

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา

ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รหัสโครงการเลขที่ _2554A10862003

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) ฤทธิ์ต้านมะเร็งและกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุล
ของสารเมตาโบไลต์ที่ออกฤทธิ์ชีวภาพ จากแอคติโนแบคทีเรียในชั้นออร์เดอร์
Micromonosporineae ที่แยกจากตะกอนทะเล

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาอังกฤษ) Anti-cancer activities and molecular
mechanisms of bioactive metabolites from actinobacteria in suborder
Micromonosporineae isolated from marine sediments

หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.จันทรวรรณ แสงแข

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ร่วมโครงการวิจัย นางสาวรัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

A0.0094602

#0155077 ซี.ศ. 2556

316516

เริ่มบริการ

4 ซี.ย. 2556

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา

และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักคณะกรรมการอุดมศึกษา

บทคัดย่อ

บทนำ จุลินทรีย์แกรมบวกเช่น Actinomycetes เป็นแหล่งผลิตสาร secondary metabolites ซึ่งออกฤทธิ์ชีวภาพโดยเฉพาะสารต้านเซลล์มะเร็ง และแอคติโนมัยซีทในทะเลโดยเฉพาะ *Micromonospora* sp. มีความหลากหลายของชนิด มีแนวโน้มสร้างสารเมตาโบไลต์อันดับสองชนิดใหม่ ๆ ที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็ง

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ KB cells ในระดับหลอดทดลอง และศึกษากลไกการตายระดับโมเลกุลแบบ apoptosis ของสารสกัดจาก *Micromonospora* ที่แยกจากตะกอนทะเล

วิธีการทดลอง นำดินตะกอนก้นทะเลมาคัดเลือกเชื้อใน suborder *Micromonosporineae* สกัดสารจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย methanol และ ethyl acetate ได้สารสกัดหยาบ MAG 9-7 และ MAG 9-19 นำมาบ่มกับเซลล์นาน 48 ชั่วโมง ศึกษาการเจริญของเซลล์ด้วย MTT assay นับจำนวนนิวเคลียสที่มีอะโพโทซิสโดยการย้อมสี DAPI วิเคราะห์ผลด้วย fluorescent microscopy ศึกษาการแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis ศึกษาวัฏจักรเซลล์โดยการย้อมสี PI วิเคราะห์ผลด้วย flow cytometry จากนั้นวัด caspase-3 activity

ผลการทดลอง สารสกัด MAG 9-19 ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ขณะที่ MAG 9-7 มีพิษระดับปานกลาง ($IC_{50} = 83.46 \pm 3.9 \mu\text{g/ml}$) เมื่อนำสารสกัด MAG 9-7 (50 $\mu\text{g/ml}$) หรือ MAG 9-19 (300 $\mu\text{g/ml}$) บ่มร่วมกับ doxorubicin (DOX) (1 $\mu\text{g/ml}$) พบว่าเซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารเพียงอย่างเดียว โดยเซลล์ที่ตายหลุดจากพื้นผิวง่าย มี apoptotic body พบโครมาตินหนาแน่น นิวเคลียสติดสี DAPI เป็นหย่อมๆ มี DNA ฟุ้งกระจายใน agarose gel เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการสะสมเซลล์ในระยะ sub- G_1 phase และ caspase-3 activity ที่เพิ่มขึ้น

สรุป สารสกัดจาก *Micromonospora* เพิ่มประสิทธิภาพ DOX ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายด้วย apoptosis ผ่านทาง caspase-3 dependent pathway จึงมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเพื่อให้ร่วมกับเคมีบำบัดเป็นการรักษาแบบผสมผสาน (complementary therapies)

คำสำคัญ: *Micromonospora*, KB cells, ยับยั้งการเจริญเติบโต, อะโพโทซิส, การแตกของ DNA, แคลสเปซ-3

Abstract

Background The marine actinomycetes genus *Micromonospora* 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 therapeutic properties.

Objective To investigate the anti-cancer activities and molecular mechanisms of the extraction from *Micromonospora* in human carcinoma of nasopharynx (KB cells)

Methods *Micromonospora* strains (MAG 9-7 & MAG 9-19) 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 MAG 9-19 was non-toxic but the extract of MAG 9-7 inhibited KB cells with IC_{50} of 83.46 ± 3.9 . The combined MAG 9-7 (50 $\mu\text{g/ml}$) or MAG 9-19 (300 $\mu\text{g/ml}$) with DOX (1 $\mu\text{g/ml}$) treatment produced greater cytotoxicity associated with the increasing of chromatin condensation, DNA fragmentation and cells in sub-G1 phase compared with treating cells with each agent alone. Apoptosis enhancement of combination treatment was accompanied by increasing in the relative activity of caspase-3 which was significantly attenuated in a caspase-3 inhibitor.

Conclusions The induction of apoptosis by combined MAG extract + DOX treatment involves the activation of effector caspases-3. Thus, the combination may provide one other important advantage. MAG extract would represent a promising source for its ability to discovery of interesting anticancer compounds. The elucidation of the apoptosis-related others intracellular targets will be addressed in future studies.

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

สารบัญเรื่อง

บทนำ (INTRODUCTION)	1
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	2
วัตถุประสงค์โครงการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
วิธีดำเนินการวิจัย โดยสรุปทฤษฎี	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
เนื้อเรื่อง (MAIN BODY)	5
วิธีดำเนินการวิจัย	5
การเก็บตัวอย่าง	5
การแยกเชื้อแอสคิต โนมิยซ์ท	5
การคัดเลือกเชื้อ	5
การส่งต่อสารออกฤทธิ์ชีวภาพ	6
การเลี้ยงเซลล์ (cell culture)	6
ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT	6
วิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis	7
ศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI staining	8
วิเคราะห์วัฏจักรเซลล์ (cell cycle)	9
ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase 3	9
การแสดงผลข้อมูล	9
ผลการวิจัย (RESULTS)	9
ผลจากการแยกเชื้อ จากตะกอนทะเล	9
ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT	10
ผลการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis	13
ผลการศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI staining	15
ผลการวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์ (cell cycle)	20
ผลการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase 3	21
อภิปราย/วิจารณ์ (DISCUSSION)	24
สรุปและเสนอแนะ	27
สรุป	27
ข้อเสนอแนะ	27
ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัย	27
ผลผลิต (OUTPUT)	29
นำเสนอบทคัดย่อ	29
นำเสนอ ORIGINAL ARTICLE ใน ASIAN BIOMEDICINE JOURNAL	30
รายงานการเงิน	44
รายงานสรุปการเงิน	44
บรรณานุกรม (BIBLIOGRAPHY)	47
ประวัตินักวิจัยและคณะพร้อมหน่วยงานสังกัด	50

สารบัญตาราง

ตาราง 1 เปอร์เซ็นต์การเกิด APOPTOSIS โดย MAG 9-7 จากการย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI, $* = P < 0.05$ เมื่อเทียบกับ MAG 9-7 และ DOX.....	16
ตาราง 2 เปอร์เซ็นต์การเกิด APOPTOSIS โดย MAG 9-19 จากการย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI, $* = P < 0.05$ เมื่อเทียบกับ MAG 9-19 และ DOX.....	18

สารบัญภาพ

รูป 1 ประสิทธิภาพของสารสกัด MAG 9-7 ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M. (N=3)	11
รูป 2 ประสิทธิภาพของ DOXORUBICIN ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M. (N=3)	11
รูป 3 ประสิทธิภาพของการบ่มสาร MAG 9-7 ร่วมกับ DOX ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M. (N=3), $P < 0.05$ vs MAG 9-7	12
รูป 4 ประสิทธิภาพของการบ่มสาร MAG 9-19 ร่วมกับ DOX ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M. (N=3), $P < 0.05$ vs DOX.....	13
รูป 5 การเกิด DNA FRAGMENTATION ของ KB CELLS ที่บ่มด้วย MAG 9-7, DOX และ MAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOX ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS	14
รูป 6 การเกิด DNA FRAGMENTATION ของ KB CELLS ที่บ่มด้วย MAG 9-19 (300 μ G/ML), DOX (1 μ G/ML) และ MAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOX ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS	14
รูป 7 แสดงลักษณะเซลล์และนิวเคลียสจากกล้องจุลทรรศน์ ① & ② = 0.21% ETOH, ③ & ④ = MAG 9-7 (50 μ G/ML), ⑤ & ⑥ = DOX (1 μ G/ML), ⑦ & ⑧ = MAG 9-7 + DOX โดยการย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI, N = NORMAL, F = NUCLEAR FRAGMENTATION, C = NUCLEAR CONDENSATION, SCALE BAR = 10 μ M	17
รูป 8 แสดงลักษณะเซลล์และนิวเคลียสจากกล้องจุลทรรศน์ ① & ② = 0.3% ETOH, ③ & ④ = MAG 9-19 (300 μ G/ML), ⑤ & ⑥ = DOX (1 μ G/ML), ⑦ & ⑧ = MAG 9-19 + DOX โดยการย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI, N = NORMAL, F = NUCLEAR FRAGMENTATION, C = NUCLEAR CONDENSATION, SCALE BAR = 10 μ M	19
รูป 9 วิถีจักรของ KB เซลล์ที่บ่มด้วย 0.21% ETOH, สารสกัด MAG 9-7 (50 μ G/ML), DOX (1 μ G/ML), สารสกัด MAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOX วิเคราะห์ผลโดย FLOW CYTOMETRY	20
รูป 10 วิถีจักรของ KB เซลล์ที่บ่มด้วย 0.3% ETOH, สารสกัด MAG 9-19 (300 μ G/ML), DOX (1 μ G/ML), สารสกัด MAG 9-19 บ่มร่วมกับ DOX วิเคราะห์ผลโดย FLOW CYTOMETRY	21
รูป 11 ค่า RELATIVE ACTIVITIES ของ CASPASE-3 จากสารสกัด MAG 9-7 ค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 และค่าที่วัดได้ในกลุ่มอื่นเป็นค่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, $*P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด MAG 9-7, DOX และ MAG 9-7 + DOX + INHIBITOR.....	22
รูป 12 ค่า RELATIVE ACTIVITIES ของ CASPASE-3 จากสารสกัด MAG 9-19 ค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 และค่าที่วัดได้ในกลุ่มอื่นเป็นค่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, $*P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด MAG 9-19 และ DOX.....	23

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
MAG	Mineral Agar Gause
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

Actinomycetes เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งเป็นเส้นสายยาว และแตกแขนงเป็นกิ่งก้าน มีลักษณะคล้ายเชื้อรา สามารถสร้างเส้นใย (hyphae) และสร้างสปอร์ (spore) เพื่อใช้สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ Actinomycetes จัดอยู่ใน phylum Actinobacteria order Actinomycetales มีความสำคัญทั้งทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม เนื่องจาก Actinomycetes 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) ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของสารที่สร้างหรือสกัดมาจาก Actinomycetes เป็นจำนวนมาก เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรค

Zheng และคณะ (2000) ได้ศึกษาคุณสมบัติการต้านมะเร็งและการต้านจุลชีพของ Actinomycetes ที่เก็บตัวอย่างจากพืชและสัตว์ทะเลในประเทศไทยได้หวั่นและจีน จากการศึกษาคุณสมบัติการต้านมะเร็งด้วยเทคนิค 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide a tetrazole (MTT) assay พบว่า 20.6% จาก Actinomycetes ทั้งหมดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P388 cells และ 22.6% เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเยื่อโพรงจมูก (KB cells) และจากการศึกษาด้วยเทคนิค biochemical induction assay พบว่าจีนัส *Micromonospora* มีคุณสมบัติต้านมะเร็งดีที่สุด แอคติโนแบคทีเรียในซับออร์เดอร์ *Micromonosporineae* เป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยในน้ำทะเล และตะกอนทะเล (Jensen, et al., 1991; Takizawa, et al., 1993; Fiedler et al., 2005; Ghanem, et al., 2000; Maldonado, et al., 2005; Pathom-aree, et al., 2006; Bredholdt, et al., 2007; Vijayakumar, et al., 2007; Bredholdt, et al., 2008) และจากรายงานข้อมูลใน ABL (Lazzarini, et al., 2000) พบว่า *Micromonospora* มีศักยภาพสูงในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพและมักมีการพบสารออกฤทธิ์ใหม่ ๆ เสมอ รองจาก แอคติโนมัยซีทในจีนัส *Streptomyces* ซึ่งพบได้บ่อย แต่มักพบสารที่ซ้ำๆ จากที่เคยพบแล้ว

นอกจาก *Micromonospora* แล้วในตะกอนของทะเลก็ยังสามารถพบ *Verrucosipora* และ *Salinispora* ซึ่งจากรายงานของ Fiedler et al. (2005) พบ *Verrucosipora* จากตะกอนในทะเลลึกที่ระดับความลึก 289 เมตร สร้างสาร polycyclic polyketide ใน family abyssomicins ส่วน *Salinispora* ก็เป็นอีกจีนัสหนึ่งในซับออร์

เดอร์ *Micromonosporineae* ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพมากเช่น สาร Salinosporamide A (Fiedler et al., 2005)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคมะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์ โดยเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตได้อย่างไม่หยุดยั้ง มักตรวจพบหลังจากโรคได้ดำเนินไประยะหนึ่งแล้ว ทำให้การรักษาทำได้ยาก ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ และมักพบการเกิดซ้ำในอวัยวะส่วนอื่น สาเหตุที่ทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง เชื่อว่าเกิดจากปัจจัยหลายๆอย่างรวมกัน ในเซลล์มะเร็งมีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมที่ซับซ้อน ทำให้เซลล์แบ่งตัว และเจริญเติบโตได้อย่างไม่หยุดยั้ง มีกระบวนการเกิด apoptosis ที่ผิดปกติ ทำให้ตั้งสมมุติฐานได้ว่า ในเซลล์มะเร็งพบการเพิ่มสัญญาณของ anti-apoptotic signals ขณะเดียวกันก็ลดสัญญาณของ pro-apoptotic signals เซลล์จึงผ่านเข้าสู่วัฏจักรเซลล์ และเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าเซลล์ปกติ จนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (Kasibhatla & Tseng, 2003; Hu & Kavanagh, 2003) ถ้าเราสามารถพัฒนายาหรือสมุนไพรที่ออกฤทธิ์กระตุ้นกระบวนการเกิด apoptosis ได้ก็น่าจะประสบความสำเร็จในการควบคุมหรือรักษาโรคมะเร็งได้เช่นกัน โดยมุ่งเป้าที่เอนไซม์ caspases ในเซลล์มะเร็ง โดยเอนไซม์ caspases ที่ถูกกระตุ้นให้ทำงานจะทำลายโปรตีนที่เป็นโครงสร้าง ทำลายโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ซ่อมแซมดีเอ็นเอ และทำลายดีเอ็นเอ ทำให้เซลล์มะเร็งแบ่งตัวไม่ได้ (Kaufmann & Earnshaw, 2000; Reed, 2001; Vermeulen et. al., 2005)

ในปัจจุบันมียาออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด แต่ยาเหล่านี้มีพิษค่อนข้างสูง หลังจากใช้ยาไปแล้วระยะหนึ่งเซลล์มักจะเกิดการดื้อยาที่ใช้รักษาและดื้อต่อยาอีกหลายชนิด (multidrug resistance) (Chau et. al., 2006) ดังนั้นการหาแนวทางการรักษา โดยใช้สารสกัดจากธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น สภาพภูมิประเทศอยู่ในในแถบชายฝั่งทะเลตะวันออกเฉียงใต้ของทวีปเอเชียที่อยู่ใกล้กับเส้นศูนย์สูตรที่เป็นเขตร้อน จึงทำให้มีระบบนิเวศที่เหมาะสมในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในทะเลจำนวนมาก และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกมั่นใจว่าสิ่งมีชีวิตเล็กๆ อย่างจุลินทรีย์ทางทะเลจะเป็นแหล่งของยาสำคัญ

ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยกำลังค้นหาสารออกฤทธิ์ใหม่ ๆ จาก *Micromonospora* เพราะมีความเชื่อว่าแต่ละชนิดของแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ได้นั้น สามารถสร้างได้หลายชนิดขึ้นกับหลายปัจจัย ในปัจจุบันสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งก็สามารถใช้ได้กับมะเร็งเพียงบางชนิดเท่านั้น และจะต้องยับยั้งการเจริญเฉพาะเซลล์มะเร็งตั้งแต่ระยะแรก ๆ ขณะเดียวกันก็ต้องไม่มีผลต่อเซลล์ปกติที่อยู่โดยรอบ การค้นหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งใหม่ ๆ จะทำให้ทางเลือกในการใช้ยามีมากขึ้น อย่างไรก็ตามยัง

ขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุน งานวิจัยชิ้นนี้จึงศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่จะพบประสิทธิภาพของสารสกัดจาก *Micromonospora* ที่สามารถฆ่ามะเร็ง โดยปราศจากผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในระดับหลอดทดลอง และศึกษากลไกการตายระดับโมเลกุลแบบ apoptosis ของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียในซับออร์เดอร์ *Micromonosporineae* ที่แยกจากตะกอนทะเล

ขอบเขตของการวิจัย

เตรียมสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียในซับออร์เดอร์ *Micromonosporineae* จากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุล

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี

ยาต้านมะเร็งที่ใช้ในปัจจุบันก็มีข้อจำกัดเกี่ยวกับผลของการรักษา มีปัญหาการดื้อยา ทำให้ต้องเพิ่มขนาดยามากขึ้น ส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงไม่พึงประสงค์ นักวิจัยจึงมีความพยายามที่จะค้นหาสารจากธรรมชาติในการป้องกันและรักษามะเร็งเพิ่มขึ้น 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) ดังนั้นวิธีดำเนินการวิจัยเริ่มจากทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จากนั้นศึกษากลไกการตายระดับ DNA และเอนไซม์ caspase ร่วมกับการศึกษารูปร่างเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

พัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเล
แตกต่างกับสารที่พบบนพื้นดิน

ซึ่งมีโอกาสค้นพบสารจากธรรมชาติที่มีความ

หน่วยงานหรือสถาบันที่เกี่ยวข้องกับการทำวิจัย นำผลงานวิจัยไปพัฒนาต่อยอดเช่นศึกษาวิจัยเพื่อแยกสารบริสุทธิ์ ศึกษาโครงสร้างโมเลกุลที่แสดงคุณสมบัติด้านมะเร็ง โดยนำสารสกัดหยาบมาสกัดแยกเป็นส่วนๆ แล้วนำแต่ละส่วนไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ทดสอบสรรพคุณด้านอื่นเช่นในการต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ลดการอักเสบ คุณสมบัติเหล่านี้เป็นผลให้ชะลอการลุกลามของมะเร็ง และลดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์

การถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่การเรียนการสอนให้กับนักศึกษาแพทย์ และนักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

เนื้อเรื่อง (Main body)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างตะกอนดินบริเวณทะเล ภาคตะวันออกของอ่าวไทยของจังหวัด ชลบุรี โดยใช้ grab sampler เก็บตามแนวขนานกับชายฝั่ง บริเวณใกล้ชายฝั่งมีระยะห่างจากฝั่งประมาณ 0-100 เมตร ส่วนบริเวณห่างจากชายฝั่งมีระยะประมาณ 1 กิโลเมตรจากฝั่ง ตัวอย่างทั้งหมดถูกเก็บไว้ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อที่ 4°C ก่อนที่จะนำมาถึงห้องปฏิบัติการ และนำมาทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศและเย็นจัด *Micromonospora* ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ แยกได้จากดินตะกอนก้นทะเล จากบริเวณชายฝั่งที่ระดับความลึก 1-11 เมตร ตั้งแต่ชายฝั่ง อ. ศรีราชา จนถึงตำบลนาเกลือ อ. บางละมุง จังหวัดชลบุรี จำนวน 10 ตัวอย่าง

การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

นำตัวอย่างดินตะกอนมาทำการการเจือจางตามลำดับส่วนจนถึงระดับความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายแขวนลอยของตะกอนดินมาเกลี่ยบนอาหารที่จำเพาะต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีท คืออาหาร Mineral Agar Gause1 (Gause, et al., 1983) และ Humic Acid Vitamin Agar, HV ที่เติมน้ำทะเล 50% และสารแอนติไบโอติก nystatin (50 mg/l) และ novobiocin (20 mg/l) บ่มจานอาหารที่ 30 °C และสังเกตการเจริญจนถึง 4 สัปดาห์ เลือกโคโลนีที่มีลักษณะของแอกติโนมัยซีทมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหารที่เหมาะสม เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วจะเก็บไว้ในสารละลาย Glycerol 20% ที่ -80 °C สำหรับการศึกษาคต่อไป

การคัดเลือกเชื้อ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยเลือกเชื้อที่อยู่ใน Suborder *Micromonosporineae* โดยการสังเกตลักษณะ โคลินี สปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์น้ำตาลใน whole-cell hydrolysate นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง ต่อจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวก แกรมลบ และ *Candida albicans* ด้วยวิธี Cross streak technique แล้วเลือกเชื้อที่ให้สารออกฤทธิ์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด และยับยั้งได้ดีกว่าชนิดอื่น ๆ มาทดสอบกับเซลล์มะเร็ง โดยเลี้ยงเชื้อในปริมาณมากขึ้น เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์

การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

1. นำเชื้อที่คัดเลือกลี้นในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เช่น ISP 2 ที่มีน้ำทะเล 50% ใน flask รูปชมพู่ ขนาด 250 ml เขย่า (ซ้าย-ขวา) ที่ 110 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน แล้วถ่ายเชื้อลงใน flask ขนาด 1000 ml เลี้ยงต่อไปอีก 2 สัปดาห์

2. Centrifuge แยกเซลล์และ อาหารเลี้ยงเชื้อออกจากกัน และสกัดสารออกจากทั้งเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate

3. ถ่ายเซลล์ หรือ อาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 2 ลงใน separating funnel ขนาด 1000 ml เติม ethyl acetate/solvent ที่เหมาะสมอื่น ๆ ในอัตราส่วน 1:1 ระเหย ethyl acetate/solvent ให้แห้งด้วยเครื่อง Vacuum Evaporator ที่ 32 °C

4. ละลายสาร ใน flask ออกมาด้วย acetone หรือ methanol แล้วใช้ pasteur pipette ที่ sterile ดูดออกมา ชั่งใน vial ที่รู้น้ำหนักแล้ว เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อให้ได้สารแห้ง แล้วนำ vial ไปชั่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อทราบน้ำหนักสาร (สารปริมาณมาก นำไป freeze dry เพื่อให้ได้น้ำหนักแห้ง) นำไปตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

การเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องจมูก (Human nasopharyngeal epidermoid carcinoma, KB) การเลี้ยงเซลล์ ทำการเตรียมเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1×10^5 cells/ml ด้วย RPMI 1640 ใน culture flask ภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ โดยใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน จนมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 1×10^6 cells/ml ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่เกาะพื้นผิวผ่านทางกล้อง stereoscope ถ้าพบว่ามีเซลล์ที่เกาะพื้นผิวมากกว่า 80 % ของพื้นที่ทั้งหมด แสดงว่าสามารถทำการ subculture ได้

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT

เตรียมเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 2×10^4 cells/ml ลงใน 96 well plate บ่มเซลล์ภายใต้ อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ นาน 24 ชม. เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์มีชีวิตสามารถลงเกาะที่พื้นผิวภาชนะได้ จากนั้นเริ่มบ่มเซลล์กับสารสกัด โดยหลุมที่เป็น vehicle control บ่มด้วย 0.21% absolute ethanol (EtOH) หลุมที่ทดสอบความเป็นพิษบ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 0-300 µg/ml นาน 48 ชม. ส่วน positive control นั้นทำการทดสอบด้วย doxorubicin ที่ความเข้มข้น 0-10 µg/ml นาน 48 ชม. แล้ววิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT

การวิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT โดยมีหลักการคือภายในเซลล์ที่มีชีวิตจะมีกระบวนการเมทาบอลิซึมในไมโทคอนเดรีย โมเลกุล MTT มีเป้าหมายอยู่ที่ไมโทคอนเดรีย และเนื่องจากโครงสร้างของโมเลกุล MTT เป็น tetrazolium rings ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อรับอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ succinate dehydrogenase ได้เป็นผลิตภัณฑ์ formazan สีม่วงและไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

นำสารละลาย MTT (5g/L) ปริมาตร 30 μ l ลงใน well ที่ต้องการทดสอบ จากนั้นบ่มภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ นาน 4 ชม. แล้วละลายผลิตภัณฑ์ formazan ด้วย DMSO (99.99%) ปริมาตร 100 μ l แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) โดยใช้สูตรดังนี้

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

จากนั้นสร้างกราฟระหว่าง % cell viability (แกน y) กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (แกน x) จากกราฟนี้สามารถคำนวณหา ขนาดความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 50% (inhibit concentration at 50%, IC₅₀)

วิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis

เตรียมเซลล์ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1×10^5 cells/ml ปริมาตร 5 ml ลงใน flask ขนาด 25 cm² เลี้ยงเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อด้วย 0.21% EtOH, DOX [IC₅₀] และสารสกัด [IC₅₀] ตามลำดับ นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ทั้งหมด (เซลล์เกาะพื้นและเซลล์แขวนลอย) นำมาสกัด DNA ด้วย GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (VIVANTIS) โดยเติม proteinase K ปริมาตร 20 μ l เพื่อทำลายโปรตีน จากนั้นเติม lysis enhancer ปริมาตร 2 μ l แล้วทำการ vortex เพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และบ่มต่อด้วย TB buffer ปริมาตร 200 μ l ที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีนออกให้เหลือแต่ DNA และ RNA จากนั้นทำลาย RNA ด้วย 20 mg/ml RNaseA ปริมาตร 20 μ l โดยบ่มที่ 37 °C นาน 10 นาที จากนั้นทำการตกตะกอน DNA ด้วย ice-cold absolute ethanol แล้ว load ลง column บันที่ 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

$$\text{ความเข้มข้นของ DNA} = \text{dilution factor} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{Abs}_{260}$$

(เมื่อค่าการดูดกลืนแสง 1 มีค่าเท่ากับ 50 ng/ μ l)

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

Agarose gel electrophoresis

นำ 100 ng/ μ l DNA ปริมาตร 8 μ l (800 ng) ผสมกับ 6x loading dry ที่มีส่วนผสมกับ SYBR Gold (100:1 μ l) ปริมาตร 2 μ l เพื่อให้ดูการเคลื่อนที่ของ DNA และป้องกันไม่ให้ DNA ฟุ้งกระจาย จากนั้น load ลง 1.5% agarose gel โดยใช้กระแสไฟ 100 V นาน 45 นาที ซึ่งใช้ 0.1 μ g/ μ l 1kb DNA ladder ปริมาตร 8 μ l 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% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อด้วย 0.21% EtOH, DOX [IC₅₀] และสารสกัด [IC₅₀] 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 μ l โดยบ่มที่ 37 °C นาน 20 นาที และล้าง RNaseA ด้วย PBS จากนั้นนำไปย้อมด้วย PI [5 μ g/ml] และ DAPI [5 μ g/ml] ปริมาตรอย่างละ 700 μ l 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 nm 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 ย้อมสีดีเอ็นเอด้วย Propidium iodide (PI)/Triton X-100 37°C เป็นเวลา 15 นาที วิเคราะห์ผลด้วย flow cytometry (BD FACS Calibur) ซึ่งปริมาณการติดสี PI ในแต่ละเซลล์เป็นสัดส่วนโดยตรงต่อปริมาณดีเอ็นเอ การเกิด apoptosis จะพิจารณาจากระดับการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนของเซลล์ในระยะ sub-G1 (hypodiploid) จำนวนเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ในระยะ sub-G1 โดย CELL Quest software

ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase 3

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

การแสดงผลข้อมูล

ในแต่ละการทดลอง ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง (n=3) การทดลองความเป็นพิษต่อ HeLa cells เขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม microcal origin 6.0 แสดงผลเป็นค่า mean \pm standard error of mean (S.E.M.) การวิเคราะห์การแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) แสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ \pm 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

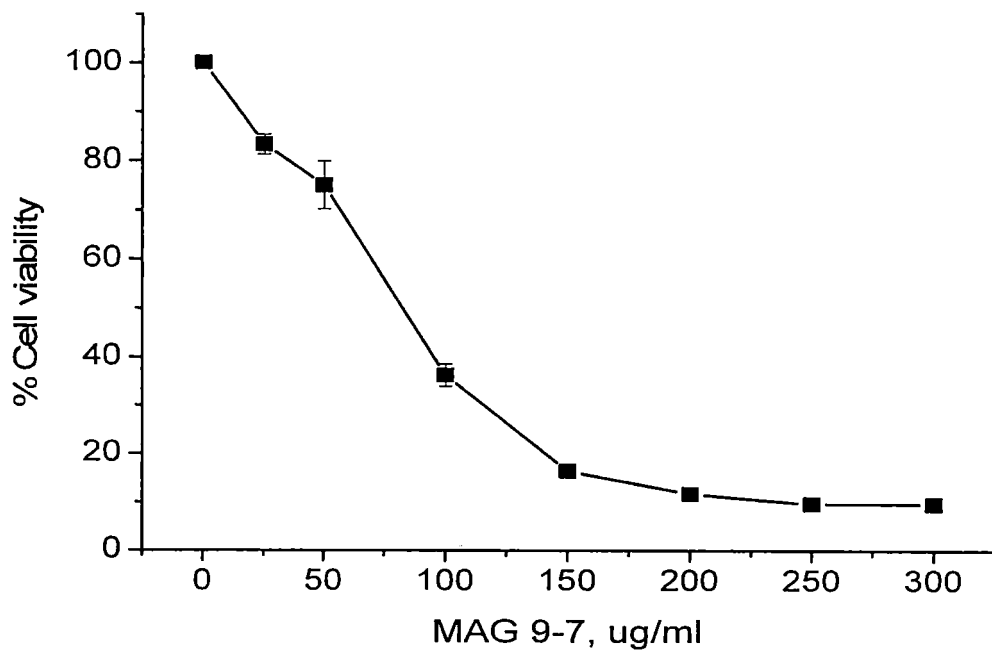
จากตะกอนทะเล 10 ตัวอย่าง พบเชื้อใน Suborder *Micromonosporineae* 15 ไอโซเลต โดยได้เชื้อที่เจริญบนอาหาร Mineral Agar Gause I (MAG) 14 ไอโซเลต และที่เจริญบนอาหาร HV จำนวน 1 ไอโซเลต และได้เลือกไอโซเลตที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งที่ดีมาทดสอบ คือ MAG 8, MAG 9-7, MAG 9-9 และ MAG 9-19

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT

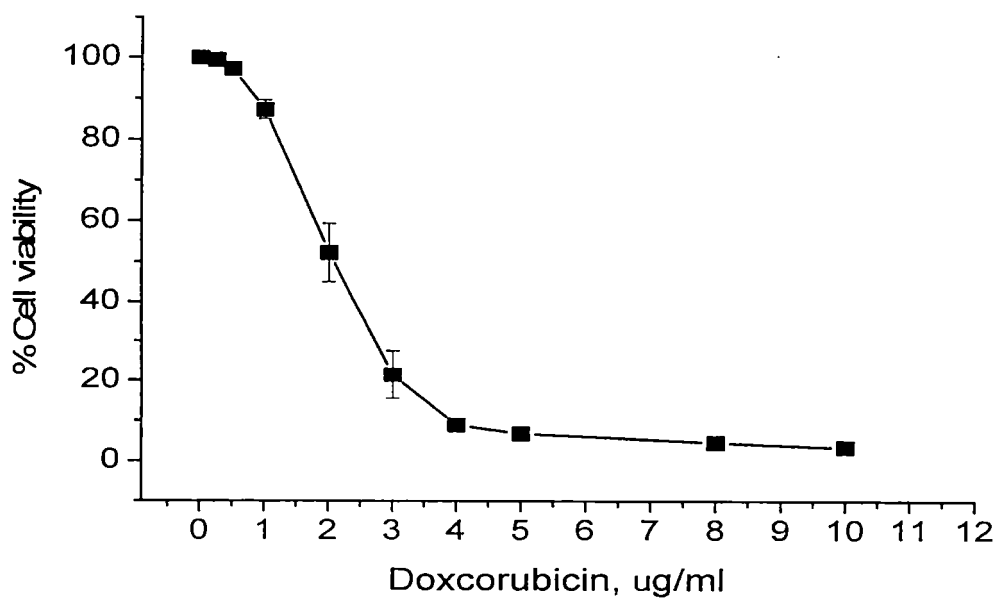
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องจมูก (KB cells) โดยเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบ่มเซลล์กับสารสกัดความเข้มข้น 0-300 $\mu\text{g/ml}$ และ doxorubicin (DOX) ความเข้มข้น 0-10 $\mu\text{g/ml}$ (positive control) และ 0.21% EtOH (negative control) ใน 96 well plate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมินรูปร่างของเซลล์ ลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์ ลักษณะไซโตพลาซึม ลักษณะการเกาะที่พื้นผิว เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ลอย ภายใต้อกล้อง stereoscope และนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้อกล้อง stereoscope พบว่าในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.21% EtOH เซลล์มีลักษณะปกติ เขี่ยตัวเป็นรูปกระสวย เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาซึมเรียบ และมีจำนวนเซลล์เกาะพื้นมากกว่า 90% เมื่อได้รับการเขย่าแรงๆ เซลล์ยังคงไม่หลุดจากพื้นผิว แตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัด คือเซลล์มีรูปร่างกลม เยื่อหุ้มเซลล์เป็นถุงน้ำ (bleb) และไซโตพลาซึมขรุขระ ลักษณะการเกาะพื้นผิวไม่แน่น เมื่อเขย่าเบาๆ เซลล์หลุดจากพื้นผิวได้ง่าย ส่วนกลุ่มที่บ่มด้วย DOX พบว่าเซลล์มีลักษณะกลม เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาซึมขรุขระ การเกาะพื้นผิวไม่แน่น พบเซลล์ลอยจำนวนมาก และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT พบว่าเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัด และ DOX มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มที่บ่มด้วย 0.21% EtOH อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการนับเซลล์มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT มีความสัมพันธ์กับการศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยกล้อง stereoscope

