จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

ผลของพิโนสโทรบินจากกระชายเหลืองที่มีต่อการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิดและการใช้ไลโปโซมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของพิโนสโทรบิน

โดย

ชุลี ยมภักดี
บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล

มกราคม ๒๕๕๘

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

ผลของพิโนสโทรบินจากกระชายเหลืองที่มีต่อการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิดและการใช้ไลโปโซมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของพิโนสโทรบิน

โดย

ชุลี ยมภักดี
บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล

มกราคม ๒๕๕๘

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง iii

สารบัญรูปภาพ iv

บทคัดย่อ v

Abstract vi

บทนำ 1

วัตถุประสงค์ของโครงการ 5

วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

1. แหล่งของพิโนสโทรบิน 5
2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ 5
3. การศึกษาผลของพิโนสโทรบินต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ โดยวิธี MTT viability assay 6
4. การเตรียมไลโปโซม การเตรียมและหาปริมาณพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซม(LipoPino) 6
5. การเตรียมเซลล์เพื่อส่องด้วยเครื่อง Transmission Electron Microscope (TEM) 8
6. การศึกษาผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อวัฏจักรการแบ่งเซลล์ 8
7. การคำนวณค่าทางสถิติ 9

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

1. ฤทธิ์การต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิดโดยพิโนสโทรบิน 9

2. อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างพิโนสโทรบินต่อไลโปโซม 14

3. ลักษณะทางกายภาพของพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซม 17

4. ผลการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิดโดยพิโนสโทรบิน ที่บรรจุในไลโปโซม (LipoPino) 20

5. ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อวัฏจักรการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งบางชนิด 26

สรุปผลการทดลอง 35

เอกสารอ้างอิง 37

กิตติกรรมประกาศ 40

Output 40

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ค่าความเข้มข้นของพิโนสโทรบินที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) 13

2. ค่า IC_{50} ของพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซมที่อัตราส่วนต่างๆ ที่มีต่อเซลล์ไลน์มะเร็งกระเพาะอาหาร KATO III และ เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat 15

3. ค่า IC50 ของพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซม (LipoPino) ที่มีต่อการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งชนิดต่างๆ 24

4. ความเป็นพิษของไลโปโซม ที่ความเข้มข้นเท่ากับใน LipoPino ที่ความเข้มข้น IC_{50} ที่มีต่อเซลล์ไลน์มะเร็งที่ไวต่อพิโนสโทรบิน 25

5. ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อจำนวนประชากรของเซลล์มะเร็ง Jurkat ในระยะต่างๆ 29

6. ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อจำนวนประชากรของเซลล์มะเร็ง KATOIII ในระยะต่างๆ 31

7. ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อจำนวนประชากรของเซลล์มะเร็ง BT474 ในระยะต่างๆ 33

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของส่วนประกอบสำหรับการเตรียมพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซม	7
2	ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งชนิดต่างๆ	12
3	ลักษณะของไลโปโซม (Free Liposome) และไลโปโซมที่มีการบรรจุพิโนสโทรบิน (LipoPino) ภายในเซลล์ของเซลล์ไลน์มะเร็งกระเพาะอาหาร KATOIII เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน	18
4	แบบจำลองของโครงสร้างพิโนสโทรบินในไลโปโซม	19
5	ผลของพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซมต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งชนิดต่างๆ โดยวิธี MTT viability assay	23
6	ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อรูปแบบวัฏจักรการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง Jurkat	28
7	ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อรูปแบบวัฏจักรการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งKATOIII	30
8	ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อรูปแบบวัฏจักรการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง BT474	32

บทคัดย่อ

พิโนสโทรบิน เป็นฟลาวาโนนชนิดหนึ่งที่พบในกระชายเหลือง (*Boesenbergia pandurata*) ถูกค้นพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมที่มีผลต่อการควบคุมการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการศึกษานี้มุ่งหมายที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของพิโนสโทรบินและพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซม (LipoPino) ในเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิด รวมทั้งศึกษาผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อวัฏจักรการแบ่งเซลล์ของเซลล์ไลน์มะเร็งที่ไวต่อพิโนสโทรบิน โดยได้ศึกษาฤทธิ์ของพิโนสโทรบินที่มีต่อการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร KATOIII เซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 เซลล์มะเร็งตับ HepG2 เซลล์มะเร็งปากมดลูก Ca-Ski และเซลล์มะเร็งเต้านม BT474 พบว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร KATOIII มีความไวต่อพิโนสโทรบินที่สุด ที่ค่า IC_{50} 24.7 ± 4.5 ไมโครโมลาร์ การใช้ LipoPino สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งของพิโนสโทรบินโดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 2.6 - 9.3 ไมโครโมลาร์ (ยกเว้นในเซลล์มะเร็ง BT474 and SW620 ที่พบว่าไลโปโซมมีความเป็นพิษที่สูงในเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิด) โดยไลโปโซมช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของพิโนสโทรบินได้ 2.7 - >20.9 เท่าเมื่อเทียบกับฤทธิ์ของการใช้พิโนสโทรบินอย่างเดียว ในการศึกษาผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อวัฏจักรการแบ่งเซลล์โดยวิธีFlow cytometry พบว่าโดยการใช้พิโนสโทรบินที่ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า IC_{50} ณ วันที่ 4 พบว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat และเซลล์มะเร็งเต้านม BT474 มีประชากรเซลล์ในระยะ sub G1 สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มีพิโนสโทรบิน และพบว่าประชากรของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร KATOIII หยุดอยู่ที่ระยะ G2/M อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลจากการศึกษานี้แนะนำว่าพิโนสโทรบิน สามารถถูกใช้เป็นสารต้านการเจริญในเซลล์มะเร็งหลายๆชนิดได้ และไลโปโซมสามารถนำมาใช้เป็นสิ่งนำส่งพิโนสโทรบินเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ในเซลล์มะเร็งบางชนิดได้

Abstract

Pinostrobin, a flavanone from *Boesenbergia pandurata*, was previously identified as an inhibitor of Ca^{2+}-signal mediated growth regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. This study aimed to investigate the anti-proliferative activity of pinostrobin and the liposome-encapsulated pinostrobin (LipoPino) in some human cancer cell lines, as well as determine the effect of pinostrobin on cell cycle progression. Cytotoxicity of free- and liposome encapsulated-pinostrobin against Jurkat, KATOIII, SW620, HepG2, Ca-Ski and BT474 cell lines was assessed. Among the tested cell lines, KATOIII cells were the most sensitive to pinostrobin. The use of liposomal pinostrobin showed significantly enhance the cytotoxic effect of pinostrobin in all cell lines studied (except for BT474 and SW620 which showed highly toxic to liposome) with IC_{50} values ranging from 2.6 - 9.3 μM exhibited 2.7 - >20.9 times higher cytotoxic effect than those of the free form. A flow cytometric analysis revealed that 2x IC_{50} concentration of pinotrobin treated cells caused significantly increase in sub G1 population at 96 h of Jurkat T cells and BT474 while caused G2/M cell cycle arrest in KATO III cells. The results suggested that pinostrobin should be a potential candidate for various cancer therapies and liposome could be a vehicle of choice to improve the efficacy of pinostrobin.

บทนำ

มะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์หนึ่งเซลล์ตั้งต้น การเปลี่ยนแปลงนี้อาจเป็นผลมาจากปัจจัยภายนอกร่างกาย เช่น รังสี มลพิษ หรือมาจากพันธุกรรม โดยความผิดปกติของเซลล์ที่เป็นเซลล์มะเร็งคือเจริญโดยไม่สามารถควบคุมได้ มะเร็งจึงเป็นโรคร้ายแรงที่เป็นสาเหตุการตายอันดับต้น ๆ ของการตายของประชากรโลก มีรายงานการตายถึง 8.2 ล้านคนจากประชากรทั่วโลกโดยมะเร็งในปี ค.ศ. 2012 องค์การอนามัยโลกยังได้คาดการณ์ว่าอุบัติการณ์การเกิดของโรคมะเร็งจะเพิ่มสูงจาก 14 ล้านคน ในปี คศ. 2012 เป็น 22 ล้านคน ในอีก 20 ปีข้างหน้า (http://www.who.int/cancer/about/facts/)

ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเป็นแหล่งที่ถูกนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคมากที่สุด พบว่ากว่า 80% ของยามาจากธรรมชาติ หรือมาจากสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติ (Sneader, 1996) เกือบครึ่งหนึ่งของยาที่ผ่านการรับรองโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาตั้งแต่ปี คศ. 1994 ล้วนมาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Newman และ Cragg, 2007) จึงเป็นที่ยอมรับกันว่าความหลากหลายของโครงสร้างโมเลกุลของสารในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติซึ่งมีอยู่มาก สามารถใช้เป็นโครงสร้างหลักเพื่อการพัฒนาเป็นยารักษาโรคใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นต่อไป ปัจจุบันมีรายงานมากมายเกี่ยวกับการศึกษาสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพื่อการป้องกันและการรักษาโรคมะเร็ง ได้แก่ β-carotene, curcumin, epigallocatechin gallate, genistein, resveratrol, gingerol, and capsaicin เป็นต้น (Bachrach และ Wang, 2002; Sastry, 2004; Suresh และคณะ, 2009; . Lee และคณะ, 2011)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มาจากธรรมชาติ มักเป็นสารที่มีขั้วต่ำ จึงมีผลต่อการละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วสูงเช่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ละลายได้ค่อนข้างต่ำ จึงเป็นอุปสรรคต่อการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จำเป็นต้องมีระบบนำส่งสารออกฤทธิ์เข้าเซลล์ที่ดี ไลโปโซมเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความนิยมในการใช้นำส่งสารออกฤทธิ์เข้าเซลล์

ไลโปโซมประกอบด้วยชั้นไขมัน 2 ชั้น (lipid bilayer) ที่สามารถหุ้มสารที่มีประจุไว้ด้านใน ไลโปโซมชนิดไขมันประจุบวก (cationic lipids) เป็น non-viral vector ชนิดหนึ่งที่ใช้ในการพายีนเข้าสู่เซลล์ ไลโปโซมมีวิธีการเตรียมไม่ยุ่งยาก มีประสิทธิภาพในการนำพาดีเอ็นเอ หรือยา เข้าสู่เซลล์ได้สูง มีความเสถียรและไม่มีผลข้างเคียง หรือมีความเป็นพิษกับเซลล์ต่ำ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในสิ่งมีชีวิตอื่นได้ จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการนำส่งยีนในการรักษาโรคทางพันธุกรรม การนำส่งยารักษาโรคเข้าสู่เซลล์ (Chona และ Cullis, 1998 ; Torchilin, 2005) เป็นต้น ไขมันประจุบวกประกอบไปด้วยสามส่วนสำคัญคือ ส่วนหัวประจุบวก (cationic head) ส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic tail) และ ส่วนตัวเชื่อม (linker) ส่วนหัวประจุบวกมีได้ตั้งแต่ประจุเดียวจนถึงหลายประจุ ส่วนมากส่วนหัวประกอบด้วยเอมีนชนิดต่าง ๆ หรือกัวนิดีน (guanidine) สำหรับส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำ ประกอบด้วยสองกลุ่มหลักคือ กลุ่ม long-chain fatty acid จำนวนหนึ่งหรือสองสายโซ่และกลุ่มสเตียรอยด์ เช่น cholesterol หรือ bile acid สำหรับส่วนตัวเชื่อม (linker) เป็นพันธะเคมีที่เชื่อมต่อระหว่างส่วนหัวประจุบวกและส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำ โดยพันธะดังกล่าวเป็นได้ทั้งพันธะที่ย่อยสลายได้ง่าย เช่น พันธะเอสเทอร์ และ เอไมด์ หรือพันธะที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น พันธะอีเธอร์ (Zhu และ Mahato, 2010)

ไขมันประจุบวกที่มี cholesterol เป็นส่วนไม่มีขั้ว เป็นสารกลุ่มหนึ่งที่เป็นที่นิยมใช้ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการเข้าเซลล์ได้ดี และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ (Apiratikul และคณะ, 2013) รายงานโดย Mehta และคณะ (1987) แสดงการเพิ่มประสิทธิภาพยา Nystatin ในการรักษาโรค Candidiasis โดยเทคนิค liposome incorporation ทำให้ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อราดังกล่าวดีขึ้นโดยมีค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ลดลงกว่าเดิม และส่งผลกระทบต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงลดลงกว่าการใช้ยา Nystatin ที่ไม่มีการดัดแปลงด้วยเทคนิค liposome incorporation Etten และคณะ (2000) ค้นพบการเพิ่มประสิทธิภาพยา Amphotericin B-desooxycholate (AMB-DOC) โดยการให้ความร้อน

70°C เป็นเวลา 20 นาที Heat Amphotericin B-desooxycholate (hAMB-DOC) และชนิดที่เพิ่มการปั่นเหวี่ยง หลังจากการให้ความร้อน Heat and centrifugation Amphotericin B-desooxycholate (hcAMB-DOC) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านเชื้อรา พบว่า hAMB-DOC มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อราเพิ่มขึ้นจากการใช้ยา AMB-DOC และทั้ง hAMB-DOC และ hcAMB-DOC มีความเป็นพิษลดลงโดยศึกษาการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง Liolios และคณะ (2009) ทำการเพิ่มประสิทธิภาพสาร Carvasol โดยการบรรจุในไลโปโซม และทำการศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทั้งก่อนและหลังการบรรจุในไลโปโซม พบว่าการบรรจุสารดังกล่าวในไลโปโซมช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ Huang และคณะ (2011) ทำการทดลองเพิ่มประสิทธิภาพของกรดโอเลอิกด้วยการบรรจุในไลโปโซม (LipoOA) และศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยทำการทดสอบกับเชื้อดื้อยา methicilin-resistant *S. aureus* (MRSA) โดยการติดตามปริมาณการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นของสารเรืองแสง rhodamine ที่ติดฉลากบน LipoOA (LipoOA-RhB) พบว่าไลโปโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำยาเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น ผลการศึกษาหาค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC) พบว่าได้ค่า MBC ของ LipoOA น้อยกว่าค่า MBC ของ กรดโอเลอิกอย่างเดียวถึง 12 เท่า Dass (2003) ใช้ไลโปโซมในการเพิ่มประสิทธิภาพการนำเข้าของยาเพื่อต้านการสร้างเส้นเลือดในเนื้องอก และ Apiratikul และคณะ (2013) ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของสาร curcumin โดยการบรรจุในไลโปโซม และศึกษาฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง Wang และคณะ (2012) ได้ทำการทดสอบสาร curcumin ที่บรรจุในไลโปโซม พบว่ามีฤทธิ์เพิ่มมากขึ้นในการต้านการเจริญของมะเร็งเยื่อบุชนิด MS1 โดยมีกลไกต้านการสร้างเส้นเลือดที่ไปหล่อเลี้ยงให้เซลล์เกิดการเจริญ Li และคณะ (2007) ได้ทดสอบฤทธิ์ของสาร curcumin ที่บรรจุในไลโปโซม เทียบกับสาร oxaliplatin ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการต้านเซลล์มะเร็งพบว่า curcumin ที่บรรจุในไลโปโซมมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด Colo205 ได้ดีกว่า oxaliplatin

ในงานวิจัยก่อนหน้าก่อนของคณะผู้วิจัย ได้ใช้ระบบคัดกรอง $\Delta zds1$ proliferation assay เพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์ ซึ่งเป็นระบบที่พัฒนาโดย (Shitamukai และคณะ 2000) เพื่อคัดกรองสารสกัดอย่างหยาบจากพืชสมุนไพรไทย พบสารสกัดอย่างหยาบจากกระชายเหลือง *Boesenbergia pandurata* เป็นหนึ่งในสารสกัดที่ให้ผลบวกแรง ต่อมาคณะผู้วิจัยได้ใช้ $\Delta zds1$ proliferation assay เพื่อแยกเป็นส่วนย่อยและติดตามฤทธิ์ดังกล่าวจนได้สารบริสุทธิ์ หนึ่งในสารบริสุทธิ์ที่ได้ คือ พินโนสโทรบิน หรือ 5-hydroxy-7-methoxyflavanone ซึ่งได้แสดงฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์ (Wangkangwan และคณะ (2009))

กระชายเหลือง (*B. pandurata*) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ส่วนของรากหรือเหง้า ได้ถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารไทยบางชนิด นอกจากนี้ ตามภูมิปัญญาไทย ได้มีการใช้ในการรักษาโรคบางชนิดเช่นใช้พอกรักษาแผล แก้ท้องอืดเฟ้อ เป็นต้น

ก่อนหน้านี้ได้มีรายงานฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหลายชนิดโดยโนสโทรบิน ดังนี้ Smolarz และคณะ (2006) ได้รายงานว่า พินโนสโทรบินจาก *Polygonum lapathifolium* มีฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat และ HL-60 และทำให้เซลล์มีการตายแบบอะพอพโทซิส โดยมีการตายเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของพินโนสโทรบิน โดยพบว่าที่ 10 นาโนโมลาร์ ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 25-60 ที่ 100 นาโนโมลาร์ทำให้เซลล์ตาย ร้อยละ 45-76 และที่ 1 ไมโครโมลาร์ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 70-88 ตามลำดับ เมื่อตรวจด้วยวิธีย้อมเซลล์โดยสี Annexin V Ashidi และคณะ (2007) ทดสอบฤทธิ์ของพินโนสโทรบินในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CCRF-CEM พบว่าพินโนสโทรบินมีฤทธิ์ต้านการแบ่งตัวของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดดังกล่าว และยังทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ที่ไปทำลายเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียที่เป็นปัจจัยสำคัญในการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส ยัง

ไม่มีรายงานฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนในเซลล์ไลน์มะเร็งอื่น ๆ นอกเหนือจากมะเร็งเม็ดเลือดขาวสองชนิดดังกล่าว แต่อย่างใด

เนื่องจากพิโนสโทรบินมีความสามารถในการละลายได้ค่อนข้างต่ำในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีขั้วสูง ทำให้เป็นข้อจำกัดในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพิโนสโทรบิน งานวิจัยนี้จึงมุ่งหมายที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ของพิโนสโทรบิน และศึกษาผลของไลโปโซมชนิดไขมันประจุบวกในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของพิโนสโทรบินในเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิด

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อการต้านการเจริญของเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิด

2.ศึกษาผลของไลโปโซมชนิดไขมันประจุบวกที่บรรจุพิโนสโทรบินที่มีต่อเซลล์ไลน์มะเร็งที่ถูกต้านการเจริญจากข้อ 1

วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

1. แหล่งของพิโนสโทรบิน

พิโนสโทรบินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชายเหลือง มีการทำให้บริสุทธ์ พิสูจน์โครงสร้างและฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียม ดังรายงานใน Wangkangwan และคณะ (2009)

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

ทำการเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ Jurkat (มะเร็งเม็ดเลือดขาว) HepG2 (มะเร็งตับ) SW620 (มะเร็งลำไส้ใหญ่) KATO III (มะเร็งกระเพาะอาหาร) BT474 (มะเร็งเต้านม) และ Ca-Ski (มะเร็งปากมดลูก) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่มี fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ของ

HEPES ความเข้มข้นร้อยละ 1 ของโซเดียมไพรูเวทความเข้มข้นร้อยละ 1 ของเพนนิซิลินจีความเข้มข้น 10^4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตร็ปโตมัยซินความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ complete media บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 ร้อยละ 5 ทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-4 วัน

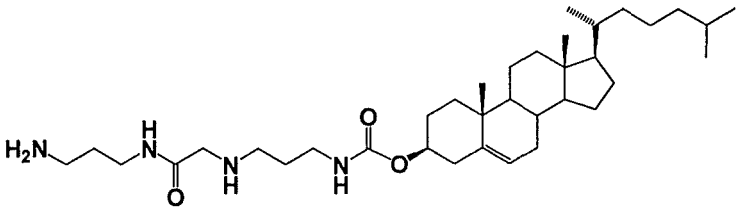
3. **การศึกษาผลของพิโนสโทรบินต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งชนิดต่าง ๆ โดยวิธี** MTT proliferation assay

เตรียมเซลล์ไลน์ทดสอบที่ความเข้มข้นของ $5x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อหลุม เติมพิโนสโทรบินที่ผันแปรความเข้มข้นในช่วง 0.1- 100 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 ร้อยละ 5 นาน 1 หรือ 4 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา ตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต โดย MTT proliferation assay ตามวิธีที่รายงานโดย Mosmann (1983) โดยใช้ MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (% viability) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

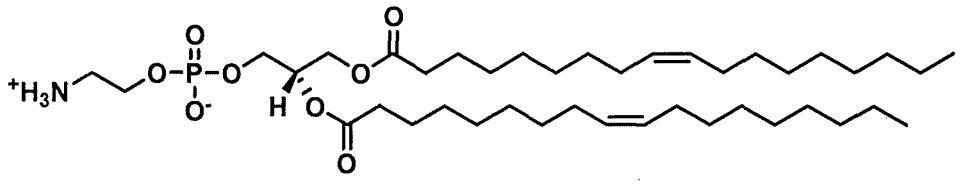
4. **การเตรียมไลโปโซม การเตรียมและหาปริมาณพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซม** (LipoPino)

ไลโปโซมจากไขมันชนิดประจุบวก (ได้รับจากห้องปฏิบัติการของ รองศาสตราจารย์ ดร. บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง) มีวิธีการเตรียมดังนี้ ทำการผสมไขมันประจุบวก (ภาพที่ 1) กับ ไขมันตัวช่วย dioleoyl-L-α-phosphatidylethanolamine (DOPE) ในอัตราส่วน 1:1 นำไขมันชนิดประจุบวกที่ได้ มาศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสม กับพิโนสโทรบิน โดยใช้พิโนสโทรบิน 27 ไมโครกรัม ในการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างพิโนสโทรบิน : ไลโปโซม (LipoPino) ได้ทำการแปรผันอัตราส่วนระหว่างพิโนสโทรบิน : ไลโปโซม ดังนี้ 1:1, 1:5, 1:10 และ 1:20 โดยคงที่ปริมาณพิโนสโทรบิน ที่ 27 ไมโครกรัม และแปรผันปริมาณไลโปโซมที่ 27, 135, 270 และ 540 ไมโครกรัม ตามลำดับ โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย จากนั้นทำระเหยคลอโรฟอร์มออกด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้ว

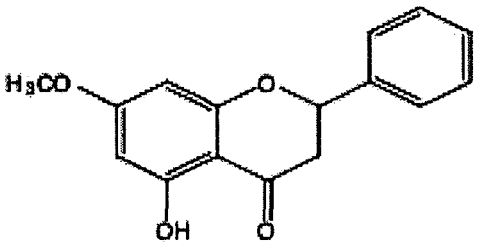
นำไปทำให้แห้งภายใต้เครื่องทำสุญญากาศแรงดันสูงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนเห็นเป็นแผ่นฟิล์มบางเคลือบอยู่ที่ก้นหลอดไมโครฟิวจ์ เติมสารละลาย phosphate-buffer saline (PBS, pH 7.4 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร) ละลายที่อุณหภูมิห้อง นำไปผสมด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 30 วินาที ต่อด้วยนำเข้าเครื่อง sonicator นาน 20 นาที จากนั้นนำหลอดไมโครฟิวจ์ ไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 x *g* นาน 15 นาที (ดัดแปลงจาก Immordino และคณะ 2003) เพื่อแยกเอาส่วนใสที่มี LipoPino ออกจากผลึกพิโนสโทรบิน (free pinostrobin) ที่ก้นหลอด นำส่วนสารละลายที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต่อไป



(1)



(2)



(3)

ภาพที่ 1 โครงสร้างของส่วนประกอบสำหรับการเตรียมพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซม ประกอบด้วย(1) ไขมันประจุบวกที่มีคอเลสเตอรอลเป็นโครงสร้างหลัก (2) ไขมันตัวช่วย Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) และ (3) พิโนสโทรบิน

สำหรับการหาปริมาณพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซม มีรายละเอียดดังนี้ นำส่วนผลึกพิโนสโทรบิน (free pinostrobin) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ไปทำการล้างตะกอนด้วยน้ำ 2 ครั้ง และละลายตะกอนด้วยไดคลอโรมีเทน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Waters, Modal 515 liquid chromatography, Modal 2487 UV detector, luna5μsilica 250 × 4.60 mm Phenomenex ใช้ mobile phase Dichloromethane/Methanol 90/10, v/v) คำนวณประสิทธิภาพการบรรจุพิโนสโทรบินในไลโปโซมตามสูตร ดังนี้

$$\text{ประสิทธิภาพการบรรจุ (\%Loading efficiency)} = \frac{\text{ปริมาณทั้งหมดของพิโนสโทรบิน} - \text{พิโนสโทรบินอิสระ}}{\text{ปริมาณทั้งหมดของพิโนสโทรบิน}} \times 100$$

$$\text{\% Loading Content} = \frac{\text{ปริมาณทั้งหมดของพิโนสโทรบิน} - \text{พิโนสโทรบินอิสระ}}{\text{ปริมาณทั้งหมดของไลโปโซม}} \times 100$$

