

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5780035  
 ชื่อโครงการ: ผลกระตุ้นของสารสำคัญจากสองฟ้าต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ด้วยเทรล  
 ชื่อนักวิจัย: ผศ.ดร.พรทิพย์ ไวกูณ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
 E-mail Address : [pwaiwut79@yahoo.com](mailto:pwaiwut79@yahoo.com), [porntip.w@ubu.ac.th](mailto:porntip.w@ubu.ac.th)  
 ระยะเวลาโครงการ : 2 มิถุนายน พ.ศ. 2557 ถึงวันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2559

เทรล (TRAIL, TNF-related apoptosis inducing ligand) เป็นไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสอย่างจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งแต่ไม่ทำลายเซลล์ปกติ ดังนั้นจึงมีการนำเทรลมาใช้ศึกษาวิจัยในการรักษามะเร็ง อย่างไรก็ตามพบว่ายังมีเซลล์มะเร็งหลายชนิดที่ต่อต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายด้วยเทรล เพื่อหาแนวทางในการพัฒนายาต้านมะเร็งที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสำคัญจากพืชสมุนไพรพื้นบ้าน คือ สองฟ้า (*Clausena harmandiana*) โดยใช้สารสำคัญสองกลุ่มคือ คูมาริน ได้แก่ dentatin และ nordentatin และสารกลุ่ม คาร์บาโซล ได้แก่ heptaphyllin และ 7-methoxyheptaphylline ต่อการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT29) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเทรล การทดสอบผลของสารสำคัญต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ HT29 และ เซลล์ลำไส้ปกติ (FHC colon normal cells) วัดด้วยวิธี MTT assay หลังจากนั้นศึกษารูปร่างเซลล์และลักษณะการตายของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast microscope มียา doxorubicin เป็นสารมาตรฐาน สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของสารสำคัญได้มีการวัดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสด้วยวิธี Western blotting และศึกษาการแสดงออกของ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR และ Real time RT-PCR ผลการทดลองพบว่าสารสำคัญ dentatin nordentatin และ 7-methoxyheptaphylline สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งลำไส้ HT29 ได้ตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นโดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (FHC cells) ในขณะที่ heptaphyllin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติแต่ทำให้เซลล์ตายต่ำกว่าร้อยละห้าสิบของเซลล์ที่มีชีวิต และจากการทดลองพบว่า heptaphyllin ในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ผ่าน intrinsic pathway เมื่อทำการทดลองโดยใช้ dentatin และ heptaphyllin ร่วม TRAIL ในการเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งลำไส้ให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส พบว่า dentatin และ heptaphyllin ไม่มีผลที่มีนัยสำคัญต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของ HT29 ด้วย TRAIL แต่เมื่อเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งลำไส้ด้วย nordentatin และ 7-methoxyheptaphyllin ร่วมกับ TRAIL พบว่าสามารถเพิ่มการตายของเซลล์มะเร็งด้วยการเพิ่มการกระตุ้น cleavage ของ caspase-3 และ PARP-1 ซึ่งเป็น marker ของ apoptosis มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในการศึกษากลไกของ nordentatin และ 7-methoxyheptaphyllin ร่วมกับ TRAIL ต่อการตายของ HT-29 cells พบว่า nordentatin และ 7-methoxyheptaphyllin สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ TRAIL receptor หรือ death receptor 5 (DR5) mRNA และ protein สูงขึ้นโดยมีกลไกผ่านวิถีของ JNK งานวิจัยนี้ค้นพบว่าสารสำคัญจากสองฟ้าคือ 7-methoxyheptaphyllin และ nordentatin มีฤทธิ์ในการเพิ่มความไวของเซลล์มะเร็งลำไส้ต่อการเหนี่ยวนำด้วย TRAIL ด้วยการกระตุ้นการแสดงออกของ DR5 โดยมีกลไกผ่านวิถี JNK

**Keywords:** สองฟ้า เทรล ดีอาร์-5 คูมาริน คาร์บาโซล

## Abstract

---

**Project Code :** TRG5780035

**Project Title :** Sensitizing Effects of Active Constituents of *Clausena harmandiana* on TRAIL-mediated Colorectal Adenocarcinoma Cells Death

**Investigator :** Pornthip Waiwut, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University

**E-mail Address :** [pwaiwut79@yahoo.com](mailto:pwaiwut79@yahoo.com), [porntip.w@ubu.ac.th](mailto:porntip.w@ubu.ac.th)

**Project Period :** 2 June 2014 to 1 June 2016

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) is a cytokine that can selectively induce apoptosis in cancer cells without damaging normal cells. Regarding current research finding, a number of cancer cells are resistant to TRAIL-induced apoptosis. This study was designed to investigate the molecular mechanisms of antitumor activity of active constituents of Songfa (*Clausena harmandiana*), including two coumarin based compounds (dentatin and nordentatin) and two carbazole based compounds (heptaphyllin and 7-methoxyheptaphylline). The molecular mechanisms of antitumor activities of these compounds in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) were investigated in HT29 colorectal adenocarcinoma cells. The quantification of cell viability was performed by using cell proliferation assay (MTT assay) and the cell morphology was investigated by phase contrast microscope. The molecular mechanisms were studied by Western blotting, RT-PCR and Real time RT-PCR. The results showed that dentatine, nordentatine and 7-methoxyheptaphylline induced cancer cell death in concentration dependent manner without cytotoxic effect to normal colon FHC cells, while hepataphylline showed cytotoxicity to normal cells but not lower than 50% cell viability. Heptaphylline alone induced apoptosis of cancer cells via intrinsic pathway. In combination with TRAIL, dentatin and heptaphylline had no significantly effects to TRAIL-induced HT-29 cell death. While, the cleavage of caspase-3 and PARP-1 were increased when combined nordentatin and 7-methoxyheptaphylline with TRAIL. The investigation of mechanism of nordentatin and 7-methoxyheptaphylline combined with TRAIL on HT-29 cells found that nordentatin and 7-methoxyheptaphylline increased TRAIL receptor, death receptor 5 (DR5) mRNA and protein through JNK pathway. The findings suggested that 7-methoxyheptaphylline and nordentatin of Songfa (*Clausena harmandiana*) sensitized TRAIL-induced human colon adenocarcinoma cell death by increasing expression of DR5 via the JNK pathway.

**Keywords:** *Clausena harmandiana*, TRAIL, DR-5, coumarin, carbazole