



รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย (research project)

รหัสโครงการวิจัย 65413000110026_1230010900_1330110026

สภาการวิจัยแห่งชาติ

เรื่อง

ผลของเหงือกปลาหมอดอกขาวต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ และต่อการ
เติบโตของ เซลล์มะเร็งปากมดลูก ที่ปลูกบนผิวหนังของหนูผู้ด้อย

**Effects of *Acanthus ebracteatus* Vahl. on Tumor Angiogenesis
and on Tumor Growth in Cervical Cancer Implanted Nude Mice**

โดย

รองศาสตราจารย์. ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช
ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางหลอดเลือดจุกฤภาค
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รองศาสตราจารย์. ดร. ภาวพันธ์ ภัทร โกศล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ดร. สัตยญา หกพุดชา
สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	iii
สารบัญตาราง.....	v
สารบัญภาพ.....	vi
บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	1
ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	3
ทฤษฎีสมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	3
ทบทวนวรรณกรรม	4
วิธีดำเนินการวิจัยและผลการทดลอง	4
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	23
บรรณานุกรม.....	25
ประวัติผู้วิจัย.....	

สารบัญตาราง

Table 3.1. Values of mean body weight (g)	10
Table 4.1.1 Short-term <i>in vitro</i> cytotoxicity	12
Table 4.1.2 The half maximal inhibitory concentration	12
Table 4.2.1 Proportion of number of P53-positive	14
Table 4.5.1 Tumor volume of tumor nodule	16
Table 7.1 Area of VEGF expression in tumor tissue	22

สารบัญภาพ

Figure 3.1A-B Photography of experimental mice	9
Figure 4.1.1 A-B The percent cell viability	11
Figure 4.1.2 The dose response curve and IC_{50} value	11
Figure 4.2.1 Histology of nuclear staining of P53	14
Figure 4.2.2 The proportion of number of P53-positive	15
Figure 5.2.1 Histological finding	17
Figure 6.1 A-F Confocal laser microscopic images	19
Figure 6.2 The percentages of capillary vascularity	20
Figure 7.1 The expression of VEGF	21
Figure 8 Proposed possible mechanism	24

รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย (research project)

ประกอบการเสนอของบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 – 2554

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) ผลของเหงือกปลาหมอดอกขาวต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ และต่อการ
เติบโตของ เซลล์มะเร็งปากมดลูก ที่ปลูกบนผิวหนังของหนูชนิดไมส์
(ภาษาอังกฤษ) Effects of Acanthus ebracteatus Vahl. on Tumor Angiogenesis
and on Tumor Growth in Cervical Cancer Implanted Nude Mice

ส่วน ก : ลักษณะโครงการวิจัย

- โครงการวิจัยใหม่
 โครงการวิจัยต่อเนื่องระยะเวลา...2.ปี ปีนี้เป็นปีที่...2..

รหัสโครงการวิจัย 65413000110026_1230010900_1330110026

I ระบุความสอดคล้องของโครงการวิจัยกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผน
พัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554) (ผนวก 2) ซึ่ง
ประกอบด้วย 5 ยุทธศาสตร์ (กรณาระบุความสอดคล้องเพียง 1 ยุทธศาสตร์ ที่มี
ความสอดคล้องมากที่สุด โดยทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง และระบุความสำคัญ
กับเรื่องที่สอดคล้องมากที่สุดในยุทธศาสตร์นั้น ๆ)

ยุทธศาสตร์การพัฒนาคุณภาพคนและสังคมไทยสู่สังคมแห่งภูมิปัญญาและ
การเรียนรู้ ให้มีความสำคัญกับ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)

การพัฒนาคนให้มีคุณธรรมนำความรู้เกิดภูมิคุ้มกัน

การเสริมสร้างสุขภาพของคนไทยให้มีสุขภาพแข็งแรงทั้งกายและใจ มี
ความสัมพันธ์ทางสังคมและอยู่ในสภาพแวดล้อมที่น่าอยู่

การเสริมสร้างคนไทยให้อยู่ร่วมกันในสังคมได้อย่างสันติสุข

ยุทธศาสตร์การสร้างความเข้มแข็งของชุมชนและสังคมให้เป็นรากฐานที่
มั่นคงของประเทศ ให้มีความสำคัญกับ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)

การเสริมสร้างความเข้มแข็งของชุมชน

การสร้างความมั่นคงของเศรษฐกิจชุมชน

- การเสริมสร้างศักยภาพของชุมชนในการอยู่ร่วมกันกับทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมอย่างสันติและเกื้อกูล
- ยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุลและยั่งยืน ให้มีความสำคัญ กับ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)
 - การปรับ โครงสร้างการผลิตเพื่อเพิ่มผลิตภาพ และคุณค่าของสินค้าและ บริการบนฐานความรู้และความเป็นไทย
 - การสร้างภูมิคุ้มกันของระบบเศรษฐกิจ
 - การสนับสนุนให้เกิดการแข่งขันที่เป็นธรรม และการกระจายผลประโยชน์ จากการพัฒนาอย่างเป็นธรรม
- ยุทธศาสตร์การพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสร้าง ความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ให้มีความสำคัญกับ (ทำ เครื่องหมาย ✓ ในช่อง)
 - การรักษาฐานทรัพยากรและความสมดุลของระบบนิเวศน์
 - การสร้างสภาพแวดล้อมที่ดีเพื่อยกระดับคุณภาพชีวิต และการพัฒนาที่ ยั่งยืน
 - การพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพ และภูมิปัญญาท้องถิ่น
- ยุทธศาสตร์การเสริมสร้างธรรมาภิบาลในการบริหารจัดการประเทศ ให้ ความสำคัญกับ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)
 - การเสริมสร้าง และพัฒนาวัฒนธรรมประชาธิปไตยและธรรมาภิบาล ให้เป็นส่วนหนึ่งของวิถีการดำเนินชีวิตในสังคมไทย
 - เสริมสร้างความเข้มแข็งของภาคประชาชน ให้สามารถเข้าร่วมในการ บริหารจัดการประเทศ
 - สร้างภาคราชการที่มีประสิทธิภาพและมีธรรมาภิบาล เน้นการบริการ แทนการกำกับควบคุม และทำงานร่วมกับหุ้นส่วนการพัฒนา
 - การกระจายอำนาจการบริหารจัดการประเทศสู่ภูมิภาค ท้องถิ่น และ ชุมชนเพิ่มขึ้นต่อเนื่อง
 - ส่งเสริมภาคธุรกิจเอกชนให้เกิดความเข้มแข็ง สุจริต และมีธรรมาภิบาล
 - การปฏิรูปกฎหมาย กฎระเบียบและขั้นตอน กระบวนการเกี่ยวกับการ พัฒนาเศรษฐกิจและสังคมเพื่อสร้างความสมดุลในการจัดสรร ประโยชน์จากการพัฒนา
 - การรักษาและเสริมสร้างความมั่นคง เพื่อสนับสนุนการบริหารจัดการ ประเทศสู่คุณภาพและความยั่งยืน

- II ระบุความสอดคล้องของโครงการวิจัยกับนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ (พ.ศ. 2551-2553) (ผนวก 3) ซึ่งประกอบด้วย 5 ยุทธศาสตร์ (กรุณาระบุความสอดคล้องเพียง 1 ยุทธศาสตร์ ที่มีความสอดคล้องมากที่สุด โดยทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง และระบุกลยุทธ์การวิจัยที่สอดคล้องมากที่สุดในยุทธศาสตร์นั้น ๆ พร้อมทั้งระบุแผนงานวิจัยที่สอดคล้องมากที่สุดในกลยุทธ์การวิจัยนั้น ๆ)
- ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 1 การสร้างศักยภาพและความสามารถในการพัฒนาทางเศรษฐกิจ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 1 การสร้างมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรและประมง และการพัฒนาศักยภาพในการแข่งขันและการพึ่งพาตนเองของสินค้าเกษตรและประมง (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)
- แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาการผลิตพืชเศรษฐกิจ เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มและนำไปสู่การแข่งขันและการพึ่งพาตนเอง เช่น ข้าว ยางพารา ปาล์ม น้ำมัน อ้อย มันสำปะหลัง พืชผัก ผลไม้ ไม้ดอกไม้ประดับ เป็นต้น
- แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับปศุสัตว์เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มและนำไปสู่การแข่งขันและการพึ่งพาตนเอง เช่น สุกร โคเนื้อ โคนม สัตว์ปีก แพะ เป็นต้น
- แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับประมงและการเพาะเลี้ยงชายฝั่งเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มและนำไปสู่การแข่งขันและการพึ่งพาตนเอง
- แผนงานวิจัยที่ 4 การวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มประสิทธิภาพด้านการจัดการเกี่ยวกับผลผลิตทางการเกษตรและประมง
- แผนงานวิจัยที่ 5 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนามาตรฐานสินค้าเกษตรและประมง
- แผนงานวิจัยที่ 6 การวิจัยเกี่ยวกับการผลิตอาหารปลอดภัย
- แผนงานวิจัยที่ 7 การวิจัยเกี่ยวกับเกษตรอินทรีย์
- แผนงานวิจัยที่ 8 การวิจัยเกี่ยวกับการบริหารจัดการระบบชลประทานที่เหมาะสมในพื้นที่และการใช้น้ำชลประทานอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อการผลิตทางการเกษตรและประมง

- กลยุทธ์การวิจัยที่ 2 การพัฒนาองค์ความรู้และภูมิปัญญาท้องถิ่น เพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาเศรษฐกิจชุมชนอย่างยั่งยืน (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)
- แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาเศรษฐกิจชุมชนตามปรัชญาเศรษฐกิจพอเพียง
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับกระบวนการสร้างองค์ความรู้และต่อยอดภูมิปัญญาท้องถิ่น
 - แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์สินค้าของท้องถิ่น
 - แผนงานวิจัยที่ 4 การวิจัยเกี่ยวกับการจัดการผลิตและการตลาดสินค้าในระดับชุมชนที่เหมาะสม โดยใช้องค์ความรู้และภูมิปัญญาท้องถิ่น
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 3 การพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตทางอุตสาหกรรมให้เอื้อต่อการดำเนินธุรกิจอย่างยั่งยืน (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)
- แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตทางอุตสาหกรรมเป้าหมาย
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มศักยภาพของการเป็นฐานการผลิตภาคอุตสาหกรรม
 - แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาวัตถุดิบในประเทศและการเพิ่มมูลค่าสินค้าเพื่อพัฒนาศักยภาพการผลิตและการตลาด
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 4 การพัฒนาศักยภาพทางเศรษฐกิจจากการท่องเที่ยว (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)
- แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาศักยภาพการบริหารจัดการด้านการท่องเที่ยว
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับวิสาหกิจชุมชนกับการพัฒนาการท่องเที่ยว
 - แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาศักยภาพแหล่งท่องเที่ยวอย่างยั่งยืน
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 5 การพัฒนาอุตสาหกรรมผลิตพลังงานชีวภาพและพลังงานทางเลือกอื่น (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)
- แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาอุตสาหกรรมผลิตพลังงานชีวภาพ

- แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาอุตสาหกรรมผลิตพลังงานทางเลือกอื่น
- แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับการประหยัดการใช้พลังงานประเภทต่าง ๆ
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 6 การยกระดับประสิทธิภาพและมาตรฐานการให้บริการด้านโลจิสติกส์ที่มีคุณภาพ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนามาตรฐานและยกระดับประสิทธิภาพการให้บริการด้านโลจิสติกส์
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาศักยภาพบุคลากรด้านโลจิสติกส์
 - แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาโครงข่ายคมนาคมและระบบการจัดส่งและกระจายสินค้าที่มีมาตรฐาน และการเพิ่มประสิทธิภาพด้านการขนส่งผลผลิตที่มีประสิทธิภาพ
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 7 การเพิ่มสมรรถนะและขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศด้านเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มสมรรถนะและพัฒนาศักยภาพขีดความสามารถทางเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับระบบฐานข้อมูลและการเชื่อมโยงข้อมูลระหว่างหน่วยงานภาครัฐ เอกชนและผู้ให้บริการ
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 8 การพัฒนาเศรษฐกิจระหว่างประเทศ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับผลกระทบทางเศรษฐกิจและแนวทางการแก้ไขปัญหา อันเกิดจากการเปลี่ยนแปลงนโยบายทางการค้า ข้อตกลงการค้าเสรี และการเชื่อมโยงอาเซียนสู่สากล
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการสร้างสัมพันธภาพและการพัฒนาทางเศรษฐกิจที่ยั่งยืนร่วมกับประเทศเพื่อนบ้าน
 - แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับกลไกที่เหมาะสมในการพัฒนาเศรษฐกิจระหว่างประเทศ
- ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 2 การสร้างศักยภาพและความสามารถในการพัฒนาทางสังคม (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง □)

- กลยุทธ์การวิจัยที่ 1 การปฏิรูปการศึกษา กระบวนการเรียนการสอน ทั้งในและนอกระบบ ตลอดจนการพัฒนากระบวนการเรียนรู้ ตลอดชีวิต ที่สอดคล้องกับวิถีชีวิตในแต่ละท้องถิ่น (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
- แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการปฏิรูปการศึกษา
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาคุณภาพการศึกษาที่เหมาะสมกับท้องถิ่น
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 2 การส่งเสริม อนุรักษ์และพัฒนาคุณค่าทางศาสนา ศิลปวัฒนธรรมและเอกลักษณ์ที่หลากหลาย (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
- แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการส่งเสริม อนุรักษ์ และพัฒนาคุณค่าทางศาสนา ศิลปวัฒนธรรม และเอกลักษณ์ของชาติ บนฐานภูมิปัญญาท้องถิ่น
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับองค์ความรู้ทางศิลปวัฒนธรรม ประเพณี ค่านิยม และสร้างสรรค์งานศิลป์ ระดับท้องถิ่น ระดับชาติ และระดับนานาชาติ
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 3 การส่งเสริมสุขภาพ การป้องกันโรคอุบัติใหม่ การรักษาพยาบาล การฟื้นฟูสมรรถภาพทางกายและจิตใจ รวมถึงการคุ้มครองผู้บริโภค (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
- แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการส่งเสริมสุขภาพและเพิ่มประสิทธิภาพการให้บริการทางการแพทย์และสาธารณสุข
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับสุขภาพของประชาชนในภาคการเกษตร อุตสาหกรรม และบริการ
 - แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับการเฝ้าระวังพฤติกรรมเสี่ยงต่อการติดเชื้อเอชไอวี
 - แผนงานวิจัยที่ 4 การวิจัยเกี่ยวกับการป้องกันโรคอุบัติใหม่
 - แผนงานวิจัยที่ 5 การวิจัยเกี่ยวกับการฟื้นฟูสมรรถภาพทางกายและจิตใจ
 - แผนงานวิจัยที่ 6 การวิจัยเกี่ยวกับการคุ้มครองผู้บริโภค

- กลยุทธ์การวิจัยที่ 4 การพัฒนาและการคุ้มครองภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย การแพทย์พื้นบ้าน การแพทย์ทางเลือก และสมุนไพร (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย การแพทย์พื้นบ้าน และการแพทย์ทางเลือก เพื่อสร้างองค์ความรู้จากภูมิปัญญาท้องถิ่นและการคุ้มครองภูมิปัญญา
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และสาธารณสุข
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 5 การพัฒนาศักยภาพทางการกีฬา (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการกีฬาเพื่อการพัฒนาสังคม
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับวิทยาศาสตร์การกีฬา
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 6 การพัฒนาขีดสมรรถนะและศักยภาพของหน่วยงานภาครัฐและภาคเอกชน (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาประสิทธิภาพการปฏิบัติงานของบุคลากรภาครัฐและภาคเอกชน
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนากฎหมายและระบบงานยุติธรรม
 - แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับการมีคุณธรรมและจริยธรรม และการเสริมสร้างธรรมาภิบาลในสังคม
 - แผนงานวิจัยที่ 4 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนารูปแบบการบริหารจัดการเพื่อการต่อต้านและป้องกันการทุจริตและการประพฤติมิชอบของภาคราชการและภาคเอกชน
 - แผนงานวิจัยที่ 5 การวิจัยเกี่ยวกับนโยบายและยุทธศาสตร์การบริหารจัดการที่มีประสิทธิภาพ
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 7 การจัดการปัญหาสุขภาพจิต ความปลอดภัยในชีวิตและทรัพย์สิน และปัญหาผู้มีอิทธิพล (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาเครือข่ายบริหารจัดการปัญหาสุขภาพจิต
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการแก้ปัญหาความปลอดภัยในชีวิตและทรัพย์สิน

- แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับการป้องกันและปราบปรามผู้มีอิทธิพล โดยใช้มาตรการทางสังคม และกระบวนการมีส่วนร่วมของชุมชน
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 8 การส่งเสริมความเข้มแข็งและการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของท้องถิ่นและสังคม (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการสร้างเสริมความเข้มแข็งของท้องถิ่น กระบวนการและกลไกสนับสนุนการมีส่วนร่วมของประชาชน และการพัฒนาระเบียบชุมชน
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการส่งเสริมกระบวนการออมและการสร้างหลักประกันรายได้ ตลอดจนความมั่นคงในครัวเรือน
 - แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาศักยภาพเยาวชนผู้ด้อยโอกาส ผู้พิการและผู้สูงอายุ
 - แผนงานวิจัยที่ 4 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาองค์ความรู้ด้านประชาสังคม และการจัดการความรู้เพื่อขจัดความยากจนและเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของท้องถิ่นและสังคม
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 9 การเสริมสร้างความมั่นคงและบูรณาการการแก้ไขปัญหาสถานการณ์ความไม่สงบในประเทศ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับความมั่นคงในประเทศ
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับหลักการ “เข้าใจ เข้าถึง พัฒนา” คุณภาพชีวิตและสังคม และการสร้างความสมานฉันท์ที่สอดคล้องกับวิถีชีวิตและวัฒนธรรมของชุมชนในพื้นที่จังหวัดชายแดนและในประเทศ
 - แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับการบริหารจัดการและผลกระทบอันเนื่องมาจากผู้ลี้ภัยเข้าเมือง แรงงานต่างด้าวและแรงงานต่างถิ่น
 - แผนงานวิจัยที่ 4 การวิจัยเกี่ยวกับศักยภาพและประสิทธิภาพงานการข้าวและการประชาสัมพันธ์ภาครัฐ
- ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 3 การสร้างศักยภาพและความสามารถในการพัฒนาทางวิชาการและทรัพยากรบุคคล (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง □)

- กลยุทธ์การวิจัยที่ 1 การพัฒนานวัตกรรมและองค์ความรู้ใหม่ทางวิทยาศาสตร์ ทางสังคมศาสตร์ และการพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ในวิทยาการต่าง ๆ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
- แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยและพัฒนานวัตกรรมและองค์ความรู้ใหม่ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เช่น เทคโนโลยีชีวภาพ วัสดุศาสตร์ เทคโนโลยีสารสนเทศและสื่อสาร นานาเทคโนโลยี วิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุข เทคโนโลยีด้านอวกาศ ยุทธโศปกรณ์ เป็นต้น
- แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยและพัฒนานวัตกรรมและองค์ความรู้ใหม่ทางสังคมศาสตร์
- แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยและพัฒนานวัตกรรมและองค์ความรู้ใหม่ทางวิทยาการอื่น ๆ
- แผนงานวิจัยที่ 4 การวิจัยเพื่อต่อ ยอดภูมิปัญญาของประเทศเพื่อการใช้ประโยชน์ในการพัฒนาประเทศ
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 2 การสร้างศักยภาพและความสามารถของทรัพยากรบุคคลในวิทยาการต่าง ๆ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาศักยภาพและความสามารถของนักวิจัยรุ่นใหม่ นักวิจัย และนักบริหารการวิจัย ในวิทยาการต่าง ๆ ของภาครัฐและภาคเอกชน
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาผู้ช่วยนักวิจัยในภาครัฐและภาคเอกชน
- ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 4 การเสริมสร้างและพัฒนาทุนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง □)
 - กลยุทธ์การวิจัยที่ 1 การบริหารจัดการและการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพอย่างยั่งยืน

- แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์เพื่อเสริมสร้างคุณค่า (Value Creation) ของผลผลิตและทรัพยากร
- แผนงานวิจัยที่ 4 การวิจัยเกี่ยวกับการใช้มาตรการทางสิ่งแวดล้อมเพื่อแก้ปัญหาคาถักกันทางการค้า
- แผนงานวิจัยที่ 5 การวิจัยเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศกับการเปลี่ยนแปลงของทรัพยากรทางการเกษตร ประมง และชายฝั่ง
- แผนงานวิจัยที่ 6 การวิจัยเกี่ยวกับการสร้างจิตสำนึกในการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
- แผนงานวิจัยที่ 7 การวิจัยเกี่ยวกับการอนุรักษ์พื้นที่ที่สำคัญและมีความเปราะบางเชิงนิเวศ
- แผนงานวิจัยที่ 8 การวิจัยเพื่อฟื้นฟูและเพิ่มความสามารถของพื้นที่ป่าอนุรักษ์ ป่าสงวนแห่งชาติ ป่าชายเลน และทรัพยากรชายฝั่ง และการจัดการไฟป่า
- แผนงานวิจัยที่ 9 การวิจัยเกี่ยวกับมลพิษ การจัดการมลพิษ และผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากมลพิษ
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 2 การสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับการฟื้นฟูบำรุงดินรวมทั้งการใช้ประโยชน์ที่ดิน (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับวิทยาศาสตร์ทางดิน
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงคุณภาพและการฟื้นฟูบำรุงดิน
 - แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาการใช้ประโยชน์ทรัพยากรที่ดินอย่างมีประสิทธิภาพ
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 3 การพัฒนาระบบการบริหารจัดการทรัพยากรน้ำแบบบูรณาการและสร้างความเป็นเอกภาพในการบริหารจัดการน้ำของประเทศ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาระบบและกลไกการบริหารจัดการน้ำของประเทศที่มีประสิทธิภาพ
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการสร้างเขื่อนและฝาย
- กลยุทธ์การวิจัยที่ 4 การสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับภัยพิบัติจากธรรมชาติ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง ○)

- แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับภัยพิบัติจากธรรมชาติและผลกระทบทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม
- แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาระบบฐานข้อมูลระบบการพยากรณ์เตือนภัยและระบบการเฝ้าระวังเกี่ยวกับอุบัติเหตุทางธรรมชาติ
- ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 5 การบริหารจัดการความรู้ ผลงานวิจัย ทรัพยากร และภูมิปัญญาของประเทศ ผู้การใช้ประโยชน์ด้วยยุทธวิธีที่เหมาะสม (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)
 - กลยุทธ์การวิจัยที่ 1 การพัฒนาระบบบริหารงานวิจัยของประเทศ ตลอดจนการบริหารจัดการความรู้ ผลงานวิจัย ทรัพยากร และภูมิปัญญาของประเทศ และจากต่างประเทศผู้การใช้ประโยชน์ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาระบบบริหารงานวิจัยของประเทศ ตลอดจนการบริหารจัดการความรู้ ผลงานวิจัย ทรัพยากร และภูมิปัญญาของประเทศ ผู้การใช้ประโยชน์
 - แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับระบบการคุ้มครองสิทธิประโยชน์และทรัพย์สินทางปัญญา และแนวทางการผลักดันสู่การนำทรัพย์สินทางปัญญาไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์
 - แผนงานวิจัยที่ 3 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาฐานข้อมูลและดัชนีด้านการวิจัยที่เหมาะสมแก่การพัฒนาประเทศ
 - แผนงานวิจัยที่ 4 การวิจัยเกี่ยวกับการเข้าถึงทรัพยากรทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และวิทยาการสาขาต่าง ๆ ตลอดจนองค์ความรู้ในประเทศและจากต่างประเทศ
 - แผนงานวิจัยที่ 5 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาองค์กรวิจัยระดับชุมชน
 - กลยุทธ์การวิจัยที่ 2 การวิเคราะห์และประเมินผลเพื่อการพัฒนาศักยภาพและความสามารถด้านการวิจัยของประเทศที่มีประสิทธิภาพ (ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)
 - แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับระบบการวิเคราะห์และประเมินผลเพื่อพัฒนาศักยภาพและความสามารถด้านการวิจัยของประเทศที่มีประสิทธิภาพ

○ แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนามาตรฐานการวิจัย
ของประเทศ

III ระบุความสอดคล้องของโครงการวิจัยกับกลุ่มเรื่องที่ควรวิจัยเร่งด่วนตามนโยบาย

และยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ (พ.ศ. 2551-2553) ซึ่งประกอบด้วย 10 กลุ่มเรื่อง

(หากสอดคล้องกับกลุ่มเรื่องใดมากที่สุดให้ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่อง)

- การประยุกต์ใช้เศรษฐกิจพอเพียง
- ความมั่นคงของรัฐและการเสริมสร้างธรรมาภิบาล
- การปฏิรูปการศึกษา
- การจัดการน้ำ
- การพัฒนาพลังงานทดแทน
- การเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกและลดการนำเข้า
- การป้องกันโรคและการรักษาสุขภาพ
- การบริหารจัดการสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพ
- เทคโนโลยีใหม่และเทคโนโลยีที่สำคัญเพื่ออุตสาหกรรม
- การบริหารจัดการการท่องเที่ยว

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อเรื่อง ผลของเหงือกปลาหมอดอกขาวต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ และต่อการเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ที่ปลูกบนผิวหนังของหนูชนิดไมส์

คณะผู้วิจัย รองศาสตราจารย์. ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช

ภาควิชา สรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์. ดร. กวพันธ์ ภัทร โกลส

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร. สัญญา หกพุดชา

สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาผลของสมุนไพรเหงือกปลาหมอดอกขาวที่สกัดด้วยน้ำต่อการเจริญเติบโตและการเกิดหลอดเลือดใหม่ของมะเร็งปากมดลูก โดยทำการศึกษาในหลอดทดลองเพื่อทดสอบผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และทำการศึกษาในหนูชนิดไมส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกใต้ชั้นผิวหนัง โดยเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ใช้เป็นชนิดที่บรรจุสารชีวพิษธรรมชาติของชีวแมนปาปิลโลมาไวรัส ชนิด 16 (Human papillomavirus type 16, (HPV)-16 DNA) และศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรเหงือกปลาหมอต่อชีวโมเลกุลที่บ่งชี้การเกิดหลอดเลือดใหม่ของมะเร็ง และการตายของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ VEGF และ P53

การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรเหงือกปลาหมอดอกขาวต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งคือ เซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki (HPV-16 positive) เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติคือเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ HDFs โดยวิธีที่ใช้ในการทดสอบ คือ Trypan blue exclusion method และ MTT assay ผลการทดสอบในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดไม่มีพิษเฉียบพลันหรือทำลายเซลล์โดยตรงต่อเซลล์ทุกชนิดเมื่อให้สารสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และมีฤทธิ์อย่างอ่อนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki โดยให้ความเข้มข้นในการทำให้เซลล์ตาย 50% น้อยกว่าการยับยั้งเซลล์ปกติ ($P < 0.05$)

การศึกษาในสัตว์ทดลองใช้หนูชนิดสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย น้ำหนัก 20-25 กรัม และอายุระหว่าง 5-6 สัปดาห์ โดยแบ่งหนูทดลองออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HPV group) โดยการฉีดเซลล์ CaSki จำนวน 1×10^7 เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 200 ไมโครลิตร เข้าใต้ผิวหนังบริเวณกลางหลัง ส่วนกลุ่มควบคุม (Con group) ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากเซลล์มะเร็งฉีดเข้าใต้ชั้นผิวหนังในปริมาณที่เท่ากัน หลังจากนั้นหนึ่งสัปดาห์จะสามารถสังเกตเห็นตุ่มนูนขนาดเล็กของมะเร็งปรากฏขึ้นที่ชั้นใต้ผิวหนัง และสัตว์ทดลองจะถูกป้อนด้วยสารสกัดสมุนไพรเหงือกปลาหมอ (AE) ขนาด 300 และ 3,000 มก./ นน. กก./ วัน/ 0.2 มล. เป็นระยะเวลา 14 และ 28 วัน (กลุ่ม Con-AE และ HPV-AE) หนูกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นในปริมาณ และระยะเวลาเท่ากัน (กลุ่ม Con-Veh และ HPV-Veh) และเมื่อสิ้นสุดให้สารสกัดสมุนไพร ทำการศึกษาการเกิดหลอดเลือดใหม่ของมะเร็งภายใต้กล้อง confocal fluorescence microscope ด้วยการใช้การฉีดสารเรืองแสงเข้าทางหลอดเลือดดำจากหัวใจ เมื่อสิ้นสุดการทดลองชิ้นเนื้อมะเร็งถูกเก็บเพื่อวัดขนาด และศึกษาพยาธิวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาดเล็ก โดยใช้เทคนิค Hematoxyline&Eosin (H&E) และตรวจอิมมูโนพยาธิวิทยาเพื่อศึกษาการแสดงออกของ VEGF และ p53 ในเนื้อเยื่อมะเร็ง

ผลการทดสอบในหนูที่ได้รับการปลูกเซลล์มะเร็งปากมดลูก พบว่าผลการทดลองจากภาพส่องกราดสารเรืองแสง สังเกตพบโครงข่ายของหลอดเลือดขนาดเล็กบริเวณรอบก้อนมะเร็งเป็นจำนวนมากภายหลังจากการปลูกเซลล์มะเร็งในวันที่ 21 และ 35 และเมื่อวิเคราะห์ความหนาแน่นของหลอดเลือด (CV) พบว่า ในกลุ่ม HPV-Veh มีค่า %CV เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con-Veh ($P < 0.001$) และเมื่อให้สารสกัดสมุนไพรในขนาดสูง (3,000 มก./นน.กก.) เป็นเวลา 14 และ 28 วัน พบว่าค่า %CV ที่เพิ่มขึ้นนั้นลดลง ($P < 0.001$) อีกทั้งปริมาณของก้อนมะเร็งมีค่าน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด (HPV-Veh) และพบการแสดงออกของ VEGF ในเนื้อเยื่อมะเร็งสูงกว่ากลุ่มควบคุม (Con) และพบว่าสารสกัดในขนาดสูงทำให้ระดับ

ของ VEGF ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) นอกจากนั้นสารสกัดยังทำให้เพิ่มการแสดงออกของ โปรตีน p53 ในเนื้อเยื่อมะเร็ง (HPV-AE) มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด (HPV-Veh) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$)

สรุปได้ว่าสารสกัดสมุนไพรเหงือกปลาหมอมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็ง และยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ในมะเร็งปากมดลูกโดยกลไกการออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ VEGF และการเพิ่มขึ้นของ p53

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Title Effects of *Acanthus ebracteatus* Vahl. on Tumor Angiogenesis and on Tumor Growth in Cervical Cancer Implanted Nude Mice

The aim of this study was to examine the effects of aqueous crude extract of *Acanthus ebracteatus* Vahl. (AE) on tumor growth and tumor angiogenesis in human cervical cancer cells contained human papillomavirus (HPV)-16 DNA - implanted nude mice model.

In vitro the growth inhibitory effect of AE was studied by using cell types including CaSki and Human dermal fibroblast cells, HDFs. The cell growth-inhibitory activity and IC_{50} of AE were determined at different incubation time 24-, 48-, and 72-hours by using Trypan blue exclusion method and MTT assay.

Under *in vitro* condition, AE exhibited weak anti-proliferative effect on CaSki, cell growth in a dose-dependent manner with exposure time at 48-hr. AE could inhibit the growth of CaSki cells, the only one cancer cell, while less inhibitory effect to normal cells, HDFs ($p < 0.05$).

In vivo study Female BALB/c nude mice (weighing 20-25 g, age 5-6 weeks) were used for establishment of HPV16-positive cervical cancer mice model. CaSki cells, 1×10^7 cells/MEM 200 μ l were injected subcutaneously in the middle dorsum of each animal (HPV group). One week after, mice were fed orally with AE 300 or 3,000 mg/kg BW/day for 14 and 28 days (HPV-AE groups), distilled water were used as vehicle control. After 14- and 28-day of treatments, the tumor microvasculature and capillary vascularity (CV) were determined by using laser scanning confocal microscopic system. Tumor tissue sample of each mouse was collected for immunohistochemical examination of biomarkers, vascular endothelial growth factor (VEGF) and p53 proteins.

In vivo study, the increasing in tumor volume were observed during day 14th - 28th, and high dose treatment of AE (3,000 mg/ kg BW) could inhibit the increase of tumor volume ($P < 0.001$). A large number of microvascular network around tumor area was observed in HPV-Veh groups on day 21st and 35th after cancer-cell inoculation. Tumor capillary vascularity (CV) in HPV-Veh groups was significantly increased when compared to Con-Veh group ($P < 0.001$). High dose treatment of AE significantly attenuated the increase of tumor angiogenesis on both 14- and 28-days of treatment ($P < 0.001$). Tumor VEGF expression with strong intensity was detected in HPV-Veh group, and %area of VEGF expression in HPV-3,000AE both 14- and 28-days were significantly less than HPV-Veh and HPV-300AE group ($P < 0.001$). Tumor p53 expression in HPV-Veh group was detected with a very small number or almost none. The elevation of p53 expression in HPV-AE groups was observed in dose dependent manner ($P < 0.001$).

Our novel findings demonstrated that aqueous crude extract of *Acanthus ebracteatus* Vahl. could inhibit tumor growth and tumor angiogenesis in cervical cancer mice model. Therefore, it provides the research evidence that *Acanthus ebracteatus* Vahl. might be contribute to the development of new therapeutic management against cervical cancer in the near future.

ส่วน ข : องค์ประกอบในการจัดทำโครงการวิจัย

1. ผู้รับผิดชอบ (คณะผู้วิจัย บทบาทของนักวิจัยแต่ละคนในการทำวิจัย และสัดส่วนที่ทำการวิจัย (%)) และ
หน่วยงานประกอบด้วย หน่วยงานหลักและหน่วยงานสนับสนุน

รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช

ภาควิชา สรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมลล์ suthilukp@yahoo.com

หมายเลขโทรศัพท์ 02-252-7854 ต่อ 104

02-256-4267 ต่อ 104

แฟกซ์ 02-252-7854

สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 40 (%)

รับผิดชอบในขั้นตอนที่ทำการศึกษานโมเดลสัตว์ทดลองที่เป็นมะเร็ง

รศ.ดร. กาวพันธ์ ภัทรโกศล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมลล์ parvapan@chula.ac.th

หมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์ 0-2252-8181 ต่อ 3628 โทรสาร 0-2252-5952

สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 35 (%)

รับผิดชอบในขั้นตอนที่ทำการศึกษาน in vitro และการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

ดร. สันญา หกพุดชา

สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม

อีเมลล์ sanya@gpo.or.th

หมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์ 0-2-203-8122 โทรสาร 0-2-354-8812

สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 25 (%)

รับผิดชอบในขั้นตอนการเตรียมสารสมุนไพรและการวิเคราะห์ปริมาณสาร

ส่วนประกอบออกฤทธิ์

หน่วยงานหลักที่รับผิดชอบงานวิจัย และที่อยู่ พร้อมทั้งชื่อหน่วยงานและลักษณะของกร่วมงานวิจัยกับ
หน่วยงานอื่น (ถ้ามี)

Microcirculation research unit ภาควิชาสรีรวิทยา และ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ
แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับ องค์การเภสัชกรรม

2. ประเภทของการวิจัย Experimental development
3. สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาการที่ทำการวิจัย Microcirculation, Microbiology, herbal phramacology
4. คำสำคัญ (keywords) anti-angiogenesis, tumor growth, Acanthus ebracteatus, Cervical Cancer -implanted nude mice

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ดังเป็นที่ทราบกันว่าในขณะนี้ สาเหตุการตายของคนในประเทศไทยที่สูงที่สุด คือ สาเหตุจากโรคมะเร็งและที่สำคัญคือมากกว่า 7 ล้านคนต่อปีเมื่อเทียบกับประชากรของโลกที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง (1) มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบได้ เป็นอันดับต้นๆ ในสตรีทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งรวมประเทศไทยด้วย จากสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ(2) มะเร็งปากมดลูกจัดเป็นมะเร็งอันดับหนึ่งที่พบได้ในผู้หญิงไทย ซึ่งนับว่าเป็นโรคที่ก่อปัญหาทางสาธารณสุขและส่งผลกระทบต่อทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ จากรายงานการศึกษาถึงสาเหตุของมะเร็งปากมดลูกจำนวนมากทั่วโลก (3-6) มีข้อมูลที่ได้รับการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์อย่างชัดเจนว่าสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูก 90-99.7% เกิดจากการติดเชื้อ Human papilloma virus (HPV) ซึ่งจัดเป็นเชื้อไวรัสที่สามารถติดต่อทางเพศสัมพันธ์ (Sexual transmitted disease) HPV เป็นไวรัสใน Family *Papillomaviridae*

ในปัจจุบันถึงแม้จะมีการพัฒนาวัคซีนสำหรับป้องกัน HPV ก็ตาม แต่เมื่อผู้ป่วยเป็นมะเร็งไม่ว่าชนิดใดมักจะขาดต่อการรักษา รวมทั้งการใช้เคมีบำบัดยังก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่อาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ และ ที่สำคัญคือ มิใช่ผู้ป่วยมะเร็งทุกคนจะสามารถรับการรักษาที่เหมาะสมที่สุดได้ เนื่องจากสถานะทางเศรษฐกิจ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาภูมิปัญญาไทย ในการนำสมุนไพรไทยที่มีรายงานว่ามีความสมบัติน่าจะช่วยในการรักษาโรคมะเร็งได้ โดยในอนาคตสมุนไพรเหล่านี้ อาจสามารถนำมาใช้เป็นแพทย์ทางเลือกให้กับผู้ป่วยโรคมะเร็งได้

จากรายงานการวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ (8-9) คณะผู้วิจัยพบว่าสารสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการลดการอักเสบ จะมีกลไกที่สำคัญเกี่ยวข้องคือ กลไกการยับยั้งเอ็นไซม์ที่สำคัญคือ cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งมักจะมีผลต่อการยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ของมะเร็งได้ด้วย เพราะพบว่า COX-2 เป็น ตัวควบคุมร่วมกับ vascular endothelial growth factor (VEGF)

ถึงแม้จะมีงานวิจัยไม่มากนักเกี่ยวกับผลของเหงือกปลาหมอดอกขาว แต่มีการศึกษาทางเภสัชวิทยา และจากการใช้เป็นยารักษาโรคในตำราอายุรเวช พบว่าเหงือกปลาหมอดอกขาว ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ : *Acanthus ebracteatus* Vahl และชื่อวงศ์ Acanthaceae มีสรรพคุณใช้เป็นยารักษาโรคมานานแล้วในอดีต จากรายงานการวิจัย (ภัทรกร มานะสมบุรณ์ (วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)) พบว่าแต่ละส่วนของพืชชนิดนี้มีสรรพคุณต่างๆ เช่น anti-inflammation, antiviral, anti-cancer, etc. นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าสารที่มีอยู่ในเหงือกปลาหมอ

ดอกขาว เช่น Martynoside เป็นสารที่มีคุณสมบัติคล้ายสารจำพวก Dihydro-benzofuran ซึ่งมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ได้ รวมทั้งมีสารจำพวก Polysaccharides ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่มีรายงานไว้โดยการวิจัยของ Hokputsa, S., et al.(2004) ว่าในเหงือกปลาหมอดอกขาวมี สารพวก polysaccharides ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสามารถยับยั้งการสร้าง TGF- β and MMP-9 ซึ่งเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในการเกิดภาวะอักเสบเรื้อรัง และในการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็ง ดังที่ทราบกันว่า ยาเคมีบำบัดหลายชนิดให้ผลคือยับยั้ง MMP-9 เช่นกัน

นอกจากนั้นในปัจจุบันพบว่ามีรายงานวิจัยจำนวนมากที่สนใจศึกษาการใช้สารจำพวก polysaccharides เพื่อยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งรวมทั้งเพื่อยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ พบว่า polysaccharides ที่สกัดได้จากสาหร่ายจะสามารถยับยั้ง human microvascular endothelial cells (HMEC-1) proliferation ด้วยเช่นกัน (19-22)

คณะผู้วิจัย พบว่าสมุนไพรไทย เช่น ขมิ้นชัน ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ curcuminoids ซึ่งคณะผู้วิจัย พบว่า curcuminoids (Sigma Co. 95%) ในขนาด 3000มก./กก.นน.ตัว สามารถยับยั้ง vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclooxygenase-2 (COX-2) (8-9) จากรายงานการวิจัยพบว่าทั้ง VEGF และ COX-2 เป็นองค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการสร้างหลอดเลือดใหม่ในมะเร็ง นอกจากนั้นจากรายงานวิจัยกลุ่มอื่นได้รายงานสอดคล้องกันว่า ทั้ง VEGF และ COX-2 มีบทบาทที่สำคัญต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ อาทิเช่นใน uterine cervical cancers อีกทั้งการให้ COX-2 inhibitor อาจเป็นผลดีต่อการป้องกันการ regrowth or recurrence ได้อีกด้วย (10-17)

แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่าเหงือกปลาหมอมะเร็งจะมีสารหลายชนิดที่มีสรรพคุณที่ดูเหมือนว่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ได้ แต่ก็ยังไม่มีรายงานวิจัยที่ชัดเจน โดยเฉพาะในโมเดลของสัตว์ทดลอง รวมทั้งผลของเหงือกปลาหมต่อ angiogenic biomarkers ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่คือ VEGF และ COX-2 นั้นยังไม่ปรากฏสำหรับโมเดลของมะเร็งเช่นกัน

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของเหงือกปลาหมอดอกขาวต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งและต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ในโมเดลสัตว์ทดลองที่ได้รับการปลูกเซลล์มะเร็งปากมดลูก ซึ่งเป็นมะเร็งที่เชื่อว่ากว่า 90% เกิดจากไวรัส ดังกล่าวแล้วข้างต้น โดยคณะผู้วิจัยมีสมมติฐานคือ สารออกฤทธิ์ในเหงือกปลาหมอดอกขาวจะสามารถลดจำนวนของเซลล์มะเร็งได้โดยอาจมีกลไกผ่านการยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ และ/หรือเหงือกปลาหมอดอกขาวอาจจะมีผลโดยตรงคือ anti-proliferation เพราะเซลล์มะเร็งเป็น hyper-proliferation

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของเหงือกปลาหมอดอกขาว ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก
2. ศึกษาผลและกลไกของเหงือกปลาหมอดอกขาว ต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ในโมเดลสัตว์ทดลองที่ได้รับการปลูกเซลล์มะเร็งปากมดลูก

ขอบเขตของโครงการวิจัย

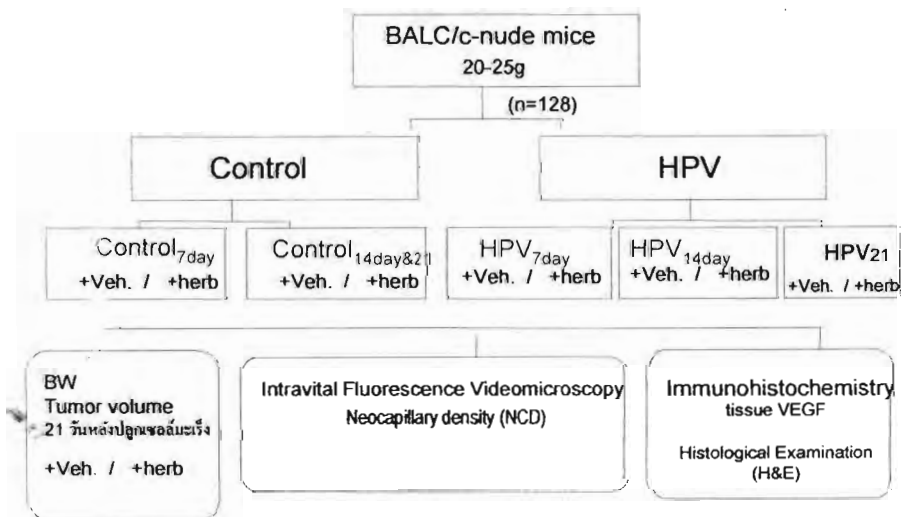
เพื่อที่จะพิสูจน์สมมติฐานของการวิจัยดังกล่าว ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการวิจัยทั้งในหลอดทดลอง (*In vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) โดย

In vitro เพื่อทดสอบฤทธิ์โดยตรงของสารละลายสกัดหยาบเหงือกปลาหมอดอกขาว ว่าจะสามารถมีฤทธิ์ เป็น anti-proliferation ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหรือไม่ โดยใช้เทคนิค MTT assay และตรวจดูโปรตีน p53 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยวิธี Immunocytochemical study

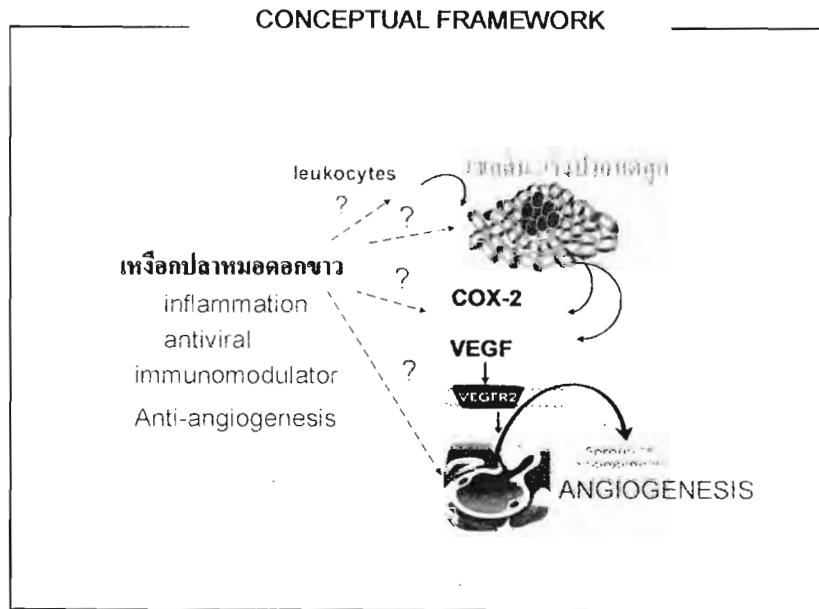
In vivo โดยใช้โมเดลสัตว์ทดลอง ที่ทำการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก บนผิวหนังโดยการฉีดเซลล์มะเร็งปากมดลูกเข้าสู่ชั้นผิวหนังบริเวณหลัง (Intradermal injection) เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารละลายสกัดหยาบเหงือกปลาหมอดอกขาว ว่าจะสามารถยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ (tumor angiogenesis) ในบริเวณที่ทำการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกหรือไม่ รวมทั้งสิ่งสำคัญของงานวิจัยคือ หากผลการออกฤทธิ์ของเหงือกปลาหมอดอกขาวในระดับ molecular biomarkers ด้วย

เพื่อมุ่งหวังให้เป็นองค์ความรู้ใหม่ทางวิทยาศาสตร์ที่จะสามารถนำไปสู่การการพัฒนาการใช้สมุนไพรเพื่อการรักษาผู้ป่วยมะเร็งต่อไปในอนาคต

In vivo study



ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวคิด ของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)



Hypothesis : การออกฤทธิ์ของเม็ดเลือดขาว อาจไปยับยั้งที่เซลล์มะเร็งโดยตรง หรืออาจไปยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ โดยผ่านการยับยั้ง การสร้าง Biomarkers (Vascular endothelial growth factor=VEGF and Cyclooxygenase-2 enzyme = COX-2) ซึ่งสำคัญต่อ กระบวนการเกิด tumor angiogenesis (ref. 8-9) ดังนั้นจึงยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ ทำให้ เซลล์มะเร็งขาดเลือดไปเลี้ยงและตายในที่สุด

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

คงเป็นที่ทราบกันดีว่ามะเร็งเป็นโรคที่มีอัตราการเพิ่มจำนวนของผู้ป่วยที่เพิ่มขึ้นทุกปี โดยในปี คศ. 2050 อาจมีจำนวนผู้ป่วยใหม่เพิ่มขึ้นถึง 25 ล้านคนต่อปี(1) ในปัจจุบันต้องยอมรับว่าการรักษา โรคมะเร็งนั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับการวินิจฉัยของแพทย์แล้ว ยังมีปัจจัยอื่นร่วมด้วยคือ สถานะทาง เศรษฐกิจ และสภาพร่างกายของผู้ป่วย ทั้งนี้เพราะยาเคมีบำบัด หรือการฉายแสงรังสี ยังก่อให้เกิดอาการ ข้างเคียงที่เป็นอันตราย และอาจถึงชีวิต หรือปัญหาจากโรคแทรกซ้อนเพราะยาเคมีบำบัดไปทำลายเซลล์ ในระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยด้วย และที่สำคัญคือผู้ป่วยบางรายอาจไม่มีโอกาสได้เข้าสู่กระบวนการ การรักษาเลย เนื่องจากปัญหาทางเศรษฐกิจสถานะของผู้ป่วย ทำให้ไม่สามารถรองรับค่าใช้จ่ายที่จะเกิดขึ้น จากกระบวนการการรักษาได้

ดังนั้นจึงมีองค์กรทั้งทางภาครัฐและเอกชน ที่มีความสนใจและสนับสนุนให้เกิดการพัฒนาองค์ความรู้ทางสมุนไพร เพื่อที่จะสามารถนำมาพัฒนาให้เกิด แนวทางการรักษาและเป็นอีกทางเลือกให้แก่ผู้ป่วย จากนโยบายดังกล่าว องค์กรเภสัชกรรมของประเทศไทย จึงเกิดมีงานวิจัยจำนวนมากที่ค้นคว้าวิจัยเพื่อตรวจหาว่าสมุนไพรชนิดใดที่มีคุณสมบัติด้านมะเร็งได้ จากการวิจัยดังกล่าวพบว่า **สมุนไพรไทยหลายชนิด** ทั้งในรูปสารเดี่ยว หรือในรูปตำหรับยา ที่มีเอกสารอ้างอิงมาแต่อดีตนั้นเมื่อนำมาทดสอบตรวจหาองค์ประกอบด้วยวิธีทางเภสัชวิทยาแล้วพบว่าน่าจะมีคุณสมบัติที่สามารถให้ผลในการรักษา หรือทำลายเซลล์มะเร็งได้ แต่อย่างไรก็ตามในการพัฒนาสมุนไพรเหล่านี้จำเป็นต้องมีงานวิจัยทางสรีรวิทยาที่จะสนับสนุนหรือพิสูจน์^๔ โดยเฉพาะในโมเดลของสัตว์ทดลองที่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งชนิดเดียวกับที่พบในคน เพื่อให้มีการศึกษาวิจัยที่ให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์และสามารถนำไปอธิบายให้เหตุผลทางวิทยาศาสตร์แก่ผู้ใช้ได้

งานวิจัยที่ผ่านมาคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษามาแล้วว่า สมุนไพรไทยเช่น ขมิ้นชัน (CURCUMIN) (8-9) มีคุณสมบัติที่สามารถยับยั้งการโตของเซลล์มะเร็งได้ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Anti-angiogenesis)

Tumor angiogenesis เป็นกระบวนการที่มีความสำคัญในการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งทุกชนิด ทั้งนี้เพราะเซลล์ทุกเซลล์ต้องอาศัยออกซิเจนและสารอาหารจากเลือด ดังนั้นการสร้างหลอดเลือดใหม่จึงมีบทบาทที่สำคัญคือทั้ง cell survival and metastasis

คณะผู้วิจัยพบว่า การเกิดหลอดเลือดใหม่จำเป็นต้องอาศัยกระบวนการที่สำคัญๆคือ

◆ Inflammation เกิดในระยะแรก ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ pro-inflammatory cytokines to initiate tumor angiogenesis

◆ Hypoxia induced tumor angiogenesis เกิดในระยะแรกหลังจากที่ tumor มีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เซลล์ที่อยู่ห่างจาก existing host vessels เกิดภาวะ "Hypoxia" กระตุ้นให้เกิดการสร้าง Hypoxia inducible factor (HIF-1 α) และกระตุ้นการสร้าง Vascular endothelial growth factor (VEGF) โดยผ่านทาง AP-1 - SP-1 - NF-kB pathway (Pouysségur *et al.*, 2006). เมื่อ tumor induced VEGF จับกับตัวรับบน endothelia cells, VEGFR-1 and VEGFR-2, MMP-9 endothelia cells proliferation, migration

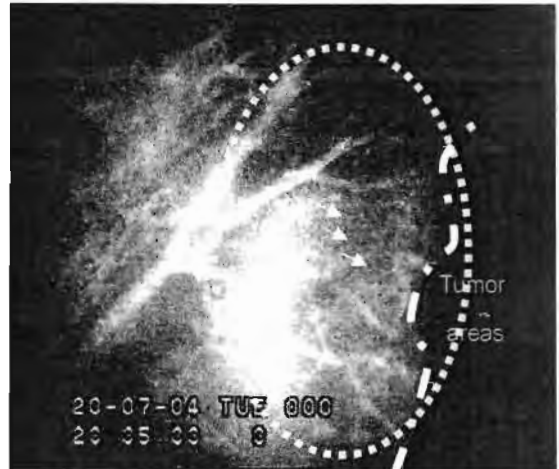
◆ Angiogenic switch เกิดในระยะที่ 2 ตามมาหลัง 6 -7 วันที่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิด endothelial sprouting

ตั้งรูป แสดงการเกิด endothelial sprouting ในการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งชนิด HEPG-2 (Patumraj *et al.* *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.33, 2005 :137-144).



