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

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การตายของเซลล์มะเร็งแบบอะโพโทซิสโดยสารสกัดจาก Streptomyces CH54-4 และ SS15-1 ที่แยกจากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาอังกฤษ) Apoptosis induction of human cancer cells by Streptomyces strain CH54-4 and SS15-1 isolated from mangrove sediments

หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.จันทรวรรณ แสงแข
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ผู้ร่วมโครงการวิจัย นางสาวรัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ธันวาคม 2555

Bio 178650
AB-0178650
14 ส.ค. 2558
356754

เริ่มบริการ
27 ส.ค. 2555

อภินันทนาการ

รหัสโครงการเลขที่_2555A10862025 _

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การตายของเซลล์มะเร็งแบบอะโพโทซิสโดยสารสกัดจาก Streptomyces CH54-4 และ SS15-1 ที่แยกจากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาอังกฤษ) Apoptosis induction of human cancer cells by Streptomyces strain CH54-4 and SS15-1 isolated from mangrove sediments

หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.จันทรวรรณ แสงแข
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ผู้ร่วมโครงการวิจัย นางสาวรัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา
และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักคณะกรรมการอุดมศึกษา

บทคัดย่อ

บทนำ จุลินทรีย์แกรมบวกเช่น แอคติโนมัยซีท เป็นแหล่งผลิตสาร secondary metabolites ซึ่งออกฤทธิ์ชีวภาพโดยเฉพาะสารต้านเซลล์มะเร็ง และแอคติโนมัยซีทในป่าชายเลนโดยเฉพาะ *Streptomycetes* sp. มีความหลากหลายของชนิด มีแนวโน้มสร้างสารเมตาโบไลท์อันดับสองชนิดใหม่ ๆ ที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็ง

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก (KB cells) ในระดับหลอดทดลอง และศึกษากลไกการตายระดับโมเลกุลแบบ apoptosis ของสารสกัดจาก *Streptomycetes* CH54-4 และ SS15-1 ที่แยกจากดินบริเวณป่าชายเลน

วิธีการทดลอง นำดินดินบริเวณป่าชายเลนมาคัดเลือกเชื้อใน suborder *Streptomycetes* CH54-4 และ SS15-1 สกัดสารจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย methanol และ ethyl acetate ได้สารสกัด CH54-4 และ SS15-1 นำมาบ่มกับเซลล์นาน 48 ชั่วโมง ศึกษาการเจริญของเซลล์ด้วย MTT assay นับจำนวนนิวเคลียสที่มีอะโพโทซิสโดยการย้อมสี DAPI วิเคราะห์ผลด้วย fluorescent microscopy ศึกษาการแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis ศึกษาวัฏจักรเซลล์โดยการย้อยสี PI วิเคราะห์ผลด้วย flow cytometry จากนั้นวัด caspase-3 activity

ผลการทดลอง สารสกัด *Streptomycetes thermocarboxydus* (CH54-4) และ *Streptomyces ghanaensis* (SS15-1) มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยมีค่า IC_{50}= 14.29 ± 1.34 และ 0.4 ± 0.08 μg/ml ตามลำดับ โดยเซลล์ที่ตายหลุดจากพื้นผิวง่าย มี apoptotic body พบโครมาตินหนาแน่น นิวเคลียสติดสี DAPI เป็นหย่อมๆ มี DNA ฟุ้งกระจายใน agarose gel เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการสะสมเซลล์ในระยะ sub-G_1 phase เพิ่มขึ้นเป็น 25.65 ± 2.2 และ 15.93 ± 1.01 % ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 1.21 ± 0.03 % เช่นเดียวกับระดับ caspase-3 activity ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด และลดลงในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดร่วมกับ caspase-3 inhibitor

สรุป ประสิทธิภาพของสารเมตาบอไลท์ที่มาจากแบคทีเรีย (*Streptomyces*) คุณค่าสูงจากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกตายแบบ apoptosis ผ่านทางเอนไซม์ caspase-3 ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดจาก *Streptomyces* เป็นแหล่งของการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็ง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมีและกลไกการเกิด apoptosis ภายในเซลล์

คำสำคัญ: *Streptomyces*, KB cells, ยับยั้งการเจริญเติบโต, อะโพโทซิส, การแตกของ DNA, แคสเปซ-3

Abstract

Background The mangrove actinomycetes genus *Streptomyces* has long been recognized as an important source of its secondary metabolites. It may provide novel structural diversity to be discovered and hope to improve anti-cancer properties.

Objective To investigate the anti-cancer activities and molecular apoptosis mechanisms of the extraction from *Streptomycetes* CH54-4 and SS15-1 in Human nasopharyngeal epidermoid carcinoma (KB cells)

Methods *Streptomycetes* CH54-4 and SS15-1 were extracted and treated with KB cells. The viable cell number is based on MTT colorimetric assay. Apoptosis was assessed by nuclear staining with DAPI, agarose gel electrophoresis for DNA fragmentation assay and quantified by flow cytometry analysis of cells stained with propidium iodide. Caspase-3 activity was measured by a colorimetric assay.

Results The extract of *Streptomycetes thermocarboxydus* (CH54-4) and *Streptomyces ghanaensis* (SS15-1) inhibited KB cells with IC_{50} of 14.29 ± 1.34 and 0.4 ± 0.08 μg/ml. The growth inhibition and induction of apoptosis were appeared as morphological alteration in round shape that easily detached from the surface, chromatin condensation, apoptotic body formation and DNA fragmentation in a dose-dependent manner. The increased accumulation of cells in the sub-G1 phase were 25.65 ± 2.2% and 15.93 ± 1.01%, respectively when compared with control. The apoptosis enhancement of CH54-4 and SS15-1 treatment was accompanied by increasing in the relative activity of caspase-3 which was significantly attenuated in a caspase-3 inhibitor.

Conclusions The extraction from *Streptomycetes* CH54-4 and SS15-1 were effective in inhibiting proliferation and inducing apoptosis of KB cells. The induction of apoptosis was associated with the activation of effector caspases-3. Based on the above data, *Streptomycetes* extraction would represent a promising source for its ability to discovery of interesting anticancer compounds. The elucidation of chemical structure and the apoptosis-related others intracellular targets will be addressed in future studies.

Key words *Streptomycetes*, KB cells, Anti-cancer, Apoptosis, DNA fragmentation, Caspase-3

สารบัญเรื่อง

บทนำ (INTRODUCTION) **1**
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา 5
วัตถุประสงค์โครงการวิจัย 6
ขอบเขตของการวิจัย 6
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี 6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 7
เนื้อเรื่อง (MAIN BODY) **8**
วิธีดำเนินการวิจัย 8
การเก็บตัวอย่าง *8*
การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพ *8*
การเลี้ยงเซลล์ (cell culture) *9*
ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT *9*
วิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis *9*
ศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI staining *10*
วิเคราะห์วัฏจักรเซลล์ (cell cycle) *11*
ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase 3 ..... *11*
การแสดงข้อมูล *12*
ผลการวิจัย (RESULTS) 12
ผลจากการแยกเชื้อ จากตะกอนทะเล *12*
ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT *13*
ผลการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis *15*
ผลการศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI staining *17*
ผลการวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์ (cell cycle) *24*
ผลการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase 3 ..... *25*
อภิปราย/วิจารณ์ (DISCUSSION) **28**
สรุปและเสนอแนะ **32**
สรุป 32
ข้อเสนอแนะ 32
ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัย 32
ผลผลิต (OUTPUT) **33**
นำเสนอบทคัดย่อ 33
รายงานการเงิน **35**
รายงานสรุปการเงิน 35
บรรณานุกรม (BIBLOGRAPHY) **38**
ประวัตินักวิจัยและคณะพร้อมหน่วยงานสังกัด **41**
ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย 41
ประวัติผู้ร่วมวิจัย 43

สารบัญตาราง

ตาราง 1 เปอร์เซ็นต์การเกิด APOPTOSIS โดย KB CELLS บ่มด้วย DOXORUBICIN และ STREPTOMYCETES CH54-4 (6.19, 14.29, 26.66 UG/ML) และย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI 19

ตาราง 2 เปอร์เซ็นต์การเกิด APOPTOSIS โดย KB CELLS บ่มด้วย DOXORUBICIN และ STREPTOMYCETES SS15-1 (0.2, 0.4, 0.8 UG/ML) และย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI 22

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 ภาพจากกล้องอิเลคตรอนชนิดส่องกราด (SCANNING ELECTRON MICROSCOPE) ของเชื้อ *STREPTOMYCES* CH54-4 สร้างสปอร์ที่ปลายเส้นใย ①. ที่กำลังขยาย 3000X เท่า และ ②. ที่กำลังขยาย 7500 X เท่า 12
รูปที่ 2 ภาพจากกล้องอิเลคตรอนชนิดส่องกราด (SCANNING ELECTRON MICROSCOPE) ของเชื้อ *STREPTOMYCES* SS15-1 สร้างสปอร์ที่ปลายเส้นใย ①. ที่กำลังขยาย 3000X เท่า และ ②. ที่กำลังขยาย 7500 X เท่า 13
รูปที่ 3 ประสิทธิภาพของสารสกัด STREPTOMYCES CH54-4 และ DOXORUBICIN ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± S.E.M. (N=4) 14
รูปที่ 4 ประสิทธิภาพของ สารสกัด STREPTOMYCES SS15-1 และ DOXORUBICIN ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± S.E.M. (N=4) 15
รูปที่ 5 การเกิด DNA FRAGMENTATION ของ KB CELLS ที่บ่มด้วย DOXORUBICIN และ STREPTOMYCETES CH54-4 (6, 14, 26 UG/ML) ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS 16
รูปที่ 6 การเกิด DNA FRAGMENTATION ของ KB CELLS ที่บ่มด้วย DOXORUBICIN และ STREPTOMYCETES SS15-1 (0.2, 0.4, 0.8 UG/ML) ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS 16
รูปที่ 7 แสดงลักษณะเซลล์ที่บ่มด้วย DOXORUBICIN และ STREPTOMYCETES CH54-4 และลักษณะนิวเคลียสจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ โดยการย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI: B = BLEBBING, N = NORMAL, F = NUCLEAR FRAGMENTATION, C = NUCLEAR CONDENSATION, SCALE BAR = 10 μM 20
รูปที่ 8 แสดงลักษณะเซลล์ที่บ่มด้วย DOXORUBICIN และ STREPTOMYCETES SS15-1 และลักษณะนิวเคลียสจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ โดยการย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI: B = BLEBBING, N = NORMAL, F = NUCLEAR FRAGMENTATION, C = NUCLEAR CONDENSATION, SCALE BAR = 10 μM 23
รูปที่ 9 วัฏจักรของ KB เซลล์ที่บ่มด้วย 0.42% ETOH, สารสกัด CH54-4 (14.29 & 26.66 μG/ML), DOX (1.04 μG/ML) วิเคราะห์ผลโดย FLOW CYTOMETRY 24
รูปที่ 10 วัฏจักรของ KB เซลล์ที่บ่มด้วย 0.003% ETOH, สารสกัด SS15-1 (0.4 & 0.8 μG/ML), DOX (1.04 μG/ML) วิเคราะห์ผลโดย FLOW CYTOMETRY 25
รูปที่ 11 ค่า RELATIVE ACTIVITIES ของ CASPASE-3 จากสารสกัด STREPTPMYCES CH54-4 และ DOXORUBICIN ค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 และค่าที่วัดได้ในกลุ่มอื่นเป็นค่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, *$P < 0.05$เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, ** $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด STREPTPMYCES CH54-4 เพียงอย่างเดียว 26
รูปที่ 12 ค่า RELATIVE ACTIVITIES ของ CASPASE-3 จากสารสกัด STREPTPMYCES SS15-1 และ DOXORUBICIN ค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 และค่าที่วัดได้ในกลุ่มอื่นเป็นค่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, *$P < 0.05$เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, ** $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด STREPTPMYCES SS15-1 เพียงอย่างเดียว 27

คำอธิบายสัญลักษณ์

Caspase	cysteine aspartyl–specific proteases
DAPI	4',6–diamidino–2–phenylindole
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DOX	doxorubicin
EtOH	ethanol
IC_{50}	50% inhibitory concentration
KB cells	Human nasopharyngeal epidermoid carcinoma
MTT	3–(4, 5–Dimethylthiazol–2–yl)–2, 5–diphenyltetrazolium bromide tetrazole
PBS	phosphate buffered saline
PI	propidium iodide
S.E.M.	standard error of mean

บทนำ (Introduction)

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งเป็นเส้นสายยาว และแตกแขนงเป็นกิ่งก้าน มีลักษณะคล้ายเชื้อรา สามารถสร้างเส้นใย (hyphae) และสร้างสปอร์ (spore) เพื่อใช้สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แอคติโนมัยซีทจัดอยู่ใน phylum actinobacteria ใน order actinomycetales ซึ่งเป็นแหล่งของการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายชนิด จากการสำรวจรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ และสารแอนติไบโอติก ของ Lazzarini และคณะ (2000) พบว่าในจำนวนสารแอนติไบโอติกที่มีอยู่ในปัจจุบันประมาณกว่า 8000 ชนิดนั้น พบว่ามากกว่า 60% ถูกสร้างมาจากแอคติโนมัยซีท โดยเป็นสารที่ Streptomycetes สร้างขึ้น 45.6 % และอีกประมาณ 16% สร้างได้จากแอคติโนมัยซีทที่หายาก และสารแอนติไบโอติกที่สร้างนั้นส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีทใน Family *Streptomyceteaceae* รองลงมาได้แก่ *Micromonosporaceae*, *Pseudonocardiaceae, Nocardiaceae* และ *Streptosporangiaceae* ตามลำดับ และจาก หลาย ๆรายงานได้แสดงให้เห็นว่า แอคติโนมัยซีทมีการแพร่กระจายโดยทั่วไปในตะกอนของทะเลชายฝั่ง รวมไปถึงสิ่งแวดล้อมทางทะเลอื่น ๆ และตะกอนก้นทะเลลึก ๆด้วย (Ghanem *et al.*, 2000; Pathom-aree *et al.*, 2006; Bull *et al.* 2005; Maldonado *et al.*, 2005; Bredholdt *et al.* 2007, Bredholdt *et al.* 2008).

แอคติโนมัยซีทมีความสำคัญทั้งทางด้านการแพทย์ และเภสัชกรรม เนื่องจาก แอคติโนมัยซีท หลายชนิดสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพได้ (Suthindhiran & Kannabiran, 2009) สารต้านอนุมูลอิสระ (Chang & Kim, 2007) สารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive compound) (Komatsu *et al.*, 2004) สารยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis inhibitor) (Shin *et al.*, 2008) รวมถึงสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (anti-cancer) (Moon *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2007) ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของสารที่สร้างหรือสกัดมาจากแอคติโนมัยซีท เป็นจำนวนมาก เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรค

Hardt และคณะ (2000) แยก แอคติโนมัยซีท สายพันธุ์ CNH-099 จากตะกอนดินที่ระดับความลึก 1 เมตร บริเวณ Batiquitos Lagoon ทางตอนเหนือของเมืองซานดิเอโก รัฐแคลิฟอร์เนียประเทศสหรัฐอเมริกา เชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสารชนิดใหม่คือ neomarinone และสารที่เป็นอนุพันธ์อีก 3 ชนิด คือ isomarinone, hydroxy-debromomarinone และ methoxydebromomarinone โดยจัดอยู่ในกลุ่ม sesquiterpene ร่วมกับ polyketide-derived carbon skeleton สารดังกล่าวทั้งหมดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้

ปานกลาง โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลาไส้ (HCT-116 colon carcinoma) ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 8.0 μg/ml

Zheng และคณะ (2000) แยก แอคติโนมัยซีท จากสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น sea hare, sea anemone และพืชทะเลชนิดอื่นๆ ซึ่ง แอคติโนมัยซีท ที่แยกได้ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* sp. และ *Micromonospora* sp. เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพบว่ามีสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ถึง 43% และเมื่อทดสอบคุณสมบัติ cytotoxic activity โดยวิธี MTT assay และ DNA target activity ในเซลล์ P-388 lymphocytic leukemia และเซลล์มะเร็งลำไส้ (HLF cells และ CNE cells) พบว่ามีสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ดังกล่าวได้

Manam และคณะ (2005) แยกเชื้อสายพันธุ์ *Streptomyces* nodosus (NPS007994) จากตะกอนดินบริเวณ Scripps Canyon, La Joola และ California โดยพบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ สารนี้มีชื่อว่า Lajollamycin สามารถยับยั้งได้ทั้งการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย (Staphylococcus aureus-methicillin resistant, Streptococcus pneumonia-penicillin resistant, Enterococcus faecium-vancomycin resistant) และเพิ่มความไวต่อยาของเชื้อแบคทีเรีย (Staphylococcus aureus-methicillin sensitive, Streptococcus pneumonia-penicillin sensitive, Enterococcus faecalis-vancomycin sensitive) รวมทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด Murine melanoma cell line B16-F10 ได้

Soria-Mercado และคณะ (2006) แยกเชื้อ แอคติโนมัยซีท จากตะกอนดินที่เก็บบริเวณ Lajolla รัฐแคลิฟอร์เนีย ที่ระดับความลึก 152 เมตร พบเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ใหม่ โดยให้สารสกัด Terpenoid Chloro-Dihydroquinone ชนิดใหม่ 3 ชนิด และยังมีสารอีก 2 ชนิด ที่จัดได้ว่าเป็นสารชนิดนี้แต่มีคลอรีนเป็นสารประกอบอยู่ในโครงสร้างของสาร Terpenoid Chloro-Dihydroquinone นี้ด้วย สาร Terpenoid Chloro-Dihydroquinone เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay ในการวิเคราะห์ พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลาไส้ชนิด HCT-116 ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.40, 0.97 และ 1.84 μg/ml ตามลาดับ และพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRAS)

Adinarayana และคณะ (2006) สกัดสารจาก แอคติโนมัยซีท สปีชีส์ Streptomyces corchorusii สายพันธุ์ AUBN1/7 ที่เก็บตัวอย่างจากตะกอนในอ่าวเบงกอล ประเทศอินเดีย สกัดสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 ชนิด คือ resistomycin ซึ่งเป็นสารต้านจุลชีพ ประเภท quinone และ tetracenomycin D ซึ่งเป็นสารต้านจุลชีพ ประเภท anthraquinone เมื่อทดสอบความเป็นพิษพบว่า resistomycin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร HMO2 cells และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 cells โดยมีค่า 50% inhibitory concentration (IC_{50}) เท่ากับ 0.005 และ 0.009 μg/ml ตามลาดับ ส่วน tetracenomycin D มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.008 และ 0.013 μg/ml ตามลำดับ

Lee และคณะ (2007) ซึ่งได้ค้นหาสารยับยั้งเซลล์มะเร็งจาก *Streptomyces* sp. KACC91015 พบว่าสาร F-3-2-5 ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่สามารถยับยั้งการเจริญของ cancer cell lines หลายชนิดรวมทั้ง HeLa cell lines ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 37 μM เมื่อทดสอบกับ Cells A549 และ Cells HT-29 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 72 และ 190 μM ตามลาดับ โดยที่สาร F-3-2-5 นี้ ไม่มีผลต่อการเจริญของ prolymphocyte และ fibroblast ปกติที่ใช้เป็น control ผลต่อ HeLa cells พบว่าสารนี้มีผลต่อโครมาตินหดตัว และDNA แตกหัก และจากการวิเคราะห์โดย Western Blot พบว่า สาร F-3-2-5 ยังสามารถยับยั้งขบวนการ Phosphorylation ของโปรตีน retinoblastoma (pRb) และยับยั้งการแสดงออกของเอ็นไซม์ Cyclindependent kinase-4 และ -6 และ Cyclin D1 และ Cyclin E

Liu และคณะ (2007) ได้นา แอคติโนมัยซีท สายพันธุ์ Z2039-2 ซึ่งเก็บตัวอย่างจากดินในทะเลเมืองชิงเต่า ประเทศจีน มาทาการสกัดด้วย ethyl acetate ได้ indolocarbazole alkaloids 2 ชนิด ได้แก่ K252c และ arcyriaflavin A จากนั้นทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 cells และสามารถกระตุ้นให้เกิด apoptosis จากการศึกษาด้วยเทคนิค Annexin V-EGFP/PI staining โดย K252c ที่ความเข้มข้น 10 μM และ 100 μM สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิด apoptosis ได้ 57.30% และ เกือบ 100% ตามลำดับ ส่วน arcyriaflavin A ที่ความเข้มข้น 10 μM และ 100 μM สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิด apoptosis ได้ 25.90% และ 68.93% ตามลำดับ

Boonlarppradab และคณะ (2008) ได้ทำการแยกสาร marineosins A และ B จาก marine แอคติโนมัยซีทจีนัส *Steptomycetes* แล้วทาการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT 116 cells พบว่า marineosin A มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า marineosin B โดย marineosin A มีค่า 50% inhibitory concentration (IC_{50}) เท่ากับ 0.5 μM และ marineosin B มีค่า IC_{50} เท่ากับ 46 μM นอกจากนี้ยังพบว่า Marineosin A มีความเป็นพิษในเซลล์มะเร็งผิวหนัง และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

Park และคณะ (2008) ได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ Streptochlorin ซึ่งเป็นสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 cells พบว่า Streptochlorin สามารถยับยั้งการเจริญของ U937 cells ได้ โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและเวลา (dose and time dependent) และพบว่า Streptochlorin ทาให้เซลล์เกิด apoptotic bodies เกิดการแตกของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) และพบว่ามีจานวนเซลล์ในระยะ G1 ลดลง ทาให้มีเซลล์สะสมในระยะ sub G1 หรือมี apoptotic cells เพิ่มขึ้น จึงสรุปได้ว่า Streptochlorin เหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis โดยอัตราการตายของเซลล์ที่สูงขึ้น มีความสัมพันธ์กับการลดลงของ Bcl-2 ซึ่งเป็น anti-apoptotic regulator และพบการเพิ่มขึ้นของ Bax และ FasL ซึ่งเป็น proapoptotic regulator นอกจากนี้พบว่าความต่างศักย์ของไมโตคอนเดรียลดลง มีการทำงานของเอนไซม์ caspase จากการทำลาย poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังมีผล

ยับยั้งการทางานของ phospholipase C-g1 protein ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสาคัญเกี่ยวกับการเพิ่มจานวนของเซลล์มะเร็ง

Xiao และคณะ (2008) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากป่าชายเลนในเมือง Zhangzhou และ เมือง Fujian ของประเทศจีน โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด คือ Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Esherichia coli, Candida albicans และ Rhizoctonia solani รวมทั้งเซลล์เนื้องอก 3 ชนิด คือ BEL 7402, A549 และ HL 60 cell ines พบว่า 42.3% ของ แอคติโนมัยซีทที่แยกได้มีสารแอนติไบโอติกยับยั้งจุลินทรีย์ 37.4% ของ แอคติโนมัยซีท พบว่ามีสารยับยั้งเซลล์เนื้องอก (anti-tumor activities) และจากการวิเคราะห์ลาดับเบสของ 16S rDNA ของแอคติโนมัยซีทเหล่านี้ พบว่าเป็น Streptomyces 89%, Microomonospora 6.1%, Saccharomonospora 0.6%, Actinomadura 3.7% และ Nocardiopsis 0.6% และพบว่าเป็น Streptomyces ชนิดใหม่ถึง 3 isolates

Hong และคณะ (2009) ซึ่งได้ค้นหาแอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณป่าชายเลน รวมทั้งจากชิ้นส่วนของพืชป่าชายเลนชนิดต่างๆ ในประเทศจีน พบว่ามากกว่า 2000 ไอโซเลตของ แอคติโนมัยซีทที่แยกได้นั้น มีประมาณ 20% สามารถสร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกบริเวณลำไส้ใหญ่ของคน (Human Colon Tumor 116) มี 5% สามารถยับยั้ง Candida albicans และอีก 10% สามารถยับยั้ง Staphylococcus aureus ในขณะที่อีก 3% สามารถยับยั้งโปรตีน Tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับอาการโรคเบาหวาน อีก 3 ไอโซเลต สามารถยับยั้ง aurorakinase A ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับอาการโรคเซลล์ประสาทเสื่อม (neurodegenerative desease) ไอโซเลตทั้งหมดนี้ได้ถูกนามาศึกษารูปร่างลักษณะเพื่อจำแนกชนิดในระดับจีนัส พบว่ามีทั้งหมด 13 genus ที่พบมากที่สุดคือ *Micromonospora* และ *Streptomyces* ส่วนแอคติโนมัยซีทที่ให้ผลที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activity) มีทั้งหมด 7 genus และโดยภาพรวมแล้วดินจากป่าชายเลนพบแอคติโนมัยซีทที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจานวนมาก

Suthindhiran และ Kannabiran (2009) เก็บตัวอย่างจากตะกอนที่อยู่ลึก 400 เซนติเมตร จากอ่าวเบงกอลในเมือง Marakkanam ประเทศอินเดีย แยกชนิดของ แอคติโนมัยซีท ที่ชอบความเค็ม (halophilic) และนำสารสกัดหยาบมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cells ด้วยวิธี MTT assay พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 26.2 µg/ml ทดสอบฤทธิ์ในการทาให้เม็ดเลือดแดงแตก ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู ด้วยวิธี hemolytic assay พบว่ามีค่า 50% effective inhibitory concentration (EC_{50}) เท่ากับ 266 µg/ml และทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ ด้วยวิธี agar diffusion assay พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อรา Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Candida albicans, แบคทีเรียแกรมลบ Escherichia coli, Klebsiella pneumonia แต่มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลางต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก Staphylococcus aureus และ Bacillus subtilis

ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยกำลังค้นหาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ จาก Streptomyces CH54-4 และ SS15-1 ที่แยกจากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี และเกาะแสมสาร จังหวัดระยอง เนื่องจากแต่ละชนิดของ *Streptomyces* สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ได้ขึ้นกับสภาวะแวดล้อมหลายปัจจัยการค้นหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่ที่ยับยั้งเซลล์มะเร็ง จะทำให้มีทางเลือกในการใช้ยามีมากขึ้น มีความสำคัญทางการแพทย์และทางเภสัชวิทยา

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

จุลินทรีย์จากทะเลเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญได้แก่แอคติโนมัยสีท ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายเชื้อรา พบในสิ่งแวดล้อมทั่วไปรวมทั้งสิ่งแวดล้อมทางทะเล มีคุณค่าและมีคุณประโยชน์ต่องานด้านไบโอเทคโนโลยี เนื่องจากเป็นแหล่งของการผลิตสาร secondary metabolites ซึ่งออกฤทธิ์ชีวภาพที่หลากหลาย เช่น สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ (Suthindhiran *et al.*, 2009) สารยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis inhibitor) (Shin *et al.*, 2008) สารต้านอนุมูลอิสระ (Chang *et al.*, 2007) สารยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (anti-cancer) (Moon *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2007 และ Zheng *et al.*, 2000) สารต้านไวรัส (Kumar *et al.*, 2006) สารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive compound) (Komatsu *et al.*, 2004) และสารต้านเชื้อรา (Woo *et al.*, 2002) เป็นต้น แอคติโนมัยสีทจึงมีความสำคัญทางการแพทย์และมีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นยาต่อไป

ใน order Actinomycetales มีแบคทีเรียทั้งที่มีประโยชน์และก่อโรคแก่มนุษย์และสัตว์ แต่เชื้อใน genus *Streptomyces* เป็นเชื้อที่น่าสนใจ เพราะเชื้อในกลุ่มนี้สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด และยังไม่ถูกค้นพบอีกมาก มียาปฏิชีวนะมากกว่า 60 ชนิด ที่ผลิตโดยเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* ในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ streptomycin, spectinomycin, neomycin, tetracycline, chlorotetracycline, erythromycin, clindamycin, nystatin, amphoteracin B และ chloramphenical เป็นต้น (Madigan *et al.*, 2009) และเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* จากทะเลที่ให้สาร bioactive metabolites ชนิดใหม่ ได้แก่ aureoverticillactam, caprolactones, chinikomycins, 3,6-disubstituted indoles, mechercharmycins และ trioxacarcins เป็นต้น มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด (Jimenez *et al.*, 2009)

โรคมะเร็งเกิดจากความผิดปกติของการเพิ่มจำนวน (proliferation) เซลล์ได้อย่างไม่หยุดยั้ง มีการหลีกเลี่ยงกระบวนการ apoptosis ทำให้ตั้งสมมุติฐานได้ว่า ในเซลล์มะเร็งพบการเพิ่มสัญญาณของ anti-apoptotic signals ขณะเดียวกันก็ลดสัญญาณของ pro-apoptotic signals เซลล์จึงผ่านเข้าสู่วัฏจักรเซลล์ และเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าเซลล์ปกติ จนกลายเป็นเซลล์ก้อนมะเร็งซึ่งสามารถแบ่งตัวอย่างควบคุมไม่ได้ (Kasibhatla & Tseng,

2003; Hu & Kavanagh, 2003) ถ้าสามารถพัฒนายาหรือสมุนไพรที่ออกฤทธิ์กระตุ้นกระบวนการเกิด apoptosis ได้จะกลยุทธ์สำคัญในการควบคุมหรือรักษาโรคมะเร็ง

เชื้อใน *Streptomyces* กระจายอยู่ทั่วไปในมหาสมุทรรวมทั้งในระบบนิเวศทางทะเล แม้ว่าบนบกจะพบ *Streptomyces* ได้มาก แต่ในทะเลจะพบทั้งความหลากหลายและความใหม่ของชนิดที่มากกว่า สามารถสร้างสารเมตาโบไลท์อันดับสอง และมีแนวโน้มว่าน่าจะพบสารออกฤทธิ์ที่ใหม่ ๆ ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และมีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นยาต่อไป (Lam, 2006). และจากข้อมูลพื้นฐานจากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ได้แยกเชื้อ *Streptomyces* CH54-4 จากตะกอนดินป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (IC_{50} = 2.91 µg/ml) (Srivibool *et al.*, 2010) แต่อย่างไรก็ตามยังขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในระดับหลอดทดลอง และศึกษากลไกการตายระดับโมเลกุลแบบ apoptosis โดยสารสกัดจาก *Streptomyces* CH54-4 และ SS15-1 ที่แยกจากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน

ขอบเขตของการวิจัย

เตรียมสารสกัดจาก *Streptomyces* CH54-4 และ SS15-1 จากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและกลไกการออกฤทธิ์แบบ apoptosis ระดับโมเลกุล

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี

ยาต้านมะเร็งที่ใช้ในปัจจุบันก็มีข้อจำกัดเกี่ยวกับผลของการรักษา มีปัญหาการดื้อยา ทำให้ต้องเพิ่มขนาดยามากขึ้น ส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงไม่พึงประสงค์ นักวิจัยจึงมีความพยายามที่จะค้นหาสารจากธรรมชาติในการป้องกันและรักษามะเร็ง โดยสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้จะกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งฆ่าตัวตายแบบ apoptosis ซึ่งมีลักษณะแสดงคือเซลล์เกิดการสูญเสียปริมาตรของเซลล์ (loss of cell volume) เยื่อหุ้มเซลล์หดแฟบ (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่ม (chromatin aggregation) และ DNA ถูกย่อยเป็นชิ้นเล็ก (DNA fragmentation) และขบวนการนี้อาศัยเอนไซม์ caspase เป็นตัวกลาง (caspase-mediated events) ดังนั้นวิธีดำเนินการวิจัยเริ่มจากทดสอบความเป็นพิษต่อ