5. การเตรียมเซลล์เพื่อส่องด้วยเครื่อง Transmission Electron Microscope (TEM)

เลี้ยงเซลล์ไลน์ KATO III ที่ความเข้มข้น 1.25×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต่อหลุม ที่เติม 10 ไมโครโมลาร์ LipoPino หรือ เติมเฉพาะไลโปโซมในปริมาณที่เท่ากับที่มีใน LipoPino เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์และตรึงเซลล์ตามวิธีการของ Bozzola (2007) เพื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Transmission Electron Microscope (TEM)

6. การศึกษาผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อวัฏจักรการแบ่งเซลล์

เตรียมเซลล์ไลน์ทดสอบที่ความเข้มข้นของ 1.25×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต่อหลุม เติมพิโนสโทรบินที่ความเข้มข้นในช่วง 100 ไมโครโมลาร์ สำหรับ Jurkat และ KATO III และ 120

ไมโครโมลาร์ สำหรับ BT474 เพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 ร้อยละ 5 นาน 1 ถึง 4 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา เก็บเกี่ยวเซลล์และทำการ fix เซลล์ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซนต์ และย้อมด้วย Propidium iodide (Sigma, USA) นำเซลล์ดังกล่าวเข้าตรวจสอบโดยเครื่อง Flow cytometer (Beckman Coulter, USA)

7. **การคำนวณค่าทางสถิติ**

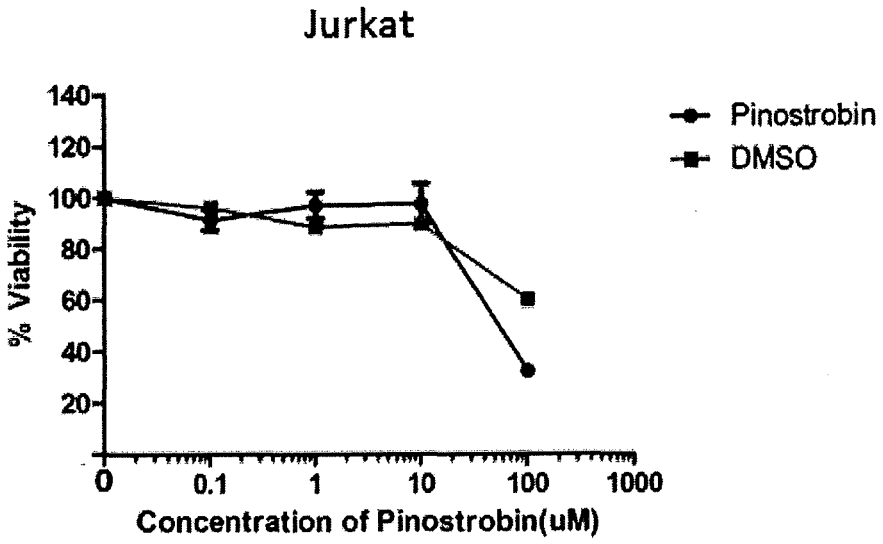
เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อมูลแบบ unpaired t-test (two-tailed) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5 (GraphPad Software)

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

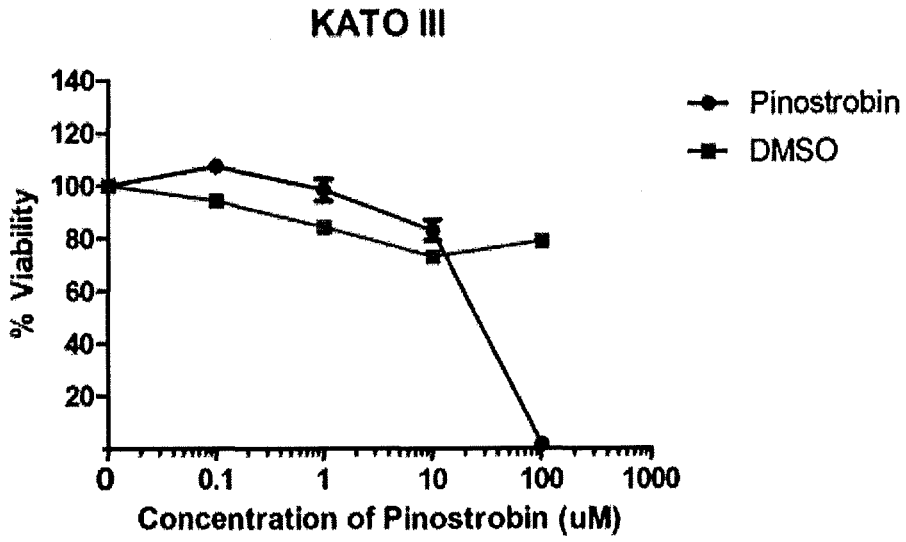
1. **ฤทธิ์การต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิดโดยพิโนสโทรบิน**

จากรายงานการวิจัยก่อนหน้าที่พบว่าพิโนสโทรบินจาก *P. lapathifolium* มีฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด Jurkat และ HL-60 (เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว human promyelocyte) (Smolarz และคณะ (2006)) และ ชนิด CCRF-CEM (เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว T-lymphoblast) (Ashidi และคณะ (2007)) เพื่อที่จะทราบว่าฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยพิโนสโทรบิน มีความจำเพาะต่อชนิดของอวัยวะ หรือเนื้อเยื่อ (organ or tissue specific) หรือไม่ ในรายงานนี้จึงทำการศึกษาผลการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในเซลล์ไลน์จากอวัยวะต่าง ๆ ดังนี้ มะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด Jurkat มะเร็งกระเพาะอาหาร KATO III มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 มะเร็งตับ HepG2 และ มะเร็งเต้านม BT474 โดยวิธี MTT viability assay จากการทดลอง 3 ซ้ำ ได้ผลดังภาพที่ 2 และค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) แสดงในตารางที่ 1

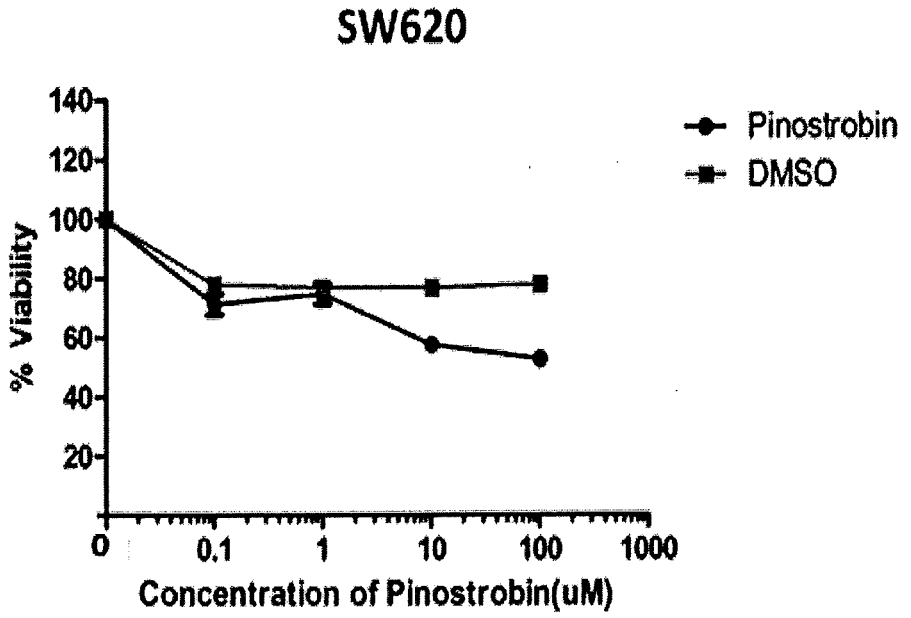
n)


Jurkat
140
120
100
80
60
40
20
% Viability
0
0.1
1
10
100
1000
Concentration of Pinostrobin(uM)
Pinostrobin
DMSO

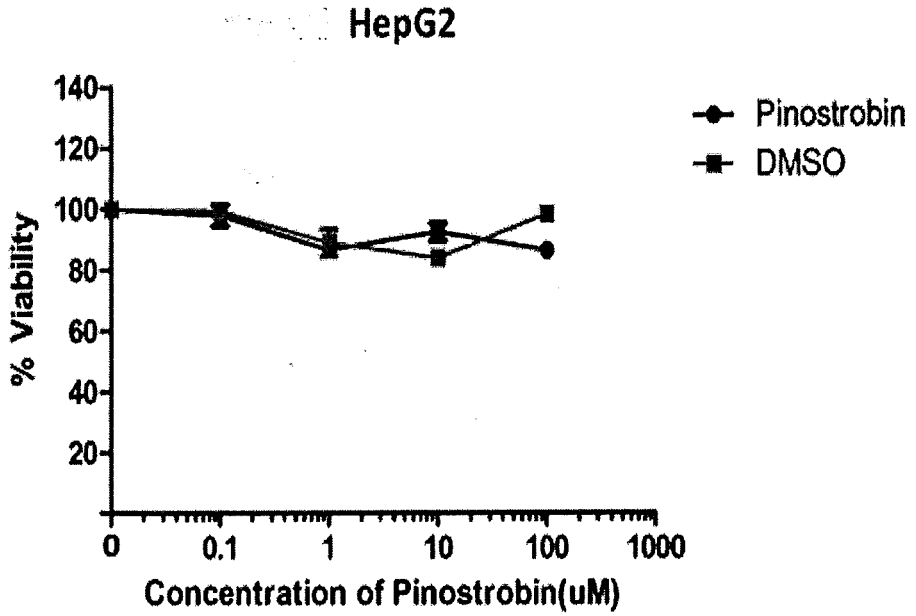
2)


KATO III
140
120
100
80
60
40
20
% Viability
0
0.1
1
10
100
1000
Concentration of Pinostrobin (uM)
Pinostrobin
DMSO

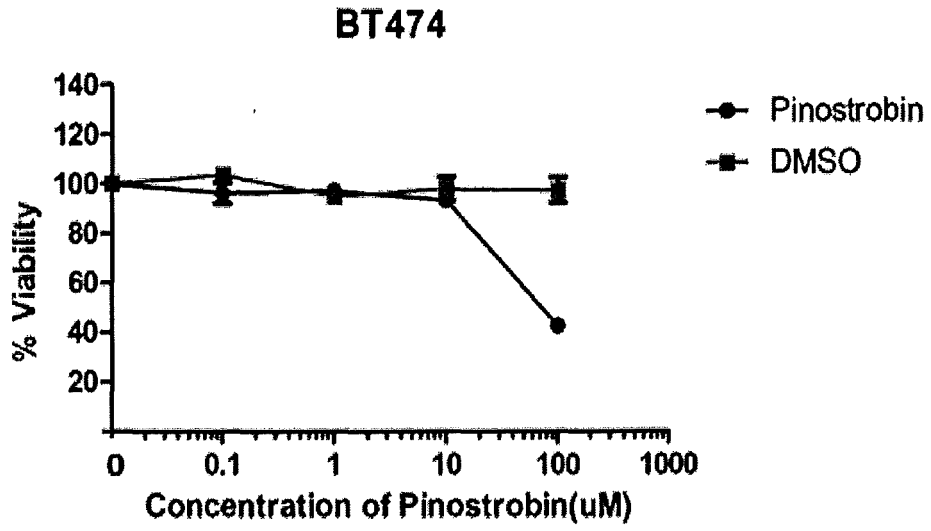
ค)


SW620
Pinostrobin
DMSO
% Viability
140
120
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
1000
Concentration of Pinostrobin(uM)

