

Thesis title Antimutagenicity, Cytotoxicity and Antitumor Activity  
of Lemon Grass Extract(*Cymbopogon citriatus* DC Stapf)

Author Miss Rawiwan Puatanachokchai

Master of Science Biochemistry

Examining committee

Assistant Professor Dr. Usanee Vinitketkumnuen Chairperson

Mrs. Porntipa Picha Member

Dr. Nirush Lertprasertsuke Member

Assistant Professor Dr. Prachya Kongtawelert Member

### ABSTRACT

In this investigation, antimutagenicity, cytotoxicity and antitumor activity of 80% ethanolic extract of lemon grass were evaluated. The antimutagenicity of lemon grass extract was examined against various known environmental mutagens such as indirect acting mutagens; AFB<sub>1</sub> (aflatoxin B<sub>1</sub>), Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-5H- pyrido [4,3b] indole), Trp-P-2 (3-amino-1-methyl-5H- pyrido[4,3b] indole), Glu-P-1 (2-amino-6-methyldipyrido [1,2-a': 3'2'-d] imidazole), Glu-P-2 (2-aminodipyrido [1,2-a: 3'2'-d] imidazole), IQ (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline), and B(a)P (Benzo(a)pyrene) and direct acting mutagens; MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) and AF-2 (2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)

furamide). Although, lemon grass extract inhibited the mutagenicity of direct and indirect mutagens in a dose-dependent manner, it could not inhibit mutagenesis induced by B(a)P. Moreover, it showed biphasic effects on the mutagenicity of Trp-P-1 and Trp-P-2. Lemon grass may contain direct and indirect desmutagens compounds. Cytotoxic effects of lemon grass extract were studied in P388 murine lymphocytic leukemia cells (P388 cells) and murine ascites mammary carcinoma cells (FM3A cells). The extract showed no cytotoxicity on both cells lines. The ED<sub>50</sub> values were 401.52 and 87.46 ug/ml in P388 and FM3A cells, respectively.

The antitumor activity of the lemon grass extract was also examined in male C3H mice transplanted with 2% (W/V) fibrosarcoma cells. Two protocols were designed for this experiment. In the first protocol, lemon grass extract was given orally 5 g/kg body weight/day daily for 10 days after transplantation, in the second one, the same amount of lemon grass was given daily for 7 days before and 10 days after transplantation. The results showed that lemon grass extract did not prolong survival time after fibrosarcoma transplantation. However, pathological studies revealed that lemon grass retarded tumor growth and also reduced the severity of lung metastases. Protocol 2 tended to give a better result than protocol 1. It was anticipated that lemon grass might be used for the prevention of carcinogenesis.

When antimutagenic substances in lemon grass extract were partially purified by using Sephadex LH-20 chromatography, all active antimutagenic substances still decreased the mutagenesis of the AFB<sub>1</sub>, Glu-P-1, Glu-P-2, IQ and MNNG, but they could not inhibit mutagenesis of B(a)P and AF-2. Moreover, 4 fractions from Sephadex LH-20 column had no cytotoxic effect on either the cell

ชื่อวิทยานิพนธ์                      การต้านฤทธิ์ก่อการกลาย    ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง  
 และฤทธิ์ด้านการเกิดเนื้องอกโดยสารสกัดจากตะไคร้

ชื่อผู้เขียน                            นางสาววิวรรณ พัชณาโชคชัย

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต    สาขาชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.อุษณีย์  วินิจฉัยค่านวณ ..... ประธานกรรมการ

