Thesis Title Inhibition of Proliferation and Induction of Apoptosis in Human Colon Carcinoma Cells by Partially Purified *Centella asiatica* Fractions

Author Miss Somsiri Udompaisarn

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Prof. Dr. Usanee Vinitketkumnuen	Chairperson
Dr. Khanittha Taneyhill	Member
Asst. Prof. Dr. Jiraporn Tocharus	Member

ABSTRACT

The present study examined the anticancer effects of the crude extract of *Centella asiatica* (*C. asiatica*) as well as its partially purified fractions. The 70% ethanolic extract of *C. asiatica* was subsequently partitioned with hexane, ethyl acetate and butanol, respectively. The hexane-soluble fraction inhibited the proliferation of human colon cancer cell lines significantly more than did the ethyl acetate-soluble fraction. The IC_{50} of the hexane-soluble fraction on HCT-15 cells after 48 hour exposure was 191.19$\pm$19.42 µg/ml. The IC_{50} of the hexane -soluble fraction on SW-48 cells after 36 hour exposure was 191.63$\pm$6.18 µg/ml. The IC_{50} of the ethyl acetate-soluble fraction on HCT-15 cells after 48 hour exposure was 268.85$\pm$1.62 µg/ml. The IC_{50} of the ethyl acetate-soluble fraction on SW-48 cells after 36 hour exposure was 326.88$\pm$10.75 µg/ml. The crude extract and the butanol-soluble fraction were not toxic to the tested cancer cells. No toxic effects were detected in a normal NIH 3T3 cell line. The hexane-soluble and ethyl acetate-soluble fractions exhibited the apoptosis induction with dose- and time-dependent manner. The apoptosis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

induction was demonstrated by DNA ladder formation and flow cytometry. Hexane-soluble and ethyl acetate-soluble fraction treatment of cancer cells resulted in a dose-dependent decrease in phosphorylation of Akt. On the other hand, hexane-soluble and ethyl acetate-soluble fraction treatments resulted in a dose-dependent increase in the Bax/Bcl-X_L ratio in such a way as to favor apoptosis. Furthermore, the hexane-soluble and ethyl acetate-soluble fractions also increased caspase-3 activity. The mechanisms of apoptosis induction by *C. asiatica* may be related to the activation of caspase-3 activity, up-regulation of the pro-apoptotic protein, Bax, and down-regulation of the anti-apoptotic protein, Bcl-X_L via reduction of Akt phosphorylation in the apoptosis signaling pathway. However, the exact mechanism of induction of apoptosis by the fractions are still not fully understood. Since the partially purified fractions from *C. asiatica* are complex mixtures containing many flavonoid, glycosides and various other constituents, the potential health benefits of *C. asiatica* can be linked to its phytochemicals. The question arises as to which of these compounds mediated the protective activity of the extracts. It will be important to identify and examine the roles of these bioactive compounds in regulating cellular processes related to apoptosis.

These data provide evidence for the use of the partially purified fraction from *C. asiatica* as chemotherapeutic agents in cancer therapies.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การยับยั้งการเจริญเติบโตและการเหนี่ยวนำอะพอพโทสิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่โดยสารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วนจากบัวบก

ผู้เขียน นางสาวสมศิริ อุดมไพศาล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ.ดร. อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ	ประธานกรรมการ
อ. ดร. ขนิษฐา ทานี่ฮิล	กรรมการ
ผศ. ดร. จิราภรณ์ โตจรัส	กรรมการ

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดแยกบริสุทธิ์บางส่วนจากสารสกัดหยาบบัวบก สารสกัดหยาบด้วย 70% ethanol จะนำมาสกัดแยกส่วนตามลำดับด้วยเฮกเซน เอทิลอะซีเตต และ บิวทานอล สารสกัดที่ละลายในเฮกเซนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าสารสกัดส่วนที่ละลายในเอทิลอะซีเตต ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% ของสารสกัดที่ละลายในเฮกเซนต่อเซลล์ชนิด HCT-15 เมื่อให้สารเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 191.19 ±19.42 μg/ml ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% ของสารสกัดที่ละลายในเฮกเซนต่อเซลล์ชนิด SW-48 เมื่อให้สารเป็นเวลา 36 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 191.63±6.18 μg/ml ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% ของสารสกัดที่ละลายในเอทิลอะซีเตตต่อเซลล์ชนิด HCT-15 เมื่อให้สารเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 268.85 ±1.62 μg/ml ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% ของสารสกัดที่ละลายในเอทิลอะซีเตตต่อเซลล์ชนิด SW-48 เมื่อให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเป็นเวลา 36 36 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 326.88±10.75 μg/ml ทั้งนี้ สารสกัดหยาบและสารสกัดส่วนที่ละลายในบิวทานอล ไม่พบความเป็นพิษเมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ สารสกัดที่ละลายในเฮกเซนและเอทิลอะซีเตตไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ NIH3T3 กลไกความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดที่ละลายในเฮกเซนและเอทิลอะซีเตต อาจเกิดจากการเหนี่ยวนำขบวนการอะพอพโทสิส ซึ่งยืนยันได้โดยการตรวจหาการแตกหักของดีเอ็นเอ และตรวจสอบโดยวิธีโฟลไซโตเมทรี การกระตุ้นขบวนการอะพอพโทสิสของสารสกัดจากบัวบกสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์แคสเปส 3 การเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นขบวนการอะพอพโทสิสได้แก่ โปรตีน Bax และการลดลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งขบวนการอะพอพโทสิสได้แก่ Bcl-X_L โดยที่โปรตีนทั้งสองมีการควบคุมผ่านการเติมฟอสเฟตของโปรตีน Akt ที่อยู่ในวิถีอะพอพโทสิส ผลการทดลองแสดงว่าสารสกัดที่ละลายในเฮกเซนและเอทิลอะซีเตต มีผลต่อการลดการเติมฟอสเฟตให้แก่ Akt ส่งผลให้อัตราส่วนระหว่างโปรตีน Bax/Bcl-X_L เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นนัยของการบ่งชี้ถึงการกระตุ้นการเข้าสู่ขบวนการอะพอพโทสิสของเซลล์ สารสกัดทั้งสองส่วนมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แคสเปส 3 แบบที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร อย่างไรก็ตามกลไกทั้งหมดที่เกี่ยวข้องนั้นยังไม่ได้ทำการศึกษา และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ด้วยเหตุที่สารสกัดจากบัวบกนั้นประกอบไปด้วยสาระสำคัญหลายชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ และยังมีสารอื่นๆ อีกมากมาย ซึ่งพฤกษเคมีเหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสมกับการนำมาใช้ประโยชน์ด้านสุขภาพ จึงเป็นที่น่าสนใจและนำไปศึกษาต่อถึงประสิทธิภาพของสารประกอบเหล่านี้ โดยยังต้องการข้อมูลในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารและการทดสอบบทบาทของสารสำคัญเหล่านี้ในกระบวนการควบคุมวิถีอะพอพโทสิส

งานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากบัวบกที่ทำการแยกบริสุทธิ์บางส่วน เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นสารเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved