



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกได้จากมะรุมใน
การส่งสัญญาณของเซลล์
ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์

โดย

พีรยศ ภมรศิลปกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

พฤษภาคม พ.ศ. 2561

สัญญาเลขที่ MRG-5680119

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกได้จากมะรุมใน
การส่งสัญญาณของเซลล์
ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์

พีรยศ ภามรศิลป์ธรรม

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Research Report

Isolation and identification molecular cell signaling of lead compounds form
Moltinga Olifera L for anti-cancer activities in human colon cancer cell line

By

Perayot PAMONSINLAPATHAM

With support form

The Thailand Research Fund (Reference no. MRG-5680119)

and Faculty of Pharmacy – Silpakorn University

Close on Year 2019

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG-5680119

(รหัสโครงการ)

Project Title : การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกได้จากมะรุมในการส่งสัญญาณของเซลล์ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์

(ชื่อโครงการ)

Investigator : พริยศ ภูมิศิลปธรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

(ชื่อนักวิจัย)

E-mail Address : Pamonsinlapa_P@su.ac.th

Project Period : 3 ปี

(ระยะเวลาโครงการ)

Moringa oleifera Lamk (พืชวงศ์ Moringaceae) เป็นพืชที่ใช้เป็นสมุนไพรและใช้เป็นอาหารของคนไทย ในการศึกษาครั้งนี้ พืชมะรุมได้ถูกเก็บและแยกส่วนออกเป็น 3 ส่วนสำคัญคือ ใบ ผล และดอก มะรุม ตามลำดับ จากนั้นนำพืชไปสกัดโดยใช้แอลกอฮอล์ด้วยวิธีการสกัดแบบซอกเล็ต (Soxhlet extraction) สารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้นำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงลำไส้ใหญ่ โดยใช้วิธีทดสอบ MTT assay และเมื่อนำสารสกัดหยาบมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธี Gel filtration โดยใช้เจล Sephadex LH-20 พบว่าสามารถแยกสารสกัดหยาบได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 3 กลุ่ม คือ pf1(หรือ MLO1), pf2 (MLO2), และ pf3(MLO3) โดยพบว่า มีสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์ (HCT116 cell line) โดยศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตในระดับเซลล์ โดยมีผลทำให้เซลล์ตาย ภายใต้กระบวนการ Cell cycle และพบการรบกวนสัญญาณโปรตีนภายในเซลล์ pERK MAPK pathway ที่เป็นสัญญาณสำคัญในการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ทำให้มีแนวโน้มที่จะพัฒนาสารสำคัญที่จะช่วยในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ในอนาคต

Keywords : มะรุม, สารสกัด, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็ง, สมุนไพร

(คำหลัก)

คำนำ (Preface)

รายงานการวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกได้จากมะรุมในการส่งสัญญาณของเซลล์ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์ ชื่อภาษาอังกฤษ “Isolation and identification molecular cell signaling of lead compounds from *Molanga Olifera* L for anti-cancer activities in human colon cancer cell line” ได้รับการสนับสนุนจาก (ชื่อเดิม) สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (สกว) ปัจจุบันโอนย้ายอยู่ภายใต้กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (อว.) และจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เพื่อให้ นักวิจัยรุ่นใหม่ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยและได้เริ่มผลงานวิจัยที่จะเป็นรากฐานของการพัฒนาประเทศชาติ

การวิจัยเรื่องนี้ได้แนวคิดเริ่มจากความต้องการในการพัฒนาสมุนไพรไทย เพื่อประโยชน์สำหรับประชาชนไทย ที่จำเป็นต้องมีการบริโภคยาและผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสุขภาพจำนวนมาก การศึกษาสมุนไพรไทยโดยเลือกพืชมะรุมทำการศึกษาในระดับเซลล์ เพื่อค้นคว้าองค์ความรู้ที่สำคัญจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพืชสมุนไพรไทยให้มีโอกาสนำไปสู่การพัฒนาใหม่ พืชมะรุมเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่มีการเผยแพร่และแหล่งข้อมูลอ้างอิงที่พบสรรพคุณหลากหลาย จากการค้นหาจากฐานข้อมูลอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ มีหลักฐานที่น่าเชื่อถือได้ว่ามีสารสำคัญบางชนิดอยู่ในพืช จึงได้มีการนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ ที่เป็นสาเหตุการตาย 1 ใน 3 ของคนไทยในปัจจุบัน และได้นำผลการวิจัยเผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ตามที่ได้แนบมาด้วยในรายงานนี้

-ข-

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ผู้วิจัย ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่อำนวยความสะดวกในสถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์สำคัญ และส่งเสริมสนับสนุนให้อาจารย์รุ่นใหม่ได้ทำวิจัยต่อเนื่อง และขอขอบคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (สกว) ที่มอบทุนอุดหนุนการวิจัย เพื่อนักวิจัยรุ่นใหม่

หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

Moringa oleifera Lamk (พืชวงศ์ Moringaceae) เป็นพืชที่ใช้เป็นสมุนไพรและใช้เป็นอาหารของคนไทย ใน การศึกษานี้ พืชมะรุมได้ถูกเก็บและแยกส่วนออกเป็น 3 ส่วนสำคัญคือ ใบ ฝัก และดอกมะรุม ตามลำดับ จากนั้นนำพืชไปสกัด โดยใช้แอลกอฮอล์ด้วยวิธีการสกัดแบบซอกซ์เลต (Soxhlet extraction) สารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้นำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงลำไส้ใหญ่ โดยใช้วิธีทดสอบ MTT assay และเมื่อนำสารสกัดหยาบมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธี Gel filtration โดยใช้เจล Sephadex LH-20 พบว่าสามารถแยกสารสกัดหยาบได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 3 กลุ่ม คือ pf1(หรือ MLO1), pf2 (MLO2), และ pf3(MLO3) โดยพบว่า มีสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์ (HCT116 cell line) โดยศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตในระดับเซลล์ โดยมีผลทำให้เซลล์ตาย ภายใต้กระบวนการ Cell cycle และพบการรบกวนสัญญาณโปรตีนภายในเซลล์ pERK MAPK pathway ที่เป็นสัญญาณสำคัญในการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ทำให้มีแนวโน้มที่จะพัฒนาสารสำคัญที่จะช่วยในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ในอนาคต

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Moringa oleifera Lamk (Family: Moringaceae) is used plant as a herb and food for Thai people. In this study, Moringa plants are collected and separated into 3 important parts: leaves, Drum, and Moringa flowers, respectively. Then, plants are extracted using Soxhlet apparatus by alcohol extraction. The crude extract has been tested to inhibit the growth of human colorectal cancer cultured cells by using the MTT assay method. The crude extracts were purified by gel filtration using Sephadex LH-20 gel, it was found that the crude extracts can be separated into 3 large groups: pf1 (or MLO1), pf2 (MLO2), and pf3 (MLO3), respectively. It was found that the active purified obtained from column inhibited the growth of human colorectal cancer cells (HCT116 cell line) by studying the inhibition mechanism of growth at the cellular level. The cells died under the cell cycle process and there was a signal interfering with the protein inside the pERK MAPK pathway, which is an important signal in colon cancer cell proliferation. The conclusion of this study was confirmed to develop important substances that will help to stop cancer cells in the future.

สารบัญเรื่อง
(Table of Contents)

หน้า

หัวเรื่อง

บทนำ (Introduction).....	1
ความสำคัญ ปัญหาที่ทำการวิจัย	2
คำสำคัญ (Keywords).....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)	3
วิธีการดำเนินการวิจัย (Material and Method)	4
อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	4
การเก็บพืชและสกัดสารสำคัญ	4
การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง	5
การทดสอบการเจริญของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay	5
การแยกสารสกัดหยาบด้วย Gel filtration chromatography	6
การทดสอบการส่งสัญญาณภายในเซลล์	7
การทดสอบการเจริญของเซลล์ภายใต้ Cell cycle.....	8
การทดสอบโครงสร้างของสารสำคัญด้วย NMR/MS spectroscopy	8
ขอบเขตของการวิจัย	8
ระยะเวลาที่ทำการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง /เก็บข้อมูล/ รายงานผล	9
ผลการวิจัยและวิจารณ์ (Result and Discussion)	10
ก. การสกัดสารจากพืชด้วยวิธี Soxhlet extraction.....	10
ข. การตรวจสอบคุณสมบัติกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในพืช (Phytochemical screening).....	10
ค. การแยกสารสกัดหยาบด้วย Sephadex-LH20	11
ง. ผลการทดสอบฤทธิ์การเจริญของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง	13
(1) ผลการทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดหยาบ.....	13

(2) ผลการทดสอบจากสารสกัดหยาบที่แยกส่วน.....	13
จ. ผลการทดสอบเกี่ยวกับสัญญาณภายในเซลล์	15
ฉ. ผลการพิสูจน์โครงสร้างสารสำคัญด้วย NMR	15
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	18
(Conclusion and Recommendation).....	18
บรรณานุกรม (Bibliography).....	19
ภาคผนวก (Appendix).....	20
ประวัติผู้วิจัย.....	21

-จ-

สารบัญตาราง
(List of Tables)

	หน้า
ตาราง 1 เปรียบเทียบมูลค่ายาแผนปัจจุบันและยาแผนโบราณตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 - 2551 (ล้านบาท).....	2
ตาราง 2 แสดงผลการสกัดสารจากพืชมะรุม และสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธี Soxhlet extraction.....	10
ตาราง 3 แสดงการตรวจสอบสารสกัดหยาบมะรุม จากการทดสอบพิษเคมีในพืช	11

สารบัญภาพ
(List of illustrations)

	หน้า
รูป 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงสาร MTT ไปเป็น Formazan โดยเอนไซม์ mitochondria reductase.....	5
รูป 2 ตารางแสดงคุณสมบัติของเนื้อเจล Sephadex LH-20	6
รูป 3 การทดสอบ SDS-page โดยหลักการทั่วไป ที่ใช้แยกโปรตีนในสารละลายที่นำมาทดสอบ เพื่อนำไปทดสอบในขั้นต่อไป..	7
รูป 4 การดำเนินการทดสอบแบบ Western blot analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับโปรตีนที่ต้องการทดสอบ ..	8
รูป 5 รูปแบบการแยกสารสกัดหยาบใบมะรุม จากการทดลอง 3 ครั้งพบลักษณะการแยกสารได้รูปแบบเดียวกัน	12
รูป 6 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงใน 3 เซลล์ จากสารสกัดหยาบมะรุม ที่ได้จากใบ ดอก และฝัก	13
รูป 7 ผลการทดสอบการยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์ (HCT116) จากสารสกัดที่แยกได้จากใบมะรุม pf1, pf2, pf3, และ pf4 ที่เวลา 24, 48 ชั่วโมง	14
รูป 8 ผลการทดสอบด้วย Flow cytometry และการย้อมสีเซลล์ด้วย immunofluorescence	15
รูป 9 การทดสอบด้วย TLC เพื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ.....	16
รูป 10 เปรียบเทียบตำแหน่งของสารสกัดที่แยกได้ ใน TLC เทียบกับสารมาตรฐานทั้งสามชนิด.....	16

บทนำ (Introduction)

การศึกษาวิจัย เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรพื้นฐาน ให้ได้รับการยอมรับหรือเชื่อถือจากทั้งในประเทศและต่างประเทศนั้น จำเป็นต้องมีข้อมูลหรือการศึกษาที่ยืนยันผล ที่แสดงถึงประสิทธิภาพหรือฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรนั้นๆ โดยเฉพาะการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีที่ยอมรับเป็นมาตรฐานสากลและได้รับการเผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองที่ได้ และสรรพคุณที่ค้นพบในการวิจัยพืช

มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colon cancer) เป็นโรคที่สำคัญและพบได้มากขึ้นในประชากรทั่วโลก โดยพบเฉพาะในประเทศที่พัฒนาแล้ว พบว่ามีอุบัติการณ์สูงในประเทศแถบตะวันตก เช่น สหรัฐอเมริกาและประเทศทางยุโรป โดยในสหรัฐอเมริกา ประชากรมีโอกาสที่จะเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ตลอดชีวิตประมาณร้อยละ 6 หรือพบได้ 1 คนต่อ 20 คนของประชากร ได้มีการประมาณการว่าจะพบผู้ป่วยรายใหม่เกิดขึ้นเฉลี่ย 138,000 รายต่อปี และจะมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากมะเร็งลำไส้ใหญ่ประมาณ 60,000 คนต่อปี สำหรับประเทศไทย มะเร็งลำไส้ใหญ่ มีอุบัติการณ์ต่ำกว่าในประเทศที่พัฒนาแล้วจากสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (National cancer institute, THAILAND) พบว่าในปี พ.ศ. 2553 ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ มีอุบัติการณ์สูงเพิ่มขึ้นเป็นอันดับ 2 ในเพศชาย รองจากมะเร็งปอด และหลอดลม ส่วนในเพศหญิงพบมากเป็นอันดับ 3 รองจากมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งเต้านม (รูป 1) โดยอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่จะสูงขึ้นในผู้สูงอายุ เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่มักจะถูกวินิจฉัยในช่วงอายุระหว่าง 50-70 ปี ร่วมกับปัจจัยเสริมเช่น ผู้ที่มีประวัติมีติ่งเนื้อออกในลำไส้ใหญ่ และผู้ที่มีประวัติโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ในครอบครัว

การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ สามารถทำได้โดยการผ่าตัดเอาลำไส้ส่วนที่เป็นมะเร็งออก ในผู้ป่วยส่วนใหญ่ลำไส้จะถูกต่อเข้าหากันใหม่ และผู้ป่วยจะสามารถถ่ายอุจจาระทางทวารหนักได้ตามปกติ โดยปกติการผ่าตัดมะเร็งลำไส้ใหญ่จะทำโดยการผ่าตัดทางหน้าท้อง แต่ในปัจจุบันศัลยแพทย์สามารถทำการผ่าตัดโดยใช้กล้องส่องเข้าไปในร่างกายผู้ป่วยที่มีเนื้องอก โดยกล้องส่องจะมีขนาดเล็ก ซึ่งจะทำให้แผลผ่าตัดมีขนาดเล็กลง และผู้ป่วยจะมีอาการปวดแผลหลังผ่าตัดลดลง หากตรวจพบว่ามะเร็งกระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองแล้ว ผู้ป่วยควรได้รับการรักษาเพิ่มเติมโดยการให้ยาเคมีบำบัดและถ้าเนื้องอกอยู่ในตำแหน่งลำไส้ตรงส่วนปลายหรือทวารหนัก ผู้ป่วยอาจจะต้องได้รับการฉายรังสีเพิ่มเติม ในส่วนของการป้องกันโรคลำไส้ใหญ่ทำได้โดย การรับประทานอาหารที่มีกากใยสูง เช่น ผักและผลไม้ ออกกำลังกายให้สม่ำเสมอ ควบคุมน้ำหนักและดื่มสุรา หลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารประเภทเนื้อแดง หรืออาหารประเภทปิ้งย่าง จะช่วยลดการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ลงได้

อย่างไรก็ตามความพยายามการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้กับการรักษาปัจจุบัน ยังมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง เช่น การรักษาแบบพุ่งเป้า (Target therapy) โดยการใช้แอนติบอดี เช่น monoclonal antibody ที่จำเพาะเจาะจงกับตัวรับบนเซลล์ผิวมะเร็ง หรือการใช้โมเลกุลขนาดเล็ก (small molecule) ในการออกฤทธิ์ที่เป้าหมาย เช่น เอนไซม์ไคเนส (kinase inhibitor) นอกจากนี้การรักษาตามแนวทางวิถีตะวันออกหรือแนวทางการแพทย์ทางเลือก ที่ได้มีการศึกษาและปฏิบัติมาตั้งแต่สมัยโบราณหลายร้อยปี ต้องการความรู้ทางวิทยาศาสตร์เพื่อพิสูจน์หรือยืนยันว่าเป็นวิธิต่างที่ได้ผลและมีประสิทธิภาพดี โดยจำเป็นต้องมีข้อมูลที่นำเชื่อถือและพิสูจน์ซ้ำได้นำมาพิจารณาหรือใช้ในการรักษา ดังที่ได้มีการศึกษาที่ได้จากธรรมชาติและพัฒนาจนเป็นยาที่สามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้ อาทิเช่น Taxol ได้จากเปลือกต้น *Taxus brevifolia* วงศ์ *Taxaceae* เป็นสารประเภท diterpene มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมทั้ง B6-melanoma, L1210 Leukemia และ human tumor xenografts ให้ผลดีกับมะเร็งรังไข่ และมะเร็งเต้านม

ความสำคัญ ปัญหาที่ทำการวิจัย

การพัฒนาทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทย ยังต้องการความรู้และเทคโนโลยีส่วนใหญ่จากต่างประเทศ เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการจัดหาวัสดุ ครุภัณฑ์ทางการแพทย์ รวมทั้งยาแผนปัจจุบันที่คิดเป็นจำนวนเงินที่สูงมาก (ตาราง 1) จากปัญหาดังกล่าวประกอบกับปัญหาเศรษฐกิจในปี พ.ศ. 2541 ทำให้ประชาชนและรัฐบาลเห็นถึงความสำคัญต่อความรู้ และเทคโนโลยีในการดูแลสุขภาพตนเองโดยการใช้พืชสมุนไพรพื้นบ้าน หรือพืชสมุนไพรที่มีอยู่ในท้องถิ่น ซึ่งเป็นยาจากธรรมชาติมาใช้รักษาโรคและอาการเจ็บป่วยและนำไปสู่มาตรการการประหยัด ช่วยลดค่าใช้จ่ายที่ไม่จำเป็นจากการเจ็บป่วยลงได้ และเป็นการส่งเสริมให้ประชาชนหันกลับมาใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคและอาการเจ็บป่วยเบื้องต้นได้

ตาราง 1 เปรียบเทียบมูลค่ายาแผนปัจจุบันและยาแผนโบราณตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 - 2551 (ล้านบาท)

	ยาแผนปัจจุบัน (ล้านบาท)			ยาแผนโบราณ (ล้านบาท)			ร้อยละของยาแผนโบราณ
	ผลิตในประเทศ	นำเข้า	รวม	ผลิตในประเทศ	นำเข้า	รวม	
2530	5,454.9	2,803.5	8,258.4	208.5	45.5	253.9	3.1
2531	6,890.1	3,163.6	10,053.7	243.5	74.6	318.1	3.2
2532	8,596.8	3,932.4	12,529.3	270.1	57.1	327.1	2.6
2533	9,176.5	4,319.3	13,495.8	294.6	80.1	374.7	2.8
2534	9,983.2	5,250.3	15,233.5	225.7	84.2	309.9	2.0
2535	11,081.6	5,796.8	16,878.3	264.8	90.2	355.1	2.1
2536	12,106.7	6,220.7	18,327.4	286.0	111.1	397.1	2.2
2537	13,254.0	7,298.3	20,552.3	416.4	101.4	517.7	2.5
2538	16,282.6	10,763.7	27,046.3	304.5	137.6	442.1	1.6
2539	18,647.0	12,063.6	30,710.6	319.3	139.6	458.9	1.5
2540	20,069.3	15,491.2	35,560.5	252.2	177.4	429.6	1.2
2541	17,078.3	11,839.6	28,917.9	485.7	100.3	586.0	2.0
2542	19,720.7	16,719.2	36,439.9	550.3	114.0	664.4	1.8
2543	21,678.4	19,217.6	40,896.0	676.7	124.6	801.3	2.0
2544	23,917.5	22,689.7	46,607.2	738.5	146.6	885.1	1.9
2545	24,686.8	22,769.8	47,456.6	870.4	167.5	1,037.9	2.2
2546	27,563.3	29,588.1	57,151.5	1,205.1	202.7	1,407.8	2.5
2547	32,639.5	33,647.1	66,286.6	1,392.0	199.4	1,591.4	2.4
2548	31,130.6	41,630.9	72,761.5	1,487.6	394.1	1,881.7	2.6
2549	32,745.1	48,589.0	81,334.2	2,200.7	244.3	2,445.1	3.0
2550	42,706.3	56,237.2	98,943.6	2,188.1	270.5	2,458.6	2.5
2551	36,840.5	67,318.1	104,158.6	2,547.3	330.6	2,877.9	2.8

