
ABSTRACT

Project Code : RSA 5780017
Project Title : Study of chemopreventive effect and mechanism of action of Thai rat-tailed radish
Investigator : Associate Professor Natthida Weerapreeyakul, Ph.D.
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University
E-mail Address : natthida@kku.ac.th
Project Period : June 2014 - June 2017 (3 years)

Thai rat-tailed radish (*Raphanus sativus* L. var. *caudatus* Alef) is an indigenous cruciferous plant. Various parts of RS were extracted with two extraction techniques—super critical CO₂ fluid extraction (SFE) and dichloromethane (DCM) extraction. The association of solvent and extraction yield of isothiocyanates (ITCs)—sulforaphane (SF) and sulforaphene (SE)—was determined by the FTIR and HPLC analysis. The chemopreventive effect was investigated in cancer cells by determining the apoptosis inducing effect. Results from HPLC analysis showed that DCM extraction yielded higher SF and SE contents than SFE. The characteristic ITCs band was revealed by FTIR at 2,000–2,200 cm⁻¹. SE was quantified at higher content than SF in most RS parts. The order from high to low SE content was stem, mixed arial part, seed, whole pod, mixed pod and flower, flower, root, seedless pod, and leave, respectively. The DCM crude extracts of pod exerted greater anti-proliferation in human colon HCT-116 cancer cell than stem and the other parts. The pod extract showed higher antiproliferation than the stem extract in most of cancer cell lines studied. Therefore, the DCM crude extract from pod was further fractionated by various polar solvents. However, the fractions possessed lesser antiproliferation than the whole DCM crude extract. Hence only the whole DCM crude extract was investigated for apoptosis inducing effect in the HCT-116 cells. The DCM crude extracts from pod and stem induced apoptosis via both extrinsic and intrinsic pathways as evidenced by (i) nuclei morphological changes, (ii) DNA laddering pattern, (iii) increased %apoptotic cells, (iv) increased caspases 3, 8 and 9 activities, and (iv) increased mitochondria membrane potential. Interestingly, only RS pod extract inhibited MRP-1 activity of the efflux protein found in cancer cells similar to SE and SF. The presence of MRP-1 inhibitory action of the RS pod extract may provide benefit in increasing an uptake of the existed active components in the RS pod extract into the HCT-116 cells. The FTIR microspectroscopy of the HCT-116 cells revealed different changes of cellular biochemical compositions—lipid, protein and nucleic acid—between the extracts from pod, stem, SF and SE. It indicated different extracted phytoconstituents between pod and stem parts and different degree of synergy chemopreventive effect. In conclusion, the pod and stem could be an alternative functional food and good source of chemopreventive compounds. However, further studies *in vivo* pharmacodynamics and pharmacokinetics are still required to warrant its clinical relevant action.

Keywords : Thai rat-tailed radish, chemoprevention, cancer, isothiocyanates, FTIR microspectroscopy

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA 5780017
ชื่อโครงการ : การศึกษาการต้านการก่อมะเร็งและกลไกการออกฤทธิ์ของผักชีหูด
ชื่อนักวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร. นาถธิดา วีระปรียาภรณ์
และสถาบัน : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
E-mail Address : natthida@kku.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : มิถุนายน 2557 - มิถุนายน 2560 (3 ปี)

ผักชีหูด หรือชื่อวิทยาศาสตร์ *Raphanus sativus* L. var. *caudatus* Alef เป็นพืชในตระกูลผักกาดที่นำแต่ละส่วนมาศึกษา โดยสกัดด้วยเทคนิคการสกัด 2 วิธี คือ วิธีการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้สภาวะวิกฤติด้วยยิ่งและการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดตัวทำละลายและสารกลุ่มไอโซไธโอไซยาเนทที่สกัดได้ ได้แก่ ซัลโฟราเฟนและซัลโฟราเฟนด้วยเทคนิค FTIR และ HPLC และศึกษาฤทธิ์ต้านการก่อมะเร็งจากการชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็ง ผลจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนให้ผลผลิตของซัลโฟราเฟนและซัลโฟราเฟนมากกว่าอีกเทคนิค และวิธี FTIR ตรวจพบลักษณะของแถบสารกลุ่มไอโซไธโอไซยาเนทที่ $2,000-2,200\text{ cm}^{-1}$ โดยพบปริมาณสารซัลโฟราเฟนมากกว่าซัลโฟราเฟนแทบจะทุกส่วนของผักชีหูด เรียงลำดับจากปริมาณมากไปน้อย คือ ก้าน ส่วนที่เป็นทั้งใบและก้านเหนือดิน เมล็ด ผัก ส่วนผสมที่มาจากผักและดอก ดอก ราก ผักที่แกะเมล็ดออก และใบ ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากผักมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์ HCT-116 ดีกว่าสารสกัดจากก้านหรือส่วนอื่นๆ จึงนำเฉพาะสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากผักมาแยกต่อด้วยตัวทำละลายขั้วต่างๆ แต่พบว่าสารที่แยกได้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งน้อยกว่าสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากผัก ดังนั้นจึงทำการศึกษาการชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสใน HCT-116 ของสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากผักและก้าน พบว่าสารสกัดหยาบทั้ง 2 ชนิดสามารถชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านทั้งวิถีภายนอกและภายใน ตรวจพบได้จาก (1) การทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณของนิวเคลียส (2) เห็นการแยกดีเอ็นเอ แบบขั้นบันได (3) การเพิ่มเปอร์เซ็นต์การตายแบบอะพอพโทซิส (4) การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์แคสเปส 3, 8, และ 9 และ (5) การเพิ่มความต่างศักย์ของผนังไมโทคอนเดรีย และที่น่าสนใจคือสารสกัดหยาบจากผักยับยั้งกิจกรรมของโปรตีนที่บีบยาออกนอกเซลล์มะเร็ง MRP-1 เหมือนที่พบในซัลโฟราเฟนหรือซัลโฟราเฟน ซึ่งเป็นประโยชน์ในการเพิ่มการนำส่งสารประกอบต่างๆที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบให้เข้าเซลล์มะเร็ง HCT-116 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ FTIR ไมโครสเปกโตรสโกปียังตรวจพบความแตกต่างของระดับสารชีวโมเลกุล (ได้แก่ ไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลีอิก) ที่เป็นส่วนประกอบในเซลล์ HCT-116 เมื่อได้รับสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากผัก ก้าน ซัลโฟราเฟน หรือซัลโฟราเฟน ผลดังกล่าวระบุถึงความแตกต่างของสารที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากผัก และก้าน ตลอดจนความแตกต่างของการออกฤทธิ์เสริมการต้านการก่อมะเร็ง จากการศึกษาที่สรุปได้ว่าผักชีหูดมีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านการก่อมะเร็ง เพราะผักหรือก้านของผักชีหูดสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งของอาหารเพื่อสุขภาพ และเป็นแหล่งของสารที่ต้านการก่อมะเร็ง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมทางเภสัชพลศาสตร์และเภสัชจลนศาสตร์ ใน *in vivo* ก่อนนำไปใช้เพื่อผลทางคลินิกในคนต่อไป

คำหลัก : ผักชีหูด, ฤทธิ์ต้านการก่อมะเร็ง, มะเร็ง, ไอโซไธโอไซยาเนท, FTIR ไมโครสเปกโตรสโกปี