Thesis Title Chemopreventive Effects of Rice Products on Lung and Colorectal Tumorigenesis

Author Mr. Suphot Phutthaphadoong

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Dejkriengkraikul Advisor
Asst. Prof. Dr. Chaiyawat Chaiyasut Co-advisor
Dr. Supachai Yodkeeree Co-advisor

ABSTRACT

Cancer chemoprevention is a rational and appealing strategy for decreasing the number of cancer patients. Recently, rice constituents, such as γ-tocotrienols and phytic acid, and rice product named fermented brown rice and rice bran (FBRA) have been reported as the chemopreventive agents against many types of cancer. Therefore, the objectives of this study were to investigate the chemopreventive effects of FBRA, γ-tocotrienol and phytic acid against the tumorigenesis of lung and colon, the major cause of cancer deaths each year.

In the 1st phase of this study, the chemopreventive effect of FBRA against nicotine-derived nitrosamine ketone (NNK)-induced lung tumorigenesis in animal model was determined. Intraperitoneal injection of 10μmol/L NNK, the most potent carcinogen of cigarette smoke, in female A/J mice significantly increased the incidence of lung lesions. FBRA administration was established in both initiation and post-initiation phase of NNK injection (during and after NNK injection, respectively). Results showed that administration of 10%FBRA at initiation phase significantly

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

reduced multiplicity of lung tumor, but not its size. However, 10%FBRA administration in post-initiation phase significantly reduced both the multiplicity and size of lung tumor. Moreover, the results showed that 10%FBRA significantly decreased mRNA expression of *cytochrome P450 isotype 2a5* (*Cyp2a5*) gene, which involved in NNK activation, in the lung tissue, and significantly reduced the cell proliferative index in lung lesions of mice.

In the 2nd phase, the chemopreventive effect of γ-tocotrienol and phytic acid against NNK-induced lung tumorigenesis in cell culture model was determined. Results showed that 10μmol/L NNK treatment significantly increased both cell viability and proliferation in lung cancer A549 cells through MAPK signaling-induced cell cycle progression. NNK treatment clearly induced overexpression of the cell cycle regulatory proteins, including cyclinD1, cyclinE and PCNA, and MAPK transducing proteins, including phosphorylated-MEK1/2 (p-MEK1/2) and K-ras. Pre-treatment with γ-tocotrienol but not phytic acid for 12 hours significantly inhibited these activities of 10μmol/L NNK treatment on both the cell viability and proliferation due to decreasing expression of cyclinD1, cyclinE, PCNA and p-MEK1/2 proteins. However, the overexpression of K-ras was not inhibited. Furthermore, the results showed that pre-treatment with γ-tocotrienol but not phytic acid for 12 hours clearly inhibited the NNK-induced overexpression of CYP2A6 and CYP2A13 proteins, which involved in NNK activation, and nuclear accumulation of DNMT1 protein, which involved in epigenetic regulation of tumor suppressor genes, in 10μmol/L NNK-treated A549 cells. However, pre-treatment with γ-tocotrienol had no effect on NNK-induced DNA damage. In addition, treatment with γ-tocotrienol also significantly inhibited both the cell viability and proliferation of A549 cells through the cell cycle arrest at G0/G1 phase (due to decreasing the expression of cyclinD1), and then induction of apoptosis (inducing the cell morphology changes, phosphatidylserine externalization, PARP cleavage, and caspase-3 activation) via both intrinsic (inducing caspase-9 activation and bax/bcl-xL ratio), and extrinsic (inducing caspase-8 activation) pathways.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In the 3rd phase, the chemopreventive effect of FBRA against inflammation-related colon tumorigenesis in animal model was determined. Results showed that treatment of dextran sodium sulfate (DSS), inflammation inducing agent, in *Apc*$^{Min/+}$ mice significantly increased the incidence of colon tumors. 10%FBRA administration in DSS-treated *Apc*$^{Min/+}$ mice significantly suppressed the multiplicities but not incidences or size of colon tumors. The results also showed that 10%FBRA significantly reducing in both the cell proliferative index in colonic crypts, and mRNA expression of the inflammatory-related genes (*Cox2* and *iNos*, but not *Tnf-α*) in colon tissue of mice. However, 10%FBRA administration had no significantly effect on colorectal tumorigenesis in *Apc*$^{Min/+}$ mice due to its mutation in *Apc* gene.

In 4th phase, the chemopreventive effect of γ-tocotrienol and phytic acid against inflammation-related colon tumorigenesis in cell culture model was determined. Results showed that treatment of lipopolysaccharide (LPS), a bacterial pro-inflammatory factor, at 1μg/mL in colon cancer SW480 cells significantly induced secretion of chemoattractants, nuclear accumulation of NF-κB protein, and overexpression of iNOS protein. Pre-treatment with phytic acid but not γ-tocotrienol significantly inhibited these activities of LPS and further inhibited LPS-induced overexpression of cyclinD1 in SW480 cells.

