



รายงานการวิจัย

เรื่อง

ผลของอาหารเสริมจากเส้นใยธรรมชาติซิริซินต่อการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่

The effect of sericin on prevention of colon cancer

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิง ดร.สุชาติพิย์ พงษ์เจริญ  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันท์ทิพ ลิ้มเพียรชอบ  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรี คิยะบุญชัย  
นางสาววราภรณ์ แก้วคอน

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน..... - 3 ส.ค. 2554
เลขทะเบียน..... 1560 248 8
เลขเรียกหนังสือ..... 09

554  
67448  
1551

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร  
: ส่วนงบประมาณรายได้ คณะแพทยศาสตร์  
ประจำปีงบประมาณ 2551

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร :ส่วนงบประมาณ  
รายได้คณะแพทยศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2551 สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ กลุ่มวิชา  
แพทยศาสตร์



**บทคัดย่อมหาวิทยาลัยนเรศวร****ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย**

**ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ผลของอาหารเสริมจากเส้นใยธรรมชาติซิริซินต่อการป้องกันมะเร็ง  
ลำไส้ใหญ่**

(ภาษาอังกฤษ) The effect of sericin on prevention of colon cancer.

คณะผู้วิจัย และสัดส่วนที่ทำงาน (%)

**1. หัวหน้าโครงการ (30%)**

ชื่อ-สกุล นางสุธาทิพย์ พงษ์เจริญ

คุณวุฒิ พบ., PhD (Immunology)

ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์

หน่วยงาน ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 0 5596 5053, โทรสาร 0 5596 1923

E-mail: sutatipwp@yahoo.co.uk ; sutatipp@nu.ac.th

**2. ผู้ร่วมวิจัย (30%)**

ชื่อ-สกุล นางสาวนันทิทิพย์ ลิ้มเพ็ชรขอบ

คุณวุฒิ PhD (Pharmacology and Toxicology)

ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์

หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 055-261000-4 ต่อ 3621

E-mail: nanteetipl@yahoo.com, nanteetipl@nu.ac.th

**3. ชื่อผู้ร่วมวิจัย (10%)**

ชื่อ-สกุล นางสาว วรี ดิยะบุญชัย

คุณวุฒิ PhD (Pharmaceutical Chemistry)

ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์

หน่วยงาน ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 055-261000 ext 3619 โทรสาร 055-261057

E-mail: pphrase@yahoo.com, wareet@nu.ac.th

## 4. ชื่อนิติและผู้ร่วมวิจัย (30%)

ชื่อ-สกุล นางสาววารภรณ์ แก้วคอน

คุณวุฒิ ปริญญาโท

นิสิตปริญญาเอกหลักสูตรเภสัชศาสตร์ หลักสูตรนานาชาติ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000

ได้รับทุนอุดหนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร : ส่วนงบประมาณรายได้คณะแพทยศาสตร์  
ประจำปีงบประมาณ 2551 สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ กลุ่มวิชาแพทยศาสตร์  
จำนวนเงิน 140,000 บาท ใช้จ่ายจริง 140,000 บาท  
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี 5 เดือน ตั้งแต่ 1 พฤษภาคม 2551 ถึง 31 ตุลาคม 2552

## บทคัดย่อ

มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสามของสาเหตุการตายด้วยโรคมะเร็ง  
ในทั่วโลกและจัดเป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่สามารถป้องกันได้ จากรายงานผลการศึกษาเกี่ยวกับมะเร็ง  
ลำไส้ใหญ่พบว่า มะเร็งลำไส้ใหญ่สามารถป้องกันได้โดยอาหารในกลุ่มของผักและผลไม้  
นอกจากนี้ไม่เพียงแต่ผลผลิตที่ได้จากพืชเท่านั้น พบว่าการใช้โปรตีนชิริซินที่แยกได้จากหนอนไหม  
สามารถช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในสัตว์ทดลองได้ ในงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์  
ในการตรวจสอบผลของโปรตีนชิริซินต่อการเพิ่มจำนวนการตายแบบ apoptosis และวัฏจักรของ  
เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยงและเซลล์ปกติลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยง ซึ่งทำการศึกษาโดยใช้วิธี MTT  
assay, annexin-V staining และ caspase-3 assay ส่วนการศึกษาในวัฏจักรของเซลล์ใช้วิธีการ  
วิเคราะห์ผลโดย flow cytometry จากผลการศึกษาพบว่าโปรตีนชิริซินที่ความเข้มข้นสูงสุด (1600  
 $\mu\text{g/ml}$ ) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ทั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ปกติลำไส้ใหญ่  
เพาะเลี้ยงได้ ในด้านการศึกษาผลของโปรตีนชิริซินต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis พบว่า ชิ  
ริซินสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยงตายแบบ apoptosis โดยพบเซลล์ตายใน  
ระยะสุดท้ายของการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นต่างจากเซลล์ในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ  
( $p < 0.05$ ) ในขณะที่เซลล์ปกติลำไส้ใหญ่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการตายทั้งแบบ apoptosis และ  
necrosis ส่วนการศึกษาผลของโปรตีนชิริซินต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 และวัฏจักรของ  
เซลล์ ไม่พบมีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างจากเซลล์ในกลุ่มควบคุมปกติ จากการที่โปรตีนชิริซิน  
สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็ง  
ลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยงได้ อาจจะเป็นผลมาจากคุณสมบัติของโปรตีนชิริซินที่สามารถยับยั้งการเจริญ

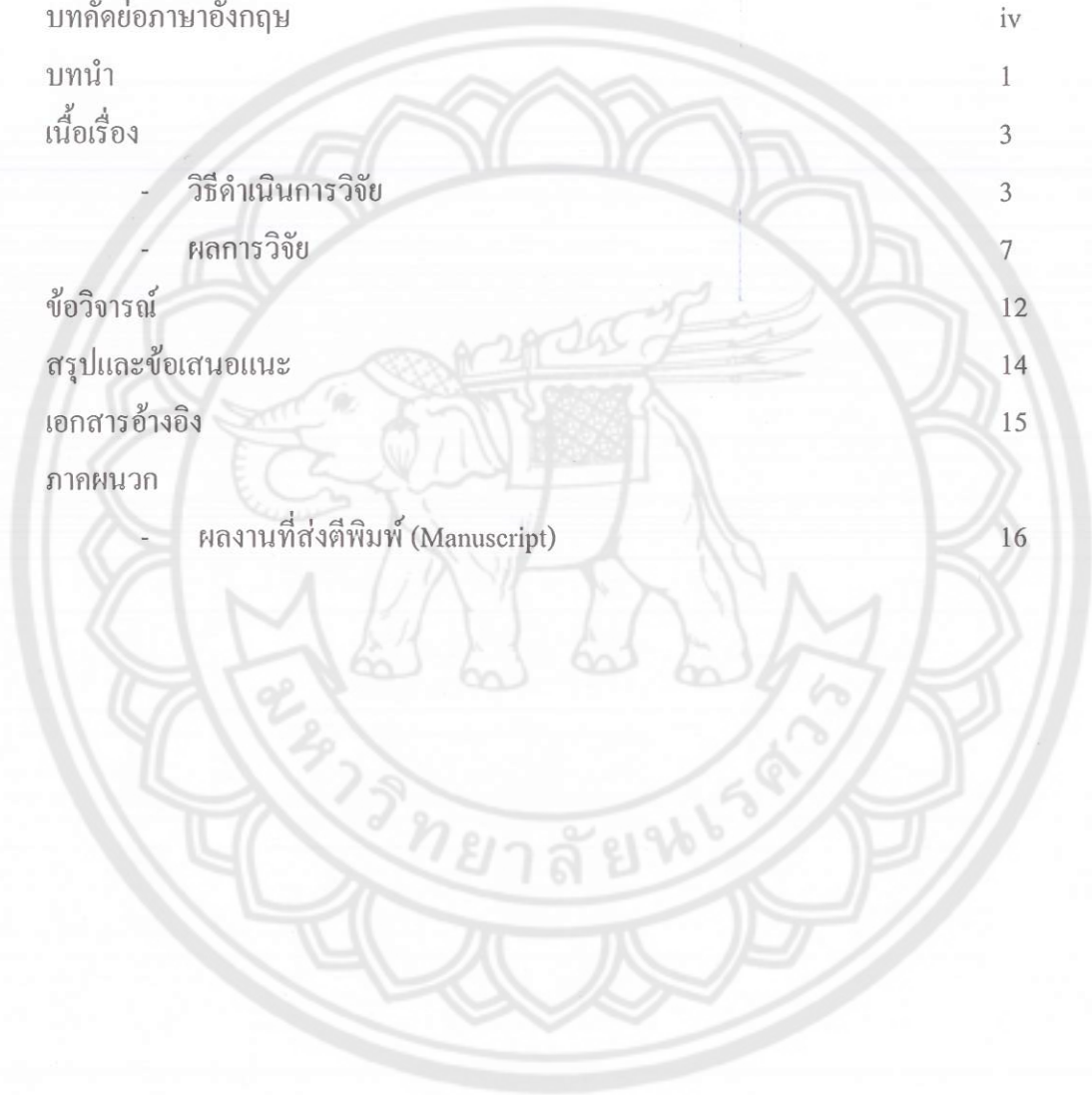
ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญของสารต้านมะเร็งที่สามารถใช้ใน  
แนวทางป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ ส่วนการศึกษาในสัตว์ทดลองยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม  
เพื่อค้นหากลไกในการ ออกฤทธิ์ของโปรตีนซีรีซินในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ต่อไป

### Abstract

Colon cancer is the third most common cause of cancer-related death in the world and one of cancer that can be prevented. The protective effects of diet rich in vegetables and fruits had been reported the effect to against the development of colon cancer. Not only plant products, silk sericin has been reported to prevent colon cancer in animal experiments. The present research was aimed at investigating the effects of silk sericin on the proliferation, apoptosis, and cell cycle of human colorectal cancer SW480 and normal colonic mucosal FHC cells. These were studied using the MTT assay, annexin-V staining and caspase-3 assays, as well as flow cytometric analyses. The results showed that sericin at high concentration (1600 µg/ml) inhibited SW480 and FHC cell proliferation. SW480 cells significantly increased late apoptotic cells ( $p < 0.05$ ), while there was no change in apoptosis and necrosis of FHC cells. There was no difference in caspase-3 activity and the cell cycle between sericin-treated and control cells. Thus, sericin can inhibit colon cancer cell proliferation and induce cell apoptosis, which may contribute to its chemopreventive effect. Experiments in animal model are needed to gain more understandings about mechanism of action of sericin.

