

Thesis title Effect of Lemongrass Extract on Azoxymethane-induced Colon
 Carcinogenesis in Rats

Author Ratchada Suaeyun

Master of Science Biochemistry

Examining committee

Associate Professor Dr. Usanee Vinitketkumnuen Chairperson

Associate Professor Dr. Ampai Panthong Member

Dr. Treetip Ratanavorachai Member

ABSTRACT

This study has investigated anticarcinogenicity of 80% ethanolic extract of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) in animal model. The effect of lemongrass extract on the formation of azoxymethane(AOM)-induced DNA adducts and aberrant crypts foci (ACF) in rat colon was studied. One week after the start of treatment of F344 rats with lemongrass extract at the dairy dose of 0.5 or 5 g/kilogram of body weight (kg bw) by intragastric route, the rats received two subcutaneous injections with 15 mg/kg bw of azoxymethane (AOM), once a week for two weeks. For colonic and hepatic DNA adduct analysis, the rats were sacrificed 12 hrs after the second AOM injection. DNA was extracted from liver and colon and was analyzed for O⁶-methylguanine (O⁶-meGu) and N⁷-methylguanine (N⁷-meGu) formation by high performance liquid chromatography (HPLC).

For aberrant crypt foci (ACF) formation at the initiation step of carcinogenesis, AOM-injected rats were continuously treated with lemongrass extract daily for 5 weeks and were killed 3 weeks after the second AOM injection. For analysis of ACF at the promotion step, the treatment with the lemongrass extract (0.5 g/kg) started two weeks after the second AOM injection and continued for 12 weeks until the animals were sacrificed.

It was found that lemongrass significantly inhibited DNA adduct formation in colon both in the mucosa and muscular layer. In addition, lemongrass extract significantly inhibited ACF formation in colon both at the initiation and promotion step of the carcinogenesis. Especially in the promotion step, lemongrass extract inhibited the formation of larger ACF (with four or more crypts per focus) which was predictive of colon tumor incidence. However, lemongrass at dose 0.5 g/kg bw significantly induced O⁶-meGu formation in the liver, but this effect was not seen at the dose of 5 g/kg bw.

In order to clarify the possible protective mechanism of lemongrass extract, the effects of this medicinal plant on bacterial β -glucuronidase activity and antioxidant activity were studied. The antioxidant activity was determined by studying the effect of lemongrass on the formation of malondialdehyde (MDA) induced by *t*-butylhydroperoxide and hemin.

The results showed that lemongrass may have an active substance which was able to act as a competitive inhibitor of β -glucuronidase *in vitro*. In addition, the lemongrass extract was shown to possess antioxidant activity. From the results, it was proposed that the lemongrass extract may inhibit the release of methylazomethanol (carcinogenic aglycon) from its substrate (glucuronide conjugated form) in the colon, and thus decreased the DNA adduct and ACF formation in rat colon. An antioxidant activity of lemongrass may be responsible

for the inhibitory effect on ACF formation in the chemical-induced colon carcinogenesis both at initiation and promotion steps. The antioxidant activity may be able to prevent free radical formation which can be important in causing the cellular damage. However, the inductive effect of lemongrass at low dose (0.5 g/kg bw) on O⁶-meGu adduct formation in liver has not been clearly understood. This adverse side effect should be studied more extensively.

This investigation is the first to report that lemongrass inhibited the development of preneoplastic colonic lesions induced by AOM. Further studies, including the examination of the inhibitory effects on long term carcinogen exposure, the confirmation of adverse side effects, and the extension to study in human population, could provide useful information for the development and assessment of lemongrass as a chemoprotective agent.

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสารสกัดตะไคร้ต่อการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูขาว
ที่ได้รับสารเอโซซีมีเทน

ชื่อผู้เขียน นางสาวรัชดา เสื่อยันต์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. อุษณีย์ วิจิเขตค่านวล ประธานกรรมการ