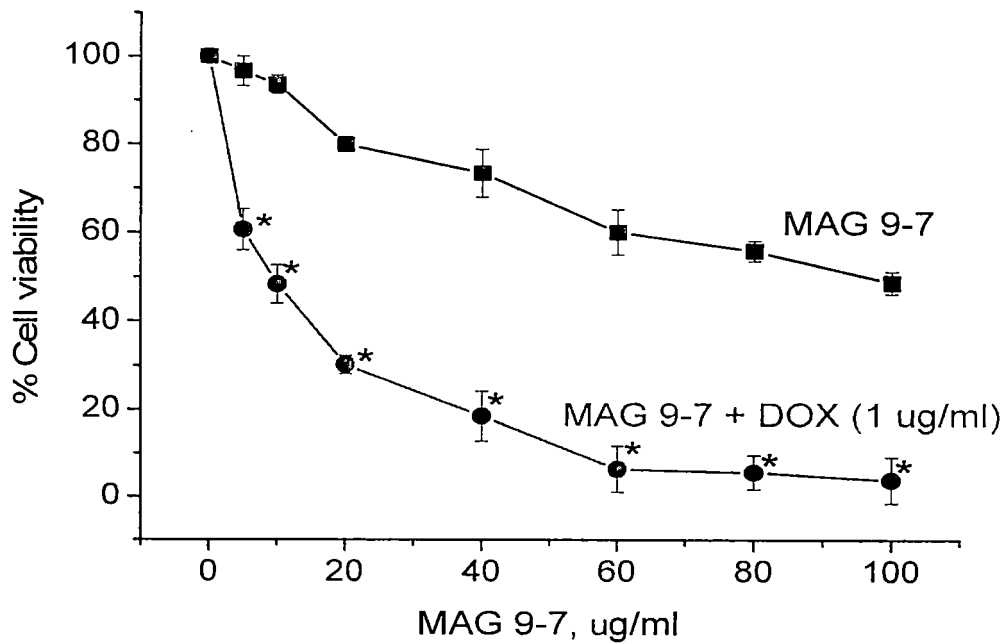
ประสิทธิภาพของสารสกัด MAG 9-7 ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องจมูก พบว่าสารสกัด MAG 9-7 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/ml}$ เริ่มยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ และความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง 30, 50 และ 80% (inhibitory concentration; IC_{20} , IC_{50} และ IC_{80}) มีค่าเท่ากับ 33.26 ± 2.35 , 83.46 ± 3.9 และ 141.43 ± 8.4 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เกือบ 100% ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ (รูป 1) ในขณะที่ doxorubicin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.0 $\mu\text{g/ml}$ (รูป 2) เมื่อนำสารสกัด MAG 9-7 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (0 - 100 $\mu\text{g/ml}$) นำมาบ่มร่วมกับ DOX ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (1 $\mu\text{g/ml}$) เช่นกัน พบการออกฤทธิ์เสริมกัน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้มากขึ้นประมาณ 10 เท่า โดยมีค่า IC_{50} ลดลงเหลือเพียง 8.8 ± 1.2 $\mu\text{g/ml}$ (รูป 3)



รูป 1 ประสิทธิภาพของสารสกัด MAG 9-7 ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M. (N=3)

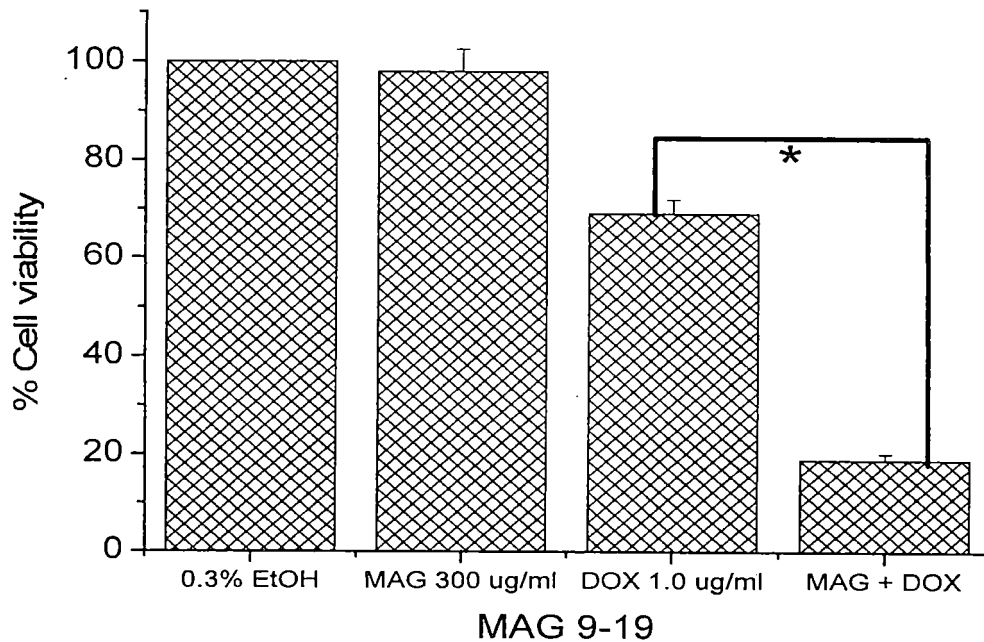


รูป 2 ประสิทธิภาพของ DOXORUBICIN ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M. (N=3)



รูป 3 ประสิทธิภาพของการบ่มสาร MAG 9-7 ร่วมกับ DOX ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M. (N=3), $P < 0.05$ VS MAG 9-7

สารสกัด MAG 9-19 ที่ความเข้มข้นมากกว่า 800 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงนำสารสกัด MAG 9-19 (300 $\mu\text{g/ml}$) บ่มร่วมกับ DOX (1 $\mu\text{g/ml}$) พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดย DOX (1 $\mu\text{g/ml}$) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ $30.94 \pm 3.39\%$ แต่เมื่อนำ MAG 9-19 (300 $\mu\text{g/ml}$) บ่มร่วมกับ DOX (1 $\mu\text{g/ml}$) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งถึง $81.12 \pm 9.9\%$ (รูป 4)

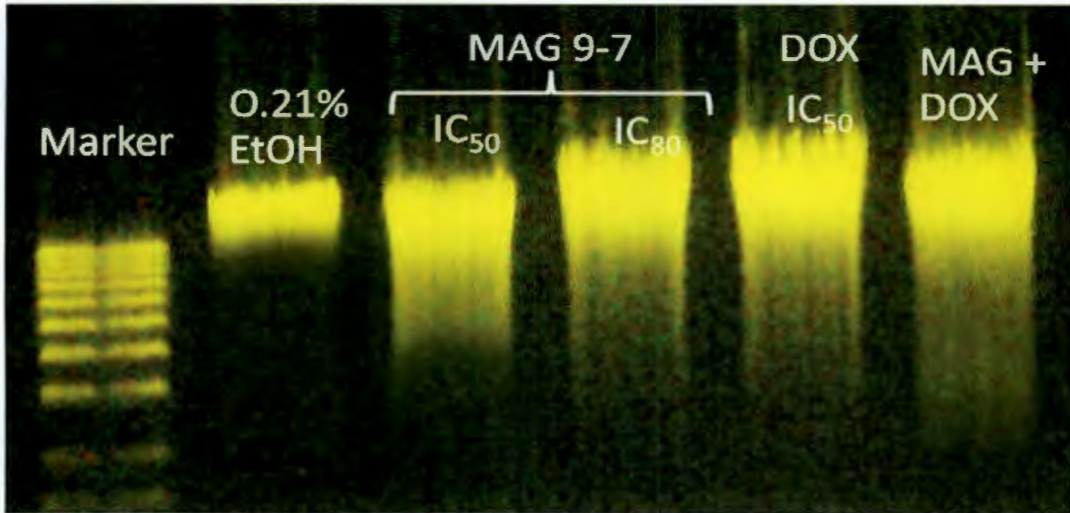


รูป 4 ประสิทธิภาพของการบ่มสาร MAG 9-19 ร่วมกับ DOX ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M. (N=3), $P < 0.05$ VS DOX

ผลการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis

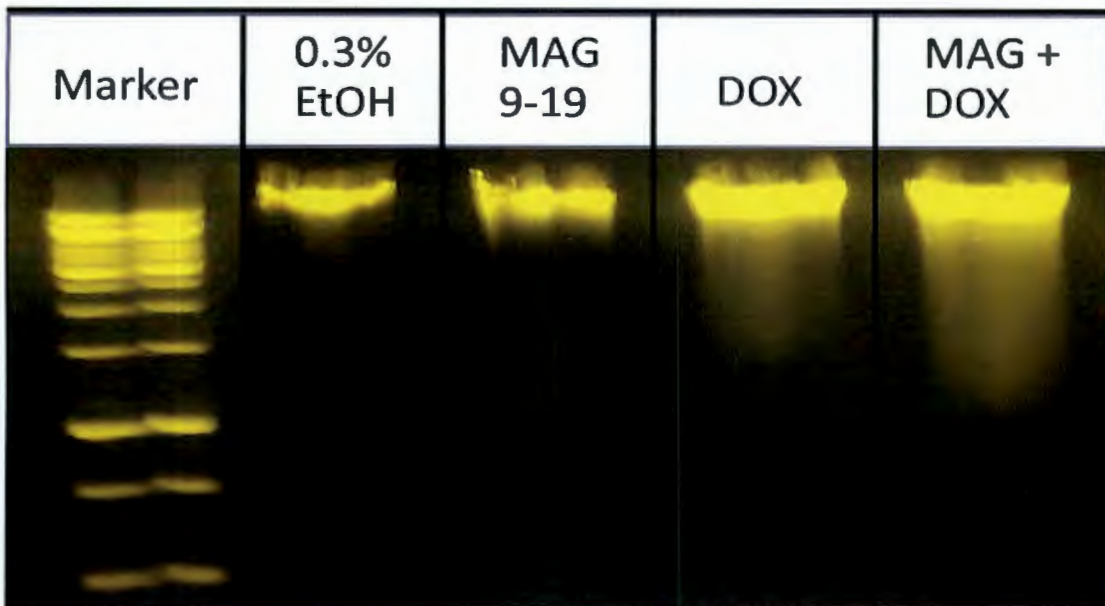
ทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อการแตกของ DNA โดยเลี้ยง KB cells ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด MAG 9-7 ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} และ IC_{80} , DOX (positive control) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} , สารสกัด MAG 9-7 (50 μ g/ml) บ่มร่วมกับ DOX (1 μ g/ml) และ 0.21% EtOH (negative control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน flask ปริมาตร 25 cm^3 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

เมื่อวิเคราะห์การแตกของ DNA แล้วพบว่า กลุ่มที่บ่มด้วย 0.21 % EtOH เกิดแถบ (band) หนาเพียง 1 แถบ แสดงว่ามี DNA ขนาดใหญ่จึงเคลื่อนที่ได้ไม่ไกล แตกต่างจากในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัดโดยพบแถบหนา 1 แถบและมีลักษณะเป็น smear band ยาวลงมา แสดงว่ากลุ่มที่บ่มเซลล์ด้วยสารสกัด เกิดการแตกของ DNA ทำให้มีขนาดของ DNA แตกต่างกันไป (DNA fragmentation) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับกลุ่มที่บ่มเซลล์ด้วย DOX และกลุ่มที่มีสารสกัด MAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOX (รูป 5)



รูป 1 การเกิด DNA FRAGMENTATION ของ KB CELLS ที่บ่มด้วยMAG 9-7, DOXและMAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOXด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS

สารสกัด MAG 9-19 (300 $\mu\text{g/ml}$) และ 0.3% EtOHไม่มีผลต่อการแตกของดีเอ็นเอ จึงไม่พบการฟุ้งกระจายของดีเอ็นเอใน agarose gel แต่ในหลุมที่บ่มสารสกัด MAG 9-19 (300 $\mu\text{g/ml}$) ร่วมกับ DOX (1 $\mu\text{g/ml}$) พบการฟุ้งกระจายของดีเอ็นเอใน agarose gel มากกว่าหลุมที่บ่มด้วย DOX เพียงอย่างเดียว (รูป 6)



รูป 2 การเกิด DNA FRAGMENTATION ของ KB CELLS ที่บ่มด้วยMAG 9-19 (300 UG/ML), DOX(1 UG/ML) และMAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOXด้วยวิธี 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 MAG 9-7 (50 $\mu\text{g/ml}$), Dox (1 $\mu\text{g/ml}$), สารสกัด MAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOX และ 0.21% EtOH (negative control) 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) จึงพบการติดสีแบบกระจายเป็นหย่อมๆ

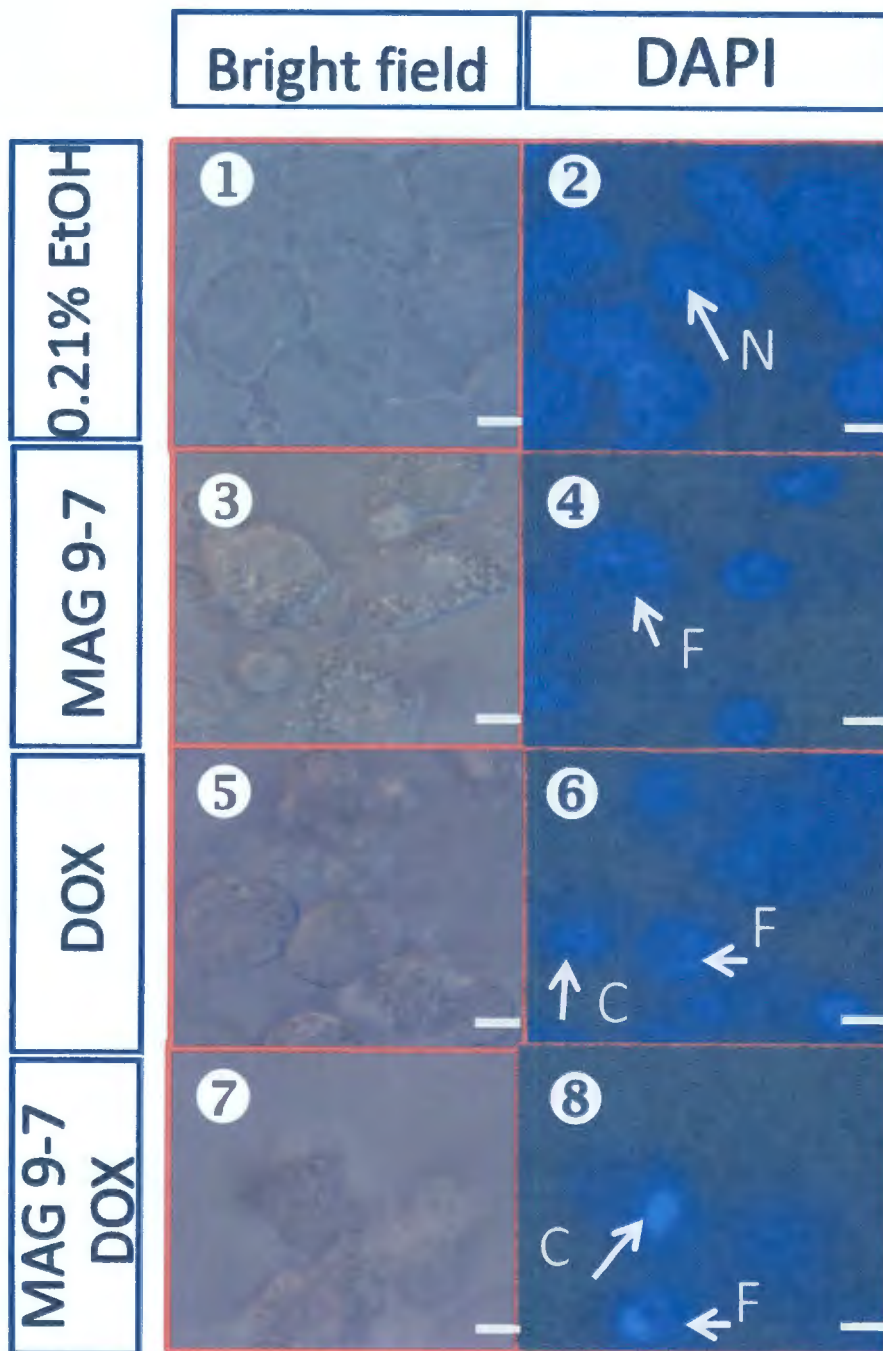
เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์จาก bright field ในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.21% EtOH พบว่าเซลล์มีลักษณะเหยียดเยื่อหุ้มเซลล์เรียบมีขอบเขตชัดเจน (รูป 7 ①) ลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI (รูป 7 ②) พบว่าเซลล์ทั้งหมด (100%) ติดสีฟ้าของ DAPI แบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ปกติ

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์แบบ bright field ในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด MAG 9-7 (50 $\mu\text{g/ml}$), DOX (1 $\mu\text{g/ml}$), และสารสกัด MAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOX พบเซลล์ส่วนมากมีลักษณะเซลล์กลม ไม่เหยียดเยื่อหุ้มเซลล์เป็นตุ่มพอง (bleb) ซัยโทพลาสซึมขรุขระ และมีจำนวนของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูป 7 ③, ⑤ & ⑦) (ตาราง 1)

เมื่อศึกษาลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI พบว่ากลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด MAG 9-7 (50 $\mu\text{g/ml}$) (รูป 7 ④) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ $75.73 \pm 2.99\%$ ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) หรือติดสีฟ้าแน่น (nuclear condensation) เป็นจำนวนถึง $24.27 \pm 0.35\%$, สำหรับ DOX (1 $\mu\text{g/ml}$) (รูป 7 ⑥) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ $70.32 \pm 6.46\%$ ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) หรือติดสีฟ้าแน่น (nuclear condensation) เป็นจำนวนถึง $29.68 \pm 3.49\%$ และเมื่อนำสารสกัด MAG 9-7 (50 $\mu\text{g/ml}$) บ่มร่วมกับ DOX (1 $\mu\text{g/ml}$) (รูป 7 ③) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสมอลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย MAG 9-7 เพียงอย่างเดียว โดยพบเซลล์ปกติเพียง $25.36 \pm 3.27\%$ ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) หรือติดสีฟ้าแน่น (nuclear condensation) เป็นจำนวนมากขึ้นถึง $74.64 \pm 6.19\%$ (ตาราง 1)

ตาราง 1 เปอร์เซ็นต์การเกิด APOPTOSIS โดย MAG 9-7 จากการย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI, * = $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับ MAG 9-7 และ DOX

