

**SCREENING FOR ANTI-METASTATIC AND  
ANTI-ANGIOGENIC AGENTS, AND INVESTIGATION OF  
THEIR MECHANISMS**

The logo of Mahidol University is a circular emblem with a yellow border. Inside the border, the Thai text 'มหาจุฬาลงกรณราชวิทยาลัย' is written in a circular path. The center of the logo features a stylized golden chhatra (umbrella) with a flame-like base, set against a light blue background.

**KRIENGSAK LIRDPRAPAMONGKOL**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(BIOCHEMISTRY)**

**FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การคัดกรองและศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็งและยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ (SCREENING FOR ANTI-METASTATIC AND ANTI-ANGIOGENIC AGENTS, AND INVESTIGATION OF THEIR MECHANISMS)

เกรียงศักดิ์ เลิศประภามงคล 4736006 SCBC/D  
ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ม.ร.ว. ชัยณัฐร สวัสดิวัฒน์, Ph.D. (Molecular Biology), ศ. ดร. อานนท์ บุญยรัตเวช, Ph.D. (Pathobiology), รศ. ดร. ดวงพร สุทธิพงษ์ชัย, Ph.D. (Biochemistry)

บทคัดย่อ

การรุกรานของเซลล์มะเร็งเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยรอบเป็นขั้นตอนสำคัญของการแพร่กระจายของมะเร็งในร่างกาย ก้อนมะเร็งยังชักนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ไม่เพียงแต่มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโต แต่ยังเป็นเส้นทางการแพร่กระจายของมะเร็งด้วย การศึกษานี้มีเป้าหมายที่จะค้นหาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง จากสมุนไพรไทยหรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และศึกษากลไกออกฤทธิ์รวมถึงการประเมินฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของสารดังกล่าว จากการคัดกรอง พบว่าน้ำคั้นจากต้นกะเม็ง (*Eclipta prostrata*) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองได้เป็นอย่างดี ซึ่งพบว่าการยับยั้งกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ น้ำคั้นกะเม็งสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิดและรวมถึงเซลล์ผนังหลอดเลือด โดยมีค่า IC<sub>50</sub> อยู่ระหว่าง 31-70 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร น้ำคั้นกะเม็งยังสามารถยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ในไขไก่ได้ถึง 50% เมื่อทดสอบที่ปริมาณ 200 ไมโครกรัม/ฟอง

ได้เคยมีการแสดงให้เห็นว่าสาร vanillin มีฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็งในหนูทดลอง จึงได้ทำการศึกษากับ A549 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยงของคน พบว่าสาร vanillin และสาร apocynin ที่เป็นสารอนุพันธ์ เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ สารทั้งสองสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง A549 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hepatocyte growth factor ได้ถึง 57% และ 40% ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ด้วย เทคนิค western blot และ *in vitro* lipid kinase assay แสดงให้เห็นว่ากลไกออกฤทธิ์ของสาร vanillin และสาร apocynin เกิดจากการที่สารไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phosphoinositide 3-kinase โดยหมู่อัลดีไฮด์หรือคีโตนที่ตำแหน่ง C-1 ของสารเป็นหมู่ที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ แต่ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารไม่มีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ยับยั้งดังกล่าว สาร vanillin และสาร apocynin ยังสามารถยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ในไขไก่ได้ถึง 28% และ 37% ตามลำดับเมื่อทดสอบที่ปริมาณ 500 นาโนโมล/ฟอง

เคยมีการเสนอว่าเซลล์มะเร็งตับสายพันธุ์ SK-Hep-1 มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ผนังหลอดเลือด อย่างไรก็ดี พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้ไม่มีการตอบสนองต่อ vascular endothelial growth factor และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงนี้ไม่มีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อเซลล์ผนังหลอดเลือด ดังนั้นเซลล์ SK-Hep-1 จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแบบจำลองของการสร้างเส้นเลือดใหม่ในหลอดทดลอง แต่มีประโยชน์ในการศึกษา vasculogenic mimicry

**SCREENING FOR ANTI-METASTATIC AND ANTI-ANGIOGENIC AGENTS,  
AND INVESTIGATION OF THEIR MECHANISMS**

KRIENGSAK LIRDPRAPAMONGKOL 4736006 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS : JISNUSON SVASTI , Ph.D. (MOLECULAR BIOLOGY),  
AHNOND BUNYARATVEJ, Ph.D. (PATHOBIOLOGY), TUANGPORN  
SUTHIPHONGCHAI, Ph.D. (BIOCHEMISTRY)**ABSTRACT**

The ability of cancer cells to invade surrounding tissues is essential in allowing them to spread throughout the body or undergo metastasis. The tumor also induces formation of new blood vessels or angiogenesis, which not only supports tumor growth but also provides an escape path for metastasis. This study aimed to find novel anti-metastatic agents from Thai medicinal plants or natural products, and to investigate their mechanisms, including their anti-angiogenic activity. Juice prepared from *Eclipta prostrata* showed a potent inhibition of cancer invasion in an *in vitro* anti-invasion screening, and this was shown to be due to inhibition of cell migration. The *E. prostrata* juice inhibited cell migration in a variety of human cancer cell types and also in human endothelial cells, with IC<sub>50</sub> values of 31-70 µg/ml. The juice (200 µg/egg) could also inhibit angiogenesis in a chick chorioallantoic membrane (CAM) model, with up to 50% inhibition.

Another compound, vanillin previously shown to have anti-metastatic effect in a mouse model, was also studied using A549 human lung cancer cell line. Vanillin and its derivative, apocynin, (4 mM each) were able to inhibit hepatocyte growth factor-induced cell migration of A549 cells by 57% and 40% inhibition, respectively. Western blot analysis and *in vitro* lipid kinase assay revealed that inhibition of phosphoinositide 3-kinase activity is a mechanism underlying the inhibitory effect of vanillin and apocynin. The aldehyde or ketone group at C-1 position of vanillin and apocynin is important for the inhibitory effects, but antioxidant activity was not important. Vanillin and apocynin (500 nmol/egg) were able to inhibit angiogenesis in the CAM model, by 28% and 37%, respectively.

SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cell line has been proposed to be an endothelial-derived cell line. However, this cell line did not respond to vascular endothelial growth factor, and real-time RT-PCR analysis revealed no expression of endothelial-specific genes in this cell line. Thus, SK-Hep-1 cell line is not suitable for use in the *in vitro* angiogenesis model, but is useful for studying vasculogenic mimicry.

**KEY WORDS : ANTI-METASTATIC / ANTI-ANGIOGENIC / CELL MIGRATION /  
SIGNAL TRANSDUCTION / HEPATOCELLULAR CARCINOMA /  
VASCULOGENIC MIMICRY / MEDICINAL PLANTS**

146 pp.