เซลล์มะเร็ง จากนั้นศึกษากลไกการตายระดับ DNA และเอนไซม์ caspase ร่วมกับการศึกษารูปร่างเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- มหาวิทยาลัยและสถาบันต่าง ๆ นำผลการวิจัยนี้ไปพัฒนาต่อยอด เช่น การทำให้สารบริสุทธิ์และหาโครงสร้างทางเคมี การทดสอบฤทธิ์ชีวภาพอื่น ๆ เพิ่มเติม ที่สามารถพัฒนาสู่อุตสาหกรรมได้
- เกิดความร่วมมือทางวิชาการกับทีมนักวิจัยจากประเทศญี่ปุ่นที่เชี่ยวชาญด้านหาโครงสร้างทางเคมี
- เป็นส่วนหนึ่งในงานด้านการเรียนการสอนวิชาโครงงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเวชศาสตร์
- เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ และนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการ แก่นักวิชาการ นักวิจัย ได้นำไปใช้ประโยชน์ในส่วนงานที่เกี่ยวข้องซึ่งเป็นการตอบสนองต่อยุทธศาสตร์ชาติในด้านการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพ
- พัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเล ซึ่งมีโอกาสค้นพบสารจากธรรมชาติที่มีความแตกต่างกับสารที่พบบนพื้นดิน

เนื้อเรื่อง (Main body)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างตะกอนดินที่แยกจากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลนภาคตะวันออกของอ่าวไทยของจังหวัดระยอง และจังหวัดจันทบุรี โดยใช้ grab sampler เก็บตามแนวป่าชายเลน ตัวอย่างทั้งหมดถูกเก็บไว้ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อที่ 4°C ก่อนที่จะนำมาถึงห้องปฏิบัติการ และนำมาทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศและเย็นจัด

การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

1. คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ เพื่อมาทดสอบฤทธิ์ชีวภาพต้านเซลล์มะเร็ง โดยเลือก สายพันธุ์ CH 54-4 และ 15-1

2. ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เลือกไว้บนจานเพาะเชื้อจนเชื้อสร้างสปอร์ และเจริญเต็มที่ ตรวจดูความบริสุทธิ์ของเชื้อก่อนที่จะเขี่ยเชื้อลงใน flask ขนาด 250 ml เลี้ยงเชื้อให้เจริญบนเครื่องเขย่า ที่ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วจึงถ่ายเชื้อลงใน อาหารเหลว ใน Flask ขนาด 1 ลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Bio-shaker (ซ้าย-ขวา) ที่ 105 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14- 28 วัน

3. แยกเซลล์ออกจาก medium ด้วยเครื่อง centrifuge จากนั้นถ่ายเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 2 ลงใน Separating funnel ขนาด 500 ml และขนาด 2000 ml โดยใช้ Ethyl acetate (สำหรับสกัดสารจาก medium และ methanol สำหรับสกัด สารจากเซลล์) หรือ solventที่เหมาะสมอื่น ๆ ในอัตราส่วน 1:1 ระเหย Ethyl acetate/หรือ methanol หรือ solventอื่น ๆที่ใช้ ให้แห้งด้วยเครื่อง Vacuum Evaporator ที่ 32 ° C

4. ละลายสารใน flask ออกมาด้วย methanol แล้วใช้ Pasteur pipette ที่ sterile ดูดออกมาชั่งใน vial ที่ทราบน้ำหนัก ตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเชื้อด้วยวิธี Bioautography assay แล้วจึงเป่าสารด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อให้ได้สารแห้ง แล้วนำ vial ไปชั่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อทราบน้ำหนักสาร (สารปริมาณมาก นำไป freeze dry เพื่อให้ได้น้ำหนักแห้ง)

5. หากสารที่เป็นองค์ประกอบที่สกัดได้จากเซลล์ และจาก medium ไม่ค่อยแตกต่างกัน จะรวมสารที่สกัดได้เข้าด้วยกัน ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

การเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติได้แก่ เซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก (Human nasopharyngeal epidermoid carcinoma, KB) การเลี้ยงเซลล์ ทำการเตรียมเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1×10^5 cells/ml ด้วย RPMI 1640 ใน culture flask ภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 โดยใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน จนมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 1×10^6 cells/ml ตรวจดูเปอร์เซ็นเซลล์ที่เกาะพื้นผิวผ่านทางกล้อง stereoscope ถ้าพบว่ามีเซลล์ที่เกาะพื้นมากกว่า 80 % ของพื้นที่ทั้งหมด แสดงว่าสามารถทำการ subculture ได้

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT

เตรียมเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 2×10^4 cells/ml ลงใน 96 well plate บ่มเซลล์ภายใต้ อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 นาน 24 ชม. เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์มีชีวิตสามารถลงเกาะที่พื้นผิวภาชนะได้ จากนั้นเริ่มบ่มเซลล์กับสารสกัด โดยหลุมที่เป็น vehicle control บ่มด้วย 0.42% absolute ethanol (EtOH) หลุมที่ทดสอบความเป็นพิษบ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 0–100 µg/ml นาน 48 ชม. ส่วน positive control นั้นทำการทดสอบด้วย doxorubicin ที่ความเข้มข้น 0-10 µg/ml นาน 48 ชม. แล้ววิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT

การวิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT โดยมีหลักการคือภายในเซลล์ที่มีชีวิตจะมีกระบวนเมทาบอลิซึมในไมโตคอนเดรีย โมเลกุล MTT มีเป้าหมายอยู่ที่ไมโตคอนเดรีย และเนื่องจากโครงสร้างของโมเลกุล MTT เป็น tetrazolium rings ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อรับอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ succinate dehydrogenase ได้เป็นผลึก formazan สีม่วงและไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

นำสารละลาย MTT (5g/L) ปริมาตร 30 µl ลงใน well ที่ต้องการทดสอบ จากนั้นบ่มภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 นาน 4 ชม. แล้วละลายผลึก formazan ด้วย DMSO (99.99%) ปริมาตร 100 µl แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%\ Cell\ viability = \frac{Absorbance\ at\ 540\ nm\ of\ sample}{Absorbance\ at\ 540\ of\ control} \times 100$$

จากนั้นสร้างกราฟระหว่าง % cell viability (แกน y) กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (แกน x) จากกราฟนี้สามารถคำนวณหา ขนาดความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 50% (inhibit concentration at 50%, IC_{50})

วิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis

เตรียมเซลล์ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1×10^5 cells/ml ปริมาตร 5 ml ลงใน flask ขนาด 25 cm^3 เลี้ยงเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อด้วย 0.42% EtOH, DOX [IC_{50}] และสารสกัด [IC_{50}] ตามลำดับ นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ทั้งหมด (เซลล์เกาะพื้นและเซลล์แขวนลอย) นำมาสกัด DNA ด้วย GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (VIVANTIS) โดยเติม proteinase K ปริมาตร 20 µl เพื่อทำลายโปรตีน จากนั้นเติม lysis enhancer ปริมาตร 2 µl แล้วทำการ vortex เพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และบ่มต่อด้วย TB buffer ปริมาตร 200 µl ที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีนออกให้เหลือแต่ DNA และ RNA จากนั้นทำลาย RNA ด้วย 20 mg/ml RNaseA ปริมาตร 20 µl โดยบ่มที่ 37 °C นาน 10 นาที จากนั้นทำการตกตะกอน DNA ด้วย ice-cold absolute ethanol แล้ว load ลง column ปั่นที่ 5,000g นาน 1 นาที จากนั้นล้างด้วย wash buffer แล้วนำไปปั่นที่ 5,000g นาน 1 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นแห้งที่ 10,000g นาน 1 นาที แล้วเติม elution buffer ที่ได้ผ่านความร้อนแล้วที่ 65 °C เพื่อ elute DNA จนได้ผลผลิตสุดท้ายคือ DNA ที่บริสุทธิ์ผ่าน filter ลงมา นำไปเก็บไว้ที่ −20°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การหาความเข้มข้นของ DNA

นำ DNA ที่สกัดได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของ DNA โดยใช้สูตร ดังนี้

ความเข้มข้นของ DNA = dilution factor × 50 ng/µl × Abs_{260}

(เมื่อค่าการดูดกลืนแสง 1 มีค่าเท่ากับ 50 ng/µl)

เมื่อได้ความเข้มข้นของ DNA แล้วนำมาปรับความเข้มข้นของทุกกลุ่มเป็น 100 ng/µl โดยเจือจางกับน้ำกลั่น เพื่อนำไป load ลงหลุมของ agarose ในขั้นตอนต่อไป

Agarose gel electrophoresis

นำ 100 ng/µl DNA ปริมาตร 8 µl (800 ng) ผสมกับ 6x loading dry ที่มีส่วนผสมกับ SYBR Gold (100:1 µl) ปริมาตร 2µl เพื่อใช้ดูการเคลื่อนที่ของ DNA และป้องกันไม่ให้ DNA ฟุ้งกระจาย จากนั้น load ลง 1.5% agarose gel โดยใช้กระแสไฟ 100 V นาน 45 นาที ซึ่งใช้ 0.1 µg/µl 1kb DNA ladder ปริมาตร 8 µl เป็น marker แล้ววิเคราะห์ผลโดยเครื่อง dark reader

ศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI staining

เตรียมเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ปริมาตร 4 ml โดยเลี้ยงเซลล์บน cover slide ซึ่งแช่อยู่ใน 6 well plate แล้วบ่มเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อด้วย 0.42% EtOH, DOX [IC_{50}] และสารสกัด [IC_{50}] ตามลำดับนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำ cover slide ซึ่งมีเซลล์เกาะอยู่มาย้อมสี fluorescent DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

ขั้นตอนการย้อมสี DAPI

นำเซลล์ที่เกาะบน cover slide มา fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde pH 8.3 ปริมาตร 1 ml นาน 3 นาที จากนั้นทำลาย RNA ด้วย 20 mg/ml RNaseA ปริมาตร 20 µl โดยบ่มที่ 37 °C นาน 20 นาที และล้าง RNaseA ด้วย PBS จากนั้นนำไปย้อมด้วย PI [5 µg/ml] และ DAPI [5 µg/ml] ปริมาตรอย่างละ 700 µl นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องและปราศจากแสง จากนั้นล้างสีออกด้วย PBS

นำเซลล์บน cover slide คว่ำลงบน slide จากนั้นปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บ แล้วนำไปส่องด้วย fluorescent microscope กำลังขยาย 100 เท่า โดย DAPI มี excitation/emission ที่ 358/461 mm ทำการบันทึกภาพแบบสุ่ม 3 ตำแหน่งต่อ 1 slide และในแต่ละตำแหน่งแสดงภาพ 2 แบบ คือ bright field, DAPI

การวิเคราะห์ข้อมูล โดยนับเซลล์จำนวน 500 เซลล์ แบบสุ่ม เพื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่อยู่ในลักษณะต่างๆ ซึ่งเซลล์มีชีวิตจะพบนิวเคลียสติดสีฟ้าเนียน ขณะที่ apoptotic cells จะพบนิวเคลียสติดสีฟ้าไม่เรียบเนียน แต่เป็นหย่อมๆ โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

วิเคราะห์วัฏจักรเซลล์ (cell cycle)

เลี้ยงเซลล์ลงใน flask T25 cm3 ทำการบ่มเซลล์กับสารสกัด เมื่อครบกำหนดเวลา เก็บเซลล์โดยวิธี trypsinization ล้างเซลล์ด้วย cold PBS นำไปปั่นเหวี่ยง นำเซลล์ที่ได้ไปทำให้คงสภาพ (fixation) ด้วย 70% ethanol 4°C ล้างเซลล์ด้วย cold PBS ย้อมสีดีเอนเอด้วย Propidium iodide (PI)/Triton X-100 37°C เป็นเวลา 15 นาที วิเคราะห์ผลด้วย flow cytometry (BD FACS Calibur) ซึ่งปริมาณการติดสี PI ในแต่ละเซลล์เป็นสัดส่วนโดยตรงต่อปริมาณดีเอนเอ การเกิด apoptosis จะพิจารณาจากระดับการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนของเซลล์ในระยะ sub-G1 (hypodiploid) คำนวณเปอร์เซนของเซลล์ในระยะ sub-G1 โดย CELL Quest software

ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase 3

ลักษณะของ apoptosis (programmed cell death) คือการที่เซลล์มีกระบวนการทำลายตัวเองหากพบว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้น โดยจะเปลี่ยนโปรตีน “procaspase 3” เป็น “caspase 3” ส่งสัญญาณให้เซลล์ฆ่าตัวเอง ในกรณีที่สารสกัดออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ caspase 3 ส่งผลให้ดีเอนเอและโปรตีนที่ซ่อมแซมดีเอนเอถูกทำลายเซลล์มะเร็งจึงไม่สามารถแบ่งตัวได้ การวัด caspase 3 activity โดยใช้เทคนิค caspase 3 colorimetric assay kit (Clontech, Texas, USA) ทำการทดลองโดยบ่มเซลล์กับสารสกัดตามเวลาที่กำหนด จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยบ่มเซลล์กับ 50 µl lysis buffer เป็นเวลา 30 นาที บนน้ำแข็ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 ° C, 14,000g, 5 นาที จากนั้นเก็บ supernatant (50 µl) มาทำปฏิกิริยากับ 50 µl 2x reaction buffer และ 5 µl DEVD-pNA บ่มที่ 37°C ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที ในกรณีที่มีเอนไซม์ caspase 3 จะได้ pNA ซึ่งสามารถติดตามโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

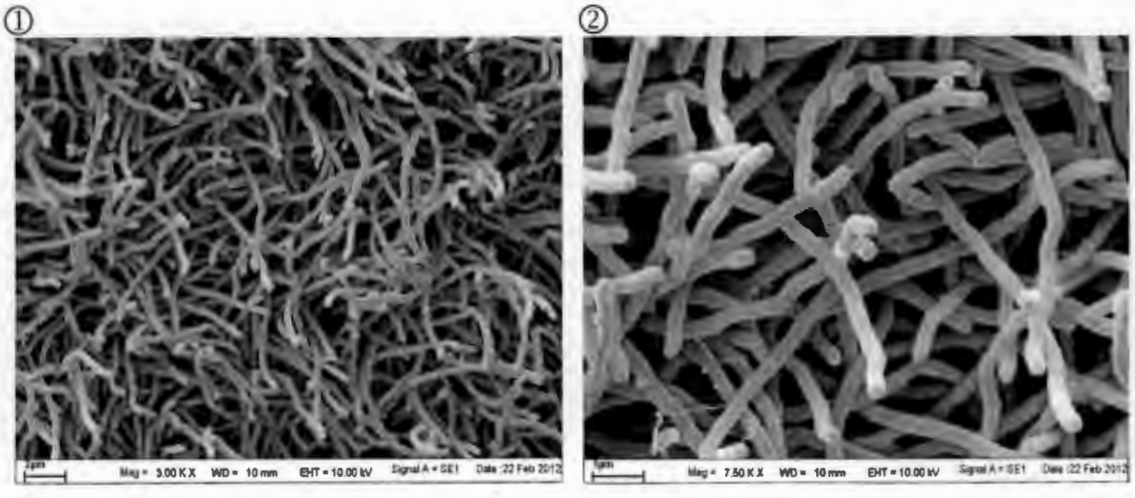
การแสดงข้อมูล

ในแต่ละการทดลอง ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง (n=3) การทดลองความเป็นพิษต่อ HeLa cells เขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม microcal origin 6.0 แสดงผลเป็นค่า mean ± standard error of mean (S.E.M.) การวิเคราะห์การแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmention) แสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ ± S.E.M. ร่วมกับภาพถ่าย ส่วนการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis แสดงผลเป็นภาพถ่าย ใช้สถิติ Student's t-test ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย และค่า $p < 0.05$ แสดงว่ามีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

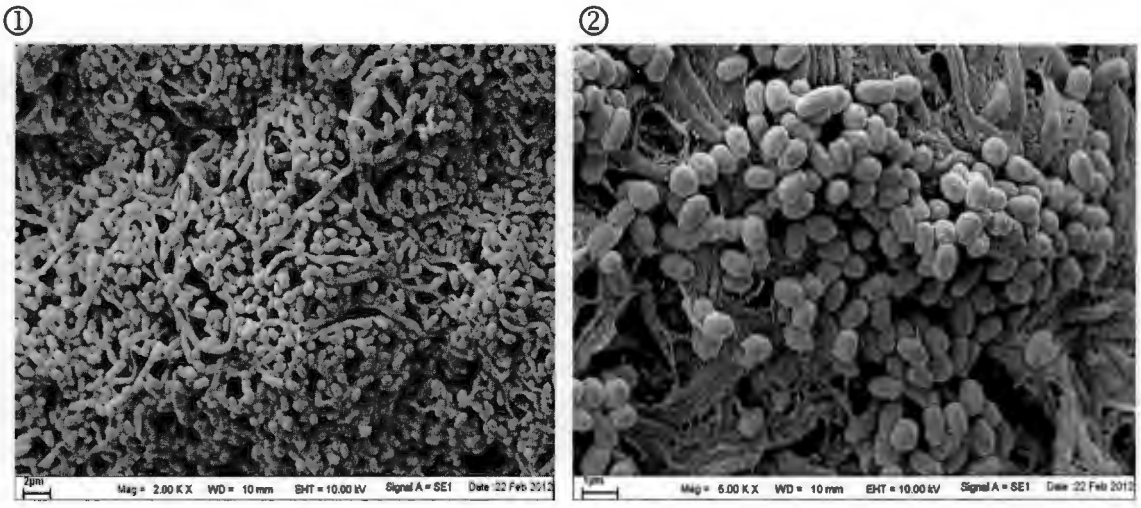
ผลการวิจัย (Results)

ผลจากการแยกเชื้อ จากตะกอนทะเล

จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ CH 54-4 (Chantaburi 54-4) และ 15-1 (Samesan 15-1) ในอาหาร ISP2 (International Streptomyces Project 2) ได้สารสกัดหยาบในปริมาณ 0.150 g/l และนำสารสกัดที่ได้มาละลายด้วย absolute ethanol ลักษณะของเชื้อแต่ละสายพันธุ์แสดงด้วยภาพจากกล้องอิเลคตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope) ของเชื้อ *Streptomyces* CH54-4 และ 15-1 สร้างสปอร์ที่ปลายเส้นใย และจากการทำ 16S rRNA gene sequence พบว่า CH 54-4 ใกล้เคียงกับ *Streptomyces thermocarboxydus* ส่วน SS 15-1 ใกล้เคียงกับ *Streptomyces ghanaensis*



รูปที่ 1 ภาพจากกล้องอิเลคตรอนชนิดส่องกราด (SCANNING ELECTRON MICROSCOPE) ของเชื้อ *STREPTOMYCES* CH54-4 สร้างสปอร์ที่ปลายเส้นใย ①. ที่กำลังขยาย 3000X เท่า และ ②. ที่กำลังขยาย 7500 X เท่า



รูปที่ 2 ภาพจากกล้องอิเลคตรอนชนิดส่องกราด (SCANNING ELECTRON MICROSCOPE) ของเชื้อ *STREPTOMYCES* SS15-1 สร้างสปอร์ที่ปลายเส้นใย ①. ที่กำลังขยาย 3000X เท่า และ ②. ที่กำลังขยาย 7500 X เท่า

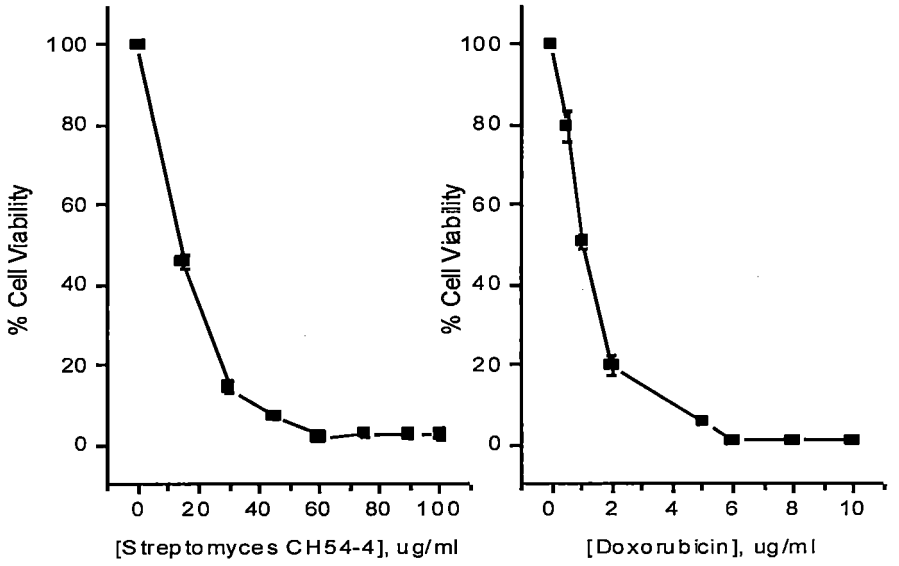
ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด *Streptomyces* CH54-4 และ SS15-1 ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก (KB cells) โดยเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบ่มเซลล์กับสารสกัดความเข้มข้น 0-100 μg/ml และ doxorubicin (DOX) ความเข้มข้น 0-10 μg/ml (positive control) และ 0.42% EtOH (negative control) ใน 96 well plate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมินรูปร่างของเซลล์ ลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์ ลักษณะไซโตพลาซึม ลักษณะการเกาะที่พื้นผิว เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ลอย ภายใต้กล้อง stereoscope และนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

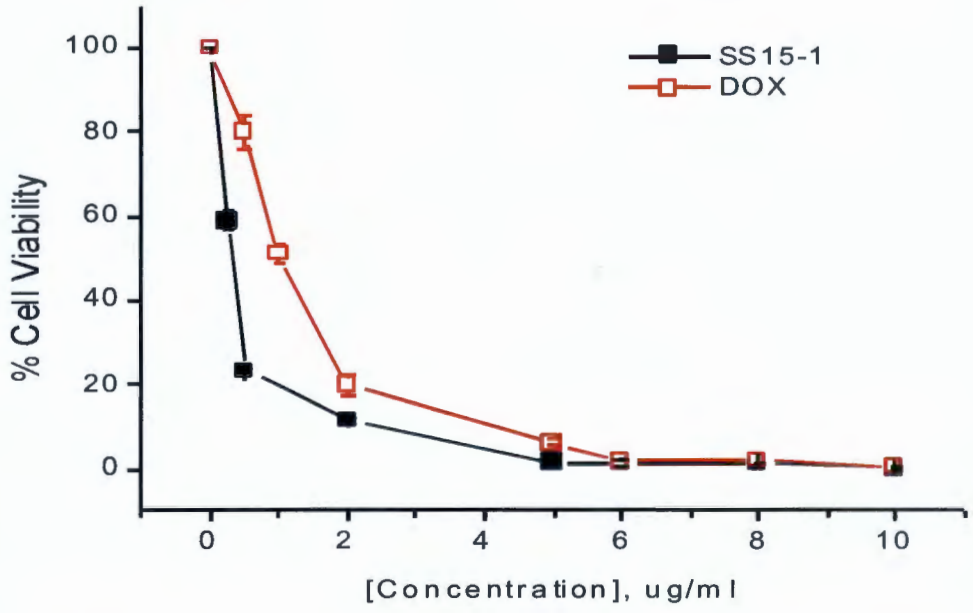
เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้อง stereoscope พบว่าในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.42% EtOH เซลล์มีลักษณะปกติ เหยียดตัวเป็นรูปกระสวย เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาซึมเรียบ และมีจำนวนเซลล์เกาะพื้นมากกว่า 90% เมื่อได้รับการเขย่าแรงๆ เซลล์ยังคงไม่หลุดจากพื้นผิว แสดงว่า 0.42% EtOH ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเซลล์ในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.42% EtOH มีความแตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัด คือเซลล์มีรูปร่างกลม เยื่อหุ้มเซลล์เป็นถุงน้ำ (bleb) และไซโตพลาซึมขรุขระ ลักษณะการเกาะพื้นผิวไม่แน่น เมื่อเขย่าเบาๆเซลล์หลุดจากพื้นผิวได้ง่าย ส่วนกลุ่มที่บ่มด้วย DOX พบว่าเซลล์มีลักษณะกลม เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาซึมขรุขระ การเกาะพื้นผิวไม่แน่น พบเซลล์ลอยจำนวนมาก และเมื่อนำมาวิเคราะห์หา

จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT พบว่าเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัด *Streptomyces* CH54-4 และ SS15-1 และ DOX มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น แตกต่างจากกลุ่มที่บ่มด้วย 0.42% EtOH อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการนับเซลล์มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT มีความสัมพันธ์กับการศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยกล้อง stereoscope

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ *Streptomyces* CH54-4 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกได้ โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ 20, 50 และ 80% (Inhibitory Concentration: IC_{20} IC_{50} และ IC_{80}) เท่ากับ 6.19 ± 0.6, 14.29 ± 1.34 และ 26.66 ± 1.93 µg/ml ตามลำดับ (รูป 3) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น (dose–dependent) ในขณะที่ doxorubicin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.04 ± 0.21 µg/ml (รูป 1) ในขณะที่ประสิทธิภาพของสารสกัดจากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ *Streptomyces* SS15-1 มีค่า IC_{20}, IC_{50} และ IC_{80} เท่ากับ 0.2 ± 0.02, 0.4 ± 0.08 และ 0.8 ± 0.11 µg/ml (รูป 4) ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกดีกว่า doxorubicin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 3 ประสิทธิภาพของสารสกัด STREPTOMYCES CH54-4 และ DOXORUBICIN ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± S.E.M. (N=4)



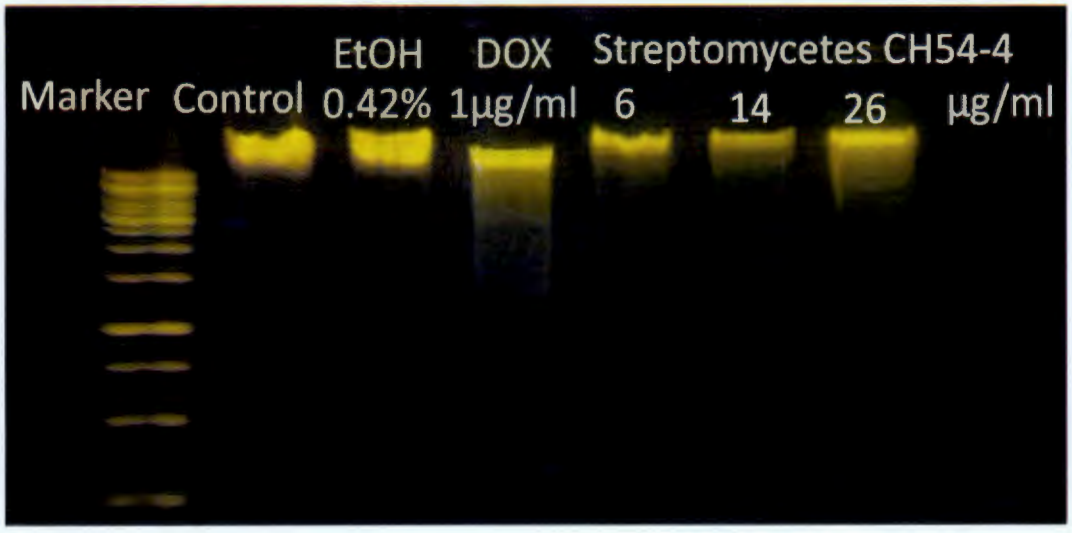
รูปที่ 4 ประสิทธิภาพของ สารสกัด STREPTOMYCES SS15-1 และ DOXORUBICIN ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± S.E.M. (N=4)

ผลการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis

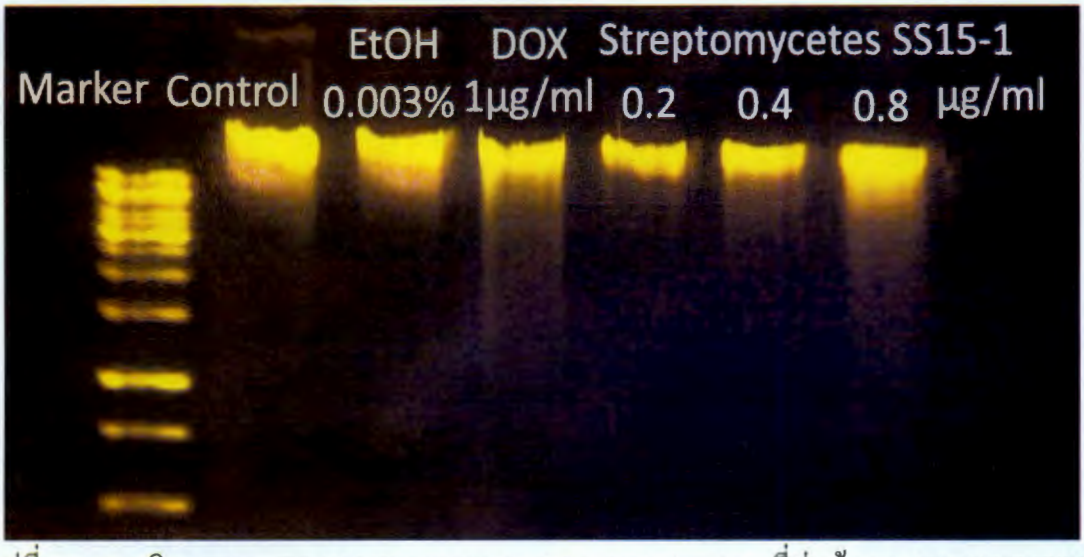
ทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อการแตกของ DNA โดยเลี้ยง KB cells ความเข้มข้น $1x10^5$ cells/ml ให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด Streptomyces CH54-4 และ SS15-1 ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{20}, IC_{50}, IC_{80} และ DOX (positive control) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} จากนั้นนำเซลล์ทั้งหมด (เซลล์เกาะพื้นและเซลล์แขวนลอย) มาสกัด DNA ด้วย GF- 1 Tissue DNA Extraction Kit (VIVANTIS) แล้วนำมาวิเคราะห์การแตกของ DNA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 volt นาน 45 นาที

เมื่อวิเคราะห์การแตกของดีเอนเอ พบว่า กลุ่มที่บ่มด้วย 0.42% EtOH (negative control) และกลุ่ม control พบแถบหนาของดีเอนเอ เพียงแถบเดียว แสดงว่าดีเอนเอมีขนาดใหญ่จึงเคลื่อนที่ได้ไม่ไกลและไม่มีการแตกของดีเอนเอ นอกจากนี้ตัวทำละลายที่ใช้คือ 0.42% EtOH ไม่มีผลต่อการแตกของดีเอนเอ จึงไม่พบการฟุ้งกระจายของดีเอนเอใน agarose gel ซึ่งแตกต่างจาก KB cells ที่บ่มด้วยสารสกัดจากแอคติโนมัยซีท สายพันธุ์ Streptomyces 54-4 (รูป 7) และ SS15-1 (รูป 8) เกิดแถบหนาของดีเอนเอ 1 แถบ และ smear band ยาวลงมา โดยความยาวจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (dose dependent) ทำให้มีขนาดของดีเอนเอ แตกต่างกัน สายดีเอนเอ ขนาดเล็กเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่าขนาดใหญ่ สอดคล้องกับกลุ่มที่บ่มด้วย doxorubicin (positive control) พบ

แถบหนาของดีเอนเอ 1 แถบ และ smear band ยาวลงมา แสดงว่าเซลล์กลุ่มที่บ่มด้วย doxorubicin เกิดการแตกของดีเอนเอเช่นกัน



รูปที่ 5 การเกิด DNA FRAGMENTATION ของ KB CELLS ที่บ่มด้วย DOXORUBICIN และ STREPTOMYCETES CH54-4 (6, 14, 26 UG/ML) ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS



รูปที่ 6 การเกิด DNA FRAGMENTATION ของ KB CELLS ที่บ่มด้วย DOXORUBICIN และ STREPTOMYCETES SS15-1 (0.2, 0.4, 0.8 UG/ML) ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS

ผลการศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI staining

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการเกิด nuclear fragmentation โดยเลี้ยง KB cells ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ให้เกาะบน cover slide ซึ่งแช่ใน 6 well plate นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด Streptomyces CH54-4 และ SS15-1 ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{20}, IC_{50}, IC_{80} และ DOX (positive control) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำ cover slide ที่มีเซลล์เกาะอยู่ย้อมด้วย DAPI ซึ่งสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ และศึกษาลักษณะนิวเคลียสภายใต้กล้อง fluorescence microscopy ซึ่ง DAPI มีเป้าหมายที่ nucleic acid เมื่อถูก excitation ด้วยแสงความยาวคลื่น 358 nm จะ emission ได้แสงสีน้ำเงิน (461 nm) เซลล์ที่มีชีวิตจะพบลักษณะการติดสี DAPI กระจายอย่างสม่ำเสมอ (homogenous) ตลอดทั้งนิวเคลียส ในขณะที่ apoptotic cell จะมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนของเส้นใยโครมาติน (chromatin condensation) จึงติดสีน้ำเงินของ DAPI หนาแน่น และมีนิวเคลียสขนาดเล็กกว่าปกติ และเมื่อพบการแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) จะพบการติดสีแบบกระจายเป็นหย่อมๆ

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์จาก bright field กำลังขยาย 100X ในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.42% EtOH พบว่าเซลล์มีลักษณะเหยียด เยื่อหุ้มเซลล์เรียบมีขอบเขตชัดเจน และไซโตพลาสซึมเรียบ ลักษณะเซลล์เหยียดเป็นรูปกระสวย เกาะบนผิว slide หนาแน่น มีช่องว่างระหว่างเซลล์น้อยมาก (รูป 7, ①) ลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI (รูป 7, ②) พบว่าเซลล์ทั้งหมด (100%) ติดสีฟ้าของ DAPI แบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ ไม่พบ nuclear fragmentation และ chromatin condensation ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ปกติ

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์แบบ bright field กำลังขยาย 100X ในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด Streptomyces CH54-4 (6.19, 14.29, 26.66 µg/ml) และ DOX (1.04 µg/ml) พบเซลล์ส่วนมากมีลักษณะเซลล์กลม ไม่เหยียด เยื่อหุ้มเซลล์เป็นตุ่มพอง (bleb) ซัยโตพลาสมบรุขระ มีจำนวนของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และจำนวนของเซลล์ปกติลดน้อยลงตามความเข้มข้นของสารสกัด สารสกัดที่เพิ่มขึ้น (รูป 7 ③, ⑤ & ⑦) มีจำนวนเซลล์ปกติ (normal cells) ลดลงคิดเป็น 80.33 ± 9.80%, 56.00 ± 4.36% และ 29.67 ± 5.97% ในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด Streptomyces CH54-4 (6.19, 14.29, 26.66 µg/ml) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเท่ากับ 100% (ตาราง 1)

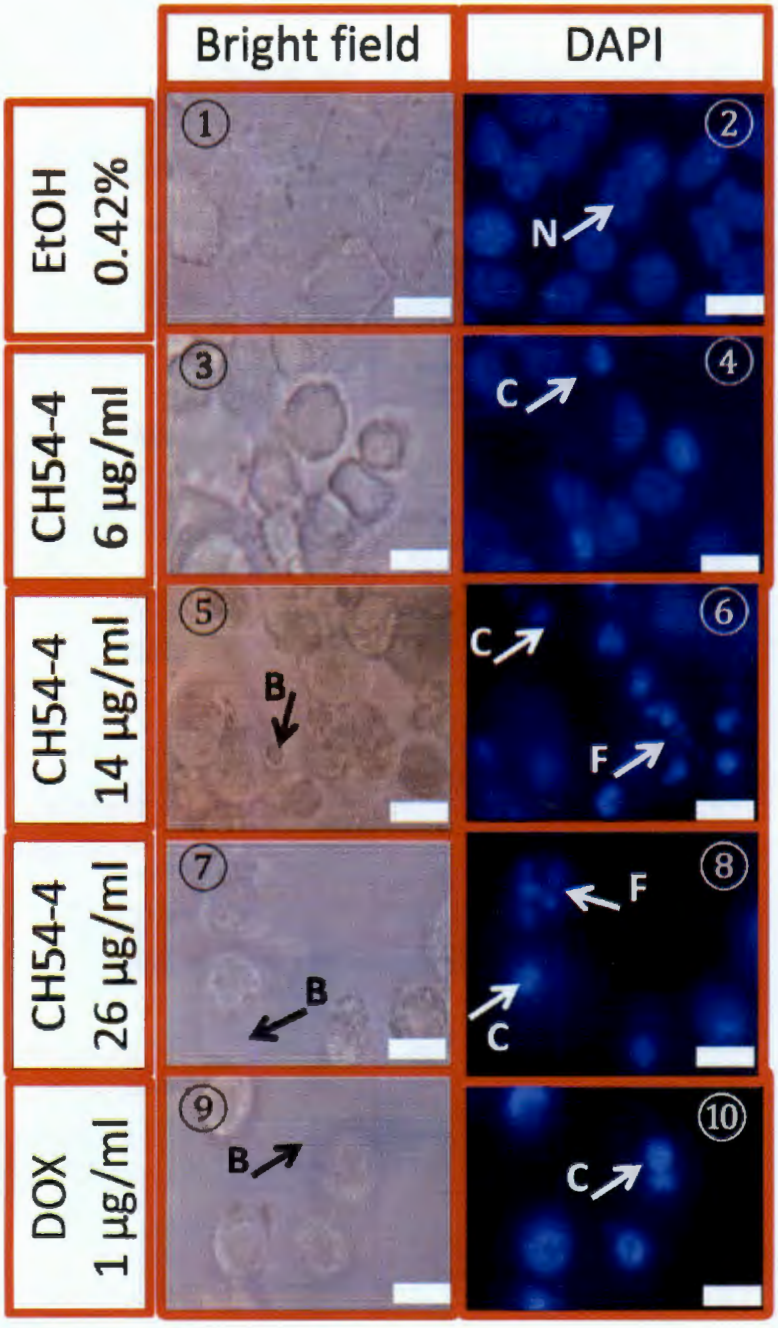
เซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด Streptomyces CH54-4 (6.19 µg/ml) (รูป 7: ③ & ④) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ 80.33 ± 9.80% ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) 15.00 ± 3.61% และติดสีฟ้าเข้ม มีขนาดเล็กลง (nuclear condensation) 4.67 ± 1.76% (ตาราง 1) เซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด Streptomyces CH54-4 (14.29 µg/ml) (รูป 7: ⑤ & ⑥) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ 56.00 ± 4.36% ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) 27.00 ± 2.65% และติดสีฟ้าเข้ม มีขนาดเล็กลง (nuclear condensation)

17.00 ± 3.28 (ตาราง 1) เซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด Streptomyces CH54-4 (26.66 μg/ml) (รูป 7: ⑦ & ⑧) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ 29.67 ± 5.97% ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) 30.00 ± 4.00% และติดสีฟ้าเข้ม มีขนาดเล็กลง (nuclear condensation) 40.33 ± 5.58 (ตาราง 1)

ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับเซลล์กลุ่มที่บ่มด้วย DOX (1.04 μg/ml) (รูป 7: ⑨ & ⑩) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ 37.67 ± 3.51% ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) 49.83 ± 3.33% และติดสีฟ้าเข้ม มีขนาดเล็กลง (nuclear condensation) 12.50 ± 1.50 (ตาราง 1)

ตาราง 1 เปอร์เซ็นต์การเกิด APOPTOSIS โดย KB CELLS บ่มด้วย DOXORUBICIN และ STREPTOMYCETES CH54-4 (6.19, 14.29, 26.66 UG/ML) และย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI

	% Normal cells (homogenous DAPI) ± S.E.M.	**% Nuclear fragmentation ± S.E.M.**	**% Chromatin condensation ± S.E.M.**
Control	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
EtOH 0.42% (negative control)	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
สารสกัดจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ *Streptomyces* CH54-4 [6.19 µg/ml]	80.33 ± 9.80	15.00 ± 3.61	4.67 ± 1.76
สารสกัดจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ *Streptomyces* CH54-4 [14.29 µg/ml]	56.00 ± 4.36	27.00 ± 2.65	17.00 ± 3.28
สารสกัดจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ *Streptomyces* CH54-4 [26.66 µg/ml]	29.67 ± 5.97	30.00 ± 4.00	40.33 ± 5.58
Doxorubicin [1.04 µg/ml] (positive control)	37.67 ± 3.51	49.83 ± 3.33	12.50 ± 1.50



รูปที่ 7 แสดงลักษณะเซลล์ที่บ่มด้วย DOXORUBICIN และ STREPTOMYCETES CH54-4 และลักษณะนิวเคลียสจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ โดยการย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI: B = BLEBBING, N = NORMAL, F = NUCLEAR FRAGMENTATION, C = NUCLEAR CONDENSATION, SCALE BAR = 10 µM

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์จาก bright field กำลังขยาย 100X ในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.0003% EtOH พบว่าเซลล์มีลักษณะเหยียด เยื่อหุ้มเซลล์เรียบมีขอบเขตชัดเจน และไซโตพลาสซึมเรียบ ลักษณะเซลล์เหยียดเป็นรูปกระสวย เกาะบนผิว slide หนาแน่น มีช่องว่างระหว่างเซลล์น้อยมาก (รูป 8, ①) ลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI (รูป 8, ②) พบว่าเซลล์ทั้งหมด (100%) ติดสีฟ้าของ DAPI แบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ ไม่พบ nuclear fragmentation และ chromatin condensation ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ปกติ

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์แบบ bright field กำลังขยาย 100X ในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด Streptomyces SS15-1 (0.2, 0.4, 0.8 μg/ml) และ DOX (1.04 μg/ml) พบเซลล์ส่วนมากมีลักษณะเซลล์กลม ไม่เหยียด เยื่อหุ้มเซลล์เป็นตุ่มพอง (bleb) ซัยโตพลาสมขรุขระ มีจำนวนของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และจำนวนของเซลล์ปกติลดน้อยลงตามความเข้มข้นของสารสกัด สารสกัดที่เพิ่มขึ้น (รูป 8 ③, ⑤ & ⑦) มีจำนวนเซลล์ปกติ (normal cells) ลดลงคิดเป็น 81.67 ± 2.517, 58.00 ± 3.605% และ 25.33±2.517% ในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด Streptomyces SS15-1 (0.2, 0.4, 0.8 μg/ml) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเท่ากับ 100% (ตาราง 1)

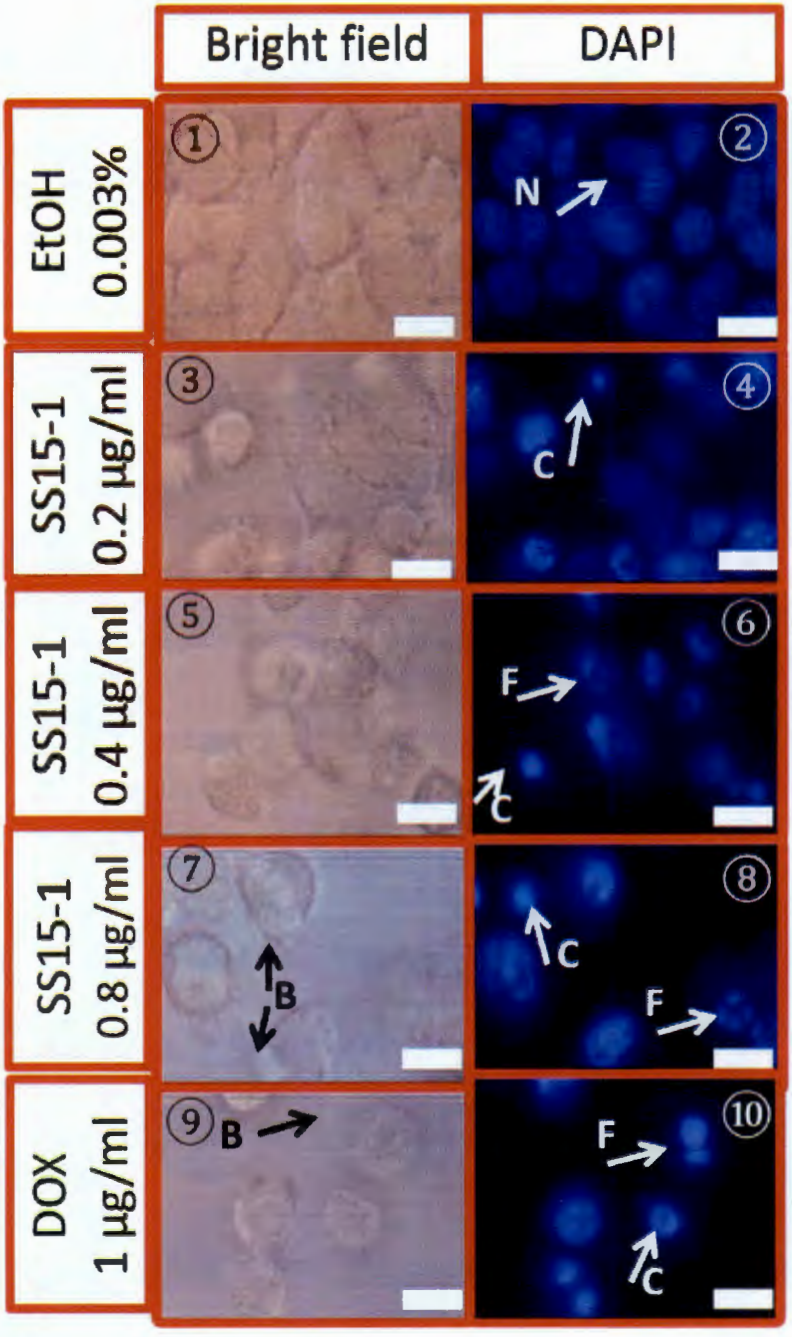
เซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด Streptomyces SS15-1 (0.2 μg/ml) (รูป 8: ③ & ④) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ 81.67 ± 2.517% ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) 11.67 ± 2.082% และติดสีฟ้าเข้ม มีขนาดเล็กลง (nuclear condensation) 6.67 ± 1.527% (ตาราง 2) เซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด Streptomyces SS15-1 (0.4 μg/ml) (รูป 8: ⑤ & ⑥) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ 58.00 ± 3.605% ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) 26.00 ± 4.583% และติดสีฟ้าเข้ม มีขนาดเล็กลง (nuclear condensation) 16.00 ± 1.000 (ตาราง 2) เซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด Streptomyces SS15-1 (0.8 μg/ml) (รูป 8: ⑦ & ⑧) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ 25.33 ± 2.517% ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) 45.33 ± 2.517% และติดสีฟ้าเข้ม มีขนาดเล็กลง (nuclear condensation) 29.33 ± 2.517 (ตาราง 2)

ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับเซลล์กลุ่มที่บ่มด้วย DOX (1.04 μg/ml) (รูป 8: ⑨ & ⑩) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ 37.67 ± 3.51% ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) 49.83 ± 3.33% และติดสีฟ้าเข้ม มีขนาดเล็กลง (nuclear condensation) 12.50 ± 1.50 (ตาราง 2)

ตาราง 2 เปอร์เซ็นต์การเกิด APOPTOSIS โดย KB CELLS บ่มด้วย DOXORUBICIN และ STREPTOMYCETES SS15-1 (0.2, 0.4, 0.8 UG/ML) และย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI

	% Normal cells (homogenous DAPI) ± S.E.M.	**% Nuclear fragmentation ± S.E.M.**	**% Chromatin condensation ± S.E.M.**
Control	100.00	0	0
EtOH 0.0003% (negative control)	100.00	0	0
สารสกัดจากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ *Streptomyces* SS15-1 [0.2 µg/ml]	81.67±2.517	11.67±2.082	6.67±1.527
สารสกัดจากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ SS15-1 [0.4 µg/ml]	58.00±3.605	26.00±4.583	16.00±1.000
สารสกัดจากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ SS15-1 [0.8 µg/ml]	25.33±2.517	45.33±2.517	29.33±2.517
Doxorubicin [1.04 µg/ml] (positive control)	37.67 ± 3.51	49.83 ± 3.33	12.50 ± 1.50

616.994
Q276ก
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131



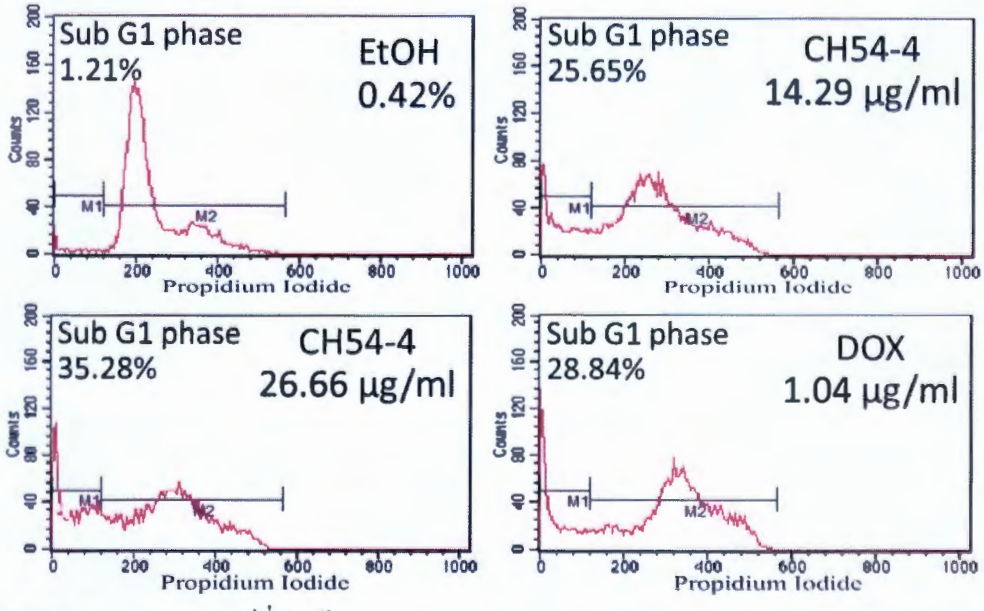
รูปที่ 8 แสดงลักษณะเซลล์ที่บ่มด้วย DOXORUBICIN และ STREPTOMYCETES SS15-1 และลักษณะนิวเคลียสจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ โดยการย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI: B = BLEBBING, N = NORMAL, F = NUCLEAR FRAGMENTATION, C = NUCLEAR CONDENSATION, SCALE BAR = 10 µM

356754

ผลการวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์ (cell cycle)

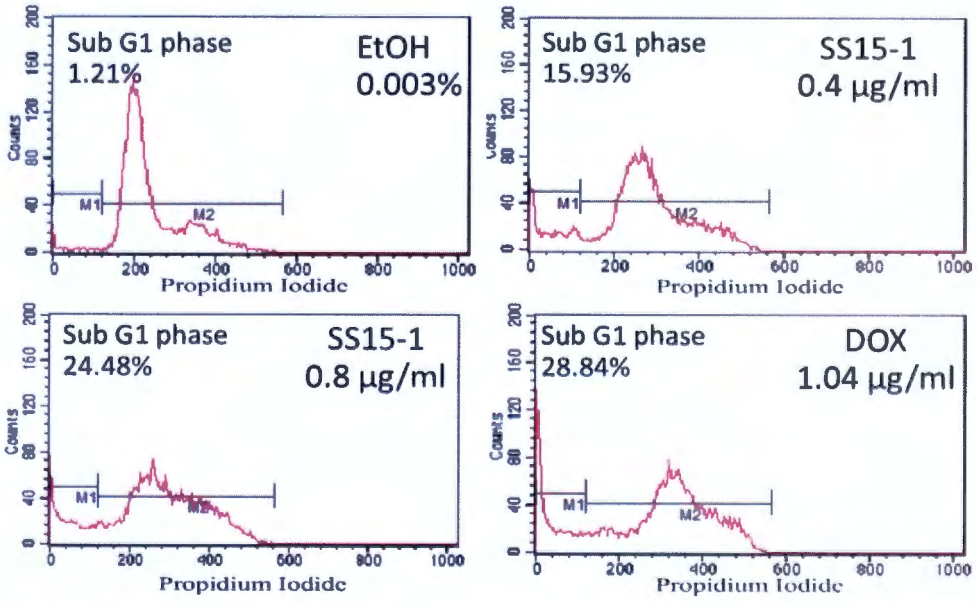
การทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ Streptpmyces CH54-4 และ SS15-1 โดยการวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์ (cell cycle) และวัดการเปลี่ยนแปลงในระยะ Sub-G1 cell (hypodiploid) ทำการทดลองโดยเตรียม KB cells ความเข้มข้นเริ่มต้น 1×10^5 cells/ml ใน 6 well plate จากนั้นบ่มภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง บ่ม KB cells กับสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น IC_{50} และ IC_{80}, Doxorubicin (DOX) ความเข้มข้น 1.04 µg/ml [IC_{50}] (positive control) และกลุ่ม control เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ย้อมสีดีเอนเอด้วย Propidium iodide (PI)/Triton X-100 จากนั้นนำไปวัดปริมาณ PI ที่สะสมในนิวเคลียสด้วย flow cytometry

จากกราฟ flow cytometry พบว่าเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัดจากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ Streptomyces CH54-4 ความเข้มข้น 14.29 µg/ml (IC_{50}) และ 26.66 µg/ml (IC_{80}) มีดีเอนเอติดสี PI ซึ่งตรงกับเซลล์ระยะ Sub-G1 (DNA<2n) เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นสารที่เพิ่มขึ้น (dose dependent) คือ 25.65 ± 2.2 และ 35.28 ± 3.44% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) โดยกลุ่มควบคุมพบเซลล์ในระยะ sub-G1 (hypodiploid) เพียง 1.21 ± 0.03 % (รูป 9) แสดงให้เห็นว่าเซลล์หยุดแบ่งตัวในระยะ G1 ส่งผลให้มีการสะสมเซลล์ระยะ sub-G1 (apoptotic cells) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ผลการทดลองยังสอดคล้องกับเซลล์กลุ่มที่บ่มด้วย doxorubicin (DOX) ความเข้มข้น 1.04 µg/ml [IC_{50}] มีการติดสี PI ในเซลล์ระยะ Sub-G1 (DNA<2n) เท่ากับ 28.84 ± 2.47%



รูปที่ 9 วัฏจักรของ KB เซลล์ที่บ่มด้วย 0.42% ETOH, สารสกัด CH54-4 (14.29 & 26.66 µG/ML), DOX (1.04 µG/ML) วิเคราะห์ผลโดย FLOW CYTOMETRY

เซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัดจากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ Streptomyces SS15-1 ความเข้มข้น 0.4 µg/ml (IC_{50}) และ 0.8 µg/ml (IC_{80}) พบว่ามีดีเอนเอติดสี PI ซึ่งตรงกับเซลล์ระยะ Sub-G1 (DNA<2n) เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นสารที่เพิ่มขึ้น (dose dependent) คือ 15.93 ± 1.01 และ 24.48 ± 3.19% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) โดยกลุ่มควบคุมพบเซลล์ในระยะ sub-G1 (hypodiploid) เพียง 1.21 ± 0.03 % (รูป 10) แสดงให้เห็นว่าเซลล์หยุดแบ่งตัวในระยะ G1 ส่งผลให้มีการสะสมเซลล์ระยะ sub-G1 (apoptotic cells) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ผลการทดลองยังสอดคล้องกับเซลล์กลุ่มที่บ่มด้วย doxorubicin (DOX) ความเข้มข้น 1.04 µg/ml [IC_{50}] มีการติดสี PI ในเซลล์ระยะ Sub-G1 (DNA<2n) เท่ากับ 28.84 ± 2.47%



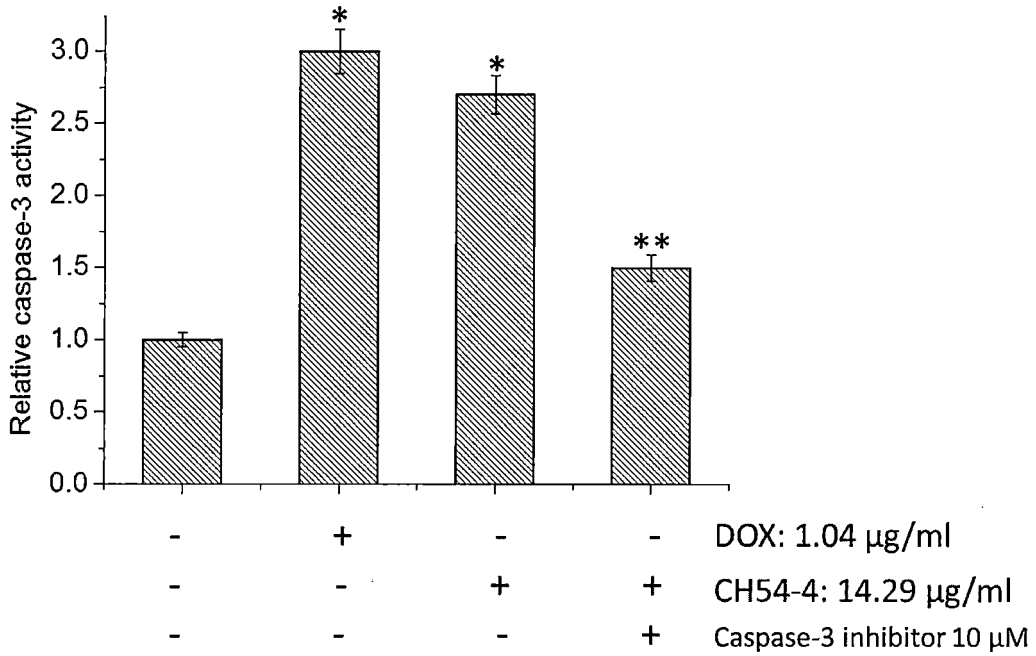
รูปที่ 10 วัฏจักรของ KB เซลล์ที่บ่มด้วย 0.003% ETOH, สารสกัด SS15-1 (0.4 & 0.8 µG/ML), DOX (1.04 µG/ML) วิเคราะห์ผลโดย FLOW CYTOMETRY

ผลการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase 3

การวัดการทำงานของเอนไซม์ caspase 3 ในเซลล์ โดยนำ KB cells มาบ่มด้วยสารสกัดแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ Streptpmyces CH54-4 และ SS15-1 ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} และ DOX (positive control) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดย lysis buffer นำส่วน supernatant มาทำปฏิกิริยากับ substrate: Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA) ในกรณีที่มีเอนไซม์ caspase-3 จะตัด

พันธะที่เชื่อมระหว่าง (DEVD)- (pNA) และได้ pNA ในรูปอิสระ ซึ่งสามารถติดตามโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm

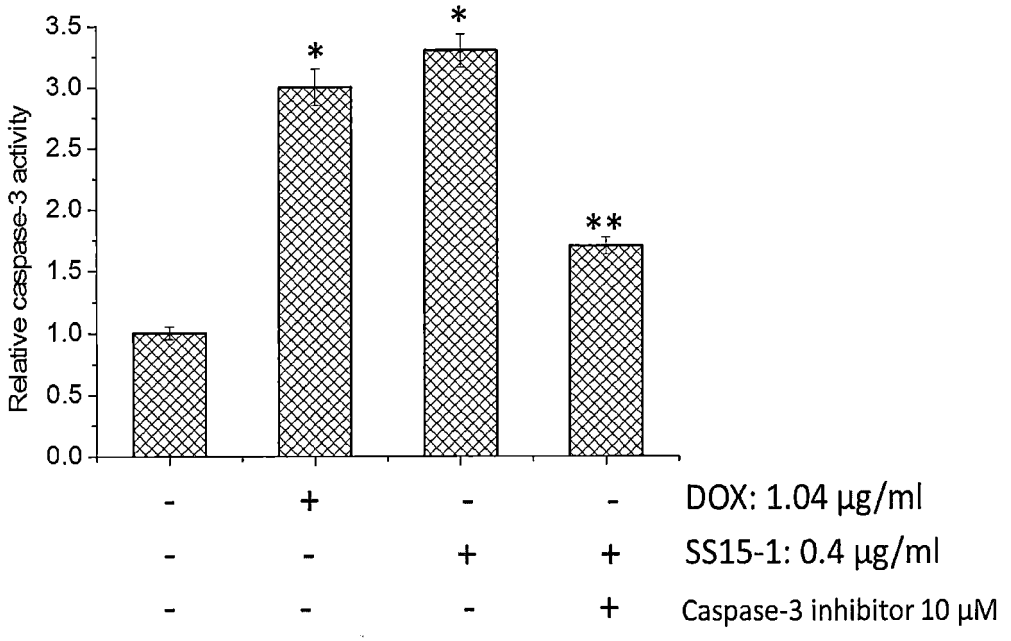
ผลการทดลองพบว่าค่า relative activities ของ caspase-3 ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ Streptpmyces CH54-4 (14.29 µg/ml) และ Dox (1.04 µg/ml) มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 1.7 ± 0.135, 2.0 ± 0.15 เท่าตามลำดับ ซึ่งเป็นการเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 0.42% EtOH นอกจากนี้เมื่อบ่มเซลล์ร่วมกันระหว่าง Streptpmyces CH54-4 (14.29 µg/ml) กับ DEVD-fmk (caspase-3 inhibitor) พบว่าค่า relative activities ของ caspase-3 ลดลงเหลือ 1.5 ± 0.09 ซึ่งเป็นการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด Streptpmyces CH54-4 เพียงอย่างเดียว (รูป 11) แสดงว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ Streptpmyces CH54-4 ผ่านทางเอนไซม์ caspase-3



รูปที่ 11 ค่า RELATIVE ACTIVITIES ของ CASPASE-3 จากสารสกัด STREPTPMYCES CH54-4 และ DOXORUBICIN ค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 และค่าที่วัดได้ในกลุ่มอื่นเป็นค่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, *$P < 0.05$เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, ** $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด STREPTPMYCES CH54-4 เพียงอย่างเดียว

ค่า relative activities ของ caspase-3 ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ Streptpmyces SS15-1-4 (0.4 µg/ml) และ Dox (1.04 µg/ml) มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 2.3 ± 0.35, 2.0 ± 0.15 เท่า

ตามลำดับ ซึ่งเป็นการเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 0.003% EtOH นอกจากนี้เมื่อบ่มเซลล์ร่วมกันระหว่าง Streptpmyces SS15-1 (0.4 µg/ml) กับ DEVD-fmk (caspase-3 inhibitor) พบว่าค่า relative activities ของ caspase-3 ลดลงเหลือ 1.7 ± 0.07 ซึ่งเป็นการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด Streptpmyces SS15-1 เพียงอย่างเดียว (รูป 12) แสดงว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ Streptpmyces SS15-1 ผ่านทางเอนไซม์ caspase-3



รูปที่ 12 ค่า RELATIVE ACTIVITIES ของ CASPASE-3 จากสารสกัด STREPTPMYCES SS15-1 และ DOXORUBICIN ค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 และค่าที่วัดได้ในกลุ่มอื่นเป็นค่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, *$P < 0.05$เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, ** $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด STREPTPMYCES SS15-1 เพียงอย่างเดียว

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายเชื้อรา กระจายอยู่ทั่วไปในมหาสมุทรรวมทั้งในระบบนิเวศทางทะเลอื่น ๆ มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีคุณค่าและมีคุณประโยชน์ต่องานด้านไบโอเทคโนโลยี เนื่องจากเป็นแหล่งของการผลิตสาร secondary metabolites ซึ่งออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีศักยภาพสูงและยังไม่ถูกค้นพบอีกมาก แม้ว่าบนบกจะพบแอคติโนมัยซีทได้มาก แต่ในทะเลจะพบทั้งความหลากหลายและความใหม่ของชนิดที่พบมากกว่า โดยเชื้อในกลุ่ม แอคติโนมัยซีท พบว่า genus *Streptomyces* เป็นเชื้อที่น่าสนใจ สามารถผลิตสาร secondary metabolites ได้มากถึง 70-80% และยังใช้ในทางการแพทย์อยู่จนถึงปัจจุบัน (Berdy, 2005) ตัวอย่างเช่น สารต้านเชื้อรา (antifungal), ต้านการเกิดเนื้องอก (antitumor), ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial), ต้านภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive), ฆ่าแมลง (insecticidal properties) (Solanki et al., 2008) และต้านการอักเสบ (anti-inflammation) (Kondratyuk et al., 2012) อย่างไรก็ตามอัตราการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ๆ จาก แอคติโนมัยซีท ที่อยู่บนบกนั้นลดลง จึงจำเป็นต้องค้นหาจากสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ โดยเฉพาะสิ่งแวดล้อมทางทะเล เนื่องจากมีโอกาสสูงที่จะพบสารออกฤทธิ์ใหม่ ๆ ที่พัฒนาไปสู่อุตสาหกรรมได้ ทำให้ทางเลือกในการใช้ยามีมากขึ้น

ในการศึกษาครั้งนี้มีการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical tests) และ 16S rDNA sequencing ของเชื้อที่อยู่ใน genus *Streptomycetes* และสารสกัดจาก *Streptomycetes* SS15-1 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกคือมีค่า IC_{50} = 0.4 ± 0.08 µg/ml และมีประสิทธิภาพดีกว่า doxorubicin คือมีค่า IC_{50} = 1.04 ± 0.21 µg/ml ขณะที่สารสกัดจาก *Streptomycetes* CH54-4 มีประสิทธิภาพในระดับปานกลางคือมีค่า IC_{50} = 14.29 ± 1.34 µg/ml สารสกัดที่ได้จากการทดลองครั้งนี้มาจากส่วนที่เป็น cell-free supernatant ซึ่งในขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อ *Streptomycetes* CH54-4 และ SS15-1 จะสร้างสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและหลั่งออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (growth medium) จึงแสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* จากดินตะกอนทะเลฝั่งอ่าวไทยนั้นให้สาร secondary metabolites ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก และมีศักยภาพสูงในการพัฒนาต่อยอดเป็นยารักษาโรคมะเร็ง ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปควรนำสารสกัดเหล่านี้มาแยกเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธี reverse-phase HPLC พร้อมกับหาสูตรโครวสร้างทางเคมี (chemical structure)

ในปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งด้วยยาเคมีบำบัดพบว่า มีผลข้างเคียงสูง เนื่องจากมีการทำลายเซล์ปกติด้วย มีการดื้อต่อยาที่รักษา ทำให้ต้องเพิ่มขนาดยาขึ้นเรื่อย ๆ แต่ในขณะเดียวกันผลการรักษาก็ไม่มีประสิทธิภาพ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพัฒนายาต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพสูง และมีผลข้างเคียงต่ำ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงมุ่งพัฒนายารักษาโรคมะเร็งแบบกำหนดเป้าหมาย ทำให้เซลล์มะเร็งหยุดการเจริญเติบโตและและเพิ่มสัญญาณชักนำทำให้เซลล์เข้าสู่การตายแบบ apoptosis ดังนั้นการออกฤทธิ์ของยารักษาโรคมะเร็งแบบ

มุ่งเป้าจะสามารถลดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ได้ ยารักษาโรคมะเร็งส่วนมากสกัดได้จากเชื้อจุลชีพ (microorganisms) และเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* จากทะเลที่ให้สาร bioactive metabolites ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิดและกระตุ้นการตายแบบอะโพโทซิส ได้แก่ doxorubicin (Lee *et al.,* 2002), macrolides, α- pyrones, lactones, indoles, terpenes, quinones (Dharmaraj, 2010), Resistomycin (Vijayabharathi1 *et al.,* 2011), Phenazines (Kondratyuk *et al.,* 2012), Kiamycin (Xie *et al.,* 2012) เป็นต้น จึงเป็นเชื้อที่น่าสนใจ เพราะเชื้อในกลุ่มนี้สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด และยังไม่ถูกค้นพบอีกมาก

ในการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจาก *Streptomycetes* CH54-4 และ SS15-1 ครั้งนี้พบลักษณะเซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis โดยเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเฉพาะ คือ เซลล์หดตัว (cell shrinkage) เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นถุง (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่ม (chromatin condensation) DNA ถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ (DNA fragmentation) และในระยะสุดท้ายส่วนของเซลล์มีการแตกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ เรียก apoptotic bodies ซึ่งหากอยู่ในร่างกาย ส่วนของ apoptotic bodies จะถูกกำจัดโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ macrophage จึงไม่เกิดการกระจายของพยาธิสภาพไปยังเซลล์ข้างเคียง คือไม่ทำให้เกิดการอักเสบเหมือนกับการตายแบบ necrosis (Elmore, 2007) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์จากการศึกษาด้วย microscopy เหมือนกับที่กล่าวมาข้างต้น แต่เป็นการทดสอบในหลอดทดลอง (*in Vitro*) ซึ่งเซลล์ไม่ถูกกำจัดโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เซลล์ที่เกิด apoptosis อาจพัฒนาต่อไปเป็น late apoptosis และ necrosis ได้

การศึกษาด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) พบว่าสารสกัดจาก *Streptomycetes* CH54-4 และ SS15-1 ทำให้เกิดการแตกของ DNA โดยพบลักษณะของ smear band เช่นเดียวกับเซลล์ที่บ่มด้วย DOX ซึ่ง smear band เป็นตัวบ่งชี้ว่า DNA ถูกตัดโดยไม่มีแบบแผน (non-random digestion) ซึ่งเป็นลักษณะของการตายแบบ necrosis (Lieberthal *et al.,* 1996) แต่การตายแบบ apoptosis จะพบลักษณะ ladder band ซึ่งเกิดจากการทำงานของ caspase 3 และcaspase activated DNase (CAD) ไปตัดสาย DNA ที่บริเวณ internucleosome ได้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 180-200 bp จึงมีสาย DNA ปรากฏทั้ง mono-nucleosome และ oligo-nucleosome เพราะฉะนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ ทำให้เซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกตายแบบ apoptosis และสุดท้ายเซลล์เปลี่ยนแปลงเป็น secondary necrotic cells จึงพบ smear band ที่เกิดจาก DNA fragment ของ late apoptotic cells และคาดว่าน่าจะพบ ladder band ที่เกิดจาก DNA fragment ของ early apoptotic cells ร่วมด้วย แต่เห็นได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรทำการศึกษาที่เวลาต่างๆ กันเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้เกิด ladder band

การศึกษาการแตกของนิวเคลียสด้วยวิธี DAPI staining ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) พบว่าสารสกัดจาก *Streptomycetes* CH54-4 และ SS15-1 ทำให้เกิด apoptotic โดยมีนิวเคลียสแตก

(nuclear fragmentation) ทำให้ติดสี DAPI ไม่สม่ำเสมอ มีการรวมกลุ่มของเส้นใยโครมาติน (chromatin condensation) ทำให้ติดสี DAPI เข้มกว่าปกติและมีขนาดเล็ก ซึ่งผลการศึกษาด้วยวิธี DAPI staining สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของ sub G1 cells (DNA < 2n) ซึ่งศึกษาโดย PI staining ด้วยเทคนิค flow cytometry ซึ่งเป็นศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่ลักษณะนิวเคลียสและ DNA เท่านั้น

กลไกในระดับไซโตพลาซึมโดยเอนไซม์ caspases (Cysteine aspartyl-specific proteases) ในส่วนที่เป็น effector caspases ได้แก่ caspase-3 เมื่อถูกกระตุ้นให้ทำงานจะย่อยโปรตีนโครงสร้างต่างๆ ได้แก่ actin, fodrin, และ lamin ทำให้เซลล์หดตัวมีขนาดเล็กลง (shrinkage) นอกจากนี้ caspase-3 ยังส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ caspase-activated DNase ทำให้เกิด DNA fragmentation เอนไซม์ในกลุ่มนี้ยังสามารถย่อยโปรตีนในวัฏจักรเซลล์ทำให้การแบ่งตัวของเซลล์หยุดชะงัก (Stennicke & Salvesen, 1998) การศึกษานี้ได้แสดงถึงสารสกัดจาก *Streptomycetes* CH54-4 และ SS15-1 สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกเกิด apoptosis ผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ caspase-3 และภายใต้เงื่อนไขเดียวกัน กลุ่มที่ได้รับ caspase-3 inhibitor (DEVD-fmk) สามารถยับยั้งการเกิด apoptosis ซึ่งเป็นการพิสูจน์ให้เห็นว่า กลไกที่เกิด apoptosis นั้นเป็นลักษณะของ caspase3-dependent pathway

ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Boonlarppradab และคณะ (2008) ได้ทำการแยกสาร marineosins A และ B จาก marine แอคติโนมัยซีท จีนัส *Steptomycetes* แล้วทาการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT 116 cells พบว่า marineosin A มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า marineosin B โดย marineosin A มีค่า 50% inhibitory concentration (IC_{50}) เท่ากับ 0.5 μM และ marineosin B มีค่า IC_{50} เท่ากับ 46 μM นอกจากนี้ยังพบว่า Marineosin A มีความเป็นพิษในเซลล์มะเร็งผิวหนัง และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เช่นเดียวกับการศึกษาของ Yeok และคณะในปี 2008 สามารถสกัดสารStreptochlorinได้จาก *Streptomyces* sp. (strain 04DH110) จากทะเลประเทศสาธารณรัฐเกาหลีใต้ กลไกการออกฤทธิ์ของสารStreptochlorin คือการสร้างอนุมูลอิสระและทำลายความต่างศักดิ์ที่ไมโตคอนเดรีย ส่งผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ที่เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตับ (Hep3B) ตายแบบ apoptosis

Park และคณะ (2008) ได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ Streptochlorin ซึ่งเป็นสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 cells พบว่าStreptochlorin สามารถยับยั้งการเจริญของ U937 cells ได้ โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและเวลา (dose and time dependent) และพบว่า Streptochlorin ทาให้เซลล์เกิด apoptotic bodies เกิดการแตกของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) และพบว่ามีจานวนเซลล์ในระยะ G1 ลดลง ทำให้มีเซลล์สะสมในระยะ sub G1 หรือมี apoptotic cells เพิ่มขึ้น จึงสรุปได้ว่า Streptochlorin เหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis โดยอัตราการตายของเซลล์ที่สูงขึ้น มีความสัมพันธ์กับการลดลงของ Bcl-2 ซึ่งเป็น anti-apoptotic regulator และพบการเพิ่มขึ้นของ Bax และ FasL

ซึ่งเป็น proapoptotic regulator นอกจากนี้พบว่าความต่างศักย์ของไมโตคอนเดรียลดลง มีการทำงานของเอนไซม์ caspase จากการทาลาย poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งการทางานของ phospholipase C-g1 protein ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสาคัญเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง

Suthindhiran และ Kannabiran (2009) เก็บตัวอย่างจากตะกอนที่อยู่ลึก 400 เซนติเมตร จากอ่าวเบงกอลในเมือง Marakkanam ประเทศอินเดีย แยกชนิดของ แอคติโนมัยซีท ที่ชอบความเค็ม (halophilic) และนำสารสกัดหยาบมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cells ด้วยวิธี MTT assay พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 26.2 µg/ml ทดสอบฤทธิ์ในการทาให้เม็ดเลือดแดงแตก ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู ด้วยวิธี hemolytic assay พบว่ามีค่า 50% effective inhibitory concentration (EC_{50}) เท่ากับ 266 µg/ml และทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ ด้วยวิธี agar diffusion assay พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* แต่มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลางต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis*

Jeong และคณะ (2010) ได้เก็บตัวอย่างจากน้ำทะเลบริเวณอ่าว Jinhae ประเทศสาธารณรัฐเกาหลีใต้ พบเชื้อ แอคติโนมัยซีท จำนวน 23 ตัวอย่าง โดยมีสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* sp. SY-103 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ต่อมาจึงสกัดสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. SY-103 ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายแบบ apoptosis สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน Bcl-2 family การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 และยับยั้ง PI3K/Akt pathway นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสารชนิดใหม่คือ Kiamycin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ angucyclinone สามารถสกัดได้จาก *Streptomyces* sp.strain M268 จากทะเล สารดังกล่าวน่าสนใจมากเนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่างเช่น ต้านไวรัส, ต้านเชื้อรา และต้านมะเร็งได้หลายชนิดเช่น เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60 cells), เซลล์มะเร็งปอด (lung adenocarcinoma) และมะเร็งตับ (BEL-7402) เป็นต้น (Xie et al., 2012)

ในงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารเมตาบอไลท์ที่มาจากแบคทีเรีย (*Streptomyces*) คุณค่าสูงจากธรรมชาติโดยเฉพาะสิ่งแวดล้อมทางทะเลที่แยกจากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลนจังหวัดระยองและจังหวัดจันทบุรี เนื่องจากแต่ละชนิดของ *Streptomyces* สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ได้ขึ้นกับสภาวะแวดล้อมหลายปัจจัย การค้นหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่ที่ยับยั้งเซลล์มะเร็ง จะทำให้มีทางเลือกในการใช้ยามีมากขึ้น มีความสำคัญทางการแพทย์และทางเภสัชวิทยา

สรุปและเสนอแนะ

สรุป

นำตัวอย่างตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน ภาคตะวันออกของอ่าวไทยของจังหวัดระยอง และจังหวัดจันทบุรี มาคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ ทดสอบฤทธิ์ชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก (KB cells) พบว่าสารสกัดจาก *Streptomycetes* CH54-4 และ SS15-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก โดยเซลล์ที่ตายมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเฉพาะ คือ เซลล์หดตัว (cell shrinkage) เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นถุง (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่ม (chromatin condensation) DNA ถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ (DNA fragmentation) มีการสะสมของเซลล์ระยะ sub-G1 (apoptotic cells) เพิ่มมากขึ้น มีกลไกระดับซัยโตพลาสมเป็น caspase3-dependent pathway ซึ่งจากหลักฐานดังกล่าวนี้พอที่จะสรุปได้ว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกตายแบบ apoptosis

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับไมโตคอนเดรีย เพื่อยืนยันการตายแบบ apoptosis
2. ควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโปรตีน เพื่อยืนยันการตายแบบ apoptosis
3. ควรมีการทดลองในเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับการทดลองในเซลล์มะเร็ง
4. ควรมีการทดลองในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นและในสัตว์ทดลอง
5. ควรหาองค์ประกอบของสารสำคัญและโครงสร้างทางเคมี

ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัย

นักวิจัยได้พัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเชื้อในห้องทดลอง เพื่อให้มีปริมาณสารออกฤทธ์มากขึ้นในอาหารที่มีราคาถูกลง และสารสกัดจาก *Streptomycetes* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษานั้นยังเป็นสารสกัดหยาบซึ่งมีโมเลกุลหลายชนิดรวมอยู่ด้วยกัน การเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ซึ่งประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยครั้งนี้เป็นการพัฒนางานวิจัยต่อยอด คือนำสารสารสกัดหยาบมาสกัดแยกเป็นส่วนๆ แล้วนำแต่ละส่วนไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง จากนั้นนำส่วนที่ active มาสกัดแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ นำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งอีกเป็นครั้งสุดท้าย และหาสูตรโครงสร้าง เพื่อนำไปสังเคราะห์เป็นยาต้านมะเร็งต่อไป

ผลผลิต (Output)

นำเสนอบทคัดย่อ

The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference

April 23, 2012

Ms. Rattanaporn Srivibool
Institute of Marine Science, Burapha University,
Bangsaen, Chonburi, 20121, Thailand.

Dear Ms. Rattanaporn Srivibool,

Thank you for your mail.
We certify here that we have received your paper (abstract number 76) entitled
" Antiproliferative and Apoptosis-Inducing Activities of an Extract from *Streptomyces* CH54-4 on Human Cancer Cells." is accepted for poster presentation in the 9th APMBC which will be held in Kochi, Japan during 13th to 16th of July 2012.
We appreciate your contribution very much.
Looking forward to meeting you in the Conference at Kochi.

Sincerely yours,

Akira Tominaga, Ph.D. and Masashi Tsuda, Ph.D.
Secretaries-General
The 9th APMBC

Secretariat of the 9th APMBC
E-mail: apmbc-9@kochi-u.ac.jp
Tel & Fax: +81-88-864-6720
Center for Advanced Marine Core Research, Kochi University
Address: Otsu 200, Monobe, Nankoku,Kochi 783-8502, Japan

Antiproliferative and Apoptosis-Inducing Activities of an Extract from *Streptomyces* CH54-4 on Human Cancer Cells.

Rattanaporn Srivibool[1], Chantarawan Saengkhae[2], Keiichi Enomoto[3]

[1] Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand. [2] Department of Biomedical Science, Faculty of Allied Health Science, Burapha University, Chonburi, 20131 Thailand. [3] School of Environmental Science and Engineering, Kochi University of Technology, Kochi 782-8502, Japan
E-mail: rattanap@buu.ac.th

Cervical cancer is one of the principle life-threatening conditions that results in the death of women. At present, conventional treatment which includes the use of chemotherapeutic agents, surgery and radiation are not totally effective in the removal of cancerous cells and the treatment regime gives unacceptable side effects. To date approximately 23,000 bioactive secondary metabolites produced by microorganisms have been reported of which 10,000+ compounds are produced by actinomycetes; circa 7,600 of these are produced by *Streptomyces* species[1,2]. A bioprospecting programme for novel anti-cervical cancer compounds has isolated an actinomycete from mangrove soil deposits, *Streptomyces* CH54-4, with demonstrable activity. Following culture, the ethyl acetate extracted crude product in red was assessed for its anti-proliferative and apoptosis-inducing activity on cervical human cancer HeLa cells. Extract CH54-4 gave a dose dependent inhibition of growth of HeLa cells with IC_{20}, IC_{50} and IC_{80} at 4.28, 8.50 and 34.76 μg/ml respectively. Induction of HeLa cell apoptosis was through DNA fragmentation. At IC_{20}, IC_{50} and IC_{80}, early apoptosis was observed in 13.63±8.97%, 20.90±3.84% and 16.67±4.09% of cells, while in late apoptosis 1.60±2.67%, 14.25±10.58% and 55.30±7.45% of cells were affected. The IC_{50} of the extract was close to that of doxorubicin, an anthracycline compound of *Streptomyces* origin with demonstrable anti-cancerogenic activity. Partial purification has revealed anti-cancerogenic activity in some fractions and data from HPLC analysis at 220 and 535 nm showed some interesting unique peaks in those fractions which might be the corresponding active components. The potential anti-proliferative and apoptosis-inducing activity of each pure component would be in future assessment. Phylogenetic analysis of a 16S rRNA gene sequence showed that strain CH54-4 forms a distinct clade within the *Streptomyces* 16S rRNA gene tree and closely related to *Streptomyces thermocarboxydus*

References:
1. Berdy, J. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* **2005**, 58, 1-26.
2. Olano, C., Méndez, C., Salas, J.A. Antitumor compounds from marine Actinomycetes. *Mar. Drug.* **2009**,7, 210-248.

รายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการ (NRPM 13 หลัก) _2555A10862025 _

โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ชื่อมหาวิทยาลัย บูรพา จ.ชลบุรี 20131

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การตายของเซลล์มะเร็งแบบอะโพโทซิสโดยสารสกัดจาก Streptomyces CH54-4 และ SS15-1 ที่แยกจากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลน

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Apoptosis induction of human cancer cells by Streptomyces strain CH54-4 and SS15-1 isolated from mangrove sediments

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน / ผู้วิจัย (อ./ ดร./ ผศ./ รศ./ ศ.)

ผศ.ดร.จันทรวรรณ แสงแข คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (1/ตุลาคม/ 2554) ถึงวันที่ (3/ธันวาคม/2555)

ระยะเวลาดำเนินการ ปี เดือน ตั้งแต่วันที่ (1/ตุลาคม/ 2554) ถึงวันที่ (30/กันยายน/2555)

รายจ่าย

หมวด	รายจ่ายสะสมจากรายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	รวมรายจ่ายสะสมถึงปัจจุบัน	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	คงเหลือ (หรือเกิน)
1. ค่าตอบแทนผู้ช่วยนักวิจัย นางสาวจันทรัตน์ ภูมิพื้นผล เดือนพฤศจิกายน 54 ถึงเดือนสิงหาคม 55	38,000.-	2,500.-	40,500.-	392,900.-	352,400.-
2. ค่าอาหารทำการนอกเวลา ผู้วิจัย 2 คน จำนวน 270 วัน ๆละ 4 ชั่วโมงๆ ละ 50 บาท	22,500.-	31,500.-	94,500.-		298,400.-

2. ค่าจ้างเหมาขับรถยนต์	15,000.-	7,500.-	117,000.-		275,900.-
3.ค่าวัสดุ					
ชุดเครื่องแก้ว soxlet and condensor	6,099.-		123,099.-		269,801.-
Tissue culture flask (plastic ware)	20,100.-		143,199.-		249,701.-
Ultravette Micro Cuvette, Z 15 mm., 70-550 ul.	4,280.-		147,479.-		245421.-
Fetal Bovine Serum 500 ml X 4	36,880.-		184,359.-		208,541.-
GF-1 Tissue DNA	14,154.-		198,513.-		194,387.-
Agarose gel	5,738.-		204,251.-		188,649.-
Media RPMI 1640 500 ml X 10	7,293.-		211,544.-		181,356.-
Penicillin/Streptomycin Trypsin/EDTA Dimethylsulfoxide Phosphate buffer Conical tube		7,383.-	218,927.-		173,973.-
RPMI medium 1640 Fetal bovine serum JC-1: CBIC2		48,057.98	266,984.98		125,915.02
Conical tube Pipette tip		2516.64	269,501.62		123,398.38
Parafilm Iso propyl alcohol Ethyl alcohol Syring		3070.90	272,572.5		120,327.48
TAQ DNA polymer Trizol reagent		21,400.-	293,972.5		98,927.48

Stripette 5 & 10 ml Syring filter 0.2 uM		10,325.25	304,297.75		88,601.75
Cryovial 1.8 ml Serological pipette		3,220.70	307,518.45		85,381.05
Cell culture chamber slide 4 wells		8,560.-	316,078.45		76,821.05
Liquid N_2 800 x 11		8,800.-	324,878.45		68,021.05
Gas CO_2		8,400.-	333,278.45		59,621.05
4.ค่าใช้สอยอื่นๆ ค่าใช้เครื่องมือถ่ายภาพจากกล้องอิเลคตรอน		10,000.-	343,278.45		49,621.05
ค่าใช้เครื่องมือถ่ายภาพจากกล้อง Fluorescence microscopy		4,000.-	347,278.45		45,621.05
5.ค่าใช้จ่ายอื่นๆ วัสดุสำนักงาน วัสดุคอมพิวเตอร์ ค่าถ่ายเอกสารและเข้าเล่ม		 1,582.- 2,923.- 2,408.-	 348,860.45 351,783.45 354,191.45		 44,039.05 41,116.05 38,708.05
สมทบเข้ามหาวิทยาลัย		39,290.-	393,481.47		
รวม	**170,044.-**	**223,473.47**	**393,481.47**	**392,900.-**	**581.47.-**

<u>จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ งวดที่ 1 = 196,450.-บาท เมื่อ มิถุนายน 2555

งวดที่ 2 = 157,160.- บาท เมื่อ ตุลาคม 2555 รวม = 353,610.- บาท

จันทรวรรณ แสงแข

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

บรรณานุกรม (Biblography)

Adinarayana G, Venkateshan MR, Bapiraju K, Sujatha P, Premkumar J, Ellaiah P & Zeeck A. Cytotoxic compounds from the marine Actinobacterium *Streptomyces corchorusii* AUBN1/71. *Rus J Bioorg Chem*. 2006, 32(1); 328-34.

Berdy J. Bioactive microbial metabolites: a personal view. *J Antibiot*. 2005, 58; 1-26.

Boonlarppradab C, Kauffman CA, Jensen PR & Fenical W. Marineosins A and B, cytotoxic spiroaminals from a marine-derived Actinomycete. *Org Lett*. 2008, 10(24); 5505-08.

Bredholdt H, Fjaervik E, Johnsen G & Zotchev S. B. Actinomyetes from sediment in the Trondheim fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. *Mar Drugs*. 2008; 6: 12-24.

Bredholdt H, Galatenko OA, Engelhardt K, Fjaervik E, Terekhova LP & Zotchev SB. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments from of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity. *Environ Microbiol*. 2007; 9: 2756-64.

Bull AT, Stach JE, Ward AC & Goodfellow M. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2005; 87(1): 65-79.

Chang HB & Kim JH. Antioxidant properties of dihydroherbimycin A from a newly isolated from *Streptomycetes* sp. *Biotechnol Lett*. 2007; 29: 599-603.

Dharmaraj S. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2010; 26: 2123-39.

Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35: 495–516.

Ghanem NB, Sabry S A, El-Sherif Z M & El-Ela GA. Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *Appli Microbiol*. 2000; 46: 105-111.

Hardt IH, Jensen PR & Fenical W. Neomarinono and new cytotoxic marinone derivatives produced by a marine filamenous bacterium (Actinomycetales). *Tetrahedron Lett*. 2000; 42: 2073-76.

Hong K, Gao AH, Xie QY, Gao H, Zhuang L, Lin HP, Yu HP, Yao SH, Goodfello M & Ruan JS. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove Soils and plants in China. *Mar Drugs. 2009*; 7: 24-44.

Hu W & Kavanagh JJ. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol*. 2003; 4: 721–29.

Jeong SY, Han MH, Jin CY, Kim GY, Choi BT, Nam TJ, Kim SK & Choi YH. Apoptosis induction of human leukemia cells by *Streptomyces* sp. SY-103 metabolites through activation of caspase-3 and inactivation of Akt. *Int J Mol Med*. 2010; 25: 31-40.

Jimenez JT, Sturdikova M, Sturdik E. Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta Chimica Slovaca*. 2009; 2(2): 63-74.

Kasibhatla S & Tseng B. Why Target Apoptosis in Cancer Treatment? *Mol Cancer Ther*. 2003; 2: 573–80.

Komatsu K, Tsuda M, Shiro M, Tanaka Y, Mikami Y & Kobayashi J. Brasilicardins B-D new tricyclic terpernoids from actinomycete Nocardia brasiliensis. *Bioorg Med Chem*. 2004; 12: 5545-51.

Kondratyuk TP, Park EJ, Yu R, Breemen RB, Asolkar RN, Murphy BT, Fenical W & Pezzuto. Novel Marine Phenazines as Potential Cancer Chemopreventive and Anti-Inflammatory Agents. *Mar Drugs*. 2012; 10: 451-64.

Kumar SS, Philip R & Achuthankutty CT. Antiviral property of marine Actinomycetes against white spot syndrome virus in penaeid shrimps. *Current science*. 2006; 91(6): 807-11.

Lam KS. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin Microbiol*. 2006; 9: 245-51.

Lee S, Baek M, Kim HY, Ha JH & Jeoung DI. Mechanism of doxorubicin-induced cell death and expression profile analysis. *Biotechnol Lett.* 2002; 24: 1147–51.

Lieberthal W, Triaca V and Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.*1996; 270(4): 700–8.

Liu R, Zhu T, Li D, Gu J, Xia W, Fang Y, Liu H, Zhu W & Gu Q. Two Indolocarbazole alkaloids with apoptosis activity from a marine-derived Actinomycete Z2039-2. *Arch Pharm Res.* 2007; 30(3): 270-74.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV and Clark DP. (2009). In "Brock Biology of Microorganism" 12th edition. Pearson, Benjamin Cummings, Pearson Education, Inc.

Maldonado LA, Stach JE, Pathom-aree W, Ward AC, Bull AT & Goodfellow M. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Anton Leeuw.* 2005; 87: 11-18.

Manam RR, Teisan S, White DJ, Nicholson B, Grodberg J, Neuteboom STC, Lam KS, Mosca DA, Lloyd GK & Potts BCM. Lajollamycin, a nitrotetraene spiro-beta-lactone-gamma-lavtam antibiotic from marine actinomycete *Streptomyces nodosus*. *J Nat Prod.* 2005; 68: 240-43.

Moon HS, Lim H, Moon S, Oh HL, Kim YT, Kim MK & Lee CH. Benzyldihydroxyoctenone, a novel anticancer agent induces apoptosis via mitocrondrial mediated pathway in androgen-sensitive LNCaP prostate cancer cells. *Bioorg Med Chem.* 2009; 19: 742-44.

Park C, Shin HJ, Kim GY, Kwon TK, Nam TJ, Kim SK, Cheong J, Choi IW & Choi YH. Induction of apoptosis by streptochlorin isolated from *Streptomyces* sp. in human leukemic U937 cells. *Toxicol In Vitro. 2008*; 22: 1573-81.

Pathom-aree W, Stach JEM, Ward AC, Hrikoshi K, Bull AT & Goodfellow, M. Diversity of แอคติโนมัยซีท isolated from Challenger Deep sediment (10, 898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles.* 2006; 10: 181-89.

Shin HJ, Kim TS, Lee HS, Park JY, Choi IK & Kwon HJ. Streptopyrrolidine, an angiogenesis inhibitor from a marine-derived Streotomyces sp. KORDI-3973. *Phytochemistry.* 2008; 69: 2363-66.

Solanki R, Khana M. & Lal R.Bioactive compounds from marine Actinomycetes. *Indian J Microbiol.* 2008; 48: 410-31.

Soria MIE, Prieto DA, Jensen PR & Fenical W. Antibiotic terpenoid chloro-dihydroquinones from a new marine actinomycete. *J Nat Prod.* 2006; 68: 904-10.

Srivibool R, Jaidee K, Sukchotiratana M, Tokuyama S & Pathom-aree W. Taxonomic characterization of Streptomyces strain CH54-4 isolated from mangrove sediment. *Ann Microbiol.* 2010; 60: 299-305.

Stennicke HR and Salvesen GS. Properties of the caspases. Biochim Biophys Acta. 1998; 1387: 17-31.

Suthindhiran R & Kannabiran K. Cytotoxic and antimicrobial potential of actinomycete species Saccharopopolyspora salina VITSDK4 isolated from the bay of Bengal coast of India. *American J Infect Dis.* 2009; 5(2): 90-98.

Vijayabharathi R, Bruheim P, Andreassen T, Raja DS, Devil PB, Sathyabamal S & Priyadarisini VB. Assessment of resistomycin, as an anticancer compound isolated and characterized from *Streptomyces* aurantiacus AAA5. *J Microbiol Biotechnol.* 2011; 49(6): 920-26.

Woo JH, Kitamura H & Kamei Y. An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. strain AP77 is apecific for Pythium porphyrae a causative agent of red rot disease in porphyra spp. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(6): 2666-75.

Xiao J, Xu J, Xie S, Zhang X, Yu Z & Xu J. Isolation of mangrove actinomycetes and their antagonistic activities. *J Appl Environ Bio.* 2008; 14: 244-48.

Xie CY, Zhu H, Lin LP, Miao ZH, Geng MY, Cai YJ, Chen Y, Zhao HJ, Luo HB, Zhang XW, Fan LM, Shen YM & Ding J. MFTZ-1, an actinomycete subspecies-derived anti-tumor macrolide functions as a novel topoisomerase II poison. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(11): 3059-60.

Xie Z, Liu B, Wang H, Yang S, Zhang H, Wang Y, Ji N, Qin S & Laatsch H. Kiamycin, a unique cytotoxic angucyclinone derivative from a marine *Streptomyces* sp. *Mar Drugs*. 2012; 10: 551-58.

Yeok SD, Shin HJ, Kim GY, Cheong JH, Choi IW, Kim SK, Moon SK, Kang HS & Choi YH. Streptochlorin Isolated from *Streptomyces* sp. Induces Apoptosis in Human Hepatocarcinoma Cells Through a Reactive Oxygen Species-Mediated Mitochondrial Pathway. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18(11): 1862–67.

Zheng Z, Zeng W, Huang Y, Yang Z, Li J, Cai H & Su W. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiology Letters*. 2000; 188: 87-91.