

หัวข้อคุณสมบัติ	กลไกเคมีป้องกันของสาหร่ายเตาในระหว่างการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะเริ่มต้นของหนูขาว	
ผู้เขียน	นางสาวสิริยุญา ทายะ	
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ. ดร. รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ. ดร. ชีระ ชีโวรินทร์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ. ดร. พิรพรรณ โปธาเจริญ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

สาหร่ายเตาเป็นสาหร่ายน้ำจืดสีเขียว ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย อาทิเช่น ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการเกิดมะเร็งตับ การศึกษานี้มุ่งเน้นเกี่ยวกับฤทธิ์เคมีป้องกันของสาหร่ายเตาต่อกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะเริ่มต้นที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีในหนูขาว การเปรียบเทียบฤทธิ์เคมีป้องกันของสาหร่ายเตาในรูปสาหร่ายแห้ง และสารสกัด โดยเตรียมผงสาหร่ายเตาแห้งผสมอาหารหนูมาตรฐาน และสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อนให้แก่หนูขาวเพศผู้ที่ถูกฉีดด้วย 1,2-dimethylhydrazine (DMH) ทางใต้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิด aberrant crypt foci (ACF) ซึ่งเป็นรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ ในการศึกษาผลของสาหร่ายเตาทั้ง 2 รูปแบบต่อกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะก่อดังนั้น ได้ให้อาหารผสมสาหร่ายเตาอบแห้ง และสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน 1 สัปดาห์ก่อนการฉีด DMH และให้ต่อเนื่องเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า สารสกัดเตาส่วนน้ำร้อนสามารถลดจำนวนของ ACF ในหนูที่ถูกฉีดด้วย DMH ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยสารสกัดเตานั้นสามารถเหนี่ยวนำกัมมันตภาพของเอนไซม์กำจัดสารพิษในระยะที่ 2 และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระบางชนิดได้ เช่น UDP-GT, GST และ GPx สำหรับการศึกษาลักษณะของสารทดสอบทั้ง 2 รูปแบบต่อกระบวนการเกิดมะเร็งในระยะหลังก่อดังนั้น ได้ให้อาหารผสมสาหร่ายเตาอบแห้ง และสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อนเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ โดยเริ่มให้หลังจากการฉีด DMH ครั้งที่ 2 พบว่า สารสกัดเตาส่วนน้ำร้อนสามารถลดจำนวนของ ACF ในหนูที่ถูกฉีดด้วย DMH อย่างมีนัยสำคัญ โดยสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อนสามารถลดจำนวน PCNA positive cells และเพิ่มจำนวนของ apoptotic cells ใน colonic crypt ของหนูที่ถูกฉีดด้วย DMH อย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่า สาหร่ายเตาป้องกันกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะเริ่มต้นในหนูขาว โดยปรับเปลี่ยนการทำงานของเอนไซม์กำจัดสารพิษ รวมถึงยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ และเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบ apoptosis

การศึกษาหาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน โดยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เตรียมได้จากการตกตะกอนด้วยเอทานอล ส่วนสารสกัดส่วนคลอโรฟอร์มนั้นได้จากกระบวนการกำจัดไขมันและสีในระหว่างการเตรียมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ซัลเฟต และ น้ำตาลกรดยูโรนิก ในสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ นั้นมีปริมาณมากกว่าในสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน แต่ไม่พบองค์ประกอบดังกล่าวในสารสกัดส่วนคลอโรฟอร์ม จากผลการทดลองนี้ สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์อาจเป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน นอกจากนั้นการศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน และสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ ด้วยเทคนิค TLC พบว่า น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบเป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดทั้งสองชนิดได้แก่ fucose และ rhamnose ส่วนการศึกษาหาชนิดของ phenolic acid ในสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ด้วยเทคนิค HPLC นั้น พบว่า ในสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อนนั้นพบ gallic acid และ ellagic acid เป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ และสารสกัดส่วนคลอโรฟอร์ม นั้นพบ ellagic acid และ gallic acid เป็นองค์ประกอบตามลำดับ จากการทำบริสุทธิ์สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์โดยผ่าน DEAE Sepharose anion-exchange column และชะด้วย 0.2 M NaCl ใน sodium acetate buffer pH 6 ได้สารกึ่งบริสุทธิ์ออกมา 3 ส่วน และพบว่า F1 และ F2 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ซัลเฟต และน้ำตาลกรดยูโรนิกสูง จากผลการทดลองนี้คาดว่า สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้จากสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อนเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ประเภท heteropolysaccharide ที่มีซัลเฟตเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย โดยสารพอลิแซ็กคาไรด์นี้ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด เช่น galactose arabinose fucose และ rhamnose