In conclusion, this study demonstrated that the rice product named FBRA exhibits the chemopreventive effects against the cigarette carcinogen (NNK)-induced lung tumorigenesis and the inflammation (DSS)-related colorectal tumorigenesis in the animal model. Furthermore, γ-tocotrienol but not phytic acid exhibits the anti-tumorigenesis effects in NNK-treated lung cancer cell line and also inducing apoptosis via G0/G1 cell cycle arrest in lung cancer cell line. Even though, phytic acid but not γ-tocotrienol exhibits the anti-inflammation and anti-tumorigenesis in LPS-treated colon cancer cell line.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ป้องกันมะเร็งของผลิตภัณฑ์จากข้าวต่อการเกิดมะเร็งปอดและมะเร็งลำไส้

ผู้เขียน นายสุพจน์ พุทธผดุง

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร.พรงาม เดชเกรียงไกรกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไชยวัฒน์ ไชยสุต	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร.ศุภชัย ยอดคีรี	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การป้องกันการเกิดมะเร็งจากสารเคมีจัดเป็นวิธีที่มีผลสัมฤทธิ์สูงในการใช้ลดจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็ง เมื่อไม่นานนี้มีการรายงานว่าสารที่เป็นองค์ประกอบในข้าว ได้แก่ สารแกมม่า-โทโคไตรอีนอลและกรดไฟติก พร้อมทั้งผลิตภัณฑ์จากข้าวที่มีชื่อว่า Fermented brown rice and rice bran (FBRA) สามารถป้องกันการเกิดมะเร็งในหลาย ๆ อวัยวะได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันมะเร็งของผลิตภัณฑ์จากข้าว ได้แก่ สาร FBRA, สารแกมม่า-โทโคไตรอีนอลและกรดไฟติก เพื่อใช้ในการป้องกันการเกิดมะเร็งปอดและลำไส้ซึ่งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตหลักของผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งในแต่ละปี

ในการศึกษาระยะที่ 1 เป็นการศึกษาฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งปอดอันเนื่องมาจากสาร nicotine-derived nitrosamine ketone (NNK) ของสาร FBRA ในสัตว์ทดลอง การฉีดสาร NNK ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งสำคัญในควันบุหรี่ที่ความเข้มข้น 10μmol/L ให้กับหนูทดลองประเภท mice สายพันธุ์ A/J เพศเมียพบว่าสามารถก่อให้เกิดมะเร็งปอดในสัตว์ทดลองได้ ในการศึกษานี้ทำการให้สาร FBRA ในระยะก่อตัวและหลังการก่อตัวของเซลล์มะเร็ง (ระหว่างและหลังการฉีดสาร NNK, ตามลำดับ) ซึ่งผลการศึกษาพบว่าการได้รับสาร FBRA ที่ความเข้มข้น 10% ในระยะก่อตัวของเซลล์มะเร็งมีผลอย่างมีนัยสำคัญในการลดจำนวนก้อนมะเร็งในปอดแต่ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญในการลดขนาดของก้อนมะเร็งในปอด ขณะที่การได้รับสาร FBRA ที่ความเข้มข้น 10% ในระยะหลังการก่อตัวของเซลล์มะเร็งมีผลในการลดทั้งจำนวนและขนาดของก้อนมะเร็งในปอดอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การได้รับ 10%FBRA มีผลอย่างมีนัยสำคัญในการลดการแสดงออกของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

mRNA จากยีน *cytochrome P450 isotype 2a5 (Cyp2a5)* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นฤทธิ์ก่อมะเร็งของสาร NNK ในเนื้อเยื่อปอด และลดอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอด

ในระยะที่ 2 เป็นการศึกษาฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งปอดอันเนื่องมาจากสาร NNK ของสารแกมม่า-โทโคไตรอีนอลและกรดไฟติกในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยผลการศึกษาแสดงว่าสาร NNK ความเข้มข้น 10μmol/L มีผลในการเพิ่มการดำรงอยู่และการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 ผ่านทางสัญญาณ MAPK ซึ่งเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงของวัฏจักรเซลล์ โดยสาร NNK มีฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ ได้แก่ cyclinD1, cyclinE และ PCNA พร้อมทั้งโปรตีนที่นำสัญญาณ MAPK ได้แก่ phosphorylated-MEK1/2 (p-MEK1/2) และ K-ras และจากผลการศึกษาพบว่าเฉพาะการได้รับสารแกมม่า-โทโคไตรอีนอลเป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนการได้รับสาร NNK มีผลอย่างมีนัยสำคัญในการยับยั้งฤทธิ์ของสาร NNK ต่อทั้งการดำรงอยู่และการแบ่งตัวของเซลล์ A549 ที่กล่าวมาข้างต้นโดยการลดการแสดงออกของโปรตีน cyclinD1, cyclinE, PCNA และ p-MEK1/2 แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน K-ras นอกจากนี้พบว่าเฉพาะการได้รับสารแกมม่า-โทโคไตรอีนอลเป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนการได้รับสาร NNK มีผลในการป้องกันการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน CYP2A6 และ CYP2A13 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นฤทธิ์ก่อมะเร็งของสาร NNK และเอ็นไซม์ DNMT1 ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมระดับการเกิดความผิดปกติของยีนต้านมะเร็งในเซลล์ A549 ที่ได้รับ NNK ความเข้มข้น 10μmol/L แต่การได้รับสารแกมม่า-โทโคไตรอีนอลก่อนสาร NNK ไม่มีผลในการป้องกันการเกิดความเสียหายของสาย DNA อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของสาร NNK พร้อมกันนั้นที่สารแกมม่า-โทโคไตรอีนอลมีฤทธิ์ในการลดการดำรงอยู่และการแบ่งตัวของเซลล์ A549 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นผลมาจากการหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ไว้ในระยะ G0/G1 (โดยลดการแสดงออกของโปรตีน cyclinD1), แล้วจึงเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งปอดเกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านทั้งแบบการกระตุ้นภายในและการกระตุ้นภายนอก ซึ่งกรดไฟติกไม่มีฤทธิ์ต่าง ๆ ที่กล่าวมานี้เลย

ในระยะที่ 3 เป็นการศึกษาฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้อันเนื่องมาจากการอักเสบของสาร FBRA ในสัตว์ทดลอง จากผลการศึกษาพบว่าหนูทดลองประเภท mice สายพันธุ์ $Apc^{Min/+}$ ซึ่งได้รับสารก่อการอักเสบ DSS ทางน้ำดื่มมีอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งลำไส้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่การให้สาร FBRA ความเข้มข้น 10% กับหนูทดลองซึ่งได้รับสาร DSS ดังที่กล่าวมาข้างต้นมีผลอย่างมีนัยสำคัญในการลดจำนวนมะเร็งในลำไส้ใหญ่โดยที่ไม่มีผลต่ออุบัติการณ์และขนาดของก้อนมะเร็งลำไส้ ทั้งนี้ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสาร FBRA ที่ความเข้มข้น 10% มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่ออัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และการแสดงออกของ mRNA จากยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่น *Cox2* และ *iNos* แต่ไม่มีผลต่อยีน *Tnf-α* อย่างไรก็ดีการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้รับสาร FBRA ที่ความเข้มข้น 10% ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้อันเนื่องมาจากความผิดปกติของยีน *Apc* ของหนูทดลองสายพันธุ์ $Apc^{Min/+}$

ในระยะที่ 4 เป็นการศึกษาฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้อันเนื่องมาจากการอักเสบของสารแกมม่า-โทโคไตรอีนอลและกรดไฟติกในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยผลการศึกษาแสดงว่าสารก่อการอักเสบ LPS ความเข้มข้น 1μg/mL มีผลอย่างมีนัยสำคัญในการลดการหลั่งสารที่มีคุณสมบัติ chemoattractants, การลดการสะสมภายในนิวเคลียสของโปรตีน NF-κB และการป้องกันการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์ iNOS ในเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด SW480 ซึ่งการได้รับกรดไฟติกก่อนการได้รับสารก่อการอักเสบ LPS มีผลอย่างมีนัยสำคัญในการยับยั้งฤทธิ์ของสาร LPS ดังที่กล่าวมาข้างต้นพร้อมทั้งป้องกันการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีน cyclinD1 ในเซลล์ SW480 ที่ได้รับสาร LPS ซึ่งการได้รับสารแกมม่า-โทโคไตรอีนอลไม่มีผลต่าง ๆ ที่กล่าวมานี้เลยในเซลล์ SW480 ที่ได้รับสาร LPS

กล่าวโดยสรุปการศึกษานี้พบว่าผลิตภัณฑ์จากข้าว FBRA มีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดมะเร็งปอดอันเนื่องมาจากการได้รับสารก่อมะเร็งในควันบุหรี่ (NNK) และการเกิดมะเร็งลำไส้ซึ่งเกี่ยวข้องกับภาวะอักเสบของลำไส้อันเนื่องจากสาร DSS ในการศึกษากับสัตว์ทดลอง นอกจากนี้พบว่าเฉพาะสารแกมม่า-โทโคไตรอีนอลจึงมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งปอดอันเนื่องมาจากการได้รับสาร NNK และมีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งปอดเกิดกระบวนการตายแบบ apoptosis โดยหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ไว้ที่ระยะ G0/G1 ขณะที่เฉพาะกรดไฟติกมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดการอักเสบและการเกิดมะเร็งลำไส้อันเนื่องมาจากภาวะการอักเสบในเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ได้รับสาร LPS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved