นิพนธ์ต้นฉบับ • Original Article

ฤทธิ์ของโคคลานต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์หลอดเลือดและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

พิศมัย เหล่าภัทรเกษม[1*], บรรจบ ศรีภา[2], จริยา หาญวจนวงศ์[3]
[1]ภาควิชาเภสัชวิทยา, [2]ภาควิชาพยาธิวิทยา, [3]ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาขอนแก่น 40002

Effect of *Mallotus repandus* on Vascular Endothelial and Cholangiocarcinoma Cells Migration

Pisamai Laupattarakasem[1*], Banchob Sripa[2], Chariya Hahnvajanawong[3]
[1]Department of Pharmacology, [2]Pathology, [3]Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University 40002

หลักการและวัตถุประสงค์: โคคลาน (*Mallotus repandus*, Euphorbiaceae) เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และใช้เป็นยาแผนโบราณในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยที่นิยมใช้ในการรักษาอาการปวดตามกล้ามเนื้อและข้อ โคคลานมีสารสำคัญหลายชนิดและที่สำคัญคือ triterpenoids ซึ่งมีรายงานถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลายรวมทั้งฤทธิ์ต้านอักเสบและฤทธิ์ต้านมะเร็ง การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงศักยภาพของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากส่วนเปลือกต้นของโคคลานต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์หลอดเลือดและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับยาต้านมะเร็งชนิด antimitotic เช่น paclitaxel (Taxol®)

วิธีการศึกษา: หาความเข้มข้นของสารสกัดโคคลาน, paclitaxel และตัวทำละลายที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT สำหรับฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์จะทดสอบด้วยเทคนิค co-culture โดยการบ่มสารที่จะทดสอบในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ล่วงหน้า (pre-treat) กับเซลล์เป็นเวลา 30 นาที ก่อนเติมลงไปใน insert (upper chamber) ทำการบ่มต่อไปอีก 18 ชั่วโมงที่ 37°C ในตู้ 5% CO_2 ตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนลงมาที่ well (lower chamber) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ แล้วคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์

ผลการศึกษา: พบว่าขนาดของสารสกัดโคคลานที่ไม่มีพิษต่อเซลล์สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์หลอดเลือดและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ตามขนาดที่เพิ่มขึ้น

สรุป: ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารที่ได้จากการสกัดโคคลานด้วยแอลกอฮอล์น่าจะออกฤทธิ์ต้านการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

Background and objectives: *Mallotus repandus* (Euphorbiaceae), a widely distributed plant in South-East Asia, used as medicinal herb in many countries, including Thailand which is commonly used in the treatment of muscle and joint pain. Many active ingredients were found in *Mallotus repandus*, especially triterpenoids previously reported in various pharmacologic effects including anti-inflammatory and anticancer activities. The objective of this study was to study the potential of the methanol extract of the stem bark of *M. repandus* on the migration of vascular endothelial cells and cholangiocarcinoma (CCA) cells in comparing with to anti-mitotic drug, paclitaxel (Taxol®)

Methods: Non-cytotoxic concentrations of *M. repandus* extract, paclitaxel and vehicle were determined by MTT assay. Co-culture technique was performed to test for anti-migration. The cells were pre-treated with the non-cytotoxic concentrations of paclitaxel, extracts, or vehicle for 30 min before being added to insert (upper chamber), then further incubated for 18 h at 37°C in 5% CO_2 incubator. The number of cells migrated to well (lower chamber) were counted under a microscope and the percentage of inhibition was calculated.

Results: The findings revealed that the non-cytotoxic dose of the *M. repandus* extract could inhibit the migration of both vascular endothelial and CCA cells in dose-dependent manners.

Conclusions: Our results suggested that the methanol extract of the *M. repandus* stem bark of had anti-tumor metastatic activity.

คำสำคัญ: โคคลาน มะเร็งท่อน้ำดี ฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์

Keywords: *Mallotus repandus*, Cholangiocarcinoma, Anti-migration

ศรีนครินทร์เวชสาร 2553; 25(3): 201-7 • Srinagarind Med J 2010; 25(3): 201-7

บทนำ

การรักษาโรคมะเร็งชนิดปฐมภูมิที่ก้อนมะเร็งยังไม่มีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น (metastasis) จะได้ผลดีโดยการผ่าตัดหรือฉายรังสี ในขณะที่มะเร็งชนิดที่มีการแพร่กระจายแล้วจะต้องทำการรักษาด้วยเคมีบำบัด ซึ่งการออกฤทธิ์ของยาเคมีส่วนใหญ่ทำให้เซลล์ตาย (cytotoxicity) ส่งผลเสียต่อเซลล์ปกติของร่างกายด้วยโดยเฉพาะเซลล์ที่มีการแบ่งตัวสูง เช่น ไขกระดูก และยังทำให้ผู้ป่วยมีอาการข้างเคียงสูง นอกจากนี้การใช้เคมีบำบัดในระยะที่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งแล้วมักจะไม่ค่อยได้ผล จึงเป็นข้อจำกัดของการใช้เคมีบำบัด ปัจจุบันการศึกษาหายาที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งรวมทั้งการศึกษาหายาที่มีผลลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยเกิดอาการข้างเคียงต่ำจึงเป็นหัวข้อหนึ่งที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งขึ้นกับปัจจัยหลายชนิดที่สำคัญได้แก่ การเกิดหลอดเลือดใหม่ (neovascularization หรือ angiogenesis)[1] และความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (tumor metastasis) เอง Angiogenesis เริ่มจากการที่เซลล์มะเร็งหลั่งสารออกมากระตุ้นเซลล์หลอดเลือดให้หลั่งเอนไซม์ออกมาทำลาย basement membrane และหลั่งสารที่กระตุ้นการสร้างหลอดเลือด ซึ่งจะกระตุ้นให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดเคลื่อนที่เข้าไปใน extracellular matrix ขณะเดียวกันเซลล์บุผนังหลอดเลือดก็จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นและเกิด tube formation ได้เป็นหลอดเลือดใหม่ในที่สุด[2, 3] จากการที่กระบวนการนี้มีหลายขั้นตอนและมีสารสื่อที่เกี่ยวข้องจำนวนมาก ทำให้มีสาร/ยาที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการนี้ได้หลายชนิดรวมทั้งสารกลุ่ม terpenoids [4-6] ที่พบได้แพร่หลายในพืชหลายชนิดรวมทั้งต้นโคคลาน (*Mallotus repandus*)[7]

โคคลานเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae พบได้ทั่วไปในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และใช้เป็นยาแผนโบราณในหลายประเทศ[8-10] รวมทั้งประเทศไทยที่นิยมใช้ในการรักษาอาการปวดตามกล้ามเนื้อและข้อ โคคลานมีสารสำคัญหลากหลายรวมทั้งกลุ่ม terpenoids ที่สำคัญ เช่น ursulic acid, oleanolic acid และ lupeol ฯลฯ[7] มีรายงานถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างกว้างขวาง ได้แก่ anti-inflammatory[11], antihepatotoxic[9], antioxidant[12, 13], immunomoduratory[14], antiangiogenesis[15-18] และ anticancer activity[19-22] จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาผลการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดโคคลาน และจากแนวคิดที่ว่าการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งมีความสัมพันธ์กับการเกิดหลอดเลือดใหม่และความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งกระบวนการทั้งสองนี้มีหลักการเบื้องต้นที่คล้ายกันคือความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้ antimigration test เป็นรูปแบบการศึกษาโดยใช้เซลล์บุผนังหลอดเลือดจากรก (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma cells, CCA cells) เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษา

วิธีการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่างสมุนไพรและการเตรียมสารสกัด

โคคลานที่ใช้ในการศึกษานี้เก็บมาจากอำเภอแวงน้อย จังหวัดขอนแก่น ระหว่างเดือน มีนาคม-พฤษภาคม ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพฤกษศาสตร์จาก National herbarium แล้วนำกิ่งโคคลานมาลอกเอาส่วนเปลือก ล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งพอหมาด อบที่อุณหภูมิ 50-60°ซ จนกระทั่งแห้งบดด้วยเครื่องและผ่านแร่ง เก็บผงยาสมุนไพรในถุงที่ปิดสนิทและเก็บในที่เย็น นำผงสมุนไพรมาสกัดด้วยวิธี reflux ในmethanol เป็นเวลาประมาณ 30 นาที ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง นำสารสกัดไปประเหยเอาแอลกอฮอล์ออกภายใต้อุณหภูมิและความดันต่ำด้วยเครื่อง Rota evaporator ระเหิดส่วนน้ำที่เหลือออกด้วยเครื่อง Lyophilizer ชั่งน้ำหนัก (ได้ % yield = 3.23) แล้วนำไปบรรจุในภาชนะที่ปิดสนิทและเก็บที่ 4°ซ

ในการทดสอบนำสารสกัดโคคลานที่เก็บไว้มาละลายด้วยสารละลายที่เหมาะสม (vehicle) จากนั้นนำมาทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน millipore filter paper ขนาด 0.45 μm นำสารละลายที่ได้มาเตรียมให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ antimigration เทียบกับ vehicle (DMSO) และสารมาตรฐาน (paclitaxel, Taxol®)

2. Cytotoxic test

ทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดโคคลาน, paclitaxel และ vehicle (DMSO) ที่ไม่มีพิษต่อเซลล์ด้วย MTT assay[23] โดยการวัดความสามารถของเอนไซม์ไมโตคอนเดรียที่เปลี่ยน tetrazolium salt (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, MTT) สีเหลือง ไปเป็น formazan ที่มีสีน้ำเงินเข้ม ความเข้มของสีน้ำเงินจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต วิธีการทดลองคร่าวๆ คือ บ่มเซลล์ที่จะทดสอบในสารที่ความเข้มข้นครอบคลุมถึงขนาดที่ใช้ในการทดลองที่ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากเปลี่ยน media แล้วบ่มต่ออีก 2 ชม.ใน MTT solution (10 mg/ml) จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง

แยกเซลล์ออก ทำให้เซลล์แตกและละลายสีภายในเซลล์ด้วย DMSO แล้ววัดระดับของ formazan product ด้วยเครื่อง spectrophotometer (ELx800; Bio-Tek Instrument, USA) ที่ความยาวคลื่น 540 nm

3. Antimigration test

ทดสอบความสามารถของสารสกัดโคคลานในการยับยั้งการเคลื่อนที่ (migration) ของเซลล์ 2 ชนิด คือ เซลล์บุผนังหลอดเลือดจากรก (HUVECs) และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด ได้แก่ KKU-100 และ KKU-M139 ที่พัฒนามาจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มารับการรักษา ณ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.1 การเตรียม HUVECs คัดเลือกสายรกที่ไม่มีรอยเขียวช้ำจากการ clamp ที่มีความยาวประมาณ 10-20 ซม. หลังจากล้างด้วย steriled normal saline solution (NSS) แล้วบรรจุหลอดเลือดดำด้วย 0.05% trypsin-EDTA และ incubate ที่ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาทีพร้อมทั้งบีบนวดสายรกเบาๆ เก็บเซลล์บุผนังหลอดเลือดด้วยการฉีดล้างหลอดเลือดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด M199 ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin ปั่นเหวี่ยงที่ 600 x g, 10 นาที แล้ว resuspend เซลล์ใน 5 ml M199 medium เปลี่ยน media ที่ 24 ชม. แล้วบ่มต่อที่ 37°ซ ใน 5% CO_2 incubator โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบจะอยู่ระหว่างรุ่นที่ 3-4 และ มี cell viability อย่างน้อย 90% การตรวจสอบ cell viability จะทำโดยการย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue (trypan blue exclusion technique)

3.2 การเตรียม CCA cells โดยจะเลือกใช้เซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ KKU-100 และ KKU-M139 ทำการเพาะเลี้ยงใน HAM's F12 และsupplement ด้วย 10-15% fetal bovine serum (FBS), 100 U penicillin, 100 μg streptomycin ที่ 37°ซ, 5% CO_2 incubator

3.3 Antimigration test

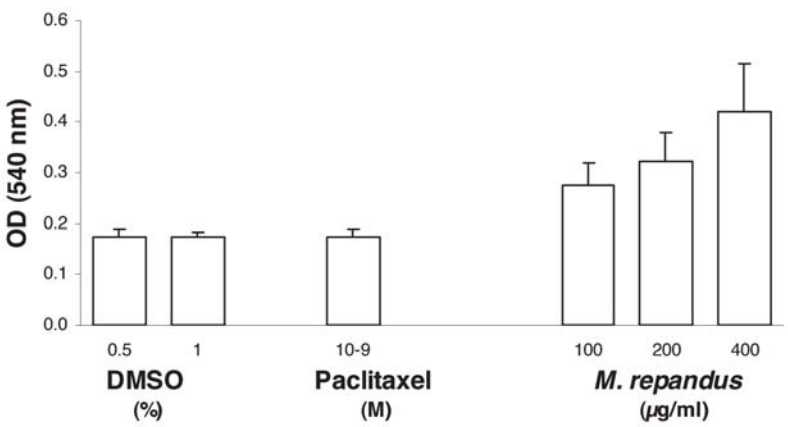
วิธีที่ใช้ในการศึกษานี้ดัดแปลงจากวิธีของ Deryugina และคณะ[24] โดยสรุปการทดลองคร่าวๆ ดังนี้ ทำการเคลือบด้านก้น (underside) ของ insert ในส่วน 24 well migration chamber (Transwell® polycarbonate membrane, pore size 8 μm) ด้วย 1 μg fibronectin ทิ้งไว้ให้แห้ง เติม 250 μl cell suspension ($5x10^4$ cells/insert) ที่ pretreat ด้วยสารสกัดที่จะทดสอบในขนาดต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปใส่ใน well ที่เติมด้วย 750 μl, 10-15% FBS medium ที่มีสารสกัดในขนาดเดียวกัน incubate ที่ 37°ซ, 5% CO_2 เป็นเวลา 18-24 ชม. เมื่อครบกำหนด เช็ดเซลล์ที่เหลืออยู่บน insert (non-migrating cells) ออกด้วย cotton swab หลังจากนั้น fix เซลล์ด้วย 25 % MeOH และย้อมด้วย 0.5 % w/v crystal violet ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ที่ก้นของ insert ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เทียบจำนวนเซลล์ของกลุ่มที่ pre-treat ด้วยสารสกัดกับกลุ่มควบคุมที่ pre-treat ด้วย vehicle (DMSO) หรือ reference drug (Taxol®)

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ ผลการทดลองแสดงค่าเป็น mean ± SE และทดสอบโดยใช้ Students't test กำหนดค่า $p<0.05$ ถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

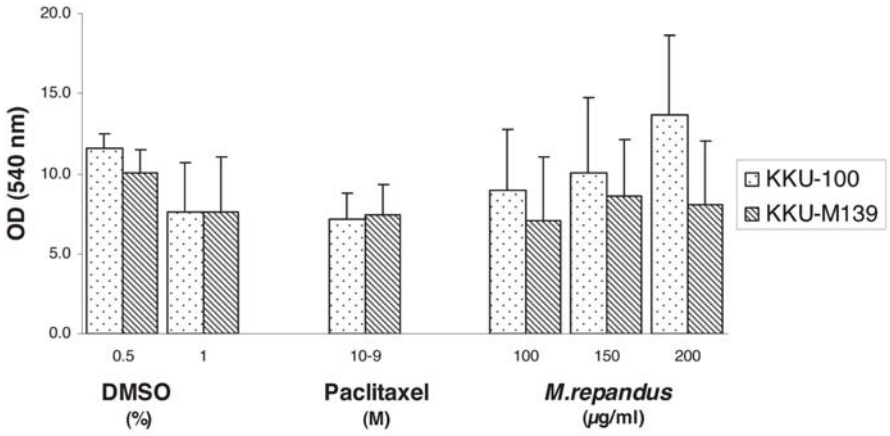
ผลการศึกษา

1. Cytotoxic test

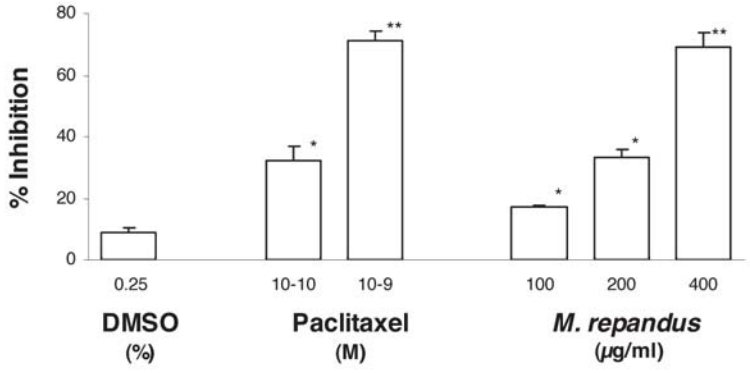
ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้หาขนาดความเข้มข้นของสารสกัดโคคลาน, paclitaxel และ DMSO ที่ไม่มีพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยการบ่มเซลล์ที่จะทดสอบ (HUVECs, KKU-100 และ KKU-M139) ในสารทดสอบในขนาดต่างๆ แล้วทำการตรวจวัดระดับของ formazan product ด้วยเครื่อง spectrophotometry ที่ 540 nm พบว่าสารสกัดโคคลานขนาด 100-400 μg/ml, paclitaxel ขนาด 10^{-9} M หรือ DMSO ขนาด 0.5-1% ไม่มีพิษต่อทั้งเซลล์ HUVECs (รูปที่ 1) และต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 และ KKU-M139 (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัดโคคลานต่อเซลล์ HUVECs (ค่าที่แสดงคือค่า mean±SE, n=3)



รูปที่ 2 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัดโคคลานต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 และ KKU-M139 (ค่าที่แสดงคือค่าของ mean ± SE, n=3)



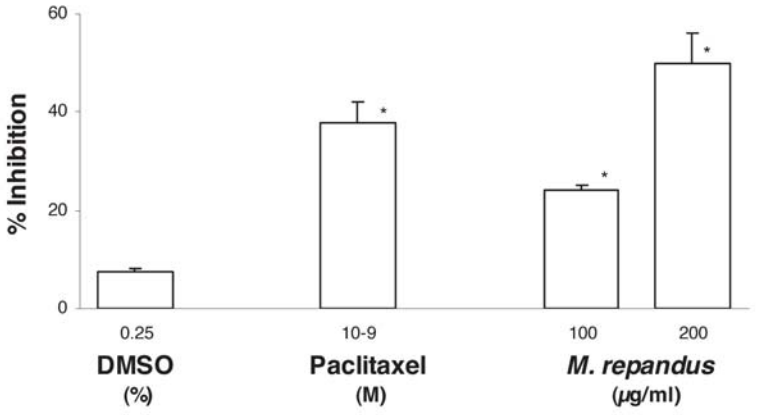
รูปที่ 3 แสดงฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ (antimigration) ของสารสกัดโคคลานต่อเซลล์ HUVECs (ค่าที่แสดงคือค่าของ mean ± SE, n=3; *$P < 0.05$; ** $P < 0.001$ เทียบกับ DMSO)

2. Effect of *Mollotus repandus* on HUVECs migration

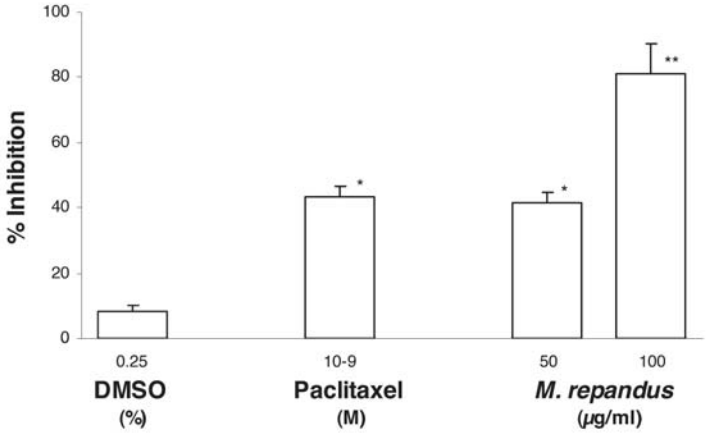
จากการ pre-treat HUVECs (5x104 cells/insert) ในสารสกัดโคคลาน, paclitaxel หรือ DMSO (0.25%) ก่อนที่จะใส่ลงบน upper chamber ของ transwell ที่เคลือบด้วย fibronectin ในขณะที่ lower chamber ของ transwell ที่บรรจุด้วย culture media ซึ่งมี 15% FBS แล้วตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ลงมาที่ด้านล่างของ upper chamber พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ HUVECs เพิ่มขึ้นตามขนาด สารสกัดในขนาด 200 และ 400 μg/ml และมีฤทธิ์ยับยั้งได้พอๆ กับ paclitaxel ที่ขนาด 10^{-10} และ 10^{-9} M ตามลำดับ (รูปที่ 3)

3. Effect of *Mollotus repandus* on CCA cells migration

จากการ pre-treat KKU-100 และ KKU-M139 ($1x10^5$ cells/insert) ในสารสกัดโคคลาน, paclitaxel หรือ DMSO (0.25%) ก่อนที่จะใส่ลงบน upper chamber ของ transwell ที่เคลือบด้วย fibronectin ในขณะที่ lower chamber ของ transwell ที่บรรจุด้วย culture media ซึ่งมี 15% FBS แล้วตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ลงมาที่ด้านล่างของ upper chamber พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ CCA cells เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น รูปที่ 4 แสดงผลของสารสกัดโคคลานในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ KKU-100 และพบว่าสารสกัดในขนาด 200 μg/ml มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้สูงกว่า paclitaxel ขนาด 10^{-9} M แต่ก็ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (*P*.0.05) ส่วนรูปที่ 5 แสดงผลของสารสกัดโคคลานในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ KKU-M139 พบว่าสารสกัดในขนาด 50 μg/ml มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้พอๆ กับ paclitaxelที่ขนาด 10^{-9} M และสารสกัดในขนาด 100 μg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ได้มากกว่า paclitaxel ที่ขนาด 10^{-9} M อย่างชัดเจน



รูปที่ 4 แสดงผลของสารสกัดโคคลานในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ KKU-100 (ค่าที่แสดงคือค่าของ mean ± SE, n=3; *P < 0.05 เทียบกับ DMSO)



รูปที่ 5 แสดงผลของสารสกัดโคคลานในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ KKU-M139 (ค่าที่แสดงคือค่าของ mean ± SE, n=3; *P < 0.05; ** P < 0.001 เทียบกับ DMSO)

วิจารณ์

จากการทดลองพบว่าสารสกัดโคคลานในความเข้มข้นที่ไม่มีพิษต่อเซลล์มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ HUVECs ได้ตามขนาด สารสกัดในขนาด 200 μg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ HUVECs ได้พอๆ กับ paclitaxel ที่ 10^{-10} M ผลที่ได้จากการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานอื่นๆ ซึ่งเชื่อว่าน่าจะสัมพันธ์กับฤทธิ์ของ triterpenoids ที่เป็นสารสำคัญของโคคลาน[7] มีรายงานว่าสารหลายตัวในกลุ่ม triterpenoids สามารถยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ด้วยกลไกต่างๆ รวมทั้งฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์หลอดเลือด[5, 6, 16, 18, 25] You และคณะ[15] รายงานฤทธิ์ต้านการเกิดหลอดเลือดใหม่ของ lupeol โดยการยับยั้ง tube formation ของ HUVECs Cardenas และคณะ[16] รายงานว่า ursolic acid มีฤทธิ์ต้านการเกิดหลอดเลือดใหม่หลายกลไก ได้แก่ การยับยั้ง endothelial cell proliferation, migration,และ differentiation ซึ่งล้วนแต่เป็นกลไกที่สำคัญต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ รวมทั้งสามารถแสดงฤทธิ์ต้านการเกิดหลอดเลือดใหม่ในสัตว์ทดลอง (CAM assay) นอกจากนี้ Sogno และคณะ[18] ได้รายงานฤทธิ์ต้านการเกิดหลอดเลือดใหม่ของ oleanolic acid จากผลการทดลองทั้ง in vitro & in vivo ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Vannini และคณะ[26]

ผลของสารสกัดโคคลานต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (CCA cells) พบว่าสารสกัดโคคลานในขนาดที่ไม่มีพิษต่อเซลล์จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ CCA cells ได้ตามขนาด (รูปที่ 4-5) ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ของ triterpens ที่พบในสารสกัดโคคลาน และสอดคล้องกับหลายรายงานที่แสดงถึงฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งของ ursolic acid, oleanolic acid และ lupeol[5, 6, 16, 25, 27]

สรุป

จากผลการทดลองในการศึกษานี้แสดงถึงศักยภาพของสารสกัดส่วนเปลือกต้นของโคคลานด้วยแอลกอฮอล์ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์บุผนังหลอดเลือดและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่มีพิษต่อเซลล์สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงสนับสนุนฤทธิ์ของโคคลานในการต้านมะเร็งด้วยการยับยั้งกระบวนการ angiogenesis และ tumor cell migration

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อนุญาตให้คณะผู้วิจัยใช้สถานที่และอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย และเจ้าหน้าที่ของศูนย์ฯ ที่ช่วยสนับสนุนการวิจัยรวมทั้งการเบิกจ่ายงบประมาณ

เอกสารอ้างอิง

1. Ranieri G, Gasparini G. Angiogenesis and angiogenesis inhibitors: a new potential anticancer therapeutic strategy. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2001; 1:241-53.
2. Slaton JW, Inoue K, Perrotte P, El-Naggar AK, Swanson DA, Fidler IJ, et al. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. Am J Pathol 2001; 158:735-43.
3. Marler JJ, Fishman SJ, Kilroy SM, Fang J, Upton J, Mulliken JB, et al. Increased expression of urinary matrix metalloproteinases parallels the extent and activity of vascular anomalies. Pediatrics 2005; 116:38-45.
4. Jedinak A, Muckova M, Kost'alova D, Maliar T, Masterova I. Antiprotease and antimetastatic activity of ursolic acid isolated from Salvia officinalis. Z Naturforsch C 2006; 61:777-82.
5. Lee TK, Poon RT, Wo JY, Ma S, Guan XY, Myers JN, et al. Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-kappaB activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. Cancer Res 2007; 67:8800-9.
6. Yamai H, Sawada N, Yoshida T, Seike J, Takizawa H, Kenzaki K, et al. Triterpenes augment the inhibitory effects of anticancer drugs on growth of human esophageal carcinoma cells in vitro and suppress experimental metastasis in vivo. Int J Cancer 2009; 125:952-60.
7. Huang PL, Wang LW, Lin CN. New triterpenoids of mallotus repandus. J Nat Prod 1999; 62:891-2.
8. Yang LL, Yen KY, Kiso Y, Hikino H. Antihepatotoxic actions of Formosan plant drugs. J Ethnopharmacol 1987; 19:103-10.
9. Lin CC, Lin JM, Chiu HF. Studies on folk medicine "thang-kau-tin" from Taiwan. (I). The anti-inflammatory and liver-protective effect. Am J Chin Med 1992; 20:37-50.
10. Lin JM, Lin CC, Chen MF, Ujiie T, Takada A. Studies on Taiwan folk medicine, thang-kau-tin (II): Measurement of active oxygen scavenging activity using an ESR technique. Am J Chin Med 1995; 23:43-51.
11. Fernandez MA, de las Heras B, Garcia MD, Saenz MT, Villar A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. J Pharm Pharmacol 2001; 53:1533-9.
12. Somova LO, Nadar A, Rammanan P, Shode FO. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. Phytomedicine 2003; 10:115-21.
13. Gayathri R, Priya DK, Gunassekaran GR, Sakthisekaran D. Ursolic acid attenuates oxidative stress-mediated hepatocellular carcinoma induction by diethylnitrosamine in male Wistar rats. Asian Pac J Cancer Prev 2009; 10:933-8.
14. Jeong HG, Kim HG, Hwang YP. Involvement of cytokines in the hepatic expression of metallothionein by ursolic acid. Toxicol Lett 2005; 155:369-76.
15. You YJ, Nam NH, Kim Y, Bae KH, Ahn BZ. Antiangiogenic activity of lupeol from Bombax ceiba. Phytother Res 2003; 17:341-4.
16. Cardenas C, Quesada AR, Medina MA. Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. Biochem Biophys Res Commun 2004; 320:402-8.
17. Kiran MS, Viji RI, Sameer Kumar VB, Sudhakaran PR. Modulation of angiogenic factors by ursolic acid. Biochem Biophys Res Commun 2008; 371:556-60.
18. Sogno I, Vannini N, Lorusso G, Cammarota R, Noonan DM, Generoso L, et al. Anti-angiogenic activity of a novel class of chemopreventive compounds: oleanic acid terpenoids. Recent Results Cancer Res 2009; 181:209-12.

19. Gao X, Deeb D, Jiang H, Liu Y, Dulchavsky SA, Gautam SC. Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of prosurvival Akt, NF-kappaB and Notch1 signaling. J Neurooncol 2007;84:147-57.
20. He X, Liu RH. Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. J Agric Food Chem 2007; 55:4366-70.
21. Neto CC, Amoroso JW, Liberty AM. Anticancer activities of cranberry phytochemicals: an update. Mol Nutr Food Res 2008; 52 Suppl 1:S18-27.
22. Petronelli A, Pannitteri G, Testa U. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. Anticancer Drugs 2009; 20:880-92.
23. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65:55-63.
24. Deryugina EI, Bourdon MA. Tenascin mediates human glioma cell migration and modulates cell migration on fibronectin. J Cell Sci 1996; 109 (Pt 3):643-52.
25. Johnson SM, Wang X, Mark Evers B. Triptolide Inhibits Proliferation and Migration of Colon Cancer Cells by Inhibition of Cell Cycle Regulators and Cytokine Receptors. J Surg Res 2009.
26. Vannini N, Lorusso G, Cammarota R, Barberis M, Noonan DM, Sporn MB, et al. The synthetic oleanane triterpenoid, CDDO-methyl ester, is a potent antiangiogenic agent. Mol Cancer Ther 2007; 6:3139-46.
27. Sorokina IV, Tolstikova TG, Zhukova NA, Petrenko NI, Uzenkova NV, Shul'ts EE, et al. Antitumor and antimetastatic effects of betulonic acid amides in mice with transplantable lewis carcinoma. Bull Exp Biol Med 2006; 142:69-72.