	%Normal cells (homogenous DAPI)	%Apoptotic cells (condensed or fragment DAPI)
0.21% EtOH (negative control)	100	100
MAG 9-7 [50 µg/ml]	75.73 ± 2.99	24.27 ± 0.35
DOX [1 µg /ml] (positive control)	70.32 ± 6.46	29.68 ± 3.49
MAG 9-7 [50 µg/ml] + DOX [1 µg /ml]	25.36 ± 3.27*	74.64 ± 6.19*



รูป 1 แสดงลักษณะเซลล์และนิวเคลียสจากกล้องจุลทรรศน์ ①&② = 0.21% ETOH, ③&④ = MAG 9-7 (50 μ G/ML), ⑤&⑥ = DOX (1 μ G/ML), ⑦&⑧ = MAG 9-7 + DOX โดยการย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI, N = NORMAL, F = NUCLEAR FRAGMENTATION, C = NUCLEAR CONDENSATION, SCALE BAR = 10 μ M

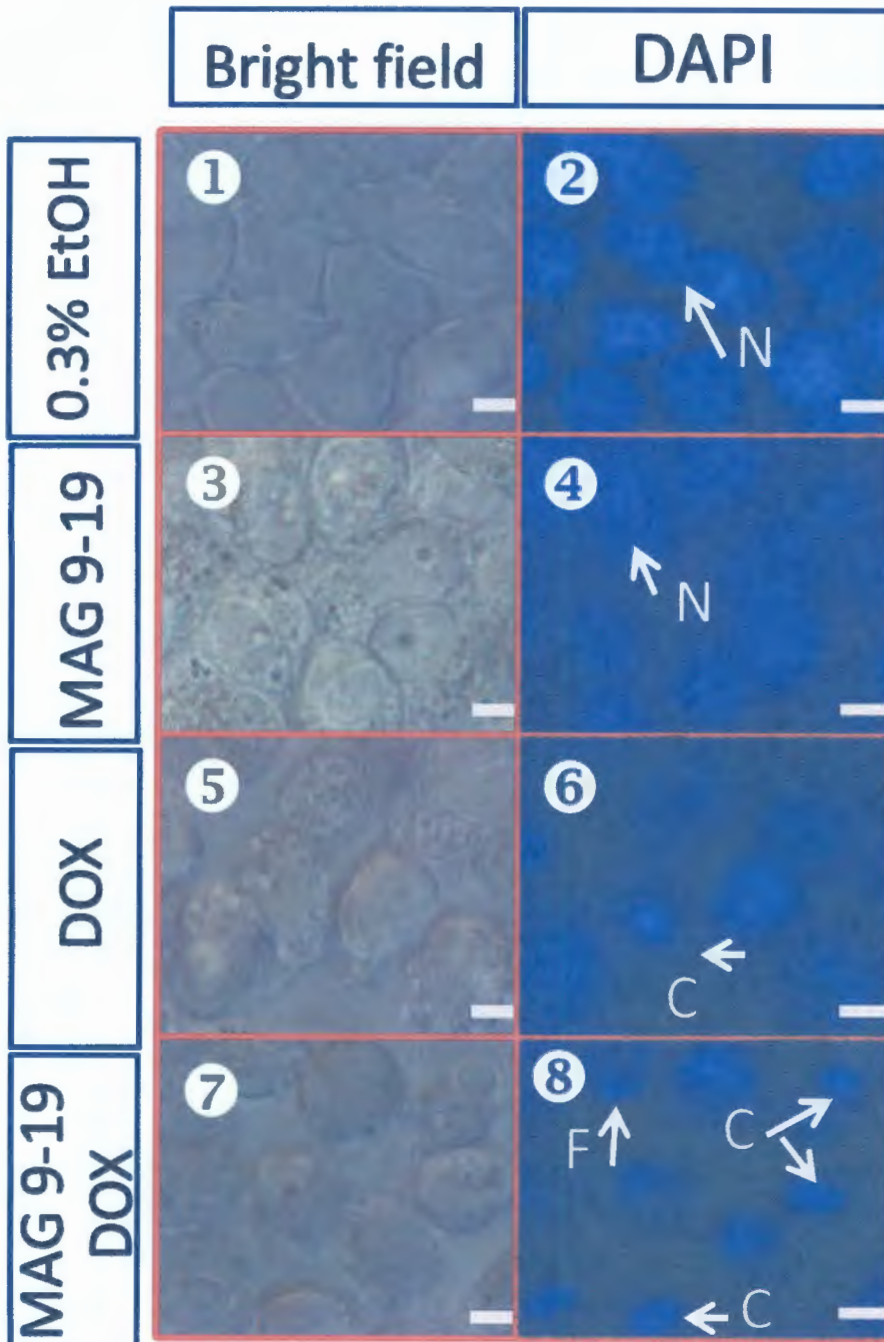
เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์จาก bright field ในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.3% EtOH พบว่าเซลล์มีลักษณะเหยียดเยื่อหุ้มเซลล์เรียบมีขอบเขตชัดเจน (รูป 8 ①) ลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI (รูป 8 ②) พบว่าเซลล์ทั้งหมด (100%) ติดสีฟ้าของ DAPI แบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ปกติ

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์แบบ bright field ในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด MAG 9-19 (300 µg/ml) พบเซลล์ส่วนมากมีลักษณะเป็นปกติคือมีเยื่อหุ้มเซลล์เรียบมีขอบเขตชัดเจน (รูป 8 ③), ส่วนกลุ่มที่ได้รับ DOX (1 µg/ml), และสารสกัด MAG 9-19 บ่มร่วมกับ DOX พบเซลล์ส่วนมากมีลักษณะเซลล์กลม ไม่เหยียดเยื่อหุ้มเซลล์เป็นตุ่มพอง (bleb) ซัยโทพลาสซึมขรุขระ และมีจำนวนของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูป 8 ⑤ & ⑦) (ตาราง 2)

เมื่อศึกษาลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI พบว่ากลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด MAG 9-19 (300 µg/ml) (รูป 8 ④) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอมากถึง $94.38 \pm 3.49\%$ ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้าเป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) หรือติดสีฟ้าแน่น (nuclear condensation) เป็นจำนวนน้อยมากเพียง $5.62 \pm 0.38\%$, สำหรับ DOX (1 µg/ml) (รูป 8 ⑥) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ $78.27 \pm 3.49\%$ ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้าเป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) หรือติดสีฟ้าแน่น (nuclear condensation) เป็นจำนวนถึง $21.73 \pm 2.37\%$ และเมื่อนำสารสกัด MAG 9-19 (300 µg/ml) บ่มร่วมกับ DOX (1 µg/ml) (รูป 8 ⑧) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนเสมอลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย MAG 9-19 เพียงอย่างเดียว โดยพบเซลล์ปกติเพียง $35.37 \pm 5.33\%$ ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้าเป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) หรือติดสีฟ้าแน่น (nuclear condensation) เป็นจำนวนมากขึ้นถึง $64.63 \pm 5.38\%$ (ตาราง 2)

ตาราง 2 เปอร์เซนต์การเกิด APOPTOSIS โดย MAG 9-19 จากการย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI, , * = $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับ MAG 9-19 และ DOX

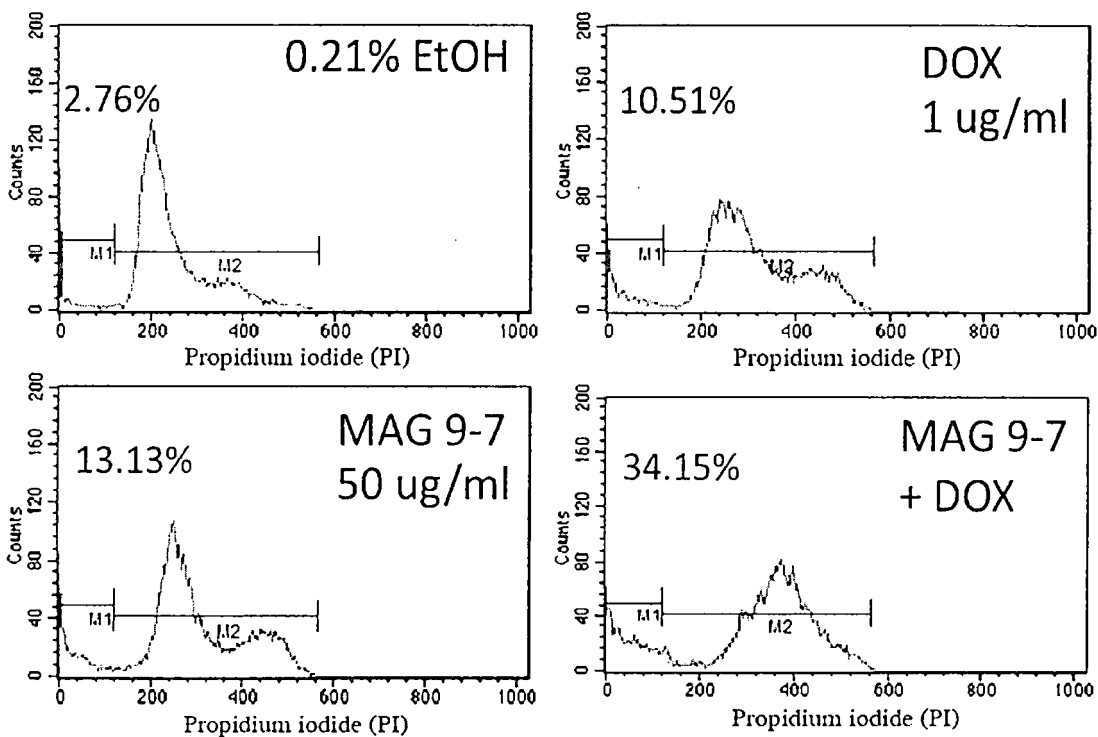
	%Normal cells (homogenous DAPI)	%Apoptotic cells (condensed or fragment DAPI)
0.3% EtOH (negative control)	100	100
MAG 9-19 [300 µg/ml]	$94.38 \pm 3.49\%$	5.62 ± 0.38
DOX [1 µg /ml] (positive control)	78.27 ± 3.49	21.73 ± 2.3
MAG 9-19 [300 µg/ml] + DOX [1 µg /ml]	$35.37 \pm 5.33^*$	$64.63 \pm 5.38^*$



รูป 1 แสดงลักษณะเซลล์และนิวเคลียสจากกล้องจุลทรรศน์ ①&② = 0.3% ETOH, ③&④ = MAG 9-19 (300 μ G/ML), ⑤&⑥ = DOX (1 μ G/ML), ⑦&⑧ = MAG 9-19 + DOX โดยการย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI, N = NORMAL, F = NUCLEAR FRAGMENTATION, C = NUCLEAR CONDENSATION, SCALE BAR = 10 μ M

ผลการวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์ (cell cycle)

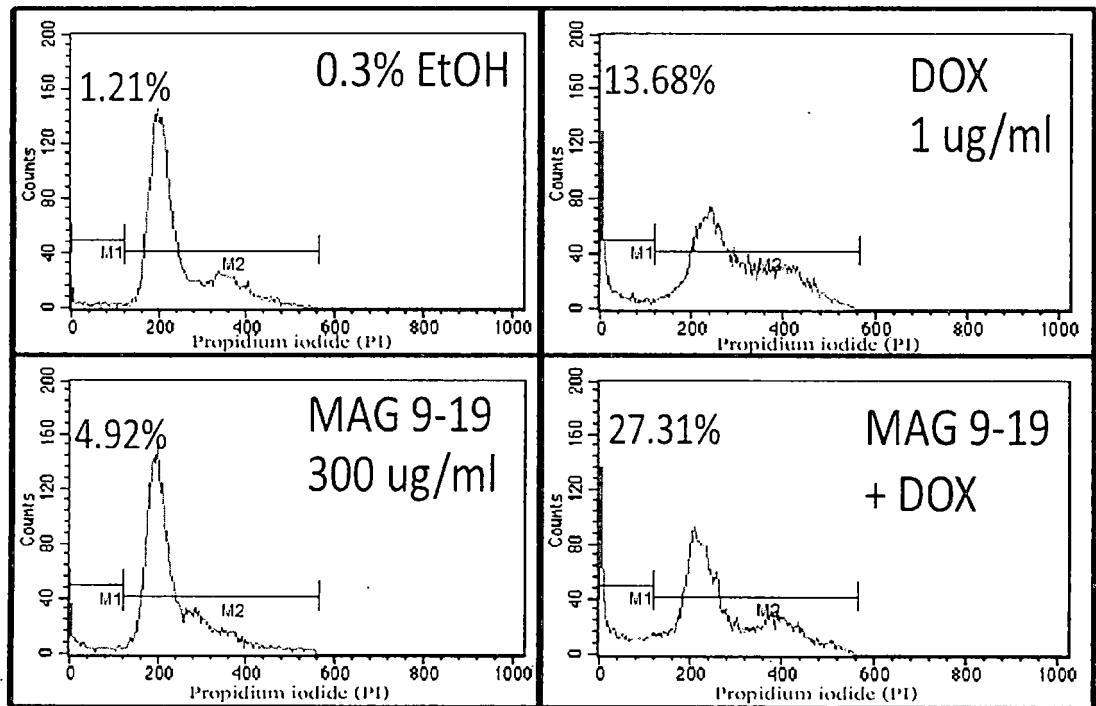
การทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยการวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์ (cell cycle) นำ KB cells มาบ่มด้วยสารสกัด MAG 9-7 (50 $\mu\text{g/ml}$), Dox (1 $\mu\text{g/ml}$), สารสกัด MAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOX และ 0.21% EtOH (negative control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้อมสีดีเอ็นเอด้วย Propidium iodide (PI)/Triton X-100 ผลการทดลองพบเซลล์ในระยะ sub-G1 (hypodiploid) เพียง 2.76% ในกลุ่มควบคุม เมื่อบ่มด้วย MAG 9-7 (50 $\mu\text{g/ml}$) และ Dox (1 $\mu\text{g/ml}$) พบเซลล์ในระยะ sub-G1 เพิ่มขึ้นเท่ากับ 13.13% และ 10.51% ตามลำดับ ในทางตรงข้ามกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด MAG 9-7 ร่วมกับ DOX พบเซลล์ในระยะ sub-G1 เพิ่มขึ้นถึง 34.15% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ MAG 9-7 เพียงอย่างเดียว (รูป 9) ผลการทดลองพบว่ามีการเพิ่มเซลล์ในระยะ sub-G1 แสดงให้เห็นว่าเซลล์หยุดแบ่งตัวในระยะ G1 ส่งผลให้มีการสะสมเซลล์ระยะ sub-G1 (apoptotic cells) เพิ่มมากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับจำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มขึ้น



รูป 9 วัฏจักรของ KB เซลล์ที่บ่มด้วย 0.21% ETOH, สารสกัด MAG 9-7 (50 $\mu\text{G/ML}$), DOX (1 $\mu\text{G/ML}$), สารสกัด MAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOX วิเคราะห์ผลโดย FLOW CYTOMETRY

เมื่อนำ KB cells มาบ่มด้วยสารสกัด MAG 9-19 (300 $\mu\text{g/ml}$), Dox (1 $\mu\text{g/ml}$), สารสกัด MAG 9-19 บ่มร่วมกับ DOX และ 0.3% EtOH (negative control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้อมสีดีเอ็นเอด้วย Propidium iodide (PI)/Triton X-100 ผลการทดลองพบเซลล์ในระยะ sub-G1 (hypodiploid) เพียง 1.21% ในกลุ่มควบคุม เมื่อบ่ม

ด้วย MAG 9-19 (300 $\mu\text{g/ml}$) และ Dox (1 $\mu\text{g/ml}$) พบเซลล์ในระยะ sub-G1 เพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.92% และ 13.68% ตามลำดับ ในทางตรงข้ามกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด MAG 9-19 ร่วมกับ DOX พบเซลล์ในระยะ sub-G1 เพิ่มขึ้นถึง 27.31% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ MAG 9-19 เพียงอย่างเดียว (รูป 10) ผลการทดลองพบว่าการเพิ่มเซลล์ในระยะ sub-G1 แสดงให้เห็นว่าเซลล์หยุดแบ่งตัวในระยะ G1 ส่งผลให้มีการสะสมเซลล์ระยะ sub-G1 (apoptotic cells) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มขึ้น

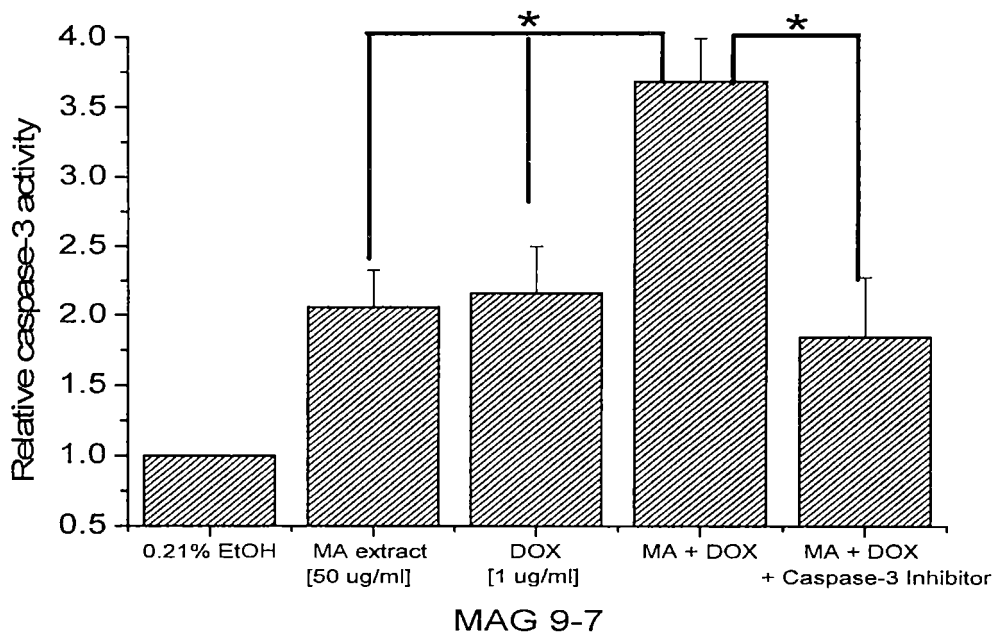


รูป 10 วิจัยกรของ KB เซลล์ที่บ่มด้วย 0.3% ETOH, สารสกัด MAG 9-19 (300 $\mu\text{G/ML}$), DOX (1 $\mu\text{G/ML}$), สารสกัด MAG 9-19 บ่มร่วมกับ DOX วิเคราะห์ผลโดย FLOW CYTOMETRY

ผลการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase 3

การวัดการทำงานของเอนไซม์ caspase 3 ในเซลล์ โดยนำ KB cells มาบ่มด้วยสารสกัด MAG 9-7 (50 $\mu\text{g/ml}$), Dox (1 $\mu\text{g/ml}$), สารสกัด MAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOX และ 0.21% EtOH (negative control) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดย lysis buffer นำส่วน supernatant มาทำปฏิกิริยากับ substrate: Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA) ผลการทดลองพบว่าค่า relative activities ของ caspase-3 ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด MAG 9-7 (50 $\mu\text{g/ml}$) และ Dox (1 $\mu\text{g/ml}$) เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 2.05 ± 0.07 , 2.15 ± 0.04 เท่าตามลำดับ ในขณะที่ค่า relative activities ของ caspase-3 ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด MAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOX มี

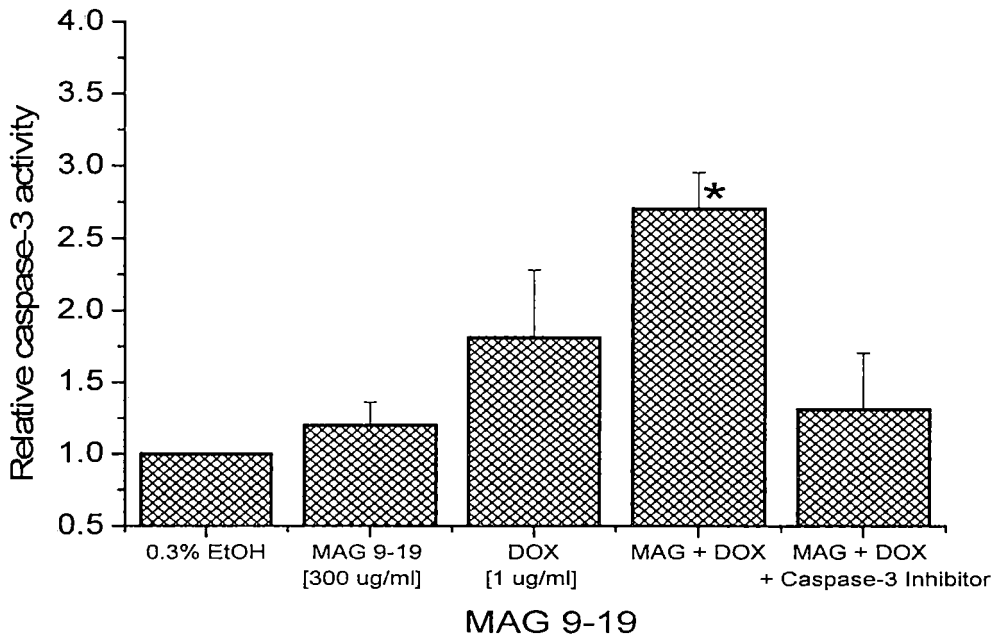
ค่าเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 3.67 ± 0.31 เท่า ซึ่งเป็นการเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ MAG 9-7 หรือ DOX เพียงอย่างเดียว (รูป 11) นอกจากนี้ค่า relative activities ของ caspase-3 นั้นถูกยับยั้งโดย DEVD-fmk (caspase-3 inhibitor) แสดงว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ MAG 9-7 ที่บ่มร่วมกับ DOX นั้นผ่านทาง caspase-3



รูป 11 ค่า RELATIVE ACTIVITIES ของ CASPASE-3 จากสารสกัด MAG 9-7 ค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 และค่าที่วัดได้ในกลุ่มอื่นเป็นค่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด MAG 9-7, DOX และ MAG 9-7 + DOX + INHIBITOR

การวัดการทำงานของเอนไซม์ caspase 3 ในเซลล์ โดยนำ KB cells มาบ่มด้วยสารสกัด MAG 9-19 (300 ug/ml), Dox (1 ug/ml), สารสกัด MAG 9-19 บ่มร่วมกับ DOX และ 0.3% EtOH (negative control) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดย lysis buffer นำส่วน supernatant มาทำปฏิกิริยากับ substrate: Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA) ผลการทดลองพบว่าค่า relative activities ของ caspase-3 ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด MAG 9-19 (300 ug/ml) และ Dox (1 ug/ml) เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุม 1.2 ± 0.16 , 1.81 ± 0.47 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ค่า relative activities ของ caspase-3 ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด MAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOX มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 2.7 ± 0.25 เท่า ซึ่งเป็นการเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ MAG 9-7 หรือ DOX เพียงอย่างเดียว (รูป 12) นอกจากนี้ค่า relative activities ของ caspase-3

นั้นถูกยับยั้งโดย DEVD-fmk (caspase-3 inhibitor) แสดงว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ MAG 9-7 ที่บ่มร่วมกับ DOX นั้นผ่านทาง caspase-3



รูป 12 ค่า RELATIVE ACTIVITIES ของ CASPASE-3 จากสารสกัด MAG 9-19 ค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 และค่าที่วัดได้ในกลุ่มอื่นเป็นค่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด MAG 9-19 และ DOX

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

แอสโคสปอร์ที่กระจายอยู่ทั่วไปในมหาสมุทรรวมทั้งในระบบนิเวศทางทะเลอื่น ๆ ด้วย แม้ว่าบับบจะพบแอสโคสปอร์ได้มาก แต่ในทะเลจะพบทั้งความหลากหลายและความใหม่ของชนิดที่พบมากกว่า ตัวอย่างยาแผนปัจจุบันที่ผลิตได้จากแอสโคสปอร์ มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายเช่น erythromycin ด้านเชื้อแบคทีเรีย, amphotericin B ด้านเชื้อรา, avermectin ด้านเชื้อพยาธิ, doxorubicin ด้านเชื้อมะเร็ง และยังมี anthracyclines ชนิดใหม่ที่เป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่สกัดได้จากเชื้อ *Micromonospora* sp. (Sousa et. al., 2012) และพบว่าแอสโคสปอร์ที่หายากในทะเลนั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Micromonospora* sp. มีความหลากหลายของชนิดสามารถสร้างสารเมตาบอไลต์อันดับสองใหม่ ๆ และมีแนวโน้มว่าจะพบสารออกฤทธิ์ที่ใหม่ ๆ ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และมีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นยาต้านโรคมะเร็งต่อไป (Lam, 2006) ซึ่งแนวทางหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็งคือการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัด MAG ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องจุก (KB cells) และศึกษากลไกการตายในระดับโมเลกุล

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัด MAG 9-7 มีค่า $IC_{50} = 83.46 \pm 3.9$ ug/ml ซึ่งเป็นประสิทธิภาพในระดับปานกลางในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องจุก แต่ในขณะที่สารสกัด MAG 9-19 ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องจุก จากการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical tests) และ 16S rDNA sequencing ของเชื้อสายพันธุ์นี้พบว่าอยู่ใน genus *Micromonosporas* แต่เมื่อนำสารสกัดทั้งสองชนิด (ขนาดความเข้มข้นต่ำๆ) มาบ่มร่วมกับ DOX (ขนาดความเข้มข้นต่ำๆ) พบว่ามีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ทำให้ใช้ขนาดยาลดลงได้ เนื่องจาก DOX มีโครงสร้างเป็น quinone-containing anthracycline ซึ่งมีเป้าหมายออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจงที่ DNA บริเวณหมู่น้ำตาลใน minor groove ทำให้เอนไซม์ topoisomerase II ซึ่งทำหน้าที่ในการคลายเกลียวของ double helix ไม่สามารถทำงานได้ การสังเคราะห์ DNA จึงหยุดลง และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (Wang et. al., 2004) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ DOX ยังมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์มากเนื่องจากออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ปกติด้วย จึงยังมีข้อจำกัดในการใช้ ดังนั้นจากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าสารสกัด MAG เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเมื่อบ่มร่วมกับ DOX ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis จึงน่าจะนำสารสกัด MAG มาพัฒนาเป็น chemo-sensitizing agent เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาและลดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์

งานวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็งในปัจจุบันเน้นไปทางด้าน cancer biology อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยยา มีข้อจำกัดมาก เนื่องจากผู้ป่วยมักจะตอบสนองต่อการรักษาในระยะแรกเท่านั้น ต่อมาเกิดการดื้อยาทำให้ต้องเพิ่มขนาดยาขึ้น ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงต้องค้นหาสารชนิดใหม่จากธรรมชาติอยู่ตลอดเวลา ตัวอย่างเช่น

Tetrocarcin A (TCA) จาก *Micromonospora* NRRL 11289 มีคุณสมบัติทั้ง antibacterial และ antitumor โดยเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายด้วยกระบวนการ apoptosis ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Nakajima et. al., 2007) การสังเคราะห์ TCA analogs ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนของ preclinical trials (Fang et. al., 2008) ดังนั้นการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis จึงเป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาการรักษาโรคมะเร็ง ซึ่งยารักษาโรคมะเร็งแผนปัจจุบันที่มีกลไกในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis ได้แก่ doxorubicin (Lee et. al., 2002) เป็นต้น

เพื่อศึกษากลไกของสารสกัด MAG ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis เมื่อกระตุ้นให้เกิดสัญญาณภายในเซลล์แล้ว ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเฉพาะ 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) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์จากการศึกษาด้วย microscopy เหมือนกับที่กล่าวมาข้างต้น แต่เป็นการทดสอบในหลอดทดลอง (*in Vitro*) ซึ่งเซลล์ไม่ถูกกำจัดโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เซลล์ที่เกิด apoptosis อาจพัฒนาต่อไปเป็น late apoptosis และ necrosis ได้

การศึกษาด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) พบว่าสารสกัด MAG 9-7 ทำให้เกิดการแตกของ DNA แต่ถ้านำสารสกัด MAG 9-7 บ่มร่วมกับ DOX และ สารสกัด MAG 9-19 บ่มร่วมกับ DOX ทำให้เกิดการแตกของ DNA เพิ่มมากกว่าบ่มด้วยสารสกัด MAG เพียงอย่างเดียว 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 และ caspase activated DNase (CAD) ไปตัดสาย DNA ที่บริเวณ internucleosome ได้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 180-200 bp จึงมีสาย DNA ปรากฏทั้ง mono-nucleosome และ oligo-nucleosome เพราะฉะนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ ทำให้เซลล์มะเร็งปากช่องจมนตายแบบ 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 ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไป ควรทำการศึกษาที่เวลาต่างๆ กันเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้เกิด ladder band

การศึกษาการแตกของนิวเคลียสด้วยวิธี DAPI staining ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) พบว่าสารสกัด MAG 9-7 และ MAG 9-19 ที่บ่มร่วมกับ DOX ทำให้เกิด apoptotic cells มากกว่ากลุ่มที่

บ่มด้วยสารเพียงชนิดเดียวโดยมีนิวเคลียสแตก (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) การศึกษานี้ได้แสดงถึงสารสกัด MAG 9-7 หรือสารสกัด MAG ที่บ่มร่วมกับ DOX สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งช่องจมูกเกิด apoptosis ผ่านการกระตุ้น caspase-3 และภายใต้เงื่อนไขเดียวกันกลุ่มที่ได้รับ caspase-3 inhibitor (DEVD-fmk) สามารถยับยั้งการเกิด apoptosis ซึ่งเป็นกลไกที่เรียกว่า caspase3-dependent pathway ตัวอย่างสาร Streptonigrin และสารอนุพันธ์ 7-(1-methyl-2-oxopropyl) streptonigrin สกัดได้จาก actinomycete strain, *Micromonospora* sp. IM 2670 มีศักยภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด human neuroblastoma (SH-SY5Y cells) โดยกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายด้วย apoptosis ผ่านทาง p53-dependent pathway (Wang et. al., 2002)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัด MAG 9-7 มีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัด MAG 9-19 เนื่องจากชนิดและจำนวนของสารออกฤทธิ์ที่ยังที่สร้างขึ้นที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดจาก *Micromonospora* ทุกสายพันธุ์ ที่นำมาศึกษานั้นยังเป็นสารสกัดหยาบซึ่ง มีโมเลกุลหลายชนิดรวมอยู่ด้วยกัน ซึ่งอาจมีทั้งสารที่ออกฤทธิ์ และไม่ออกฤทธิ์ จึงยังไม่ทราบถึงคุณลักษณะของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งจะได้มีการศึกษาในขั้นต่อไป

สรุปและเสนอแนะ

สรุป

จากตะกอนทะเล 10 ตัวอย่าง พบเชื้อใน Suborder Micromonosporineae 15 ไอโซเลต ได้เชื้อที่เจริญบนอาหาร Mineral Agar Gause 1 (MAG) ซึ่งนำมาสกัดได้เป็นสารสกัด MAG 8, MAG 9-7, MAG 9-9 และ MAG 9-19 สำหรับสารสกัด MAG 8 และ MAG 9-9 ในเบื้องต้นได้ผลการทดลองเป็นไปตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้ แต่สารสกัดมีจำนวนน้อย จึงต้องทำการเพาะเลี้ยงและสกัดใหม่ แต่ผลการทดลองไม่เป็นไปตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้ เนื่องจากต้องใช้สารจำนวนมากทำให้สารหมด จึงไม่ได้ผลการทดลอง

สารสกัด MAG 9-7 มีประสิทธิภาพดีกว่า MAG 9-19 และประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นเมื่อบ่มร่วมกับ DOX และเมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัด จากการวิเคราะห์การแตกของ DNA ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าทำให้ DNA แตกเป็น smear band การวิเคราะห์การแตกของนิวเคลียสด้วยเทคนิค DAPI staining พบว่าทำให้เกิด chromatin condensation และ nuclear fragmentation และสอดคล้องกับ PI staining ด้วย flow cytometry พบการสะสมเซลล์ระยะ sub-G1 (apoptotic cells) เพิ่มมากขึ้น มีกลไกระดับซัยโตพลาสซึมเป็น caspase3-dependent pathway ซึ่งจากหลักฐานดังกล่าวนี้พอที่จะสรุปได้ว่าสารทั้ง 2 ชนิดเมื่อบ่มร่วมกับ DOX มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งช่องจุกตายแบบ apoptosis

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับ โมโตคอนเดรีย เพื่อยืนยันการตายแบบ apoptosis
2. ควรมีการทดลองในเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับ การทดลองในเซลล์มะเร็ง
3. ควรมีการทดลองในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นและในสัตว์ทดลอง
4. ควรหาสัดส่วนการใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็งแผนปัจจุบัน

ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัย

พัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเชื้อในห้องทดลอง เพื่อให้มีปริมาณสารสกัดมากขึ้น และสารสกัดจาก *Micromonospora* ทุกสายพันธุ์ ที่นำมาศึกษานั้นยังเป็นสารสกัดหยาบซึ่ง มีโมเลกุลหลายชนิดรวมอยู่ด้วยกัน ซึ่งอาจมีทั้งสารที่ออกฤทธิ์ และไม่ออกฤทธิ์ จึงยังไม่ทราบถึงคุณลักษณะของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงควรนำสารสกัดหยาบไปแยกเป็นสารบริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

สารสกัดที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเพื่อให้ร่วมกับเคมีบำบัดเป็นการรักษาแบบผสมผสาน (complementary therapies) ลดการการพัฒนาลูกหลานของเซลล์มะเร็ง และลดผลข้างเคียงที่จะเกิดจากการรักษาด้วยเคมีบำบัด หรืออาจใช้เป็นสารจากธรรมชาติ เพื่อป้องกันหรือยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งในระยะยาว (chemopreventive agent)

ผลผลิต (Output)

นำเสนอบทคัดย่อ

Sensitization of KB Cells to Doxorubicin by MAG 9-19 Extracted from *Micromonospora* in Marine Sediments (การประชุมวิชาการสรีรวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 41 ประจำปี 2555)

Chantarawan Saengkhae1*, Jantharat Pumpunphol1, Rattanaporn Srivibool2

Introduction. The search for new anticancer drugs to induce apoptosis is urgently required. The marine actinomycetes genus *Micromonospora* has long been recognized as an important source of its secondary metabolites, including therapeutic antibiotics for antibacterial, anticancer, antioxidant, and anti-inflammatory. The coastal marine sediments are largely unexplored source for *Micromonospora*, however, little is known about its ability to produce anticancer activity and molecular mechanisms. The aim of the study was to investigate the apoptosis-modulating activities of MAG 9-19 from *Micromonospora* extraction in human carcinoma of nasopharynx (KB cells).

