

บทความวิจัย (Research Article)

ความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมของเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมลโดรินอลที่แยกได้จากต้นสะทางเล็ก

นัทชลิดา ดีสา^{1,2}, อนันดา ทองศรี^{1,2}, รัชนาพร โชคชัยศิริ³, รักษกุล แก่นเรณู³, ชลธิดา เทพหินลัก^{1,2}, กฤษณะ คู่เทียม^{1,3}, นิจิตติยา สุวรรณสม^{1,2}, อุษรา ปัญญา⁴ และ จุฑามาศ เทพมาลี^{1,2*}

Cytotoxicity against breast cancer cell line of 7R-acetylmelodorinol isolated from *Xylopi* *pierrei* Hance

Natchalida Deesa^{1,2}, Ananda Thongsri^{1,2}, Ratchanaporn Chokchaisiri³, Lucksagoon Ganranoo⁴, Chonthida Thephinlap^{1,2}, Krissana Khoothiam^{1,4}, Nittiya Suwannasom^{1,2}, Aussara Panya⁵ and Chutamas Thepmalee^{1,2*}

¹ Unit of excellent of Research and development for cancer therapy, University of Phayao Phayao 56000

² Division of Biochemistry, School of Medical Sciences, University of Phayao Phayao 56000

³ Division of Chemistry, School of Science, University of Phayao, Phayao 56000

⁴ Division of Microbiology, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao 56000

⁵ Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

* Corresponding to: th.chutamas@gmail.com

Naresuan Phayao J. 2021;14(1): 25-32.

Received; 2 October 2020; Revised: 8 December 2020; Accepted: 7 April 2021

บทคัดย่อ

เจ็ดอาร์-แอซิทิลเมลโดรินอล (7R-acetylmelodorinol) เป็นสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเปลือกของต้นสะทางเล็ก (*Xylopi pierrei* Hance) ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอดชนิด NCI-H187 อย่างไรก็ตามฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านมยังไม่มีการศึกษาแน่ชัด ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ คือ ศึกษาฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ของเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมลโดรินอล โดยวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี crystal violet staining, MTT assay และ clonogenic assay หลังจากบ่มสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมลโดรินอลไว้กับเซลล์มะเร็งเต้านมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากวิธี crystal violet staining พบว่าสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมลโดรินอลที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์มะเร็งตายทั้งหมด จากวิธี MTT assay พบว่า ค่า IC₅₀ ของสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมลโดรินอลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 8.57± 0.012 และ 7.80± 0.013 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และจากวิธี clonogenic assay พบว่าสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมลโดรินอลที่ความเข้มข้น 4 และ 8 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งจาก

¹ โครงการจัดตั้งหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศ: ด้านการวิจัยและพัฒนาเพื่อการรักษาโรคมะเร็ง มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

² สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

³ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

⁴ สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

⁵ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

3 วิธีการทดลองให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกัน ดังนั้นสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมลโดรินอลมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งอาจจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งเต้านมได้ในอนาคต

คำสำคัญ: เจ็ดอาร์-แอซิทิลเมลโดรินอล, เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านม, การต้านการเจริญ

Abstract

7*R*-acetylmelodorinol is extracted and purified compound from stem bark of *Xylopi*a *pierrei* Hance. Previous studies, it was reported that 7*R*-acetylmelodorinol has the cytotoxicity activity against human small cell lung cancer (NCI-H187). However, the cytotoxicity activity against breast cancer is still unclear. The aim of the study is to determine cytotoxicity effect of 7*R*-acetylmelodorinol in breast cancer cell lines. The cell viabilities of MCF-7 breast cancer cell line after treated with various concentrations of 7*R*-acetylmelodorinol were evaluated by crystal violet staining, MTT assay, and clonogenic assay, respectively. For the crystal violet staining, treatment cells with 50 and 100 μ M of 7*R*-acetylmelodorinol significantly decreased cell viability of breast cancer cells for 24 and 48 hours. The IC_{50} of 7*R*-acetylmelodorinol for 24 and 48 hours in MCF-7 was 8.57 ± 0.012 and 7.80 ± 0.013 μ M, respectively. The result of clonogenic assay revealed that colony formation showed a significant decrease in breast cancer cell treated with 7*R*-acetylmelodorinol at concentrations of 4 and 8 μ M ($p < 0.01$). Taken together, 7*R*-acetylmelodorinol has cytotoxicity activity against breast cancer cells by three different methods. These findings suggested that 7*R*-acetylmelodorinol might be a useful compound for breast cancer therapy.

Keywords: 7*R*-acetylmelodorinol, Breast cancer cell line, Cytotoxicity activity

คำนำ

ในปัจจุบันนี้ ได้มีการนำสมุนไพรรักษาหรือสารสกัดจากธรรมชาติมาศึกษาคุณสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น ได้แก่ เรสเวอรอล (resveratrol) เป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) พบในพืชตระกูลถั่ว องุ่น ต้นหม่อน และต้นบลูเบอร์รี่ ผลการศึกษาพบว่า เรสเวอรอล (resveratrol) มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) และต้านการอักเสบ (anti-inflammation) สามารถกระตุ้นเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส [1] เช่นเดียวกับแมงจิเฟอริน (mangiferin) เป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอลที่พบในส่วนต่างๆ ของต้นมะม่วง (*Mangifera indica* Linn.) โดยเฉพาะในเปลือกและใบมะม่วง มีรายงานคุณสมบัติในการต่อต้านมะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งปอด มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งเต้านม เป็นต้น และยังพบอีกว่าแมงจิเฟอริน มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านมะเร็งผ่านหลายกลไก เช่น ยับยั้งการเพิ่ม

จำนวนของเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส จะเห็นได้ว่าสารสกัดธรรมชาติหลายชนิดมีฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็ง [2, 3]

ในงานวิจัยองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพรรณไม้วงศ์กระดังงาชนิดใหม่ของไทย ชื่อว่า “ต้นสะทางเล็ก” สามารถแยกสารออกมาได้ 8 ชนิด แบ่งออกได้ 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มไตรเทอร์พีน ได้แก่ โพลีคาร์ปอล (polycarpol) กลุ่มเฮปทีน ได้แก่ เจ็ดอาร์-แอซิทิลเมลโดรินอล (7*R*-acetylmelodorinol), เจ็ดอาร์-เมลโดรินอล (7*R*-melodorinol) และเมลเดียนอน melodienone และกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ พินोเซมบริน (pinocembrin), ไอโซชาแมนติน (isochamanetin), ไคซิน (chrysin), และ ไดชาแมนติน (dichamanetin) นำสารที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบเบื้องต้น พบว่า เจ็ดอาร์-แอซิทิลเมลโดรินอล มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H187 สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารที่แยกได้ทั้งหมด

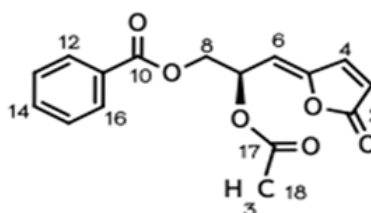
และสารมาตรฐานที่ใช้เป็นยาฆ่ามะเร็งอีลิปติซิน (ellipticine) และเป็นพืชตำในเซลล์เยื่อบุผิวไตลิง (Vero) [4] แต่กลไกการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้สารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันเช่น (อี)-แอซิติลเมลโดรินอล (E-Acetylmeleodorinol) ที่แยกได้จากส่วนเปลือกและรากของ *Cleistochlamys kirkii* [5] และสารแอซิติลเมลโดรินอลที่แยกได้จาก *Artabotrys madagascariensis* [6] พบว่ามีฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และ MDA-MB-435 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสารในกลุ่มของแอซิติลเมลโดรินอล จัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้ แต่ไม่พบการศึกษาถึงกลไกเชิงลึกในการต้านเซลล์มะเร็ง ดังนั้นในการศึกษานี้จะเป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารเจ็ดอาร์-แอซิติลเมลโดรินอลในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ซึ่งเป็นมะเร็งชนิดร้ายแรงชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยในประชากรผู้หญิงไทยและทั่วโลก และยังพบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมคือต่อการรักษาด้วยยา

เคมีบำบัด (chemotherapy resistance) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เซลล์มะเร็งปรับเปลี่ยนตัวเองเพื่อให้ทนต่อการรักษาด้วยยาชนิดเดิม โดยการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดธรรมชาติอาจจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาเคมีบำบัดชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งมากกว่ายาเดิมที่มีอยู่ในปัจจุบัน หรือนำไปใช้ร่วมกับวิธีการรักษาที่มีอยู่ปัจจุบันก็ได้

วัสดุและวิธีการ

สารเจ็ดอาร์-แอซิติลเมลโดรินอล

เป็นสารที่พบในพืชสกุล *Xylopi* หรือต้นสะทางเล็ก (*Xylopi pierrei* Hance) สกัดได้จากส่วนเปลือกของต้นสะทางเล็ก มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ละลายในตัวทำละลาย dimethyl sulphoxide (DMSO) ซึ่งสารเจ็ดอาร์-แอซิติลเมลโดรินอลได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.รัชนาพร โชคชัยศิริ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา [4]



รูป 1 แสดงโครงสร้างของสารเจ็ดอาร์-แอซิติลเมลโดรินอล

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7

เลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) ที่มี Penicillin/ Steptomycin ความเข้มข้น 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ fetal bovine serum ความเข้มข้นร้อยละ 10 เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

การทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี crystal violet staining

เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) จำนวน

1.5×10^4 เซลล์/หลุม บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วเติมสารละลาย เจ็ดอาร์-แอซิติลเมลโดรินอลความเข้มข้นดังนี้ 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ โดยหลุมควบคุมจะเติมสารละลาย DMSO ร้อยละ 0.5 และนำเซลล์ไปบ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มเซลล์เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำถาดหลุมมาดูดอาหารทิ้ง และตรึงเซลล์ด้วยเมทานอลที่เป็นปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 45 นาที จากนั้นดูดเมทานอลทิ้ง แล้วเติมสารละลาย crystal violet ร้อยละ 0.5 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตรทิ้งไว้ 45 นาที เมื่อครบเวลาแล้วดูดสารละลาย crystal violet ทิ้ง นำถาดหลุมไปล้างผ่าน

น้ำสะอาดและผึ่งทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเก็บภาพผลการทดลองด้วยกล้องถ่ายรูป และนำไปวิเคราะห์หาความเข้มของสีด้วยโปรแกรม ImageJ analysis เพื่อนำค่ามาวิเคราะห์หาร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ (triplicate)

การทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) จำนวน 5×10^3 เซลล์ บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งแล้วเติมสารละลายเจือจางสารเจ็ดอาร์-แอสซิทิลเมโลโดรีนอลตามความเข้มข้นดังนี้ 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ และยาเคมีบำบัดดอกโซรูบิซิน (doxorubicin) เป็นกลุ่มควบคุมผลบวกความเข้มข้นดังนี้ 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ โดยหลุมควบคุมจะเติมสายละลาย DMSO ร้อยละ 0.5 และนำเซลล์ไปบ่มทิ้งไว้ในตู้ บ่มเซลล์เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำถาดหลุมมาเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุมเขย่าเบาๆ ให้สารละลายกระจายทั่วเซลล์ บ่มทิ้งไว้ในตู้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลาย MTT ทิ้ง แล้วเติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน เขย่าให้ตะกอนละลาย จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm และนำค่ามาคำนวณค่า IC_{50} โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 5.0 และค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ (triplicate)

การทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี clonogenic assay

เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (6-well plate) จำนวน 2×10^5 เซลล์ บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งแล้วเติมสารละลายเจือจางสารเจ็ดอาร์-แอสซิทิลเมโลโดรีนอลตามความเข้มข้นดังนี้ 2, 4 และ 8 ไมโครโมลาร์

โดยหลุมควบคุมจะเติมสายละลาย DMSO ร้อยละ 0.5 และนำเซลล์ไปบ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนับเซลล์ จากแต่ละหลุมมาเพาะเลี้ยงต่อในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (6-well plate) อันใหม่ จำนวน 1×10^3 เซลล์ต่อหลุม นำเซลล์ไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 10 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก 3 วัน หลังจากครบเวลาทำการย้อมเซลล์ที่อยู่บนถาดหลุมด้วยสารละลาย crystal violet ร้อยละ 0.5 และทำการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ (triplicate)

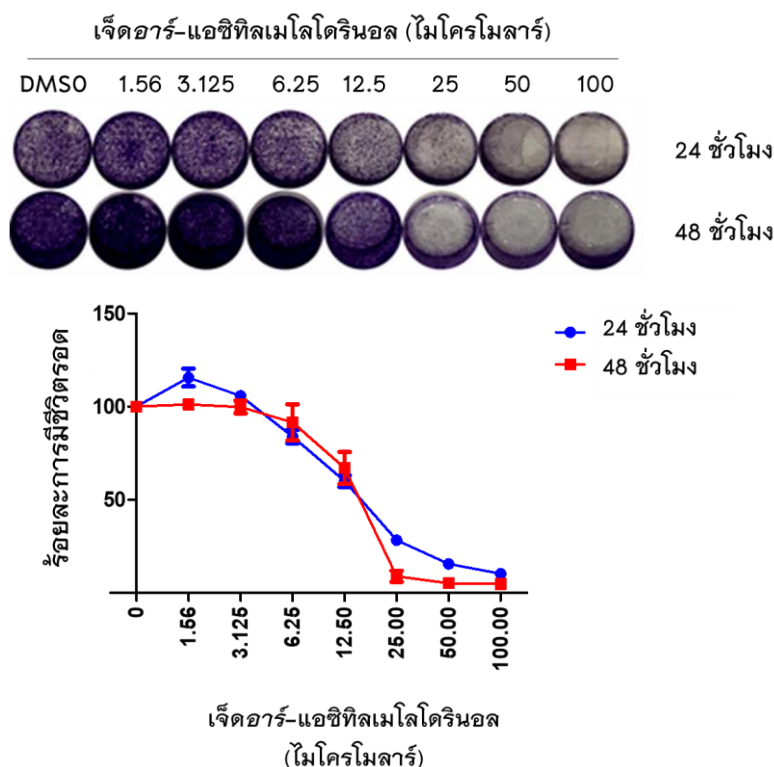
การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า Mean $\pm$ SEM จากนั้นทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองโดยวิธี One-Way ANOVA วิเคราะห์แบบ Turkey โดยความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างข้อมูลจะถูกพิจารณาที่ p -value < 0.05 โดยจะใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 5.0

ผลการศึกษา

ผลของสารเจ็ดอาร์-แอสซิทิลเมโลโดรีนอลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านม ด้วยวิธี crystal violet staining

ทำการทดสอบการมีชีวิตรอดของสารเจ็ดอาร์-แอสซิทิลเมโลโดรีนอลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี crystal violet staining จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของสารเจ็ดอาร์-แอสซิทิลเมโลโดรีนอลที่ความเข้มข้น 12.5 ไมโครโมลาร์ เริ่มที่จะสามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมได้ และเซลล์มะเร็งตายเกือบทั้งหมดที่ความเข้มข้นระดับสูง คือ 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ จากการเปรียบเทียบร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของสารเจ็ดอาร์-แอสซิทิลเมโลโดรีนอลที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยกว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงรูป 2



รูป 2 แสดงผลการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านม MCF-7 หลังจากบ่มทิ้งไว้กับของสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ด้วยวิธี crystal violet staining ทำการวัดค่าความเข้มของสีย้อมที่เกิดขึ้นด้วยโปรแกรม ImageJ analysis และนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์

ผลของสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านม ด้วยวิธี

MTT assay

ทำการทดสอบการมีชีวิตรอดของสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay พบว่า ค่า IC_{50} ของสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านม

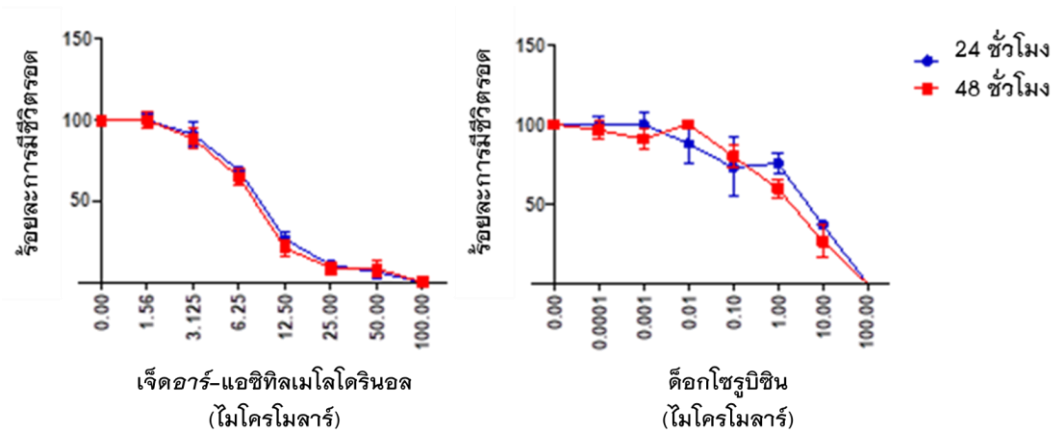
ชนิด MCF-7 ที่ 24 ชั่วโมงมีค่า 8.57 ± 0.012 ไมโครโมลาร์ และที่ 48 ชั่วโมง มีค่า 7.80 ± 0.013 ไมโครโมลาร์ ค่า IC_{50} ของยาเคมีบำบัดดอกโชรูบิซิน ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก ที่ 24 ชั่วโมง มีค่า 2.96 ± 0.115 ไมโครโมลาร์ และ 48 ชั่วโมง มีค่า 1.62 ± 0.065 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (ดังตาราง 1)

ตาราง 1 ตารางแสดงค่า IC_{50} ของสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอลและ ดอกโชรูบิซิน ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านม	สารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอล (ไมโครโมลาร์)		ดอกโชรูบิซิน (ไมโครโมลาร์)	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
MCF-7	8.57 ± 0.012	7.80 ± 0.013	2.96 ± 0.115	1.62 ± 0.065

นำค่าที่ได้มาแสดงรูปร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์แสดงดังรูป 3 พบว่าสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอลและดอกโซรูบิซิน ให้ค่าการมีชีวิตรอดไม่แตกต่างกันที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สอดคล้องกับผลการทดลองของ crystal violet

staining และเมื่อความเข้มข้นของสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอลเพิ่มขึ้น พบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมจะมีการตายเพิ่มขึ้น แต่ยาเคมีบำบัดดอกโซรูบิซิน ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก พบว่าที่ความเข้มข้นระดับต่ำสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งเต้านมได้

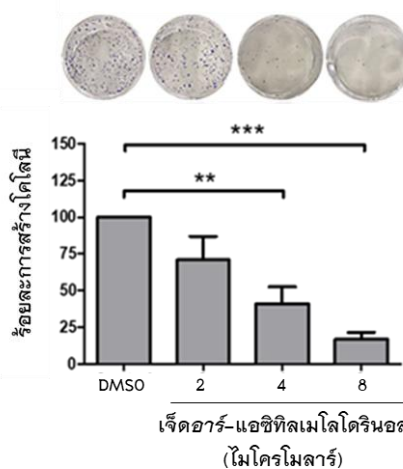


รูป 3 แสดงกราฟการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมหลังจากบ่มทิ้งไว้กับสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอล และยาเคมีบำบัดดอกโซรูบิซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7

ผลของสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านม ด้วยวิธี clonogenic assay

ทำการทดสอบการมีชีวิตรอดของสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี clonogenic assay ซึ่งเป็นการดูความสามารถของเซลล์หลังจากที่

บ่มกับสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการสร้างโคโลนีของเซลล์มะเร็งภายใน 10 วัน พบว่าสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอลที่ความเข้มข้น 4 และ 8 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการสร้างโคโลนีของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังรูป 3



รูป 4 แสดงผลการสร้างโคโลนีของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (A) หลังจากบ่มเซลล์ไว้กับสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินอลที่เวลา 24 ชั่วโมง (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

วิจารณ์

ในปัจจุบันสารสกัดธรรมชาติได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ในการนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและสรรพคุณทางยาที่น่าสนใจ เพื่อใช้ในการรักษาโรคต่างๆ รวมถึงโรคมะเร็งด้วยเหตุผลหลายประการ เช่น สารสกัดบางชนิดมีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย หาได้ง่าย และเมื่อนำมาใช้รักษามีโอกาสเกิดผลข้างเคียงค่อนข้างน้อยหรือบางชนิดไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายเลย นอกจากนี้ได้มีการรายงานเกี่ยวกับสารหรือยาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ พบว่ามีสารหลายชนิดที่อยู่ในระหว่างการศึกษาระดับคลินิก และสารบางชนิดถูกผลิตเป็นยาเคมีบำบัดแล้วเช่น ด็อกโซรูบิซิน, ไซทาราบิน (cytarabine) และพาซิแทกเซล (paclitaxel) เป็นต้น [7]

จากการศึกษาของ Ratchanapom Chokchaisiri [4] ทำการศึกษาขององค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพรรณไม้วงศ์กระดังงาชนิดใหม่ของไทย คือ สะทางเล็ก พบว่า สารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินเป็นสารในกลุ่มเฮปทีน มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H187 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 6.66 ไมโครโมลาร์ ด้วยวิธี resazurin microplate assay [4] ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินมีฤทธิ์ต้านเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ให้ค่า IC_{50} ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 8.57 ± 0.012 และ 7.80 ± 0.013 ไมโครโมลาร์ ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งไม่แตกต่างกับในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด ในการศึกษาของ Siriwat Hongnak [8] ได้ทำการศึกษาศักยภาพการต้านเซลล์มะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ พบว่า สารแอซิทิลเมโลโดรินสามารถยับยั้งการเจริญ โดยให้ค่าดังนี้ IC_{50} ในเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) เท่ากับ 2.2 ไมโครโมลาร์ ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เท่ากับ 2.2 ไมโครโมลาร์, ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านม (MCF-7) เท่ากับ 4.2 ไมโครโมลาร์ และในเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เท่ากับ 16.3 ไมโครโมลาร์ [8] นอกจากนี้สาร(อี)-แอซิทิลเมโลโดริน (E-Acetylmelodrinol) ที่แยกได้จากส่วนเปลือกและรากของ *Cleistochlamys kirkii* ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 13.2 $\mu\text{g/mL}$ ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 [5] และมีการรายงานถึงสารแอซิทิลเมโลโดรินที่แยกได้จาก *Artabotrys*