ที่มา: กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

สมุนไพรไทยมีคุณค่ามากมาย ได้ผ่านการส่งเสริมการผลิตและการใช้สมุนไพร โดยกระทรวงสาธารณสุขอย่างต่อเนื่อง สมุนไพรหลายชนิดได้ผ่านการศึกษาวิจัยในระดับห้องทดลอง เพื่อศึกษาความปลอดภัยและคุณประโยชน์ของยา และขยายมาเป็นการพัฒนาอย่างครบวงจร ซึ่งมีสมุนไพรไทยหลายชนิดที่ได้รับการพิสูจน์ว่าประโยชน์ทางยา สามารถพัฒนาและนำมาใช้ประโยชน์ในชั้นอุตสาหกรรม เช่น ฟาหลายโจร ขมิ้นชัน เป็นต้น [1] นอกจากนี้ยังมีสมุนไพรไทยอีกหลายชนิดมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาได้ ถ้ามีการศึกษาวิจัยและได้รับการสนับสนุนอย่างต่อเนื่อง ยังมีการใช้มากขึ้นเพียงใด จะลดการนำเข้าจากต่างประเทศ และสมุนไพรสามารถปลูกได้ในท้องถิ่นการสนับสนุนให้เกิดการใช้สมุนไพรยังเป็นประโยชน์ต่อการดำเนินการทางสาธารณสุขที่มีประชาชนเป็นส่วนร่วมและสร้างรายได้ให้กับชุมชน

มะรุมหรือ *Moringa oleifera* Lamk (พืชในวงศ์ Moringaceae) เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาได้ เนื่องจากมะรุมเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณในหลายด้าน ตามข้อมูลทางยาโบราณ กล่าวว่า ราก จะมีรสเผ็ด หวาน ขม แก่

อาการบวม บำรุงไฟฟ้าดู เปลือก จะมีสร้อย ช่วยขับลม ใบ ช่วยแก้เลือดออกตามไรฟัน แก้อักเสบ ดอก ช่วยบำรุงร่างกาย ขับ ปัสสาวะ ขับน้ำตา ฝัก รสหวาน แก้ไข้หรือลดไข้ เป็นต้น [2, 3] และในปัจจุบันมีการบริโภคกันอย่างแพร่หลาย จึงเป็นสิ่งที่ทาง กลุ่มผู้วิจัย สนใจจะศึกษาถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และมุ่งหวังว่าสมุนไพรนี้จะสามารถพัฒนาต่อไปได้ในทางยาได้ มะรุมหรือ *Moringa oleifera* Lamk มีรายงานการศึกษาจากต่างประเทศ โดยเฉพาะในประเทศอินเดียถึงฤทธิ์ของสารสกัด จากใบมะรุมเพื่อใช้ในการฆ่าเชื้อโรคแบคทีเรีย [4, 5] สารสกัดจากส่วนของใบมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หลายชนิด [6] สารสกัดมะรุมยังมีฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็งรังไข่ [7] มีฤทธิ์ลดระดับไขมันในสัตว์ทดลอง [8] และยังมีฤทธิ์ทางยาอื่นๆ [9, 10, 11] นอกจากนี้มะรุมเป็นพืชที่มีความปลอดภัยสูงโดยคนไทยใช้ผลมะรุมรับประทานเป็นอาหารได้

งานวิจัยนี้จึงมุ่งหวังเพื่อทดสอบสารสกัดและพัฒนาสารสกัดที่ได้จากพืชมะรุม เพื่อส่งเสริมให้เกิดการค้นคว้าและการ วิจัยให้มีศักยภาพที่จะนำมาค้นหาสารสำคัญที่จะสามารถนำมาใช้เป็นยาต้านมะเร็ง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษา และค้นคว้าวิจัย ไปสู่การหาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยจะสามารถลดต้นทุนการใช้จ่ายที่นำเข้าจากต่างประเทศได้ อีกทั้งช่วย ส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรไทยเพื่อผลิตและบริโภคภายในประเทศ

คำสำคัญ (Keywords)

มะรุม, สารสกัด, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็ง, สมุนไพร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์การเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (HT29 and HCT116) จากสารสกัด มะรุมที่ได้จากส่วนต่างๆ ของพืช
2. เพื่อการศึกษาถึงวิถีทางโมเลกุลในระดับเซลล์ (molecular signaling pathway) ของสารสกัดมะรุมที่มีผลต่อ เซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์
3. เพื่อศึกษาสารสำคัญที่พบว่ามีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และแนวโน้มที่พัฒนาไปเป็นโมเลกุล หรือสารใหม่ (novel or lead compound)

วิธีการดำเนินการวิจัย (Material and Method)

โครงการวิจัยนี้ เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) โดยทำการวิเคราะห์ผลฤทธิ์ของสารสกัดมะรุมที่แยกได้ ต่อการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งมนุษย์ ภายใต้สภาวะห้องทดลองจากวิธีการทดสอบ MTT assay และตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์ในระดับเซลล์ แบ่งได้เป็น 2 ช่วงระยะสำคัญ คือ การทดสอบการรบกวนสัญญาณการเจริญในวงจรชีวิตของเซลล์มะเร็ง และการรบกวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์มะเร็ง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องมืออบแห้งด้วยลมร้อน Hot air oven (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร)
- เครื่องมือการสกัดสาร Soxhlet extractor (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร)
- เครื่องมือที่ใช้ในการระเหยสารตัวอย่าง จากเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator)
- ห้องเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง และ Laminar Air flow (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร)
- ตู้อบ 5% CO₂ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง UV-spectrophotometer
- ตู้แช่แข็ง สำหรับเตรียมอุปกรณ์และวัสดุสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง Micro plate Reader สำหรับ 96-wells plate
- ห้องเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง Cell culture with camera
- ชุดทดสอบ Electrophoresis/Protein Transfer (Semi-dry) Set
- เครื่องอ่านเจล Gel document (UV) machine
- ตู้แช่แข็ง -20°C, -80°C
- ถังเก็บเซลล์เพาะเลี้ยงแบบเติมไนโตรเจนเหลว
- อุปกรณ์ที่ต้องจัดหาเพิ่มเติม
 - ชุดทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์ MTT-assay anti-proliferation assay
 - แอนติบอดีต่อโปรตีนภายในเซลล์ p38, Akt, MAP kinase
 - สารเคมีอื่นๆ เช่น Cell lysis solution, Dye, PBS, D-MEM, FBS, antibiotic, Trypsin etc.
- อุปกรณ์สำหรับการทดสอบ Western blot analysis

การเก็บพืชและสกัดสารสำคัญ

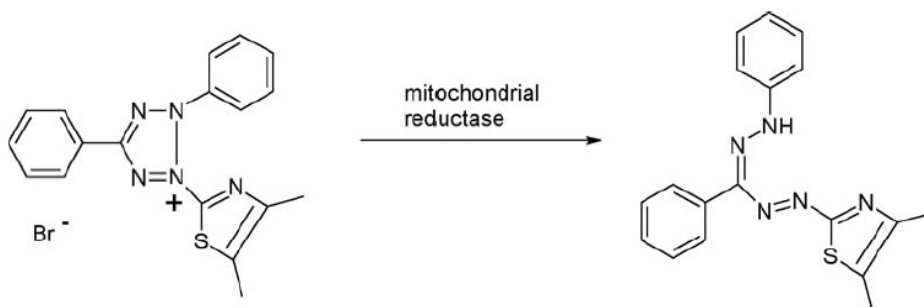
จากการเก็บส่วนต่างๆ ของพืชในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม มาคัดแยกเป็นส่วน และทำการล้างด้วยน้ำสะอาด สับให้มีขนาดเล็กลง เพื่อนำไปอบแห้งและบดเก็บในรูปผงแห้ง เก็บในที่แห้ง อุณหภูมิห้อง ป้องกันความชื้น เพื่อรอสำหรับการเตรียมการสกัดสารสำคัญ หลังจากนั้นทำการสกัดสารสำคัญโดยเลือกวิธีการสกัดแบบ Soxhlet extraction โดยใช้เมธานอลในการสกัด ใช้อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นรวบรวมสารสกัดและนำไประเหยเมธานอลออกจนหมด และเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อการเก็บรักษา โดยทำการศึกษาคุณลักษณะของสารสำคัญหลังการสกัด โดยการทำการตรวจสอบกลุ่มของสารสำคัญด้วยคุณสมบัติกลุ่มสารทางพิษเคมีในพืช

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง

เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่ใช้ทดสอบ มี 3 ชนิดคือ 1) HCT116 and 2) HT29 คือ เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์ (Human colorectal carcinoma cells และ Human colon adenocarcinoma) 3) HeLa cells คือ เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกมนุษย์ (cervix adenocarcinoma) ได้รับจาก American Type Culture Collection, ATCC, (Manassas, VA) เซลล์เพาะเลี้ยงทั้งหมดเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM medium (Gibco BRL Life Technologies)) ที่เติมสาร 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) และ 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml, streptomycin (Sigma) เซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าว เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C อากาศเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (5% CO₂/air)

การทดสอบการเจริญของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay

การทดสอบ MTT assay มีหลักการโดยสาร MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ซึ่งเรียกว่า tetrazole เป็นสีย้อมสีเหลืองที่ละลายน้ำได้ และจะถูกเปลี่ยนเป็นตะกอนสีฟ้าของ formazan โดยเอนไซม์ mitochondria reductase จากเซลล์ที่ยังมีชีวิต (XX) จากนั้นสาร formazan จะถูกละลายใน DMSO ที่เติมลงไปเพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 500-600nm โดยการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจะวัดจำนวนเซลล์ที่รอดหรือมีชีวิตอยู่หลังสัมผัสกับสารทดสอบ (สารสกัดของพืชสมุนไพร) ด้วยการดูการลดลงของสาร MTT ที่เปลี่ยนเป็น formazan เปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ



รูป 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงสาร MTT ไปเป็น Formazan โดยเอนไซม์ mitochondria reductase

การทดสอบด้วยวิธี MTT assay เริ่มจากการทดสอบฤทธิ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์ ประมาณ 3,000 cells/well ในอาหารเลี้ยงเชื้อ D-MEM medium ที่เติม FBS 10% และ Antibiotic ในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96-well tissue culture plate บ่มเพาะเซลล์จนเซลล์ติดที่หลุมเลี้ยงเซลล์ อย่างน้อย 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบแต่ละส่วนมาละลายใน DMSO ด้วยความเข้มข้นของ DMSO ที่ต่ำที่สุด จากนั้นนำไปเจือจางด้วย sterile water ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ เติมสารสกัดหยาบของสมุนไพร ตามความเข้มข้นต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงที่ 37°C ภายใต้ 5% CO₂ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ สารละลาย MTT solution (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ D-MEM medium ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml บ่มเพาะเซลล์ต่อเนื่องอีก 4 ชั่วโมงภายใต้สภาวะเดิม ล้างเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย Sterile PBS และละลายเซลล์ด้วย DMSO และนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Bio-Rad Coda microplate analyzer at

a wavelength of 450 nm (reference wavelength: 600 nm) แล้วนำเซลล์มาตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์ โดยเปรียบเทียบสารสกัดหยาบในความเข้มข้นต่าง ๆ โดยมีกลุ่มควบคุมเป็นสาร DMSO ที่ความเข้มข้นเดียวกับที่มีในสารสกัดหยาบ และใช้สาร Cisplatin เป็นสารที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยง

การคำนวณ

% inhibition by calculate = $[1 - (\text{OD treated cell} / \text{OD non-treated cell})] \times 100$

การแยกสารสกัดหยาบด้วย Gel filtration chromatography

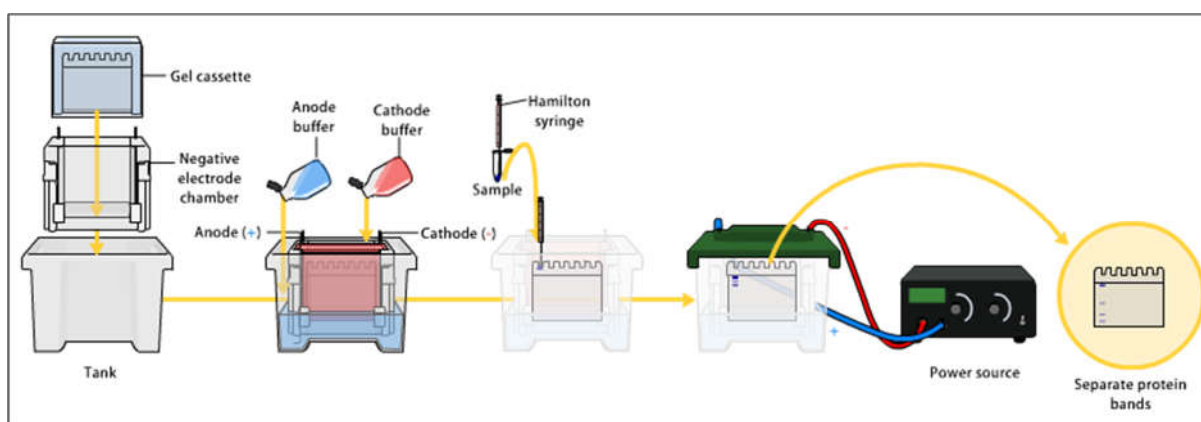
หลังจากได้สารสกัดหยาบมะรุม ที่ได้จากการสกัดแล้วนั้น สารสกัดหยาบได้นำมาแยกด้วยวิธีเจลฟิวเทชั่น (Gel filtration chromatography) โดยเลือกใช้เนื้อเจลชนิด Sephadex LH-20 ซึ่งเตรียมมาจาก hydroxypropylation of Sephadex G-25 เป็นเม็ดปิดที่เกิดจากโครงสร้างของสารเด็กแทรน (a bead-formed dextran medium) เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และใช้สารละลายเมทานอล (Methanol) ละลายในน้ำบริสุทธิ์ (Methanol in purified water) ในอัตราส่วนต่างๆ กัน ตั้งแต่ 0-100% เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยทำการเตรียมเจลและเตรียมคอลัมน์การแยกตามที่แนะนำในเอกสารจากบริษัท มีค่า Exclusion limit ประมาณ 4,000-5,000 โดยขึ้นกับสารละลายที่ใช้ในเฟสเคลื่อนที่

Exclusion limit (M _r)	4000–5000 (depends on solvent)
Sample loading:	
adsorption mode	depends on resolution required
molecular sizing	< 2% total bed volume
partition mode	< 1% total bed volume
Matrix	Hydroxypropylated, cross-linked dextran
Particle form	Spherical, porous
Particle size range (dry)	18–111 µm
Average diameter (dry)	70 µm
Particle size range (methanol)	27–163 µm
Average diameter (methanol)	103 µm
Max. linear flow rate	720 cm/hour
Rec. linear flow rate	60 cm/hour
pH stability	
working	2–13
cleaning	2–13
Chemical stability	Stable in most aqueous and organic eluent systems. Not stable below pH 2 nor to strong oxidising agents.
Autoclavable	20 min at +121 °C
Operating temperature	+4 to +40 °C
Shelf-life	5 years

รูป 2 ตารางแสดงคุณสมบัติของเนื้อเจล Sephadex LH-20

การทดสอบการส่งสัญญาณภายในเซลล์

การทดสอบการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Cell signaling) สามารถทำได้โดยทำการทดสอบการลดลงของโปรตีนภายในเซลล์ โดยใช้เทคนิค Western blot analysis โดยมีหลักการตามรูป เบื้องต้นทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงลำไส้ใหญ่ (HCT116) ในจานหลุมขนาด 6-well plate ในปริมาณเซลล์ 1×10^6 cells/well บ่มเพาะเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการทดสอบโดยใช้สารสกัดที่แยกได้จากคอลัมน์ (pf1, pf2, pf3) บ่มเพาะเซลล์ต่อเนื่องที่เวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วย Sterile PBS และทำการ Lysis cells ด้วยสารละลายมาตรฐาน lysis buffer (with 1 mM Na_3VO_4 and 1 mM NaF inhibitor) อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายที่ได้จากการ Lysis cell ที่อุณหภูมิ 4°C นำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000rpm อุณหภูมิ 4°C เก็บสารละลายส่วนใสที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปทดสอบปริมาณโปรตีนและการทดสอบต่อไป



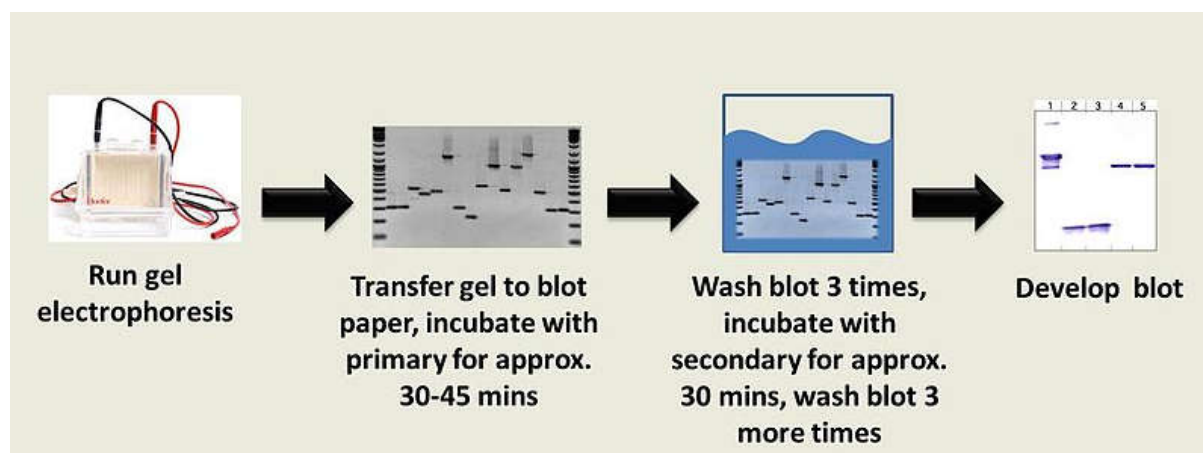
รูป 3 การทดสอบ SDS-page โดยหลักการทั่วไป ที่ใช้แยกโปรตีนในสารละลายที่นำมาทดสอบ เพื่อนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

นำสารละลายส่วนใสหลังจากการทดสอบกับสารต่างๆ มาทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วยการเปรียบเทียบกับโปรตีนจาก Bovine Serum Albumin (BSA) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ BSA ที่ความเข้มข้น 1-10 microgram/ml และเตรียมสารละลายที่ต้องการทดสอบปริมาณโปรตีนในหลายความเข้มข้น จากนั้นผสมสารละลายด้วย Bradford reagent (BioRad Protein Assay Solution) สารละลายที่ไม่มีโปรตีนอยู่จะให้สีน้ำตาลแดงในสภาวะกรด เมื่อมีสารละลายที่มีโปรตีนอยู่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงให้สารสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวัดได้ด้วยความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (595nm) โดยในขั้นตอนต่อไปนำไปทดสอบด้วยวิธี Western blot

การทดสอบ Western blot นำโปรตีนที่หาความเข้มข้นมาทำการโหลดลงในหลุมเจล ปริมาณในช่วง 5-25 ไมโครกรัมต่อหลุมโดยผสมกับสารละลาย loading buffer โดยนำไปต้มที่น้ำเดือด 100°C เป็นเวลานาน 5 นาทีก่อนโหลดลงในหลุมเจลในเจลอะคริลามิด (Acrylamine) 8 – 12 % SDS-PAGE ใช้กระแสไฟฟ้า 110 โวลต์เป็นเวลาประมาณ 90 นาที จากนั้นนำเจลไปถ่ายลงสู่ PVDF membrane โดยสารละลาย Transfer buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°C

โปรตีนที่ติดอยู่ที่ PVDF membrane จะถูกบล็อกด้วยสารละลาย 5 % BSA ใน TBS-T buffer เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมงเพื่อป้องกันการจับกันของโปรตีนที่ไม่จำเพาะเจาะจง สำหรับการตรวจสอบปริมาณโปรตีนในเซลล์ ที่สำคัญสำหรับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ใช้แอนติบอดี pERK1/2 polyclonal antibody #9101 หรือ Akt antibody #9272 หรือ p38 MAPK antibody #9212 (Cell Signaling Technology) เจือจางในสารละลาย 5 % BSA ใน TBS-T buffer ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อแอนติบอดีตัวแรก โดยใช้ horseradish peroxidase-conjugated

secondary antibodies สัญญาณการจับของแอนติบอดี เพิ่มโดยใช้สารละลาย chemiluminescence (ECL) เป็นเวลา 1-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายด้วยฟิล์มและวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ (open source software)



รูป 4 การดำเนินการทดสอบแบบ Western blot analysis โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับโปรตีนที่ต้องการทดสอบ

การทดสอบการเจริญของเซลล์ภายใต้ Cell cycle

การทดสอบการเจริญของเซลล์ ภายใต้วงจรชีวิตของเซลล์ ใช้วิธีการ ตัดเซลล์ที่จำเพาะกับแอนติบอดี ตัวแรกคือ anti-caspase-3 antibody และใช้แอนติบอดีตัวที่สอง คือ Alexa-Fluor 647-conjugated with anti-rabbit IgG antibody และใช้ Propidium iodide (PI) สำหรับการติดสีของดีเอ็นเอ แล้วนำไปทดสอบในเครื่อง Flow cytometry โดยรุ่น Guava easyCyte Flow Cytometer (Merk Millipore) โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 488nm และ ที่ 640nm ข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Flowing Software version 2.5.1

การทดสอบโครงสร้างของสารสำคัญด้วย NMR/MS spectroscopy

Mass Spectrophotometer ได้ความร่วมมือจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยชิบะ ประเทศญี่ปุ่น (JEOL AccuTOF-T100LP spectrometer (Japan) และเครื่อง 1H NMR Spectrophotometer รุ่น ECA 600 spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) ตัวคอลัมน์ที่ใช้เป็นชนิด silica gel PSQ 100B or ODS Chromatorex (Fuji Syllisia, Kasugai, Japan) or SephadexLH-20 (GE Healthcare Waukesha, WI, USA)

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยได้ศึกษาการสกัดสารจากพืชสมุนไพร โดยใช้ส่วนต่างๆ เช่น ใบ ดอก และ ผล เพื่อนำสารสกัดไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งเฉพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ โดยจะทำการสกัดสารสำคัญจากส่วนของพืช ด้วยสารละลายเมทานอล (Methanol) และทำการระเหยเอาสารละลายเมทานอลออกจนหมดให้ได้สารละลายเข้มข้น (Crude extracts) ศึกษาคุณลักษณะของสารสกัด โดยวิธีการทดสอบทางพิษเคมี หลังจากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการ

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง /เก็บข้อมูล/ รายงานผล

โครงการวิจัย ดำเนินการภายใน 2 ปี- 4 ปี

1. ขั้นตอนการจัดหาพืชมะรุม และเตรียมการสกัด/ เตรียมสารสกัดจากมะรุม (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร)
2. ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์ และการทดสอบการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่านโปรตีนต่างๆ (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จ.นครปฐม)
3. ขั้นตอนการทดสอบการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ใน Cell cycle ทำที่ประเทศญี่ปุ่น (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยชิบะ)
4. ขั้นตอนการพิสูจน์โครงสร้างของสารสำคัญ ด้วยเทคนิค NMR ทำที่ประเทศญี่ปุ่น (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยชิบะ)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ (Result and Discussion)

ก. การสกัดสารจากพืชมะรุมด้วยวิธี Soxhlet extraction

การสกัดสารจากส่วนสำคัญของพืชมะรุม ที่ระบุไว้ 3 ส่วนคือ ใบ ผล และดอกมะรุม ได้น้ำหนักของสารสกัดหยาบ แสดงผลตามตาราง โดยพบว่าได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ของพืชมะรุม สามารถสกัดได้จากใบ ผล และดอก ร้อยละ 10.46, 22.65, และ 22.69 ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบที่ได้มีลักษณะเหนียวและดำ โดยเฉพาะที่สารสกัดหยาบที่ได้จากผลมะรุม จะค่อนข้างเหนียวกว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนอื่นๆ

ตาราง 2 แสดงผลการสกัดสารจากพืชมะรุม และสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธี Soxhlet extraction

ส่วนของพืช มะรุม	น้ำหนักหลังบด ละเอียด	น้ำหนักสาร สกัด+ถ้วยระเหย (a)	น้ำหนักถ้วย ระเหย (b)	น้ำหนักสารสกัด หยาบที่ได้ c = (a)-(b)	% สารสกัดเทียบกับ พืชมะรุม 300gm (sum(c)/300)*100
ใบ	50gm x 6 ถุง = 300 gm	71.4888	54.7828	16.7060	10.46%
		73.3353	58.3198	15.0155	
		67.3456	50.9757	16.3699	
ผล	50gm x 6 ถุง = 300 gm	118.402	90.1363	28.2665	22.65%
		78.1811	57.5967	20.5844	
		73.9618	54.8589	19.1029	
ดอก	50gm x 6 ถุง = 300 gm	112.2790	89.5692	22.7098	22.69%
		103.7816	83.3014	20.4802	
		105.7536	80.8569	24.8967	

ข. การตรวจสอบคุณสมบัติกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในพืช (Phytochemical screening)

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากส่วนของมะรุม 3 ส่วน มาทดสอบหาคุณสมบัติกลุ่มสารทางพฤกษเคมี เบื้องต้น ดังการทดสอบต่างๆ ต่อไปนี้

1. สารประกอบกลุ่ม flavonoids ตรวจสอบด้วย Cyanidin's test, ferric chloride test และ Molisch's test
2. สารประกอบกลุ่ม coumarins ตรวจสอบการเรืองแสงในรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 365 นาโนเมตร
3. สารประกอบกลุ่ม tannins ตรวจสอบด้วย gelatin solution, lead acetate solution, ferric chloride test, lime water และ vanilin's reagent
4. สารประกอบกลุ่ม anthraquinones ตรวจสอบด้วย modified
5. สารประกอบกลุ่ม terpenoids ตรวจสอบด้วย Liebermann-Burchard test, Kedde's reagents, modified Killiani test และ foam test
6. สารประกอบกลุ่ม alkaloids ตรวจสอบด้วย Dragendorff's reagent

ตาราง 3 แสดงการตรวจสอบสารสกัดหยาบมะรุ่ จากการทดสอบพิษเคมีในพืช

สารสกัดที่ได้จาก	กลุ่มของสารที่ตรวจสอบ					
	Flavonoids	Coumarins	Tannins	Anthraquinones	Terpenoids	Alkaloids
ใบ	+/-	+	+	-	-	+/-
ฝัก	+/-	+	+/-	-	-	+/-
ดอก	+	+	+	-	-	+/-

หมายเหตุ + หมายถึง พบสารในกลุ่มดังกล่าว - หมายถึง ไม่พบสารในกลุ่มดังกล่าว

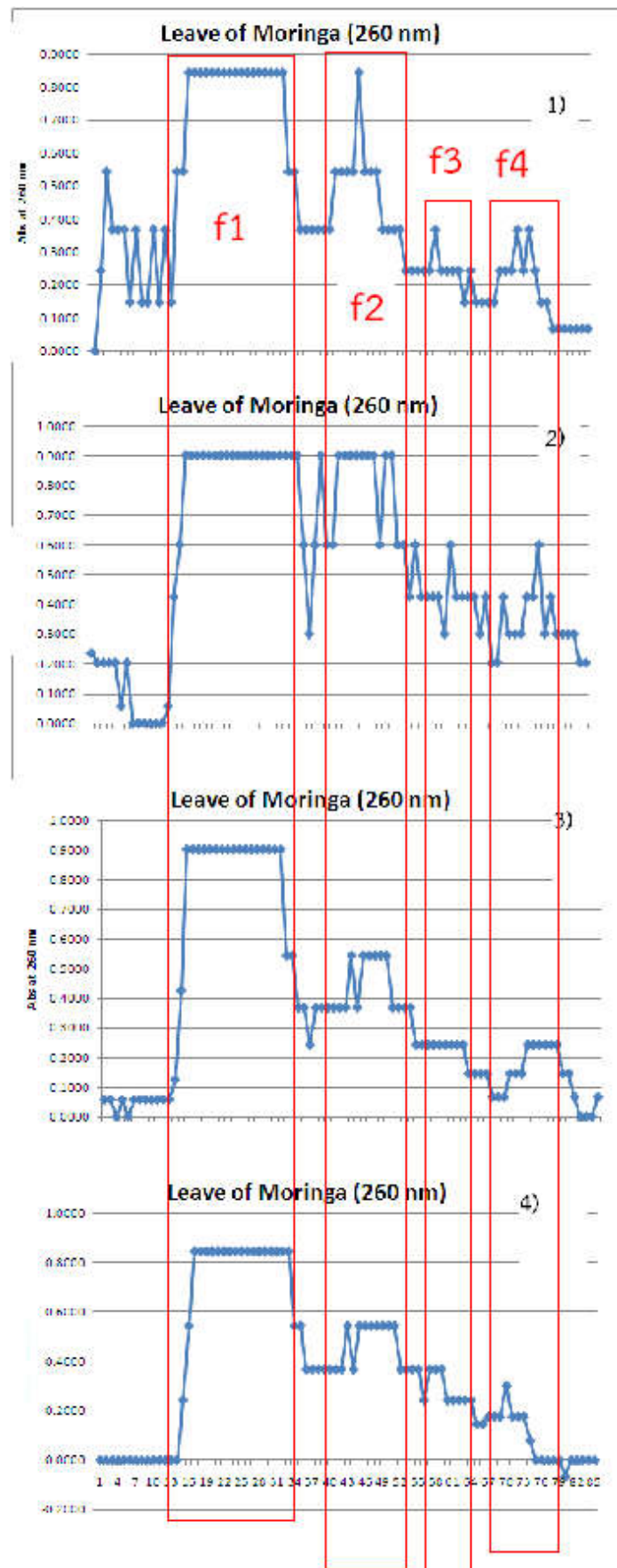
+/- พบหรือไม่พบ สารในกลุ่มดังกล่าวเนื่องจากให้ผลการทดสอบบวกและลบ

ค. การแยกสารสกัดหยาบด้วย Sephadex-LH20

ภายหลังจากได้สารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของพืชมะรุ่ 3 ส่วน นำมาทำการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Gel filtration chromatography) โดยเลือกใช้ Sephadex-LH20 ในการแยกสารที่มีขนาดเล็กที่เป็นสารสำคัญ เนื่องจากไม่ต้องการใช้สารเคมีในการเปลี่ยนแปลงสภาพสารสำคัญที่สกัดได้จากส่วนของพืชที่ออกฤทธิ์ หลังจากการทดสอบในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงแล้ว และเป็นการยืนยันผลการค้นหาสารสำคัญโดยไม่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารที่พบเป็นสำคัญ ผลการทดลองที่ได้หลังจากแยกสารสำคัญจากส่วนของพืชมะรุ่ ส่วนของใบพบว่ามีการแยกส่วนได้ดีกว่าส่วนอื่นๆ ของพืชมะรุ่ ดังแสดงผลในภาพ ส่วนสารสกัดที่ได้จากฝัก มีการแยกสารที่ไม่ดีและทำการแยกส่วนได้ยาก ส่วนการสกัดจากดอกมีปริมาณไม่เพียงพอเนื่องจาก ปริมาณที่จัดเก็บมามีไม่เพียงพอต่อการทำการแยกสารปริมาณมาก จึงไม่นำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

การแยกสารสามารถทำได้ดีในสารสกัดหยาบที่ได้จากส่วนของใบมะรุ่ โดยสามารถแยกได้เป็นส่วนสำคัญที่ยังออกฤทธิ์ได้ คือ ส่วน pf2, pf3 โดยการใช้สารละลายเมทานอล (MeOH Solution) โดยการใช้การไล่ลำดับความเข้มข้นของสารละลายเมทานอลในน้ำ (gradient mixture of 0-100% methanol in H₂O) ในระหว่างที่ส่วนของ pf3 ถูกชะล้างออกจากคอลัมน์ สารละลายอยู่ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเมทานอลในน้ำ ที่ร้อยละ 30 (30-100% methanol in H₂O)

หลังจากได้ส่วนต่างๆ ตามแผนผังของการแยกสารแล้ว สารแต่ละหลอดทดลองได้ถูกจัดกลุ่มตามรูปแบบที่พบหลังจากวัดด้วย UV spectrometer ที่ 260nm เพื่อรวบรวมส่วนย่อยๆ (Fraction) โดยพบว่า สารที่แยกได้ในกลุ่ม pf2 (ประมาณ 40 มิลลิกรัม) และนำไปทดสอบด้วย thin layer chromatography (TLC) ได้ทั้งหมดรวม 38 fractions (f1-f16) โดยอาศัยลักษณะของรูปแบบที่พบใน TLC patterns



รูป 5 รูปแบบการแยกสารสกัดหยาบใบมะรุม จากการทดลอง 3 ครั้งพบลักษณะการแยกสารได้รูปแบบเดียวกัน

ง. ผลการทดสอบฤทธิ์การเจริญของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง

(1) ผลการทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดหยาบ

ผลการทดสอบฤทธิ์การเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้มนุษย์ 2 ชนิด (HT29 และ HCT116) และในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงปากมดลูก (HeLa cell) โดยทดสอบกับสารสกัดหยาบที่ได้จากพืชมะรุม 3 ส่วนสำคัญ คือ ใบ ดอก และฝักมะรุม ที่เวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ได้ผลเบื้องต้นตามภาพ โดยทั้งสามส่วนที่ได้จากสารสกัดหยาบ พบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงทั้งสามชนิด

Moringa oleifera Lamk



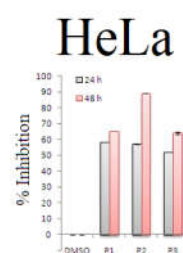
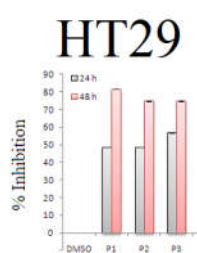
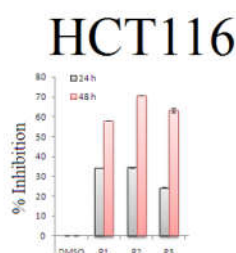
1) Leaf



2) flower



3) drum



Anti-proliferative effects in cancer cell line

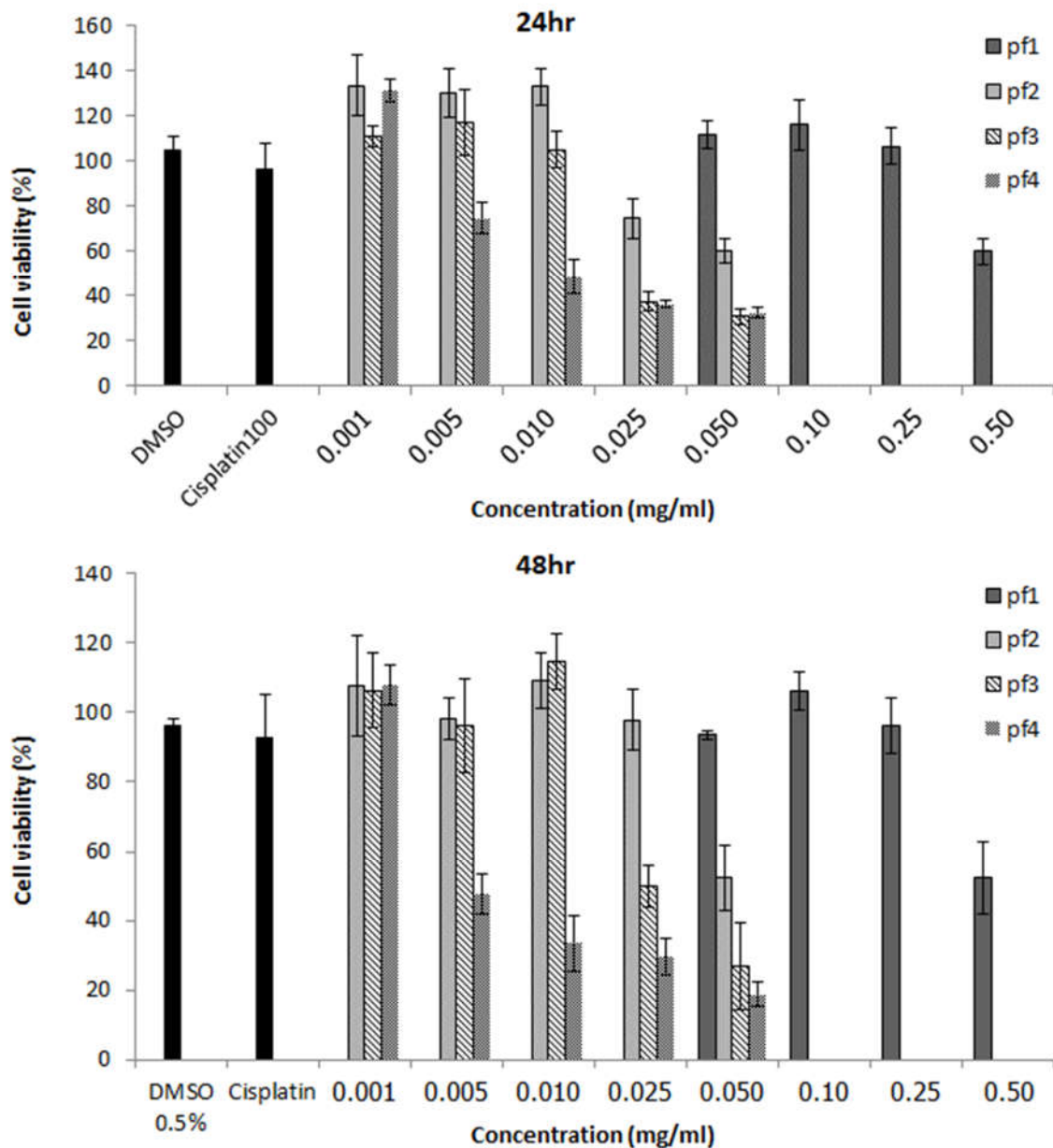
รูป 6 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงใน 3 เซลล์ จากสารสกัดหยาบมะรุม ที่ได้จากใบ ดอก และฝัก

เมื่อนำสารสกัดที่แยกได้มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยเลือกเซลล์ HCT116 cell line เนื่องจากเป็นเซลล์ที่ทดสอบแล้วเห็นผลการทดลองชัดเจนที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เซลล์ชนิดนี้มีการเจริญที่มีเวลาแบ่งตัวเป็น 2 เท่า (Doubling time) น้อยกว่าเซลล์ประเภท HT29 cell line นอกจากนั้น ยังเป็นเซลล์มะเร็งที่พบว่าการกลายพันธุ์ระดับโปรตีน Ras ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาต้านมะเร็ง ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงเลือกเซลล์ HCT116 มาทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป เพื่อหาความสัมพันธ์ของการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในระดับโมเลกุลต่อไป