Methods. *Micromonospora* strains were extracted (MAG 9-19) 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. MAG 9-19 extraction ($>1,000 \mu\text{g/ml}$) was not cytotoxic in KB cells. Nevertheless, the combined MAG 9-19 ($300 \mu\text{g/ml}$) and doxorubicin (DOX) ($1 \mu\text{g/ml}$) treatment increased significantly the number of nuclei fragmentation with chromatin condensation, DNA fragmentation and hypodiploid cells (sub-G1 phase) compared with MAG 9-19, DOX alone. Apoptosis enhancement of combination treatment was accompanied by increasing in the relative activity of caspase-3 by (2.7 ± 0.25) fold which was significantly attenuated in a caspase-3 inhibitor. The morphological evidence indicated a diminished size, rounded and easily detached when compared with polygonal adherent cells in normal shape.

Conclusions. The induction of apoptosis by combined MAG 9-19 and DOX treatment involves the activation of effector caspases-3. MAG 9-19 significantly sensitized KB cells to death induced by DNA damage and kill cancer cells by mainly apoptosis, therefore, it is suggested that this compound is a promising anticancer agent for nasopharynx cells.

Supported by Office of the Higher Education Commission (2011)

นำเสนอ Original article ใน Asian Biomedicine Journal

Extraction of *Micromonospora aurantiaca* from Coastal Marine Sediments Enhances Doxorubicin Induced Apoptosis in KB Cells

Chantarawan Saengkhae^{1*}, Jantharat Pumpunphol¹, Rattanaorn Srivibool²

¹Faculty of Allied Health Sciences and ²Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi, 20131

E-mail: schantara@yahoo.com (Chantarawan Saengkhae)

Abstract

Background: The search for substances sensitizing cancer cells to apoptosis is necessary. The potential activities of *Micromonospora* may provide novel structural diversity to be discovered. The coastal marine sediments are largely unexplored source for *Micromonospora*, however, little is known about its ability to produce anticancer activity and molecular mechanisms.

Objective: To investigate the apoptosis-modulating activities of *Micromonospora aurantiaca* in human carcinoma of nasopharynx (KB cells).

Methods: Marine *Micromonospora aurantiaca* (MA) were extracted with methanol and ethyl acetate 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 MA and doxorubicin (DOX) alone inhibited KB cells with IC₅₀ of 83.46 ± 3.9 and 2.0 ± 0.1 µg/ml, respectively. The combined MA extract (50 µg/ml) and DOX (1 µg/ml) treatment produced greater cytotoxicity associated with the increasing of chromatin condensation, DNA fragmentation and hypodiploid cells compared with treating cells with each agent alone. Apoptosis enhancement of combination treatment was accompanied by increasing in the relative activity of caspase-3 by 3.67 ± 0.31 fold which was significantly attenuated in a caspase-3 inhibitor. The morphological evidence indicated a diminished size, rounded and easily detached compared with polygonal adherent cells in normal shape.

Conclusions: The induction of apoptosis by combined MA extract + DOX treatment involves the activation of effector caspases-3. Thus, the combination may provide one other important advantage. MA extract would represent a promising source for its ability to discovery of interesting anticancer compounds. The elucidation of the apoptosis-related others intracellular targets will be addressed in future studies.

Key words: KB cells, *Micromonospora aurantiaca*, Doxorubicin, Apoptosis, Caspase-3

Introduction

Actinomycetes are filamentous gram-positive bacteria belonging to the phylum Actinobacteriaceae which are considered an important natural source of bioactive secondary metabolites from natural products. Because the marine environments are particularly different from terrestrial, the marine actinomycetes have developed unique pharmacological activities that would not be observed in terrestrial microorganisms [1, 2, 3]. The anticancer secondary metabolites produced by *actinomycetes* such as anthracyclines (doxorubicin), peptides

(bleomycin and actinomycin D) etc. showed significant activity in medical treatment [4, 5]. The secondary metabolites derived from actinomycetes display different biological activities including anti-bacterial, anti-fungal, cytotoxic, anti-oxidant, anti-inflammatory and immunosuppressive agents [6]. Actinomycetes isolated from the samples collected at the different marine environments, such as the deep sea floor, marine invertebrates and coastal sediments represent unique ecosystems that cannot be found anywhere else in the world [7]. Among the marine actinomycetes, the genus *Micromonospora* has become a focus in the search for novel secondary metabolites.

Micromonospora species are best known for synthesizing antibiotics, especially aminoglycoside (gentamicin and netamicin), enediynes, and oligosaccharide antibiotics which contribute their impact on medicinal usage [8]. Furthermore, *Micromonospora* species has been intensively investigated and isolated anti-cancer antibiotics such as anthraquinones [9], anthracyclines [10], alkaloids [11], and macrolides [12]. Recently, the four new anthracyclines were isolated from a strain of *Micromonospora* species associated with the tunicate *Eudistoma vannamei*. Two compounds were cytotoxic against the HCT-8 human colon adenocarcinoma cell line, with IC₅₀ values of 12.7 and 6.2 μ M, respectively, while the other two compounds were inactive [13]. The alkaloid from *Micromonospora* secondary metabolite, diazepinomicin, has demonstrated with a broad spectrum of *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity and has been completed by Ecopia BioSciences Inc. as an anticancer agent [11]. Streptonigrin isolated from *Micromonospora* sp. IM 2670 induced apoptosis through a p53-dependent pathway in the human neuroblastoma SH-SY5Y cells [14]. Tetrocarcin A (TCA), produced by *Micromonospora chalcea* NRRL 11289, induced apoptosis via activating the caspase-dependent cell death pathway [15].

The potential activities of *Micromonospora* may provide novel structural diversity to be discovered. The search for the substances sensitizing cancer cells to apoptosis induction by chemotherapeutic agents is urgently required in the current strategy and hope to improve therapeutic properties by using combinatorial biosynthesis approaches. The coastal sediments from the gulf of Thailand are a largely unexplored source for *Micromonospora* with the potential to produce biologically active secondary metabolites, however, little is known about its ability to produce anticancer activity and molecular mechanisms by inducing apoptosis. The aim of the study was to investigate the apoptosis-modulating activities of *Micromonospora aurantiaca* (MA) extraction in human carcinoma of nasopharynx (KB cells).

Materials and Methods

Chemicals

The following chemicals were purchased from the following suppliers: propidium iodide (PI), 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) and SYBER Gold from invitrogen, Ltd. (Paisley, UK); dimethyl sulfoxide (DMSO) and [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] (MTT) from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA); Cell culture media or materials were purchased from Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA) and InVitromex (Grevenbroich, Germany).

Isolation and identification of marine *Micromonospora*

The coastal sediment samples were collected at 1.3 meter in depth, in Na-Klua sub-district of Chonburi Province, which is located on the east coast of the Gulf of Thailand. Sample soil was diluted, inoculated and isolated on Mineral Agar Guase 1 in 50 percent sea water adding with nystatin (50 mg/l) and novobiocin (20 mg/l). After incubation at 30°C for 14 days, all colonies with different pigmentation and morphology were chosen for isolation.

Micromonospora strain (MAG 9-7) appeared on Mineral Agar Guasel in orange-black colonies after 10-days incubation at 30° C of 100 µl aliquot inoculation on petri dish. After purification, the pure colonies were preserved in 20% glycerol at -80° C for further studies. Standard morphological property and chemotaxonomic analysis were proved, including molecularly identification by 16S rRNA gene sequencing [16, 17]. Analysis of the DNA sequence revealed genomic features characteristic of *Micromonospora aurantiaca*.

Crude Extract Preparation

Micromonospora aurantiaca was cultured in 1 litre ISP2 broth medium and 105 rpm reciprocal shaken at 30 °C for 10 days before extraction. The culture cells were separated from medium by centrifugation. Cells were extracted with methanol and ethyl acetate and medium was extracted with ethyl acetate. Evaporated the solvent off with vacuum evaporator and dry crude extract was kept in vial at -20 °C.

Cell culture and viability assay

KB cell line, human carcinoma of the nasopharynx, was obtained from National Cancer Institute of Thailand. KB cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cell cultures were maintained in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37 °C.

Measurement of cell viability was determined using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] assay. This assay is based on cleavage of the tetrazolium salt by mitochondrial dehydrogenase of viable cells to formazan dye [18]. At least three separate experiments for each sample were used to determine the cell viability. In brief, cells in exponential growth phase were incubated with absolute ethanol (EtOH) (0.21%), MA extract (0-300 µg/ml), Doxorubicin (DOX) (0-10 µg/ml) and MA extract + DOX for 48 h incubation. The MTT-formazan was measured at 570 nm with a microplate reader (Cecil Bioquest 2000 Series). Under these conditions, EtOH (0.21%) was not toxic and cell survival in vehicle control was assumed 100%. The percentage of cell viability was demonstrated in relation to control.

Nuclear staining with DAPI

KB cells were placed in the six-well plate attached with cover slide. Following various treatments, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 2.5% glutaraldehyde. RNase A (100 µg/ml) treatment was performed in the dark for 30 minutes at room temperature. The fixed cells were washed with PBS, and stained with a 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (5 µg/ml) for 10 min at room temperature. After remove unbound dye, cells were mounted on a glass slide with mounting solution (1:9; PBS: glycerol), sealed the edges with nail polish and then visualized with fluorescence microscope (Olympus BX51) at 100 × magnification. For each treatment group, approximately 500 different nuclei were counted in random microscopic fields. Data were expressed as percentage of nuclei in different phases [19]. At least three separate experiments for each sample were performed.

Agarose gel electrophoresis for DNA fragmentation assay

The GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Vivantis) was used according to the manufacturer's instructions. After treatments, floating and adherent cells were washed with PBS and then lysed with digestion buffer containing proteinase K (400 µg/ml) at 60 °C. RNase A (100 µg/ml) was added and incubated for 10 min at 37 °C. Genomic DNA was extracted with ice-cold absolute ethanol. High-purity genomic DNA is eluted in low salt buffers and has absorbance 260/280 ratio between 1.7 and 1.9 making it ready to use. Equal amounts of DNA samples (300 ng) were mixed with SYBER Gold (0.1 mg/ml, 1 µl) and loading buffer and then

loaded onto pre-solidified 1.5% agarose [19]. The agarose gels were run at 125 V for 30 min in TBE buffer. Gels were observed and photographed under transilluminator (Clare Chemical Research).

Flow cytometry analysis for measurement of sub-G1 phase

Each group of cells were harvested and washed once with cold PBS, fixed in 4% paraformaldehyde (cold) for 15 min and stored at 4°C. Prior to analysis, the cells were washed twice again with PBS, suspended in 1 ml of a cold propidium iodide (PI) solution containing RNase A (100 µg/ml), PI (50 µg/ml), EDTA disodium (0.1 mM), Triton X-100 (0.1%) (v/v) and further incubated on ice in the dark until analysis. Flow cytometry analysis were carried out using a flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA). Data were analyzed by using CellQuest software (BD Biosciences, USA) which was used to determine the cellular DNA content based on the presence of PI-labeled cells [20].

Measurement of Caspase-3 Activity

Caspase-3 activity was measured by a colorimetric assay kit (Clontech, Texas, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cell lysates from 4×10^6 cells in each group were prepared using the lysis buffer (50 µl) and then incubated on ice for 30 min. After centrifugation at 14,000 g, 4 °C for 5 min, the supernatant (50 µl) was collected and mixed with 50 µl 2× reaction buffer and 5 µl caspase-3 substrate (DEVD-pNA). The samples were incubation at 37 °C in the dark for 4 h and were read on a spectrophotometer at a wavelength of 405 nm, which represented the intra-cellular activity of caspase-3. Data were expressed as fold increase on the control level [21].

Data processing and statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M) from independent 3-4 experiments and analyzed with the software Microcal™ Origin 6. Statistical comparisons were performed using Student's t-test. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Combined MA extract and DOX treatment inhibits viability in KB cells

KB cells were exposed to 0-300 µg/ml of MA extract for 48 h. The MA extract treatment significantly inhibited the cell viability in a concentration-dependent manner as determined using MTT assay. It was found that absolute ethanol (0.21%) is not toxic for cells. At 200 µg/ml of MA extract, the viability of KB cells was reduced to less than 15%. The IC₅₀ values for MA extract and DOX were 83.46 ± 3.9 and 2.0 ± 0.1 µg/ml, respectively (Fig. 1). Direct observations by inverted microscopy demonstrated that KB cells treated with MA extract or DOX indicated a diminished size, rounded and detached from the monolayer, condensed cytoplasm accompanied by transforming cell into a cluster of membrane-bound bodies when compared with cuboidal and polygonal adherent cells in normal shape. In the combined treatment, the MA extract (0-100 µg/ml) + DOX (1 µg/ml) produced significantly greater cytotoxicity compared with that observed by treating cells with each agent individually (Fig. 2). Overall, the IC₅₀ value for combined treatment was 8.8 ± 1.2 µg/ml and it was approximately 10 folds lower than treating cells with MA extract only.

Combined MA extract and DOX treatment enhances apoptosis in KB cells

To determine the mechanism of the cytotoxic effect of the combined treatment, KB cells treated with MA extract, DOX and MA extract + DOX for 48 h were carried out using fluorescence microscopy, agarose gel electrophoresis, and flow cytometry. Nucleic acids were stained with DAPI and observed under a fluorescence microscope. In the control group, the nuclei were homogeneously stained and the quantitative estimation of normal cells was 100%.

The apoptotic nuclei showed fragmented in nuclei with chromatin condensation. When the KB cells were treated with MA extract (50 µg/ml) and DOX (1 µg/ml), the apoptotic nuclei was 24.27 ± 0.35 and 29.68 ± 3.49 %, respectively (Fig. 3). The sensitization effect of the combination treatment was significantly evident in the increasing apoptotic cell as $74.64 \pm 6.19\%$ (Table 1).

Agarose gel electrophoresis indicated that treatment with MA extract and DOX alone induced some fragmented DNA. DNA fragmentation induced by combined MA extract + DOX treatment was progressive accumulation of nucleosomal fragmentation and the intensity of smear-like DNA degradation was more prominent compared to solitary treatment (Fig. 4). Therefore, flow cytometry analysis was used to determine the magnitude of apoptosis. KB cells treated with MA extract, DOX and MA extract + DOX were stained with propidium iodide. In normal cell cycle, the percentage of hypodiploid cells was 2.76% that revealed very little in sub-G1 phase. After treatment with MA extract or DOX alone, the hypodiploid cells in sub-G1 phase were increased to 13.13 and 10.51%, respectively. On the other hand, treatment with a combination of MA extract + DOX resulted in obvious increase in hypodiploid cells in sub-G1 phase to 34.15% (Fig. 5).

Combined MA extract and DOX treatment enhances caspase-3 activity

To further evaluate the apoptotic pathway, the activities of caspase-3 were detected by colorimetric analysis. After treatment with MA extract and DOX alone, the relative activity of caspase-3 increased by 2.05 ± 0.07 and 2.15 ± 0.04 fold, respectively when compared with the control. The relative activity of caspase-3 in combined treatment increased significantly by 3.67 ± 0.31 folds which was statistically different ($P < 0.05$) compared with non-combined treatment. The z-DEVD-fmk (caspase-3 inhibitor) prevented the MA extract induced caspase-3 activation (Fig. 6).

Discussion

The marine micro-organisms, particularly *Micromonospora*, have been proven to be a rich source for the discovery of novel secondary metabolites. Although collecting soil and marine sediments are relatively inexpensive, their pharmacological potential has not yet to be fully explored. With growing and intense interest, *Micromonospora* is being investigated for the discovery of new bioactive compounds that have no terrestrial equivalents [2, 3, 4, 7]. During cancer progression, cancer cells are conferred with capacity to proliferate independently and produce their own growth factors, which can make growth factor receptors more responsive to stimulation. Thus, the anti-proliferative effect of natural products produced by microorganisms on cancer cells is one of the mechanistic ways in chemoprevention and chemotherapy.

In the present study, *Micromonospora aurantiaca* was collected from coastal sediments on the east coast of the Gulf of Thailand and extracted with methanol and ethyl acetate to be dry crude extract. The MA extract showed a moderate cytotoxicity ($IC_{50} = 83.46 \pm 3.9$ µg/ml) against KB cells. These results did not meet the criterion set by the National Cancer Institute (NCI) for the crude extract in that the acceptable IC_{50} value is lower than 30 µg/mL [22]. Further, the MA extract is about 42-fold less toxic than DOX. However, MA extract in combination with DOX caused 10-fold enhanced cell death at concentrations that each agent alone is poorly effective. Furthermore, the enhanced cytotoxicity of the combined treatment may result from augmentation of DOX-induced apoptosis by MA extract.

The induction of apoptosis in cancer cells is one of the advantageous strategies for anticancer drug development and many studies were performed for screening of apoptosis inducing compounds from marine actinomycetes [1,4,5,7]. The search of novel substances with

considerable potential for chemosensitization was ideally suited for enhancing the cytotoxic activity of chemotherapeutics. In this present study, the MA extract in combination with DOX at each sub-cytotoxic concentration exhibits the morphological and biochemical changes that characterize apoptosis *in vitro*. The combined treatment significantly increased apoptosis as shown by loss of cell viability (Fig. 2), chromatin condensation (Fig. 3), DNA fragmentation (Fig. 4) sub-G1 phase accumulation (Fig. 5) and relative caspase-3 activity (Fig. 6) as compared with single treatment. Based on these results, the mechanisms of such enhancement seem to be related to caspase-3 dependent cell death pathway in KB cell line. Because no phagocytic cells were presented *in vitro*, the apoptotic cells eventually reached a late stage similar to necrosis. At any time point, the cell asynchrony would demonstrate a mixture of apoptosis events together with necrosis or late apoptosis.

