Thesis Title Induction of Apoptosis in Colon Cancer Cells by *Millingtonia hortensis* Extract

Author Mr. Siwapong Tansuwanwong

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Prof. Dr. Usanee Vinitketkumnuen	Chairperson
Prof. Dr. Kohzoh Imai	Member
Assoc.Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana	Member

ABSTRACT

Millingtonia hortensis is an important traditional medicinal plant frequently used by people of Southeast Asia including Thai folk. The effects of aqueous and ethanol extracts of *M. hortensis* on proliferation of colon cancer cells were investigated. Treatment with aqueous extract significantly reduced the proliferation rate of colon cancer cell lines (DLD-1, HCT15, RKO, SW48 and SW480), while the ethanol extract did not inhibit cell proliferation. To study whether the effect of the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

aqueous extract of *M. hortensis* on colon cancer cell lines involved the induction of apoptosis, aqueous extract was further investigated by DNA fragmentation assay. The extract induced fragmented DNA in all colon cancer cell lines; HCT15 and RKO colon cancer cell lines exhibited the highest responses to the extract. These results suggested that inhibition of cell growth and proliferation by aqueous extract of *M. hortensis* is associated with the induction of apoptosis in colon cancer cell lines.

The effect of aqueous extract of *M. hortensis* on early apoptosis and apoptotic protein expression was further studied using HCT15 and RKO cells. *M. hortensis* increased the exposure of phosphatidylserine to the outer surface of the cell membrane in both HCT15 and RKO cells. Furthermore, the extract decreased the expression of p-Bad and Bcl-x_L proteins, which are anti-apoptotic proteins in both HCT15 and RKO cells. These findings indicated that aqueous extract of *M. hortensis* inhibited cell growth and proliferation through decreased expression of anti-apoptotic proteins.

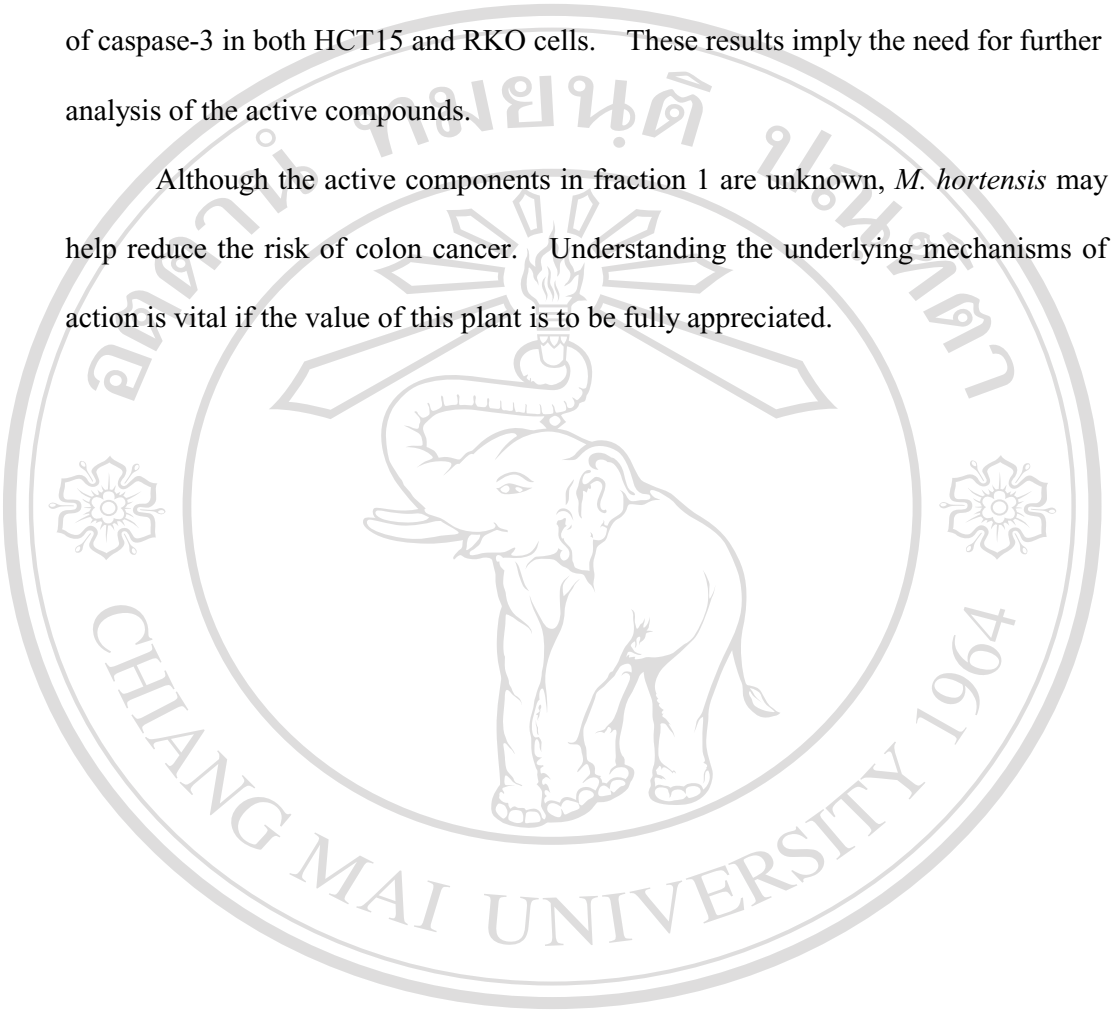
Aqueous extract of *M. hortensis* induced apoptosis in HCT15 and RKO cells. To learn more about this extract, partial purification by Sephadex LH20 was used. Three fractions of this extract were collected and investigated for their effects on HCT15 and RKO cells. Fraction 1 had antiproliferative effects on both HCT15 and RKO cells, while fractions 2 and 3 did not decrease cell proliferation.

