ผลของเซฟราเรนทีนต่อความเป็นพิษของด็อกโซรูบิซิน ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์

Effect of Cepharanthine on the Cytotoxicity of Doxorubicin in Human B-Lymphoma Cells

สุณิษา คงทอง[1*] วราลี คงทอง[1] และ ยงยุทธ เทพรัตน์[2]

Sunisa Khongthong[1*], Waralee Khongthong[1] and Yongyuth Theaparat[2]

Received: 30 April 2018, Revised: 5 July 2018, Accepted: 6 September 2018

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสาร cepharanthine (CEP) และ doxorubicin และการใช้ร่วมกันต่อความเป็นพิษและชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง โดยเซลล์ Ramos ได้รับยา doxorubicin หรือได้ร่วมกับสาร CEP (10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์) และประเมินความเป็นพิษและการตายของเซลล์หลังจากบ่มเซลล์ 24 ชั่วโมง จากผลการศึกษาพบว่าสาร CEP มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 13.77 ไมโครโมลาร์ และสาร CEP ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลเพิ่มความเป็นพิษและสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิสเมื่อให้ร่วมกับยา doxorubicin และมีผลทำให้ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ลดลงจาก 2.55 ถึง 2.20, 1.85 และ 1.20 ตามลำดับ สาร CEP มีประสิทธิภาพเสริมฤทธิ์ความเป็นพิษของยา doxorubicin โดยชักนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ดังนั้นสรุปได้ว่าสาร CEP มีประโยชน์ต่อการรักษามะเร็งต่อมน้ำเหลืองที่ได้รับการรักษาเคมีบำบัด

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านมะเร็ง, ยาเคมีบำบัด, เซฟราเรนทีน, มะเร็งต่อมน้ำเหลือง

---

[1] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย เลขที่ 133 หมู่ 5 ตำบลทุ่งใหญ่ อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80240

[1] Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Srivijaya, 133 Moo 5, Thungyai, Thungyai, Nakhon Si Thammarat 80240, Thailand.

[2] สถาบันวิจัยความเป็นเลิศระบบการนำส่งยา ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

[2] Drug Delivery Excellent System Center, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Science, Prince of Songkla University, HatYai, Songkla 90110, Thailand.

[*] ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): Sunisa.p@rmutsv.ac.th Tel: 08 1145 4610

ABSTRACT

In this study, we investigated the activity of cepharanthine (CEP), doxorubicin, and combination on cytotoxicity and apoptosis using human lymphoma Ramos cells. Cells were treated with doxorubicin alone or in combination with CEP (10, 20 and 40 μM). Cytotoxic and apoptosis studies were done after 24 h incubations. CEP had cytotoxicity on cells with an IC_{50} value of 13.77 μM. CEP at concentrations of 10, 20 and 40 μM additively increased the cytotoxic and the apoptotic effects of doxorubicin, leading to a decrease in IC_{50} (μM) of the drug from 2.55 to 2.20, 1.85 and 1.20, respectively. CEP potentiated cytotoxicity of doxorubicin by increasing apoptotic effects. We conclude that CEP may have beneficial effects in patients with B cell lymphoma treated with chemotherapy.

Key words: anticancer, chemotherapeutic drugs, cepharanthine, lymphoma

บทนำ

มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (Lymphoma) เป็นมะเร็งที่เกิดจากเม็ดเลือดขาวชนิดบีลิมโฟไซต์ที่มีการเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโตผิดปกติ ทำให้ต่อมน้ำเหลืองโตเร็วมาก ซึ่งหากไม่ได้รับการรักษามะเร็งจะกระจายไปสู่ระบบต่างๆ ของร่างกาย และทำให้การทำงานของร่างกายล้มเหลวถึงแก่ชีวิตได้ โดยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดฮอดกินส์ หรือ Hodgkin's lymphoma และมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดไม่ใช่ฮอดกินส์ หรือ Non-Hodgkin's lymphoma (NHL) ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุด และเป็นมะเร็งทางระบบโลหิตวิทยาที่พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วยไทย (Zhong, 2006)โดยพบอุบัติการณ์ของ NHL ในปี 2012 จำนวน 385,741 คน และเสียชีวิตจำนวน 199,630 โดยปัจจัยที่ก่อให้เกิดการเพิ่มสูงขึ้นของโรคนั้นไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่ามีหลายปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการเกิด NHL เช่น การสัมผัสสารเคมี การปลูกถ่ายอวัยวะ การได้รับเชื้อไวรัส การถ่ายเลือด พันธุกรรม และปัจจัยอันเนื่องมาจากลักษณะการดำเนินชีวิต NHL สามารถแบ่งออกได้มากกว่า 30 ชนิดย่อย ซึ่งถ้าอาศัยอัตราการเจริญของตัวมะเร็งแล้วจะสามารถแบ่ง NHL ออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดค่อยเป็นค่อยไป (indolent) ซึ่งจะมีอัตราการแบ่งตัวของมะเร็งค่อนข้างช้า และชนิดรุนแรง (aggressive) การรักษา NHL มีวิธีที่ใช้ในรักษาทั่วไป คือ การใช้ยาเคมีบำบัด ซึ่งการให้ยาเคมีบำบัดถือเป็นแนวทางการรักษาที่มีบทบาทสำคัญในปัจจุบัน โดยยาออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งหรือยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ซึ่งยาเคมีบำบัดที่นิยมใช้ในการรักษามะเร็ง NHL จะมีสูตรยาหลายสูตร (drug regimen) โดยพบว่า CHOP regimen เป็น gold standard regimen สำหรับผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดรุนแรง (Aggressive Non-Hodgkin's lymphoma) (Hennessy *et al*., 2004) ประกอบด้วยยา cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine และ prednisolone โดยยา doxorubicin เป็นยาเคมีบำบัดที่นิยมใช้รักษาและให้ยาร่วมกันในสูตร แต่พบความเป็นพิษต่อระบบหัวใจและอาการไม่พึงประสงค์ และปัญหาการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง (Soni *et al*., 2011) ดังนั้นการหาแนวทางเพื่อลดความเป็นพิษและการดื้อยาของ doxorubicin สำหรับการรักษามะเร็ง ดังนั้นการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งและมีผลข้างเคียงต่ำอีกทั้งช่วยเสริมฤทธิ์ของยาเคมีบำบัด

เซฟราเรนทีน (Cepharanthine, CEP) เป็นสารในกลุ่ม biscoclaurine alkaloid ที่พบได้ในรากของต้น *Stephania cepharantha* Hayata ที่พบมากในประเทศญี่ปุ่น และสามารถพบได้ในหัวของต้นบอระเพ็ดพุงช้าง (*Stephania suberosa* L.L. Forman) และบัวบกหัว (*Stephania erecta* Craib) จากรายงานการศึกษาพบว่า CEP เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย เช่น ต้านการอักเสบ ต้านไวรัส ต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง เป็นต้น (Rogosnitzky and Danks, 2011) CEP มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบ pro-inflmmatory cytokines (tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β, IL-6) และ nitric oxide ผ่านการยับยั้ง NF-κB (Kudo *et al*., 2011) นอกจากนี้ CEP ยังมีฤทธิ์ต้านมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งช่องปากและลำคอ มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งตับ และมะเร็งท่อน้ำดี เป็นต้น (Furusawa and Wu, 2007; Wu *et al*., 2001; Seubwai *et al*., 2010) จากการรายงานพบว่าสาร CEP ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผ่านหลายกลไก ประกอบด้วย เพิ่มการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (immune response) (Ebina *et al*., 1990) เหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) โดยกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 และ caspase-9 (Harada *et al*., 2001; Biswas *et al*., 2006) และยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ในวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle arrest) (Chen *et al*., 2012) และจากการศึกษาของ Fang และคณะพบว่า CEP ยังสามารถกระตุ้นการตอบสนองของ cervical adenocarcinoma cell line ต่อการฉายรังสีโดยการลดการแสดงออกของ STAT3, Bcl-2, c-Myc และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo* (Fang *et al.*, 2013) และมีผลชักนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิสและสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 ในมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่มีการแสดงออกของ COX -2 ในเซลล์ HT-29 cells (Rattanawong *et al*., 2015) การศึกษาเบื้องต้นของงานวิจัยนี้พบว่า CEP มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของสาร CEP และ doxorubicin และการใช้ร่วมกันต่อความเป็นพิษและชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารทดสอบ

ละลายสารทดสอบ CEP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ใน DMSO เตรียมเป็น stock แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อทำการทดลองนำมาเจือจางโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ CEP ที่ต้องการ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 0.2 เปอร์เซ็นต์

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ Ramos cells (Human Burkitt's lymphoma cell line) ชนิด aggressive type B-cell lymphoma จาก American Type Cell Culture (ATCC) (Rockville, MD) โดยเซลล์จะเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 medium ประกอบด้วย 10% (v/v) fetal bovine serum, 0.5% L-glutamine, 100 µg/ml streptomycin และ 100 units/ml penicillin (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) ที่อุณภูมิ 37 ^{o}C ในสภาวะที่มี CO_2 5%

3. การศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของ CEP ต่อความเป็นพิษของ doxorubicin ใน Ramos cell

การศึกษาความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ Ramos cell ด้วยวิธี Resazurin reduction assay โดยใช้สารละลาย resazurin ที่สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ เซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้เอนไซม์ในไมโทคอนเดรียเปลี่ยนสาร resazurin ที่มีสีน้ำเงินให้เป็นสีแดง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และ 600 นาโนเมตร ซึ่งความเข้มข้นของ

สีแดงที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต (Vega-Avila and Pugsley, 2011)

เพาะเลี้ยงเซลล์ Ramos cell ใน 96-well plate จำนวน 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสาร CEP ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO 0.2 เปอร์เซ็นต์ และสภาวะที่เติมสาร CEP ที่ความเข้มข้น (10, 20, 40 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับยา doxorubicin (0-2.5 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 150 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม บ่มในสภาวะมาตรฐานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย resazurin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม บ่มในสภาวะมาตรฐานเป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร (microplate reader) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตอยู่รอดจากสูตร (ค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ/ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม × 100) และคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (half inhibitory concentration, IC_{50}) และวิเคราะห์ค่า Combination index จาก IC_{50} ของสาร CEP และ doxorubicin ต่อความเป็นพิษใน Ramos cell จะวิเคราะห์โดยใช้ Probit analysis, SPSS version 10 เพื่อหาค่า IC_{50} จากการใช้ยา cepharanthine-drug interaction โดยวิธี combination index (CI) (Chou, 2010) โดยค่า CI > 1.3 antagonism; CI 1.1-1.3 moderate antagonism; CI 0.9-1.1 additive effect; CI 0.8-0.9 slight synergism; CI 0.6-0.8 moderate synergism; CI 0.4-0.6 synergism; CI 0.2-0.4 strong synergism; CI < 0.1 very strong synergism (Chougule *et al*., 2011)

4. การศึกษาผลของ CEP ต่อการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส (Induction of apoptosis)

เซลล์ระยะเริ่มเกิดอะพอพโทซิสจะมีการเปลี่ยนแปลงของพลาสมาเมมเบรนโดย phosphatidyl serine (PS) ซึ่งอยู่ที่เยื่อหุ้มด้านในจะเคลื่อนที่ออกด้านนอกซึ่ง annexin V-FITC สามารถจับกับประจุลบของ phosphatidyl serine ได้ ซึ่งในระยะนี้ propidium iodide (PI) ยังไม่สามารถผ่านพลาสมาเมมเบรนได้ แต่เมื่อพลาสมาเมมเบรนเสียคุณสมบัติ PI จะเข้าไปจับ ดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้จำแนกการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือ necrosis ซึ่งจะสามารถตรวจสอบได้โดยใช้เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ (Flow cytometer)

เพาะเลี้ยงเซลล์ Ramos cell ใน 24-well plate จำนวน 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสาร CEP ที่ความเข้มข้น (10, 20, 40 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับยา doxorubicin (1.5, 2, 2.5 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 150 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม บ่มในสภาวะมาตรฐานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย phosphate buffer saline solution (PBS) และย้อมเซลล์ด้วย 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ annexin V-FITC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Invitrogen, USA) และย้อมด้วย 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ 40, 6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) ในสารละลาย annexin V-binding buffer (0.1 M HEPES/ NaOH pH 7.4, 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Invitrogen, Carlsbad, CA) ตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่ย้อมติด annexin V-FITC และ DAPI ด้วย fluorescence flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) นำผลจากโครมาโตแกรมที่แสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ติดสี single positive (annexin V-FITC or PI) และ double positive (annexin V-FITC and PI) ของเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบเปรียบเทียบกับ untreated control และวิเคราะห์การเกิด apoptosis ประกอบด้วย viable cells (annexin V-, PI -) ล่างซ้าย,

early apoptotic cells (annexin V +, PI -) ล่างขวา, late apoptotic cells (annexin V +, PI +) บนขวา และ necrotic cell (annexin V -, PI +) บนซ้าย

