



## ส่วนประกอบเนื้อเรื่อง

### รายงานฉบับสมบูรณ์ของการวิจัย

แผนงานวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญจากมังคุดเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง  
และการรักษาภาวะพังผืดในตับ และภาวะตับแข็งในสัตว์ทดลอง

(ภาษาอังกฤษ) Study activities of major constituents isolated from  
mangosteen as chemotherapy for cancers and liver  
fibrosis and liver cirrhosis (in vivo)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2556 จำนวนเงินงบประมาณที่ได้รับ 3,273,784 บาท

ทุนอุดหนุนสำหรับโครงการวิจัยที่ 1 จำนวนเงินรวม 1,789,448 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ วันที่ 1 เมษายน 2557 ถึง 1 เมษายน 2558

#### โครงการวิจัยที่ 1 (งบประมาณ 1,789,448 บาท)

(ภาษาไทย) การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดบริสุทธิ์แอลฟาแมงโกสตินจาก  
มังคุดในหนู

(ภาษาอังกฤษ) Study on antitumor activities of purified alpha mangostin  
isolated from mangosteen in mice

#### หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. ปริมเจนียน มุ่งการดี

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

โทรศัพท์ : 0-2644-8677 ต่อ 1133, 1136

โทรสาร : 0-2644-8692, 0-2354-4326 โทรศัพท์มือถือ 0-817424561

E-mail address: primchanien.moo@mahidol.ac.th

#### ผู้ร่วมวิจัย

##### 1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นัฐวุฒิ กอเข้ม

สถานที่ทำงาน Innovation Center for Medical Redox Navigation

Kyushu University, Fukuoka 812-8582, ประเทศญี่ปุ่น

Tel; +81-(0)92-642-6620, Fax; +81-(0)92-642-6630

E-mail address: kosem\_k@hotmail.com

## 2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภโชค มั่งมุล

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

โทรศัพท์ : 0-2644-8677 ต่อ 5630 โทรสาร : 0-2644-8700

E-mail address: supachoke.man@mahidol.ac.th

## 3. นายเอกรัฐ รอดภัย

โครงการวิจัยและพัฒนาวัคซีนสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

โทรศัพท์ : 0-2441-9337 โทรสาร : 0-2441-9336

E-mail address: erodpai@gmail.com

### ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

#### 1. ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง นิโลบล เนืองตัน

ตำแหน่ง ศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

เลขที่ 2 ถนนพราณนก บางกอกน้อย กทม 10700

โทรศัพท์ : 0-2419-7581 โทรสาร : 0-24199141

E-mail address: neelobol.neu@mahidol.ac.th

#### 2. Professor Dr. HIDEO UTSUMI

ตำแหน่ง Professor Emeritus of Kyushu University

สถานที่ทำงาน Director Innovation Center for Medical Redox Navigation,

Kyushu University, Fukuoka 812-8582, ประเทศญี่ปุ่น

Tel; +81-(0)92-642-6620, Fax; +81-(0)92-642-6630

E-mail address: hideo.utsumi.278@m.kyushu-u.ac.jp

(ลงชื่อ).....หัวหน้าโครงการวิจัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีเมณีน มุ่งการดี)

12 กุมภาพันธ์ 2559

## 1. บทนำ

เนื่องจากมังคุดเป็นตัวอย่างของผลไม้ไทย ที่มีการใช้ในภูมิปัญญาไทย ในการรักษาโรคหลายชนิด จากรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของกลุ่มต่างๆ และของคณะผู้วิจัยทำให้ทราบศักยภาพเบื้องต้นที่น่าสนใจอย่างยิ่งของมังคุดในการนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคต่างๆ โดยขณะนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาและทำการแยกสารบริสุทธิ์และสารกึ่งบริสุทธิ์จากมังคุดจากสารสกัดอัลกอฮอล์ได้ คือ  $\alpha$ -mangostin จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า สารสกัดเบื้องต้นก่อนการแยกให้บริสุทธิ์มีคุณสมบัติที่มีศักยภาพสูง ในการนำมาประยุกต์ใช้ด้านด้านการแบ่งตัวของมะเร็งและมีฤทธิ์ antioxidation ที่มีประสิทธิภาพสูง ขณะนี้หลายประเทศได้มีความสนใจศึกษาสารจากมังคุดอย่างเข้มข้น บางประเทศกำลังเริ่มการทดลองทำการศึกษาด้านคลินิกในบางโรคแล้ว โดยส่วนใหญ่ใช้เพียงสารสกัดหยาบ (crude extract)

สำหรับคณะผู้วิจัยเองก่อนที่เสนอขอทุน วช. ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็ง *in vitro* ของสาร  $\alpha$ -mangostin ที่แยกได้บริสุทธิ์ จากผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าสาร  $\alpha$ -mangostin ให้ผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3 ที่ให้ผลที่ชัดเจนเดียวกับที่ได้ศึกษา จาก crude extract แต่มีฤทธิ์ที่แรงขึ้น ในปีงบประมาณ 2554-2555 ที่ผ่านมานี้ ทีมผู้วิจัยได้รับงบประมาณสนับสนุนการศึกษาค้นคว้าการใช้สาร  $\alpha$ -mangostin ที่ลงลึกในด้านต่างๆของเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิด (10 ชนิด) เปรียบเทียบกับยาต้านมะเร็งชนิดต่างๆ เพื่อการพัฒนาเป็นยาต่อไป จะเห็นว่าผลที่ได้สำหรับสาร  $\alpha$ -mangostin ได้ฤทธิ์ที่แรงกว่ายาที่ใช้เปรียบเทียบบางชนิดในการทดลองกับเซลล์หลายชนิดโดยเฉพาะกับมะเร็งลำไส้ (CACO-II) และเซลล์มะเร็งเต้านมบางชนิด (MCF-7), (MDA-MB-231) และโดยภาพรวมให้ฤทธิ์ที่ได้ผลดีเมื่อเทียบกับยาชนิดต่างๆ รายงานจากต่างประเทศแสดงผลของ  $\alpha$ -mangostin จากมังคุดสามารถลด tumor growth และ lymph node metastasis ในหนู ซึ่งผลงานตีพิมพ์ในกลุ่มคณะผู้วิจัยศึกษาในหนู BALB/c แสดงผลของ crude methanolic extract ที่ชัดเจนในการลดขนาดของก้อนมะเร็งลำไส้ (NL-17) ที่ทำการ transplanted ในหนูได้ผลดี เป็นรายงานที่ชัดเจน จึงควรนำไปสู่การศึกษาฤทธิ์ต้านก้อนมะเร็งของสารบริสุทธิ์  $\alpha$ -mangostin ซึ่งเป็นสารสำคัญ และมีปริมาณสูง ใน crude extract ที่สามารถแยกสารสำคัญได้เอง โดยทำการศึกษาผลในสัตว์ทดลอง *in vivo* ในปีงบประมาณ 2556 นี้ โดยศึกษาผลจากการฉีดสาร  $\alpha$ -mangostin เข้าช่องท้อง และโดยการป้อน รวมทั้งทำการศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง BALB/c mice นอกเหนือจากที่ศึกษาในโครงการวิจัยที่ 2 ที่ศึกษาสมบูรณในหนูแรทและเม้าส์ ซึ่งหากได้ผลดีมีความปลอดภัยในระดับประยุกต์ใช้ได้ จึงจะสามารถสรุปผลประเมินเพื่อใช้ศึกษาทางคลินิกต่อไป

ขณะนี้การศึกษาในกลุ่มผู้วิจัยต่างๆทางด้านสมุนไพรในประเทศไทย มีผลการศึกษาในระดับแนวหน้าใกล้เคียงกับรายงานของโลกในปัจจุบัน จึงเชื่อว่าการวิจัยในเรื่องนี้ จะสามารถแข่งขันได้กับ

ต่างประเทศที่กำลังให้ความสนใจศึกษาฤทธิ์ของมังคุดมากยิ่งขึ้น ยิ่งกว่านั้นมังคุดเป็นผลไม้ที่เป็นทรัพยากรของชาติเราเอง ที่สามารถนำเปลือกที่ทิ้งแต่คงคุณประโยชน์อย่างสูงมาศึกษาได้ง่าย จึงหวังว่าผลจากการวิจัยจะเป็นส่วนหนึ่งในการนำประโยชน์ของผลไม้ซึ่งเป็นสมุนไพรไทย คือ มังคุด มาใช้ในการรักษาโรคเป็นยาใหม่ที่พัฒนามาจากสมุนไพรได้ และจะมีผลต่อความน่าเชื่อถือ และส่งเสริมการวิจัยและพัฒนาของสมุนไพรไทยในระดับสากล

## 2. วัตถุประสงค์

เพื่อการศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์  $\alpha$ -mangostin ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลอง ดังนี้

2.1 ศึกษาผลด้านการต้านมะเร็งลำไส้ (*in vivo* antitumor activity) ของสารบริสุทธิ์ (แอลฟาแมงโกสตินสาร;  $\alpha$ -mangostin) ในสัตว์ทดลอง เปรียบเทียบกับยาปัจจุบันที่ใช้รักษาโรคมะเร็ง โดยการทดลองจะทำการทดลองในระบบที่ได้เคยทดลองได้ผลดีจากสาร crude alcoholic extract

2.1.1 การศึกษานี้จะดูผลการต้านมะเร็งโดยการฉีดสาร  $\alpha$ -mangostin ทางช่องท้อง และทำเพิ่มจากที่นำเสนอไว้ โดยจะทดลองการต้านมะเร็งเมื่อป้อนสาร  $\alpha$ -mangostin ทางปากเพื่อการประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำการพัฒนาขึ้นในโครงการ

2.1.2 ตรวจระดับ gene expression ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกต่างๆของการต้านมะเร็งด้าน apoptosis (Bax และ Bcl ยีน) ที่สกัดแยก RNA จากชิ้นเนื้อของสัตว์ทดลองที่ใช้สาร  $\alpha$ -mangostin และศึกษา tumor marker; cytokeratin โดยใช้วิธี real time PCR เช่นเดียวกับวิธีการที่ศึกษาใน *in vitro* ในปี 1

2.2 ศึกษาขนาดพิษ (toxicity) ของสาร  $\alpha$ -mangostin โดยศึกษาในหนู BALB/c (เพิ่มจากที่เสนอในโครงการที่ 2) เพื่อเป็นข้อมูลในการทดลองการต้านมะเร็งในหนู BALB/c ขนาดที่ใช้ฉีดและเพิ่มการป้อน และเพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสาร  $\alpha$ -mangostin ในโครงการที่ 3 และเป็นข้อมูลสำหรับการใช้โรคมะเร็งและการป้องกันและรักษาภาวะพังผืดในตับ และภาวะตับแข็ง

## 3. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

|                 |                               |
|-----------------|-------------------------------|
| มังคุด          | Mangosteen                    |
| ชื่อวิทยาศาสตร์ | <i>Garcinia mangostana</i> L. |
| ชื่อวงศ์        | Guttiferae                    |

### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้ยืนต้นสูงประมาณ 10-12 เมตร ทุกส่วนมียางสีเหลือง ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปไข่หรือรูปวงรีแกมขอบขนาน กว้าง 6-11 ซม. ยาว 15-25 ซม. เนื้อใบหนาและค่อนข้างเหนียวคล้ายหนัง หลังใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ท้องใบสีอ่อนกว่า ดอกเดี่ยวหรือเป็นคู่ออกที่ซอกใบใกล้ปลายกิ่ง สมบูรณ์เพศ หรือแยกเพศ กลีบเลี้ยงสีเขียวอมเหลือง กลีบดอกสีแดง ฉ่ำน้ำ ผลเป็นผลสด ค่อนข้างกลม (สมุนไพรพื้นบ้าน, 2542) ส่วนที่ใช้ ราก ทำให้ประจำเดือนมาตามปกติ รักษาโรคบิดมูกเลือด, ต้น รักษาโรคบิดมูกเลือด, เปลือกต้น ชะล้างบาดแผล รักษาแผล, ใบ รักษาโรคบิดมูกเลือด, ดอก รักษาโรคบิดมูกเลือด, ผลดิบ สมานแผล แก้บาดแผล แก้ท้องร่วง, เปลือกผล แก้แผลเป็นหนอง แก้แผลเปื่อย แก้บิดมูกเลือด (สมุนไพรพื้นบ้าน, 2542)

### องค์ประกอบทางเคมี

ประกอบด้วย xanthone, mangostin, tannin, chrysanthemin, gartinone, gartanin, mangostanol, mangostinone, vitamin B1, B2, C (สมุนไพรพื้นบ้าน, 2542; Moongkarndi et al., 2004) เป็นต้น

### ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

สารจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ต้านเชื้อรา, ยับยั้งเอนไซม์ viral reverse transcriptase และ HIV protease, ต้านเชื้อมาลาเรีย, แก้ท้องเดิน, ต้าน histamine, ต้าน serotonin, ลดการอักเสบ ลดการเกิดแผลในทางเดินอาหาร, ยับยั้งเอนไซม์ DNA topoisomerases I และ II, จับกับอนุมูลอิสระ ต้านออกซิเดชัน, ต้านมะเร็ง, เพิ่มความดันโลหิต (สมุนไพรพื้นบ้าน, 2542; Moongkarndi et al., 2004) เป็นต้น

การวิจัยในประเทศไทย พบว่าสารสกัดหยาบ (crude extract) จากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วย methanol สามารถการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม (SKBR3) โดยมีค่า ED<sub>50</sub> ที่ความเข้มข้น  $9.25 \pm 0.64 \mu\text{g/ml}$  ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis โดยตรวจสอบจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidation) รวมถึงการยับยั้งการเกิด Reactive Oxygen Species (ROS reduction) อีกด้วย (Moongkarndi et al., 2004)

### Mangostin

เป็นสารกลุ่ม phenolic compounds ตัวหนึ่ง ซึ่งอนุพันธ์ของ xanthone มีชื่อทางเคมี คือ 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2,8-bis-(3-methyl-2-butenyl)-9H-xanthen-9-one หรือ 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2,8-di(3-methyl-2-butenyl) xanthone (The Merck Index, 1996) และยังแบ่งเป็น  $\alpha$ - beta และ gamma-mangostin ขึ้นกับหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง hydroxyl (-OH) ดังแสดงในรูปที่ 3 (Matsumoto et al., 2004) ในด้านของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่า  $\alpha$ -mangostin

สามารถเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ของ human leukemia HL60 cell line โดยกระตุ้นระบบ caspase-3, 9 ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งตรวจการเกิด apoptosis โดยดูจากรูปร่างของเซลล์ที่เปลี่ยนไป และดูจาก cytochrome C/AIF ที่ถูกปลดปล่อยออกมา จากการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีที่สัมพันธ์กับกระบวนการ apoptosis พบว่าการแทนที่หมู่ methoxy (H<sub>3</sub>C-O-C) โดยหมู่ hydroxyl พบว่าลดความแรงอย่างมีนัยสำคัญ (Matsumoto et al., 2003); antiproliferative activity, antioxidation และ induction of apoptosis ต่อ SKBR3 human breast adenocarcinoma cell line (Moongkarndi et al., 2004 (a), Moongkarndi et al., 2004 (b)) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ sphingomyelinase ทำให้กระตุ้นการเกิด apoptosis ของเซลล์ การยับยั้งกระบวนการเกิด oxidative damage ของ LDL ในมนุษย์, การเป็น competitive antagonist ของ histamine ที่ H<sub>1</sub> receptor และมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Helicobacter pylori* (Iikubo et al., 2002) เป็นต้น สำหรับ  $\alpha$ -mangostin มีการศึกษาพบว่าสามารถยับยั้งการสร้าง prostaglandin E<sub>2</sub> โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-1 และ COX-2 ที่ความเข้มข้น 0.8 และ 2  $\mu$ g/ml ตามลำดับ, มีฤทธิ์ต้านเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), มีฤทธิ์ antimalarial และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ monoamine oxidase (Nakatani et al., 2002) ผลการศึกษาทาง in vivo ของสารสกัด และ  $\alpha$ -mangostin มีการรายงานเป็นระยะๆ โดยจากการทดลองและการศึกษาที่แตกต่างกัน (Doi H et al., 2009; Shibata Ma, et al., 2011; Kosem K et al., 2012) แต่ก็มีผู้ศึกษาว่าการวิจัยยังคงต้องมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ต่างๆมากขึ้นในการนำมาใช้ทางคลินิก

#### 4. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย (ตามที่เสนอไว้)

4.1 ได้รับผลการพิจารณาอนุมัติการวิจัยในสัตว์ทดลอง จากคณะกรรมการกำกับและดูแลการใช้สัตว์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กำหนดการศึกษาตาม modified protocol ของ Gupta et al., 2000 and Holland, 2004 และได้รับอนุมัติการวิจัยในสัตว์ทดลองที่ Kyushu University ประเทศญี่ปุ่น

4.2 ศึกษาความเป็นพิษของสาร  $\alpha$ -mangostin ใน BALB/c mice ทั้งโดยการฉีดเข้าช่องท้อง และการให้ทางปาก (ทำวิจัยเพิ่มขึ้นจากที่เสนอไว้)

4.2.1 การทดสอบความเป็นพิษของ  $\alpha$ -mangostin ด้วยวิธีฉีดทางช่องท้อง โดยใช้สารช่วยการละลายที่ได้ทำการทดลองศึกษามาให้เหมาะสม (ใช้สารช่วยละลายคือ 0.5 % hydroxypropyl methylcellulose; HPMC) ด้วยขนาด 0, 50, 100, 200 และ 500 mg/kg body weight ถูกฉีดทางช่องท้องวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 7 วัน โดยแบ่งหนูเป็นกลุ่มกลุ่มละ 5 ตัว หลังจากการฉีดครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หนูถูกชั่งน้ำหนักและทำการฆ่าเพื่อเก็บอวัยวะภายในได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ไต และม้าม

4.2.2 การทดสอบความเป็นพิษของ  $\alpha$ -mangostin ด้วยวิธีการป้อนทางปาก สารละลาย  $\alpha$ -mangostin ใน 0.5 % HPMC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50 – 500 mg/kg body weight) ถูกป้อนทางปากวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 14 วัน

#### 4.3 การศึกษาฤทธิ์ของ $\alpha$ -mangostin ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหนู

4.3.1 หนูที่ใช้ทดลองคือ BALB/c mice จะแบ่งหนูออกเป็นกลุ่มๆต่างๆ เตรียมเซลล์ เพื่อฉีดเซลล์ NL-17 cells ( $10^6$  cells/mouse; ที่เดิมเคยศึกษาใช้ left footpad แต่จาก ประสิทธิภาพต่อมาใช้ฉีดเข้าด้านข้างของท้องหนู

4.3.2 ฉีดเซลล์ NL-17 cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/mouse; ที่ใต้ผิวหนังกลางหลังหนู แนะนำให้ฉีดบริเวณหลังเอียงทางขวา) เป็นเวลา 3 วัน ทดลองเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบความสำเร็จของการ เกิดขนาดของก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นให้มีขนาดใกล้เคียงกัน

4.3.3 ทำการฉีดสาร  $\alpha$ -mangostin ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal administration; i.p.) ภายหลังฉีดเซลล์มะเร็ง 3 วัน ด้วยขนาดยา ที่ 25, 50, 100 mg/kg body weight, 200  $\mu$ l /mouse (ขนาดที่ใช้จะต้องทำการวิจัยเริ่มต้นก่อนว่าได้ผลและปรับเปลี่ยนเมื่อ ประเมินจากผลเริ่มต้นที่ได้) เป็นเวลา 14 วัน กลุ่มควบคุมฉีดยา 5-FU ขนาด 10 mg/kg body weight

4.3.4 ทำการป้อนสาร  $\alpha$ -mangostin ภายหลังฉีดเซลล์มะเร็ง 24 ชม. (ทำวิจัยเพิ่ม จากที่เสนอขอทุนไว้) ด้วยขนาดยาต่างๆ ที่ 25, 50, 100, 250 mg/kg body weight (ขนาดที่ เลือกใช้ต้องปรับเปลี่ยนเมื่อประเมินจากผลความเป็นพิษที่ได้ผลจากการศึกษา) เป็นเวลา 14 วัน กลุ่ม ควบคุมฉีดยา 5-FU ขนาด 20 mg/kg body weight จากการทดลองสรุปว่าขนาด  $\alpha$ -mangostin ที่ ใช้ป้อนคือ 250 mg/kg body weight

4.3.5 ตรวจผลทุก 2 วัน และคำนวณ Median survival time (MST) และ life span of treated-tumor mice ของหนูทุกกลุ่ม

$$\text{Antitumor activity (\%)} = [1 - (\text{treated tumor mice} / \text{untreated tumor mice})] \times 100$$

$$\text{Increase in life span (\%)} = (\text{MST}_{\text{treated-tumor mice}} / \text{MST}_{\text{untreated-tumor mice}}) \times 100$$

ขนาดของก้อนมะเร็ง น้ำหนักและพฤติกรรมกินอาหาร ถูกบันทึกทุก 2 วัน ขนาดของ ก้อนมะเร็งแสดงเป็นปริมาตร (Volume, V, mm<sup>3</sup>) คำนวณจาก ความยาว (Length, L, mm) และ ความกว้าง (Width, W, mm) ตามสมการ  $V = L \times (W^2/2)$

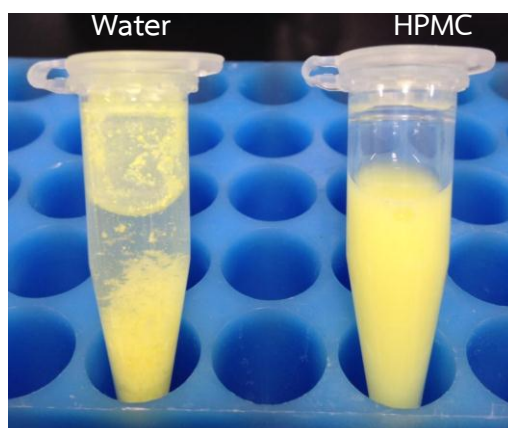
Sacrifice หนูโดยการดมยา เจาะเลือด ตัดชิ้นเนื้อเพื่อทำ การตรวจทางพยาธิวิทยา และการ แยกสกัด RNA ในการตรวจ gene expression ต่างๆ

4.3.6 ประเมินค่าทางสถิติโดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และ Student *t* - test. ค่า  $P < 0.01$  และ  $P < 0.05$  พิจารณา statistically as significant.

