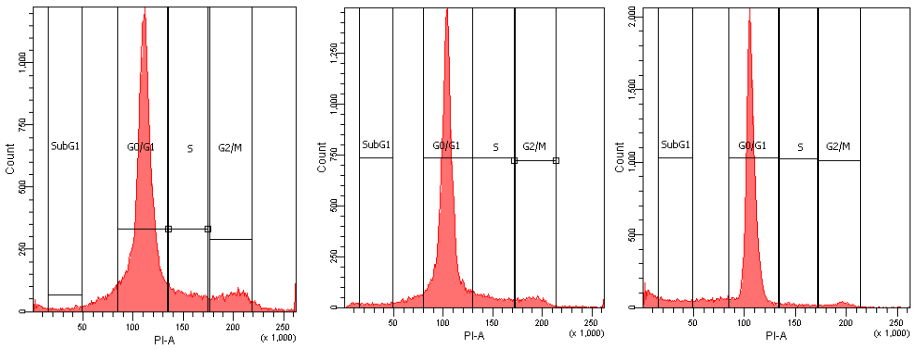
รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๕

เรื่อง

การเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยสารสกัดบริสุทธิ์จากจุลชีพทะเลที่คัดแยกจากน่านน้ำไทย

The induction of apoptosis in cholangiocarcinoma cell lines by marine microbes which isolated from Thai Waters



ภายใต้แผนงานวิจัย

การค้นหาและพัฒนาสารตัวยาจากน่านน้ำไทย

Discovery and Development on the Drug Agents from Thai Waters

คณะผู้วิจัย

ผศ.ดร.จริยา หาญวจนวงศ์	คณะแพทยศาสตร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ.ดร.นิษณา นามวาท	คณะแพทยศาสตร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ดร.ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา	สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล	มหาวิทยาลัยบูรพา
รศ.ดร.วิจิตรา ทัศนียกุล	คณะแพทยศาสตร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร.บรรจบ ศรีภา	คณะแพทยศาสตร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ งบประมาณแผ่นดินปี ๒๕๕๕

กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้เป็นผลการศึกษาของโครงการปีที่ 3 เรื่อง “การเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยสารสกัดบริสุทธิ์จากจุลชีพทะเลที่คัดแยกจากน่านน้ำไทย” ซึ่งในขณะนี้งานวิจัยได้เสร็จแล้ว คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ 2555 ที่ให้ทุนสนับสนุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

สิงหาคม 2558

บทคัดย่อภาษาไทย

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่มีความสามารถในการบุกรุกสูง ปัจจุบันยังไม่มีการรักษามะเร็งชนิดนี้อย่างมีประสิทธิภาพ รายงานที่ผ่านมาพบว่ามีสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลในอ่าวไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม และมะเร็งปากมดลูก ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลในอ่าวไทย จำนวน ชนิด ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 5 ชนิด คือ KKU-100, KKU-M139, KKU-M156, KKU-M213 และ KKU-M214 พบว่า สารสกัดจำนวน 6 สาร ได้แก่ CD508-SX, MSA2-3, MSB6-3, TA5-2, CD508-CB และ TA3-3-X มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบ dose dependent ในขณะที่สาร CD508-SX ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยพบว่าสาร MSA2-3 และ CD508-SB มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในระดับที่ดีและปานกลาง การที่เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีความไวต่อสารที่นำมาทดสอบแตกต่างกัน อาจเกิดเนื่องจากเซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบมี histological type ที่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยจะได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลในอ่าวไทยเพิ่มเติม และศึกษากลไกในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของสาร MSA2-3 และ CD508-SB ต่อไป

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CCA) is an aggressive malignancy of the biliary tract for which effective treatment is lacking. Natural products isolated from sponges and bacteria in Thai Gulf have been shown to inhibit the growth of various cancer cell lines such as breast cancer and cervical cancer. In this study, we investigated the growth inhibitory effect of 7 natural products isolated from sponges and bacteria in Thai Gulf in human CCA cell lines (KKU-100, KKU-M139, KKU-M156, KKU-M213 and KKU-M214). We found that 6 natural products including MSA2-3, MSB6-3, TA5-2, CD508-SB, CD508-CB and TA3-3-X inhibited growth of CCA cell lines in a dose dependent manner, whereas CD508-SX did not inhibit growth of all CCA cell lines tested. The MSA2-3 and CD508-SB were shown to have a strong and moderate growth inhibitory effect against CCA cell lines. The difference in sensitivity of different CCA cell lines to these natural products may be due to the different histological type of CCA cell lines.

More natural products isolated from sponges and bacteria in Thai Gulf will be tested for growth inhibitory activity in CCA cell lines. Moreover, the mechanism of growth inhibitory activity of MSA2-3 and CD508-SB will also be determined.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
ABSTRACT	iii
สารบัญ	iv
สารบัญภาพ	v
สารบัญตาราง	vi
คำสำคัญ	vii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	vii
1. บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
3. วิธีดำเนินการวิจัย	6
4. ผลการวิจัย	10
4. อภิปรายผล/วิจารณ์	18
5. บรรณานุกรม	20

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 และ KKU-M156 ของสารสกัด Violacein จากแบคทีเรีย CDB 22-2 ตรวจปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดย SRB assay ค่าแสดงในรูปเป็นค่า mean ± SEM ที่ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง 11

รูปที่ 2 ฤทธิ์ชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 ของสาร Violacein ที่สกัดจากแบคทีเรีย CDB 22-2 ตรวจปริมาณ apoptotic cell โดยใช้วิธี Flow cytometric analysis รูปที่แสดงเป็นรูปตัวแทนจากการทดลอง 2 ครั้ง ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกัน 12

รูปที่ 3 ฤทธิ์ชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M156 ของสาร Violacein ตรวจปริมาณ apoptotic cell โดยใช้วิธี Flow cytometric analysis รูปที่แสดงเป็นรูปตัวแทนจากการทดลอง 2 ครั้ง ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกัน 15

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบและต้านอนุมูลอิสระ 10

ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} ของสารสกัดจำนวน 7 สาร ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100, KKU-M139, KKU-M156, KKU-M213 และ KKU-M214 โดยทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งในสภาวะที่ใส่และไม่ใส่สาร นาน 72 ชั่วโมง ทำการหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี SRB assay หาค่า IC_{50} ผลที่แสดงเป็นค่า mean ± SEM (ทำการทดลอง 3 ครั้ง) 14

ตารางที่ 3 ปริมาณเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 ที่ treat ด้วยสาร Violacein ตรวจปริมาณ apoptotic cell โดยใช้วิธี Flow cytometric analysis 15

คำสำคัญ

สารสกัดจากธรรมชาติ ฟองน้ำ แบคทีเรียทะเล เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี การตายแบบ apoptosis cholangiocarcinoma cell lines

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Cholangiocarcinoma, CCA; SRB, sulforhodamine B; EB/AO staining, ethidium bromide/acridine orange staining

1. บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญในประชากรทั่วโลก จากประมาณการใน พ.ศ. 2537 พบว่า มีจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งมากกว่า 18 ล้านคน และมีผู้ป่วยใหม่ประมาณ 9 ล้านคนในทุก ๆ ปี องค์การอนามัยโลกได้คาดการณ์ไว้ว่าในปี 2563 ทั่วโลกจะมีคนตายด้วยโรคมะเร็งมากกว่า 11 ล้านคน และเกิดขึ้นในประเทศที่กำลังพัฒนามากกว่า 7 ล้านคนเนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง สาเหตุการเกิดมะเร็งพบว่ามีปัจจัยร่วมที่หลากหลายและประกอบด้วยหลายขั้นตอน ได้แก่ initiation, promotion และ progression จากกลไกการเกิดมะเร็งที่เป็น multifactorial และ multistep processes ทำให้การรักษามีได้หลายวิธีตั้งแต่การป้องกันการเกิดมะเร็งไปจนถึงการรักษา ประกอบกับการตรวจพบมะเร็งมักจะเป็นระยะหลัง ๆ ประมาณการว่าร้อยละ 70 ของผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับการวินิจฉัยจะมีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งแล้ว ซึ่งการรักษาแบบ local treatment (เช่น การผ่าตัด หรือรังสีรักษา) มักไม่ได้ผล การรักษาในระยะนี้จึงต้องใช้ยาต้านมะเร็งหรือยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์จึงมักมีผลต่อเซลล์ปกติที่กำลังแบ่งตัวด้วย นอกจากนี้เซลล์มะเร็งบางชนิดจะมีปัญหาการดื้อยา แม้จะให้การรักษาแบบ combination therapy ก็จะให้ผลไม่ดีนัก

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งตับที่มีอุบัติการณ์สูงมากในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมะเร็งดังกล่าวมีอุบัติการณ์ในชายมากกว่าหญิง (1) โดยทั่วไปมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเริ่มแรกมักไม่แสดงอาการ ประกอบกับในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการที่ใช้ในการวินิจฉัยในระยะเริ่มแรก ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เข้ารับการรักษามักมีการดำเนินโรคอยู่ในระยะสุดท้าย ซึ่งมะเร็งได้ลุกลามเกินกว่าจะทำการรักษาได้ ทำให้มะเร็งชนิดนี้มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี และมีอัตราการตายสูง ปัจจุบันยังไม่มีการรักษามะเร็งชนิดนี้อย่างมีประสิทธิภาพ (2) การรักษาส่วนใหญ่จึงเป็นลักษณะบรรเทา (palliative treatment) หรือหากรักษาโดยการผ่าตัดก็มักพบการกลับเป็นซ้ำในอัตราสูง

ปัจจุบันยาที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งเป็นยาแผนปัจจุบัน ยาส่วนใหญ่ได้มาจากการนำเข้าจากต่างประเทศ การผลิตยาแผนปัจจุบันในประเทศเองก็มักใช้วัตถุดิบจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ การรักษาโรคมะเร็งโดยการให้ยารักษามะเร็งในปัจจุบัน ยังคงมีข้อจำกัด เช่น ปัญหาการดื้อยา (drug resistance) ผลข้างเคียงของยาที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วย (side effect) เป็นต้น ดังนั้นการพยายามนำเอาสารสกัดจากธรรมชาติซึ่งเป็นทรัพยากรหรือวัตถุดิบที่มีราคาไม่สูงมากนักมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง เพื่อนำไปสู่การผลิตเป็นยารักษาโรคแผนปัจจุบัน และนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับยารักษาโรคแผนปัจจุบัน จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะให้ผู้ป่วยมีชีวิตที่ยืนยาว และมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น โดยการรักษาด้วยยาที่มีค่าใช้จ่ายไม่สูง

เกินไป และช่วยทำให้การนำสารสกัดจากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันรักษาโรคมะเร็งตามแนวทางการรักษาแผนปัจจุบันแพร่หลายมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์จากจุลชีพทะเลที่คัดแยกได้จากน่านน้ำไทย

2. เพื่อศึกษากลไกการตายของเซลล์เบื้องต้นที่ถูกชักนำ โดยสารสกัดบริสุทธิ์จากจุลชีพทะเลที่คัดแยกได้จากน่านน้ำไทย โดยทำ apoptosis assay ใช้วิธี ethidium bromide/acridine orange (EB/AO) staining และ DNA fragmentation assay

3. เพื่อศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของการเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งโดยตรวจดูการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2, Survivin, Bax, Caspase-9, Caspase-3 และ AIF โดยวิธี Western blotting

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากจุลชีพทะเลซึ่งประกอบด้วย

(1) สารสกัดที่ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากชายฝั่งทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก

(2) สารสกัดใหม่ที่ได้จากชายฝั่งทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันตก

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 5 ชนิด ได้แก่ KKU-100, KKU-M139, KKU-M156, KKU-M213 และ KKU-M214 ของสารสกัดหยาบจำนวน 30 ตัวอย่างและสารบริสุทธิ์จำนวน 10 ตัวอย่างจากจุลชีพทะเลที่คัดแยกได้จากน่านน้ำไทย จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ดีจำนวน 4 ตัวอย่างมาศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์โดยทำการทดสอบด้วยวิธี apoptosis assay และศึกษาฤทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2, Bax, Survivin, Caspase-9, Activated-caspase-9, Caspase-3, Activated-caspase-3, AIF และ beta-actin โดยวิธี Western blotting

(3) คัดเลือกสารประกอบตั้งต้น ที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจเพื่อนำไปวิจัยและพัฒนาต่อโดยเครือข่ายการวิจัย ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมเคมี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบถึงสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากจุลชีพทะเลที่แยกได้จากน่านน้ำไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

2. ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารบริสุทธิ์จากจุลชีพทะเลที่แยกได้จากน่านน้ำไทยต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

3. ทราบถึงกลไกในระดับโมเลกุลของสารจากจุลชีพทะเลที่แยกได้จากน่านน้ำไทยต่อการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมกระบวนการ apoptosis

4. จากข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อทำการทดลองในสัตว์ทดลองและในการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งต่อไป

5. เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ

2. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

ในประเทศไทย มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งตับที่มีอุบัติการณ์สูงมาก โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มะเร็งดังกล่าวมีอุบัติการณ์ในชายมากกว่าหญิง (1) โดยทั่วไปมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเริ่มแรกมักไม่แสดงอาการ ประกอบกับในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการที่ใช้ในการวินิจฉัยในระยะเริ่มแรก ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เข้ารับการรักษามักมีการดำเนินโรคอยู่ในระยะสุดท้าย ซึ่งมะเร็งได้ลุกลามเกินกว่าจะทำการรักษาได้ทำให้มะเร็งชนิดนี้มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี และมีอัตราการตายสูง ปัจจุบันยังไม่มีการรักษามะเร็งชนิดนี้อย่างมีประสิทธิภาพ (2) การรักษาส่วนใหญ่จึงเป็นลักษณะบรรเทา (palliative treatment) หรือหากรักษาโดยการผ่าตัดก็มักพบการกลับเป็นซ้ำในอัตราสูง

ปัจจุบันยาที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งเป็นยาแผนปัจจุบัน ยาส่วนใหญ่ได้มาจากการนำเข้าจากต่างประเทศ การผลิตยาแผนปัจจุบันในประเทศเองก็มักใช้วัตถุดิบจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ การรักษาโรคมะเร็งโดยการให้ยารักษามะเร็งในปัจจุบัน ยังคงมีข้อจำกัด เช่น ปัญหาการดื้อยา (drug resistance) ผลข้างเคียงของยาที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วย (side effect) เป็นต้น ดังนั้นการพยายามนำเอาสารสกัดจากธรรมชาติซึ่งเป็นทรัพยากรหรือวัตถุดิบที่มีราคาไม่สูงมากนักมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง เพื่อนำไปสู่การผลิตเป็นยารักษาโรคแผนปัจจุบัน และนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับยารักษาโรคแผนปัจจุบัน จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะให้ผู้ป่วยมีชีวิตที่ยืนยาว และมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น โดยการรักษาด้วยยาที่มีค่าใช้จ่ายไม่สูงเกินไป และช่วยทำให้การนำสารสกัดจากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันรักษาโรคมะเร็งตามแนวทางการรักษาแผนปัจจุบันแพร่หลายมากยิ่งขึ้น

พืชเป็นแหล่งของยารักษาโรคที่สำคัญของมนุษย์มาเป็นเวลายาวนาน องค์การอนามัยโลก (World Health Organization) ประมาณการว่าประมาณร้อยละ 80 ของประชากรโลกใช้สมุนไพรพื้นบ้านโดยเฉพาะสารสกัดจากพืชในการรักษาการเจ็บป่วยเบื้องต้น ยิ่งไปกว่านั้นยาแผนปัจจุบันของประเทศตะวันตกหลายชนิดรวมทั้งยารักษามะเร็ง ก็มีแหล่งกำเนิดมาจากสารสกัดจากพืช (3) ปัจจุบันนี้พืชสมุนไพรกำลังได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อทำเป็นยารักษาโรคต่างๆ รวมทั้งโรคมะเร็ง เนื่องจากในพืชสมุนไพรมีสารสำคัญในการออกฤทธิ์หลายชนิด บางชนิดสามารถออกฤทธิ์ได้กว้าง และมีรายงานว่ามีศักยภาพป้องกันหรือรักษาโรคมะเร็ง เช่น phenolic compounds, alkaloids, flavonoids, terpenoids, carotenoids, curcumin เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการรายงานข้อมูลยืนยันถึงความพยายามที่จะค้นหาสารหรือยาจากพืช เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง โดยพบว่าสารหลายตัวอยู่ในระหว่างการศึกษาระดับคลินิก และหลายตัวถูกผลิตเป็นยาแผนปัจจุบันและใช้เป็นยารักษามะเร็งอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เช่น vinblastin, vincristine, podophyllotoxin, camptothecin, และ paclitaxel เป็นต้น (4)

Zhu และคณะ (2007) ได้ทำการวิจัยในการคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียน้ำเค็มกับกิจกรรมต้านเชื้อแบคทีเรียและความเป็นพิษต่อเซลล์ และความเกี่ยวข้องของการดำรงอยู่ของยีนส์ PKS I และ NRPS ในสายพันธุ์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยคัดกรองแบคทีเรียทะเล ซึ่งได้รับการคัดแยกออกจากสิ่งมีชีวิต ตะกอนอินทรีย์และน้ำทะเลในพื้นที่ชายฝั่งทะเลของจีน พบว่ามี 42 ไอโซเลตมีฤทธิ์ต้านจุลชีพและ 12 ไอโซเลตมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเชื้อแบคทีเรียทางทะเลที่มีพิษอยู่บนพื้นฐานของ 16S rRNA ลำดับชี้ให้เห็นว่าพวกเขาอยู่ในจำพวก Aerococcus, Agrobacterium, Alteromona, Bacillus, Exiguobacterium, Paracoccus, Pseudoalteromons, Rheinheimera นอกจากนี้แบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งถูกคัดเลือกยัง PKS I และยีน NRPS ซึ่งอาจจะส่วนในการชีวสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ออกฤทธิ์ทางชีวภาพการ, 4 สายพันธุ์ที่มี KS โดเมนหรือโดเมนที่ได้รับซึ่งให้หลักฐานที่แบคทีเรียทางทะเลทีมีฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ผ่านวิถี PKS และ NRPS

Dechsakulwatana, และคณะ (2007) ได้แสดงผลให้เห็นถึงศักยภาพของการสร้างนวัตกรรมทางเคมีผลิตภัณฑธรรมชาติของทรัพยากรชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ฟองน้ำ และแบคทีเรียทะเลในอ่าวไทย ได้พบสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก นอกจากนี้ Kijjoa และคณะ (2007) ได้รายงานถึงศักยภาพของสารประกอบที่สกัดจากฟองน้ำจากอ่าวไทยแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง เซลล์มะเร็งได้ดี และเมื่อเร็วๆ นี้ Watanadilok., R. และคณะ(2007) ค้นพบฟองน้ำ 2 ชนิดที่เก็บจากอ่าวไทยแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา และจุลินทรีย์อื่นได้ดีเช่นกัน นอกจากนี้ Wimolpun Rungprom และคณะ (in press) ได้รายงานถึงการค้นพบสารไซคลิกเปปไตด์ ชนิดใหม่ที่สกัดได้จากแบคทีเรียทะเล *Pseudoalteromonas* sp. ที่คัดแยกจากฟองน้ำ *Halisarca ectofibrosa* ที่เก็บจากอ่าวไทยเช่นกัน คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าควรที่มีการสนับสนุนให้มีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง เพื่อการวิจัยและพัฒนาต่อยอดการวิจัยอย่างต่อเนื่อง

3. วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. เซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 5 ชนิด ได้แก่ KKU-100 (poorly-differentiated adenocarcinoma), KKU-M139 (squamous carcinoma), KKU-M156 (moderately-differentiated adenocarcinoma), KKU-M213 (adenosquamous carcinoma), และ KKU-M214 (moderately-differentiated adenocarcinoma) เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 5 ชนิด เป็นเซลล์ที่ establish ขึ้นที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด เพาะเลี้ยงใน Dulbecco's minimum essential medium/F-12 (Ham) ใส่ 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, 2mM-glutamine, 100 IU Penicillin, 100 μg streptomycin เซลล์ทุกชนิดเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°ซ ภายใต้บรรยากาศ 5 % CO_2 ทำการเปลี่ยน media สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

2. สารสกัดและการเตรียมสารละลายสารสกัด

สารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากจุลชีพทะเลที่แยกได้จากน่านน้ำไทยได้จากโครงการย่อยที่ 3 เรื่อง "จุลชีพที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ แหล่งใหม่ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ระยะที่ 2"

2.1 เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนดใน modified Zobell agar slant บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.2 ทำการถ่ายเชื้อลงใน modified Zobell broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้การเขย่าในแนวราบ (100 รอบต่อนาที)

2.3 ทำการถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 2 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งบรรจุฟลาสค์ละ 1 ลิตร จำนวน 1 – 10 ลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าในแนวราบ (100 รอบต่อนาที) โดยจะใช้ทำการทดลองเมื่อครบเวลาเท่ากับที่เชื้อออกฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนด

2.4 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง High Speed Refrigerated Centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

หลังจากผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้วจะแยกออกเป็นสองส่วน ดังนี้

2.5 ส่วนเซลล์ของแบคทีเรีย

2.5.1 นำส่วนของเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาล้างด้วย Normal saline 0.85%

2.5.2 ทำการปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้อ 3.4 ในแต่ละหลอดที่ใช้ปั่นแยกเซลล์โดยนำส่วนที่ชะได้ทั้งหมดใส่ลงในหลอด ที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ที่ชั่งน้ำหนัก และบันทึกไว้แล้ว

2.5.3 แยกส่วน supernatant ทิ้งไปคงเหลือแต่ส่วนของเซลล์ และนำไปชั่งน้ำหนักทั้งหมด แล้วคำนวณหาน้ำหนักของเซลล์

2.5.4 ทำการสกัดส่วนของเซลล์ด้วยสารละลาย ผสม คลอโรฟอร์ม และเมทธานอล ($CHCl_3$: MeOH = 1 : 2) ประมาณ 100-300 มิลลิลิตร โดยทำการชะตะกอนเซลล์ให้หลุดออกจากกัน แล้วนำไปผ่านการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrazonic นาน 10 นาที

2.5.5 ทำการปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้อ 6.2.4 ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นำส่วนของตะกอนเซลล์ที่ได้มาทำเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1 ถึงข้อ 2.5.6 อีก 2 ครั้ง

2.5.6 นำส่วนใสที่ได้($CHCl_3$: MeOH extract) แต่ละครั้ง ใส่ฟลาสค์สำหรับ evaporate โดยต่อเข้ากับเครื่อง rotary vacumm evaporator แล้วทำการชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่เหลือสุดท้าย(residues) เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

2.6 ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (supernatant)

2.6.1 นำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาสกัดด้วย ethyl acetate ในอัตราส่วน 4 : 1 พร้อมทั้งเขย่าจนสารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นของ ethyl acetate และน้ำ โดยส่วนชั้นบนจะเป็นส่วนสารที่สามารถละลายได้ใน ethyl acetate ซึ่งจะนำมาระเหยให้แห้งโดยใช้ฟลาสค์สำหรับ evaporate ด้วยเครื่อง rotary vacumm evaporator

2.6.2 ส่วนชั้นล่างจะเป็นส่วนที่มีสารสกัดที่ละลายได้ดีในน้ำจะนำมาใส่ ethyl acetate ในอัตราส่วน 4 : 1 ประมาณ พร้อมทั้งเขย่าจนสารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น

2.6.3 ทำเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง แล้วเอาส่วนของน้ำที่ได้สุดท้ายไปทำให้แห้ง และชั่งน้ำหนักก่อน และหลังทำการทดลองทุกครั้ง แล้วทำการชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่เหลือสุดท้าย(residues) เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

จากนั้นนำสารสกัดมาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม แล้วนำมาทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน millipore filter membrane ขนาด 0.45 μm นำสารละลายที่ได้มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นในขนาดต่าง ๆ กัน เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ เทียบกับ vehicle และสารมาตรฐานต่อไป

3. Apoptosis assay

เลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระดับที่ดี มาทำการตรวจสอบกลไกการตายของเซลล์ว่าเกิดจากกระบวนการ apoptosis หรือไม่ โดยวิธี ethidium bromide/acridine orange (EB/AO) staining และ DNA fragmentation

3.1 Ethidium bromide/acridine orange (EB/AO) staining

การศึกษากลไกการเกิด apoptosis โดยการดู nuclear morphology ด้วยวิธี EB/AO staining ทำโดยเลี้ยงเซลล์ 1 x 10^4 เซลล์ / หลุม ใน 96-well culture plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ใน CO_2-incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นที่ทำให้เกิด 100 % cytotoxicity ลงไป และใช้ RPMI 1640 ที่มี 0.1%DMSO เป็น vehicle control นำไปบ่มที่ 37°ซ ใน CO_2-incubator นาน 48 ชั่วโมง แล้วทำการย้อมเซลล์ด้วย ethidium bromide/acridine orange จากนั้นนำมาตรวจสอบ nuclear morphology โดยใช้กล้อง Nikon fluorescent microscope เซลล์ที่เกิด apoptosis จะมีนิวเคลียสที่มี condensed chromatin และพบ fragmented apoptotic nuclei ทำการนับเซลล์ที่เกิด apoptosis จากเซลล์ทั้งหมด 500 เซลล์ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis และคำนวณหาค่า mean ± SEM ของการทดลอง 3 ครั้ง ต่อไป

3.2 DNA fragmentation

การตรวจสอบ DNA fragmentation จะทำการวิเคราะห์โดยการทำ agarose gel electrophoresis ใช้วิธีของ Sambrook และ Russell (2001) (8) ทำโดยเลี้ยงเซลล์ 2-3 x 10^6 เซลล์ใน 25 cm^2 culture flask เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใส่สารสกัดจากจุลชีพทะเลที่แยกได้จากน่านน้ำไทยที่มีความเข้มข้นที่ทำให้เกิด 100 % cytotoxicity นำไปบ่มที่ 37°ซ ใน CO_2-incubator นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์ล้าง ใส่ lysis buffer ลงในตะกอนเซลล์ ทำการสกัด DNA ด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) นำตะกอน DNA มาละลายด้วย TE buffer เติม Rnase นำไปบ่มที่ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง นำ DNA ที่สกัดได้มาทำ electrophoresis ใน 2 % agarose gel ที่ 80 โวลท์ นาน 1.5 ชั่วโมง นำมาย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจดู DNA fragmentation ภายใต้ UV light transilluminator (Fotodyne, USA)

4. การตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2, Bax, Survivin, Caspase-9, Activated-caspase-9, Caspase-3, Activated–caspase-3, AIF, และ beta-actin โดยวิธี Western blotting

นำเซลล์ที่ผ่านการ treat ด้วยสารสกัดมาทำการย่อยเซลล์โดยใช้ lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.3 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, 0.2 mM sodium orthovanadate, 0.5% NP-40, 5 U/ml aprotinin) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำ cell lysates มาปั่นเหวี่ยงที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ทำการคำนวณปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Lowry-method ในขั้นตอนต่อไปนำโปรตีนปริมาณ 70-100 µg มาทำการ denature โดยใช้วิธี SDS-PAGE

จากนั้นนำโปรตีนที่ถูกแยกแล้วมา transfer ลงใน nitrocellulose membrane และทำการ block membrane ด้วย 5% non-fat milk powder (w/v) ใน TBS (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หรือทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4°C ต่อจากนั้น membrane จะถูก probe ด้วย antibody ต่อ Bcl-2, Bax, Survivin, Caspase-9, Activated-caspase-9, Caspase-3, Activated–caspase-3, AIF, และ beta-actin และต่อมาทำการ probe ด้วย peroxidase-conjugated secondary antibody และในขั้นตอนสุดท้ายทำการตรวจวัดผลโดยใช้ ECL detection system (10)

5. Statistical analysis

ทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วย Student t test ของค่า mean ± SEM ของการทดลองที่ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

สถานที่ทำการทดลอง/และเก็บข้อมูล

ภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (ให้ระบุขั้นตอนอย่างละเอียด)

ระยะเวลา 2 ปี

กิจกรรม	ระยะเวลา (เดือน)											
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์	←	—	—	—	—	—	→					
2. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารบริสุทธิ์ (apoptotic assay) EB/AO staining, DNA fragmentation						←	—	—	→			
4. ศึกษาฤทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2, Bax, survivin, AIF, caspase-9, Activated-caspase-9, caspase-3, Activated-caspase-3, beta-actin โดยวิธี Western blotting							←	—	—	—	→	
5. รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล			←	—	→				←	—	→	
6. สรุปผลและจัดทำรายงานการวิจัย						↔						↔