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้แสดงนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่โดยวิธี Duncan's test กำหนดค่า $p < 0.01$ จึงถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

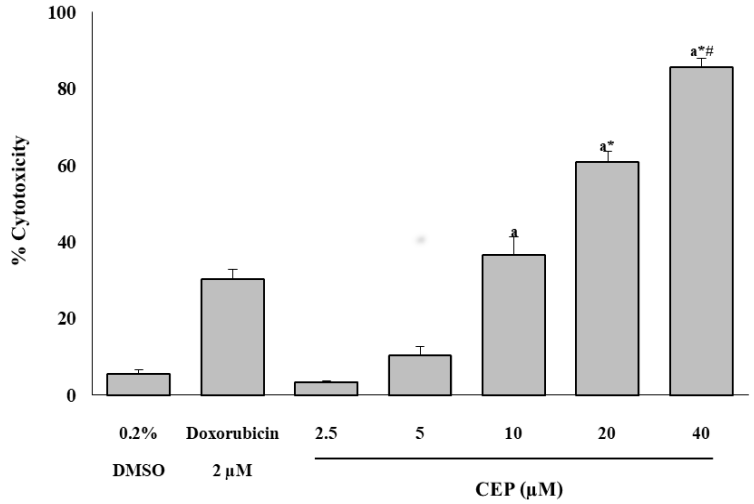
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ผลของสาร CEP ต่อความเป็นพิษของยา doxorubicin

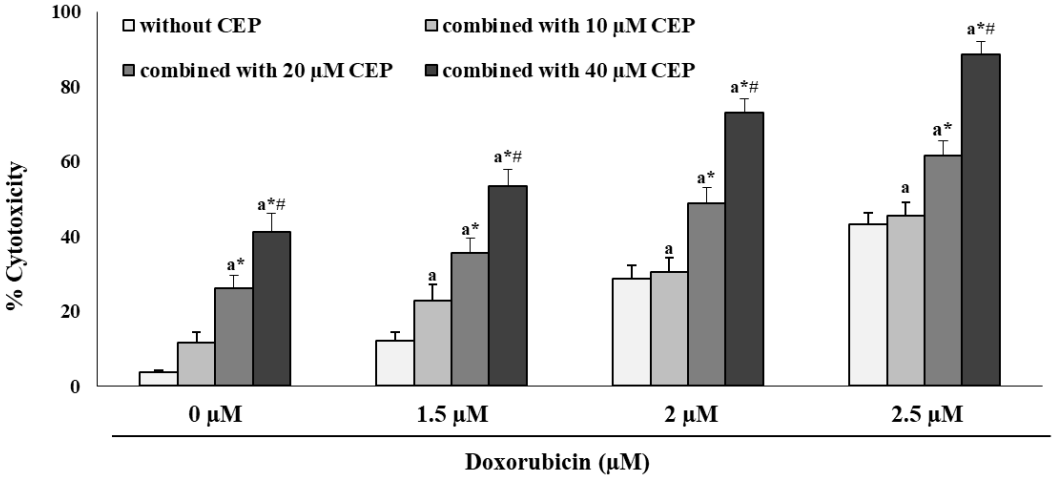
สาร CEP มีความเป็นพิษต่อ Ramos cells หลังจากได้รับสารทดสอบ 24 ชั่วโมงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น (concentration-dependent manner) โดยมีค่า IC_{50} 13.77 ± 1.25 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 1) และผลของสาร CEP ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ ที่ให้ร่วมกับยา doxorubicin (0-2.5 ไมโครโมลาร์) ใน Ramos cell พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ Ramos โดยมีค่า IC_{50} ของยา doxorubicin ลดลงจาก 2.55 ± 0.01 ถึง 2.20 ± 0.03, 1.85 ± 0.04, 1.20 ± 0.04 ไมโครโมลาร์ ดังนั้นผลจากการใช้สาร CEP ร่วมกับยา doxorubicin มีผลเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง Ramos cells แบบเสริมฤทธิ์กัน (additive effect) โดยมีค่า CI value ในช่วง 0.99 - 1.02 (ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1 และ 2) การรักษามะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดไม่ใช่ฮอดกินส์ หรือ Non-Hodgkin's lymphoma (NHL) จะใช้ยาเคมีบำบัดในสูตร CHOP (ประกอบด้วยยา cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) ซึ่งเป็นสูตรยาที่มีมาตรฐานดีสุด (gold standard regimen) และให้ผลสำเร็จสำหรับการรักษามะเร็ง (Hennessy *et al*., 2004) สาร CEP เป็นสารกลุ่ม alkaloid ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งหลายชนิด เหมือนกับยาเคมีบำบัดกลุ่ม vinca alkaloid คือ ยา vincristine และ vinblastine จากผลการศึกษาพบว่าสาร CEP ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลเพิ่มความเป็นพิษของยา doxorubicin ต่อเซลล์มะเร็ง Ramos cell โดยมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองเท่ากับ 13.77 ไมโครโมลาร์ และมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เท่ากับ 2.4 ไมโคโมลาร์ (Rattanawong *et al*., 2015)

ตารางที่ 1 IC_{50} และค่า combination index (CI) values ของยา doxorubicin ที่ให้ร่วมกับสาร CEP ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ ต่อเซลล์มะเร็ง Ramos หลังจากบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

Treatment	IC_{50} (μM)	CI
Cepharanthine (CEP)	13.77 ± 1.25	-
Doxorubicin	2.55 ± 0.01	-
Doxorubicin plus 10 μM CEP	2.20 ± 0.03	0.99
Doxorubicin plus 20 μM CEP	1.85 ± 0.04	1.02
Doxorubicin plus 40 μM CEP	1.20 ± 0.04	1.01



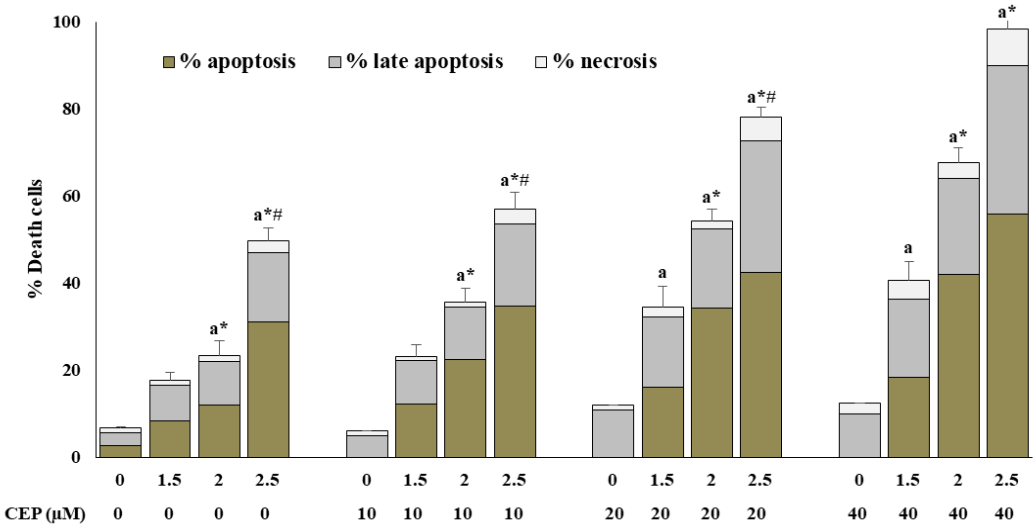
ภาพที่ 1 ผลของ CEP (2.5 - 40 ไมโครโมลาร์) ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ Ramos cell ที่เวลา 24 ชั่วโมง และประเมินความเป็นพิษด้วยวิธี resazurin reduction assay ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลอง 3 ซ้ำ, $^{a}p < 0.01$ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติกับยา doxorubicin (without CEP), $^{*}p < 0.01$ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติกับ CEP 10 ไมโครโมลาร์, $^{\#}p < 0.01$ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติกับ CEP 20 ไมโครโมลาร์



ภาพที่ 2 ผลของ CEP ต่อฤทธิ์ความเป็นพิษของยา doxorubicin ในเซลล์ Ramos cell ที่ได้รับยา doxorubicin (0-2.5 ไมโครโมลาร์) หรือการให้ร่วมกับสาร CEP ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ประเมินความเป็นพิษด้วยวิธี resazurin reduction assay ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ $^{a}p < 0.01$ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติกับยา doxorubicin (without CEP), $^{*}p < 0.01$ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติกับ CEP 10 ไมโครโมลาร์, $^{\#}p < 0.01$ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติกับ CEP 20 ไมโครโมลาร์

2. ผลของ CEP ต่อการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งของยา doxorubicin

ยาเคมีบำบัด (chemotherapeutic drugs) มีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง เซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสวิเคราะห์โดยการย้อมเซลล์ด้วย annexin V-FITC และ PI และตรวจวัดด้วย fluorescence flow cytometer ผลจากการศึกษาพบว่าสาร CEP มีผลเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสตามเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น (concentration dependent manner) โดยสาร CEP ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ มีผลเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสรูปแบบ late apoptosis คิดเป็น 11.25 ± 2.66, 30.47 ± 1.68 และ 45.36 ± 2.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และผลของยา doxorubicin ร่วมกับสาร CEP (10, 20, 40 ไมโครโมลาร์) มีผลเพิ่มการตายแบบอะพอพโทซิสต่อเซลล์มะเร็งชนิด early apoptosis ถึง late apoptosis (annexin V-FITC+/DAPI+cells) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับยา doxorubicin โดยสาร CEP และ doxorubicin มีผลเสริมฤทธิ์กัน (additive effect) ต่อการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง (ดังแสดงในรูปที่ 3) จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร CEP ต่อรูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งพบว่า CEP ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีผลเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสและมีผลเพิ่มการตายของเซลล์รูปแบบ early และ late apoptosis เมื่อให้ร่วมกับยา doxorubicin โดยสาร CEP เหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านกระตุ้นการทำงานของ caspase-9 และ caspase-3 (Harada *et al*., 2001; Biswas *et al*., 2006) และกระตุ้น pro-apoptotic signaling pathways เช่น JNK, ERK และ p38 MAPK (Harada *et al*., 2009) และยับยั้งการแสดงออก anti-apoptotic gene Bcl-xl (Fang *et al*., 2013) จากรายงานการศึกษาพบว่าสาร CEP มีผลเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโตซิสและยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ cyclooxygenase 2 (COX-2) ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT-29 cells (Rattanawong *et al*., 2015) และเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (P338) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อต่อยา doxorubicin ให้เกิดโดยการเพิ่มปริมาณของอนุมูลอิสระและเพิ่มการแสดงออกของ Fas-antigen (Furusawa and Wu, 2007) ดังนั้นสาร CEP มีผลเสริมฤทธิ์ยา doxorubicin (additive effect) ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง



ภาพที่ 3 ผลของสาร CEP ต่อการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง Ramos cell ของยา doxorubicin เซลล์ได้รับยา doxorubicin (1.5, 2 และ 2.5 ไมโครโมลาร์) หรือให้ร่วมกับสาร CEP (10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้อมเซลล์ด้วย annexin V-FITC/DAPI ประเมินการตายของเซลล์มะเร็งจากการติดสี annexin V-FITC^{+} (apoptotic cells) และติดสี DAPI^{+} (necrotic cell) และติดสี annexin V-FITC^{+}/DAPI^{+} cells (late apoptotic cells) ด้วยเครื่อง flow cytometer แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ (apoptosis, late apoptosis, และ necrosis) โดยข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ, $^{a}p < 0.01$ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติกับยา doxorubicin (without CEP), $^{*}p < 0.01$ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติกับ CEP 10 ไมโครโมลาร์, $^{\#}p < 0.01$ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติกับ CEP 20 ไมโครโมลาร์

สรุป

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสาร CEP มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมีผลเพิ่มฤทธิ์ของยา doxorubicin ต่อการเกิดความเป็นพิษโดยออกฤทธิ์เหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นสรุปได้ว่าสาร CEP มีศักยภาพสูงต่อการเสริมฤทธิ์ของยา doxorubicin และสามารถลดขนาดการใช้ยา doxorubicin ที่มีผลเกิดการดื้อยาและอาการไม่พึงประสงค์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณพระคุณทุนวิจัยจากมหาวิทยาเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย และสถานที่ในการทำวิจัย คือ ห้องปฏิบัติการชีวเคมีและเภสัชวิทยา ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ทุ่งใหญ่

เอกสารอ้างอิง

Biswas, K.K., Tancharoen, S., Sarker, K.P., Kawahara, K., Hashiguchi, T. and Maruyama, I. 2006. Cepharanthine triggers apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line (HuH-7) through the activation of JNK1/2 and the downregulation of Akt. **FEBS Letters** 580: 703-710.

