

Thesis Title	The Studies of Inhibitory Effects of <i>Momordica charantia</i> Leaves on Cancer Cell Progression <i>In Vitro</i> and <i>In Vivo</i>	
Author	Miss Pornsiri Pitchakarn	
Degree	Doctor of Philosophy (Biochemistry)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Dejkriengkraikul	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Wilart Pompimon	Co-advisor
	Assist. Prof. Dr. Teera Chewonarin	Co-advisor

ABSTRACT

Current strategy for the evaluation of anticancer phytochemicals is based in part on cancer progression including cell cycle and apoptosis regulation, drug resistance of cancer cells and metastasis. Bitter melon or *Momordica charantia* is widely consumed as vegetable and especially folk medicine in Asia. Our previous study demonstrated that the bitter melon leaf extract (BMLE) was able to reverse the multidrug resistant (MDR) phenotype. However the active compounds have not been characterized. Besides, there is no evidence whether bitter melon leaf extract affects on prostate cancer progression, that prompt author to study the inhibitory effects of BMLE on cancer cell progression *in vitro* and *in vivo*.

In the first part of this study, bioguided fractionation was used to identify the active component(s) of BMLE, which is able to modulate the function of P-gp and the MDR phenotype in a multidrug resistant human cervical carcinoma KB-V1 cells

(high expression of P-glycoprotein, P-gp) compared to parental KB-3-1 cells (lack of P-gp). Researcher found that kuguacin J, a triterpenoid, one of the active components in BMLE, increased sensitivity to vinblastine and paclitaxel in KB-V1 cells. A flow cytometry assay indicated that kuguacin J inhibits the transport function of P-gp and thereby significantly increase the accumulation of rhodamine123 and calcein-AM in the cells. Kuguacin J significantly increases intracellular [³H]-vinblastine accumulation and decreased the [³H]-vinblastine efflux in the cells. Kuguacin J also inhibited the incorporation of [¹²⁵I]-iodoarylazidoprazosin (IAAP) into P-gp in a concentration-dependent manner, indicating that kuguacin J directly interacts with the drug-substrate-binding site on P-gp. These results indicate that kuguacin J modulates the function of P-gp by directly interacting at the drug-substrate-binding site and it appears to be an effective inhibitor of P-gp activity *in vitro*, and thus could be developed as an effective chemosensitizer to treat multidrug resistant cancers.

In second part of this study, researcher focused on the effects of BMLE and kuguacin J on androgen-dependent LNCaP human prostate cancer cells. Both treatments exerted growth inhibition through G1-arrest and induction of apoptosis. In addition, kuguacin J markedly decreased the levels of cyclins (D1 and E), cyclin-dependent kinases (Cdk2 and Cdk4) and proliferating cell nuclear antigen, and caused an increase in p21 and p27 levels. Its induction of apoptosis was accompanied by an increase in cleavage of caspase-3 and poly (ADP-ribose) polymerase, attributable to augment of Bax/Bcl-2 and Bad/Bcl-xL and reduction of survivin levels. BMLE and kuguacin J also reduced the expression of androgen receptor (AR), prostate-specific antigen (PSA) while increased p53 level. Down-regulation of p53 by RNA interference indicated that BMLE and kuguacin J inhibited cell growth partly through

p53-dependent cell cycle arrest and apoptotic pathways. Both BMLE and kuguacin J caused less toxicity in a normal prostate cell line, PNT1A. The results suggest that BMLE and kuguacin J, from its diethyl ether fraction could be promising candidate new antineoplastic and chemopreventive agents for cancer and carcinogenesis.

The anti-invasive effects of BMLE on a rat prostate cancer cell line (PLS10) *in vitro* and *in vivo* also have been investigated. The results indicated that non-toxic concentrations of BMLE significantly inhibited the migration and invasion of cells *in vitro*. The results of zymography showed that BMLE inhibited the secretion of MMP-2, MMP-9 and uPA from PLS10. Besides, BMLE not only significantly decreased gene expression of MMP-2 and MMP-9, but also markedly increased the mRNA level of TIMP-2, known to have inhibitory effects on the activity of MMP-2. Collagenase type IV activity also was partially inhibited by BMLE. *In vivo* study, intravenous inoculation of PLS10 to nude mice resulted in 100% survival rate in the mice given BMLE-diet as compared to 80% in the controls. The incidence of lung metastasis did not show any difference, but the percentage lung area occupied by metastatic lesions was slightly decreased in the 0.1% BMLE treatment group and significantly decreased with 1% BMLE treatment as compared to the control. The results thus indicate for the first time an anti-metastatic effect of BMLE both *in vitro* and *in vivo*.

