ผลการทดลอง

1. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

สารสกัดบริสุทธิ์ จำนวน 5 ชนิด คือ สาร phyllanthusol A สารสกัดจากสมุนไพรซาไก สารสกัดจากต้นสอยดาว สารสกัดจากต้นสักขี A และ สารสกัดจากต้นสักขี B ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ประเภท คือ เซลล์มะเร็งลำไส้ (รูปที่ 1) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (รูปที่ 2) และ เซลล์มะเร็งตับ (รูปที่ 3) โดยเปรียบเทียบผลกับยาควบคุม doxorubicin และใช้วิธีการ MTT assay ในการทดสอบ เมื่อทำการหาค่า IC_{50} ของสารสกัดบริสุทธิ์ ทั้ง 5 ชนิด ได้ผลดังตารางที่ 1

2. การศึกษาลักษณะภายนอกและการหดตัวของโครมาติน

มีเซลล์จำนวนมากที่มีการเปลี่ยนแปลงขนาดเหี่ยวเล็กลง และ บางเซลล์ยังมีลักษณะของการโป่งพองของเยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 4) ซึ่งเซลล์ที่มีลักษณะเช่นนี้จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามเวลาของการทดสอบที่เพิ่มมากขึ้น และเมื่อทำการย้อมด้วย DAPI ซึ่งเป็นสีที่ย้อมติดดีเอ็นเอ พบว่า ลักษณะของนิวเคลียสบางเซลล์มีการหดตัวและติดสีเข้มขึ้น บางเซลล์มีการแตกออกเป็นส่วนของนิวเคลียสเล็กๆ ซึ่งจะแยกได้ชัดจากเซลล์ปกติที่มีการกระจายของโครมาตินทั่วนิวเคลียส (รูปที่5)

3. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 และผลของ caspase-3, caspase-8 และ caspase-9 inhibitors ต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase-3

จากการทดสอบการทำงานของ caspase-3 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่บ่มกับสารสมุนไพรซาไกพบว่ามีการทำงานเพิ่มมากขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้นจาก 0, 3, และ 6 ชม (รูปที่6) และเมื่อนำเซลล์บ่มกับ caspase-8 inhibitor หรือ caspase-9 inhibitor แล้วเติมด้วยสารสกัดสมุนไพรซาไกเป็นเวลา 6 ชม แล้วทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ซึ่งผลการทดสอบพบว่าตัวยับยั้งทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของ caspase-3 ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่าการกระตุ้นจากสารสมุนไพรซาไกนั้นมีกลไกที่ผ่านทั้งเอนไซม์ caspase-8 และ caspase-9

4. การตรวจสอบการหลั่งของ cytochrome c จากไมโตคอนเดรีย

เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรซาไก นำมาตรวจสอบการหลั่งของ cytochrome c จากไมโตคอนเดรียด้วยวิธี western blotting ซึ่งพบว่าสมุนไพรซาไกสามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของ cytochrome c จากไมโตคอนเดรียได้จริง (รูปที่ 7)โดยพบว่า cytochrome c มีปริมาณเพิ่มขึ้นในส่วนของ cytosol และมีลดลงในส่วนของ mitochondrial pellet โดยในการทดลองได้ทำการตรวจสอบโปรตีนมาตรฐาน actin ด้วย ซึ่งพบว่ามีปริมาณที่ใกล้เคียงกันในทุกตัวอย่าง

5. การตรวจสอบการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Bid

เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรซาไก นำมาตรวจสอบการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Bid ด้วยวิธี western blotting ซึ่งพบว่าสมุนไพรซาไกสามารถกระตุ้นให้เกิด Bid cleavage ได้จริง (รูปที่ 8)โดยพบว่าโปรตีน Bid ในรูปของ pro-form มีปริมาณลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารมีมากขึ้น โดยในการทดลองได้ทำการตรวจสอบโปรตีนมาตรฐาน actin ด้วย ซึ่งพบว่ามีปริมาณที่ใกล้เคียงกันในทุกตัวอย่าง

6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน p53 และ Bcl-2

การแสดงออกของโปรตีน p53 และ Bcl-2 ตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR และ1.5 % agarose gel electrophoresis ซึ่งจากผลการตรวจสอบพบว่า ระดับของการแสดงออกของยีน p53 มีเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้สารสมุนไพรซาไก ส่วนระดับการแสดงออกของยีน Bcl-2 มีลดลง โดยในการทดลองได้เลือกใช้ยีน G3PDH เป็นตัวควบคุมปริมาณ ซึ่งผลพบว่าระดับการแสดงออกมีใกล้เคียงกันในทุกตัวอย่าง (รูปที่ 9)

<u>สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง</u>

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จากสารสกัดจากพืชในประเทศไทย โดยทดสอบสารสกัดบริสุทธิ์จำนวน 5 ชนิด คือ สาร phyllanthusol A สารสกัดจากสมุนไพรซาไก สารสกัดจากต้นสอยดาว สารสกัดจากต้นสักขี A และ สารสกัดจากต้นสักขี B สารสกัดทั้ง 5 ชนิด ทำการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีในเซลล์มะเร็ง 3 ประเภท คือ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela) (รูปที่ 1) เซลล์มะเร็งลำไส้ (COLO 205) (รูปที่ 2) และ เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) (รูปที่ 3) ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากสมุนไพรซาไก สารสกัดจากต้นสักขี A และ สารสกัดจากต้นสักขี B มีการออกฤทธิ์อยู่ในระดับดีในเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ประเภท คือ มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 4-30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ สาร phyllanthuso! A และ สารสกัดจากต้นสอยดาว มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 30-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อทำการศึกษาถึงกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากธรรมชาตินี้ ได้เลือกเซลล์มะเร็งปากมดลูกเป็นแม่แบบในการศึกษา และเลือกสารสกัดจากสมุนไพรซาไกเป็นสารที่ใช้ในการกระตุ้น ซึ่งจากผลการศึกษาเบื้องต้น โดยการดูที่ลักษณะภายนอก (morphological study) พบว่าลักษณะของเซลล์มะเร็งภายหลังจากกระตุ้นด้วยสารสกัดจากสมุนไพรซาไก มีการหดตัวของเซลล์ มีการโป่งพองของเยื่อหุ้มเซลล์ มีการแตกออกของเซลล์เป็นส่วนขนาดเล็กๆ (รูปที่ 4) ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญของเซลล์ที่ตายด้วยกระบวนการ apoptosis และเมื่อทำการย้อมนิวเคลียสด้วย DNA staining dye โดยใช้ DAPI ในการย้อม พบว่านิวเคลียสของเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากสมุนไพรซาไกมีการกระจายตัวของโครมาตินทั่วนิวเคลียส ในขณะที่เซลล์ที่ถูกกระตุ้น

ด้วยสารสกัดจากสมุนไพรซาไก มีเซลล์จำนวนหนึ่งมีการหดตัวของนิวเคลียสเห็นลักษณะการติดสีเข้มกว่าปกติ นอกจากนั้นมีการแตกออกของนิวเคลียสเป็นส่วนเล็กๆ (รูปที่ 5) ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีความสอดคล้องกับเซลล์ที่เกิดการตายโดยกระบวนการ apoptosis

นอกจากนั้นเมื่อศึกษาถึงการทำงานของ caspase-3 ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในกลไกการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ก็พบว่ามีเกิดขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดจากสมุนไพรซาไก และยังเพิ่มมากขึ้นสัมพันธ์กับเวลาที่มากขึ้น จึงเป็นการยืนยันได้ว่ากระบวนการที่เกิดขึ้นนี้เป็นการตายแบบ apoptosis สำหรับการวิจัยนี้ยังได้ทำการศึกษาต่อไป ถึงกลไกที่สารสกัดจากสมุนไพรซาไกใช้ในการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ซึ่งจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าโดยทั่วไปแบ่งออกได้เป็น 2 กลไกใหญ่ๆ คือ death receptor pathway และ mitochondrial pathway โดยทั้งสองกลไกนี้จะมี initiator caspase ที่แตกต่างกัน โดย initiator caspase ของ death receptor pathway คือ caspase-8 และสำหรับ mitochondrial pathway คือ caspase-9 ดังนั้นในการทดลองจึงได้ทำการพิสูจน์กลไกที่ใช้ในการกระตุ้น apoptosis ด้วยการใช้ตัวยับยั้งที่จำเพาะต่อเอนไซม์ทั้งสองชนิดและวัดการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ซึ่งเป็น effector caspase ของทั้งสอง pathway ผลการทดสอบพบว่าเกิดการยับยั้งการทำงานของ caspase-3 จากตัวยับยั้งทั้งสองชนิด (caspase-8 และ caspase-9 inhibitor) ซึ่งผลที่ได้นี้ไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ว่าควรพบการยับยั้งด้วยตัวยับยั้งชนิดใดชนิดหนึ่งไม่ใช่ทั้งสองชนิด เมื่อได้ทบทวนวรรณกรรมเพิ่มเติมจึงพบว่าใน death receptor pathway นั้นยังแบ่งออกได้เป็น 2 pathway ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ โดยแบ่งเป็น type I cell และ type II cell ซึ่งทั้งสองประเภทนี้จะมีกลไกย่อยที่ต่อเนื่องจากการกระตุ้นของ caspase-8 ที่แตกต่างกัน โดย type I cell เริ่มต้นจาก caspase-8 แล้วจึงเป็น caspase-3 ตามลำดับ แต่ใน type II cell จะเกิดการกระตุ้นจาก caspase-8 ผ่านทางโปรตีน Bid แล้วไปกระตุ้นการหลั่ง cytochrome c จาก mitochondria จากนั้นจึงกระตุ้น caspase-9 และ caspase-3 เป็นลำดับถัดไป ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบการหลั่งของ cytochrome c ออกจากไมโตคอนเดรีย ซึ่งพบว่ามีการหลั่งของ cytochrome c จริง (รูปที่ 7) จากผลดังกล่าวจึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมจากที่ได้นำเสนอเอาไว้เพื่อให้มีความชัดเจนของกลไกการกระตุ้น โดยได้ตรวจสอบที่การกระตุ้น Bid cleavage ด้วยวิธี western blotting ซึ่งจากผลการทดลองพบว่ามีการตัดโปรตีน Bid ให้ active เป็น truncated Bid (รูปที่ 8)

ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าการกระตุ้นของสารสมุนไพรซาไกต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกมีการกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบ apoptosis และมีการกระตุ้นเป็นแบบ type II cell คือกระตุ้นจาก caspase-8 ผ่านทาง Bid cleavage ซึ่งทำให้เกิดการหลั่งของ cytochrome c และมีการกระตุ้น caspase-9 และ caspase-3 เป็นลำดับ เมื่อ caspase-3 ถูกกระตุ้นแล้วก็จะทำให้เกิดการตัดดีเอ็นเอในนิวเคลียสเกิดลักษณะ DNA fragmentation ขึ้น

นอกจากนั้น คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพิ่มเติมขึ้นจากที่เสนอไว้เพื่อให้เกิดความชัดเจนของงานวิจัย รวมทั้งเพื่อให้มีข้อมูลที่มากพอต่อการตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานในวารสารต่างประเทศ

โดยทำการตรวจสอบถึงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง ได้แก่ กลุ่ม tumor suppressor genes และกลุ่ม proto-oncogenes ซึ่งยีนทั้งสองกลุ่มนี้มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง โดย tumor suppressor genes ช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่ให้มีมากเกินไป ในขณะที่ proto-oncogenes ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างไม่จำกัด โปรตีนทั้งสองกลุ่มนี้มักพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปหรือเกิดการกลายพันธุ์ในโรคมะเร็งชนิดต่างๆ โดยกลุ่ม tumor suppressor มักมีปริมาณลดลง และกลุ่ม proto-oncogene ที่เมื่อกลายพันธุ์ไปแล้วจะเรียกว่า oncogenes มักมีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งหากระดับของโปรตีนทั้งสองกลุ่มนี้มีการปรับเปลี่ยนมาสู่ระดับปกติจะเป็นดัชนีที่สำคัญของการรักษามะเร็ง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจสอบปริมาณของโปรตีนสองกลุ่มนี้หลังจากที่ได้กระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรซาไก โดยเลือกโปรตีนตัวแทนจากทั้งสองกลุ่มในการตรวจสอบคือ p53 กลุ่ม tumor suppressor และ Bcl-2 กลุ่ม oncogenes โดยใช้วิธี RT-PCR ในการตรวจสอบ ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่าสมุนไพรซาไกส่งผลให้ p53 มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้น และ Bcl-2 มีปริมาณลดลง (รูปที่ 9) ดังนั้นจากผลดังกล่าวจึงช่วยยืนยันได้ว่าสมุนไพรซาไกเป็นสารที่ออกฤทธิ์ในการเป็นสารต้านมะเร็งที่มีความน่าสนใจ นอกจากการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายด้วยกระบวนการ apoptosis แล้วยังส่งผลต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งด้วย สารสมุนไพรซาไกจึงเป็นสารที่น่าสนใจในการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

จากผลงานวิจัยทำให้ได้สารสกัดที่มี potential ในการเป็น anticancer agent ได้ในอนาคต และจากการตรวจสอบโครงสร้างของสารเพิ่มเติมภายหลังงานวิจัยที่ได้เสร็จสิ้นพบว่ามีโครงสร้างเป็นสาร altholactone ซึ่งจากการค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่าสารนี้มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้จากการทดสอบในมะเร็งประเภทอื่น ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจในการศึกษาถึงกลไกการต้านมะเร็งต่อไประดับโมเลกุล เพื่อการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งต่อไปในอนาคต

<u>Output จากโครงการวิจัย</u>

- มีการนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

  Uthaisang-Tanechpongtamb W, and Wilairat P. Altholactone induces apoptosis via caspase-8 and -9 dependent pathways in cervical carcinoma cell. International cell death society symposium "Targeting cell death pathways for human diseases". Shanghai, China. 2008; 6-9 June, p43
- ผลงานวิจัยอยู่ในระหว่างส่งเสนอตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