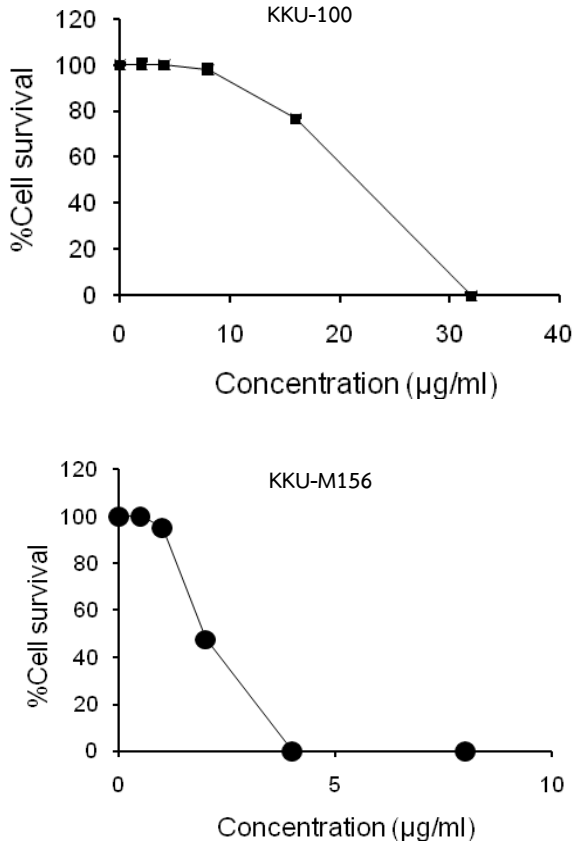
4. ผลการวิจัย

ผลจากการทดสอบสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Pseudoalteromonas* sp. (CDB 22-2) ในเซลล์มะเร็ง 6 ชนิด ได้แก่ P-388, KB, Col-2, MCF-7, Lu-1 และ ASK จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง พบว่า สารสกัด CDB 22-2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งทั้ง 6 ชนิด ในระดับที่ดีมาก โดยให้ค่า IC_{50} ในช่วง <4 ถึง 10 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า IC_{50} ของสารสกัด CDB 22-2 ในเซลล์มะเร็ง 6 ชนิด ได้แก่ P-388, KB, Col-2, MCF-7, Lu-1 และ ASK ค่า IC_{50} ผลที่แสดงเป็นค่า mean (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

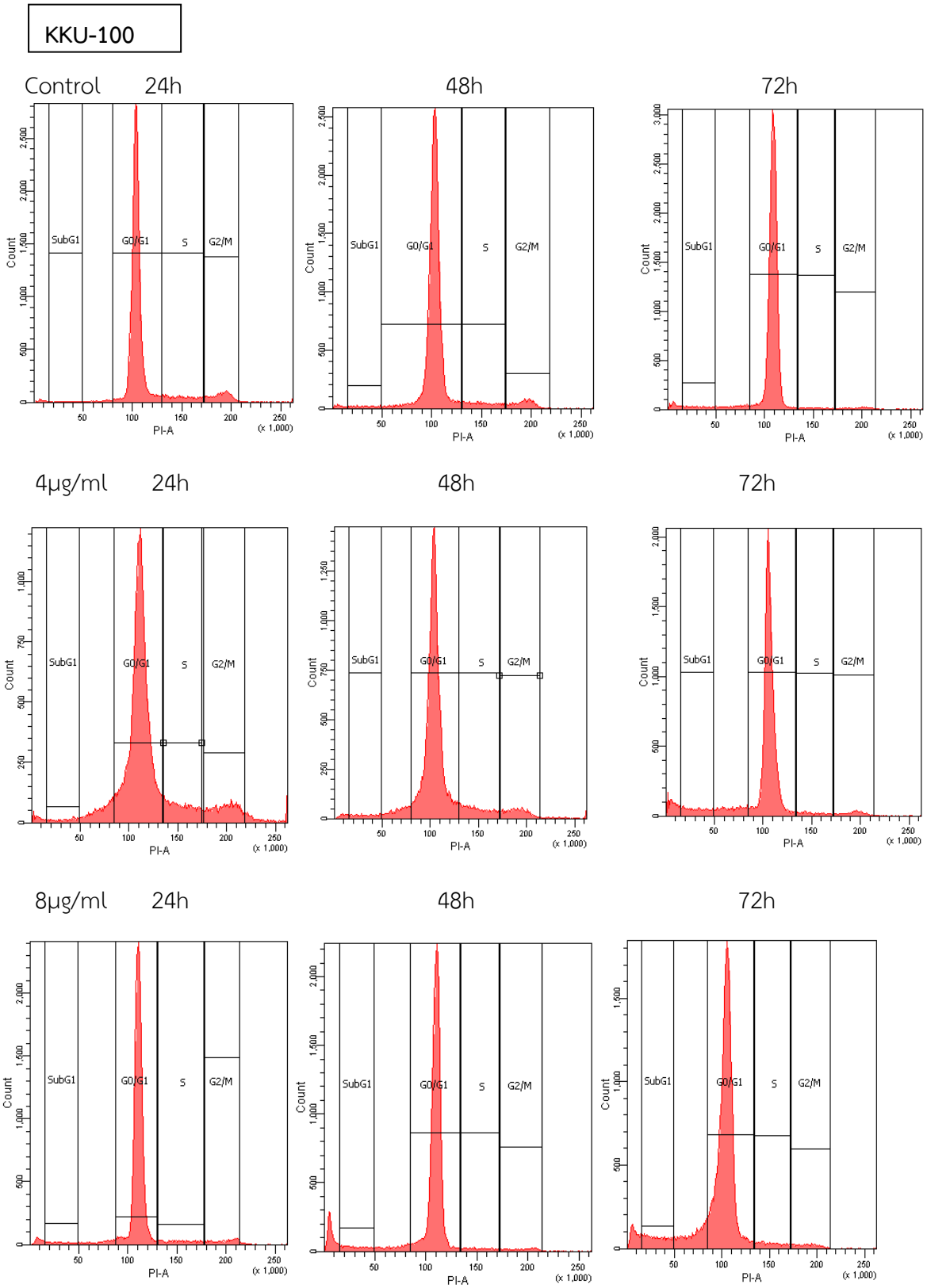
สารสกัด	เชื้อแบคทีเรีย	IC_{50} values (μg/ml)					
		P-388	KB	Col-2	MCF-7	Lu-1	ASK
CDB 22-2	*Pseudoalteromonas* sp.	<4	<4	7.0	<4	<4	10.0

จากนั้นได้นำสารสกัด CDB 22-2 มาแยกสารบริสุทธิ์ได้เป็นสาร Violacein ได้ทำการทดสอบสาร Violacein ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด ได้แก่ KKU-100 และ KKU-M156 จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง พบว่า สาร Violacein มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด ในระดับที่ดีมาก โดยให้ค่า IC_{50} เป็น 21.5 ± 0.5 μg/ml ใน KKU-100 และ 1.99 ± 0.22 μg/ml ใน KKU-M156 ดังแสดงในรูปที่ 1



