รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสาร คาบิเรไมด์ ซี ดีเมทธอกซีคาบิเรไมด์ ซี และเฮทาโรนีมิน ที่มีต่อการแตกหักของดีเอ็นเอและการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งเต้านม

Study of kabiramide C, demethoxykabiramide C and heteronemin on DNA fragmentation and gene expression on breast cancer cell line

ผู้วิจัย
นางสุปรียา ยืนยงสวัสดิ์
นางสาวสิรีวรรณ แก้วสุวรรณ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2552-2554

สัญญาเลขที่ PHA520114S

เมษายน 2555

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ประเภทพัฒนานักวิจัยประจำปี 2552 ในการสนับสนุนการวิจัยเรื่องการศึกษาสาร คาบิเรไมด์ ซี ดีเมทธอกซีคาบิเรไมด์ ซี และเฮทาโรนีมิน ที่มีต่อการแตกหักของดีเอ็นเอและการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งเต้านม

ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ศูนย์บริการปฏิบัติการทางเภสัชศาสตร์ และภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนสถานที่ตลอดจนให้สิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆ ในการทำวิจัย

บทคัดย่อ

มะเร็งเกิดจากการเสียสมดุลระหว่างการสร้างเซลล์ และการตายของเซลล์ สาร Kabiramide C และ Demethoxykabiramide C ที่แยกได้จาก *Plakinastrella* และ heteronemin ซึ่งได้จาก *Hyrtios* มีฤทธิ์ที่ดีต่อการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม จากการตรวจการแตกหักของ DNA ซึ่งเป็นตัวชี้วัดการตายแบบ อะพอพโทซิสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟไรซิส และผลของสารต่อการแสดงออกของยีน พบว่า สารคาบิเรไมด์ ซี ดีเมทธอกซีคาบิเรไมด์ ซี และเฮทาโรนีมิน ทำให้เกิดอะพอพโทซิสร่วมกับการลด ไซคลินอี ไซคลินบี และซีดีเคหนึ่ง ทำให้เกิดการชะงักการทำงานของวงจรชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม

Abstract

Tumor growth is regulated by the balance between cell proliferation and apoptosis.

Kabiramide C and Demethoxykabiramide C isolated from *Plakinastrella* and heteronemin isolated from *Hyrtios* have been proposed as potent cytotoxic compounds against breast carcinoma (MCF-7) cell line. Fragmentation of genomic DNA, which was the crucial characteristics of apoptosis, was detected to confirm apoptotic cell death by agarose gel electrophoresis. The inhibitory effect of the compounds on mRNA expression of genes related cell proliferation was also investigated. This study showed that heteronemin, kabiramide C and demethoxykabiramide C induced apoptosis were associated with reduction of mRNA level of Cyclin E, Cyclin B and Cdk1. Our data support antiproliferation of breast cancer cell line by inducing cell cycle arrest.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญรูป	ง
บทที่ 1 บทนำ	1
1. วิธีตรวจการตายแบบ apoptosis	2
2. การศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆที่มีผลเกี่ยวกับเซลล์มะเร็ง	3
บทที่ 2 วิธีวิจัย	9
1. การเตรียมเซลล์	9
2. การศึกษาการแตกหักของสายดีเอ็นเอ	9
3. การศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆที่มีผลเกี่ยวกับเซลล์มะเร็ง	10
3.1 การสกัด total RNA จากเซลล์มะเร็ง MCF-7	10
3.2 การสังเคราะห์สาย cDNA จากเซลล์มะเร็ง MCF-7	10
3.3 การทำ PCR amplification ของยีนต่างๆ ที่มีผลเกี่ยวกับเซลล์มะเร็ง	11
บทที่ 3 ผลการทดลอง	12
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผล	17
เอกสารอ้างอิง	19

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 Genomic DNA ของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่บ่มด้วยสาร Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) kabiramide C (K) เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis 13

รูปที่ 2 mRNA expression ของยีน Cyclin E จากเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่บ่มด้วย สาร Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) kabiramide C (K) เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis 15

รูปที่ 3 mRNA expression ของยีน Cyclin B จากเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่บ่มด้วย สาร Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) kabiramide C (K) เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis 15

รูปที่ 4 mRNA expression ของเอนไซม์ Cdk1 จากเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่บ่มด้วย สาร Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) kabiramide C (K) เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis 16

รูปที่ 5 mRNA expression ของยีน Cyclin D จากเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่บ่มด้วย สาร Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) kabiramide C (K) เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis 16

บทที่ 1

บทนำ

มะเร็ง คือ กลุ่มของโรคที่เกิดเนื่องจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติ ที่ DNA หรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว และมากกว่าปกติ โรคมะเร็งเป็นโรคที่พบบ่อย พบได้ทั่วโลกและเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์ที่มีอัตราการเจ็บป่วยและอัตราการตายสูงมากทั้งในผู้ชายและผู้หญิง คนมากกว่า 6 ล้านคนทั่วโลกเป็นมะเร็ง โดยมะเร็งเต้านมพบเป็นอันดับ 1 ของสตรีทั่วโลก แต่ในประเทศไทยพบเป็นอันดับ 2 รองจากมะเร็งปากมดลูก ทุกวันนี้พบว่ายาเคมีบำบัดมะเร็งที่นำมาใช้รักษาทางคลินิก ทำให้เกิดผลข้างเคียงและการต้านยา ปกติแล้วเซลล์มะเร็งจะสูญเสียคุณสมบัติในการเกิด apoptosis ซึ่งมีในเซลล์ปกติเมื่อเกิดการผิดปกติหรือหมดอายุขัยในการทำงาน เซลล์จะถูกกำจัดด้วยกลไกดังกล่าว ด้วยเหตุนี้เซลล์มะเร็งจึงไม่ถูกกำจัด ถ้าเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการนี้ได้เซลล์มะเร็งจะตาย การทำลายเซลล์มะเร็งโดยทำให้เซลล์มะเร็งเกิด apoptosis ซึ่งไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงจึงเป็นแนวทางใหม่ของยาต้านมะเร็ง

เซลล์ร่างกายมนุษย์สร้างใหม่และตายลงเป็นวงจรอย่างสมดุล มีระบบหรือโปรแกรมและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมเพื่อให้เกิดความสมดุลตามธรรมชาติ เช่น growth factor , apoptosis program , receptor ต่างๆ , DNA และ protein อีกหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีระบบตรวจสอบความผิดปกติของ DNA และของเซลล์อีกหลายชนิด เพื่อทำการซ่อมแซมและหยุดวงจรการสร้างเซลล์ หากเกิดความผิดปกติขึ้น หรือการทำลายเซลล์ที่ผิดปกติก่อนที่ความผิดพลาดในระดับ DNA จะถูกถ่ายทอดต่อไปยังเซลล์ลูก (daughter cell) ดังนั้นร่างกายจะอยู่ในสมดุลของการสร้างเซลล์ (cell proliferation) และการทำลายเซลล์ (apoptosis) เกือบตลอดเวลาอันยาวนานของชีวิต หากมีเซลล์ใดเซลล์หนึ่งที่ผิดปกติ แล้วหลุดรอดไปจากการ

ทำลายของระบบได้ ความสมดุล ณ ตำแหน่งของอวัยวะนั้นจะเสียไป เซลล์ที่ผิดปกติจะเริ่มเปลี่ยนแปลงให้ผิดปกติมากขึ้นในเซลล์รุ่นลูกๆ จนกระทั่งเป็นเซลล์มะเร็งหรือเนื้อร้าย (Zhang, et al, 2004)

เนื่องจากปกติแล้วเซลล์มะเร็งจะสูญเสียคุณสมบัติในการเกิด Apoptosis ซึ่งมีในเซลล์ปกติ เมื่อเกิดการผิดปกติหรือหมดอายุขัยในการทำงานก็จะถูกกำจัดด้วยกลไกดังกล่าว ด้วยเหตุนี้เองเซลล์มะเร็งจึงไม่ถูกกำจัด หากสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการนี้ในเซลล์มะเร็งได้ จะทำให้เซลล์มะเร็งตาย Apoptotic cells มีเครื่องบ่งชี้ทางรูปร่างและชีวเคมี การตรวจ apoptosis มีหลายวิธีโดยตรวจเครื่องบ่งชี้เหล่านี้ (Wang and Shi, 2002) แต่ละวิธีมีหลักการและข้อดีข้อด้อยแตกต่างกัน

วิธีตรวจการตายแบบ apoptosis ทำได้หลายวิธีคือ

1. Annexin V/ propidium iodide (PI) binding เป็นการใช้ annexin Vในการจับ phosphatidylserine ที่เยื่อหุ้มพลาสมา phosphatidylserine มีคุณสมบัติเป็น anionic phospholipid ปกติจะอยู่ด้านในของ plasma membrane ระยะแรกของการตายแบบ apoptosis จะเกิด membrane alteration ส่วนของ phosphatidylserine จะย้ายมาอยู่ด้านนอก ซึ่งสามารถจับกับ annexin V ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง อาจใช้ร่วมกับการย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide จะทำให้สามารถจำแนกเซลล์ ได้โดยสารทั้งสองนี้ไม่ซึมผ่านผนังเซลล์ที่มีชีวิต (annexin V negative/PI negative), early apoptosis cell (annexin V positive/PI negative), late apoptosis cell หรือ necrosis (annexin V positive/PI positive)
2. การวัดระดับเอนไซม์ caspase ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทในการกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบ apoptosis เช่น caspase-3, caspase-8 และ caspase-9 เป็นต้น
3. ตรวจ DNA fragmentation วิธีที่ใช้กันทั่วไปเพื่อตรวจเบื้องต้นคือ fragmentation of genomic DNA โดยมีหลักการคือ เซลล์ apoptosis จะเกิดการแตกหักของ genomic DNA เป็น

oligonucleosomal fragments หรือ fragmented DNA มีรูปแบบจำเพาะขนาด 180-200 bp โดยทั่วไปเรียกว่า apoptotic ladder และยังอาจพบ DNA fragment ขนาดใหญ่ประมาณ 50-300 kb ร่วมด้วย วิธีตรวจ DNA fragmentation ทำได้หลายวิธีคือ

- การตรวจการแยกตัวของ DNA ด้วย agarose gel electrophoresis เป็นการตรวจ fragmented DNA เบื้องต้น
- การตรวจปริมาณ fragmented DNA โดยใช้ Strand break labeling (TUNEL assay) เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis สาย DNA ถูกตัดด้วย endonuclease มีส่วนที่เป็น strand break ตรวจสอบได้โดยการเติมสารพวก Biotinylated BrdU หรือ digoxygenin-labeled nucleotide ให้กับส่วนปลายสาย DNA ด้วยเอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง

4. วิธีตรวจปริมาณ mRNA เมื่อเกิด apoptosis จะมีการสร้าง RNA ที่กำหนดการสร้างสารชีวเคมีต่างๆที่ควบคุม apoptosis การวิเคราะห์ mRNA ทำได้โดยสกัด RNA ออกมาแล้วเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ Reverse transcriptase และเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ซึ่งสามารถบ่งชี้การแสดงออกของยีนต่างๆที่ควบคุม apoptosis (ปกป้อง และคณะ, 2007)

ในการวิจัยนี้ได้เลือกตรวจการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยดูการแตกหักของ DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีการตรวจ fragmented DNA เบื้องต้น

การศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆที่มีผลเกี่ยวกับเซลล์มะเร็ง

ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งต้องเจริญเติบโตผ่านขั้นตอนทางชีวเคมีตามลำดับ เป็นวงจรที่เรียกกันว่ากับวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) ดังภาพ โดยเซลล์ปกติ จะมีกลไกที่สลับซับซ้อนของร่างกาย คอยควบคุมให้มี

จำนวนเซลล์แต่ละชนิดอยู่ในระดับที่เหมาะสม แต่โรคมะเร็งเกิดจากระบบควบคุมนี้สูญเสียประสิทธิภาพ ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถเจริญเติบโตไปเรื่อยๆ โดยร่างกายควบคุมไม่ได้

โปรตีนจากยีนมะเร็งในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (Marks et al, 2005)