In conclusion, BMLE and kuguacin J have shown to possess potent anticancer capabilities to induce apoptosis/cell cycle arrest in pre-initiated/initiated tumor cells, while in more advanced tumors, these compounds could block resistant to anticancer drugs, tumor progression and metastasis. These findings provide the evidences of anticancer effects of BMLE and kuguacin J and possibility to develop these natural products for cancer chemoprevention and chemotherapy.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของใบมะระระจั้นต่อการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง ในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลอง	
ผู้เขียน	นางสาวพรสิริ พิจการ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.พรงาม เดชเกรียงไกรกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รองศาสตราจารย์ ดร.วิลาศ พุ่มพิมล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีระ ชิ โจนรินทร์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารพฤกษเคมี (Phytochemical) ที่แสดงผลต่อพัฒนาการของมะเร็งซึ่งรวมไปถึง การควบคุมวัฏจักรของเซลล์, การตายแบบอะพอพโทซิส และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ในแถบเอเชียมีการบริโภคมะระระจั้น (*Momordica charantia*) ทั้งในรูปแบบของอาหารและยาพื้นบ้าน โดยก่อนหน้านี้ทางทีมงานวิจัยได้รายงานฤทธิ์ยับยั้งการดื้อยาหลายขนานของสารสกัดหยาบจากใบมะระระจั้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีมีการรายงานชนิดของสารสำคัญจากใบมะระระจั้นที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว นอกจากนี้ยังไม่มีมีการรายงานฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดใบมะระระจั้นต่อการพัฒนาการของมะเร็งต่อมลูกหมาก ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากใบมะระระจั้นต่อการพัฒนาการของมะเร็งทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง

ส่วนแรกของการศึกษาได้นำใบมะระระจั้นมาทำการสกัดแยกส่วนเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ และหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนบนผิวเซลล์ที่ทำหน้าที่ขับไล่ออกซิเจน-ไกลโคโปรตีนและการดื้อยาหลายขนาน ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่ดื้อยา KB-V1 ที่มีการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนมากบนผิวเซลล์ เทียบกับ KB-3-1 เซลล์ที่ไม่ดื้อยาและมีการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนในระดับต่ำ

จากการศึกษาพบว่าสารสำคัญจากใบมะระขี้นก สารกุกวาซินเจ (kuguacin J) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ (triterpenoid) สามารถเพิ่มความไวของเซลล์ KB-V1 ต่อยาวิโนบลาสติน และแพคลิแทกเซล ผลการศึกษาจากโพลีไซโตเมตรีพบว่าสารกุกวาซินเจสามารถเพิ่มการสะสมของสารเรืองแสงชนิด โรดามีนหนึ่งสองสาม และ แคลซิน เอเอ็มภายในเซลล์ดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญ กุกวาซินเจยังสามารถเพิ่มการสะสมและลดการขับออกของยาวิโนบลาสตินที่ติดฉลากด้วยสารรังสีในเซลล์ดังกล่าว นอกจากนี้สารกุกวาซินเจยังให้ผลยับยั้ง IAAP photoaffinity labeling ของพี-ไกลโคโปรตีนอีกด้วย ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงยับยั้งการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีน โดยการแข่งขันระหว่างสารกุกวาซินเจกับพี-ไกลโคโปรตีน ตรงตำแหน่งจำเพาะที่ยาจับกับพี-ไกลโคโปรตีน การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งชนิดพี-ไกลโคโปรตีนโดยสารกุกวาซินเจ ซึ่งแสดงถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาสารกุกวาซินเจไปใช้เป็นสารที่สามารถควบคุมหรือลดการดื้อยาในผู้ป่วยมะเร็งได้

