

รายงาน

โครงการวิจัย

คุณสมบัติต้านออกซิเดชั่น และต้านโรคมะเร็งของ Terpene : โดย
ทำปฏิกิริยากับ ฮัยดรอกซิลแรดดิคัล ซูเปอร์ออกไซด์แรดดิคัล และ
ฮัยโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ผู้วิจัย

ผศ. จันทวรรณ แสงแข

ดร. สำรี มั่นเขตต์กรณ์

Lab. Physical Chemistry, Molecular and Cellular Biology,
Faculty of Science, Burapha University

ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินประเภทเงิน
อุดหนุนงานวิจัยปีงบประมาณ 2543 มหาวิทยาลัยบูรพา

23 ส.ค. 2552

bk 0069217
AQ 0055541

เริ่มบริการ

249080

23 ส.ค. 2552

บทคัดย่อ

การศึกษาคุณสมบัติ antioxidant และ anticancer ของโมเลกุลในกลุ่ม polyphenols 2 ชนิด คือ terpene และ apigenin ซึ่งเป็นโมเลกุลที่พบในพืช ผัก ผลไม้ ที่ใช้บริโภคเป็นอาหารประจำวัน พบว่า โมเลกุล apigenin มีศักยภาพสูงกว่า โมเลกุล terpene อย่างมีนัยสำคัญ โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง มีค่า IC_{50} ของโมเลกุล apigenin น้อยกว่าค่า IC_{50} ของโมเลกุล terpene ถึง 3 เท่า ในเซลล์มะเร็ง K562/S, K562/ADR และ 2 เท่าในเซลล์มะเร็ง GLC4/S, GLC4/ADR ตามลำดับ โมเลกุล apigenin มีประสิทธิภาพดีมากในการออกฤทธิ์เป็น chemosensitisers ร่วมกับยาต้านมะเร็ง DNR โดยมีร้อยละของค่า IC_{50} ของ DNR ลดลงเท่ากับ 53.0, 61.3, 90.7, 82.1 ในเซลล์มะเร็ง K562/S, K562/ADR, GLC4/S, GLC4/ADR ตามลำดับ แต่ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าวในโมเลกุล terpene โมเลกุลทั้งสองมีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งการทำงานของ P-gp และ MRP และไม่มีผลต่อความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย ($\Delta\Psi_m$) ในเซลล์มะเร็ง K562/S, K562/ADR, GLC4/S, GLC4/ADR ตามลำดับ เนื่องจาก ROS มีผลโดยตรงต่อ ($\Delta\Psi_m$) และระดับพลังงานในเซลล์ ในการศึกษานี้ได้เหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในภาวะ oxidative stress จากภายนอก โดยการปั๊มเซลล์ด้วย H_2O_2 และจากภายในโดยปั๊มเซลล์ด้วย BSO และ H_2O_2 ทำให้มี $\Delta\Psi_m$ ลดลงสัมพันธ์กับการตายของเซลล์ โมเลกุล apigenin ออกฤทธิ์กำจัด ROS ที่มากเกินไปในไมโทคอนเดรีย และป้องกันการตายของเซลล์ โดยเพิ่ม $\Delta\Psi_m$ 1.32, 4.77 เท่าในเซลล์มะเร็ง GLC4/S, GLC4/ADR ตามลำดับ สรุปได้ว่า โมเลกุล apigenin มีประสิทธิภาพสูงกว่าโมเลกุล terpene ในการออกฤทธิ์เสริมกับยาต้านมะเร็ง DNR ขณะเดียวกันก็มีคุณสมบัติ antioxidant ที่ไมโทคอนเดรีย

สารบัญ

บทคัดย่อ.....	1
บทที่ 1 บทนำ.....	2
1 การเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) และโรคมะเร็ง.....	2
2 การรักษาโรคมะเร็งและปัญหาการดื้อยาในเซลล์มะเร็ง.....	2
3 คุณสมบัติ antioxidants ต่อการต้านโรคมะเร็ง.....	4
4 วัตถุประสงค์.....	5
บทที่ 2 วิธีการทดลองและวัสดุที่ใช้ในการทดลอง.....	7
1 Cell culture.....	7
2 การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของโมเลกุล terpene, apigenin และ danorubicin (DNR) ต่อเซลล์ K562 และ GLC4.....	7
3 การทดสอบความเป็นพิษโดยใช้โมเลกุล terpene หรือ apigenin ร่วมกับยารักษามะเร็ง DNR.....	8
4 การเตรียมสารละลาย.....	9
5 การทดสอบจุลศาสตร์ประสิทธิภาพของโมเลกุล terpene หรือ apigenin ในการเพิ่มความเข้มข้น DNR สะสมภายในเซลล์.....	9
6 ประสิทธิภาพของโมเลกุล apigenin ต่อความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย และการกำจัด ROS ที่ไมโทคอนเดรีย.....	13
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง.....	16
1 ผลการทดลอง.....	16
2 สรุปผลการทดลอง.....	26
เอกสารอ้างอิง.....	28

สารบัญรูป

รูปที่ 1 แบบจำลองของเซลล์มะเร็งที่ไวต่อยา ดื้อต่อยา และการยับยั้งการปั๊มยาออกนอกเซลล์ โดยโมเลกุลที่เป็น INHIBITOR.....	4
รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล APIGENIN (ก) และ TERPENE (ข)	5
รูปที่ 3 จลศาสตร์การเข้าสู่เซลล์ที่ไวต่อยาและดื้อต่อยาของ DNR	12
รูปที่ 4 ภาพแสดงการทำงานของ P-GP ในเซลล์ดื้อยาที่ไม่มีโมเลกุลที่เป็น INHIBITOR (ก) และในเซลล์ดื้อยาที่มี INHIBITOR (ข)	13
รูปที่ 5 การวัดความต่างศักย์ของไมโทคอนเดรียโดย RHODAMINE B และ MTT-REDUCTION (ก) กราฟมาตรฐาน (CALIBRATION CURVE) ระหว่างความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย กับ อัตราเร็วของการสะสม RHODAMINE B ในไมโทคอนเดรีย (ข)	15
รูปที่ 6 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า IC_{50} ของ DNR ระหว่าง โมเลกุล TERPENE และ APIGENIN ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งร่วมกับ DNR.....	19
รูปที่ 7 ประสิทธิภาพของโมเลกุล APIGENIN ต่อการลดลงของการซึมผ่านของสัญญาณ RHODAMINE B ในเซลล์มะเร็ง K562 และ GLC4 ที่ดื้อต่อยา และที่ไวต่อยาตามลำดับ.....	22
รูปที่ 8 การซึมผ่านของสัญญาณ RHODAMINE B ในเซลล์ที่บ่มด้วย H_2O_2 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สเปกตรัมแสดงข้อมูลเชิงคุณภาพของสัญญาณ RHODAMINE B (ก) ประสิทธิภาพของโมเลกุล APIGENIN ต่อการกำจัด ROS ที่ไมโทคอนเดรีย (ข).....	24
รูปที่ 9 การซึมผ่านของสัญญาณ RHODAMINE B ในเซลล์ที่บ่มด้วย BSO 50 μM เป็นเวลา 20 – 24 ชั่วโมง และบ่มต่อด้วย H_2O_2 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สเปกตรัมแสดงข้อมูลเชิงคุณภาพของสัญญาณ RHODAMINE B (ก) ประสิทธิภาพของโมเลกุล APIGENIN ต่อการกำจัด ROS ที่ไมโทคอนเดรีย (ข).....	25
รูปที่ 10 สเปกตรัมแสดงประสิทธิภาพของโมเลกุล APIGENIN ต่อการเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านของสัญญาณ RHODAMINE B ในเซลล์มะเร็ง GLC4/ADR โดยบ่มด้วย BSO 50 μM เป็นเวลา 20–24 ชั่วโมง และบ่มต่อด้วย H_2O_2 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....	26

สารบัญคำย่อ

DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
$O_2^{\cdot -}$	Superoxide anion
$OH^{\cdot}$	Hydroxyl radical
H_2O_2	Hydrogenperoxide
MDR	Multidrug resistance
P-gp	P-glycoprotein
MRP1	Multidrug resistance associated protein
ATP	Adenosine-triphosphate
$\Delta\psi_m$	mitochondrial membrane potential
EGFR	Epidermal growth factor receptor
MAPKs	Mitogen-activated protein kinase
DNR	Daunorubicin
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2-5-diphenyl-tetrazolium bromide
BSO	DL-Buthionine-[S,R]-Sulfoximine

บทที่ 1 บทนำ

มะเร็งเป็นโรคที่ซับซ้อน เป็นผลสืบเนื่องมาจากกรรมพันธุ์ และการเปลี่ยนแปลงหน้าที่กลไกการทำงานของเซลล์รวมถึง การลอกของ DNA (DNA replication) การซ่อมแซม DNA (DNA repair) การถอดรหัส (transcription) การดำเนินการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ RNA (RNA processing) วงชีวิตของเซลล์ (cell cycle process) โปรแกรมการตายของเซลล์ (programmed cell death) ทำให้สูญเสียความสามารถในการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ สาเหตุที่สำคัญคือการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) [1-2]

1 การเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) และโรคมะเร็ง

อนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในระบบการทำงานของร่างกาย ในภาวะปกติของสิ่งมีชีวิตออกซิเจนสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นสารประกอบที่เรียกว่า reactive oxygen species (ROS) ซึ่งมีหลายชนิดได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion) (O_2^-) ฮัยดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radical) ($OH^\cdot$) และกลุ่มอนุพันธ์ที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระได้แก่ ฮัยโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) หรือ (H_2O_2) เป็นต้น ไมโตคอนเดรียยังเป็นแหล่งกำเนิด ROS ที่สำคัญมากจากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโตคอนเดรีย ประมาณ 2% ของออกซิเจนที่ใช้ในไมโตคอนเดรีย ถูกรีดิวซ์กลายเป็น O_2^- และเกิดปฏิกิริยา dismutation โดยเอนไซม์ manganese-superoxide dismutase กลายเป็น H_2O_2 [3-5] ROS ที่มีความไวสูงจะถูกผลิตขึ้นเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะในสภาวะที่เกิดพยาธิสภาพ ROS สามารถทำลายชีวโมเลกุลได้ทุกชนิดโดยก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่แล้วไปทำลายพันธะในสารประกอบโมเลกุลใหญ่ (macromolecules) ก่อให้เกิดพยาธิสภาพด้วยการทำลาย DNA โปรตีน ไขมัน ฮอริโมน เอนไซม์ เปลี่ยนแปลงการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์ตาย ก่อให้เกิดโรคต่างๆมากมายโดยเฉพาะโรคมะเร็ง [6-8]

2 การรักษาโรคมะเร็งและปัญหาการดื้อยาในเซลล์มะเร็ง

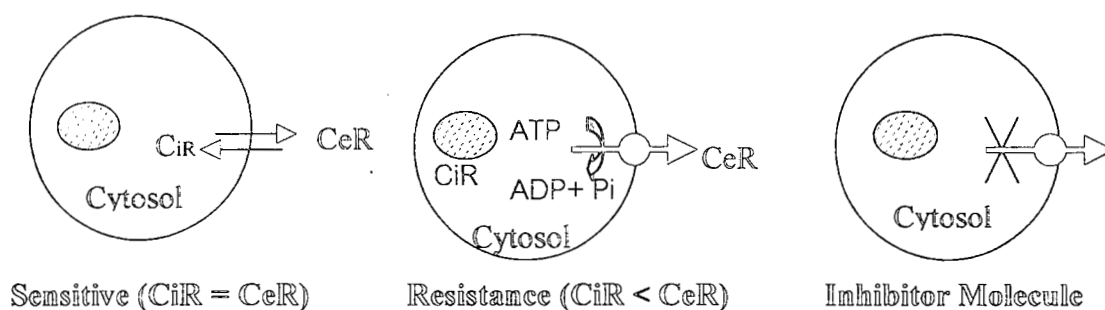
การรักษาโรคมะเร็งวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ การให้ยาเคมีบำบัด (chemotherapy) โมเลกุลยาส่วนมากออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ โดยมีเป้าหมายการออกฤทธิ์ที่ DNA ทำให้สาย DNA ถูกทำลาย ผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัดคือการเกิด ROS ซึ่งทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโมเลกุลข้างเคียงเป็นแบบไม่เฉพาะเจาะจง จึงทำให้ร่างกายเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เพิ่มขึ้นผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดระยะหนึ่งแล้ว ส่วนมากจะเกิดปัญหาการดื้อยาหรือยาไม่ตอบ

