

Thesis Title	Effect of <i>Momordica Charantia</i> Extract on Preneoplastic Lesion of Colon Cancer in Rats	
Author	Miss Sawitree Chiampanichayakul	
M.S.	Biochemistry	
Examining committee	Assoc. Prof. Dr. Usanee Vinitketkumnuen	Chairman
	Assoc. Prof. Dr. Duangta Kanjanapothi	Member
	Assoc. Prof. Dr. Nirush Lertprasertsuke	Member
	Asst. Prof. Dr. Prachya Kongtawelet	Member

ABSTRACT

Antimutagenicity and chemopreventive ability of 80% ethanolic extract of bitter melon (*Momordica charantia*) was investigated. The *Momordica charantia* extract is nonmutagenic, but inhibits the mutagenicity of Glu-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP and AFB1 in the Salmonella mutation pre-incubation technique. The ability of *Momordica charantia* extract to inhibit colon carcinogenesis was conducted in Male F344 rats, using azoxymethane (AOM) induced colonic aberrant crypt foci (ACF) and DNA adduct formation as biomarkers. Rats were fed daily with various concentrations of *Momordica charantia* extract at 0.1 and 1.0 g/kg body weight (bw) by gavage for 2 and 5 weeks to study DNA adduct and ACF at initiation stage, respectively. One week after the administration of the plant extract, rats were subcutaneously injected with AOM at 15 mg/kg bw for two weeks apart (Day 7 and 14). Three rats of each group were sacrificed 12 h. after the second AOM injection, and DNA was extracted from the colon. DNA adduct formation ; O⁶-methylguanine (O⁶-meGua) and N⁷-methylguanine (N⁷-meGua) was analyzed by HPLC. Remained rats were sacrificed 3 weeks after the second AOM injection and ACF formation at initiation stage was examined. To study antitumor formation of *Momordica charantia*

extract at the promotion step, rats were fed with *Momordica charantia* extract at 0.1 and 1.0 g/kg bw 2 weeks after the second AOM injection and continued for 12 weeks. All rats were sacrificed after 12 weeks and ACF formations in colonic mucosa were examined.

The results showed the decreases of O⁶-meGua and N⁷-meGua adduct levels in the colonic mucosa and colonic muscular in rats received *Momordica charantia* extract was not different from control rats. At initiation stage, treatment with *Momordica charantia* extract at 1.0 and 0.1 g/kg bw, significantly inhibited total ACF formation 21% and 18%, respectively. At promotion stage, *Momordica charantia* extract at 1.0 g/kg bw, significantly inhibited ACF formation 18%. In addition, *Momordica charantia* extract also decreased the formation of larger ACF with more than 4 crypts/focus, which correlated with tumor incidence, as high as 41%.

To explain the possibility of a protective mechanism of *Momordica charantia* extract against colon carcinogenesis, the effect of *Momordica charantia* extract on bacterial β -glucuronidase activity (*in vitro*) was also investigated. The results showed that *Momordica charantia* extract mildly inhibited bacterial β -glucuronidase activity. It is suggested that *Momordica charantia* extract weakly inhibited the release of free MAM from MAM-glucuronide in the colon, leading to DNA adduct formation and consistent with the weakly inhibitory effect of *Momordica charantia* extract on ACF formation at initiation stage (inhibitory effect less than 40%). Interestingly, *Momordica charantia* extract has inhibitory effect on ACF with more than 4 crypts/focus at promotion stage. However, the mechanism of this effect can not be explained by this investigation.

In summary, *Momordica charantia* extract shows a tendency to prevent colon carcinogenesis at promotion stage, not at initiation stage. The extract did not inhibited O⁶-meGua adduct formation which is considered to be a critical step for initiation of carcinogenesis. Although, the exact mechanism of the chemopreventive effects of *Momordica charantia* are not yet known, the results described here suggest a possibility of chemopreventive action of *Momordica charantia* extract against colon cancer in rat model by exerting specific on promotion stage.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดจากมะระขี้นกต่อการเกิดรอยโรคก่อนเกิด มะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูขาวใหญ่		
ชื่อผู้เขียน	นางสาว สาวิตรี เขียมพานิชกุล		
วิทยาสตรั่มหาบัณฑิต	สาขาวิชาชีวเคมี		
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. อุษณีย์	วินิจฉัยค่านวณ	ประธานกรรมการ
	รศ.ดร. ดวงตา	กาญจน โฟธิ์	กรรมการ
	รศ.ดร. นิรัชร์	เลิศประเสริฐสุข	กรรมการ
	ผศ.ดร. ปรัชญา	คงทวีเลิศ	กรรมการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์และคุณสมบัติในการป้องกันหรือลดการเกิดมะเร็งของสารสกัดมะระขี้นก พบว่าส่วนสกัดอัลกอฮอล์ของมะระขี้นกไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แต่มีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์ เช่น Glu-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP และ AFB1 โดยการทดสอบกับแบคทีเรียซัลโมเนลลาด้วยวิธี pre-incubation สำหรับคุณสมบัติของสารสกัดมะระขี้นกต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ทำการศึกษาในหนูขาวสารพันธุ์ F344 โดยใช้สารเอโซซิมิเทน (Azoxymethane : AOM) ในการเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์ลำไส้ที่ผิดปกติ (Aberrant Crypt Foci : ACF) และดีเอ็นเอแอกัดคัส โดยหนูขาวจะได้รับสารสกัดมะระขี้นกที่ความ