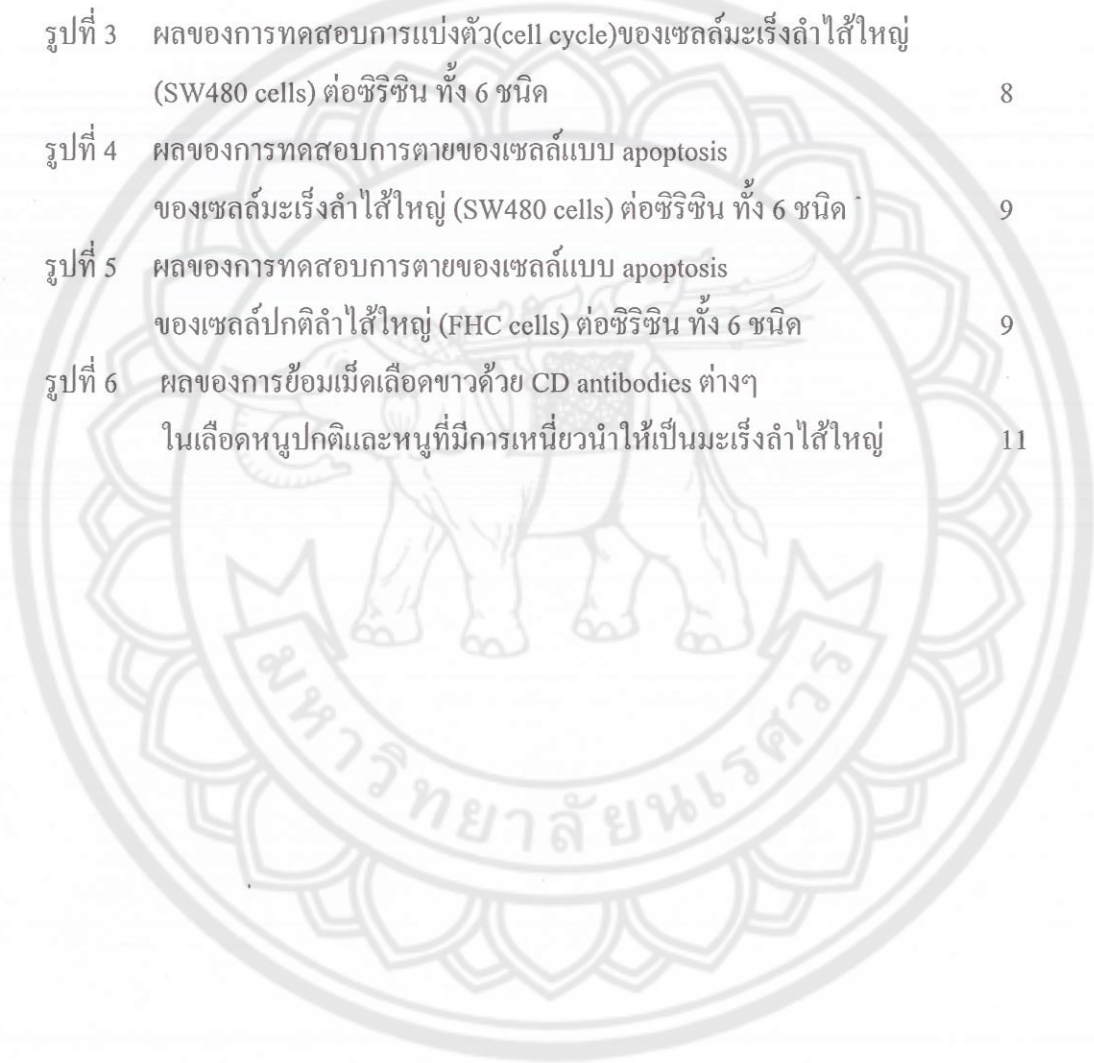
## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
บทนำ	1
เนื้อเรื่อง	3
- วิธีดำเนินการวิจัย	3
- ผลการวิจัย	7
ข้อวิจารณ์	12
สรุปและข้อเสนอแนะ	14
เอกสารอ้างอิง	15
ภาคผนวก	
- ผลงานที่ส่งตีพิมพ์ (Manuscript)	16



## สารบัญญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงกลุ่มของหนูที่ทำการทดลองทั้ง 5 กลุ่ม	6
รูปที่ 2 ผลของการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW480 cells) และเซลล์ปกติลำไส้ใหญ่(FHC cells) ต่อซิริซิน ทั้ง 6 ชนิด	7
รูปที่ 3 ผลของการทดสอบการแบ่งตัว(cell cycle)ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW480 cells) ต่อซิริซิน ทั้ง 6 ชนิด	8
รูปที่ 4 ผลของการทดสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW480 cells) ต่อซิริซิน ทั้ง 6 ชนิด	9
รูปที่ 5 ผลของการทดสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของเซลล์ปกติลำไส้ใหญ่ (FHC cells) ต่อซิริซิน ทั้ง 6 ชนิด	9
รูปที่ 6 ผลของการย้อมเม็ดเลือดขาวด้วย CD antibodies ต่างๆ ในเลือดหนูปกติและหนูที่มีการเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่	11



## บทนำ

มะเร็งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทยด้วยเช่นกัน จากฐานข้อมูลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบว่ามะเร็งลำไส้ใหญ่พบมากเป็นอันดับ 3 รองจากมะเร็งตับและปอดในเพศชาย และพบเป็นอันดับ 5 รองจากมะเร็งปากมดลูก ตับ เต้านมและปอดในเพศหญิง จากข้อมูลที่นักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษามาเป็นระยะเวลาอันยาวนานทำให้ทราบว่าอาหารเป็นสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังอาจมีสาเหตุจากปัจจัยทางพันธุกรรม สิ่งแวดล้อม และพฤติกรรมการรับประทานอาหารเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย โดยพบว่าการรับประทานอาหารประเภทเนื้อสัตว์และไขมันในปริมาณสูงหรืออาหารที่มีเส้นใยน้อย จะมีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ค่อนข้างสูง ส่วนการรับประทานอาหารที่มาจากพืชรวมทั้งการรักษาน้ำหนักที่เหมาะสมและมีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอจะทำให้ร่างกายสามารถต่อต้านโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหาร วิตามินในพืชสามารถทำให้ร่างกายซ่อมแซมเซลล์ได้ดี ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และยังทำลายสารที่จะก่อให้เกิดมะเร็งได้ ดังนั้น 90% ของการเกิดมะเร็งชนิดนี้จึงสามารถป้องกันได้ โดยการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการรับประทานอาหารหรือทานอาหารเสริมที่สามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ ในด้านความสัมพันธ์ระหว่างการรับประทานอาหารที่มีเส้นใยสูง (dietary fiber) กับการลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ จากการศึกษาต่างๆ มีความขัดแย้งกันและยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดถึงบทบาทการป้องกันมะเร็งลำไส้ของอาหารที่มีเส้นใยสูง (Ferguson, 2005) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาจำนวนมากที่พยายามค้นหาวิธีการป้องกันมะเร็งลำไส้จากการทานอาหารเสริมชนิดต่างๆ เช่น การศึกษากรดไขมันไม่อิ่มตัว (n-3 polyunsaturated fatty acids) ในน้ำมันปลาพบว่า สามารถป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ได้ในสัตว์ทดลอง (Roynette et al., 2004) การเสริมวิตามินดีและแคลเซียมก็พบว่าช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ได้ (Gross, 2005) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าวิตามินอีช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ได้เช่นกัน ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (free radicals) ภายในลำไส้ (Campbell et al., 2003)

ดังนั้น การใช้โปรตีนชิริซินที่แยกได้จากหนอนไหมซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีคุณสมบัติในการทนกรดใกล้เคียงกับสถานะในลำไส้ได้ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำชิริซินมาใช้เป็นอาหารเสริมซึ่งออกฤทธิ์โดยตรงที่ส่วนของลำไส้เพื่อช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ และมีเพียงข้อมูลบางส่วนที่ศึกษาในสัตว์ทดลองที่พบว่ามีความปลอดภัยในการรับประทาน แต่ยังไม่มีการรายงานการศึกษาผลชิริซินโดยตรงใน *in vitro* ดังนั้นการศึกษาผลของชิริซินใน *in vitro* จึงเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญในการพัฒนาชิริซินให้เป็นอาหารเสริมเพื่อป้องกันหรือลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของอุตสาหกรรมการเลี้ยงไหมด้วย



## วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาผลและกลไกของซีรีซินในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้เพาะเลี้ยง (human colon cancer cell line) เพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประกอบกับการศึกษาในสัตว์ทดลองเพื่อพัฒนาซีรีซินให้เป็นอาหารเสริมในเชิงป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่

## ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาผลและกลไกของซีรีซินในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในลำไส้เพาะเลี้ยง โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์ลำไส้ปกติ จากนั้นทดสอบการมีชีวิต การแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยง วัฏจักรของเซลล์ การตายของเซลล์ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตายของเซลล์ มะเร็งลำไส้และเซลล์ลำไส้ปกติ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่มีซีรีซินในความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ กัน รวมทั้งผลของซีรีซินในการต้านเซลล์มะเร็งที่เกี่ยวข้องกับการต้านการเกิด oxidative stress ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะนำไปประกอบกับการศึกษาผลของซีรีซินในสัตว์ทดลอง เพื่อพัฒนาซีรีซินให้เป็นอาหารเสริมในเชิงป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ต่อไป และเพื่อการตีพิมพ์ผลการวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้

## วิธีดำเนินการวิจัย

### ตารางสรุปการดำเนินการวิจัยและผลที่ได้รับ

วิธีการดำเนินการวิจัย	ผลที่ได้รับ
<p><b>1. การทดสอบในเซลล์มะเร็งลำไส้เพาะเลี้ยง</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเพื่อใช้ทดสอบกับฤทธิ์ของซีรีซินตามขนาดโมเลกุล</li> <li>- ทดสอบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ (cell viability)</li> <li>- ทดสอบการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ (cell cycle)</li> <li>- ทดสอบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ</li> <li>- ทดสอบการเกิด lipid peroxidation</li> </ul>	<p>ได้ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยซีรีซิน A, B และ L ที่ความเข้มข้นสูง ทำให้เซลล์มีร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลดลง แต่ไม่มีผลต่อความแตกต่างของ cell cycle พบว่าซีรีซิน B, C และ M ทำให้เซลล์มะเร็งมีการตายแบบ apoptosis เพิ่มมากขึ้น</p>
<p><b>2. การทดสอบในสัตว์ทดลอง</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- การเตรียมสัตว์ทดลองเพื่อชักนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (preliminary experiment)</li> <li>- ทดสอบผลของซีรีซินต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยการเชื่อมด้วย cell surface molecules และวิเคราะห์ผลโดยใช้ Flow cytometer</li> </ul>	<p>สามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่าซีรีซินทำให้สัตว์ทดลองที่เป็นมะเร็งลำไส้ มีปริมาณเซลล์ที่เป็น CD3+ T cell เพิ่มขึ้น และมีเซลล์ที่เป็น CD25+ activated leukocyte เพิ่มมากขึ้น แต่พบว่า มีปริมาณ cytotoxic T cell และ NK cell ลดลงในกลุ่มสัตว์ทดลองเหล่านี้</p>

### 1. การทดสอบในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ปกติ

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ SW480 human colon cancer cell (ATCC CCL-228) และ FHC normal fetal human colon cell (ATCC CRL-1831)

### 1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ

เลี้ยงเซลล์ SW480 ในขวดเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 ที่มี 10% FBS และ 1% antibiotics ในตู้เลี้ยงเซลล์ CO<sub>2</sub>- incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C และมี 5% CO<sub>2</sub> หลังจากเซลล์เพิ่มจำนวนจนเกือบเต็มพื้นที่ของขวดเลี้ยงเซลล์ (95% confluent) จึงทำการ subculture ด้วย 0.25% Trypsin-EDTA ในทุกๆ 3 – 4 วัน และจะเริ่มนับเป็น passage ที่ 1 และเริ่มแบ่งเก็บเซลล์แช่แข็ง (freeze cell) เมื่อเซลล์อยู่ใน passage ที่ 5 ซึ่งเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้จะเริ่มใช้ในช่วงของ passage ที่ 10 – 20 ในการเลี้ยงเซลล์ FHC จะทำการเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 ที่มี 10% FBS และ 1% antibiotics แต่เนื่องจากเป็นเซลล์ปกติจึงมีการเติม Cholera toxin, HEPES buffer, Insulin, Hydrocortisone และ Transferrin ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น จากนั้นจึงเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ CO<sub>2</sub>- incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C และมี 5% CO<sub>2</sub> รวมทั้งมีการ subculture และ freeze cell เช่นเดียวกับเซลล์ SW480 และเริ่มต้นทดลองเมื่อเซลล์อยู่ใน passage ที่ 10 – 20 เช่นเดียวกัน

### 1.2 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์

การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถวัดด้วยวิธี MTT assay [3-(3,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetra-zolium bromide), MTT] โดยเลี้ยงเซลล์จำนวน  $1 \times 10^4$  เซลล์/ well ใน 96-well cell culture plate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 + 10% FBS + 1% antibiotics ที่มีซิริซินลงไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของซิริซินเท่ากับ 25, 50, 100, 200, 400, 800 และ 1,600 µg/ml ซึ่งละลายใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 และใช้ PBS เป็นกลุ่มควบคุม และนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในตู้ CO<sub>2</sub> – incubator เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10 µl ของ MTT (5 mg/ml ใน PBS) ใน 2 ชั่วโมงก่อนสิ้นสุดการทดสอบ และนำเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติม 200 µl DMSO : EtOH (1:1) และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วย ELISA reader

### 1.3 การทดสอบการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ (cell cycle)

การทดสอบการแบ่งตัวของเซลล์ทั้งสองชนิดโดยใช้ flow cytometry ซึ่งจะเลี้ยงเซลล์จำนวน  $1 \times 10^6$  เซลล์ใน 60 mm culture dish เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มี 1% FBS เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์พักอยู่ในระยะเดียวกัน (cell synchronization) คือ ระยะ G0/G1 และเริ่มทำการทดสอบ cell cycle โดยเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มี 10% FBS + 1% antibiotics และเติมซิริซินที่ความเข้มข้น 1,600 µg/ml หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์โดยการ trypsinization ล้างเซลล์ด้วย PBS pH 7.4 แล้ว fix ด้วย 70% ice-cold ethanol เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จึงปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS pH 7.4

จากนั้นนำเซลล์มาย้อมด้วย propidium iodide (PI) (25  $\mu\text{g/ml}$  PI ใน PBS + 200  $\mu\text{g/ml}$  RNase A + 0.1% triton X-100) ที่ 37 °C นาน 30 นาที จากนั้นจึงวิเคราะห์ cell cycle ด้วย CellQuestPro software (FACS Calibur, BD Biosciences)

#### 1.4 การทดสอบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ

การตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ทั้งสองชนิดทำโดยใช้ Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences) ซึ่งในการทดลองจะทำการเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดด้วยอาหารที่มี ซีรีซินความเข้มข้น 1,600  $\mu\text{g/ml}$  เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นจึงล้างเซลล์ด้วย PBS และกระจายเซลล์ใน 1x binding buffer และนำเซลล์มาย้อมด้วย Annexin V-FITC และ Propidium Iodide (PI) และนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer จากนั้นจึงทำการแปลผลโดยใช้โปรแกรม CellQuestPro software (FACS Calibur, BD Biosciences)

### 2. การเตรียมสัตว์ทดลองเพื่อชักนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

#### 2.1 การเลี้ยงสัตว์ทดลอง

หนูขาวใหญ่ (rat) 30 ตัว สายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 5 – 8 สัปดาห์ (จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา) ทำการเลี้ยงเพื่อปรับสภาพสัตว์ทดลองเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์โดยให้อาหารปกติ (จากบริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์, CP) ภายใต้ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่มีอุณหภูมิ  $24 \pm 2$  °C และมีความชื้นประมาณ  $50 \pm 10\%$  และมีการควบคุมการปิด-เปิดไฟเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง อย่างสม่ำเสมอ

#### 2.2 การเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่

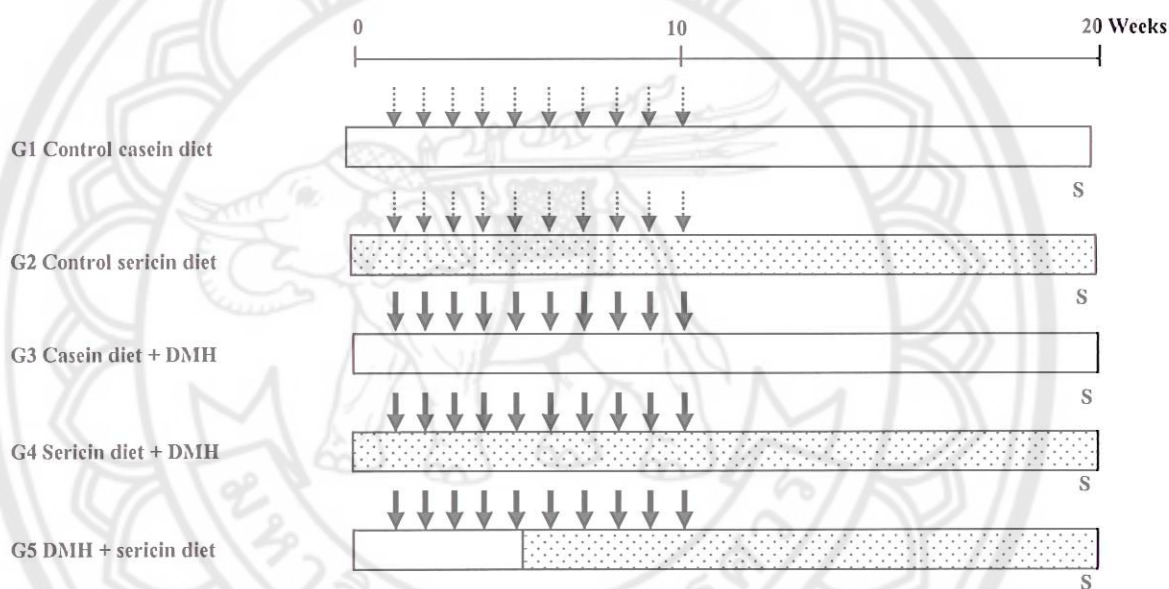
หลังจากปรับสภาพหนูทดลองเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ จึงแบ่งกลุ่มหนูทดลอง เป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว (ภาพ 1) โดยกลุ่ม 1 และ 2 เป็นกลุ่มควบคุมจะได้รับ 1 mM EDTA pH6.5 ส่วนกลุ่ม 3, 4 และ 5 จะทำการเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยสาร 1,2-Dimethylhydrazine (DMH) ขนาด 20 mg/kg body weight เข้าใต้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงเลี้ยงหนูทดลองอีกประมาณ 10 สัปดาห์จึงทำการผ่าตัดเพื่อเก็บตัวอย่างของลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองเพื่อนำไปตรวจสอบการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

