6. ผลการวิจัย

6.1 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

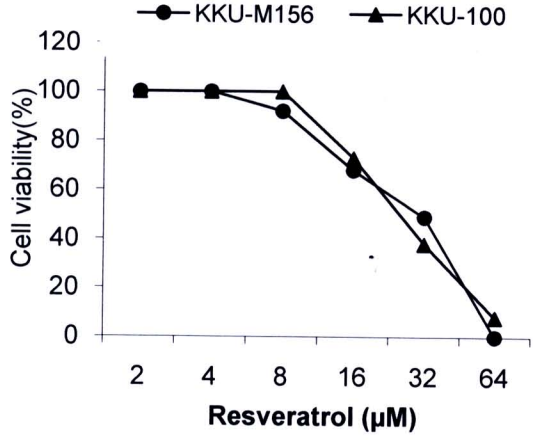
พบว่า resveratrol มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบ dose dependent ดังแสดงในรูปที่ 1 ในระดับดีมาก โดยให้ค่า IC_{50} values เป็น 33.5 ± 0.12 μM และ 17.04 ± 1.40 μM ใน KKU-100 และ KKU-M156 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

6.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของยาเคมีบำบัด

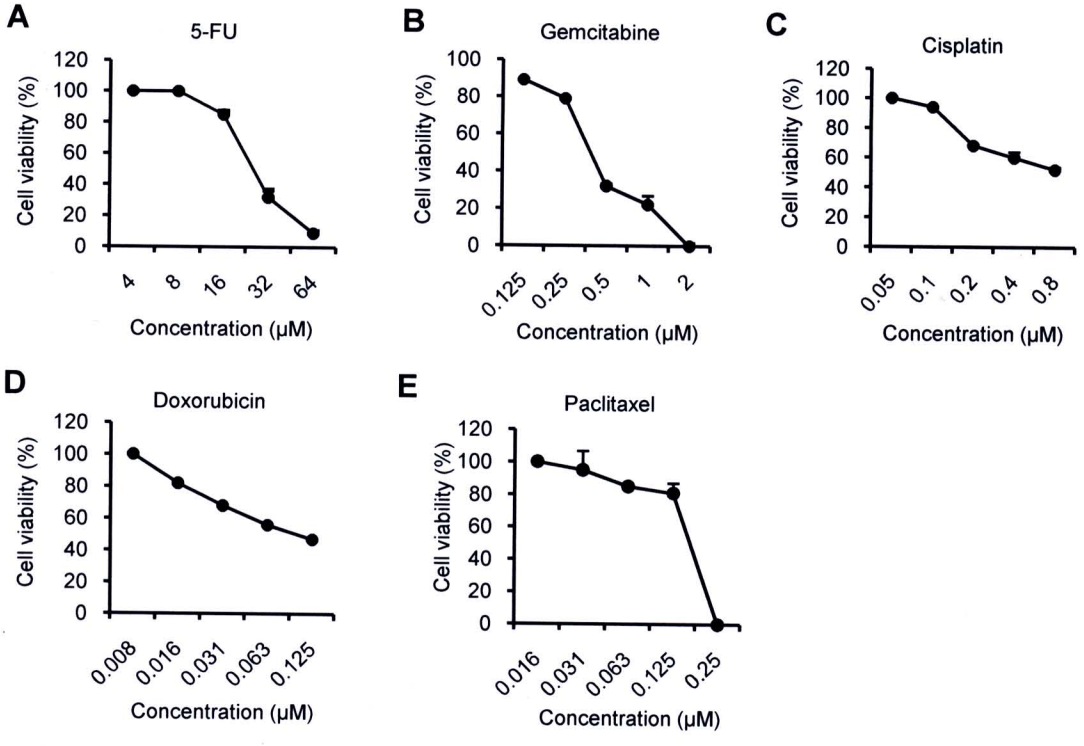
พบว่ายาเคมีบำบัด 5-FU, gemcitabine, cisplatin, doxorubicin และ paclitaxel มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบ dose dependent ทั้งใน KKU-100 (รูปที่ 2) และ KKU-M156 cells (รูปที่ 3) โดยให้ค่า IC_{50} values อยู่ในช่วง 0.01 ± 0.01 μM ถึง 32.79 ± 4.73 μM ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า IC_{50} ของ resveratrol, 5-FU, gemcitabine, cisplatin, doxorubicin และ paclitaxel ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 และ KKU-M156 โดยทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งในสภาวะที่ใส่และไม่ใส่สาร นาน 72 ชั่วโมง ทำการหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี SRB assay หาค่า IC_{50} แสดงผลเป็นค่า mean ± SEM (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