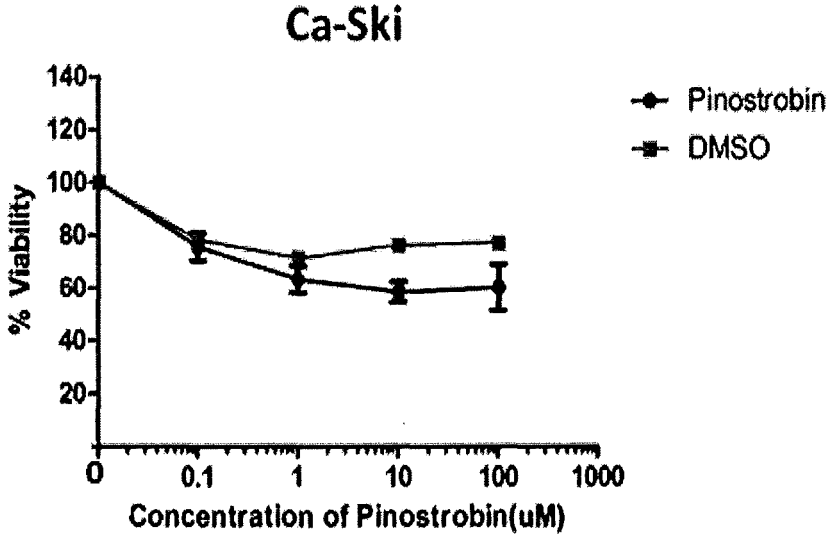
ง)


HepG2
Pinostrobin
DMSO
% Viability
140
120
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
1000
Concentration of Pinostrobin(uM)

จ)



ฉ)



ภาพที่ 2 ผลของพิโนสโทรบินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งชนิดต่าง ๆ เซลล์ไลน์มะเร็ง ก) Jurkat ข) KATOIII ค) SW620 ง) HepG2 จ) BT474 ฉ) Ca-Ski ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมพิโนสโทรบิน (●) หรือ DMSO (■) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน วัดร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดโดยวิธี MTT viability assay

ตารางที่1 ค่าความเข้มข้นของพิโนสโทรบินที่สามารถต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 (IC_{50})

ชนิด	เซลล์ไลน์	IC_{50} (ไมโครโมลาร์)
มะเร็งกระเพาะอาหาร	KATOIII	24.7 ± 4.5
มะเร็งลำไส้ใหญ่	SW620	> 100
มะเร็งตับ	HepG2	> 100
มะเร็งเต้านม	BT474	61.9 ± 1.2
มะเร็งเม็ดเลือดขาว	Jurkat	48.0 ± 6.2
มะเร็งปากมดลูก	Ca-Ski	> 100

จากผลการทดลอง พบว่าพิโนสโทรบินมีผลต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งได้ดี (มีค่า IC_{50} ต่ำกว่า 100 ไมโครโมลาร์) ในมะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat มะเร็งกระเพาะอาหาร KATOIII และมะเร็งเต้านม BT474 โดยพบว่ามะเร็งกระเพาะอาหาร KATOIII มีความไวต่อพิโนสโทรบินมากที่สุด ส่วนในอีก 3 เซลล์ไลน์ ได้แก่ มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 มะเร็งตับ HepG2 มะเร็งปากมดลูก Ca-Ski มีค่า IC_{50} เกิน 100 ไมโครโมลาร์ ทั้งนี้การศึกษาฤทธิ์ของพิโนสโทรบินต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่าง ๆ ของมะเร็งก่อนหน้างานวิจัยนี้มีจำกัด โดยงานก่อนหน้าได้มีการกล่าวถึงในบทนำไปแล้ว

การที่เซลล์ไลน์มะเร็ง 3 ชนิด ไม่ไวต่อพิโนสโทรบินนั้น อาจเป็นผลมาจากการที่พิโนสโทรบินผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ไม่ดี เพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการนำพิโนสโทรบินเข้าเซลล์ให้มากขึ้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ ไลโปโซมชนิดไขมันประจุบวก (ดังรายงานใน Apiratikul และคณะ 2013) เพื่อช่วยนำพาพิโนสโทรบินซึ่งเป็นสารที่มีขั้วต่ำเข้าสู่เซลล์

2. **อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างพิโนสโทรบินต่อไลโปโซม**

การเลือกใช้ไลโปโซมชนิดคลอเรสเตอรอลเพื่อบรรจุพิโนสโทรบินนั้น คาดหวังให้ได้ประสิทธิภาพของพิโนสโทรบินที่สูงสุดและมีความเป็นพิษจากไลโปโซมน้อยที่สุด จึงได้ทำการศึกษาเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างพิโนสโทรบินต่อไลโปโซม โดยทำการเตรียมพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซม โดยผันแปรอัตราส่วนระหว่างพิโนสโทรบินต่อไลโปโซม ดังนี้ 1:1 1:5 1:10 และ 1:20 จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยวิธี MTT viability assay โดยเลือกศึกษาในเซลล์ไลน์ 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat และมะเร็งกระเพาะอาหาร KATO III ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} ของพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซมที่อัตราส่วนต่าง ๆ ที่มีต่อเซลล์ไลน์มะเร็งกระเพาะอาหาร KATO III และ เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat

รูปแบบของพิโนสโทรบิน	IC_{50} (ไมโครโมลาร์)	
	เซลล์ไลน์ KATOIII	เซลล์ไลน์ Jurkat
พิโนสโทรบิน	24.7 ± 4.5	48.0 ± 6.2
พิโนสโทรบิน:ไลโปโซม อัตราส่วน 1:1	>100	>100
ไลโปโซม เท่ากับในอัตราส่วน 1:1	>100	>100
พิโนสโทรบิน:ไลโปโซม อัตราส่วน 1:5	20.9 ± 0.4	17.9 ± 2.2
ไลโปโซม เท่ากับในอัตราส่วน 1:5	19.3 ± 1.5	20.4 ± 0.5
พิโนสโทรบิน:ไลโปโซม อัตราส่วน 1:10	19.0 ± 2.3	3.6 ± 0.5
ไลโปโซม เท่ากับในอัตราส่วน 1:10	12.8 ± 0.2	6.4 ± 1.4
พิโนสโทรบิน:ไลโปโซม อัตราส่วน 1:20	9.3 ± 1.1	2.7 ± 0.5
ไลโปโซม เท่ากับในอัตราส่วน 1:20	18.0 ± 0.6	22.1 ± 1.2

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซมด้วยอัตราส่วน พิโนสโทรบิน : ไลโปโซม เป็น 1:1 รวมทั้งไลโปโซมที่มีปริมาณเท่ากับที่ใช้ในอัตราส่วน 1:1 ไม่พบฤทธิ์ต้าน

การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครโมลาร์) แต่เมื่อปริมาณของไลโปโซมที่เพิ่มมากขึ้น ดังเช่นในอัตราส่วนพิโนสโทรบิน:ไลโปโซม เป็น 1:5 1:10 และ 1:20 พบว่าค่า IC_{50} ของพิโนสโทรบินในไลโปโซม มีค่าลดลงเมื่ออัตราส่วนที่มีไลโปโซมที่มากขึ้น เป็นที่สังเกตว่า ที่อัตราส่วนพิโนสโทรบิน:ไลโปโซม เป็น 1:1 ไม่พบฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครโมลาร์) โดยให้ผลการทดลองไม่ต่างจาก ชุดการทดลองที่เติมเฉพาะไลโปโซมที่มีปริมาณของไลโปโซมเท่ากับในพิโนสโทรบินในไลโปโซม (LipoPino) ที่อัตราส่วน พิโนสโทรบิน:ไลโปโซม เป็น 1:1 นอกจากนี้ยังให้ค่า IC_{50}ที่สูงกว่าในชุดการทดลองที่เติมพิโนสโทรบินอิสระ อธิบายได้ว่า ใน LipoPino (1:1) นั้น พิโนสโทรบินถูกละลายใน Phosphate buffer saline (PBS) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง พิโนสโทรบินจึงไม่สามารถละลายได้ และตกเป็นผลึกแทน จึงไม่พบฤทธิ์ชีวภาพของพิโนสโทรบิน ในขณะที่พิโนสโทรบินอิสระถูกละลายใน dimethylsulfonate (DMSO) ซึ่งเป็นตัวทำละลายพิโนสโทรบินได้ดีกว่า จึงพบฤทธิ์ชีวภาพที่ดีกว่า (ค่า IC_{50} ต่ำกว่า)

ที่อัตราส่วนพิโนสโทรบิน:ไลโปโซม 1:20 พบว่าค่า IC_{50} ของพิโนสโทรบินในไลโปโซม มีค่าต่ำสุดในทั้ง 2 เซลล์ไลน์ทดสอบ นอกจากนี้ที่อัตราส่วนดังกล่าว ปริมาณของไลโปโซม มีค่า IC_{50} ที่ห่างจาก ค่า IC_{50} ของพิโนสโทรบินในไลโปโซมมากที่สุด เป็น 1.94 เท่า ในเซลล์ไลน์มะเร็ง KATOIII และ 8.2 เท่า ในเซลล์ไลน์มะเร็ง Jurkat ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างพิโนสโทรบิน:ไลโปโซม ให้สูงขึ้นเป็น 1:30 และ 1:40 พบว่าเซลล์ทดสอบมีการรอดชีวิตน้อย อันเป็นผลจากปริมาณที่มากเกินไปของไลโปโซม ซึ่งมีผลเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ (ไม่ได้แสดงผล)

ผลการทดลองในตารางที่ 2 ทำให้ผู้วิจัยเลือกอัตราส่วนระหว่างพิโนสโทรบิน:ไลโปโซม เป็น 1:20 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

และจากผลการทดลองในตารางที่ 2 จะเห็นว่าการใช้พิโนสโทรบินช่วยนำพิโนสโทรบินเข้าเซลล์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์ทดสอบได้ โดยสามารถลดปริมาณของพิโนสโทรบินลง 2.7 เท่า สำหรับเซลล์ไลน์มะเร็ง KATOIII และ 17.8 เท่า สำหรับเซลล์ไลน์มะเร็ง Jurkat ที่สามารถต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งทดสอบได้ ร้อยละ 50

3. **ลักษณะทางกายภาพของพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซม**

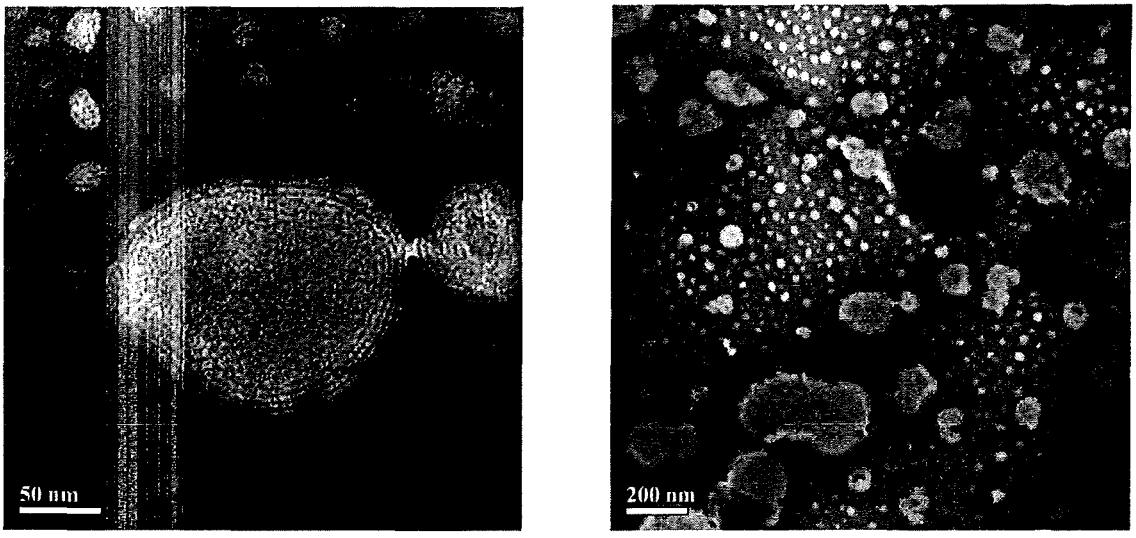
จากผลการทดลองใน ตารางที่ 2 ซึ่งผู้วิจัยได้เลือกอัตราส่วนระหว่างพิโนสโทรบิน:ไลโปโซมเป็น 1:20 (LipoPino) และจากการเตรียมพิโนสโทรบิน : ไลโปโซม ที่อัตราส่วน 1:20 ได้ผลประสิทธิภาพการเตรียมดังนี้

ค่า % Loading efficiency ประมาณ 83% (พิโนสโทรบิน 22.41 ไมโครกรัม : ไลโปโซม 448.2 ไมโครกรัม)