#### 2.3 การตรวจสอบการเป็นมะเร็ง

นำตัวอย่างของลำไส้ใหญ่ที่เก็บได้มาล้างด้วย PBS pH 7.4 ที่เย็น และจากนั้นจึงทำการแบ่งลำไส้ใหญ่ออกเป็น 3 ส่วน คือส่วนต้นที่ติดกับลำไส้เล็ก (proximal) ส่วนกลาง (mid) และส่วนท้ายที่ติดกับลำไส้ตรง (distal) จากนั้นจึงตรึงลำไส้ให้แผ่ออกด้วยกระดาษและจึงนำไปแช่ใน 10% neutral formalin buffer เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง จึงนำย้อมด้วย 0.2% methylene blue และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ crypt (aberrant crypt foci; ACF) ซึ่งเป็น marker ของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

## 2.4 การทดสอบผลของซีรีซินต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในเลือดของหนูทดลอง

หลังจากทำการผ่าหนูทดลองเพื่อเก็บตัวอย่างของลำไส้ใหญ่มาศึกษาการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ และขณะเดียวกันได้เก็บเลือดจากหัวใจเพื่อมาชั่งมวลสถานะของเม็ดเลือดขาวหนูที่มีการกระตุ้นให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และเปรียบเทียบกับหนูปกติ ด้วย CD antibodies และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Flow cytometer ซึ่งขั้นตอนในการชั่งเซลล์เม็ดเลือดขาว มีขั้นตอนดังนี้ นำเลือดปริมาณ 50 มล. มาทำการ lysis เม็ดเลือดแดงด้วย lysis buffer และย้อมด้วย CD ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทั้ง 10 ชนิด ประกอบด้วย CD2, CD3, CD4, CD8a, CD11a, CD25, CD45, CD54, CD80 และ CD86 จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม CellQuestPro software (FACS Calibur, BD Biosciences)



### หมายเหตุ

- G1 Control casein diet : กินอาหารที่มี 4% casein
- G2 Control sericin diet : กินอาหารที่มี 4% sericin
- G3 casein + DMH : กินอาหารที่มี 4% casein และฉีด DMH 20 mg/kg ใต้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 สัปดาห์
- G4 sericin + DMH : กินอาหารที่มี 4% sericin และฉีด DMH 20 mg/kg ใต้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 สัปดาห์
- G5 casein + DMH + sericin : กินอาหารที่มี 4% casein และฉีด DMH 20 mg/kg ใต้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 5 หลังฉีด DMH จะเปลี่ยนเป็นอาหารที่มี 4% sericin

S : Sacrifice

⋮ : S.C. injection of 1 mM EDTA pH 6.5 (vehicle)

↓ : S.C. injection of DMH 20 mg/kg b.w.

รูป 1 แสดงกลุ่มของหนูที่ทำการทดลองทั้ง 5 กลุ่ม

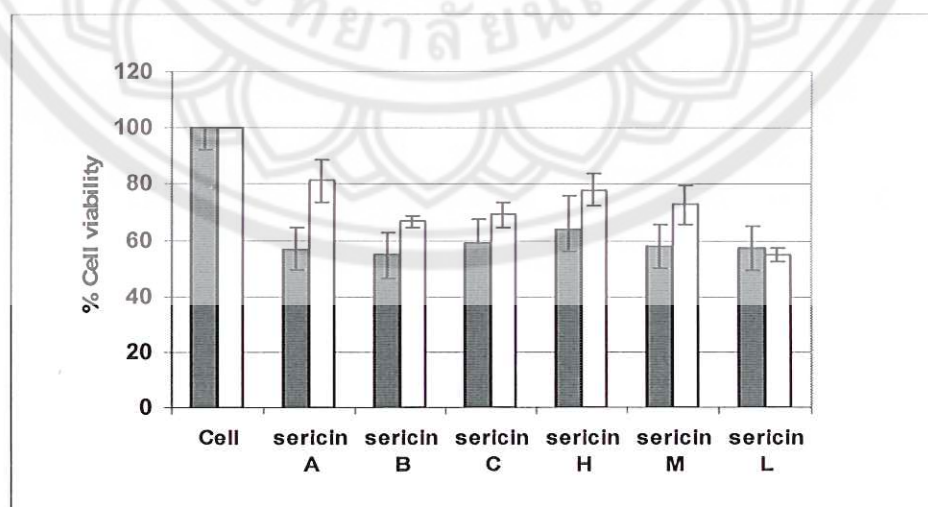
## ผลที่ได้รับจากการวิจัย

### 1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติในระยะเวลา 6 เดือนแรก สามารถเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดให้มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ นอกจากนี้สามารถเก็บเซลล์ในรูปของเซลล์แช่แข็งเพื่อใช้เป็นเซลล์สำรองในตลอดการทดลองได้

### 1.2 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์

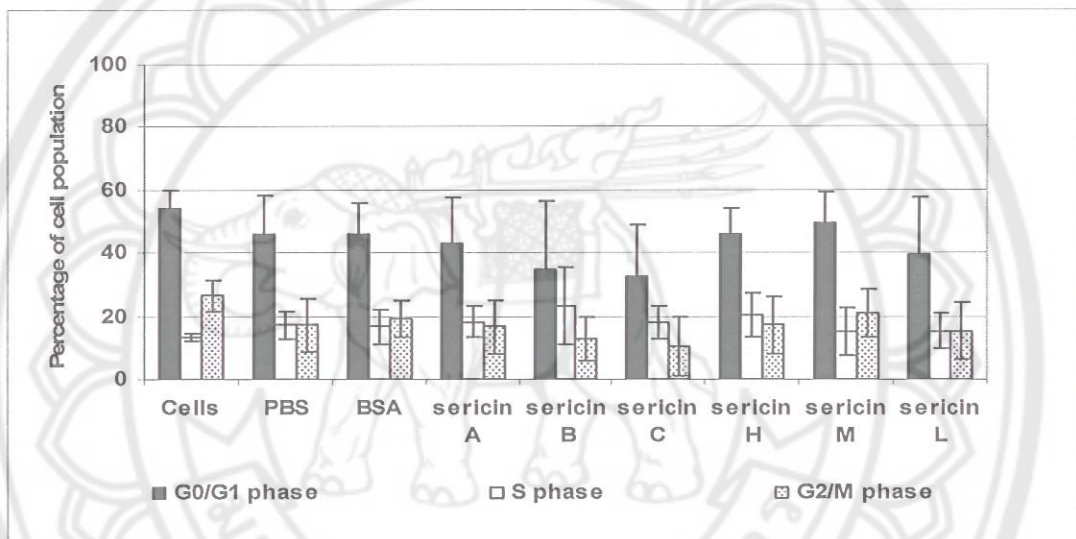
การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW480 cells) และเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ (FHC cells) โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 +10% FBS ที่มีซีริซินที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400, 800 และ 1,600  $\mu\text{g/ml}$  เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้ซีริซินในการทดสอบทั้งหมด 6 ชนิด คือ A (191-339 kDa), B (76-132 kDa), C (61-113 kDa), L (1-30 kDa), M (30-300 kDa) และ H (>300 kDa) และจำนวนเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่เติมซีริซิน (เติม PBS pH7.4) จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซีริซินและระยะเวลาที่ทำการทดสอบในเซลล์ทั้งสองชนิด โดยพบว่า เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ทั้งสองชนิดลดลง โดยที่ความเข้มข้นของซีริซิน 1,600  $\mu\text{g/ml}$  และระยะเวลา 72 ชั่วโมงเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจน (รูป 2) ซีริซิน A, B และ L ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์มะเร็ง SW480 ลดลงเท่ากับ 43.30%, 45.04% and 42.90% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนในเซลล์ปกติ พบว่าซีริซิน A, B, C, H และ M มีผลต่อการลดลงของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเช่นกัน (18-33%) ยกเว้นในซีริซิน L ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ลดลงทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งใกล้เคียงกัน



รูป 2 ผลของการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW480 cells) และเซลล์ปกติลำไส้ใหญ่ (FHC cells) ต่อซีริซินทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 1600  $\mu\text{g/ml}$  ระยะเวลา 72 ชั่วโมง (กราฟแท่งสีดำแสดงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW480 cells) และกราฟแท่งสีขาวแสดงเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ (FHC cells); Mean  $\pm$  SEM)

### 1.3 การทดสอบการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ (Cell cycle)

การทดสอบการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cells และเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ (FHC cells) โดยใช้ Flow cytometer จะทำการเลี้ยงเซลล์จำนวน  $1 \times 10^6$  เซลล์ใน 60-mm culture dish เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มี 1% FBS เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์พักอยู่ในระยะเดียวกัน (cell synchronization) และเริ่มทำการทดสอบ cell cycle โดยเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มี 10% FBS และเติมซิริซินทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 1,600  $\mu\text{g/ml}$  ระยะเวลา 72 ชั่วโมง และนำมาทดสอบ cell cycle พบว่า ไม่มีความแตกต่างใน ระยะต่างของ cell cycle ของเซลล์ SW480 (รูป 3) เช่นเดียวกับการทดสอบในเซลล์ FHC



รูป 3 ผลของการทดสอบการแบ่งตัว (cell cycle) ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW480 cells) ต่อซิริซินทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 1,600  $\mu\text{g/ml}$  ระยะเวลา 72 ชั่วโมง (กราฟแท่งสีดำแสดงระยะ G0/G1 phase, กราฟแท่งสีขาวแสดงระยะ S phase และกราฟแท่งสีขาลายจุดแสดงระยะ G2/M phase; Mean  $\pm$  SEM)

### 1.4 การทดสอบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ

การทดสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cells และเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ FHC cells โดยใช้ Flow cytometer จะทำการเลี้ยงเซลล์จำนวน  $1 \times 10^6$  เซลล์ใน 60-mm culture dish เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มี 10% FBS จากนั้นเติมซิริซินทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 1,600  $\mu\text{g/ml}$  ระยะเวลา 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า ซิริซิน B, C และ M ชักนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cells ตายแบบ apoptosis เพิ่มมากขึ้น โดยจะเห็นได้ว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ตายนั้นอยู่ในระยะ late apoptosis (10.83%, 10.96% และ 12.12% ตามลำดับ) ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ SW480 ที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มี 10% FBS อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (รูป 4) ซึ่งในการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์แบบ

ว ดพ  
551  
ลำปาง  
2551

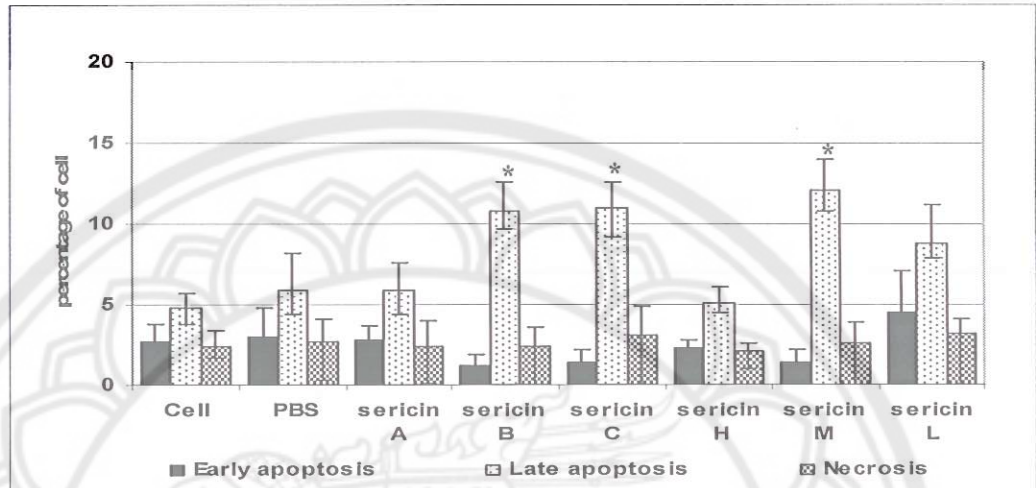
15602488



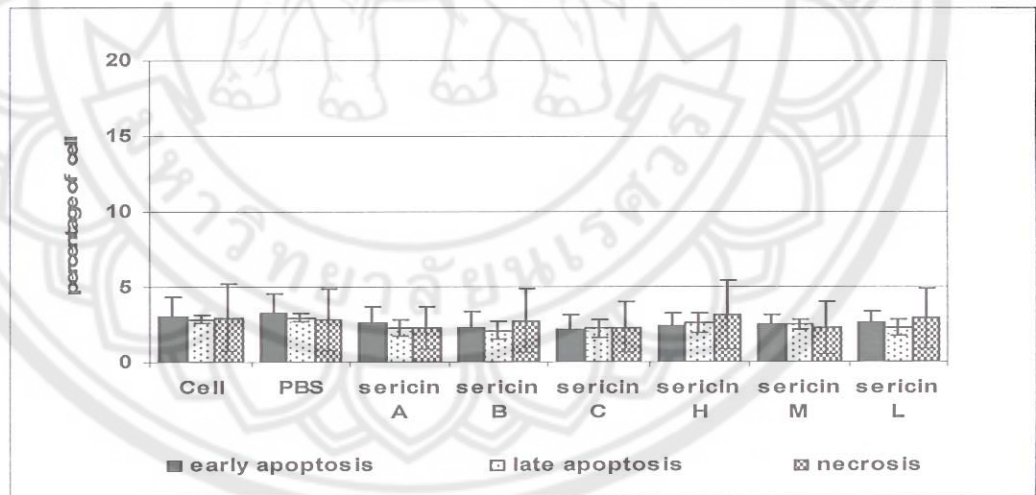
necrosis ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 2-3% และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ SW480 ที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มี 10% FBS ส่วนผลการทดสอบในเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ FHC พบว่าซิริซินทั้ง 6 ชนิดไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ทั้งแบบ apoptosis และ necrosis เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มี 10% FBS (รูป 5)

สำนักหอสมุด

3 ส.ค. 2554



รูป 4 ผลของการทดสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW480 cells) ต่อซิริซินทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1600  $\mu\text{g/ml}$  ระยะเวลา 72 ชั่วโมง (กราฟแท่งสีดำแสดง เซลล์ตายในระยะ early apoptosis, กราฟแท่งสีขาวลายจุด แสดง เซลล์ตาย ระยะ late apoptosis และกราฟแท่งสีขาวลายสี่เหลี่ยม แสดง เซลล์ตายแบบ necrosis; Mean  $\pm$  SEM)



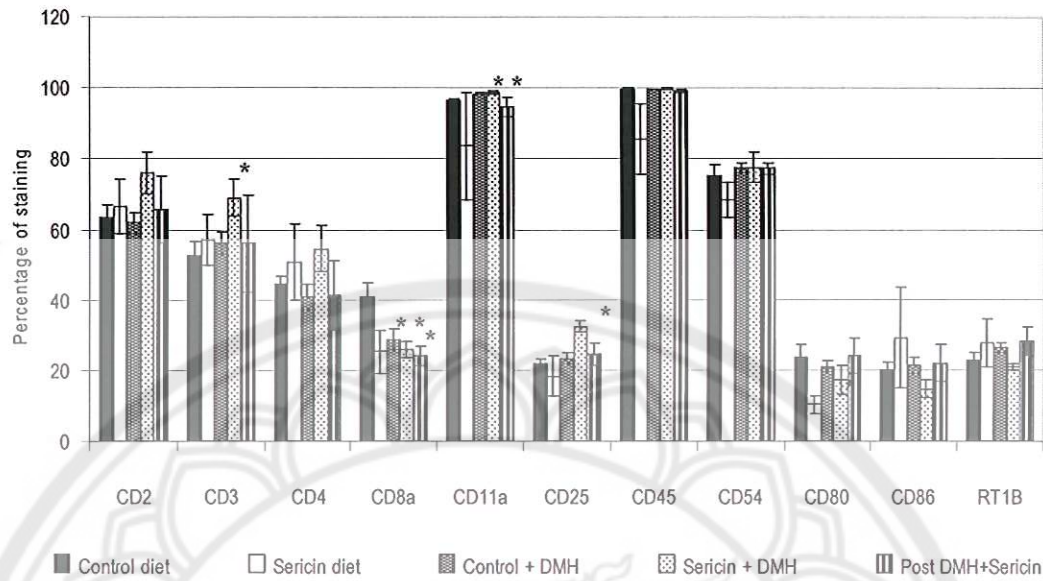
รูป 5 ผลของการทดสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของเซลล์ปกติลำไส้ใหญ่ (FHC cells) ต่อการซิริซินทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1600  $\mu\text{g/ml}$  ระยะเวลา 72 ชั่วโมง (กราฟแท่งสีดำแสดง เซลล์ตายในระยะ early apoptosis, กราฟแท่งสีขาวลายจุด แสดง เซลล์ตาย ระยะ late apoptosis และกราฟแท่งสีขาวลายสี่เหลี่ยม แสดง เซลล์ตายแบบ necrosis; Mean  $\pm$  SEM)



