สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานโครงการวิจัย

เรื่อง

การแยกบริสุทธิ์สารในกลุ่ม Polyphenols จากมะเม่าและศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นและการต้านมะเร็ง

ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์

โดย

ดร. สำรี มั่นเขตต์กรน์

8 ส.ค. 2545
156150

หน่วยวิจัย Physical Chemistry Molecular and Cellular Biology
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัด ชลบุรี

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2543

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้จัดทำขึ้นที่ห้องปฏิบัติการ Physical Chemistry Molecular and Cellular Biology คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยได้รับเงินสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2543

ขอขอบคุณผู้ร่วมทีมวิจัยดังมีรายนามต่อไปนี้

1. นางสาว วิภาวี แจ้งสว่าง
2. นางสาวจิดชนนี มะลิซ้อน
3. นายมนตรี ตั้งใจ
4. นายสุชาติ โกทัณฑ์
5. ผ.ศ. จันทรวรรณ แสงแข

บทสรุป

สารสกัดในกลุ่ม polyphenol จากเนื้อไม้มะเม่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งเม็ดเลือด K562 และมะเร็งปอด GLC4 ทั้งในชนิดที่ดื้อยาและไวต่อยา และสามารถกำจัด ROS ที่มากเกินไปในไมโตคอนเดรียได้โดยทำให้ความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรียเพิ่มขึ้น 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 นอกจากนี้ยังพบว่า โมเลกุล polyphenol ที่ศึกษามีศักยภาพในการเพิ่มพิษของยารักษามะเร็ง

โมเลกุลที่สกัดได้จากเนื้อไม้มะเม่ามีศักยภาพสูงมากที่ควรจะได้รับการพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้เป็นยาต้านมะเร็งหรือในอุตสาหกรรมอาหาร

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 วิธีการทดลอง และวัสดุที่ใช้ในการทดลอง 5

2.1 การเตรียมสารละลาย 5

2.2 การสกัดสารสกัดหยาบ จากเนื้อไม่เม่าหลวง (Crude extracts) 5

2.3 ตรวจสอบส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี แบบ 2 มิติ (Thin-Layer Chromatography two-dimension) 6

2.4 วิธีการแยกสารบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) 6

2. 5 Cell culture 7

2.6 การทดสอบพิษของโมเลกุล anthracyclines ต่อเซลล์ 8

2.7 ประสิทธิภาพของโมเลกุลในการยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein 9

2.8 ประสิทธิภาพของโมเลกุล ต่อความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย และการกำจัด ROS ที่ไมโตคอนเดรีย 10

บทที่ 3 ผลการทดลอง 15

3.1 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารสกัด 15

3.2 การทดสอบพิษของโมเลกุลต่อเซลล์ 23

3.3 ประสิทธิภาพของpolyphenol บางโมเลกุล ต่อความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย และการกำจัด ROS ที่ไมโตคอนเดรีย 25

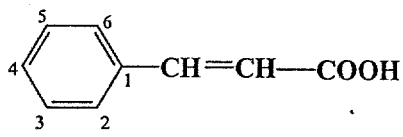
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 32

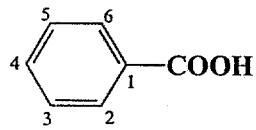
เอกสารอ้างอิง 33

บทที่ 1 บทนำ

สารในกลุ่ม Polyphenolic จัดเป็นกลุ่มโมเลกุลที่พบในพืช ผัก และผลไม้ และพบหลายชนิดรวมอยู่ในเครื่องดื่มบางชนิดโดยเฉพาะ ไวน์ และเบียร์ มีหลักฐานชัดเจนว่าสารในกลุ่ม polyphenolic มีฤทธิ์ในเชิงชีวภาพที่สำคัญเช่น การต้านการออกซิเดชั่น และการต้านมะเร็ง ซึ่งได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะการนำไปใช้ในสูตรอาหาร ยา และเครื่องในปัจจุบัน [1-7]

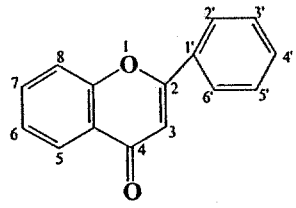
สีของพืชหลายชนิดจัดอยู่ในกลุ่ม polyphenolic ซึ่งแบ่งออกเป็น กลุ่มใหญ่ ๆ 2 กลุ่ม คือ (1) phenolic acid และ (2) flavonoid class ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ



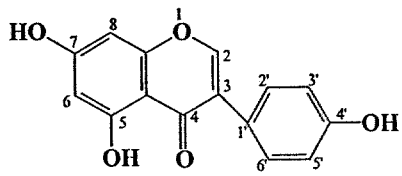


Substituent	Hydroxycinamic acid	Hydroxybenzoic acid
2 - OH	o-Coumeric acid	Salicyl acid
4 - OH	p-Coumeric acid	p-hydroxybenzoic acid
2,5 -di-OH		Gentisic acid
3,4 -di-OH	Caffeic acid	procatechuic acid
3-OCH_3 4-OH	Ferulic acid	Vanilic acid
3-OH 4-OCH_3	Iso-ferulic acid	Iso-vanilic acid
3,4,5-tri-OH		Gallic acid

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่ม phenolic acid



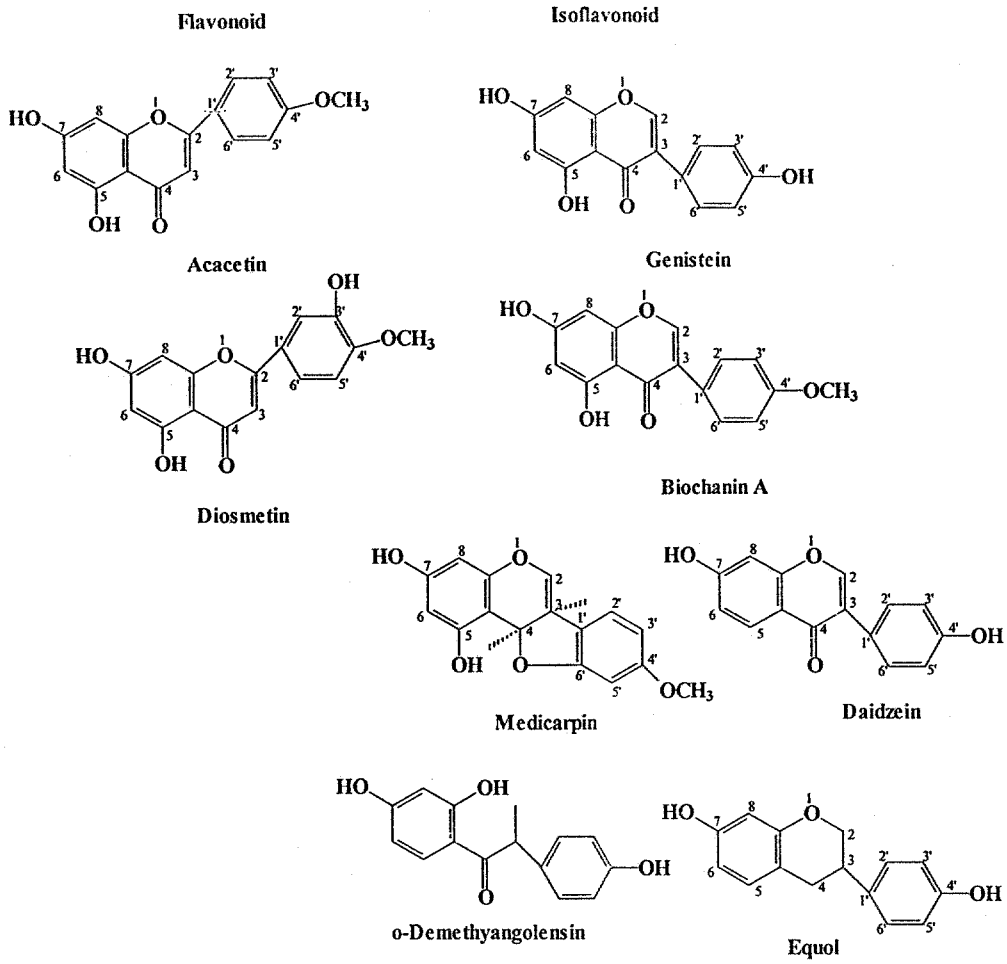
Sustituent						Flavonol	Flavone
3	5	7	3'	4'	5'		
OH	OH	OH	H	OH	H	Kamferol	
OH	OH	OH	OH	OH	H	Quercetin	
H	OH	OH	H	OH	H		Apeginin
H	OH	OH	OCH_3	OH	OCH_3		Tricin



Genistein

รูปที่ 2 โครงสร้างพื้นฐานทางเคมีของสารในกลุ่ม flavonoid

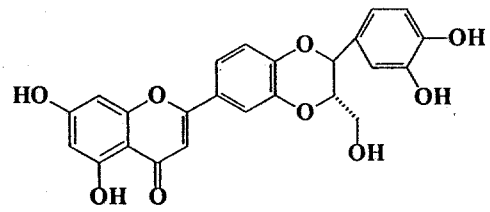
ในปัจจุบันมากกว่า 8000 โมเลกุลของสารในกลุ่ม polyphenol ได้ถูกแยกจากธรรมชาติ โครงสร้างเคมีของสารกลุ่มนี้คล้ายคลึงกับ ฮอร์โมน Estrogen ของคนและสัตว์ ทำให้สารในกลุ่มนี้โดยกลุ่มย่อย Iso-flavonoid มีคุณสมบัติเป็น estrogen อ่อน ๆ และจากรายงานการศึกษาพบว่า polyphenol หลายชนิด (รูปที่ 3) มีคุณสมบัติเป็น phytoestrogen ใช้แทนฮอร์โมนในผู้หญิงที่อยู่ในวัยหมดประจำเดือน และอยู่ในระหว่างการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ร่วมรักษาโรคมะเร็งเต้านม และต่อมลูกหมาก **[8-14]** เป็นต้น



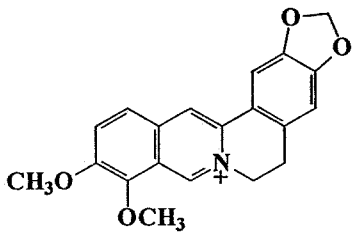
รูปที่ 3 สารในกลุ่ม polyphenol บางชนิดที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งและใช้แทนออร์โมน

นอกจากสารในกลุ่ม polyphenol จะออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและต้านมะเร็งหลายชนิดแล้ว ปัจจุบันกำลังเป็นที่สนใจของนักวิจัยอย่างมากคือ สารกลุ่มนี้สามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและ ต้านมะเร็งที่ดื้อยา และเป็นสารยับยั้งการดื้อยาแบบ multidrug resistance ทั้งในแบคทีเรียดื้อยาและมะเร็งที่ดื้อยา **[15-30]** Frank et al **[31]** ได้ทำการสกัดสารจากพืชตระกูล B. fremontii ซึ่งโมเลกุลที่สกัดได้จัดอยู่ในกลุ่ม alkaloid berberine ดังแสดงในรูปที่ 4 โมเลกุล

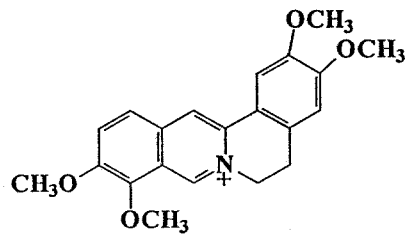
ดังกล่าวมีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพในระดับต่ำเนื่องจากถูกแบคทีเรียขับออกนอกเซลล์โดย MDRs protein



5'-methoxyhydnocarpin



Berberine



Palmatine

รูปที่ 4 โครงสร้างเคมีของสารสกัดจากใบ ของ B. fremontii

จากการวิจัยของหน่วยวิจัย Physical Chemistry, Molecular and cellular Biology คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา พบว่าสารสกัดบริสุทธิ์ในกลุ่ม polyphenol จากต้นมะเม่า (*Antidesma thwaitesianum* Muell. Arg.) ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นไทยที่มีหลักฐานการใช้ในตำรับยาไทยโบราณ สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด K562 และเซลล์มะเร็งปอด GCL4 ที่ไวและดื้อต่อยา adriamycin และสามารถป้องกันการทำลายของเซลล์จากสารอนุมูลอิสระได้

บทที่ 2 วิธีการทดลอง และวัสดุที่ใช้ในการทดลอง

2.1 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 MΩ ปรับ pH เป็น 7.3 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสด้วยสารละลาย NaOH 0.1 N

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

สารสะลายที่ทำหน้าที่ชะ สาร A ประกอบด้วย เมธานอล : เอกเซน : กรดอะซิติกในอัตราส่วน 86.4 : 9.6 : 4 สาร B ประกอบด้วย เมธานอล:ไฮโดรเจนออกไซด์ ในอัตราส่วน 96:4

2.2 การสกัดสารสกัดหยาบ จากเนื้อไม่เม่าหลวง (Crude extracts)

เนื้อไม้มะเม่าหลวงเพศผู้และเพศเมียจาก อำเภอกุดบาก จังหวัดสกลนครที่แห้งสนิท 1648.62 กรัม บรรจุลงในโหลแก้วขนาด 20 ลิตร ที่ทำความสะอาด และอบแห้ง เติม 60% เมธานอลลงไป 10 ลิตร จนท่วมเนื้อไม้กดทับให้แน่น ปิดปากโหลแก้วให้สนิท หมักทิ้งไว้ 7 วัน โดยเขย่าโหลทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เนื้อไม้สัมผัสกับเมทธานอลได้อย่างทั่วถึง นำสาร

ที่ได้จากการหมักมากรองเอาเนื้อไม้ออก แล้วนำสารละลายใส่ขวดก้นกลมนำไประเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหย เพื่อเอาเมธานอลออกจนได้สารละลายข้นหนืด ชั่งน้ำหนักสารที่ได้จากการระเหย และบันทึกผลเป็นน้ำหนักของสารสกัดหยาบ (crude extracts)

2.3 ตรวจสอบส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี แบบ 2 มิติ (Thin-Layer Chromatography two-dimension)

ตัดแผ่น TLC ที่มีซิลิกาเจลเคลือบอยู่ ให้ได้ขนาด 8X10 เซนติเมตร จุดสารสกัดที่ได้จากการหมักเนื้อไม้เม่าหลวง ด้วยไมโครปิเปต ประมาณ 30 ไมโครลิตรลงบนมุมของแผ่น TLC ที่ทำเครื่องหมายไว้ ห่างจากขอบแผ่น 1 เซนติเมตรปล่อยไว้ให้แห้ง วางแผ่นTLC ที่แห้งแล้วลงไปในถัง TLC ที่มีสาร A ปิดฝาไว้ ปล่อยให้สารละลายเคลื่อนที่จนกระทั่งห่างจากขอบด้านบน 1 เซนติเมตร นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ทำสัญลักษณ์บนแผ่น TLC เมื่อพบตำแหน่งที่โมเลกุลไม่เรืองแสง (สีน้ำตาล) นำแผ่น TLC แผ่นเดิมใส่ถังรัน TLC ที่มีสาร B โดยทิศทางการเคลื่อนที่ตั้งฉากกับการเคลื่อนที่ของสาร A ปล่อยให้สารละลายเคลื่อนที่จนกระทั่งห่างจากขอบด้านบน 1 เซนติเมตร นำออกมาตั้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ทำสัญลักษณ์บนแผ่น TLC เมื่อพบตำแหน่งของโมเลกุล

2.4 วิธีการแยกสารบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

ใช้คอลัมน์แก้ว ขนาดความยาว 90 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร เทสาร A ลงในคอลัมน์แก้วที่มีสำลีอุดอยู่ที่ปลายคอลัมน์ ค่อยๆ เทผงซิลิกาเจลลงในคอลัมน์แก้ว

อย่างช้าๆ และใช้มือเคาะข้างๆ คอลัมน์เพื่อให้ซิลิกาเจลสม่ำเสมอ จนกระทั่งคอลัมน์มีซิลิกาเจลอิ่มตัวสูงประมาณ 60 เซนติเมตร ปล่อยสาร A ออกมาทางด้านปลายคอลัมน์ จนสารละลายสูงกว่าขอบ ซิลิกาเจลเล็กน้อย ใส่สำลีปิดทางด้านบนซิลิกาเจล คลุกสารสกัดเม่าหลวงที่ได้จากการระเหยให้เข้มข้นแล้วกับผงซิลิกาเจลผสมให้เข้ากัน เทลงในคอลัมน์ กดให้แน่น ใช้สำลีปิดด้านบน เทสาร A ลงไปเรื่อยๆ สังเกตเห็นสารสกัดเม่าหลวงแยกออกเป็นชั้นๆ ในคอลัมน์ ซึ่งให้แถบสีต่างๆ กัน แยกเก็บสารที่ได้ในแต่ละส่วน ซึ่งมีสีต่างๆกัน ในขวดรูปชมพู่ เทสาร A จนครบ 2.5 ลิตร จากนั้นให้เปลี่ยนตัวทำละลายเป็นสาร B นำสารที่แยกได้ไประเหยโดยเครื่องกลั่นระเหยเพื่อแยกเอาตัวทำละลายออก แล้วนำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ UV-visible spectrophotometer และนำไปตรวจวัดมวลโมเลกุลด้วยเครื่อง mass spectrometer เก็บสารที่แยกบริสุทธิ์ได้ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2. 5 Cell culture

เซลล์มะเร็งชนิด Erythromyeogenous leukemic cell (K562) และ small cell lung carcinoma (GLC4) ทั้งชนิดที่ไวและดื้อต่อยา Adriamycin ถูกเลี้ยงในในอาหารชนิด RPMI 1640 โดยเติม 10 % calf serum และ 1% Penicillin-Streptomycin บ่มในตู้บ่มที่ควบคุมความเข้มข้นของ CO_2 โดยปรับอุณหภูมิให้มีค่า 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% และความเข้มข้นของ $CO_{2(g)}$ 5 %

การเตรียมเซลล์เริ่มต้นในการเลี้ยง 10^5 เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร โดยเซลล์จะเจริญเข้าสู่ระยะ exponential phase ในระยะเวลา 72 ชั่วโมงซึ่งจะได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.8-1 x 10^6 เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร และถ้าเตรียมเซลล์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 5 x 10^5 เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร เซลล์จะเจริญเข้าสู่ระยะ exponential phase ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงซึ่งจะได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.8-1 x 10^6 เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร การนับจำนวนเซลล์ทำโดยใช้ hemocytometer

ปริมาณของเซลล์ตายทดสอบโดยการต้านการซึมเข้าสู่เซลล์ของโมเลกุล Trypan Blue โดยเซลล์ที่ตายแล้วจะสูญเสียความสามารถในการกั้นแยก Trypan Blue ตลอดระยะเวลาในการทดลองนี้พบเปอร์เซนต์การตายของเซลล์ก่อนการทดลองแต่ละชุดไม่เกิน 1.2 $\pm$ 1%

2.6 การทดสอบพิษของโมเลกุล anthracyclines ต่อเซลล์

เซลล์ที่มีความเข้มข้น 5 x10^4 เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร ถูกบ่มในอาหารเลี้ยงชนิด RPMI 1640 ที่มีปริมาตรสุทธิ 1 มิลลิลิตร โดยเติมความเข้มข้นของโมเลกุลที่ต้องการทดสอบเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แล้วนำไป บ่มในตู้บ่มที่ควบคุมความเข้มข้นของ CO_2 โดยปรับอุณหภูมิให้มีค่า 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% และความเข้มข้นของ $CO_{2(g)}$ 5 %เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ความสามารถในกรยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ หรือปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทดสอบโดยเติม 120 µL MTT (0.833 g/l) แล้วนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำเซลล์ไปปั่นแยกและล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ครั้ง เก็บตะกอนเซลล์และเติม 200 µL DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer

เปอร์เซนต์การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์คำนวณได้จากความสัมพันธ์ต่อไปนี้

$$\%IC = 100\{\frac{D.O._{(control)} - D.O._{(drug)}}{D.O._{(control)} - D.O._{(5x10^4)}}\} \quad (1)$$

เมื่อ $D.O._{(control)}$ = จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ต่อ มิลลิลิตรโดยเลี้ยงในอาหารที่ไม่มียา

$D.O._{(drug)}$ = จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ต่อ มิลลิลิตรโดยเลี้ยงในอาหารที่มียา

ประสิทธิภาพของโมเลกุลแสดงโดยค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของโมเลกุลที่ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ 50 %

Resistance Factor (RF) นิยามจากสัดส่วนของ IC_{50} ของเซลล์ดื้อยาต่อ IC_{50} ของเซลล์ที่ไวต่อยา

2.7 ประสิทธิภาพของโมเลกุลในการยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein

เซลล์ที่มีความเข้มข้น 5 $x10^4$ เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร ถูกบ่มในอาหารเลี้ยงชนิด RPMI 1640 ที่มีปริมาตรสุทธิ 1 มิลลิลิตร โดยเติมความเข้มข้นของ pirarubicin หรือ doxorubicin และโมเลกุลที่ต้องการทดสอบเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แล้วนำไป บ่มในตู้บ่มที่ควบคุมความเข้มข้นของ CO_2 โดยปรับอุณหภูมิให้มีค่า 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% และความเข้มข้นของ $CO_{2(g)}$ 5 %เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ประสิทธิภาพของโมเลกุลในการยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ทำให้ระดับความเข้มข้นของยาภายในเซลล์สูง ใช้สัญญลักษณ์ β คำนวณได้จากความสัมพันธ์ต่อไปนี้

$$\beta = \left(\frac{IC_{50R} - IC_{50RI}}{IC_{50R} - IC_{50S}}\right)$$

IC_{50R} คือความเข้มข้นของ anthracycline ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ดื้อยาได้ 50 %

IC_{50RI} คือความเข้มข้นของ anthracycline ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ดื้อยาได้ 50 % เมื่อมีโมเลกุลที่ยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein

IC_{50S} คือความเข้มข้นของ anthracycline ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ไวยาได้ 50 %

2.8 ประสิทธิภาพของโมเลกุล ต่อความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย และการกำจัด ROS ที่ไมโตคอนเดรีย

ไมโตคอนเดรียเป็นแหล่งสังเคราะห์พลังงานที่เกี่ยวกับขบวนการเมทาบอลิซึมของไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของเซลล์ ทำให้มีการเหนี่ยวนำการสร้างสารอนุมูลอิสระหลายชนิดเช่น suproxide anions ($O_2^{\bullet-}$) hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ส่งผลให้เกิดการทำงานที่ผิดปกติของไมโตคอนเดรียหรือถูกทำลาย การติดตามการทำงานของไมโตคอนเดรียโดยตรงจึงเป็นดรรชนีบ่งชี้ถึงระดับภาวะ oxidative damage อันเนื่องมาจากสารอนุมูลอิสระ ที่หน่วยวิจัย physical chemistry Molecular and cellular biology, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้แสดงให้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะเครียดและการเปลี่ยนแปลงระดับสถานะภาพเชิงพลังงานของไมโตคอนเดรีย ซึ่งการศึกษาการเปลี่ยนแปลง

การทำงานของไมโตคอนเดรีย และสถานภาพพลังงานของเซลล์ สามารถกระทำได้แบบไม่ทำลายเซลล์โดยติดตามการสะสมของ Rhodamine B ในไมโตคอนเดรีย ด้วยเทคนิค flow cytometry และ conventional spectrofluorometry

Rhodamine B ถูกนำเข้าและสะสมอยู่ภายในเซลล์โดยความต่างศักย์เมมเบรน โดยเข้าไปสะสมจำเพาะในไมโตคอนเดรีย ซึ่งความเร็วในการซึมเข้าและปริมาณของโมเลกุลที่สะสมในไมโตคอนเดรียขึ้นอยู่กับความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย ความจำเพาะของการสะสมของ Rhodamine B ในไมโตคอนเดรียถูกตรวจสอบ โดย (1) เติม 5 μM FCCP ทำให้ความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรียถูกลบ ส่งผลให้ปริมาณการสะสมของ Rhodamine B ลดลงอย่างมาก (2) เติม 5 μM Cyclosporine A ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการเปิดของ mitochondrial permeability transitin pores (MTP) ของไมโตคอนเดรีย ทำให้ความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรียสูงขึ้นทำให้ Rhodamine B สะสมในไมโตคอนเดรียมากขึ้น และ (3) เติม MTT ซึ่งถูกรีดิวส์ด้วย succinate dehydrogenase (complex II) ทำให้ความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรียเพิ่มขึ้นทำให้ Rhodamine B สะสมมากขึ้น ในขณะเดียวกันสัญญาณการเรืองแสงของ Rhodamine B จะถูกดับลง (quenching)โดยผลผลิตของการรีดิวส์ MTTที่เกิดในไมโตคอนเดรีย

การเข้าสู่เซลล์ของ Rhodamine B สามารถขยายผลเพื่อให้สามารถติดตามด้วยเครื่อง conventional spectrofluorometer ดังรูปที่ 5 เมื่อเซลล์ถูกบ่มกับ 40 nM Rhodamine B ซึ่งให้ความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงเท่ากับ F_o โดยสัญญาณการเรืองแสงจะคงที่ เมื่อเติม MTT

มีผลทำให้สัญญาณการเรืองแสงลดลงเรื่อยเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งความชันของกราฟ $(\frac{dF}{dt})_{MTT}$ แสดงถึงความเร็วในการเข้าสู่เซลล์ของ Rhodamine B ซึ่งความเร็วในการเข้าสู่เซลล์ของ Rhodamine B สามารถคำนวนได้จาก

$$V_{rho} = (\frac{dF}{dt}) x C_T$$

เมื่อ C_T คือความเข้มข้นของของ Rhodamine B ที่เติมเข้าไปมีหน่วยเป็น M

ความเร็วในการเข้าสู่เซลล์ของ Rhodamine B ขึ้นอยู่กับความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย ความต่างศักย์เมมเบรนไมโตคอนเดรียสามารถคำนวณได้จากความสัมพันธ์ของ Nerst ดังนี้

$$[\text{Rho B}]_m/[\text{RhoB}]_i = 10^{(\Delta\Psi_{m.F/2.303RT})}$$

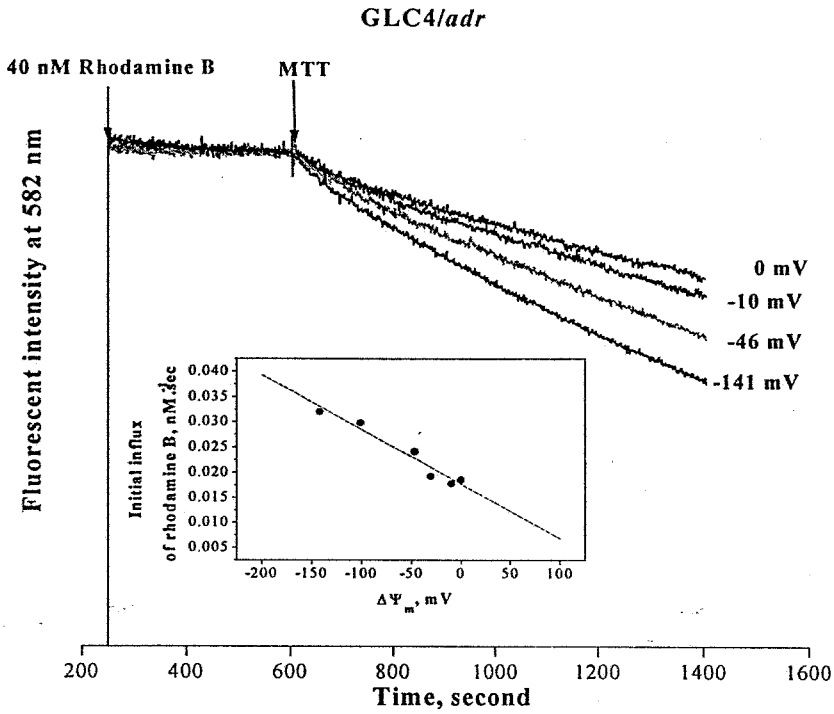
เมื่อเวลาใกล้ ๆ จุดเริ่มต้นและความเร็วของการเข้าไปสะสมภายในไมโตคอนเดรียในหน่วย nM/s ทำให้สามารถคำนวณความต่างศักย์เมมเบรนในหน่วย mV ได้ดังนี้

$$\Delta\Psi_m = -61.51 \log V_i - 258.46$$

ประสิทธิภาพของโมเลกุล apigenin ต่อการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย ในสภาวะปกติ และในสภาวะ oxidative stress

การทดสอบประสิทธิภาพของโมเลกุล polyphenol ต่อการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย และการกำจัด ROS ที่ไมโตคอนเดรีย โดยบ่มเซลล์กับโมเลกุล polyphenol ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ ในสภาวะที่เซลล์ปกติ และที่บ่มเซลล์ในสภาวะ

ต่างๆเพื่อชักนำให้เกิดภาวะ oxydative 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