แบ่งได้เป็นหลายประเภทดังนี้

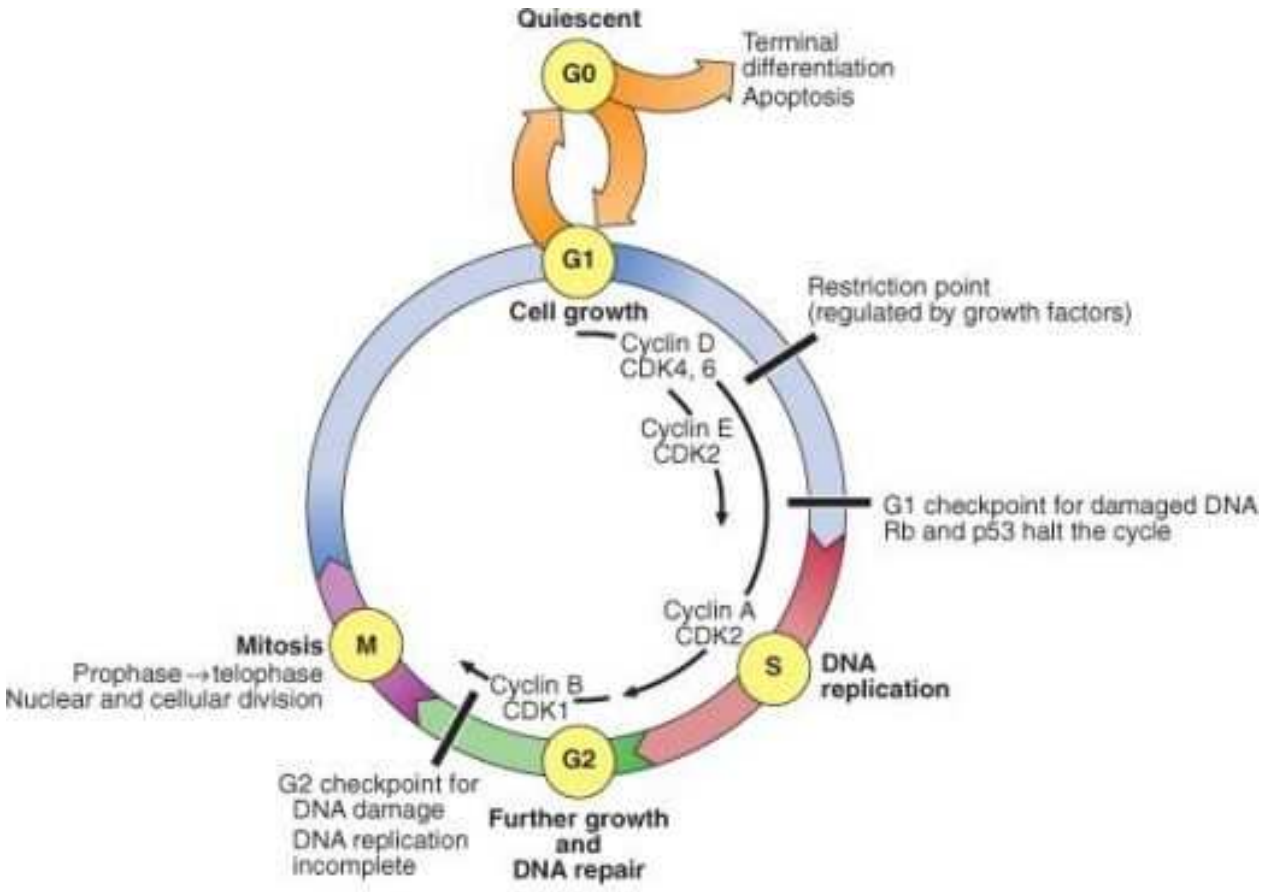
1. Growth factors เป็นกลุ่มโปรตีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตโดยทำหน้าที่เป็น ligands สำหรับจับกับ receptors ที่เยื่อหุ้มเซลล์ เช่น platelet-derivedgrowth factor (PDGF)
2. Growth factor receptors คือกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสารกระตุ้นการเจิญเติบโตที่เยื่อหุ้มเซลล์ เช่น Epidermal growth factor receptor (EGFR)
3. Intracellular transducers คือกลุ่มโปรตีน GTP-binding ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ด้านใน โดยการรับสัญญาณจาก receptors เช่น Ras และ Raf เป็นต้น
4. Transcription factor กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีน เช่น Fos, Jun และ Myc เป็นต้น
5. Apoptotic regulator proteins คือโปรตีนที่ควบคุมกระบวนการ apoptosis เช่น Bcl-2 และ Bax เป็นต้น
6. DNA repair proteins คือโปรตีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซม DNA ที่บกพร่องหรือถูกทำลาย เช่น BRCA เป็นต้น
7. Cell-cycle control proteins คือ กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุม cell cycle เช่น cyclins และ cyclin-dependent kinases (Cdks)

หน้าที่สำคัญของ cell cycle คือสร้าง DNA ขึ้นมาเป็นจำนวนมาก เพื่อทำให้โครโมโซมสามารถแบ่งตัวเกิด mitosis (ดังภาพ) cell cycle จะถูกควบคุมโดยโปรตีนกลุ่มหนึ่งเรียกว่า cyclins ซึ่งอัตราการสร้าง

การสลาย และการกระตุ้นโดยเติมหมู่ฟอสเฟตให้ cyclins จะเป็นตัวกำหนดอัตราเร็วในการที่เซลล์จะดำเนินต่อไปจนจบขบวนการต่างๆ ใน cell cycle (Lee et al, 2006)

cyclins มีหลายชนิด ที่สำคัญคือ cyclin D ควบคุมเซลล์ในระยะ G1 ที่เริ่มมีการเตรียมจะแบ่งตัวซึ่งมีปริมาณ DNA คงเดิม cyclin E ควบคุม cell cycle ณ จุดที่เซลล์ดำเนินกิจกรรมต่างๆ จาก G1 phase เข้าสู่ระยะ S phase และ cyclin B ซึ่งจะควบคุม ณ จุดที่เซลล์ผ่านจาก G2 phase เข้าสู่ระยะ M phase โปรตีนภายในเซลล์ที่สำคัญอีกตัวหนึ่งคือ cyclin dependent kinases (CDKs) ซึ่งจะออกฤทธิ์เมื่อจับกับ cyclin โดยเติมหมู่ฟอสเฟตให้ cyclin-CDK complex ในระยะ Interphase เป็นระยะที่สำคัญมาก และใช้เวลานานที่สุดเป็นระยะที่กำหนดว่าเซลล์จะทำงานต่อไปหรือว่าจะแบ่งตัว การที่เซลล์เข้าสู่กระบวนการแบ่งตัวถูกควบคุมโดยโปรตีนหลายชนิด ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปตามระยะต่างๆดังกล่าว (Mantena et al, 2006)

การเพิ่มจำนวนของเซลล์เป็นกระบวนการที่มีความสัมพันธ์กับวัฏจักรเซลล์อย่างใกล้ชิด ดังนั้นวัฏจักรเซลล์จึงเป็นเป้าหมายสำคัญอย่างหนึ่งของการพัฒนายาต้านมะเร็ง ตัวจักรสำคัญที่มีหน้าที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์คือ เอนไซม์ที่มีชื่อว่า cyclin-dependent kinases (CDK) เอนไซม์ชนิดนี้ถูกกระตุ้นให้ทำงานโดย cyclin และถูกยับยั้งมิให้ทำงานโดยโปรตีนอีกชนิดหนึ่งคือ CDK inhibitors (CDKIs) การกระตุ้น CDKs โดย cyclin มีผลทำให้เซลล์ที่กำลังอยู่ในวัฏจักรเซลล์สามารถผ่านจากระยะหนึ่งไปสู่อีกระยะหนึ่งของวัฏจักรเซลล์ได้ ส่วนการยับยั้ง CDK โดย CDKIs มีผลทำให้เซลล์หยุดชะงักอยู่ที่ระยะใดระยะหนึ่งของวัฏจักรเซลล์ จากบทบาทของ CDKs ตามที่ได้กล่าวมา ทำให้ตั้งสมมติฐานได้ว่า เซลล์มะเร็งอาจมีกำเนิดมาจากเซลล์ใดเซลล์หนึ่งในร่างกายที่ cyclin ทำงานมากเกินไป หรือ CDKIs ทำงานน้อยเกินไป เซลล์นั้นจึงผ่านเข้าสู่วัฏจักรเซลล์ และเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าเซลล์ปกติจนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง ดังนั้นถ้าเราสามารถพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CDKs และ cyclin ได้ เราน่าจะประสบความสำเร็จในการควบคุมหรือรักษาโรคมะเร็งได้



ภาพ แสดงระยะการแบ่งตัวของเซลล์และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง (http://s2.hubimg.com/u/150501_f520.jpg)

จากเหตุผลดังกล่าวทำให้มีการศึกษาเพื่อมุ่งหาสารใหม่ที่มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งโดยมีกลไกดังกล่าวจากหลายแหล่งในธรรมชาติรวมทั้งสิ่งมีชีวิตในทะเล (Lin et al, 2005)

ทะเลและมหาสมุทรเป็นที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตในทะเล (marine organisms) มากมายหลากหลายชนิด พบว่ามีสัตว์ชนิดต่าง ๆ มากกว่า 95% ที่อาศัยอยู่ในท้องทะเลเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง(marine invertebrates) ซึ่งเป็นแหล่งที่มีความอุดมสมบูรณ์หลากหลายของกลุ่มสารเคมีและสารตั้งต้นทางยา ได้แก่ พวกฟองน้ำ (sponges) พวกปะการังอ่อน (soft corals) และ coelentebrates อื่น ๆ พวก echinoderms พวก bryozoans และพวกเพรียงหัวหอม (tunicates หรือ ascidians) ซึ่งโดยทั่วไปสัตว์เหล่านี้โดยเฉพาะพวกที่อยู่นิ่งอยู่กับที่ (sessile organisms) มักจะไม่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและไม่สามารถใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์ได้ เนื่องจากมีรสชาดไม่ดีและมีความเป็นพิษสูง จึงมีการศึกษาไม่มากนัก ข้อมูลจากการทดสอบเบื้องต้นของยา

ต้านมะเร็งในระดับ preclinic ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (National Cancer Institute, NCI) พบว่าพวกฟองน้ำรวมทั้งกลุ่ม tunicates และ bryozoans มีฤทธิ์ที่ดี ยาต้านมะเร็งตัวแรกที่ได้จาก marine invertebrate คือ Trabectedin® ผลิตโดยบริษัท Pharma Mar เป็นที่ยอมรับในยุโรปสำหรับการรักษา advanced soft tissue sarcoma ปัจจุบัน Aplidin® dihydrodidemnin B กำลังอยู่ใน clinical trial phase II (Bugni et al, 2008)

การศึกษาอื่นๆ ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล ได้แก่ *Spongo thymidine* (ara-T) และ Spongouridine (ara-U) เป็น arabinosyl nucleosides แยกได้จากฟองน้ำชนิดหนึ่งในแถบทะเลคาริบเบียน ชื่อ *Tethya crypta (Cryptotethia crypta)* สารนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส จึงได้นำมาเป็นสารต้นแบบในการสังเคราะห์สาร ara-C (cytosine arabinoside, cytobarine) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งและใช้ในการสังเคราะห์สาร ara-A (adenine arabinoside, vidabarine) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังเป็นสารต้นแบบในการสังเคราะห์ AZT (Zidovudine) ซึ่งใช้เป็นยาในการบำบัดโรค เอดส์ (Dunlap et al, 2007)

แม้ว่าการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลจะมีน้อยแต่ก็ทำให้ทราบว่าสิ่งมีชีวิตในทะเลสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่ ๆ ได้มากมายซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีที่มีความเป็นเอกลักษณ์ และมีความแตกต่างไปจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เคยพบในสิ่งมีชีวิตอื่นที่อาศัยบนพื้นดิน ซึ่งจากการศึกษาก็ทำให้ได้ยาที่ได้จากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่อาจนำมาพัฒนาเป็นยาใหม่

การศึกษาที่ผ่านมา ผู้วิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล จากตัวอย่างที่เก็บโดยหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลจากบริเวณอ่าวไทยตอนล่าง ตั้งแต่จังหวัดชุมพรลงมา ผลการศึกษาพบว่าสารหลายชนิดมีฤทธิ์ที่ดีต่อการทำลายเซลล์มะเร็ง และจากการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ของฟองน้ำสกุล *Plakinastrell, Pachastrissa* และ *Hyrtios* ที่เก็บจากจังหวัดกระบี่ พบว่ามีฤทธิ์ดี เมื่อนำมาแยกสารบริสุทธิ์และทดสอบฤทธิ์ พบว่าสารที่แยกได้ คือสารกลุ่ม

trisoxazole macrolide ได้แก่ kabiramide C จากฟองน้ำสกุล *Pachastrissa*, และ demethoxy kabiramide C ซึ่งเป็นสารใหม่จากฟองน้ำสกุล *Plakinastrella* มีฤทธิ์ในช่วง IC_{50} 0.00179-0.479 nM สาร kabiramide C นี้สามารถยึดเหนี่ยว G-actin ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบใน cytoplasm มีความสำคัญในการทำหน้าที่ต่างๆของเซลล์ เช่น การแบ่งเซลล์ การเจริญ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ สารกลุ่ม scalarin type sesterterpene ได้แก่ Heteronemin จากฟองน้ำสกุล *Hyrtios* และมีรายงานว่าได้จากฟองน้ำอีกหลายสกุล มีค่า IC_{50} 157 μM จากการศึกษาผลของ heteronemin ต่อ chronic myeloid leukemia cell line K562 โดยวิธี annexin V-FIT C/propidium iodide staining พบว่าสารมีผลต่อ cell cycle ทำให้เซลล์เกิด apoptosis (Schumacher et al 2010)

แต่สารเหล่านี้ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาถึงกลไกของการออกฤทธิ์หรือผลต่อ DNA และการแสดงออกของยีนเซลล์มะเร็งเต้านม เพื่อให้สามารถนำสารเหล่านี้มาพัฒนาเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดโรคมะเร็ง การวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบผลของสารว่าทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมตายเนื่องจากมีผลต่อการแสดงออกของยีนใดหรือเนื่องจากกลไกด้านอื่น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสิ่งมีชีวิตในทะเลมีความน่าสนใจในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ เนื่องจากการวิจัยพบว่าสารคาบิเรไมด์ ซี ดีเมทธอกซีคาบิเรไมด์ ซี และเฮทาโรนีมินมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1. เพื่อศึกษาผล ของสารคาบิเรไมด์ ซี ดีเมทธอกซีคาบิเรไมด์ ซี และเฮทาโรนีมิน ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลต่อ DNA ของเซลล์มะเร็งเต้านม

2. เพื่อศึกษาผลของสารคาบิเรไมด์ ซี ดีเมทธอกซีคาบิเรไมด์ ซี และเฮทาโรนีมิน ต่อการแสดงออกของยีนระดับ mRNA ของเซลล์มะเร็งเต้านม

บทที่ 2

วิธีวิจัย

ศึกษาผลต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ของสารบริสุทธิ์ที่ผู้วิจัยในหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลได้แยกสารและศึกษาสูตรโครงสร้างแล้วคือ kabiramide C, demethoxy kabiramide C และ Heteronemin โดยศึกษาการแตกหักของสายดีเอ็นเอ และการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งหลังได้รับสาร

1. การเตรียมเซลล์

เลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม (human breast adenocarcinoma, MCF-7) ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงชนิด EMEM ใน culture flask บ่มใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 และความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 95% นาน 3 วัน เตรียม cell suspension โดยการล้าง cell monolayer ด้วย phosphate buffer saline และย่อย monolayer ออกจากพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยง ให้ได้ single cells แขวนลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง คำนวณปริมาณเซลล์ที่ได้ โดยการนับ viable cells ด้วย haemocytometer ทำ dilution ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงให้ได้ความเข้มข้น $1X10^6$ cells/ml และถ่ายเซลล์เลี้ยงลงใน 12-well plate เติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบใน culture medium ความเข้มข้นที่เหมาะสมจำนวน 5 ความเข้มข้นลงไป ทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 หลุม เลี้ยงใน CO_2 incubator นาน 24, 48, 72 ชั่วโมง ดูด culture medium ทั้งหมดใส่หลอดทดสอบขนาด 15 ml หากมีเซลล์ติดก้นหลุมล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline หลังจากนั้น เก็บเซลล์รวมกับ culture medium นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์มาศึกษาการแตกหักของสายดีเอ็นเอและการแสดงออกของยีนที่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง เลือกความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมเพื่อนำเซลล์มาศึกษาการแตกหักของสาย DNA

2. การศึกษาการแตกหักของสายดีเอ็นเอ (DNA fragmentation assay)

นำเซลล์มะเร็งเต้านม (human breast adenocarcinoma, MCF-7) ที่เพาะเลี้ยงประมาณ 1×10^6 cells/well และบ่มด้วยสาร kabiramide C, demethoxy kabiramide C และ Heteronemin ความเข้มข้นต่างๆ

นาน 48 ชั่วโมง มาสกัด genomic DNA ด้วย Genomic DNA Mini Kit นำ DNA ที่แยกได้มา วิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis

3. การศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่มีผลเกี่ยวกับเซลล์มะเร็ง

3.1 การสกัด total RNA จากเซลล์มะเร็ง MCF-7

นำเซลล์มะเร็งประมาณ 1×10^{6} cells/well ที่บ่มด้วยสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ นาน 48 ชั่วโมง total RNA ด้วย E.Z.N.A. Total RNA Animal Cell (Omega) ดังนี้

- เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 500g นาน 5 นาที
- ย่อยเซลล์ด้วย TRK Lysis Buffer ปริมาตร 350 µl และปั่นผสมให้เข้ากับด้วยเครื่อง vortex
- เติม 70% ethanol ปริมาตร 350 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วถ่ายส่วนผสมที่ได้ลงใน HiBind RNA column ที่บรรจุอยู่ใน collection tube
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000g นาน 1 นาที เพื่อทิ้งสารละลาย
- ล้าง column ที่มี RNA ด้วย RNA Wash buffer I ปริมาตร 500 µl และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000g นาน 1 นาที เพื่อทิ้งสารละลาย
- ล้าง column ที่มี RNA ซ้ำด้วย RNA Wash buffer II ปริมาตร 500 ml และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000g นาน 1 นาที เพื่อทิ้งสารละลาย (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)
- ชะ (elute) RNA ออกจาก column ด้วย DEPC-treated water ปริมาตร 50 µl

3.2 การสังเคราะห์สาย cDNA จากเซลล์มะเร็ง MCF-7

นำส่วน total RNA ที่สกัดได้มาสังเคราะห์สาย cDNA โดยใช้ Superscript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) โดยเตรียมส่วนผสมของ total RNA (5 µl), 2.5 mM dNTPmix (4 µl), RACE 32 (5’-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTT-3’) (1 µl) และ RNase free water (4 µl) นำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 65 °C นาน 5 นาที แล้วย้ายไปวางที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเติม 5× first strand buffer (4 µl), 0.1 M DTT (1 µl) และ15 units/µl SuperScript™ III Reverse Transcriptase (1 µl) ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 60 นาที เพื่อสังเคราะห์สาย cDNA และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 75 °C นาน 5 นาที

3.3 การทำ PCR amplification ของยีนต่างๆ ที่มีผลเกี่ยวกับเซลล์มะเร็ง

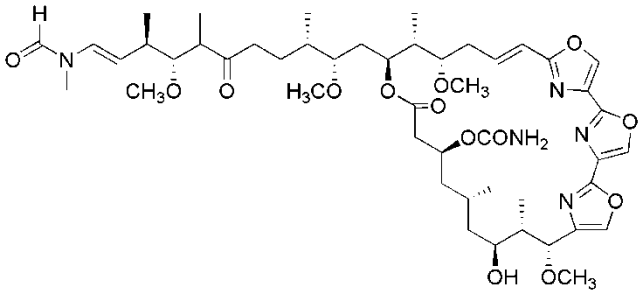
นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาวัดปริมาณด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm และใช้เป็น template (1 µg) ในการทำ PCR amplificationด้วยคู่ primers สำหรับยีนมะเร็งต่างๆ (ตารางที่ 1) โดยมียีน GAPDH เป็นตัวควบคุม และสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณเริ่มจาก pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 4 นาที แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA ภายใต้สภาวะ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที และ primer annealing ที่อุณหภูมิ 52-60 °C ขึ้นกับ Tm ของแต่ละคู่ primers เป็นเวลา 0.5 นาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2.5 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำ DNA ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนถ่ายภาพภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Documentation

Gene	Forward primer	Reverse primer	Annealing temp.
cyclin B	5’-CTTATACTAAGCACCAAATC-3’	5’-CTTGGCTAAATCTTGAACT-3’	55
cyclin D	5’-CTGGCCATGAACTACCTGGA-3’	5’-CCAGGAAATCATGTGCAATC-3’	55
cyclin E	5’-TTCTCGGCTCGCTCCAGGAA-3’	5’-TGGAGGATAGATTTCCTC-3’	55
Cdk1	5’-GGTCGGAGTCAACGGATTTG-3’	5’-TGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3’	57
GAPDH	5’-CGAAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3’	5’-AGCCTTCTCGGTGGTGAAGAC-3’	57

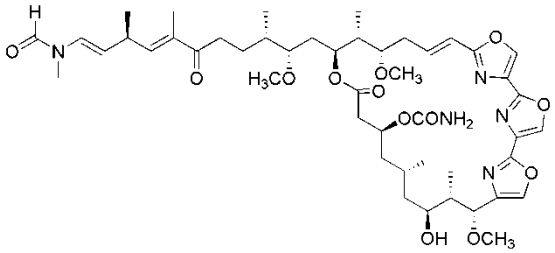
บทที่ 3

ผลการทดลอง

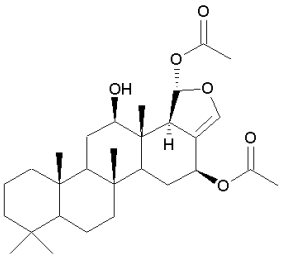
การศึกษาสาร คาบิเรไมด์ ซี ดีเมทธอกซีคาบิเรไมด์ ซี และเฮทาโรนีมิน ที่มีต่อการแตกหักของดีเอ็นเอและการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งเต้านม



Kabiramide C (K)



Demethoxy kabiramide C (DK)



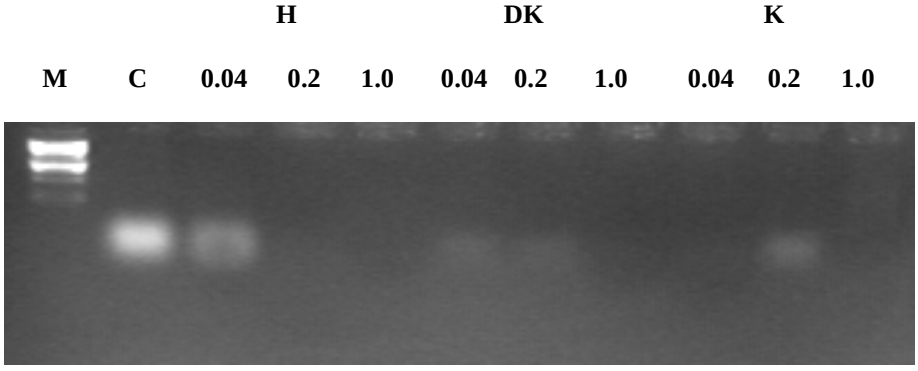
Heteronemin (H)

1. การเตรียมเซลล์มะเร็ง

จากการทดลองพบว่าการเตรียมเซลล์ 100,000 cell/well ได้ปริมาณเซลล์น้อย จึงปรับเพิ่มจำนวนเป็น 300,000 cell/well เพื่อให้เพียงพอในการศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆ ซึ่งทำให้ต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารด้วย ส่วนเวลาที่ใช้ในการบ่มคือ 48 ชั่วโมง

2. การศึกษาการแตกหักของสายดีเอ็นเอ (DNA fragmentation assay)

เมื่อบ่มเซลล์มะเร็งเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม (human breast adenocarcinoma, MCF-7) ด้วยสาร Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) kabiramide C (K) ที่ความเข้มข้น1,0.2,0.04 μg/ml นาน 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารทดสอบ ทำให้เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงเกิดการตายมากขึ้น โดยมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของชิ้นดีเอ็นเอมากขึ้นตามความเข้มข้นของสาร ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ ไม่พบการแตกหักของชิ้นดีเอ็นเอดังรูปที่ 1 ดังนั้นสารทั้ง 3 ชนิดมีผลยับยั้งการเจริญแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 โดยกลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอภายในเซลล์

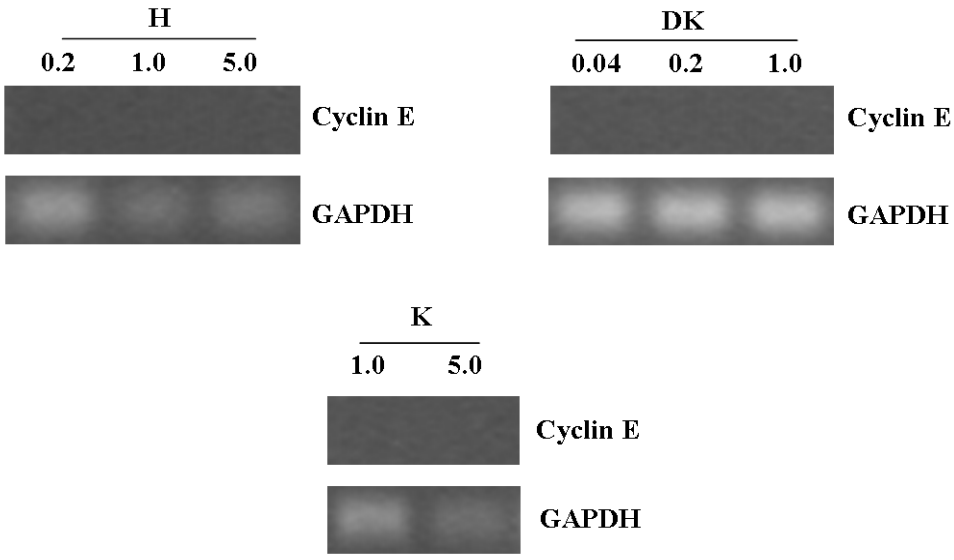


รูปที่ 1. Genomic DNA ของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่บ่มด้วยสาร Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) kabiramide C (K) เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis

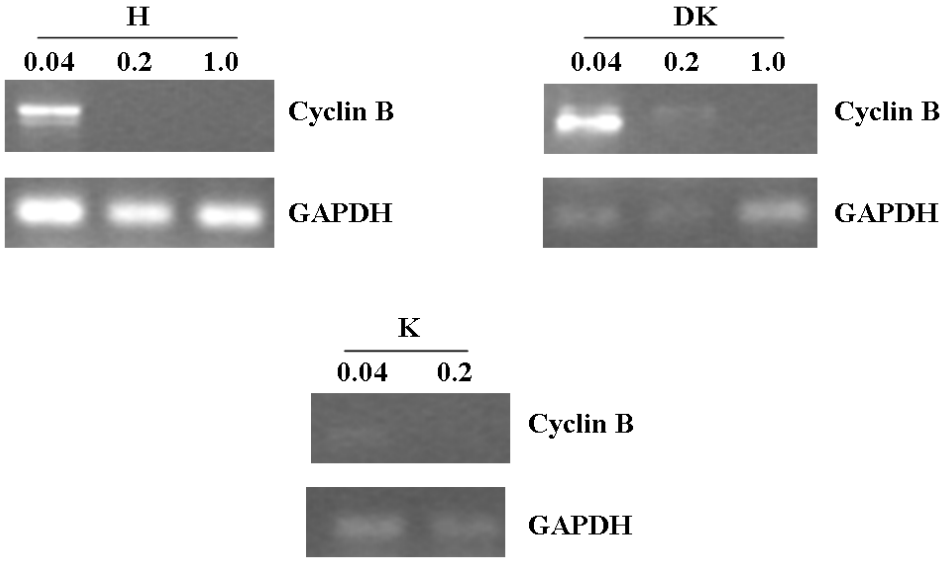
3. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง

โดยทั่วไปการเจริญแบ่งตัวของเซลล์จะถูกควบคุมโดยการทำงานของโปรตีน Cyclins ต่างๆ ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ cyclin-dependent kinase (Cdks) ตัวอย่างเช่น cyclin A มีบทบาทสำคัญต่อการแบ่งตัวในระยะ S เฟส ไปสู่ระยะ G2 เฟส สำหรับ Cylin E ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของโปรตีน Cdk2 ใกล้จุดเริ่มต้นของระยะ S เฟส ในขณะที่ Cyclin B1 จะเป็นตัวควบคุมการแบ่งตัวในระยะ M (mitosis) เฟส อย่างไรก็ตาม หากไม่สามารถควบคุมการทำงานของ Cyclins และ/หรือ Cdks ต่างๆให้เป็นปกติได้ อาจนำไปสู่ภาวะการเกิดมะเร็ง (tumorigenesis) หรือในทางตรงข้ามทำให้เซลล์หยุดแบ่งตัวได้ (cell cycle arrest)

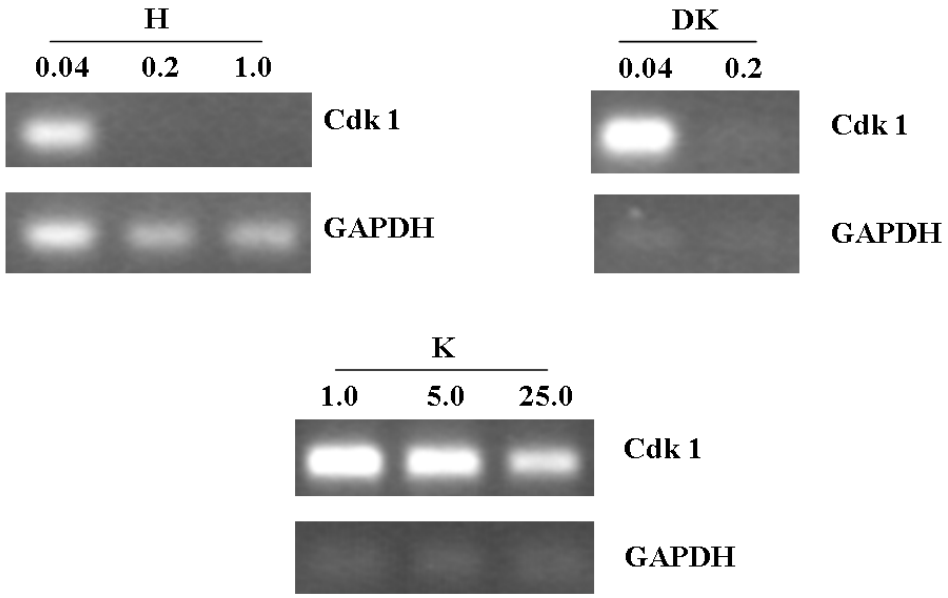
สำหรับการศึกษาผลของการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA expression ของสารทั้ง 3 ชนิดซึ่งมีผลทำให้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ตาย (apoptosis) โดยนำ Total RNA ที่สกัดได้จากเซลล์มะเร็งเต้านม (human breast adenocarcinoma, MCF-7) ที่บ่มด้วยสาร Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) และ kabiramide C (K) ที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 48 ชั่วโมง มาสังเคราะห์สาย cDNA เพื่อทำ PCR amplification ด้วยคู่ไพรเมอร์สำหรับยีนต่างๆ พบว่า สารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) และ kabiramide C (K) มีผลยับยั้งการทำงาน Cyclin E อย่างชัดเจนในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (รูปที่ 2) นอกจากนี้ ยังสามารถยับยั้งการทำงานของ Cyclin B และ cdk1 โดยแปลตามความเข้มข้น (รูปที่ 3 และ 4) แต่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของ Cyclin D แต่อย่างใด (รูปที่ 5) ผู้วิจัยจึงสันนิษฐานว่าสารทั้งสามชนิดดังกล่าวน่าจะมีผลทำให้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 หยุดการเจริญ (cell cycle arrest) แบ่งตัวในระยะ G1/S และ G2/M เฟส ดังนั้นผู้วิจัยจึงวางแผนในการยืนยันผลสำหรับระยะของการหยุดการเจริญแบ่งตัวของเซลล์โดยเครื่อง flow cytometry ในงานวิจัยขั้นถัดไป



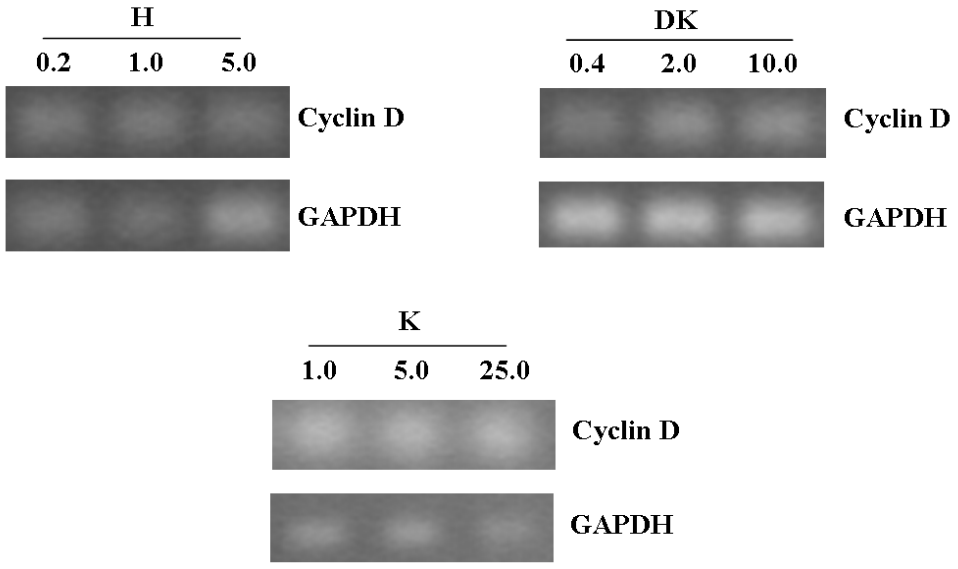
รูปที่ 2. mRNA expression ของยีน Cyclin E จากเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่บ่มด้วยสาร Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) kabiramide C (K) เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis



รูปที่ 3. mRNA expression ของยีน Cyclin B จากเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่บ่มด้วยสาร Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) kabiramide C (K) เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis



รูปที่ 4. mRNA expression ของเอนไซม์ Cdk1 จากเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่บ่มด้วยสาร Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) kabiramide C (K) เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis



รูปที่ 5. mRNA expression ของยีน Cyclin D จากเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่บ่มด้วยสาร Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) kabiramide C (K) เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis

บทที่ 4
สรุปและวิจารณ์ผล

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลมีผลในการทำลายเซลล์มะเร็งโดยทำให้เกิดการแตกหักของDNA และมีผลต่อการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ โดยสารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Heteronemin (H), demethoxy kabiramide C (DK) และ kabiramide C (K) ทำให้เกิดการแตกหักของ DNA และมีผลยับยั้งการทำงาน Cyclin E อย่างชัดเจน ทำให้เซลล์ไม่สามารถผ่านระยะ G_1 ในครึ่งหลังและผลักดันให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S ได้ ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ นอกจากนี้ ยังสามารถยับยั้งการทำงานของ Cyclin B และ Cdk1 โดยแปลตามความเข้มข้น ทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งออกเป็น 2 เซลล์ในระยะ M ได้อย่างสมบูรณ์

วิธีรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันมี 4 วิธีคือ การใช้ยา การฉายรังสี การผ่าตัด และการเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน ยาต้านมะเร็งเป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ในปัจจุบันยาต้านมะเร็งมีกลไกการออกฤทธิ์เป็นยาต้านเมตาโบไลท์ ยาพวกฮอร์โมน ยาที่ทำปฏิกิริยาแอลคิเลชัน แต่ยาเหล่านี้มีพิษค่อนข้างสูง และเซลล์มะเร็งมักเกิดการดื้อยา ดังนั้นจึงมีการพัฒนายาชนิดใหม่ที่มีกลไกการออกฤทธิ์ต่างจากยาเดิม เพื่อให้ได้ยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาสูงและมีผลข้างเคียงน้อยลง