สนองต่อการทำลายเซลล์มะเร็ง (multidrug resistance) หรือ (MDR) ทำให้ต้องเพิ่มขนาดของยาที่ใช้รักษา ขณะเดียวกันก็จะเกิดผลข้างเคียงตามมามากขึ้นตามลำดับ [9-10]

ปัญหาหลักของการดื้อยาแบบ MDR ทำให้มีการสะสมของยาที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ต่ำ และเซลล์ MDR จะแสดงการดื้อต่อยาอีกหลายชนิด โดยไม่มีความสัมพันธ์ทั้งทางโครงสร้างทางเคมี และวิธีการออกฤทธิ์ของโมเลกุล เป็นการดื้อยาแบบ cross resistance เกี่ยวข้องกับปรากฏการณ์ที่สำคัญที่มีโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์เรียกว่า P-glycoprotein (P-gp) ที่ถูกควบคุมการสร้างโดยยีน *mdr* และเกี่ยวข้องกับโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์อีกชนิดหนึ่งเรียกว่า multidrug resistance associated protein (MRP protein) ที่ถูกควบคุมการสร้างโดยยีน *mrp* การทำงานของ MRP protein ต้องการ glutathione ที่อยู่ในรูปรีดิวส์ (reduced form) จะเกาะกับยาแล้วคอมเพล็กซ์นี้จะถูกขับออกนอกเซลล์ โปรตีนทั้งสองชนิดทำหน้าที่ขับยาออกนอกเซลล์โดยอาศัย ATP ทำให้ความเข้มข้นของยาดำไม่เพียงพอที่จะยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง [11-12] นอกจากนี้ สาเหตุอื่นของการดื้อยาแบบ MDR ยังเกิดจากการสะสมของยาในส่วนต่างๆ ของเซลล์ได้แก่ ไมโทคอนเดรีย lysosomes, golgi bodies [13-14] การเพิ่มความเป็นเบสในไซโตพลาสซึม ทำให้ยาสะสมที่เป้าหมายลดลง [15]

การที่เซลล์ MDR สามารถต้านความแตกต่างของความเข้มข้นของยาระหว่างภายนอกเซลล์ และภายในเซลล์ เนื่องมาจากการปั๊มยาของ P-gp ซึ่งต้องใช้ ATP "สถานะภาพพลังงานของเซลล์ MDR จะต้องมีการใช้พลังงานสูงกว่าในเซลล์ปกติหรือในเซลล์ที่ไม่ดื้อยา" [16] การสังเคราะห์ ATP ภายในเซลล์มีอยู่ 2 ขบวนการคือ glycolysis ที่เกิดขึ้นใน cytoplasm โดยสารตั้งต้นที่เป็น glucose จะถูกเปลี่ยนเป็น pyruvate ซึ่งขบวนการนี้มีการสร้าง 2 mole ATP และ ขบวนการ oxidative phosphorylation ซึ่งเกิดในเมมเบรนด้านในของไมโทคอนเดรียซึ่งให้ 30 mole ATP คิดเป็น 90-95% ของ ATP ที่สร้างขึ้นในเซลล์ [17] และเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของเซลล์ นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียยังเป็นแหล่งกำเนิด ROS และในภาวะที่ ROS เกิดขึ้นมากอย่างไม่สมดุล จะมีผลโดยตรงต่อการลดลงของความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย ($\Delta\psi_m$) และการตายของเซลล์ ซึ่ง $\Delta\psi_m$ จะเป็นตัวบ่งชี้โดยตรงถึงสถานะพลังงานที่เกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย โดยจะสัมพันธ์ถึงความสามารถในการสร้าง ATP ของเซลล์

แนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการดื้อยาแบบ MDR คือ (1) การค้นหาโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็น substrate ของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย เพื่อยับยั้งการปั๊มยาออกนอกเซลล์ (รูปที่ 1) (2) ตรวจเลือกโมเลกุลที่สามารถเปลี่ยนแปลงสถานะภาพพลังงานของเซลล์ MDR โดยเฉพาะโมเลกุลที่สามารถลดความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย



CiR = ความเข้มข้นของยาภายในเซลล์

CeR = ความเข้มข้นของยาภายนอกเซลล์

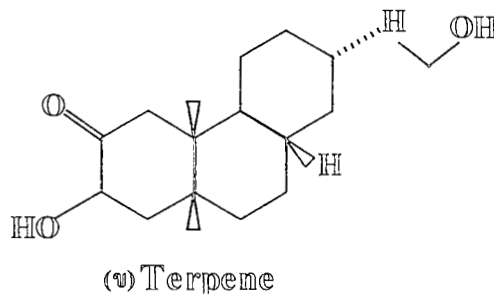
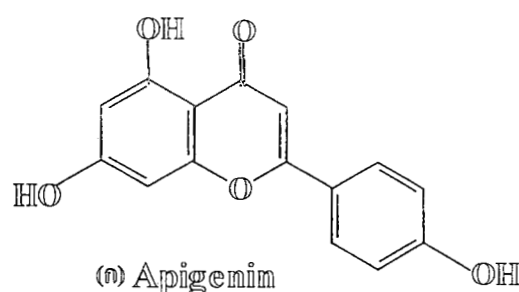
รูปที่ 1 แบบจำลองของเซลล์มะเร็งที่ไวต่อยา คือต่อยา และการยับยั้งการปั๊มยาออกนอกเซลล์ โดยโมเลกุลที่เป็น INHIBITOR

3 คุณสมบัติ antioxidants ต่อการต้านโรคมะเร็ง

เซลล์มีกลไกต่าง ๆ มากมายที่จะป้องกันการทำลายโดย ROS กลไกที่เป็น antioxidants เหล่านี้รวมถึงเอนไซม์หลายชนิดได้แก่เอนไซม์ catalase, glutathione peroxidase (ทำหน้าที่เปลี่ยน H_2O_2 ให้เป็นออกซิเจนและน้ำ) และเอนไซม์ superoxide dismutase (ทำหน้าที่เปลี่ยน O_2^- ให้เป็น H_2O_2 และออกซิเจน) [18-19] นอกจากเอนไซม์ต่าง ๆ เหล่านี้แล้วยังมีสาร antioxidants ที่เป็นโมเลกุลเล็กๆ ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี carotene, terpene, flavonoid เป็นต้น antioxidants จากภายนอกร่างกายจะพบอยู่ในผัก ผลไม้ เมล็ดของพืชหลายชนิด แนวคิดในการป้องกันรักษาโรคมะเร็งหรือโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระ จึงได้มุ่งไปที่การค้นหาและใช้โมเลกุลที่เป็นสารสกัดจากธรรมชาติ ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งปฏิกิริยาถูกใช้จากอนุมูลอิสระ และยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง โดยที่โมเลกุลนี้ไม่สามารถถูกขับออกนอกเซลล์ MDR และไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์

ในประเทศที่บริโภคอาหารประเภท ผัก ผลไม้ ถั่วเหลือง หรือธัญพืชที่มีส่วนประกอบของโมเลกุล polyphenols จะพบว่าอัตราการเกิดโรคมะเร็งต่ำ และโรคมะเร็งที่ต่อมลูกหมากต่ำกว่าประเทศที่บริโภคอาหารดังกล่าวน้อย ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของโมเลกุลในกลุ่ม polyphenols นอกจากนี้โมเลกุลในกลุ่ม polyphenols ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอีกมากมายได้แก่ต้านอนุมูลอิสระ ต้านภูมิแพ้ ต้านการอักเสบ ต้านไวรัส [20] คณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาโมเลกุลในกลุ่ม polyphenols 2 ชนิด คือ terpenoid และ flavonoid (apigenin) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2

โดยมีการศึกษาโมเลกุล apigenin แล้วพบว่าสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งโดย ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase ยับยั้งเฟคเตอร์ที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ epidermal growth factor receptor (EGFR), mitogen-activated protein kinase (MAPKs) [21] นอกจากนี้ยังกระตุ้น apoptosis โดยลดความต่างศักย์ของไมโทคอนเดรีย [22] อย่างไรก็ตามการศึกษาในเซลล์ที่ต่างชนิดกันก็จะได้ผลที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งการเข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ของโมเลกุล polyphenols ต่อเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาแบบ MDR จะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมกรรมการบริโภคอาหารเพื่อป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง และยับยั้งผลข้างเคียงที่เกิดจากการรักษาโรคมะเร็ง



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล APIGENIN (ก) และ TERPENE (ข)

4 วัตถุประสงค์

โมเลกุลในกลุ่ม polyphenols หลายชนิดที่สกัดได้จากพืชในประเทศไทย สามารถกำจัดอนุมูลอิสระของออกซิเจนได้ดี และมีคุณสมบัติต้านมะเร็งในระดับห้องทดลอง แต่ศักยภาพของโมเลกุลที่สามารถใช้เป็นยา ยังไม่ได้รับการศึกษาที่แท้จริง โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ดังนี้

- 4.1 ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาแบบ MDR ของโมเลกุลในกลุ่ม polyphenols 2 ชนิดคือ terpenoid และ flavonoid
- 4.2 ศึกษาประสิทธิภาพของโมเลกุลในกลุ่ม polyphenols ในการยับยั้งการปั๊มยาออกนอกเซลล์โดยโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ชนิด P-gp และ MRP protein
- 4.3 ศึกษาประสิทธิภาพของโมเลกุลในกลุ่ม polyphenols ในการเปลี่ยนแปลงสถานะพลังงานในไมโทคอนเดรียของเซลล์ MDR
- 4.4 ศึกษาประสิทธิภาพของโมเลกุลในกลุ่ม polyphenols ในการยับยั้งอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์ที่อยู่ในภาวะเครียด

บทที่ 2 วิธีการทดลองและวัสดุที่ใช้ในการทดลอง

1 Cell culture

เซลล์มะเร็งที่ใช้เป็น model ในการทดลองที่อยู่ในกลุ่ม cell line มี 2 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งที่เป็น systemic cancer ชนิด erythromyoleukemic cell ทั้งชนิดไวต่อยา (K562/S) และดื้อต่อยา adriamycin (K562/ADR) ซึ่งมีการ expression ของ P-gp ที่ผนังเยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์มะเร็งอีกชนิดหนึ่งเป็น solid cancer ชนิด small cell lung carcinoma ทั้งชนิดที่ไวต่อยา (GLC4/S) และดื้อต่อยา adriamycin (GLC4/ADR) ซึ่งมีการ expression ของ MRP1 ที่ผนังเยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์ที่ดื้อต่อยาทั้งชนิด K562/ADR และ GLC4/ADR จะถูกบ่มด้วย 100 nM doxorubicin เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ก่อนทำการทดลอง และตรวจการมีชีวิตของเซลล์ก่อนทำการทดลองทุกครั้งด้วยการย้อม trypan blue โดยเซลล์ที่ตายแล้วจะสูญเสียคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน ตลอดระยะเวลาในการทดลอง พบการตายของเซลล์ก่อนการทดลองแต่ละชุดไม่เกิน 1-2 %

เซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด RPMI 1640 โดยเติม 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin - streptomycin บ่มในตู้ควบคุมความชื้นของ CO_2 โดยปรับอุณหภูมิให้มีค่า 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% และความชื้นของ $\text{CO}_{2(g)}$ 5% เตรียมเซลล์เริ่มต้น 10^5 cell/ml โดยเซลล์จะเจริญเข้าสู่ระยะ exponential phase ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งจะได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นประมาณ $0.8 - 1 \times 10^6$ cell/ml ถ้าเตรียมเซลล์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 5×10^5 cell/ml เซลล์จะเข้าสู่ระยะ exponential phase ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นประมาณ $0.8 - 1 \times 10^6$ cell/ml การนับจำนวนเซลล์ทำโดยใช้ hemocytometer

2 การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของโมเลกุล terpene, apigenin และ danorubicin (DNR) ต่อเซลล์ K562 และ GLC4

เตรียมเซลล์ที่มีความเข้มข้น 5×10^4 cell/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่มีปริมาตรสุทธิ 1 มิลลิลิตร ในภาชนะเลี้ยงเชื้อ 24 หลุม ที่เคลือบด้วย polystyrene และเติมความเข้มข้นของโมเลกุลที่ต้องการทดสอบ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 12 ความเข้มข้น ในกลุ่ม control จะไม่เติมโมเลกุล จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมความชื้นของ CO_2 โดยปรับอุณหภูมิให้มีค่า 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% และความชื้นของ $\text{CO}_{2(g)}$ 5% เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

จากนั้นนำเซลล์ที่เลี้ยงทั้งที่เติมยาและไม่เติมยาไปนับจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค MTT-reduction โดยเติม 200 μl ของ MTT (0.083 g/l) แล้วนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์

ไปป็นแยก และล้างตะกอน formazan ในเซลล์ที่มีชีวิต MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) สามารถผ่านเข้าเซลล์ไปเป็น substrate ของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโทคอนเดรีย การเกิด reduction ของ MTT จะได้ผลผลิตเป็น formazan ซึ่งปริมาณ formazan จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อนำ formazan มาละลายด้วยสารอินทรีย์ DMSO (dimethyl sulphoxide) จะให้สารละลายสีม่วงและเมื่อมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm

ประสิทธิภาพของโมเลกุลแสดงโดยค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของโมเลกุลที่ทดสอบสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ 50 % และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ (%IC) คำนวณได้จากความสัมพันธ์ต่อไปนี้

$$\%IC = 100 \times \left\{ \frac{[Abs_{560}(\text{control}) - Abs_{560}(5 \times 10^4 \text{ Cells})] - [Abs_{560}(\text{drug}) - Abs_{560}(5 \times 10^4 \text{ Cells})]}{[Abs_{560}(\text{control}) - Abs_{560}(5 \times 10^4 \text{ Cells})]} \right\}$$

$Abs_{560}(\text{control})$ = ความเข้มของการดูดกลืนแสงที่ 560 nm โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารไม่มีโมเลกุล

$Abs_{560}(\text{drug})$ = ความเข้มของการดูดกลืนแสงที่ 560 nm โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารมีโมเลกุล

$Abs_{560}(5 \times 10^4)$ = ความเข้มของการดูดกลืนแสงที่ 560 nm จำนวนเซลล์ = 5×10^4 เซลล์/มิลลิตร

3 การทดสอบความเป็นพิษโดยใช้โมเลกุล terpene หรือ apigenin ร่วมกับยารักษามะเร็ง DNR

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2 และใช้ความเข้มข้นของโมเลกุล terpene คงที่ 2, 4, 6 μM และโมเลกุล apigenin คงที่ 2, 4, 6, 8 μM โดยเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของ DNR เพิ่มขึ้นตามลำดับ

ประสิทธิภาพของโมเลกุล terpene และ apigenin ที่สามารถเสริมฤทธิ์กับยารักษามะเร็ง DNR ต่อเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาแบบ MDR และเซลล์มะเร็งที่ไวต่อยา สามารถคำนวณได้จากความสัมพันธ์ต่อไปนี้

$$\%IC_{DNR} = \frac{100 \times [IC_{50(DNR)} - IC_{50(DNR+Molecule)}]}{IC_{50(DNR)}}$$

$IC_{50\ DNR}$ = ความเข้มข้นของ DNR ที่ยับยั้งการแบ่งตัวของ MDR cell ได้ 50%

$IC_{50\ DNR + \text{โมเลกุล}}$ = ความเข้มข้นของ DNR ที่ยับยั้งการแบ่งตัวของ MDR cell ได้ 50% ในสภาวะที่มีโมเลกุล terpene หรือ apigenin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

4 การเตรียมสารละลาย

สารละลายบัฟเฟอร์ Hepes- Na^+ ประกอบด้วย NaCl 132 mM, KCl 3.5 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, Hepes 20 mM และ Glucose 5 mM ละลายในน้ำกลั่น 2 ครั้งโดยมีค่าความต้านทาน $-18\ M\Omega$ ปรับ pH เป็น 7.3 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยสารละลาย NaOH 0.1 N

สารละลาย DNR เข้มข้นประมาณ 10^{-4} M ถูกเตรียมก่อนใช้งานและวัดความเข้มข้นด้วย spectrophotometer รุ่น UV-2501 PC Shimadzu โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (molar extinction coefficient) ที่ 480 นาโนเมตร เท่ากับ $11500\ mol^{-1}.cm^{-1}.L$

5 การทดสอบจุลศาสตร์ประสิทธิภาพของโมเลกุล terpene หรือ apigenin ในการเพิ่มความเข้มข้น DNR สะสมภายในเซลล์

การศึกษานี้ทำโดยใช้เทคนิค spectrofluorometry ซึ่งเทคนิคนี้มีความแม่นยำสูงและมีประสิทธิภาพสูงทำให้สามารถวัดความเข้มข้นของยาที่เรืองแสง ในเซลล์โดยไม่ทำลายเซลล์และสมดุลของระบบ เทคนิค fluorescence นี้ตั้งอยู่บนพื้นฐานของการสังเกตการเรืองแสงของโมเลกุล DNR ซึ่งความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงจะลดลง (quenching) เมื่อโมเลกุล DNR เข้าไปสอดอยู่ระหว่างคู่เบสของ DNA โดยพบว่าการเกิด quenching จะเกิดอย่างรวดเร็วทั้งในกรณีของ DNA ที่อยู่ในรูปของสารละลายและใน isolated nucleus ของเซลล์

Fezard *et al.* [23-25] พบว่าโมเลกุล anthracyclines ในรูป neutral สามารถซึมผ่าน (passive diffusion) เข้าไปในเซลล์ และปฏิกริยาระหว่าง anthracyclines และ liposomes หรือเซลล์ที่ไม่มี nucleus เช่น platelets และเม็ดเลือดแดง ไม่ปรากฏการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการเรืองแสงของ anthracyclines แต่พบว่าปฏิกริยาระหว่าง anthracyclines และ DNA ทำให้สัญญาณการเรืองแสงดับ (quenching) อย่างรวดเร็วทั้งในกรณีของ DNA ที่อยู่ในรูปของสารละลายและใน

isolated nucleus ของเซลล์ เช่นในกรณีของ DNA ที่อยู่ในรูปของสารละลาย จะเกิดภายในเวลาต่ำกว่า 1 วินาที ในขณะที่ isolated nucleus ของเซลล์จะเกิดภายในเวลา 10-15 วินาที แต่ในกรณีที่ เป็น intact cell ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่มี anthracyclines สัญญาณการเรืองแสงของ โมเลกุลจะลดลงช้ากว่าอย่างมีนัยสำคัญทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ anthracyclines

การซึมผ่านของโมเลกุล anthracyclines ไปยัง nucleus ถูกทำให้ช้าลงเนื่องจากมี เมมเบรน เป็นตัวจำกัด (limiting step) การลดลงของสัญญาณการเรืองแสงต่อเวลาคือความเร็วในการซึมผ่าน ของโมเลกุล anthracyclines ผ่านเมมเบรนของเซลล์

5.1 การวัดปริมาณ anthracyclines ที่สอดอยู่ระหว่างคู่เบสของ DNA ภายใน nucleus ของ เซลล์

ให้ F_0 คือความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงของ anthracyclines ที่เวลา $t = 0$ ซึ่งแสดงถึง ความเข้มข้นของ anthracyclines ที่เติมลงใน cuvette ที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเซลล์แขวนลอย อยู่ กวนให้สม่ำเสมอและควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ของเครื่อง spectrofluorometer (LS50B, Perkin Elmer)

ในกรณีของเซลล์ที่ไวต่อยาหรือเซลล์ที่ดื้อต่อยา สัญญาณการเรืองแสง ต่อเวลา $F = f(t)$ จะ ลดลงและคงที่ในที่สุด ซึ่งหมายถึงระบบ anthracyclines - cells จะเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady - state) โดยความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงเท่ากับ F_n (รูปที่ 3)

การลดลงของสัญญาณการเรืองแสงของ anthracyclines แสดงถึงปริมาณของ anthracyclines โดยรวมที่เข้าไปสอดอยู่ระหว่างคู่เบสของ DNA ภายใน nucleus ของเซลล์ ใช้ สัญลักษณ์ C_n

$$C_n = \frac{(F_0 - F_n)}{F_0}$$

เมื่อ C_T คือความเข้มข้นของ anthracyclines ที่เติมลงไปในสารละลายที่มีเซลล์

ระบบ anthracyclines - cells เข้าสู่สภาวะสมดุล (equilibrium state) โดยเติม 0.01 % (v/v) ของสารละลาย triton X-100 เพื่อ permeable plasma membrane ซึ่งที่สภาวะสมดุลนี้ความเข้มของ สัญญาณการเรืองแสงใช้สัญลักษณ์ F_n และความเข้มของ anthracyclines รวมใน nucleus คือ C_N

$$C_N = \frac{C_T(F_0 - F_N)}{F_0}$$

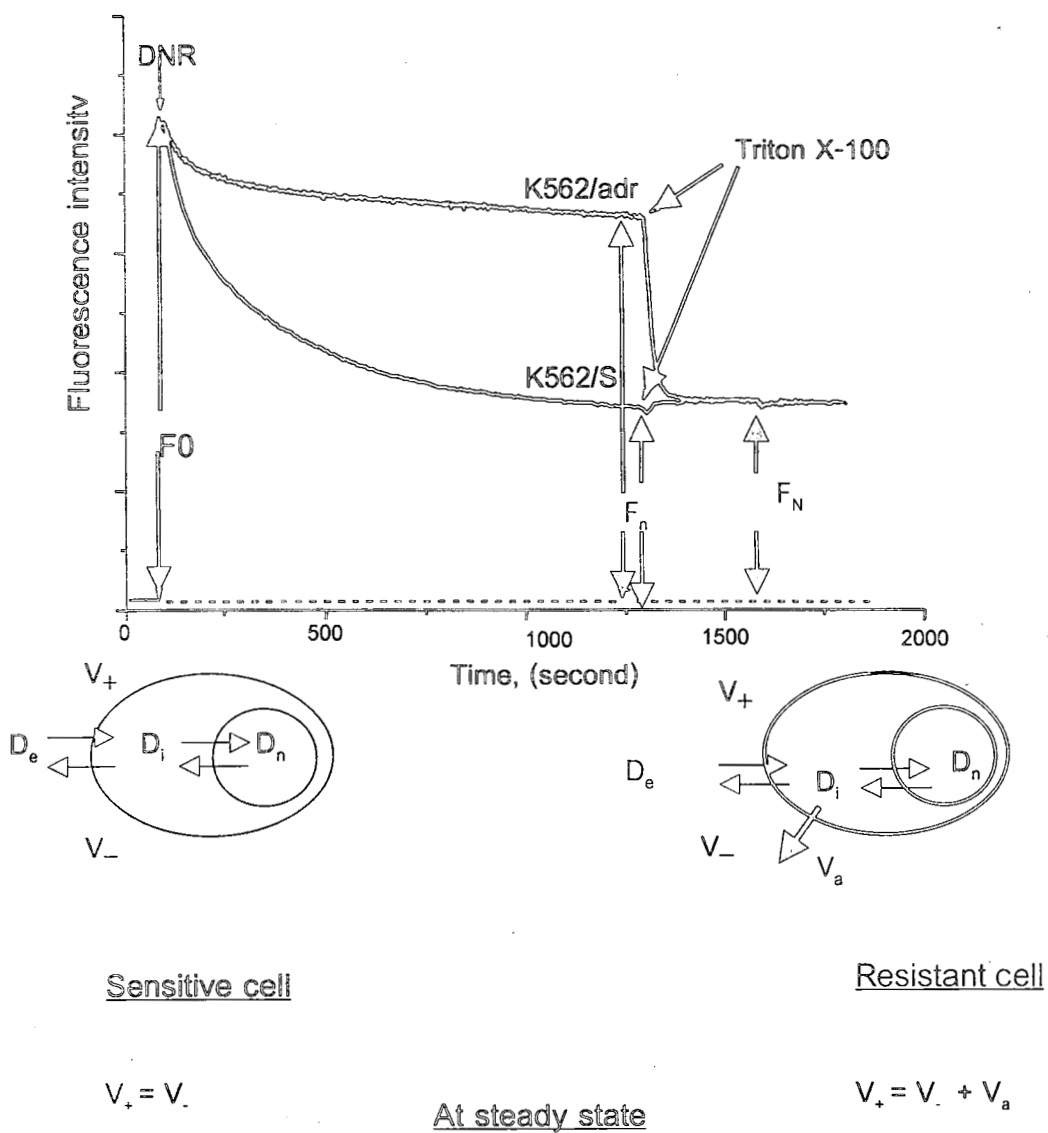
5.2 การยับยั้งการปั๊มยาออกนอกเซลล์ของ P-glycoprotein ด้วยโมเลกุล terpene และ apigenin

การศึกษากลไกของโมเลกุลต่อการทำงานของ P-gp กระทำโดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเซลล์ที่ดื้อยาปั๊มกับ anthracycline 1 μM เมื่อระบบเข้าสู่สภาวะคงที่ จึงเติมโมเลกุลที่ทดสอบลงไปรอจนระบบเข้าสู่สภาวะสมดุลใหม่ (รูปที่ 3) และ (รูปที่ 4) ซึ่งสัญญาณความเข้มแสงที่สภาวะสมดุลใหม่นี้ให้สัญญาณการเรืองแสงเท่ากับ F_n' และความเข้มข้นของ anthracycline รวมที่สะสมใน nucleus ของเซลล์มีค่าเท่ากับ

$$C_n' = \frac{C_T(F_0 - F_n')}{F_0}$$

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของ P-gp (α) คำนวณได้จากความสัมพันธ์

$$\alpha = \frac{(C_N - C_n')}{(C_N - C_n)}$$

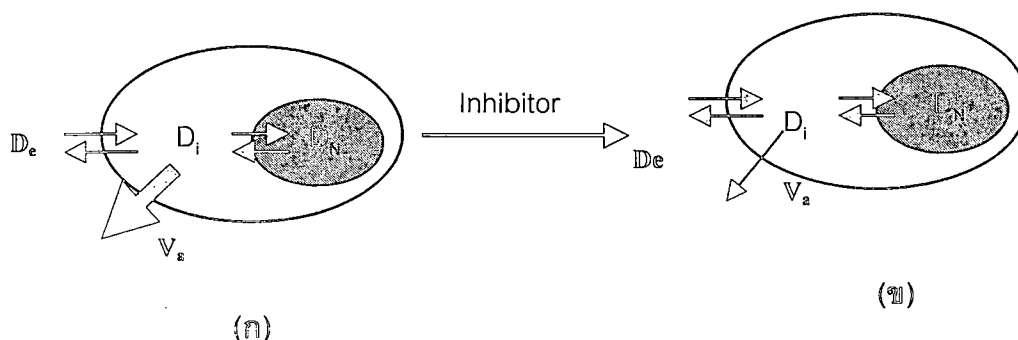


รูปที่ 3 จลศาสตร์การเข้าสู่เซลล์ที่ไวต่อยาและดื้อต่อยาของ DNR

F₀, F_n, F_N ความเข้มของสัญญาณเรืองแสงของ DNR ที่เวลา t=0, ที่สภาวะคงที่ และ ที่สภาวะสมดุล

D_e, D_i, D_n ความเข้มข้นของ DNR ที่อยู่นอกเซลล์ ที่อยู่ในไซโตพลาสซึม และที่อยู่ในนิวเคลียส

V₊, V₋, V_a ความเร็วของ DNR ที่ซึมผ่านเข้าเซลล์ ที่ซึมผ่านออกนอกเซลล์ และที่ถูกปั๊มออกนอกเซลล์



รูปที่ 4 ภาพแสดงการทำงานของ P-GP ในเซลล์ดื้อยาที่ไม่มีโมเลกุลที่เป็น INHIBITOR (ก) และในเซลล์ดื้อยาที่มี INHIBITOR (ข)

D_e = ความเข้มข้นของยานอกเซลล์

D_i = ความเข้มข้นของยาในไซโตพลาสซึม

D_N = ความเข้มข้นของยาในนิวเคลียส

V_a = ความเร็วในการปั๊มยาออกนอกเซลล์

6 ประสิทธิภาพของโมเลกุล apigenin ต่อความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย และการกำจัด ROS ที่ไมโทคอนเดรีย

6.1 การวัดความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรียในขณะที่เซลล์มีชีวิต

การวัดความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรียในขณะที่เซลล์มีชีวิต ศึกษาโดย spectrofluorescence ใช้เทคนิค colocalization ของโมเลกุล rhodamine B กับ MTT - reduction เนื่องจาก rhodamine B มีคุณสมบัติเป็น substrate ที่แย่งที่สุดของ P-gp และไม่เป็น substrate ของ MRP1 ทำให้ rhodamine B ถูกปั๊มออกนอกเซลล์ได้น้อยใน MDR เซลล์ นอกจากนี้ rhodamine B ยังมีคุณสมบัติเป็น lipophilic cation จึงมีเป้าหมายการสะสมอย่างเฉพาะเจาะจงที่ไมโทคอนเดรียตามลาดความต่างศักย์ของเมมเบรน [26]

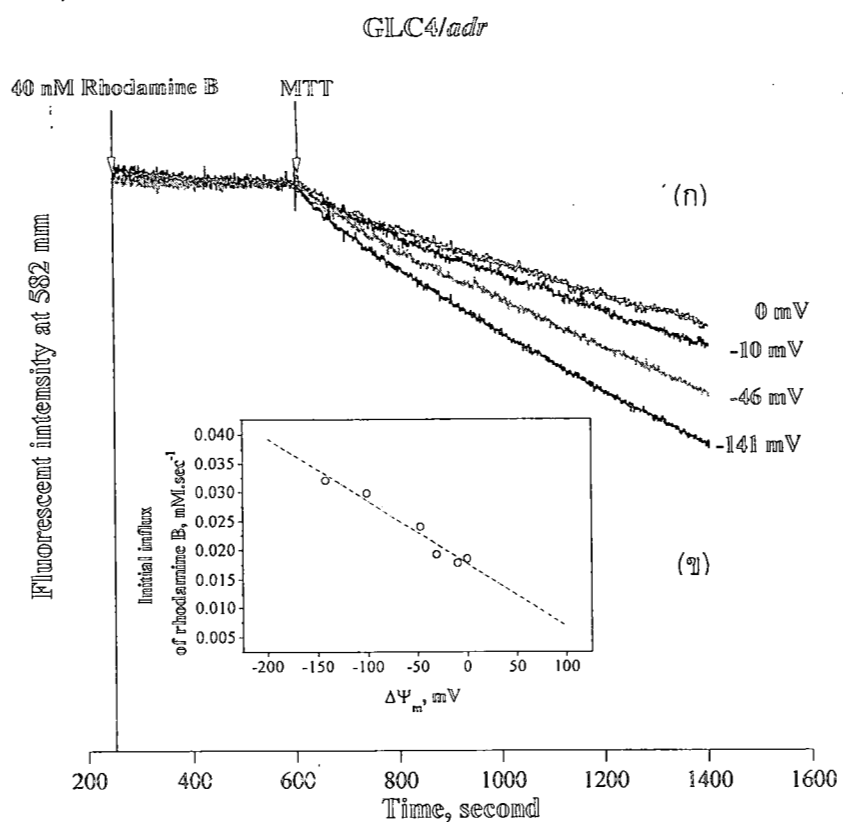
MTT - reduction ใช้ในการติดตามการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดย MTT ถูกรีดิวส์โดยเอนไซม์ succinate dehydrogenase ใน complex II ของการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรีย ทำให้มีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเพิ่มมากขึ้น ความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรียและการสร้าง ATP เพิ่มขึ้น เป็นผลให้เพิ่มการสะสมของ rhodamine B มากขึ้นในไมโทคอนเดรีย ดังนั้น MTT - reduction จึงมีผลขยายสัญญาณทำให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงการทำงานของไมโทคอนเดรียซึ่งสะท้อนถึงการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรียในขณะที่เซลล์ยังมีชีวิต [27]

เนื่องจากผลผลิตของ MTT – reduction ทำให้เกิด formazan ในไมโตคอนเดรีย และผลึก formazan ทำให้สัญญาณ rhodamine B ดับลง (quenching) ดังนั้นการติดตามการลดลงของสัญญาณ rhodamine B ที่ 582 nm (excite 553 nm) จึงเป็นส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ rhodamine B ซึ่ผ่านเมมเบรนของไมโตคอนเดรียตามลาดความต่างศักย์ การลดลงของสัญญาณ rhodamine B เพียงเล็กน้อยสามารถแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรียได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยคำนวณได้จาก slope of tangent ของ F ในช่วงเวลาหนึ่ง F(t) เมื่อ F คือสัญญาณ rhodamine B เริ่มต้น ด้วยเทคนิคนี้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรียในขณะที่เซลล์ยังมีชีวิต เนื่องจากการบ่มเซลล์ด้วย MTT ทำให้เซลล์มี ATP และ viability เพิ่มขึ้น

จากเทคนิคดังกล่าวทำให้สามารถคำนวณค่าความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย โดยทำให้ความต่างศักย์เกิดดีโพลาร์ไรเซชันเพิ่มขึ้นทีละน้อย โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปแตสเซียมไอออนในบัฟเฟอร์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ rhodamine B ซึ่งแสดงโดยกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย กับ อัตราเร็วของการสะสม rhodamine B ในไมโตคอนเดรีย (รูปที่ 5) ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง [27]

6.2 ประสิทธิภาพของโมเลกุล apigenin ต่อการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย ในสภาวะปกติ และในสภาวะ oxidative stress

การทดสอบประสิทธิภาพของโมเลกุล apigenin ต่อการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย และการกำจัด ROS ที่ไมโตคอนเดรีย โดยบ่มเซลล์กับโมเลกุล apigenin ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ ในสภาวะที่เซลล์ปกติ และที่บ่มเซลล์ในสภาวะต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดภาวะ oxidative stress จากภายนอกโดยบ่มเซลล์ด้วย H_2O_2 100 μM 2 ชั่วโมง และจากภายในโดยบ่มเซลล์ด้วย BSO (DL-Buthionine-[S,R]-Sulfoximine) 50 μM 20 ชั่วโมง และบ่มต่อด้วย H_2O_2 100 μM 2 ชั่วโมง และติดตามการลดลงของสัญญาณ rhodamine B ที่ 582 nm (excite 553 nm) การลดลงของสัญญาณ rhodamine B เพียงเล็กน้อยสามารถแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรียได้อย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 5 การวัดความต่างศักย์ของไมโทคอนเดรียโดย RHODAMINE B และ MTT-REDUCTION (ก) กราฟมาตรฐาน (CALIBRATION CURVE) ระหว่างความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย กับ อัตราเร็วของการสะสม RHODAMINE B ในไมโทคอนเดรีย (ข)

บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

โมเลกุลในกลุ่ม terpenoid และ flavonoid เป็นองค์ประกอบในพืชหลายชนิด ที่กระจายอยู่ในประเทศไทย และโมเลกุลในกลุ่มนี้หลายชนิดมีศักยภาพในการเสริมภูมิคุ้มกัน เป็น antioxidant ที่มีศักยภาพสูง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเป็น antioxidant และ anticancer ของโมเลกุล terpene ที่สกัดบริสุทธิ์ได้จากพืชที่มีอยู่ในประเทศไทย เปรียบเทียบกับโมเลกุล flavonoid โดยศึกษาในเซลล์มะเร็ง MDR และเซลล์มะเร็งที่ไวต่อยา ผลการทดลองมีดังนี้

1 ผลการทดลอง

1.1 ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง โดยโมเลกุล terpene และโมเลกุล apigenin โดยเปรียบเทียบโมเลกุลทั้งสองกับยารักษามะเร็ง daunorubicin (DNR)

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษามี 2 ชนิดคือ K562 เป็น systemic cancer ทั้งชนิดดื้อต่อยา และไวต่อยา adriamycin ซึ่ง ชนิดดื้อต่อยามี โปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ขนาด 170-kDa เรียกว่า P-glycoprotein (P-gp) เซลล์มะเร็งอีกชนิดหนึ่งคือ GLC₄ เป็น solid cancer ทั้งชนิดดื้อต่อยา และไวต่อยา adriamycin ซึ่งชนิดดื้อต่อยามี โปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ขนาด 190-kDa เรียกว่า multidrug resistance-associated protein (MRP1) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1 พบว่า DNR มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง K562/S และ GLC4/S ได้ดีที่สุดในระดับนาโนโมลาร์ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างโมเลกุล terpene กับ apigenin พบว่าโมเลกุล apigenin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งที่ไวต่อยาได้ดีกว่าโมเลกุล terpene ถึง 3 เท่าในเซลล์มะเร็ง K562/S และ 2 เท่าในเซลล์มะเร็ง GLC/S ซึ่งต้องใช้ความเข้มข้นของโมเลกุลในระดับไมโครโมลาร์

ในเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยา พบว่า ทั้งโมเลกุล terpene และ apigenin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง K562/ADR และ GLC4/ADR ได้ใกล้เคียงกับเซลล์มะเร็งที่ไวต่อยา โดยมีค่า RF อยู่ในช่วง (0.94 – 1.11) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโมเลกุล terpene กับ apigenin พบว่าในเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยา โมเลกุล apigenin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาได้ดีกว่าโมเลกุล terpene ถึง 3 เท่าในเซลล์มะเร็ง K562/ADR และ 2 เท่าในเซลล์มะเร็ง GLC4/ADR เนื่องจากโมเลกุลทั้งสองมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งต่ำ เมื่อเทียบกับยารักษามะเร็ง DNR จึงน่าจะมีการศึกษาประสิทธิภาพของโมเลกุลทั้ง 2 ชนิด

ในการยับยั้งการทำงานของเมมเบรนโปรตีน และเพิ่มการสะสมของ DNR ภายในเซลล์มากขึ้น ซึ่งศึกษาโดยใช้เป็นโมเลกุลร่วมในการรักษา (co-treatment) กับยาต้านมะเร็ง DNR

ตารางที่ 1 ค่า IC_{50} ของเซลล์ที่ไวต่อยา และค่า RF ของโมเลกุล DNR, terpene และ apigenin

Molecule	K562		GLC ₄	
	IC_{50} (S)	RF	IC_{50} (S)	RF
DNR	49.57 ± 8.5 nM	30.43 ± 1.6	26.08 ± 7.4 nM	12.36 ± 1.6
Terpene	79.5 ± 2.12 μ M	0.94 ± 0.08	52.5 ± 3.5 μ M	1.09 ± 0.06
Apigenin	26.56 ± 2.25 μ M	0.95 ± 0.1	25.12 ± 5.1 μ M	1.17 ± 0.22

IC_{50} (S) คือค่าความเข้มข้นของยาที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งที่ไวต่อยาได้ 50%

RF (resistance factor) คือค่าที่นิยามจากสัดส่วนของ IC_{50} ของเซลล์ที่ไวต่อยา / IC_{50} ของเซลล์ที่ไวต่อยา

ข้อมูล (data) แสดงโดยค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) จากการทดลอง 3-5 ครั้ง

1.2 ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ระหว่างโมเลกุล terpene และ apigenin โดยใช้เป็นโมเลกุลร่วมในการรักษา (co-treatment) ร่วมกับ DNR

เมื่อใช้ความเข้มข้นของโมเลกุล terpene และ apigenin ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ 2-8 μ M ร่วมกับ DNR ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งของ DNR ดังแสดงในตารางที่ 2 และในรูปที่ 6

การออกฤทธิ์ของโมเลกุล terpene ในระดับความเข้มข้น 2-6 μ M ร่วมกับ DNR พบว่าโมเลกุล terpene ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของ DNR ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง K562/ADR และ GLC4/ADR โดยมีร้อยละการลดลงของค่า IC_{50} ของ DNR เท่ากับ (- 6.1) ถึง (- 11.4) ในเซลล์มะเร็ง K562/ADR และเท่ากับ (- 77.3) ถึง (- 84.8) ในเซลล์มะเร็ง GLC4/ADR

ทำให้ต้องใช้ความเข้มข้นของ DNR เพิ่มขึ้น จึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ DNR ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง K562/ADR และ GLC4/ADR อาจเป็นผลเนื่องจากโมเลกุล terpene ออกฤทธิ์กระตุ้นกระบวนการป้องกันตัวเองของเซลล์ต่อยาหรือสิ่งแปลกปลอมที่เป็นพิษ

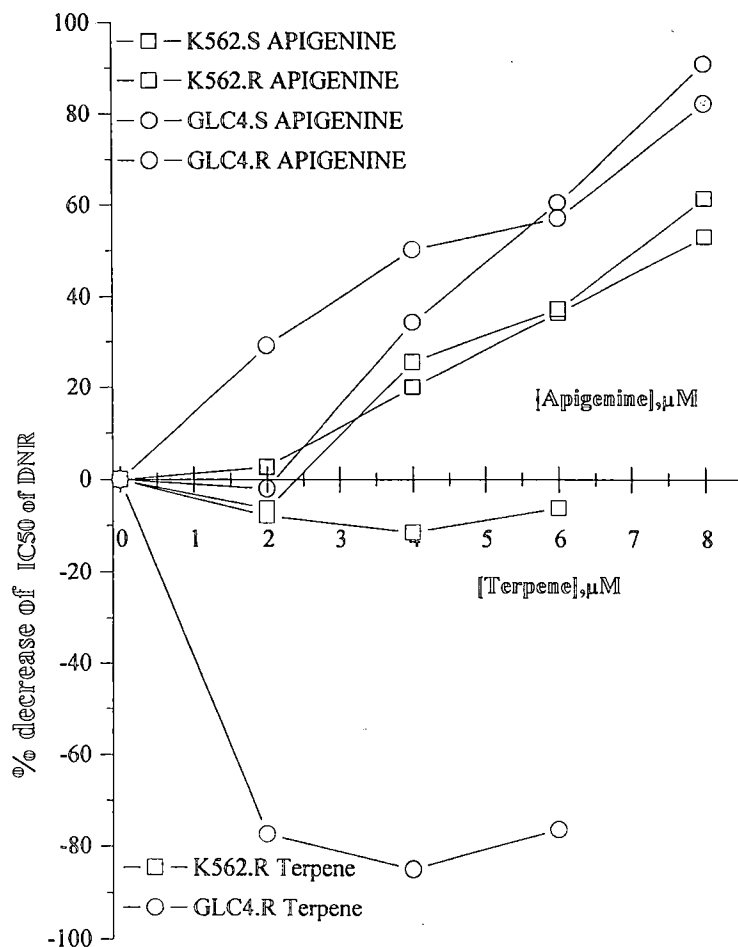
เมื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของโมเลกุล apigenin ในระดับความเข้มข้น 2-8 μM ร่วมกับ DNR พบว่าโมเลกุล apigenin ที่ระดับความเข้มข้น 8 μM มีผลเพิ่มประสิทธิภาพของ DNR ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง โดยมีร้อยละการลดลงของค่า IC_{50} ของ DNR เท่ากับ 53.0, 61.3, 90.7, 82.1 ในเซลล์มะเร็ง K562/S, K562/ADR, GLC4/S, GLC4/ADR ตามลำดับ โดยโมเลกุล apigenin 8 μM สามารถออกฤทธิ์เสริมกับ DNR ทำให้ใช้ความเข้มข้นของ DNR ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ DNR เพียงชนิดเดียว นั่นคือโมเลกุล apigenin เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำๆร่วมกับ DNR สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น และส่งผลให้การให้ยารักษามะเร็ง DNR ลดลงกลไกที่น่าจะเป็นไปได้คือ โมเลกุล apigenin สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนเมมเบรนที่ทำหน้าที่ขับยาออกนอกเซลล์ และทำให้ความเข้มข้นของยาด้านมะเร็ง DNR สะสมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น เนื่องจากประสิทธิภาพของยาขึ้นกับความเข้มข้นของยาที่สะสมอยู่ที่เป้าหมายการออกฤทธิ์

ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} ของ DNR (nM) เมื่อเติมโมเลกุล terpene หรือ apigenin ที่ความเข้มข้น 2 μM , 4 μM , 6 μM , 8 μM

	DNR (nM)	DNR + Terpene			DNR + Apigenin			
		2 μM	4 μM	6 μM	2 μM	4 μM	6 μM	8 μM
K562	49.6 $\pm$ 8.5				48.3 $\pm$ 5.7	39.7 $\pm$ 10	31.6 $\pm$ 8.3	23.3 $\pm$ 6.5
K562/adr	1508 $\pm$ 79	1625 $\pm$ 35	1680 $\pm$ 28	1600 $\pm$ 0	1602 $\pm$ 31	1122 $\pm$ 46	947.5 $\pm$ 74	583 $\pm$ 39
GLC ₄	26.8 $\pm$ 7.4				27.3 $\pm$ 6.6	17.6 $\pm$ 2.8	10.6 $\pm$ 1.9	2.5 $\pm$ 0.45
GLC ₄ /adr	322 $\pm$ 41.4	571 $\pm$ 16	595 $\pm$ 7	567 $\pm$ 25	228 $\pm$ 12	160 $\pm$ 14	138.5 $\pm$ 19	57.5 $\pm$ 10.6

IC_{50} คือค่าความเข้มข้นของยาที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ 50%

ข้อมูล (data) แสดงโดยค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) จากการทดลอง 3-5 ครั้ง



รูปที่ 6 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่า IC_{50} ของ DNR ระหว่าง โมเลกุล TERPENE และ APIGENIN ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งร่วมกับ DNR

1.3 ศึกษาจลนศาสตร์การสะสมของ DNR ในเซลล์ และความสามารถของโมเลกุล terpene และ apigenin ในการยับยั้งการขับยา DNR ออกนอกเซลล์มะเร็ง

การศึกษานี้ทำโดยใช้เทคนิค spectrofluorometry โดยติดตามสัญญาณการเรืองแสงของ DNR ภายหลังจากการบ่มเซลล์กับโมเลกุล terpene ที่ระดับความเข้มข้น 25-275 μM ในเซลล์มะเร็ง K562/ADR พบว่าความเข้มข้นของ DNR ที่สะสมในนิวเคลียสมีค่า $\alpha_{0.2}$ เท่ากับ 205 μM แสดงว่า

ต้องใช้ความเข้มข้นของ terpene 205 μM จึงสามารถเพิ่มการสะสมของ DNR ในนิวเคลียสได้ 20 % ส่วนในเซลล์มะเร็ง GLC4/ADR พบว่าโมเลกุล terpene มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการสะสม DNR ในนิวเคลียสได้มากกว่าเซลล์มะเร็ง K562 ที่ดื้อต่อยา โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 120 μM

สำหรับโมเลกุล apigenin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 250, 300 μM ในเซลล์มะเร็ง K562/ADR และ GLC4/ADR แสดงว่า โมเลกุล terpene และ apigenin (ในระดับความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงสูงกว่าค่า IC_{50}) ($\text{IC}_{50} = 26 \mu\text{M}$) มีประสิทธิภาพต่ำมากมากในการยับยั้งการขับยาออกนอกเซลล์โดย P-gp และ MRP1 จากการศึกษาของ Conseil และคณะ [28] โดยแยกเฉพาะส่วนที่เป็น hexahistidine-tagged C-terminal nucleotide-binding domain ($\text{H}_6\text{-NBD2}$) ของ P-gp ในหนู mouse พบว่าโมเลกุลในกลุ่ม flavonoids เป็น bifunctional modulators ของ P-gp และมีตำแหน่งที่เป็น binding site 2 แห่งคือ vicinal ATP-binding site และ steroid-binding site ภายในส่วนที่เป็น cytosolic domain ของ P-gp แต่ในการศึกษานี้ได้ศึกษา P-gp และ MRP1-protein ในเซลล์ที่ยังมีชีวิต ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบโมเลกุล apigenin เป็น substrate ของ P-gp เฉพาะในส่วนของโปรตีนที่แยกมาศึกษา แต่เมื่อศึกษาการทำงานของโปรตีนที่เป็นองค์รวมในเซลล์ขณะที่มีชีวิต จึงไม่พบว่าโมเลกุล apigenin สามารถยับยั้งการขับยาออกนอกเซลล์ของ P-gp เนื่องจากโมเลกุล apigenin มีประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ของ DNR สูง แต่มีประสิทธิภพต่ำมากมากในการยับยั้งการขับยาออกนอกเซลล์โดย P-gp และ MRP1 กลไกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้คือโมเลกุล apigenin ออกฤทธิ์เปลี่ยนแปลงสภาพพลังงานของไมโทคอนเดรียของเซลล์ MDR โดยเฉพาะการลดความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย ทำให้ระดับ ATP ของเซลล์ลดต่ำลง

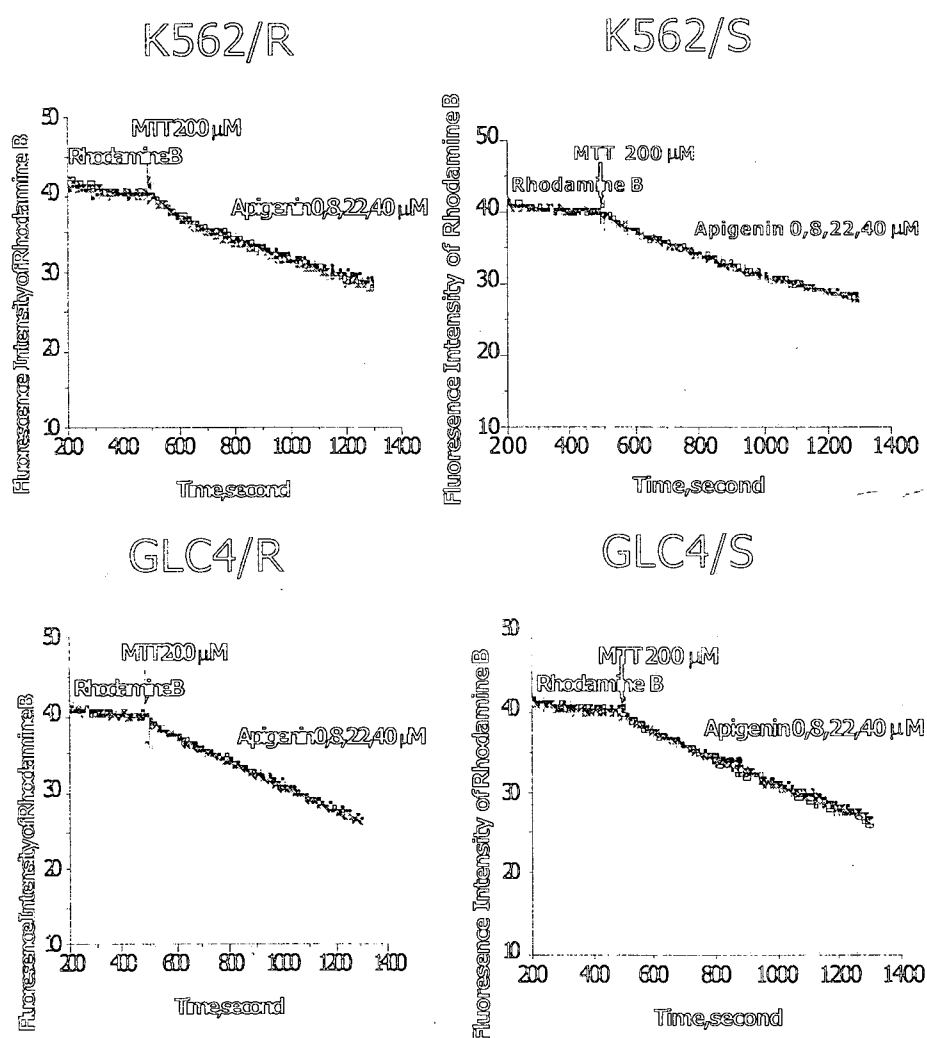
1.4 ประสิทธิภาพของโมเลกุล apigenin ต่อความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรียและการกำจัด ROS ที่ไมโทคอนเดรีย

เนื่องจากโมเลกุล apigenin ในระดับความเข้มข้น 2-8 μM สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ DNR ในการออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง การทดสอบประสิทธิภาพของโมเลกุล apigenin ต่อความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย โดย spectrofluorescence ใช้เทคนิค colocalization ของโมเลกุล rhodamine B กับ MTT-reduction พบว่า apigenin ในระดับความเข้มข้น 40 μM ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรียในทุก cell lines (รูปที่ 7) การลดลงของความต่างศักย์เมมเบรนแม้เพียงเล็กน้อย มีผลโดยตรงต่อระดับพลังงานภายในเซลล์และส่งผลต่อการตายของเซลล์ ไมโทคอนเดรียเป็นเป้าหมายของยาหรือโมเลกุลหลายชนิด เนื่องจากหน้าที่หลักของไมโทคอนเดรียคือการสร้าง ATP จากกระบวนการ oxidative phosphorylation และยังคง

คุมการตายแบบ apoptosis ด้วย ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้ไมโทคอนเดรียเสื่อมสภาพจึงก่อให้เกิดการตายของเซลล์และก่อให้เกิดโรคร้ายต่าง ๆ จำนวนมาก นอกจากนี้ประสิทธิภาพของโมเลกุลขึ้นกับการสะสมของโมเลกุลที่เป้าหมายโดยตรงภายในเซลล์ และขึ้นกับชนิดของเซลล์ด้วย ซึ่งถ้าโมเลกุลออกฤทธิ์ที่เป้าหมายภายในเซลล์อย่างเหมาะสมแล้ว จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ และลดผลข้างเคียง [14,16,29] โดยเฉพาะการออกฤทธิ์ของโมเลกุล apigenin ที่เสริมฤทธิ์กับยารักษา มะเร็ง DNR การศึกษา กลไกการออกฤทธิ์ของ apigenin โดย Wang I.K. และคณะ [22] พบว่าโมเลกุล apigenin ($60 \mu\text{M}$) กระตุ้นการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ HL-60 leukaemia โดยลดความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย กระตุ้นการหลั่ง cytochrome c เข้าสู่ cytoplasm และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis นอกจากนี้ยังมีกลไกอื่นๆที่โมเลกุล apigenin ออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งคือ ทำลาย DNA ยับยั้งวงจรของเซลล์ (cell cycle arrest) ยับยั้ง signal transduction pathway โดยเฉพาะตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการจับของ ATP ได้แก่ receptor tyrosine kinase, epidermal growth factor receptor, mitogen activated protein kinase เป็นต้น [21]

เนื่องจากโมเลกุล apigenin มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ดังนั้นเพื่อที่จะทดสอบประสิทธิภาพของโมเลกุล apigenin ต่อการกำจัด ROS ที่ไมโทคอนเดรีย ได้ทำการทดลองโดยบ่มเซลล์กับ H_2O_2 $100 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง คุณสมบัติของ H_2O_2 นั้นสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้เร็ว และถูกเปลี่ยนเป็น ROS ชนิดอื่นๆ เช่น $\text{OH}^\cdot$ โดย Fenton reaction และในภาวะปกติการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียจะมีอิเล็กตรอนออกมาสู่ออกซิเจนเกิดเป็น $\text{O}_2^\cdot$ และ H_2O_2 ดังนั้นเมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้มี ROS จำนวนมากหลายชนิดเช่น H_2O_2 , $\text{O}_2^\cdot$, $\text{OH}^\cdot$ เป็นต้น เซลล์จึงอยู่ในภาวะเครียดเรียกว่า oxidative stress ซึ่งการกำจัด ROS ขึ้นกับเอนไซม์ที่เป็น antioxidant ภายในเซลล์ ได้แก่ glutathione peroxidase, catalase เป็นต้น ในไมโทคอนเดรียไม่มีเอนไซม์ catalase ดังนั้นจึงมี glutathione peroxidase ทำหน้าที่กำจัด ROS [18] เมื่อทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะเครียดจากการเพิ่มปริมาณของ ROS พบว่าในเซลล์มะเร็ง GLC4 ความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรียลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 8ก) และโมเลกุล apigenin ($40 \mu\text{M}$) สามารถกำจัด ROS และเพิ่มความต่างศักย์ไมโทคอนเดรียได้เฉพาะในเซลล์มะเร็ง GLC4 โดยมีความเร็วการซึมผ่านของสียยวัญ rhodamine B เพิ่มขึ้น 0.5, 0.97 เท่าในเซลล์มะเร็ง GLC4/S, GLC4/ADR ตามลำดับ (รูปที่ 8ข) จากสเปกตรัมการซึมผ่านของสียยวัญ rhodamine B ในรูปที่ 8ก. พบว่าเซลล์มะเร็ง K562 สามารถทนต่อภาวะ oxidative stress ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็ง GLC4 เพราะความเร็วการซึมผ่านของสียยวัญ rhodamine B ในเซลล์

มะเร็ง K562 เร็วกว่าในเซลล์มะเร็ง GLC4 และในภาวะที่ชักนำให้เซลล์มะเร็ง K562 อยู่ในภาวะ oxidative stress พบว่าโมเลกุล apigenin ออกฤทธิ์ทำให้ความเร็วการซึมผ่านของสัญญาณ rhodamine B ลดลงเพียงเล็กน้อยคือ 0.09, 0.08 เท่าในเซลล์มะเร็ง K562/S, K562/ADR ตามลำดับ (รูปที่ 8ข)



รูปที่ 7 ประสิทธิภาพของโมเลกุล APIGENIN ต่อการลดลงของการซึมผ่านของสัญญาณ RHODAMINE B ในเซลล์มะเร็ง K562 และ GLC4 ที่ดื้อต่อยา และที่ไวต่อยาตามลำดับ

เมื่อทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะเครียดมากกว่าเดิมโดยบ่มด้วย BSO ความเข้มข้น 50 μM เป็นเวลา 20–24 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ glutathione ภายในเซลล์ลดต่ำลง อย่างมีนัยสำคัญ โดย BSO ยับยั้งเอนไซม์ γ -glutamylcysteine synthetase ที่ใช้ในการสร้าง glutathione และนำเซลล์ที่บ่มด้วย BSO มาบ่มต่อด้วย H_2O_2 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเมื่อตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วย trypan blue มีการตายของเซลล์คิดเป็นร้อยละ 6, 5, 96, 86 ในเซลล์มะเร็ง K562/S, K562/ADR, GLC4/S, GLC4/ADR ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์กับสเปกตรัมการซึมผ่านของสัญญาณ rhodamine B (รูปที่ 9ก) เซลล์มะเร็ง GLC4 มีภาวะ oxidative stress มากกว่าเซลล์มะเร็ง K562 เนื่องจากความเร็วซึมผ่านของสัญญาณ rhodamine B ในเซลล์มะเร็ง GLC4 น้อยกว่าในเซลล์มะเร็ง K562 อย่างมีนัยสำคัญ โมเลกุล apigenin (40 μM) สามารถกำจัด ROS และเพิ่มความต่างศักย์ไมโทคอนเดรียได้เฉพาะในเซลล์มะเร็ง GLC4 โดยมีความเร็วการซึมผ่านของสัญญาณ rhodamine B เพิ่มขึ้น 1.32, 4.77 เท่า และมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนการตายของเซลล์ที่ลดลงคิดเป็นร้อยละ 12, 10 ในเซลล์มะเร็ง GLC4/S, GLC4/ADR ตามลำดับ (รูปที่ 9ข) และ (รูปที่ 10) ส่วนในเซลล์มะเร็ง K562 พบว่าเซลล์สามารถทนต่อภาวะ oxidative stress ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็ง GLC4 และโมเลกุล apigenin ไม่เปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไมโทคอนเดรีย (รูปที่ 9 กและข)

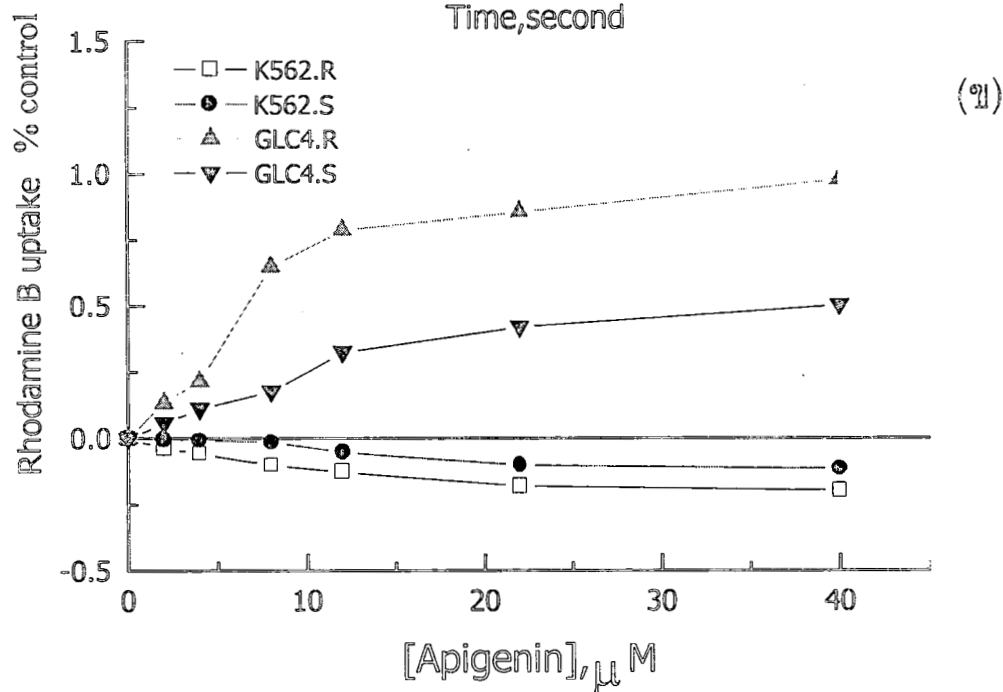
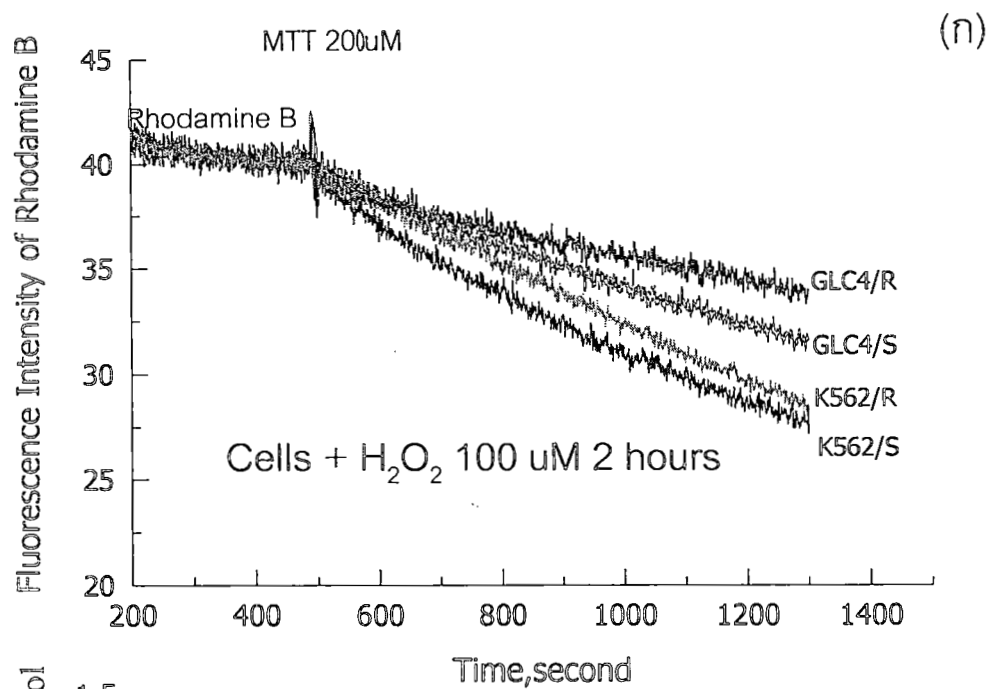
ในภาวะที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด oxidative stress และติดตามการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย พบว่าเซลล์มะเร็ง K562 สามารถทนต่อภาวะ oxidative stress ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็ง GLC4 อาจเนื่องมาจาก การทำงานของ MRP protein ซึ่งต้องการ glutathione นอกจากนี้ยังขึ้นกับคุณสมบัติจำเพาะของเซลล์แต่ละชนิด ซึ่งมีเอนไซม์ที่เป็น antioxidant แตกต่างกัน H_2O_2 มีคุณสมบัติเป็น oxidizing agent อย่างอ่อน ทำให้เกิด oxidation ของเอนไซม์ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ทำให้ ATP ภายในเซลล์ลดต่ำลง ไม่เพียงพอที่จะเปลี่ยน GSSG (oxidized form) ให้เป็น GSH (reduced form) จึงมีผลให้มีการสะสม ROS เพิ่มขึ้นในไมโทคอนเดรีย ทำให้ความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรียลดลง [9] และโมเลกุล apigenin มีประสิทธิภาพในการกำจัด ROS ที่ไมโทคอนเดรียในเซลล์มะเร็ง GLC4 โดยทำให้เซลล์ที่อยู่ในสภาวะเครียด กลับสู่สภาพที่มีความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้น

๕๗๑.๙๗๘

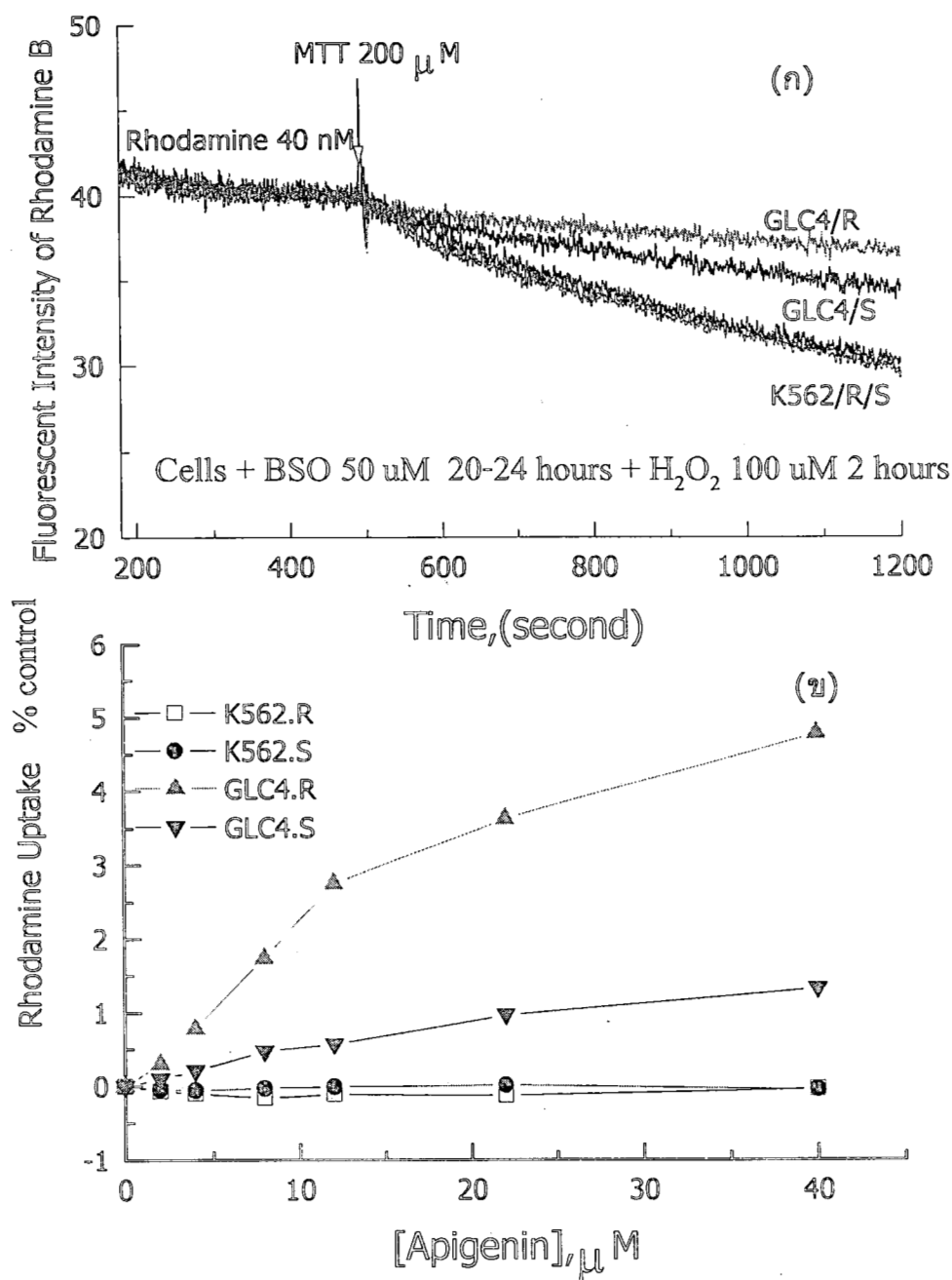
๘ ๒๗๕๑

๑.๓

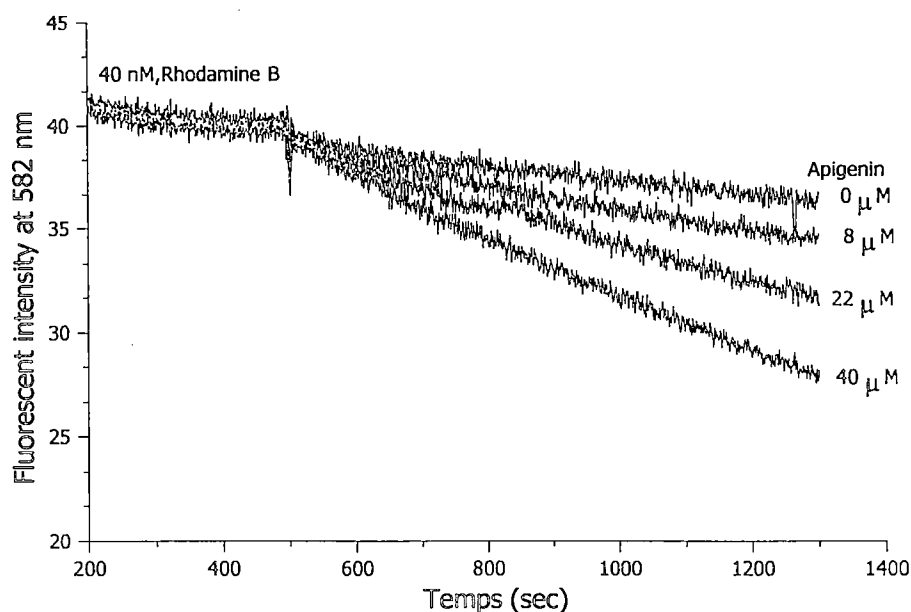
249080



รูปที่ 8 การซึมผ่านของสัญญาณ RHODAMINE B ในเซลล์ที่ป้อนด้วย H_2O_2 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
 สเปกตรัมแสดงข้อมูลเชิงคุณภาพของสัญญาณ RHODAMINE B (ก) ประสิทธิภาพของโมเลกุล
 APIGENIN ต่อการกำจัด ROS ที่ไม่ได้ออกฤทธิ์ (ข)



รูปที่ 9 การซึมผ่านของสัญญาณ RHODAMINE B ในเซลล์ที่บ่มด้วย BSO 50 μ M เป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง และบ่มต่อด้วย H_2O_2 100 μ M เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สเปกตรัมแสดงข้อมูลเชิงคุณภาพของสัญญาณ RHODAMINE B (ก) ประสิทธิภาพของโมเลกุล APIGENIN ต่อการกำจัด ROS ที่ไมโทคอนเดรีย (ข)



รูปที่ 10 สเปกตรัมแสดงประสิทธิภาพของโมเลกุล APIGENIN ต่อการเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านของ
สัญญาณ RHODAMINE B ในเซลล์มะเร็ง GLC4/ADR โดยบ่มด้วย BSO 50 μM เป็นเวลา 20–24
ชั่วโมง และบ่มต่อด้วย H_2O_2 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาคุณสมบัติ antioxidant และ anticancer ของโมเลกุลในกลุ่ม polyphenols 2 ชนิด คือ terpene และ apigenin ซึ่งเป็นโมเลกุลที่พบในพืช ผัก ผลไม้ ที่ใช้บริโภคเป็นอาหารประจำวัน โมเลกุล apigenin มีศักยภาพสูงกว่าโมเลกุล terpene อย่างมีนัยสำคัญ ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง และการนำมาใช้เป็นยาร่วมกับยาต้านมะเร็ง การศึกษาจุลนาศาสตร์การสะสมของ DNR ในเซลล์ และความสามารถของโมเลกุล terpene และ apigenin ในการยับยั้งการขับยา DNR ออกนอกเซลล์มะเร็ง พบว่าทั้งสองโมเลกุลมีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งการทำงานของ P-gp และ MRP โมเลกุล apigenin ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ 2-8 μM ($\text{IC}_{50} = 26 \mu\text{M}$) ออกฤทธิ์เสริมกับยารักษามะเร็ง DNR ทั้งในเซลล์มะเร็ง K562/S, K562/ADR, GLC4/S, GLC4/ADR และพบว่าโมเลกุล apigenin ไม่มีผลต่อความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย และเมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์แบบ antioxidant โดยเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในภาวะ oxidative stress มีผลทำให้ความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรียลดลง สัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ตายที่เพิ่มขึ้นจากการตรวจสอบด้วย trypan blue โมเลกุล apigenin สามารถกำจัด ROS ที่มากเกินไปในไมโทคอนเดรียได้ โดยทำให้ความต่างศักย์เมม

เบรอนของไมโตคอนเดรียเพิ่มขึ้น สัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ตายที่ลดลง เซลล์มะเร็ง K562 และ GLC4 มีความไวต่อภาวะ oxidative stress ไม่เท่ากัน เซลล์มะเร็ง K562 ทนต่อภาวะ oxidative stress ได้ดีกว่า เซลล์มะเร็ง GLC4 และโมเลกุล apigenin สามารถกำจัด ROS ในเซลล์มะเร็ง GLC4 ได้ดีกว่า เซลล์มะเร็ง K562 จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า โมเลกุล apigenin มีศักยภาพในการเพิ่มพิษของยา รักษามะเร็ง ขณะเดียวกันก็สามารถกำจัด ROS ที่มากเกินไปในไมโตคอนเดรีย

เอกสารอ้างอิง

- [1] Yamasaki L. (1999) Balancing proliferation and apoptosis in vivo: the goldilocks theory of E2F/DP action, *Biochem. Biophys. Acta.* 1423: M9-M15.
- [2] Wang Y.J. and Kolodner R.D. (2000) The molecular and cellular biology: The molecular basis of cancer, *Biochem. Biophys. Acta.* 1470: R21-R28.
- [3] Dean R.T., Shanlin F.U., Stocker R., Davies M.J. (1997) Biochemistry and pathology of radical - mediated protein oxidation, *Biochem. J.* 324: 1-18.
- [4] Morel Y. and Barouki R. (1999) Repression of gene expression by oxidative stress, *Biochem. J.* 342: 481-496.
- [5] Bailey S.M., Pietsch E.C., Cunningham C.C. (1999) Ethanol stimulates the production of reactive oxygen species at mitochondrial complex I and III. *Free Radic. Biol Med.* 27: 891-900.
- [6] Cardoso S.M., Pereira C., Oliveira C.R. (1999) Mitochondria function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radic. Biol Med.* 26: 3-13.
- [7] Lemasters J.J., Nieminen A.L., Qian T., Trost L.C., Elmore S.P., Nishimura Y., Crowe R.A. (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis and autophagy. *Biochem. Biophys. Acta.* 1366: 177-196.
- [8] Yakes F.M. and Van Houten B. (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 514-519.
- [9] Saves and Masson J.M. (1998) Mechanism of resistance to xenobiotics in human therapy. *Cell.Mol. Life. Sci.* 54: 405-426.
- [10] Simon S.M. and Schindler M. (1994) Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 3497-3504.
- [11] Neilsen D. and Skovsgaard T. (1992) Review P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistance cell lines. *Biochem. Biophys. Acta.* 1139: 169-183.
- [12] Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. (1999) Review the multidrug resistance protein family. *Biochem. Biophys. Acta.* 1461: 347-357.

[13] Gong Y., Wang Y., Chen F., Han J., Miao J., Shao N., Fang Z., Yang R.O. (2000) Identification of the subcellular of daunorubicin in multidrug resistance K562 cell lines. *Leuk. Res.* 24: 769-774.

[14] Murphy M.P., and Smith R.A.J. (2000) Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 41: 235-250.

[15] Ouar Z., Lacave R., Bens M., Vandewalle A. (1999) Mechanisms of altered sequestration and efflux of chemotherapeutic drugs by multidrug resistance cells. *Cell. Bio. Toxicol.* 100: 15-91.

[16] Jia L., Allen P.D., Macey M.G., Grahn M.F., Newland A.C., Kelsey S.M. (1997) Mitochondrial electron transport chain activity, but not ATP synthesis, is required for drug-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible novel mechanism of regulating drug resistance. *British. J. Haemato.* 98: 686-698.

[17] Skulachev V.P. (1999) Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Molec. Aspects Med.* 20: 139-184.

[18] Anderson M.E. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico. Biol. Interact.* 111: 1-14.

[19] Arai M., Imai H., Koumurat T., Yoshida M., Emoto., Umeda M., Chiba N., Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. *J. Biol. Chem.* 274:4924-4933.

[20] Giles D. and Wei H. (1997) Effects of structurally related flavones/isoflavones on hydrogenperoxide production and oxidative DNA damage in ester-stimulated HL-60 cells. *Nutr. Cancer.* 29(1): 77-82.

[21] Yin F., Giulino A.E. and Van Herle A.J. (1999) Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). *Anticancer Res.* 19: 4297-4304.

[22] Wang I.K., Lin-Shiau S.Y., Lin J.K. (1999) Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukemia HL-60 cells. *Eur. J. Cancer.* 35: 1517-1525.

[23] Frezard F. and Garnier-Suillerot A. (1991) Comparison of the membrane transport of anthracycline derivatives in drug-resistant and drug-sensitive K562 cells. *Eur. J. Biochem.* 196, 483-491.

[24] Tarasuik J., Frezard F., Gattegno L., and Garnier-Suillerot A. (1989) Anthracycline incorporation in human lymphocytes. Kinetics of uptake and nuclear incorporation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1013, 109-117.

[25] Frezard F. and Garnier-Suillerot A. (1991) Determination of the osmotic active drug concentration in the cytoplasm of anthracycline-resistant and -sensitive K562 cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1091, 29-35.

[26] Eytan G.D., Regev R., Oren G., Hurwitz C.D. Assaraf Y.G. (1997) Efficiency of P-glycoprotein-mediated exclusion of rhodamine dyes from multidrug-resistant cells is determined by their passive transmembrane movement rate. *Eur. J. Biochem.* 248: 104-112.

[27] Reungpattananpong R., Dechsupa S., Meesungnoen J., Mankhetkorn S. (in press) Up regulation of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and electron transport chain activity render the GLC4/adr cells, highly express MRP1 resistant to pirarubicin.

[28] Conseil G., Baubichon-Cortay H., Dayan G., Jault J.M., Barron D., Pietro A.D. Flavonoids: A class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 9831-9836.

[29] Dorward A., Sweet S., Moorehead R., Singh G. (1997) Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: redox balance, cell cycle, and drug resistance. *J. Bioener. Biomem.* 29: 385-392.