The effects of fraction 1 on early apoptosis, DNA fragmentation, the expression of apoptotic-related proteins and caspase-3 activity were investigated. Fraction 1 increased the exposure of PS on the outer cell membrane and fragmented DNA in both HCT15 and RKO cells. Moreover, fraction 1 decreased the expression of anti-apoptotic proteins, Bcl-x_L, p-Akt and p-Bad. This suggested that fraction 1 of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

M. hortensis extract inhibited cell proliferation and induced apoptosis via down-regulation of the above anti-apoptotic proteins. Fraction 1 also increased the activity of caspase-3 in both HCT15 and RKO cells. These results imply the need for further analysis of the active compounds.

Although the active components in fraction 1 are unknown, *M. hortensis* may help reduce the risk of colon cancer. Understanding the underlying mechanisms of action is vital if the value of this plant is to be fully appreciated.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโตซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ ใหญ่โดยสารสกัดปีบ

ผู้เขียน นายศิวพงษ์ ตันสุวรรณวงค์

ปริญญา วิทยาศาสตร ดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ ประธานกรรมการ

Prof. Dr. Kohzoh Imai กรรมการ

รศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา กรรมการ

บทคัดย่อ

ปีบจัดเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านสำคัญชนิดหนึ่งที่มีการใช้ประจำในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทยด้วย สารสกัดปีบด้วยน้ำและเอธานอลถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ การบ่มเซลล์ไลน์ด้วยสารสกัดปีบด้วยน้ำสามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (DLD-1, HCT15, RKO, SW48 และ SW480) ได้อย่างมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นัยสำคัญ ในขณะที่สารสกัดปีบด้วยเอธานอลไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ เพื่อเป็นการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของสารสกัดปีบด้วยน้ำว่าเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโตซิสหรือไม่ จึงนำวิธีตรวจสอบการแตกหักเป็นท่อนของดีเอ็นเอมาใช้ทดสอบ พบว่าสารสกัดเหนี่ยวนำการแตกหักเป็นท่อนของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ทุกชนิดที่ใช้ศึกษา โดยพบว่าเซลล์ไลน์ชนิด HCT15 และ RKO ตอบสนองต่อสารสกัดได้สูงที่สุด ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าการยับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่โดยสารสกัดปีบด้วยน้ำจะเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโตซิส

ฤทธิ์ของสารสกัดปีบด้วยน้ำต่อการเกิดอะพอพโตซิสระยะเริ่มต้นและการแสดงออกของอะพอพโตติกโปรตีนในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT15 และ RKO ได้ถูกนำไปศึกษาต่อ พบว่าสารสกัดสามารถเพิ่มปริมาณการแสดงออกของฟอสฟาติดิลเซอรีนที่บริเวณผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งในเซลล์ไลน์ชนิด HCT15 และ RKO นอกจากนี้สารสกัดยังสามารถลดการแสดงออกของแอนตี้อะพอพโตติกโปรตีนชนิด p-Bad และ Bcl-x_L ทั้งในเซลล์ไลน์ชนิด HCT15 และ RKO ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดปีบด้วยน้ำสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT15 และ RKO โดยลดการแสดงออกของแอนตี้อะพอพโตติกโปรตีน

เนื่องจากสารสกัดปีบด้วยน้ำแสดงฤทธิ์การเกิดอะพอพโตซิสต่อเซลล์ไลน์ HCT15 และ RKO เพื่อเป็นการศึกษาเพิ่มเติมต่อฤทธิ์ของสารสกัดนี้ จึงได้นำสารสกัดนี้มาทำกึ่งบริสุทธิ์โดยอาศัยการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทรกราฟฟีโดยใช้เซฟาเด็กแอลเอชยี่สิบ พบว่าสามารถแยกกึ่งบริสุทธิ์ได้ 3 แฟรกชั่น โดยทั้ง 3 แฟรกชั่นถูกนำไปศึกษาต่อเกี่ยวกับฤทธิ์ของการเพิ่มจำนวนของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลล์ไลน์ชนิด HCT15 และ RKO พบว่าเฉพาะแฟรกชั่น 1 เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิด ในขณะที่แฟรกชั่น 2 และ 3 ไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ ฤทธิ์ของแฟรกชั่น 1 ถูกนำไปทดสอบการเกิดอะพอพโตซิสระยะเริ่มต้น การแตกหักของดีเอ็นเอ การแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะพอพโตซิส และแอคติวิตี้ของเอนไซม์แคสเปส-3 พบว่าแฟรกชั่น 1 สามารถเพิ่มปริมาณการแสดงออกของฟอสฟาติดิลเซอรีนที่ผิวด้านนอกของเซลล์เมมเบรนและการแตกหักของดีเอ็นเอทั้งในเซลล์ HCT15 และ RKO นอกจากนี้ยังพบว่า แฟรกชั่น 1 สามารถลดการแสดงออกของแอนตี้อะพอพโตติกโปรตีน Bcl-x_L, p-Akt และ p-Bad ได้ ผลจากการศึกษาครั้งนี้ระบุได้ว่าแฟรกชั่น 1 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพ โตซิสโดยผ่านการลดการแสดงออกขอ งแอนตี้อะพอพโตติกโปรตีน นอกจากนี้แฟรกชั่น 1 ยังสามารถเพิ่มแอคติวิตี้ของเอน ไซม์แคสเปส -3 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT15 และ RKO ได้อีกด้วย ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความจำเป็นที่จะศึกษาเพื่อหาสารสำคัญในพืชชนิดนี้ต่อไป

ถึงแม้ว่าจะยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในแฟรกชั่น 1 คือสารกลุ่มไหน แต่สารสกัดจากปีบได้แสดงให้เห็นว่าอาจจะช่วยลดความเสี่ยงของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดอย่างลึกซึ้งต่อไปจะสามารถช่วยอธิบายประโยชน์และคุณค่าของพืชชนิดนี้ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved