocyanidin was detected in the CEE and water fractions. It could be suggested that these active compounds which are contained in the red rice fractions might be responsible for the inhibition of tumor cell invasion.

In second part, we investigated the effects of proanthocyanidin enrich fraction (PRFR) isolated from red rice on MDA-MB-231 breast cancer cell invasion. We found that procyanidins and prodelfphinidins may be major proanthocyanidin derevatives included in PRFR. Treatment the cells with PRFR significantly decreased the expression of ECM degradation-associated proteins, including MMP-9, MT1-MMP, uPA, uPAR and PAI-1. Additional, PRFR also inhibited collagenase IV and MMP-9 activities. Furthermore, the expression of ICAM-1 and IL-6 that have been reported to associate with cancer cell motility and invasion was down-regulated by PRFR. Interestingly, DNA binding activity of nuclear factor kappa B (NF- κ B), which is a mediator of ECM degradation-associated proteins, was suppressed by PRFR. These findings suggested that proanthocyanidin isolated from red rice altered the expression of invasion-associated proteins, potentially by targeting NF- κ B, which leading to inhibit MDA-MB-231 breast cancer cell invasion.

In conclusion, red rice extracts provided inhibitory effects on cancer invasion, which is involved in cancer progression. This work suggested that red rice extracts, especially PRFR have potential to be developed and served as preventive agents against metastasis of breast cancer or combination therapeutic strategies with current anti-cancer drugs. However, *in vivo* and clinical studies will be required for further development of PRFR to be use in cancer patients.