นางพรทิพา  พิชา ..... กรรมการ

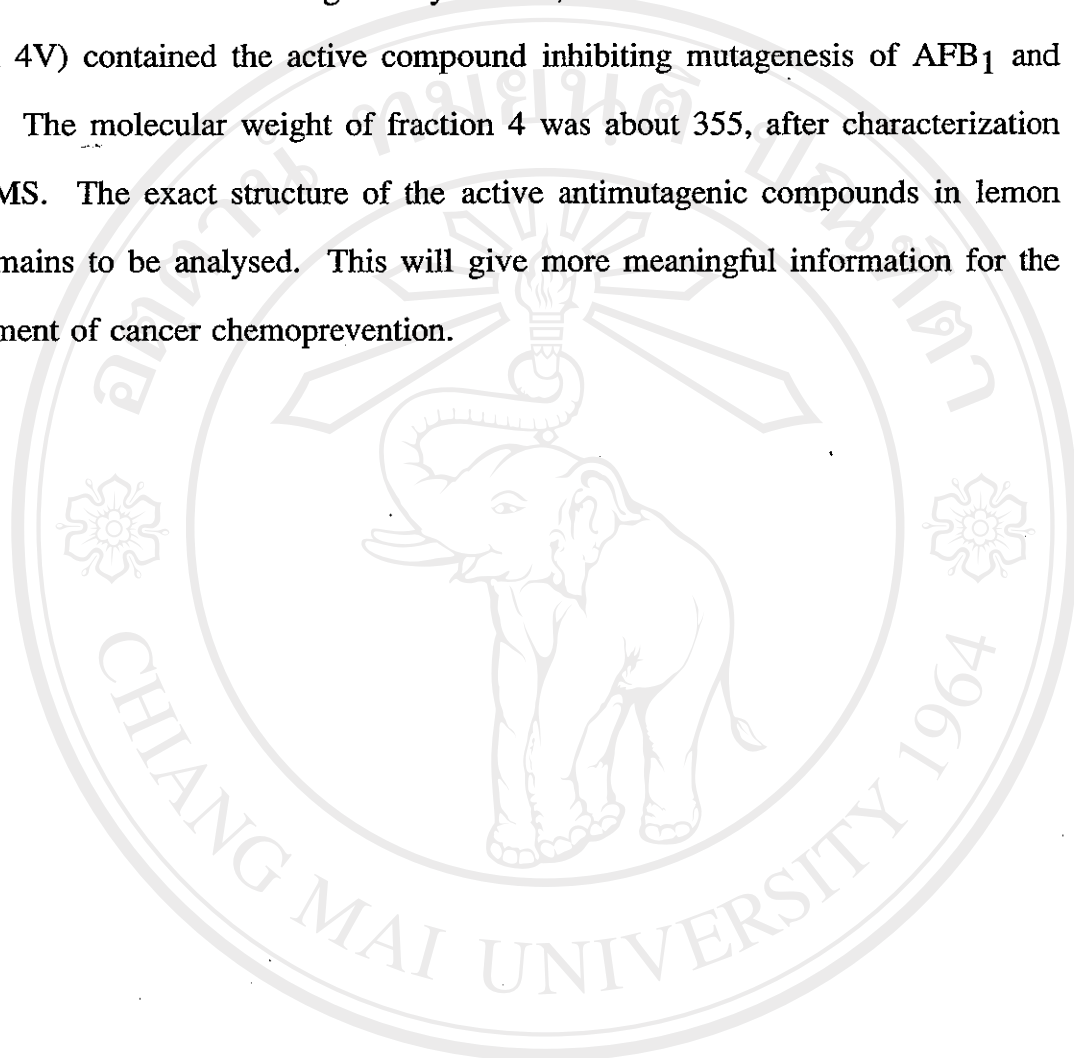
พญ.ดร.นิรัชร์  เลิศประเสริฐสุข ..... กรรมการ

ผศ.ดร.ปรัชญา  คงทวีเลิศ ..... กรรมการ

#### บทคัดย่อ

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาศักยภาพการกลาย ที่เกิดจากสารก่อการกลายชนิดต่าง ๆ , ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ต้านเนื้องอก fibrosarcoma ของสารสกัดส่วน 80% เอทานอลจากตะไคร้ ฤทธิ์ยับยั้งการกลายของสารสกัดตะไคร้ ทำการทดสอบในแบคทีเรียซัลโมเนลลา รัยพีมิวเรียม ด้วยเทคนิค preincubation โดยใช้สารก่อกลาย ได้แก่ AFB<sub>1</sub>, Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, IQ , MNNG, B(a)P และ AF-2 จากการศึกษาพบว่า สารสกัดตะไคร้ดังกล่าวสามารถยับยั้งฤทธิ์ก่อการกลายที่เหนี่ยวนำ โดยสารก่อการกลายดังกล่าว ยกเว้น สาร B(a)P นอกจากนี้ยังแสดง biphasic effect ในการยับยั้งการกลายในแบคทีเรียที่ถูกเหนี่ยวนำ โดย Trp-P-1 และ Trp-P-2 ดังนั้นตะไคร้อาจมีสาร antimutagen ที่มีกลไกแบบที่กระทำต่อสารก่อกลายโดยตรง หรือมีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ที่ต้องการช่วยโคโครม P-450 เพื่อกระตุ้นฤทธิ์ก่อการกลาย จากการ