These results were comparable with the finding of others studies. *Micromonospora* has been intensively investigated and also produced several active secondary metabolites, such as anthraquinones [23], anthracyclines [13], alkaloids [24], and macrolides [12]. The macrolide, a spiroketal lactone structure, is produced by *Micromonospora* sp showed cytotoxic activity against mouse leukemia P-388 and human lung nonsmall cell A-549, colon adenocarcinoma HT-29 and melanoma MEL-28 cell lines [25]. The aminoquinone antibiotic streptonigrin and its novel derivative from an actinomycete strain, *Micromonospora* sp. IM 2670 induced apoptosis through a p53-dependent pathway in human neuroblastoma SH-SY5Y cells as the model system [14]. Four new anthracyclinones were isolated from a strain of *Micromonospora*. Two compounds were cytotoxic against the HCT-8 human colon adenocarcinoma cell line, with IC₅₀ values of 12.7 and 6.2 μ M, respectively, while the other 2 compounds were inactive [13]. Additionally, doxorubicin belonging to anthracyclines caused DNA damage as a result of topoisomerase II poisoning that inhibits cancer cells by mainly apoptosis [26].

Thus, the use of combinations may provide a matter of great interest for improving the anticancer activity of DOX because it allows lower and safer doses of each compound. Natural compounds are ideally suited for this application because they allow a variety of large combinations to be used safely. The different components in the MA extract may have synergistic activities and may offer greater therapeutic or preventive activity when used in combination. A well-designed combination of compounds has attracted special attention for further studies. Taken together with this present study, the elucidation of the apoptosis-related others intracellular targets will be also addressed in future studies. However, cancer is a multifactorial disease, which demands multimodal therapeutic approaches. Recent studies indicated that marine microorganisms are economically and biotechnologically attractive in that many are not general cytotoxic agents but rather display a broad spectrum of biological activities including anti-microbial, anti-fungal, anti-inflammatory and immunosuppressive agents [6]. So, the combinations or synergistic interactions provide one other important advantage. MA extract would represent a promising source for its ability to discovery of interesting anticancer compounds.

Conclusion

In summary, this study demonstrates that the methanol and ethyl acetate extraction from marine *Micromonospora aurantiaca* significantly enhanced human carcinoma of the nasopharynx (KB cell) to apoptosis induced by DNA topoisomerase II poisoning (doxorubicin). This apoptotic response was associated with caspase-3 activation. Thus, the combination may provide a more effective treatment for nasopharynx cancer. The MA extract would represent a promising source for its ability to discovery of interesting anticancer compounds. A well-

designed combination of compounds and the apoptosis-related others intracellular targets will be addressed in future studies.

Acknowledgements

This study was supported by the grants from Office of the Higher Education Commission (2011). The authors wish to thank Prof. Dr. Kovit Pattanapanyasat: Head of Medical Device Division, Faculty of Medicine Siriraj Hospital for a complimentary support in flow cytometry and Miss Surada Lerdwana for technical assistance. Further thanks go also to the National Cancer Institute, Bangkok, Thailand for donating the KB cell lines.

References

1. Lam KS. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9:245–251.
2. Bull AT & Stach JEM. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *TRENDS in Microbiology.* 2007; 15(11):491-499.
3. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.* 2007; 70:461-477.
4. Williams PG. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol.* 2009; 27:45-52.
5. Olano C, Méndez C, Salas JA. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep.* 2009; 26: 628-660.
6. Jensen PR, Mincer TJ, Williams PG & Fenical W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2005; 87:43–48.
7. Jimenez JT, Šturdíková M, Šturdík E. Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta Chimica Slovaca.* 2009; 2(2):63-74.
8. Hirsch AM, Valdés M. *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology & Biochemistry.* 2010; 42(4): 536–542.
9. Igarashi Y, Yanase S, Sugimoto K, Enomoto M, Miyanaga S, Trujillo ME, Saiki I, Kuwahara S. Lupinacidin C, an Inhibitor of Tumor Cell Invasion from *Micromonospora* lupine. *J Nat Prod.* 2011; 74:862–865.
10. Yang SW, Chan TM, Terracciano J, Patel R, Loebenberg D, Chen G, Patel M, Gullo V, Pramanik B, Chu M. A new anthracycline antibiotic micromonomycin from *Micromonospora* sp. *J Antibiot.* 2004; 57:601–604.
11. McAlpine JB, Banskota AH, Charan RD, Schlingmann G, Zazopoulos E, Pirae M, Janso J, Bernan VS, Aouidate M, Farnet CM, Feng X, Zhao Z & Carter GT. Biosynthesis of Diazepinomicin/ECO-4601, a *Micromonospora* Secondary Metabolite with a Novel Ring System. *J Nat Prod.* 2008; 71:1585–1590.
12. Gaertner A, Ohlendorf B, Schulz D, Zinecker H, Wiese J, Imhoff JF. Levantilides A and B, 20-Membered Macrolides from a *Micromonospora* Strain Isolated from the Mediterranean Deep Sea Sediment. *Mar Drugs.* 2011; 9:98–108.

13. Sousa TDS, Jimenez PC, Ferreira EG, Silveira ER, Braz-Filho R, Pessoa ODL & Costa-Lotufu LV. Anthracyclines from *Micromonospora* sp. J Nat Prod. 2012; Article ASAP: A-E.
14. Wang H, Yeo SL, Xu J, Xu X, He H, Ronca F, Ting AE, Wang Y, Yu VC & Sim MM. Isolation of Streptonigrin and Its Novel Derivative from *Micromonospora* as Inducing Agents of p53-Dependent Cell Apoptosis. J Nat Prod. 2002; 65:721-724.
15. Anether G, Tinhofer I, Senfter M & Greil R. Tetrocarcin-A induced ER stress mediates apoptosis in B-CLL cells via a Bcl-2-independent pathway. Blood. 2003; 101:4561-4568.
16. Williams ST, Goodfellow M and Alderson G. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams ST (ed). Vol. 4 Williams & Wilkins, Baltimore, pp2452-2492, 1989.
17. Staneck JL, Roberts GD. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. Appl Microbiol. 1974; 28:226-231.
18. Alley MC, Scudiero DA, Monks PA, Hursey ML, Czerwinski MJ, and Fine DL. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. Cancer Res. 1976; 72:248-254.
19. Saengkhae C, Noiraksar T, Jongaramruong J & Palee P. Antiproliferation and induction of apoptosis by extract of *Turbinaria conoides* (J. Agardh) Kützing on human cervical cancer cell line. Chula Med J. 2010; 54(1):13-24.
20. 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.
21. Qin FX, Shao HY, Chen XC, Tan S, Zhang HJ, Miao ZY, Wang L, Chen H & Zhang L. Knockdown of NPM1 by RNA Interference Inhibits Cells Proliferation and Induces Apoptosis in Leukemic Cell Line. Int J Med Sci. 2011; 8:287-294.
22. Suffness M, Pezzuto JM. Assays related to cancer drug discovery. In *Methods in Plant Biochemistry: Assay for Bioactivity Volume 6*. Edited by: Hostettmann K. London: Academic Press; 1990.
23. Igarashi Y, Trujillo ME, Molina EM, Yanase S, Miyanaga S, Obata T, Sakurai H, Saiki I, Fujita T & Furumai T. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. Bioorg Med Chem Lett. 2007; 17:3702-3705.
24. Charan RD, Schlingmann G, Janso J, Bernan V, Feng X, Carter GT. Diazepinomicin, a New Antimicrobial Alkaloid from a Marine *Micromonospora* sp. J Nat Prod. 2004; 67: 1431-1433.
25. Fernández-Chimeno RI, Cañedo L, Espliego F, Grávalos D, De La Calle F, Fernández-Puentes JL, Romero F. IB-96212, a novel cytotoxic macrolide produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. J Antibiot. 2000; 53: 474-478.

26. Lee S, Baek M, Kim HY, Ha JH & Jeoung DI. Mechanism of doxorubicin-induced cell death and expression profile analysis. *Biotechnol Lett.* 2002; 24:1147–1151.

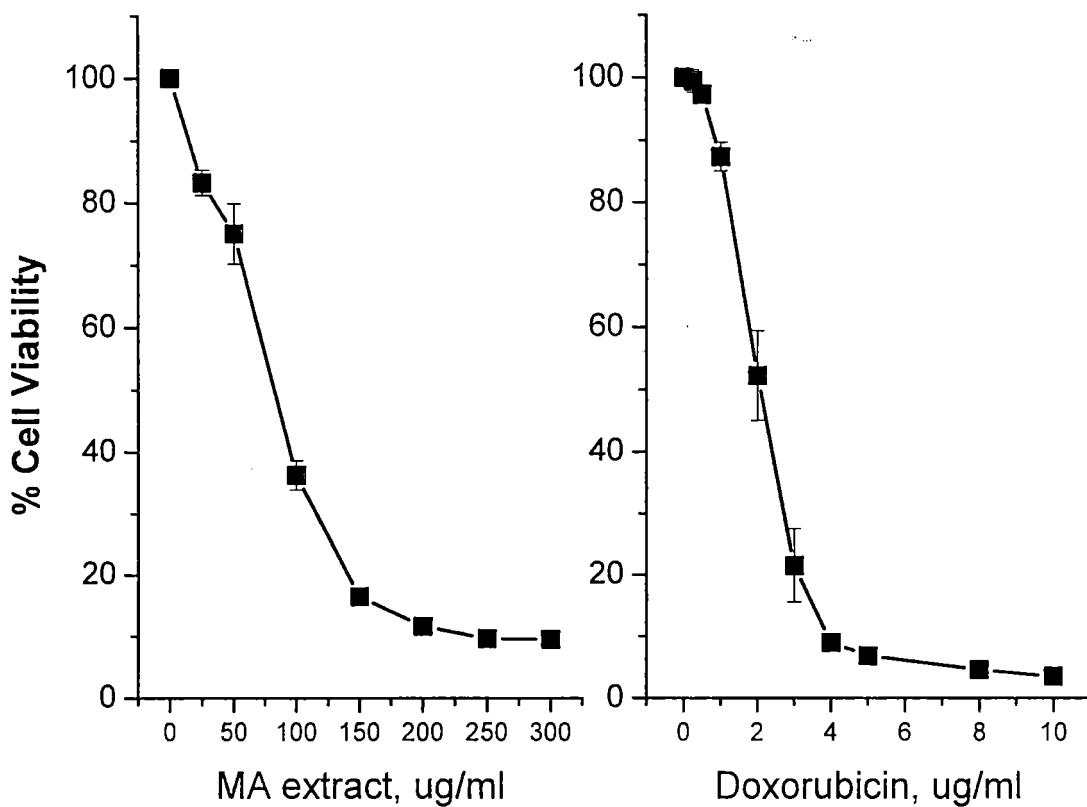


Figure 1. Effects of MA extract and Doxorubicin on viability of KB cells. Cells were treated with MA extract (0-300 $\mu\text{g/ml}$) or Doxorubicin (0-10 $\mu\text{g/ml}$) for 48 h. Viable cell number was measured with MTT assay. Control cells were treated with 0.21% EtOH. Data were expressed as mean \pm S.E.M of $n = 3$ samples.

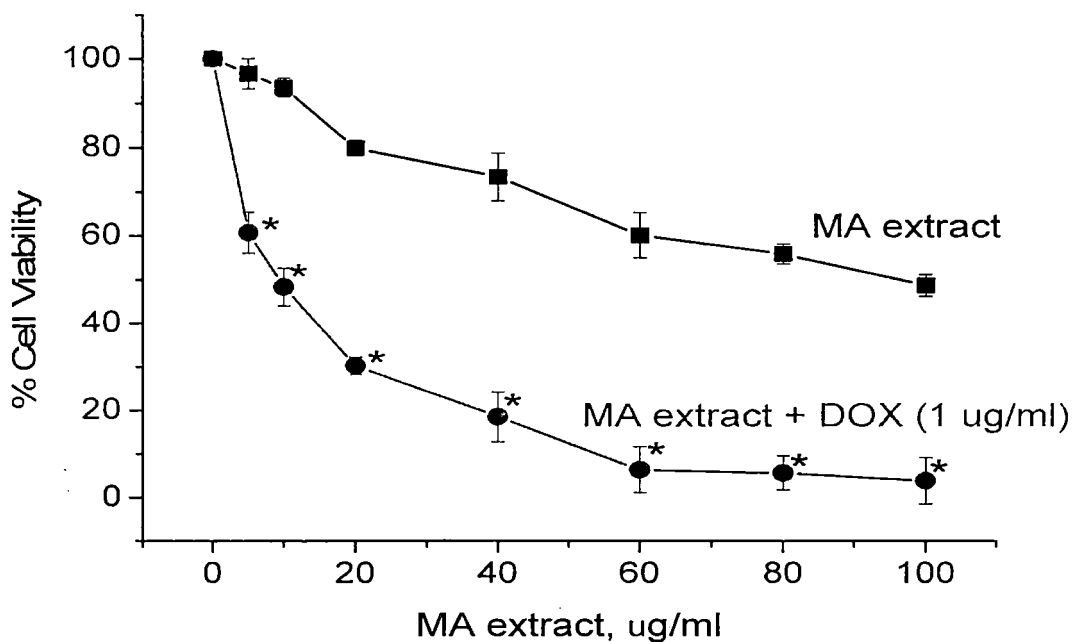


Figure 2. Effects of MA extract and Doxorubicin in combination on viability of KB cells. Cells were treated with MA extract (0-100 $\mu\text{g/ml}$) alone (■) or MA extract (0-100 $\mu\text{g/ml}$) + Doxorubicin (1 $\mu\text{g/ml}$) (●) for 48 h. Viable cell number was measured with MTT assay. Control cells were treated with 0.21% EtOH. Data were expressed as mean \pm S.E.M of $n = 3$ samples. The significance was determined by Student's t-test ($*p < 0.05$ vs. MA extract)

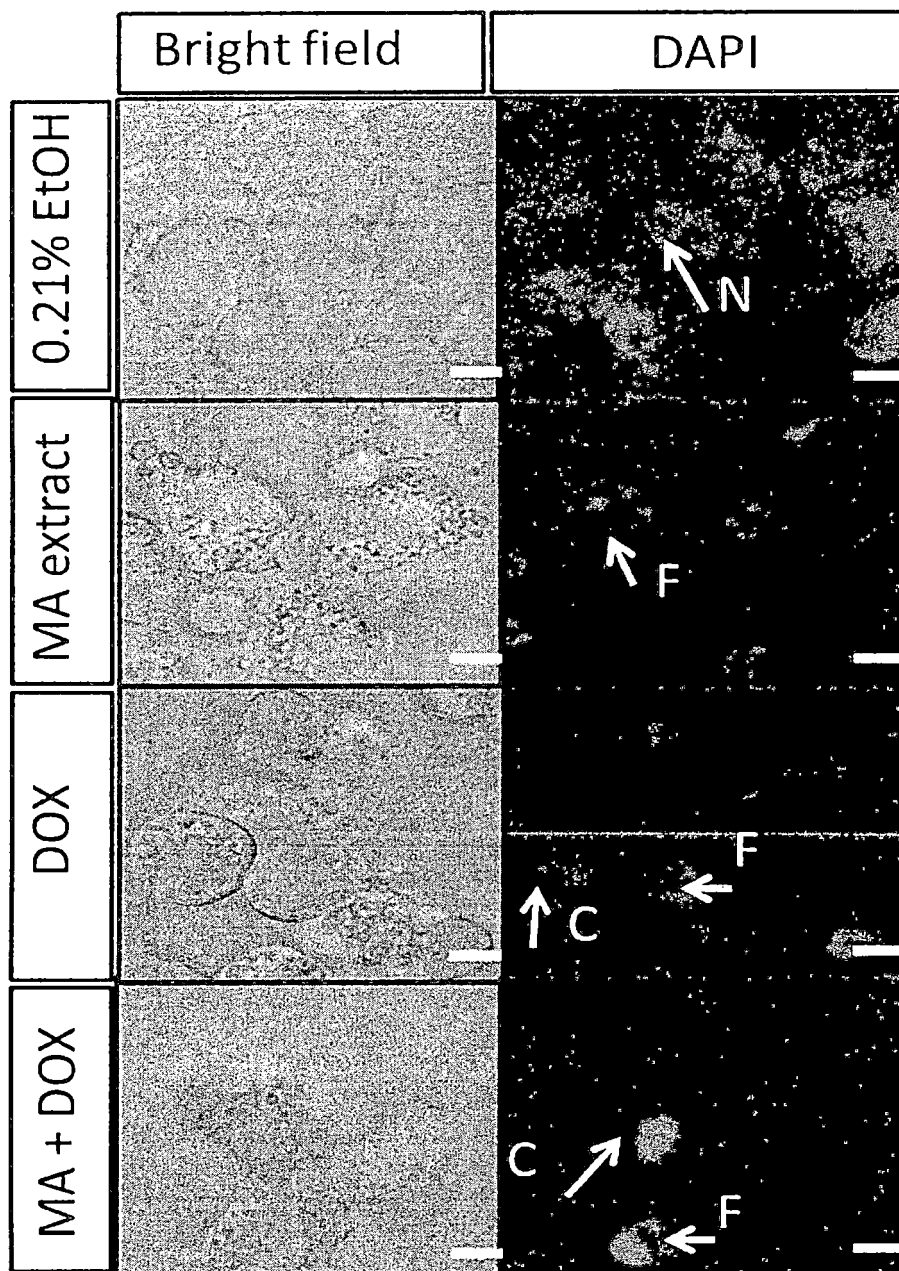


Figure 3. Correlation of surface morphologies with nuclear features. KB cells were treated with 0.21% EtOH, MA extract (50 $\mu\text{g/ml}$), Doxorubicin (1 $\mu\text{g/ml}$) and MA extract (50 $\mu\text{g/ml}$) + Doxorubicin (1 $\mu\text{g/ml}$) for 48 h and then stained with DAPI. Cells were detected by bright field and blue filter (DAPI) at the same view point. N: normal nuclei, F: nuclear fragmentation and C: chromatin condensation. Data were expressed as mean \pm S.E.M of $n = 3$ samples. Scale bar is 10 μM . similar results were obtained in two different experiments.