การศึกษาในส่วนที่สองเป็นการศึกษาผลของสารสกัดใบมะระขี้นกอย่างหยาบ และสารกุกวาซินเจต่อมะเร็งต่อมลูกหมากของมนุษย์ชนิดที่ขึ้นกับฮอร์โมนแอนโดรเจน LNCaP พบว่าสารดังกล่าวทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยกระตุ้นให้เซลล์หยุดการเจริญอยู่ที่ระยะก่อนการสร้างดีเอ็นเอ (G1) และยังกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่ขบวนการตายแบบอะพอพโตซิส สารกุกวาซินเจควบคุมวัฏจักรของเซลล์ในระยะ G1 โดยยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนชนิด ไชคลิน (cyclin D1 & E), ไชคลินดีเพนเดนทีไคเนส (Cdk 2 & 4), โพรลิเฟอเรติงเซลล์นิวเคลียร์แอนติเจน (PCNA) และยังกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนชนิด p21 และ p27 นอกจากนี้พบว่าสารกุกวาซินเจยังเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสผ่านทาง การเพิ่มอัตราส่วนของ โปรตีน Bax/Bcl-2 และ Bad/Bcl-xL และการลดการแสดงออกของโปรตีนเซอร์วัวร์วิน ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของแคสเปส-3 และยับยั้งการทำงานของโปรตีน โพลีเอดีพีไรโบสโพลีเมอเรส (PARP) นอกจากนี้สารสกัดหยาบใบมะระขี้นกและสารกุกวาซินเจยังลดการแสดงออกของตัวรับแอนโดรเจน (AR) และ พรอสแตตสเปซิฟิกแอนติเจน (PSA) ในขณะที่เพิ่มการแสดงออกของโปรตีนชนิด p53 การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนชนิด p53 โดยวิธี RNA interference พบว่า สารสกัดหยาบใบมะระขี้นก และสารกุกวาซินเจยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง LNCaP ผ่านทางการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนชนิด p53 โดยการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวนี้ทำให้เกิดการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ที่ระยะ G1 และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิส นอกจากนี้สารสกัดหยาบใบมะระขี้นก และสารกุกวาซินเจมีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อมลูกหมาก PNT1A น้อยกว่าเซลล์มะเร็ง LNCaP จากผลการทดลองในส่วนนี้พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำ

สารสกัดหยาบไบบะระจี้กและสารกุกวาชินเจมาพัฒนาใช้เป็นสารต่อต้านมะเร็งได้ ทั้งในระดับป้องกันและ/หรือการรักษาโรคมะเร็งในระยะเริ่มต้นของการพัฒนาของโรค

ในส่วนสุดท้ายได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดหยาบไบบะระจี้กต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากของหนูชนิดที่ไม่ขึ้นกับฮอร์โมนแอนโดรเจน PLS10 ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดหยาบไบบะระจี้ก ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สามารถยับยั้งทั้งการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาผลของสารสกัดหยาบไบบะระจี้กต่อการหลั่งของเอนไซม์เมทริกซ์เมทาโลโปรตีนเนส (MMP)-2, MMP-9 และ ยูโรไคเนสพลาสมิโนเจนแอกติเวเตอร์ (uPA) โดยวิธี Zymography พบว่าสารสกัดหยาบไบบะระจี้กยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ดังกล่าวทั้งสามชนิด การศึกษาผลของสกัดหยาบไบบะระจี้กต่อการแสดงออกของ MMP-2, MMP-9 และ โปรตีนยับยั้งเอนไซม์เมทริกซ์เมทาโลโปรตีนเนสชนิดที่ 2 (TIMP-2) โดยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ พบว่าสารสกัดหยาบไบบะระจี้กไม่เพียงแต่ยับยั้งการแสดงออกของทั้ง MMP-2 และ MMP-9 แต่ยังเพิ่มการแสดงออกของ TIMP-2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ MMP-2 จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบไบบะระจี้กต่อการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสชนิด IV พบว่าสารสกัดหยาบไบบะระจี้กยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว การศึกษาผลของสารสกัดหยาบไบบะระจี้กต่อการแพร่กระจายเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PLS10 ที่ทำการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำของหนูชนิด nude mouse พบว่า หนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบไบบะระจี้กมีอัตราการรอด 100% ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอด 80% แม้ว่าอัตราการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง PLS10 ไปสู่ปอดของหนูในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมจะไม่มี ความแตกต่างกัน แต่พบว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เปอร์เซ็นต์พื้นที่ของรอยโรคมะเร็งที่แพร่กระจายสู่ปอดมีค่าลดลงในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบไบบะระจี้กที่ความเข้มข้น 0.1% และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบไบบะระจี้กที่ความเข้มข้น 1% ผลการศึกษานี้เป็นการรายงานฤทธิ์ของสารสกัดหยาบไบบะระจี้กต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งทั้งในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลองเป็นครั้งแรก

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบไบบะระจี้กและสารกุกวาชินเจ มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็ง สามารถยับยั้งพัฒนาการของเซลล์มะเร็งในระยะแรกโดยเหนี่ยวนำการเกิดการตายแบบอะพอพโตซิสและการหยุดวัฏจักรของเซลล์ที่ระยะ G1 และยังสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในระยะพัฒนาไปสู่ระยะสุดท้ายอีกด้วย การศึกษานี้ค้นพบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบไบบะระจี้กและสารกุกวาชินเจ โดยจากองค์ความรู้นี้สามารถจะนำสารดังกล่าวมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารต่อต้านมะเร็งได้ทั้งในรูปแบบของสารป้องกันรวมถึงยารักษาโรคมะเร็ง