รศ.ดร. อำไพ บันทอง กรรมการ

ดร.ตรีทิพย์ รัตนวรชัย กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรด้วย 80% เอทานอลต่อการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง โดยเป็นการศึกษาถึงการยับยั้งของสารสกัดตะไคร้ต่อการเกิด DNA adducts และ aberrant crypts foci (ACF) ในลำไส้ใหญ่ของหนูขาวสายพันธุ์ F344 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย azoxymethane (AOM) หลังจากการป้อนสารสกัดตะไคร้แก่หนูที่ความเข้มข้น 0.5 ก. หรือ 5 ก./กก.นน.หนู เป็นเวลา 1 อาทิตย์ จึงฉีด AOM เข้มข้น 15 มก./กก.นน.หนู อาทิตย์ละครั้งเป็นเวลา 2 อาทิตย์ ในขณะที่หนูยังคงได้รับสารสกัดทุกวัน หนูที่ทำการทดลองสำหรับการศึกษา DNA adduct จะถูกฆ่าที่เวลา 12 ชั่วโมง หลังจากฉีด AOM ครั้งสุดท้ายแล้ว โดยนำตับและลำไส้ใหญ่ออกมาสกัดเอา DNA นำไปวิเคราะห์ O⁶-methylguanine (O⁶-meGu) และ N⁷-methylguanine (N⁷-meGu) โดย HPLC หนูที่ทำการทดลองสำหรับศึกษา การยับยั้งของสารสกัดตะไคร้ต่อการเกิด ACF ในระยะที่เริ่มต้นการเกิดมะเร็ง (Initiation step) จะถูกฆ่าหลังจากได้รับสารสกัดเป็นเวลา 3 อาทิตย์ หลังการได้รับ AOM ครั้งสุดท้าย สำหรับการศึกษาค้นคว้าการยับยั้งในระยะส่งเสริมมะเร็ง (Promotion step) หนูขาวจะเริ่มได้รับสารสกัดหลังจากได้รับการฉีด AOM ครั้งสุดท้ายแล้ว 2 อาทิตย์ และจะถูกฆ่าเมื่อได้รับสารสกัดครบ 12 อาทิตย์

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากตะไคร้สามารถลดการเกิด DNA adducts ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย AOM ในลำไส้ใหญ่ทั้งในส่วนของกล้ามเนื้อ และส่วนของเยื่ออย่างมีนัยสำคัญ สารสกัดจากตะไคร้สามารถลดการเกิด ACF ได้ทั้งที่ระยะเริ่มต้นและระยะส่งเสริมมะเร็ง โดยเฉพาะการยับยั้งที่ระยะส่งเสริมมะเร็ง พบว่าสารสกัดตะไคร้ลดการเกิด ACF ที่มีขนาดใหญ่ (จำนวน crypts มากกว่า 4 crypts/focus) ซึ่งเป็นลักษณะที่ใช้พยากรณ์เกี่ยวกับอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ แต่ในส่วนของตับสารสกัดจากตะไคร้ที่ความเข้มข้น 0.5 ก./กก.นน.หนู มีผลกระตุ้นการเกิด O⁶-meGu ทั้งนี้สารสกัดที่ความเข้มข้น 5 ก./กก.นน.หนู ไม่แสดงผลแต่อย่างใด

เพื่อเป็นการอธิบายกลไกการยับยั้งที่อาจจะเป็นไปได้ของสารสกัดตะไคร้ ในการทดลองครั้งนี้ ได้ศึกษาผลของสารสกัดต่อการทำงานของเอนไซม์ β -glucuronidase นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงคุณสมบัติการเป็น antioxidant ของสารสกัดจากตะไคร้ด้วย โดยศึกษาผลการยับยั้งการเกิด malondialdehyde (MDA) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย *t*-butylhydroperoxide และ hemin

ผลจากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดจากตะไคร้ยับยั้งการทำงานของ β -glucuronidase แบบแข่งขัน นอกจากนี้สารสกัดตะไคร้มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดตะไคร้สามารถยับยั้งเอนไซม์ β -glucuronidase ที่จะสลายหมู่ glucuronide ออกมาจาก substrate ของมันคือ methylazomethanol (MAM) - β -D-glucuronide เป็นผลให้เกิดสาร MAM ซึ่งเป็นอะกลัยโคเนที่มีฤทธิ์ก่อมะเร็งในลำไส้ลดลง ส่งผลให้ปริมาณ DNA adduct ลดลงและยับยั้งการเกิด ACF ที่ลำไส้ของหนูทดลอง

การลดลงของ ACF ทั้งที่ระยะเริ่มต้น และระยะส่งเสริมมะเร็งนั้น ส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะสารสกัดตะไคร้สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการผิดปกติของเซลล์ทั้งที่ระยะเริ่มต้นและระยะส่งเสริมมะเร็ง อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่สามารถอธิบายถึงสาเหตุของการเพิ่มของการเกิด O⁶-meGu ที่ตับหลังจากหนูทดลองได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5ก./กก.นน.หนู ทั้งนี้ควรมีการศึกษาถึงผลข้างเคียงนี้โดยละเอียดต่อไป

การศึกษานี้เป็นการรายงานครั้งแรกถึงผลการยับยั้งของสารสกัดตะไคร้ต่อรอยโรคการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่จากสาร AOM การศึกษาเพิ่มเติมถึงผลการยับยั้งการเกิดมะเร็งระยะยาว การ

ศึกษาผลข้างเคียงของตะไคร้ ตลอดจนการศึกษาในคน เป็นสิ่งที่จะต้องทำต่อไป เพื่อให้ได้ข้อมูลที่
เป็นประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาตะไคร้เป็นสารป้องกันโรคมะเร็ง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University