(2) ผลการทดสอบจากสารสกัดหยาบที่แยกส่วน

จากการแยกสารสกัดหยาบที่ได้ และเลือกใช้ส่วนที่ได้จากใบ เนื่องจากมีปริมาณหลังจากแยกได้มากที่สุด และสามารถแยกส่วนต่างๆ ออกมาได้เป็นส่วนๆ (Fraction) ที่ชัดเจนได้มากที่สุด นำมาทดสอบยืนยันผลกับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่เลือกไว้คือเซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์ HCT116 พบว่า สารสกัดหยาบที่แยกได้จากส่วน pf2 และ pf3 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ

เซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์ ได้ดีกว่าส่วนที่ pf1 และ pf4 เมื่อเทียบในความเข้มข้นที่ใช้ในช่วงเดียวกันที่ 0.005-0.050 mg/ml โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ลงมาได้ปริมาณน้อยกว่า 50-60% ที่ความเข้มข้น 0.025-0.050 mg/ml

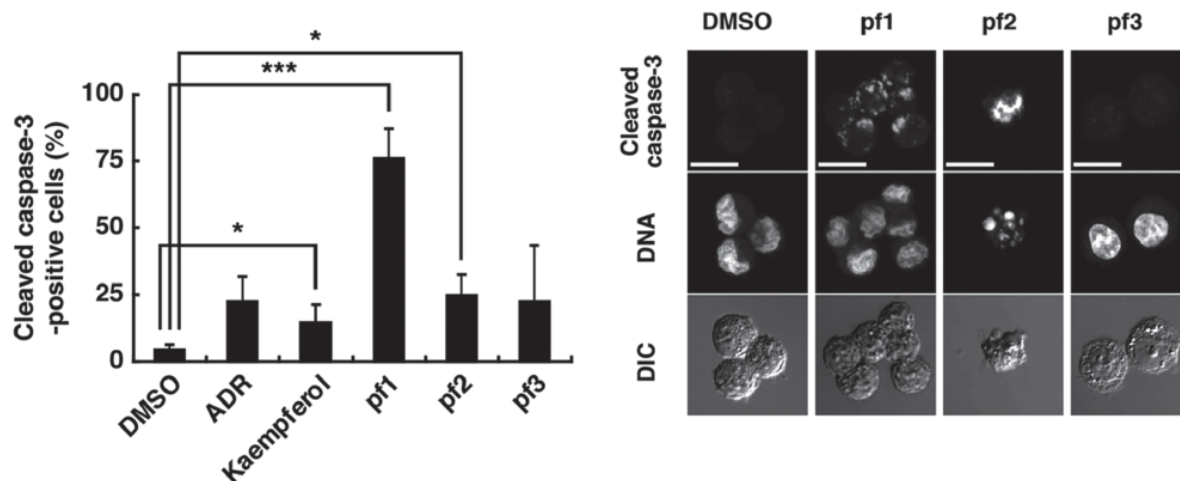


รูป 7 ผลการทดสอบการยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์ (HCT116) จากสารสกัดที่แยกได้จากใบมะรุ่ pf1, pf2, pf3, และ pf4 ที่เวลา 24, 48 ชั่วโมง

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 cell line พบว่าสารสกัดประเภท pf1-pf3 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิดนี้ โดยใช้ความเข้มข้นที่ประมาณ 0.050 mg/ml โดยพบสารสกัดประเภท pf2-pf3 ที่ให้ผลดีในความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ที่อยู่ระหว่าง 0.01-0.025 mg/ml นอกจากนี้สารสกัดชนิด pf4 ให้ผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิดนี้ ที่ความเข้มข้นสูง มากกว่า 0.25 mg/ml

จ. ผลการทดสอบเกี่ยวกับสัญญาณภายในเซลล์

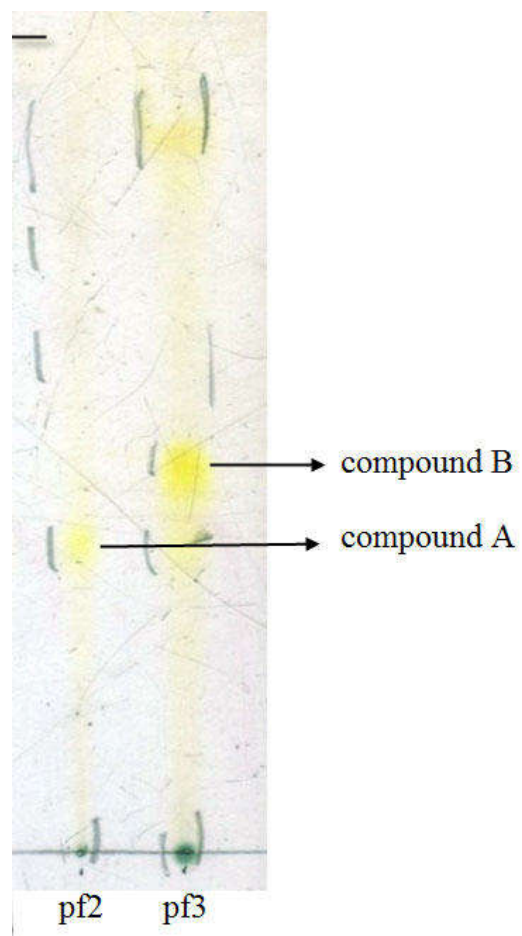
จากผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์ พบว่า สารสกัดรบกวนการทำงานของสัญญาณภายในเซลล์ โดยมีผลต่อการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยเฉพาะโปรตีน Caspase-3 ที่พบว่ามี การแตกสลาย (Cleaved caspase-3) ดังที่พบในการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซน เมื่อใส่สารสกัดชนิด pf1 และ pf2 แต่ไม่พบในสารสกัดที่แยกได้ใน pf3 สอดคล้องกับผลการทดสอบด้วยเครื่อง Flow cytometry พบว่าสารสกัด pf1 สามารถทำให้เซลล์เกิดการแตกสลายของโปรตีน ได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยการใช้สารละลาย DMSO



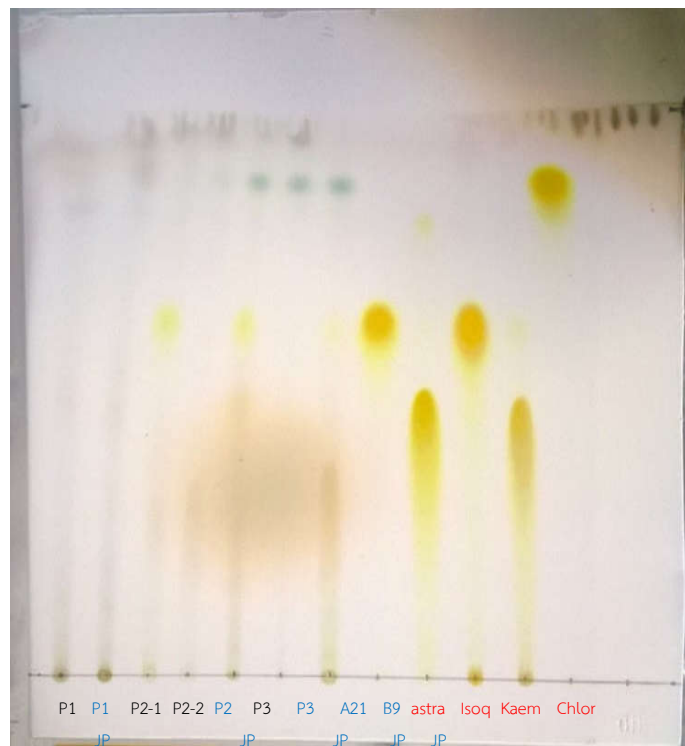
รูป 8 ผลการทดสอบด้วย Flow cytometry และการย้อมสีเซลล์ด้วย immunofluoresence

ฉ. ผลการพิสูจน์โครงสร้างสารสำคัญด้วย NMR

สารประกอบ (compound A and B) เป็นสารที่มีลักษณะผงสีเหลือง (yellow amorphous powder) หลังจากแยกโดยใช้ column chromatography โดยใช้สารละลายภายใต้เงื่อนไขที่ได้รับการปรับให้เหมาะสม และเมื่อนำสารดังกล่าวมาทดสอบในแผ่น TLC ตามวิธีการของ Tuzimski, 2002. จากรูป แสดงให้เห็นชัดเจนว่าสารประกอบ (Compound A or B) สามารถแยกจากกันได้ โดยใช้สัดส่วนของสารละลายเมธานอลต่อน้ำในสัดส่วน 60:40 (MeOH: H₂O =60:40) สารดังกล่าวถูกพ่นด้วยสารละลายกรดซัลฟริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 (50% H₂SO₄) และนำไปอบที่อุณหภูมิ 90-100 °C พบสารประกอบที่มีสีเหลือง และสารประกอบที่พบ compound A และ compound B มีค่า R_f= 0.393 และ R_f= 0.464 ตามลำดับ



รูป 9 การทดสอบด้วย TLC เพื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ



รูป 10 เปรียบเทียบตำแหน่งของสารสกัดที่แยกได้ใน TLC เทียบกับสารมาตรฐานทั้งสามชนิด

จากการทดสอบการหาโครงสร้างของสารเคมีด้วยเครื่องมือ NMR spectrometer โดยพบว่า ^1H NMR spectra of A and B แสดงลักษณะของสารที่พบอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์กลัยโคไซด์ (flavonoid glycosides) น้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบ A และ B สามารถระบุได้ว่ามี $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ และ $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยเครื่องวัด Mass Spectrometer พบน้ำหนักของสารดังกล่าว ที่ m/z 447 and 463 $[\text{M}-\text{H}]^-$

นอกจากนี้ พบว่าโครงสร้างของสารประกอบ A และ B มีลักษณะของน้ำหนักและลักษณะของสเปกตรัมที่พบ (mass and ^1H NMR spectra) สัมพันธ์กับลักษณะของการมีหมู่น้ำตาลอิสระ (sugar moiety) จากโครงสร้างที่พบและการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่คลังข้อมูลสารเคมีสำคัญ พบว่า โครงสร้างของสารประกอบ A และ B คือ สาร kaempferol 3-o-glucoside (astragalin) และ quercetrin 3-o-glucoside (isoquercetin) ตามลำดับ

Astragalin: yellow amorphous powder, Molecular formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$. LC-MS: m/z 447 $[\text{M}-\text{H}]^-$. ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ ppm 7.92 (d, $J=8.8$, 2H, H-2 $\square$, 6 $\square$), 6.75 (d, $J=8.8$, 2H, H-3 $\square$, 5 $\square$), 6.21 (d, $J=2.1$, 1H, H-8), 6.03 (d, $J=2.1$, 1H, H-6), 5.08 (d, $J=7.2$, 1H, H-1 $\square$ of Glc). (Aishan et al., 2010)

Isoquercetin: yellow amorphous powder, Molecular formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$, LC-MS: m/z 463 $[\text{M}-\text{H}]^-$. ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ ppm 7.70 (d, $J=2.3$, 1H, H-2 $\square$), 7.58 (dd, $J=2.3$, 8.5, 1H, H-6 $\square$), 6.86 (d, $J=8.5$, 1H, H-5 $\square$), 6.35 (d, $J=2.1$, 1H, H-8), 6.17 (d, $J=2.1$, 1H, H-6), 5.23 (d, $J=7.7$, 1H, H-1 $\square$ of Glc). The peaks assigned in ^1H NMR corresponded to those Refs. (Kazuma et al, 2003)

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)

1) การทดสอบสารสกัดหยาบมะรุม กับฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 3 ชนิด

สารสกัดหยาบมะรุม ที่แยกได้จากใบมะรุม ดอกมะรุม และผลมะรุม มีฤทธิ์ด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) ด้วยการทดสอบ MTT assay โดยสารสกัดหยาบที่แยกได้จากใบมะรุม ได้นำไปทดสอบในขั้นตอนถัดไป

2) การแยกสารสกัดหยาบที่ได้จากใบมะรุม และการทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในมนุษย์

สารสกัดหยาบมะรุม ที่แยกได้จากใบมะรุม เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธี Column chromatography สามารถแยกสารสกัดออกมาได้ 3 กลุ่มสำคัญ และเมื่อนำไปทดสอบการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ได้แตกต่างกัน โดยกลุ่มที่แยกได้กลุ่มแรก pf1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ดี

3) การทดสอบกลไกระดับเซลล์ ของสารสกัดหยาบที่แยกได้จากใบมะรุม

สารสกัดหยาบมะรุม ที่แยกได้จากใบมะรุม และเมื่อนำไปทดสอบการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่พบว่า pf1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ดี ผ่านโปรตีน Caspase-3 ในการตายของเซลล์ และมีผลต่อโปรตีนในวิถีของเซลล์ภายใต้สัญญาณ MAPK kinase สอดคล้องกับการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

4) โครงสร้างของสารสำคัญที่ทราบในสารสกัดจากใบมะรุม

ผลการวิจัยหาโครงสร้างของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ที่พบจากการวิเคราะห์หาโครงสร้างสารบริสุทธิ์ พบว่า มีสารอย่างน้อย 2 ชนิดที่พบ คือ Astragalin และ Isoquercetrin ที่ตรวจพบในส่วนของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ จากสารสกัดหยาบได้จากใบมะรุม (bioactive fractions of *M. oleifera* leaves) และน่าจะมีการศึกษาถึงสารสำคัญที่น่าจะพัฒนาเป็นยาได้เพิ่มเติม จากสารสกัดหยาบมะรุมได้อีก

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2542 (บัญชียาจากสมุนไพร). กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 2543.
2. สุชาติพิพ ภมรประวัติ. มะรุม ลดไขมันป้องกันมะเร็ง. หมอชาวบ้าน, 2007. 338: 1245.
3. มะรุม. นันทวัน บุญยะประภัสร์ ใน สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน (3). กรุงเทพฯ. บริษัทประชาชนจำกัด, 2541: 693-694.
4. Caceres, A., et al., Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. J Ethnopharmacol, 1991. 33(3): 213-6.
5. Eilert, U., B. Wolters, and A. Nahrstedt, The Antibiotic Principle of Seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*. Planta Med, 1981. 42(5): 55-61.
6. Chuang, P.H., et al., Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. Bioresour Technol, 2007. 98(1): 232-6.
7. Bose, C.K., Possible role of *Moringa oleifera* Lam. root in epithelial ovarian cancer. MedGenMed, 2007. 9(1): 26.
8. Chumark, P., et al., The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. J Ethnopharmacol, 2008. 116(3): 439-46.
9. Mahajan, S.G. and A.A. Mehta, Effect of *Moringa oleifera* Lam. seed extract on ovalbumin-induced airway inflammation in guinea pigs. Inhal Toxicol, 2008. 20(10): 897-909.
10. Debnath, S. and D. Guha, Role of *Moringa oleifera* on enterochromaffin cell count and serotonin content of experimental ulcer model. Indian J Exp Biol, 2007. 45(8): 726-31.
11. Hoffmann, E.M., S. Muetzel, and K. Becker, Effects of *Moringa oleifera* seed extract on rumen fermentation in vitro. Arch Tierernahr, 2003. 57(1): 65-81.
12. Sayeed S and Ahmed K. Hypocholesterolemic effect of sterol of Colocasia leaves. Bangladesh J. Biol. Sci, 1979. 8: 17-21.
13. Dayrit F M, Alcantar AD and Villasena IM. Studies on *Moringa oleifera* seeds. Part I. The antibiotic compound and its deactivation in aqueous solution. Phillipp J. Sci, 1990. 119: 23-32.
14. Caceres A and Lopez S. Pharmacological properties of *Moringa oleifera* three effects of seed extracts in the treatment of experimental pyoderma. Fioterapia, 1991. 62: 449-450.
15. เกษร นันทจิต. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของฝักมะรุม. รายงานการวิจัย. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2539. 25 หน้า
16. Eloff JM. A sensitivity and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Medica, 1998. 64(8): 711-3.
17. ปารยะ อาศนะเสน. ยาหยอดหู. คลินิก, 2551. 24 (11): 1013-17.
18. Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>

ภาคผนวก (Appendix)

ภาคผนวก ก. ประวัติผู้วิจัย

ภาคผนวก ข. ผลงานวิจัยที่เผยแพร่ 3 เรื่อง

ภาคผนวก ค. รูปภาพประกอบรายงานวิจัย (เพิ่มเติม)

ประวัติผู้วิจัย

เภสัชกร ดร.พีรยศ ภมรศิลป์ธรรม

สถานที่ทำงาน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (สนามจันทร์) จ.นครปฐม

โทรศัพท์ 034-255800 โทรสาร 034-255801

E-mail address (ต้องระบุ) Pamonsinlapa_P@su.ac.th

ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรีสาขาเภสัชศาสตรบัณฑิต สถาบันมหาวิทยาลัยนเรศวร ปีที่จบ พ.ศ. 2541
- ปริญญาโทสาขาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ) สถาบันมหาวิทยาลัยศิลปากร ปีที่จบ พ.ศ.2548
- ปริญญาเอกสาขา Biomedical and Pharmaceutical science สถาบัน University Rene Descartes (U. Paris V), FRANCE ปีที่จบ พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีที่ดำเนินการ ทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาโท ชื่อเรื่อง การประเมินผลเปปไทด์วัคซีน(PADRE-ASREAK) เพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เยื่อ
บุต่อ Group A Streptococcal (GAS) ปีที่ดำเนินการ 2546-2547
- ระดับปริญญาเอก ชื่อเรื่อง Studies of interaction RasGAP/CAPNS1 and development inhibitor of
domain SH3 of RasGAP ปีที่ดำเนินการ 2548-2551

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ โพรตระบุแขนงวิชา

- ☐ สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ประกอบด้วยกลุ่มวิชา
ชีวเคมี แขนงวิชาอนุชีววิทยาของเซลล์
เภสัชชีวภาพ แขนงวิชาสัญญาณภายในเซลล์
- ☐ สาขาเทคโนโลยีสารสนเทศและนิเทศศาสตร์ ประกอบด้วยกลุ่มวิชา
สารสนเทศศาสตร์ แขนงวิชา การจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ระดับนานาชาติ (Recent International publications)

1. **Pamonsinlapatham P**, Hadj-Slimane R, Raynaud F, Bickle M, Corneloup C, Barthelaix A, Lepelletier Y, Mercier P, Schapira M, Samson J, Mathieu AL, Hugo N, Moncorgé O, Mikaelian I, Dufour S, Garbay C, Colas P. A RasGAP SH3 peptide aptamer inhibits RasGAP-Aurora interaction and induces caspase-independent tumor cell death. PLoS ONE. 2008 Aug 6; 3(8):e2902.
2. **Pamonsinlapatham P**, Gril B, Dufour S, Hadj-Slimane R, Gigoux V, Pethe S, L'hoste S, Camonis J, Garbay C, Raynaud F, Vidal M. Capns1, a new binding partner of RasGAP-SH3 domain in K-Ras(V12) oncogenic cells: Modulation of cell survival and migration. Cell Signal. 2008 Aug 13.
3. **Pamonsinlapatham P**, Hadj-Slimane R, Lepelletier Y, Allain B, Toccafondi M, Garbay C, Raynaud F. P120-Ras GTPase activating protein (RasGAP): a multi-interacting protein in downstream signaling. Biochimie. 2009 Mar 91(3): 320-8.
4. Dourlat J, Liu WQ, Sancier F, Edmonds T, **Pamonsinlapatham P**, Cruzalegui F, Garbay C. A novel

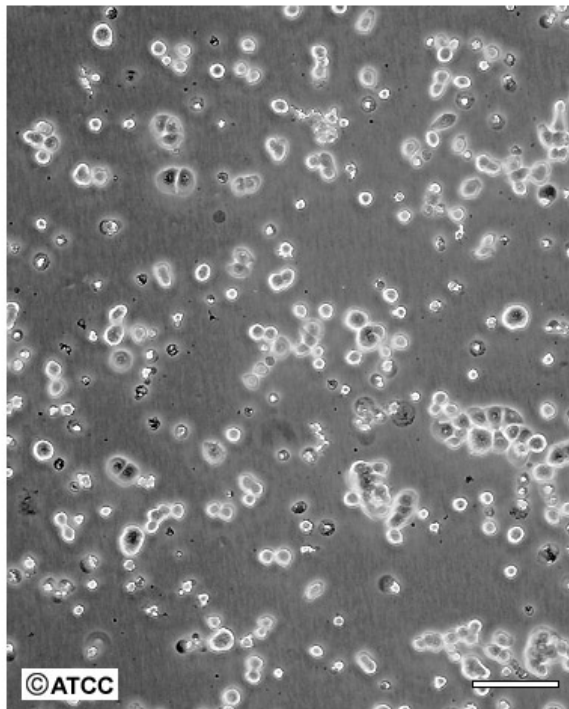
non-phosphorylated potential antitumoral peptide inhibits STAT3 biological activity. *Biochimie*. 2009 Aug; 91(8): 996-1002. Epub 2009 May 24.

