

Thesis Title	Effect of <i>Cleistocalyx nervosum</i> var. <i>paniala</i> Seed Extracts on Cancer Chemoprevention
Author	Miss Wanida Inboot
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai

ABSTRACT

Cleistocalyx nervosum var. *paniala* is a local plant in the Plant Genetic Conservation Project under the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn mainly cultivated in the northern provinces of Thailand. Its flesh can be eaten and processed as juice, wine and jam remaining many wasted seeds. To add economic value and increase scientific information of *C. nervosum* seed, this study aimed to investigate cancer chemopreventive effect of *C. nervosum* seed extracts using both *in vitro* and *in vivo* genotoxicity tests. It was found that 0.1-1.0 mg/plate of dichloromethane and methanol crude extracts had no mutagenic effects on *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100 both with and without metabolic activation. However, at high concentrations in absence of metabolic activation showed cytotoxic effect on bacteria. Furthermore, both extracts presented antimutagenicity against aflatoxin B1 (AFB1) and 2-amino-3,4 dimethylimidazo[4,5-f] quinoline (MeIQ) induced mutagenesis on *S. typhimurium* strain TA98 and 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide (AF-2) induced mutagenesis on *S. typhimurium* strain TA100. Dichloromethane extract exhibited stronger antimutagenicity than methanol extract. To confirm their genotoxicity by using *in vivo* model, rat liver micronucleus test was evaluated. Various concentrations of dichloromethane extract (100-500 mg/kg bw) and methanol extract (10-1000 mg/kg bw) were orally administrated to rats for 21 days. The highest treated dose of both extracts did not

induce micronucleus formation in rat liver Methanol extract slightly inhibited micronucleus formation in the liver of diethylnitrosamine initiated rats, while dichloromethane extract significantly inhibited liver micronucleus formation in a dose-dependent manner. Furthermore, the inhibitory mechanism of dichloromethane extract on the early stage of hepatocarcinogenesis involving Phases I and II of xenobiotic metabolizing enzymes; NADPH-cytochrome P450 reductase (P450R), cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO-1), glutathione *S*-transferase (GST), UDP-glucuronyl transferase (UGT) and heme oxygenase (HO) was investigated. The dichloromethane extract enhanced the GST and UGT activities but decreased HO activity in the liver of diethylnitrosamine induced rat. However, it did not affect on the expression of these proteins. Our previously study showed that fraction 4 isolated from dichloromethane extract using column chromatography presented the strongest antimutagenic potency against several mutagens. The five partially purified fractions (MK4.1-4.5) and its pure compounds; 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone (DMC) and hariganetin obtained from fraction 4 were investigated for their genotoxic effect. All fractions did not exhibit mutagenic effects on *S. typhimurium* strains TA98 and TA100 in presence and absence of metabolic activation. They presented antigenotoxicity against AFB1, MeIQ and AF-2 induced mutagenesis in *S. typhimurium*. The antimutagenic potency of these fractions ordered from high to low was DMC, hariganetin, MK4.1, MK4.4, MK4.5, MK4.2 and MK4.3, respectively. In conclusion, dichloromethane extract obtained from seed of *C. nervosum* demonstrated cancer chemopreventive effects on both mutant bacterial and rat models. 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone might be an antimutagenic compound presented in *C. nervosum* seed. Its inhibitory mechanism on the early stage of rat hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine might be partly due to enhancement of detoxifying enzymes in rat liver

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงต่อการป้องกันการเกิดมะเร็ง
ผู้เขียน	นางสาวนิตดา อินบุตร
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย

บทคัดย่อ

มะเกี๋ยง เป็นพืชพื้นเมืองในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พบมากในเขตภาคเหนือ นิยมนำมาบริโภคทั้งในรูปผลสด และผลิตภัณฑ์แปรรูป เช่น น้ำมะเกี๋ยง ไวน์และแยม เป็นต้น จึงทำให้ส่วนของเมล็ดเหลือเป็นจำนวนมาก เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของเมล็ดมะเกี๋ยง รวมทั้งมีการศึกษาประโยชน์จากเมล็ดมะเกี๋ยงอยู่จำกัด ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของเมล็ดมะเกี๋ยง โดยทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และด้านการกลายพันธุ์ทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่า สารสกัดหยาบจากเมล็ดมะเกี๋ยงชั้น ไคคลอโรมีเทน และเมทานอลที่ความเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อเพลท ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธัยฟิมิวเรียม สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีเอนไซม์จากตับหนูกระตุน์ อย่างไรก็ตามพบว่า สารสกัดหยาบ ไคคลอโรมีเทนและเมทานอลที่ความเข้มข้นสูงมีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธัยฟิมิวเรียมในสภาวะที่ปราศจากเอนไซม์ และสารสกัดทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ต่อ AFB1 และ MeIQ ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธัยฟิมิวเรียม สายพันธุ์ TA 98 และมีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ต่อ AF-2 ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธัยฟิมิวเรียม สายพันธุ์ TA 100 โดยเฉพาะสารสกัดชั้น ไคคลอโรมีเทนที่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์สูงกว่าชั้นเมทานอล นอกจากนี้ ได้ทำการยืนยันผลของสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะเกี๋ยงต่อการเกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ทดลองโดยใช้การเกิดไมโครนิวเคลียสในตับหนูเป็นตัวบ่งชี้ความผิดปกติของสารพันธุกรรมที่เกิดจากสารเคมี ทำการป้อนสารสกัดหยาบ ไคคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 100-500 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัว และสารสกัดเมทานอล ความเข้มข้น 10-1000 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัว ทางปากเป็นเวลา 21 วัน พบว่า สารสกัดหยาบทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นสูงไม่มีผลเหนี่ยวนำการ

เกิดไมโครนิวเคลียสในตับหนู แต่พบว่า สารสกัดชั้นเมทานอลสามารถยับยั้งการเกิดไมโครนิวเคลียสได้เล็กน้อย (21%) ในขณะที่สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถยับยั้งการเกิดไมโครนิวเคลียสในตับหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็งตับไดเอทิลไนโตรซามีนอย่างมีนัยสำคัญได้ 49% และ 60% ตามลำดับ จากการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการยับยั้งการเกิดไมโครนิวเคลียสของสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์กำจัดสารพิษระยะที่ 1 และ 2 ได้แก่ NADPH-cytochrome P450 reductase (P450R), cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO-1), glutathione S-transferase (GST), UDP-glucuronyl transferase (UGT) และ heme oxygenase (HO) พบว่า สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนเหนี่ยวนำกัมมันตภาพของเอนไซม์ GST และ UGT แต่ลดกัมมันตภาพของเอนไซม์ HO อย่างไรก็ตามสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า สารกึ่งบริสุทธิ์ลำดับที่ 4 ที่ได้จากการแยกสารสกัดไดคลอโรมีเทนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์สูงสุดต่อสารก่อกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ จึงทำการแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ดังกล่าวด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีต่อ ทำให้ได้สารกึ่งบริสุทธิ์ 5 ส่วน (MK4.1-4.5) และสารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone (DMC) และ hariganetin ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย ทั้งสายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีสารกระตุ้นด้วยเอนไซม์จากตับหนู แต่มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ต่อสารก่อกลายพันธุ์ AFB1, MeIQ และ AF-2 โดยเรียงลำดับฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์สูงไปหาค่า ดังนี้ DMC, hariganetin, MK4.1, MK4.4, MK4.5, MK4.2 และ MK4.3 ตามลำดับ จากงานวิจัยทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดหยาบจากเมล็ดมะเขือขื่นชั้นไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง โดยมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone ส่วนกลไกยับยั้งการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้นจากสารก่อมะเร็งไดเอทิลไนโตรซามีนในหนูทดลอง อาจเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำเอนไซม์กำจัดสารพิษในตับ