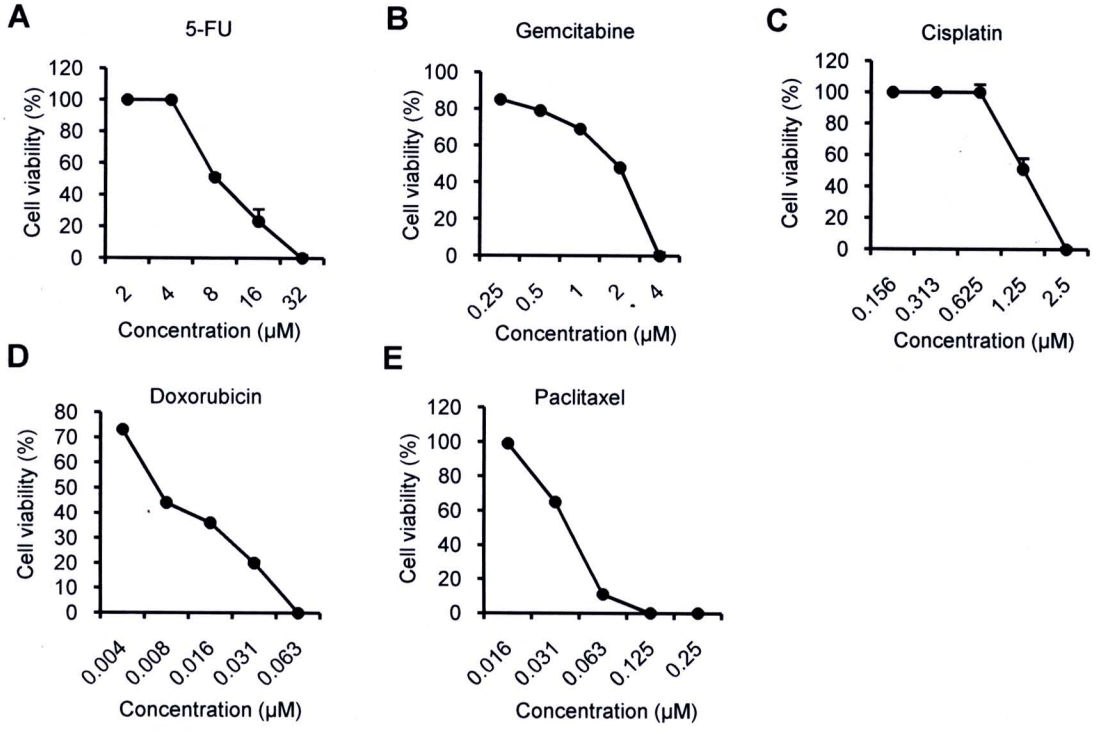
Drugs	IC_{50} value (μM)	
	KKU-100	KKU-M156
5-FU	32.79 ± 4.73	10.13 ± 2.73
Gemcitabine	0.33 ± 0.09	0.72 ± 0.06
Cisplatin	0.49 ± 0.14	0.27 ± 0.08
Doxorubicin	0.66 ± 0.07	0.01 ± 0.01
Paclitaxel	0.08 ± 0.003	0.04 ± 0.01
Resveratrol	33.50 ± 0.12	17.04 ± 1.4



รูปที่ 1 ฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดย resveratrol ตรวจปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดย SRB assay ค่าแสดงในรูปของ mean ± SEM ที่ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง



รูปที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 โดยยาเคมีบำบัด 5-FU, gemcitabine, cisplatin, doxorubicin และ paclitaxel ตรวจปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดย SRB assay ค่าแสดงในรูปของ mean ± SEM ที่ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง

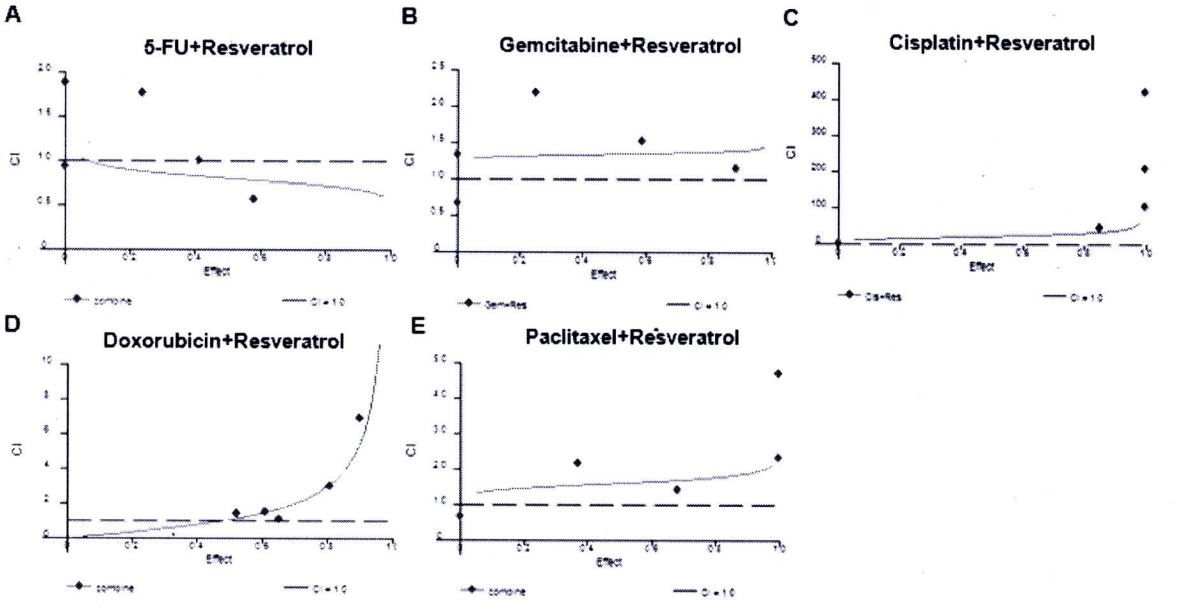


รูปที่ 3 ฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M156 โดยยาเคมีบำบัด 5-FU, gemcitabine, cisplatin, doxorubicin และ paclitaxel ตรวจปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดย SRB assay ค่าแสดงในรูปของ mean ± SEM ที่ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง

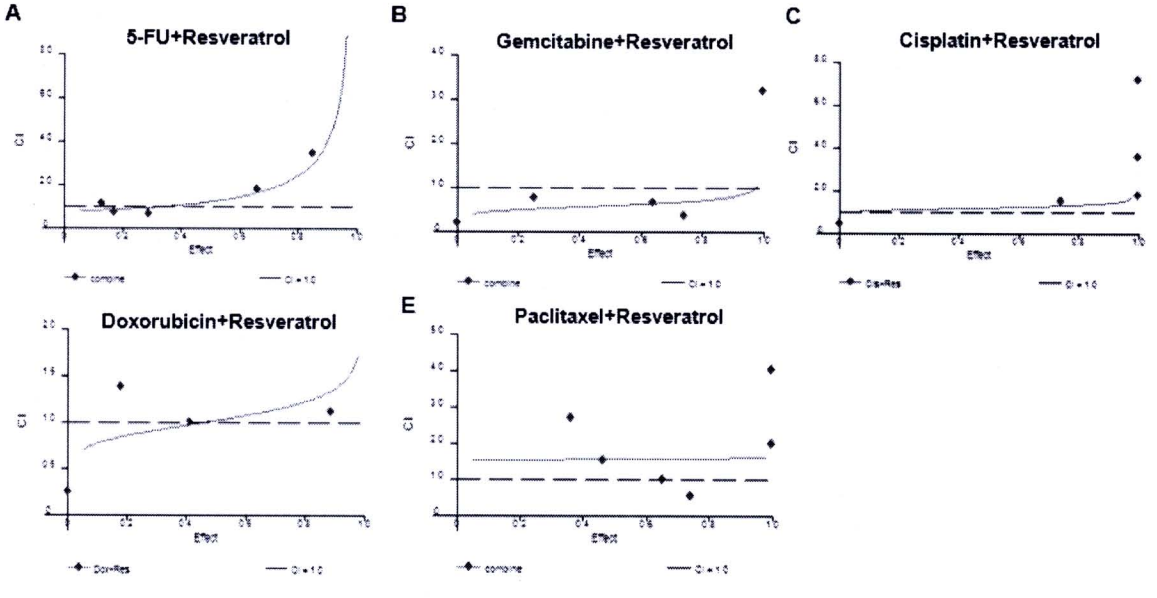
6.3 การศึกษาผลการใช้ร่วมกันของ resveratrol กับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและ Chang cell

พบว่าเมื่อทำการทดสอบในเซลล์ KKU-100 ทดสอบโดยใช้ resveratrol ร่วมกับ 5-FU จะให้ผลเสริมฤทธิ์ (synergism) ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง โดยให้ค่า combination index (CI) น้อยกว่า 1 ในขณะที่เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ resveratrol ร่วมกับ gemcitabine, cisplatin, doxorubicin หรือ paclitaxel จะให้ผลต้านฤทธิ์กัน (antagonism) ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง โดยให้ค่า combination index (CI) มากกว่า 1 ดังแสดงในรูปที่ 4

เมื่อทำการทดสอบในเซลล์ KKU-M156 ทดสอบโดยใช้ resveratrol ร่วมกับ gemcitabine จะให้ผลเสริมฤทธิ์ (synergism) ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง โดยให้ค่า combination index (CI) น้อยกว่า 1 ในขณะที่เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ resveratrol ร่วมกับ 5-FU, cisplatin, doxorubicin หรือ paclitaxel จะให้ผลต้านฤทธิ์กัน (antagonism) ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง โดยให้ค่า combination index (CI) มากกว่า 1 ดังแสดงในรูปที่ 5

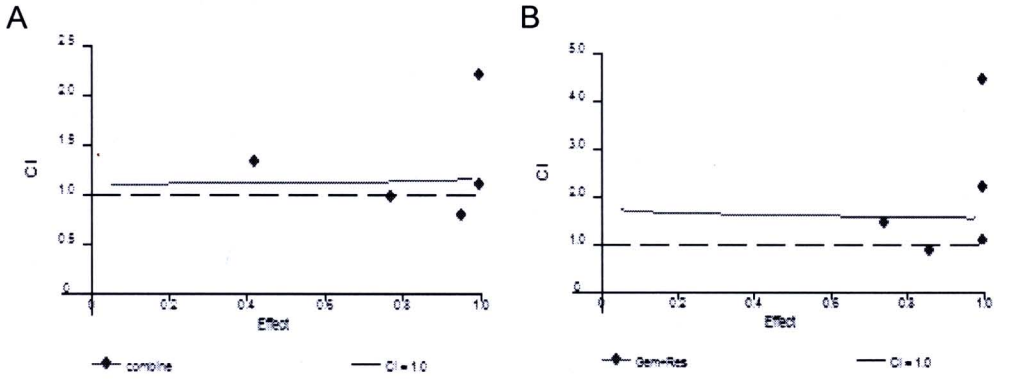


รูปที่ 4 ผลการใช้ร่วมกันของ resveratrol กับ 5-FU, gemcitabine, cisplatin, doxorubicin หรือ paclitaxel (A, B, C, D, E) ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 กราฟที่เป็นเส้นทึบแสดงค่า combination index (CI) โดยค่า CI < 1 = synergism, CI = 1 = additive effect, CI > 1 = antagonism