madagascariensis พบว่ามีฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-435 [6] ด้วย จะเห็นได้ว่า สารในกลุ่มของแอซิทิลเมโลโดริน จัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้ ในการศึกษาของ Pornticha Loluphiman [9] พบว่าสารแอซิทิลเมโลโดริน มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิดด้วยวิธี MTT assay โดยให้ค่า IC_{50} ดังนี้ เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านม (BT-474) 1.43 ± 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งตับ (HepG2) 4.32 ± 0.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) 3.10 ± 0.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620), 1.39 ± 0.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Hs27) และผลการศึกษาของสารแอซิทิลเมโลโดรินในกลไกเชิงลึกพบว่าสารแอซิทิลเมโลโดรินมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและชักนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) และลดระดับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส [9] จะเห็นได้ว่าสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินและแอซิทิลเมโลโดรินมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด ซึ่งในการศึกษานี้เป็นกึ่งเพียงการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมต่อสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินด้วย 3 วิธีการ คือ crystal violet staining, MTT assay และ clonogenic assay พบว่าสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้ ซึ่งยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด

อย่างไรก็ตามกลไกในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมของสารเจ็ดอาร์-แอซิทิลเมโลโดรินในระดับเชิงลึก เช่น การยับยั้งเซลล์มะเร็งผ่านขบวนการตายแบบอะพอพโทซิส การยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และการยับยั้งวัฏจักรเซลล์ของเซลล์มะเร็ง ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาและการทดสอบต่อไป เพื่อให้เกิดองค์ความรู้ไปสู่การพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งจากสารสกัดธรรมชาติหรือการนำไปใช้ร่วมกับวิธีการรักษาที่มีอยู่ปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยพะเยา โครงการจัดตั้งหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศ (Unit of Excellent) ด้านการวิจัยและพัฒนาเพื่อการรักษาโรคมะเร็ง (UoE62015) และกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (กสว.) ทุน Basic Research (FF64-RIB004)

เอกสารอ้างอิง

1. Alkhalaf M, El-Mowafy A, Renno W, Rachid O, Ali A, Al-Attyiah R. Resveratrol-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated primarily through the caspase-3-dependent pathway. *Archives of medical research*. 2008;39(2):162-8.
2. Núñez Selles AJ, Daglia M, Rastrelli L. The potential role of mangiferin in cancer treatment through its immunomodulatory, anti-angiogenic, apoptotic, and gene regulatory effects. *BioFactors* (Oxford, England). 2016;42(5):475-91.
3. Imran M, Arshad MS, Butt MS, Kwon J-H, Arshad MU, Sultan MT. Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):84-.
4. Chokchaisiri R, Kunkaewom S, Chokchaisiri S, Ganranoo L, Chalermglin R, Suksamran A. Potent cytotoxicity against human small cell lung cancer cells of the heptenes from the stem bark of *Xylopiya pierrei* Hance. *Medicinal Chemistry Research*. 2017;26(6):1291-6.
5. Nyandoro SS, Maeda G, Munissi JJE, Gruhonjic A, Fitzpatrick PA, Lindblad S, et al. A New Benzopyranyl Cadenane Sesquiterpene and Other Antiplasmodial and Cytotoxic Metabolites from *Cleistochlamys kirkii*. *Molecules*. 2019;24(15):2746.
6. Jung JH, Chang CJ, Smith DL, McLaughlin JL, Pummangura S, Chaichantipyuth C, et al. Additional bioactive heptenes from *Melodorum fruticosum*. *Journal of natural products*. 1991;54(2):500-5.
7. Hahnvajanawong C SW, Boonmars T, Vaeteewoottacharn K. Natural Products for Prevention and Treatment of Cholangiocarcinoma. *Srinagarind Med J*. 2012;27(suppl (Cholangiocarcinoma)):371-80.
8. Hongnak S, Jongaramruong J, Khumkratok S, Siriphong P, Tip-pyang S. Chemical Constituents and Derivatization of Melodoriol from the Roots of *Melodorum fruticosum*. *Natural Product Communications*. 2015;10(4):1934578X1501000426.
9. Pornticha Loluphiman. Effects of acetylmelodoriol and plaunotol on cancer cell lines. Bangkok : Chulalongkorn. University, 2004. 62 p.