5. Hadj-Slimane R, **Pamonsinlapatham P**, Herbeuval JP, Garbay C, Lepelletier Y, Raynaud F. RasV12 induces Survivin/AuroraB pathway conferring tumor cell apoptosis resistance. *Cell Signal*. 2010 Aug;22(8):1214-21.
6. Allain B, Jarray R, Borriello L, Leforban B, Dufour S, Liu WQ, **Pamonsinlapatham P**, Bianco S, Larghero J, Hadj-Slimane R, Garbay C, Raynaud F, Lepelletier Y. Neuropilin-1 regulates a new VEGF-induced gene, Phactr-1, which controls tubulogenesis and modulates lamellipodial dynamics in human endothelial cells. *Cell Signal*. 2012
7. Satiraphan M, **Pamonsinlapatham P**, Sotanaphun U, Sittisombut C, Raynaud F, Garbay C, Michel S, Cachet X. Lupane triterpenes from the leaves of the tropical rain forest tree *Hopea odorata* Roxb. and their cytotoxic activities. *Biochemical Systematics and Ecology* 2012 Volume 44: 407–412

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ระดับชาติ (Recent local publications in Thailand)

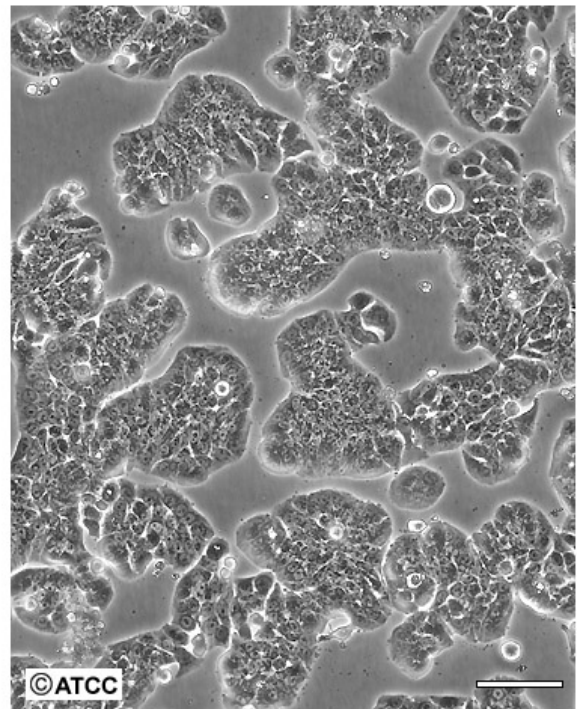
1. **Pamonsinlapatham P**. Mucosal Immunity and Vaccine Development. *Journal of Health Science* 2003; 12: 635-44.
2. **Pamonsinlapatham P** and Pengrungrangwong K. Mother to Child HIV transmission. *Thai Journal of Hospital Pharmacy (TJHP)* 2003; 2: 142-49
3. Sithisombat C and **Pamonsinlapatham P**. Calanolide A and its derivative for anti-HIV. *Silpakorn University Journal* 2004; 23 (2): 36-55.
4. **Pamonsinlapatham P** and Pengrungrangwong K. Vaccine Development for Group A *Streptococcus pyogenes* (GAS) Infection. *Journal of Health Science* 2006; 15: 163-175.
5. **Pamonsinlapatham P** and Intralapairoj T. Targeting the Epidermal growth factor receptors (EGFR) pathway for cancer therapy. *PharmaTime* 2007; (8) 110: 5-15.
6. **Pamonsinlapatham P** and Intralapairoj T. Cancer Vaccine. *PharmaTime* 2008; (8) 115: 5-16.
7. **Pamonsinlapatham P**, Pamonsinlapatham K, Thangwirai W. Limitation of anti-HIV drug and new drug development. *Thai Journal of Hospital Pharmacy (TJHP)* 2009; 19(3): 247-259.
8. **Pamonsinlapatham P**. Focal adhesion kinase (FAK): a new target in cancer therapy *Thai Journal of Pharmacy* 2010; (5) Jan-Dec: 139-150.

ATCC Number: **HTB-38**
Designation: **HT-29**



Low Density

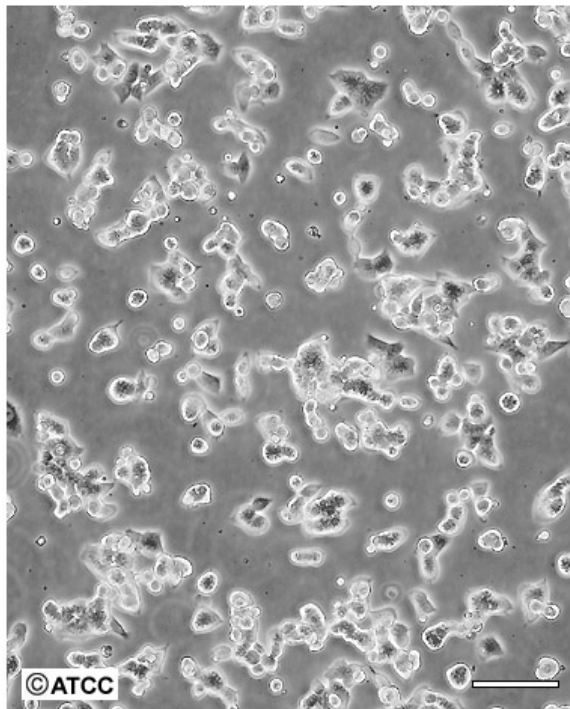
Scale Bar = 100µm



High Density

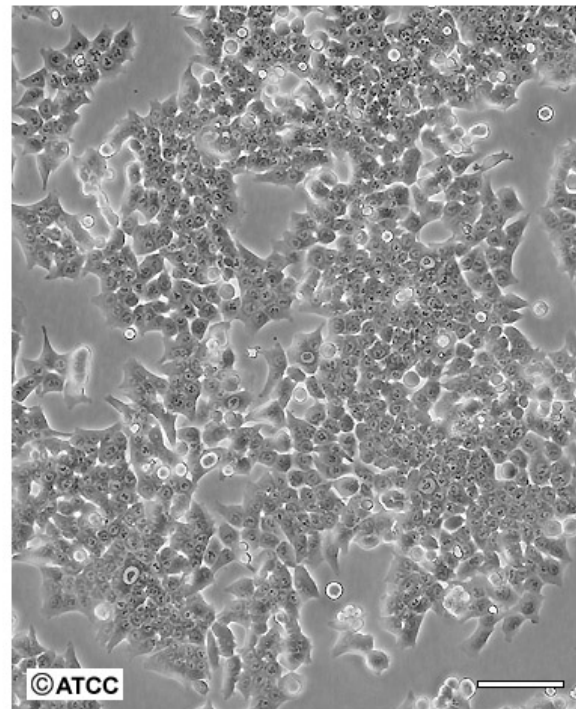
Scale Bar = 100µm

ATCC Number: **CCL-247**
Designation: **HCT 116**



Low Density

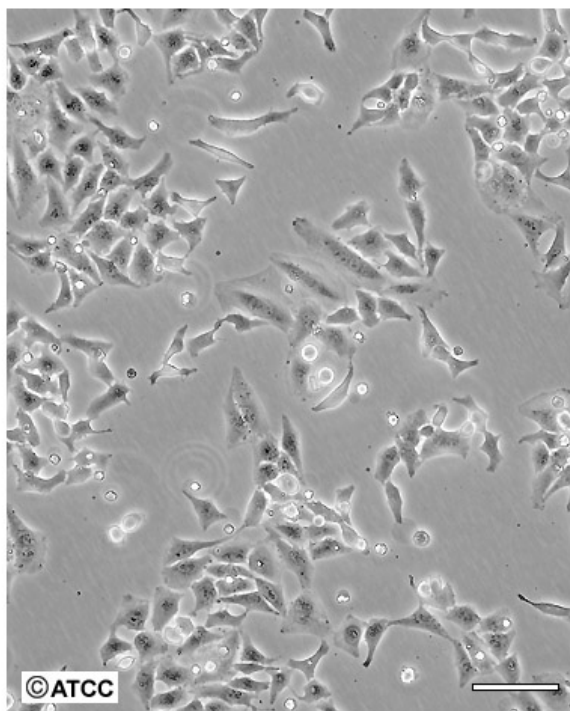
Scale Bar = 100µm



High Density

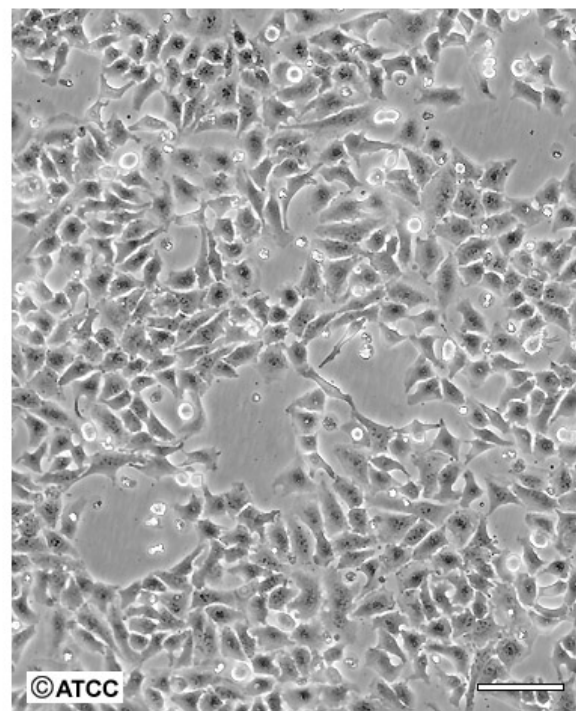
Scale Bar = 100µm

ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**



Low Density

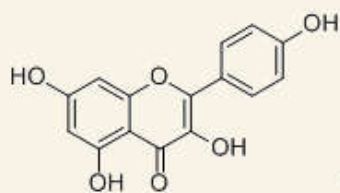
Scale Bar = 100µm



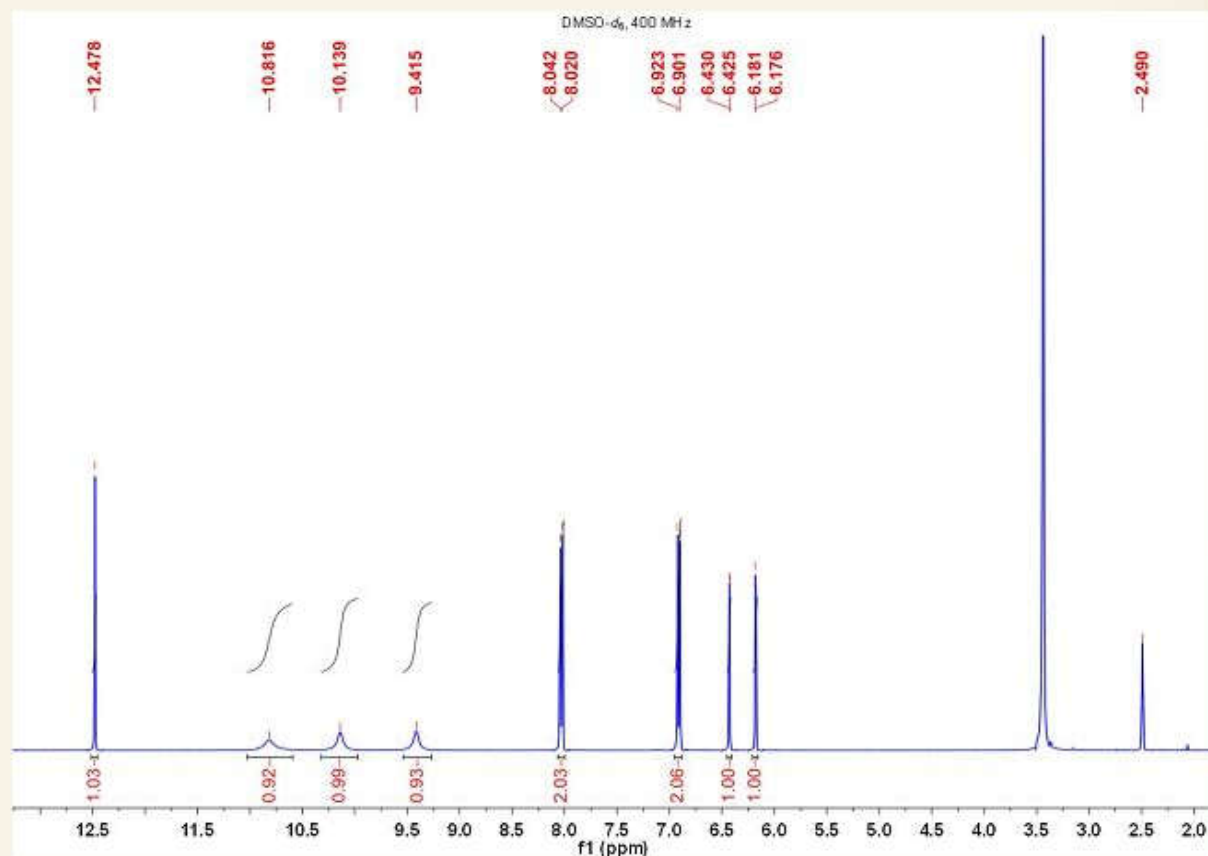
High Density

Scale Bar = 100µm

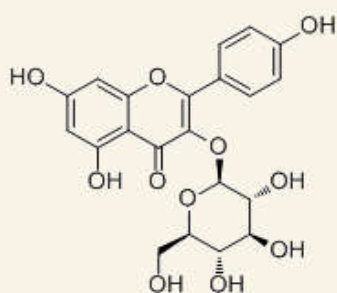
[1] **Kaempferol**; CAS: 520-18-3



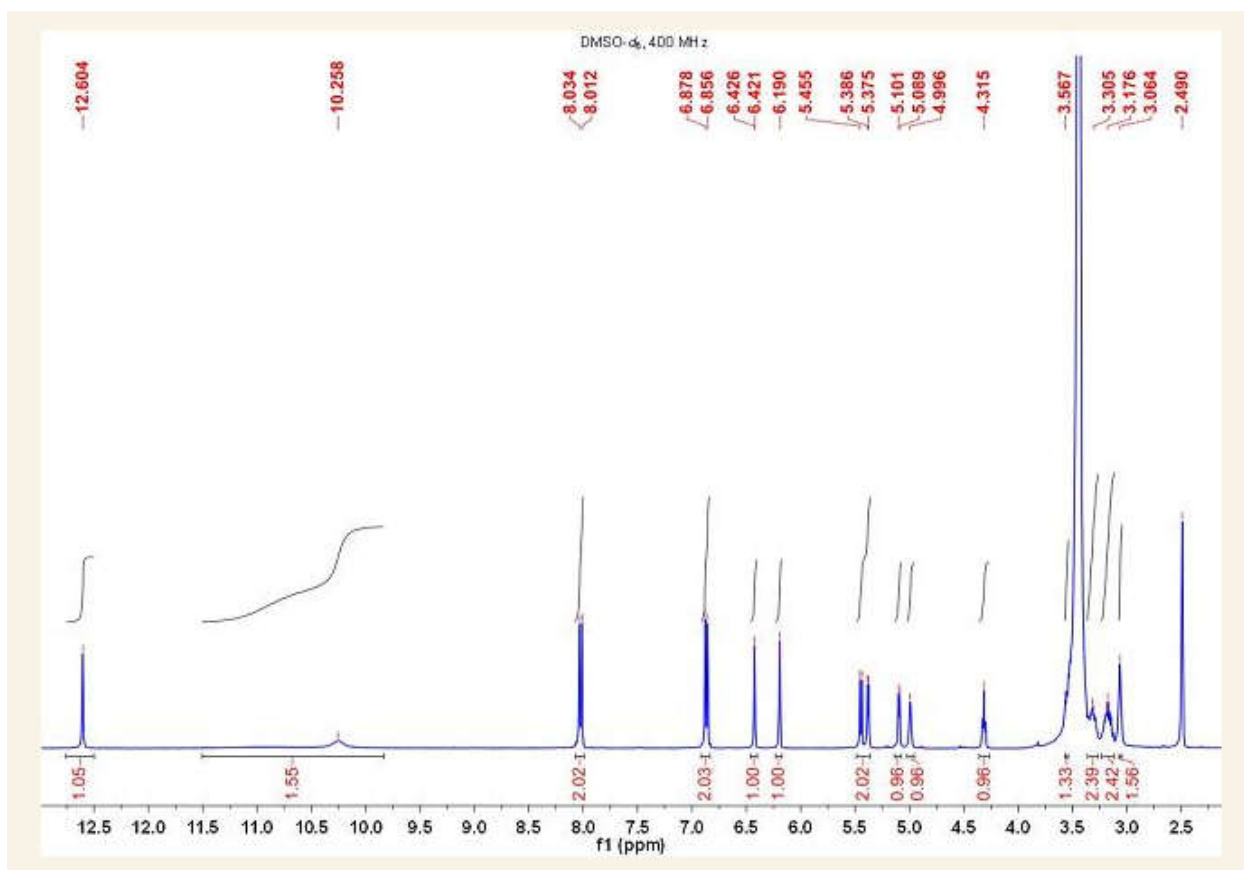
Y. K. Qiu, et al., *J Shenyang Pharm Univ*, 2000, 17(4), 267-268



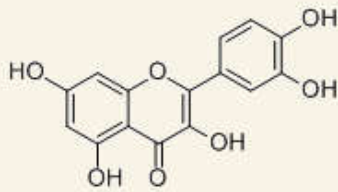
[2] **Astragalin** (Kaempferol 3-O-glucoside); CAS: 480-10-4



