

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

“ผลการใช้ร่วมกันของ caged xanthenes ที่แยกได้จากต้น *Garcinia hanburyi* กับยาเคมีบำบัดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี และกลไกในระดับโมเลกุล”

เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่มาพบแพทย์เมื่อมะเร็งได้พัฒนาสู่ระยะสุดท้าย หรือระยะแพร่กระจายซึ่งทำให้การบำบัดรักษาโดยการผ่าตัดให้พยากรณ์โรคที่ไม่ดี อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยหลังผ่าตัดที่มีชีวิตถึง 5 ปีต่ำมาก การใช้ยาต้านมะเร็งก็ให้ผลในการรักษาต่ำ เนื่องจากการดื้อต่อยาและเกิดอาการพิษของยาร่วมด้วย ดังนั้น การนำสารสกัดจากธรรมชาติที่ได้ทำการศึกษาแล้วพบว่ามียุทธียับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดยไปชักนำให้เกิด cell cycle arrest และ การตายแบบ apoptosis และมีความเป็นพิษต่ำ มาศึกษาฤทธิ์ร่วมกับยาเคมีบำบัดในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจึงมีความจำเป็น ดังนั้น การเลือกใช้สมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่กำลังมีการศึกษาเพิ่มขึ้น

รงทอง เป็นพืชในวงศ์ Guttiferae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Garcinia hanburyi* Hook. f. ได้มีการนำมาใช้เป็นยาถ่าย ยารักษาแผลติดเชื้อ รักษาโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรัง ริดสีดวงทวาร และแผลกดทับ (9) จากการศึกษาสารเคมีพบว่า ยาง ผล และลำต้น มีสาร caged xanthenes หลายชนิด ได้แก่ desoxymorellin, isomorellin, isomorellinol, morellic acid, gambogic acid, desoxygambogenin, hanburin, forbesione และ dihydroisomorellin (10, 11, 12, 13) มีรายงานการทดลองพบว่าสารสกัดจากรงทองมีฤทธิ์ต้านอักเสบ ฤทธิ์ลดไข้ และฤทธิ์แก้ปวด (14) และยังพบว่าสาร caged xanthenes หลายชนิดมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด รวมทั้งฤทธิ์ anti-tumor (10, 11, 12, 15, 16) จากการศึกษาโดยจริยา หาญจนวนวงศ์และคณะ พบว่าสาร caged xanthone 4 ชนิด ได้แก่ isomorellin, isomorellinol, gambogic acid และ forbesione ที่แยกได้จากรงทองสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 และ KKU-M156 เกิด apoptosis โดยกลไกการเกิด apoptosis เกิดผ่านทาง mitochondrial pathway ทั้งแบบ caspase-dependent และ caspase-independent pathway (ทุนวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่นปี 2549-2550) และยังพบว่า isomorellin, isomorellinol, gambogic acid และ forbesione ชักนำให้เกิด G0/G1 arrest ใน KKU-100 และ KKU-M156 (ทุนวิจัย PERCH-CIC ปี 2550-2552) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะศึกษาผลการใช้ร่วมกันของ isomorellin, isomorellinol, gambogic acid และ forbesione กับยาเคมีบำบัดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยจะทำการตรวจสอบฤทธิ์ cytotoxicity ของยาเคมีบำบัด (5-FU, Gemcitabine, Cisplatin, Doxorubicin และ Paclitaxel) ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี SRB assay แล้วทำการศึกษาผลการใช้ร่วมกันของ caged xanthone 4 ชนิดกับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี จากนั้นทำการศึกษากลไกเบื้องต้นในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยทำ apoptosis assay ด้วยวิธี EB/AO staining และกลไกในระดับโมเลกุลโดยศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2, Bax, survivin, activated caspase-3 และ activated caspase-9 ด้วยวิธี western blot analysis

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1 เพื่อศึกษาถึงฤทธิ์ cytotoxicity ของยาเคมีบำบัด (5-FU, Gemcitabine, Cisplatin, Doxorubicin และ Paclitaxel) ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี SRB assay
- 2 เพื่อศึกษาผลการใช้ร่วมกันของสารบริสุทธิ์จาก *Garcinia hanburyi* 4 ชนิด (isomorellin, isomorellinol, forbesione และ gambogic acid) กับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี และเซลล์ปกติ
- 3 เพื่อศึกษากลไกเบื้องต้นในการยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีของสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรร่วมกับยาเคมีบำบัดที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กันต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่ถูกชักนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis โดยวิธี EB/AO staining

4 เพื่อศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของการเกิดกระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็งโดยตรวจดูการ แสดงออกของโปรตีน Bcl-2, Bax, survivin, activated caspase-3 และ activated caspase-9 โดยวิธี western blot