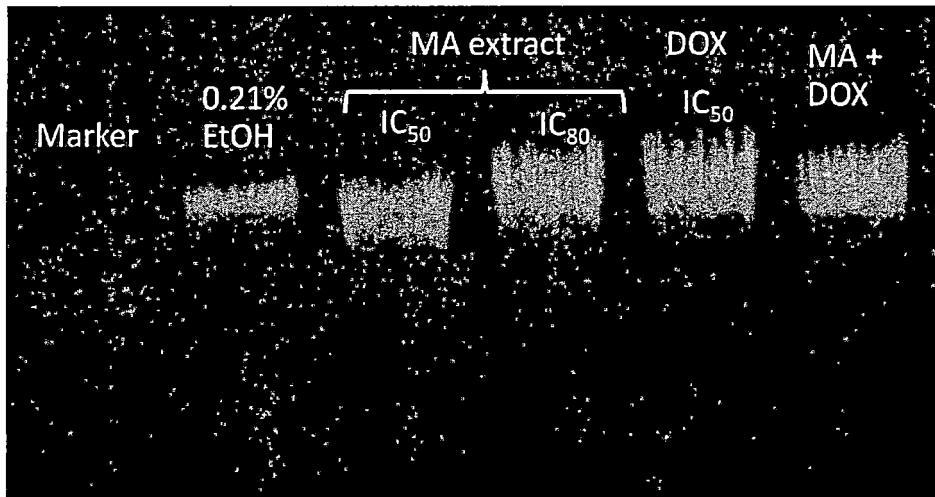


Figure 4. A photograph of the SYBER Gold-stained agarosegel. KB cells were treated with 0.21% EtOH, MA extract (IC_{50} and IC_{80}), Doxorubicin (IC_{50}) and MA extract (50 $\mu\text{g/ml}$) + Doxorubicin (1 $\mu\text{g/ml}$) for 48 h and then DNA was extracted and electrophoresed. Similar results were obtained in two different experiments.

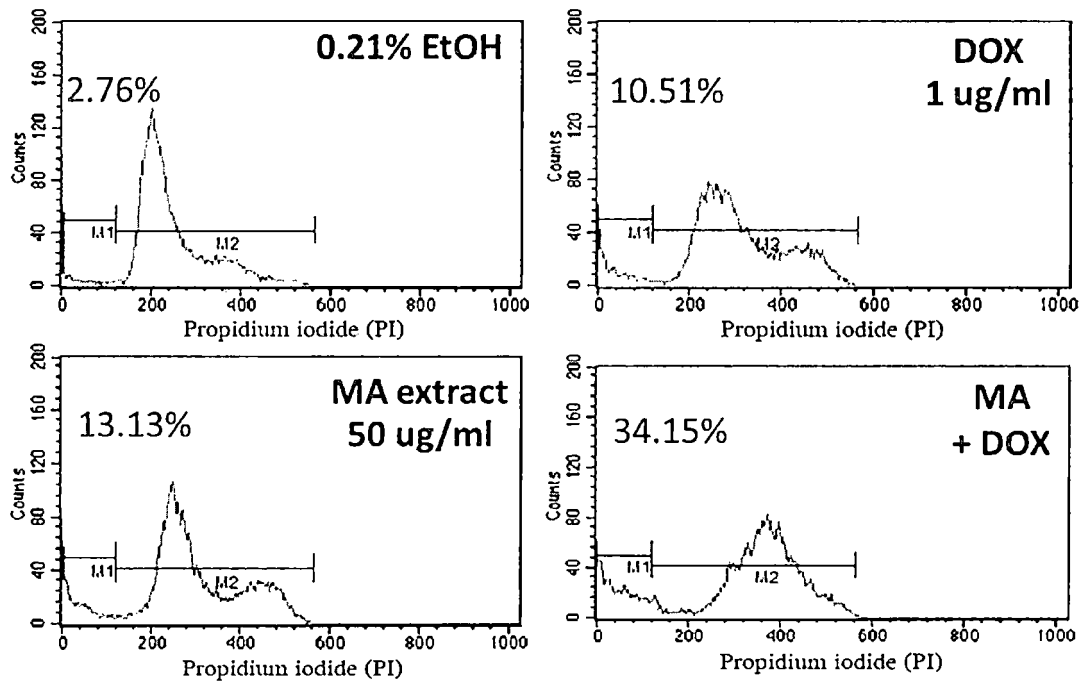


Figure 5. Histograms of flow cytometric analysis. KB cells were treated with 0.21% EtOH, MA extract (50 $\mu\text{g/ml}$), Doxorubicin (1 $\mu\text{g/ml}$) and MA extract (50 $\mu\text{g/ml}$) + Doxorubicin (1 $\mu\text{g/ml}$) for 48 h and then stained with PI. MI was the percentage of cells in sub-G1 phase. Similar results were obtained in two different experiments.

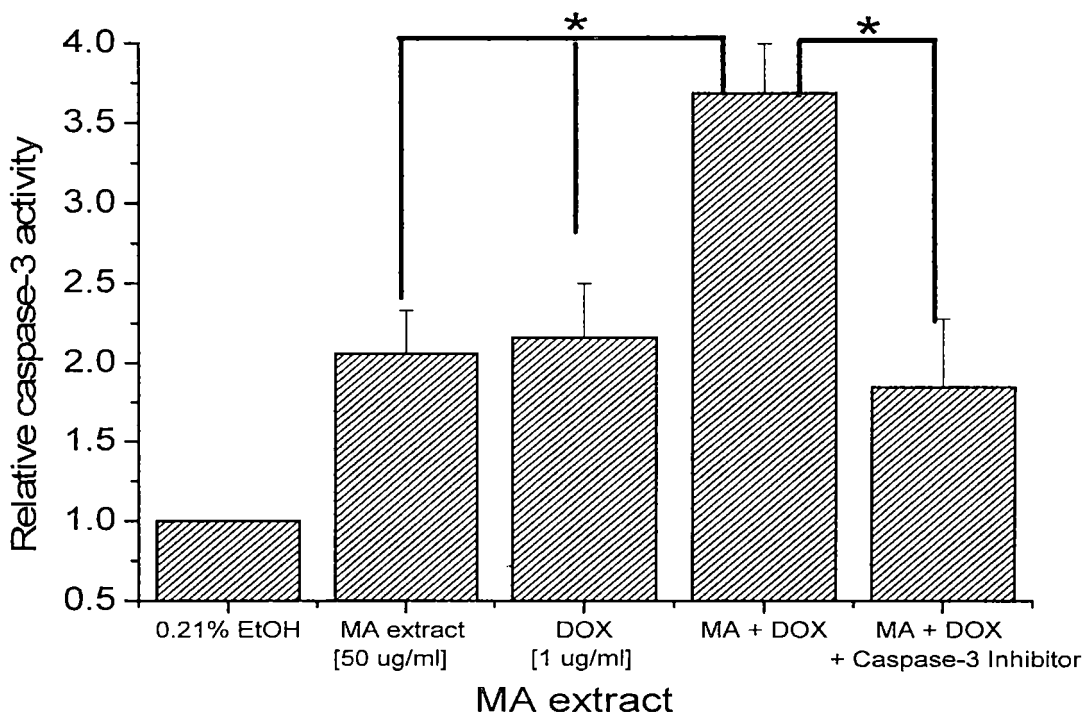


Figure 6. Relative caspases-3 activities in KB cells were measured by spectrophotometry. The control group (0.21% EtOH) was set as 1, and the values of other groups were standardized against it. Data were expressed as mean \pm S.E.M of $n = 3$ samples, $*p < 0.05$.

	%Normal cells (homogenous DAPI)	%Apoptotic cells (condensed or fragment DAPI)
0.21% EtOH (negative control)	100	100
MA extract [50 $\mu\text{g/ml}$]	75.73 \pm 2.99	24.27 \pm 0.35
DOX [1 $\mu\text{g/ml}$] (positive control)	70.32 \pm 6.46	29.68 \pm 3.49
MA extract [50 $\mu\text{g/ml}$] + DOX [1 $\mu\text{g/ml}$]	25.36 \pm 3.27*	74.64 \pm 6.19*

Table1. Percentage of apoptotic nuclei stained with DAPI. KB cells were treated with 0.21% EtOH, MA extract (50 $\mu\text{g/ml}$), Doxorubicin (1 $\mu\text{g/ml}$) and MA extract (50 $\mu\text{g/ml}$) + Doxorubicin (1 $\mu\text{g/ml}$) for 48 h and then stained with DAPI. Cells were detected by bright field and blue filter (DAPI) at the same view point. Data were expressed as mean \pm S.E.M of $n = 3$ samples

รายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการ (NRPM 13 หลัก) 2554A10862003

โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ชื่อมหาวิทยาลัย บูรพา จ.ชลบุรี 20131

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ฤทธิ์ต้านมะเร็งและกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของสารเมตาโบไลต์ที่ออกฤทธิ์ชีวภาพ จากแอคติโนแบคทีเรียในชั้นออร์เดอร์ Micromonosporineae ที่แยกจากตะกอนทะเล

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Anti-cancer activities and molecular mechanisms of bioactive metabolites from actinobacteria in suborder Micromonosporineae isolated from marine sediments

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

ผศ.ดร.จันทวรรณ แสงแข คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (18/เมษายน/ 2552) ถึงวันที่ (26/มีนาคม/2555)

ระยะเวลาดำเนินการ ปี เดือน ตั้งแต่วันที่ (18/เมษายน/ 2552) ถึงวันที่ (26/มีนาคม/2555)

รายจ่าย

หมวด	รายจ่ายสะสม จากรายงาน ครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวด ปัจจุบัน	รวมรายจ่าย สะสมถึง ปัจจุบัน	งบประมาณ รวมทั้ง โครงการ	คงเหลือ (หรือ เกิน)
1. ค่าตอบแทน ผู้ช่วยนักวิจัย นางสาวจันทร์รัตน์ ภูมิพันธ์ ผล เดือนพฤษภาคม ถึงเดือนสิงหาคม และ ก.ย. 54 – ก.พ. 55	33,600.-	50,400.-	84,000.-	390,400.-	306,400.-
2. ค่าตอบแทนผู้วิจัย 2 คน (270 B x120วัน X 2)		64,800.-	148,800.-		241,600.-

2. ค่าจ้างเหมาขับรถขนถ่าย เที่ยวๆละ 2500 บาท	5,000.-	30,000.-	183,800.-		206,600.-
3.ค่าวัสดุ					
-6-well TC Plate 50/cs.	2,100.-	42,00.-	190,100.-		200,300.-
-96well TC Plate 100/cs	4,200.-	42,00.-	198,500.-		191,900.-
-75 Sq.cm. TC Flask Vent Cap 100/cs.	4,500.-	4,500.-	207,500.-		182,900.-
-Syringe Filter 26 nm.0.2 um. SFCA,S, 50/cs.	2,000.-		209,500.-		180,900.-
-Fetal Bovine Serum	25,680.-	5,350.-	240,530.-		149,870.-
-Cryospeed Nitrogen	3,825.-	3,825.-	248,180.-		142,220.-
-Ethy Acetate, CG 20L	6,500.-		254,680.-		135,720.-
-Methanol, CG 20L	2,900.-		257,580.-		132,820.-
-GF-1 Tissue DNA Extraction Kit	4,718.-		262,298.-		128,102.-
-GeneRuler 1 kb DNA Ladder	4,601.-		266,899.-		123,501.-
-Caspase 3 activity	34,600.-		301,499.-		88,901.-
-DNA Polymerase		12,500.-	313,999.-		76,401.-
-Trizol Reagent		7,500.-	321,499.-		68,901.-
-RPMI 1640		6,750.-	328,249.-		62,151.-
-Pencillin Strep		4,320.-	332,569.-		57,831.-
-Microcentrifuge		2,140.-	334,709.-		55,691.-
-T 25 Flask		5,638.-	340,347.-		50,053.-
- Stripette 5, 10,20 ml		10,352.-	350,699.-		39,701.-
-Tip 10, 200 ul		2,514.-	353,213.-		37,187.-
-Becton Diskinson tube		4,601.-	357,814.-		32,586.-

4.ค่าใช้จ่าย ค่าบริการกล้อง จุลทรรศน์แบบฟลูออ เรสเซนส์สำหรับถ่ายภาพ	15,500	17,000.-	390,314.-		86.-
5.ค่าใช้จ่ายอื่นๆ					
รวม	149,724.-	240,590.-	390,314.-	390,400.-	86.-

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 = 195,200.-บาท เมื่อ เมษายน 2554

งวดที่ 2 = 0 บาท เมื่อ

รวม = 195,200.- บาท

จันทร์วรรณ แสงแจ

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

บรรณานุกรม (Bibliography)

- Bredholdt H, Fjaervik E, Johnsen G & Zotchev S. B. Actinomycetes 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 actinomycetes bacteria from the shallowwater sediments from of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity. *Environ Microbiol*. 2007; 9: 2756-64.
- Chang HB & Kim JH. Antioxidant properties of dihydroherbimycin A from a newly isolated from *Streptomyces* sp. *Biotechnol Lett*. 2007; 29: 599-603.
- Chau GY, Lui WY, Tsay SH, Chao Y, King KL, Wu CW. Post resectional adjuvant intraportal chemotherapy in patients with hepatocellular carcinoma: a case-control study. *Ann Surg Oncol*. 2006; 13: 1329-37.
- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35: 495-516.
- Fang J, Zhang Y, Huang L, Jia X, Zhang Q, Zhang X, Tang G & Liu W. Cloning and Characterization of the Tetrocarcin A Gene Cluster from *Micromonospora chalcea* NRRL 11289 Reveals a Highly Conserved Strategy for Tetronate Biosynthesis in Spirotetronate Antibiotics. *J Bacteriol*. 2008; 190(17): 6014-25.
- Fiedler HP, Bruntner C, Bull AT, Ward, AC, Goodfello M, Potterat, O., Puder, C. & Mihm G. Marine Actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Anton Leeuw*. 2005; 87: 37-42.
- 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.
- Hu W & Kavanagh JJ. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol*. 2003; 4: 721-29.
- Jensen PR, Dwight R & Fenical W. Distribution of Actinomycetes in near-shore marine sediments. *Appli Environ Microbiol*. 1991, 57 ; 1102-08.
- Kasibhatla S & Tseng B. Why Target Apoptosis in Cancer Treatment? *Mol Cancer Ther*. 2003; 2: 573-80.
- Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*. 2000; 256: 42-49.
- Komatsu K, Tsuda M, Shiro M, Tanaka Y, Mikami Y & Kobayashi J. Brasilicardins B-D new tricyclic terpenoids from actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *Bioorg Med Chem*. 2004, 12; 5545-51.
- Lam KS. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin Microbiol*. 2006; 9: 245-51.

- Lazzarini AL, Cavaletti G, Toppo FM. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Anton Leeuw*. 2000; 78: 399-405.
- 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.
- Maldonado LA, Stach J.E, Pathom-aree, W, Ward AC, Bull AT & Goodfellow M. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Anton Leeuw*. 2005; 87: 11-18.
- Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA & Fenical W. Wide spread and persistent population of a major new marine actinomycetes taxon in ocean sediments. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68: 5005-11.
- Moon HS, Lim H, Moon S, Oh HL, Kim YT, Kim MK & Lee CH. Benzylidihydroxyoctenone, a novel anticancer agent induces apoptosis via mitochondrial mediated pathway in androgen-sensitive LNCaP prostate cancer cells. *Bioorg Med Chem*. 2009; 19: 742-44.
- Nakajima HK, Sakaguchi I, Fujiwara M, Mizuta M, Tsuruga J, Mizuta N. Apoptosis and inactivation of the PI3-kinase pathway by tetrocarcin A in breast cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2007; 356: 260-265.
- Pathom-aree W, Stach JEM, Ward AC, Hrikoshi K, Bull AT & Goodfellow, M. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10, 898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*. 2006; 10: 181-89.
- Reed JC. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med*. 2001; 7: 314-19.
- Shin HJ, Kim TS, Lee HS, Park JY, Choi IK & Kwon HJ. Streptopyrrolidine, an angiogenesis inhibitor from a marine-derived *Streptomyces* sp. KORDI-3973. *Phytochemistry*. 2008; 69: 2363-66.
- Sousa TDS, Jimenez PC, Ferreira EG, Silveira ER, Braz-Filho R, Pessoa ODL & Costa-Lotufo LV. Anthracyclinones from *Micromonospora* sp. *J Nat Prod*. 2012; Article ASAP: A-E.
- 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 *Saccharopolyspora salina* VITSDK4 isolated from the bay of Bengal coast of India. *American J Infect Dis*. 2009; 5(2): 90-98.

- Takizawa M, Colewell R & Hill R. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59: 997-1002.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman Z N. Apoptosis: Mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol.* 2005; 84: 627-39.
- Vijayakuma R, Muthukumar C, Thajuddin, N, Panneerselvan A & Saravanamuthu R. Studies On the diversity of actinomycetes in the Palk Straight region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetologica.* 2007; 21: 59-65.
- Wang H, Yeo SL, Xu J, Xu X, He H, Ronca F, Ting AE, Wang Y, Yu VC, Sim MM. Isolation of Streptonigrin and Its Novel Derivative from *Micromonospora* as Inducing Agents of p53-Dependent Cell Apoptosis. *J Nat Prod.* 2002; 65: 721-24.
- Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S and Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. *J Biol Chem.* 2004; 279(24): 25535-43.
- 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 actinomycetes subspecies-derived anti-tumor macrolide functions as a novel topoisomerase II poison. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6(11): 3059-60.
- 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. *Federation of European materials societies microbiology letters.* 2000; 188: 87-91.