เข้มข้นต่างๆ (0.1 และ 1.0 กรัม/กก. น้ำหนักตัว) โดยการป้อน (gavage) ทุกวันเป็นเวลา 2 และ 5 สัปดาห์สำหรับการศึกษาดิเอโนเอแอดคักส์ และ ACF ในระยะเริ่มต้น (Initiation stage) ตามลำดับ โดยเริ่มป้อนสารสกัด 1 สัปดาห์ก่อนการฉีด AOM ความเข้มข้น 15 มก./กก. น้ำหนักตัวเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) สัปดาห์ละครั้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (วันที่ 7 และ 14) หนู 3 ตัว ในแต่ละกลุ่มจะถูกฆ่าที่ 12 ชั่วโมงหลังจากฉีด AOM ครั้งที่สอง และทำการสกัดดีเอ็นเอจากลำไส้เพื่อตรวจวิเคราะห์ DNA adduct ชนิด O⁶-methylguanine (O⁶-meGua) และ N⁷-methylguanine (N⁷-meGua) โดยวิธี HPLC ส่วนการศึกษา ACF ในระยะเริ่มต้นของขบวนการเกิดมะเร็ง (Initiation stage) หนูจะถูกฆ่าหลังจากครบ 3 สัปดาห์ของการฉีด AOM ครั้งสุดท้าย ระยะส่งเสริมของขบวนการเกิดมะเร็ง (Promotion stage) หนูจะได้รับสารสกัดมะเร็งขึ้นกับความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 กรัม/กก. น้ำหนักตัว โดยการป้อนทุกวันเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ เริ่มป้อนสารสกัดหลังจากฉีด AOM ครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดหนูแต่ละกลุ่มจะถูกฆ่าและนำเซลล์มาตรวจวิเคราะห์การเกิด ACF ผลการทดลองพบว่าปริมาณการเกิดดีเอ็นเอแอดคักส์ ชนิด O⁶-meGua และ N⁷-meGua ที่บริเวณเยื่อหูและส่วนกล้ามเนื้อของลำไส้ใหญ่ในหนูขาวที่ได้รับสารสกัดมะเร็งขึ้นก็ไม่มีแตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม สำหรับผลของสารสกัดมะเร็งขึ้นต่อการเกิดความผิดปกติที่เซลล์ลำไส้ใหญ่ (ACF) ในระยะเริ่มต้นของการเกิดมะเร็ง พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดมะเร็งขึ้นความเข้มข้น 1.0 และ 0.1 กรัมต่อกก. น้ำหนักตัว สามารถลดการเกิด ACF ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีผลการยับยั้ง 21% และ 18% ตามลำดับ ในระยะส่งเสริมของขบวนการเกิดมะเร็ง พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดมะเร็งขึ้นความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อกก. น้ำหนักตัวสามารถลดการเกิด ACF ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือการยับยั้งประมาณ 18% และสารสกัดมะเร็งขึ้นก็ยังสามารถลดการเกิด ACF ที่มีจำนวน crypt มากกว่า 4 crypts ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งถึง 41%

เพื่ออธิบายกลไกการยับยั้งการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยสารสกัดมะเร็งจีนก จึงได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดมะเร็งจีนกต่อการทำงานของเอนไซม์ β -glucuronidase ในหลอดทดลอง ผลการทดลองพบว่าสารสกัดมะเร็งจีนกมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β -glucuronidase จากแบคทีเรียในลำไส้ได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดมะเร็งจีนกสามารถยับยั้งการปล่อย MAM อีสาระจาก MAM glucuronide ในลำไส้ได้เพียงเล็กน้อยนำไปสู่การเกิดคีเอ็นเอแอดคัส และพบว่ามีความสัมพันธ์กับการยับยั้ง ACF ที่ระยะเริ่มต้นของขบวนการเกิดมะเร็งได้เพียงเล็กน้อย (การยับยั้งน้อยกว่า 40%) แต่ที่น่าสนใจคือ สารสกัดมะเร็งจีนกมีฤทธิ์ยับยั้ง ACF ที่มีมากกว่า 4 crypts ที่ระยะส่งเสริมของขบวนการเกิดมะเร็ง อย่างไรก็ตามกลไกการยับยั้งดังกล่าวไม่สามารถอธิบายได้จากการศึกษา

การวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่า สารสกัดมะเร็งจีนกมีแนวโน้มที่จะป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะส่งเสริมของขบวนการเกิดมะเร็ง และพบว่าสารสกัดดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการเกิด O⁶-meGua ซึ่งแสดงถึงการเกิดมะเร็งในระยะเริ่มต้น อย่างไรก็ตามกลไกการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยสารสกัดมะเร็งจีนกยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดมะเร็งจีนกมีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูขาวโดยเป็นการออกฤทธิ์ที่ระยะส่งเสริมมะเร็ง