### 1.5 การทดสอบผลของซีรีซินต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในเลือดของหนูทดลอง

เมื่อนำเลือดที่เก็บได้จากหัวใจในหนูทดลองมาข้อมูสภาวะของเม็ดเลือดขาวหนู ด้วยการข้อมด้วย CD antibodies ทั้ง 10 ชนิด คือ CD2, CD3, CD4, CD8a, CD11a, CD25, CD45, CD54, CD80 และ CD86 จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Flow cytometer พบว่า ในหนูทดลองที่กินอาหารที่มี 4% sericin และได้รับ DMH 20 mg/kg มีการติด CD3 ซึ่งเป็น marker ของ T cell เฉลี่ยประมาณ 69.05% ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ที่ข้อมติดเพิ่มขึ้นและแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่กินอาหารที่มี 4% casein อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ส่วนใน CD11a ซึ่งเป็น marker ของ adhesion molecule ที่ช่วยในการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด โดยจะข้อมติดทุกเซลล์ที่เป็นเม็ดเลือดขาว ที่พบในกลุ่มที่ได้รับ DMH และกินอาหารที่มี 4% casein และ 4% sericin โดยมีค่าเพิ่มขึ้นต่างจากกลุ่มควบคุมที่กินอาหารที่มี 4% casein (96.37%) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยประมาณ 98.32% และ 98.74% และนอกจากนี้ยังพบว่า มีการติด CD25 ซึ่งข้อมติดใน T cell ที่ได้รับการกระตุ้นเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มที่กินอาหารที่มี 4% sericin (32.31%) ต่างจากกลุ่มควบคุมที่กินอาหารที่มี 4% casein (23.18%) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

ส่วนในเชิงมีการกระตุ้นที่ลดลง ภายหลังการข้อม CD ต่างๆ พบว่า การติด CD8a ซึ่งเป็น marker ของ cytotoxic T cells และ NK cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่ช่วยในการกำจัดเซลล์มะเร็งในร่างกาย พบว่า หนูในกลุ่มควบคุมที่กินอาหารที่มี 4% sericin, กลุ่มที่กินอาหารที่มี 4% casein และ 4% sericin และได้รับ DMH 20 mg/kg มีค่าเฉลี่ยของ NK cell น้อยลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่กินอาหารที่มี 4% casein (40.73%) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยประมาณ 25.25, 28.60 และ 25.72% ตามลำดับ และการติด CD80 ที่เป็น marker ของ monocyte, dendritic cell และ B cell น้อยลงในกลุ่มที่กินอาหารที่มี 4% sericin (10.28%) ต่างจากกลุ่มควบคุมที่กินอาหารที่มี 4% casein (23.55%) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (รูป 6)



รูป 6 ผลของการย้อมเม็ดเลือดขาวด้วย CD antibodies ต่างและวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Flow cytometry ในเลือดหนูปกติ และหนูที่มีการเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ในการทดสอบเบื้องต้น; กราฟแท่งสีดำ แสดง กลุ่มควบคุมกินอาหารที่มี 4% casein, กราฟแท่งสีขาว แสดง กลุ่มที่กินอาหารที่มี 4% sericin, กราฟแท่งสีดำลายจุดเข้ม แสดง กลุ่มที่กินอาหารที่มี 4% casein และเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่, กราฟแท่งสีดำลายจุดจาง แสดง กลุ่มที่กินอาหารที่มี 4% sericin และเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ และ กราฟแท่งลายทาง แสดง กลุ่มที่กินอาหารที่มี 4% sericin หลังจากเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ ระยะเวลา 5 สัปดาห์, Mean  $\pm$  SEM; n:5, P<0.05)

## ข้อวิจารณ์

ในการศึกษานี้ ได้ทำการศึกษาผลของชิรินในเซลล์ลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยง โดยผลการศึกษาของชิรินต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่า ความเข้มข้นสูงสุดของชิรินที่ใช้ในการศึกษานี้ (1600  $\mu\text{g/ml}$ ) ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง ชิรินที่มีขนาดกลางถึงขนาดเล็ก สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติของลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยงได้ ซึ่งผลที่พบจากการศึกษานี้ ทำให้เกิดความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของชิรินในเซลล์เพาะเลี้ยงเพิ่มเติม

การที่ชิรินมีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์นั้นมีกลไกที่คาดว่าเกี่ยวข้องกัน สองกลไก คือ ชิรินอาจจะมีผลต่อการหยุดการทำงานของวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) หรือชิรินอาจจะมีผลในทางเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงมีการตายแบบ apoptosis ซึ่งเราได้เริ่มต้นการศึกษาผลของชิรินต่อวัฏจักรของเซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้ความเข้มข้นของชิรินที่ 1600  $\mu\text{g/ml}$  ในระยะเวลา 72 ชั่วโมงเช่นเดียวกับในการการศึกษาค้นคว้าของชิรินต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยในการศึกษาจะใช้การย้อมเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยงด้วยสารเรืองแสง propidium iodide ที่สามารถจับได้กับ DNA ของเซลล์และดูการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ DNA จากนั้นจึงวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง flow cytometer จากการศึกษาค้นคว้า พบว่า ชิรินไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระยะต่างๆของวัฏจักรของเซลล์ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมปกติอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามชิรินที่มีขนาดกลางถึงขนาดเล็กมีแนวโน้มที่ลดจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะพักและเพิ่มจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะที่มีการสังเคราะห์ DNA เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะชิรินไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนบางตัวที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของวัฏจักรเซลล์ (Schafer, 1998) ทำให้พบว่า มีจำนวนเซลล์ที่ลดลงในระยะพักและไปเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่อยู่ในระยะที่มีการสังเคราะห์ DNA เพิ่มขึ้น

เนื่องจากในการศึกษานี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของชิรินต่อ cell cycle ในเซลล์เพาะเลี้ยง ทำให้เราคาดว่าชิรินอาจจะมีผลต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis แล้วส่งผลให้มีการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิด ในการศึกษาการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้เลือกใช้วิธีการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยชุดทดสอบสำเร็จ annexin-V assay kit และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง flow cytometer ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาพบว่า ชิรินขนาดกลางและขนาดเล็กมีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยง มีการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นโดยมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะสุดท้ายของเซลล์ apoptosis ต่างจากเซลล์ในกลุ่มควบคุมปกติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่เดียวกันไม่พบว่าชิรินมีผลต่อการตายของเซลล์ปกติลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยงทั้งในการตายแบบ apoptosis และแบบเนโครซิสเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมปกติ แสดงให้เห็นว่าชิรินน่าจะมีความจำเพาะในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

## สรุปและข้อเสนอแนะ

การที่ชิริชินสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยงโดยสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบ apoptosis ได้ นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังพบว่าชิริชินไม่มีผลกระทบต่ออัตราการตายของเซลล์ปกติลำไส้ใหญ่ ทำให้การเลือกใช้ชิริชินในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นแนวทางหนึ่งของการพัฒนาชิริชินเป็นอาหารเสริมเพื่อป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่มีความปลอดภัยสูง แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นผลที่ได้จากการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเป็นหลัก ซึ่งควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลองเพื่อทำการยืนยันผลการใช้ชิริชินในรูปอาหารเสริมและเพื่อค้นหาผลข้างเคียงของการกินชิริชินในสัตว์ทดลองและกลไกการออกฤทธิ์ของชิริชินต่อการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่แน่ชัดต่อไป



## เอกสารอ้างอิง

- Campbell S, Stone W, Whaley S, Krishnan K (2003) Development of gamma (gamma)-tocopherol as a colorectal cancer chemopreventive agent. *Crit Rev Oncol Hematol* 47:249-259.
- Donovan M, Cotter TG (2004) Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 1644, 133-47.
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
- Ferguson LR (2005) Does a diet rich in dietary fibre really reduce the risk of colon cancer? *Dig Liver Dis* 37:139-141.
- Gross MD (2005) Vitamin D and calcium in the prevention of prostate and colon cancer: new approaches for the identification of needs. *J Nutr* 135:326-331.
- Martinalet D, Zhu P, Lieberman J (2005) Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22:355-370.
- Roynette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C (2004) n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clinical Nutrition* 23:139-151.
- Schafer KA (1998) The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 35, 461-78.
- Shi Y (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9, 459-70.
- Stennicke HR, Salvesen GS (1998) Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1387, 17-31.



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยนเรศวร

**Manuscript****Title: Effects of sericin on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells**

Authors: Waraporn Kaewkona, Nanteetip Limpeanchoba, Waree Tiyafoonchaib, Manote Sutherawattananondac, and Sutatip Pongcharoend\*

Addresses: aDepartments of Pharmacy Practice and bPharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, cSchool of Food Technology, Institute of agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, and dDepartment of Medicine, Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok 65000 Thailand.

\*Corresponding author: Dr. Sutatip Pongcharoen

Faculty of Medicine, Naresuan University,

Phitsanulok 65000, Thailand

Tel.: +66 55 965053

Fax: +66 55 227137

E-mail: sutatipp@nu.ac.th

Keywords: sericin, colon cancer cell, apoptosis

**Abstract**

Silk sericin has been reported to prevent colon cancer in animal experiments. The present research was aimed to investigate the effects of silk sericin on the proliferation, apoptosis, and cell cycle of human colorectal cancer SW480 and normal colonic mucosal FHC cells. These were studied using the MTT assay, annexin-V staining and caspase-3 assays, as well as cell cycle detection by flow cytometry. The results showed that sericin at high concentration inhibited SW480 and FHC cell proliferation. SW480 cells significantly increased late apoptotic cells, while there was no change in apoptosis and necrosis of FHC cells. There was no difference in caspase-3 activity and cell cycle between sericin-treated and control cells. Thus, sericin can inhibit colon cancer cell proliferation and induce cell apoptosis, which may contribute to its chemopreventive effect.