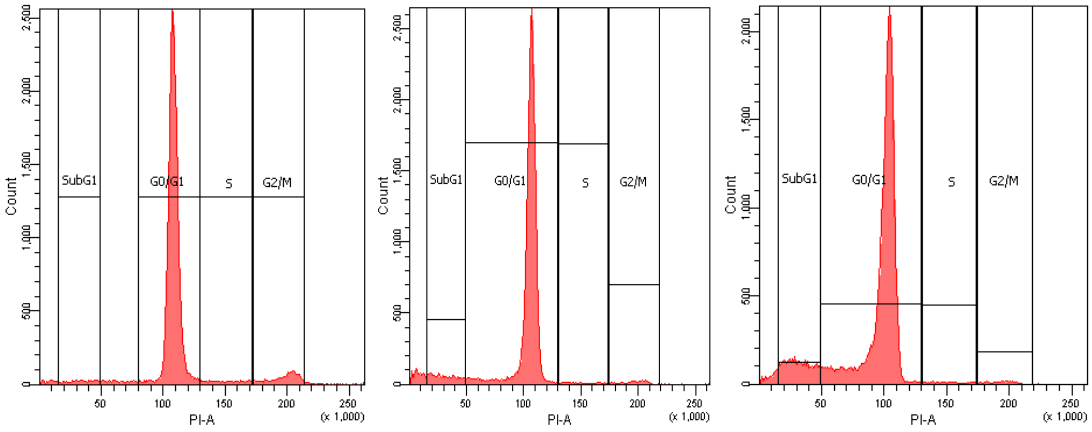
รูปที่ 1 ฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 และ KKU-M156 ของสารสกัด Violacein จากแบคทีเรีย CDB 22-2 ตรวจปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดย SRB assay ค่าแสดงในรูปเป็นค่า mean ± SEM ที่ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง

ทำการทดสอบกลไกในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยการใช้ flow cytometric analysis พบว่าสาร สาร Violacein ชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ทั้งแบบ dose- และ time-dependent manner โดยพบว่า ในเซลล์ KKU-100 ปริมาณเซลล์ที่เกิด apoptosis จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จาก 0.40 (ใน control) เป็น 4.10 (เมื่อ treat ด้วยสาร 16 µg/ml) และเมื่อ treat ด้วยสารที่ความเข้มข้น 16 µg/ml ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณเซลล์ที่เกิด apoptosis จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จาก 4.10 (ที่ 24 ชั่วโมง) เป็น 12.25 (ที่ 72 ชั่วโมง) ดังแสดงในรูปที่ 2 และตารางที่ 2



รูปที่ 2 ฤทธิ์ชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 ของสาร Violacein ที่สกัดจากแบคทีเรีย CDB 22-2 ตรวจปริมาณ apoptotic cell โดยใช้วิธี Flow cytometric analysis รูปที่แสดงเป็นรูปตัวแทนจากการทดลอง 2 ครั้ง ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกัน

16µg/ml 24h 48h 72h



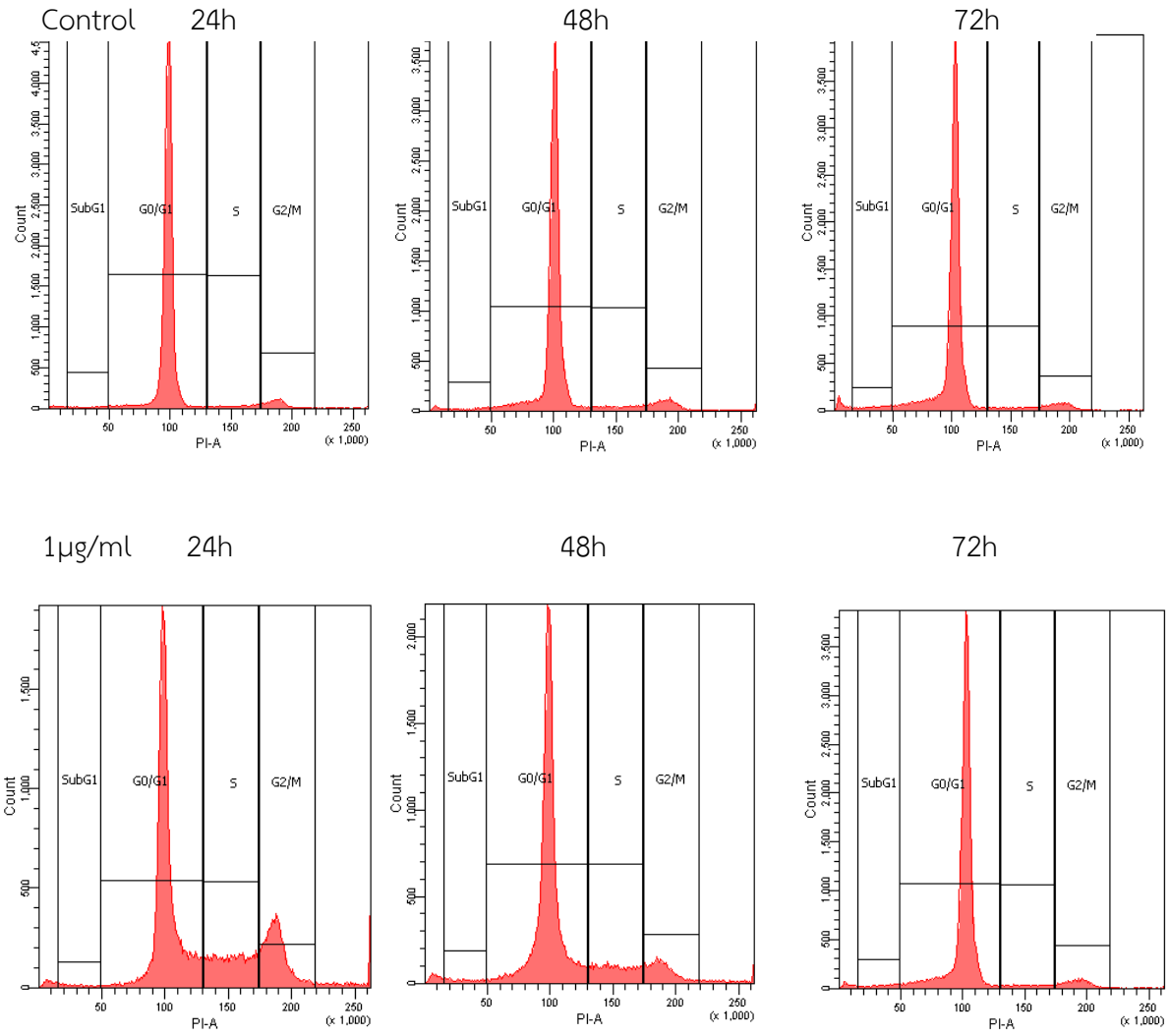
รูปที่ 2(ต่อ) ฤทธิ์ชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 ของสาร Violacein ที่สกัดจากแบคทีเรีย CDB 22-2 ตรวจปริมาณ apoptotic cell โดยใช้วิธี Flow cytometric analysis รูปที่แสดงเป็นรูปตัวแทนจากการทดลอง 2 ครั้ง ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 2 ปริมาณเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 ที่ treat ด้วยสาร Violaceinจากแบคทีเรีย CDB 22-2 ตรวจปริมาณ apoptotic cell โดยใช้วิธี Flow cytometric analysis ผลที่แสดงเป็นค่า mean (จากการทดลอง 2 ครั้ง) (เซลล์ใน sub G1 คือเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis)

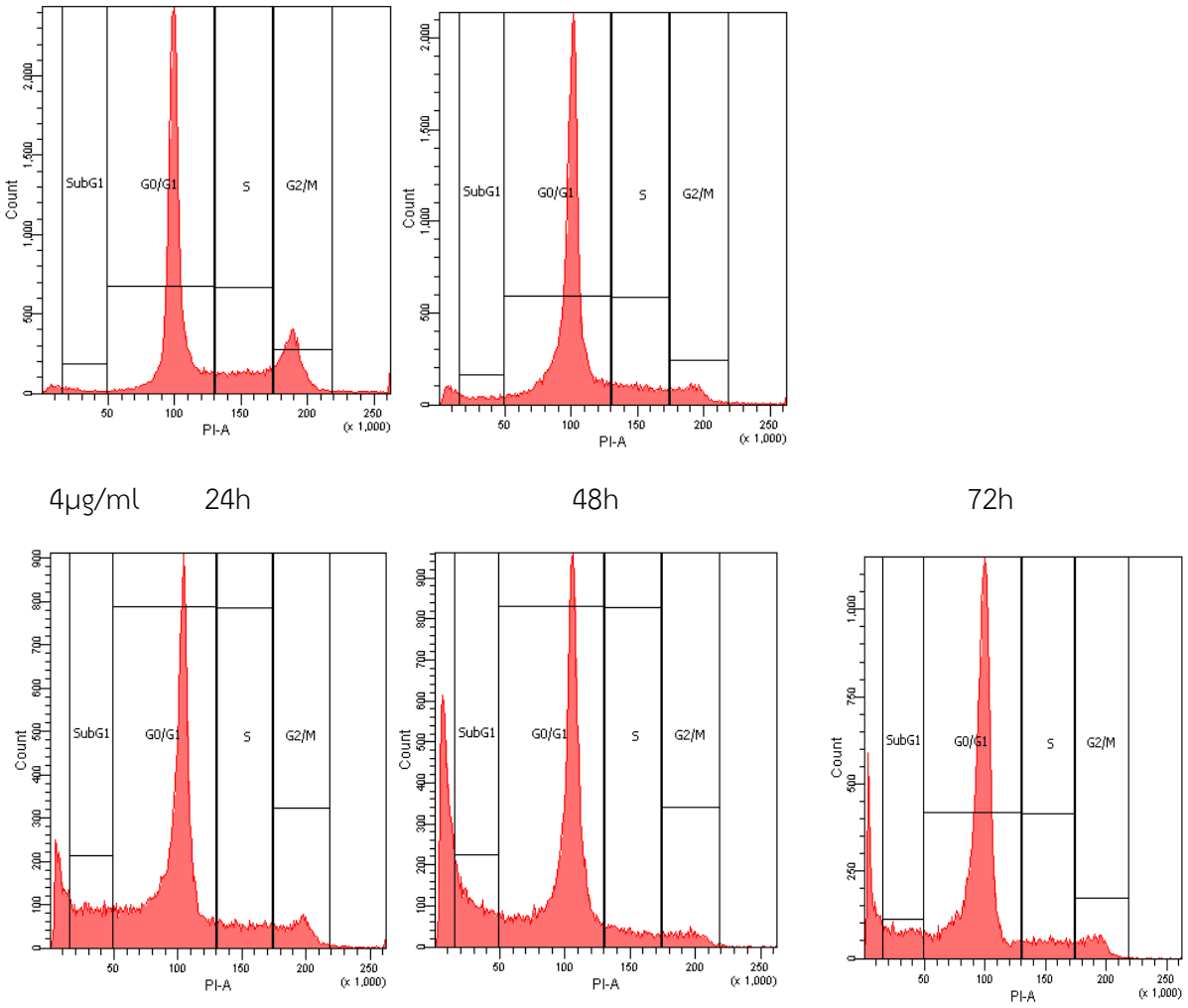
ความเข้มข้นของสาร Violacein (µg/ml)	**ระยะเวลา**		
	24h	**48h**	**72h**
	Sub G1	**Sub G1**	**Sub G1**
Control	0.40	1.65	2.5
4	0.85	2.20	6.1
8	1.90	4.00	6.5
16	4.10*	7.60*	12.25**

ในเซลล์ KKU-M156 ปริมาณเซลล์ที่เกิด apoptosis จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก1.00 (ใน control) เป็น 12.10 (เมื่อ treat ด้วยสาร 4 µg/ml) และเมื่อ treat ด้วยสาร Violacein ที่ความเข้มข้น 2 µg/ml ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณเซลล์ที่เกิด apoptosis จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จาก 1.70 (ที่ 24 ชั่วโมง) เป็น 17.7 (ที่ 72 ชั่วโมง) ดังแสดงในรูปที่ 3 และตารางที่ 3

KKU-M156



รูปที่ 3 ฤทธิ์ชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M156 ของสาร Violacein ตรวจปริมาณ apoptotic cell โดยใช้วิธี Flow cytometric analysis รูปที่แสดงเป็นรูปตัวแทนจากการทดลอง 2 ครั้ง ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกัน



รูปที่ 3 (ต่อ) ฤทธิ์ชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M156 ของสาร Violacein ตรวจปริมาณ apoptotic cell โดยใช้วิธี Flow cytometric analysis รูปที่แสดงเป็นรูปตัวแทนจากการทดลอง 2 ครั้ง ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 3 ปริมาณเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 ที่ treat ด้วยสาร Violacein ตรวจปริมาณ apoptotic cell โดยใช้วิธี Flow cytometric analysis ผลที่แสดงเป็นค่า mean (จากการทดลอง 2 ครั้ง) (เซลล์ใน sub G1 คือเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis)

ความเข้มข้นของสาร A (µg/ml)	**ระยะเวลา**		
	24h	**48h**	**72h**
	Sub G1	**Sub G1**	**Sub G1**
Control	1.00	1.60	2.60
1	0.90	1.70	2.1
2	1.70	3.50	17.70**
4	12.10**	13.65**	13.35**

5. อภิปรายผล/วิจารณ์

จากผลการศึกษาวิจัยนี้เพื่อคัดกรองแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบและสารสกัดหยาบของแบคทีเรียเหล่านี้แสดงแนวโน้มในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดจากแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียเกือบทุกสายพันธ์ออกฤทธิ์ ในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ ยกเว้นเพียงสายพันธุ์ MSA 4-9 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของฤทธิ์ชีวภาพเช่นเดียวกับรายงานของ Zhu และคณะ (2007) ได้ทำการวิจัยในการคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียน้ำเค็มกับกิจกรรมต้านเชื้อแบคทีเรียและความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีความเกี่ยวข้องของการดำรงอยู่ของยีนส์ PKS I และ NRPS ในสายพันธุ์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากแบคทีเรียทะเลที่คัดแยกออกจากสิ่งมีชีวิต ตะกอนอินทรีย์และน้ำทะเลในพื้นที่ชายฝั่งทะเลของจีน พบว่ามี 42 ไอโซเลตมีฤทธิ์ต้านจุลชีพและ 12 ไอโซเลตมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง อีกทั้งยังได้ทำการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเชื้อแบคทีเรียทางทะเลที่มีพิษอยู่บนพื้นฐานของ 16S rRNA ลำดับชี้ให้เห็นว่าพวกเขาอยู่ในจำพวก Aerococcus, Agrobacterium, Alteromona, Bacillus, Exiguobacterium, Paracoccus, Pseudoalteromons, Rheinheimera นอกจากนี้แบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งถูกคัดเลือกยัง PKS I และยีน NRPS ซึ่งอาจจะส่วนในการชีวสังเคราะห์สารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพการ, 4 สายพันธุ์ที่มี KS โดเมนหรือโดเมนที่ได้รับซึ่งให้หลักฐานที่แบคทีเรียทางทะเลทีมีฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ผ่านวิถี PKS และ NRPS