## 5. ผลการวิจัย

### 5.1 การเตรียม $\alpha$ -mangostin สำหรับการทดสอบในสัตว์ทดลอง

$\alpha$ -mangostin เป็นสารในกลุ่ม xanthenes ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น hydrophobic compound ที่ไม่ละลายน้ำ การศึกษาครั้งนี้จึงใช้ 0.5 % HPMC (hydroxypropyl methylcellulose) เป็นตัวทำละลาย การทดลองแสดงให้เห็นชัดว่า  $\alpha$ -mangostin สามารถถูกเตรียมเป็นสารละลายแบบ suspension ได้ดีด้วย HPMC ในขณะที่ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ ดังแสดงใน รูปที่ 1 และการทดลองยังพบว่าความเข้มข้นสูงสุดของ  $\alpha$ -mangostin สามารถถูกเตรียมได้ที่ระดับ 50 mg ในปริมาตร 1 ml ของ 0.5 % HPMC การเตรียม  $\alpha$ -mangostin ใน HPMC ที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ นั้น จะถูกใช้สำหรับการฉีดทางช่องท้องและการป้อนทางปาก หลังจากการ sonication ที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 1 การเตรียม  $\alpha$ -mangostin ในน้ำและ 0.5% HPMC

### 5.2 การทดสอบความเป็นพิษของ $\alpha$ -mangostin ด้วยวิธีฉีดทางช่องท้อง

$\alpha$ -mangostin ใน 0.5 % HPMC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 50, 100, 200 และ 500 mg/kg ถูกฉีดทางช่องท้องวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 7 วัน โดยแบ่งหนูเป็นกลุ่มกลุ่มละ 5 ตัว หลังจากการฉีดครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หนูถูกชั่งน้ำหนักและทำการฆ่าเพื่อเก็บอวัยวะภายในได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ไต และม้าม

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า น้ำหนักร่างกายหนูที่ถูกฉีดด้วย  $\alpha$ -mangostin ที่ความเข้มข้น 200 และ 500 mg/kg นั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละวัน ลักษณะภายนอกพบว่าหนูมีอาการผิดปกติอย่างเห็นได้ชัด คือ ขนตั้ง อุจจาระเหลว มีสีเหลือง แสดงว่า  $\alpha$ -mangostin ถูกดูดซึมเข้าทางเดินอาหารที่ความเข้มข้นสูงยังพบว่าหนูมีอาการเซื่องซึม สำหรับหนูที่ฉีดด้วย  $\alpha$ -mangostin ขนาดสูงที่ 500 mg/kg พบว่าหนูตายถึง 2 ตัว จาก 5 ตัวหลังจากฉีดเพียง 1 ครั้งและหนูทุกตัวตายหลังจากการฉีดครั้งที่ 3 สำหรับการฉีด  $\alpha$ -mangostin สำหรับความเข้มข้น 50 – 200 mg/kg พบว่าหนอรอดชีวิตทุกตัวหลังจากการฉีด 7 วัน แต่กลุ่มที่ฉีดด้วยความเข้มข้น 200 mg/kg พบว่าน้ำหนักร่างกายหนูลดลงอย่างเห็นได้ชัดและเมื่อเปิดช่องท้องพบว่าการตกค้างของ  $\alpha$ -mangostin บนพื้นผิวอวัยวะภายในและยังพบว่าอวัยวะภายในต่าง ๆ มีสีคล้ำและจับตัวกันเป็นก้อนในรูปแบบที่ผิดปกติแตกต่างจากหนูที่ฉีดด้วย vehicle (0.5 % HPMC เพื่อเป็น control group) อย่างชัดเจนดัง **รูปที่ 2** ดังนั้นความเข้มข้นที่ปลอดภัยสำหรับหนูในการศึกษาฤทธิ์ด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งควรที่จะ  $\leq 100$  mg/kg สำหรับการฉีดทางช่องท้อง



Control mouse



200 mg/kg  $\alpha$ -mangostin

**รูปที่ 2** แสดงภาพอวัยวะภายในช่องท้องของหนูกลุ่มควบคุมและหนูกลุ่มที่ฉีด  $\alpha$ -mangostin ความเข้มข้น 200 mg/kg

**ตารางที่ 1** จำนวนหนูที่รอดชีวิตหลังจากการฉีด  $\alpha$ -mangostin ทางช่องท้อง

| การฉีดครั้งที่ | $\alpha$ -mangostin (mg/kg) |    |     |     |     |
|----------------|-----------------------------|----|-----|-----|-----|
|                | 0                           | 50 | 100 | 200 | 500 |
| 1              | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 2              | 5                           | 5  | 5   | 5   | 3   |
| 3              | 5                           | 5  | 5   | 5   | 1   |
| 4              | 5                           | 5  | 5   | 5   | 0   |
| 5              | 5                           | 5  | 5   | 5   | 0   |
| 6              | 5                           | 5  | 5   | 5   | 0   |
| 7              | 5                           | 5  | 5   | 5   | 0   |
| วันสุดท้าย     | 5                           | 5  | 5   | 5   | 0   |

วันสุดท้าย คือ หนึ่งวันหลังจากฉีด  $\alpha$ -mangostin ทางช่องท้องครั้งสุดท้าย เป็นวันที่นับจำนวนหนูที่รอดชีวิต ก่อนชั่งน้ำหนักร่างกายและฆ่าหนู เพื่อเก็บตัวอย่างเลือดและอวัยวะภายใน

**ตารางที่ 2** การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักร่างกายหนูหลังจากการฉีด  $\alpha$ -mangostin ทางช่องท้อง

| การฉีดครั้งที่ | $\alpha$ -mangostin (mg/kg) |                |                |                |                |
|----------------|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                | 0                           | 50             | 100            | 200            | 500            |
| 1              | 18.9 $\pm$ 0.3              | 18.4 $\pm$ 1.0 | 19.2 $\pm$ 0.7 | 18.5 $\pm$ 0.5 | 17.5 $\pm$ 1.2 |
| 2              | 19.6 $\pm$ 0.8              | 17.5 $\pm$ 1.2 | 18.1 $\pm$ 0.8 | 18.1 $\pm$ 0.9 | 16.9 $\pm$ 1.1 |
| 3              | 18.9 $\pm$ 0.5              | 16.3 $\pm$ 1.7 | 17.1 $\pm$ 0.8 | 16.7 $\pm$ 0.5 | 15.2 $\pm$ 0.0 |
| 4              | 19.6 $\pm$ 0.5              | 17.5 $\pm$ 1.3 | 17.8 $\pm$ 0.9 | 16.1 $\pm$ 0.5 | -              |
| 5              | 20.1 $\pm$ 0.6              | 17.6 $\pm$ 1.4 | 18.3 $\pm$ 0.6 | 15.7 $\pm$ 0.7 | -              |
| 6              | 19.8 $\pm$ 0.8              | 17.8 $\pm$ 1.0 | 18.3 $\pm$ 0.7 | 15.5 $\pm$ 1.0 | -              |
| 7              | 19.9 $\pm$ 0.8              | 18.1 $\pm$ 1.0 | 18.7 $\pm$ 0.6 | 14.7 $\pm$ 1.3 | -              |
| วันสุดท้าย     | 20.0 $\pm$ 0.7              | 17.2 $\pm$ 1.1 | 18.3 $\pm$ 0.5 | 14.3 $\pm$ 2.1 | -              |

วันสุดท้าย คือ หนึ่งวันหลังจากฉีด  $\alpha$ -mangostin ทางช่องท้องครั้งสุดท้าย เป็นวันที่นับจำนวนหนูที่รอดชีวิต ก่อนชั่งน้ำหนักร่างกายและฆ่าหนู เพื่อเก็บตัวอย่างเลือดและอวัยวะภายใน

**ตารางที่ 3** เปรียบเทียบน้ำหนักของอวัยวะภายในหลังจากการฉีด  $\alpha$ -mangostin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็น ระยะเวลา 7 วัน ทางช่องท้อง

| อวัยวะ<br>(g) | $\alpha$ -mangostin (mg/kg) |                 |                 |                 |     |
|---------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|
|               | 0                           | 50              | 100             | 200             | 500 |
| หัวใจ         | $0.11 \pm 0.00$             | $0.10 \pm 0.01$ | $0.09 \pm 0.01$ | $0.08 \pm 0.01$ | -   |
| ปอด           | $0.16 \pm 0.01$             | $0.13 \pm 0.01$ | $0.14 \pm 0.01$ | $0.12 \pm 0.01$ | -   |
| ตับ           | $1.07 \pm 0.05$             | $0.88 \pm 0.13$ | $1.06 \pm 0.08$ | $0.78 \pm 0.20$ | -   |
| ไต            | $0.27 \pm 0.01$             | $0.23 \pm 0.01$ | $0.25 \pm 0.02$ | $0.23 \pm 0.04$ | -   |
| ม้าม          | $0.10 \pm 0.01$             | $0.11 \pm 0.01$ | $0.15 \pm 0.02$ | $0.08 \pm 0.04$ | -   |

### 5.3 การทดสอบความเป็นพิษของ $\alpha$ -mangostin ด้วยวิธีการป้อนทางปาก

การป้อนทางปากเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลองสารละลาย  $\alpha$ -mangostin ใน 0.5 % HPMC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50 – 500 mg/kg) ถูกป้อนทางปากวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 14 วัน จากการสังเกตพฤติกรรมภายนอกและน้ำหนักร่างกายพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างหนูที่ป้อน  $\alpha$ -mangostin และหนูกลุ่มควบคุมที่ป้อน 0.5% HPMC ตลอดระยะเวลาการทดสอบยังพบว่าหนูรอดชีวิตทุกตัว และมีการเพิ่มน้ำหนัก ร่างกายตามเกณฑ์ปกติ นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างของน้ำหนักของอวัยวะภายใน แต่อย่างไรก็ตามได้ท การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวัดระดับเอนไซม์ที่บ่งชี้การทำงานของตับและไตเพิ่มเติม ผลการทดสอบความเป็นพิษ ของ  $\alpha$ -mangostin ที่ป้อนทางปากนั้นแสดงให้เห็นว่า  $\alpha$ -mangostin มีความเป็นพิษน้อยมาก เนื่องจากหนูยังมี อาการปกติ สามารถกินอาหารและน้ำได้ทำให้น้ำหนักร่างกายเพิ่มขึ้นตามเกณฑ์ปกติเช่นเดียวกับหนูกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4 จำนวนหนูที่รอดชีวิตหลังจากการป้อน  $\alpha$ -mangostin ทางปาก

| การป้อนครั้งที่ | $\alpha$ -mangostin (mg/kg) |    |     |     |     |
|-----------------|-----------------------------|----|-----|-----|-----|
|                 | 0                           | 50 | 100 | 200 | 500 |
| 1               | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 2               | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 3               | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 4               | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 5               | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 6               | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 7               | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 8               | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 9               | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 10              | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 11              | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 12              | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 13              | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| 14              | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |
| วันสุดท้าย      | 5                           | 5  | 5   | 5   | 5   |

วันสุดท้าย คือ หนึ่งวันหลังจากป้อน  $\alpha$ -mangostin ทางปากครั้งสุดท้าย เป็นวันที่นับจำนวนหนูที่รอดชีวิต ก่อนซึ่งนำน้ำหนักร่างกายและฆ่าหนูเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดและอวัยวะภายใน

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักร่างกายหนูหลังจากการป้อน  $\alpha$ -mangostin ทางปาก

| การป้อนครั้งที่ | $\alpha$ -mangostin (mg/kg) |                |                |                |                |
|-----------------|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                 | 0                           | 50             | 100            | 200            | 500            |
| 1               | 18.0 $\pm$ 0.9              | 17.7 $\pm$ 0.4 | 18.0 $\pm$ 1.0 | 18.6 $\pm$ 1.4 | 18.5 $\pm$ 0.8 |
| 2               | 17.7 $\pm$ 0.9              | 17.5 $\pm$ 0.4 | 18.0 $\pm$ 1.3 | 18.7 $\pm$ 1.3 | 18.7 $\pm$ 0.9 |
| 3               | 17.6 $\pm$ 0.7              | 17.5 $\pm$ 0.7 | 17.0 $\pm$ 1.1 | 18.2 $\pm$ 1.6 | 18.2 $\pm$ 1.0 |
| 4               | 18.2 $\pm$ 0.8              | 17.7 $\pm$ 0.7 | 17.3 $\pm$ 1.0 | 17.7 $\pm$ 1.4 | 17.3 $\pm$ 0.9 |
| 5               | 18.8 $\pm$ 0.7              | 17.7 $\pm$ 0.7 | 17.8 $\pm$ 0.9 | 18.5 $\pm$ 1.3 | 18.2 $\pm$ 0.9 |
| 6               | 18.5 $\pm$ 0.8              | 17.8 $\pm$ 0.8 | 17.8 $\pm$ 1.0 | 18.7 $\pm$ 1.1 | 18.5 $\pm$ 0.6 |
| 7               | 18.8 $\pm$ 0.6              | 17.8 $\pm$ 1.0 | 18.0 $\pm$ 0.8 | 18.7 $\pm$ 1.2 | 19.0 $\pm$ 0.8 |
| 8               | 18.9 $\pm$ 0.7              | 18.0 $\pm$ 1.0 | 18.3 $\pm$ 1.0 | 19.0 $\pm$ 1.1 | 18.9 $\pm$ 0.6 |
| 9               | 18.8 $\pm$ 0.8              | 18.3 $\pm$ 0.7 | 18.2 $\pm$ 1.0 | 18.9 $\pm$ 1.1 | 18.7 $\pm$ 0.7 |
| 10              | 18.6 $\pm$ 0.7              | 18.0 $\pm$ 0.8 | 18.6 $\pm$ 1.1 | 19.3 $\pm$ 1.3 | 18.9 $\pm$ 0.7 |
| 11              | 18.8 $\pm$ 0.6              | 18.4 $\pm$ 0.8 | 18.7 $\pm$ 1.2 | 19.5 $\pm$ 1.5 | 19.2 $\pm$ 0.6 |
| 12              | 19.0 $\pm$ 0.8              | 18.1 $\pm$ 0.7 | 18.6 $\pm$ 1.2 | 19.4 $\pm$ 1.6 | 19.2 $\pm$ 0.7 |
| 13              | 19.4 $\pm$ 0.7              | 18.7 $\pm$ 0.5 | 19.4 $\pm$ 1.1 | 20.0 $\pm$ 1.6 | 19.9 $\pm$ 0.7 |
| 14              | 19.1 $\pm$ 0.6              | 18.6 $\pm$ 0.5 | 19.3 $\pm$ 1.0 | 20.3 $\pm$ 1.9 | 20.1 $\pm$ 0.8 |
| วันสุดท้าย      | 19.3 $\pm$ 0.6              | 18.8 $\pm$ 0.9 | 19.1 $\pm$ 1.2 | 19.9 $\pm$ 1.7 | 19.8 $\pm$ 0.8 |

วันสุดท้าย คือ หนึ่งวันหลังจากป้อน  $\alpha$ -mangostin ทางปากครั้งสุดท้าย เป็นวันที่นับจำนวนหนูที่รอดชีวิต ก่อนชั่งน้ำหนักร่างกายและฆ่าหนู เพื่อเก็บตัวอย่างเลือดและอวัยวะภายใน

**ตารางที่ 6** เปรียบเทียบน้ำหนักของอวัยวะภายในหลังจากการป้อน  $\alpha$ -mangostin ทางปาก ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน

| อวัยวะ<br>(g) | $\alpha$ -mangostin (mg/kg) |                 |                 |                 |                 |
|---------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|               | 0                           | 50              | 100             | 200             | 500             |
| หัวใจ         | $0.10 \pm 0.01$             | $0.11 \pm 0.01$ | $0.11 \pm 0.01$ | $0.11 \pm 0.01$ | $0.11 \pm 0.01$ |
| ปอด           | $0.16 \pm 0.02$             | $0.15 \pm 0.01$ | $0.16 \pm 0.02$ | $0.17 \pm 0.01$ | $0.16 \pm 0.02$ |
| ตับ           | $1.06 \pm 0.13$             | $0.99 \pm 0.08$ | $0.97 \pm 0.13$ | $1.03 \pm 0.07$ | $1.21 \pm 0.20$ |
| ไต            | $0.25 \pm 0.02$             | $0.28 \pm 0.03$ | $0.26 \pm 0.02$ | $0.28 \pm 0.01$ | $0.27 \pm 0.02$ |
| ม้าม          | $0.10 \pm 0.02$             | $0.10 \pm 0.01$ | $0.11 \pm 0.02$ | $0.10 \pm 0.01$ | $0.10 \pm 0.01$ |

#### 5.4 การศึกษาฤทธิ์ของ $\alpha$ -mangostin ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหนู

##### 5.4.1 ฤทธิ์ของ $\alpha$ -mangostin ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหนูที่ให้การฉีดทางช่องท้อง

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง หลังจากการปลูกเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ NL-17 cells ปริมาณ  $1.5 \times 10^6$  cells ในหนูแต่ละตัวบริเวณใต้ผิวหนัง (แนะนำให้ฉีดบริเวณหลังเยื้องทางขวา subcutaneous inoculation) เป็นเวลา 3 วัน สาร์ เพื่อดูว่าปริมาณก้อนมะเร็งเกิดขึ้นในขนาดที่ใกล้เคียงกัน ฉีดสาร  $\alpha$ -mangostin ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 mg/kg ทางช่องท้องวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน ขนาดของก้อนมะเร็งถูกแสดงเป็นปริมาตร (Volume, V,  $\text{mm}^3$ ) คำนวณจากความยาว (Length, L, mm) และความกว้าง (Width, W, mm) ตามสมการดังต่อไปนี้

$$V = L \times (W^2/2)$$

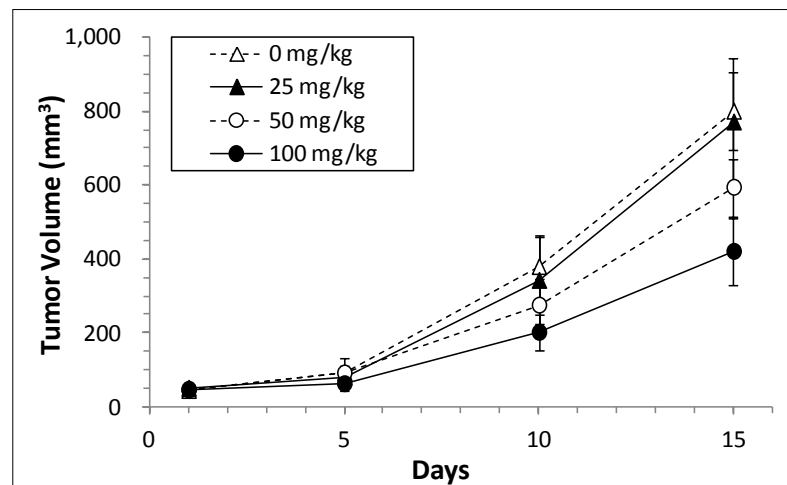
นอกจากนี้ ในวันสุดท้ายของการทดลองก้อนมะเร็งจะถูกตัดออกเพื่อเทียบน้ำหนักที่แน่นอนระหว่างกลุ่ม และเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป

##### ฤทธิ์ของ $\alpha$ -mangostin ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหนูที่ให้การฉีดทางช่องท้อง

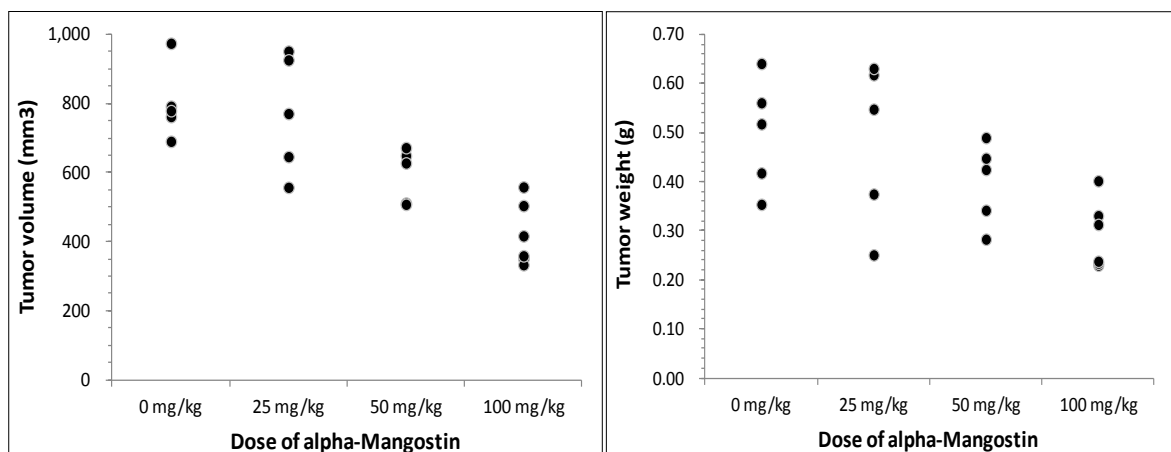
###### การทดลองครั้งที่ 1

จากการวัดทุกวันหลังจากการฉีด  $\alpha$ -mangostin จนสิ้นสุดการทดลองพบว่า การเพิ่มขนาดของก้อนมะเร็งช้าลงในหนูกลุ่มที่ฉีด  $\alpha$ -mangostin ตามลำดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ในวันสุดท้ายหลังจากการฉีด  $\alpha$ -mangostin ได้ทำการเทียบกับปริมาตรก้อนมะเร็งกับกลุ่มควบคุมที่ฉีด 0.5 % HPMC เท่านั้น ( $799.7 \pm 105.3 \text{ mm}^3$ ) พบก้อนมะเร็งเมื่อฉีด  $\alpha$ -mangostin ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 mg/kg มีปริมาตรลดลง 3.7% ( $770.5 \pm 171.8 \text{ mm}^3$ ), 25.7% ( $593.8 \pm 78.3 \text{ mm}^3$ ) และ 47.4 %

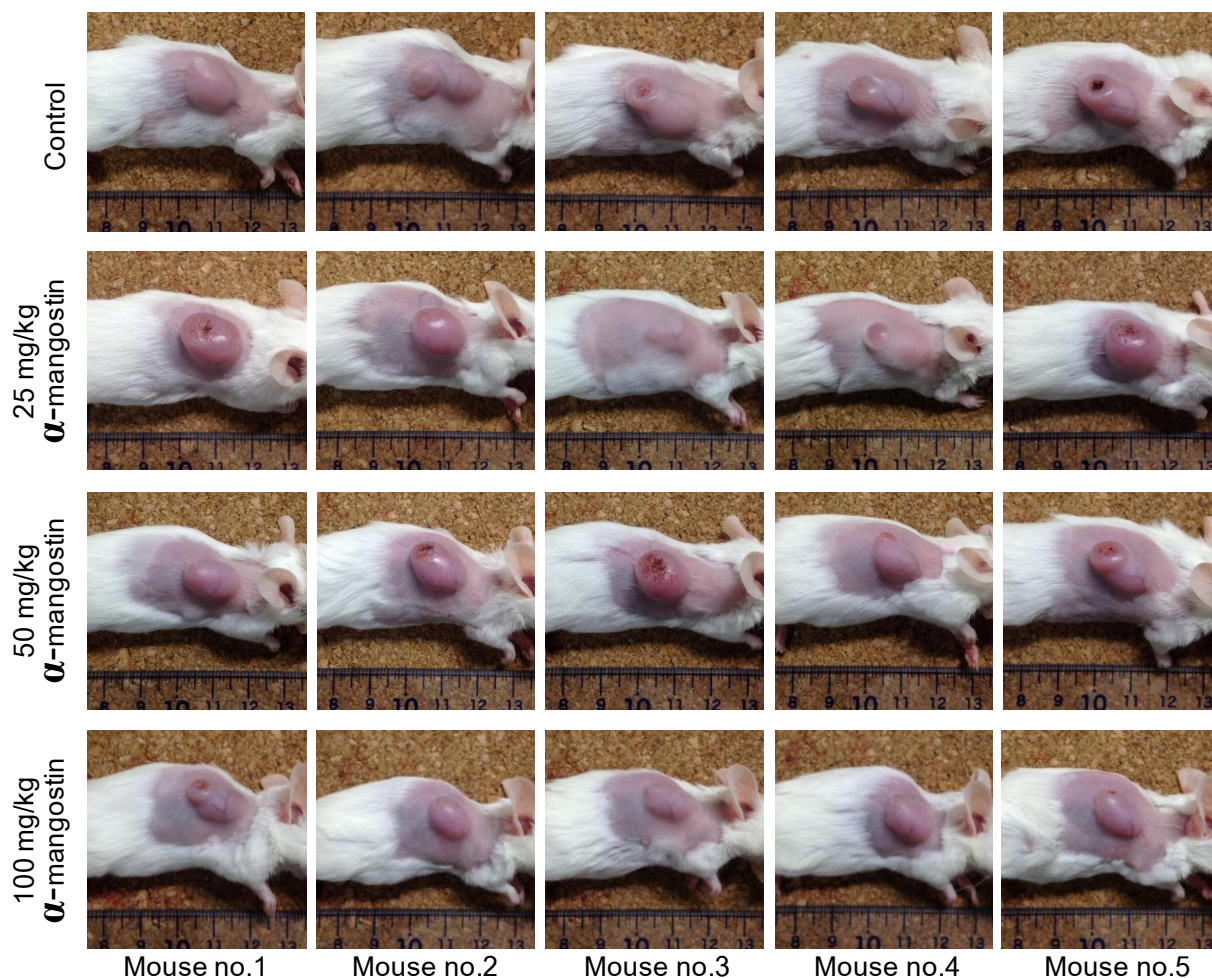
( $420.2 \pm 92.1 \text{ mm}^3$ ) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำการเก็บและชั่งน้ำหนักก้อนมะเร็งในวันสุดท้ายหลังจากการฉีด  $\alpha$ -mangostin ครั้งที่ 14 เป็นเวลา 1 วัน เพื่อเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็ง สำหรับการทดสอบอื่น ๆ ต่อไป เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักของก้อนมะเร็งระหว่างหนูกลุ่มควบคุมกับหนูกลุ่มที่ฉีด  $\alpha$ -mangostin พบความสัมพันธ์เช่นเดียวกับการเปรียบเทียบปริมาตรของก้อนมะเร็ง น้ำหนักของมะเร็งกลุ่มควบคุมสูงที่สุดคือ  $0.498 \pm 0.114$  กรัม และลดลง 2.6 % ( $0.485 \pm 0.166$  กรัม), 20.1 % ( $0.398 \pm 0.084$  กรัม) และ 41.6 % ( $0.29 \pm 0.070$  กรัม) เมื่อฉีด  $\alpha$ -mangostin ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 mg/kg ตามลำดับ



รูปที่ 3 การเพิ่มขนาดของมะเร็ง NL-17 colon cancer ในหนูแต่ละกลุ่มที่ฉีด  $\alpha$ -mangostin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 4 เปรียบเทียบขนาดของก้อนมะเร็ง NL-17 colon cancer จากปริมาตร (volume,  $\text{mm}^3$ ) และน้ำหนัก (weight, g) ในหนูแต่ละกลุ่มหลังจากฉีด  $\alpha$ -mangostin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 5 เปรียบเทียบขนาดของก้อนมะเร็ง NL-17 colon cancer ในหนูแต่ละกลุ่มหลังจากฉีด  $\alpha$ -mangostin

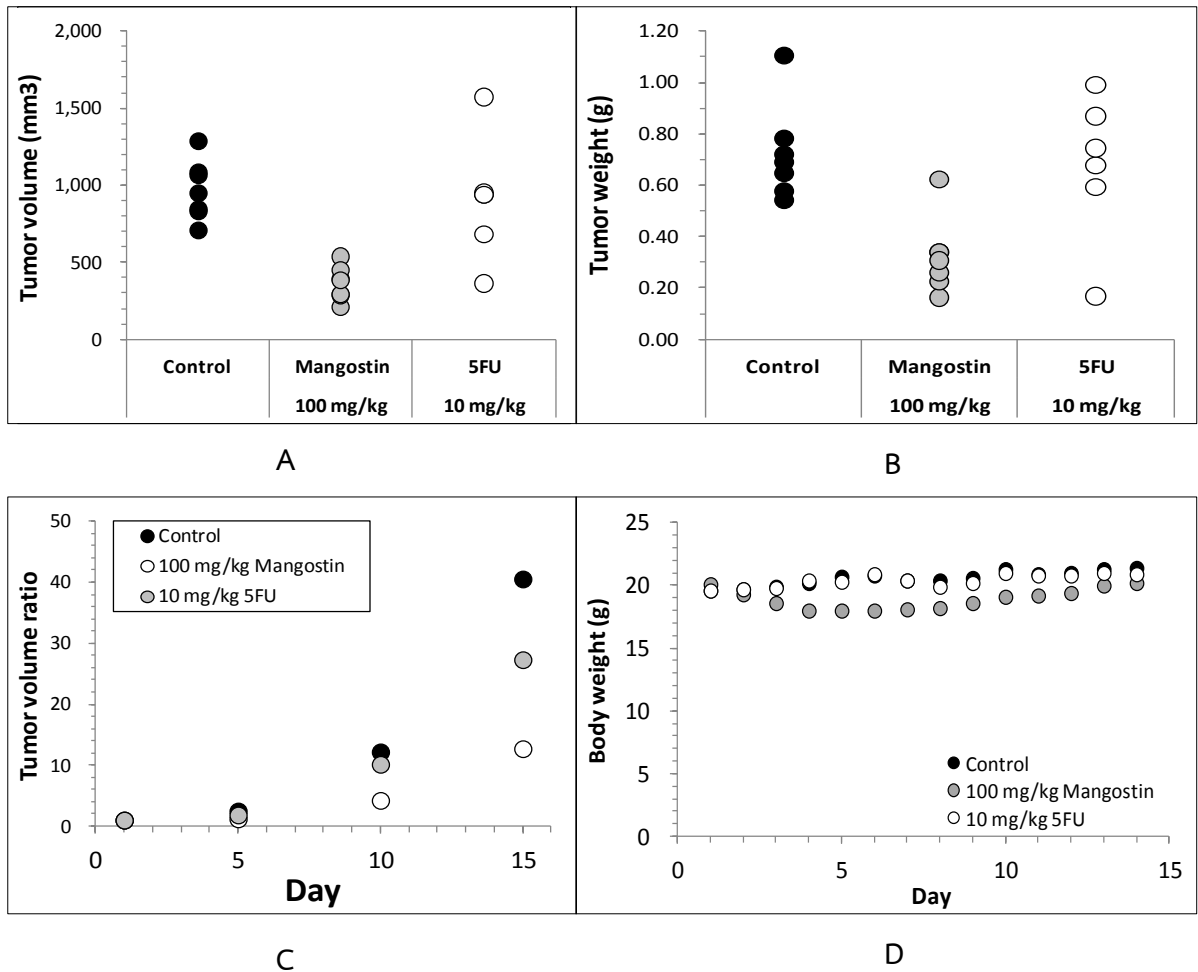
ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 14 วัน

ฤทธิ์ของ  $\alpha$ -mangostin ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหนูที่ให้การฉีดทางช่องท้อง

## การทดลองครั้งที่ 2

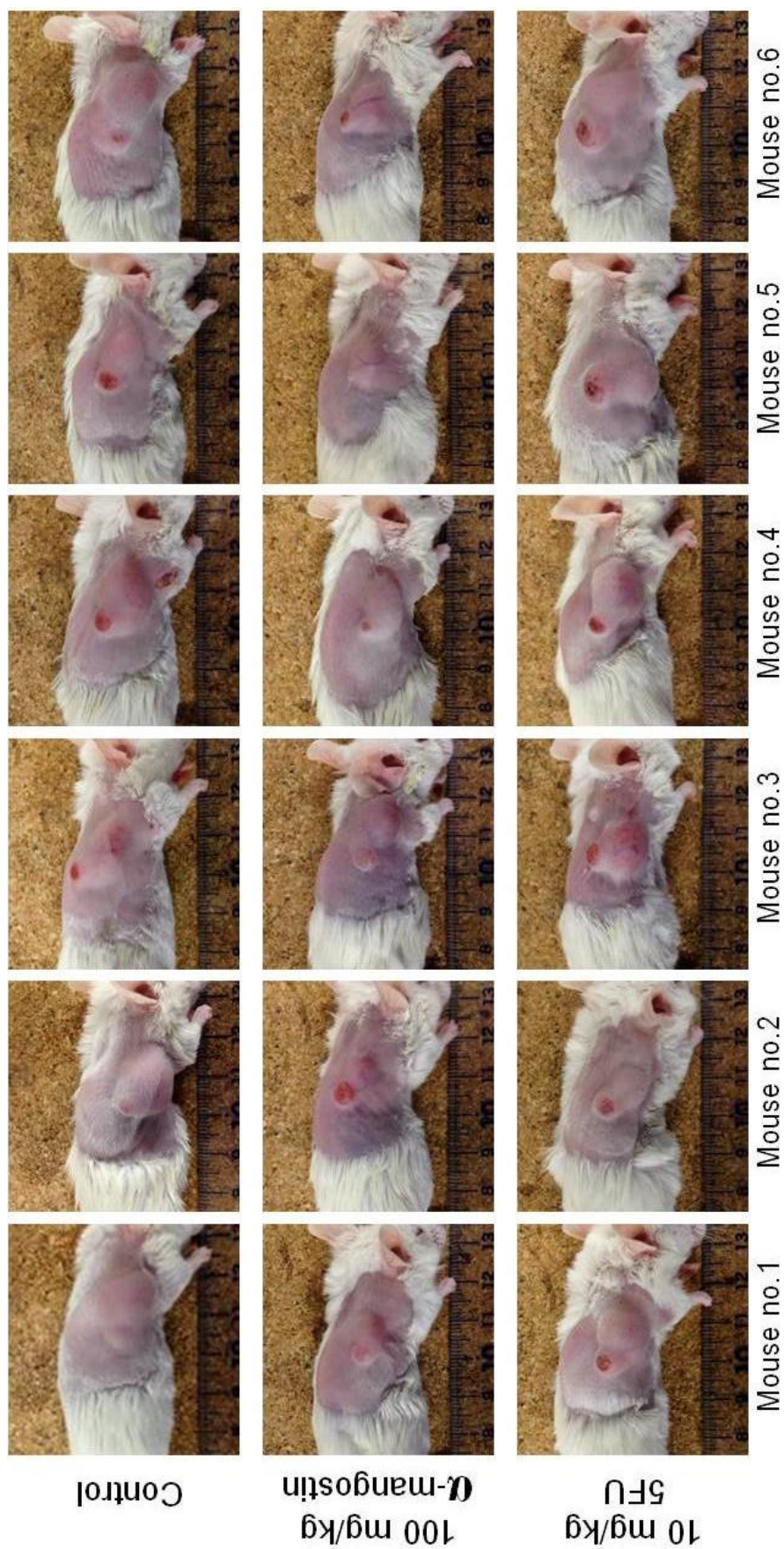
การฉีดสาร  $\alpha$ -mangostin ที่ความเข้มข้น 100 mg/kg ทางช่องท้องเป็นเวลา 14 วัน พบว่าก้อน มะเร็งมีขนาดเล็กกว่าก้อนมะเร็งของหนูกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 0.5% HPMC อย่างมีนัยสำคัญ วันสุดท้ายของการทดลอง ปริมาตร (Tumor volume) และน้ำหนัก (Tumor weight) เฉลี่ยของกลุ่มควบคุม คือ  $969.9 \pm 194.3 \text{ mm}^3$  และ  $0.725 \pm 0.187 \text{ g}$  ในขณะที่หนูกลุ่มที่ฉีด  $\alpha$ -mangostin มีปริมาตรและน้ำหนักของก้อนมะเร็งที่  $363.6 \pm 109.4 \text{ mm}^3$  และ  $0.326 \pm 0.144 \text{ g}$  ซึ่งให้ฤทธิ์ยับยั้งที่ดีกว่าหนูที่ฉีด 5-FU 10 mg/kg ในฐานะยามาตรฐานซึ่งมีปริมาตรก้อนมะเร็งเฉลี่ยที่  $906.4 \pm 398.4 \text{ mm}^3$  และมีน้ำหนักก้อนมะเร็งเฉลี่ยที่  $0.674 \pm 0.285 \text{ g}$  ดังในรูปที่ 6A และ 6B

เมื่อเปรียบเทียบปริมาตรของก้อนเนื้อมะเร็ง ณ วันที่ 5, 10 และ 15 กับปริมาตรก้อนเนื้อมะเร็ง ณ วันที่เริ่มต้นฉีดสาร  $\alpha$ -mangostin จึงทราบสัดส่วนปริมาตร (Tumor volume ratio) ที่เพิ่มขึ้นจากวันแรก ผลการทดลองดังรูปที่ 6C แสดงให้เห็นสัดส่วนปริมาตรของก้อนมะเร็งที่เพิ่มขึ้นสูงสุด  $40.6 \pm 22.5$  เท่าในหนูกลุ่มควบคุม ส่วนหนูกลุ่มที่ฉีด  $\alpha$ -mangostin พบสัดส่วนปริมาตรเพิ่มขึ้นต่ำสุด  $12.7 \pm 4.8$  เท่า ในขณะที่หนูกลุ่มฉีด 5-FU พบการเพิ่มขึ้น  $27.3 \pm 11.4$  เท่า เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนปริมาตรของก้อนมะเร็ง ทั้ง 3 กลุ่มในวันสุดท้ายของการทดลองพบว่าหนูกลุ่มฉีด  $\alpha$ -mangostin สามารถยับยั้งการ เจริญได้ 68.7% ในขณะที่หนูกลุ่มที่ฉีด 5-FU ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 32.7% เมื่อเทียบกลับหนูกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการฉีด  $\alpha$ -mangostin ทางช่องท้องทำให้น้ำหนักร่างกายหนูลดลง 11% แต่พฤติกรรม ภายนอกยังปกติและไม่พบการตกค้างของ  $\alpha$ -mangostin ในช่องท้อง จึงเป็นช่วงความเข้มข้นที่ปลอดภัย และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง



รูปที่ 6 ฤทธิ์ของ  $\alpha$ -mangostin ที่ให้โดยการฉีดทางช่องท้อง

- A: เปรียบเทียบปริมาตร (volume, mm<sup>3</sup>) ของก้อนมะเร็งในหนูหลังจากฉีด 100 mg/kg  $\alpha$ -mangostin และ 10 mg/kg 5-FU เป็นระยะเวลา 14 วัน
- B: เปรียบเทียบน้ำหนัก (weight, g) ของก้อนมะเร็งในหนูหลังจากฉีด 100 mg/kg  $\alpha$ -mangostin และ 10 mg/kg 5-FU เป็นระยะเวลา 14 วัน
- C: สัดส่วนปริมาตรของก้อนมะเร็ง (Tumor volume ratio) ในหนูหลังจากฉีด 100 mg/kg  $\alpha$ -mangostin และ 10 mg/kg 5-FU ณ วันที่ 5, 10 และ 15 เทียบกับวันที่เริ่มต้นฉีดสาร  $\alpha$ -mangostin
- D: น้ำหนักร่างกายหนูในแต่ละวันระหว่างการทดลอง



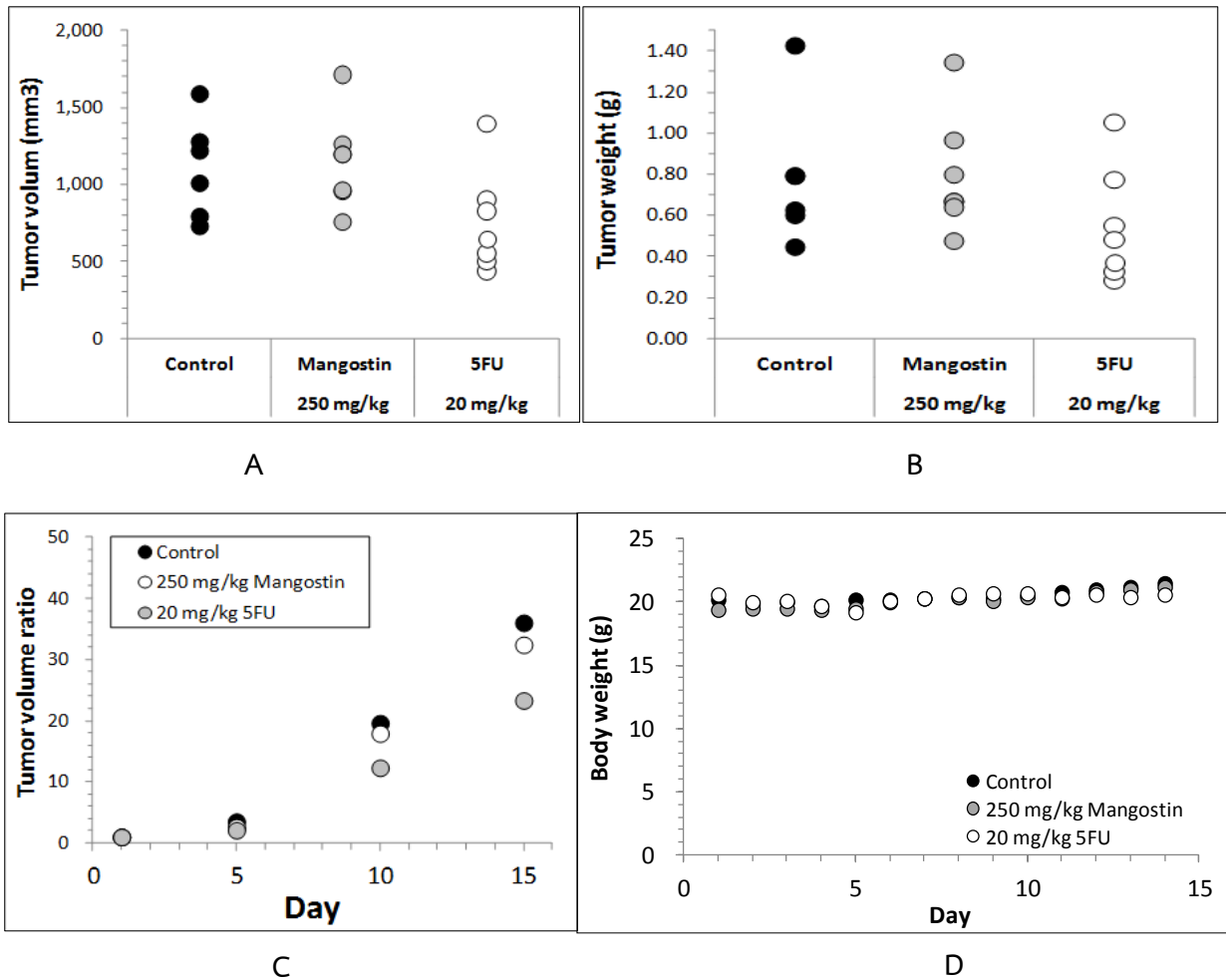
รูปที่ 7 เปรียบเทียบขนาดของก้อนมะเร็ง NL-17 colon cancer ในหนูแต่ละกลุ่มหลังการฉีด 100 mg/kg  $\alpha$ -mangostin และ 10 mg/kg 5FU เป็นระยะเวลา 14 วัน

#### 5.4.2 ฤทธิ์ของ $\alpha$ -mangostin ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหนูที่ให้อาหารโดยการป้อนทางปาก

การศึกษานี้ได้ตรวจสอบประสิทธิภาพของ  $\alpha$ -mangostin ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วยวิธีการป้อนทางปาก การศึกษาความเป็นพิษก่อนหน้านี้นี้  $\alpha$ -mangostin ที่มีความเข้มข้นสูง 500 mg/kg ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางร่างกายและพฤติกรรมใดๆ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้  $\alpha$ -mangostin ที่ความเข้มข้น 250 mg/kg เนื่องจากละลายใน 0.5% HPMC ได้ดีกว่าสำหรับกลุ่มยาควบคุมใช้ 5-FU ยามาตรฐานขนาด 20 mg/kg ตามขนาดยาที่ปรับสำหรับใช้ป้อนทางปาก

ผลการทดลองด้วยการป้อน  $\alpha$ -mangostin เป็นเวลา 14 วัน (รูปที่ 8 และ 9) ในหนูแสดงให้เห็นว่าไม่พบความแตกต่างของปริมาตรและน้ำหนักของก้อนมะเร็งเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ป้อน 0.5% HPMC เท่านั้น ดังในรูปที่ 8A และ 8B ปริมาตรและน้ำหนักของก้อนมะเร็งในวันสุดท้ายของหนูกลุ่มควบคุม โดยยังไม่เปรียบเทียบกับขนาดเริ่มต้นวันแรกของก้อนมะเร็งที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม คือ  $1,104.9 \pm 324.1 \text{ mm}^3$  และ  $0.728 \pm 0.342 \text{ g}$  ตามลำดับ หนูกลุ่มที่ป้อน  $\alpha$ -mangostin มีก้อนมะเร็งปริมาตร  $1,148.4 \pm 305.7 \text{ mm}^3$  และน้ำหนัก  $0.792 \pm 0.286 \text{ g}$ , ส่วนหนูในกลุ่มที่ป้อน 5-FU มีก้อนมะเร็งขนาดเล็กกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างชัดเจน คือ ปริมาตร  $750.4 \pm 330.8 \text{ mm}^3$  และน้ำหนัก  $0.546 \pm 0.277 \text{ g}$  ตามลำดับ

เมื่อแสดงค่าเป็นสัดส่วนปริมาตรก้อนมะเร็งในหนูระหว่างวันสุดท้ายและวันแรกพบว่าหนูกลุ่มควบคุมมีขนาดสัดส่วนปริมาตรเพิ่มขึ้น  $36.0 \pm 10.5$  เท่า, หนูกลุ่มที่ป้อน  $\alpha$ -mangostin เพิ่มขึ้น  $32.4 \pm 10.3$  เท่า และหนูกลุ่มที่ป้อน 5FU มีสัดส่วนปริมาตรเพิ่มเพียง  $23.3 \pm 12.0$  เท่า จากค่าสัดส่วนปริมาตรของก้อนมะเร็งของหนูแต่ละกลุ่มเทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงให้เห็นว่าสาร  $\alpha$ -mangostin ที่ป้อนทางปากสามารถ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 10.0% ส่วน 5-FU มีฤทธิ์ยับยั้งได้ 35.3 % ตลอดระยะเวลาการทดลองด้วย การป้อน  $\alpha$ -mangostin ไม่พบผลกระทบต่อร่างกายใด ๆ พฤติกรรมภายนอก เช่น การเคลื่อนไหว การบริโภคอาหารและน้ำ ส่วนน้ำหนักร่างกายเฉลี่ยของหนูแต่ละกลุ่มก็ไม่แตกต่างกันตลอดการทดลอง



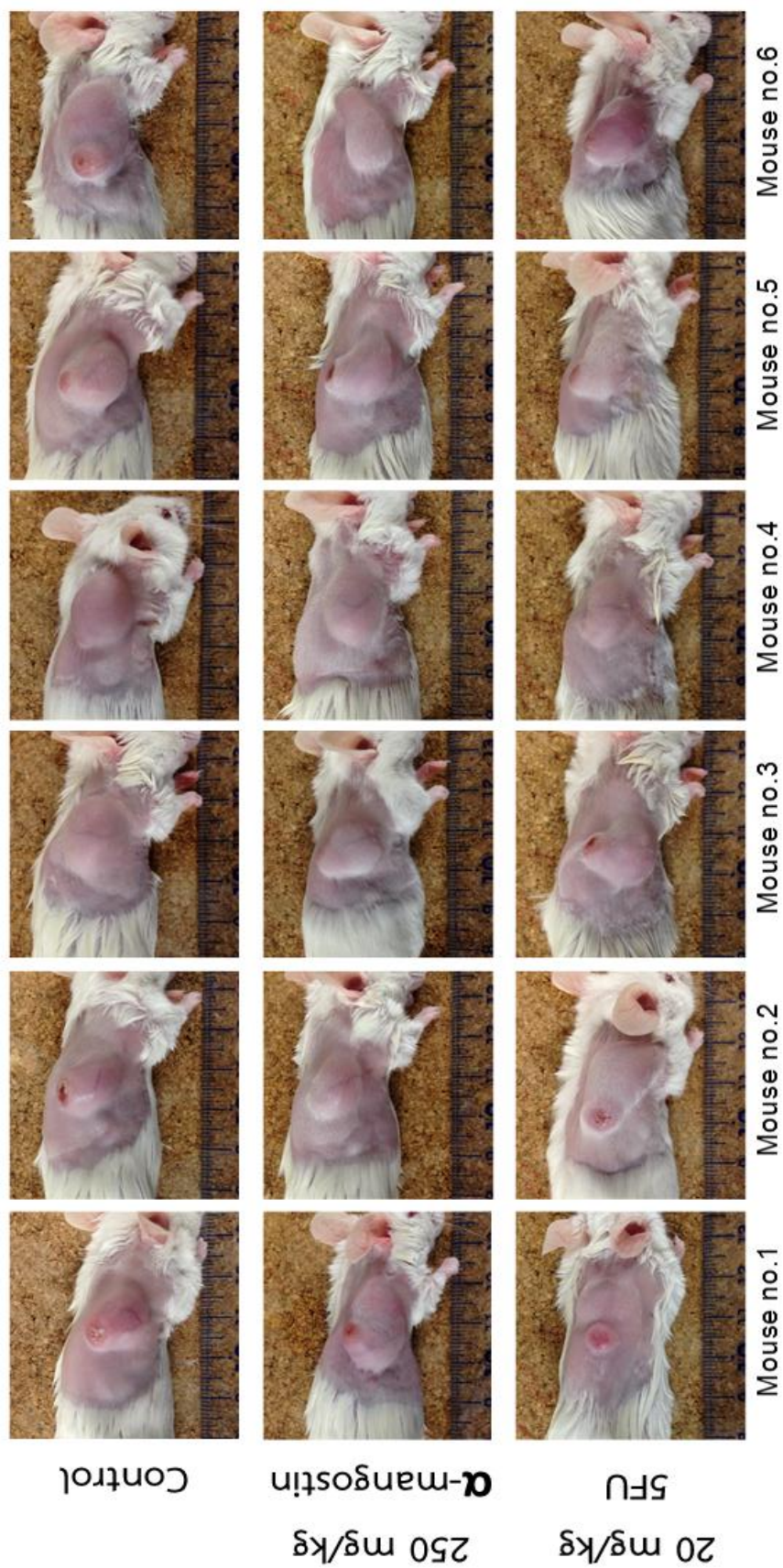
รูปที่ 8 ฤทธิ์ของ  $\alpha$ -mangostin ที่ให้โดยการป้อนทางปาก

A: เปรียบเทียบปริมาตร (volume, mm<sup>3</sup>) ของก้อนมะเร็งในหนูหลังจากป้อน 250 mg/kg  $\alpha$ -mangostin และ 20 mg/kg 5-FU เป็นระยะเวลา 14 วัน

B: เปรียบเทียบน้ำหนัก (weight, g) ของก้อนมะเร็งในหนูหลังจากป้อน 250 mg/kg  $\alpha$ -mangostin และ 20 mg/kg 5-FU เป็นระยะเวลา 14 วัน

C: สัดส่วนปริมาตรของก้อนมะเร็ง (Tumor volume ratio) ในหนูหลังจากป้อน 250 mg/kg  $\alpha$ -mangostin และ 20 mg/kg 5-FU ณ วันที่ 5, 10 และ 15 เทียบกับวันที่เริ่มต้นป้อนสาร  $\alpha$ -mangostin

D: น้ำหนักร่างกายหนูในแต่ละวันระหว่างการทดลอง



รูปที่ 9 เปรียบเทียบขนาดของก้อนมะเร็ง NL-17 colon cancer ในหนูแต่ละกลุ่มหลังการป้อน 250 mg/kg  $\alpha$ -mangostin และ 20 mg/kg 5FU เป็นระยะเวลา 14 วัน

### การย้อมเนื้อเยื่อมะเร็ง

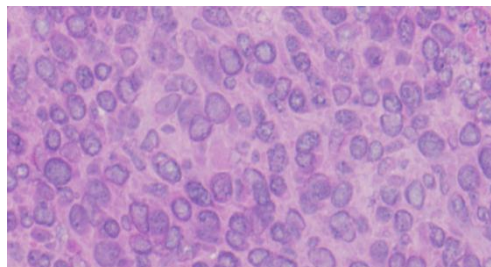
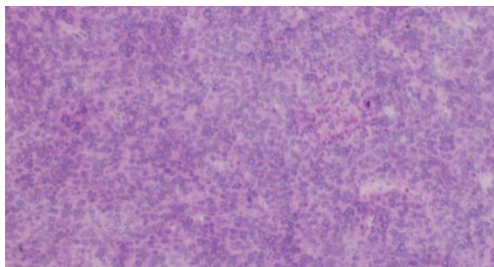
วิธีการทาง Histochemical stains ถูกใช้เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อมะเร็งหลังจากที่หนู BALB/c ที่ได้รับการฉีดยาโดยการย้อมด้วย Hematoxylin and Eosin (HE staining) Hematoxylin สามารถย้อม DNA , RNA แสดงให้เห็นสีม่วงโดยเฉพาะบริเวณนิวเคลียสและ Eosin สามารถเชื่อมต่อกับโปรตีนแสดงให้เห็นสีแดงหรือสีชมพูโดยเฉพาะบริเวณ cytoplasm ดังรูปที่ 10 ด้วยวิธีการนี้ที่กำลังขยาย x 400 เราสามารถเห็นนิวเคลียส (สีม่วง) และ cytoplasm (สีชมพู) ของแต่ละเซลล์ได้อย่างชัดเจน

ผลการศึกษา HE staining ไม่พบความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งจากหนูกลุ่มควบคุม (A) และหนูกลุ่มที่ฉีด  $\alpha$  - mangostin (B) ถึงแม้ว่าขนาดของก้อนมะเร็งจะต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ การย้อมด้วยวิธี COX (Cytochrome C Oxidase) และ SHD (Succinate dehydrogenase) staining ถูกทำเพื่อวัดการทำงานของ mitochondria ซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงไป

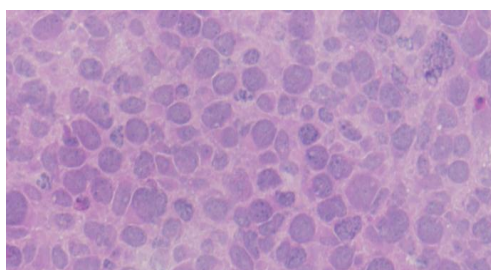
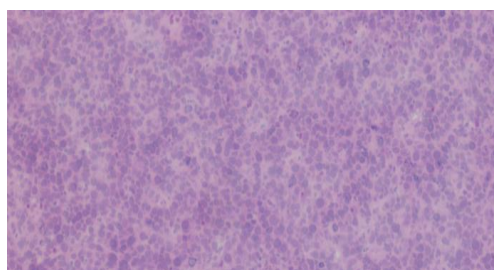
ระดับ Cytochrome C oxidase หรือ Complex IV และ Succinate dehydrogenase หรือ Complex II ของ electron transports chain ใน mitochondria ของเซลล์มะเร็งอาจเปลี่ยนแปลง oxidative capacity หลังจากฉีดยา อย่างไรก็ตามหลังจากการย้อมและสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย x100 และ x400 ไม่พบความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ  $\alpha$  - mangostin

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการทำงานของ mitochondria ในเซลล์มะเร็งของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาไม่แตกต่างกัน การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหนูที่ได้รับ  $\alpha$  - mangostin อาจใช้กลไกอื่นที่เราต้องการศึกษาต่อไป

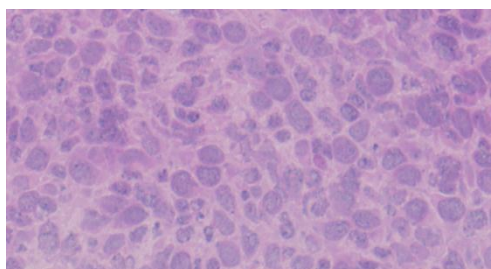
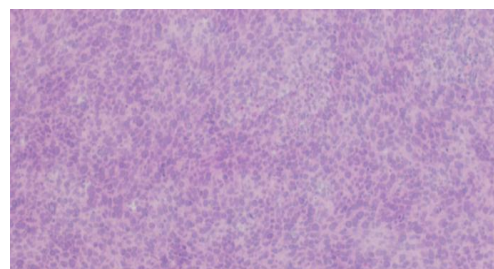
A. Control mouse



B. Mangostin-treated mouse



C. 5FU-treated mouse

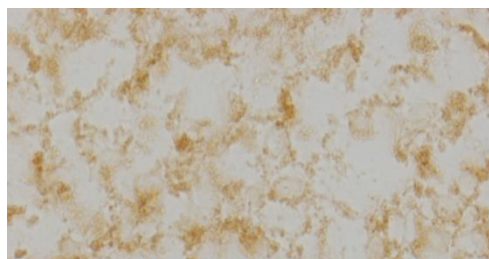
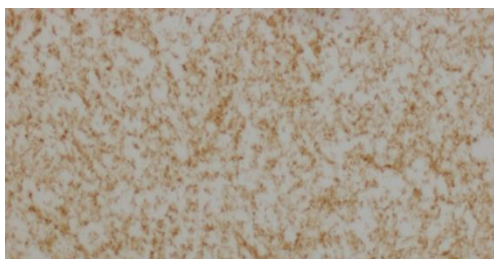


×100

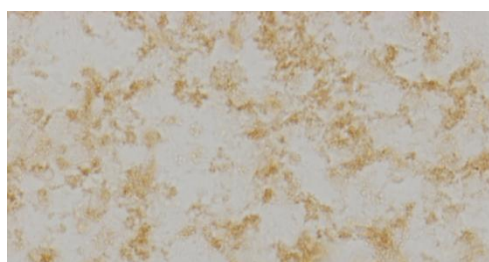
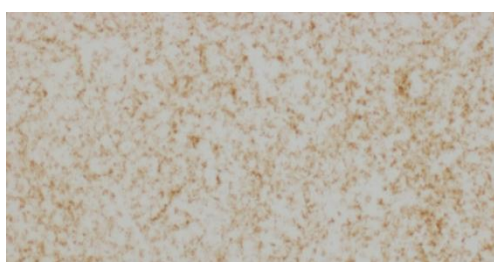
×400

รูปที่ 10 การย้อมเนื้อเยื่อมะเร็งด้วยวิธี HE Stain จากก้อนมะเร็งของหนูกลุ่มควบคุม (A), หนูที่ฉีด mangostin, (B) และ หนูที่ฉีด 5-FU (C)

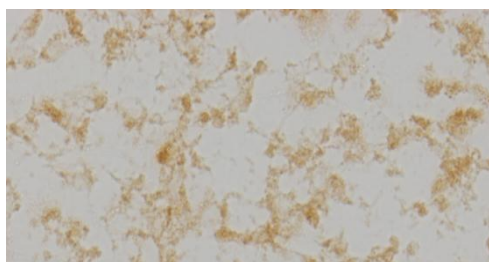
A. Control mouse



B. Mangostin-treated mouse



C. 5FU-treated mouse

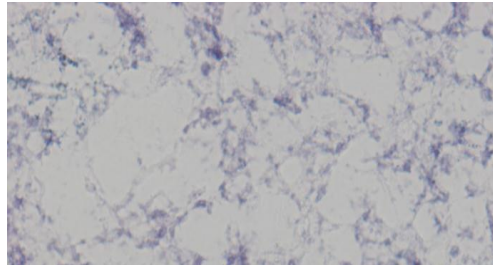
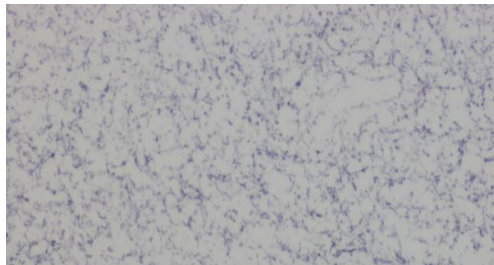


×100

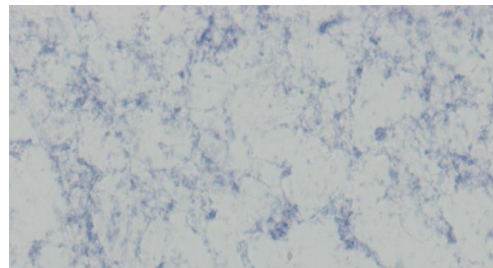
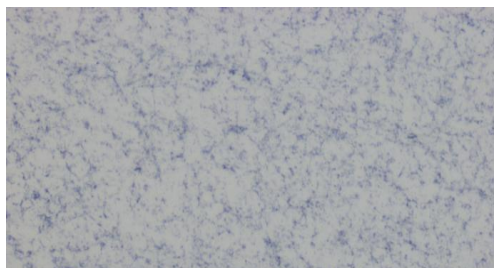
×400

รูปที่ 11 การย้อมเนื้อเยื่อมะเร็งด้วยวิธี COX Stain จากก้อนมะเร็งของหนูกลุ่มควบคุม (A), หนูที่ฉีด mangostin, (B) และ หนูที่ฉีด 5-FU (C)

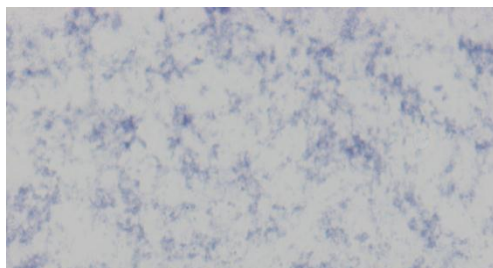
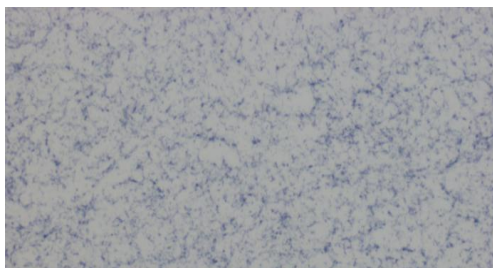
A. Control mouse



B. Mangostin-treated mouse



C. 5-FU-treated mouse



×100

×400

รูปที่ 12 การย้อมเนื้อเยื่อมะเร็งด้วยวิธี SDH Stainจากก้อนมะเร็งของหนูกลุ่มควบคุม (A), หนูที่ฉีด mangostin, (B) และ หนูที่ฉีด 5-FU (C)

#### 5.4.3 การประเมินศักยภาพของ $\alpha$ -mangostin ต่อการแสดงออกของ Bax และ Bcl-2 mRNA

ประเมินศักยภาพของ  $\alpha$ -mangostin ต่อการเพิ่มหรือลดปริมาณของระดับ mRNA ของ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis คือ Bax และ Bcl-2 โดยใช้วิธี real time RT-PCR แบบ one-step method ทำการตรวจการแสดงออกของ ยีน Bax, Bcl-2 ซึ่งมีการรายงานว่าระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าว มีความสัมพันธ์กับการตายของเซลล์มะเร็งโดยกระบวนการ apoptosis (Ferenc et al, 2010; Lee et al, 2012) และ นอกจากนี้มีการทดสอบระดับการแสดงออกของยีน CK-19 ซึ่งมีการศึกษาเพื่อใช้เป็น molecular marker การบ่งชี้การเกิดมะเร็งในเนื้อเยื่อที่ตรวจ (Saloustros et al, 2011; Uawisetwathana, 2007) โดยศึกษาปริมาณ และ วิธีการได้รับสาร  $\alpha$ -mangostin ต่อหนู BALB/c มีผลกับการแสดงออกของยีนดังกล่าวหรือไม่ ซึ่งในโครงการวิจัยที่ศึกษาในปีที่ 1 ที่ทดลองในเซลล์มะเร็ง 10 ชนิด พบว่ามีผลกระตุ้นการเกิด apoptosis เพื่อทำให้เซลล์มะเร็งตายเพิ่มขึ้น และลดการแสดงออกของ ยีน CK-19 ซึ่งเป็นยีนบ่งชี้การเป็นมะเร็ง

การวิจัยในโครงการนี้ นำก้อนเนื้อมะเร็งจาก หนู BALB/c ที่ทำการทดลองฤทธิ์ของ  $\alpha$ -mangostin ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหนู (หัวข้อ 5.4, 5.4.1 และ 5.4.2) มาสกัด total RNA โดยทดสอบก้อนเนื้อหนูทดลอง ที่ให้สาร  $\alpha$ -mangostin เปรียบเทียบกับการให้ยาปัจจุบันที่ใช้รักษามะเร็ง คือ 5-Fluorouracil (5-FU) โดยมีการศึกษาวิธีการให้ยาในหนู 2 วิธี ได้แก่ การให้ยาโดยวิธีการฉีด และให้ยาโดยวิธีการป้อน

ก้อนเนื้อเยื่อมะเร็งของหนู BALB/c ถูกนำมาสกัด total RNA โดยใช้วิธีสกัดแบบ Tri-reagent วัดความเข้มข้นของ total RNA โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm แล้วนำ total RNA ปริมาณ 50 ng มาทดสอบระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ ข้างต้น ด้วยวิธี real time one step RT-PCR ต่อไป

Primers ที่ใช้ในการทดสอบมีความจำเพาะต่อยีน Bax, Bcl-2 และ CK-19 รวมทั้งยีน  $\beta_2$  microglobulin ซึ่งเป็น house-keeping gene เป็นยีนมาตรฐาน มีลำดับเบสดังนี้

ตารางที่ 7 แสดงลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการทดสอบมีความจำเพาะต่อยีน Bax, Bcl-2 และ CK-19 และยีน  $\beta_2$  microglobulin

| Gene                              | Primers                                                   | Ref.                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------|
| Mouse-Bax                         | 5'-accagctctgaacagatcat-3'<br>5'-agatggctcactgtctgccat-3' | (Mizuno et al, 1998)   |
| Mouse-Bcl-2                       | 5'-ttgtggccttctttgagttcg-3'<br>5'-tactgcttagtgaacctttt-3' | (Agarwal et al, 1999)  |
| Mouse-CK-19                       | 5'-ttgagacagaacacgccttg-3'<br>5'-ggatccttgctaggtcgaca-3'  | (Uawisetwathana, 2007) |
| Mouse- $\beta_2$<br>microglobulin | 5'-ctgaccggcctgtatgctat-3'<br>5'-tttcccgttcttcagcattt-3'  | (Uawisetwathana, 2007) |

ทำการทดสอบโดยใช้ส่วนผสมปริมาตร 20  $\mu$ l ที่ประกอบด้วย 0.5  $MgCl_2$ , PCR buffer, 10 pMole ของ primer แต่ละเส้น และ taq polymerase (GoTaq 1-Step qRT-PCR, Promega, USA) และน้ำกลั่น มาทดสอบเพิ่มจำนวนของ DNA ในเครื่อง real time PCR (MX3000, Agilent, USA) โดยเริ่มจากการสังเคราะห์สาย complementary DNA (cDNA) โดย reverse transcriptase ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเริ่มขั้นตอน PCR โดยใช้โปรแกรม denaturation ที่ 95°C, 30 วินาที, primer annealing ที่ 55°C, 30 วินาทีและ extension ที่ 72°C, 30 วินาที เป็นจำนวน 30 รอบ โดยแต่ละรอบมีการอ่านค่าสี SYBG ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสาย DNA ที่ถูกสังเคราะห์ในขั้นตอนของปฏิกิริยา

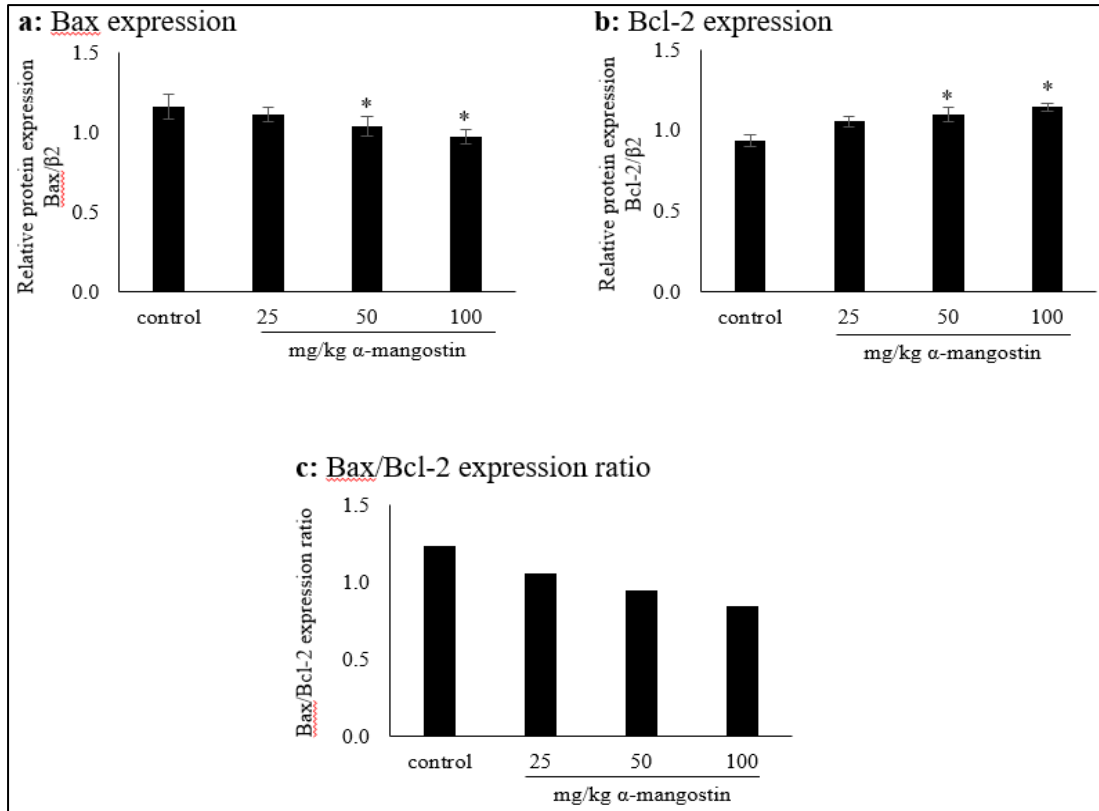
วิธีการทดลอง real-time RT-PCR ที่ใช้สี SYBG ในการอ่านผลนั้น สี SYBG มีคุณสมบัติในการเรืองแสงเมื่อทำปฏิกิริยากับ โมเลกุลของ ดีเอ็นเอ สายคู่ เมื่อใส่สียชนิดนี้ลงในปฏิกิริยา PCR เมื่อมีการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นใหม่ในรอบต่างๆ ของการทำปฏิกิริยา สี SYBG จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับสายดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการเรืองแสง ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ ซึ่งค่าการเรืองแสงที่วัดได้ในปฏิกิริยาจะแสดงเป็นค่าของรอบปฏิกิริยา (threshold cycle; Ct) ที่ตรวจพบการเรืองแสง ซึ่งจะมีค่าแปรผกผันกับปริมาณของสายดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น โดยค่า Ct ที่อ่านได้มีค่าน้อย จะเนื่องจากสามารถตรวจพบยีนนั้นในรอบปฏิกิริยาช่วงแรกๆ ซึ่งแปลความหมายได้ว่า ค่า Ct ที่อ่านค่าได้น้อย จะพบใน

ตัวอย่างที่มีปริมาณของยีนที่เป็นเป้าหมาย และจะมีการแสดงออกของยีนในตัวอย่างมากกว่าตัวอย่างที่ตรวจพบในรอบของปฏิกิริยาที่ช้ากว่า

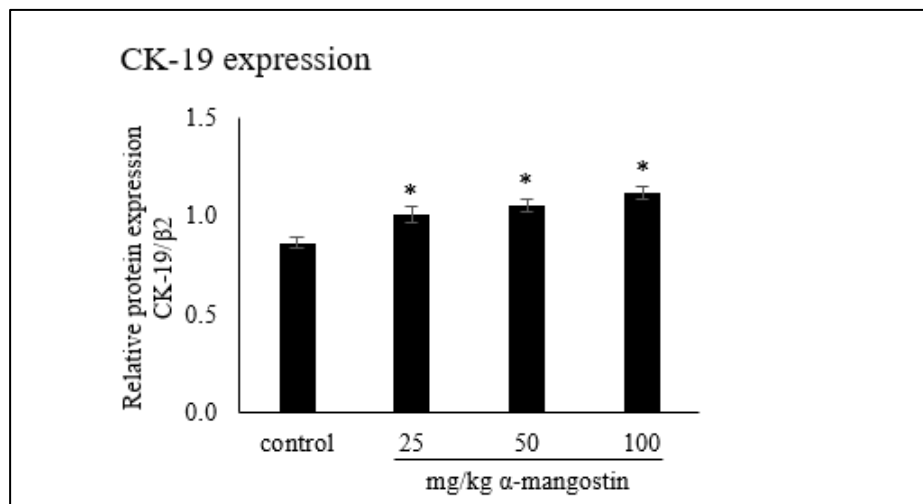
ในการทดลองผลจาก real-time RT-PCR จะแสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีน (relative expression) เปรียบเทียบกับ  $\beta_2$  microglobulin ซึ่งเป็น house-keeping gene

Apoptosis เป็นกลไกหนึ่งของร่างกายที่ใช้กำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการหรือเมื่อถึงอายุขัย แต่เซลล์มะเร็งสามารถต่อต้านการควบคุมการตายแบบ apoptosis ได้ ทำให้มีปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้นตลอดเวลา จากผลการทดลองพบว่าสาร  $\alpha$ -mangostin มีผลต่อการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ในเซลล์มะเร็ง เมื่อเซลล์มะเร็งได้รับสาร  $\alpha$ -mangostin จะมีผลทำให้มี อัตราส่วนของ Bax/Bcl-2 (relative expression) ลดลง เนื่องจากมีการแสดงออกของยีนที่เหนี่ยวนำกระบวนการเกิด apoptosis (Bax) มากขึ้น (รูปที่ 13a; Ct ที่อ่านได้มีค่าน้อยลง ค่าค่า relative protein expression/ $\beta_2$  microglobulin น้อยลง) และที่มีการแสดงออกของยีนที่ยับยั้งกระบวนการเกิด apoptosis (Bcl2) น้อยลง (รูปที่ 13b; Ct ที่อ่านได้มีค่ามากขึ้น ค่า relative protein expression/ $\beta_2$  microglobulin เพิ่มขึ้น) ซึ่งสามารถแปลผลได้ว่าเซลล์มะเร็งชนิดนั้น มีอัตราการตายที่เกิดจากกระบวนการ apoptosis เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งที่ไม่มีการให้  $\alpha$ -mangostin อย่างมีนัยสำคัญที่เมื่อนำมาพิจารณาค่าของ Bax/Bcl-2 expression ratio ปริมาณการฉีด  $\alpha$ -mangostin ขนาด 50 และ 100 mg/kg ตามลำดับ มีผลทำให้ค่าสัดส่วนของ Bax/Bcl-2 มีค่าที่ลดลง (รูปที่ 13c)

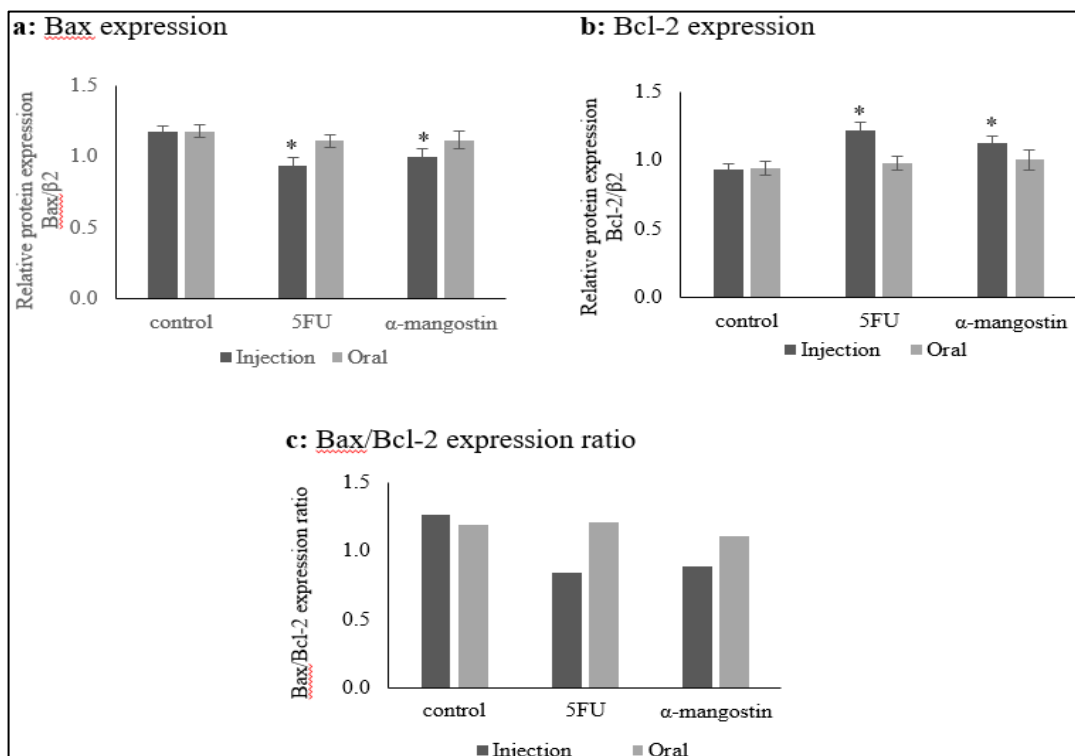
ในการวัดการแสดงออกของยีน CK-19 ซึ่งเป็นยีนชนิดหนึ่งที่บ่งบอกการเป็นมะเร็ง พบว่าระดับการแสดงออกของยีนมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 14) ที่ปริมาณ  $\alpha$ -mangostin 25, 50 และ 100 mg/kg ซึ่งหมายถึงปริมาณของเซลล์มะเร็งมีแนวโน้มลดลง เพราะฉะนั้นสาร  $\alpha$ -mangostin จากมังคุดจึงมีศักยภาพในการที่จะนำมาใช้เป็นสารต้านมะเร็งได้



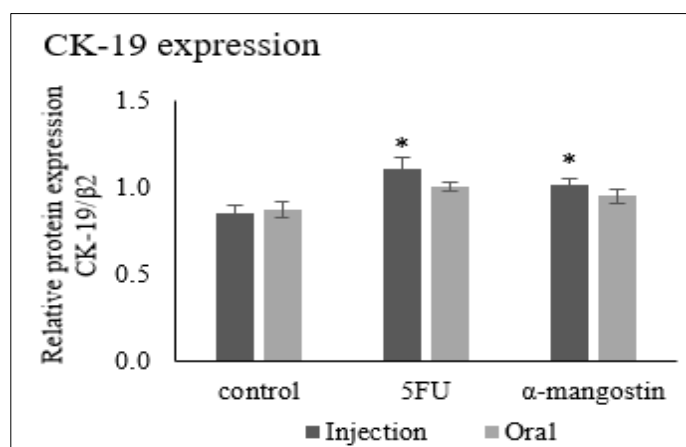
รูปที่ 13 แสดงระดับการแสดงออกของยีน Bax (a), Bcl-2 (b) และ อัตราส่วนการแสดงออกของยีน Bax/Bcl-2 (c) ในเนื้อเยื่อมะเร็งจากหนู BALB/c ที่ทำการฉีดสาร  $\alpha$ -mangostin ที่ปริมาณ 25, 50 และ 100 mg/kg โดยใช้  $\beta$ <sub>2</sub>-microglobulin เป็นยีนควบคุม ( $p > 0.05$ )



รูปที่ 14 แสดงระดับการแสดงออกของยีน CK-19 ในเนื้อเยื่อมะเร็งจากหนู BALB/c ที่ทำการฉีดสาร  $\alpha$ -mangostin ปริมาณ 25, 50 และ 100 mg/kg โดยใช้  $\beta$ <sub>2</sub>-microglobulin เป็นยีนควบคุม ( $p > 0.05$ )



รูปที่ 15 แสดงระดับการแสดงออกของยีน Bax (a), Bcl-2 (b) และ อัตราส่วนการแสดงออกของยีน Bax/Bcl-2 (c) ในเนื้อเยื่อมะเร็งจากหนู BALB/c ที่ทำการฉีดและป้อนสาร  $\alpha$ -mangostin เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน 5-FU ที่ปริมาณ 100 และ 10 mg/kg ตามลำดับโดยใช้วิธีการฉีด และ  $\alpha$ -mangostin และยามาตรฐาน 5FU ที่ปริมาณ 250 และ 20 mg/kg ตามลำดับโดยใช้วิธีการป้อน โดยใช้  $\beta_2$ -microglobulin เป็นยีนควบคุม ( $p>0.05$ )



รูปที่ 16 แสดงระดับการแสดงออกของยีน CK-19 ในเนื้อเยื่อมะเร็งจากหนู BALB/c ที่ทำการให้สาร  $\alpha$ -mangostin และยามาตรฐาน 5-FU ที่ปริมาณ 100 และ 10 mg/kg ตามลำดับโดยใช้วิธีการฉีด และ  $\alpha$ -mangostin และยามาตรฐาน 5-FU ที่ปริมาณ 250 และ 20 mg/kg ตามลำดับโดยใช้วิธีการป้อน โดยใช้  $\beta_2$ -microglobulin เป็นยีนควบคุม ( $p>0.05$ )

การแสดงออกของยีน Bax ปกติจะสามารถตรวจพบได้ในเซลล์มะเร็งที่อยู่ในช่วงเริ่มต้นของการเกิดกระบวนการ apoptosis ในการทดลอง หนูที่ได้รับสาร  $\alpha$ -mangostin และยามาตรฐาน 5-FU พบว่าการแสดงออกของยีน Bax มากกว่าในหนูที่ไม่ได้รับสาร  $\alpha$ -mangostin และยามาตรฐาน 5-FU

การศึกษาวิธีการให้ยา 2 วิธีการ คือ การฉีด และ การป้อนพบว่า การให้ยาโดยวิธีการฉีดนั้น อัตราการแสดงออกของยีน Bax เพิ่มขึ้น (รูปที่ 15a) และ Bcl-2 (รูปที่ 15b) ลดลง จากการให้ยาทั้งสองชนิดอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีผลให้อัตราส่วนของ Bax/Bcl-2 ลดลง (รูปที่ 15c) เช่นกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ การให้ยาโดยวิธีการป้อนนั้น อัตราการแสดงออกของยีน Bax, Bcl-2 และ CK-19 นั้น ไม่มีความเปลี่ยนแปลง อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับไม่มีการให้ยา (รูปที่ 16)

ยีน Cytokeratin-19 (CK-19) มีการนำมาใช้เป็นตัวตรวจวินิจฉัยมะเร็ง โดยมีรายงานว่า ยีน CK-19 สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดปริมาณเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน CK-19 จะมีความสัมพันธ์กับระดับของเซลล์มะเร็ง (Umaporn (2007)) พบว่าการตรวจวัดการแสดงออกของยีน CK-19 ในหนูที่ได้รับสาร  $\alpha$ -mangostin ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี real time one step RT-PCR ในการศึกษาพบว่า  $\alpha$ -mangostin มีบทบาทต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง สัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของสาร  $\alpha$ -mangostin อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 14) และเมื่อเปรียบเทียบกับ การศึกษาระดับแสดงออกของยีน CK-19 มีระดับลดลงเมื่อได้รับสาร  $\alpha$ -mangostin โดยการฉีด 100 mg/kg (รูปที่ 16) และยามาตรฐาน 5-FU ขนาด 10 mg/kg (หมายถึงมีผลในการยับยั้งการเกิดมะเร็งสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของสาร  $\alpha$ -mangostin อย่างมีนัยสำคัญด้วยเช่นเดียวกัน) เมื่อให้โดยการฉีด แต่การให้สาร  $\alpha$ -mangostin โดยการป้อนขนาด 250 mg/kg และ 5-FU ขนาด 20 mg/kg (รูปที่ 16) แม้จะมีแนวโน้มว่าจะมีผลต่อการแสดงออกของ CK-19 แต่ยังไม่มีความสำคัญทางสถิติ

## 6. สรุปผลการทดลอง

การให้  $\alpha$ -mangostin เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วยการฉีดทางช่องท้องมี ประสิทธิภาพดีกว่าการป้อนทางปากอย่างชัดเจน อาจเนื่องจาก  $\alpha$ -mangostin ที่ฉีดทางช่องท้องถูก ดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ดีกว่า ขณะที่  $\alpha$ -mangostin ปริมาณมากที่ป้อนทางปากอาจถูกทำลายด้วย ระบบย่อยอาหาร และถูก กำจัดออกจากร่างกาย ดังนั้นควรพัฒนาระบบการขนส่งยาเข้าสู่ร่างกาย เพื่อให้เกิดการดูดซึม  $\alpha$ -mangostin ได้มากที่สุด เพื่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด

จากการทดลองหนูที่ได้รับสาร  $\alpha$ -mangostin และได้รับยา 5-FU โดยเปรียบเทียบการได้รับ สารสองวิธี ได้แก่ โดยการฉีด และ ผ่านทางการป้อน พบว่า การให้ยาทั้งสองชนิดโดยการฉีดมีผลใน การยับยั้งการเกิดมะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญคือ พบระดับของสัดส่วนการแสดงออกของยีน Bax/Bcl-2 มีค่าเพิ่มขึ้น และการแสดงออกของยีน CK-19 มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการให้ยา ใดๆ แต่จากการให้ยาผ่านการป้อนนั้นไม่พบความแตกต่างทั้งใน ระดับของสัดส่วนการแสดงออกของ ยีน Bax/Bcl-2 และระดับการแสดงออกของยีน CK-19 อย่างมีนัยสำคัญ เพราะฉะนั้นจากผลการ ทดลอง การให้ยารักษามะเร็งในหนูโดยการฉีดมีประสิทธิภาพดีกว่าการให้ยาผ่านทางการป้อน

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสาร  $\alpha$ -mangostin จากมังคุดนั้นมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ พัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งได้ แต่รูปแบบของการได้รับยาต้องมีความเหมาะสม จึงจะมีประสิทธิภาพใน การรักษามะเร็งได้

## 7. บรรณานุกรม

### References สำหรับ mangosteen และ $\alpha$ -mangostin

- Benjakul R, Moongkarndi P, Panyarachun B, Sarisuta N. Novel Freeze-drying method for preparation of  $\alpha$ -mangostin dry reconstitute liposomal powder. *Adv Sci Lett* 2012; 11: 120-125.
- Chaivisuthangkura A, Malaikaew Y, Chaovanalikit A, Jaratrungtawee A, Panseeta P, Ratananukul P, Suksamrarn S. Prenylated xanthone composition of *Garcinia mangostana* (Mangosteen) FruitHull. *Chromatographia* 2009;69:315-318.
- Doi H, Shibata MA, Shibata E, Morimoto J, Akao Y, Iinuma M, Tanigawa N, Otsuki Y. Panaxanthone isolated from pericarp of *Garcinia mangostana* L. suppresses tumor Growth and metastasis of a mouse model of mammary cancer. *AnticancerRes* 2009; 29: 2485-2496.
- Farnsworth NR, Bunyapraphatsara N. Thai medicinal plant: recommended for primary health care system. Bangkok: Mahidol University; 1992.
- Gupta M, Mazumder UK, Rath N, Mukhopadhyay DK. Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich ascites carcinoma. *J Ethnopharmacol* 2000;72:151-156.
- Holland EC. Mouse models of human cancer. New York: Wiley-Liss, 2004.
- Kosem N, Han YH, Moongkarndi P. Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* hulls. *ScienceAsia* 2007;33:283-292.
- Kosem N, Ichikawa K, Utsumi H, Moongkarndi P. In vivo toxicity and antitumor activity of mangosteen extract. *J Nat Med* 2013;67:255-63.
- Moongkarndi P, Kaslungka S, Kosem N, Junnu S, Theptaranon Y, Neungton N. Cytotoxicity and apoptosis of ovarian and breast cancer cell lines induced by OVS1 monoclonal antibody and paclitaxel. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2003;21:31-41.
- Moongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *J Ethnopharmacol* 2004;90:161-6.

- Moongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, Jongsomboonkusol S, Pongpan N. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia* 2004;75:375-7.
- Moongkarndi P, Kosem N. Phytochemicals as Chemoprevention. In : Series in Recent Progress in Medicinal Plants, VK Singh, J.N.Govil, Ahmad K, Sharma RK, ed. Texas : Studium Press LLC, Volume 15, Natural Products, Chapter 9, December 2007, p177-207.
- Moongkarndi P, Jaisupa N, Jongsomboonkusol S, Kaslungka S, Sengpanich N, Samosorn W, Kosem N, Neungton N. Effect of OVS1 monoclonal antibody as targeted ovarian and breast cancer therapy. *Mahidol Univ J Pharm Sci* 2007;34(1-4):53-59.
- Moongkarndi P, Srisawat C, Saetun P, Jantaravinid J, Peerapittayamonkol C, Soi-ampornkul R, Junnu S, Sinchaikul S, Chen ST, Charoensilp P, Thongboonkerd V, Neungton N. Protective effect of mangosteen extract against  $\beta$ -amyloid-induced cytotoxicity, oxidative stress and altered proteome in SK-N-SH cells. *J Proteome Res* 2010;9:2076–2086.
- Obolskiy D, Pischel I, Siriwatanametanon N, Heinrich M. *Garcinia mangostana* L.: A Phytochemical and Pharmacological Review. *Phytother Res* 2009;23:1047–1065.
- Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Orozco-Ibarra M, Pérez-Rojas J. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chem Toxicol* 2008;46:3227-3239.
- WHO 2000. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine., Geneva: World Health Organization; 2000.

### References สำหรับ PCR และ apoptosis

- Agarwal R, Talati M, Lambert W, Clark AF, Wilson SE, Agarwal N, & Wordinger RJ. Fas-activated apoptosis and apoptosis mediators in human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 1999;68(5):583-90.

- Ferenc P, Solar P, Kleban J, Mikes J, & Fedorcko P. Down-regulation of Bcl-2 and Akt induced by combination of photoactivated hypericin and genistein in human breast cancer cells. *J Photoch Photobio* 2010;B 98(1):25-34.
- Lee JS, Jung WK, Jeong MH, Yoon TR, & Kim HK. Sanguinarine Induces Apoptosis of HT-29 Human Colon Cancer Cells via the Regulation of Bax/Bcl-2 Ratio and Caspase-9-Dependent Pathway. *Int J Toxicol* 2012;31(1):70-77.
- Mizuno N, Yoshitomi H, Ishida H, Kuromi H, Kawaki J, Seino Y, & Seino S. Altered bcl-2 and bax expression and intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose-induced insulin secretion. *Endocrinology* 1998;139(3):1429-1439.
- Saloustros E, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, Xyrafas A, Kalbakis K, Agelaki S, Kalykaki A, Georgoulas V, & Mavroudis D. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse. *Breast Cancer Res* 2011;13(3).
- Uawisetwathana U. Expression of cytokeratin 19 gene in breast cancer cell lines after exposure to alpha-mangostin from *Garcinia mangostana*. Master degree thesis, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 2007.



## ภาคผนวก 1

### ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์ 4 เรื่อง

Kasemwattanaroj P, Moongkarndi P, Pattanapanyasat K, Mangmool S, Rodpai E, Samer J, Konlata J, Sukapirom K. Immunomodulatory activities of  $\alpha$ -mangostin on peripheral blood mononuclear cells. Nat Prod Com 2013;8:1257-1260.

(โครงการนักศึกษาปริญญาโท)

Moongkarndi P, Jaisupa N, Samer J, Kosem N, Konlata J, Rodpai E, Pongpan N. Comparison the biological activities of two different isolates from mangosteen. JPP 2014;66:1171-1179.

Jittiporn K, Suwanpradid J, Patel C, Rojas M, Thirawarapan S, Moongkarndi P, Suvitayavat W, Caldwell RB. Anti-angiogenic actions of the mangosteen polyphenolic xanthone derivative  $\alpha$ -mangostin. Microvas Res 2014; 93:72-79.

(โครงการนักศึกษาปริญญาเอก)

Moongkarndi P, Jaisupa N, Kosem N, Konlata J, Samer J, Pattanapanyasat K, Rodpai E. Effect of purified  $\alpha$ -mangostin from mangosteen pericarp on cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptotic gene expression in human cancer cells. WJPS World J Pharm Sci ISSN (Print): 2015; 2321-3310; ISSN (Online): 2321-3086.

## Immunomodulatory Activities of $\alpha$ -Mangostin on Peripheral Blood Mononuclear Cells

Pimolkarn Kasemwattanasroj<sup>a</sup>, Primchanien Moongkarndi<sup>a\*</sup>, Kovit Pattanapanyasat<sup>b</sup>, Supachoke Mangmool<sup>c</sup>, Ekkarat Rodpai<sup>c</sup>, Jutima Samer<sup>c</sup>, Julaporn Konlata<sup>c</sup> and Kasama Sakapirom<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>b</sup>Office of Research and Development, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

<sup>c</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

primchanien.mo@mahidol.ac.th; prim.moongkarndi@gmail.com

Received: February 27<sup>th</sup>, 2013; Accepted: July 3<sup>rd</sup>, 2013

Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) a tropical fruit, has been used in traditional medicine. A frequently used part of mangosteen is the pericarp, containing a high content of xanthones.  $\alpha$ -Mangostin, one of the major xanthone derivatives, exhibits a variety of actions, including antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and antitumor; however, its function on the immune system is still equivocal. This study aimed to examine the immunomodulatory activities of  $\alpha$ -mangostin on lymphocyte lineage and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The cytotoxic activity of  $\alpha$ -mangostin was measured by MTT assay. The concentration of  $\alpha$ -mangostin at 5.55  $\mu$ g/mL resulted in a 50% survival of PBMCs, which was as potent a cytotoxic activity as that of paclitaxel. After 24 h of PBMCs culture, the percentages of T cells (CD3<sup>+</sup>), B cells (CD19<sup>+</sup>) and NK cells (CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) were not significantly changed by treatment with 1, 2 and 4  $\mu$ g/mL of  $\alpha$ -mangostin compared with untreated-PBMCs; in addition, the percentages of these lymphocytes treated with the combination of  $\alpha$ -mangostin (1, 2 and 4  $\mu$ g/mL) and the mitogen concanavalin A (ConA) was not significantly different from that of ConA-treated PBMCs. For cytokine secretion,  $\alpha$ -mangostin (1, 2 and 4  $\mu$ g/mL) did not significantly induce either proinflammatory cytokines (i.e., TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) or cytokine of adaptive immunity (i.e., IL-2). The combination of  $\alpha$ -mangostin (1, 2 and 4  $\mu$ g/mL) and ConA did not significantly alter the relative difference of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  compared with ConA-treated PBMCs; however, these combinations could significantly decrease the relative difference of IL-2 compared with ConA-treated PBMCs. These data indicated that  $\alpha$ -mangostin was able to inhibit IL-2 release without interfering with human immune cells; therefore, further studies are necessary to investigate its effect on IL-2 production.

**Keywords:**  $\alpha$ -Mangostin, Immunomodulatory activities, PBMCs.

Mangosteen, *Garcinia mangostana* L., is a tropical tree found in Southeast Asia. It has been used in traditional medicine for the treatments of diarrhea, dysentery, infections and wounds [1, 2]. The frequently used part has been the pericarp, containing a high content of xanthones.  $\alpha$ -Mangostin is one of the major xanthone derivatives. Numerous studies have reported a variety of its actions, such as antibacterial, antifungal, antioxidant, cytotoxic and antitumor effects both in *in vitro* and *in vivo* [3-5]. Despite the immune function playing an important role in health and the formation of diseases, studies of the actions of  $\alpha$ -mangostin on the immune system have been limited. Therefore, the aim of this study was to investigate the immunomodulatory activities of purified  $\alpha$ -mangostin *in vitro*. PBMCs were stimulated with various concentrations of  $\alpha$ -mangostin with and without ConA. The effects of  $\alpha$ -mangostin on lymphocyte subsets and cytokine production were determined by flow cytometric immunophenotyping and an ELISA method, respectively.

The cytotoxic activity of  $\alpha$ -mangostin on normal human PBMCs was determined by the MTT test. After 24 h of incubation, 50% cell survival resulted from being exposed to 5.55  $\mu$ g/mL of  $\alpha$ -mangostin. For the non-cytotoxic concentration of  $\alpha$ -mangostin, more than 95% cell viability was obtained from the concentration lower than 4.5  $\mu$ g/mL (Figure 1a); meanwhile, 5.85 and 2.35  $\mu$ g/mL of paclitaxel (a positive control) resulted in 50% and 95% of PBMCs survival (Figure 1b). These data indicated that  $\alpha$ -mangostin possesses the same substantial cytotoxic property as paclitaxel.

PBMCs contain essential components of the human immune system, which mainly are lymphocytes, monocytes and a small number of NK cells [6]. To determine the immunomodulatory action of  $\alpha$ -mangostin on immune cells (T lymphocytes, B lymphocytes and NK cells), PBMCs were cultured with  $\alpha$ -mangostin, T-cell stimulating ConA, or a combination of the two for 24 h. The flow cytometric results showed that the percentages of CD3<sup>+</sup> of T cells (76.0  $\pm$  4.3, 75.5  $\pm$  5 and 75.2  $\pm$  3.9%) were not significantly increased by 1, 2 and 4  $\mu$ g/mL of  $\alpha$ -mangostin compared with untreated-PBMCs (72.0  $\pm$  4.6%,  $P$  > 0.05). In combination with ConA,  $\alpha$ -mangostin (1, 2 and 4  $\mu$ g/mL) also did not significantly change the percentages of CD3<sup>+</sup> (77.8  $\pm$  4.7, 77.7  $\pm$  4.3 and 77.8  $\pm$  3.6%, respectively) compared with ConA-treated PBMCs (77.5  $\pm$  4.9%,  $P$  > 0.05). For B cells,  $\alpha$ -mangostin concentrations of 1, 2 and 4  $\mu$ g/mL did not significantly change the percentages of CD19<sup>+</sup> (7.6  $\pm$  2.4, 8.2  $\pm$  2.4 and 7.8  $\pm$  2.3%, respectively) compared with untreated-PBMCs (8.6  $\pm$  2.5%,  $P$  > 0.05); furthermore, the combination of  $\alpha$ -mangostin (1, 2 and 4  $\mu$ g/mL) with ConA did not affect the percentages of CD19<sup>+</sup> (4.3  $\pm$  1.0, 4.7  $\pm$  1.6, 3.8  $\pm$  1.7  $\mu$ g/mL, respectively) compared with ConA-treated PBMCs (5.5  $\pm$  1.6%,  $P$  > 0.05). For NK cells,  $\alpha$ -mangostin (1, 2 and 4  $\mu$ g/mL) did not significantly reduce the percentages of CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> (15.9  $\pm$  3.5, 15.8  $\pm$  4.2 and 16.3  $\pm$  3.6%, respectively) compared with untreated-PBMCs (18.9  $\pm$  3.4%,  $P$  > 0.05); moreover, the combination of  $\alpha$ -mangostin (1, 2 and 4  $\mu$ g/mL) with ConA did not significantly alter the percentages of NK cells (16.5  $\pm$  4.1, 16  $\pm$  3.8 and 15.5  $\pm$  3.5% respectively) compared with ConA-treated PBMCs (15.4  $\pm$  3.6%,  $P$  > 0.05) (Figure 2).

## Comparison of the biological activity of two different isolates from mangosteen

Primchanien Moongkarndi<sup>a</sup>, Nattapon Jaisupa<sup>a</sup>, Jutima Samer<sup>a</sup>, Nuttavut Kosem<sup>a</sup>, Julaporn Konlata<sup>a</sup>, Ekkarat Rodpaib<sup>b</sup> and Narongchai Pongpan<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Microbiology, <sup>b</sup>Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, <sup>c</sup>Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Bangkok, Thailand

### Keywords

DPPH assay; *Garcinia mangostana* L.; mangosteen; MTT assay; reactive oxygen species assay

### Correspondence

Primchanien Moongkarndi, Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.  
E-mail: primchanien.mooc@mahidol.ac.th

Received October 21, 2013

Accepted February 2, 2014

doi: 10.1111/jphp.12239

### Abstract

**Objective** Mangosteen has been used in traditional medicine for treatment of many diseases. Recent studies have reported the active constituents isolated from this plant. In this study, purified  $\alpha$ -mangostin, a major component and partially purified water-soluble fraction found in fruit pericarps, was carefully isolated, and their biological activity was compared, i.e. antioxidative activity and cytotoxic effect in breast cancer cells: SKBR3.

**Methods** Antioxidative activity was determined using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) assay and reactive oxygen species (ROS) assay, whereas the cytotoxic effect was evaluated by the MTT assay and morphological changes by fluorescence staining.

**Key finding** The DPPH scavenging capacities of  $\alpha$ -mangostin and water-soluble extract were obtained, the IC<sub>50</sub> at 183.95 and 54.57  $\mu$ g/ml, respectively. Meanwhile, the intracellular ROS level was significantly decreased after treatment with  $\alpha$ -mangostin and water-soluble extraction at 20 and 200  $\mu$ g/ml, respectively.  $\alpha$ -mangostin exhibited the cytotoxicity at ED<sub>50</sub> 8.21  $\mu$ g/ml, while the water-soluble extract was non-toxic to cells at ED<sub>50</sub> higher than 160  $\mu$ g/ml. Both constituents showed antioxidative activity by chemical assay and in cells, but  $\alpha$ -mangostin expressed strong cytotoxicity and showed apoptotic bodies.

**Conclusion** The different isolated constituents would be further studied for future possible use as chemotherapy in cancer and chemoprevention in Alzheimer's disease.

### Introduction

Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) is a tropical tree from India, Myanmar, Malaysia, Philippines, Sri Lanka and Thailand. People named as it 'queen of fruits' due to the juicy, silky, sweet, fragrant and marvellous taste. The fruit pericarp of mangosteen has been used as a traditional medicine for many years as treatment for skin infection, wound, dysentery and diarrhoea.<sup>[1,2]</sup> The pericarp is a source of xanthones, mangostin, tannin, chrysanthemin, gartnone, gartanin, vitamin B1, B2, C, and other bioactive substances.<sup>[3,4]</sup> In this study, the extraction process of the fruit pericarp of mangosteen gave main two partitions: EtOH extract and water-soluble partition of ethanol extraction. The EtOH contained high amount of  $\alpha$ -mangostin,

which was reported as a potent chemical for anti-inflammatory, antitumour, antioxidant and antibacterial activity.<sup>[5]</sup> The water-soluble partition, which is isolated differently from other reports, has a neuroprotective effect against oxidative stress in various neuronal cells *in vitro* and *in vivo*.<sup>[5-8]</sup> Thus, the aim of this study was to isolate the purified  $\alpha$ -mangostin and partially purified water extract and compare the biological activity of these isolates using the MTT assay, cytosolic reactive oxygen species (ROS) level test and DPPH scavenging assay to evaluate the appropriate application of these constituents in the future. Our finding showed the different activity of these two isolated extracts from mangosteen.



Contents lists available at ScienceDirect

Microvascular Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ymvre](http://www.elsevier.com/locate/ymvre)



## Anti-angiogenic actions of the mangosteen polyphenolic xanthone derivative $\alpha$ -mangostin<sup>☆</sup>

Kanjana Jittiporn<sup>a,b,c</sup>, Jutamas Suwanpradid<sup>a,b</sup>, Chintan Patel<sup>a,b</sup>, Modesto Rojas<sup>a,b</sup>, Suwan Thirawarapan<sup>c</sup>, Primchanien Moongkarndi<sup>d</sup>, Wisuda Suvitayavat<sup>c</sup>, Ruth B. Caldwell<sup>a,b,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Vision Discovery Institute, Georgia Regents University, Augusta, GA 30912, USA

<sup>b</sup> Vascular Biology Center, Georgia Regents University, Augusta, GA 30912, USA

<sup>c</sup> Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 10400, Thailand

<sup>d</sup> Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 10400, Thailand

<sup>e</sup> VA Medical Center, Augusta, GA 30912, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 28 March 2014

Available online 8 April 2014

### ABSTRACT

Retinal neovascularization is a major cause of vision loss in diseases characterized by retinal ischemia and is characterized by the pathological growth of abnormal vessels. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is known to play an important role in this process. Oxidative stress has been strongly implicated in up-regulation of VEGF associated with neovascularization in various tissues. Hence, compounds with anti-oxidant actions can prevent neovascularization.  $\alpha$ -Mangostin, a component of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn), has been shown to have an anti-oxidant property in pathological conditions involving angiogenesis such as cancer. However, the effect of  $\alpha$ -mangostin on ROS formation and angiogenic function in microvascular endothelial cells has not been studied. Hence, this study demonstrated the anti-angiogenic effects of  $\alpha$ -mangostin in relation to ROS formation in bovine retinal endothelial cells (REC).  $\alpha$ -Mangostin significantly and dose-dependently reduced formation of ROS in hypoxia-treated REC.  $\alpha$ -Mangostin also significantly and dose-dependently suppressed VEGF-induced increases in permeability, proliferation, migration and tube formation in REC and blocked angiogenic sprouting in the ex vivo aortic ring assay. In addition,  $\alpha$ -mangostin inhibited VEGF-induced phosphorylation of VEGFR2 and ERK1/2-MAPK. According to our results,  $\alpha$ -mangostin reduces oxidative stress and limits VEGF-induced angiogenesis through a process involving abrogation of VEGFR2 and ERK1/2-MAPK activation.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Angiogenesis is the process of vessel sprouting from pre-existing vessels that is involved in various pathological conditions such as cancer, rheumatoid arthritis and ocular diseases including diabetic retinopathy (DR), age-related macular degeneration (AMD) and retinopathy of prematurity (ROP). Retinal neovascularization is a major cause of vision loss and is characterized by disruption of endothelial cell–cell junctions, leading to increased permeability which is followed by endothelial cell migration, proliferation, and capillary tube formation. Vascular

endothelial growth factor (VEGF), a potent angiogenic growth factor, is known to play an important role in these events.

Formation of reactive oxygen species (ROS) has been strongly implicated in up-regulation of VEGF associated with neovascularization. ROS increase VEGF expression and activity by inhibition of the protein tyrosine phosphatase and activation of VEGFR and downstream signaling proteins (Colavitti et al., 2002; Ushio-Fukai and Nakamura, 2008). Hence, the use of anti-oxidants can suppress angiogenesis.

Mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn) is a tropical fruit native to Southeast Asia including Indonesia, Malaysia, and Thailand. Various parts of mangosteen have been used as traditional medicine. For example, dried and powdered fruit hull is used as anti-microbial agent and anti-parasitic treatment for dysentery, whereas leaves and bark are used for eczema treatment (Obolskiy et al., 2009). At present, scientific reports demonstrate numerous actions of mangosteen including anti-tumor (Ho et al., 2002; Jung et al., 2006; Matsumoto et al., 2003, 2004; Moongkarndi et al., 2004a,b; Sukamram et al., 2006), anti-inflammation, anti-allergy (Chen et al., 2008; Nakatani et al., 2002a,b, 2004), and anti-oxidant activity (Chin et al., 2008; Jung et al., 2006; Yu et al., 2007). Mangosteen contains high amounts of xanthones which are secondary metabolites that demonstrate significant biological

<sup>☆</sup> Authors' contributions: Kanjana Jittiporn designed and performed all experiments, analyzed the data and wrote the manuscript; Jutamas Suwanpradid assisted with Western blot technique; Chintan Patel assisted with design and execution of Western blot and cell culture experiments; Modesto Rojas assisted with design and execution of aortic ring experiments and DHE assay; Primchanien Moongkarndi provided alpha-mangostin; Suwan Thirawarapan and Wisuda Suvitayavat provided guidance on research protocol and writing the results and discussion; Ruth B. Caldwell provided guidance on research design, data analysis and in writing and editing the manuscript.

\* Corresponding author at: Vascular Biology Center, CB3209, Georgia Regents University, 1439 Laney Walker Blvd., Augusta, GA 30912, USA.

E-mail address: [rcaldwell@gru.edu](mailto:rcaldwell@gru.edu) (R.B. Caldwell).



## Effect of purified $\alpha$ -mangostin from mangosteen pericarp on cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptotic gene expression in human cancer cells

Primchanien Moongkarndi<sup>1,\*</sup>, Nattapon Jaisupa<sup>2</sup>, Nuttavut Kosem<sup>3</sup>, Julaporn Konlata<sup>1</sup>, Jutima Samer<sup>1</sup>, Kovit Pattanapanyasat<sup>4</sup> and Ekkarat Rodpai<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand.

<sup>3</sup>Innovation Center for Medical Redox Navigation, Kyushu University, Fukuoka, Japan

<sup>4</sup>Center of Excellence for Flow Cytometry, Office for Research and Development, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

<sup>5</sup>Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Received: 17-05-2015 / Revised: 23-06-2015 / Accepted: 06-07-2015

### ABSTRACT

$\alpha$ -Mangostin from pericarp of *Garcinia mangostana* L. was purified and investigated on the anti-proliferation, anti-cancer activity on apoptotic-related gene expression and cell cycle arrest against human cancer cells.  $\alpha$ -Mangostin was identified by <sup>13</sup>C-NMR, DEPT 135-NMR, IR and MS. The peak of  $\alpha$ -mangostin from HPLC chromatogram was monitored at 316 nm and displayed at retention time 20.9 minute. Ten human cancer cells showed the cytotoxicity by MTT assay after exposure to  $\alpha$ -mangostin. Real-time RT-PCR was used to measure the apoptotic-related genes expression and flow cytometer was performed to analyze the cell cycle arrest. The ED<sub>50</sub> on cytotoxicity of  $\alpha$ -mangostin obtained from 5 breast cancer cells were between 8.21-15.41  $\mu$ g/ml; from 2 ovarian cancer cells were 8.15-33.4  $\mu$ g/ml; from 1 liver hepatocellular carcinoma cell was 6.12 $\pm$ 0.32  $\mu$ g/ml and from 2 colon cancer cells were 8.63-18.98  $\mu$ g/ml. The Bax/Bcl-2 ratios were increased in all cancer cells suggested that it might induce cell death by apoptotic pathway.  $\alpha$ -Mangostin demonstrated at G0/G1 phase cell cycle arrest by flow cytometric analysis.  $\alpha$ -Mangostin showed anti-proliferation activities to all 10 cancer cells. This compound should be further investigated for understanding the mechanisms of action and *in vivo* model study to justify that  $\alpha$ -mangostin is effective for prevention and treatment of cancers.

**Key Words:**  $\alpha$ -mangostin, mangosteen, validation method, cytotoxicity, cancer, cell cycle, Bax/Bcl-2 ratio



### INTRODUCTION

*Garcinia mangostana* L. (mangosteen), belonging to family Guttiferae, is an evergreen plant widely found in the tropical countries including Thailand. The pericarp of the fruit has been used as a folk medicine for many years to treatment of skin infection, wound and dysentery diarrhea [1]. It has been revealed to have major biological active compounds,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -mangostin, and other minor xanthenes [2]. Among these compounds,  $\alpha$ -mangostin is one of the interesting constituent, which generally found in various parts of this plant especially in the pericarp which was thrown away after taken the meat of the fruits.  $\alpha$ -Mangostin has been reported to possess interesting pharmacological activities, such as anti-vancomycin resistant *Enterococci* [3], induction

apoptosis of human leukemia [4], inhibition the oxidation modification of human LDL [5], histamine H1 receptor antagonist [6], anti-MRSA[7] and effect on Ca<sup>2+</sup>-ATPase [8] [9]. In addition, anticancer of this compound is increasingly interesting. A number of studies reported anticancer both *in vitro* and *in vivo* studies. For example,  $\alpha$ -mangostin showed the inhibition of human malignant glioblastoma growth by 50%, decrease human prostate carcinoma and human colon adenocarcinoma growth, as well as induced apoptosis of several cancer cells lines. Moreover, it can inhibit chemically-induced cancer from 1,2 dimethylhydrazine in colon cancer model [10]. Physically,  $\alpha$ -mangostin is a yellow solid with the melting point 181.6-182.6 °C[11]. Its IUPAC name is 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2,8-bis-(3-methyl-2-butenyl)-9-xanthenone [12] or 1,3,6-

\*Corresponding Author Address: Primchanien Moongkarndi, Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand. [primchanien.mo@mahidol.ac.th](mailto:primchanien.mo@mahidol.ac.th)

## ภาคผนวก 2

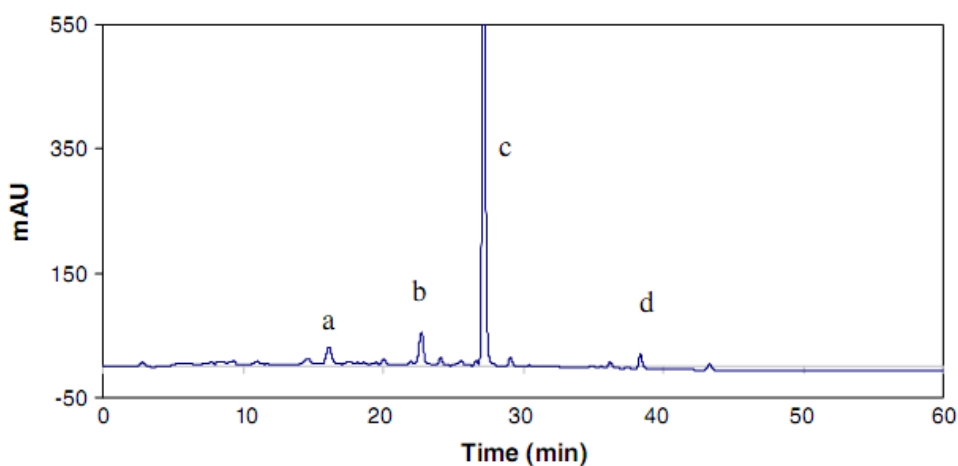
### การแยกสารบริสุทธิ์ $\alpha$ -mangostin

สารจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ต้านเชื้อรา, ยับยั้งเอนไซม์ viral reverse transcriptase และ HIV protease, ต้านเชื้อมาลาเรีย, แก้กongden, ต้าน histamine, ต้าน serotonin, ลดการอักเสบ ลดการเกิดแผลในทางเดินอาหาร, ยับยั้งเอนไซม์ DNA topoisomerases I และ II, จับกับอนุมูลอิสระ ต้านออกซิเดชัน, ต้านมะเร็ง, เพิ่มความดันโลหิต (สมุนไพรรักษา, 2542; Moongkarndi et al., 2004) เป็นต้น

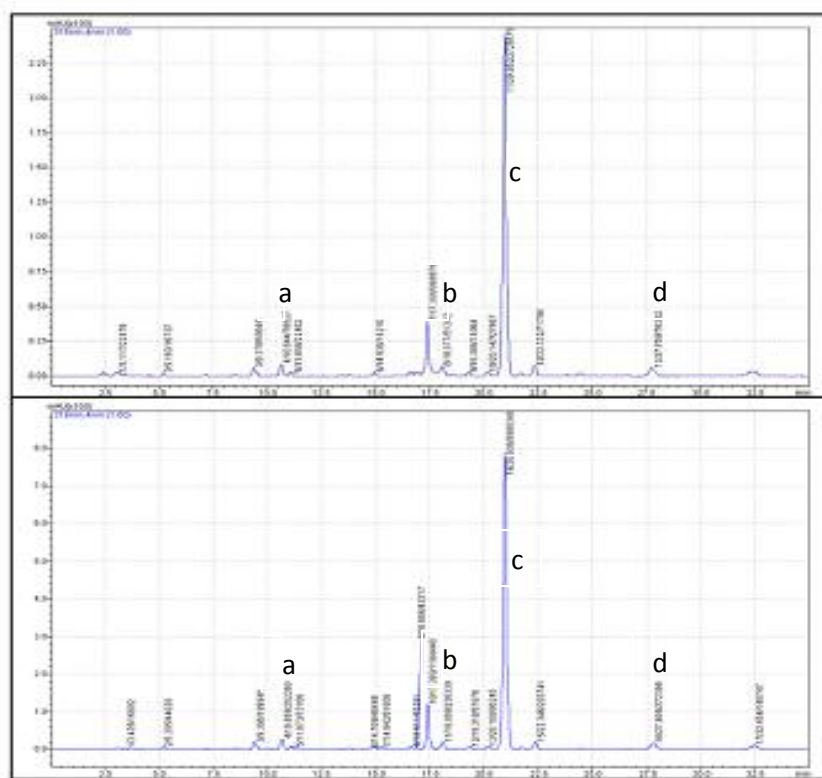
การวิจัยในประเทศไทย พบว่าสารสกัดหยาบ (crude extract) จากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วย methanol สามารถต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม (SKBR3) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis โดยตรวจสอบจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidation) รวมถึงการยับยั้งการเกิด Reactive Oxygen Species (ROS reduction) อีกด้วย (Moongkarndi et al., 2004) พบว่าสาร mangostin เป็นกลุ่มสาร phenolic compounds ตัวหนึ่ง ซึ่งอนุพันธ์ของ xanthone มีชื่อทางเคมี คือ 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2,8-bis-(3-methyl-2-butenyl)-9H-xanthen-9-one หรือ 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2,8-di(3-methyl-2-butenyl) xanthone (The Merck Index, 1996) และยังสามารถแบ่งเป็น  $\alpha$ , beta และ gamma-mangostin ขึ้นกับหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง hydroxyl (-OH) เช่น ในด้านของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่า  $\alpha$ -mangostin สามารถเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ของ human leukemia HL60 cell line โดยกระตุ้นระบบ caspase-3, 9 ในไมโทคอนเดรีย สาร  $\alpha$ -mangostin พบปริมาณสูงจากเปลือกมังคุดที่เป็นขยะทิ้ง รวมทั้งมีปริมาณสูงและเป็น major constituent ในส่วนของ crude ethanolic/methanolic extract ที่มีฤทธิ์ต่างๆที่สำคัญที่มีผู้ศึกษาไว้ จะเกิดประโยชน์อย่างยิ่งหากจะนำมาใช้ประโยชน์แยกสารสำคัญมาใช้เป็นยาได้ ตามฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีผู้ศึกษาหลายกลุ่มรายงานไว้

การแยกสารสำคัญจากเปลือกมังคุดได้สารบริสุทธิ์ คือ  $\alpha$ -mangostin โดยต้องทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่ได้ และให้มีปริมาณมากพอ อย่างน้อย 70 กรัม (โครงการปีที่ 1) ให้พอเพียงสำหรับการทดลองในทุกโครงการที่นำเสนอ ที่ทำการศึกษาทั้งทางเซลล์ และที่ใช้การทดลองในสัตว์ทดลอง โดยจากแนวทางการวิจัยที่ วช. เคยสนับสนุนงบประมาณในโครงการวิจัยของ

รศ. ดร. พินิติ รตะนานุกูล และคณะ ในโครงการนี้ได้เคยเสนอผลเปรียบเทียบแสดงสารเริ่มต้นที่ใช้ที่มี chromatogram ใกล้เคียงกัน จาก methanol และ ethyl acetate extracts (ภาพที่ 17, 18 และ 19) และต่อมาในโครงการวิจัยนี้หลังการได้รับอนุมัติทุนสนับสนุนปีที่ 1 ได้ทำการแยกสาร  $\alpha$ -mangostin บริสุทธิ์ได้ตามที่ตั้งเป้าหมายไว้ในโครงการวิจัย ไม่ต่ำกว่า 70 กรัม ของแต่ละโครงการ โดยแสดงผลการตรวจสอบสาร  $\alpha$ -mangostin บริสุทธิ์ดังแสดงข้อมูลไว้ใน ตารางที่ 8 และ 9 และ ภาพที่ 20 และ 21 โดยค่าที่ได้เปรียบเทียบผลคำนวณ โดยใช้สารมาตรฐานที่ซื้อมาเป็นตัวเทียบเคียง หาก lot ของสารที่แยกได้มีผลต่ำกว่า 90% จะไม่ได้ใช้ lot นั้นในการทดลองที่ศึกษา เช่น ใน lot C ไม่ได้ใช้ในการศึกษา อย่างไรก็ตามเนื่องจากการเตรียมในปริมาณที่มาก ในระดับอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ผลที่ได้อยู่ในความพอใจ และถ้าเตรียมในระดับปริมาณน้อย จะได้สารที่มีความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน และในการเตรียมใช้งานในปีที่ 2 ที่ได้ทุนวิจัย สาร  $\alpha$ -mangostin ที่เตรียมได้ในแต่ละ lot มีความบริสุทธิ์มากกว่า 98% ภาพที่ 21 แสดงสรุปการแยกสารบริสุทธิ์  $\alpha$ -mangostin จากเปลือกมังคุด



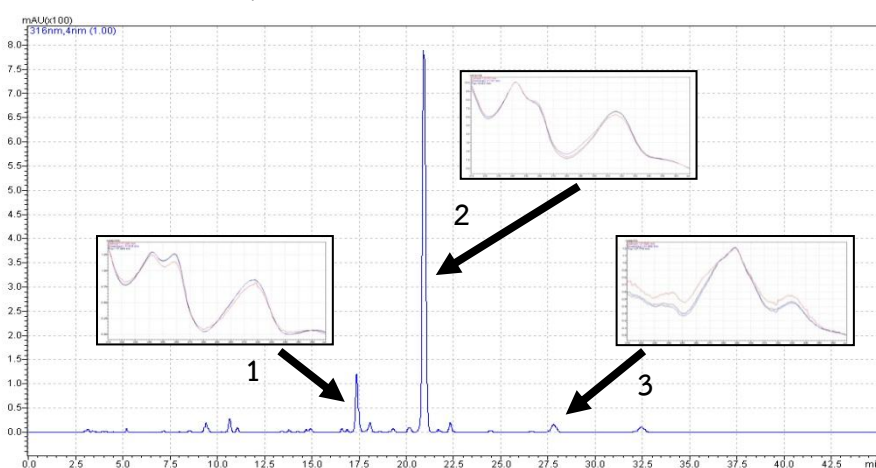
รูปที่ 17 แสดง chromatogram ของสารสกัดจากมังคุด ที่ได้จากโครงการวิจัยของรศ. ดร. พินิติ รตะนานุกูล และคณะ a=garcinone D, b= gamma mangostin, c= alpha mangostin, and d=beta mangostin



1 = สารสกัด MeOH

2 = สารสกัด Ethylacetate

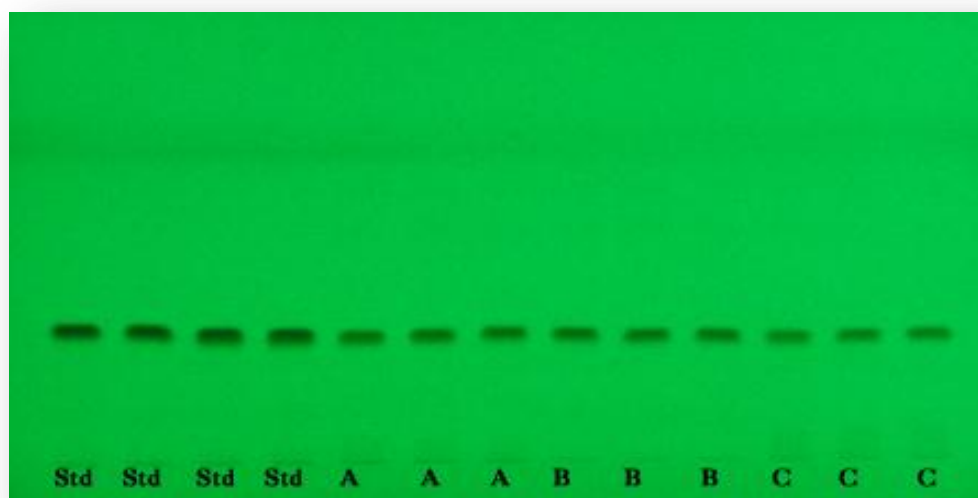
รูปที่ 18 แสดง HPLC Chromatogram ของสารสกัดต่างๆตามลำดับในโครงการนี้ 1) ส่วนของสารสกัด MeOH 2) ส่วนของสารสกัด Ethylacetate จากการวิเคราะห์พบว่ามีสาร  $\alpha$ -mangostin ในสารสกัดเปลือกมังคุด ในทุกๆส่วนสกัดโดยจะให้ฟีกของสารเกิดขึ้นที่ retention time เท่ากับ 20.95 นาทีในปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน



รูปที่ 19 แสดง HPLC Chromatogram ของสารสกัด MeOHของเปลือกมังคุด และ UV Spectrum ของฟีกสารต่างๆ 1) UV Spectrum ของฟีกสารที่ retention time = 17.38 นาที 2) UV Spectrum ของฟีกสารที่ retention time = 20.95 นาที (สาร  $\alpha$ -mangostin) 3) UV Spectrum ของฟีกสารที่ retention time = 27.78 นาที

ตารางที่ 8 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีคที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารละลาย  $\alpha$ -mangostin

| ความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์<br>$\alpha$ -mangostin<br>(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค<br>(Mean )(n=3) |
|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 10                                                                           | 106740.00                              |
| 25                                                                           | 272,676.00                             |
| 50                                                                           | 545,352.00                             |
| 100                                                                          | 1,097,118.00                           |
| 250                                                                          | 2,487,852.00                           |
| 500                                                                          | 5,421,438.00                           |
| 1,000                                                                        | 11,103,916.00                          |



รูปที่ 20 แสดงผลของ Thin layer chromatography ของสารบริสุทธิ์  $\alpha$ -mangostin ที่แยกได้ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ดูผล TLC ที่ UV lamp 256 nm ใช้ solvent system =  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (96:4)

Std = Standard  $\alpha$ -mangostin

A =  $\alpha$ -mangostin Lot A

B =  $\alpha$ -mangostin Lot B

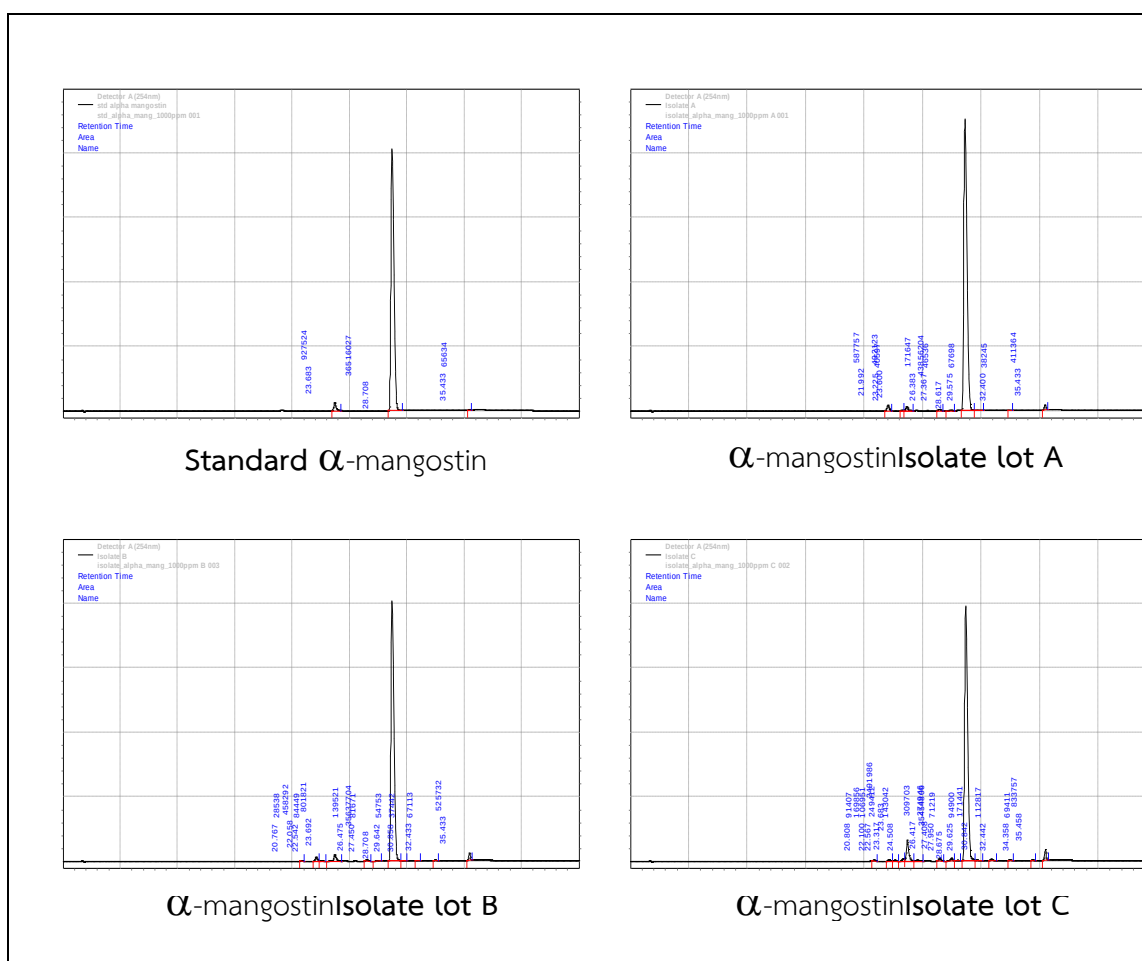
C =  $\alpha$ -mangostin Lot

ตารางที่ 9 แสดงผลของการคำนวณ % ความบริสุทธิ์ของสาร  $\alpha$ -mangostin ที่แยกได้  
เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ซื้อมา

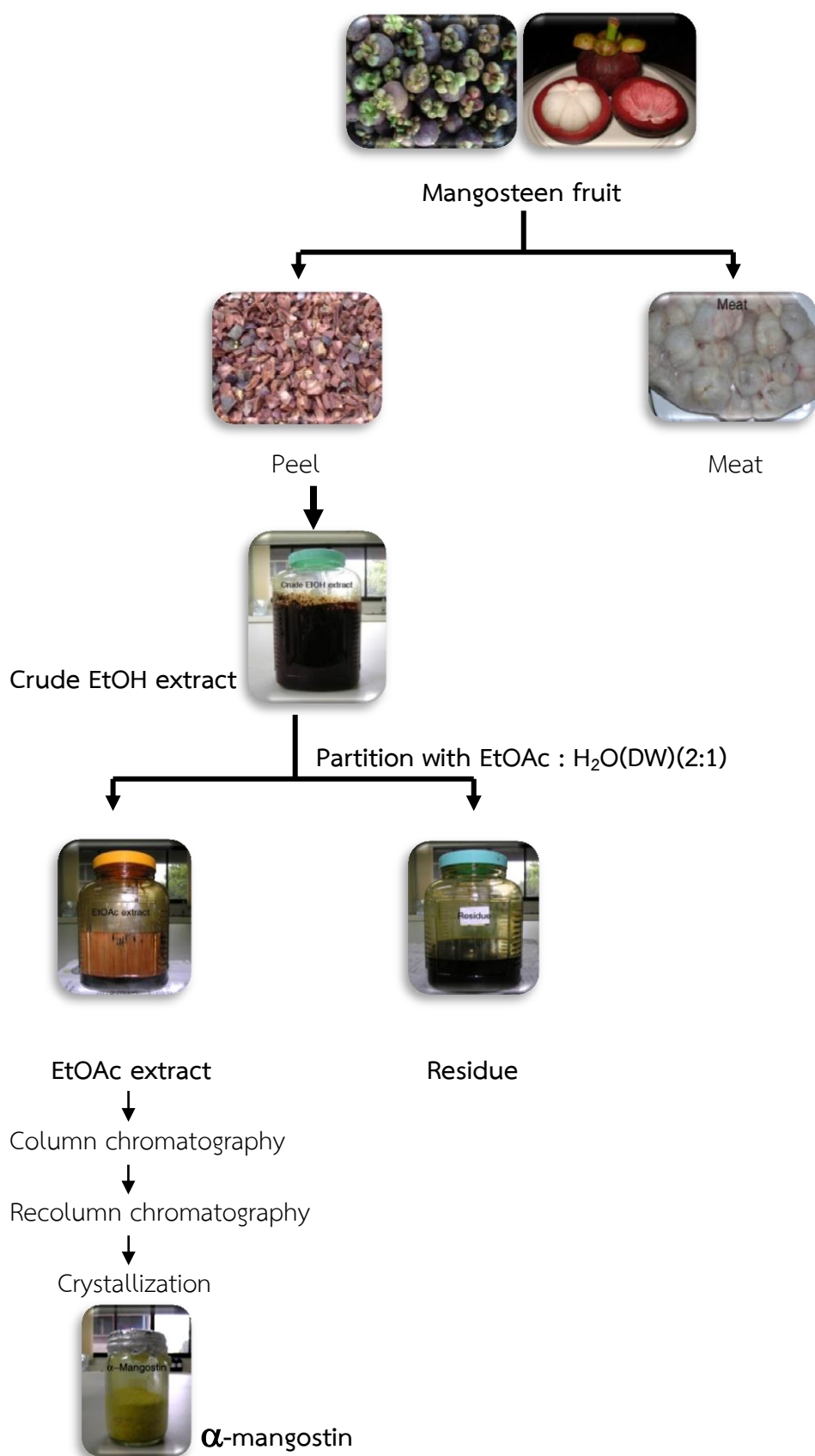
| Sample                                | ปริมาณ $\alpha$ -mangostin<br>(ppm) | % ความบริสุทธิ์ของ<br>$\alpha$ -mangostin |
|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------|
| Std* $\alpha$ -mangostin              | 1000                                | 97.37                                     |
| A $\alpha$ -mangostin isolate lot A** | 1000                                | 95.89                                     |
| B $\alpha$ -mangostin isolate lot B   | 1000                                | 93.98                                     |
| C $\alpha$ -mangostin isolate lot C   | 1000                                | 87.17                                     |

\*Standard  $\alpha$ -mangostin from ChromeDex Part # ASB-00013096-025

\*\*lots purified in the second year-grant were obtained higher purity more than 98%



รูปที่ 21 แสดงผลของ HPLC chromatography ของสารบริสุทธิ์  $\alpha$ -mangostin ที่แยกได้จาก  
3 lots เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

รูปที่ 22 Summary of the  $\alpha$ -mangostin isolation from *Garcinia mangostana* L.

สาร  $\alpha$ -mangostin มีคุณสมบัติ non-polar มาก ในการช่วยการเกิดการละลายที่ดี จะใช้ DMSO หรือ Methanol หรือ Ethanol เป็นสารช่วยละลาย และ เมื่อทำการเจือจางต่อไป ผลของ DMSO หากจะมีพิษต่อเซลล์จะมีผลน้อยมากเมื่อเจือจางไปจนเหลือค่าของ DMSO ประมาณ ต่ำกว่า 2.5% แต่ methanol และ ethanol ไม่ใช้ในการทดสอบกับ cell culture สำหรับการช่วยการกระจายตัวของสาร หากจะทำการฉีดเข้าสัตว์ทดลอง หรือการป้อนทางปาก จะใช้สารช่วยการกระจายตัวคือ 0.5% hydroxypropyl methylcellulose; HPMC หรืออาจใช้ 0.1% carboxymethylcellulose; CMC

ผลการทดสอบความคงตัวของสาร  $\alpha$ -mangostin ที่อุณหภูมิ 60-150 °C แสดงค่าฤทธิ์การทำลายเซลล์มะเร็งได้ด้วยค่าที่คงตัวใกล้เคียงกับตัว  $\alpha$ -mangostin ควบคุม เป็นผลการทดสอบที่รายงานในโครงการวิจัยย่อยที่ 3 ตารางที่ 31 แสดงฤทธิ์และความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมังคุด (แอลฟาแมงโกสติน) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ Caco-2 cells ได้ร้อยละ 50 (ED50)

| สภาวะการทดสอบ | เวลา (นาที) | ED <sub>50</sub> (ug/ml) |
|---------------|-------------|--------------------------|
| Control       |             | 8.09 ± 0.18              |
| 60°C          | 15          | 9.01 ± 0.35              |
|               | 30          | 8.76 ± 0.28              |
|               | 45          | 8.70 ± 0.51              |
|               | 60          | 8.43 ± 0.27              |
|               | 75          | 8.55 ± 0.13              |
|               | 90          | 8.22 ± 0.13              |
| 90°C          | 15          | 8.77 ± 0.37              |
|               | 30          | 8.21 ± 0.10              |
|               | 45          | 8.27 ± 0.12              |
|               | 60          | 8.27 ± 0.25              |
|               | 75          | 8.22 ± 0.12              |
|               | 90          | 8.69 ± 0.26              |
| 120°C         | 15          | 8.65 ± 0.04              |
|               | 30          | 8.94 ± 0.09              |
|               | 45          | 8.90 ± 0.22              |
|               | 60          | 8.47 ± 0.26              |
|               | 75          | 8.38 ± 0.22              |
|               | 90          | 8.76 ± 0.38              |
| 150°C         | 15          | 8.44 ± 0.40              |
|               | 30          | 8.72 ± 0.13              |
|               | 45          | 8.58 ± 0.09              |
|               | 60          | 8.77 ± 0.11              |
|               | 75          | 8.64 ± 0.25              |
|               | 90          | 8.53 ± 0.13              |

ผลการทดสอบความคงตัวของสารสกัดน้ำจากเปลือกมังคุด ที่อุณหภูมิ 60-120 °C แสดงค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay ที่มีผลใกล้เคียงกับสารสกัดน้ำควบคุมตั้งต้น เป็นผลการทดสอบที่รายงานในโครงการวิจัยย่อยที่ 3 ตารางที่ 32

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากเปลือกมังคุด โดยวิธี DPPH assay

| ความเข้มข้นของสารสกัดน้ำจากเปลือกมังคุด (µg/ml) | % DPPH radical scavenging activity after treatment |              |              |               |               |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
|                                                 | Control                                            | 60 °C, 15min | 80 °C, 15min | 100 °C, 15min | 120 °C, 15min |
| 0                                               | 0.00 ± 0.00                                        | 0.00 ± 0.00  | 0.00 ± 0.00  | 0.00 ± 0.00   | 0.00 ± 0.00   |
| 3.91                                            | 16.22 ± 2.56                                       | 15.82 ± 2.34 | 16.59 ± 0.27 | 17.27 ± 0.78  | 7.35 ± 5.00   |
| 7.81                                            | 28.92 ± 1.33                                       | 28.81 ± 3.73 | 31.57 ± 1.46 | 33.05 ± 1.27  | 25.57 ± 0.47  |
| 15.63                                           | 48.58 ± 0.68                                       | 48.19 ± 0.80 | 54.01 ± 2.80 | 54.41 ± 1.69  | 45.08 ± 0.93  |
| 31.25                                           | 79.49 ± 2.29                                       | 80.73 ± 2.69 | 89.44 ± 2.91 | 90.26 ± 1.86  | 79.83 ± 2.43  |
| 62.50                                           | 95.19 ± 0.42                                       | 95.31 ± 0.75 | 95.40 ± 0.34 | 95.81 ± 0.66  | 95.31 ± 0.12  |
| 125                                             | 95.09 ± 0.25                                       | 95.31 ± 0.68 | 95.34 ± 0.39 | 95.73 ± 0.80  | 95.18 ± 0.18  |
| 250                                             | 94.58 ± 0.33                                       | 95.36 ± 0.52 | 94.87 ± 0.28 | 95.27 ± 0.69  | 94.83 ± 0.11  |
| 500                                             | 93.47 ± 0.63                                       | 94.73 ± 0.70 | 94.40 ± 0.37 | 94.28 ± 0.41  | 94.02 ± 0.06  |
| IC <sub>50</sub>                                | 16.35                                              | 16.51        | 14.27        | 14.03         | 17.85         |
| S.D.                                            | 0.33                                               | 0.49         | 0.32         | 0.67          | 0.02          |

## การแยกสาร

- การแยกสารบริสุทธิ์  $\alpha$ -mangostin ได้ดำเนินการเป็นตามแผนงานที่กำหนดทั้งปริมาณของสารที่เตรียมได้คือ 70 กรัม และตามกำหนดเวลาที่ตั้งไว้ในแผนงาน ผู้ทำวิจัยทุกโครงการได้สารไปดำเนินการทดลองได้ตามแผนที่เสนอไว้กับวช. และสาร  $\alpha$ -mangostin ที่แยกได้บริสุทธิ์นี้มีความคงตัวดี การเก็บรักษาในภาชนะที่ปิดฝาสนิทไม่ให้ความชื้น สามารถเก็บได้ในห้องปฏิบัติการ หรือที่ความเย็น 10 °C ในระหว่างที่ทำการวิจัยนี้ สารยังคงมีฤทธิ์ต่อเซลล์ได้ค่าใกล้เคียงกับที่ศึกษาเริ่มต้น การตรวจทางจุลชีววิทยาไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ เป็นไปตามข้อกำหนดของการตรวจคุณภาพของผลิตภัณฑ์ยา

- การเตรียมทำในห้องปฏิบัติการวิจัย โดยใช้อุปกรณ์พื้นฐานที่มีในโครงการและของคณะเป็นงานที่ค่อนข้างหนักสำหรับผู้วิจัยและเจ้าหน้าที่ผู้ช่วย เนื่องจากการศึกษาที่ใช้สัตว์ทดลองจำเป็นต้องใช้สารปริมาณมากต่างจากที่เคยเตรียมสารเพื่อใช้ทดสอบในหลอดทดลองและเซลล์ ซึ่งหากจะเป็นการเตรียมปริมาณมากขึ้นด้วยอุปกรณ์ขนาดใหญ่ขึ้น อาจต้องปรับวิธีอีกเล็กน้อยในการดำเนินงาน

- อุปกรณ์จำเป็นบางอย่าง เช่น HPLC ต้องจองการใช้เป็นเวลานานมาก เพราะอุปกรณ์มีไม่มากพอสำหรับนักศึกษาและบุคลากรโครงการวิจัย ภาควิชาไม่มีอุปกรณ์นี้ ต้องใช้เครื่องกลาง ซึ่งบางครั้งต้องรอคิวและการซ่อม
- กำลังเตรียมผลงานตีพิมพ์ เปรียบเทียบสารที่ได้จากมังคุด และการทดสอบฤทธิ์ในด้านต่างๆ จะสามารถสรุปงานและส่งเสนอได้ ภายในกลางเดือนกุมภาพันธ์ 2556 นี้ หลังจากการส่งรายงานสมบูรณ์นี้
- งานต่างๆดำเนินการได้ด้วยดี อุปสรรคไม่มาก และคณะผู้วิจัยอื่น ให้ความร่วมมือที่ดีมาก สามารถทำงานด้วยกันได้ดี มีความเป็นนักวิจัยที่ดีมาก ผู้ช่วยวิจัยมีความสามารถมาก ตั้งใจทำงานอดทน รับผิดชอบงานดีมาก ขณะนี้มีประสบการณ์สูง งานวิจัยที่ทำอยู่จากทุนที่ได้นี้จะไม่สามารถดูแล ผู้ช่วยวิจัยได้ยาวนาน ซึ่งเป็นปัญหาในทุกโครงการที่ไม่มีพนักงานตำแหน่งประจำในหน่วยงาน ทำให้ต้องฝึกงานใหม่ตลอดเวลา และมีผลให้งานล่าช้า ดังนั้นขบที่ วช. กำหนดไว้จึงไม่อิงกับความจริงที่เหมาะสมในสถานะเศรษฐกิจปัจจุบัน

#### ข้อเสนอแนะ

สารบริสุทธิ์สามารถเตรียมได้  $\alpha$ -mangostin ปริมาณมากจากเปลือกมังคุดที่ทิ้งเปล่า นำมาใช้ประโยชน์ได้ ชาวสวนจะได้ประโยชน์ หากมีผู้สนใจศึกษาทางวิชาการมากขึ้น และผู้ผลิตระดับใหญ่มีข้อมูลที่ถูกต้องมีความสนใจดำเนินการจริงจังในอนาคต

- หากมีความเป็นไปได้ในอนาคตการเตรียมสารสกัด  $\alpha$ -mangostin ที่บริสุทธิ์ หรือการเตรียมสารสกัดจากส่วนน้ำ ตามกรรมวิธีที่ศึกษาวิจัย สามารถมีการถ่ายทอดเทคโนโลยีไปสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ เช่น องค์การเภสัชกรรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นต้น จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อประเทศ และการวิจัยไม่สูญเปล่า

- สาร  $\alpha$ -mangostin ให้ผลที่ดีมากในการทดลองด้านมะเร็งที่ศึกษาในเซลล์มะเร็ง และการศึกษาด้านการรักษาและภาวะพึงผิดในตับ และภาวะตับแข็งในสัตว์ทดลอง สาร  $\alpha$ -mangostin มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาใหม่ ซึ่งจำเป็นต้องทำการทดลองลงลึกในด้านต่างๆตามที่นำเสนอไว้ในโครงสร้างต่อไป เช่น การศึกษา pharmacodynamics pharmacokinetics เป็นต้น หากมีผู้สนใจศึกษาถ่ายทอดงานต่อไป มีนักวิทยาศาสตร์ จากต่างประเทศที่ทำการวิจัยชำนาญทางด้านนี้อาจร่วมวิจัยศึกษา เมื่อทางประเทศไทยเจ้าของโครงการสนใจและมีทุนสนับสนุน โดยได้มีโอกาสพูดคุยปรึกษาในระดับหนึ่ง

### บรรณานุกรม

- Chaivisuthangkura A, Malaikaew Y, Chaovanalikit A, Jaratrungtawee A, Panseeta P, Ratananukul P, Suksamrarn S. Prenylated xanthone composition of *Garcinia mangostana* (Mangosteen) Fruit Hull. *Chromatographia* 2009;69:315-318.
- Farnsworth NR, Bunyapraphatsara N. Thai medicinal plant: recommended for primary health care system. Bangkok: Mahidol University; 1992.
- Gad SC, Chengelis CP. Animal models in toxicology. New York: Marcel Dekker; 1992.
- Gupta M, Mazumder UK, Rath N, Mukhopadhyay DK. Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich Ascites Carcinoma. *J Ethnopharmacol* 2000;72:151-6.
- Holland EC. Mouse models of human cancer. New York: Wiley-Liss, 2004.
- Kosem N, Han YH, Moongkarndi P. Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* hulls. *ScienceAsia* 2007;33:283-292.
- Kosem N. et al. *In vivo* toxicity and antitumor activity of mangosteen extract. *J Nat Med* 2013;67:255-263.
- <sup>a</sup>Moongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *J Ethnopharmacol* 2004;90:161-6.
- <sup>b</sup>Moongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, Jongsomboonkusol S, Pongpan N. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia* 2004;75:375-7.
- <sup>c</sup>Moongkarndi P, Jaisupa N, Samer J, Kosem N, Konlata J, Rodpai E, Pongpan N. Comparison the biological activities of two different isolates from mangosteen. *JPP* 2014;66:1171-1179.
- Suksamrarn S, Suwannapoch N, PhakhodeeW, Thanuhiranlert J, Ratananukul P, Chimnoi N, et al. Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2003;51:857-859.
- Uawisetwathana U, Rodpai E, Moongkarndi P. Gene expression of cytokeratin 19 and its molecular detection in human breast cancer cell lines. *J Pharm Biomed Anal* 2015; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba2015.11.034>.

### ภาคผนวก 3

#### บรรณานุกรมสำหรับการสกัด DNA, RNA, Protein

- Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J. and Struhl K. 1990. Appendix 1, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2, A.1.5, John Wiley and Sons, Inc., New York, NY.
- Banerjee, S, Smallwood A, Chambers AE and Nicolaidis K. (2003) Quantitative Recovery of Immunoreactive Proteins from Clinical Samples Following RNA and DNA Isolation. *BioTechniques*, 35, 450-456.
- Chomczynski P. and Sacchi N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
- Chomczynski P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15, 532-537.

- Chomczynski P. and Mackey K. 1995. Substitution of chloroform with bromochloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal Biochem*, 225, 163-164.
- Chomczynski P. and Mackey K. 1995. Modification of the TRI Reagent™ procedure for isolation of RNA from polysaccharide - and proteoglycan - rich sources. *Biotechniques*, 19, 942-945.
- Mackey K. and Chomczynski P. 1996. Long-term stability of RNA isolation reagents. *J NIH Res.*, 8 , 72.
- Wilfinger W., Mackey K. and Chomczynski P. 1997 Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22, 474-481.
- Wu, LC (1997) Isolation and Long-Term Storage of Proteins from Tissues and Cells Using TRIzol Reagent. *FOCUS*, 17, 98-100.

The use of TRI REAGENT can be cited by referring to this brochure: TRI Reagent - RNA, DNA, protein isolation reagent. Manufacturer's protocol (1995), Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH; or to references 1 or 2. TRI REAGENT® and FORMAZOL® are registered trademarks of Molecular Research Center, Inc. Copyright Molecular Research Center, Inc., 1993-2010.



## ส่วนประกอบตอนท้าย

### ประวัติและผลงานของนักวิจัย

#### หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 1

ชื่อ นางสาวปริมณีนัน มุ่งการดี

หมายเลขบัตรประชาชน 3-1020-000-9XXXX

#### ประวัติการศึกษา

|           |                          |                                   |                                      |
|-----------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| 2517      | ภ.บ. (เกียรตินิยม)       | คณะเภสัชศาสตร์                    | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย                |
| 2520      | วท.ม. (จุลชีววิทยา)      | คณะวิทยาศาสตร์                    | มหาวิทยาลัยมหิดล                     |
| 2527      | Dr.rer.nat. (Immunol.)   | Institute for Immunology          | Heidelberg University, Germany       |
| 2535-2537 | Post Doctoral Fellowship | Duke Comprehensive Cancer Center, | Duke University, North Carolina, USA |

#### ที่ทำงาน

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

#### ตำแหน่งปัจจุบัน

รองศาสตราจารย์

กรรมการประจำหลักสูตรปริญญาโท-เอก สาขาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

#### สาขาวิชา/ความรู้ที่เกี่ยวข้อง

Microbiology, Immunology, Animal cell culture, Bioassays

#### งานสอน

ทำการสอนวิชาบังคับต่างๆในภาควิชาจุลชีววิทยา โดยจะรับผิดชอบภาคการบรรยายและปฏิบัติการของวิชา Microbiology และ Immunology สำหรับนักศึกษาเภสัชศาสตร์ รวมทั้งร่วมสอนวิชาต่างๆของภาควิชาจุลชีววิทยา และ ภาควิชาอื่น ในคณะเภสัชศาสตร์ และนอกคณะเภสัชศาสตร์ ในระดับ ปริญญาตรี โท เอก

#### สาขางานวิจัย

Drug Discovery from Natural Substances

Tumor Immunology and Immunodiagnosis

#### ผลงานตีพิมพ์

**Moongkarndi P, Bunyapraphatsara N, Srisukh V, Wagner H.** The inhibitory activity in 5-lipoxygenase pathway of hispidulin from *Millingtonia hortensis* is Linn. f. J Sci Soc Thailand 1991;17:51-6.

**Moongkarndi P, Srivattana A, Bunyapraphatsara N, Puthong S, Laohathai K.** Cytotoxicity assay of hispidulin and quercetin using colorimetric technique. Mahidol Univ J Pharm Sci 1991;18:25-31.

- Chulasiri M, Bunyaphrathatsara N, **Moongkarndi P**. Mutagenicity and antimutagenicity of hispidulin and hortensin, the flavonoids from *Millingtonia hortensis* L. Environ Mo1 Mutagen 1992;20:307-12.
- Neungton N, **Moongkarndi P**, Laohathai K, Neungton S, Juntrachotiwi P. Immunohistological characteristic of OVS1 and OVS2 monoclonal antibodies recognizing human ovarian mucinous cystadenocarcinoma. Asian Pac J Allergy Immunol 1992;10:129-34.
- Neungton N, **Moongkarndi P**, Neungton S, Laohathai K, Srisawat C, Wachirutmanggur L. Establishment of OVS1 and OVS2 monoclonal antibodies recognizing human ovarian mucinous cystadenocarcinoma. Asian Pac of Allergy Immunol. 1995;13:47-53.
- Moongkarndi P**, Wu S, Boyer C, Wiener J, DeSombre K, O'Briant, Bast C, Jr. Molecular biology as a tool for cancer diagnosis and drug discovery. Proceeding at the Fourth NRCT-JSPS Joint Seminar, Hat Yai, Songkhla, Thailand, November, 1998.
- Jiratchariyakul W, Okabe H, **Moongkarndi P**, Frahm AW. Cytotoxic glycosphingolipid from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy. Thai J Phytopharm 1999;5:10-20.
- Jiratchariyakul W, **Moongkarndi P**, Theppeang K, Sethajintanin D, Jarikasem S, Frahm W. Cytotoxic principles from *Trichosanthes cucumerina* L. Thai J Phytopharm 1999;6:1-9.
- Moongkarndi P**, Kaslungka S, Kosem N, Junnu S, Theptaranon Y, Neungton N. Cytotoxicity and apoptosis of ovarian and breast cancer cell lines induced by OVS1 monoclonal antibody and paclitaxel. Asian Pac of Allergy Immunol 2003;21:31-41.
- Moongkarndi P**, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. J Ethnopharmacol 2004;90:161-166.
- Moongkarndi P**, Kosem N, Luanratana O, Jongsomboonkusol S, Pongpan N. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. Fitoterapia 2004;75:375-377.
- Moongkarndi P**, Kosem N. Phytochemicals as Chemoprevention. In : Series in Recent Progress in Medicinal Plants, VK Singh, J.N.Govil, Ahmad K, Sharma RK, ed. Texas : Studium Press LLC, Volume 15, Natural Products, Chapter 9, December 2006, p177-207.
- Jiratchariyakul W, Vongsakul M, Sunthornsuk L, **Moongkarndi P**, Narintorn A, Somanabandhu A, Okabe, H, Frahm AW. Immunomodulatory effect and quantitation of a cytotoxic glycosphingolipid from *Murdannia loriformis*. J Nat Med 2006;60:210-216.
- Kosem N, Han YH, **Moongkarndi P**. Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* hulls. ScienceAsia 2007;33:283-292.
- Moongkarndi P**, Jaisupa N, Jongsomboonkusol S, Kaslungka S, Sengpanich N, Samosorn W, Kosem N, Neungton N. Effect of OVS1 monoclonal antibody as targeted ovarian and breast cancer therapy. Mahidol Univ J Pharm Sci 2007;34(1-4):53-59.
- Montririttigri K, **Moongkarndi P**, Joongsomboonkusol S, Chitkul B, Pattanapanyasat K. Apoptotic activity of aporphine from *Stephania venosa* on human ovarian

- cancer cells. Mahidol Univ J Pharm Sci Mahidol Univ J Pharm Sci 2008;35(1-4):52-56.
- Moongkarndi P**, Kosem N, Jongsomboonkusol S, Montririttigri K, Choljararux I, Samer J, Pattanapanyasat K, Neungton N. Herbal/Natural health products for cancer care :Turning medicinal plants into anticancer drugs. Thai Cancer J (supplement.) 2009;29 (4):107-8.
- Moongkarndi P**, Srisawat C, Saetun P, Jantaravinid J, Peerapittayamonkol C, Soi-ampornkul R, Junnu S, Sinchaikul S, Chen ST, Charoensilp P, Thongboonkerd V, Neungton N. Protective effect of mangosteen extract against beta-amyloid-induced cytotoxicity, oxidative stress and altered proteome in SK-N-SH cells. J Proteome Res 2010, 9:2076-2086.
- Moongkarndi P**, Rodpai E, Kanarat S. Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis. J Vet Diagn Invest 2011, 23(4):791-795.
- Benjakul R, **Moongkarndi P**, Panyarachun B, Sarisuta N. Novel Freeze-drying method for preparation of  $\alpha$ -mangostin dry reconstitute liposomal powder. Adv Sci Lett 2012; 11: 120-125.
- Kosem N, Ichikawa K, Utsumi H, **Moongkarndi P**. *In vivo* toxicity and antitumor activity of mangosteen extract. J Nat Med 2013;67:255-263.
- Rodpai E, Moongkarndi P, Tungrugsasut W, Phisannoradej R, Kanarat S. Comparison of multiplex polymerase chain reaction and immunoassays for the detection of *Salmonella* spp., *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* in Thai chicken meat. ScienceAsia 2013;39:150-159.
- Kasemwattanaroj P, **Moongkarndi P**, Pattanapanyasat K, Mangmool S, Rodpai E, Samer J, Konlata J, Sukapirom K. Immunomodulatory activities of  $\alpha$ -mangostin on peripheral blood mononuclear cells. Nat Prod Commun 2013;8:1257-1260.
- Sattayasai J, Chaonapan P, Arkaravichie T, Soi-ampornkul R, Junnu S, Charoensilp P, Samer J, Jantaravinid J, Masaratana P, Suktitipat B, Manissorn J, Thongboonkerd V, Neungton N, **Moongkarndi P**. Protective effects of mangosteen extract on  $H_2O_2$ -induced cytotoxicity in SK-N-SH cells and scopolamine-induced memory impairment in mice. PLOS ONE December 2013; Volume 8 Issue 12 e85053 p 1-12.
- Moongkarndi P**, Jaisupa N, Samer J, Kosem N, Konlata J, Rodpai E, Pongpan N. Comparison the biological activities of two different isolates from mangosteen. JPP 2014;66:1171-1179.
- Jittiporn K, Suwanpradid J, Patel C, Rojas M, Thirawarapan S, **Moongkarndi P**, Suvitayavat W, Caldwell RB. Anti-angiogenic actions of the mangosteen polyphenolic xanthone derivative  $\alpha$ -mangostin. Microvas Res 2014; 93:72-79.
- Moongkarndi P**, Jaisupa N, Kosem N, Konlata J, Samer J, Pattanapanyasat K, Rodpai E. Effect of purified  $\alpha$ -mangostin from mangosteen pericarp on cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptotic gene expression in human cancer cells. WJPS World J Pharm Sci ISSN (Print): 2321-3310; ISSN (Online): 2321-3086.