◆ Neovascular networking ในระยะ 14 วันหลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งจะพบ Neocapillar เพิ่มขึ้นจำนวนมาก

ตั้งรูป แสดงการเกิด neocapillaries เกิดใหม่ไปยัง บริเวณที่มีเซลล์มะเร็งชนิด HEPG-2 (Patumraj et al. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.33, 2005 :137-144).



◆ Tumor cell proliferate ในระยะ 21 วันหลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง จะเกิด tumor mass

ตั้งรูป แสดงการเกิดเป็นก้อนหลังการปลูก เซลล์มะเร็งปากมดลูก (จากรายงานการวิจัย ของคณะผู้วิจัย)



Acanthus ebracteatus Vahl (เหงือกปลาหมอดอกขาว)

จากรายงานการวิจัยพบว่าเหงือกปลาหมอดอกขาว ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ : Acanthus ebracteatus Vahl และชื่อวงศ์ Acanthaceae มีสรรพคุณที่ใช้กันมาแต่ในอดีต คือ

- ราก ขับเสมหะ แก้อัมพาต เป็นยาอายุวัฒนะ แก้หืด แก้ไอ
- รากและต้น แก้พิษไข้หัวให้ผื่นคัน แก้โรคผิวหนัง แก้ฝีหรือแผลเรื้อรัง แก้พิษฝีดาษ เป็นยาอายุวัฒนะ
- ต้น เป็นยาอายุวัฒนะ แก้ปวดศีรษะ แก้โรคผิวหนัง เป็นยาตัดรากฝี แก้ฝี ถอนพิษ แก้พิษฝีดาษ รักษาแผลเรื้อรัง แก้ประดง แก้ลมพิษ
- เปลือกต้น แก้โรคผิวหนังผื่นคัน แก้พิษฝี แก้พิษเลือด

ใบ	แก้ปวด รักษาปอดบวม รักษาแผลอักเสบ รักษาโรคไขข้ออักเสบ ขับน้ำเหลืองเสีย ขับเสมหะ แก้ไข้ จับหนวสนั่น รักษาโรคผิวหนัง แก้คัน บำรุงประสาท รักษากลาก เกลื้อน
ผล	ขับโลหิตระดู แก้ฝีตานขวาง ถอนพิษดี
เมล็ด	ขับน้ำเหลืองเสีย
ทั้งห้า	แก้พิษฝี แก้พิษกาฬ แก้ไข้หัว แก้โรคผิวหนังคันคัน แก้ประดง แก้ธาตุไม่ปกติ แก้มะเร็ง แก้โรคลม แก้เสียงแหบแห้ง ทำให้เจริญอาหาร ทำให้เลือดลมเดิน สะดวก เป็นยาอายุวัฒนะ

นอกจากนั้น ยังมีรายงานว่ามีอยู่ในเหงือกปลาหมอดอกขาว เช่น Martynoside มีคุณสมบัติ
คล้ายสารจำพวก Dihydrobenzofuran ซึ่งมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ได้
Polysaccharides จากงานวิจัยของ Hokputsa et al. (2004) พบว่าในเหงือกปลาหมอดอกขาวมี สารพวก
polysaccharides ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาช่วยยับยั้งการสร้าง TGF- β and MMP-9 ได้

มีรายงานจำนวนมากที่สนใจศึกษาการใช้สาร polysaccharides ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ
เซลล์มะเร็ง รวมทั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ เช่น polysaccharides ที่สกัดได้จากสาหร่ายจะสามารถยับยั้ง
human microvascular endothelial cells (HMEC-1) proliferation (19-22)

จากรายงานการวิจัยพบว่าเหงือกปลาหมอดอกขาว มี สารเคมี ที่สำคัญคือ alkaloid,
benzoxalinone , proteins, and polysaccharides ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาช่วยยับยั้งการสร้าง leukotriene B4
ยับยั้งเอนไซม์ aniline hydroxylase ด้านการก่อกลายพันธุ์ รวมทั้งมีสารที่มีฤทธิ์ด้านการก่อมะเร็ง ซึ่ง
สามารถสรุปตามชนิดของสารที่เป็น bioactive compounds คือ

bioactive compounds	activity
Martynoside	Anti-oxidant, anti-proliferation
Leucosceptoside	PKC α -inhibitor, Anti-oxidant, anti-proliferation, antibacterial
Isoacteoside	Anti-oxidant, anti-proliferation, Anti-inflammation, antineoplastic, antiviral, antihypertension, immunomodulator, cytotoxic, hepatoprotective, immunosuppressive, PKC α - inhibitor
Aceteoside	Anti-oxidant, anti-proliferation, Anti-inflammation, antibacterial, antiviral, antihypertension, immunomodulator, cytotoxic, hepatoprotective, immunosuppressive
2,4-dihydroxy-1,4 -benzoxazin-3-one DIBOA	Insecticide, antigermination, mutagenicity, prostate cell growth inhibitor, auxin inhibitor

จาก รายงานการวิจัยพบว่าเหงือกปลาหมอดอกขาว มีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ ยับยั้งมะเร็งได้ รวมทั้งที่สำคัญคือสามารถยับยั้ง ไวรัสได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานด้วยว่าสารเคมี ที่มีโครงสร้างคล้าย Martynoside คือ SYNTHETIC DIHYDROBENZOFURAN LIGNANS มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง หลอดเลือดใหม่ในการทดลองแบบ in vitro (7)

รายงานวิจัยในปัจจุบันจำนวนมากที่สนใจ ใช้สารจำพวก proteo-polysaccharides ซึ่งเป็นสารที่ พบในเห็ดหลายชนิดที่อ้างอิงไว้ว่ามีสรรพคุณในการต้านมะเร็งได้ โดยงานวิจัยดังกล่าวรายงานว่า proteo-polysaccharides สามารถยับยั้งการ proliferation of the tumor cells in vitro อาทิเช่น polysaccharides ที่ได้จาก *Lycium barbarum* and *Phellinus linteus* และจาก โสม จากเกสรของ oilseed crop เป็นต้น

วิธีดำเนินการวิจัยและผลการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากต้นเหงือกปลาหมอดอกขาว

นำส่วนใบและลำต้นแห้งบดของต้นเหงือกปลาหมอดอกขาว มาต้มในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 20 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง รวบรวมและกรองสารละลายที่ได้ นำสารสกัดที่ได้ทำให้แห้งด้วย วิธี spray dry ขนาดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ คือ 300 mg/KgBW และ 3,000 mg/KgBW

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ

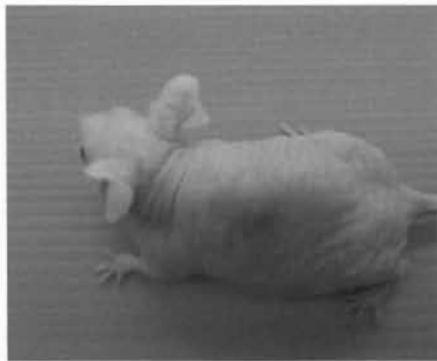
เซลล์ CaSki เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคนที่มีสารพันธุกรรมของไวรัส แปปิโลมาทอป 16 สอดแทรกอยู่ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM โดยมี fetal bovine serum 10 % และ antibiotics ใช้สำหรับเป็นเซลล์ทำการทดสอบในการวิจัยนี้ ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน เพื่อไว้ใช้ในการทดสอบผลของเหงือกปลาหมอดอกขาวแบบ in vitro และเพื่อเตรียมสำหรับการฉีดเข้า หนูทดลอง (in vivo)

3. การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลอง

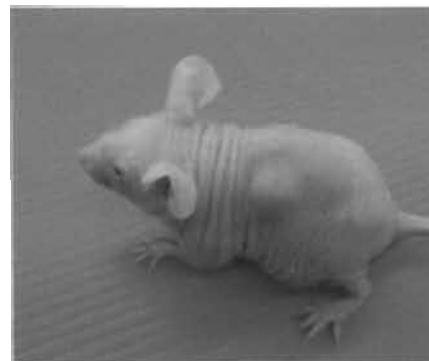
ในการดำเนินการวิจัยใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูกจากคนคือ CaSki cells ปลูกถ่ายลงใน หนูหนูดำไมซ์โดยการฉีดเซลล์ขนาด 5×10^6 cell/ml เข้าในชั้นผิวหนัง (กลุ่มละ n =8 ตัว) (8-9) ส่วนกลุ่มที่เป็นกลุ่มควบคุม จะได้รับเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 สัปดาห์หลังจากที่หนูได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ CaSki จะพบว่าจะมีก้อนเนื้ออกบริเวณที่มีการปลูกถ่ายเซลล์ในทุกกลุ่ม ทำการพิสูจน์ว่าก้อนเนื้อ ดังกล่าวเป็นมะเร็งที่เกิดจากเซลล์ CaSki โดยใช้เทคนิค PCR, in situ hybridization และ การทำ HPV genotyping (7-10)

ผลการทดลองในรูปที่ 3.1A-B แสดงว่า การปลูกเซลล์มะเร็งปากมดลูกจากคนคือ CaSki cells เข้าไปภายใต้ผิวหนังที่หลัง (Dorsal skin) ของ หนูถีบวีโมซ์ ในขนาด 5×10^6 cell/ml ในวันที่ 7 และ 21 วัน หลังการปลูกเซลล์

A) 7 วันหลังการปลูกเซลล์



B) 21 วันหลังการปลูกเซลล์



รูปที่ 3.1A-B Photography of experimental mice after injected with CaSki cells (1×10^7 cells/200 μ l) into subcutaneously at dorsum skin (A), inflammatory signs (B) and tumor bud were seen, and enlarged continuously at 21 days after CaSki cells inoculation.

ผลการทดลองในตารางที่ 3.1 แสดงว่า การปลูกเซลล์มะเร็งปากมดลูกจากคนคือ CaSki cells เข้าไปภายใต้ผิวหนังที่หลัง (Dorsal skin) ของ หนูถีบวีโมซ์ ในขนาด 5×10^6 cell/ml ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว เนื่องจากที่เวลา 21 และ 35 วันหลังการปลูกเซลล์ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างหนูแต่ละกลุ่ม ($P < 0.05$)

Table 3.1. Values of mean body weight (g) for each group at different time point with and without treatment of *A. ebracteatus* Vahl. crude extract.

Groups	Body weight (g)			% BW change
	At day 1 st	At day 21 th	At day 35 th	
Con-Veh (n=8)	21.31±0.31 (n=8)	22.90±0.77 (n=4)	23.64±0.57 (n=4)	0.34±0.14
Con-300AE (n=10)	21.21±0.32 (n=10)	20.60±0.58 [*] (n=5)	22.46±0.67 (n=5)	0.12±0.62
Con-3,000AE (n=8)	21.44±0.38 (n=8)	21.41±0.40 (n=4)	23.60±0.52 (n=4)	0.23±0.16
HPV-Veh (n=9)	21.11±0.26 (n=9)	23.57±0.32 (n=5)	24.33±0.88 (n=4)	0.38±0.21
HPV-300AE (n=7)	20.86±0.34 (n=7)	22.08±0.62 (n=3)	23.88±0.28 (n=4)	0.40±0.15
HPV-3,000AE (n=9)	22.11±0.48 (n=9)	22.30±0.15 (n=5)	24.26±0.60 (n=4)	0.30±0.16

Notes: Data expressed as mean ± SEM, * significantly difference from HPV-veh group ($P < 0.05$)

4. การทดสอบผลของเหงือกปลาหมอดอกขาว ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (*in vitro* study)

4.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ anti-proliferation ของเหงือกปลาหมอดอกขาว โดยใช้วิธี MTT assay

การทดสอบผลของเหงือกปลาหมอดอกขาว ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยตรง โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ CaSki จำนวน 10^4 cells/well ใน 96-well plates แล้วทำการใส่สารสกัดเหงือกปลาหมอในความเข้มข้นระหว่าง 10^{-1} – 10^4 mg/ml เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม จากนั้นทำการวัด % cell viability โดยใช้วิธี MTT assay

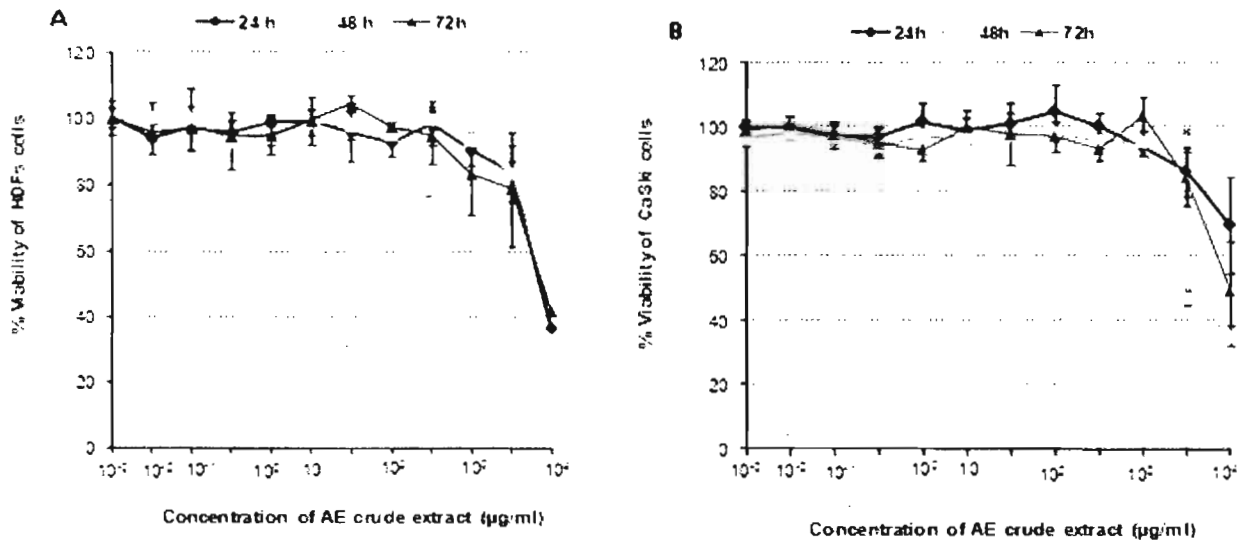


Figure 4.1.1 A-B. The percent cell viability of HDFs (A), and CaSki (B) when treated with *A. ebracteatus* Vahl. at different concentrations (10^{-3} - 10^4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with total volume 100 $\mu\text{L}/\text{well}$) after 24, 48, and 72 hour incubations.

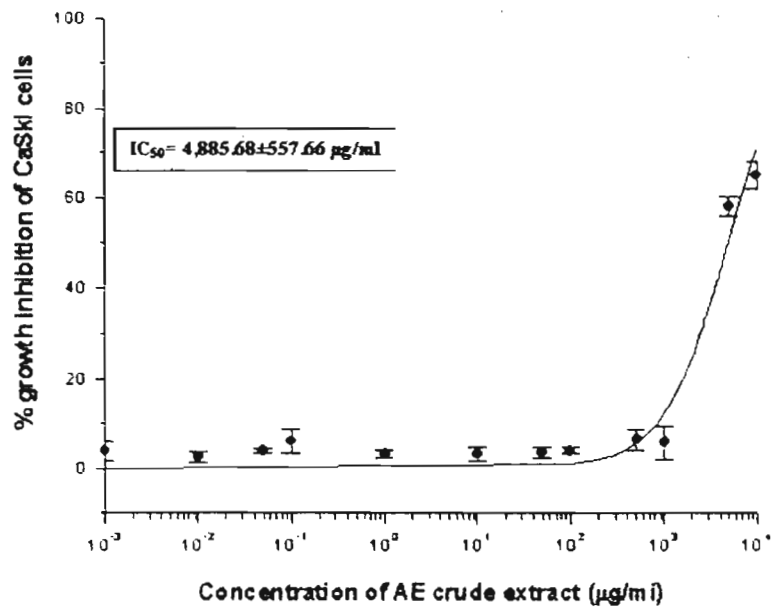


Figure 4.1.2 The dose response curve and IC₅₀ value of *A. ebracteatus* Vahl. crude extract (48 hours of incubation time) on CaSki cells were obtained by blotting the percent inhibition versus concentration. Data expressed as means \pm SEM of three independent experiments carried out in triplicate. The IC₅₀ value was required to increased cell growth inhibition from 0% to 50%.

Table 4.1.1 Short-term *in vitro* cytotoxicity of *A. ebracteatus* Vahl. crude extract

<i>A. ebracteatus</i> Vahl. crude extract concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Percentage of cell death (%)	
	CaSki cells	HDFs cells
0.1	5.21 \pm 1.18	4.87 \pm 0.48
1	5.41 \pm 1.40	4.58 \pm 0.63
10	5.63 \pm 0.34	4.87 \pm 0.42
100	4.46 \pm 0.47	4.85 \pm 0.22
1,000	5.01 \pm 1.96	5.15 \pm 0.35
5,000	4.62 \pm 0.72	5.44 \pm 0.38
10,000	4.37 \pm 0.57	4.58 \pm 0.38
Control (MEM)	5.13 \pm 0.92	4.50 \pm 0.28

Note : Data express as mean \pm SEM

จากผลของ %Viability of Caski cells โดย MTT Assay จึงนำมาคำนวณหา IC_{50} ได้ดังตารางที่ 4.1.2 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า AE มีฤทธิ์ anti-proliferation ของ CaSki ได้ที่

$IC_{50} = 4,984.90 \pm 498.72$ ($\mu\text{g/ml}$)

Table 4.1.2 The half maximal inhibitory concentration (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$) of *A. ebracteatus* Vahl. crude extract in three cancer cell lines (CaSki) and one normal cell type (HDFs) after incubation with AE for 48 hours.

Cell types	No. of Experiment	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Mean of IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
CaSki	1	4,290.11 \pm 333.06	4,984.90 \pm 498.72*
	2	4,712.45 \pm 852.03	
	3	5,952.04 \pm 595.81	
HeLa	1	7,009.56 \pm 434.40	6,072.50 \pm 573.29 ^{ns}
	2	5,031.74 \pm 33.90	
	3	6,176.10 \pm 421.22	

Notes Data are expressed as the mean \pm SEM, n=3 (n = Number of independent experiments, which were performed in triplicate). The IC_{50} values were determined at 48 hr using the non-linear regression equation (fitting Logistic-sigmoidal model) and Microcal Origin version 5.0 software program. * Significantly different compared with HDFs ($P < 0.01$), as determined by the student t-test statistical testing (SPSS Version 16). Ns: non-significant difference when compared with HDFs.

4.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน p53 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยวิธี Immunocytochemical study เพาะเลี้ยงเซลล์ CaSki จำนวน 5×10^4 cells /chamber ใน sterile slide chamber จากนั้นใส่สารสกัดเนื้อเยื่อในขนาดและระยะเวลาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ได้จากการทดสอบด้วย MTT assay และทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน p53 โดยใช้แอนติบอดีต่อ p53 และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

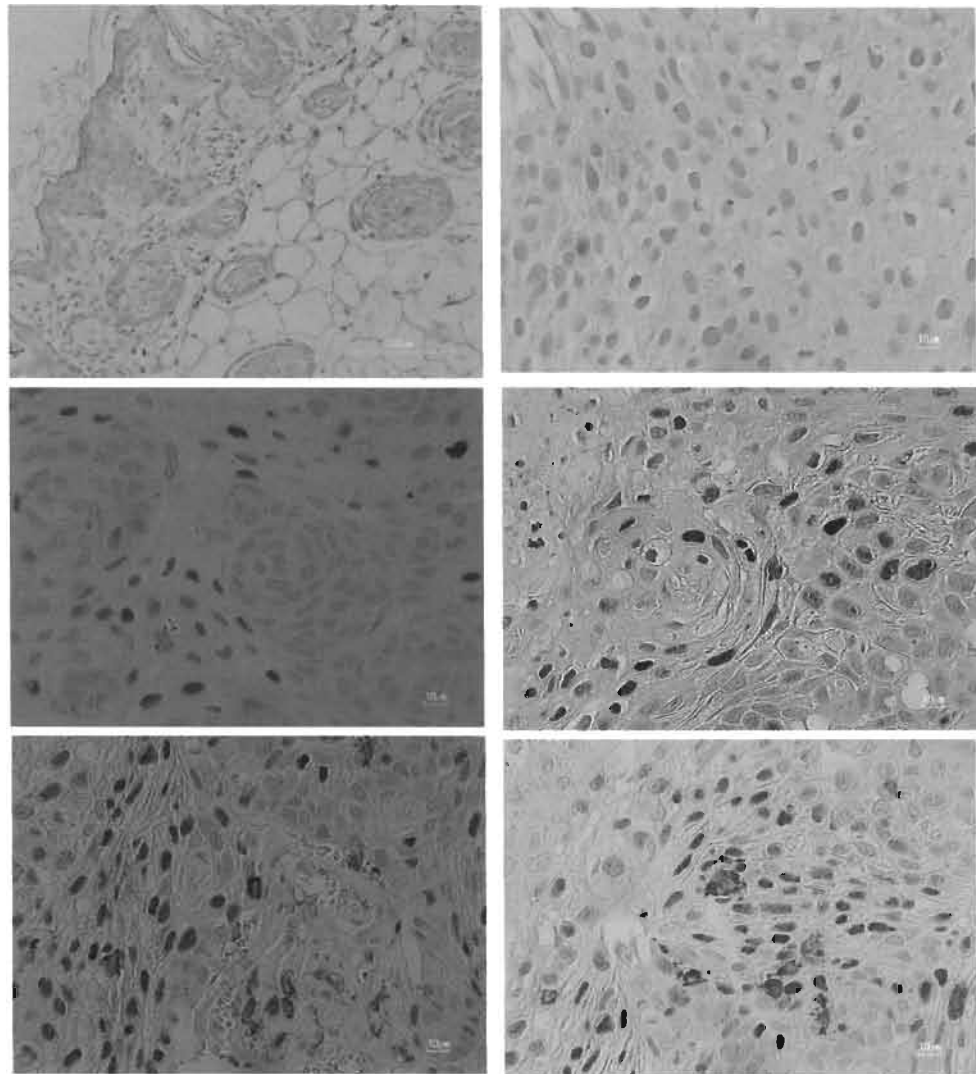


Figure 4.2.1 Histology of nuclear staining of P53 in tumor cells of tumor tissue from CaSki cells-implanted nude mice with and without AE treatment.

Table 4.2.1 Proportion of number of P53-positive tumor cells per total tumor cells (%) of tumor tissue from CaSki cells-implanted nude mice with and without AE treatment.

Groups	Number of P53-positive cells (%)	
	Days after treatment	
	At day 14 th	At day 28 th
HPV-Veh (n=9)	1.75 ± 0.23	2.96 ± 2.96
HPV-300AE (n=7)	16.27 ± 2.43[†]	13.51 ± 4.46[‡]
HPV-3,000AE (n=9)	32.66 ± 4.18^{†,*}	35.48 ± 0.35^{‡,#}

Notes: Data expressed as mean ± SEM,

[†] significantly difference from HPV-Veh at day 14th group ($P < 0.001$),

[‡] significantly difference from HPV-Veh at day 28th group ($P < 0.001$),

^{*} significantly difference from HPV-300AE at day 14th groups ($P < 0.001$),

[#] significantly difference from HPV-300AE at day 28th groups ($P < 0.001$).

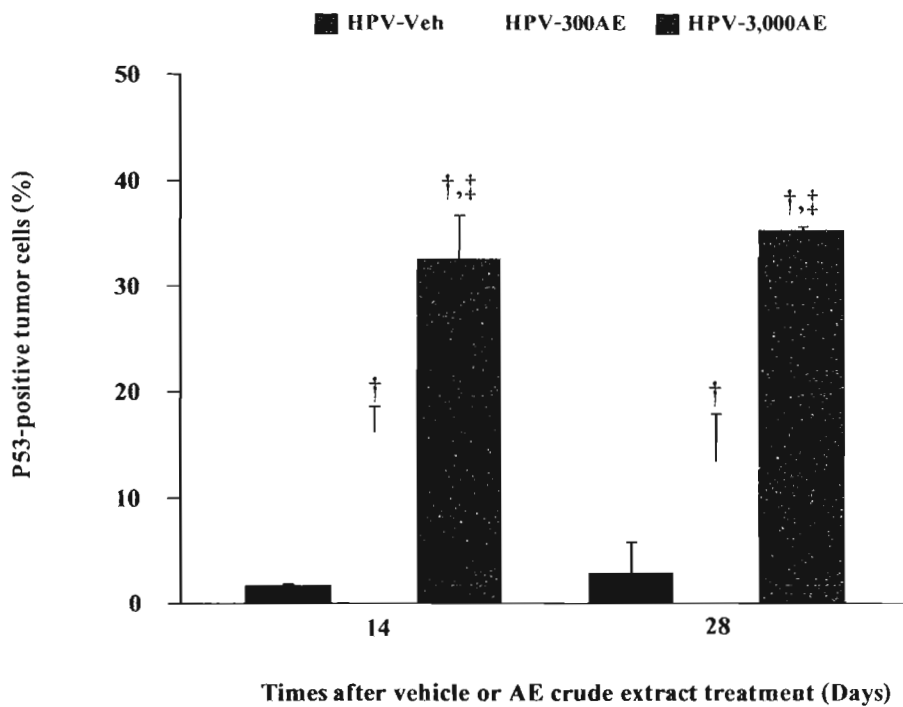


Figure 4.2.2 The proportion of number of P53-positive tumor cells per total tumor cells of tumor tissue from CaSki cells-implanted nude mice at 14 days and 28 days after vehicle (distilled water), AE (300 and 3,000 mg/kg BW) treatment in HPV groups.

Notes: Data expressed as mean \pm SEM,

† significantly difference from HPV-Veh groups ($P < 0.001$).

‡ significantly difference from HPV-300AE groups ($P < 0.001$).