Zhang และคณะ (2009) ได้แสดงผลการวิจัยที่คล้ายคลึงกันจากการการคัดกรองแบคทีเรียจำนวน 109 สายพันธุ์ ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ 4 ตัวอย่าง *Stelletta tenuis, Halichondria rugosa, Dysidea avara* และ *Australiensis Craniella* ที่หลากหลายจากฟองน้ำในทะเล จีนใต้ โดยทดสอบจากการต้านจุลชีพ พบว่ามีการสร้างสารเปปไทด์ชนิดใหม่Nonribosomal ของยีน (NRPS) synthetase

เนื่องจากการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ด้วยวิธีการผ่าตัด การใช้เคมีบำบัด หรือรังสีรักษามักไม่ได้ผล การรักษาโรคมะเร็งโดยการให้ยาเคมีบำบัดรักษามะเร็งในปัจจุบัน ยังคงมีข้อจำกัด เช่น ปัญหาการดื้อยา (drug resistance) ผลข้างเคียงของยาที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วย (side effect) เป็นต้น ดังนั้น การพยายามนำเอาสารสกัดจากธรรมชาติมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เพื่อนำไปสู่การผลิตเป็นยารักษาโรคแผนปัจจุบันจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้ผู้ป่วยมีชีวิตที่ยืนยาวและมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น โดยการรักษาด้วยยาที่มีค่าใช้จ่ายไม่สูงเกินไป ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจ

ที่จะศึกษาค้นคว้าหาสารที่มีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี รวมถึงกลไกในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 5 ชนิด โดยใช้สารสกัดจากธรรมชาติ 7 ชนิด พบว่า สารสกัดจำนวน 6 สาร ได้แก่ MSA2-3, MSB6-3, TA5-2, CD508-SB, CD508-CB และ TA3-3-X มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบ dose dependent ในขณะที่สาร CD508-SX ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ดังแสดงในรูปที่ 1A-1G การที่เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีความไวต่อสารที่นำมาทดสอบแตกต่างกันอาจเกิดเนื่องจากเซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบมี histological type ที่แตกต่างกัน การที่สาร MSA2-3, MSB6-3, CD508-SB และ CD508-CB มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้หลายชนิด แสดงว่าสารดังกล่าว มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่กว้าง

สารสกัดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ รหัส MSA-2-3 เป็นสารสกัดที่แยกได้จากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ (ฟองน้ำไฟท่อใหญ่ *Biemna* sp. ซึ่งเก็บจากเกาะสมุย จังหวัดสุราษฎร์ธานี) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในระดับดีถึงปานกลางโดยมีค่า IC_{50} value อยู่ในช่วง 20.22 ± 0.02 ถึง 62.93 ± 0.44 μg/ml ผลจากการศึกษาครั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Lin และคณะ(11) ซึ่งพบแบคทีเรียทะเล 4 สายพันธุ์ คือ QD1-2, NJ6-3-1, NJ1-1-1 และ SS6-4 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ที่ระดับ ID_{50} ที่อยู่ในช่วง 77.20 ถึง 199.84 mug/ml นอกจากนี้ Sangnoi และคณะ (12) ได้รายงานการวิจัยพบแบคทีเรียกลุ่มไกด์ดิ้งจากทะเลไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเยื่อบุลำไส้และช่องปากได้หลายชนิด แต่ไม่เคยพบรายงานว่ามีแบคทีเรียทะเลที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้เช่นเดียวกับที่พบในการวิจัยนี้

อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยจะได้ทำการทดสอบกลไกในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีต่อไป โดยจะคัดเลือกสารที่มีฤทธิ์ดีมาทำการทดสอบ ได้แก่ สาร MSA2-3 และ CD508-SB เป็นต้น

9. บรรณานุกรม

1. Vatanasapt V, Martin N, Sriplung H, Chindavijak K, Sriamporn H, Parkin DM, Ferlay J. Cancer incidence in Thailand, 1988-1991. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1995; 4 : 475-83.

2. Watanapa P. Cholangiocarcinoma in patients with opisthorchiasis. Br J Surg 1996; 83: 1062-4.

3. Kaamesaki S : Cancer Res 1993;53:4251.

4. Cordell GA, Beecher CWW, Pezzuto JM. Can ethnopharmacology contribute to development of new anticancer drugs. J Ethnopharmacol 1991;32:117-33.

5. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J Natl Cancer Inst 1990;82 :1107-12.

6. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Pr., 2001.

7. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolated by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 1987;162(1):156-9.

8. Agarwal CP, Singh R, Agarwal R. Grape seed extract induces apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. Carcinogenesis 2002;23(11):1869-76.

9. Dechsakulwatana, Chutiwan., Wimolpun Rungprom., Rawiwan Watanadilok., Preecha Phuwapraisirisarn. And Mary Garson. 2007. Natural Compounds from the Marine Organisms and their Associated Bacteria Collected from the Gulf of Thailand PERCH-CIC Congress V, Theme:Chemistry for Innovation, May 6-9, 2007, Pataya, Chonburi, Thailand

10. Wimolpun Rungprom., Eric R.O. Siwu, Lynette K Lambert., Chutiwan Dechsakulwatana., Michael C. Barden., Warinthorn Chavasiri., Udom Kokpol., Joame T. Blanchfield, Masaki Kita, and Mary Garson. Cyclic tetrapeptides from marine bacteria associated with the seaweed *Digginea* sp. and the sponge *Haliaurca ectofibrosa*. Tetrahedron 2008; 64(14):3147-3152.

11. Lin, J, X-J Yan, L Zheng, H-H Ma, H-M Chen. Cytotoxicity and apoptosis induction of some selected marine bacteria metabolites. J Appl Microbiol. 2005 ;99 (6):1373-82.

12. Yutthapong Sangnoi, Pornpoj Srisukchayakul, Vullapa Arunpairojana, Akkharawit Kanjana-Opas. Diversity of marine gliding bacteria in Thailand and their cytotoxicity. Electronic Journal of Biotechnology. 2009; 12(3): 1-8.

13. Peng Zhu, Li Zheng, Jing Li, Jian-zhong Shao, Xiao-jun Yan. 2007. Screening and characterization of marine bacteria with antibacterial and cytotoxic activities, and existence of PKS I and NRPS genes in bioactive strains. Wei sheng wu xue bao Acta microbiologica Sinica. 47 : 228-234.

14. Wei Zhang, Zhiyong Li, Xiaoling Miao, Fengli Zhang. 2009. The Screening of Antimicrobial Bacteria with Diverse Novel Nonribosomal Peptide Synthetase (NRPS) Genes from South China Sea Sponges. Marine biotechnology. 11 : 346-355.