การศึกษาต่อมาเป็นการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด โดยวิธี *Salmonella* mutation พบว่า ทั้งสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ และสารสกัดส่วนคลอโรฟอร์มไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ในแบคทีเรียสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ทั้งในสถานะที่มี และ ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวกระตุ้น ในส่วนของการศึกษาฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ พบว่า สารสกัดส่วนคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 1 mg/plate นั้น มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์สูงสุดต่อสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ) และ 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) ในขณะที่สารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน และสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์นั้น ไม่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ต่อสารก่อกลาย

พันธุ์มาตรฐานทั้ง 3 ชนิด จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดส่วนคลอโรฟอร์มเป็นสารที่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์สูงในการทดสอบด้วยวิธี *Salmonella* mutation

นอกจากนี้สารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ และสารสกัดส่วนคลอโรฟอร์ม ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในระยะหลังก่อตัวของกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูขาว โดยการฉีด DMH ทางใต้ผิวหนังให้แก่หนูขาวเพศผู้เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิด ACF และป้อนสารสกัดทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 10 สัปดาห์ หลังจากการฉีด DMH ครั้งสุดท้าย ผลการทดลองพบว่า สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์สามารถยับยั้งการเกิด ACF ได้ดีกว่าสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน และสารสกัดส่วนคลอโรฟอร์มในหนูที่ฉีด DMH นอกจากนี้สารสกัดทั้ง 3 ชนิดสามารถลดดัชนีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ในเยื่อบุทางเดินอาหารส่วนล่างของหนูที่ฉีดด้วย DMH อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งกลไกการป้องกันมะเร็งของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อนจากการศึกษานี้พบว่า น่าจะมีผลมาจากการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ในเยื่อบุทางเดินอาหารส่วนล่างของหนูที่เหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็ง

ภาวะการอักเสบเป็นปัจจัยหนึ่งในการส่งเสริมกระบวนการเกิดมะเร็ง โดยโมเดลของการเหนี่ยวนำภาวะลำไส้อักเสบในหนูถีบจักรนั้น ได้ให้ 3% DSS ผสมน้ำดื่มเป็นเวลา 7 วันแก่หนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR และให้สารสกัดทั้ง 3 ชนิดก่อนการให้ DSS 7 วัน และป้อนต่อจนครบ 14 วัน จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งความเสียหายของเยื่อบุทางเดินอาหารส่วนล่าง และภาวะการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำจาก DSS ได้ นอกจากนี้สารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน และสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์สามารถป้องกันการเกิด cell cycle arrest ที่ถูกเหนี่ยวนำจาก DSS ได้ และสารสกัดทุกชนิดสามารถลดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนของการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเยื่อบุทางเดินอาหารส่วนล่าง พบว่า สารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน และสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ยับยั้งการเหนี่ยวนำภาวะลำไส้อักเสบจาก DSS ได้โดยเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ปรับปรุงการทำงานของไมโทคอนเดรียให้กลับสู่สภาวะปกติ และควบคุมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ รวมถึงการตายของเซลล์แบบ apoptosis จากผลการทดลองนี้คาดว่า สารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน และสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์สามารถป้องกันภาวะการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำจาก DSS ได้ โดยการป้องกันความเสียหายของเยื่อบุทางเดินอาหารส่วนล่าง กำจัดอนุมูลอิสระ และรักษาการทำงานของไมโทคอนเดรีย รวมถึงปรับปรุงการตายของเซลล์แบบ apoptosis และจากการศึกษาผลของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากสาหร่ายเตาต่อกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่มีภาวะการอักเสบร่วมด้วยในหนูขาว การศึกษาส่วนนี้เป็นการศึกษาผลของสารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน และสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการให้ DMH ร่วมกับ DSS ซึ่งเหนี่ยวนำการเกิด ACF ในหนูขาว ซึ่ง

