

# ฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งของเถาวัลย์เปรียงต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

พิศมัย เหล่าภัทรเกษม<sup>1</sup>, บรรจบ ศรีภา<sup>2</sup>, วิรุพท์ เหล่าภัทรเกษม<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเภสัชวิทยา, <sup>2</sup>พยาธิวิทยา, <sup>3</sup>ออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

## Antimigration of Cancer Cells by *Derris scandens* on Cholangiocarcinoma Cells

<sup>1</sup>Pisamai Laupattarakasem, <sup>2</sup>Banchob Sripa, <sup>3</sup>Wiroon Laupattarakasem

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, <sup>2</sup>Pathology, <sup>3</sup>Orthopedics, Faculty of Medicine, Khon Kaen University 40002

**หลักการและเหตุผล:** เถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens*, Leguminosae) เป็นสมุนไพรที่ใช้ลดการอักเสบของข้อใน ประเทศไทย การศึกษาทางเคมีของส่วนลำต้นพบสารสำคัญ เป็นพวก isoflavone เช่น genistein และอนุพันธ์ มีรายงานถึง ฤทธิ์ต้านมะเร็งของ isoflavone หลายชนิดรวมทั้งฤทธิ์ต้านการ เคลื่อนที่ของเซลล์

**วัตถุประสงค์:** ศึกษาฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของสารสกัดเถาวัลย์ เปรียงต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเทียบกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆและ ยาต้านมะเร็งชนิด antimitotic เช่น paclitaxel

**วิธีการ:** หาขนาดที่ไม่เป็นพิษของสารสกัด paclitaxel และ ตัวทำละลายยา ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (KKU-100, KKU-M139, KKU-M213) มะเร็งตับ (HepG2) และ มะเร็งเต้านม (MCF-7) ด้วย วิธี MTT assay การทดสอบฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์ ด้วยเทคนิค co-culture โดยทำการให้สารทดสอบล่วงหน้า (pre-treat) ต่อเซลล์มะเร็ง ( $2.5 \times 10^4$  เซลล์) ในขนาดที่ไม่เป็นพิษ ต่อเซลล์เป็นเวลา 30 นาที ก่อนเติมลงไป insert (upper chamber) ทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 18 ชั่วโมงที่  $37^\circ\text{C}$  ในตู้  $5\% \text{CO}_2$  เช็ดเซลล์ที่เหลือค้างอยู่ใน insert ด้วยไม้พันสำลี ตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนลงมาที่ well (lower chamber) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ แล้วคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการ เคลื่อนที่ของเซลล์

**ผลการศึกษา:** จาก MTT assay เมื่อเทียบกับตัวทำละลายยา (0.25-1% DMSO) พบว่าขนาดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของสาร สกัดเถาวัลย์เปรียงได้ถึง  $800 \mu\text{g/ml}$  0.5% DMSO และ  $10^{-9} \text{M}$  สำหรับ paclitaxel ฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์พบว่าสาร สกัดเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์มะเร็งที่นำมา ทดสอบเกือบทุกชนิดยกเว้น KKU-100 ซึ่งพัฒนามาจาก poorly

**Background:** *Derris scandens* (Leguminosae) is used as traditional remedies in Thailand for arthritis. Phytochemicals obtained from the stems are mainly isoflavones such as genistein and their derivatives. Many anticancer activities of isoflavone have been reported, including antimigration effect.

**Objectives:** To assess antimigration activity of *D. scandens* extract on cholangiocarcinoma (CCA) cell lines compared to other human cancer cell lines and standard antimitotic drug (e.g., paclitaxel).

**Methods:** Non-cytotoxic concentrations of *D. scandens* ethanol extract, paclitaxel and vehicle were determined by MTT assay. For antimigration assay, co-cultured technique using CCA cell lines (KKU-100, KKU-M139 and KKU-M213), hepatoma cell line (HepG2) and breast cancer cell line (MCF-7) was employed. The cells ( $2.5 \times 10^4$  cells) were pre-treated with non-cytotoxic concentrations of tested drug or herbal extract for 30 min before adding to insert (upper chamber), then further incubated for 18 h at  $37^\circ\text{C}$  in  $5\% \text{CO}_2$  incubator. Non-migrating cells were removed using cotton swab, the number of cells migrated to well (lower chamber) were counted under a microscope and percent inhibition was calculated.

**Results:** From MTT assay, in comparison to vehicle (0.25-1% DMSO), the non-cytotoxic concentrations were up to  $800 \mu\text{g/ml}$  0.5% DMSO and  $10^{-9} \text{M}$  for *D. scandens* and paclitaxel, respectively. Antimigration activity of *D. scandens* was clearly demonstrated with nearly all of the human cancer cell lines, except KKU-100 which is derived from the poorly differentiated adenocarcinoma

differentiated adenocarcinoma tissue ในขณะที่ paclitaxel มีฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์ทุกชนิด

**สรุป:** จากผลการทดลองพบว่าสารสกัด 50%EtOH ของเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งหลายชนิด ผลต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจะได้ผลดีกับเซลล์ชนิด squamous cell carcinoma (KKU-M139) และ adenosquamous carcinoma (KKU-M213) จึงน่าจะมั่นใจว่าเถาวัลย์เปรียงน่าจะมีศักยภาพในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้อย่างน้อยโดยการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์

**คำสำคัญ:** เถาวัลย์เปรียง มะเร็งท่อน้ำดี ฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์ ความเป็นพิษต่อเซลล์

tissue. The migratory inhibition effect of paclitaxel was observed in all cell lines.

**Conclusions:** The ethanol extract of *D. scandens* shows antimigration in most many cancer cell lines. For CCA cell lines, the extract showed potent inhibitory effect especially with squamous cell carcinoma (KKU-M139) and adenosquamous carcinoma (KKU-M213). Therefore, it is interesting that the extract may have a potential as antimetastasis on CCA cells, at least in part, mediated through antimigration activity.

**Key words:** *Derris scandens*, Cholangiocarcinoma, Antimigration, Cytotoxicity

ศรีนครินทร์เวชสาร 2550; 22(4): 339-45 • Srinagarind Med J 2007; 22(4): 339-45

## บทนำ

มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) เป็นมะเร็งที่พบได้มาก ในประชากรชาวอีสานและเป็นปัญหาที่สำคัญ เนื่องจากปัจจุบันการรักษายังไม่ได้ผลดีนักไม่ว่าจะด้วยการผ่าตัด การฉายรังสี หรือการให้ยาต้านมะเร็ง<sup>1</sup> ประกอบกับผู้ป่วยมักจะมาพบแพทย์ในระยะที่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งแล้ว ทำให้การรักษาทำได้ยากและไม่ได้ผล การรักษาด้วยยาต้านมะเร็งส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการข้างเคียงค่อนข้างมาก แนวทางการรักษาด้วยยาในปัจจุบันจึงมีความจำเป็นในการค้นหายาใหม่ที่ให้ผลในการรักษา มีอาการข้างเคียงต่ำ สามารถเสริมฤทธิ์ยาต้านมะเร็ง หรือสามารถลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ การเลือกใช้สมุนไพรที่เป็นทางเลือกหนึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาเพิ่มขึ้น

จากการที่สมุนไพรมีสารสำคัญหลายชนิด และแต่ละชนิดก็ออกฤทธิ์ได้อย่างกว้างขวางรวมทั้งฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกต่างๆ<sup>2, 3</sup> มีรายงานทางระบาดวิทยาว่าประชากรที่รับประทานอาหารที่มี isoflavone สูง เช่น ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองที่มี genistein และ daidzein เป็นส่วนประกอบหลักจะช่วยลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งเต้านมและลดอัตราการตายจากมะเร็งต่อมลูกหมากได้<sup>4-6</sup> เชื่อว่ากลไกการออกฤทธิ์มีหลายชนิดรวมทั้งลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (tumor metastasis) กระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ cell adhesion, cell invasion และ cell migration ซึ่งมีรายงานว่า isoflavone ชนิดต่างๆ รวมทั้ง genistein สามารถยับยั้งขั้นตอนเหล่านี้ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด<sup>7, 8</sup>

Isoflavone เป็น flavonoids ที่พบได้มากในพืชตระกูลถั่วและพืชอีกหลายชนิดรวมทั้งเถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens*, Leguminosae)<sup>9-11</sup> เถาวัลย์เปรียงเป็นสมุนไพรที่สำคัญตัวหนึ่งที่ใช้ในการรักษาอาการปวดและอักเสบ<sup>12</sup> เป็นไม้เถาขนาดใหญ่พบได้ทั่วไปในเขตร้อนชื้น มีรายงานถึงสารสำคัญหลายชนิดที่สำคัญได้แก่ กลุ่ม isoflavonoids ซึ่งตัวหลักได้แก่ genistein และอนุพันธ์<sup>9-11</sup> genistein พบได้ในพืชหลายชนิดโดยเฉพาะ subfamily Papilionoideae, family Leguminosae ปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อนำไปใช้เป็น functional food ในการเสริมสุขภาพช่วยลดอาการในหญิงวัยทอง ลดอุบัติการณ์ของโรคหัวใจและหลอดเลือด และป้องกันการเกิดมะเร็ง<sup>4-6</sup> การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดีของเถาวัลย์เปรียง โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ (antimigration) ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งของ tumor metastasis และเพื่อยืนยันว่าฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่นี้ไม่ได้เกิดจากการตายของเซลล์มะเร็งจึงทำการศึกษาฤทธิ์ cytotoxicity ของเถาวัลย์เปรียงในขนาดที่ใช้ทดสอบในครั้งนี้อย่าง

## วัตถุประสงค์

ศึกษาฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ (antimigration) ของเถาวัลย์เปรียงต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) เพื่อยืนยันว่าฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่นี้ไม่ได้เกิดจากการตายของเซลล์มะเร็ง

## วัสดุและวิธีการ

### 1. การเก็บตัวอย่างสมุนไพรและการเตรียมสารสกัด

เถาวัลย์เปรียง (ส่วนเถา) เก็บจากท้องที่จังหวัดสงขลา ในระหว่างเดือนมีนาคม หลังการตรวจเอกลักษณ์ของพืช (Voucher number SKP A 1410101) นำสมุนไพรที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งพอมอาด อบที่อุณหภูมิ 50-60°C จนกระทั่งแห้ง บดด้วยเครื่องและผ่านร่อน เก็บผงยาสมุนไพรในถุงที่ปิดสนิท และเก็บในที่เย็น ทำการสกัดผงสมุนไพรด้วยวิธี reflux ใน 50% ethanol เป็นเวลาประมาณ 30 นาที หลังจากทิ้งไว้ให้เย็น กรองเอาสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 400 g, 10 นาที เพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนน้ำใสทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง รวมส่วนน้ำใสแล้วนำไประเหยเอาแอลกอฮอล์ออกภายใต้อุณหภูมิต่ำและความดันต่ำด้วยเครื่อง rota evaporator ส่วนน้ำที่เหลือจะระเหิดออกด้วยเครื่อง lyophilizer จนกระทั่งได้ผงแห้ง ซึ่งน้ำหนัก และบรรจุในภาชนะที่ปิดสนิทและเก็บที่ 4°C เมื่อต้องการนำมาทดสอบจะละลายด้วยสารละลายที่เหมาะสมให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

### 2. ศึกษาฤทธิ์ด้านการเคลื่อนที่ (antimigration) ของเถาวัลย์เปรียงต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

2.1 เซลล์และการเพาะเลี้ยงเชื้อ: เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมนุษย์ (cholangiocarcinoma cell lines, CCA) ได้จาก รศ. ดร. บรรจบ ศรีภา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 3 ชนิด ได้แก่ KKU-100 (poorly-differentiated adenocarcinoma type), KKU-M139 (squamous cell carcinoma) และ KKU-M213 (adenosquamous carcinoma) ส่วนเซลล์มะเร็งอื่นอีก 2 ชนิดได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ได้แก่ human hepatocellular carcinoma (HepG2, ATCC HB-8065) และ human breast adenocarcinoma (MCF-7, ECACC No. 86012803) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ CCA ใน HAM's F12 medium, HepG2 ใน MEM medium, และ MCF-7 ใน DMEM medium ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะเสริมด้วย 10-15% fetal bovine serum (FBS), 100 U penicillin, 100 µg streptomycin และเพาะเลี้ยงที่ 37°C ใน 5% CO<sub>2</sub> incubator

2.2 Cytotoxicity test ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของเถาวัลย์เปรียงด้วยวิธี MTT assay<sup>14</sup> ซึ่งเป็นการทดสอบ cell viability โดยวัดถึงความสามารถของ mitochondrial enzyme ที่เปลี่ยน tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylidiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, MTT) สีเหลือง ไปเป็น formazan product ที่มีสีน้ำเงินเข้ม ซึ่งจากระดับของสีจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ วิธีทดลองคร่าวๆ คือ เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในสารสกัดที่จะทดสอบในขนาดที่ครอบคลุมถึงขนาดที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ antimigration ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากเปลี่ยน media แล้วเพาะเลี้ยงต่ออีก 2 ชม. ใน MTT solution

(10 mg/ml) จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก ทำให้เซลล์แตกและละลายสีภายในเซลล์ด้วย dimethylsulphoxide (DMSO) วัดระดับของ formazan product ด้วยเครื่อง spectrophotometry ที่ 540 nm (ELX-800; Bio-Tek Instrument, Inc.)

2.3 Migration assay: ดัดแปลงจากวิธีของ Saito และคณะ<sup>13</sup> ซึ่งการทดลองคร่าวๆ ดังนี้ ทำการเคลือบด้านก้น (underside) ของ insert ของ 24 well migration chamber (Transwell® polycarbonate membrane, pore size 8 µm, Corning Costar, USA) ด้วย 1 µg fibronectin ทิ้งไว้ให้แห้ง เติม 250 µl cell suspension (50,000-100,000 cells/insert) ที่ pre-treat ด้วยสารสกัดที่จะทดสอบในขนาดต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวางบน well ที่เติมด้วย 750 µl, 10-15% FBS medium ที่มีสารสกัดในขนาดเดียวกันแล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่ 37°C ใน 5% CO<sub>2</sub> incubator เป็นเวลา 18 ชม เมื่อครบกำหนด เช็ดเซลล์ที่เหลืออยู่ใน insert (non-migrating cells) ออกด้วยไม้พันสำลี หลังจากนั้นตรึงเซลล์ด้วย 25% methanol และย้อมด้วย 0.5% w/v crystal violet ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่เกาะอยู่ที่ก้นของ insert ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เทียบจำนวนเซลล์ของกลุ่มที่ pre-treat ด้วยสารสกัดกับกลุ่มที่ pre-treat ด้วยยาต้านมะเร็งที่มีฤทธิ์ antimitotic (paclitaxel) และกลุ่มควบคุมที่ pre-treat ด้วยตัวทำละลาย (0.125, 0.25% DMSO)

### 3. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าแสดงเป็น mean ± SE การเปรียบเทียบในกลุ่มควบคุม ใช้ students' t test กำหนดค่า p<0.05 ถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

## ผลการวิจัย

1. ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วยวิธี MTT assay เทียบกับตัวทำละลาย (0.25-1% DMSO) พบว่าสารสกัดในขนาดสูง (800 µg/ml ที่ละลายใน 0.5% DMSO) และ paclitaxel (10<sup>-9</sup>M) จะมี % viability เท่าๆ กับตัวทำละลาย (ตารางที่ 1)
2. ฤทธิ์ด้านการเคลื่อนที่ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อเซลล์มะเร็ง

การทดสอบฤทธิ์ด้านการเคลื่อนที่ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี co-culture technique จากการตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่สามารถเคลื่อนที่จากด้านบนของ insert ลงมาที่ด้านล่างของ insert พบว่าสารสกัด 50% ethanol ของเถาวัลย์เปรียงสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบเกือบทุกชนิดยกเว้นชนิด KKU-100 แม้จะเพิ่มขนาดถึง 800 µg/ml แล้วก็ตาม (รูปที่ 2-A) ขณะที่ paclitaxel (10<sup>-9</sup>M) สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ KKU-100 ได้ประมาณ 37%

**ตารางที่ 1** แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของตัวทำละลาย (DMSO), paclitaxel ( $10^{-9}$  M) และ สารสกัดเถาวัลย์เปรียง (*D. scandens*) ด้วยวิธี MTT assay

Experiment	FC <sup>a</sup>	KKU-100		KKU-M139		KKU-M213		HepG2		MCF-7	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
DMSO	0.25%	5.81	2.31	6.92	0.88	-2.74	1.14	9.20	4.55	8.44	4.02
	0.5%	11.57	0.90	10.05	1.42	2.41	1.54	9.39	2.39	9.27	4.35
Paclitaxel	$10^{-9}$ M	7.15	1.63	7.43	1.88	9.19	3.37	8.54	5.03	9.08	0.62
D.scandens (ug/ml)	100	-6.38	3.86	-2.90	1.73	-0.15	0.98	6.71	2.40		
	200	-2.40	2.23	-0.95	2.98	-0.44	0.81	4.87	4.50	3.76	6.75
	400	2.97	2.42	-7.49	4.54	5.76	0.49	14.80	1.38	0.99	2.57
	800	1.17	2.91	-1.86	3.03	13.52	2.27	14.92	2.41	-4.16	1.06

Note: FC = final concentration

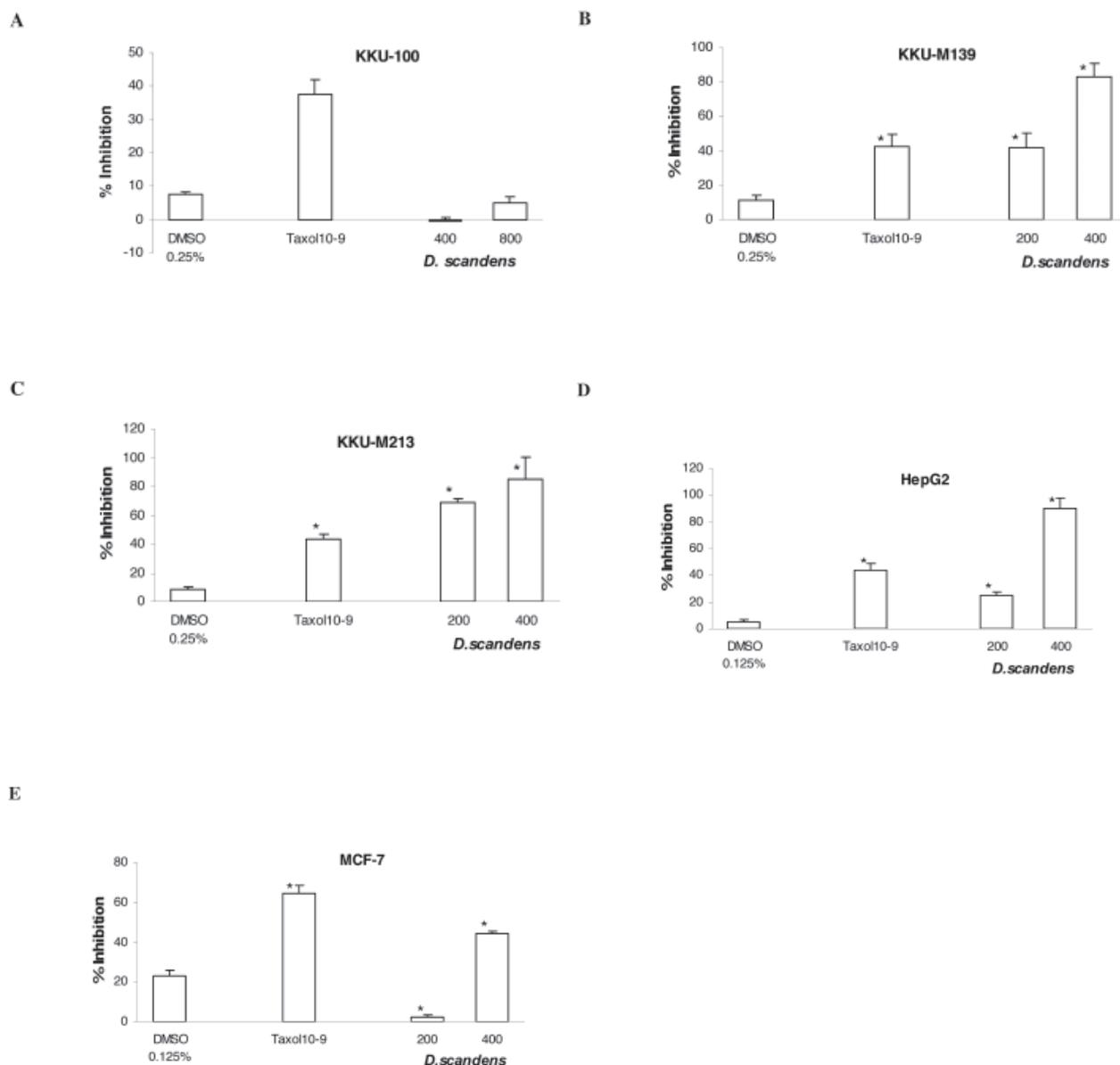
( $37.70 \pm 4.29$ ) ฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของสารสกัดต่อ KKU-M139 ที่ขนาด 200  $\mu\text{g/ml}$  ได้ผลพอๆ กับ paclitaxel (รูปที่ 2-B) ในขณะที่ผลต่อเซลล์ KKU-M213 ของสารสกัดขนาด 200  $\mu\text{g/ml}$  ได้ผลมากกว่า paclitaxel (รูปที่ 2-C) ผลของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ พบว่าสารสกัดขนาด 200  $\mu\text{g/ml}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ HepG2 ได้ประมาณ 24% ( $24.64 \pm 2.78$ ) ซึ่งต่ำกว่า paclitaxel ( $43.92 \pm 4.54$ ) แต่ที่ขนาด 400  $\mu\text{g/ml}$  สารสกัดให้ผลการยับยั้งสูงมาก ( $89.70 \pm 7.83$ ) (รูปที่ 2-D) ส่วนผลต่อเซลล์ MCF-7 สารสกัดจะมีฤทธิ์ยับยั้งต่ำกว่า paclitaxel แม้จะเพิ่มขนาดไปถึง 400  $\mu\text{g/ml}$  แล้วก็ตาม (รูปที่ 2-E)

### วิจารณ์

เถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens*, Leguminosae) เป็นสมุนไพรที่ใช้ในแพทย์แผนไทยในการรักษาอาการปวดบวมของข้อ จากการศึกษารายงานของ Laupattarakasem และคณะ<sup>12, 15</sup> พบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ต้านอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการเกิดหลอดเลือดใหม่ (พิศมัย เหล่าภักทรเกษม, ข้อมูลที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์) และจากรายงานของ Sriwanthana และคณะ<sup>16</sup> พบฤทธิ์เพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกายเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่ากลไกเหล่านี้เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดและการแพร่กระจายของมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงในประเทศไทยโดยเฉพาะในภาคอีสาน นอกจากการติดต่อการรักษารักษาแล้วปัญหาของมะเร็งท่อน้ำดีคือ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งที่จะพบได้แม้จะ

อยู่ในระยะต้นๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาถึงฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นกลไกหนึ่งของการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งที่นอกเหนือจากการเกิดหลอดเลือดใหม่

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงในขนาดที่ไม่มีพิษต่อเซลล์มีฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบแทบทุกชนิดยกเว้นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด poorly-differentiated adenocarcinoma type (KKU-100) ซึ่งเชื่อว่าน่าจะเป็นชนิดที่ต่อต้านการรักษายากที่สุดในการเคลื่อนที่ต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงน้อยน่าจะเกิดจากผลของ isoflavones และอนุพันธ์ (รวมทั้ง genistein) ซึ่งเป็นสารหลักที่พบในสารสกัด<sup>9,11</sup> มีรายงานที่แสดงถึงกลไกการออกฤทธิ์ของ isoflavones ในการลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ตั้งแต่ลดการ adhesion<sup>17</sup>, invasion<sup>5, 18</sup> และ migration<sup>19</sup> Mentor-Marcel และคณะ<sup>20</sup> รายงานถึงฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของ genistein ต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากในหนูถีบจักรโดยเฉพาะชนิด well-differentiated prostatic adenocarcinoma เมื่อเทียบกับ poorly-differentiated type การศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้นับว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งชนิด squamous cell carcinoma (KKU-M139) และ adenosquamous (KKU-M213) ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชนิด poorly-differentiated (KKU-100) ซึ่งผลการทดลองนี้ก็ให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Thepsiri และคณะ<sup>21</sup> ในการทดสอบฤทธิ์ของยาเคมีบำบัดซึ่งพบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 มีการดื้อยาสูงกว่าเซลล์ชนิดอื่นๆ ที่ทดสอบ ส่วนผลในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ ได้แก่ hepatocellular carcinoma



**รูปที่ 1** แสดงฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของสารสกัดเห็ดวักซ์เบรียง (*D. scandens*) เทียบกับ Paclitaxel (Taxol  $10^{-9}$  M) และ ตัวทำละลาย (0.125-0.25% DMSO) ด้วยวิธี co-culture ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดต่างๆ ได้แก่ (A) KKU-100 (poorly differentiated adenocarcinoma), (B) KKU-M139 (squamous cell carcinoma) และ (C) KKU-M213 (adenosquamous carcinoma) ต่อ human hepatocellular carcinoma (HepG, D) และต่อ human breast cancer (MCF-7, E) (\*เปรียบเทียบเทียบกับกลุ่ม DMSO,  $p < 0.05$ ).

(เช่น HepG2) ก็ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Nakanishi และคณะ<sup>17</sup> ที่รายงานว่าสารในกลุ่ม tyrosine kinase inhibitor (เช่น genistein) และ phosphatidylinositol 3 kinase (เช่น wortmannin) สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ hepatocellular carcinoma ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงยังสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ breast cancer cells (เช่น MCF-7) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sliva และคณะ ที่รายงานว่าสารในกลุ่ม tyrosine kinase inhibitor (เช่น genistein และ staurosporine) สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ breast cancer cells ทั้ง MDA-MB-231 และ MCF-7 ได้<sup>19</sup> และสอดคล้องกับรายงานของ Farina และคณะ<sup>22</sup> ที่พบว่า anti-metastasis ของ genistein เกิดจากหลายกลไกรวมทั้ง antimigration

### สรุป

สารสกัด 50% ethanol ของเถาวัลย์เปรียงในขนาดที่ไม่มีพิษต่อเซลล์มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดีโดยเฉพาะชนิด moderately differentiated เช่น KKU-M139 และ KKU-M213 จากฤทธิ์ดังกล่าวทำให้เชื่อว่าเถาวัลย์เปรียงน่าจะมีศักยภาพในการลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงกลไกอื่นๆ ที่สัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งก็ยังมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาอีกต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ. ดร. ไสพิศ วงศ์คำ ที่กรุณาให้คำแนะนำเกี่ยวกับ co-culture technique และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

### เอกสารอ้างอิง

1. Sripa B, Pairojkul C. Pathogenesis of Opisthorchis-associated CCA. In: Vatanasapt V, Sripa B, eds. Liver cancer in Thailand: Epidemiology, diagnosis and control. Khon Kaen: Siriphan Press; 2000:49-65.
2. da Rocha A, Lopes R, Schwartzmann G. Natural products in anticancer therapy. Current Option in Pharmacology 2001;1: 364-9.
3. Reddy L, Odhav B, Bhoola D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. Pharmacology & Therapeutics 2003;99:1-13.
4. Wang HK. The therapeutic potential of flavonoids. Expert Opin Investig Drugs 2000;9:2103-19.

5. Valachovicova T, Slivova V, Bergman H, Shuherk J, Sliva D. Soy isoflavones suppress invasiveness of breast cancer cells by the inhibition of NF-kappaB/AP-1-dependent and -independent pathways. Int J Oncol 2004;25:1389-95.
6. Jolly CA. Diet manipulation and prevention of aging, cancer and autoimmune disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2005;8:382-7.
7. Singh AV, Franke AA, Blackburn GL, Zhou JR. Soy phytochemicals prevent orthotopic growth and metastasis of bladder cancer in mice by alterations of cancer cell proliferation and apoptosis and tumor angiogenesis. Cancer Res 2006; 66:1851-8.
8. Skogseth H, Larsson E, Halgunset J. The invasive behaviour of prostatic cancer cells is suppressed by inhibitors of tyrosine kinase. APMIS 2006;114:61-6.
9. Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, Jansakul C, Taylor WC. Isoflavone glycosides from Derris scandens. Phytochemistry 2002;60:827-34.
10. Mahabusarakam W, Deachathai S, Phongpaichit S, Jansakul C, Taylor WC. A benzil and isoflavone derivatives from Derris scandens Benth. Phytochemistry 2004;65:1185-91.
11. Rao SA, Srinivas PV, Tiwari AK, Vanka UM, Rao RV, Dasari KR, et al. Isolation, characterization and chemobiological quantification of alpha-glucosidase enzyme inhibitory and free radical scavenging constituents from Derris scandens Benth. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2007.
12. 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;85:207-15.
13. Saito K, Oku T, Ata N, Miyashiro H, Hattori M, Saiki I. A modified and convenient method for assessing tumor cell invasion and migration and its application to screening for inhibitors. Biol Pharm Bull 1997;20:345-8.
14. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;48:55-63.
15. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR. Anti-inflammatory isoflavonoids from the stems of Derris scandens. Planta Med 2004;70:496-501.
16. Sriwanthana B, Chavalittumrong P. In vitro effect of Derris scandens on normal lymphocyte proliferation and its activities

- on natural killer cells in normal and HIV-1 infected patients. *J Ethnopharmacol* 2001;76:125-9.
17. Nakanishi K, Fujimoto J, Ueki T, Kishimoto K, Hashimoto-Tamaoki T, Furuyama J, et al. Hepatocyte growth factor promotes migration of human hepatocellular carcinoma via phosphatidylinositol 3-kinase. *Clin Exp Metastasis* 1999;17: 507-14.
  18. Kousidou OC, Mitropoulou TN, Roussidis AE, Kletsas D, Theocharis AD, Karamanos NK. Genistein suppresses the invasive potential of human breast cancer cells through transcriptional regulation of metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Int J Oncol* 2005;26:1101-9.
  19. Sliva D, Mason R, Xiao H, English D. Enhancement of the migration of metastatic human breast cancer cells by phosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:471-9.
  20. Mentor-Marcel R, Lamartiniere CA, Eltoum IE, Greenberg NM, Elgavish A. Genistein in the diet reduces the incidence of poorly differentiated prostatic adenocarcinoma in transgenic mice (TRAMP). *Cancer Res* 2001;61:6777-82.
  21. Tepsiri N, Chaturat L, Sripa B, Namwat W, Wongkham S, Bhudisawasdi V, et al. Drug sensitivity and drug resistance profiles of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol.* 2005;11:2748-53.
  22. Farina HG, Pomies M, Alonso DF, Gomez DE. Antitumor and antiangiogenic activity of soy isoflavone genistein in mouse models of melanoma and breast cancer. *Oncol Rep* 2006;16:885-91.