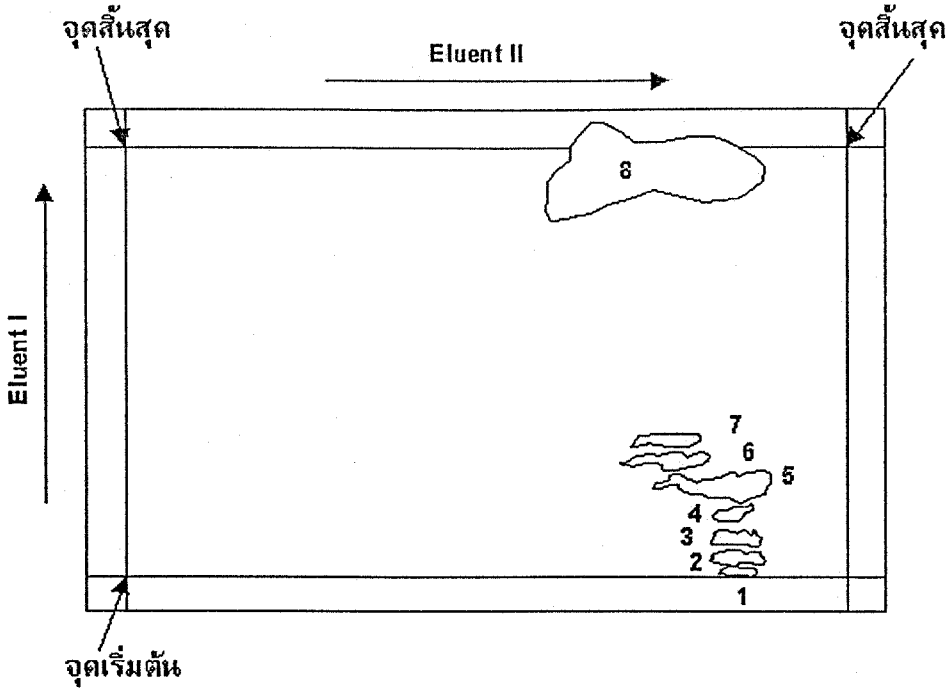
รูปที่ 5 การวัดความต่างศักย์ของไมโตคอนเดรียโดย rhodamine B และ MTT-reduction (ก). กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย กับ อัตราเร็วของการสะสม rhodamine B ในไมโตคอนเดรีย (ข)

บทที่ 3 ผลการทดลอง

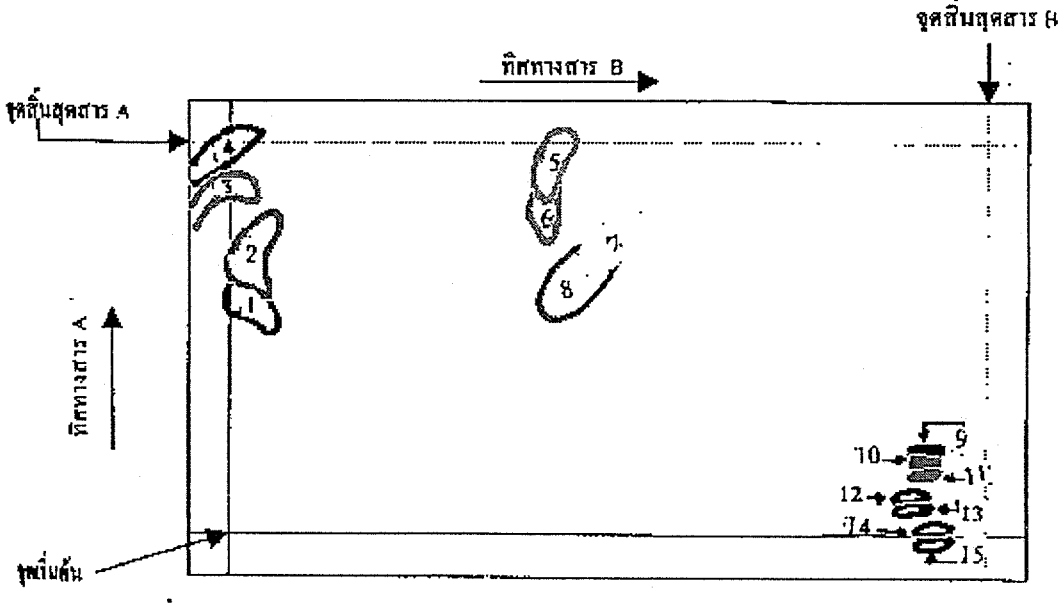
3.1 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารสกัด

มะเม่าหลวง (*Antidesma Thwaitesianum Muell. Arg*) เป็นไม้ยืนต้นที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในประเทศไทย จัดเป็นไม้แยกเพศผู้และเพศเมีย ชาวไทยได้รู้จักนำเนื้อไม้มะเม่ามาใช้เป็นองค์ประกอบของยาโดยมีสรรพคุณหลากหลาย ในการศึกษานี้พบว่าสารสกัดหยาบของเนื้อเยื่อไม้มะเม่าเพศผู้และเพศเมียที่ได้จากการสกัดโดยใช้ 60% Methanol มีองค์ประกอบทางเคมี (โดยเทคนิคด้วยเทคนิค 2-D TLC) ดังแสดงในรูปที่ 6 และ รูปที่ 7 โดยพบว่า สารสกัดหยาบของมะเม่าเพศผู้ประกอบด้วยโมเลกุลทั้งหมด 8 กลุ่ม และสารสกัดหยาบของมะเม่าเพศเมียประกอบด้วยโมเลกุล 15 กลุ่ม คุณลักษณะเฉพาะการเคลื่อนที่ของสาร (R_f) แสดงในตารางที่ 1

โมเลกุลที่แยกบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของมะเม่าเพศผู้และเพศเมียโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี (ตารางที่ 2๗ และคุณลักษณะเฉพาะแถบการดูดกลืนแสงและสเปคตรัมแสดงมวลโมเลกุลแสดงในรูปที่ 7 8 9 และตารางที่ 3



รูปที่ 6 ส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเนื้อไม้เม่าหลวงเพศผู้ที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี แบบ 2 มิติ



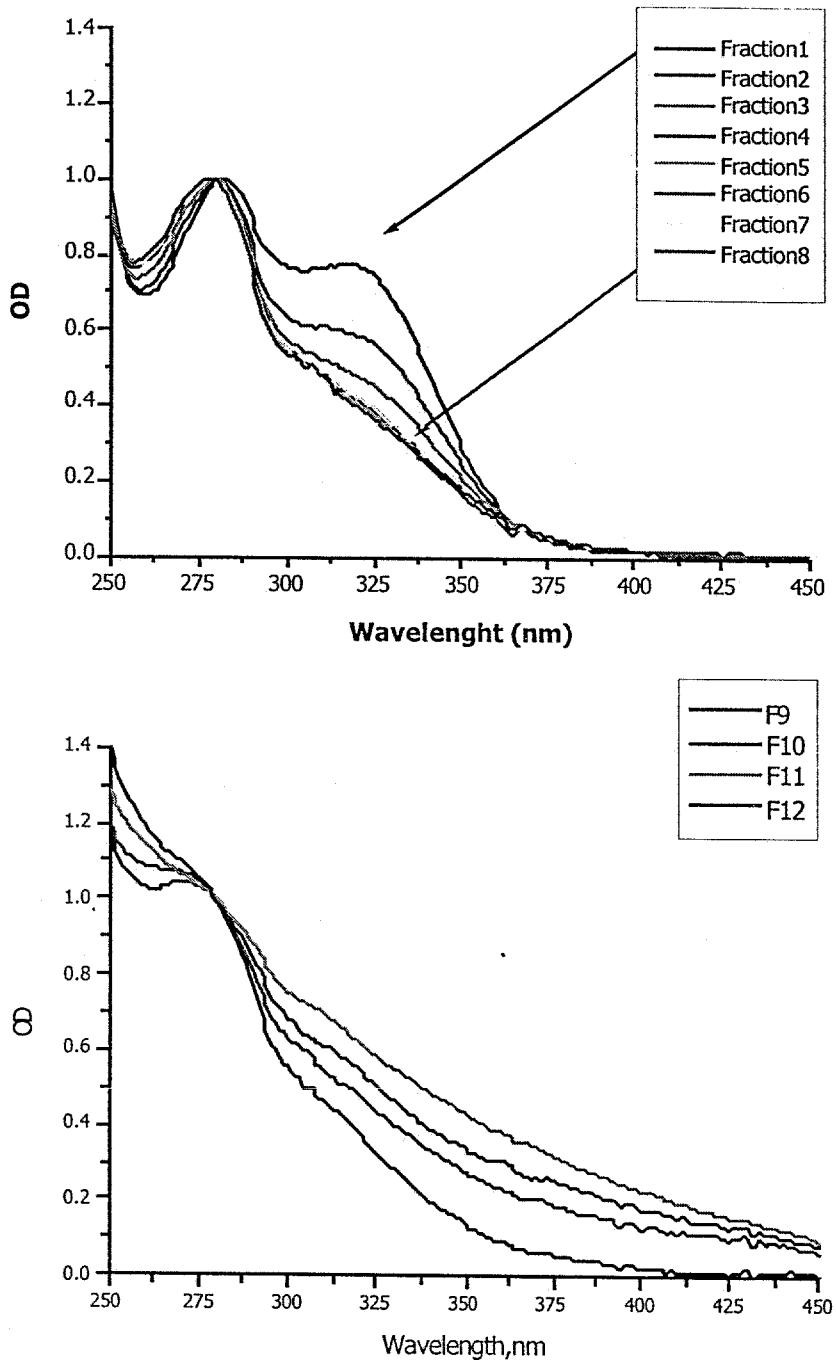
รูปที่ 7 ส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเนื้อไม้เม่าหลวงเพศเมียที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี แบบ 2 มิติ

ตารางที่ 1 ค่า Rf ของโมเลกุลที่แยกโดยเทคนิค 2-D TLC จากสารสกัดหยาบของเนื้อไม้มะเม่าเพสผู้และเพศเมีย

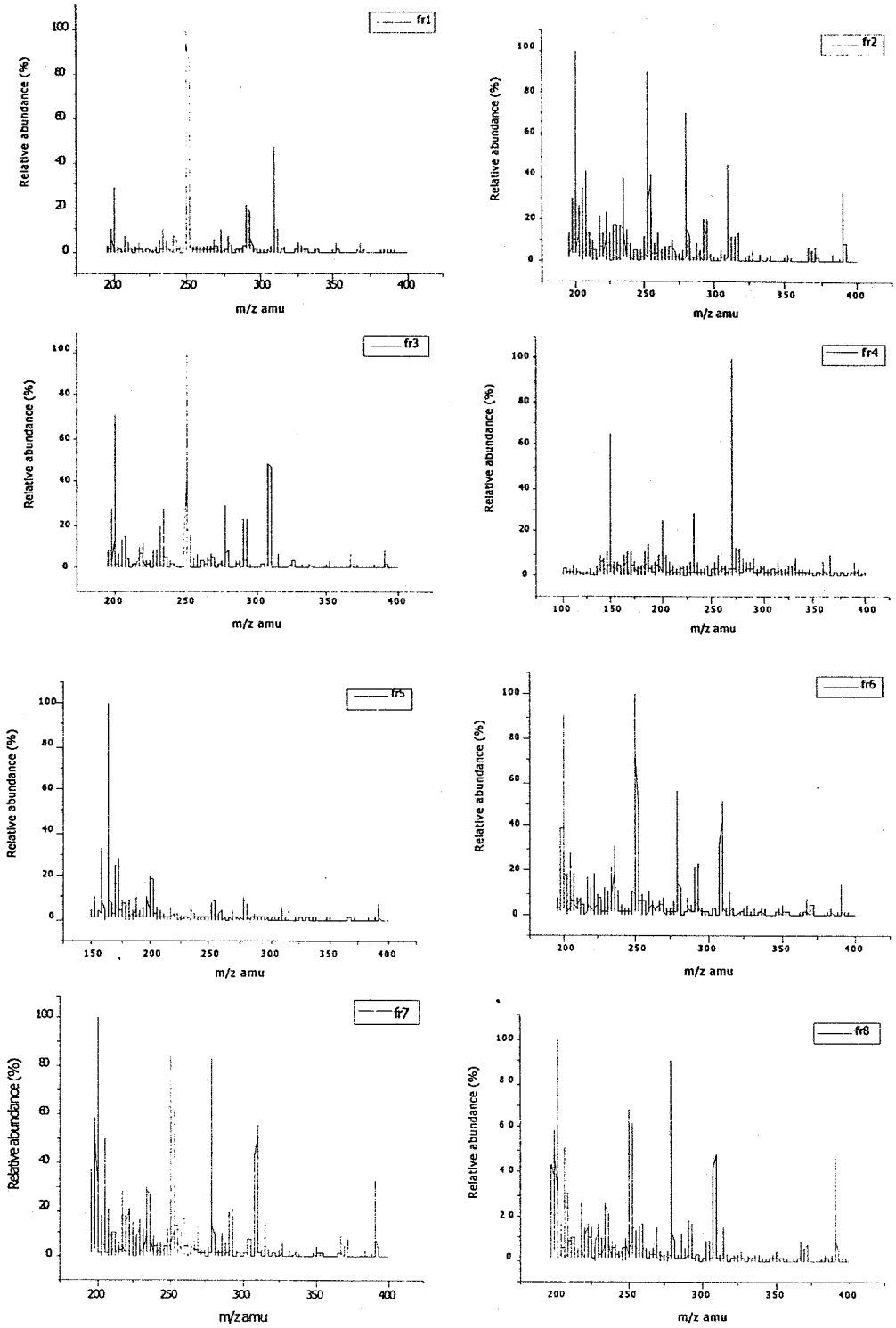
โมเลกุลลำดับที่	สารสกัดหยาบจากเนื้อไม้เพศผู้		สารสกัดหยาบจากเนื้อไม้เพศผู้	
	เรืองแสงสี	ค่า Rf	เรืองแสงสี	ค่า Rf
1	สีน้ำตาล	0.908	สีน้ำตาล	0.592
2	สีน้ำตาล	0.898	สีน้ำตาล	0.704
3	สีน้ำตาล	0.900	สีน้ำตาล	0.876
4	สีน้ำตาล	0.950	สีน้ำตาล	0.975
5	สีน้ำตาล	0.835	สีน้ำตาล	0.433
6	สีน้ำตาล	0.812	สีน้ำตาล	0.444
7	สีน้ำตาล	0.825	สีน้ำตาล	0.511
8	สีน้ำตาล	0.602	สีน้ำตาล	0.456
9			สีน้ำตาล	0.911
10			สีน้ำตาล	0.911
11			สีน้ำตาล	0.911
12			สีน้ำตาล	0.911
13			สีน้ำตาล	0.911
14			สีน้ำตาล	0.944
15			สีน้ำตาล	0.944

ตารางที่ 2 สารสกัดที่แยกได้ สีของสารละลาย และปริมาตรของสารละลายที่แยกโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสารสกัดจากเนื้อไม้มะเม่า

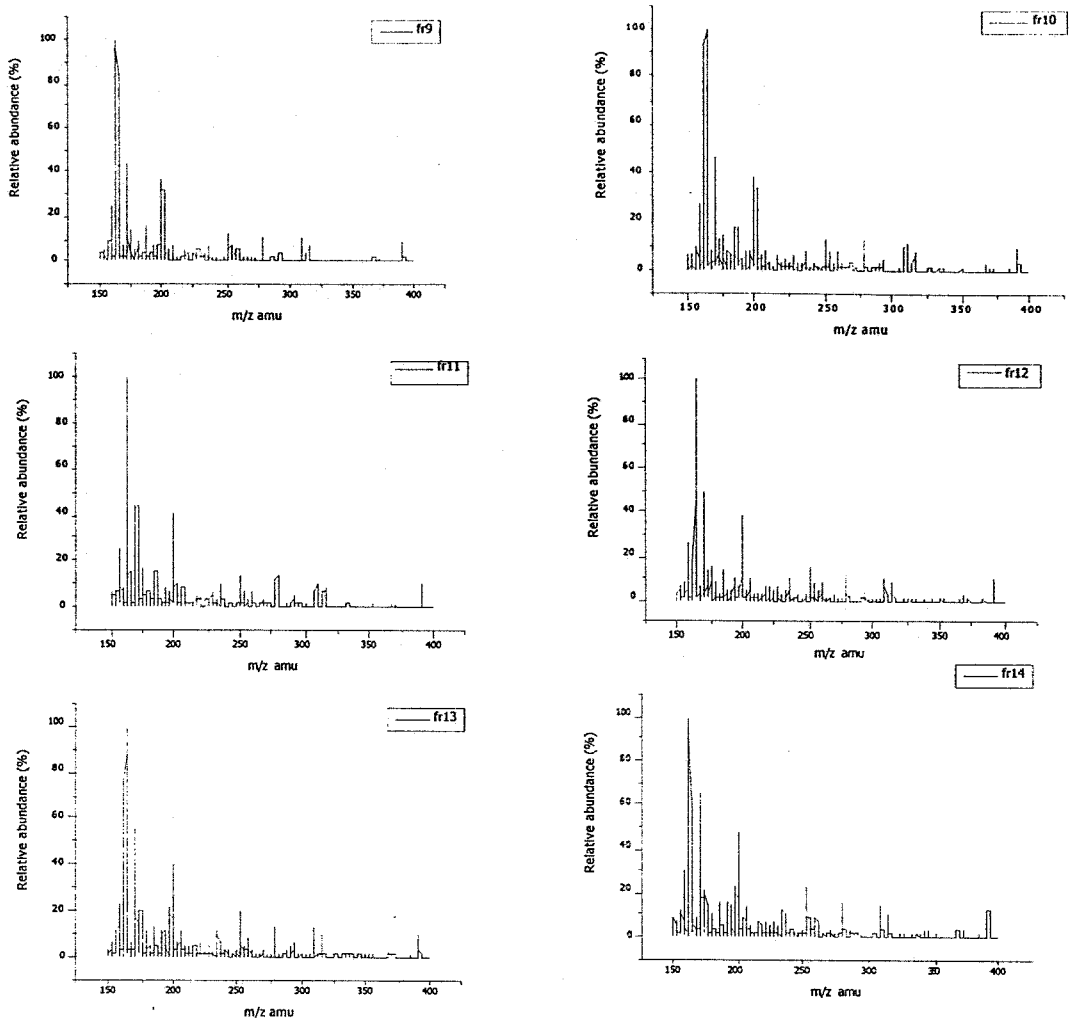
Eluent	มะเม่าเพศผู้			มะเม่าเพศเมีย		
	fraction	สีของสารละลาย	ปริมาตร (ml)	fraction	สีของสารละลาย	ปริมาตร (ml)
A	1	น้ำตาลเข้ม	100	1	เหลืองอมเขียว	50
	2	น้ำตาลดำ	100	2	น้ำตาลอมเขียว	100
	3	น้ำตาลแดง	200	3	น้ำตาลเข้ม	120
	4	ส้ม	150	4	น้ำตาลดำ	200
	5	ส้มอ่อน	150	5	น้ำตาลอมส้ม	150
	6	เหลืองเข้ม	200	6	น้ำตาลอมเหลือง	250
	7	เหลือง	300	7	ส้มอมเหลือง	350
	8	เหลืองอ่อน	200	8	เหลืองอัมพัน	250
	9	เหลืองส้มอ่อน	250	9	เหลืองเข้ม	250
	10	เหลืองส้มอ่อนมาก	200	10	เหลือง	350
				11	เหลืองอ่อน	450
B	11	เหลือง	660	12	เหลืองอ่อน(อ่อนกว่า11)	500
				13	เหลืองอ่อน(อ่อนกว่า12)	750
				14	เหลืองจาง	500



รูปที่ 8 แถบการดูดกลืนแสงของสารสกัดบริสุทธิ์จากเนื้อไม้มะเม่าเพศเมีย



รูปที่ 9.1 สเปคตรัมแสดงมวลโมเลกุลของสารสกัดที่แยกบริสุทธิ์ Fractionที่ 1-8



รูปที่ 9.2 สเปคตรัมแสดงมวลโมเลกุลของสารสกัดที่แยกบริสุทธิ์ Fraction ที่ 9-14

ตารางที่ 3 มวลโมเลกุลของสารสกัดที่แยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมโครมาโตกราฟี

Eluent	มะเม่าเพศผู้			มะเม่าเพศเมีย		
	Fraction	สีของสารละลาย	มวลโมเลกุล	fraction	สีของสารละลาย	มวลโมเลกุล
A	1	น้ำตาลเข้ม	270	1	เหลืองอมเขียว	308.19
	2	น้ำตาลดำ		2	น้ำตาลอมเขียว	390.19
	3	น้ำตาลแดง		3	น้ำตาลเข้ม	308.19
	4	ส้ม		4	น้ำตาลดำ	270.02
	5	ส้มอ่อน		5	น้ำตาลอมส้ม	199.03
	6	เหลืองเข้ม		6	น้ำตาลอมเหลือง	308.19
	7	เหลือง		7	ส้มอมเหลือง	390.30
	8	เหลืองอ่อน		8	เหลืองอัมพัน	390.40
	9	เหลืองส้มอ่อน		9	เหลืองเข้ม	390.21
	10	เหลืองส้มอ่อนมาก		10	เหลือง	
				11	เหลืองอ่อน	
B	11	เหลือง		12	เหลืองอ่อน(อ่อนกว่า11)	
				13	เหลืองอ่อน(อ่อนกว่า12)	
				14	เหลืองจาง	

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

3.2 การทดสอบพิษของโมเลกุลต่อเซลล์

ความสามารถในการต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบและโมเลกุลที่แยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีบางโมเลกุลแสดงในตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 ความสามารถในการต้านมะเร็งเม็ดเลือด K562 ที่ไวและดื้อต่อยา doxorubicin ของสารสกัดจากเนื้อไม้มะเม่าเพศผู้และเพศเมีย

ชนิดของสาร	IC_{50} (µg/ml)		Resistance factor
	K 562	K562/adr	
มะเม่าเพศผู้			
สารสกัดหยาบ	0.10 ± 0.05	0.08 ± 0.01	0.80
โมเลกุลที่ 1	2.53 ± 0.39	0.13 ± 0.02	0.05
โมเลกุลที่ 4	6.75 ± 0.20	7.50 ± 2.00	1.11
โมเลกุลที่ 9	0.35± 0.05	0.16 ± 0.05	0.46
มะเม่าเพศเมีย			
สารสกัดหยาบ	3.57 ± 0.12	2.50 ± 0.42	0.7
โมเลกุลที่ 1	5.00 ± 3.22	7.72 ± 1.14	-
โมเลกุลที่ 2	9.40 ± 0.30	10.0 ± 0.70	1.06
โมเลกุลที่ 3	10.0 ± 1.89 (Icmax=36%)	10.0 ± 0.84	-
โมเลกุลที่ 6	10.0 ± 3.03 (Icmax=33%)	10.0 ± 9.52	-

156150
571.771
ร 671
๓๑

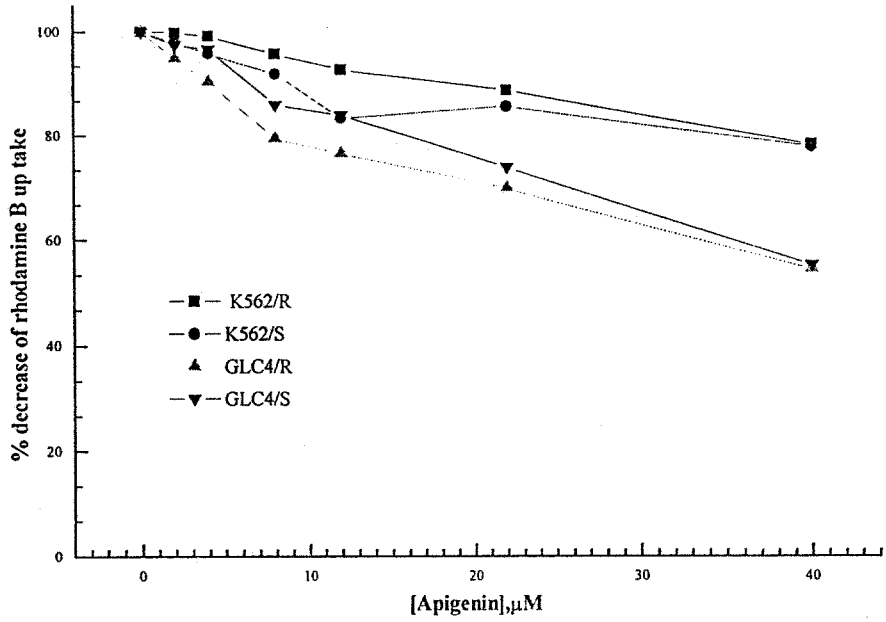
ตารางที่ 5 ความสามารถในการต้านมะเร็งเม็ดเลือด K562 และ GLC4 ที่ไวและดื้อต่อยา doxorubicin ของสารสกัดบริสุทธิบางโมเลกุลของมะเม่าเพศเมีย

Molecules	IC_{50} µg/ml			
	K562	K562/adr	GLC4	GLC4/adr
Fraction 4	215	300	125	100
Fraction 5	350	420	200	165
Fraction 6	320	420	310	215
Fraction 7	340	410	230	175
Fraction 8	510	430	185	150
Apigenin	3.2 1	1.68	1.52	1.61
Eriodictyol	7.15	2.98	4.23	3.93
Kaempferol	3.79	3.07	2.81	2.52
Quercitrin	3.19	1.48	2.44	3.37
Pirarubicin	0.0149	0.0999	0.0093	0.0534

3.3 ประสิทธิภาพของpolyphenol บางโมเลกุล ต่อความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย และการกำจัด ROS ที่ไมโตคอนเดรีย

ในชุดการทดลองได้เลือกใช้ Apigenin โดยพบว่าในระดับความเข้มข้น 40 μM มีผลทำให้ความต่างศักย์ที่ไมโตคอนเดรียลดลงในทุก cell lines (รูปที่ 10)

เนื่องจากโมเลกุล apigenin มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ดังนั้นเพื่อที่จะทดสอบประสิทธิภาพของโมเลกุล apigenin ต่อการกำจัด ROS ที่ไมโตคอนเดรีย ได้ทำการทดลองโดยบ่มเซลล์กับ H_2O_2 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะเครียดจากการเพิ่มปริมาณของ ROS พบว่าในเซลล์มะเร็ง GLC4 ความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรียลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 11ก) และโมเลกุล apigenin (40 μM) สามารถกำจัด ROS และเพิ่มความต่างศักย์ไมโตคอนเดรียได้เฉพาะในเซลล์มะเร็ง GLC4 โดยมีความเร็วการซึมผ่านของสัญญาณ rhodamine B เพิ่มขึ้น 0.5, 0.97 เท่าในเซลล์มะเร็ง GLC4/S, GLC4/ADR ตามลำดับ (รูปที่ 11ข) และพบว่าเซลล์มะเร็ง K562 สามารถทนต่อภาวะ oxidative stress ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็ง GLC4 และในภาวะที่ชักนำให้เซลล์มะเร็ง K562 อยู่ในภาวะ oxidative stress พบว่าโมเลกุล



รูปที่ 10 ประสิทธิภาพของโมเลกุล APIGENIN ต่อการลดลงของการซึมผ่านของสัญญาณ RHODAMINE B ในเซลล์มะเร็ง K562 และ GLC4 ที่ดื้อต่อยา และที่ไวต่อยาตามลำดับ

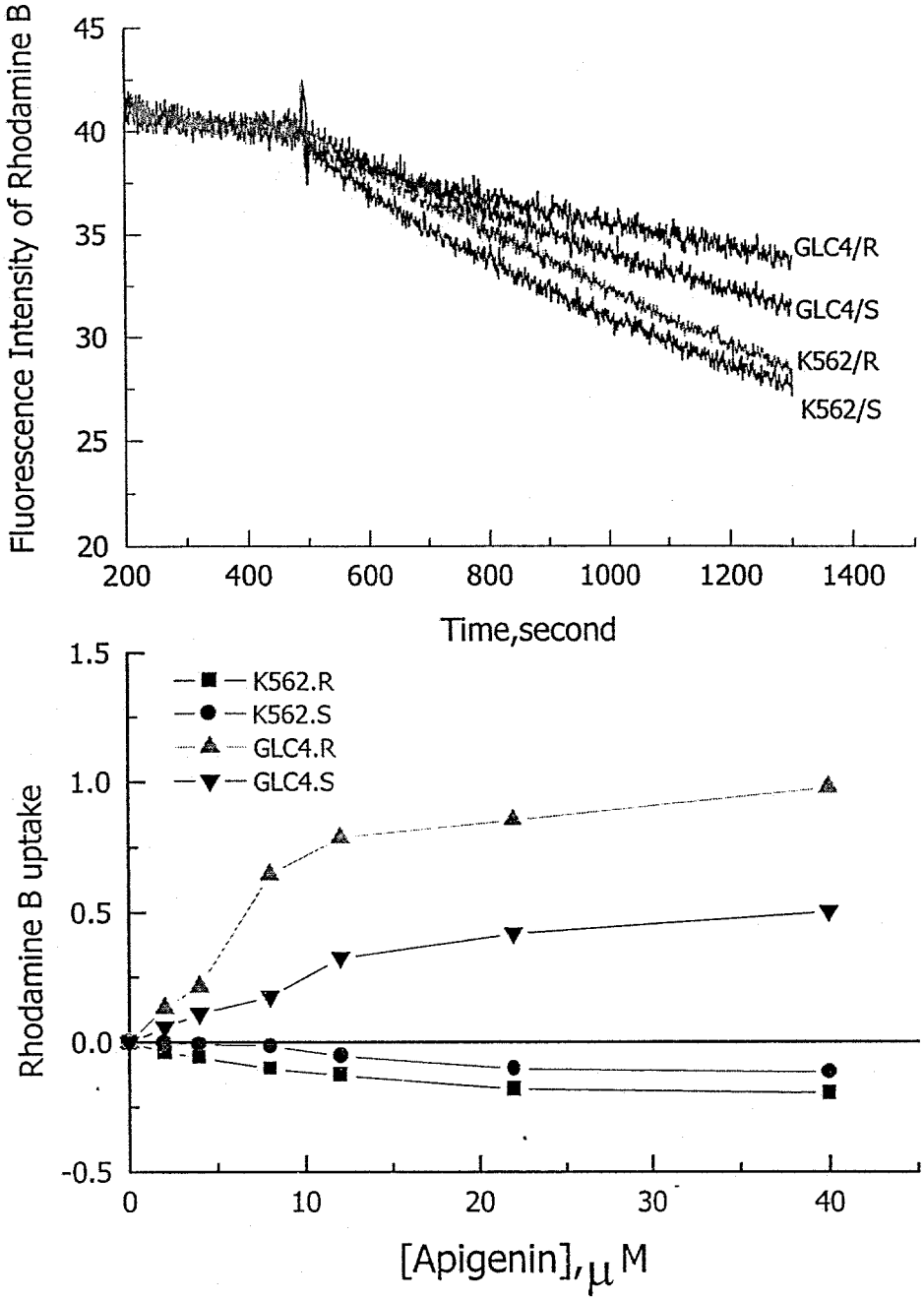
เมื่อทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะเครียดมากกว่าเดิมโดยบ่มด้วย BSO ความเข้มข้น 50 μM เป็นเวลา 20–24 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ glutathione ภายในเซลล์ลดต่ำลง อย่างมีนัยสำคัญ โดย BSO ยับยั้งเอนไซม์ γ-glutamylcysteine synthetase ที่ใช้ในการสร้าง glutathione และนำเซลล์ที่บ่มด้วย BSO มาบ่มต่อด้วย H_2O_2 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเมื่อตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วย trypan blue มีการตายของเซลล์คิดเป็นร้อยละ 6, 5, 96, 86 ในเซลล์มะเร็ง K562/S, K562/ADR, GLC4/S, GLC4/ADR ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์กับสเปคตรัมการซึมผ่านของสัญญาณ rhodamine B (รูปที่ 12ก) เซลล์มะเร็ง GLC4 มีภาวะ oxidative stress มากกว่าเซลล์มะเร็ง K562 เนื่องจากความเร็วซึมผ่านของสัญญาณ rhodamine B ในเซลล์มะเร็ง GLC4

น้อยกว่าในเซลล์มะเร็ง K562 อย่างมีนัยสำคัญ โมเลกุล apigenin (40 μM) สามารถกำจัด ROS และเพิ่มความต่างศักย์ไมโตคอนเดรียได้เฉพาะในเซลล์มะเร็ง GLC4 โดยมีความเร็วการซึมผ่านของสัญญาณ rhodamine B เพิ่มขึ้น 1.32, 4.77 เท่า และมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนการตายของเซลล์ที่ลดลงคิดเป็นร้อยละ 12, 10 ในเซลล์มะเร็ง GLC4/S, GLC4/ADR ตามลำดับ (รูปที่ 12ข) และ (รูปที่ 13) ส่วนในเซลล์มะเร็ง K562 พบว่าเซลล์สามารถทนต่อภาวะ oxidative stress ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็ง GLC4 และโมเลกุล apigenin ไม่เปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไมโตคอนเดรีย

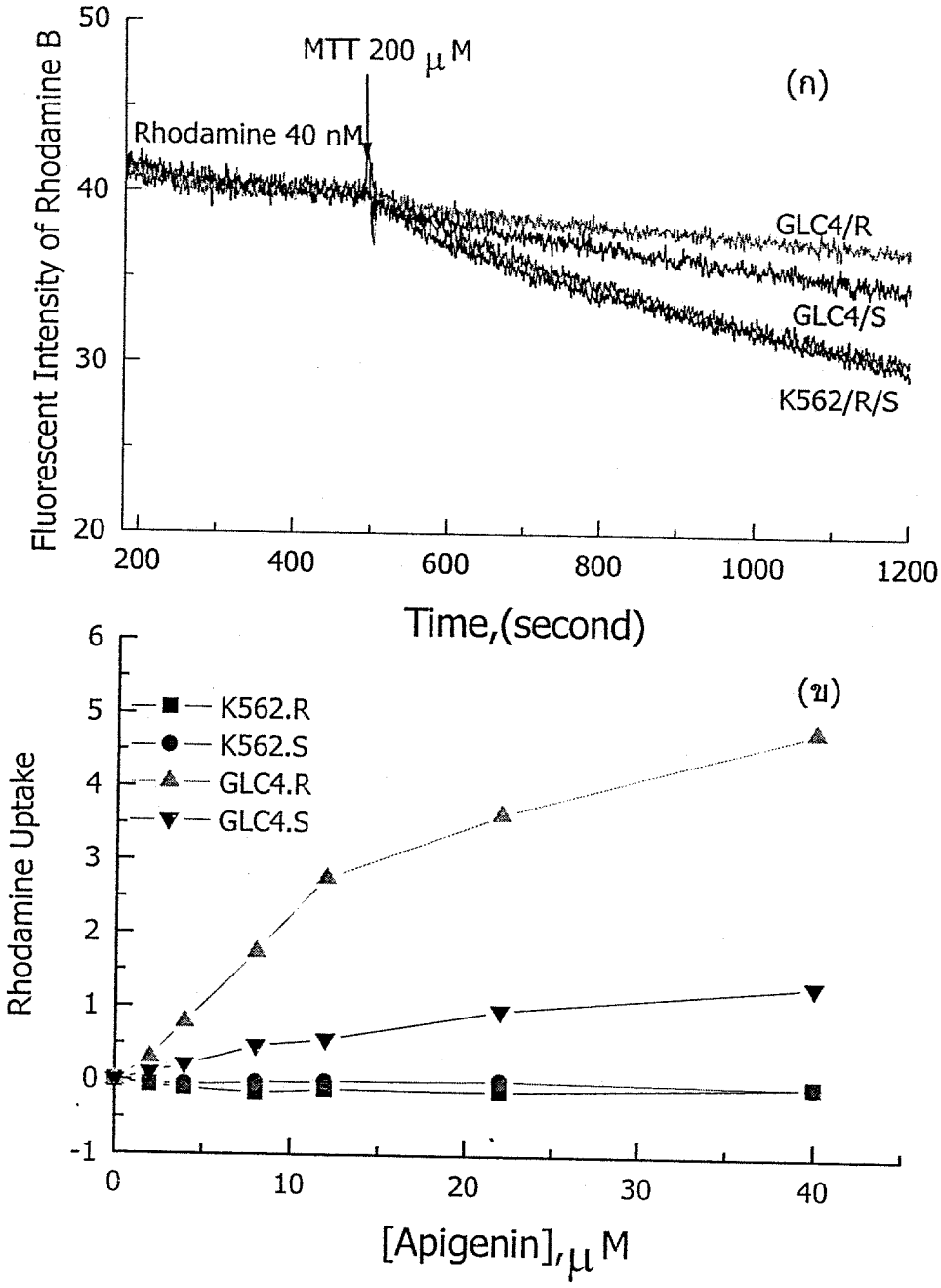
ในภาวะที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด oxidative stress และติดตามการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย พบว่าเซลล์มะเร็ง K562 สามารถทนต่อภาวะ oxidative stress ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็ง GLC4 อาจเนื่องมาจาก การทำงานของ MRP protein ซึ่งต้องการ glutathione นอกจากนี้ยังขึ้นกับคุณสมบัติจำเพาะของเซลล์แต่ละชนิด 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 เพิ่มมากขึ้นในไมโตคอนเดรีย ทำให้ความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรียลดลง และโมเลกุล apigenin มีประสิทธิภาพในการกำจัด ROS ที่ไมโตคอนเดรียในเซลล์ GLC4

โดยทำให้เซลล์ที่อยู่ในสภาวะเครียด กลับสู่สภาพที่มีความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรีย

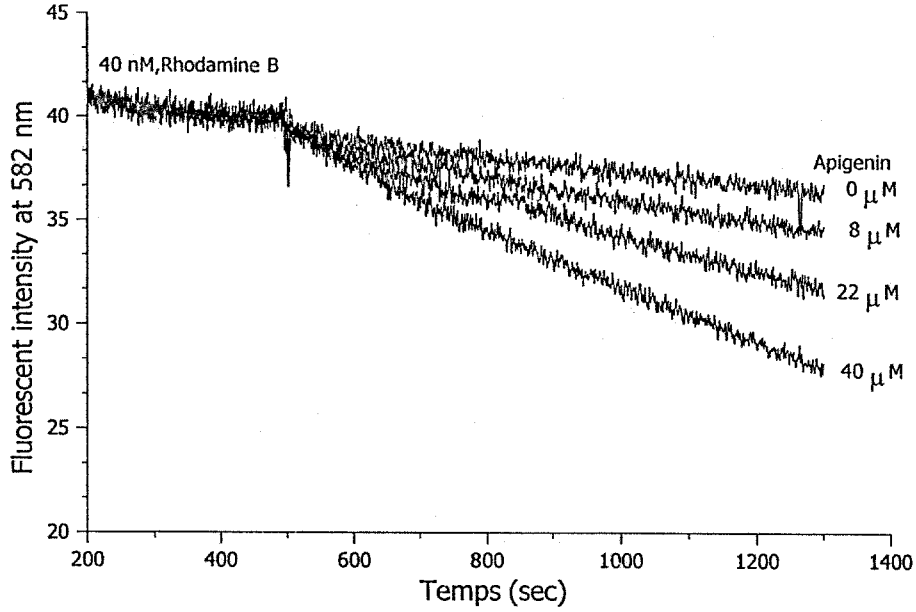
เพิ่มขึ้น



รูปที่ 11 การซึมผ่านของสัญญาณ RHODAMINE B ในเซลล์ที่บ่มด้วย H_2O_2 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สเปคตรัมแสดงข้อมูลเชิงคุณภาพของสัญญาณ RHODAMINE B (ก) ประสิทธิภาพของโมเลกุล APIGENIN ต่อการกำจัด ROS ที่ไมโตคอนเดรีย (ข)