รูปที่ 5 ผลการใช้ร่วมกันของ resveratrol กับ 5-FU, gemcitabine, cisplatin, doxorubicin หรือ paclitaxel (A, B, C, D, E) ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M156 กราฟที่เป็นเส้นทึบแสดงค่า combination index (CI) โดยค่า CI < 1 = synergism, CI = 1 = additive effect, CI > 1 = antagonism

เมื่อทำการทดสอบใน Chang cell ทดสอบโดยใช้ resveratrol ร่วมกับ 5-FU ที่ความเข้มข้นเดียวกันกับที่ให้ผลเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง KKU-100 (รูปที่ 6A) หรือทดสอบโดยใช้ resveratrol ร่วมกับ gemcitabine ที่ความเข้มข้นเดียวกันกับที่ให้ผลเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง KKU-M156 (รูปที่ 6B) พบว่าจะให้ผลต้านฤทธิ์กัน (antagonism) ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Chang cell โดยให้ค่า combination index (CI) มากกว่า 1 ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 ผลการใช้ร่วมกันของ resveratrol กับ 5-FU (A) หรือ gemcitabine (B) ใน Chang cell กราฟที่เป็นเส้นทึบแสดงค่า combination index (CI) โดยค่า CI < 1 = synergism, CI = 1 = additive effect, CI > 1 = antagonism

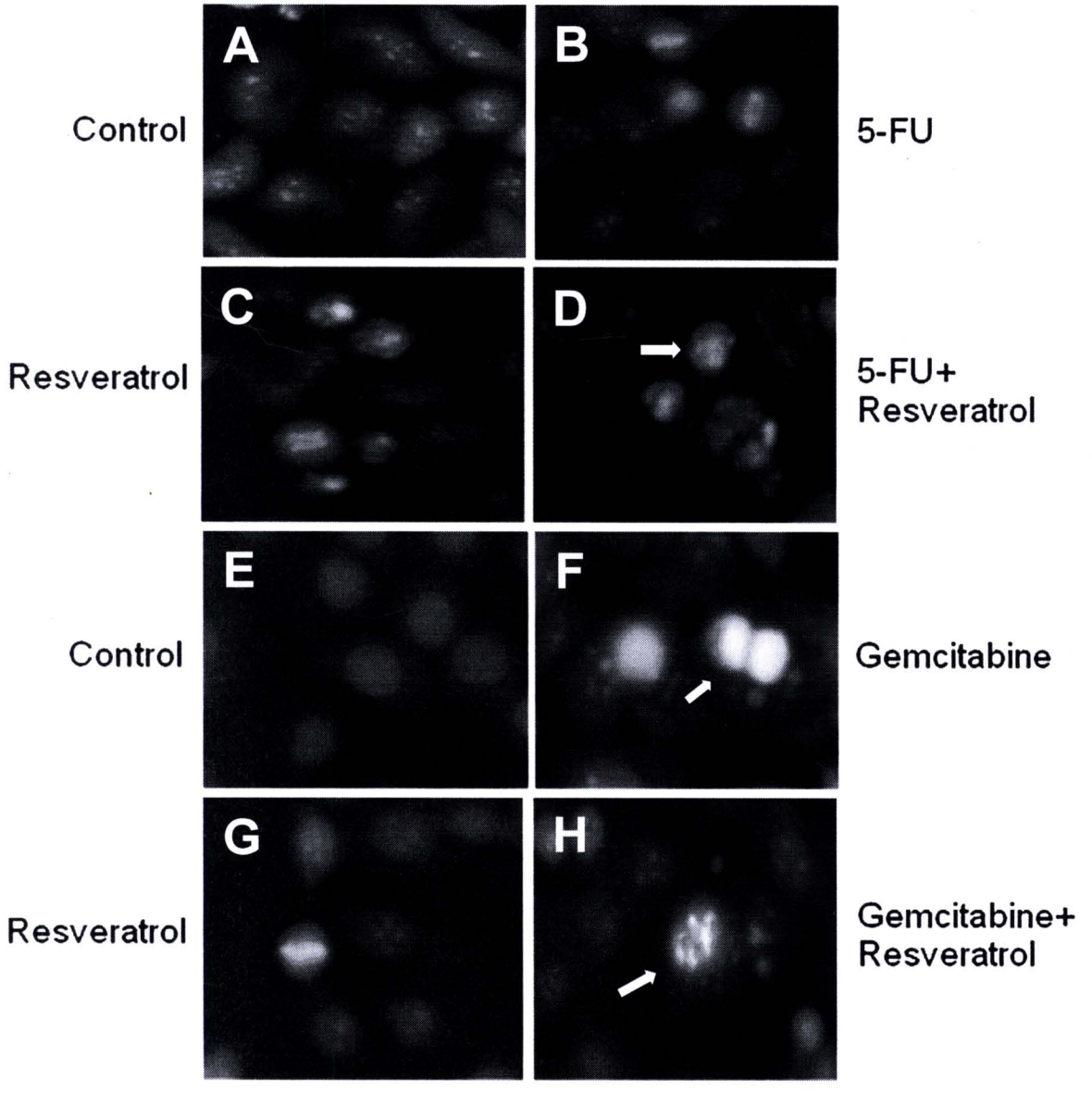
6.4 ศึกษากลไกเบื้องต้นในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

จากการทำ ethidium bromide/acridine orange staining พบว่า resveratrol, 5-FU และ gemcitabine มีฤทธิ์ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis โดยพบเซลล์มะเร็งที่ถูก treat ด้วยสารจะเกิด chromatin condensation และ nuclear fragmentation (รูปที่ 7) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis

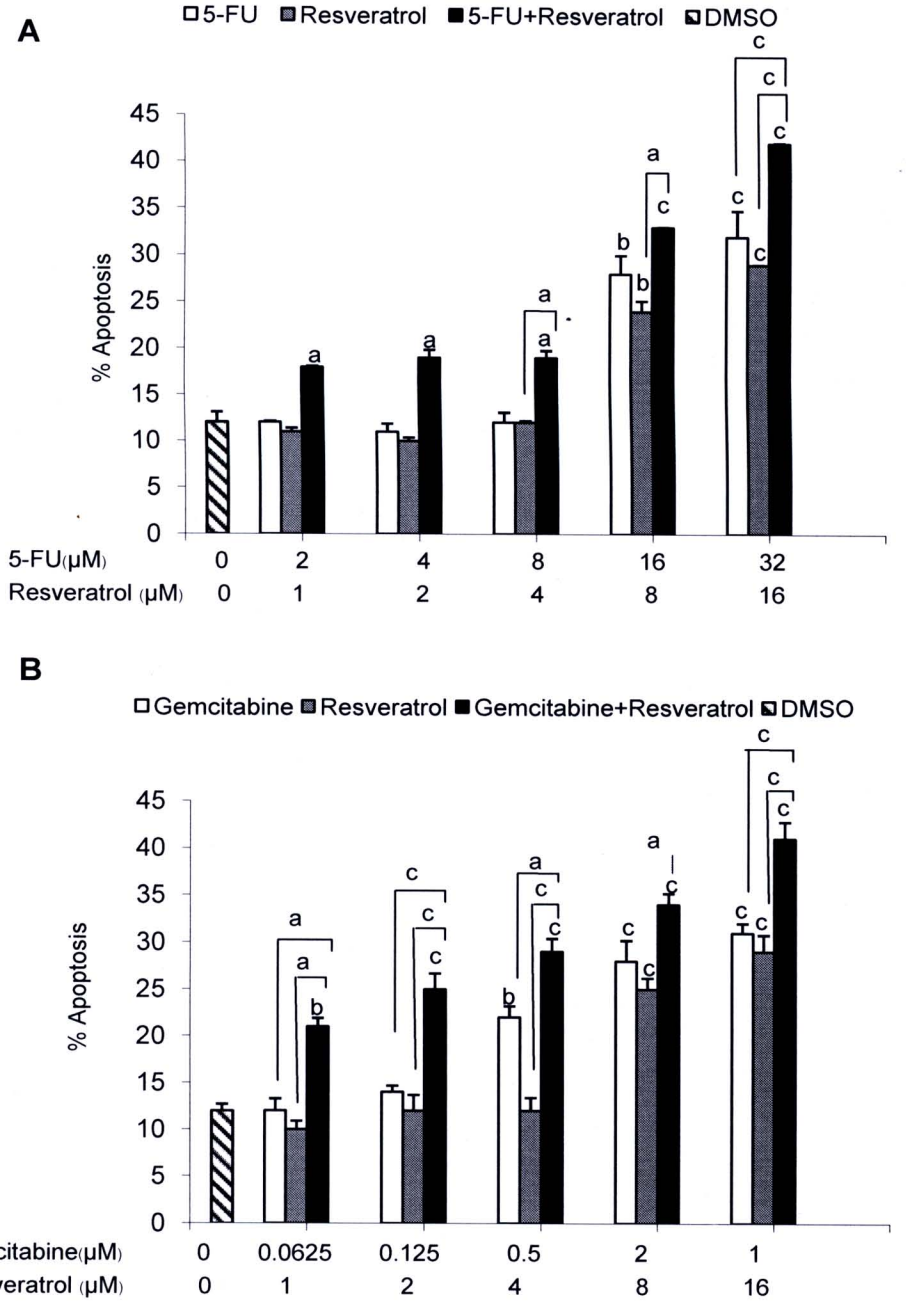
เมื่อทำการทดสอบในเซลล์ KKU-100 ทดสอบโดยใช้ resveratrol ร่วมกับ 5-FU พบว่าปริมาณเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมและเซลล์ที่ treat ด้วย resveratrol หรือ 5-FU เพียงอย่างเดียว แบบ dose dependent manner (รูปที่ 8A)

เมื่อทำการทดสอบในเซลล์ KKU-M156 ทดสอบโดยใช้ resveratrol ร่วมกับ gemcitabine พบว่าปริมาณเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมและเซลล์ที่ treat ด้วย resveratrol หรือ gemcitabine เพียงอย่างเดียว แบบ dose dependent manner (รูปที่ 8B)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 17 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 248973
เลขเรียกหนังสือ



รูปที่ 7 การชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ KKU-100 เซลล์ควบคุม (A) เซลล์ที่ถูก treat ด้วย 5-FU (B) เซลล์ที่ถูก treat ด้วย resveratrol (C) และเซลล์ที่ถูก treat ด้วย 5-FU + resveratrol (D) การชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ KKU-M156 เซลล์ควบคุม (E) เซลล์ที่ถูก treat ด้วย gemcitabine (F) เซลล์ที่ถูก treat ด้วย resveratrol (G) และเซลล์ที่ถูก treat ด้วย gemcitabine + resveratrol (H) การตรวจดูรูปร่างของเซลล์โดยใช้ ethidium bromide/acridine orange staining แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence ลูกศรแสดง chromatin condensation และ nuclear fragmentation



รูปที่ 8 เปอร์เซ็นต์ apoptotic cell ของ KKU-100 (A) และ KKU-M156 (B) เมื่อถูก treat ด้วย resveratrol, 5-FU, gemcitabine, 5-FU + resveratrol หรือ gemcitabine + resveratrol ที่ความเข้มข้นที่กำหนด นาน 48 ชั่วโมง แล้วทำ EB/AO staining จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 500 เซลล์ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ apoptotic cell ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SEM จากการทดลอง 3 ครั้ง $^{a}P < 0.05$, $^{b}P < 0.01$, $^{c}P < 0.001$ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม หรือเทียบระหว่างเมื่อ treat กับยาหรือสารเพียงอย่างเดียวกับยาร่วมกับสาร