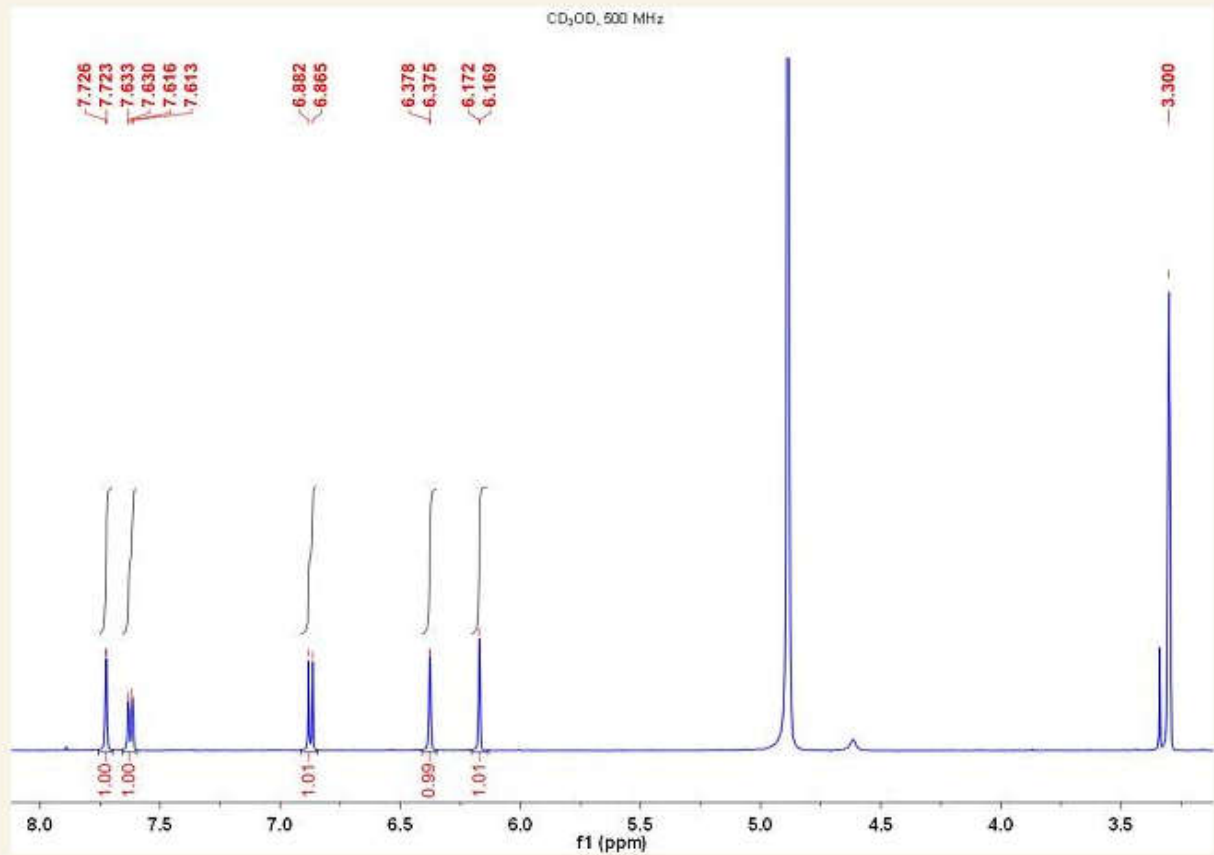
T. Okuyama, et al., *Chem Pharm Bull*, 1978, 26, 3071-3074



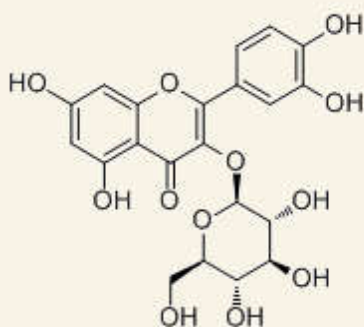
[3] **Quercetin**; CAS: 117-39-5



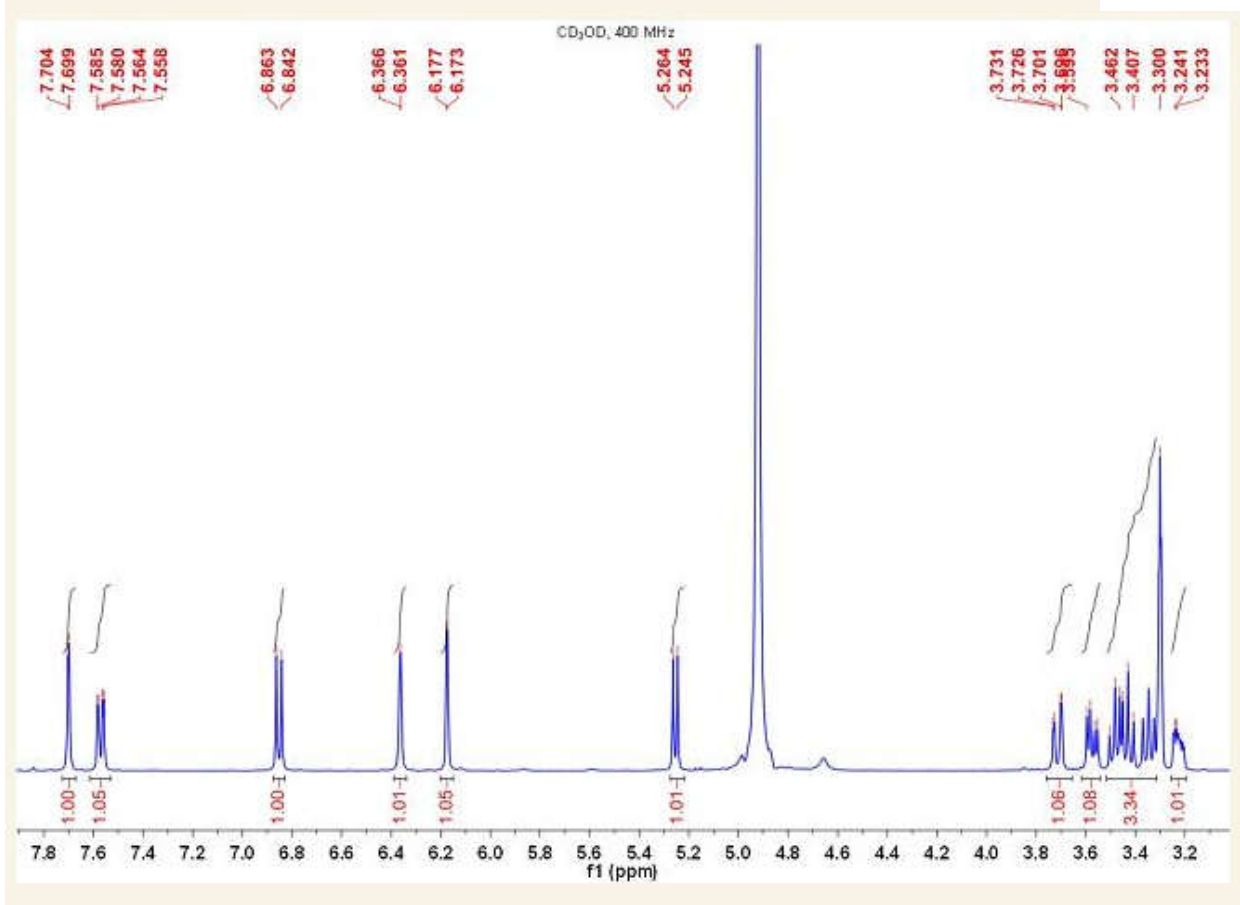
L. Y. Foo, et al., *Phytochemistry*, 2000, 54, 539-548



Isoquercitrin (Quercetin 3-O-glucoside); CAS: 482-35-9



K. Kazuma, et al., *Phytochemistry*, 2003, 62(2), 229-237 [PDF] (CD₃OD, ¹H-NMR, ¹³C-NMR)



<http://www.wangfei.ac.cn/article/3/1/27>

Original Research Article

Anti-proliferative effect of *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae) leaf extract on human colon cancer HCT116 cell line

Jintana Tragulpakseerojn^{1,2}, Naoto Yamaguchi², Perayot Pamonsinlapatham³, Penpun Wetwitayaklung⁴, Tatsuro Yoneyama⁵, Naoki Ishikawa⁵, Masami Ishibashi⁵ and Auayporn Apirakaramwong^{1*}

¹Department of Biopharmacy, ²Department of Molecular Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan, ³Department of Health-Related Informatics, ⁴Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000 Thailand, ⁵Department of Natural Products Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan

*For correspondence: **Email:** apirakaramwong_a@su.ac.th; **Tel:** +66-3425-5800; **Fax:** +66-3425-5801

Received: 4 November 2016

Revised accepted: 18 January 2017

Abstract

Purpose: To investigate the *in vitro* anti-proliferative effect and mechanism of action of *Moringa oleifera* Lam. leaf extract on human colon carcinoma HCT116 cell line.

Methods: *M. oleifera* leaves were extracted with methanol. It was fractionated by Sephadex LH-20 column chromatography. Several fractions were identified by thin layer chromatography (TLC), proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) and mass spectrometry (MS). The growth inhibitory activity and mechanism of action of the extracts in HCT116 colon cancer cells were investigated by 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and Western blotting.

Results: Successive fractions from *M. oleifera* leaf crude extracts by column chromatography were combined into four pooled batches (MOL1 - MOL4) according to their absorbance at 260 nm and TLC pattern. MOL2 and MOL3 contain astragalin and isoquercetin, respectively. The results from MTT assay indicated that cell proliferation was significantly ($p < 0.05$) inhibited in a concentration-dependent fashion, especially by MOL2, MOL3 and MOL4. MOL2 and MOL3 exhibited a stronger cell growth inhibition than their major ingredients. The anti-proliferative activity of MOL2 - MOL4 in HCT116 colon cancer cells was mediated by downregulation of ERK1/2 phosphorylation.

Conclusion: *M. oleifera* leaf extract has a strong anti-proliferative activity which is exerted by decreasing ERK1/2 phosphorylation. Thus, the extract has a potential for use in cancer chemoprevention.

Keywords: *Moringa oleifera*, Anti-proliferation, Colon cancer, AKT, ERK1/2 phosphorylation, Chemoprevention

Tropical Journal of Pharmaceutical Research is indexed by Science Citation Index (SciSearch), Scopus, International Pharmaceutical Abstract, Chemical Abstracts, Embase, Index Copernicus, EBSCO, African Index Medicus, JournalSeek, Journal Citation Reports/Science Edition, Directory of Open Access Journals (DOAJ), African Journal Online, Bioline International, Open-J-Gate and Pharmacy Abstracts

INTRODUCTION

Cancer is one of the leading diseases that results in hundreds of thousand deaths among Thais [1-3]. Many of the naturally derived anti-cancer drugs successfully became current drugs such

as paclitaxel, vincristine, and vinblastine. Several wild edible plant species in Thailand have played a prominent role in traditional medicine [4,5]. *Moringa oleifera* Lam. (*M. oleifera*) is one of the most common plant found in Southeast Asia that has been widely used [6]. It is also a valuable

plant because it is rich in vitamins, protein, carbohydrate, fatty acid, fiber and phytochemical components. The phytochemical components present in *M. oleifera* such as glycosides, alkaloids, flavonoids and phenolics are thought to have anti-oxidant and anti-cancer effects [7]. Each part of *M. oleifera* showed different effects on cancer cells [6,8-10]. Moringa root extracts inhibit epithelial ovarian cancer growth [11]. Extracts of *M. oleifera* leaves have been found to elicit anti-oxidant, anti-inflammatory, antibacterial and anti-fungal activities [12,13]. Moreover, *M. oleifera* leaf extracts inhibit human epidermal carcinoma (KB) cell growth analyzed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay [14].

Recently, astragalin, isoquercetin and cryptochlorogenic acid were discovered to be major active components in *M. oleifera* leaf extract [15]. Both astragalin and isoquercetin have been shown to possess anti-oxidant and anti-inflammatory activities [16,17]. Isoquercetin has been studied and found as a major bioactive component in St. John's wort or Klamathweed (*Hypericum perforatum* L.) [18]. Furthermore, isoquercetin and astragalin are present in vegetables and fruits such as broccoli, onions, cherries, apples [19].

The major cellular functions known to be mediated by mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are cell differentiation and transformation, cell proliferation, cell death and survival. MAPK proteins are serine-threonine kinases that include extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. The PI3K/AKT and RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathways are frequently mutationally activated in human cancer. AKT and ERK signaling pathways have been shown to coregulate several proteins promoting cancer cell survival and tumor growth [20]. Thus, the direct inhibition of AKT and ERK signaling pathways may provide a potential strategy for cancer therapy.

A previous study showed that bioactive fractions from column chromatography separation of *M. oleifera* leaf extract exhibit apoptotic induction activity in HCT 116 colon cancer cells [21]. However, the bioactive compounds from *M. oleifera* leaves have not been clarified.

The present investigation was undertaken to identify the phytochemical compounds from the bioactive fractions and to elucidate the mechanism that may be responsible for the anti-proliferative activity.

EXPERIMENTAL

Plant material and extraction

Fresh *M. oleifera* Lam. leaves were collected during January 2012 - December 2013 from Amphoe Mueng, Nakhon Pathom, Thailand. Leaves were cleaned and subsequently dried at 50-60 °C for 2 - 3 days. The dried leaves were blended by homogenization and extracted in 100 % methanol for 3 days using a Soxhlet extractor. Alcohol solvent was completely removed from total extraction solution by using an evaporator. The crude extracts were kept in a light protected glass ware at < 4 °C until used.

Column chromatography on Sephadex LH-20

The dried crude extract of *M. oleifera* leaves was dissolved in 70 % (v/v) ethanol at 1 mg/mL and then filtered with 0.45 µm filter membranes (Merck Millipore, Bedford, MA, USA) immediately before use. The fractionation of crude extract was conducted by size exclusion chromatography as described previously [21]. Briefly, the extract was separated into fractions with 2.5 x 37.5 cm glass chromatography column (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) filled with expanded Sephadex LH-20 gel particles (10 - 25 µm; GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) in 70 % (v/v) ethanol. The column was eluted with 70 % (v/v) ethanol. Collected fraction of 5 mL each was monitored by SmartSpec™ 3000 spectrophotometer (λ_{max} = 260 nm; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Based on spectral readings, four pooled, combined, fractions (pf1-pf4) were collected. The four combined fractions were evaporated and freeze-dried. Then, they were stored under refrigeration (-20 °C) and in a dark container.

General procedure

Optical rotations were measured with a JASCO-1020 polarimeter (Tokyo, Japan). MS was measured on a JEOL spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan). ¹H NMR spectra were recorded on an ECA 600 spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) with deuterated solvent. Silica gel presqualene (PSQ) 100B or ODS Chromatorex (Fuji Sylisia, Kasugai, Japan) or Sephadex LH-20 (GE Healthcare Waukesha, WI, USA) were used to carry out column chromatography. Thin layer chromatography (TLC) was done with glass pre-coated ODS RP18 F₂₅₄ plates (Merck, Darmstadt, Germany), developing with gradient methanol-H₂O (40:60-80:20). Spots were detected using UV absorbance at 254 and 365 nm and by spraying with 50 % H₂SO₄, then, the

plate was heated at 90 – 100 °C for at least 2 - 3 min.

Extraction and isolation

Dried methanol extract of *M. oleifera* leaves was subjected to gel filtration on Sephadex LH-20 with four pooled fractions (MOL1 - MOL4) collected. The bioactive fractions, MOL2 and MOL3 were resuspended in methanol and then subjected to octadecylsilyl (ODS) column with different mobile phases. MOL2 was eluted with a gradient mixture of 0 - 100 % methanol in H₂O while the MOL3 was eluted with a gradient mixture of 30 - 100 % methanol in H₂O. The dried MOL2 (40 mg) was eluted, collected and then analyzed by TLC, giving 38 fractions which were pooled into sixteen fractions (F1 - F16) based on the TLC patterns. Fraction F6, a yellow color spot on TLC plate, was concentrated using a rotary evaporator, yielding approximately 2.6 mg of dried extract. F6 (2.6 mg) was further separated by gel filtration, Sephadex LH-20 column, eluted with 80 % methanol and then analyzed by TLC. Based on the TLC patterns, the eluted subfractions were combined into thirteen subfractions (sf1 - sf13). The sf13 (0.9 mg, compound A) was identified using ¹H NMR and MS. The dried MOL3 (10 mg) was subjected to ODS column and eluted with similar

procedures. The collected eluates were monitored using TLC to obtain 29 fractions (F1 - F29). F9 (1 mg, compound B) with a yellow color spot on TLC plate was identified using ¹H NMR. The scheme of isolation is shown in Figure 1. The isolated pure compounds were identified by comparing their ¹H NMR and MS with published data.

Cell culture

Human colorectal carcinoma cells (HCT 116) were kindly provided by collaborators. The cells were propagated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin (Sigma). Cells were cultured in a humidified CO₂ incubator at 37 °C with 5 % CO₂/air. Cells were assayed during the exponential phase of growth.

Cell proliferation assay using tetrazolium salt (MTT)

Cell proliferation was measured by MTT assay (Sigma-Aldrich). Briefly, cells (1.2 x 10⁴ cells) were seeded in a 96-well flat-bottomed microplate in 100 µL medium overnight before treatment.

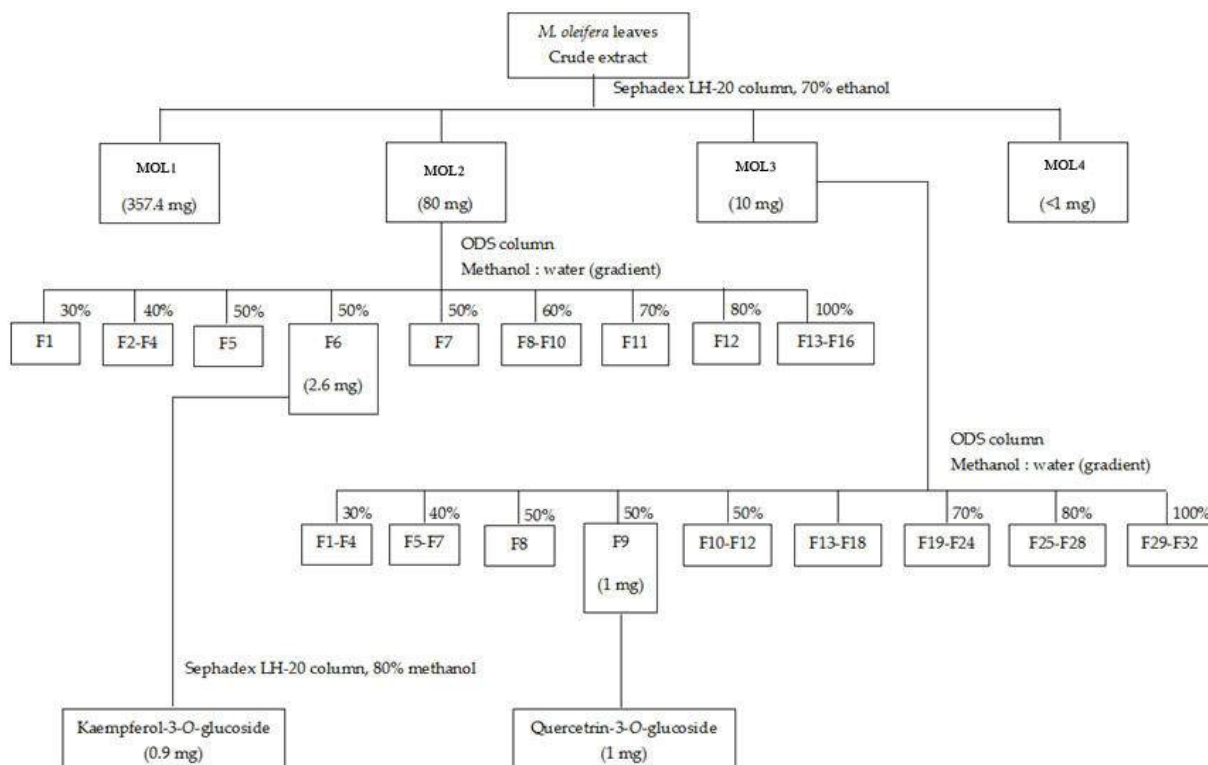


Figure 1: Separation scheme of *M. oleifera* leaf extract with gel filtration on Sephadex LH-20 after getting four pooled fractions

After 24 h, the media were removed and replaced with fresh complete medium. Cells were exposed to graded concentrations of test compounds (4 - 5 dilutions in triplicate; MOL1, MOL2, MOL3, MOL4, astragalin, and isoquercetin) for 24 and 48 h. 0.5 % DMSO-treated cells was used as a negative control. Both astragalin and isoquercetin were obtained from Sigma-Aldrich. After the incubation period, each well was washed with phosphate-buffered saline (PBS) and replaced with 1 mg/mL MTT for 4 h incubation. The resulting crystals produced from the MTT assay was dissolved in 100 μ L of 100 % DMSO and quantified at 550 nm using a microplate reader (Model No; AOPUS01 and A153601; A Packard bioscience company). The proportion of cell viability was calculated as previously described [14].