Chen, Z., Huang, C., Yang, Y.L., Ding, Y., Ou-Yang, H.Q., Zhang, Y.Y. and Xu, M. 2012. Inhibition of the STAT3 signaling pathway is involved in the antitumor activity of cepharanthine in SaOS2 cells. **Acta Pharmacologica Sinica** 33: 101-108.

Chou, T.C. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer Research** 70: 440-446.

Chougule, M.B., Patel, A., Sachdeva, P., Jackson, T. and Singh, M. 2011. Enhanced anticancer activity of gemcitabine in combination with noscapine via antiangiogenic and apoptotic pathway against non-small cell lung cancer. **PLoS One** 6(11): 1-11.

Ebina, T., Ishikawa, K. and Murata, K. 1990. Antitumor effect of Cepharanthin in the double grafted tumor system. **Gan to Kagaku Ryoho Journal** 17(6): 1165-1171.

Fang, Z., Li, Y., Chen, Z., Wang, J. and Zhu, L. 2013. Inhibition of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 and Cyclooxygenase-2 Is Involved in Radiosensitization of Cepharanthine in HeLa Cells. **International Journal of Gynecological Cancer** 23(4): 608-614.

Furusawa, S. and Wu, J. 2007. The effects of biscoclaurine alkaloid cepharanthine on mammalian cells: Implications for cancer, shock, and inflammatory diseases. **Life Sciences** 80: 1073-1079.

Harada, K., Bando, T., Yoshida, H. and Sato, M. 2001. Characteristics of antitumour activity of cepharanthin against a human adenosquamous cell carcinoma cell line. **Journal of Oral Oncology** 37(8): 643-651.

Harada, K., Ferdous, T., Itashiki, Y., Takii, M., Mano, T., Mori, Y. and Ueyama, Y. 2009. Cepharanthine inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8. **International Journal of Oncology** 35(5): 1025-1035.

Hennessy, B.T., Hanrahan, E.O. and Daly, P.A. 2004. Non-Hodgkin lymphoma: An update. **Lancet Oncology** 5: 341-353.

Kudo, K., Hagiwara, S., Hasegawa, A., Kusaka, J., Koga, H. and Noguchi, T. 2011. Cepharanthine exerts anti-inflammatory effects via NF-ĸB Inhibition in a LPS-Induced rat model of systemic inflammation. **Journal of Surgical Research** 171(1): 199-204.

Rattanawong, A., Limpanasithikul, W. and Wonganan, P. 2015. Anticancer Effects of Cepharanthine on Human Colon Cancer Cells. **KKU Research Journal** 15: 68-78.

Rogosnitzky, M. and Danks, R. 2011. Therapeutic potential of the biscoclaurine alkaloid, cepharanthine, for a range of clinical conditions. **Pharmacological Reports** 63(2): 337-347.

Seubwai, W., Vaeteewoottacharn, K., Hiyoshi, M., Suzu, S., Puapairoj, A., Wongkham, C., Okada, S. and Wongkham, S. 2010. Cepharanthine exerts antitumor activity on

cholangiocarcinoma by inhibiting NF-kappa B. **Cancer Science** 101(7): 1590-1595.

Soni, H., Pandya, G., Patel, P., Acharya, A., Jain, M. and Mehta, A.A. 2011. Beneficial effects of carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2) on acute doxorubicin cardiotoxicity in mice: Role of oxidative stress and apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology** 253: 70-80.

Vega-Avila, E. and Pugsley, M.K. 2011. An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society** 54: 10-14.

Wu, J., Suzuki, H., Zhou, Y.W., Liu, W., Yoshihara, M., Kato, M., Akhand, A.A., Hayakawa, A., Takeuchi, K., Hossain, K., Kurosawa, M. and Nakashima, I. 2001. Cepharanthine Activates Caspases and Induces Apoptosis in Jurkat and K562 Human Leukemia Cell Lines. **Journal of Cell Biology** 82(2): 200-214.

Zhong, Y. 2006. Non-Hodgkin's lymphoma: What primary care professionals need to know?. **Journal for Nurse Practitioners** 2: 309-315.