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน และสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์นั้นไม่สามารถยับยั้ง รอยโรคก่อนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูที่ได้รับ DMH ร่วมกับ DSS

จากการศึกษาทั้งหมดอาจสรุปได้ว่า สาหร่ายเตาสามารถป้องกันกระบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ของหนูขาวในระยะเริ่มต้น โดยกลไกการยับยั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะเริ่มต้นของสาหร่ายเตา นั้น อาจเนื่องมาจากการปรับปรุงการทำงานของเอนไซม์กำจัดสารพิษในระยะที่ 2 และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบ apoptosis นอกจากนั้น สารสกัดเตาส่วนน้ำร้อน และสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์สามารถป้องกันภาวะอักเสบที่เหนี่ยวนำด้วยสารเคมี โดยลดอนุมูลอิสระ รักษาการทำงานของไมโทคอนเดรีย รวมถึงยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis ซึ่งนำไปสู่การป้องกันการเกิดความเสียหายต่อเยื่อทางเดินอาหารส่วนล่าง นอกจากนี้คาดว่า สารพอลิแซ็กคาไรด์ ประเภท heteropolysaccharide ที่มีซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ น่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ป้องกันมะเร็งที่พบในสาหร่ายเตา ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษานี้ เป็นการพัฒนาสาหร่ายเตาเพื่อนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Dissertation Title	Chemopreventive Mechanisms of <i>Spirogyra neglecta</i> During Early Stages of Colorectal Carcinogenesis in Rats	
Author	Ms. Sirinya Taya	
Degree	Doctor of Philosophy (Biochemistry)	
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Teera Chewonarin	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Peraphan Pothacharoen	Co-advisor

ABSTRACT

Spirogyra neglecta is a freshwater green alga and exhibits various biological activities, including antimutagenic, antioxidant and antihepatocarcinogenic activities. This study focused on the chemopreventive effects of *S. neglecta* on chemically-induced early stages of colorectal carcinogenesis in rodents. To compare chemopreventive activity of *S. neglecta* in form of dried powder and extract, dried *S. neglecta* was mixed in basal diet and hot water extract of *S. neglecta* was prepared. Male Wistar rats were fed with dried *S. neglecta* mixed diet (SND) and *S. neglecta* extract (SNE) and subcutaneously injected by 1, 2-dimethylhydrazine (DMH) once a week for 2 weeks to initiate aberrant crypt foci (ACF), preneoplastic lesion of colorectal cancer. To study their effects on the initiation stage, SNE and SND were fed a week before DMH injection and continued for 5 weeks. SNE but not SND significantly decreased number of ACF in DMH treated rats. SNE enhanced the activities of some detoxifying and antioxidant enzymes including UDP-GT, GST, and GPx. To study their effects on the post-initiation stage, SNE and SND were administered for 10 weeks after the second DMH injection. SNE significantly decreased number of ACF in DMH-treated rats. It significantly reduced number of PCNA positive cells and increased number of apoptotic cells in colonic crypts of DMH-induced rats. These results suggested that *S. neglecta* might prevent the early stages of DMH-induced colon carcinogenesis in rats due to the modulation of xenobiotic metabolizing enzymes, inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis.