5. การศึกษาเพื่อยืนยันการเจริญของเซลล์มะเร็ง

5.1. การตรวจวัดขนาดของการขยายเพิ่มจำนวนของเซลล์ในบริเวณที่ทำการปลูก และสังเกตลักษณะการพัฒนาก่อนเนื้องอกที่งอกขึ้น ในวันที่ 21 หลังการปลูกเซลล์

โดยใช้ คิวทอลอโต้เวอร์เนีย วัดเส้นผ่าศูนย์กลางที่สั้นที่สุดและจากด้านที่ยาวที่สุด แล้วนำมาคำนวณหาค่ารัศมีเป็น r_1 และ r_2 ตามลำดับ เพื่อนำไปหาปริมาตรของก้อนมะเร็งจาก

$$\text{สมการ} \quad V = 4/3 \pi [r_1]^2 \times r_2 \quad \text{-----}[1]$$

Table 4.5.1 Tumor volume of tumor nodule excised from each HPV- group.

Groups	Tumor Volume (mm ³)/	
	days after treatment	
	At day 14	At day 28
HPV-Veh (n=9)	103.79 ± 11.69 (n=4)	235.98 ± 7.57 [†] (n=5)
HPV-300AE (n=7)	94.89 ± 9.50 (n=3)	245.36 ± 36.26 [‡] (n=4)
HPV-3,000AE (n=9)	62.37 ± 16.56 (n=5)	155.77 ± 7.55 ^{‡,*,#} (n=4)

Notes: Data expressed as mean ± SEM,

[†] significantly difference from HPV-Veh group at day 14th of treatment ($P < 0.001$),

[‡] significantly difference from HPV-300AE group at day 14th of treatment ($P < 0.001$),

[€] significantly difference from HPV-3,000AE group at day 14th of treatment ($P < 0.001$),

^{*} significantly difference from HPV-Veh group at day 28th of treatment ($P < 0.001$),

[#] significantly difference from HPV-300AE group at day 28th of treatment ($P < 0.001$).

5.2. การตรวจทางพยาธิวิทยา เมื่อเสร็จการทดลองจะทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณก้อนมะเร็ง เพื่อไปตรวจยืนยันการเป็นมะเร็งและอ่านผลโดย Pathologist

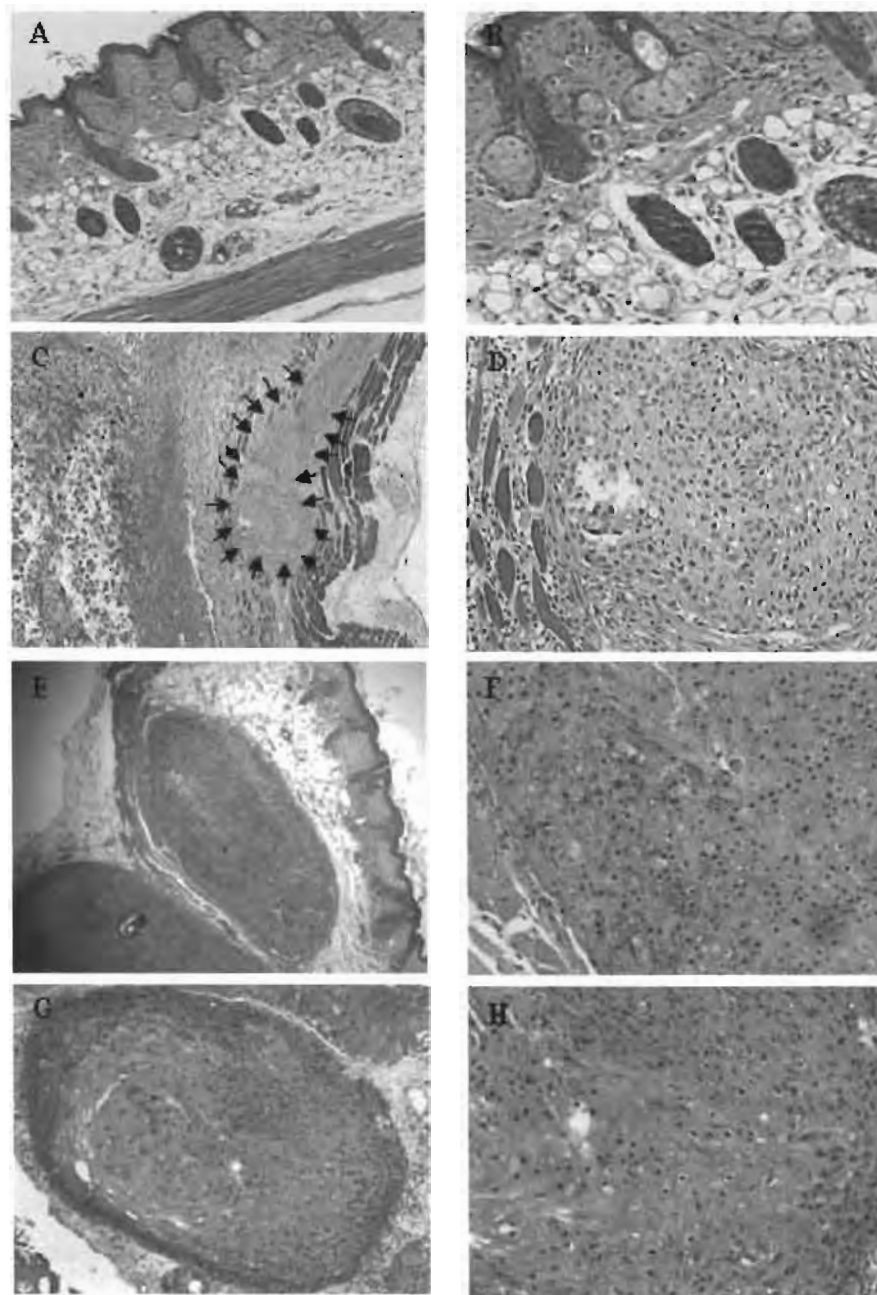
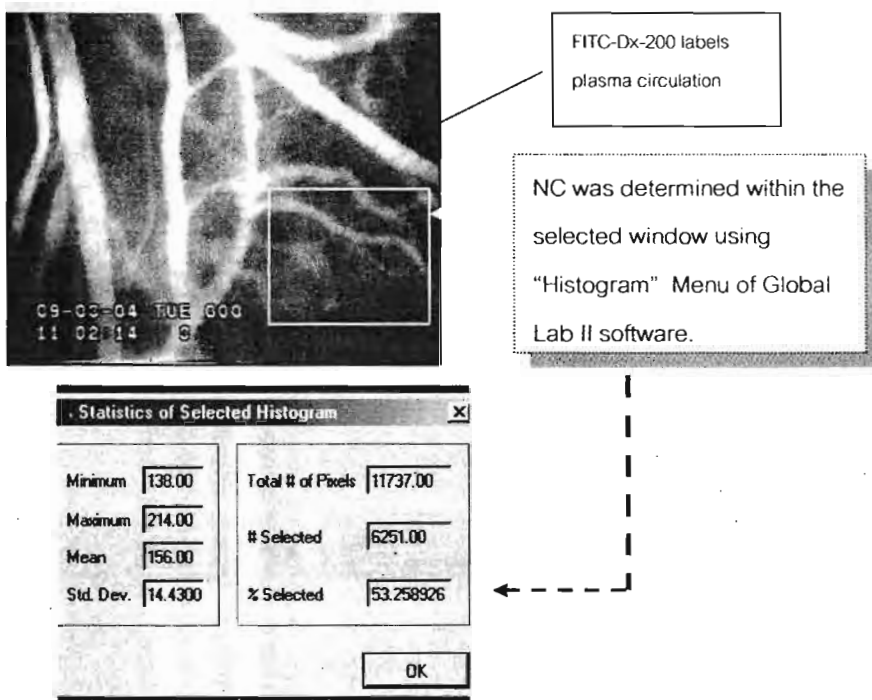


Figure 5.2.1 Histological finding of normal skin from control mice (A) and subcutaneous tumor nodules taken from CaSki cells-implanted nude mice showed marked deposit malignant tumor in deep part of skin after inoculation for 7 days (C), 21 days (E), and 35 days (G). Morphological study of epithelium cells of normal skin (B) and squamous cells carcinoma (D, F, H).

6. การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของหลอดเลือดในบริเวณที่ปลูกเซลล์มะเร็ง (Neocapillary Density)

วันที่ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ Microcirculation RU ความหนาแน่นของหลอดเลือดในบริเวณที่ปลูกเซลล์มะเร็ง (Neocapillary Density =NC) จะคำนวณโดย Software Image Analysis(ref. 8-9) หลอดเลือดในบริเวณที่ปลูกเซลล์มะเร็งจะสามารถมองเห็นได้โดยใช้สาร Florescein Isothiocyanate labeled Dextran (FITC-Dx-200, MW.=200,000) และจะถูกบันทึกเก็บภาพโดย Real time video camera (Hamamatsu) ตลอดการทดลอง จากภาพที่อัดวิดีโอจะนำมาวิเคราะห์ภายหลัง เพื่อหาความหนาแน่นของหลอดเลือดในบริเวณที่ปลูกเซลล์มะเร็ง (Neocapillary Density =NC) โดยจะสามารถแสดงเป็นร้อยละต่อพื้นที่ทำการศึกษาร่วมกัน โดยใช้ Software Digital Image Analysis ของ Datatranslation Global Lab II (USA) (ref. 8-9)



$$\text{Neocapillary density (NCD) (\%)} = \frac{\Sigma \text{ number of pixels within the capillaries} \times 100}{\text{Total number of pixels within the selected area}}$$

ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 6.1 และความหนาแน่นของหลอดเลือดในบริเวณที่ปลูกเซลล์มะเร็ง ในวันที่ 14 และ 28 หลังการให้ AE โดยหลอดเลือดใหม่ที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะ dialation, turtosity, and hyperpermeability

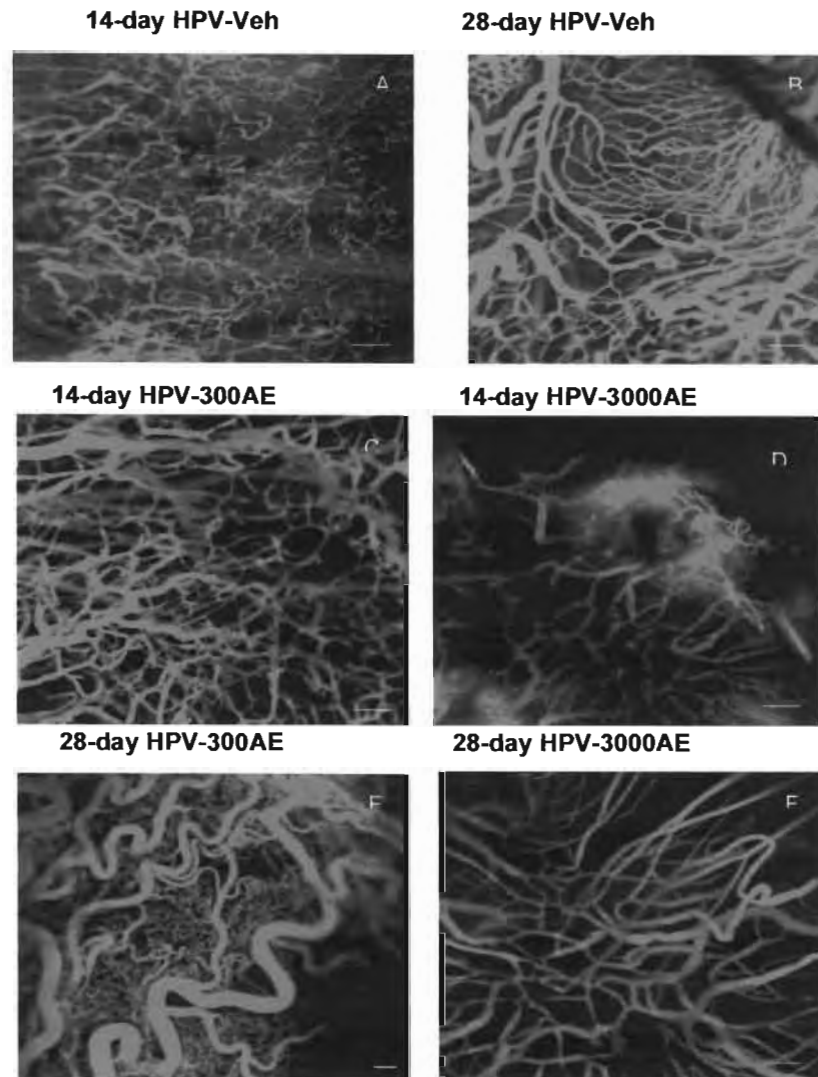


Figure 6.1 A-F. Confocal laser microscopic images of the tumor microvascular network taken on day 14 in the HPV-Veh group (A), day 28 in the HPV-Veh group (B), day 14 in the HPV-300AE (300 mg/kg BW) group (C), day 14 in the HPV-3000AE (3,000 mg/kg BW) group (D) day 28 in the HPV-300AE group (E) and day 28 in the HPV-3000AE group (F). The microvascular network was visualized using FITC-dextran fluorescence (MW 200,000), with AE (*Acanthus ebracteatus* Vahl. crude extract), low magnification $\times 10$, Bar = 50 μm .

ในกราฟรูปที่ 6.2. แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณหลอดเลือดใหม่ด้วยวิธี Image Analysis พบว่ามีการลดลงของหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม ที่ได้รับ AE ที่ความเข้มข้นสูงคือ 3000 mg/kg BW

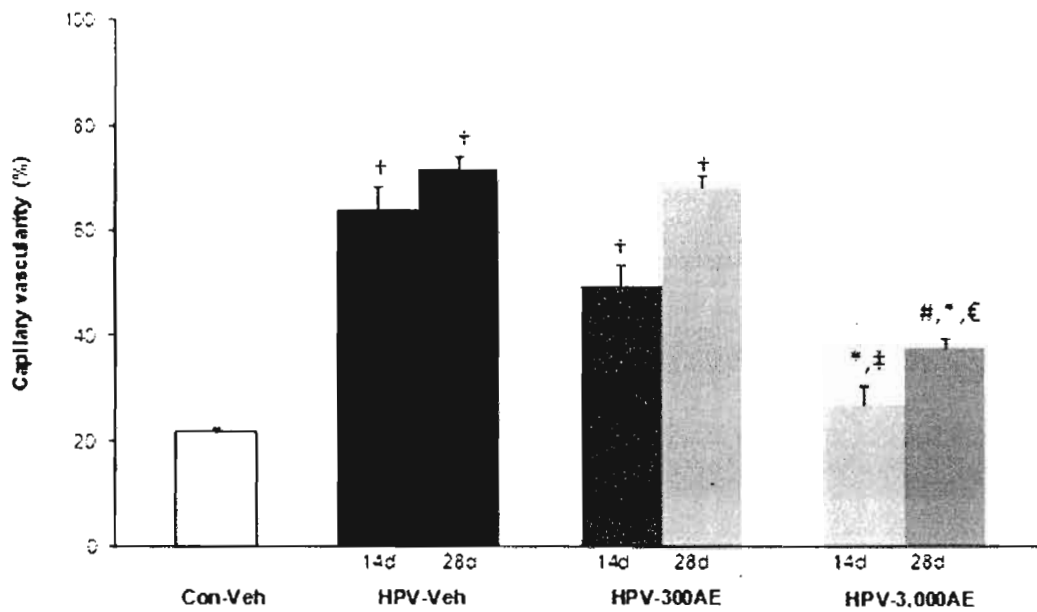


Figure 6.2. The percentages of capillary vascularity (mean \pm SE) on day 14 and day 28 after vehicle (distilled water) or AE (300 and 3,000 mg/kg BW) treatments, shown for control and HPV groups.

Notes: † Significantly different from control group ($P < 0.001$)

Significantly different from control group ($P < 0.005$)

* Significantly different from HPV-Veh group ($P < 0.001$)

‡ Significantly different from HPV-300AE group ($P < 0.001$)

€ Significantly different from HPV-300AE group ($P < 0.01$).

7. การตรวจหา VEGF

หลังจากเสร็จการทดลอง Intravital fluorescent videomicroscopy จึงทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ
ในบริเวณที่ปลูกเซลล์มะเร็ง เพื่อนำไปตรวจหา VEGF โดยวิธี immunohistochemistry (8-9)

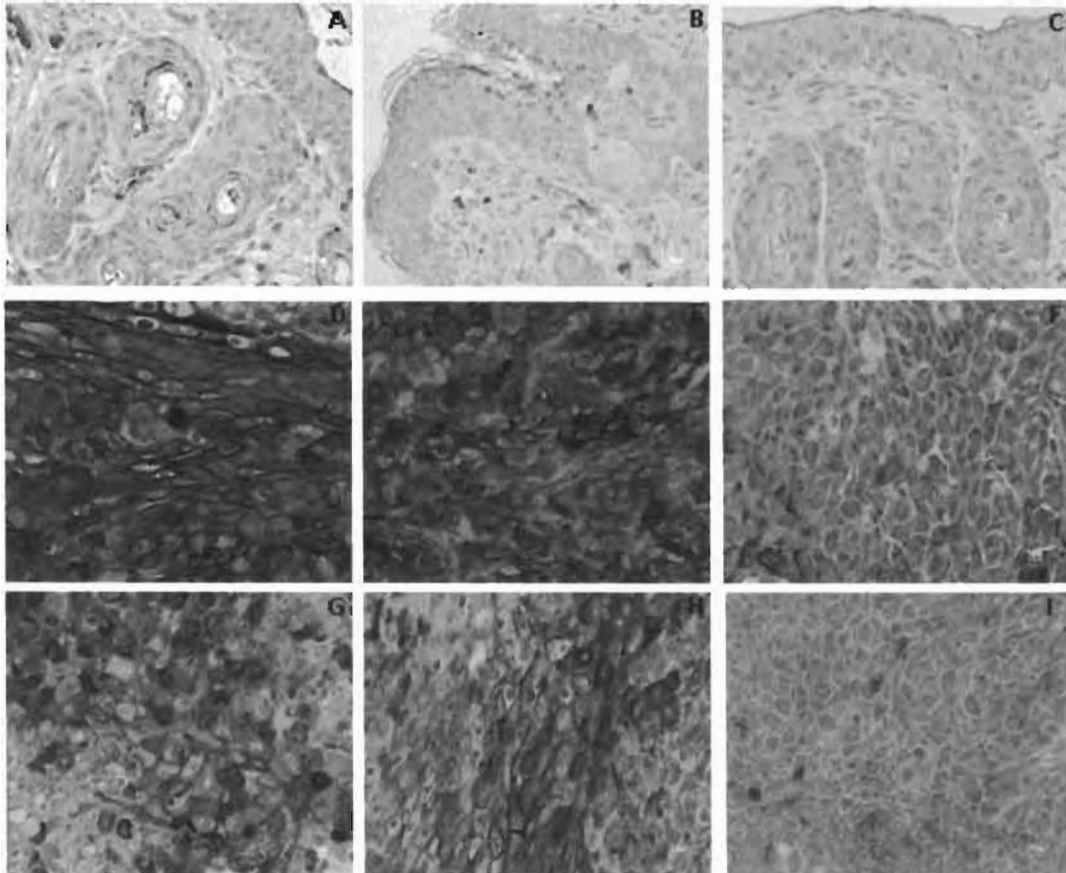


Figure 7.1 The expression of VEGF from CON-Veh (A), CON-300AE (B), CON-3,000AE (C), 14-day HPV-Veh (D), 14-day HPV-300AE (E), 14-day HPV-3,000AE (F), 28-day HPV-Veh (G), 28-day HPV-300AE (H), and 28-day HPV-3,000AE (I) (magnification $\times 40$).

Table 7.1 Area of VEGF expression in tumor tissue (%) from CaSki cells-implanted nude mice with and without AE treatment.

Groups	Area of tumor tissue VEGF expression (%)	
	Days after treatment	
	At day 14 th	At day 28 th
Con-Veh (n=8)	32.89 ± 2.06 (n=4)	33.17 ± 1.12 (n=4)
Con-300AE (n=10)	29.64 ± 2.22 (n=5)	37.26 ± 1.49 (n=5)
Con-3,000AE (n=8)	40.40 ± 3.47 (n=4)	35.17 ± 3.05 (n=4)
HPV-Veh (n=9)	80.96 ± 2.16 (n=5) [†]	80.56 ± 1.09 (n=4) [†]
HPV-300AE (n=7)	77.33 ± 3.87 (n=3) ^{†, #, ns}	77.99 ± 2.30 (n=4) ^{†, #}
HPV-3,000AE (n=9)	54.64 ± 3.59 (n=5) ^{†, *, e, †, ns}	45.63 ± 3.47 (n=4) ^{e, †}

Notes: Data expressed as mean ± SEM,

[†] significantly difference from Con-Veh groups ($P < 0.001$).

[#] significantly difference from Con-300AE groups ($P < 0.001$).

^{*} significantly difference from Con-3,000AE groups ($P < 0.001$).

^e significantly difference from HPV-Veh groups ($P < 0.001$).

[‡] significantly difference from HPV-300AE groups ($P < 0.001$).

^{ns} no significant difference compared to 28 days treatment groups

ผลการทดลองในรูปที่ 7.1 และตารางที่ 7.1 แสดงว่า AE สามารถยับยั้ง VEGF Expression ได้
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อให้ในปริมาณที่สูงคือ 3000 mg/kg BW

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

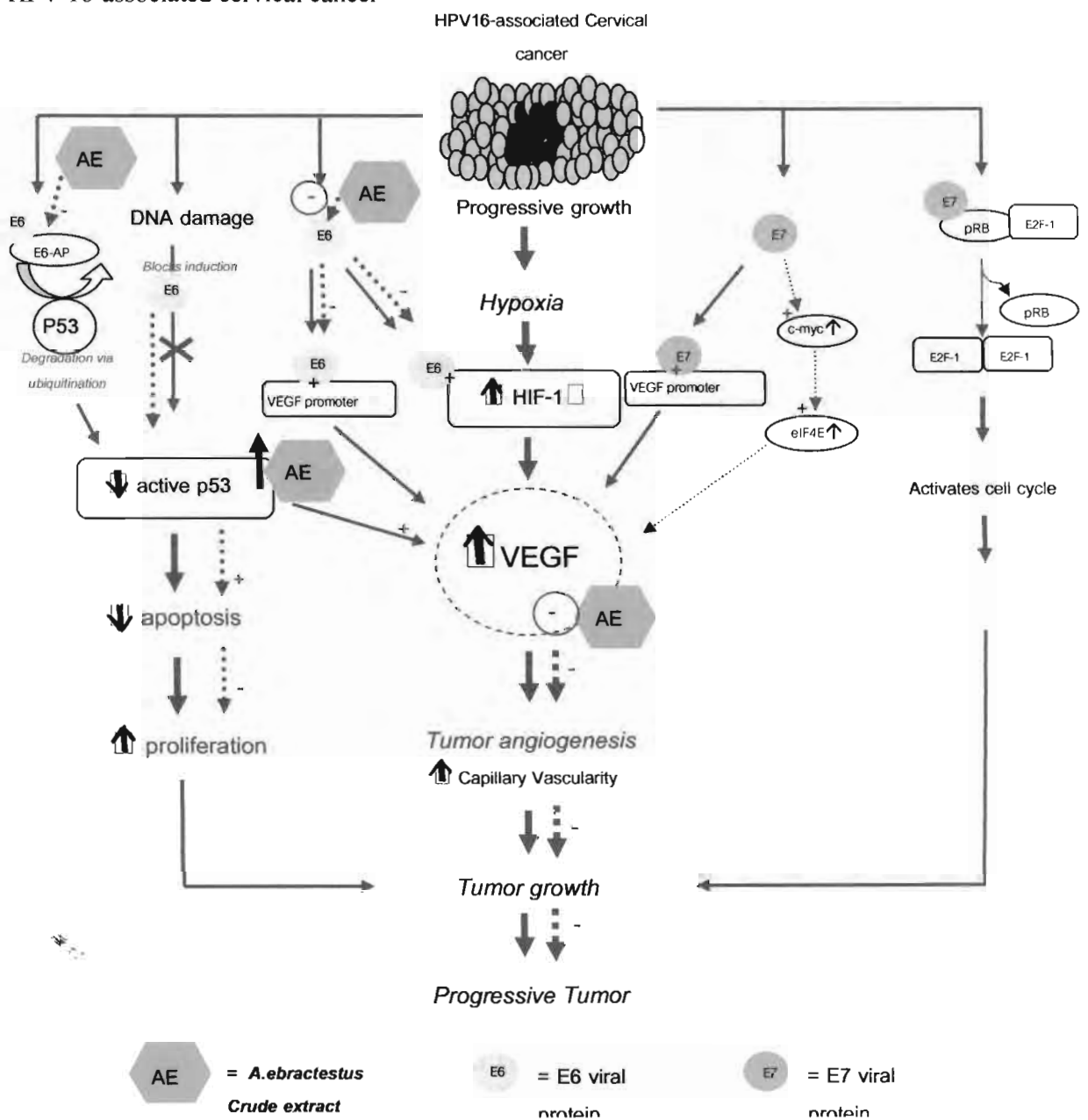
The significant exploring could be summarized as follows;

1. Under *in vitro* MTT assay observation, AE (48 hr) had an anti-proliferative effect on CaSki cells, the only one cancer cell that was significantly different from normal cells, HDFs.
2. CaSki, a human cervical cancer-derived cell lines with integrated HPV-16 DNA (1×10^7 cells/200 μ l/each mouse), could induce cervical cancer bearing mice model by directly injection into subcutaneous layer at middle dorsum skin. Thus, HPV16-associated cervical cancer mice model could be established, and also exhibited the malignant tumor feature of squamous cell carcinomas (SCCs).
3. The expression of p53 was detected very low in tumor tissue from CaSki cells-induced cervical cancer mice, suggested that this model is HPV16-associated cervical carcinoma with wild-type p53.
4. Tumor angiogenesis was observed after CaSki cells inoculation, indicating the Caski cells-induced angiogenesis, and also correlated with tumor growth. Therefore, the HPV16-associated cervical carcinoma mice provided the tumor angiogenesis mice model.
5. The up-regulation of VEGF was found in Caski cells-implanted mice model, and also exhibited the correlation with the tumor angiogenesis and p53 protein expression.
6. *A.ebracteatus* Vahl. aqueous crude extract was exhibited the anti-angiogenic and anti-tumor activity of on HPV16-associated cervical carcinoma was dose-dependent manner, but not depend on the duration of treatment.
7. The inhibitory effect of *A. ebracteatus* Vahl. aqueous crude extract on anti-angiogenesis should be related to its possible mechanism of anti-VEGF expression.
8. *A.ebracteatus* Vahl. aqueous crude extract exhibited the down-regulation of tumor VEGF expression in HPV16-associated cervical carcinoma might be related to the accumulation of tumor active p53 protein.