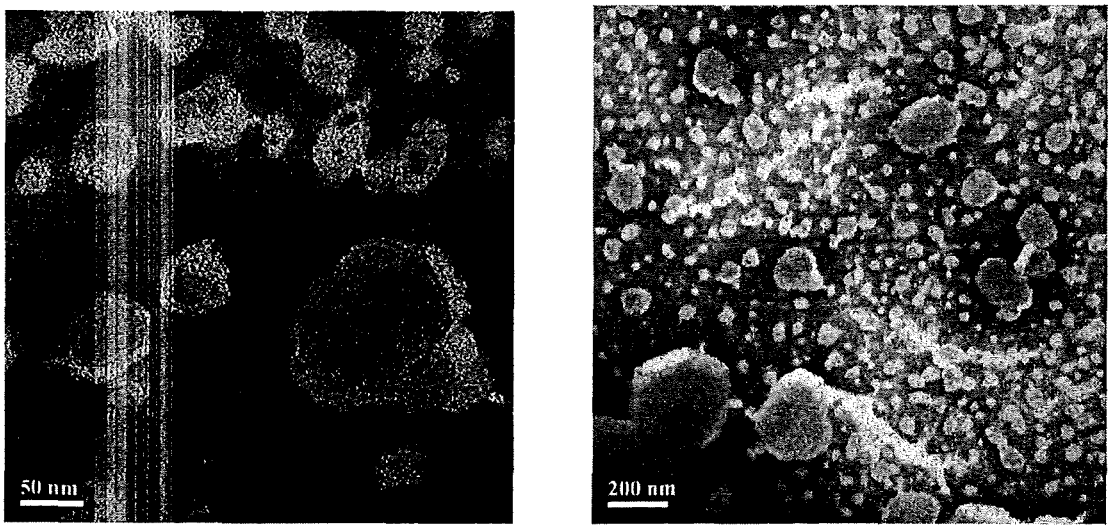
ค่า % Loading content ของ LipoPino ประมาณ 4.15%

ค่าที่ได้บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการบรรจุพิโนสโทรบินในไลโปโซมชนิดไขมันประจุบวกได้ดี และเพื่อที่จะศึกษาลักษณะสมบัติของพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซม เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร KATOIII ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่เติม 10 ไมโครโมลาร์ ของพิโนสโทรบิน ที่บรรจุในไลโปโซม (LipoPino) หรือ ไลโปโซม ในปริมาณที่เท่ากับปริมาณไลโปโซมใน LipoPino บ่มเซลล์นาน 6 ชั่วโมง ภายหลังการเก็บเกี่ยวเซลล์ และเตรียมเซลล์เพื่อนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope: TEM) ได้ผลดังภาพที่ 3

ก)

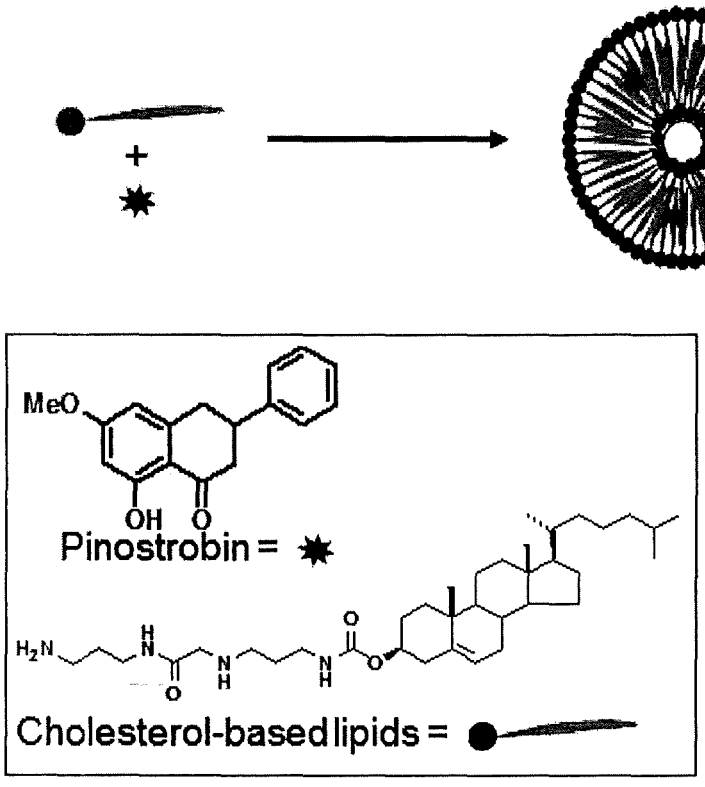


ข)



ภาพที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของไลโปโซมอิสระ (Free Liposome) **และไลโปโซมที่มีการบรรจุพิโนสโทรบิน** (LipoPino) **ภายในเซลล์ของเซลล์ไลน์มะเร็งกระเพาะอาหาร** KATOIII **เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน** ก) ไลโปโซมที่ไม่ได้มีการบรรจุพิโนสโทรบิน (Free Liposome) ข) ไลโปโซมที่มีการบรรจุพิโนสโทรบิน (LipoPino) ภายหลังที่เติม Liposome **หรือ** LipoPino 6 ชั่วโมง

ผลการทดลองจากภาพที่ 3 พบว่า ทั้งไลโปโซมที่ไม่ได้มีการบรรจุพิโนสโทรบิน (free liposome) และ LipoPino มีรูปร่างค่อนข้างกลมรี มีขนาดแตกต่างกันมาก ตั้งแต่ขนาดเล็กกว่า 50 นาโนเมตร จนถึงขนาดมากกว่า 200 นาโนเมตรมาก ซึ่งในกรณีหลังนี้ พบโครงสร้างภายใน vesicle ประกอบด้วยชั้นที่คาดว่าเป็น lipid bilayer หลายชั้นอยู่ซ้อนกัน (Multilamellar vesicle) ซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายกับที่ระบุในงานวิจัยของ Torchilin, (2005) นอกจากนั้นทั้งไลโปโซม (ภาพ 3 ก) และ ไลโปโซมที่มีการบรรจุพิโนสโทรบิน (LipoPino) (ภาพ 3 ข) ต่างก็เข้าสู่เซลล์ได้ดี ไม่พบความแตกต่างของลักษณะทางกายภาพ ทั้งรูปร่าง รูปแบบ และขนาด คณะผู้วิจัยคาดว่าพิโนสโทรบินซึ่งเป็นสารที่มีขั้วต่ำน่าจะแทรกเข้าไปในชั้นไขมันของไลโปโซมของ LipoPino ดังแสดงในภาพที่ 4

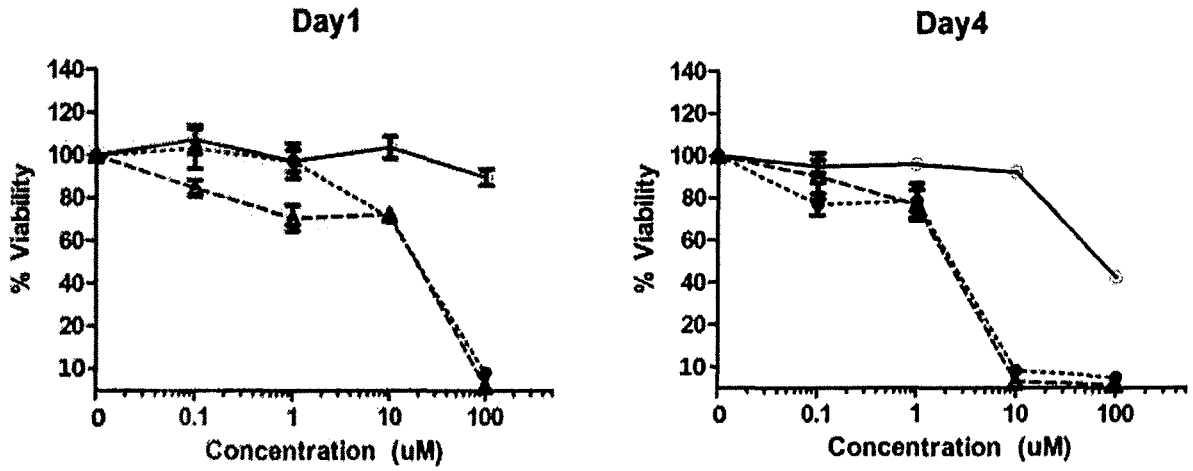


ภาพที่ 4 แบบจำลองของโครงสร้างพิโนสโทรบินในไลโปโซม

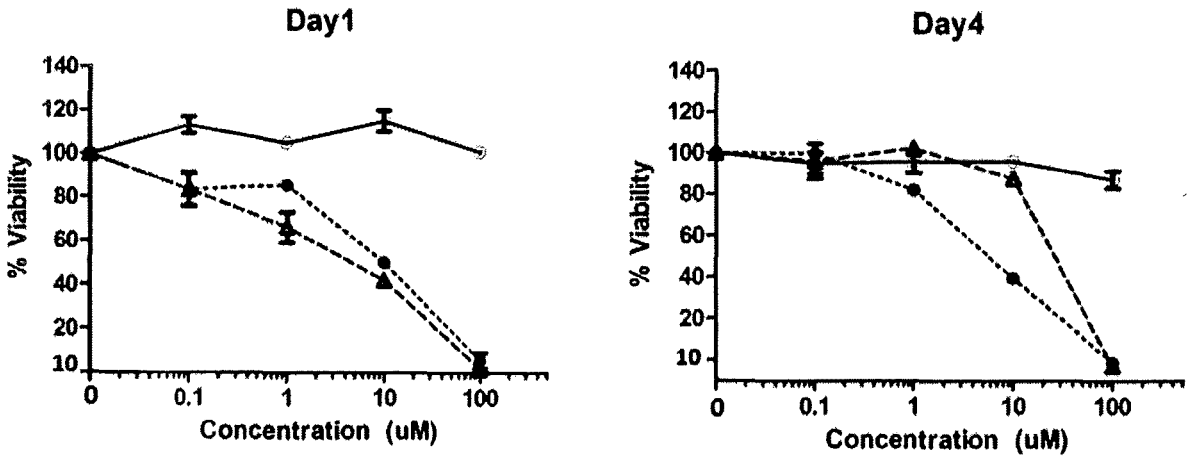
4. **ผลการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิดโดยพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซม** (LipoPino)

เพื่อที่จะศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ไลโปโซมช่วยนำพิโนสโทรบินเข้าเซลล์ จึงได้ทำการเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งทั้ง 6 ชนิดได้แก่ เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat เซลล์ไลน์มะเร็งกระเพาะอาหาร KATO III เซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 เซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์ไลน์ มะเร็งเต้านม BT474 และ เซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก Ca-Ski ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติม LipoPino หรือ ไลโปโซม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มที่ 37 °C CO_2 ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 หรือ 4 วัน วัดร้อยละการรอดชีวิต โดยวิธี MTT viability assay ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ได้ผลดังภาพที่ 4 และตารางที่ 3

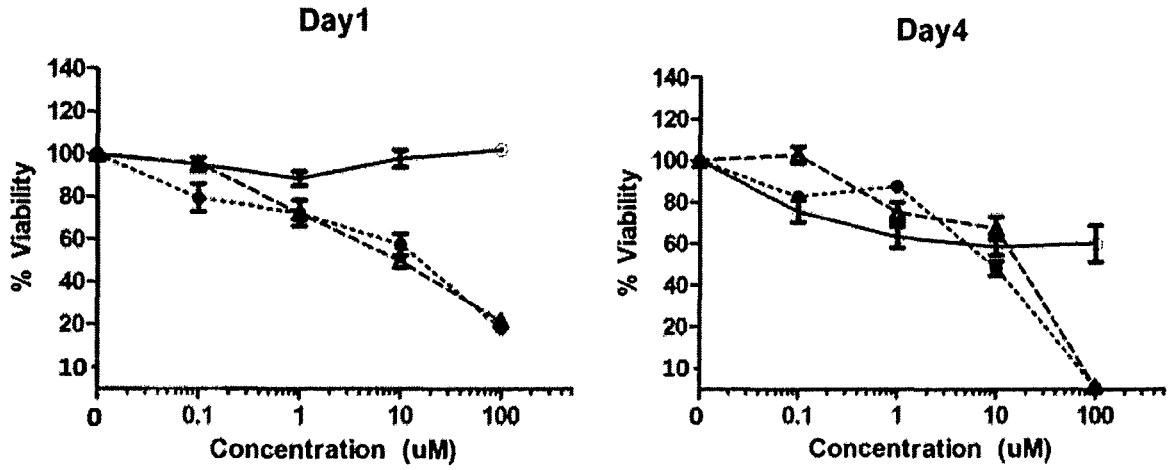
BT 474


Day1
Day4
% Viability
140
120
100
80
60
40
20
10
0
0.1
1
10
100
Concentration (uM)

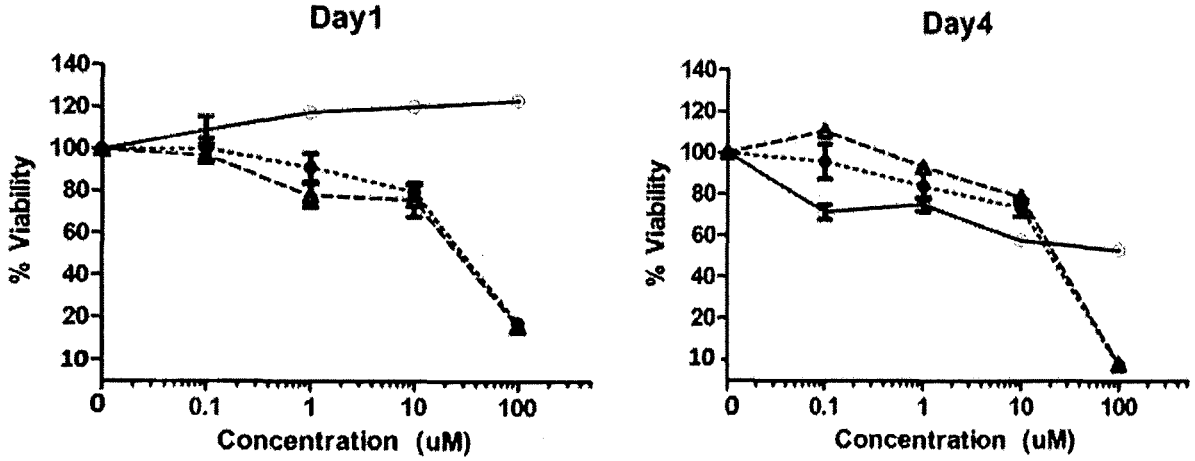
HepG2


Day1
Day4
% Viability
140
120
100
80
60
40
20
10
0
0.1
1
10
100
Concentration (uM)

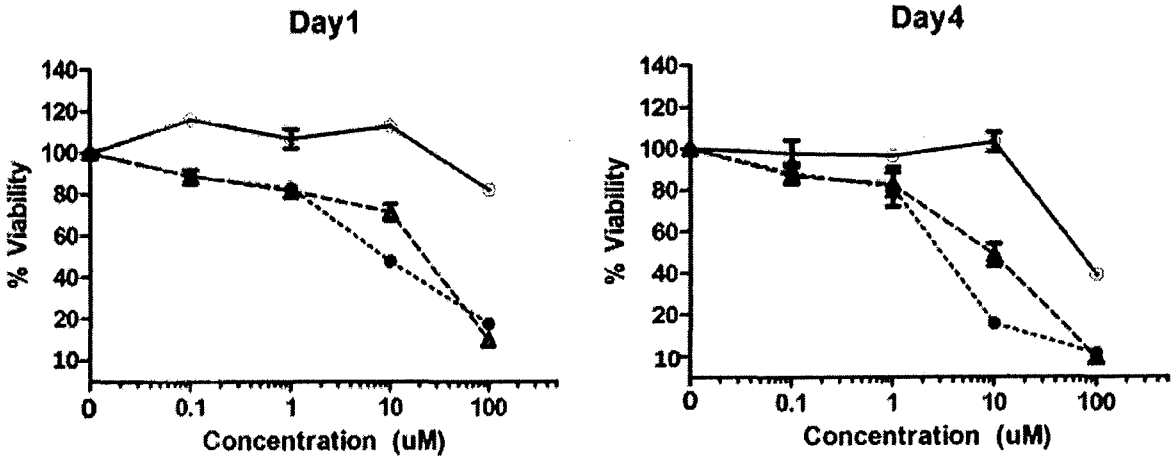
Ca-Ski


Day1
Day4
% Viability
140
120
100
80
60
40
20
10
0
0.1
1
10
100
Concentration (uM)

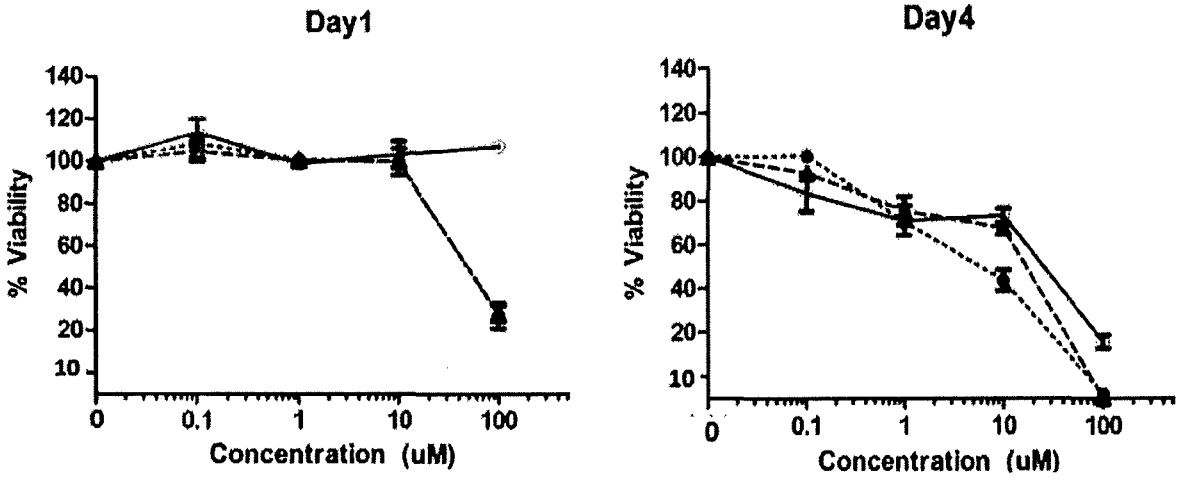
SW260


Day1
Day4
% Viability
140
120
100
80
60
40
20
10
0
0.1
1
10
100
Concentration (uM)

Jurkat



KATO III



ภาพที่ 5 ผลของพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซมที่มีต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งชนิดต่าง ๆ โดยวิธี MTT viability assay (: pinostrobin, : lipopino, : liposome)

ตารางที่ 3 ค่า IC_{50} และประสิทธิภาพของพิโนสโทรบินที่บรรจุในไลโปโซมที่มีต่อการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งชนิดต่าง ๆ

	ค่าIC_{50} (ไมโครโมลาร์)					
	Jurkat	Ca-Ski	BT474	SW620	HepG2	KATO III
Free pinostrobin	51.2 ± 1.61	>100	61.9 ± 1.15	>100	>100	24.7 ± 4.5
LipoPino	2.6 ± 0.17	7.7 ± 0.36	1.9 ± 0.03	23.2 ± 2.10	4.8 ± 0.26	9.3 ± 1.1
Liposome	10.6 ± 0.55	17.2 ± 0.65	1.6 ± 0.03	21.8 ± 1.66	28.4 ± 1.50	18.0 ± 0.6
ประสิทธิภาพของ LipoPino ที่เพิ่มจาก Pinostrobin (เท่า)	19.5	>13.1	ND*	ND*	>20.9	2.7

ND*: ตรวจสอบไม่ได้

LipoPino : ไลโปโซมที่บรรจุพิโนสโทรบิน

จากผลการทดลองในภาพที่ 4 และตารางที่ 3 พบว่าผลของ LipoPino และ Liposome อย่างเดียวที่มีต่อเซลล์ไลน์ BT474 และ SW620 ให้ผลเหมือนกัน บ่งบอกว่า Liposome มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้งสอง ซึ่งยืนยันได้จากผลในตารางที่ 4 ซึ่งแสดง ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ไลน์ชนิดต่าง ๆ เมื่อสัมผัสกับ LipoPino หรือ Liposome

ตารางที่ 4 ความเป็นพิษของไลโปโซม ที่ความเข้มข้นเท่ากับใน LipoPino ที่ความเข้มข้น IC_{50} ที่มีต่อเซลล์ไลน์มะเร็งทดสอบ

ชนิดของเซลล์ไลน์มะเร็ง	ร้อยละ การรอดชีวิตที่ความเข้มข้น IC_{50} ของ LipoPino
Jurkat	67
Ca-Ski	71
BT474	50
SW620	57
HepG2	96
KATO III	81

จากตารางที่ 4 เมื่อใช้ Liposome ที่ปริมาณเท่ากับ IC_{50} ของ LipoPino พบว่า เซลล์มะเร็ง Jurkat, Ca-Ski, HepG2 และ KATO III มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วง ร้อยละ 67- 96 ในขณะที่เซลล์มะเร็ง BT474 และ SW620 มีอัตราการรอดชีวิตประมาณร้อยละ 50 แสดงให้เห็นว่า Liposome ที่ปริมาณเท่ากับ IC_{50} ของ LipoPino มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง BT474 และ SW620 มากกว่าเซลล์ไลน์ทดสอบอื่น

จากผลการทดลองในภาพที่ 4 เมื่อทำการบ่มไลโปโซม และ LipoPino กับเซลล์ไลน์ทดสอบเป็นเวลา 1 วัน พบว่าทั้ง Liposome และ LipoPino แสดงความเป็นพิษต่อทุกเซลล์ไลน์ทดสอบตั้งแต่ความเข้มข้นของไลโปโซม 0.1 ไมโครโมลาร์ ยกเว้นในเซลล์ไลน์ SW620 ที่เริ่มพบความเป็นพิษของ Liposome ที่ความเข้มข้น >0.1 ไมโครโมลาร์ และในเซลล์ไลน์ KATOIII ที่เริ่มพบความเป็นพิษของ Lipo ที่ความเข้มข้น >10 ไมโครโมลาร์ จาก 6 เซลล์ไลน์ทดสอบ พบว่ามีเพียงเซลล์ไลน์ Jurkat ที่ LipoPino มีความเป็นพิษมากกว่า Liposome

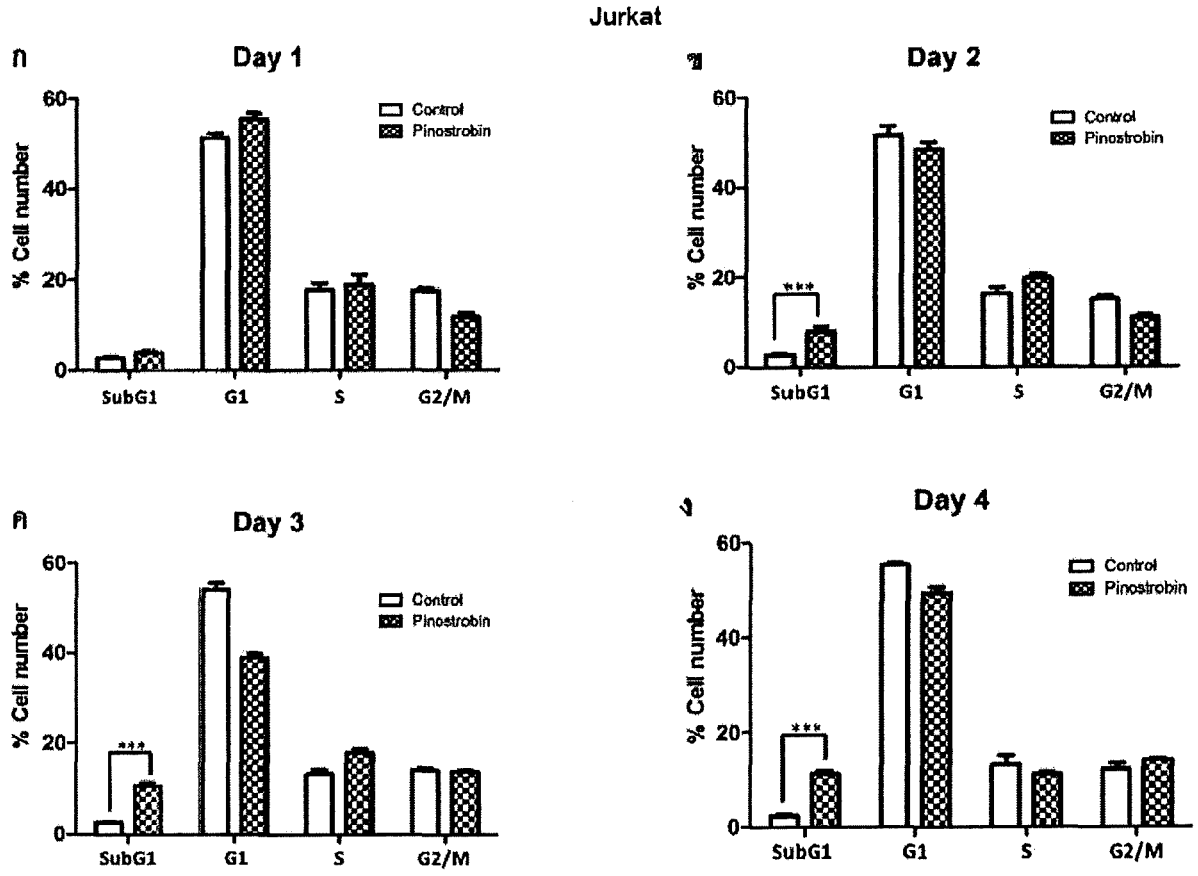
เมื่อทำการบ่ม Liposome และ LipoPino กับเซลล์ไลน์ทดสอบเป็นเวลา 4 วัน พบว่า Liposome มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ BT474 มากที่สุด และต่อเซลล์ไลน์ SW620 รองลงมา ทำให้ไม่เห็นฤทธิ์การต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งจากพิโนสโทรบินที่อยู่ใน Liposome ได้ สำหรับในเซลล์ไลน์ Ca-Ski มีความไวต่อ LipoPino ดีกว่า Liposome แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ LipoPino มากขึ้น พบว่าเซลล์มีการตายมากขึ้นใกล้เคียงกับผลจาก Liposome จากผลการทดลองในภาพที่ 4 ตารางที่ 3 และ 4 ทำให้สรุปได้ว่าเซลล์ไลน์ 3 ชนิดได้แก่ เซลล์ไลน์ BT474 เซลล์ไลน์ SW620 และเซลล์ไลน์ Ca-Ski ไม่เหมาะแก่การใช้ Liposome เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของพิโนสโทรบิน แต่จากผลการทดลองในภาพที่ 4 ตารางที่ 3 และ 4 ชี้ให้เห็นว่า Liposome ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของพิโนสโทรบินที่มีต่อการต้านการเพิ่มจำนวนในเซลล์ไลน์ Jurkat เซลล์ไลน์ HepG2 และเซลล์ไลน์ KATOIII เนื่องจากเซลล์มีการตอบสนองต่อ LipoPino ได้ดี ค่า IC_{50} ของ LipoPino ค่อนข้างต่ำ ในขณะที่ร้อยละของเซลล์ตายอันเนื่องมาจากผลข้างเคียงของ Liposome ค่อนข้างต่ำด้วยเช่นกัน หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งได้ว่า Liposome มีความเป็นพิษค่อนข้างต่ำเมื่อใช้กับ เซลล์ไลน์ Jurkat เซลล์ไลน์ HepG2 และเซลล์ไลน์ KATOIII และความเป็นพิษของ Liposome ต่อเซลล์ไลน์ BT474 และ SW620 อาจเกิดจากความแตกต่างทางกายภาพของเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดกับเซลล์ไลน์

ทดสอบอื่น ๆ หากจะมีการนำไปใช้งานควรมีการศึกษาการบรรจุพิโนสโทรบินใน Liposome ที่เตรียมโดยวัตถุดิบจากไขมันชนิดอื่น ๆ ด้วย

สรุปว่าการใช้ Liposome เป็นพาหะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของพิโนสโทรบินในการต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ 19.5 เท่าสำหรับเซลล์ไลน์ Jurkat ได้ >20.9 เท่าสำหรับเซลล์ไลน์ HepG2 และ 2.7 เท่าสำหรับเซลล์ไลน์ KATOIII เมื่อเทียบกับการใช้พิโนสโทรบินอย่างเดียว

5. ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อวัฏจักรการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งบางชนิด

เพื่อที่จะให้เข้าใจมากขึ้นถึงกลไกที่พิโนสโทรบินออกฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนในเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิดได้ ผู้วิจัยได้ทำการเลี้ยงเซลล์ไลน์ชนิดที่ไวต่อพิโนสโทรบิน แล้วทำการเติมและไม่เติมพิโนสโทรบินในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเก็บเซลล์และย้อมดีเอ็นเอด้วย Propidium iodide (PI) เพื่อศึกษารูปแบบการแบ่งเซลล์ทุกวัน นาน 4 วัน โดยวิธี Flow cytometry ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 6 ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อรูปแบบวัฏจักรการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง Jurkat

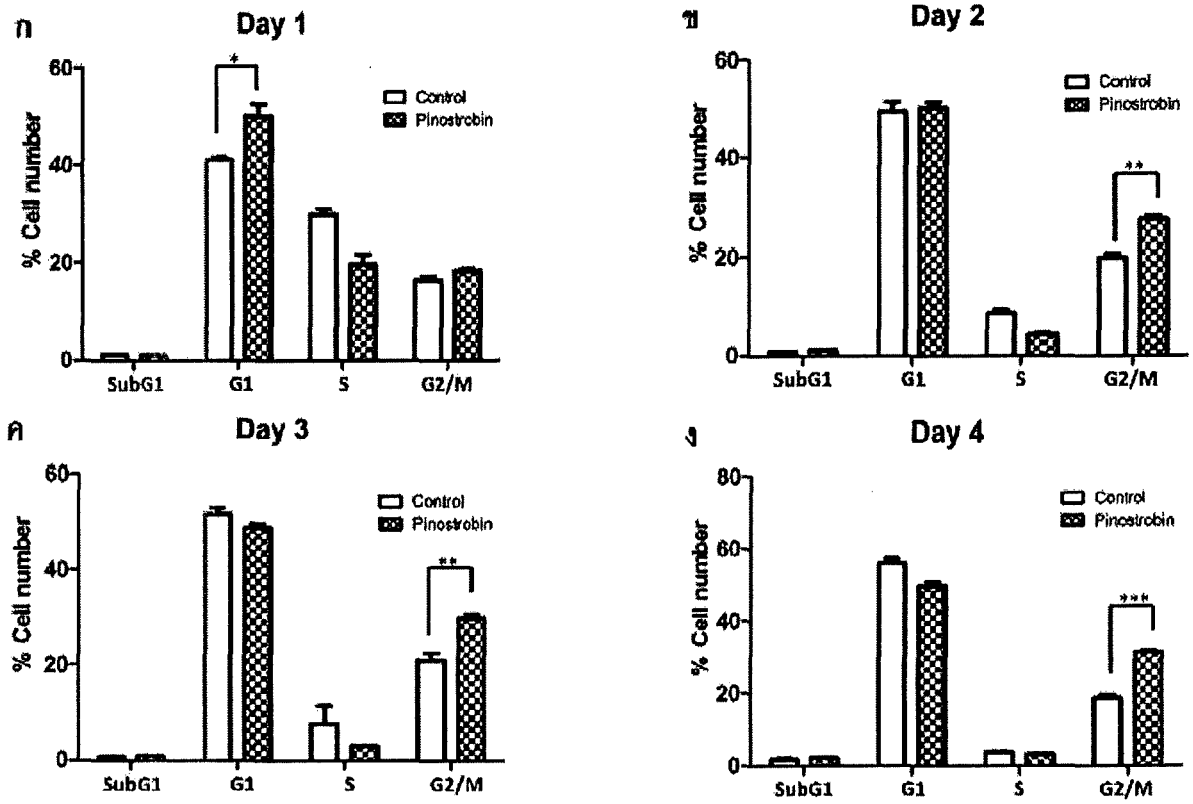
เลี้ยงเซลล์มะเร็ง Jurkat ความเข้มข้น $1.25x10^5$ เซลล์ต่อหลุม ในอาหารที่เติม 100 ไมโครโมลาร์ (ประมาณ 2 เท่า IC_{50}) พิโนสโทรบิน (กราฟแท่งลายจุด) หรือ ไม่เติม (กลุ่มควบคุม: กราฟแท่งสีขาว) บ่ม 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 ร้อยละ5 เก็บตัวอย่างเซลล์ ทุกวัน (ก-ง) นาน 4 วัน วัดปริมาณเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของวัฏจักรการแบ่งเซลล์ ด้วยเครื่อง Flow cytometer *** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.001$

ตารางที่ 5 ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อจำนวนประชากร ในระยะต่าง ๆ ของวัฏจักรการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง Jurkat

กลุ่ม	ระยะเวลาบ่ม (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์			
		Sub G1	G1	S	G2/M
กลุ่มควบคุม (ไม่เติมพิโนสโทรบิน)	24	2.7±0.6	51.4±1.8	17.7±2.6	17.4±1.1
	48	2.8±0.5	51.6±3.8	16.3±2.4	15.2±0.9
	72	2.6±0.3	54.1±2.7	13.1±1.7	13.9±0.9
	96	2.4±0.5	55.4±1.0	13.2±3.5	12.3±2.2
พิโนสโทรบิน (100 ไมโครโมลาร์)	24	3.9±0.6	55.4±2.4	18.8±4.1	11.7±1.5
	48	7.9±1.9***	48.4±2.9	19.8±1.9	11.0±1.0
	72	10.4±1.3***	39.0±1.7	17.8±1.5	13.6±0.5
	96	11.4±1.1***	49.4±2.2	11.3±1.1	14.2±0.5

*** มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.001$

KATO III



ภาพที่ 7 ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อรูปแบบวัฏจักรการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง KATOIII

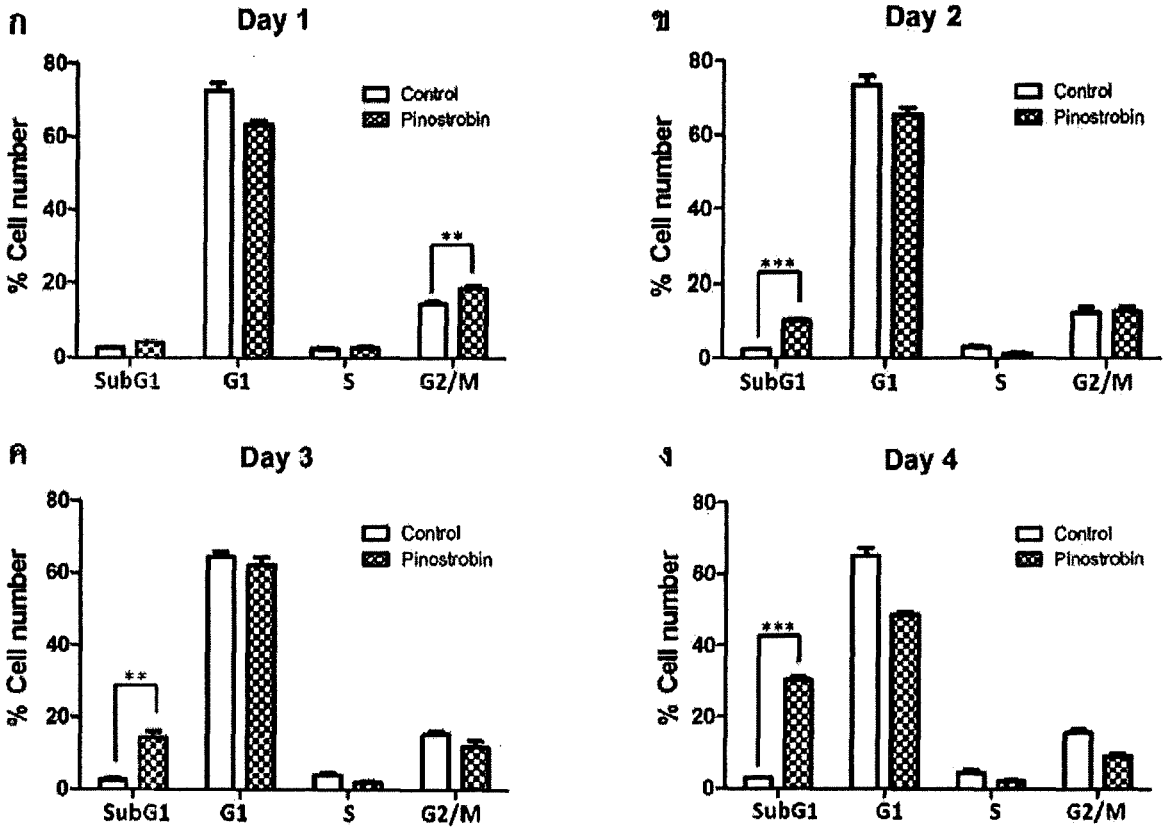
เลี้ยงเซลล์มะเร็ง KATOIII ความเข้มข้น $1.25x10^5$ เซลล์ต่อหลุม ในอาหารที่เติม 100 ไมโครโมลาร์ พิโนสโทรบิน (กราฟแท่งลายจุด) หรือ ไม่เติม (กลุ่มควบคุม: กราฟแท่งสีขาว) บ่ม 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 ร้อยละ5 เก็บตัวอย่างเซลล์ ทุกวัน (ก - ง) นาน 4 วัน วัดปริมาณเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของวัฏจักรการแบ่งเซลล์ ด้วยเครื่อง Flow cytometer *,**,*** มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$, $P<0.01$และ $P<0.001$ ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อจำนวนประชากรของเซลล์มะเร็ง KATOIII ในระยะต่าง ๆ

กลุ่ม	ระยะเวลาบ่ม (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์			
		Sub G1	G1	S	G2/M
กลุ่มควบคุม (ไม่เติมพิโนสโทรบิน)	24	1.2±0.1	41.0±0.9	29.9±2.0	16.3±1.2
	48	0.8±0.1	49.4±3.5	6.6±1.3	19.8±1.4
	72	0.7±0.1	51.7±2.4	4.0±0.4	21.5±1.7
	96	1.9±0.7	56.1±2.1	3.7±0.3	18.6±1.7
พิโนสโทรบิน (100 ไมโครโมลาร์)	24	1.0±0.1	50.1±4.3*	19.6±3.6	18.3±0.7
	48	1.0±0.1	50.1±2.2	4.4±0.4	27.5±5.1**
	72	0.9±0.0	48.8±1.3	3.0±0.1	29.2±0.7**
	96	2.3±0.4	49.6±2.3	3.1±0.2	31.4±0.6***

*,**,*** มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$, $P<0.01$และ $P<0.001$ ตามลำดับ

BT474



ภาพที่ 7 ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อรูปแบบวัฏจักรการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง BT474

เลี้ยงเซลล์มะเร็ง BT474 ความเข้มข้น $1.25x10^5$ เซลล์ต่อหลุม ในอาหารที่เติม 120 ไมโครโมลาร์ (ประมาณ 2 เท่า IC_{50}) พิโนสโทรบิน (กราฟแท่งลายจุด) หรือ ไม่เติม (กลุ่มควบคุม: กราฟแท่งสีขาว) บ่ม 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 ร้อยละ5 เก็บตัวอย่างเซลล์ ทุกวัน (ก - ง) นาน 4 วัน วัดปริมาณเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของวัฏจักรการแบ่งเซลล์ ด้วยเครื่อง Flow cytometer **,*** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$ และ $P<0.0001$ ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อจำนวนประชากรของเซลล์มะเร็ง BT474 ในระยะต่าง ๆ

กลุ่ม	ระยะเวลาบ่ม (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์			
		Sub G1	G1	S	G2/M
กลุ่มควบคุม (ไม่เติมพิโนสโทรบิน)	24	2.6±0.2	72.7±3.3	2.4±0.5	14.3±1.1
	48	2.5±0.2	73.5±4.3	3.2±0.6	12.4±2.4
	72	2.6±0.9	64.4±2.6	4.0±1.0	15.4±1.3
	96	3.1±0.0	65.1±4.0	4.5±1.4	15.7±1.7
พิโนสโทรบิน (120 ไมโครโมลาร์)	24	4.2±0.2	63.2±1.9	2.6±0.9	18.5±0.9**
	48	10.2±0.8***	65.7±3.2	1.3±0.4	12.8±1.7
	72	14.4±2.9**	62.2±3.8	2.1±0.5	11.9±3.0
	96	30.2±1.7***	48.5±1.6	2.2±0.5	9.2±1.3

,* มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$ และ $P<0.0001$ ตามลำดับ

จากผลการทดลองในภาพที่ 5-7 และตารางที่ 5-7 พบว่า พิโนสโทรบินมีผลต่อเซลล์มะเร็งที่ไวต่อพิโนสโทรบินในรูปแบบที่แตกต่างกันดังนี้ พิโนสโทรบินส่งผลให้เซลล์มะเร็ง Jurkat และ BT474 มีประชากรเซลล์ในระยะ subG1 สะสมมากกว่าเมื่อไม่ได้เติมพิโนสโทรบินอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.001$และ $P<0.0001$) โดยที่ไม่มีผลในการหยุดหรือชะลอระยะเซลล์ในระยะใดระยะหนึ่ง ซึ่งเซลล์ที่สะสมอยู่ในระยะ subG1 บ่งบอกถึงสภาพที่เซลล์มีการแตกอันเนื่องมาจากปริมาณ DNA ต่อเซลล์มีน้อยกว่า 1 ชุด ซึ่งน่าจะเป็นการตายแบบอะพอพโทซิส

สำหรับผลของพิโนสโทรบินที่มีต่อเซลล์มะเร็ง KATOIII พบว่าเซลล์มะเร็ง KATOIII ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมพิโนสโทรบินมีการหยุดสะสมอยู่ที่ระยะ G2/M มากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.001$)

จากผลการทดลองทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าพิโนสโทรบินมีกลไกการออกฤทธิ์ต่างกันในการต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต่างชนิดกัน สำหรับกลไกในเชิงลึก จำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. พิโนสโทรบินมีฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์ไลน์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat เซลล์ไลน์มะเร็งกระเพาะอาหาร KATOIII และ เซลล์ไลน์มะเร็งเต้านม BT474 ด้วยค่า IC_{50} 51.2, 24.7และ 61.9 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ โดยเซลล์ไลน์มะเร็งกระเพาะอาหาร KATOIII มีความไวต่อพิโนสโทรบินมากที่สุด

2. การใช้ Liposome ชนิดคลอเรสเตอรอลเพื่อบรรจุพิโนสโทรบิน (LipoPino) ที่อัตราส่วนระหว่างพิโนสโทรบิน : Liposome 1:20 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยในอัตราส่วนดังกล่าว ไลโปโซมสามารถบรรจุพิโนสโทรบินเข้าไปได้ ร้อยละ83 จากปริมาณตั้งต้น (% pinostrobin loading efficiency)

3. จากการศึกษาเปรียบเทียบรูปร่างและขนาดของ LipoPino กับ Liposome ที่อยู่ภายในเซลล์ไลน์มะเร็ง KATOIII ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบ่งส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope: TEM) พบว่า LipoPino มีขนาด รูปร่าง ตลอดจนลักษณะภายในที่ใกล้เคียงกับ ของ free liposome กล่าวคือ มีขนาดที่หลากหลาย พบได้ตั้งแต่ขนาดที่เล็กกว่า 50 นาโนเมตร จนถึงใหญ่กว่า 200 นาโนเมตรมาก โดยเฉพาะ vesicle ที่มีขนาดใหญ่มาก สามารถมองเห็นโครงสร้างภายในมีการจัดเรียงเป็นหลาย ๆ ชั้นซ้อนกัน (multilamellar vesicle) ซึ่งน่าจะเป็นชั้นของ lipid bilayer รูปร่างของ vesicle ที่พบไม่แน่นอน ส่วนใหญ่พบว่ามีรูปร่างค่อนข้างกลมรี คาดว่าพิโนสโทรบินซึ่งเป็นสารที่มีขั้วต่ำน่าจะเข้าไปอยู่ที่ชั้นไขมันของไลโปโซมของ LipoPino

4. การใช้ Liposome ชนิดคลอเรสเตอรอลเพื่อช่วยนำเข้ายาหรือสารออกฤทธิ์ ไม่เหมาะกับเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิด ในการศึกษานี้พบว่า Liposome ประจุบวกชนิดคลอเรสเตอรอล มีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์ไลน์ มะเร็งเต้านม BT474 และเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620

5. การใช้ Liposome เพื่อนำพิโนสโทรบินเข้าเซลล์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของพิโนสโทรบินในการต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งในเซลล์ไลน์ Jurkat เซลล์ไลน์ KATOIII และ เซลล์ไลน์ HepG2 ได้ดีขึ้น 2.7 -20 เท่า ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ไลน์ โดยได้ผลดีที่สุดกับเซลล์ไลน์ HepG2

6. จากการศึกษาในเซลล์ไลน์ที่ไวต่อพิโนสโทรบิน พบว่าพิโนสโทรบินมีผลทำให้เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat และเซลล์ไลน์มะเร็งเต้านม BT474 มีการสะสมอยู่ที่ระยะ subG1 สำหรับในเซลล์ไลน์มะเร็งกระเพาะอาหาร KATOIII พิโนสโทรบินมีผลทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ G2/M แสดงให้เห็นว่า พิโนสโทรบินมีกลไกในระดับโมเลกุลที่ต่างกันในการต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต่างชนิดกัน

เอกสารอ้างอิง

Apiratikula N, Penglongb T, K. Suksenc, Svastib S, Chairoungduac A and Yingyongnarongkul B. In vitro delivery of curcumin with cholesterol-based cationic liposomes. Russ J Bioorg Chem, 2013;39:444-450.

Ashidi JS, Houghton PJ, Hylands PJ, Sieber S and Efferth T. Molecular mechanism of action of the flavanone pinostrobin from Cajanus cajan leaves in cancer cells. Planta Med, 2007;73(9):855-855.

Bachrach U, Wang Y-C: Cancer therapy and prevention by green tea. Role of ornithine decarboxylase. Amino Acids, 2002;22:1-13.

Bozzola JJ. Conventional Specimen Preparation Techniques for Transmission Electron Microscopy of Cultured Cells. Meth Mol Biol, 2007;369:1-18.

Chonna A and Cullis PR: Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery. Adv Drug Deliver Rev, 1998;30:73-83.

Dass CR. Improving anti-angiogenic therapy via selective delivery of cationic liposomes to tumour vasculature. International J of Pharmaceutics, 2003;(267):1-12.

Etten EWMV, Vianen WV, Roovers P and Frederik P. Mild Heating of Amphotericin B-Desoxycholate: Effects on Ultrastructure, In Vitro Activity and Toxicity, and Therapeutic Efficacy in Severe Candidiasis in Leukopenic Mice. Antimicrob Agents Ch, 2000;44:1598-1603.

Huang CM, Chen CH, Pornpattananangkul D, Zhang L, Chan M, Hsieh MF and Zhang L. Eradication of drug resistant Staphylococcus aureus by liposomal oleic acids. Biomaterials, 2011;32(1):214-221.

Lee SC, Cowgill EJ, Al-Nabulsi A, Quinn EJ, Evans SM and Reese BE. Homotypic regulation of neuronal morphology and connectivity in the mouse retina. The Journal of neuroscience. J Neusosci, 2011;31(40):14126-14133.

Li L, Ahmed B, Mehta K and Kurzrock R. Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer. Mol Canc therapeut, 2007;6(4):1276-1282.

Liolios CC, Gortzi O, Lalas S, Tsaknis J and Chinou I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of Origanum dictamnus L. and in vitro antimicrobial activity, Food Chem 2009;112(1):77-83.

Mehta RT, Hopfer RL, Gunner LA, Juliano RL and Lopez-Beresteinl G. Formulation, Toxicity, and Antifungal Activity In Vitro of Liposome-Encapsulated Nystatin as Therapeutic Agent for Systemic Candidiasis. AAC, 1987;31:1897-1900.

Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J Immunol Methods, 1983;65:55-63.

Newman DJ and Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. J Nat Prod, 2007; 70:461-477.

Sastry N. Urbanization, development and under-five mortality differentials by place of residence

Zhu L and Mahato RI. Lipid and polymeric carrier-mediated nucleic acid delivery. Expert Opin Drug Del, 2010;7(10):1209-1226.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2555 (R_017_2555)

Output

1. งานวิจัยนี้ได้ถูกนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการนานาชาติ TSB2014 ที่มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่จัดขึ้นระหว่าง 26-29 พฤศจิกายน 2557 ในหัวข้อ Anti-proliferation activity of pinostrobin from *Boesenbergia pandurata* and its efficacy improvement using cationic liposome on human cancer cell lines โดยได้รับรางวัล **Best Proceeding Paper Award**

2. Sopanaporn J, Apirattikul N, Palaga T, Yingyongnarongkul B and Yompakdee C. Efficacy improvement on anti-proliferation activity of pinostrobin, a flavanone from *Boesenbergia pandurata*, by a cationic liposome. Manuscript in preparation.