การแบ่งตัวของเซลล์เป็นวงจรที่ประกอบด้วยระยะต่างๆโดยเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงผ่านระยะต่างๆ ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ถ้ามีความผิดปกติในการควบคุมหรือสูญเสียการควบคุมวงจรนี้ ทำให้การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากผิดปกติ เป็นสาเหตุให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรมต่างๆ รวมทั้งก่อให้เกิดโรคมะเร็ง การที่เซลล์จะแบ่งตัวจนครบวงจรได้ต้องมีกระบวนการตรวจสอบเพื่อป้องกันและกำจัดเซลล์ที่เกิดความผิดปกติของยีนไม่ให้เข้าสู่ cell cycle แต่จะถูกนำเข้าสู่กระบวนการ program cell death หรือ apoptosis การเข้าสู่วัฏจักรเซลล์ของเซลล์มะเร็งต้องอาศัยการกระตุ้นจากเอนไซม์ cyclin dependent kinase (CDK) เอนไซม์นี้ถูกกระตุ้นให้ทำงานโดย โปรตีนชนิดหนึ่งคือ cyclin และถูกยับยั้งการทำงานโดยโปรตีน CDK inhibitors (CDKIs) CDKs/cyclins แต่ละชนิดมีกลไกการทำงานที่คล้ายกันในการผลักดันให้เซลล์ผ่าน

ระยะต่างๆของวัฏจักรเซลล์ CDKs/cyclins จะเร่งปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีนในกลุ่ม retinoblastoma (Rb) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการผ่านวัฏจักรแต่ละระยะ จึงตั้งสมมติฐานว่าเซลล์มะเร็งเป็นเซลล์ที่มีความผิดปกติในการทำงานของโปรตีนในกลุ่ม Rb เนื่องจาก CDKs/cyclins ทำงานมากผิดปกติ หรือ CDKIs ทำงานน้อยผิดปกติ ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CDKs โดยตรงเช่น flavopiridol เป็นยาที่มีศักยภาพในการรักษาโรคมะเร็งเมื่อใช้ร่วมกับยาชนิดอื่น และมีผลไม่พึงประสงค์ที่ไม่รุนแรงเมื่อเทียบกับยาต้านมะเร็งชนิดอื่นที่มีใช้ในปัจจุบัน

Cyclin B1/cdk1 มีความสำคัญที่ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบ mitosis มีรายงานว่าในเซลล์มะเร็งเต้านม และ มะเร็งปากมดลูก มี Cyclin B1/cdk1 มากกว่าปกติ

Cyclin E ควบคุมการ transition จาก G1 phase เข้าสู่ S phase ในปี 1997 Porter และคณะศึกษาผลของ cyclin E ต่อการอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 278 ราย เมื่อตรวจเนื้อเยื่อของผู้ป่วยด้วยวิธี western blot พบว่ามี ปริมาณของ cyclin E สูง โดยผู้ป่วยระยะที่ 1 ที่มีระดับ cyclin E สูงมีอัตราส่วนในการเสียชีวิตสูงเมื่อเทียบกับตัวชี้วัดอื่นๆ ปัจจุบันการใช้ยา tamoxifen ซึ่งเป็นยาต้าน estrogen ที่ใช้กันมากในการรักษามะเร็งเต้านม 2 ใน 3 ของผู้ป่วยที่มี estrogen receptor positive tumor ตอบสนองต่อยา แต่ต่อมาครึ่งหนึ่งจะดื้อยาเนื่องจากการที่มี cyclin E สูง ซึ่งจะไปมีผลต้านต่อการทำให้เซลล์หยุดการเจริญเมื่อได้รับยา tamoxifen

การค้นพบนี้เป็นการเปิดช่องทางให้ นักวิจัยสามารถหาวิธีทำให้เซลล์มะเร็ง เกิดการไวต่อการถูกฆ่าโดยการกดระดับของโปรตีนใน cell cycle เหล่านี้ซึ่งมีส่วนทำให้เซลล์มะเร็งอยู่รอด โดยช่วยซ่อมแซมดีเอ็นเอ ที่ถูกทำลายจากการใช้เคมีบำบัดหรือการฉายแสงรักษา นอกจากนี้การให้ยาที่มีผลต่อ การยับยั้ง cell cycle ของเซลล์มะเร็งน่าจะทำให้สามารถลดผลข้างเคียงจากการรักษาได้

เอกสารอ้างอิง

ปกป้อง ประยงค์ นาถธิดา วีระปรียากูร และสหพัฒน์ บรัศว์รักษ์ (2007) อะพอพโทซิส: วิถีและการตรวจวัด J. Health Res. 21(3): 227-238.

Bugni, T.S., Harper, M.K., McCulloch, M.W.B., Reppart, J. and Ireland, C.M. (2008). fractionated marine invertebrate extract libraries for drug discovery. Molecules, 13, 1372-1383.

Dunlap, W.C., Battershill, C.N., Liptrot, C.H., Cobb, R.E., Bourne, D.G., Jaspars, M., Long, P.F. and Newman, D. J. (2007). Biomedicinals from the phytosymbionts of marine invertebrates: A molecular approach. Methods, 42(4), 358-376.

http://s2.hubimg.com/u/150501_f520.jpg

Lee, T.J., Kim, O.H., Kim, Y.H., Lim, J.H., Kim, S., Park, J.W. and Keon, T.K. (2006). Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. Cancer Letters, 240, 234-242.

Lin, J., Yan, X.-J., Zheng, L., Ma, H.-H. and Chen, H.-M. (2005). Cytotoxicity and apoptosis induction of some selected marine bacteria metabolites. Journal of Applied Microbiology, 99(6), 1373-1382.

Mantena, S.K., Sharma, S.D. and Kativar, S.K. (2006). Berberine a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. Molecular Cancer Therapeutics, 5(2), 296-308.

Marks, A., Smith, C. and Lieberman, M. (2005). Marks' basic medical biochemistry: clinical approach,2nd ed., Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins.

Porter P.L., Malone, K.E., Heagerty, P.J., Alexander,G.M., Gatti, L.A., Firpo, E.J. et al 1997. Expression of cell-cycle regulators p27 Kip1 and cyclin E, alone and in combination correlate with survival in young breast cancer patients. Nature Medicine, 3:222-225.

Schumacher, M., Cerella, C., Eifes, S. and Chateauvieux, S. (2010). Heteronemin, a spongean sesterterpene, inhibits TNF alpha-induced NF-kappa B activation through proteasome inhibition and induces apoptotic cell death. Biochemical Pharmacology, 79(4): 610-622.

Wang, R. and Shi, Y.F. (2002) A simplified protocol for apoptosis assay by DNA content analysis. Biotechniques oct.;Suppl, 88-91.

Zhang, Q., Wu, J., Hu, Z. and Duan, L. (2004). Induction of HL-60 apoptosis by ethyl acetate extract of C*ordyceps sinensis* fungal mycelium. Life Sciences, 75, 2911-2919.