To identify the active compound(s) in SNE, the polysaccharide rich extract (PE) was prepared by ethanol precipitating. The chloroform fraction (CF) was obtained from defatted and decolorized process. Chemical composition of SNE, PE and CF was determined. The total carbohydrate, sulfate and uronic acid in PE were higher content than SNE and these constituents were not found in CF. These results suggested that polysaccharide might be a major component in SNE. Moreover, the monosaccharide composition of SNE and PE detected by TLC technique were fucose and rhamnose. Using HPLC technique, the major phenolic acids in SNE were gallic acid and ellagic acid. Ellagic acid was mainly found in PE and gallic acid was primarily detected in CF. Then, PE was fractionated by DEAE Sepharose anion-exchange column and eluted by 0.25 M NaCl in sodium acetate buffer pH 6 obtaining 3 fractions, including F1, F2 and F3. The high amount of total carbohydrate, sulfate and uronic acid were found in F1 and F2. These results suggested that polysaccharide rich extract might be a sulfated heteropolysaccharide, which contained several monosaccharides including galactose, arabinose, fucose and rhamnose.

The mutagenic and antimutagenic properties of SNE, PE and CF were determined using *Salmonella* mutation assay. SNE, PE and CF were not mutagenic in TA98 and TA100 both in the presence and absence of metabolic activation. The CF at dose 1 mg/plate showed strong antimutagenicity against mutagens obtaining high-temperature cooking process including 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinolone (MeIQ) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP), while SNE and PE failed to show antimutagenic effect against these heterocyclic amine mutagens. These results indicated that CF is the most potent antimutagenicity in *Salmonella* mutation assay.

Furthermore, the extracts derived from SNE including PE and CF were investigated their anticarcinogenicity on post-initiation stage of colorectal carcinogenesis in rats. Male Wistar rats were subcutaneously injected by DMH to induce ACF and fed with SNE, PE and CF for 10 weeks after DMH treatment. PE presented stronger ACF inhibitory effect SNE and CF in DMH treated-rats. The *S. neglecta* extracts significantly decreased proliferating index in colonic mucosa of DMH initiated rats. These findings suggested chemopreventive effect of PE derived from *S. neglecta*, might be partly due to

suppression of cell proliferation in colonic mucosa of carcinogen-induced preneoplastic lesion in rats.

Inflammation acts as a key regulator of promotion and progression stages of carcinogenesis. To induce colitis, ICR mice were received 3% DSS in their drinking water for 7 days. Seven days preceding the DSS treatment, oral administration of SNE, PE and CF was started and continued for 14 days. SNE, PE and CF attenuated DSS-induced damage of colonic epithelial structure and inflammation. Furthermore, SNE and PE significantly protected colonic epithelial cells from DSS-induced cell cycle arrest, while SNE, PE and CF significantly reduced apoptosis. Proteomic analysis demonstrated that SNE and PE might ameliorated DSS-induced colitis by inducing antioxidant enzymes, restoring impaired mitochondria function, and regulating proliferation and apoptosis. These results suggested that SNE and PE could prevent DSS-induced colitis in ICR mice by protection of damaged colonic epithelium, reducing ROS and maintaining normal mitochondrial function and apoptosis. Next, we focused on the effect of PE derived from *S. neglecta* on inflammation associated colorectal carcinogenesis in rats. We evaluated the effects of SNE and PE on DMH/DSS induced ACF formation in rats. These results showed that SNE and PE in this condition were not anticarcinogenic in DMH-initiated and DSS promoted colonic preneoplastic lesion in rats.

In conclusion, *S. neglecta* could prevent the early stages of DMH-induced colon carcinogenesis in rats. The possible inhibitory effects were due to the modulation of xenobiotic metabolizing and antioxidant enzymes and inhibition of cell proliferation as well as induction of apoptosis. Furthermore, SNE and PE also diminished chemical-induced colitis in mice by reducing ROS, maintaining normal mitochondrial function, attenuating pathological apoptosis leading to protecting colonic epithelium damage. Sulfated heteropolysaccharide might be one of cancer chemopreventive ingredients in *S. neglecta*. In addition, the beneficial information of our findings allows for further improvement of *S. neglecta* into either nutraceutical or pharmaceutical products for prevention of colorectal cancer.