รูปที่ 12 การซึมผ่านของสัญญาณ RHODAMINE B ในเซลล์ที่บ่มด้วย BSO 50 μM เป็นเวลา 20 – 24 ชั่วโมง และบ่มต่อด้วย H_2O_2 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สเปคตรัมแสดงข้อมูลเชิงคุณภาพของสัญญาณ RHODAMINE B (ก) ประสิทธิภาพของโมเลกุล APIGENIN ต่อการกำจัด ROS ที่ไมโตคอนเดรีย (ข)



รูปที่ 13 สเปคตรัมแสดงประสิทธิภาพของโมเลกุล apigenin ต่อการเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านของสัญญาณ rhodamine B ในเซลล์มะเร็ง GLC4/ADR โดยบ่มด้วย BSO 50 μM เป็นเวลา 20–24 ชั่วโมง และบ่มต่อด้วย H_2O_2 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง

สารสกัดในกลุ่ม polyphenol จากเนื้อไม้มะเม่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งเม็ดเลือด K562 และมะเร็งปอด GLC4 ทั้งในชนิดที่ดื้อยาและไวต่อยา และสามารถกำจัด ROS ที่มากเกินไปในไมโตคอนเดรียได้โดยทำให้ความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรียเพิ่มขึ้น 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 นอกจากนี้ยังพบว่า โมเลกุล polyphenol ที่ศึกษามีศักยภาพในการเพิ่มพิษของยารักษามะเร็ง

โมเลกุลที่สกัดได้จากเนื้อไม้มะเม่ามีศักยภาพสูงมากที่ควรจะได้รับการพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้เป็นยาต้านมะเร็งหรือในอุตสาหกรรมอาหาร

เอกสารอ้างอิง

Guz NR, Stermitz FR, Johnson JB, Beeson TD, Willen S, Hsiang JF and Lewis K, (2001) Flavonolignan and flavone inhibitors of a *Straphylococcus aureus* multidrug resistance pump: Structure-Activity relationship, J. Med. Chem., 44, 261-268.

Taylor WC, and Attaur R, (1994) Constituents of some Asian medicinal plants, Pure and Applied chemistry, 66, 2375-2378.

Lichius JJ, Odile T, Alain M, Mary P, Francoise GV, and Thierry S, (1994) Antimitotic and cytotoxic flavonols from *Zieridium pseudobtusifolium* and Acronychia porteri, natural Products, 57, 1012-1016.

Orjala J, Anthrony D, Wright HB, Gero F, Oho S, heinz R and Topul R, (1994) Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from piper aduncum, Natural products, 57, 18-26.

Solis PN, Ravelo AG, Gonzalez AG, Gupta MP, Phillipson JD, (1995) Bioactive anthraquinone glycolysides from Picramia antidesma spp. Fessonia, Phytochemistry, 38, 477-480.

6. Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC, Rodrigguez RJ, Yang YH, Barmes DW, and Buhler DR, (1999) Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (Humulus lupulus) in human cancer cell lines, Food Chem. Tox. 37, 271-285.

7. Peterson G and Barnes S, (1993) Genistein and Biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cell but not epidermal growth factor receptor Tyrosine autophosporylation, prostate, 22, 335-345.

8. Musey PI, Adlercreutz H, Gould KG, Collins DC, Fotsis T, Bannwart C, Makela T, Wahala K, Brunow G, Hase T.(1995) Effect of diet on lignans and isoflavonoid phytoestrogens in chimpanzees. Life Sci, 57, 655-664.

9. Hutchins AM, Lampe JW, Martini MC, Campbell DR, Slavin JL. (1995) Vegetables, fruits, and legumes: effect on urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion. J Am Diet Assoc, 95, 769-774.

10. Markaverich B, Mani S, Alejandro MA, Mitchell A, Markaverich D, Brown T, Velez-Trippe C, Murchison C, O'Malley B, Faith R. (2002) A novel endocrine-disrupting agent in corn with mitogenic activity in human breast and prostatic cancer cells. Environ Health Perspect.,110, 169-177.

11. Whitten PL, Patisaul HB, Young LJ. (2002) Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. Neurotoxicol Teratol, 24, 47-54.

12. Ferguson SA, Flynn KM, Delclos KB, Newbold RR, Gough BJ. (2002) Effects of lifelong dietary exposure to genistein or nonylphenol on amphetamine-stimulated striatal dopamine release in male and female rats. Neurotoxicol Teratol, 24, 37-45.

13. Lephart ED, West TW, Weber KS, Rhees RW, Setchell KD, Adlercreutz H, Lund TD. (2002) Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. Neurotoxicol Teratol, 24, 5-16.

14. Lamartiniere CA, Wang J, Smith-Johnson M, Eltoum IE. (2002) Daidzein: bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprevention in female rats. Toxicol Sci, 65, 228-238.

15. Bobrowska-Hagerstrand M, Wrobel A, Rychlik B, Bartosz G, Soderstrom T, Shirataki Y, Motohashi N, Molnar J, Michalak K, Hagerstrand H. (2001) Monitoring of MRP-like activity in human erythrocytes: inhibitory effect of isoflavones. Blood Cells Mol Dis, 27, 894-900.

16. Tsimberidou AM, Paterakis G, Androutsos G, Anagnostopoulos N, Galanopoulos A, Kalmantis T, Meletis J, Rombos Y, Sagriotis A, Symeonidis A, Tiniakou M, Zoumbos

N, Yataganas X. (2002) Evaluation of the clinical relevance of the expression and function of P-glycoprotein, multidrug resistance protein and lung resistance protein in patients with primary acute myelogenous leukemia, Leuk Res, 26, 143-154.

17. Podgorski I, Bull AW. (2001) Energy-dependent export of the 13-oxooctadecadienoic acid-glutathione conjugate from HT-29 cells and plasma membrane vesicles. Biochim Biophys Acta, 1533, 55-65.

18. Tamai I, Yamashita J, Kido Y, Ohnari A, Sai Y, Shima Y, Naruhashi K, Koizumi S, Tsuji A. (2000) Limited distribution of new quinolone antibacterial agents into brain caused by multiple efflux transporters at the blood-brain barrier, J Pharmacol Exp Ther, 295, 146-152.

19. Decleves X, Regina A, Laplanche JL, Roux F, Boval B, Launay JM, Scherrmann JM. (2000) Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes, J Neurosci Res., 60, 594-601.

20. den Boer ML, Pieters R, Kazemier KM, Janka-Schaub GE, Henze G, Veerman AJ. (1998) The modulating effect of PSC 833, cyclosporin A, verapamil and genistein on

in vitro cytotoxicity and intracellular content of daunorubicin in childhood acute lymphoblastic leukemia, Leukemia, 12, 912-920.

21. Simon PN, Chaboud A, Darbour N, Di Pietro A, Dumontet C, Lurel F, Raynaud J, Barron D. (2001) Modulation of cancer cell multidrug resistance by an extract of Ficus citrifolia. Anticancer Res.,21,1023-1027.

22. Comte G, Daskiewicz JB, Bayet C, Conseil G, Viornery-Vanier A, Dumontet C, Di Pietro A, Barron D. (2001) C-Isoprenylation of flavonoids enhances binding affinity toward P-glycoprotein and modulation of cancer cell chemoresistance. : J Med., 44, 763-768.

23. Ahmad I, Beg AZ. (2001) Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens, J Ethnopharmacol, 74, 113-123.

24. De Vincenzo R, Ferlini C, Distefano M, Gaggini C, Riva A, Bombardelli E, Morazzoni P, Valenti P, Belluti F, Ranelletti FO, Mancuso S, Scambia G. (2000) In vitro evaluation of newly developed chalcone analogues in human cancer cells, Cancer Chemother Pharmacol, 46, 305-312.

25. Walgren RA, Karnaky KJ Jr, Lindenmayer GE, Walle T. (2000) Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2, J Pharmacol Exp Ther., 294, 830-836.

26. Sadzuka Y, Sugiyama T, Sonobe T., (2000) Efficacies of tea components on doxorubicin induced antitumor activity and reversal of multidrug resistance, Toxicol Lett. 114, 155-162.

27. Maitrejean M, Comte G, Barron D, El Kirat K, Conseil G, Di Pietro A. (2000) The flavanolignan silybin and its hemisynthetic derivatives, a novel series of potential modulators of P-glycoprotein, Bioorg Med Chem Lett, 10, 157-160.

28. Mitrocotsa D, Bosch S, Mitaku S, Dimas C, Skaltsounis AL, Harvala C, Briand G, Roussakis C. (1999) Cytotoxicity against human leukemic cell lines, and the activity on the expression of resistance genes of flavonoids from Platanus orientalis, Anticancer Res., 19, 2085-2088.

29. Perez-Victoria JM, Chiquero MJ, Conseil G, Dayan G, Di Pietro A, Barron D, Castanys S, Gamarro F. (1999) Correlation between the affinity of flavonoids binding

to the cytosolic site of Leishmania tropica multidrug transporter and their efficiency to revert parasite resistance to daunomycin, Biochemistry, 38, 1736-1743.

30. Bois F, Beney C, Boumendjel A, Mariotte AM, Conseil G, Di Pietro A. (1998) Halogenated chalcones with high-affinity binding to P-glycoprotein: potential modulators of multidrug resistance, J Med Chem., 41, 4161-4164.

31. Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K., (2000) Synergy in a medical plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor, PNAS, 97, 1433-1437.