Conclusion

In summary, our studies demonstrated that the *A. ebracteatus* Vahl. crude extract could inhibit tumor growth and tumor angiogenesis in a mouse model of HPV-16-derived cervical cancer. In particular, the anti-angiogenic activity of AE was significantly correlated to its ability to inhibit VEGF expression, providing a potential mechanism to explain the anti-tumor effects of AE. [32]

Figure 8 Proposed possible mechanism for *A. ebracteatus* Vahl. aqueous crude extract on HPV 16-associated cervical cancer



เอกสารอ้างอิง ของโครงการวิจัย

1. R. T. Greenlee, T. Murray, S. Bolden and P. A. Wingo. Cancer statistics, 2000, CA: *A Cancer Journal for Clinicians*, Vol 50, Issue 1 7-33, Copyright © 2000 by American Cancer Society
2. National Cancer Institute. Annual report 1997. Department of Medical Service, Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand.
3. Cates, W., and the American Social Health Association Panel 1999. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. *Sex. Transm. Dis.* 26: s2-s7.
4. Parkin D.M., Pisani P. and Ferlay J. 1999. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J cancer* 80: 827-841.
5. Pisani P., Parkin D.M., Bray F and Ferlay J. 1999. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 83: 18-29.
6. Burd E.M. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbio Review* 16: 1-17.
7. S. Apers, D. Paper, J. Bürgermeister, S. Van Dyck, G. Lemièrre, A. Vlietinck, L. Pieters www.biologie.uni-erlangen.de/.../Effects.html.
8. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, and Patumraj S. Antiangiogenic activity of curcumin in Hepatocellular carcinoma cells implanted nude mice. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.33, 2005 :127-136
9. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, Niimi H, and Patumraj S. Effects of curcumin on tumor antiangiogenesis and biomarkers : COX-2 and VEGF *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 :109-116.
10. Ferrara, N., Carver Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell Braxton, L., Hillan, K. J. and Moore, M. W (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442
11. Sharma, R.A., Manson, M.M., Gescher, A., and Steward, W.P. (2001). Colorectal cancer chemoprevention: biochemical targets and clinical development of promising agents. *Eur.J.Cancer.*, 37, 12-2.
12. Kelloff, G.J., Hawk. E.T., Karp, J.E., Crowell, J.A., Boone, C.W., Steele, V.E., Lubet, R.A., and Sigman, C.C. (1997). Progress in clinical chemoprevention. *Semin.Oncol.*, 24, 241-252.
13. Folkman J. (1996). Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci. Am.*, 275: 150-154.
14. Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86, 353-364.
15. Jones, M.K., Wang, H., Peskar, B.M., Levin, E., Itani, R.M., Sarfeh, I.J., and Tarnawski, A.S. (1999). Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat.Med.*, 5, 1418-1423.
16. Anna Kanerva¹, Mari Raki¹, Gerd J. Bauerschmitz², Koichi Takayama³, Masato Yamamoto³, Renee A. Desmond⁴, David T. Curiel³ and Akseli Hemminki¹ Regulation of Cyclooxygenase-2 and Vascular Endothelial Growth Factor Promoter Based Conditionally Replicating Adenoviruses for Treatment of Cervical Cancer. *Molecular Therapy* (2004) 9, S367-S367; doi: 10.1016/j.ymthe.2004.06.903
17. Jiro Fujimoto, Hiroshi Toyoki, Eriko Sato, Hideki Sakaguchi, Israt Jahan, Syed Mahfuzul Alam and Teruhiko Tamaya. Expression of cyclooxygenase-2 related to angiogenesis in uterine cervical cancers. *J.of Biomedical Science*. Volume 13, Number 6 / November, 2006:825-832.

18. Lehr, H., Leunig, M., Menger, M.D., Nolte, D., and Messmer, K. (1993). Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscope in nude mice. *Am.J.Pathol.*, 143, 1055-1062.
19. Hokputsa, S., Harding, S. E., Inngjerdingen, K., Jumel, K., Michaelsen, T. E., Heinze, Koschella, A., & Paulsen, B. S. (2004). Bioactive polysaccharides from the stems of the Thai medicinal plant *Acanthus ebracteatus*: their chemical and physical features. *Carbohydrate Research*, 339(4), 753-762.
20. D. Yin, Z. Ge, W. Yang, C. Liu, Y. Yuan. Inhibition of tumor metastasis in vivo by combination of paclitaxel and hyaluronic acid. *Cancer Letters*, Volume 243, Issue 1, Pages 71-79
21. Jian Li, Qingwang Li, Tao Feng, Tao Zhang, Kun Li , Rui Zhao, Zengsheng Han, Dawei Gao. Antitumor activity of crude polysaccharides isolated from *Solanum nigrum* Linne on U14 cervical carcinoma bearing mice. *Phytotherapy Research*. Volume 21, Issue 9 , Pages 832 – 840
22. Chao Zhang, Fan Yang, Xiong-Wen Zhang, Shun-Chun Wang, Mei-Hong Li, Li-Ping Lin and Jian Ding *Grateloupia longifolia* polysaccharide inhibits angiogenesis by downregulating tissue factor expression in HMEC-1 endothelial cells. *British Journal of Pharmacology* (2006) 148, 741–751. doi:10.1038/sj.bjp.0706741; published online 22 May 2006.
23. J.C. Lee, K.Y. Lee, Y.O. Son, K.C. Choi, J. Kim, T.T. Truong and Y.S. Jang, Plant-originated glycoprotein, G-120, inhibits the growth of MCF-7 cells and induces their apoptosis, *Food and Chemical Toxicology* 43 (2005), pp. 961–968.
24. G. Li, D.H. Kim, T.D. Kim, B.J. Park, H.D. Park and J.T. Park, Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells, *Cancer Letters* 216 (2004), pp. 175–181.
25. C.X. Zhang and K.X. Huang, Mechanism of apoptosis induced by a polysaccharide, from the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (MAP) in human hepatocellular carcinoma cells, *Toxicology and Applied Pharmacology* 210 (2006), pp. 236–245.
26. Chen-Xiao Zhang and Kai-Xun Huang Mechanism of apoptosis induced by a polysaccharide, from the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (MAP) in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volume 210, Issue 3, 1 February 2006, Pages 236-245
27. A Vecchiarelli, C Retini, D Pietrella, C Monari, C Tascini, T Beccari, and T R Kozel. Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes. *Infect Immun*. 1995 August; 63(8): 2919–2923.
28. Wei Cao, Xiao-Qiang Li, Li Liu, Tie-Hong Yang, Chen Li, Hui-Ting Fan, Min Jia, Zheng-Guang Lu and Qi-Bing Mei. Structure of an anti-tumor polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Carbohydrate Polymers* . Volume 66, Issue 2, 27 October 2006, Pages 149-159.
29. Xiaoping Yang, Dayong Guo, Jinming Zhang, and Moucheng Wu. Preliminary Report : Characterization and anti-tumor activity of pollen polysaccharide *International Immunopharmacology* Volume 7, Issue 3, March 2007, Pages 401-408.
30. Daroonwan Chakraphan, Patarin Sridulyakul, Bundit Thipakorn, Srichitra Bunnag, Virginia Huxley, Suthiluk Patumraj Leukocyte-endothelial cell interaction is attenuated by low-intensity exercise training and vitamin C supplementation in diabetic rats. *Asian Biomed Journal*. 2007:1: 67-75.

31. Amporn Jariyapongskul, Tippawan Rungjaroen , Ngamjit Kasetsuwan , Suthiluk Patumraj, Junji Seki, Hideyukii Niimi. Long-term effects of oral vitamin C supplementation on the endothelial dysfunction in the iris microvessels of diabetic rats. *Microvasc Res.* 2007 Mar 23; 174: 677-47.
32. Taksanee Mahasiripanth, Sanya Hokputsa, Somchai Niruthisard, Parvapan Bhattarakosol, Suthiluk Patumraj. Effects of *Acanthus ebracteatus* Vahl. on Tumor Angiogenesis and on Tumor Growth in Nude Mice Implanted with Cervical Cancer. *Cancer Management and Research*, 2012. (*in press*).

ประโยชน์ที่ได้รับ

เมื่อเสร็จสิ้นงานวิจัยจะทำให้ได้ผลงานวิจัยที่ส่งผลโดยตรงคือ

1. รายงานฉบับสมบูรณ์ 1 เล่ม
2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ 1 เรื่อง
3. จะดำเนินการจดสิทธิบัตรอย่างน้อยภายในประเทศ

การถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

การนำผลงานไปตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ 2 ครั้ง

1. ในการประชุม The 7th Asian Congress for Microcirculation (7th ACM) สถานที่จัด Ramada Plaza, Tai-an, Chiana. ระยะเวลา 17-19 October 2008 ชื่อผลงานทางวิชาการที่นำเสนอเรื่อง Human Papillomavirus Induces Tumor Angiogenesis in Nude-mice Dorsal Skin-fold. Mahasiripanth T., Bhattarakosol P., Niruthisard S., Patumraj S. โดย นิสิต คือ นส. ทักษณี มหาศิริพันธุ์ ได้รับ *Travel Award*
2. ในการประชุม 9th World Congress for Microcirculation, Maison de la Chimie - Paris, France, 26 – 28 September 2010 นำเสนอโดย น.ส.ทักษณี มหาศิริพันธุ์ ชื่อผลงานทางวิชาการที่นำเสนอเรื่อง Anti-proliferative effect of *Acanthus Ebracteatus* Vahl on different types of cancer cells.

ส่วน ก : ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวสุทธิลักษณ์ ปทุมราช
(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Suthiluk Patumraj
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3102002589589
3. ตำแหน่งปัจจุบัน (วิชาการ) รองศาสตราจารย์
ตำแหน่งปัจจุบัน (บริหาร) ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายบัณฑิตศึกษา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330
โทรศัพท์ (02) 252-7584 (02) 256-4267 โทรสาร. (02) 252-7854
E-mail Address mcdspr@hotmail.com, suthilukp@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรี สาขาชีวเคมี ปีที่จบ พ.ศ. 2524
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ปริญญาโท สาขา Biomedical Engineering ปีที่จบ พ.ศ. 2528
New Jersey Institute of Technology, USA
- ปริญญาเอก สาขาสรีรวิทยา ปีที่จบ พ.ศ. 2533
University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA.

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Microcirculation and Endothelial cell function
- Computer-assisted image analysis

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 หัวหน้าหน่วยปฏิบัติการวิจัย (Research Unit) แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : ชื่อ หน่วย

ปฏิบัติการวิจัยหลอดเลือดจุลภาค (Microcirculation Research Unit)

- Executive Members of Asian Union for Micorcirculation (AUM)
- Secretary General Of Physiological Society of Thailand

- Secretary General Of Thai Society for Microcirculation

Awards

- American Heart Fellowship, New Jersey, USA. 1987-1989.
- Young Investigator Award. The First Asian Congress for Microcirculation, 1993. Osaka, Japan.

7.2. หัวหน้าโครงการวิจัย

7.2.1. การพัฒนาเคอคูมินแพทเพื่อใช้ในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งระดับที่ปลูกบนผิวหนังของหนูชนิดไมส์ ทุนงบประมาณแผ่นดิน 2550 (ค.ศ.49 - ค.ศ.50)

7.2.2. In vivo study of neovascularization in biodegradable collagen scaffolds implanted mice ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ (ศค. 50 - คค.51)

7.3. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว ชื่อผลงาน ปีที่ตีพิมพ์ การตีพิมพ์เผยแพร่ และ แหล่งทุน

ชื่อโครงการวิจัย	คณะผู้วิจัย	แหล่งทุน	ปีที่เริ่ม	ปีที่เสร็จ	ดัชนีวัดความสำเร็จ
7.3.1. การพัฒนาเคอคูมินแพทเพื่อใช้ในการยับยั้งการเติบโตของ เซลล์มะเร็งระดับที่ ปลูกบนผิวหนังของหนูชนิดไมส์	รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช อ. ไครดา กนกพานนท์	ทุน วช 2550	ค.ศ.49	ค.ศ.50	<ul style="list-style-type: none"> • นำเสนอการประชุมระดับชาติ 1 ครั้ง • NCBME • กำลังจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์
7.3.2. Curcumin is effective as the anti-inflammatory, anti-infection in Helicobacter pylori infected rats, and anti-cancer in Hepatoma- cell implanted BALB/c-nude mice model	รศ. พญ. ดวงพร ทองงาม ผศ.พญ. นฤมล วิเศษโสภาส ผศ.พญ. ดร.อรอนงค์ กุลพัฒน์ รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช	ทุน เพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลาง สกว.	ค.ศ. 49	ค.ศ.51	<ul style="list-style-type: none"> • ตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 5 เรื่อง (publication number 41-45) • นำเสนอการประชุมระดับนานาชาติ 3 ครั้ง
7.3.3. ผลของเจนิสตีต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดที่กระตุกในหนูที่ถูกตัดครึ่งใช้ทั้งสองข้าง	รศ.นพ. ประสงค์ ศิริวิริยะกุล รศ. ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช นส. อัจฉริยา ชนาวิรัตน์	ทุน วช 2550-51 และ ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	ค.ศ. 49	ค.ศ.51	<ul style="list-style-type: none"> • ตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 3 เรื่อง (publication number 47, 52,56) • นำเสนอการประชุมระดับนานาชาติ 3 ครั้ง • นำเสนอการประชุมระดับชาติ 2 ครั้ง

7.3.4. Studies on the effects of Ya-hom and herbal medicine on regional cerebral blood flow การศึกษาผลของยาหอมและสารสกัดสมุนไพรต่ออัตราการไหลเวียนเลือดในสมอง	ผศ. ดร.อัมพร จาริยะพงศ์สกุล รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช	ทุนสภาวิจัยฯ	ต.ค.47	ก.ย.49	<ul style="list-style-type: none"> ตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 1 เรื่อง (publication number 48) นำเสนอการประชุมระดับนานาชาติ 2 ครั้ง (ภาคผนวก)
--	--	--------------	--------	--------	---

7.4. งานวิจัยที่กำลังทำ ชื่อผลงาน ปีที่ตีพิมพ์ การตีพิมพ์เผยแพร่ และ แหล่งทุน

ชื่อโครงการวิจัย	คณะผู้วิจัย	แหล่งทุน	ปีที่เริ่ม	ปีที่เสร็จ	ดัชนีวัดความสำเร็จ
7.4.1. Implantation of Human Papillomavirus Infected Cervical Cancer Cells into Animal Model	รศ.ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช รศ.นพ. สมชัย นิลุตติศาสน์ ผศ.นพ.ดร. ปกรณ์ หังสสุต นาย มณฑล เลิศวารปรีชา	ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์	ก.ค. 49	เม.ย.51	<ul style="list-style-type: none"> ตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 3 เรื่อง นำเสนอการประชุมระดับนานาชาติ 2 ครั้ง (ลู่วางมากกว่า 50%)
7.4.2. In vivo study of neovascularization in biodegradable collagen scaffolds implanted mice	รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช Dr.Hideyuki Niimi อ.นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ	ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์	ก.ย. 50	สค.51	<ul style="list-style-type: none"> นำเสนอการประชุมระดับนานาชาติ 1 ครั้ง (ลู่วาง 30%)

ประกอบ 7.3 Publications

- Ritter AB, Patumraj S, Duran WN. Interstitial diffusion of macromolecules. Proc. 7th Annual Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Science 2: 117
- Patumraj S, Ritter A.B., and Duran W.N. A Study of Coronary Macromolecular Transport In Diabetic Rats. *Progress In Microcirculation Research 1993*, Chapter 13: 403-406.
- Patumraj S. สรีรวิทยาและสมุนไพรไทย *Chula Med J.* 1995;39(4) : 237-241.
- Patumraj S. Roles of Garlic In Medicine *Chula Med J.* 1995;39(4) : 243-248.
- Udayachalerm W, Jariyapongsakul A, Suwangool P, Patumraj S. Effects of ACE Inhibitor on Diabetic Cardiovascular Complications : Cardiac and vascular hypertrophy. *Chula Med J.* 1995; April 39(4) : 249-250.
- Patumraj S, Jetapai U, and Udayachalerm W. Prevention of Diabetic Cardiovascular Complications by Garlic Extract. *Micocirculatory Approach To Asian Traditional Medicine : Strategy for the Scientific Evaluation 1996*, Chapter 12 : 107-116.
- Patumraj S., Tewit S., Kasantikul V., and Udayachalerm W. Effects of Garlic Extract on Plasma Insulin, Lipid Profiles and Coronary Vascular Changes In STZ-rat. *Proc. The Sixth World Congress for Microcirculation.* Monduzzi Editores S.p.A. 1996 : 989-994.
- Jariyapongsakul A, Niimi H, and Patumraj S. Cerebral Microvascular Response to Hemorrhagic Hypotension in Spontaneously Diabetic Rats : an intravital fluorescence

- microscopic analysis. *Proc. The Sixth World Congress for Microcirculation*. Monduzzi Editores S.p.A. 1996 : 977-982.
9. Jariyapongskul, Niimi H, Kasantiikul V, Maneesri S, **Patumraj S.** Morphological changes of cerebral microvasculature in streptozotocin-induced diabetic rats : In vivo fluorescence and electron microscopic studies. In : Bunnag S.C., Srikiatkachorn A., Patumraj S. (eds). *Proc. The Third Asian Congress for Microcirculation*. Monduzzi Editores S.p.A-Bologna (Italy). 1997: 239-245.
 10. Amatyakul S, **Patumraj S.**, Niimi H. The effect of topical adrenomedullin application on striated muscle microcirculation : a pilot study. In : Bunnag S.C., Srikiatkachorn A., Patumraj S. (eds). *Proc. The Third Asian Congress for Microcirculation*. Monduzzi Editores S.p.A-Bologna (Italy), 1997:229-231.
 11. Kasantikul V, Jariyapongskul A, **Patumraj S.** Computer-assisted image analysis of microvasculature in benign and malignant gliomas. In : Bunnag S.C., Srikiatkachorn A., Patumraj S. (eds). *Proc. The Third Asian Congress for Microcirculation*. Monduzzi Editores S.p.A. Bologna (Italy), 1997: 61-66.
 12. **Patumraj S.**, Tewit S., Kasantikul V., Sermputdeekul P. The Study of Garlic Extract on Diabetic Coronary Vascular Complications. *Microcirculation Annual* 1997; 13: 31-34.
 13. **Patumraj S.** Microcirculation : Endothelial Cell As A Transport Barrier. *Endothelium*. 1997 : 269-284.
 14. Kasantikul V., Maneesri S., Latikavibul W., **Patumraj S.** Ultrastructural Alterations of Blood Vessel in Hypertension and Diabetic Patients. *Endothelium*. 1997 : 269-284.
 15. Anuntasethakul T, Srikiatkachorn, Maneesri S, **Patumraj S.**, Kasantikul V. Ultrastructural changes in endothelial cells of cerebral microvessels after exposure to nitric oxide donor. *Neuropathology* 1999; 19: 259-266.
 16. Somboonwong J, Thanamitramanee S, Jariyapongskul A, **Patumraj S.** Therapeutic effects of Aloe vera on Cutaneous Microcirculation and Wound Healing in Second Degree Burn Model in Rats. *J Med Assoc Thai* 2000;83:417-425.
 17. **Patumraj S.**, Tewit S, Amatyakul S, Maneesri S, Jariyapongskul A, Kasantikul V, Shepro D. Comparative Effects of Garlic and Aspirin on Diabetic Cardiovascular Complication. *Drug Delivery* 2000; 7:1-6.
 18. Futrakul N, Panichakul T, Chaisuriya P, Sirisinha S, Futrakul P, **Patumraj S.** Endothelial Cell Cytotoxicity Induced by Nephrotic Serum. The Second Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania. Editors, Sirisinha S., Chaiyaroj S., Tapchaisri, P. Jan. 2000. Monduzzi Edi. S.p.A.
 19. Futrakul N, Panichakul T, Chaisuriya P, Sirisinha S, **Patumraj S.**, Futrakul P. Endothelial cell cytotoxicity and renal hypoperfusion in idiopathic nephrotic syndrome. *Nephron* 2000;86: 241-2.
 20. Futrakul N, Bulthep P, **Patumraj S.**, Futrakul P. Glomerular endothelial dysfunction and altered cytokines in severe nephrosis, *Nephron*. 2000;86:199.
 21. Wattanachon U., Covavisaruch N., **Patumraj S.** A measuring tool for vascular wall thickness : an image analysis approach. *Proc. The 4th National Computer Science and Engineering*. Nov. 16-17,2000.
 22. Amatyakul S., **Patumraj S.**, Niimi H. Effects of adrenomedullin on the cardiac performance and coronary flow in an isolated perfused rat heart model. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 23 (2000):269-275.
 23. Srikiatkachorn A, Anuntasethakul T., Maneesri S., Phansuwan-Pujito P., **Patumraj S.**, and Kasantikul V. Hyposerotonin-induced nitric oxide supersensitivity in the cerebral microcirculation. *Headache* 2000 Apr; 40(4): 267-275.
 24. Udayachalerm W., Vechakarn O., **Patumraj S.** Effects of ACE-I on Diabetic Cardiovascular complications : Anti-Hypertensive and Non-Anthihypertensive Doses. *J Med Assoc Thai* 2001;84 (Suppl 1): S306-S313.
 25. Chakraphan D., Thipakorn B., and **Patumraj S.** Changes of mesenteric microcirculation in chronic diabetic rats: A pilot study using invital fluorescence microscopy. *Proc. 7th World Congress for Microcirculation*. Aug. 19-22, 2001.
 26. Srikiatkachorn A, Anuntasethakul T., Phansuwan-Pujito P., **Patumraj S.**, and Kasantikul V.

- Effect of serotonin depletion on nitric oxide induced cerebrovascular nociceptive response. *Neuroreport* 2001 Apr; 12(50): 967-971.
27. Jariyapongskul A, **Patumraj S**, Yamaguchi S, Niimi H. The effect of long-term supplementation of vitamin C on leukocyte adhesion to the cerebral endothelium in STZ-induced diabetic rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* (2002) 27(1): 67-76.
 28. Futrakul N, Tosukhowong P, Valyapongichit Y, Tipprukmas N, Futrakul P, **Patumraj S**. Oxidative stress and hemodynamic maladjustment in chronic renal disease : A therapeutic implication. *Ren Fail* 2002 Jul ; 24(4) : 433-45
 29. Futrakul N, Boongen M, Tosukhowong P, **Patumraj S**, Futrakul P. Treatment with vasodilators and crude extract of *Ganoderma lucidum* suppresses proteinuria in nephrosis with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron*. 2002 ; 92(3) : 719-20
 30. Futrakul N, Tohsukhowong P, **Patumraj S**, Siriviriyakul P, Tipprukmas N, Futrakul P. Treatments of hemodynamic maladjustment and oxidative stress prevent renal disease progression in chronically severe glomerulonephritides. *Ren Fail*. 2003 Sep;25(5):839-44
 31. Khemapech S., Monsiri K, **Patumraj S**, and Siriviriyakul P. Genistein replacement therapy for vasodilation disorder in bilateral ovariectomized rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003; 29: 271-278.
 32. Futrakul N, Boongen M, **Patumraj S**, Siriviriyakul P, Tosukhowong P, Futrakul P. Treatment of glomerular endothelial dysfunction steroid-resistant nephrosis with *Ganoderma lucidum*, vitamins C, E, and vasodilators. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003; 29: 205-210.
 33. Sridulyakul P, Chakraphan D, Bhattarakosol P, **Patumraj S**. Endothelial nitric oxide synthase expression in systemic and pulmonary circulation of streptozotocin induced diabetic rats : comparison using image analysis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003; 29: 423-428.
 34. Futrakul N, Siriviriyakul P, Panichakul T, Butthep P, **Patumraj S**, Tosukhowong P, Futrakul P. Glomerular endothelial cytotoxicity and dysfunction in nephrosis with focal segmental glomerulosclerosis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003; 29: 469-477.
 35. Futrakul P, Siriviriyakul P, Kulaputana O, **Patumraj S**, Bunnag S.C., Futrakul N. A hemodynamically mediated mechanism of renal disease progression in severe glomerulonephritides or nephrosis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003; 29: 183-188.
 36. Duansak D, Somboonwong J., and **Patumraj S**. Effects of *Aloe vera* on leukocyte adhesion and TNF-alpha and IL-6 levels in burn wounded rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003; 29: 239-246.
 37. Amatyakul S, Chakraphan D, Chotpaibulpan S, and **Patumraj S**. The effect of long-term supplementation of vitamin C on pupal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003; 29: 313-320.
 38. Jariyapongskul A, **Patumraj S**, Niimi H. Cerebral endothelial dysfunction in diabetes: intravital microscopic analysis using streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press*. 2003; 29: 331-335.
 39. Molsiri K, **Patumraj S**, Siriviriyakul P. Preventive mechanism of genistein on coronary endothelial dysfunction in ovariectomized rats : An isolated arrested heart model. *Clinical Hemorheology and Microcirculation vol.31 (2), 2004*
 40. Chakraphan D, Sridulyakul P, Thipakorn B, Bunnag S.C, Huxley VA. **Patumraj S** : Attenuation of Endothelial Dysfunction by Exercise Training in STZ-Induced Diabetic Rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation vol.32, 2005 :217-226*
 41. **Patumraj S**, Yoysungnoen P, Kachonrattanadet P., and Wirachwong P. Tumor Neocapillary Density in hepatocellular carcinoma cells Implanted Nude Mice Model. *Clinical Hemorheology and Microcirculation vol.33, 2005 :137-144*
 42. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, and **Patumraj S**. Antiangiogenic activity of curcumin in Hepatocellular carcinoma cells implanted nude mice. *Clinical Hemorheology and Microcirculation vol.33, 2005 :127-136*

43. Eamlamnam K, **Patumraj S**, Visedopas N, and Thong-Ngam D. Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. *World J Gastroenterology* ISSN1007-9327 vol 12, 2006 : 2035-2040
44. Prabjone R, Thong-Ngam D, Wisedopas N, Chatsuwan T, and **Patumraj S**. Anti-inflammatory effects of *Aloe vera* on leukocyte-endothelium interaction in the gastric microcirculation of *Helicobacter pylori*-infected rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.33, 2006 :9:56
45. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, Niimi H, and **Patumraj S**. Effects of curcumin on tumor antiangiogenesis and biomarkers : COX-2 and VEGF. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 :109-116.
46. Niimi H, **Patumraj S**, and J.-Y.Han. Asian traditional medicine (ATM) : Recent progress based on scientific evidences. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 85 - 88.
47. Siriviriyakul P, Khemapech S., Monsiri K, and **Patumraj S**. The vascular effect of genistien : What is its mechanism, nitric oxide or PGL₂ ?. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 97 - 101.
48. Jariyapongskul A , **Patumraj S** and Niimi H. Effects of Yahom on the regional cerebral blood flow in rat using fluorescence videomicroscopy. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 139 - 144.
49. Futrakul N, Butthep P, **Patumraj S** , Siriviriyakul P and Futrakul P. Microvascular disease and endothelial dysfunction in chronic kidney disease : Therapeutic implication. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 265 - 271.
50. Jariyapongskul A , Rungjaroen T, Kasetsuwan N, **Patumraj S** and Niimi H. Chronic changes of the iris microvasculature of streptozotocin - induced diabetic rats using fluorescence videomicroscopy. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 283 - 293.
51. Amatyakul S, Chakraphan D, Chotpaibulpan S, and **Patumraj S**. Role of exercise training on pupal blood flow in diabetic rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 295 - 301.
52. Chanawirat A, Khemapech S, **Patumraj S** and Siriviriyakul P. Genistien replacement therapy on endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 309 - 314.
53. Sridulyakul P, Chakraphan D and **Patumraj S**. Vitamin C supplementation could reverse diabetes-induced endothelial cell dysfunction in mesenteric microcirculation in STZ-rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 315 - 321.
54. Daroonwan Chakraphan, Patarin Sridulyakul, Bundit Thipakorn, Srichitra Bunnag, Virginia H. Huxley, **Suthiluk Patumraj** Leukocyte-endothelial cell interaction is attenuated by low-intensity exercise training and vitamin C supplementation in diabetic rats. *Asian Biomed Journal*. 2007;1: 67-75.
55. Amporn Jariyapongskul , Tippawan Rungjaroen , Ngamjit Kasetsuwan , **Suthiluk Patumraj**, Junji Seki , Hideyukii Niimi. Long-term effects of oral vitamin C supplementation on the endothelial dysfunction in the iris microvessels of diabetic rats. *Microvasc Res*. 2007 Mar 23; 174: 677-47.
56. Premtip Thaveeratitham, Plengpanich W., Naen-Udom W., **Patumraj S.**, Khovidhunkit W. Effects of human apolipoprotein A-I on endotoxin-induced leukocyte adhesion on endothelial cells *in vivo* and on the growth of *Escherichia coli* *in vitro*. *J. Endotoxin Research*. Volume 13, Number 1 / 2007: 54-58.
57. Premtip Thaveeratitham, Weerapan Khovidhunkit, Suthiluk **Patumraj**. High-density lipoproteins (HDL) inhibit endotoxin-induced leukocyte adhesion on endothelial cells in rats: Effect of the acute-phase HDL. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* Volume 36, Number 1 / 2007: 1 - 12.
58. Daroonwan Chakraphan, Patarin Sridulyakul, Bundit Thipakorn, Srichitra Bunnag, Virginia H. Huxley, **Suthiluk Patumraj** Leukocyte-endothelial cell interaction is attenuated by low-

intensity exercise training and vitamin C supplementation in diabetic rats. *Asian Biomed Journal*. 2007;1: 67-75.

59. Atchareeya Kasiyaphat^a, Prasong Siriviriyakul^b, and **Suthiluk Patumraj**. Preventive effects of genistein on leukocyte adhesion in femur venules and on bone-loss induced in ovariectomized female rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. (in press)

ส่วน ค : ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว ภวพันธ์ ภัทร โกลล
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 1009 03215 20 2
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ระดับ 9
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330
โทรศัพท์ 0-2252-8181 ต่อ 3628 โทรสาร 0-2252-5952
Email: Parvapan@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
พ.ศ. 2524 ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับสอง
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
พ.ศ. 2527 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ
พ.ศ. 2533 ปรัชญาดุสิตบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ
การฝึกอบรม ผลงาน ปฏิบัติการวิจัย
พ.ศ. 2537 ประกาศนียบัตรอบรม International Training Course of Basic Procedure in
Medical Virology ที่ School of Medicine Nagoya University ประเทศญี่ปุ่นจัด
โดย International Cell Research Organization (an Affiliated organization of
UNESCO) in collaboration with Nagoya University
พ.ศ. 2538 ผลงานและปฏิบัติการวิจัย เรื่อง Signal transduction by oncogene that encode
tyrosine kinase ที่ Department of Molecular Pathogenesis, School of Medicine
Nagoya University ประเทศญี่ปุ่น ได้รับทุนสนับสนุนจาก Scientific Co-
operation NRCT-JSPS Program
พ.ศ. 2540 ผลงานและปฏิบัติการวิจัย เรื่อง Tyrosine kinase protein prepared from
Baculovirus expression system ที่ Department of Molecular Pathogenesis, School
of Medicine Nagoya University ประเทศญี่ปุ่น ได้รับทุนสนับสนุนจาก Scientific
Co-operation NRCT-JSPS Program
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
สาขาวิชาไวรัสวิทยา

7. ประสิทธิภาพที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศโดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

7.1. ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย ไม่มี

7.2. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

พ.ศ. 2535 Detection of human papillomavirus types in invasive cervical carcinoma by means of polymerase chain reaction and hybridization

ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538 Detection and typing of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) gr I-III compared to normal cervical tissue

ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2541 Seroprevalence of anti-human herpesvirus-6 IgG antibody in children

ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2542 Immunosuppression of T-lymphocytes induced by herpes simplex virus (HSV) ทุนมูลนิธิกระจกอาชาสี ประเทศญี่ปุ่น

พ.ศ. 2543 โครงการพัฒนาการตรวจจุดชีพที่เจริญยากหรือซ้ำด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล การตรวจวิเคราะห์โรคติดเชื้อไซโตเมกกาโลไวรัส เงินทุนเสริมรากฐานการวิจัย การพัฒนางานวิจัยเพื่อเป็นงานประจำ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2544 Screening for acyclovir-resistant herpes simplex virus (ACV^r HSV)

ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2545 Molecular epidemiology of herpes simplex virus by restriction fragment length polymorphism (RFLP)

ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2547 การจำแนกไทป์ของไซโตเมกกาโลไวรัสจากยีนไกลโคโปรตีนบีในตัวอย่างส่งตรวจที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ด้วยวิธี PCR-RFLP

ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2547-8 Comparison of Herpes Simplex Virus (HSV) Replication and HveA Expression in T-lymphocytes from Healthy Individuals and HIV Infected Patients ทุนมูลนิธิกระจกอาชาสี ประเทศญี่ปุ่น

พ.ศ. 2548-9 อัตราการติดต่อเชื้อไซโตเมกาโลไวรัสและไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์จาก
มารดาสู่บุตรในหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อเอชไอวีเปรียบเทียบกับหญิง
ตั้งครรภ์ที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี ทุนงบประมาณแผ่นดิน

พ.ศ. 2550-2551 การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูก
ด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด ทุนงบประมาณแผ่นดิน

พ.ศ. 2550 การศึกษาความแตกต่างของยีน L1 ในเชื้อแบคทีเรียไลมาไวรัส ที่ต่างสาย
พันธุ์ และภายในสายพันธุ์เดียวกัน ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะ
แพทยศาสตร์

พ.ศ. 2550 ความแตกต่างของยีน Glycoprotein G ในเชื้อ Respiratory syncytial
virus ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทุนรัชดาภิเษก
สมโภช คณะแพทยศาสตร์

7.3. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจ
มากกว่า 1 เรื่อง)

1. Yoosook C, Rimdusit P, Chantratita W, Leechanachai P, **Bhattarakosol P**.
Evaluation of biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay for
detection of genital herpes simplex virus infection. *Asian Pacific Journal of
Allergy and Immunology* 1989; 5; 143-8.
2. **Bhattarakosol P**, Yoosook C, Cross A. Intratypic variation of herpes simplex virus
type 2 isolates detected by monoclonal antibodies against viral glycoproteins. *Arch
Virol* 1990; 115; 89-100.
3. **Bhattarakosol P**, Yoosook C, Matangkasombat P. Intratypic variations in
neutralizable epitopes among herpes simplex virus type 2 isolates. *Microbiol
Immunol* 1991; 35(7); 525-3.
4. Werasakaumpai V, **Bhattarakosol P**, Punnarugsa V. Study on rotavirus group A
electropherotypes by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). *Cu Med J* 1992;
36(10); 781-787. ทุนสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสิทธิภาพการวิจัยนิติต
ระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. **Bhattarakosol P**, Sakunkan Y, Pakdewongse S. Detection of anti-HSV IgM and IgG
antibody in herpes patients. *Bull Cu Med Tech* 1993; 5(20); 1095-1103. (Thai) ทุน
สนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสิทธิภาพการวิจัยนิติตระดับปริญญาตรี
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. **Bhattarakosol P**, Viboonchaicheap K, Mungmee V, Punnarugsa V. Evaluation of locally developed ELISA for determining anti-CMV IgG antibody by comparison with two commercial ELISA kits. *Chula Med J* 1994; 38; 91-5. **ทุนสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสิทธิภาพการวิจัยนิตระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
7. Yoosook C, **Bhattarakosol P**, Wilairat P, Sriurairatna S. Encapsidation defectiveness of herpes simplex virus type 2 during replication at acid pH condition. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 1994; 12; 59-64.
8. **Bhattarakosol P**, Punnarugsa V, Weeragovit L, Mungmee V. Use of dried blood on whatman paper for detecting of anti-HSV IgG by ELISA. *J Med Tech Assoc Thailand* 1995; 23; 169-174. (Thai) **ทุนสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสิทธิภาพการวิจัยนิตระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
9. Pittayathikhun K, Korkij W, Punnarugsa V, **Bhattarakosol P**. Viral isolation in different stages of recurrent herpes labialis by shell vial centrifugation cell culture. *Chula Med J* 1995; 39; 593-9.
10. Wirachsilp P, **Bhattarakosol P**, Mungmee V, Punnarugsa V. Comparative study on the results of rotavirus detection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). *Chula Med J* 1995; 39; 823-831. **ทุนสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสิทธิภาพการวิจัยนิตระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
11. Poonnaniti A, **Bhattarakosol P**. Improvement of PCR detection of HPV-DNA using Enhanced Chemiluminescence system and dot hybridization. *J Med Asso Thai* 1996; 79(Suppl 1); s96-s103. **ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
12. **Bhattarakosol P**, Poonnaniti A, Niruthisard S. Detection and typing of human papillomavirus in cervical cancer in Thai women. *J Med Asso Thai* 1996; 79 (Suppl 1); s56-s64. **ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
13. Charoenwongse P, Kangwanshiratada O, Chatsuwat T, Boonnam R, Tumwasorn S, **Bhattarakosol P**. The studies of HLA class II (HLA-DR) system by PCR-SSO typing and the relationship with serological method. *J Med Asso Thai* 1996; 79 (Suppl 1); s22-s32.

14. **Bhattarakosol P**, Chantarabul S, Pittayathikhun K, Mungmee V, Punnarugsa V. Seroepidemiological study of anti-VZV IgG in undergraduate students. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 1996; 14; 129-131. **ทุนสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสบการณ์การวิจัยนิตระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
15. Mungmee V, **Bhattarakosol P**, Punnarugsa V, Bhattarakosol P. Comparative study of SPHIT, Indirect ELISA and Capture ELISA methods in determining specific anti-rubella IgM antibody. *Bull Cu Med Tech* 1997; 10; 1635-42. (Thai)
16. Lertworapreecha M, **Bhattarakosol P**, Niruthisard S. Detection and typing of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia grade III in Thai women. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998; 29; 507-11. **ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
17. Pancharoen C, **Bhattarakosol P**, Thisyakorn U. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in children. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998; 29; 269-72.
18. **Bhattarakosol P**, Sithidajporn M, Bhattarakosol P. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in Thai adults detecting by ELISA. *Chula Med J* 1998; 42; 935-43. **ทุนสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสบการณ์การวิจัยนิตระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
19. Pancharoen C, Chansongsakul T, **Bhattarakosol P**. Causes of fever in children with first febrile seizures: How common are human herpesvirus-6 and dengue virus infections?. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31; 521-3.
20. Limpiboon T, Pooart J, **Bhattarakosol P**, Niruthisard S, Chantratita W, Lulitanond V. p53 status and human papillomavirus infection in Thai women with cervical carcinoma. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31; 66-71.
21. Pancharoen C, **Bhattarakosol P**, Thisyakorn U. Infectious mononucleosis and seroprevalence of Epstein-Barr virus infection in Children. *Thai J Pediatrics* 2000; 39; 115-9.
22. **Bhattarakosol P**, Punnarugsa V, Mungmee V. Evaluation of an in-house ELISA for detecting herpes simplex virus antigen in comparison to conventional cell culture, shell vial cell culture and a commercial ELISA kit. *Chula Med J* 2001; 45; 11-9.

23. Mungmee V, Thammaborvorn R, Semboonlor L, Punnarugsa V, **Bhattarakosol P**. Situation of viral infectious diseases in King Chulalongkorn Memorial Hospital during 1993-1997. *Chula Med J* 2001: 45; 3-9.
24. **Bhattarakosol P**, Pancharoen C, Mekmullica J, Bhattarakosol P. Seroprevalence of anti-human herpesvirus-6 IgG antibody in children of Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001: 32(1); 143-7. **ทุนรัชดาภิเษก สมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
25. Pancharoen C, **Bhattarakosol P**, Thisyakorn U. Seroprevalence of Epstein-Barr virus infection in Thai children. *J Med Assoc Thai* 2001: 84(6); 850-4.
26. Kowitdamrong E, Thammaborvorn R, Semboonlor L, Mungmee V, **Bhattarakosol P**. Detection of Dengue HI and IgM antibody : Is it diagnostically useful ? When and how ? *J Med Assoc Thai* 2001: 84 (Suppl 1); s148-53.
27. Vilaichone R, Mahachai V, Eiam-Ong S, Kullavanijaya P, Wisedopas N, **Bhattarakosol P**. Necrotizing ileitis caused by cytomegalovirus in patient with systemic lupus erythematosus: case report. *J Med Assoc Thai* 2001: 84 (Suppl 1); s469-73.
28. Pancharoen C, Mekmullica J, Chinratanapisit S, **Bhattarakosol P**, Thisyakorn U. Seroprevalence of Epstein-Barr virus antibody among children in various age groups in Bangkok, Thailand. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2001: 19; 135-7.
29. **Bhattarakosol P**, Chirathaworn C, Chimma P. Replication of herpes simplex virus in T lymphocytes. *J Med Assoc Thai* 2002: 85(Suppl 1); s399-406. **ทุนมูลนิธิ กระจกอาชาสี ประเทศญี่ปุ่น**
30. **Bhattarakosol P**, Lertworapreecha M, Kitkumthorn N, Triratana chai S, Niruthisard S. Survey of human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia in Thai women. *J Med Assoc Thai* 2002: 85(Suppl 1); s360-5. **ทุน โครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
31. **Bhattarakosol P**, Wiwanitkit V, Boonchalermvichian C, Nuchprayoon I. Human herpes virus 6 antibodies in beta-thalassemia/hemoglobin E pediatric patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2002;33 Suppl 3:149-51.

32. Noppornpanth S, Haagmans BL, **Bhattarakosol P**, Ratanakorn P, Niesters HGM, Osterhaus ADME, Poovorawan Y. Molecular epidemiology of gibbon hepatitis B virus transmission. *J Gen Virol* 2003; 84: 147-55.
33. Tulvatana W, **Bhattarakosol P**, Sansopha L, Sipivarak W, Kowitdamrong E, Paisuntornsug T, Karnsawai S. Risk factors for conjunctival squamous cell neoplasia: a matched case-control study. *Br J Ophthalmol.* 2003 Apr;87(4):396-8.
34. Khongphatthanayothin A, Suesaowalak M, Muangmingsook S, **Bhattarakosol P**, Pancharoen C. Hemodynamic profiles of patients with dengue hemorrhagic fever during toxic stage: an echocardiographic study. *Intensive Care Med.* 2003 Apr;29(4):570-4.
35. Sakulwira K, Vanapongtipagorn P, Theamboonlers A, **Bhattarakosol P**, Wananukul S, Poovorawan Y. Deatection and differentiation of human herpesviruses 1-5 by consensus primer PCR and RFLP. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2003; 21:55-61.
36. Likitnukul S, **Bhattarakosol P**, Poovorawan Y. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in children born to HIV-1 infected women. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2003 Jun;21(2):127-30.
37. Sridulyakul P, Chakraphan D, **Bhattarakosol P**, Patumraj S. Endothelial nitric oxide synthase expression in systemic and pulmonary circulation of streptozotocin induced diabetic rats: comparison using image analysis. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2003;29(3-4):423-8.
38. **Bhattarakosol P**, Pancharoen C, Kowitdamrong E, Thammaborvorn R, Mungmee V. Prevalence of parvovirus B19 infection in Thai young adults. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2003; 34:585-8.
39. **Bhattarakosol P**, Pancharoen C, Mungmee V, Thammaborvorn R, Semboonlor L. Seroprevalence of anti-RSV IgG in Thai children aged 6 months to 5 years. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2003; 21:269-71.
40. Pancharoen C, Likitnukul S, Chongsrisawat V, Vivatvekin B, **Bhattarakosol P**, Suwangool P, Thisayakorn U. Rectal prolapse associated with cytomegalovirus pseudomembranous colitis in a child infected by human immunodeficiency virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34(3): 583-4.

41. Chimm P, Chirathaworn C, **Bhattarakosol P**. Increased susceptibility of HSV-1 growth in PHA activated T-lymphocyte caused by upregulating of HveA mRNA expression. *Intervirology* 2004; 47: 14-8. **ทุนทววมหาวิทยาลัยเพื่อสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์นิตยระดับบัณฑิตศึกษา**
42. Sakulwira K, Theamboonlers A, Oraveerakul K, Chaiyabutr N, **Bhattarakosol P**, Poovorawan Y. Orangutan herpesvirus. *J Med Primatol* 2004;33:1-5.
43. Hansasuta P, Incomserb P, Buranapraditkul S, **Bhattarakosol P**. Establishment of cytotoxic T lymphocytes specific for autologous Epstein-Barr virus in HIV-infected patients: The feasibility study of EBV-specific immunotherapy for patients with EBV-associated lymphoma. *J Med Assoc Thai* 2004; 87 (Suppl 2) :S146-51.
44. Pongpanich A, **Bhattarakosol P**, Chirathaworn C. Induction of apoptosis by herpes simplex virus in Jurkat cells is partly through caspase-3, -8, and -9 activation. *J Med Assoc Thai* 2004; 87 (Suppl 2):S140-5.
45. Tuksinvaracham R, Tanayapong P, Pongrattanaman S, Hansasuta P, **Bhattarakosol P**, Siriyasatien P. Prevalence of dengue virus in Aedes mosquitoes during dry season by semi-nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (semi-nestedRT-PCR). *J Med Assoc Thai*. 2004 Sep;87 Suppl 2:S129-33.
46. Visaprom S, Chindamporn A, Chantratita A, **Bhattarakosol P**. Intratypic variations among Thai herpes simplex virus (HSV) isolates determined by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Submitted to *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2005; 36(4): 910-6. **ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
47. Yoysungnoen P, Wirachwong P, **Bhattarakosol P**, Niimi H, Patumraj S. Antiangiogenic activity of curcumin in hepatocellular carcinoma cells implanted nude mice. *Clinical Hemorheology Micro*, 2005; 33(2):127-35.
48. **Bhattarakosol P**, Visaprom S, Sangdara A, Mungmee V. Increase of Genital HSV-1 And Mixed HSV-1 and HSV-2 Infection in Bangkok, Thailand. *J Med Assoc Thai*, 2005;S300-4. **ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
49. Incomserb P, **Bhattarakosol P**, Kulwichit W, Chatratita W, Hansasuta P. Establishment of real-time polymerase chain reaction-based assay for quantitation

- of Epstein-Barr virus DNA in healthy donors and in patients with EBV associated lymphoma. *J Med Assoc Thai*, 2005;S280-6.
50. Kovitdamrong E, Pancharoen C, Thammaborvorn R, **Bhattarakosol P**. The prevalence of varicella-zoster virus infection in normal healthy individuals aged above 6 months. *J Med Assoc Thai*, 2005;S7-11.
51. Boonyod D, Poovorawan Y, **Bhattarakosol P**, Chirathaworn C. Lip32, an outer membrane protein of *Leptospira*, as an antigen in dipstick assay for diagnosis of leptospirosis. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2005; 23:133-141.
52. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, Niimi H, Patumraj S. Antiangiogenic activity of curcumin in hepatocellular carcinoma cells implanted nude mice. *Clinical Hemorheology Micro*, 2005;33(2):127-35.
53. Yoysungnoen P, Wirachwong P, **Bhattarakosol P**, Niimi H, Patumraj S. Effects of curcumin on tumor angiogenesis and biomarkers, COX-2 and VEGF, in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2006;34(1-2):109-15.
54. Chutinimitkul S, **Bhattarakosol P**, Srisuratanon S, Eiamudomkan A, Kongsomboon K, Damrongwatanapokin S, Chaisingh A, Suwannakarn K, Chieochansin T, Theamboonlers A, Poovorawan Y. H5N1 influenza A virus and infected human plasma. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jun;12(6):1041-3.
55. Chantaraarphonkun S, **Bhattarakosol P**. Intra and Intergenotypic Variations among Human Cytomegalovirus (HCMV) gB Genotypes in Clinical Samples. *Intervirology*. 2007;50:78-84.
 * *ทุนทบทวงมหาวิทยาลัยเพื่อสนับสนุนการทำ
 วิทยานิพนธ์นิตยสารระดับบัณฑิตศึกษา*
56. Thammabovorn T, Mungmee V, Thammachotruja L, Kowitdamrong E, **Bhattarakosol P**. Prevalence of viral infections in clinical specimens at Virology Laboratory Unit during the year 1998 to 2004. *Chula Med J* 2007; 51: 229-39.
57. **Bhattarakosol P**, chantaraarphonkun S. Prevalence of human cytomegalovirus (HCMV) gB genotypes in Thai patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007; 38: 835-40. *ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์*

ผลงานวิจัยหมายเลข 1-3,7 เป็นงานวิจัยที่ทำวิทยานิพนธ์ขณะเรียนปริญญาโทและเอก โดยมี
 ศ.ดร.ชโลบล อยู่สุข เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา

ผลงานวิจัยหมายเลข 4-6, 8,10,14,18 เป็นผลงานจากโครงการสร้างเสริมประสบการณ์การวิจัยนิต
ระดับปริญญาตรี โดยเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ผลงานวิจัยหมายเลข 11,16,41,46,55 งานวิทยานิพนธ์ของนิสิตปริญญาโท โดยเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา

ผลงานวิจัยหมายเลข 12,22-24,26,29,30,38,39,48,56,57 เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

ผลงานวิจัยหมายเลข 13,15,17,19-21,25,27,28,31,33,34,36,40,45,50,54 เป็นผู้วิจัยร่วม

ผลงานวิจัยหมายเลข 32,35,47,52,53 เป็นงานวิทยานิพนธ์ของนิสิตปริญญาเอก โดยเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา
ร่วม

ผลงานวิจัยหมายเลข 9, 37, 42-44,49,51 เป็นงานวิทยานิพนธ์ของนิสิตปริญญาโท โดยเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา
ร่วม

**7.4. งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้
ทำการวิจัยคล้วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด**

1. การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีภูมิคุ้มกัน
บำบัด ทุนงบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2550, 2551 สถานภาพการวิจัย ทำแล้ว
ประมาณร้อยละ 30
2. การศึกษาความแตกต่างของยีน L1 ในเชื้อแปปิโลมาไวรัส ที่ต่างสายพันธุ์
และภายในสายพันธุ์เดียวกัน ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์
พ.ศ. 2550 สถานภาพการวิจัย ทำแล้วประมาณร้อยละ 40
3. ความแตกต่างของยีน Glycoprotein G ในเชื้อ Respiratory syncytial virus ที่แยกได้
จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์
พ.ศ. 2550 สถานภาพการวิจัย ทำแล้วประมาณร้อยละ 30

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. สันญา หกพุดชา
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Sanya Hokputsa
2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ 47030048
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย 5
4. หน่วยงานและที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
กลุ่มวิจัยมาตรฐานสมุนไพร สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การนาฬิกากรรม
75/1 ถ. พระราม 6 ราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 02-2038122 โทรสาร 02-3548812
Email : sanya@gpo.or.th
5. ประวัติการศึกษา
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Isolation and purification of natural products
Polysaccharide chemistry
Phytopharmaceutical analysis
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้า
โครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น
งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว
Hokputsa, S., Jumel, K., Alexander, C., & Harding, S. E. (2003). Hydrodynamic characterisation of chemically degraded hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers*, 52(2), 111-117. **Hokputsa, S., Jumel, K., Alexander, C., & Harding, S. E. (2003).** A comparison of molecular mass determination of hyaluronic acid using SEC/MALLS and sedimentation equilibrium. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 32(5), 450-456. (หัวหน้าโครงการวิจัย)
Hokputsa, S., Hu, C. X., Paulsen, B. S., & Harding, S. E. (2003). A physico-chemical comparative study on extracellular carbohydrate polymers from five desert algae. *Carbohydrate Polymers*, 54(1), 27-32. (หัวหน้าโครงการวิจัย)
Hokputsa, S., Harding, S. E., Inngjerdingen, K., Jumel, K., Michaelsen, T. E., Heinze, Koschella, A., & Paulsen, B. S. (2004). Bioactive polysaccharides from the stems of the Thai medicinal plant *Acanthus ebracteatus*: their chemical and physical features. *Carbohydrate Research*, 339(4), 753-762. (หัวหน้าโครงการวิจัย)

Hokputsa, S., Gerddit, W., Pongsamart, S., Inngjerdigen, K., Heinze, T., Koschella, A., Harding, S. E., & Paulsen, B. S.(2004). Water-soluble polysaccharides with pharmaceutical importance from the rinds of durian (*Durio zibethinus*): isolation, fractionation, characterisation and bioactivity. *Carbohydrate Polymers*, **54**, 471-481. (หัวหน้าโครงการวิจัย)

Nergard C.S., Matsumoto T., Inngjerdigen M., Inngjerdigen K., Hokputsa S., Harding S.E., Michaelsen T.E., Diallo D., Kiyohara H., Paulsen B.S., Yamada H. (2005). Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch Bip. ex Walp. (Asteraceae). *Carbohydrate Research* ,**340**(1), 115-130. (ผู้ร่วมโครงการวิจัย)

Inngjerdigen K.T., Debes S.C., Inngjerdigen M., Hokputsa S., Harding S.E., Rolstad B., Michaelsen T.E., Diallo D., Paulsen B.S. (2005). Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. *Journal of Ethnopharmacology*, **101**(1-3), 204-214. (ผู้ร่วมโครงการวิจัย)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารให้ความเผ็ด (capsaicinoids) ในพริกพันธุ์ต่าง ๆ โดยเทคนิค HPLC (หัวหน้าโครงการวิจัย)

ពាក្យបញ្ជាក់

Manuscript: Effects of *Acanthus ebracteatus* Vahl on Tumor Angiogenesis and on Tumor Growth in Cervical Cancer Implanted Nude Mice
Journal: Cancer Management and Research
Status: 6as - Proofreading
Sub ID: 33596
Submit Date: 04/May/2012

ORIGINAL RESEARCH

Acanthus ebracteatus Vahl. and Cervical Cancer

Mahasiripanth T., et al.

Effects of *Acanthus ebracteatus* Vahl on Tumor Angiogenesis and on Tumor Growth in Cervical Cancer Implanted Nude Mice

Taksanee Mahasiripanth¹

Sanya Hokputsa²

Somchai Niruthisard³

Parvapan Bhattarakosol⁴

Suthiluk Patumraj⁵

¹Inter-Department of Physiology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

²Research and Development Institute, The Government Pharmaceutical Organization, Bangkok, 10440, Thailand.

³ Pathological Division, Obstetrics and Gynecology Department, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

⁴Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

⁵Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

Correspondence: Suthiluk Patumraj, Ph.D.

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

Tel : +66-2-252-7854 ext.2032

Fax : +66-2-252-7854 ext.6032

Abstract:

Purpose: The aim of this study was to examine the effects of crude extract of *Acanthus ebracteatus* Vahl. (AE) on tumor growth and tumor angiogenesis in cervical cancer cells contained human papillomavirus 16 DNA (HPV-16 DNA) - implanted nude mice model.

Material and methods: Growth inhibitory effect of AE was studied by using four different cell types including CaSki (HPV-16 positive), HeLa (HPV-18 positive), HepG2 (Hepatocellular carcinoma cells), and HDFs (Human dermal fibroblast cells). The cell viabilities and IC50 of AE were determined for different incubation periods. For in vivo study, female BALB/c nude mice (aged 6-7 weeks, weighing 20-25 g) was used. A cervical cancer-derived cell line (CaSki) with integrated HPV-16 DNA, (1×10^7 cells/200 μ l) was injected subcutaneously in the middle dorsum of each animal (HPV group). One week after, mice were fed orally with *A. ebracteatus* Vahl. crude extract 300 or 3,000 mg/kg BW/day for 14 and 28 days (HPV-AE groups). Tumor microvasculature and capillary vascularity (CV) were determined by using laser scanning confocal microscopy. Tissue sample of tumor area in each mouse was collected for histological and for VEGF- immunostaining examinations.

Results: The time-response curves of AE and the dose-dependent effect of AE on growth inhibition were indicated. The IC50 of CaSki was significantly different from HDFs at 48-hr incubation period ($p < 0.05$). Microvascular network around tumor area was observed in HPV groups on day 21st and 35th. Tumor capillary vascularity in HPV groups were significantly increased when compared to control group ($P < 0.001$). High dose treatment of AE-extract (HPV-3,000AE group) significantly attenuated the increase in VEGF-expression and tumor angiogenesis on both 14- and 28-day of treatment periods ($P < 0.001$).

Conclusion: Our novel findings demonstrated that AE crude extract could inhibit cervical cancer growth, VEGF-expression, and angiogenesis in CaSki-transplant mice model.

Keywords: *Acanthus ebracteatus* Vahl, Tumor angiogenesis, VEGF, CaSki cells-implanted nude mice, capillary vascularity, laser scanning confocal microscopy

Introduction

Cervical cancer, a malignant tumor occur in uterine cervix area, which is the second most common cancer in women worldwide.¹ Nowadays, it is clearly that persistent infections with human papillomaviruses (HPVs) of epithelial cell in cervical mucosa are significant for the development and maintenance of cancer. Among more than 100 different types of HPVs have been reported and approximately 20 HPV types are associated with cervical cancer. HPVs DNA are found in almost all cervical cancers tissue > 99.7%,^{2,3} and the prominent types appear to be HPV16, 18, 31, and 45.⁴ The high risk types of HPV (HR-HPV), HPV16 and HPV18 are responsible for approximately 50% and 20% of all cervical cancers, respectively.^{5,6} HR-HPV contained two critical oncogenes E6 and E7 which involve in the carcinogenesis of host cells. The E6 and E7 oncoproteins bind to cellular tumor suppressor proteins, p53 and pRb, respectively, resulting in degradation of active p53 and interfering pRb function, and then lead to pre-cancerous lesion transformation to malignant cancer.⁷

Recently, there are many evidences supported that HPV also contributes a major role on angiogenesis process during early stage of cervical cancer. The highly expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), the potent angiogenic factor, have been found in all stages of cervical cancer lesion.⁸⁻¹⁵ HPV E6 promotes VEGF-dependent angiogenesis during growth and development of cervical cancer.¹⁶⁻¹⁸ Moreover, it has been reported that the up-regulation of VEGF expression occurs consequently of HPV E6 induced p53 degradation.¹⁹ In addition, both E6 and E7 also induce VEGF expression via direct triggered VEGF promoter,^{16,17} and mediated through enhancing the hypoxia-inducible factor -1 α (HIF-1 α) protein expression in HPV16-positive cervical cancer cells.¹⁸

During the last decade, there were a number of research studies indicated about antitumor potential of Thai medicinal plant, *Acanthus ebracteatus* Vahl. (Family Acanthaceae, English-name: Sea Holly, Thai-name: Ngueak-Pla-Mo). *Acanthus ebracteatus* Vahl. is a kind of Ayurveda folk-medicinal plants. This plant is a spiny mangrove herb commonly distributed in Southeast Asia. It composes of several kinds of chemical constituents including, alkaloids, flavonoids, triterpenoids, sterols, aliphatic glycosides, lignans, phenolic glycosides quaternary

amino acids and polysaccharide.²⁰⁻²⁴ A number of researches on this plant and its species have pointed out for their bioactive ingredients with their special pharmacological properties, including, antimicrobial, immunopotentiating, hepatoprotective, antioxidative, anti-inflammatory, antimutagenicity and anticarcinogenic effects.²⁵⁻³¹

Interestingly, the different experimental animal models reported that the extract from *A. ebracteatus* Vahl. could delay on set of carcinogenesis, inhibited hepatocarcinogenesis, against tumor progression, particularly decreased tumor growth.^{24, 32-34} It has been suggested that the cytotoxic effects of *A. ebracteatus* Vahl. on different types of cancer may be accounted by its bioactive compounds including; β -sitosterol, stigmasterol, lupeol, and benzoxazolines-2-one.³⁵⁻³⁸

However, the antitumor effect of *A. ebracteatus* Vahl. has not been studied in HPV16-positive cervical carcinoma cells. Moreover, there is still no experimental data addressed for its possible mechanism on tumor angiogenesis, even though, AE crude water-soluble contained polysaccharides which are well-known for their anti- VEGF^{23,38}, the key factor of angiogenesis.

Therefore, the present study will be the first investigation demonstrating for the effects of *A. ebracteatus* Vahl. on tumor angiogenesis and on VEGF expression in related to tumor growth in human cervical carcinoma cell contained human papillomavirus-16-DNA implanted nude mice model.

Material and methods

Preparation of A. ebracteatus Vahl. Crude Extract

The crude extract of *A. ebracteatus* Vahl. was prepared by Medicinal Plant Analytical Development Section, Research and Development Institute, The Government Pharmaceutical Organization (GPO), Thailand. In brief, fresh leaves and stems of *A. ebracteatus* Vahl. were chopped into small pieces and then sun-dried until the residual moisture content of 16.8% w/w was obtained. Then dried matter was boiled with distilled water (1 kg dried matter per 20L water) for 2 times. After filtration, the solution was dried by spraying until turning to powder (15 kg of ground dried leaves and stems: 1,800 gm of powder extract). The light creamy-white powder was

then kept in foil packages (20 grams per pack) with humid absorbance. The powder was dissolved by distilled water when used for each experimental^{23, 39}.

Cell Line Cultivation

Three types of human cancer cell lines and one of normal cell line were used in this study. Human cervical carcinoma which contain the integrated HPV-DNA, CaSki (HPV-16 positive) and HeLa (HPV-18 positive) cells, Hepatocellular carcinoma cells, HepG2 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and Human dermal fibroblast cells, HDFs was purchased from Cell Applications Inc, USA. All cancer were grown in Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, CA, USA), antibiotic-antimycotic mixture of penicillin (50 unit/ml) and streptomycin (50 µg/ml) (Bio Basic Inc., Canada) and 2 mM L-glutamine. HDFs cells were maintained in Fibroblast Growth Medium (FGM; Cell Applications Inc, USA) supplemented with low serum growth supplement. Cells were cultured in a 37°C, 5%CO₂ humidified incubator and changed fresh medium every other day and were sub-cultured when reach 80% confluent to maintain cell growth in log stage. Cells were trypsinized by 0.025% trypsin-EDTA (Invitrogen, USA) before used. The human cervical carcinoma cell lines, CaSki cells which contain several hundred gene copies of integrated HPV-16 DNA were used in this study. CaSki were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (CRL-1550 Lot No: 3794357). The cell was grown in Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO BRL, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, USA), antibiotic-antimycotic mixture of penicillin (50 unit/ml) and streptomycin (50 µg/ml) (Bio Basic Inc., Canada) and 2 mM L-glutamine. The cell was cultured in a 37°C, 5%CO₂ humidified incubator and changed fresh medium every other day. The cell was sub-cultured when the CaSki reach 80% confluent to maintain cell growth in log stage. The cell was trypsinized into single cells before being used.

Cell Proliferation Assay

The effects of *A. ebracteatus* Vahl. crude extract on cells growth were examined by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide assay (MTT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Cells were divided into control group (untreated) and treated groups that were treated with different concentrations of the *A. ebracteatus* Vahl. crude extract (10^{-3} - 10^4 $\mu\text{g/mL}$).

Briefly, when cells were detached by using 0.025% trypsin-EDTA into single cells, cells were then seed into 96-wells plate (1×10^4 cells per well in 100 μl of complete culture medium). The cells were allowed to grow for 24 hours at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 atmosphere. On the following day, the medium was then removed and refilled with complete medium containing the crude extract of *A. ebracteatus* Vahl. (10^{-3} - 10^4 $\mu\text{g/mL}$ with total volume 100 $\mu\text{L/well}$), but for control group only medium was used.

At the end of 21-, 48- and 72-hour incubation, the medium was aspirated and 100 μL of 0.5 mg/mL MTT in serum free medium was added into each well. The plate was then incubated for 4 hours at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 . After incubation, the MTT formazan, metabolic product produced by viable cells, appeared as dark crystals in the bottom of the wells. The MTT solution was removed from each well carefully to prevent disruption of the cell monolayer and then was refilled with 150 μL of 99.9% dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). To thoroughly dissolve the formazan crystal, each plate was placed on shaking table for 5 minutes at room temperature for a minimum of 1 hour. Purple color solution was visible at this stage and then Optical Density (OD) of each plate was read by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader (BIO-RAD Laboratories Inc., USA) at 540-nm wavelength. The MTT test was repeated at least 3 independent experiments.

The inhibitory effect of AE on cell proliferation was calculated by proportion of living cells at the same time interval: $(\text{OD of AE-treated sample} - \text{OD of blank}) / (\text{OD of untreated control} - \text{OD of blank})_{T=\text{time}} \times 100\%$.

Dose-response curves were obtained for each cell types by plotting the percentage of growth inhibition versus the AE-extract concentrations. And the non-linear regression equation was used

to calculate the half maximal inhibitory concentrations (IC50 values) at 48-hour incubation (fitting Logistic-sigmoidal model) using Origin version 5.0 software program (Microcal Software, Inc, MA, USA).

Experimental Animal Preparation

Inbred female BALB/c-nude mice (body weight 20-25 g) were obtained from the National Laboratory Animal Center, Salaya Campus, Mahidol University, Nakornpathom, Thailand. All animal experiments were conducted according to the "Ethical Guidelines for the Uses of animals" by The National Research Council of Thailand (1999) and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Chulalongkorn University, Thailand. The mice were housed in a specific pathogen germ-free environment where temperature was 25 ± 3 °C, 60-70% air humidity and 12h light-dark cycle. During the experiment, the mice were fed with standard laboratory chow and sterile water *ad libitum*.

The mice were divided into 4 groups: 1) control mice received distilled water (Con; n=5), 2) HPV-16-implanted mice treated with distilled water (HPV-Veh; n=8), 3) HPV-16-implanted mice treated with AE 300 mg/kg BW (HPV-300AE; n=8), 4) HPV-16-implanted mice treated with AE, 3,000 mg/kg BW(HPV-3000AE; n=8). The AE supplementation was started 24 hours after inoculation of CaSki cells and treatment periods were 14 and 28 days.

The HPV-implanted mice were prepared according to the procedure reported previously by Lertworapreecha M, et al. in 2009.⁴⁰ For the HPV group, CaSki cells (1×10^7 cells/200 μ l (viability > 95 %)) were injected into subcutaneous layer at dorsal skin of mice. Control mice were received only MEM medium equal volume as HPV mice groups. Then, all mice were housed one animal per cage until end of experiment.

All procedures must be performed under aseptic conditions. In order to confirm the tumorigenesis, after the end of each experiment tissue sample of dorsal skin at cancer cells injected area were collected for histological examination. Hematoxylin and eosin-stained specimens will be reported by the pathologist (SYL) in the (Pathological Division, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University).

Determination of Tumor Volume and Histopathological Examination

When tumor microvasculature study was finished, mice were sacrificed and tumor mass were excised carefully. Tumor size was measured by using Vernier caliper (VWR, St. Louis, USA). Tumor volume was calculated by the following the ellipsoid volume formula: $\text{Volume (mm}^3\text{)} = \pi/6(\text{length}) \times (\text{width}) \times (\text{height})$.⁴³ Then tumor mass was fixed with neutral buffer formalin (4% formalin, 0.4% NaH₂PO₄, 0.65% Na₂HPO₄) for further study of histopathological changes. The formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sample was cut in 5 μm on a microtome with a disposable blade. The sliced tissue was fixed on to slide and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) staining by using automatic tissue staining (LEICA, Autostaining XL, Germany). The cervical carcinoma establishment was confirmed by the pathologist (Pathological Division, Department of Obsteric and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University).

Determination of VEGF expression

Immunostaining was performed using paraffin-embedded 5- μm -thick tumor area sections. Sections were deparaffinized, hydrated, blocked for endogenous peroxidase using 3% H₂O₂/H₂O, and subsequently incubated with antigen Retrieval Solution EDTA buffer (BD Pharmingen, San Diego, CA) in 95-99°C water-bath at pH 8 for 40 minutes. Nonspecific background was blocked by application of 3% normal horse serum 200 μL . Application of antibodies, anti-VEGF (Santa Cruze Biotechnology, CA, 1:100) 200 μL were applied on tissue sections, followed by incubated at 4 °C overnight. After washed by PBS (pH7.4), 200 μL visualization reagents (Envision) were applied on tissue sections and incubated at room temperature for 30 minutes. Color was developed by using DAB (3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride), and the slides were counter-stained with Hematoxylin and mounted with resinene. Negative control slides were established by replacing the primary antibody with PBS and normal rabbit serum. Known immunostaining-positive slide were used as positive controls. The positively stained cells of VEGF were monitored and captured by digital camera (Nikon DS-Fi1-L2, Nikon, Japan) and image software (NIS-Elements Basic Research (BR). The quantitative

analysis for VEGF expression was performed by using Image-Pro Plus 6.1 Software. VEGF positive cell showed brown-yellow particles in cytoplasm, and %VEGF expression was represented by proportion of VEGF staining area per total ROI area.⁴⁴

Statistical Analysis

All results are expressed as the mean \pm standard error of means (SEM). Statistical analyses were evaluated by One way ANOVA using SPSS (version 16.0, Chicago, IL USA). The difference of means is considered when the probability level (*P* value) less than 0.05.

Results

Effects of AE on cell proliferation

The time-response curves of *A. ebracteatus* Vahl. crude extract were obtained by plotting the percentage of cell viability versus concentrations at different incubation periods, 24, 48 and 72 hours as shown in Figure 2A-D.

Figure 2A-D

In Table 1, IC₅₀ of each cell types were calculated from the non-linear regression equation (Fitting Logistic-sigmoidal model). The results showed that the dose-dependent effect of AE on growth inhibition, and the IC₅₀ of CaSki was significantly different from HDFs (*P*<0.05).

Table 1

Effects of AE on Tumor volume and Histopathological Examination

After one-week Caski cells inoculation, tumor bud could be observed and enlarged continuously. **Table 2** showed the mean values of tumor volume of each group. It indicated that HPV-3000AE tumor volume was significantly less than HPV-Veh group. (*p*<0.05) The results indicated that high dose treatment of AE crude extract could significantly inhibit or delay cervical

carcinoma growth.

Table 2

After the excisional tumor nodule was performed, the results of histological study confirmed the large deposit of malignant tumor in the deep part of mouse skin, between bundles of skeletal muscle (**Figure 3A**). Morphology of cancer cells confirmed the characteristics of squamous cell carcinomas (SCC) presenting irregular round nuclei, small nucleoli, pale pink cytoplasm (**Figure 3B**).

Figure 3A-B

Antiangiogenic Activity of AE

Figure 4A-F show confocal fluorescent images of the microvasculature of HPV groups at day 14 and 28 days with and without AE treatments. Base on these laser confocal microscopic images, a large number of microvascular networks around tumor mass in HPV-16 group was indicated (**Figure 4A-B**). In addition, it also showed that tumor microvascular ultrastructure could be characterized by pathological features including abrupt changes in the diameters, tortuosity, and hyperpermeability. From these confocal laser scanning images, the tumor capillary vascularity (CV) was evaluated using a digital image analysis as previously described. The results demonstrated that in the HPV-Veh group the neocapillary densities were significantly increased on day 14 and day 28 (CV $56.28 \pm 1.43\%$ and $71.52 \pm 3.51\%$ respectively, $p < 0.01$), when compared to the aged-matched control group ($22.58 \pm 0.39\%$, $p < 0.01$) (**Figure 5**). Interestingly, it is observed that high dose (3,000 mg/kg) treatment of AE showed significant decrease in the tumor CV on both day 14 and day 28 ($p < 0.05$) (**Figure 5**).

Figure 4A-D

Figure 5

Effects of AE on VEGF Expression

Table 3 showed the results of VEGF expression in control and CaSki-implanted mice. It indicated that CaSki-implanted mice had significant VEGF expression more than the control group. Interestingly, it also indicated that *A. ebracteatus* Vahl. crude extract could inhibit VEGF expression with dose-dependent manner.

Table 3

Discussion

In this present study, the innovation on establish a mouse model for CaSki-containing HPV-16 cervical cancer study is successfully attained. We used the different technique from our previous model of HeLa-containing cervical cancer mouse⁴⁰ by using subcutaneously injection of CaSki cells in order to induce cervical cancer nodule on mouse's dorsal skin. The amount of CaSki cells 1×10^7 cells are required to establish a tumor nodule at dorsal skin within 1 week after inoculation. By the pathologist report, this model also showed the featured of malignant tumor with particularly landmarked squamous cell carcinoma.(Figure 3) Therefore, animal model for HPV-16 acquired tumor was used and suitable to perform further study on testing anti-cancer property of *Acanthus ebracteatus* Vahl. (AE).

In this study the anti-cancer property of AE was determined by using both in vitro and in vivo assessments. The cell growth assay has performed by using 4 different types of cells including CaSki (HPV-16 positive), HeLa (HPV-18 positive), HepG2 (Hepatocellular carcinoma

cells), and HDFs (Human dermal fibroblast cells). By using the MTT assay, which is basically depend on mitochondrial enzyme activity in viable cells, the results indicated that the growth inhibitory effects of AE on each cell type depend on dose as shown in Figure 2A-D. In Table 1, by using non-linear regression equation (fitting Logistic-sigmoidal model), it showed that the mean IC50 value obtained from 48-hr growth inhibition effect of AE on CaSki was significantly less than IC50 of HDFs cells ($P < 0.01$). However, the cell growth inhibition of this crude extract of AE did not significantly demonstrate in other cancer types, HeLa and HepG2, since both means IC50 values showed no significant difference from HDFs cells ($P < 0.1$ and $P < 0.69$, respectively). Similar to the previous study by Siripong and co-workers (1998)³³ who reported that aqueous extract of AE has a weak antitumor activity against Sarcoma 180 ascites cells in transplanted ICR male mice model. Moreover, in the study done by Babu et al. (2002)²⁹, it is found that the alcoholic extract of *A. ilicifolius* is cytotoxic towards the tumor cells, L-929 cells, in 72-hr assay, but not in 3-hr assay.

Several *In vitro* studies have reported the anti-tumor and anti-proliferative properties of *A. ebracteatus* Vahl. crude extract^{33, 34} as well as its active compounds such as β -sitosterol, stigmasterol, lupeol³⁸, and benzoxazolines-2-one³⁷ on various types of cancer cells. Especially, β -sitosterol, the most common dietary phytosterol, is a high concentrate constituent of *A. ebracteatus* Vahl. and it is believed to be a potential candidate for cancer chemotherapy. Several studies demonstrated β -sitosterol-induced-apoptosis through caspase-3 activation, and it also induced MCA-102 tumor cells apoptosis via alteration of p53 and p21 resulting decreased anti-apoptotic Bcl-2 and increased pro-apoptotic Bax.^{45, 46}

Furthermore, the report by Phisalaphong et al. (2006)³⁵ also indicated that this weak anti-growth effect of AE could be enhanced by its desalted product. They demonstrated for less IC50 value of 3,500 $\mu\text{g/ml}$ (48 hrs incubation) as compared to our IC50 ($6,419.50 \pm 2,282.62 \mu\text{g/ml}$) when the same HeLa cancer cell type was used. Therefore, in the future the efficacy of AE crude extract may need to improve by these modified processes including the isolation for its active ingredients.

Antiangiogenic Activity of AE

By using a mouse model for CaSki-containing HPV-16 cervical cancer study, this is the first time that the potential of AE on anti-angiogenesis was defined. As shown in Figure 4, the capillary density was markedly increased around tumor-bearing site. It is clear that angiogenesis is an important phenotype in all stage of cervical cancer development.^{8-12, 47-49} With confocal scanning laser fluorescence micrographs, the microvascular networking images showed that newly-formed capillaries could be described by its particular characteristics such as increasing permeability, increase in diameter, and high tortuosity.⁴² In Figure 5, the high dose (3,000 mg/kg) treatment of AE showed significant decrease in the tumor CV on both day 14 and day 28 ($P < 0.05$).

In Table 3, the results of VEGF expression indicated that CaSki-implanted mice had significant VEGF expression more than the control group. Interestingly, it also indicated that *A. ebracteatus* Vahl. crude extract could inhibit VEGF expression with dose-dependent manner.

Figure 6A-B

In addition, by using means of %CV and VEGF expression of each group, the plotting data showed a linear relationship with a correlation coefficient, $R^2 = 0.82$ ($P < 0.05$) (Figure 6A). This result suggests that the reduction in tumor capillary vascularity was linearly correlated with the increment in VEGF expression during the tumor angiogenesis. Therefore, the inhibitory effect of AE on anti-angiogenesis should be related to its possible mechanism of anti-VEGF expression.

Moreover, this result is also concomitantly with the result of tumor volume as which it indicated that 3000-AE could suppress tumor growth significantly as shown in Table 1. In Figure 6B, by using means of %CV and tumor volume of every group, the correlation between these two parameters could be described by a linear relationship with a correlation coefficient, $R^2 = 0.53$ ($P < 0.07$). Therefore, it suggested that the reduction in tumor capillary vascularity was linearly correlated with the decrease in tumor volume. In other word, it implied that the anti-angiogenic activity of high-dose AE could inhibit the synthesis of new blood vessels supplying cervical

cancer cells, therefore result to lacking nutrients and oxygen supply cancer cells, and lead to suppress tumor growth.

Based on our *in vivo* model, it is demonstrated for the first time about the anti-angiogenic efficacy of *A. ebracteatus* Vahl. crude extract. The study demonstrated that HPV-16 cervical cancer neocapillarization was significantly reduced by high dose treatment of *A. ebracteatus* Vahl. crude extract (3,000 mg/ kg BW).

It is believed that the major mechanism of cervical cancer on angiogenesis is hypoxic mediated angiogenic switch. It has been reported that the dysregulation of p53 also involved in activation of pro-angiogenesis factor such as VEGF and HIF-1 α .^{19, 50} Recent studies have identified a number of additional cellular targets of E6; inactivation of active p53 protein is probably an important element of E6-induced cellular transformation of cervical cancer. E6 oncoprotein is not only an important factor for HPV-associated carcinogenesis, but also directly related in angiogenesis process. The present study indicated the important mechanism of AE on anti-angiogenesis in related to its potential of anti-VEGF expression. Therefore, the effect of AE on E6 oncoprotein may need to be confirmed in the future.

However, other properties of AE including anti-inflammatory and anti-oxidative activities may involve and cause the induction of tumor apoptosis and/or inhibiting tumor angiogenesis as well.^{21, 51-54} Therefore, anti-oxidative effect of AE might be another beneficial mechanism in addition to its potential on anti-tumor property.

Conclusion

In summary, our studies demonstrate that *A. ebracteatus* Vahl. crude extract could inhibit tumor growth and tumor angiogenesis in HPV-16 derived cervical cancer mice model. Particular, its potential mechanism on anti-tumor and anti-angiogenesis was significantly correlated to its anti-VEGF expression.

Authors' contributions

TM participated together with co-authors in the design of study. The experiments were carried out

by TM, PB and, SP. SN was the assistant for patho-histological examination and reports. TM, PB, and SP interpreted and analyzed the data. SH was the person who prepared the AE-aqueous crude extract. TM prepared the initial draft of manuscript and SP mindfully read and revised the manuscript. SP, who is the head of Microcirculation lab where the *in vivo* experiment was conducted, is the principal investigator. All authors read and approved the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests related to this study.

Acknowledgments

This study was supported by The Thailand Research Fund (No.GRB_047_52_30_17).

References

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2): 74-108.
2. Kjaer SK, Tran TN, Sparen P, et al. The burden of genital warts: a study of nearly 70,000 women from the general female population in the 4 Nordic countries. *J Infect Dis* 2007;196(10): 1447-54.
3. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370(9590): 890-907.
4. zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science* 1991;254(5035): 1167-73.
5. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006;110(5): 525-41.
6. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3: S3/1-10.
7. Prendiville W, Davies P. *The Health Professional's HPV Handbook 1: Human Papillomavirus and cervical cancer*. 2004;97.
8. Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. *J Pathol* 2003;201(4): 544-54.
9. No JH, Jo H, Kim SH, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1alpha in cervical neoplasia. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1171: 105-10.
10. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(16): 1237-45.
11. Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR, Carmichael J, Murray JC. Angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 1997;76(11): 1410-5.
12. Hammes LS, Tekmal RR, Naud P, et al. Up-regulation of VEGF, c-fms and COX-2 expression correlates with severity of cervical cancer precursor (CIN) lesions and invasive disease. *Gynecol Oncol* 2008;110(3): 445-51.
13. Kodama J, Seki N, Tokumo K, et al. Vascular endothelial growth factor is implicated in early invasion in cervical cancer. *Eur J Cancer* 1999;35(3): 485-9.

14. Yu H, Zhang S, Zhang R, Zhang L. The role of VEGF-C/D and Flt-4 in the lymphatic metastasis of early-stage invasive cervical carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28: 98.
15. Monk BJ, Willmott LJ, Sumner DA. Anti-angiogenesis agents in metastatic or recurrent cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2010;116(2): 181-6.
16. Bequet-Romero M, Lopez-Ocejo O. Angiogenesis modulators expression in culture cell lines positives for HPV-16 oncoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277(1): 55-61.
17. Lopez-Ocejo O, Vilorio-Petit A, Bequet-Romero M, Mukhopadhyay D, Rak J, Kerbel RS. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene* 2000;19(40): 4611-20.
18. Tang X, Zhang Q, Nishitani J, Brown J, Shi S, Le AD. Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2007;13(9): 2568-76.
19. Willmott LJ, Monk BJ. Cervical cancer therapy: current, future and anti-angiogenesis targeted treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9(7): 895-903.
20. Tiwari KP, Minicha PK, Masood M. Acanthiicifoline-A new alkaloid from *Acanthus ilicifolius*. *Polish Journal of Chemistry* 1980;54: 857-58.
21. Minocha PK, Tiwari KP. A triterpenoidal saponin from roots of *Acanthus ilicifolius*. *Phytochemistry* 1981;20(1): 135-37.
22. Jensen HFW, Jensen SR, Nielsen BJ. Chemotaxonomy of the acanthaceae. Indoids and quaternary amines. *Phytochemistry* 1988;27(8): 2581-89.
23. Hokputsa S, Harding SE, Inngjerdigen K, et al. Bioactive polysaccharides from the stems of the Thai medicinal plant *Acanthus ebracteatus*: their chemical and physical features. *Carbohydr Res* 2004;339(4): 753-62.
24. Kanchanapoom T, Kasai R, Picheansoonthon C, Yamasaki K. Megastigmane, aliphatic alcohol and benzoxazinoid glycosides from *Acanthus ebracteatus*. *Phytochemistry* 2001;58(5): 811-7.
25. Sittiwet C, Niamsa N, Puangpronpitag D. Antimicrobial Activity of *Acanthus ebracteatus* Vahl. Aqueous Extract: The Potential for Skin Infection Treatment. *International Journal of Biological Chemistry* 2009;3: 95-98.
26. Masathien C, Siripong P. In vitro Immunopotentiating Effect(s) of *Acanthus ebracteatus* Vahl. Roots on Human Lymphocytes. *Journal of the Medical Technologist Association of Thailand* 1991;15: 97-103.
27. Babu BH, Shylesh BS, Padikkala J. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia* 2001;72(3): 272-7.
28. Advani SB, Sam J. Potential anticancer and antiviral agents. Substituted 3-[1'(2',3',4'-tri-O-benzoyl-β-d-ribofuranosyl)]-2-benzoxazolinones. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 1968;5(1): 119-22.
29. Babu BH, Shylesh BS, Padikkala J. Tumour reducing and anticarcinogenic activity of *Acanthus ilicifolius* in mice. *J Ethnopharmacol* 2002;79(1): 27-33.
30. Wu J, Zhang S, Xiao Q, et al. Megastigmane and flavone glycosides from *Acanthus ilicifolius*. *Pharmazie* 2003;58(5): 363-4.
31. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR, Itharat A. An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. *J Ethnopharmacol* 2003;85(2-3): 207-15.
32. Srivatanakul P, Naka L. Effect of *Acanthus ilicifolius* Linn. in Treatment of Leukemic Mice. *Thai Cancer Journal* 1981;7: 89-93.
33. Siripong P, Kongkathip B, Kanokmedhakul K, Hitosuyanagi Y, Takeya K, Itokawa H. Study on Antitumor Potential of *Acanthus ebracteatus* Vahl. Roots. *Thai Cancer Journal* 1998;24(29-37): 29.
34. Tiwawech D, Siripong P, Kupradinun P. Inhibition of Diethylnitrosamine (DEN)-induced Hepatic Foci by Pre and Post Treatment with *Acanthus ebracteatus* Vahl. in Rats. *Thai Cancer Journal* 1993;1-2: 7-13.
35. Phisalaphong M, Thu Ha N, Siripong P. Desalting of Aqueous Extract of *Acanthus ebracteatus* Vahl. by Nanofiltration. *Separation Science and Technology* 2006;41(3): 455-70.

36. Moon DO, Lee KJ, Choi YH, Kim GY. Beta-sitosterol-induced-apoptosis is mediated by the activation of ERK and the downregulation of Akt in MCA-102 murine fibrosarcoma cells. *Int Immunopharmacol* 2007;7(8): 1044-53.
37. Kokpol U, Chittawong V, Miles DH. Chemical Constituents of the Roots of *Acanthus illicifolius*. *J Nat Prod* 1986;49(2): 355-56.
38. Hartwell JL. Types of anticancer agents isolated from plants. *Cancer Treat Rep* 1976;60(8): 1031-67.
39. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*: The United Nations Industrial Development Organization (UNIDO); The International Centre for Science and High Technology (ICS). , 2008:266.
40. Lertworapreecha M, Patumraj S, Niruthisard S, Hansasuta P, Bhattarakosol P. Mouse acquired HPV tumor using dorsal skin-fold window chamber. *Indian J Exp Biol* 2009;47(5): 327-32.
41. Viboolvorakul S, Niimi H, Wongeak-in N, Eksakulkla S, Patumraj S. Increased capillary vascularity in the femur of aged rats by exercise training. *Microvasc Res* 2009;78(3): 459-63.
42. Patumraj S, Yoysungnoen P, Kachonrattanadet P, Wirachwong P. Tumor neocapillary density in hepatocellular carcinoma cells implanted nude mice model. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005;33(2): 137-44.
43. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;24(3): 148-54.
44. Fok TCO, Jan A, Peel SAF, Evans AW, Clokie CML, Sándor GKB. Hyperbaric oxygen results in increased vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression in rabbit calvarial critical-sized defects. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2008;105(4): 417-22.
45. Choi YH, Kong KR, Kim YA, et al. Induction of Bax and activation of caspases during beta-sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 2003;23(6): 1657-62.
46. Awad AB, Roy R, Fink CS. Beta-sitosterol, a plant sterol, induces apoptosis and activates key caspases in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Oncol Rep* 2003;10(2): 497-500.
47. Triratanachat S, Niruthisard S, Trivijitsilp P, Tresukosol D, Jarurak N. Angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and early-staged uterine cervical squamous cell carcinoma: clinical significance. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16(2): 575-80.
48. Obermair A, Bancher-Todesca D, Bilgi S, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(16): 1212-7.
49. Smith-McCune K, Zhu YH, Hanahan D, Arbeit J. Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice. *Cancer Res* 1997;57(7): 1294-300.
50. Nakamura M, Bodily JM, Beglin M, Kyo S, Inoue M, Laimins LA. Hypoxia-specific stabilization of HIF-1alpha by human papillomaviruses. *Virology* 2009;387(2): 442-8.
51. Agshikar NV, Naik VR, Abraham GJ, Reddy CV, Naqvo SW, Mittal PK. Analgesic anti-inflammatory activity of *Acanthus illicifolius* Linn. *Indian J Exp Biol* 1979;17(11): 1257-8.
52. Liu M, Pelling JC, Ju J, Chu E, Brash DE. Antioxidant action via p53-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1998;58(8): 1723-9.
53. Maity P, Chakraborty S, Bhattacharya P. Neovascularisation offers a new perspective to glutamine related therapy. *Indian J Exp Biol* 2000;38(1): 88-90.
54. Nguyen P, Ho C-L, Teo S-S, Hanikrishna J, Rahim R. Sequence and transcript analyses of antioxidant genes from *Acanthus ebracteatus* Vahl. *Tree Genetics & Genomes* 2008;4(4): 705-13.

Table 1 The half maximal inhibitory (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$) of *A. ebracteatus* Vahl. crude extract against three cancer cells (CaSki, HeLa, HepG2) and one type of normal cell (HDFs) with incubation time 48 hours.

Cell types	No. of Experiment	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Mean of IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
CaSki	1	4,290.11 \pm 333.06	4,984.90 \pm 498.72
	2	4,712.45 \pm 852.03	
	3	5,952.04 \pm 595.81	
HeLa	1	7,009.56 \pm 434.40	6,072.50 \pm 573.29 ^{ns}
	2	5,031.74 \pm 33.90	
	3	6,176.10 \pm 421.22	
HepG2	1	2,263.06 \pm 391.99	6,419.50 \pm 2,282.62 ^{ns}
	2	7,708.35 \pm 534.24	
	3	9,988.64 \pm 1,286.13	
HDFs	1	7,121.10 \pm 296.88	7,382.40 \pm 221.05
	2	7,822.03 \pm 599.39	
	3	7,203.23 \pm 351.64	

Notes Data expressed as mean \pm SEM, n=3 (n =Number of independent experiment which was performed in triplicate). The IC_{50} were determined from 48 h, and calculated from the non-linear regression equation (fitting Logistic-sigmoidal model) using Microcal Origin version 5.0 software program. * Significantly different compared to HDFs ($P < 0.01$) by using student t-test statistical testing (SPSS Version 16). Ns: non-significant difference as compared to HDFs.

Table 2. Tumor volume of tumor nodule excised from each HPV- group.

$$\text{Volume (mm}^3\text{)} = \pi/6(\text{length})\times(\text{width})\times(\text{height}).^{43}$$

Groups	Tumor Volume (mm ³)	
	At day 14 after AE treatments	At day 28 after AE treatments
HPV-Veh	103.79 ± 11.69 (n=4)	235.98 ± 7.57 (n=5)
HPV-300AE	94.89 ± 9.50 ^{NS} (n=3)	245.36 ± 36.26 ^{NS} (n=4)
HPV-3,000AE	62.37 ± 16.56* (n=5)	155.77 ± 7.55* (n=4)

Notes: Data expressed as Mean ± SE, * significant difference from HPV-Veh group ($P<0.05$).

NS :non-significant difference from HPV-Veh group ($P<0.05$).

Table 3. VEGF expression in tumor tissue area (%) was determined from CaSki cells-implanted nude mice with and without AE treatment at day 14 and day 28.

Groups	Area of tumor tissue VEGF expression (%)	
	Days after treatment	
	At day 14 ^m	At day 28 ^m
Con-Veh (n=8)	32.89 ± 2.06 (n=4)	33.17 ± 1.12 (n=4)
Con-300AE (n=10)	29.64 ± 2.22 (n=5) ^{NS}	37.26 ± 1.49 (n=5) ^{NS}
Con-3,000AE (n=8)	40.40 ± 3.47 (n=4) ^{NS}	35.17 ± 3.05 (n=4) ^{NS}
HPV-Veh (n=9)	80.96 ± 2.16 (n=5) [†]	80.56 ± 1.09 (n=4) [†]
HPV-300AE (n=7)	77.33 ± 3.87 (n=3) [†]	77.99 ± 2.30 (n=4) [†]
HPV-3,000AE (n=9)	54.64 ± 3.59 (n=5) ^{†, ††}	45.63 ± 3.47 (n=4) ^{†, †}

Notes: Data expressed as mean ± SEM,

[†] significantly difference from Con-Veh group ($P < 0.001$).

[€] significantly difference from HPV-Veh group ($P < 0.001$).

[‡] significantly difference from HPV-300AE group ($P < 0.001$).

NS :non-significant difference from Con-Veh group ($P < 0.05$).

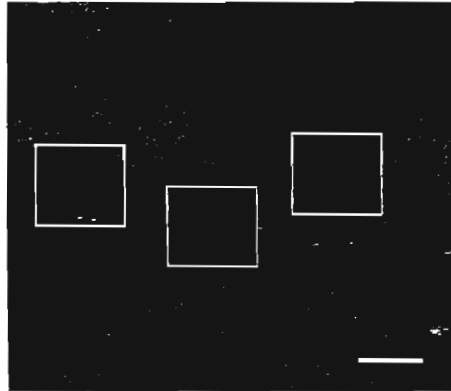


Figure 1 This figure shows an example of confocal laser microscopic image which was taken from a mouse with tumor. From the frame of microvascular network, three ROIs (100x100 pixels) were selected for determining capillary vascularity (CV) for each mouse. The microvascular network was visualized using FITC-dextran fluorescence (MW 200,000), with low magnification $\times 10$, Bar = 50 μm .

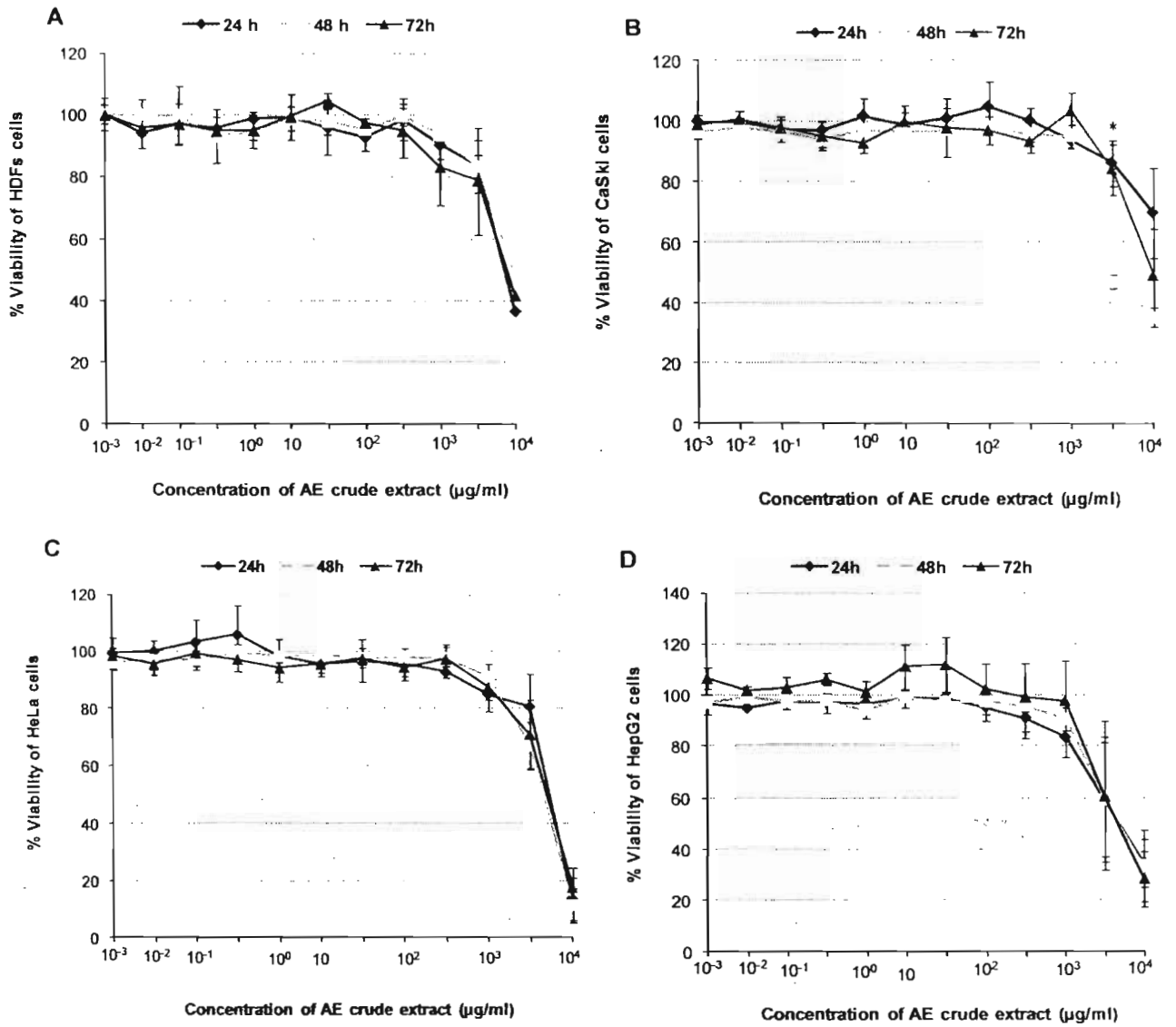


Figure 2A-D. Percentages of cell viability of HDFs (A), CaSki (B), HeLa (C), and HepG2 cells (D) when treated with *A. ebracteatus* Vahl. at different concentrations (10^{-3} - 10^4 µg/mL with total volume 100 µL/well) at 24-, 48-, and 72-hour incubations.

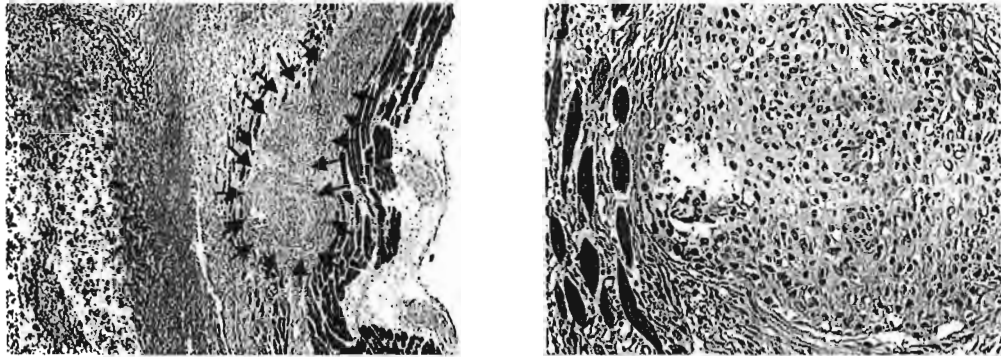


Figure 3A-B. Histology of subcutaneous tumor nodules taken from CaSki cells-implanted nude mice (A) showed marked deposit malignant tumor in deep part of skin (x4), (B) and morphology of squamous cell carcinoma (x10).

Notes: The histological analysis of one week CaSki cell-implanted nude mice. H&E, at low magnification $\times 4$ and $\times 10$.

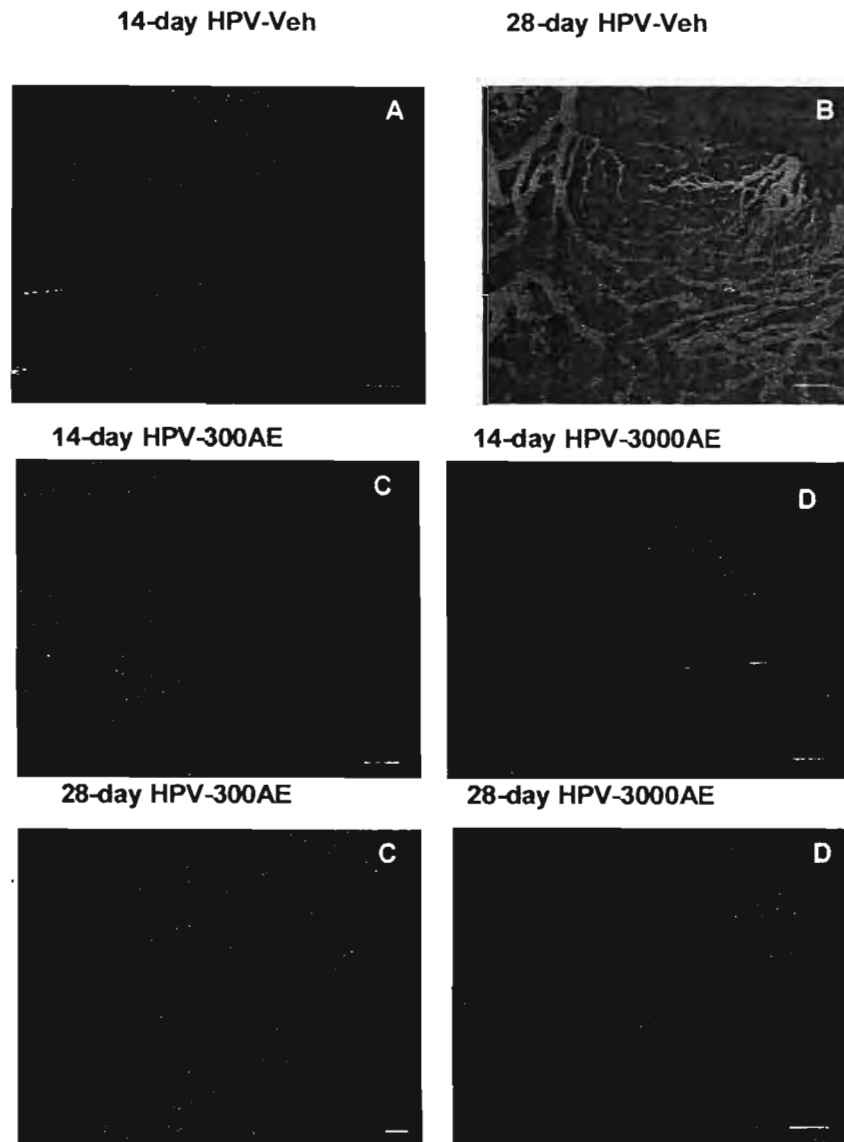


Figure 4A-F. Confocal laser microscopic images of tumor microvascular network taken from 14-day HPV-Veh (A), 28-day HPV-Veh (B), HPV-300AE (300mg/kg BW) for 14 days (C), HPV-3000AE (3,000mg/kg BW) for 14 days (D) HPV-300AE for 28 days (E) and HPV-3000AE for 28 days (F). The microvascular network was visualized using FITC-dextran fluorescence (MW 200,000), with AE, *Acanthus ebracteatus* Vahl. crude extract low magnification $\times 10$, Bar = 50 μm .

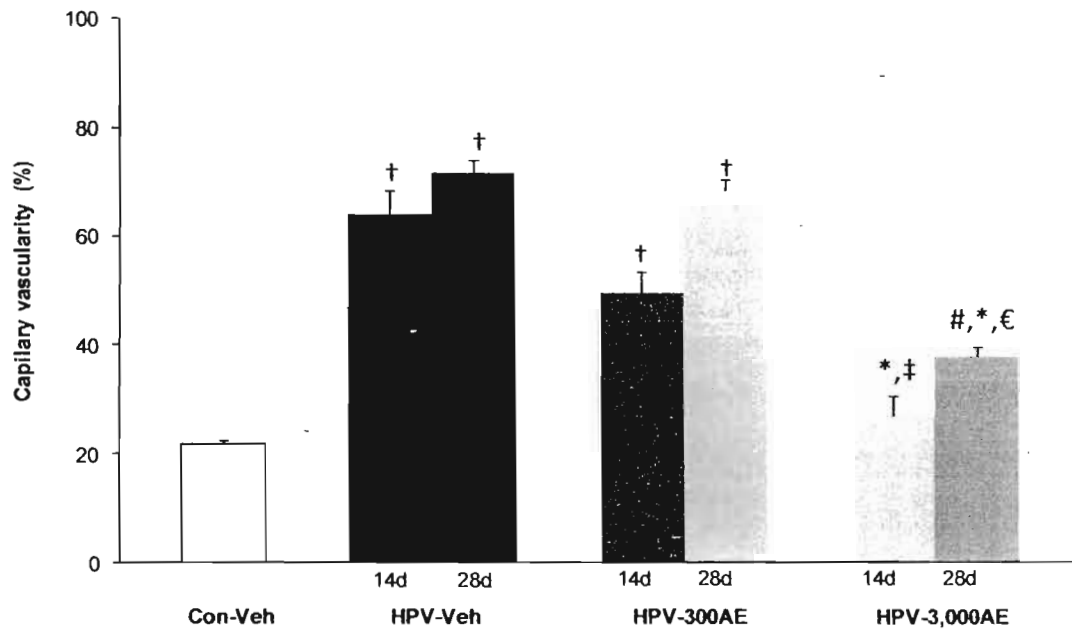


Figure 5 The percentages of capillary vascularity (mean \pm SE) of 14 days and 28 days after vehicle (distilled water), AE (300 and 3,000 mg/kg BW) treatments were shown for control and HPV groups.

Notes: † Significantly different from control group ($P < 0.001$)

Significantly different from control group ($P < 0.005$)

* Significantly different from HPV-Veh group ($P < 0.001$)

‡ Significantly different from HPV-300AE group ($P < 0.001$)

€ Significantly different from HPV-300AE group ($P < 0.01$).

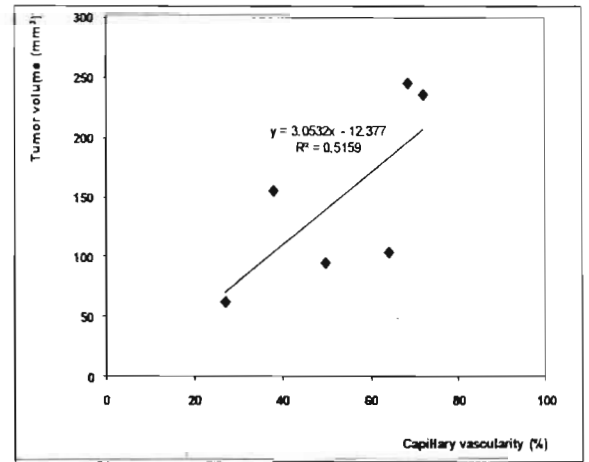
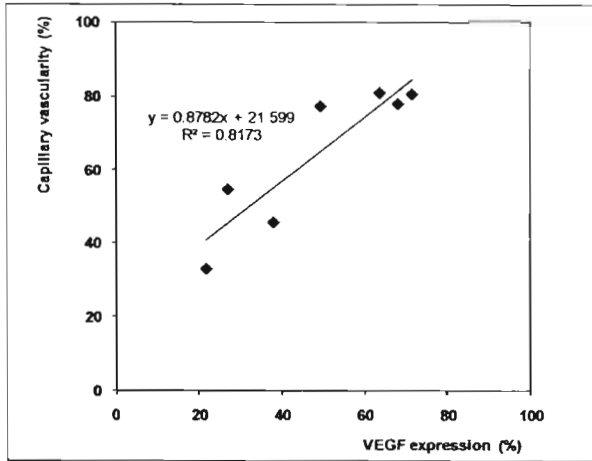


Figure 6A-B A). Plotting of data of %VEGF expression vs % capillary vascularity (%CV). The solid line represents correlations between VEGF and CV. The correlation is expressed of $y = 0.8782x + 21.599$, $R^2 = 0.82$.

B). Plotting of data of %CV vs % tumor volume. The solid line represents correlations between capillary vascularity and tumor volume. The correlation is expressed of $y = 3.0532x - 12.377$, $R^2 = 0.53$.