## Introduction

Colon cancer is one of the most common cancer in both men and women. For the incidence rate of colon cancer in Thailand, it is the third in males after the cancers of liver and lung, and the fifth after the cancer of cervix, breast, liver and lung in females. The estimated incidence rate is 8.8 and 7.6 for males and females per one hundred thousand<sup>1</sup>. Colon cancer commonly occurs sporadically and is inherited in only 5% of cases<sup>2</sup>. Diet is the major important exogenous factor of colon cancer. It has been estimated that 70% of colon cancer could be prevented by nutritional intervention<sup>2</sup>. Both epidemiological and experimental studies have suggested that diet rich in fruits and vegetables can reduce risk of colon cancer<sup>3</sup>. Several studies have shown that some dietary fibers and proteins suppress the development of colon cancer in animal models, leading to improvement of large bowel physiology<sup>4,5</sup>.

The silk protein, sericin, is one of the main constituents of silk fiber (20-30% of total cocoon weight)<sup>6</sup>. Sericin is insoluble in cold water, although it is easily dispersed or solubilised in hot water. Sericin is specifically synthesized in the middle gland of the silk worm, *Bombyx mori*. Recently, sericin has been found to suppress lipid peroxidation and tyrosinase inhibitory activity in an *in vitro* study<sup>7</sup>. In addition to its anti-oxidant activity, sericin appears to exhibit chemopreventive effect by suppressing DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis<sup>8</sup> and colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon cancer in animal models<sup>9,10</sup>. These properties of sericin appear to be similar to other dietary fibers and proteins. However, the exact mechanism for sericin functions in colon cancer prevention is unknown. In this present study, we investigated the effects of sericin on the proliferation, apoptosis and cell cycle of both human colon cancer cell line and normal colon cell lines.

## Materials and Methods

### Preparation of Sericin

Silk sericin was supplied by Institution of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakorn Ratchasima, Thailand. The sericin was classified into 3 types according to isolation techniques; sericin A (MW 191-339 kDa, large size), sericin B (76-132 kDa, medium size) and sericin C (MW 61-113 kDa, small size). Briefly, silk sericin was extracted with



deionized water from raw silk yarns of silkworm *Bombyx mori*, under high pressure and temperature. Specific extraction condition was under Thai patent pending. The extract was later dried at 130°C. Under a sterile condition, dry mass was ground and sieved through 0.75 mm screen and the sericin powder was sealed in plastic bags and kept at room temperature for further use. The sericin was used by reconstituting in phosphate-buffered saline (PBS; Sigma, MO, USA)) and was sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

#### Cell culture

The human colorectal cancer cells (SW480: ATCC number CCL-228) and human fetal normal colonic mucosal cells (FHC: ATCC number CRL-1831) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC: University Boulevard, Manassas, VA, USA). SW480 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with HamF-12 (DMEM/F-12) (Gibco, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco). FHC cells were cultured in DMEM/F-12 with 10% FBS, 25mM N'-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2 ethanesulphonic acid (HEPES) (JRH Biosciences, KS, USA), 5 µg/ml insulin (Sigma), 100 ng/ml hydrocortisone (Sigma), 100 units/ml penicillin (Gibco), and 100 µg/ml streptomycin (Gibco). Both SW480 and FHC cells were cultured in a humidified atmosphere of 95% air, 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

#### Cell viability assay

To examine cell viability, the cells were plated in 96-well plates at a concentration of 1 × 10<sup>4</sup> cells per well with complete culture medium. After an overnight incubation, the cells were exposed to various concentrations (25, 50, 100, 200, 400, 800, and 1600 µg/ml) of each type of sericin for 24, 48 and 72 h. After the indicated treatments, cells were incubated for 2 h with 0.5 mg/ml of MTT solution (Sigma) and were lysed with DMSO:ethanol (1:1) (Sigma). The absorbance was read at 595 nm using a micro-plate reader (Beckman Coulter, NSW, Australia).

#### Cell apoptosis assay

Apoptosis was detected with an annexin V-FITC kit (Becton Dickinson, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. Initially, the cells were plated in 60-mm Petri dish at a concentration of 1×10<sup>6</sup> cells per dish with complete culture medium. After an overnight

incubation, the cells were treated with each type of sericin at a concentration of 1600  $\mu\text{g/ml}$  for 72 h. This high concentration was chosen because it gave the optimal result on cell viability. After treatment, the cells were collected, washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 and centrifuged. The cells were then resuspended in 1X binding buffer and were stained with annexin V-FITC with propidium iodide (PI) solution added. They were incubated for 15 min in the dark before being analyzed by FACSCalibur using CellQuestPro software (Becton Dickinson).

#### Caspase-3 activity assay

The cells were plated in 60-mm Petri dish at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells per dish with DMEM/F-12 with 10% FBS. After overnight incubation, the culture medium was replaced with new complete medium and then treated with each type of sericin at concentration of 1600  $\mu\text{g/ml}$  for 72 h. Then, the cells were harvested by trypsinization before the detection of caspase-3 activity was determined using CASP3C Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric (Sigma-Aldrich, MO, USA) according to the manufacturer's instruction. The caspase-3 activity was determined by using specific substrate for caspase-3 and measured by micro-plate reader (Beckman Coulter).

#### Cell cycle analysis

The cells were plated in 60-mm Petri dish at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells per dish with DMEM/F-12 with 1% FBS. After overnight incubation, the culture medium was replaced with new complete medium and then treated with each type of sericin at concentration of 1600  $\mu\text{g/ml}$  for 72 h. After treatment, the cells were harvested by trypsinization, washed with PBS pH 7.4, fixed in 70% ethanol at 4°C for 1 h. The cells were then treated with 100  $\mu\text{g/ml}$  of RNase A at 37°C for 30 min and then stained with 20  $\mu\text{g/ml}$  of PI (Molecular Probes, Invitrogen, NY, USA) for 30 min at room temperature in the dark. The analysis of cells was performed by FACSCalibur using CellQuestPro software (Becton Dickinson).

#### Statistical analysis

The data are expressed as mean  $\pm$  SEM. The statistical significance was determined by Student's t-test. The p values of less than 0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Effect of sericin on cell proliferation.

The effects of various types of sericin on viability of SW480 and FHC cells were evaluated by MTT assay. The results showed that increasing concentrations of sericin decreased cell viability in a dose-dependent manner, but only at high concentration ( $>800 \mu\text{g/ml}$ ) caused a significant reduction (data not shown). Figure 1 shows the effects of sericin at high concentration ( $1600 \mu\text{g/ml}$ ) on the viability of SW480 and FHC cells after 72 h treatment. All types of sericin decreased cell proliferation in both cell lines as compared to control cells. As shown in Figure 1, the inhibitory effect of all types of sericin on SW480 cell proliferation was comparable to that on the proliferation of FHC cells. Sericin B and C but not sericin A had a significant inhibitory effect on both SW480 and FHC cell proliferation ( $p < 0.01$ ); the percent decrease in the proliferation of SW480 cells treated with sericin B and C was 26.44% and 29.90%, respectively. In addition, the percent decrease in the proliferation of FHC cells treated with sericin B and C was 28.72% and 26.85%, respectively.

### Effect of sericin on cell apoptosis.

To determine whether apoptosis was involved in the decreased cell proliferation of sericin-treated colon cell lines, cell apoptosis was investigated. SW480 and FHC cells were treated with each type of sericin at  $1600 \mu\text{g/ml}$  for 72 h (Figure 2). Sericin B and C significantly increased the percentage of late apoptotic cells in SW480 cells (10.83% and 10.96%, respectively), but they did not affect the percentage of necrotic cells, which was  $\sim 2\text{-}3\%$  in both control cells and PBS-treated cells. In contrast, for the FHC cells, there was no significant increase in the percentage of apoptotic and necrotic cells for all types of sericin compared to control cells and the PBS-treated cells (Figure 3).

### Effect of sericin-induced caspase-3 activity.

Caspase-3 is a member of the family of cysteine proteases that are importantly involved in apoptotic pathway. The effect of sericin on caspase-3 activity was examined by using specific colorimetric substrate for caspase-3 (Figure 4). SW480 cells were treated with all types of sericin at the same incubating time and concentration as in cell apoptosis assay. The results showed that the activity of caspase-3 in sericin-treated cells did not significantly differ from control and the

PBS-treated cells. However, sericin B and C slightly increased caspase-3 activity in SW480 cells compared to the control cells.

Effect of sericin on cell cycle.

To elucidate the mechanisms responsible for the reduced SW480 cell proliferation by sericin, we next determined the effect of sericin on cell cycle by flow cytometry. After treating SW480 cells with 1600  $\mu\text{g/ml}$  of all types of sericin for 72 h, cells were harvested and stained with PI. The results showed no significant difference in all stages of cell cycle in either sericin-treated, control, or PBS-treated cells (Figure 5). However, the percentage of cell population in the G0/G1 phase tended to decrease in sericin B and C treated cells (38.89% and 35.66%) compared to the control (55.58%) and PBS-treated cells (46.17%). The percentage of cell population in the S phase slightly increased in the cells treated with sericin B and C (19.75% and 20.71%) compared to control cells (12.00%).

## Discussion

In this present study, we investigated the *in vitro* effect of sericin on colon cancer cells and found that medium and small sized sericin significantly inhibited the proliferation of SW480 colon cancer cells and FHC normal colon cells. The underlying mechanism for this inhibitory effect is not clear. The inhibitory effect of the medium and small sized sericin on SW480 cell proliferation led to the further study on the mechanism of sericin-induced cell death in these cells.

Many studies have shown that sericin can suppress lipid peroxidation and tyrosinase activity *in vitro*<sup>7</sup>, protect against UVB-induced acute damage, and inhibit tumorigenesis in mouse skin<sup>11</sup> and inhibit UVB-induced cell apoptosis in human skin keratinocytes<sup>12</sup>. Other studies have demonstrated that suppression of colon tumorigenesis by sericin in animal models may be involved in reducing oxidative stress<sup>9,10</sup>. However, the exact inhibitory mechanism of sericin on colon carcinogenesis is unknown.

Colon carcinogenesis depends on the ratio of cell proliferation and cell apoptosis<sup>13,14</sup>. To elucidate the anti-proliferative mechanisms of sericin, we examined the effect of sericin on cell apoptosis as well as on cell cycle progression. We hypothesized that sericin induced apoptosis

might be associated with reduced cell proliferation. The present results showed that medium and small sized sericin was able to induce late-apoptosis in SW480 colon cancer cells but not in normal colon cells without affecting cell necrosis, suggesting that sericin has anti-tumor activity.

The development of colon carcinogenesis is an imbalance between cell renewal and cell death<sup>15</sup>. Apoptosis also called programmed cell death, play an important role in the development and homeostasis in multicellular organisms<sup>16</sup>. The mechanisms of apoptosis are highly complex. There are two main apoptotic pathways: 1) the extrinsic pathway involving the activation of death receptors 2) the intrinsic pathway involving the activation of the mitochondria and several caspases<sup>17</sup>. Caspases, also known as cysteine aspartate-specific protease, are involved in apoptosis. The caspases are divided into two categories, the initiator caspases, which include caspase-2, -8,-9 and -10, and the effector caspases, including caspase-3, -6, and -7<sup>18,19</sup>. In this study, we hypothesized that the apoptosis of SW480 cells induced by sericin might be involved in caspase-3 activity. The results showed that medium and small sized sericin insignificantly increased the caspase-3 activity in SW480 cells, suggesting that the sericin might induce cell apoptosis by another mechanism other than the activation of caspase-3<sup>20</sup>.

To investigate other mechanisms that could involve in the inhibitory effect on cell proliferation, the effect of sericin on cell cycle was analyzed and it was found that sericin B and C insignificantly decreased the numbers of SW480 cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. Since, the cell cycle progression depends on changes in the expression and/or activation of regulatory proteins of cell cycle<sup>21</sup>. The accumulation of cells in the S phase did not differ between the control cells and sericin-treated cells, thus the changes in the expression and/or activation of regulatory proteins of cell cycle in these cells are unlikely. In conclusion, the present results suggest that medium and small sized sericin can inhibit cell proliferation and induce apoptosis of human colon cancer cells through a caspase-3 independent mechanism, which may relate to the chemopreventive function of sericin and further study is needed to investigate other mechanisms that could be responsible for the apoptosis of colon cancer cells mediated by sericin.

## Acknowledgements

This work was financially supported by the Thailand Research Fund (BRG50800021) (to SP and WT), the Faculty of Medicine Naresuan University (MD-51-01-015) (to SP), and Naresuan University (IRDA fiscal year 2009: MD-AR-042/2552) (to SP and NL). The authors would like to thank Ms. Kwansuda Supalap, Ms. Sanchawan Supalap and Mr. Sang Sri-ampai for their technical assistance.

## References

1. Khuhaprema T, Srivatanakul P (2008) Colon and rectum cancer in Thailand: an overview. *Jpn J Clin Oncol* 38, 273-43.
2. Labianca R, Beretta G, Gatta G, de Braud F, Wils J (2004) Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 51, 145-70.
3. van Breda SG, de Kok TM, van Delft JH (2008) Mechanisms of colorectal and lung cancer prevention by vegetables: a genomic approach. *J Nutr Biochem* 19, 139-57.
4. Giovannucci E, Willett WC (1994) Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med* 26, 443-52.
5. Divisi D, Di tommaso S, Salvemini S, Garramone M, Crisci R (2006) Diet and cancer. *Acta Biomed* 77, 118-23.
6. Sasaki M, Yamada H, Kato N (2000) Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats. *Nutr Res* 20, 1505-11.
7. Kato N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M (1998) Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 62, 145-7.
8. Zhaorigetu S, Yanaka N, Sasaki M, Watanabe H, Kato N (2003) Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF-alpha. *Oncol Rep* 10, 537-43.
9. Zhaorigetu S, Sasaki M, Watanabe H, Kato N (2001) Supplemental silk protein, sericin, suppress colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 2181-86.
10. Zhaorigetu S, Sasaki M, Kato N (2007) Consumption of sericin suppress colon oxidative stress and aberrant crypt foci in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats by colon undigested sericin. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 53, 297-300.

11. Zhaorigetu S, Yanaka N, Sasaki M, Watanabe H, Kato N (2003) Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *J Photochem Photobiol B* 71, 11-7.
12. Dash R, Mandal M, Ghosh SK, Kundu SC (2008) Silk sericin protein of tropical tasar silkworm inhibits UVB-induced apoptosis in human skin keratinocytes. *Mol Cell Biochem* 311, 111-9.
13. Lifshitz S, Lamprecht SA, Benharroch D, Prinsloo I, Polak-Charcon S, Schwartz B (2001) Apoptosis (programmed cell death) in colonic cells: from normal to transformed stage. *Cancer Lett* 163, 229-38.
14. Sun SY, Hail N Jr, Lotan R (2004) Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst* 96, 662-72.
15. Huerta S, Goulet EJ, Livingston EH (2006) Colon cancer and apoptosis. *Am J Surg* 191, 517-26.
16. Shi Y (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9, 459-70.
17. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
18. Stennicke HR, Salvesen GS (1998) Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1387, 17-31.
19. Wang ZB, Liu YQ, Cui YF (2005) Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* 29, 489-96.
20. Donovan M, Cotter TG (2004) Control of mitochondrial integrity by Bel-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 1644, 133-47.
21. Schafer KA (1998) The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 35, 461-78.

### Figure legends

Figure 1. Effect of various types of sericin on SW480 and FHC cell viability. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and represented the average values three experiments. \*indicates significant difference compared to PBS-treated cells ( $p < 0.01$ ).

Figure 2. Effect of various types of sericin on the apoptosis of SW480 (a) and FHC cells (b). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and represented the average values three experiments. \*indicates significant difference compared to control cells and PBS-treated cells ( $p < 0.05$ ).

Figure 3. Effect of various types of sericin on caspase-3 activity (a) and the cell cycle (b) of SW480 cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and represented the average values from three experiments.

Figure 1

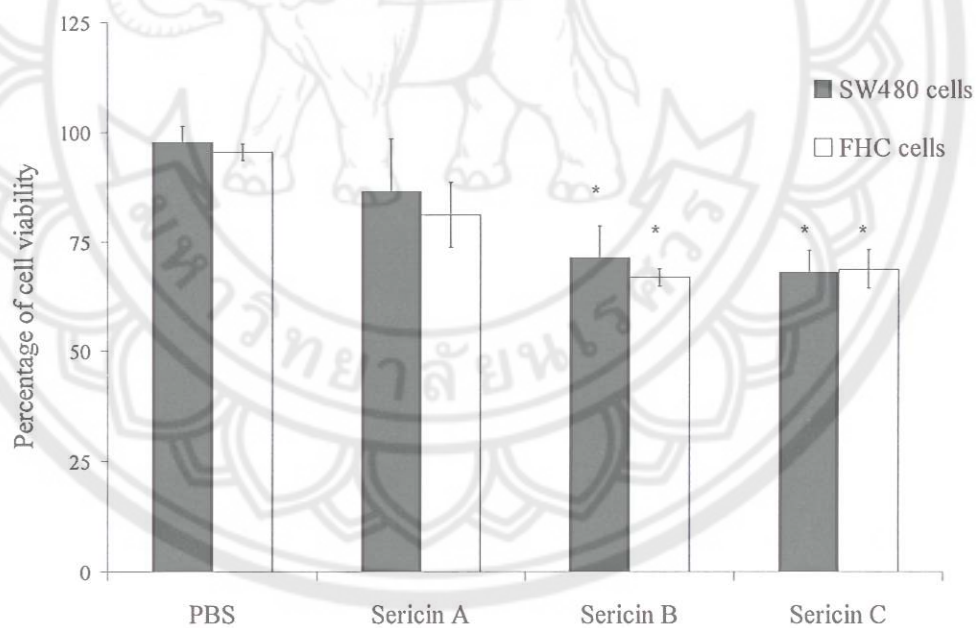




Figure 2

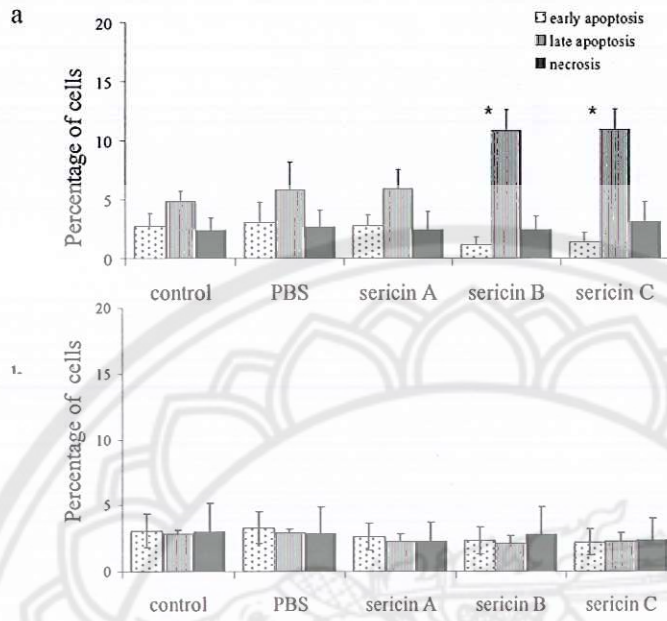


Figure 3