Cell extraction and western blotting

HCT116 cells were plated at a density of 1×10^5 cells/mL onto a 6-well plate and incubated overnight. Varying concentrations of the *M. oleifera* pooled fractions were added into the cells for 48 h in triplicate cultures, compared with positive and negative controls. After treatment with the samples, cells were washed with PBS, pH 7.4 and lysed with lysis buffer (with 1 mM Na_3VO_4 and 1 mM NaF inhibitor) on ice for 15 min. Cell lysates were centrifuged at 13,000 g for 10 min at 4 °C, and protein concentrations of supernatants were estimated by Bradford protein assay. Equivalent amounts of total cellular proteins (5 - 25 μ g) were separated by 8 - 12 % SDS-PAGE. Each protein sample was added with sample loading buffer, boiled for 5 min and kept on ice immediately prior to electrophoresis through a 8 - 12 % SDS-PAGE at 110 volts for 90 min. Proteins were then transferred onto PVDF membranes. The process was carried out for 1 h on ice. For immunodetection of the proteins, membranes were blocked in 5 % BSA in TBS-T buffer for 1 h. Probing of PVDF membranes with primary antibodies (pERK1/2 polyclonal antibody #9101, Akt antibody #9272 or p38 MAPK antibody #9212) at 4 °C overnight and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies was performed, and signals were detected by enhanced chemiluminescence (ECL). All primary antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. The chemiluminescence reagent was poured into the membrane and incubated for 1 - 5 min at room temperature and then excess chemiluminescence reagent was removed. The membrane was placed and covered with plastic wrap. The imaging film was put on top of the membrane for 5 - 10 min depending on the signal

of the protein. The film was developed and analyzed with ImageJ® software.

Statistical analysis

All experimental measurements were tested in triplicate. The results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analysis of data was evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA). Significance level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Anti-proliferative activity

Our preliminary results suggested that the crude extract from *M. oleifera* leaves shows inhibitory effect on cell growth in HCT 116 cells. The crude extracts from *M. oleifera* leaves were separated by size exclusion chromatography with Sephadex LH-20 as described previously [21]. The pooled fractions, MOL1 - MOL4, from the crude extract, were assessed against HCT 116 colon cells for anti-proliferative activity in 24 h (Figure 2a, 2b) and 48 h (Figure 2c, 2d) using an MTT assay. After 24 and 48 h treatment with individual pooled fraction, it was shown that HCT 116 cell growth was significantly inhibited in a concentration-dependent fashion, especially when treated with MOL2, MOL3, and MOL4.

MOL2 and MOL3 from *M. oleifera* leaf extract

The bioactive MOL2 and MOL3 were subjected to further isolation and identification analysis due to their drastic anti-proliferative activity, while MOL4 was not done because of recovery yield limit. Compound A from MOL2 and B from MOL3 were got as a yellow amorphous powder. The ^1H NMR spectra of A and B showed the characteristic signals of flavonoid glycosides. The molecular formula of A and B were indicated as $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ and $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$, respectively by MS, which gave molecular ion peak at m/z 447 and 463 $[\text{M}-\text{H}]^-$. In addition to the mass of compound A and B ^1H NMR spectra showed signals corresponding to a sugar moiety. Thus, the structure of A and B was determined as kaempferol 3-O-glucoside (astragalin) and quercetin 3-O-glucoside (isoquercetin), respectively.

Astragalin: yellow amorphous powder, Molecular formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$. LC-MS: m/z 447 $[\text{M}-\text{H}]^-$. ^1H NMR (600 MHz, CO_3OD): δ ppm 7.92 (d, $J=8.72$, 2H, H-2', 6'), 6.75 (d, $J=8.98$, 2H, H-3', 5'), 6.21 (d, $J=2.05$, 1H, H-8), 6.03 (d, 2.05, 1H, H-6), 5.08 (d, $J=7.18$, 1H, H-1" of Glc) [22].

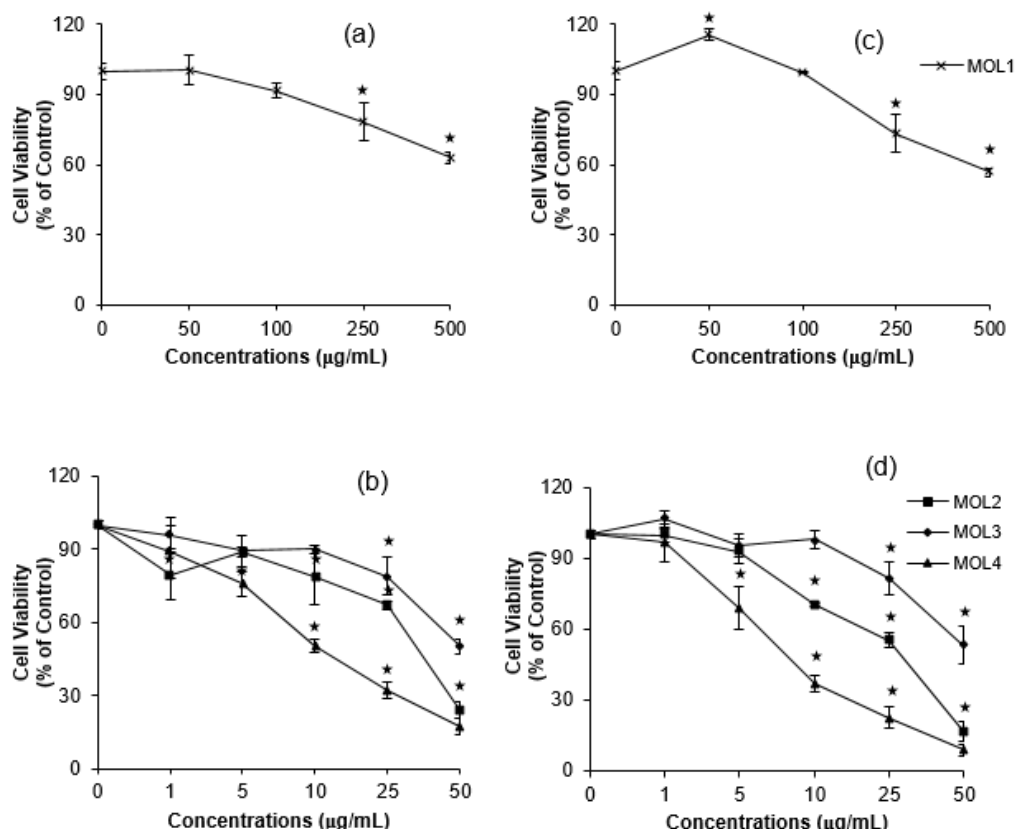


Figure 2: The anti-proliferative activity of each pooled fraction (MOL1-MOL4) on HCT116 cells at different concentrations for 24 h (a, b) and 48 h (c, d). Each value represents the mean $\pm$ SD of the triplicate of cultures, * p <0.05, significantly different from the negative control treated with 0.5 % of DMSO

Table 1: Toxicity of each pooled fraction (MOL1 - MOL4) in HCT116 and NHF cells at 24 h and 48 h

Sample	IC ₄₀ (approx, µg/mL)			
	24 h		48 h	
	HCT116	NHF	HCT116	NHF
MOL1	517.54	> 500	462.60	>500
MOL2	25.84	106.19	19.02	51.52
MOL3	41.38	52.50	44.02	39.20
MOL4	9.50	17.04	5.04	17.70
Astragalin	> 500	NA	> 500	NA
Isoquercetin	68.52	NA	5.41	NA

NA = not determined

Isoquercetin: yellow amorphous powder, Molecular formula: C₂₁H₂₀O₁₂, LC-MS: m/z 463 [M-H]⁻. ¹H NMR (600 MHz, CO₃OD) δ ppm 7.70 (d, J =2.31, 1H, H-2'), 7.58 (dd, J =2.31, 8.46, 1H, H-6'), 6.86 (d, J =8.46, 1H, H-5'), 6.35 (d, J = 2.05, 1H, H-8), 6.17 (d, J =2.05, 1H, H-6), 5.23 (d, J =7.69, 1H, H-1'' of Glc).

The peaks assigned in ¹H NMR corresponded to previous studies [23,24].

Cell proliferation inhibitory effect

In order to confirm that the anti-proliferative activity of *M. oleifera* leaf extracts may come

from their major compounds and may have a different effect on normal and cancer cells, the determination of cytotoxicity in normal human fibroblast (NHF) and HCT116 cells was done at 24 and 48 h (Table 1). Because insufficient protein lysate obtained when IC₅₀ was used in the cell, IC₄₀ was used instead in Western blot analyses.

The results showed that the cytotoxic effect of *M. oleifera* leaf extracts in HCT116 cells was higher than that in NHF cells. Although, MOL2 contained astragalin, the cytotoxicity of MOL2 was likely higher than its major component. In contrast, MOL3 contained isoquercetin, the

cytotoxicity of MOL3 was higher than its major component in 24 h of treatment but less than that in 48 h. Moreover, the cytotoxicity associated with *M. oleifera* leaf extracts in HCT116 was higher than that in the NHF normal cell line, demonstrating that normal cells are more resistant to the extract than cancer cells.

To clarify the anti-proliferation mechanism of *M. oleifera* leaf extracts in 48 h treated HCT116 cells, the protein expression of ERK, AKT, and p38 MAPK was further examined using the total

protein from cells treated with various concentrations (two-fold of IC_{40} , IC_{40} and one-half fold of IC_{40} value). Two anti-cancer drugs, adriamycin, and cisplatin, were used as positive control. Our results showed that HCT116 treated with *M. oleifera* leaf extracts resulted in drastically decreased p-ERK1/2 and little decreased AKT expression, but not p38 MAPK in a concentration dependent manner. Moreover, both adriamycin and cisplatin treatment showed a similar effect (Figure 3).

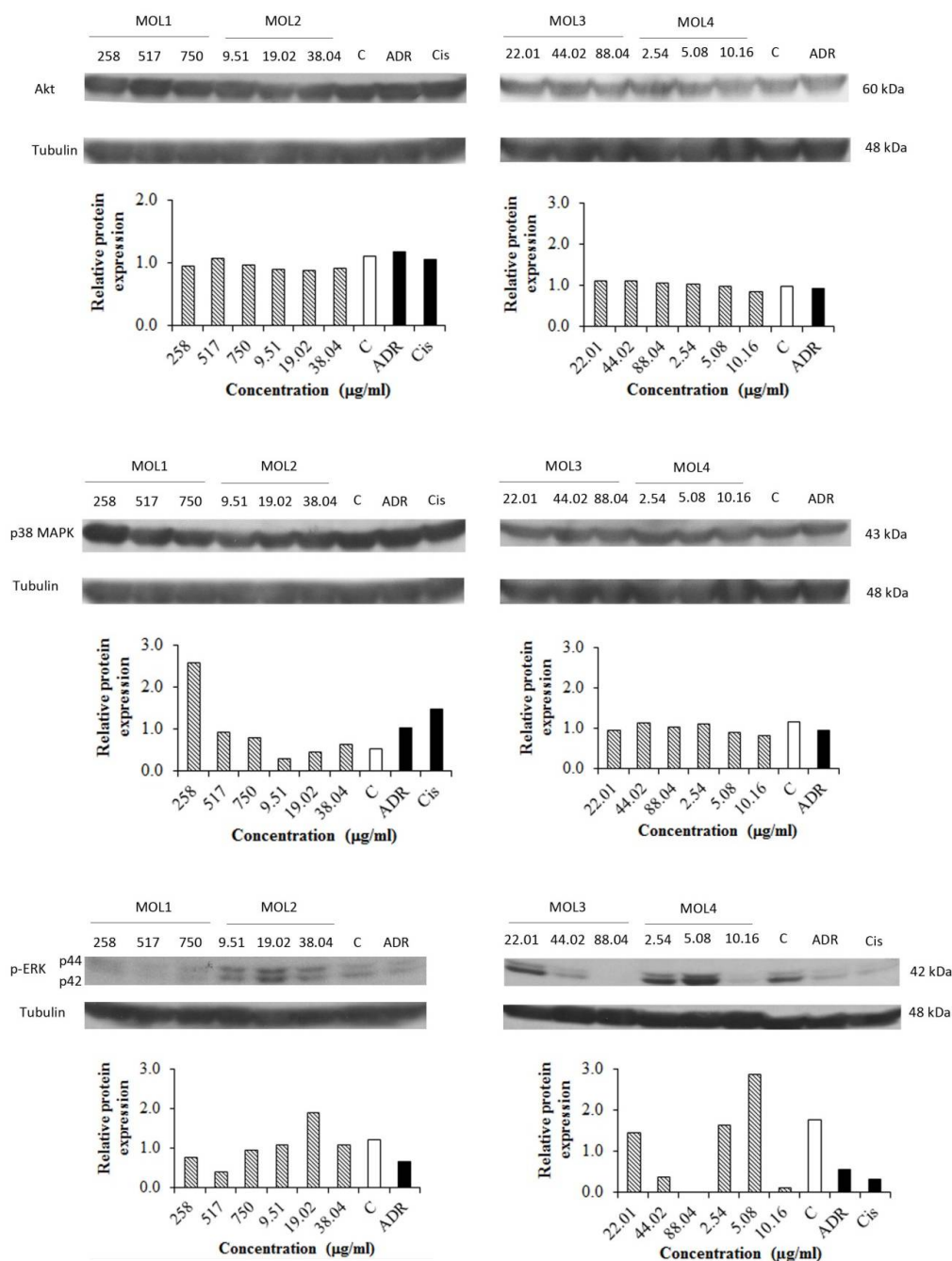


Figure 3: Effect of each pooled fraction (MOL1-MOL4) in HCT116 cells at 48 h of treatment on AKT (upper panel), p38 MAPK (middle panel) and phospho-ERK1/2 (lower panel) expression using western blot and ImageJ® software analysis. Tubulin was used as loading control. Adriamycin (0.1 µg/mL) and cisplatin (125 µg/mL) were used as positive control

DISCUSSION

In Thailand, colon cancer is considered the most common cancer in men and the third in women [3]. The development and invasion process of cancers including colon cancer is correlated with PI3K/AKT and RAS/RAF/MEK/ERK pathways [20]. The concomitant activation of AKT and ERK pathway leads to enhanced cancer progression and metastasis. Chemoprevention by natural products to inhibit or prevent tumorigenesis is a new strategy for cancer control [25]. *M. oleifera* has long been used in Thai cuisine. Its leaves are a good source of nutrients and bioactive compounds [26]. There are many reports suggesting that *M. oleifera* leaves possess anti-cancer properties with their anti-oxidant activity [8,9,11,14] or by down-regulating NF- κ B [27].

The present study focused on anti-proliferation activity and mechanism of action of four pooled fractions from *M. oleifera* leaf extract against HCT116 colon cancer cell line. In accordance with previous study, this method of extraction i.e. column chromatography is also effective in separation of major flavonoid glycosides, astragalin, and isoquercetin in *M. oleifera* leaves, [15]. Both astragalin and isoquercetin are shown to have antioxidant and anti-proliferative activities [28]. Therefore, the presence of astragalin and isoquercetin in *M. oleifera* leaf may be responsible for the promising property in chemoprevention. That was suggested by a significant suppression of HCT116 cell proliferation with the pooled fractions, especially MOL2-MOL4.

As mentioned above, ERK and AKT pathways are important for proliferation and survival of cancer cells. Furthermore, there are few studies on the effect of *M. oleifera* leaf on these pathways in colorectal cancer. The results show that the phosphorylation of ERK1/2 was dramatically inhibited by *M. oleifera* leaf fractions, along with a small reduction in AKT expression, but not p38 MAPK.

Taken together, the results show that *M. oleifera* leaf extract inhibits HCT116 cell proliferation through downregulation of ERK1/2 phosphorylation.

CONCLUSION

Column chromatography has successfully been used for the separation of two flavonoid glycosides, astragalin, and isoquercetin, from bioactive fractions of *M. oleifera* leaf extracts. The bioactive fractions exhibit anti-proliferative activity against colon cancer cells that is different

from standard compounds. A likely mechanism of action of the anti-proliferative activity is pERK1/2 downregulation. Further studies are necessary to investigate the precise components as well as other molecular mechanisms of action.

DECLARATIONS

Acknowledgement

The authors thank Dr Chatchai Chinpaisan for his kind suggestion in the manuscript preparation. This study was supported in part by Excellent International Student Scholarship between Chiba University/Silpakorn University, Silpakorn University Research and Development Institute (Grant no. SURDI 58/01/12), Thailand Research Fund (TRF) (no. MRG5680119), and Grants-in-Aid for Scientific Research (NY, 15K07922) from Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

Conflict of Interest

No conflict of interest associated with this work.

Contribution of Authors

The authors declare that this work was done by the authors named in this article and all liabilities pertaining to claims relating to the content of this article will be borne by them.

Open Access

This is an Open Access article that uses a funding model which does not charge readers or their institutions for access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) and the Budapest Open Access Initiative (<http://www.budapestopenaccessinitiative.org/read>), which permit unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited.

REFERENCES

1. Dobrossy L. Cancer mortality in central-eastern Europe: facts behind the figures. *Lancet Oncol* 2002; 3: 374-381.
2. Neumann J, Boerries M, Köhler R, Giaisi M, Krammer PH, Busch H, Li-Weber M. The natural anticancer compound rocaglamide selectively inhibits the G1-S-phase transition in cancer cells through the ATM/ATR-mediated Chk1/2 cell cycle checkpoints. *Int J Cancer* 2014; 15(134): 1991-2002.
3. Information Technology Division. National Cancer Institute, B. Cancer report year 2011, National Cancer

- Institute (NCI): Bangkok, Thailand, 2011.
4. Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Rakariyatham N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chem* 2005; 92: 491-497.
5. Manosroi J, Dhumentan P, Monosroi A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett* 2006; 235: 114-120.
6. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. *Phytother Res* 2007; 21: 17-25.
7. Zhou Jr Yu L, Zhong Y, Blackburn GL. Soy phytochemicals and tea bioactive components synergistically inhibit androgen-sensitive human prostate tumors in mice. *J Nutr* 2003; 133: 516-521.
8. Budda S, Butryee C, Tuntipopipat S, Rungsipipat A, Wangnaithum S, Lee JS, Kupradinun P. Suppressive effects of *Moringa oleifera* Lam pod against mouse colon carcinogenesis induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12: 3221-3228.
9. Pamok S, Saenphet S, Vinitketkumnuem U, Saenphet K. Anti-Proliferation effect of *Moringa oleifera* and *Psenderanthera palatiferum* extracts on the colon cancer cell. *J Med Plants Res* 2012; 6: 139-145.
10. Guevara AP, Vargas C, Sakurai H, Fujiwara Y, Hashimoto K, Maoka T, Kozuka M, Ito Y, Tokuda H, Nishino H. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutat Res* 1999; 6: 181-188.
11. Bose CK. Possible role of *Moringa oleifera* Lam. root in epithelial ovarian cancer. *Med Gen Med* 2007; 9: 26.
12. Peixoto JRO, Silva GC, Costa RA, Fontenelle JLS, Vieira GHF, Filho AAF, Vieira RHSF. In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. *Asian Pac J Trop Med* 2011; 4: 201-204.
13. Chuang P, Lee C, Chou J, Murugan M, Shieh B, Chen H. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresour Technol* 2007; 98: 232-236.
14. Sreelatha S, Jeyachitra A, Padma PR. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 1270-1275.
15. Vongsak B, Sithisarn P, Gritsanapan W. Simultaneous determination of crypto-chlorogenic acid, isoquercetin, and astragalins contents in *Moringa oleifera* leaf extracts by TLC-densitometric method. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 917609. doi: 10.1155/2013/917609. Epub 2013 Feb 25.
16. Cho IH, Gong JH, Kang MK, Lee EJ, Park JH, Park SJ, Kang YH. Astragalins inhibit airway eotaxin-1 induction and epithelial apoptosis through modulating oxidative stress-responsive MAPK signaling. *BMC Pulm Med* 2014; 29: 122. doi: 10.1186/1471-2466-14-122.
17. Vongsak B, Mangmool S, Gritsanapan W. Antioxidant activity and induction of mRNA expressions of antioxidant enzymes in HEK-293 cells of *Moringa oleifera* leaf extract. *Planta Med* 2015; 81: 1084-1089.
18. Valentová K, Vrba J, Banciřová M, Ulrichová J, Křen V. Isoquercetin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem Toxicol* 2014; 68: 267-282.
19. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer* 2010; 62: 1-20.
20. Ye Q, She QB. Integration of AKT and ERK Signaling Pathways in Cancer: Biological and Therapeutic Implications. *J Pharmacol Clin Toxicol* 2013; 1(2): 1009.
21. Tragulpakseerojn J, Yuki R, Honda T, Morii M, Apirakaramwong A, Yamaguchi N, Pamonsinlapatham P, Yamaguchi N. Apoptotic activities of the extract from *Moringa oleifera* leaves on human HCT 116 colon cancer cells. *Fund Toxicol Sci* 2014; 1: 143-149.
22. Robard K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J Chromatogr A* 2003; 1000: 657-691.
23. Kazuma K, Noda N, Suzuki M. Flavonoid composition related to petal color in different lines of *Clitoria ternatea*. *Phytochem* 2003; 64: 1133-1139.
24. Kazuma K, Noda N, Suzuki M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochem* 2003; 62: 229-237.
25. Khoogar R, Kim BC, Morris J, Wargovich MJ. Chemoprevention in gastrointestinal physiology and disease. Targeting the progression of cancer with natural products: a focus on gastrointestinal cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016; 310(9): G629-G644.
26. Leone A, Fiorillo G, Criscuoli F, Ravasenghi S, Santagostini L, Fico G, Spadafranca A, Battezzati A, Schiraldi A, Pozzi F, di Lello S, Filippini S, Bertoli S. Nutritional characterization and phenolic profiling of *Moringa oleifera* Leaves grown in Chad, Sahrawi Refugee Camps, and Haiti. *Int J Mol Sci* 2015; 16(8): 18923-18937.
27. Berkovich L, Earon G, Ron I, Rimmon A, Vexler A, Lev-Ari S. *Moringa oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappa B and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 2013; 13: 212.
28. Yi J, Wu JG, Wu YB, Peng W. Antioxidant and anti-proliferative activities of flavonoids from *Bidens pilosa* L var *radiata* Sch Bip. *Trop J Pharm Res* 2016; 15(2): 341-348.



Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)

34th International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences and
2nd CU FPhS - RIKEN CDB Symposium
(IAMPS34 and 2nd CU FPhS - RIKEN CDB)

Anti-proliferation effect of *Moringa oleifera* Lam. extracts on human cancer cell lines

Auayporn Apirakramwong¹, Jintana Tragulpakseerojn¹, Chavalit Sithisombut²,
Perayot Pamonsinlapatham^{3*}

¹Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

²Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

³Department of Health Informatics, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

* Corresponding author: Tel. +66(0)3425-5800; Fax. +66(0)3425-5801;
E-mail address: pamonsinlapatham_p @su.ac.th

Keywords: *Moringa oleifera*, pod, anti-proliferation, cancer cell lines

Introduction

Cancer is the first cause of death^{1,2} and it continues increasing death in Thai population during 2006-2011.³ Many naturally derived anti-cancer drugs have been successfully developed to a current drug such as paclitaxel, vincristine, and vinblastine. *Moringa oleifera* Lam. (MO) is commonly found in Southeast Asia. It is widely used for food due to its nutritional value and is applied in traditional medicine formula.^{4,5}

MO is a species of Moringaceae family. It is a short, slender perennial tree. It is widely cultivated and naturalized in many countries including India, Africa, Sri Lanka, Mexico, Malaysia, the Philippine Islands^{4,6}, and Thailand. MO leaves contain natural compounds with anti-bacterial⁷ and anti-fungal⁸ properties. Moreover, various parts of MO have many other activities. For instance, the extracts from its leaves, bark and seeds exhibit anti-cancer activity.^{9,10} MO root extracts inhibit epithelial ovarian cancer growth.¹¹ MO leaf extracts also show anti-inflammatory effect.¹² MO pod extracts possess an anti-diabetes activity.¹³

Although MO has been used for a long time in many countries, there are few toxicity reports from this plant. Recently, in Sprague-Dawley (S-D) rat toxicity test, the leaf extracts from MO is genotoxic at supra-supplementation level of 3,000 mg/kg body weight. However, intake is safe at levels $\leq$ 1,000 mg/kg body weight.¹⁴ Oral administration MO of leaf crude extract at the dose of 10 g/kg reveals that MO has no acute toxicity in mice.¹⁵ Study of MO leaf extract given by oral route (dose 6,400 mg/kg) in Wistar albino mice and by intraperitoneal route (dose 2,000 mg/kg) has no effects to sperm quality, hematological and biochemical parameters, respectively.¹⁶

Although there are many studies seeking for new anti-cancer drugs from natural sources which may be less toxic and have higher activity, the new ones are few. Although MO has demonstrated a variety of biological activities, the studies on the activity related to colorectal cancer inhibition are limited. Therefore, the present investigation was undertaken to elucidate the anti-proliferative activity of various parts from MO on colon and cervical cancer cells. Moreover, to mimic metastasis, the colony formation assay was performed as well.

Methods

Plant material and extraction method

Fresh MO was collected from Nakhon Pathom province, Thailand during January–2013–November 2014. Plants were cleaned and separated into different parts as follows: leaf, L; flower, F; pod or fruit, P; root, R; bark, B; and wood, W, respectively. They were cut into small pieces, and dried under incubator at 50–60°C for 3–5 days. Dried plants were powdered by homogenizer, and then each part of the plant powder was extracted with methanol using Soxhlet apparatus for 3 days at 50–60°C. Methanol was removed by evaporator and the crude extracts were protected from light and kept in glass container at 4°C until used.

Cell proliferation by MTT assay

The human colorectal carcinoma cell-lines, HCT116 and HT29, and human cervical adenocarcinoma cell line, HeLa cells, were obtained from American Type Culture Collection, ATCC (Manassas, VA).

Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (Gibco BRL Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml, streptomycin (Sigma). Cells were grown in a humidified incubator at 37°C under 5% CO₂/air and used for assays during exponential phase of growth. The MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was carried out as recommended by the manufacturer. Briefly, cells were plated at 3,000 cells/well in 96-well flat bottom microplates overnight. Cells were exposed to 100 µg /mL of tested compound for 24 h and 48 h. Then, all solution was removed and cells were washed three times with sterile phosphate buffered saline (PBS). After adding fresh medium, the MTT solution (Sigma) were added at a final concentration of 1 mg/ml, and incubated at 37°C for 4 h. Cells were then lysed with 50 µL dimethyl sulfoxide (DMSO). The optical density was measured with a Bio-Rad Coda microplate analyzer at the wavelength of 450 nm. The assay was done in triplicate. Data were expressed as % inhibition of cell proliferation which was calculated according to the following formula: $[1 - (\text{OD treated cells} / \text{OD untreated cells})] \times 100$. The positive and negative controls were 50 µg/mL cisplatin treated and non-treated cells, respectively.

Colony formation assay

In vitro colony formation assay was conducted according to the standard protocol.¹⁷ Briefly, cells were seeded at 1,000 cells/well in 6-well plates (multiple 60-mm plates). Then, they were treated with 100 µg/mL pod extract, using 50 µg/mL cisplatin and 1% DMSO treatment as the positive or negative control, respectively. Forty-eight hours after treatment, the media were replaced with fresh media, and the plates were incubated at 37°C. After three weeks, cells were washed with PBS solution, fixed with 4% para-formaldehyde solution, and then stained with a 0.1% crystal violet solution. The number of colonies, defined as >50 cells/colony, was counted and plates were photographed.

Statistical analysis

Data are expressed as means $\pm$ SD of three independent experiments. Statistical analysis of the experimental data was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) and p-values less of than 0.05 were considered to be significant.

Results

MO methanol extracts obtained from six parts (L, F, P, R, B and W) of the plant were subjected to preliminary phytochemical screening using standard procedures (Data not shown).

Cell proliferation assay: The extracts from MO were tested for anti-proliferative activity using MTT assay against three different human cancer cell lines (HCT116, HT29 and HeLa cells).

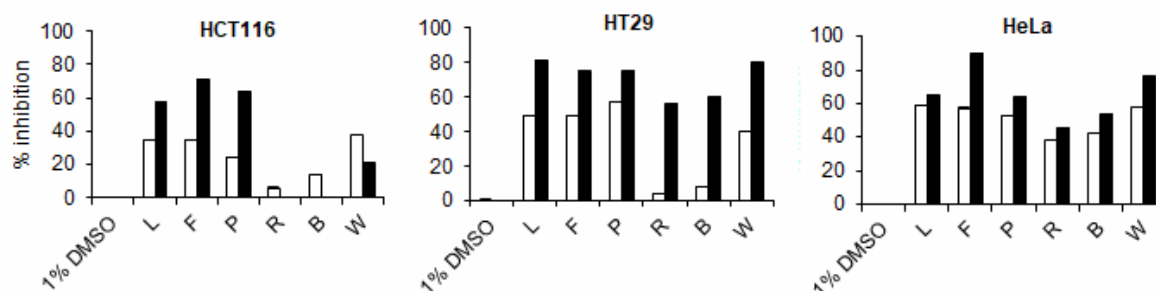


Figure 1. Anti-proliferative effect of various MO extracts (100 µg /mL) on three human cancer cell lines at 24 h (□) and 48 h (■) of treatment. Graph represented % inhibition of cell proliferation compared to 1% DMSO as a negative control, L, leaf; F, flower; P, pod; R, root; B, bark and W, wood.

As shown in Figure 1, the extracts from leaf, flower and pod showed a significant anti-proliferative effect on HCT116, HT29 and HeLa cells after 24 h (more than 30% inhibition) and 48 h (more than 60% inhibition) treatment compared to 1% DMSO as a negative control ($p \leq 0.05$). HT29 and HeLa cells treated with extracts of root, bark, and wood for 48 h also exhibited anti-proliferative effect.

Since MO pods are used as a vegetable in Thai cuisine and the extract also showed strong inhibitory effect on cancer cell growth, the pod extract was selected for further experiment. The anti-proliferative effect of the pod extract was tested on HCT116, HT29 and HeLa cells compared to a well-known anti-cancer drug, cisplatin.

Figure 2 shows the anti-proliferative effect of pod extract at different concentrations after 24 h treatment on three types of cancer cells, compared to cisplatin. It was clear that the extract from MO pods could inhibit cell proliferation comparable to cisplatin.

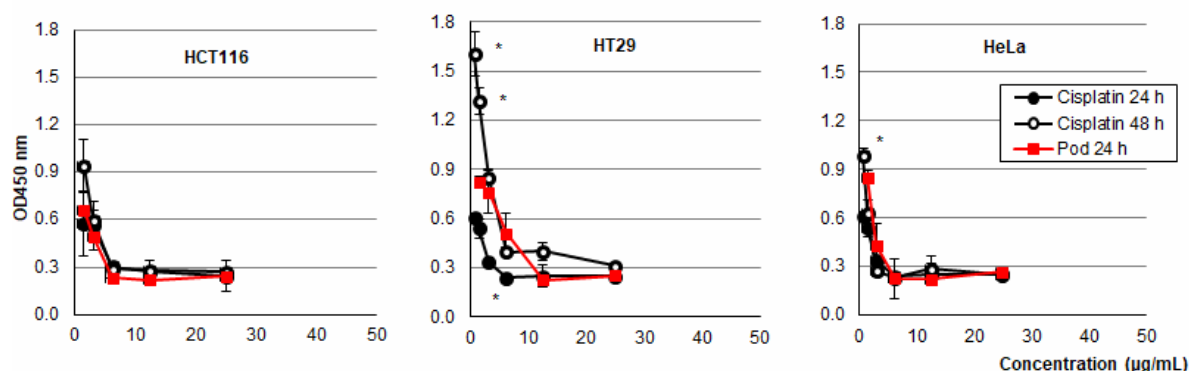


Figure 2. Anti-proliferative effect of five concentrations of Moringa pod extracts ($\mu\text{g/mL}$) on HCT116, HT29 and HeLa cells after 24 h treatment, using 50 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin as the positive control.

Colony formation assay: The cytotoxicity of the pod extract was further investigated using longer contact time (48 h) in colony formation assay. After 24 h pretreatment with the pod extract, cells that survived were allowed to grow for 3 weeks in fresh medium without extract or cisplatin (as a positive control). The results showed that the extract at the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ significantly decreased cell proliferation in all cell types (Figure 3).

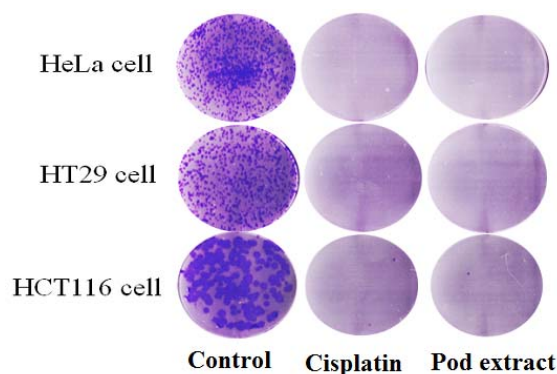


Figure 3. Colony formation assay using three different human cancer cell lines. Cells were treated with 100 $\mu\text{g/mL}$ Moringa pod extract or 50 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin for 48 h. After replacing fresh medium, cells were allowed to grow for three weeks. Then, they were stained with crystal violet. The untreated cells were used as a control.

Discussion

MO extracts contained major phytochemicals such as flavonoids, coumarins, tannins and phenolic compounds except anthraquinones and alkaloids. It has been reported that major phytochemicals found in MO were flavonoids and coumarins.^{4,18}

It had been reported that MO leaf extracts can inhibit the growth of pancreatic cancer cells¹⁹, lung adenocarcinoma cells²⁰, and alveolar epithelial cancer cells.²¹ In the present study, we also discovered that leaf, flower, and pod extracts of MO possessed high anti-proliferative effect on three types of human cancer cells (2 colorectal cancer cells: HCT116, HT29 and a cervical cancer, HeLa cells). The growth inhibitory effect of the extracts could be correlated to the incubation or contact time. After 48 h exposure to the extracts, nearly 100 % cell death was observed. The mechanism underlying of this activity might be relevant to the activity of MO leaf extract^{20,22}, which should be further clarified.

Conclusion

In summary, we showed that MO extracts had anti-proliferative effect and could inhibit colony formation in colorectal and cervical cancer cells. Therefore, MO extracts may be a potential source to discover anti-cancer compounds.

Acknowledgements

This study was supported in part by Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Silpakorn University Research and Development Institute (Grant No. SURDI 58/01/12) and the Thailand Research Fund (TRF) (MRG5680119).

References

1. Dobrossy L. Cancer mortality in central-eastern Europe: facts behind the figures. *Lancet Oncol.* 2002;3(6):374-81.
2. Neumann J, Boerries M, Kohler R, Giaisi M, Krammer PH, Busch H, Li-Weber M. The natural anticancer compound rocaglamide selectively inhibits the G1-S-phase transition in cancer cells through the ATM/ATR-mediated Chk1/2 cell cycle checkpoints. *Int J Cancer.* 2014;134(8):1991-2002.
3. National Cancer Institute (NCI), Information Technology Division. Cancer report year 2011. Bangkok: National Cancer Institute (NCI); 2011.
4. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother Res.* 2007;21(1):17-25.
5. Caceres A, Cabrera O, Morales O, Mollinedo P, Mendia P. Pharmacological properties of *Moringa oleifera* 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 1991;33(3):213-6.
6. Bhatnagar M, Parwani L, Sharma V, Ganguli J, Bhatnagar A. Hemostatic, antibacterial biopolymers from *Acacia arabica* (Lam.) Willd. and *Moringa oleifera* (Lam.) as potential wound dressing materials. *Indian J Exp Biol.* 2013;51(10): 804-10.
7. Eilert U, Wolters B, Nahrstedt A. The antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*. *Planta Medica.* 1981;42(5):55-61.
8. Batista AB, Oliveira JT, Gifoni JM, Pereira ML, Almeida MG, Gomes VM, Da Cunha M, Ribeiro SF, Dias GB, Beltrami LM, Lopes JL, Grangeiro TB, Vasconcelos IM. New insights into the structure and mode of action of Mo-CBP3, an antifungal chitin-binding protein of *Moringa oleifera* seeds. *PLoS One.* 2014 Oct 27;9(10):e111427. doi: 10.1371/journal.pone.0111427.
9. Al-Asmari AK, Albalawi SM, Athar MT, Khan AQ, Al-Shahrani H, Islam M. *Moringa oleifera* as an anti-cancer agent against breast and colorectal cancer cell lines. *PLoS One.* 2015 Aug 19;10(8):e0135814. doi: 10.1371/journal.pone.0135814.
10. Sreelatha S, Jeyachitra A, Padma PR. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(6):1270-5.
11. Bose CK. Possible role of *Moringa oleifera* Lam. root in epithelial ovarian cancer. *MedGenMed.* 2007;9:26.
12. Adedapo AA, Falayi OO, Oyagbemi AA. Evaluation of the analgesic, anti-inflammatory, anti-oxidant, phytochemical and toxicological properties of the methanolic leaf extract of commercially processed *Moringa oleifera* in some laboratory animals. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2015 Sep;26(5):491-9. doi: 10.1515/jbcpp-2014-0105.
13. Gupta R, Mathur M, Bajaj VK, Katariya P, Yadav S, Kamal R, Gupta RS. Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes. *J Diabetes.* 2012 Jun;4(2):164-71. doi: 10.1111/j.1753-0407.2011.00173.x.
14. Asare GA, Gyan B, Bugyei K, Adjei S, Mahama R, Addo P, Otu-Nyarko L, Wiredu EK, Nyarko A. Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. *J Ethnopharmacol.* 2012;139(1):265-72.
15. Chivapat S, Sincharoenpokai P, Saktiyasuthorn N, Shuaprom A, Thongsrirak P, Sakpetch A, Rungsipipa A. Acute and chronic toxicity of *Moringa oleifera* Linn leaves extracts. *Thai J Vet Med.* 2011;41(4):417-24.
16. Awodele O, Oreagba IA, Odoma S, da Silva JA, Osunkalu VO. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). *J Ethnopharmacol.* 2012;139(2):330-6.
17. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocol.* 2006;1: 2315-2319. doi:10.1038/nprot.2006.339.
18. Alhakmani F, Kumar S, Khan S A. Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013;3(8):623-7.
19. Berkovich L, Earon G, Ron I, Rimmon A, Vexler A, Lev-Ari S. *Moringa Oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:212. http://doi.org/10.1186/1472-6882-13-212.
20. Jung IL. Soluble extract from *Moringa oleifera* leaves with a new anticancer activity. *PLoS One.* 2014 Apr 18;9(4):e95492. doi: 10.1371/journal.pone.0095492.
21. Tiloke C, Phulukdaree A, Chuturgoon AA. The antiproliferative effect of *Moringa oleifera* crude aqueous leaf extract on cancerous human alveolar epithelial cells. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:226. http://doi.org/10.1186/1472-6882-13-226.
22. Tragulpakseerojn J, Yamaguchi N, Pamonsinlapatham P, Wetwitayaklung P, Yoneyama T, Ishikawa N, Ishibashi M, Apirakaramwong A. Anti-proliferative effect of *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae) leaf extract on human colon cancer HCT116 cell line. *Trop J Pharma Res.* 2017;16(2): 371-8.