lines similar to their crude extract. Only fraction 4 showed antimutagenicity of Trp-P-1 and Trp-P-2. Thus, fraction 4 may be a major antimutagens in this study. Fraction 4 was further investigated by HPLC, it was found that the last eluate (fraction 4V) contained the active compound inhibiting mutagenesis of AFB<sub>1</sub> and MNNG. The molecular weight of fraction 4 was about 355, after characterization by GC-MS. The exact structure of the active antimutagenic compounds in lemon grass remains to be analysed. This will give more meaningful information for the development of cancer chemoprevention.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า ตะไคร้ไม่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ P388 Murine lymphocytic leukemia และ FM3A Murine ascites mammary carcinoma โดยค่า ED<sub>50</sub> ต่อเซลล์มะเร็ง P388 เท่ากับ 401.52 มกค./มล. และ ต่อ FM3A เท่ากับ 87.46 มกค./มล.

การศึกษาฤทธิ์ต้านเนื้องอกของสารสกัดจากตะไคร้ โดยใช้หนูถีบจักรสายพันธุ์ C3H เพศผู้ ที่ถูกปลูกถ่ายด้วยเซลล์ Fibrosarcoma ความเข้มข้น 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) การศึกษาครั้งนี้แบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองแรก ศึกษาผลของการให้สารสกัดตะไคร้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ Fibrosarcoma. โดยให้สารสกัดตะไคร้ทุกวัน วันละ 5 กรัม/น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 10 วันหลังการปลูกถ่าย ส่วนการทดลองที่สอง ศึกษาผลของการให้สารสกัดก่อนและหลังการปลูกถ่าย โดยให้สารสกัดปริมาณที่เท่ากันกับการทดลองแรกทุกวัน เริ่มให้ก่อนการปลูกถ่าย 7 วัน และให้ต่อไปหลังการปลูกถ่ายจนครบ 10 วัน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากตะไคร้ ไม่สามารถยืดอายุขัยของหนูหลังการปลูกถ่ายเซลล์ Fibrosarcoma แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทางพยาธิวิทยา พบว่าสารสกัดจากตะไคร้ลดการเจริญเติบโตของก้อนเนื้องอก และนอกจากนี้ยังลดความรุนแรงของการแพร่กระจายไปที่ปอดของมะเร็ง โดยพบว่าการให้สารสกัดตะไคร้ก่อนการปลูกถ่าย มีแนวโน้มในการลดการเจริญและแพร่กระจายของมะเร็งได้ดีกว่าการให้สารสกัดตะไคร้หลังการปลูกถ่าย จากผลการทดลองเบื้องต้นนี้ ทำให้คาดว่า ตะไคร้น่าจะสามารถนำมา ใช้ในการป้องกันการเกิดมะเร็งได้และการรักษามะเร็งเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

การแยกสารสำคัญในสารสกัดตะไคร้ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้ Sephadex LH-20 column chromatography สามารถแยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านการกลายได้ 4 ส่วน และพบว่าสารเหล่านี้ยังคงแสดงฤทธิ์ยับยั้งการกลายจากสารก่อกลาย และไม่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด เช่นเดียวกับสารสกัดหยาบ โดยสารจากตะไคร้ยับยั้งการกลายที่เกิดจากสารก่อการกลาย AFB<sub>1</sub>, Glu-P-1, Glu-P-2, IQ และ MNNG แต่ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายที่เหนี่ยวนำ โดย B(a)P นอกจากนี้พบว่า สารบริสุทธิ์บางส่วนที่มีอยู่เฉพาะใน

ส่วนที่ 4 เท่านั้น ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการกลาย ที่เกิดจาก Trp-P-1 และ Trp-P-2 ด้วยเหตุนี้สารในส่วนที่ 4 น่าจะเป็นสารสำคัญในการแสดงฤทธิ์ยับยั้งการกลายของตะไคร้ จึงศึกษาต่อ โดยทำการแยกสารนี้ด้วยเทคนิคทาง High performance liquid chromatography พบว่ามีสารอีกอย่างน้อย 5 ชนิด ได้แก่ 4I, 4II, 4III, 4IV และ 4V ในส่วนที่ 4V ถูกแยกออกมาที่นาที่ที่ 9.11 เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการกลายที่เกิดจาก AFB<sub>1</sub> และ MNNG พบว่าสารส่วนที่ 4V มีฤทธิ์ยับยั้งการกลายได้ดีที่สุด จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของส่วน 4 V พบว่ามีน้ำหนักเท่ากับ 355 สำหรับโครงสร้างที่แท้จริง ของสารสำคัญในตะไคร้ นี้ยังคงศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved