ฤทธิ์ของสาร 7-Methoxyheptaphylline ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งประสาทของมนุษย์
Inhibitory Activity of 7-Methoxyheptaphylline on Neuroblastoma Cells

มงคลพันธ์ ตันติวัชรกุลธร[1]
กัลยา แสงฉวี[2], จันทนา บุญยะรัตน์[3]
ฉวี เย็นใจ[4], พรทิพย์ ไววุฒิ[5]

บทคัดย่อ

7-Methoxyheptaphylline (7-MH) เป็นสารกลุ่ม carbazole พบในส่องฟ้า (*Clausena harmandiana*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้สำหรับรักษาอาการปวดหัว ปวดท้อง ส่องฟ้าพบได้ในหลายพื้นที่ของประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อ ทดสอบความเป็นพิษของสาร 7-MH ต่อเซลล์มะเร็งประสาทของมนุษย์ (SHSY-5Y) และผลของสาร 7-MH ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งด้วย วิธี Western blot analysis ผลการศึกษาพบว่า สาร 7-MH มีความเป็นพิษ ต่อเซลล์มะเร็งประสาทของมนุษย์ที่ความเข้มข้น 100 μM หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์โดย phase contrast microscope แสดงให้เห็น ว่าเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่ detachment cell, shrinkage cell และ เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส การศึกษาเชิงโมเลกุลพบว่าสาร 7-MH สามารถกระตุ้นการแสดงออก cleaved ของ caspase-3 และ BAX ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ และสามารถยับยั้งการแสดงออกของ Mcl-1 และ Bcl-xL ซึ่งเกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของเซลล์ ในเซลล์มะเร็งประสาทของมนุษย์ได้

คำสำคัญ : ส่องฟ้า, 7-Methoxyheptaphylline, อะพอพโทซิส, มะเร็ง

Abstract

7-Methoxyheptaphylline (7-MH) derivatives are carbazole in *Clausena harmandiana*, a medicinal plant that is utilized for headache, stomach ache, and other treatments of illness. The present study examined the effects of 7-MH on toxicity in neuroblastoma cells (SH-SY5Y), To study the effect of 7-MH on the expression of apoptosis-related proteins in cancer disease. We used cell proliferation assay (MTT assay) for toxicity, used immunoblotting for protein expression. The results showed that 7-MH was toxic to neuroblastoma cells at a concentration of 100 μM after incubated 24h, And when examining the cell morphology by phase contrast microscope showed that 7-MH concentration at 100 μM can induced morphological changes, including detachment cells, shrinkage cells, and cell death by apoptosis. In molecular studies, we found that 7-MH can activated cleaved of caspase-3 and BAX which resulted of cell death. And it suppressed Mcl-1 and Bcl-xL, inhibitors of apoptosis in neuroblastoma cell.

Keywords : 7-Methoxyheptaphylline, cancer, *Clausena harmandiana*, apoptosis

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของสารพันธุกรรม ซึ่งทำให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างควบคุมไม่ได้ เกิดการลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียง และแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อในที่สุด (สุภัทร์ สุบงกช และคณะ , 2556) มะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆ ของคนทั่วโลก องค์การอนามัยโรครายงานว่าในปี พ.ศ. 2551 มีผู้ป่วยรายใหม่จำนวน 12.7 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งราว 7.6 ล้านคน หรือคิดเป็น 13% จากสาเหตุการเสียชีวิตของคนทั่วโลก ต่อมาในปี พ.ศ. 2555 จำนวนของผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นเป็น 8.2 ล้านคน และคาดการณ์ว่าปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้เสียชีวิตมากถึง 13 ล้านคน อุบัติการณ์ของโรคมะเร็งในประเทศไทยใน พ.ศ. 2560 พบว่ามีผู้ป่วย

[1,2,5]สาขาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ,
[3,4]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รายใหม่จำนวน 3,441 ราย และจากการรายงานของสำนักโรคไม่ติดต่อ พบว่ามีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งในปี พ.ศ. 2560 จำนวน 45,892 ราย และ พ.ศ. 2557 จำนวน 47,086 ราย การรักษาโรคมะเร็งในประเทศไทยเป็นการรักษาแบบผสมผสาน ได้แก่ การผ่าตัด การรักษาด้วยรังสี การรักษาโดยการใช้ฮอร์โมน การรักษาโดยการเพิ่มภูมิคุ้มกันให้ร่างกายเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งให้หมดจากร่างกาย และการรักษาด้วยเคมีบำบัดซึ่งเป็นวิธีที่มีความสำคัญทางคลินิก แต่ข้อเสียที่พบได้บ่อยคือยาเคมีบำบัดมีผลข้างเคียงและอาการไม่พึงประสงค์ต่อเซลล์ปกติที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งโดยเฉพาะเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เช่น เยื่อบุทางเดินอาหาร เส้นผม เม็ดเลือด ในปัจจุบันจึงมีการวิจัยที่มุ่งเน้นที่จะพัฒนายาเคมีบำบัดที่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติให้ลดลง งานวิจัยนี้สนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญจากส่องฟ้าในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญสำหรับพัฒนาสารสกัดจากต้นส่องฟ้าสำหรับใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสาร 7-MH ต่อเซลล์มะเร็งประสาทของมนุษย์ (SH-SY5Y)
2. เพื่อศึกษาผลของสาร 7-MH ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตและการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็ง

แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคมะเร็งประสาทของมนุษย์ (Neuroblastoma) เป็นโรคมะเร็งที่เกิดจากเซลล์ตัวอ่อนของระบบประสาท (Embryonic neural creast cell) ที่เรียกว่า neuroblast ที่จะเจริญต่อไปเป็นปมประสาท (Ganglion) ของประสาทซิมพาทีติค (Sympathetic nervous system) ที่กระจายอยู่ด้านข้างทั้งซ้ายและขวาตลอดความยาวของกระดูกสันหลัง รวมทั้งเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อส่วนหนึ่งของต่อมหมวกไต (Adrenal gland) ดังนั้นโรคมะเร็งนิวโรบลาสโตมาจึงเกิดได้ทั่วร่างกายตามแนวสองข้างซ้ายขวาของกระดูกสันหลัง และที่ต่อมหมวกไต ระบบประสาทซิมพาทีติค คือ ระบบประสาทที่มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของอวัยวะต่างๆ ภายในร่างกาย เช่น การบีบตัวของลำไส้ การเต้นของหัวใจ และเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาที่ตอบสนองต่อตัวกระตุ้นจากภายนอกร่างกาย เช่น ความเครียด ความกลัว ความกังวล การตกใจ เป็นต้น มะเร็งนิวโรบลาสโตมาเป็นโรคมะเร็งของเด็ก พบเป็นประมาณร้อยละ 6-10 ของมะเร็งในเด็กทั้งหมด ส่วนใหญ่พบในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี เช่นเดียวกับในโรคมะเร็งวิมส์ โดยมีการศึกษา พบว่า ประมาณร้อยละ 40 ของมะเร็งนิวโรบลาสโตมา พบในเด็กอายุต่ำกว่า 1 ปี ประมาณร้อยละ 35 พบในอายุ 1-2 ปี ประมาณร้อยละ 25 พบในอายุมากกว่า 2 ปี โดยพบในอายุมากกว่า 10 ปีและในผู้ใหญ่ได้น้อยมาก โรคมะเร็งนิวโรบลาสโตมาพบได้ในเด็กผิวขาวสูงกว่าในเด็กผิวดำ และพบในเด็กชายบ่อยกว่าในเด็กหญิงเล็กน้อย ประมาณ 1.2:1 ในประเทศไทยรายงานในปี พ.ศ. 2546 จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข พบโรคนี้ในเด็กไทยทั้งหมด 6.3 รายต่อประชากรเด็กไทย 1 ล้านคน (เกียรติคุณ ไกรพิบูลย์, 2559) ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอนของโรคมะเร็งชนิดนี้ แต่การศึกษาเชื่อว่าน่าจะเกิดจากความผิดปกติจากพันธุกรรมชนิดถ่ายทอดได้ เพราะพบโรคได้สูงขึ้นในเด็กที่ครอบครัวมีประวัติเป็นมะเร็งชนิดนี้ และอาจเกิดจากพันธุกรรมที่ผิดปกติเฉพาะตัวเด็กเอง อาการของโรคมะเร็งชนิดนี้ได้แก่ การคลำพบก้อนเนื้อผิดปกติในตำแหน่งของปมประสาทซิมพาทีติค ก้อนเนื้อนี้จะไม่เจ็บ ทั้งนี้ผู้ป่วยอาจมีไข้ต่ำๆ และอาจมีท้องเสียร่วมด้วย นอกจากนั้นจะเป็นอาการตามตำแหน่งที่เกิดโรค เช่น ถ้าโรคเกิดในช่องอกเด็กอาจมีอาการเจ็บหน้าอก หายใจเหนื่อยหอบ หายใจมีเสียงผิดปกติ หรือไอเรื้อรัง ถ้าโรคเกิดในต่อมหมวกไตมักคลำได้ก้อนในช่องท้อง ถ้าโรคเกิดในเนื้อเยื่อตาพบมีตาบวม และหนังตาตก เมื่อโรคนี้แพร่กระจายเข้าสู่กระดูกเด็กจะมีอาการร้องโยเยและไม่ยอมเดิน ปัจจุบันแนวทางการรักษาโรคมะเร็งที่เป็นที่ยอมรับจะเป็นการรักษาแบบผสมผสานของสหสาขาวิชาซึ่งประกอบด้วย 1) การผ่าตัด 2) การให้ยาเคมีบำบัด และ 3) การให้รังสีในการรักษา โดยพิจารณาตามความเหมาะสม และข้อบ่งชี้ในผู้ป่วยแต่ละราย โดยการผ่าตัดนั้นถือเป็นแนวทางหลักในการรักษาโรคมะเร็ง ส่วนการรักษาอื่นๆ ถือเป็นการรักษาเสริม (adjuvant therapy) ซึ่งการรักษาเสริมหลังการผ่าตัดนั้นขึ้นอยู่กับระยะของโรคมะเร็ง และสภาพร่างกายของผู้ป่วย (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2553) การผ่าตัด (surgery) เป็นการเอาก้อนเนื้อออกในผู้ป่วยสามารถทำได้มากในมะเร็งระยะที่ 1 (stage I CRC) โอกาสที่จะหายขาดด้วยวิธีการรักษาโดยการผ่าตัดโดยไม่ใช้การรักษาเสริมประมาณ 90 % ซึ่งจะทำการผ่าตัดในส่วนของ mesorectum ทั้งหมดออกพร้อมทั้งเนื้อเยื่อที่มี perirectal fat และ lymph node เฉพาะที่ ส่วนการรักษาด้วยรังสี (Radiation Therapy) เป็นการรักษาเสริมโดยการฉายแสงที่มีพลังงานสูงเพื่อทำลาย ลดการขยายตัวและหยุดการเจริญเติบโตของเนื้อร้าย ใช้ในผู้ที่ไม่สามารถรักษาด้วยการผ่าตัดได้ เช่น เนื้อร้ายอยู่ในตำแหน่งที่บอบบางและยากต่อการผ่าตัด หรือใช้หลังการ

ผ่าตัดที่ยังคงหลงเหลือเซลล์มะเร็งอยู่ การรักษาด้วยรังสีสามารถทำได้ด้วยกันหลายวิธี เช่น External Radiation คือการฉายรังสีที่มีพลังงานสูงผ่านชั้นผิวหนัง กะโหลก เซลล์สมอง ไปยังตำแหน่งของเนื้อร้าย โดยจะทำประมาณ 5 ครั้งต่อสัปดาห์ ใช้เวลาไม่นานต่อหนึ่งครั้ง และ Stereotactic Radiosurgery คือการทำลายเนื้อร้ายโดยการใช้รังสีที่มีพลังงานสูงจากหลายทิศทางด้วยความแม่นยำ โดยทำหลังจากมีการระบุตำแหน่งที่ชัดเจน ซึ่งทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนและใช้เวลาในการพักฟื้นน้อยกว่า และการใช้ยาเคมีบำบัดเป็นการรักษาเสริมในกรณีที่ผ่าตัดแล้วพบว่าเป็นเนื้อร้าย ก็อาจต้องอาศัยเคมีบำบัดช่วยรักษาเนื้องอกในสมองด้วยอีกทาง ซึ่งยาเคมีบำบัดที่ใช้ เช่น cyclophosphamide เป็นยาที่อยู่ในกลุ่ม alkylating agents กระบวนการออกฤทธิ์ของยาซัยโคลฟอสฟาไมด์ คือตัวยาจะออกฤทธิ์โดยการจับหรือรวมตัวกับดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็ง ทำให้ดีเอ็นเอทำหน้าที่ไม่ได้ ทำให้ไม่มีการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเกิดขึ้น และ Dinutuximab เป็นยาที่ออกฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น การกระตุ้น granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), aldesleukin (IL-2) และ 13-cis retinoic acis เป็นต้น

ส่องฟ้า ชื่อวิทยาศาสตร์ *Clausena harmandiana* เป็นไม้ล้มลุกจัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae ส่องฟ้ามีชื่อเรียกอื่นๆ ว่า หวดหม่อนต้น (ลำปาง), หัสคุณดง (โคราช), ลอดฟ้า (หล่มสัก) ลักษณะทั่วไปของส่องฟ้า เป็นสมุนไพรไทยที่พบทั่วไปในเขตร้อนชื้น และพบได้ตามป่าโปร่งทั่วภาคอีสาน มีลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 20-50 เซนติเมตร โดยใบเป็นใบประกอบแบบขนนก เรียงสลับใบย่อย มีรูปคล้ายไข่แกมวงรี ส่วนแผ่นใบมีจุดน้ำมันกระจาย เมื่อส่องดูจะมองเห็นจุดโปร่งแสงเล็กๆ กระจายทั่วทั้งใบ ออกดอกเป็นช่อที่ปลายกิ่ง โดยมีกลีบดอกสีขาวแกมเหลือง ผลสดรูปกลมรี องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของต้นไม้สกุล *Clausena* คือสารกลุ่ม carbazole alkaloids และกลุ่ม coumarins ซึ่งสารสำคัญ 7-Methoxyheptaphylline (7-MH) เป็นสารสกัดบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากรากของต้นส่องฟ้า เป็นสารในกลุ่ม carbazole alkaloids การศึกษาฤทธิ์ของสาร 7-MH ที่ผ่านมาพบว่าสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (KB cell lines) ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.21 และ 1.74 ∝g/mL และพบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ plasmodial ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.94 ∝g/mL (Thongthoom et al., 2010)

วิธีดำเนินการ

การทดสอบความเป็นของสาร 7-MH ต่อเซลล์มะเร็งประสาทของมนุษย์ (SH-SY5Y)

เพาะเลี้ยงเซลล์ SH-SY5Y ใน 96-well plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) บ่มในตู้บ่มเซลล์อุณหภูมิ 37°C หล่อเลี้ยงด้วย 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารทดสอบ หลังจากบ่มตามเวลาที่กำหนดดูดสารทดสอบออกให้หมดแล้วเติม 10% MTT ลงในหลุมๆละ 100 µl บ่มในตู้อบอุณหภูมิ 37°C หล่อเลี้ยงด้วย 5% CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลต คำนวณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{Absorbance of test well}}{\text{Control well}} \times 100$$

การศึกษาฤทธิ์ของสาร 7-MH ต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งประสาท

เติมสารทดสอบโดยการดูดอาหารเลี่ยงเซลล์เก่าออกและเติมสาร 7-MH ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 µM และ Doxorubicin ความเข้มข้น 10 mg/ml โดยเติมหลุมละ 100 µl นำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์อุณหภูมิ 37°C หล่อเลี้ยงด้วย 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานโดยใช้ Phase contrast microscopy

การเตรียมสารสกัดเซลล์

เติมสารทดสอบโดยการดูดอาหารเลี่ยงเซลล์เก่าออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1,800 µl จากนั้นทำการเติมสารทดสอบ 200 µl ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นดังนี้ หลุมที่ 1 เป็น Control เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ + DMSO หลุมที่ หลุมที่ 2 - 3 เป็นสาร 7-MH เติมที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µM หลุมที่ 4 เป็น Positive control เติม N-acetylcysteine (NAC) ความเข้มข้น 100 µM นำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์อุณหภูมิ 37°C หล่อเลี้ยงด้วย 5% CO_2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม lysate buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C หลุมละ 100 µl แช่ในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ขูดเซลล์ด้วย scraper แล้วดูดใส่ใน eppendorf

ศึกษาเชิงโมเลกุลของสาร 7-MH ต่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งประสาท โดยวิธี Western blotting analysis

แยกโปรตีนด้วย gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 60 mAmp กำลังไฟฟ้าที่ 30 watt และ

ความต่างศักย์ 500 volt เวลา 1 ชั่วโมง ทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่น gel ไปสู่ PVDF membrane เติม 1 มิลลิลิตร primary antibody (Mcl-1, Bcl-xL, BAX, Cleaved caspase-3) โดยผสมกับ antibody solution ในอัตราส่วน 1: 1,000 เติม 300 ไมโครลิตร ECL โดยเตรียมจาก Luminol enhancer solution + Peroxide solution ในอัตราส่วน 1: 1 ตรวจสอบโปรตีนบน membrane ด้วยการประกบแผ่นฟิล์มเพื่อดู band ของโปรตีนด้วยเทคนิค chemiluminescent detection ดัดแปลงวิธีจาก (Waiwut et al., 2011)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

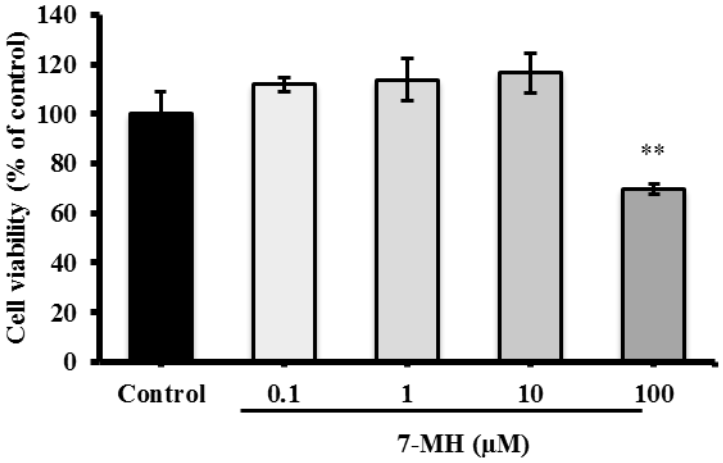
ใช้สถิติ independent t – test สำหรับการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน โดยใช้ software IMB SPSS statistics 24 ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสาร 7-MH ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ Doxorubicin และ N-acetylcysteine เป็น positive control ต่อการตายของเซลล์มะเร็งประสาทของมนุษย์ (SH-SY5Y) ผลการทดลองเป็นดังต่อไปนี้

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ SH-SY5Y ของสาร 7-MH

เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสาร 7-MH ต่อการตายของเซลล์ SH-SY5Y โดยเซลล์ถูกบ่มด้วยสาร 7-MH ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษาด้วยวิธี MTT วัดการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร คำนวณร้อยระของเซลล์ที่รอดชีวิต (% cell viability) ผลการทดลองพบว่า 7-MH ที่ความเข้มข้น 100 μM หลังการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีร้อยละของเซลล์ SH-SY5Y ที่รอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

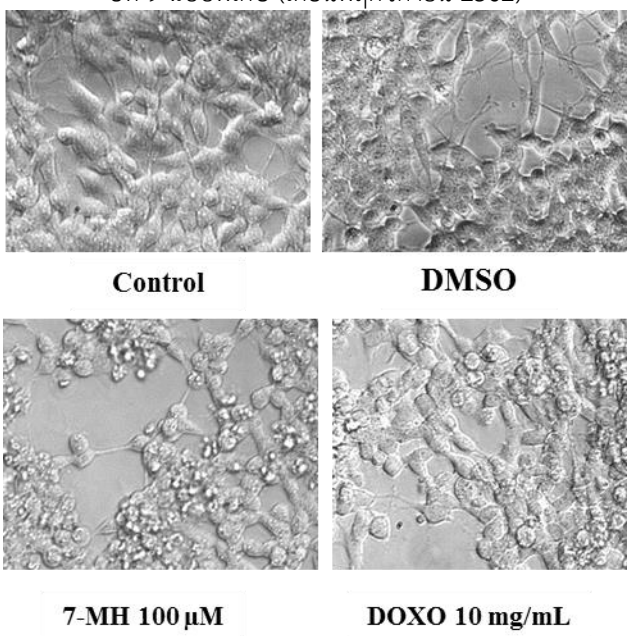


ภาพที่ 1 แสดงร้อยละของเซลล์ SH-SY5Y ที่รอดชีวิตหลังจากบ่มด้วยสาร 7-MH ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นเวลาที่ใช้ในการศึกษาหาฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง แสดงข้อมูลด้วยค่า mean ± SD (n=3),

หมายเหตุ: ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.01$

การศึกษาฤทธิ์ของสาร 7-MH ต่อการเปลี่ยนแปลสัณฐานวิทยาของ SH-SY5Y

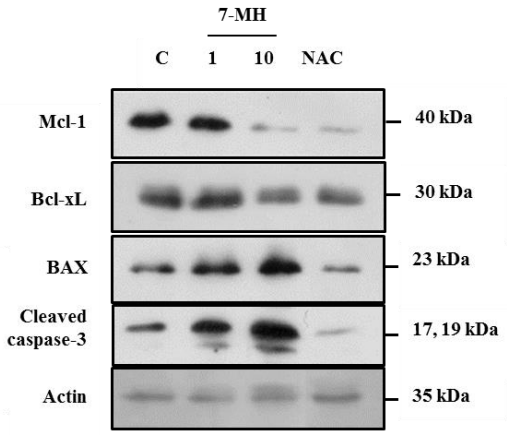
เพื่อยืนยันถึงลักษณะการการตายของเซลล์ SH-SY5Y จึงได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่มีการทดสอบฤทธิ์ด้วยสาร 7-MH และ Doxorubicin โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted phase contrast ในการบันทึกภาพเซลล์ที่เกิดขึ้น ผลการศึกษา พบว่าสัณฐานวิทยาของเซลล์ SH-SY5Y ที่ทดสอบด้วยสาร 7-MH ความเข้มข้น 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีลักษณะของเซลล์ที่เกิดการตายแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน คือมีการหดตัวเล็กลงของเซลล์ (cell shrunken) ผนังเซลล์เปลี่ยนแปลงเป็นกระเปาะหลายๆ อัน (blebs) กระเปาะที่ขอบเซลล์แตกตัวออกจากกันกลายเป็นเศษของเซลล์ (apoptotic bodies) และสัณฐานวิทยาของเซลล์ SH-SY5Y ที่ทดสอบด้วยสาร Doxorubicin ความเข้มข้น 10 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบลักษณะการตายของเซลล์คลายกับเซลล์ที่ทดสอบด้วย 7-MH แต่พบน้อยกว่า จึงสรุปได้ว่าเซลล์ SH-SY5Y เกิดการเปลี่ยนลักษณะสัณฐานวิทยาที่แสดงถึงการตายของเซลล์ภายหลังจากการทดสอบด้วย 7-MH



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ SH-SY5Y ที่ทดสอบฤทธิ์ด้วยสาร 7-MH และ Doxorubicin เมื่อสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted phase contrast

การศึกษาเชิงโมเลกุลของสาร 7-MH ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ SH-SY5Y

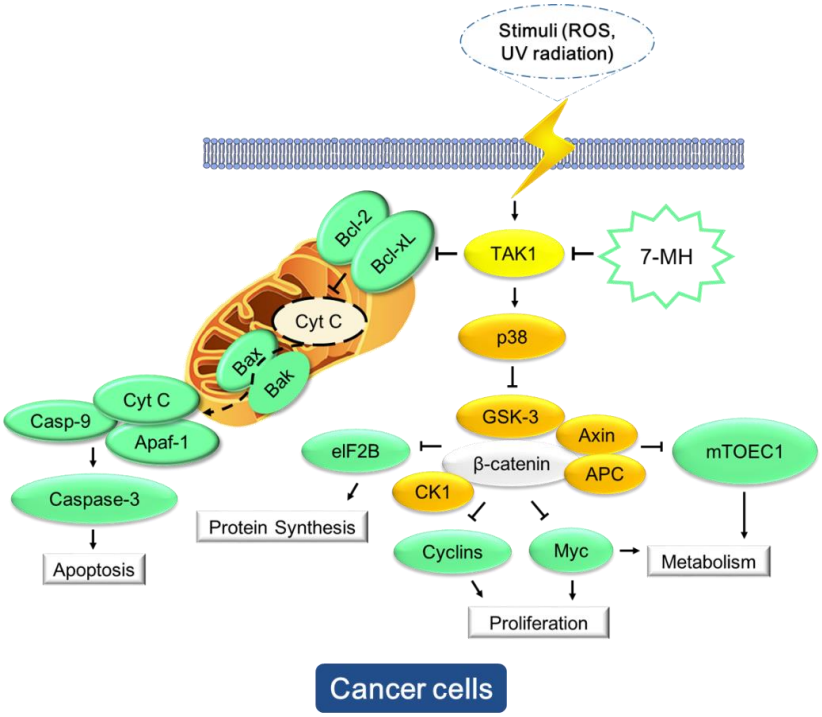
จากการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted phase contrast พบว่าเซลล์ SH-SY5Y มีการตายที่มีลักษณะคล้ายกับการตายคลายกับการตายแบบอะพอพโทซิส ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นไปที่กลไกเชิงโมเลกุลเพื่อศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิส โดยการกระตุ้นภายในเซลล์ (intrinsic pathway) โดยใช้วิธี Western blot ผลการศึกษาสาร 7-MH ด้วยการตรวจสอบโปรตีน Cleaved caspase-3 และ BAX ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในวิถีการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในแถวของ 7-MH ความเข้มข้น 10 µM และเมื่อพิจารณาโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส (anti-apoptotic protein) ได้แก่ Induced myeloid leukemia cell differentiation protein (Mcl-1) และ B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) พบว่าในแถวของ 7-MH ที่ความเข้มข้น 10 µM การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bcl-xL มีการแสดงออกลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 3 ผลการศึกษาฤทธิ์ของ 7-MH ต่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสที่พบในวิถีของโรคมะเร็งของเซลล์ SH-SY5Y

การอภิปรายผล

การทดลองแรกเป็นการศึกษาถึงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสาร 7-MH ต่อการตายของเซลล์มะเร็งประสาท โดยเซลล์ถูกบ่มด้วยสาร 7-MH ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า มีร้อยละของเซลล์มะเร็งประสาทที่รอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสาร 7-MH และสาร heptaphylline ความเข้มข้น 100 μM หลังจากทดสอบกับเซลล์เซลล์มะเร็งลำไส้ HT29 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลง 23.37 เปอร์เซ็นต์ และ 59.92 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Boonyarat et al., 2014) จากนั้นเพื่อยืนยันถึงลักษณะการการตายของเซลล์ SH-SY5Y จึงได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์ SH-SY5Y โดยการทดสอบฤทธิ์ด้วยสาร 7-MH และ Doxorubicin โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted phase contrast ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ SH-SY5Y ที่ทดสอบด้วยสาร 7-MH ความเข้มข้น 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์แตกต่างจากกลุ่ม control อย่างชัดเจน คือมีการหดตัวเล็กลงของเซลล์ (cell shrunken) ผนังเซลล์เปลี่ยนแปลงเป็นกระเปาะหลายๆ อัน (blebs) กระเปาะที่ขอบเซลล์แตกตัวออกจากกันกลายเป็นเศษของเซลล์ (apoptotic bodies) ซึ่งคล้ายกับลักษณะการตายแบบอะพอพโทซิส และสัณฐานวิทยาของเซลล์ SH-SY5Y ที่ทดสอบด้วยสาร Doxorubicin ความเข้มข้น 10 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบลักษณะการตายของเซลล์คลายกับเซลล์ที่ทดสอบด้วย 7-MH แต่พบน้อยกว่า จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าเซลล์ HT29 หลังจากทดสอบกับสาร 7-MH, heptaphylline ความเข้มข้น 100 μM และ doxorubicin ความเข้มข้น 10 mg/ml มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน คือมีการหดตัวเล็กลง และ rounding โดยพบลักษณะการตายของเซลล์มากที่สุดในสาร heptaphylline , 7-MH และ doxorubicin ตามลำดับ (Boonyarat et al., 2014) การทดลองที่ผ่านมาจากการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ SH-SY5Y ซึ่งพบว่ามีลักษณะการตายคล้ายกับการตายแบบอะพอพโทซิส ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันถึงลักษณะการตายดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาเชิงโมเลกุลของสาร 7-MH ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งประสาท การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นไปที่กลไกเชิงโมเลกุลเพื่อศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิส โดยการกระตุ้นภายในเซลล์ (intrinsic pathway) ผลการทดลองพบว่าสาร 7-MH ความเข้มข้น 10 μM มีการแสดงออกของ BAX และ Cleaved caspase-3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส (anti-apoptotic protein) ได้แก่ Induced myeloid leukemia cell differentiation protein (Mcl-1) และ B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) พบว่าในแถวของ 7-MH ที่ความเข้มข้น 10 μM มีการแสดงออกลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 4 ผลการศึกษาฤทธิ์ของ 7-MH ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งประสาท (SH-SY5Y)

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงสามารถสรุปผลการทดลองได้ว่าสาร 7-MH มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งประสาท โดยการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน Cleaved caspase-3 และ BAX และยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Mcl-1 และ Bcl-xL (รูปที่ 4) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีหน้าที่ยับยั้งกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส ในอนาคตควรทำการศึกษาสารสำคัญที่มีโครงสร้างคล้ายกันในกลุ่ม carbazoles alkaloids ที่สกัดจากส่องฟ้า เพื่อที่จะสามารถเปรียบเทียบผลของโครงสร้างที่มีฤทธิ์ต่อการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทและการตายของเซลล์มะเร็ง รวมถึงฤทธิ์อื่นๆ ของสารสำคัญ และนำไปสู่การอธิบายถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างสารกับการออกฤทธิ์ ควรศึกษาในเซลล์มะเร็งที่หลากหลายชนิดมากขึ้น เพราะสารสามารถออกฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์แต่ละชนิดได้แตกต่างกัน และควรทำการศึกษาถึงฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างเส้นเลือด และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. เกียรติคุณ ไกรพิบูลย์ และ พวงทอง ไกรพิบูลย์. (2559). มะเร็งในเด็ก. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : อมรินทร์สุขภาพ.
2. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2553). HOSPITAL-BASED CANCER REGISTRY. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : รำไทยเพรส.
3. สุภัทร์ สุบงกช และคณะ. (2556). เภสัชกรรมปฏิบัติในโรคมะเร็ง. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
4. Boonyarat C, *et al.,* (2014). Heptaphylline Induces Apoptosis in Human Colon Adenocarcinoma Cells through Bid and Akt/NF-**K**B (p65) Pathways. Asian Pac J Cancer Prev. 15(23): 10483-10487.
5. Laphookhieo, S. and Maneerat, W.(2010). Antitumoral Alkaloids from *Clausena lansium*. HETEROCYCLES. 81: 5.
6. Noipha K, *et al.,* (2010). Carbazoles and coumarins from *Clausenna harmandiana* stimulate glucose uptake in L6 myotubes. Diabates Research and Clinical Practice. 90: e67-e71.

7. Thiratmatrakul S, *et al.,* (2014). Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of novel tacrine-carbazole hybrids as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. European Journal of Medicinal Chemistry. 75: 21-30.

8. Thongthoom T, et al., (2010). Biological Activity of Chemical Constituents from Clausena harmandiana. Arch Pharm Res. 33(5): 675-680.

9. Waiwut P, *et al.,* (2011). Gomisin N enhances TRAIL-induced apoptosis via reactive oxygen species-mediated up-regulation of death receptors 4 and 5. INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY. 40: 1058-1065