วิธีดำเนินการวิจัย

1 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของ caged xanthenes 4 ชนิดและยาเคมีบำบัดในเซลล์เพาะเลี้ยง มะเร็งท่อน้ำดี ทำการทดสอบโดยตรวจหาปริมาณของ cellular protein ด้วยวิธี sulforhodamine B (SRB) assay ตามวิธีของ Skehan และคณะ (1990) จากการทดสอบทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของ caged xanthenes 4 ชนิดและของยาเคมีบำบัดที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ 50% (IC_{50})

2 การทดสอบฤทธิ์การใช้ร่วมกันของ caged xanthenes 4 ชนิดกับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในเซลล์ เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ทำการทดสอบโดยตรวจหาปริมาณของ cellular protein ด้วยวิธี sulforhodamine B (SRB) assay ตามวิธีของ Skehan และคณะ (1990) ในการทดสอบทำโดย เติมสารละลายยาและสารละลาย resveratrol ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมลงในเซลล์ แล้วทำ SRB assay ดังรายละเอียดในข้อ 1 จากนั้นทำการ วิเคราะห์ผลโดยใช้วิธีของ Chou and Talalay

3 Apoptosis assay ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษากลไกการเกิด apoptosis โดยการดู nuclear morphology ด้วยวิธี ethidium bromide/acridine orange (EB/AO) staining เซลล์ที่เกิด apoptosis จะมี นิวเคลียสที่มี condensed chromatin และพบ fragmented apoptotic nuclei ทำการนับเซลล์ที่เกิด apoptosis จากเซลล์ทั้งหมด 500 เซลล์ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis และ คำนวณหาค่า mean $\pm$ SEM ของการทดลอง 3 ครั้ง ต่อไป

4 Statistical analysis ทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วย Student's *t* test ของค่า mean $\pm$ SEM ของการทดลองที่ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

ผลการวิจัย

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี K KU-100 และ K KU-M156 โดยใช้ สาร caged xanthenes 4 ชนิด, 5-FU, gemcitabine, cisplatin, doxorubicin และ paclitaxel พบว่า caged xanthenes 4 ชนิด และยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ในระดับที่ตีความ

จากนั้นจึงทำการศึกษาผลการใช้ร่วมกันของ caged xanthenes 4 ชนิด กับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในเซลล์ เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและ Chang cell พบว่า ในเซลล์ K KU-100 ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในเซลล์ที่ treat ด้วย cisplatin+gambogic acid และ doxorubicin+forbesione ในขณะที่ ในเซลล์ K KU-M156 ให้ผลเสริมฤทธิ์กัน สำหรับเซลล์ที่ treat ด้วย cisplatin + isomorellin และ doxorubicin+isomorellin โดยให้ค่า combination index (CI) น้อยกว่า 1 ในขณะที่ เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของ caged xanthenes ร่วมกับยาเคมี บำบัดที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กันมาทดสอบใน Chang cell พบว่าให้ผลต้านฤทธิ์กัน (antagonism) ในการยับยั้งการเพิ่ม จำนวนของเซลล์ โดยให้ค่า combination index (CI) มากกว่า จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้ cisplatin+gambogic acid, doxorubicin+forbesione, cisplatin+isomorellin และ doxorubicin+isomorellin จะมีความจำเพาะในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยไม่มีผลกับ เซลล์ตับปกติ (Chang cell)

ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้น พบว่า เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ combinations ที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กัน มา treat เซลล์ K KU-100 และเซลล์ K KU-M156 พบว่า สามารถชักนำให้ เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis โดยเมื่อทำ EB/AO staining พบว่าเซลล์มะเร็งที่ถูก treat ด้วยสาร จะเกิด chromatin condensation และ nuclear fragmentation ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ apoptotic cell และยังพบว่าปริมาณของ apoptotic cell ในเซลล์ที่ treat ด้วย caged xanthenes ร่วมกับยาเคมีบำบัดจะสูง กว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมและเซลล์ที่ treat ด้วย caged xanthenes หรือ ยาเคมี บำบัดเพียงอย่างเดียว จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า caged xanthenes มีผลไปเสริมฤทธิ์ยาเคมีบำบัดใน การชักนำให้เกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ข้อเสนอแนะการวิจัย

เนื่องจาก จากผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่า caged xanthones ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว สามารถชักนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (KKU-100 และ KKU-M156) (ทุนวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี 2549-2550) และชักนำให้เกิด G0/G1 arrest ใน KKU-100 และ KKU-M156 (ทุนวิจัย PERCH-CIC ปี 2550-2552) ดังนั้น ผลจากการศึกษาค้นคว้าพบว่า caged xanthones มีฤทธิ์ในการเสริมฤทธิ์ยาเคมีบำบัดในการฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผลที่ได้จะสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของการทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (ซึ่งอยู่ในระหว่างดำเนินการศึกษา ทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีงบประมาณ 2556) ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาในสัตว์ทดลอง และในการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็ง หรือใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็งเพื่อลดความเป็นพิษของยาต้านมะเร็งต่อเซลล์ปกติ ต่อไปในอนาคต