#### ทุนวิจัยในช่วง 5 ปี (ฉบับโครงการ)

- 2546-2552      ทุนวิจัยจาก กองทุนสนับสนุนการวิจัย (ฝ่ายเกษตร ฝ่าย 2)
- 2549            ทุนร่วมโครงการวิจัยกับ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ทุนงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยมหิดล

## ผู้ร่วมวิจัย 1

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย): นาย นัฐวุฒิ กอเซ็ม  
(ภาษาอังกฤษ): Mr **Nuttavut** Kosem

1. Name : Mr. Nuttavut Kosem
2. Date of Birth : 19 April 1976
3. Place of Birth : Trat, Thailand
4. Home Address : 59/1 Moo 3 Namcheio Lamngop Trat 23120
5. Nationality : Thai
6. Marital Status : Married
7. Telephone No. : (+81)-080-3908-9876
8. E-mail Address : nuttavut@redoxnavi.med.kyushu-u.ac.jp
9. Education : 1994-1998 Bachelor of Science (Microbiology)  
Thesis: Microbiological quality of water from  
Bangsaen Beach and Koh-Srichang Island,  
Chonburi to Bang-Pakong, Samutprakan  
Department of Microbiology, Faculty of Science,  
Burapha University, Chonburi, Thailand  
1999-2003 Master of Science (Biopharmaceutical Sciences)  
Thesis: Antiproliferative and antioxidant effects on  
ovarian and breast cancers by OVS1 monoclonal  
antibody combining with mangosteen and turmeric  
Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy,  
Mahidol University, Bangkok, Thailand  
2003-2008 Doctor of Philosophy (Biopharmaceutical Sciences)  
Thesis: Eeffect of *Garcinia mangostana* extract on  
*in vitro* and *in vivo* cancer proliferation  
Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy,  
Mahidol University, Bangkok, Thailand

## 10. Position

2008 Jul 1 – present An assistant professor  
at Innovation Center for Medical Redox Navigation,  
Kyushu University, Fukuoka, Japan

## 11. Research of Interest :

1. Neuroprotective activity of metal chelators using both *in vitro* and *in vivo* models
2. *In vivo* redox imaging using Overhauser-enhanced MRI
3. Pharmacokinetics of nitroxyl radicals as redox-sensitive probes

## 12. Publications:

- Moongkarndi P, Kaslungka S, **Kosem N**, Junnu S, Jongsomboonkusol S, Theptaranon Y, Neungton N. Cytotoxicity and apoptosis of ovarian and breast cancer cell lines induced by OVS1 monoclonal antibody and paclitaxel. *Asian Pac J Allergy Immunol* **2003**;21:31-41.
- Moongkarndi P, **Kosem N**, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *J Ethnopharmacol* **2004**;90:161-6.
- Moongkarndi P, **Kosem N**, Luanratana O, Jongsomboonkusol S, Pongpan N. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia* **2004**;75:375-7.
- Moongkarndi P, **Kosem N**. Phytochemicals as chemoprevention. *Recent Progress in Medicinal Plants* **2006**;15:177-207.
- Kosem N**, Han Y-H, Moongkarndi P. Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Gracinia mangostana* hulls. *ScienceAsia* **2007**;33:283-92.
- Kinoshita Y, Yamada K, Yamasaki T, Mito F, Yamato M, **Kosem N**, Deguchi H, Shirahama C, Ito Y, Kitagawa K, Okukado N, Sakai K, Utsumi H. *In vivo* evaluation of novel nitroxyl radicals with reduction stability. *Free Radical Biology & Medicine* **2010**;49:1703-9.
- Kosem N**, Naganuma T, Ichikawa K, Morales NP, Yasukawa K, Hyodo F, Yamada K, Utsumi H. Whole-body kinetic image of a redox probe in mice using Overhauser-enhanced MRI. *Free Radical Biology & Medicine* **2012**;53:328-36.
- Kosem N, Ichikawa K, Utsumi H, Moongkarndi P. *In vivo* toxicity and antitumor activity of mangosteen extract. *J Nat Med* 2013;67:255-63.

## 13. Presentation

- Moongkarndi P, Luanratana O, Neungton N, **Kosem N**, Jongsomboonkusol S, Pongpan N (**poster presentation**). *In vitro* and *in vivo* assays of Thai medicinal plants. The 1<sup>st</sup> Asian Symposium for Pharmaceutical Sciences, **30-31 January 2004**, Room A, Centennial Hall, Kyushu University, School of Medicine, Fukuoka, Japan.
- Jongsomboonkusol S, Moongkarndi P, Luanratana O, **Kosem N**, Pattanapanyasat K (**poster presentation**). Cancer chemotherapy effect of *Stephania venosa* extracts. The 8<sup>th</sup> National Conferences on Cancer “Empowering cancer control for healthy Thailand”, **7-9 September 2005**, Miracle Grand Hotel, Bangkok, Thailand.
- Moongkarndi P, **Kosem N**, Soonthornchareonnon N, Saralam P (**poster presentation**). Antiproliferative, apoptosis and antioxidation of 9 Thai medicinal plants. The 8<sup>th</sup> National Conferences on Cancer “Empowering cancer control for healthy Thailand”, **7-9 September 2005**, Miracle Grand Hotel, Bangkok, Thailand.
- Nuttavut K**, Moongkarndi P (**oral presentation**). Evaluation the antioxidant activities of mangosteen on ESR, chemical reaction and cell culture. JSPS Asia Core Program: Kyushu-Mahidol Universities, **8-10 August 2006**, Rajcharat Building, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- Moongkarndi P, **Nuttavut K**, Uawisetwathana U, Pattanapanyasat K. Antiproliferative activity, apoptotic induction and cell cycle arrest of  $\alpha$ -mangosteen on human

- ovarian cancer cells (**oral presentation**). The 7th JSPS/NRCT Joint Seminar “Recent Advances in Natural Product Research and Its Application”, **1-4 December 2006**, University of Toyama
- Nuttavut K, Moongkarndi P (oral presentation)**. Toxicity and antitumor activity of *Garcinia mangostana*. JSPS Asia Core Program: Kyushu-Mahidol Universities, **16-19 December 2006**, Rajcharat Building, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- Kosem N, Moongkarndi P (oral presentation)**. Cytotoxic assay of bioactive compounds on cell culture. RGJ Seminar Series L, **3 August 2007**, Room K102, Faculty of Science, Mahidol University.
- Moongkarndi P, Jaisupa N, Jongsomboonkusol S, Kaslungka S, Sengparich N, Samosorn W, **Kosem N, Neungton N (poster presentation)**. Effect of QVS1 monoclonal antibody as target ovarian and breast cancer therapy. The 5<sup>th</sup> Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences, **21-24 November 2007**, Siam City Hotel, Bangkok.
- Kosem N, Yasukawa K, Yamada K, Ichikawa K, Utsumi H (poster presentation)**. Whole body imaging of redox status monitored by Overhauser-enhanced MRI with nitroxyl radicals. 日本酸化ストレス学会学術集会, 2009 年 6 月 11 日 ~ 12 日, 九州大学医学部百年講堂, 福岡, 日本.
- Kosem N, Morales NP, Ichikawa K, Utsumi H (poster presentation)**. Whole body pharmacokinetic imaging of carboxy-PROXYL monitored by Overhauser-enhanced MRI. The 16<sup>th</sup> JSPS Core-to-Core Seminar: Winter School in Fukuoka 2011, **8-10 January 2011**, Lake Side Hotel Hisayama, Fukuoka, Japan
- Kosem N, Ichikawa K, Morales NP, Yamada K, Yasukawa K, Hyodo H, Naganuma T, Utsumi H (oral presentation)**. Whole body kinetic image of a redox probe in mice using Overhauser-enhanced MRI. The 5<sup>th</sup> SFRR-Asia, 8<sup>th</sup> ASMRM, 11<sup>th</sup> J-mit. **8 August - 4 September 2011**, Kagoshima, Japan.
- Kosem N, Morales NP, Hyodo F, Ito S, Yasukawa K, Ichikawa K, Utsumi H (oral presentation)**. In vitro and in vivo neuroprotective effects of deferiprone. The Seventh Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences organized by Faculty of Pharmacy, Mahidol University. **December 14 – 16, 2011**, Anoma Hotel, Bangkok, Thailand.
- Kosem N, Hyodo F, Ito S, Naganuma T, Ichikawa K, Morales NP, Utsumi H (oral presentation)**. Brain redox images of nitroxyl radicals by Overhauser-enhanced MRI. The 19th JSPS Core-to-Core Seminar: Winter School in Fukuoka 2012 and the 20th JSPS Core-to-Core Seminar: International Redox Core Symposium on In Vivo Magnetic Resonance Imaging organized by Innovation Center for Medical Redox Navigation, Kyushu University. **February 4 – 6, 2012**, Nishitetsu Grand Hotel, Fukuoka, Japan.
- Kosem N, Hyodo F, Ito S, Naganuma T, Ichikawa K, Morales NP, Utsumi H (poster presentation)**. Brain redox imaging by Overhauser-enhanced MRI for noninvasively monitoring neuroprotection of deferiprone. International conference on oxidative stress in congenital and acquired hemolytic anemia organized by Department of Biochemistry, Faculty of Medicine Siriraj Hospital and Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University. **March 22 – 23, 2012**, Garden Cliff Resort & Spa, Pattaya, Thailand.



## ผู้ร่วมวิจัย 2

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย): นาย ศุภโชค มั่งมูล  
(ภาษาอังกฤษ): Mr Supachoke Mangmool  
เลขประจำตัวบัตรประชาชน: 356030029XXXX  
ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์  
หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
447 ถนนศรีอยุธยา เขตราชเทวี จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10400  
โทรศัพท์: 0-2644-8677 ต่อ 5630 โทรสาร: 0-2644-8700  
E-mail: [pysmm@mahidol.ac.th](mailto:pysmm@mahidol.ac.th)

ประวัติการศึกษา:

| คุณวุฒิ                           | ปี พ.ศ. ที่จบ | ชื่อสถานที่ศึกษา         |
|-----------------------------------|---------------|--------------------------|
| Ph.D. (Pharmaceutical Sciences)   | 2550          | Kyushu University, Japan |
| วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เภสัชวิทยา) | 2546          | มหาวิทยาลัยมหิดล         |
| เภสัชศาสตรบัณฑิต                  | 2542          | มหาวิทยาลัยเชียงใหม่     |

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ: cardiovascular pharmacology and receptor signal transduction

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ:

พ.ศ. 2550-2553 Department of Medicine, Duke University Medical Center, NC, USA

Project: G protein-coupled receptor signaling in hypertrophy and heart failure.

Position: Research Associate (Post-doctoral fellowship)

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่:

1. Nishida M, Tanabe S, Maruyama Y, **Mangmool S**, et al. (2005)  $G\alpha_{12/13}$ - and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and p38 MAPK by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 18434-18441.
2. **Mangmool S**, Haga T, Kobayashi H, Kim KM, Nakata H, Nishida M, and Kurose H. (2006) Clathrin required for phosphorylation and internalization of  $\beta_2$ -adrenergic receptor by G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2). *J. Biol. Chem.* 281, 31940-31949.
3. Yoo BS, Lemaire A, **Mangmool S**, Wolf MJ, Curcio A, Mao L, and Rockman HA. (2009)  $\beta_1$ -Adrenergic receptors stimulate cardiac contractility and CaMKII activation

- in vivo and enhance cardiac dysfunction following myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1377-86.
4. **Mangmool S**, Zou WL, Mao L and Rockman HA. (2009)  $\beta$ -Arrestin-dependent activation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II following  $\beta_1$ -adrenergic receptor activation. *Circulation*. 120, S1147.
5. **Mangmool S**, Shukla AK, and Rockman HA. (2010)  $\beta$ -arrestin-dependent activation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase II after  $\beta_1$ -adrenergic receptor stimulation. *J. Cell Biol.* 189, 573-87.

### ผู้ร่วมวิจัย 3

|                                |                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) (นาย) | นายเอกรัฐ รอดภัย                                                                                                                                                                                        |
| (ภาษาอังกฤษ) (Mr.)             | Ekkarat Rodpai                                                                                                                                                                                          |
| เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน     | 314030014XXXX                                                                                                                                                                                           |
| ตำแหน่งปัจจุบัน                | นักวิทยาศาสตร์                                                                                                                                                                                          |
| ที่อยู่ติดต่อได้สะดวก          | สถาบันวิจัยชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล<br>ศาลายา จังหวัดนครปฐม รหัสไปรษณีย์ 73170<br>โทรศัพท์ 02-441-9337 โทรสาร 02-441-9336<br>โทรศัพท์มือถือ 0818105011<br>E-mail Address rodpai@gmail.com |

### ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ  
สถาบัน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์  
ปริญญาโท สาขา Biopharmaceutical Science (Microbiology)  
สถาบัน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ Molecular Virology, Vaccine Science, Cell Culture Technology  
ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

- งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : (ชื่อผลงานวิจัย ปี ที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี )
  - Yoksan S., Thaisom S., Rodpai E., Thongchai P., Wootisarn C., Palabodeewat S., Rajakam S., Chokephaibulkit K., Jirakanjanakit N.\* Efficiency of NS1 antigen detection and virus isolation to diagnose dengue infection in patients with acute febrile illness.
  - Science and Technology for Self Sufficient Economics 28 – 30 Nov, 2007, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya.

- Rodpai E, Moongkarndi P, Tungrugsasut W, Phisannoradej R, Kanarat S. Comparison of multiplex polymerase chain reaction and immunoassays for the detection of *Salmonella* spp., *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* in Thai chicken meat. *ScienceAsia* 2013;39:150-159.
- Moongkarndi P, Jaisupa N, Samer J, Kosem N, Konlata J, Rodpai E, Pongpan N. Comparison the biological activities of two different isolates from mangosteen. *JPP* 2014;66:1171-1179.
- Moongkarndi P, Jaisupa N, Kosem N, Konlata J, Samer J, Pattanapanyasat K, Rodpai E. Effect of purified  $\alpha$ -mangostin from mangosteen pericarp on cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptotic gene expression in human cancer cells. *World J Pharm Sci* 2015; ISSN (Print): 2321-3310; ISSN (Online): 2321-3086.
- Uawisetwathana U, Rodpai E, Moongkarndi P. Gene expression of cytokeratin 19 and its molecular detection in human breast cancer cell lines. *J Pharm Biomed Anal* 2015; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba2015.11.034>.

### ที่ปรึกษาคนที่ 1

#### ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงนีโลบล เนืองตัน

สังกัด ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

โทรศัพท์ 0-2419-7581 โทรสาร 024199141

E-mail : neelobol.neu@mahidol.ac.th

#### ประวัติการศึกษาและวุฒิบัตรการฝึกอบรม

| ปีที่ศึกษา | เวลาที่ศึกษา | ชื่อสถานศึกษา                                      | ได้รับปริญญา/ประกาศนียบัตร                                                      |
|------------|--------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 2508-2512  | 4 ปี         | คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล<br>มหาวิทยาลัยมหิดล     | แพทยศาสตรบัณฑิต                                                                 |
| 2512-2513  | 1 ปี         | คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล<br>มหาวิทยาลัยมหิดล     | แพทย์ฝึกหัด                                                                     |
| 2513-2516  | 3 ปี         | แพทยสภา                                            | วุฒิบัตรแสดงความรู้ความชำนาญ<br>ในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม<br>สาขากุมารเวชศาสตร์ |
| 2519-2520  | 1 ปี 4 เดือน | Washington University<br>School of Medicine, U.S.A | Research Associate in<br>Biological Chemistry<br>(NIH Research Grant)           |

2546

แพทยสภา

อนุมัติบัตรเป็นผู้มีความรู้ความ

ชำนาญในการประกอบวิชาชีพ

เวชกรรมสาขาเวชศาสตร์ครอบครัว

### การดูงานและการอบรมระยะสั้น

1. Research fellow in carcinogenic activity detection, Fellowship Program in Japan for foreign researcher 30 มกราคม – 2 มีนาคม 2523 ด้วยทุน JSPS

2. ดูงานบัณฑิตศึกษาและงานวิจัยทางชีวเคมี ณ Monash University และ Melbourne University, Australia. 6 เมษายน – 5 พฤษภาคม 2531 (ทุนคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล)

3. Attend course “Immunotherapy with monoclonal antibody” ณ Downing College, Cambridge, UK. 5-18 เมษายน 2534 ด้วยทุน British Council

4. ดูงานวิจัยเกี่ยวกับการทดสอบสมุนไพรรักษาและป้องกันโรคมะเร็ง ณ Sloan-Kettering Memorial Cancer Center, Cornell University และ Yale University School of Medicine 6-17 สิงหาคม 2547 ด้วยทุนสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (ทบวงมหาวิทยาลัย) ประเทศไทย

### ประวัติการรับราชการที่คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

| ปี พ.ศ. | ชื่อตำแหน่ง            | สถานที่ทำงาน   |
|---------|------------------------|----------------|
| 2516    | อาจารย์ ภาควิชาชีวเคมี |                |
| 2521    | ผู้ช่วยศาสตราจารย์     | ภาควิชาชีวเคมี |
| 2527    | รองศาสตราจารย์         | ภาควิชาชีวเคมี |
| 2540    | ศาสตราจารย์            | ภาควิชาชีวเคมี |

### เกียรติยศ หรือ รางวัลที่ได้รับ

| ปี พ.ศ.          | ได้รับเกียรติยศ/รางวัล                                                        |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 30 มิถุนายน 2526 | รางวัลอาจารย์แพทย์ดีเด่นทางปรีคลินิก<br>ทุนเจ้าพระยาพระเสด็จสุเรนทราธิบดี     |
| 13 มีนาคม 2528   | รางวัลอาจารย์ตัวอย่าง (ปรีคลินิก) ของสภาอาจารย์ศิริราช                        |
| 24 กันยายน 2538  | รับพระราชทานรางวัลงานวิจัยดีเด่น (ปรีคลินิก)<br>ของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล |

- 7 มีนาคม 2546      รางวัลตำราศิริราช-มหิดลประจำปี 2545 เรื่อง  
“ตำราชีวเคมี 1-2 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล”  
พิมพ์ครั้งที่ 5 พ.ศ. 2542 (จำนวน 1058 หน้า)  
โดยเป็นบรรณาธิการ และได้แต่งเอง 2 บท  
(จำนวน 139 หน้า)
- 14 มกราคม 2548      รับรางวัลบุคลากรดีเด่นของ  
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ประจำปี 2547

### ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ และบทความทางวิชาการที่สำคัญ

1. Moongkarndi P, Srisawat C, Saetun P, Jantaravinid J, Peerapittayamongkol C, Soi-ampornkul R, Junnu S, Sinchaikul S, Chen S, Charoensilp P, Thongboonkerd V, Neungton N. Protective effect of mangosteen extract against  $\beta$ -amyloid-induced cytotoxicity, oxidative stress and altered proteome in SK-N-SH cells. JPR 2010; 9: 2076-86. (impact factor 5.684).
2. Chularojanamontri L, Tuchinda C, Srisawat C, Neungton N, Junnu S and Kanyok S. Utility of plasma fluorometric emission scanning for diagnosis of the first 2 cases reports of variegate porphyria: A very rare type of porphyrias in Thai. J Med Assoc Thai 2008; 91: 1915-9.
3. Peerapittayamongkol C, Srisawat C, Junnu S, Kanyok S, Soi-ampornkul R, Poonsawas, Neungton N. Porphyrias Diagnosed by HPLC Analysis : 10 Years of Siriraj Experience. Siriraj Med J 2007; 59: 356-60.
4. Moongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. J Ethnopharmacol 2004;90: 161-6.
5. Moongkarndi P, Kaslungka S, Kosem N, Junnu S, Theptaranon Y, Neungton N. Cytotoxicity and apoptosis of ovarian and breast cancer cell lines induced by OVS1 monoclonal antibody and paclitaxel. Asian Pac of Allergy Immunol 2003;21:31-41.
6. Neungton N, Neungton S, Leelaphatanadit C, Dangrat C, Soiampornkul R. p53 tumor suppressor gene mutation in ovarian cancer in Thai patients. J Med Assoc Thai 2002; 85: 658-67.
7. Permpikul C, Ratanarat R, Neungton N. Blood lactate determined by a portable device in critically ill patients. J Med Assoc Thai 2000; 83: 1348-53.

8. Neungton N, Moongkarndi P, Neungton S et al. Establishment of OVS1 and OVS2 monoclonal antibodies recognizing human ovarian mucinous cystadenocarcinoma. Asian Pacific J Allerg Immunol 1995; 13:47-53. (Awarded best research of the year from Faculty of Medicine Siriraj Hospital)
9. Neungton N, Kachintron U, Chinapak O et al. Significance of ascitic fluid white blood cells, pH, lactate and other chemistry in immediate diagnosis of spontaneous peritonitis. J Med Assoc Thai 1994; 77:265-70.
10. Neungton N, Chearskul S, Neungton S et al. Evaluation of new ovarian cancer markers, STN, CA 546 and CA 72-4 in Thai patients. Siriraj Hosp Gaz 1993; 45:307-14.
11. Neungton N, Monngkarndi P, Laohathai K, Neungton S and Juntrachotiwi P. Immuno-histological characterization of OVS1 and OVS2 monoclonal antibodies recognizing human ovarian mucinous cystadenocarcinoma. Asian Pacific J Allerg Immun 1992; 10: 129-34.
12. Neungton N, Taedwatanasak S, Patimapakorn S. Blood lactate and exercise. J Sport Med Assoc Thai. 1989; 5: 69-75.
13. Neungton N, Kuttiyothaivong S. Blood level of beta-hydroxybutyrate in normal and ketotic patients. Siriraj Hosp Gaz 1984; 36: 1: 7-14.
14. Lau C. Greenway DLA, Freter CE, Neungton N, Wattenberg B, and Silbert DF. Conditions influencing formation of 16:0/16:0 molecular species in membrane phospholipids of Escherichia coli. J Biol Chem 1983; 258: 13027-33.
15. Rinoul DA, Neungton N, and Silbert DF. Isolation and characterization of filipin-resistant LM cell variants not auxotrophic for sterol. J lipid Research 1982; 23: 405-9.

## ที่ปรึกษาคนที่ 2

**NAME;** Hideo Utsumi  
**DATE OF BIRTH;** February 5<sup>th</sup>, 1947. Japan.  
**AFFILIATION;** Innovation Center for Medical Redox Navigation, Kyushu University  
Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan  
Phone; +81-(0)92-642-6620, Fax; +81-(0)92-642-6630  
**E-MAIL;** hideo.ustumi.278@m.kyushu-u.ac.jp

## Education:

1965 March      Graduated from Shimizu-Higashi High School, Shizuoka



1971 June B.S. (Pharmaceu. Sci.), University of Tokyo  
1976 March Ph.D. (Pharmaceu. Sci.), University of Tokyo  
(Thesis: ESR Studies on Bio-membrane Dynamics)

**Brief Chronology of Employment:**

|              |                                                                                                        |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1976-1977    | Lecturer, Establishment Project for Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University              |
| 1977-1982    | Assistant Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University                             |
| 1982-1994    | Associate Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Showa University                              |
| 1994-2000    | Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University                                       |
| 2000-2010    | Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University                               |
| 2003-2007    | Senior Program Officer, Research Center for Science System, Japan Society for the Promotion of Science |
| 2007-present | Director, Innovation Center for Medical Redox Navigation, Kyushu University                            |
| 2008-2010    | Vice-President, Kyushu University                                                                      |
| 2010-present | Executive Director, Pharmaceutical and Medical devices Agency, Japan                                   |

**Honors and Other Special Scientific Recognition:**

The SFRR (Society of Free Radical Research) Japan Prize, 2005  
Prize for Science and Technology from Minister of MEXT (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology), 2006  
Prize for Society of Electron Spin Science and Technology, 2007  
Medal with Purple Ribbon, 2011 from the Japanese Emperor

On November 15th 2011, the Japanese Emperor bestowed the Medal with Purple Ribbon on Professor Hideo Utsumi for contributions to redox biology. Professor Utsumi was awarded Ph.D. in Pharmaceutical Sciences from University of Tokyo in 1976, and started his professional career as Assistant Professor at Teikyo University. He visited Cologne University as fellow during 1978-80. In 1982, he moved to Showa University as Associate Professor. In 1994, he moved to Kyushu University as



Professor. During 2008-2010, he served as vice president of Kyushu University. From 2007 to now he serves as the Director of Innovation Center for Medical Redox Navigation. Beginning 2010 he serves as the Executive Director of the Center for Product Evaluation, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Professor Utsumi was the first to develop in vivo electron spin resonance (ESR; also known as electron paramagnetic resonance or EPR) imaging system in Japan and commercialized it to promote redox research. Over 30 in vivo ESR systems are currently used in Japan today. A compact or high-resolution Overhauser-enhanced MRI (OMRI) system has been developed by his group and will be available next year. His translational research activities have uniquely covered instrumentation, organic synthesis and disease model applications. He synthesized many redox-sensitive compounds, and collaborated with clinicians to understand mechanisms underlying disease systems caused by redox imbalance using his compounds as tools. Thus, Professor Hideo Utsumi contributed a novel technology to investigate in vivo redox status in disease models. This technology platform has immense potential for bedside application to humans.