



รายงานผลการดำเนินงาน
ปีงบประมาณ 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งของซีรูเมนจากชั้นโรง *Tetragonula*
laeviceps และพรอพอลิสจากผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera*

ผู้รับผิดชอบโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร. จันท์เพ็ญ จันท์เจ้า

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

ฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งของซีรูเมนจากชันโรง *Tetragonula laeviceps* และพรอพอลิสจากผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera*
Antiproliferative activity of cerumen from stingless bee
Tetragonula laeviceps and propolis from European honeybee
Apis mellifera

รองศาสตราจารย์ ดร. จันท์เพ็ญ จันท์เจ้า
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อไทย

ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เลี้ยงร่วมกับคาร์ดินอลส่งผลต่อ Cytotoxicity ของ BT474 cells เมื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบการหดตัวและการหลุดลอยของเซลล์ คาร์ดินอลทำให้เกิด Cell cycle arrest ที่ระยะย่อย G_1 ในขณะที่ Doxorubicin ทำให้เกิด Cell cycle arrest ที่ระยะย่อย G_2/M พบการตายของเซลล์แบบ Late apoptosis ($27.2 \pm 1.1\%$) และ Necrosis ($25.4 \pm 1.4\%$) หลังจากการเลี้ยงร่วม 72 ชม. ในขณะที่ Doxorubicin ทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ($4.3 \pm 0.4\%$) และ Necrosis ($35.8 \pm 13.0\%$) นอกจากนี้ยังพบว่าคาร์ดินอลเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Apoptosis (เพิ่มการแสดงออกของ *DR5* และ *Bcl-2* แต่ลดการแสดงออกของ *Mcl-1*, *MADD* และ *c-FLIPP*) และการแบ่งเซลล์ (เพิ่มการแสดงออกของ p21 และ E2F1 แต่ลดการแสดงออกของ Cyclin D1, cyclin E, CDK4 และ CDK2), รวมทั้งเพิ่มระดับของ p21 p-ERK, p-JNK และ p-p38 แต่ลด Cyclin D จึงทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะพัก G_1 ของวัฏจักร

บทคัดย่ออังกฤษ

Cardanol induced a time- and dose-dependent cytotoxicity along with cell shrinkage and detachment from substratum by light microscopy. Cardanol caused cell cycle arrest at the G₁ subphase (as opposed to at the G₂/M subphase seen with doxorubicin) and cell death by late apoptosis, with both late apoptosis (27.2 ± 1.1%) and necrosis (25.4 ± 1.4%) being found in cardanol treated cells after 72 h, compared to a lower proportion of apoptosis (4.3 ± 0.4%) and higher proportion of necrosis (35.8 ± 13.0%) induced by doxorubicin. Moreover, cardanol changed the transcript expression levels of genes involved in the control of apoptosis (increased *DR5* and *Bcl-2* expression and decreased *Mcl-1*, *MADD* and *c-FLIPP*) and cell division (increased p21 and E2F1 and decreased cyclin D1, cyclin E, CDK4 and CDK2 expression), as well as increasing the level of p21 p-ERK, p-JNK and p-p38 and decreasing cyclin D. This accounts for the failure to progress from the G₁ to the S subphase.

สารบัญเรื่อง	หน้า
1) บทนำ	6
2) วัตถุประสงค์ของโครงการ	7
3) วิธีดำเนินการวิจัย และแผนการปฏิบัติงาน	7
4) สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล	13
5) ผลการดำเนินงาน	13
6) สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	20
7) เอกสารอ้างอิง	23

สารบัญรูป	หน้า
รูปที่ 1 แสดง IC ₅₀ value ของ Cardanol ที่มีต่อ BT 474 cell line	14
รูปที่ 2 Growth curve of untreated and treated BT-474 cell line	15
รูปที่ 3 แสดงสัญญาณของ Cardanol treated BT-474 cells	16
รูปที่ 4 การชักนำให้เกิดการตายแบบ Apoptosis และ Necrosis ใน BT-474 cells	17
รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน	19
รูปที่ 6 Western blot analysis เพื่อแสดงระดับโปรตีนใน BT-474 cells	20
รูปที่ 7 โมเดลแสดงกลไกการทำงานของคาร์ดานอล	22

สารบัญตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 แสดง Forward and reverse primers (5' → 3') ที่ใช้ใน qRT-PCR	12
ตารางที่ 2 แสดงลักษณะและ IC ₅₀ value ของ Crude extract (CME, CDE, และ CHE)	14
ตารางที่ 3 สรุปเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่ในระยะย่อย Interphase	18

1) บทนำ

ผลิตภัณฑ์ของผึ้งมีหลายชนิด ได้แก่ น้ำผึ้ง นมผึ้ง เกสรผึ้ง ไขผึ้ง พิษผึ้งและพรอพอลิส ในส่วนของฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าพรอพอลิสมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลาย ๆ ชนิดที่น่าสนใจ จึงนิยมนำมาใช้ในทางการแพทย์แผนโบราณ องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติต่าง ๆ ของพรอพอลิสขึ้นอยู่กับสภาพทางภูมิศาสตร์ ชนิดของผึ้ง ชนิดของพืชอาหาร เป็นต้น โดยทั่วไปพรอพอลิสมีลักษณะเป็นยางเหนียวมีสีน้ำตาลเข้ม พรอพอลิสที่ได้จากต้น Poplar (*Populus nigra* L.) ประกอบด้วย ยางจากพืช (50%), ไข (30%), น้ำมัน (10%), เกสรดอกไม้ (5%) และองค์ประกอบอื่น ๆ (5%) [1]

พรอพอลิสมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลาย ๆ ชนิด เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านไวรัส ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน [2-5] ซึ่งพบว่าทั้งสารสกัดอย่างหยาบและสารประกอบมีฤทธิ์ที่ดีทั้งสองชนิด และให้ผลที่ดีทั้งในระดับ *in vitro* หรือ *in vivo* ยกตัวอย่างเช่น หนู mice เพศผู้แบบ BALB/c ได้รับสารสกัดอย่างหยาบด้วยเอทานอล (CEE) ของ Brazillian green propolis (200 mg/kg ของน้ำหนักตัว) เป็นเวลา 3 วัน ผลพบว่า หนูมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น มีการแสดงออกของยีน *Toll-like receptor (TLR)-2* และ *TLR-4* ที่สูงขึ้น และมีการสร้าง Pro-inflammatory interleukin (IL)-1 และ IL-6 ที่มากขึ้นใน Macrophages และ Spleenocyte cells [6] นอกจากนี้ยังพบว่าพรอพอลิสทำให้มีการแสดงออกของ *TLR-4* และกลุ่มของ *CD80* ใน Human monocytes และเพิ่มระดับการแสดงออกของ Tumor necrosis factor (TNF)- α และ IL-10 ในลักษณะที่แปรผันตามความเข้มข้นของสาร [7] ถ้า *TLR-4* ถูกยับยั้ง ผลพบว่าการผลิต Cytokine จะลดลง

พรอพอลิสมีสารประกอบทางเคมีอยู่ประมาณ 50 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวก Polyphenolic, flavonoids และ Fatty acids [8] ยกตัวอย่างเช่น Baccharin ที่แยกได้จาก Brazillian propolis สามารถยับยั้ง Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการดีอียา Castration ของ Prostate cancer [9] นอกจากนี้ยังพบว่า ในหนู Mice ซึ่งได้รับ Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ซึ่งเป็นสารประกอบที่สำคัญในพรอพอลิส ที่มีความเข้มข้น 5 μ M/kg โดยวิธี Intraperitoneal injection สามารถอาการกังวลลงได้ พบว่ามีการเกิด p38MAPK phosphorylation ที่ลดลง ซึ่งส่งผลให้เกิดการทำงานของ Glucocorticoid receptor ที่มากขึ้น [10]

Propoelix™ ซึ่งเป็นสารสกัดด้วยน้ำของพรอพอลิสใช้รักษาผู้ป่วยที่เป็นไข้เลือดออกได้ดี [11] ผู้ป่วยจำนวน 63 คน ที่ได้รับ Propoelix™ ขนาด 200 mg/แคปซูล จำนวน 2 แคปซูล จำนวน 3 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน จะฟื้นไข้ได้เร็วอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 3 และวันที่ 6 ตามลำดับ

มีการรายงานถึงกลไกในระดับโมเลกุลของสารประกอบทางเคมีในพรอพอลิส ยกตัวอย่างเช่น CAPE (25 μ M) สามารถชักนำ Apoptosis ใน HeLa cervical cancer cell line (ME 180) หลังเลี้ยงร่วมกันเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง และชักนำ Cell cycle arrest ที่ระยะย่อย S และ G₂/M subphases, พบการแสดงออกที่สูงขึ้นของ E2F-1 target gene, cyclin A, cyclin E, apoptosis protease activating of factor-1 (Apaf-1) และ Myeloid leukemia cell differentiation protein (Mcl-1) แต่มีการแสดงออกของ Cyclin B ที่ลดลง [12]

นอกเหนือจากนี้ ยังพบว่า Chrysin สามารถลดระดับของ Pro-inflammatory cytokines IL-1 β และ IL-6 ในน้ำเลือดในหนู Rat ที่มีอาการของ Type 2 diabetic โดยการชักนำด้วยอาหารที่มีไขมันสูง / streptozotocin เนื่องจาก Pro-inflammatory cytokines ซึ่งรวมถึง TNF- α มีบทบาทสำคัญต่อการต้าน Insulin resistance และการตอบสนองทางการอักเสบ, chrysin จึงเป็นเป้าหมายใหม่ในการใช้รักษา Type 2 diabetes [13]

คาร์ดานอล ซึ่งเป็นสารประกอบ Phenolic มักพบใน Cashew tree (Anacardiaceae) family ถูกรายงานการค้นพบมาก่อนหน้านี้แล้วในพรอพอลิสของผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* [14] มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านแบคทีเรีย และต้านออกซิเดชัน [15-17] แต่อย่างไรก็ตามบทบาทการทำงานในระดับโมเลกุลยังไม่มี การรายงานถึง ในงานวิจัยนี้ เลือกใช้ BT-474 cell line ซึ่งเป็นมะเร็งเต้านมเป็นต้นแบบในการศึกษา เนื่องจากเป็นสาเหตุการตายของผู้หญิงไทยในระดับต้น ๆ [18]

เนื่องจากคาร์ดานอลไม่สามารถหาซื้อได้ตามท้องตลาด ในการทดลองนี้จึงต้องทำการสกัดบริสุทธิ์เอง ตามวิธีที่เคยรายงานมาแล้วก่อนหน้านี้ [14] ในงานวิจัยนี้ให้ความสำคัญกับการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาซึ่งสังเกตได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ศึกษา Cytotoxic activity โดยใช้ 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay และการเกิด Cell cycle arrest, apoptosis และ Necrosis ด้วยวิธี Flow cytometric analysis ร่วมกับการย้อมเซลล์ด้วยสี Annexin V และ Propidium (PI) พร้อมกับดูการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์และวัฏจักรของเซลล์โดยใช้เทคนิค Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) และ Western blot analyses และท้ายสุดได้มีการเสนอกลไกในระดับโมเลกุลของการทำงานของคาร์ดานอลที่มีต่อ BT-474 cell line

2) วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 2.1 ศึกษาฤทธิ์ของพรอพอลิสของผึ้งพันธุ์ที่มีต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม BT-474
- 2.2 การตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งเต้านม BT-474 พร้อมทั้งระยะในวัฏจักรของเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยพรอพอลิส
- 2.3 ศึกษากลไกของพรอพอลิสในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม BT-474

3) วิธีดำเนินการวิจัย และแผนการปฏิบัติงาน

การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บพรอพอลิสของผึ้งพันธุ์จากจังหวัดน่าน แล้วทำการห่อด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C

การสกัดบริสุทธิ์พรอพอลิส

การสกัดด้วยตัวทำละลายแบบแยกส่วน

นำพรอพอลิส (90 กรัม) มาละลายใน 400 มล. ของ 80% (v/v) เมทานอล เขย่าที่ 100 รอบต่อนาที, 15 °C, เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4930 g, 20 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปทำการระเหยโดยใช้ Rotary evaporator (Buchi rotavapor R-114) เมื่อแห้งจะได้ Crude MeOH extract (CME) นำตะกอนมาผสมกับ 400 มล. ของ Dichloromethane (CH₂Cl₂) แล้วเขย่าต่อที่ 100 รอบต่อนาที, 15 °C, เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4930 g, 20 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสแล้วนำมาทำการระเหยโดยใช้ Rotary evaporator เมื่อแห้งจะได้ Crude CH₂Cl₂ extract (CDE) ต่อจากนั้นนำตะกอนไปละลายใน 400 มล. ของ Hexane, เขย่าที่ 100 รอบต่อนาที, 15 °C, เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากการปั่นเหวี่ยงที่ 4930 g, 20 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไประเหยโดยใช้ Rotary evaporator เมื่อแห้งจะได้ Crude hexane extract (CHE), นำ CME, CDE และ CHE ไปชั่ง สังเกตลักษณะที่ได้ แล้วนำไปตรวจสอบ Antiproliferative activity และเก็บรักษาไว้ในที่มืด ที่ -20 °C

โครมาโตกราฟี

Quick column chromatography

ทำการบรรจุ silica gel 60 G (0.063-0.2 mm) ลงใน Sintered glass (ขนาดความจุ 250 มล.) ใช้ปั๊มสูญญากาศในการช่วยอัดเจลให้แน่น ผสม Crude extract กับ Silica gel 60 จนกระทั่งผสมเป็นเนื้อเดียวกันและไม่เหนียว ต่อจากนั้นนำของผสมไปวางทางด้านบนของคอลัมน์ วางชั้นกระดาษกรอง (Whatman, 110 mm in Ø) บนของผสม หลังจากนั้นวางสำลีทางด้านบนของกระดาษกรอง เติม 1.5 ลิตรของตัวทำละลายต่อไปนี้ (500 มล. / ครั้ง, 3x) hexane 25% (v/v) , CH₂Cl₂ -hexane 50% (v/v), CH₂Cl₂ - hexane 75% (v/v), CH₂Cl₂ 100% (v/v), MeOH - CH₂Cl₂ 4% (v/v), และ MeOH - CH₂Cl₂ 30% (v/v) ลงในคอลัมน์ตามลำดับ เก็บ Fractions, สังเกตรูปแบบของสารประกอบทางเคมีของทุก Fractions ด้วย Thin layer chromatography (TLC), นำ Fraction ที่มีรูปแบบบน TLC ที่เหมือนกันมารวมกัน แล้วนำไประเหยและชั่งน้ำหนัก บันทึกลักษณะของสารที่ได้ แล้วนำไปตรวจสอบ Antiproliferative activity ด้วย MTT assay

Adsorption chromatography

นำ Silica gel 60 (90 กรัม) มาผสมกับ Hexane (250 มล.) บรรจุลงในคอลัมน์ แล้วนำ Fraction ที่มีฤทธิ์จาก Quick column chromatography มาผสมกับ Silica gel 60 (5-7 กรัม) จนกระทั่งของผสมไม่เหนียว ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปบรรจุลงบนด้านบนของคอลัมน์ คลุมด้วยสำลี ทำการชะด้วย 500 มล. ของ 100% (v/v) hexane, 50% (v/v) CH₂Cl₂-hexane, 75% (v/v) CH₂Cl₂-hexane และ 100% (v/v) MeOH ตามลำดับ เก็บ Fractions (ขนาด 2.5 ml) แล้วตรวจสอบรูปแบบขององค์ประกอบทางเคมีแต่ละ Fraction โดย TLC, จากผลบน TLC plate, นำ Fraction ที่มี Cardanol มารวมกัน แล้วทำการระเหย ซึ่งสารที่ได้

Thin layer chromatography (TLC)

ใช้วิธีนี้เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่าง ทำการตัด TLC plate (a silica coated plate, Merck) ให้มีขนาด 5 x 5 cm² ชีดเส้นทางด้านล่างของแผ่นโดยให้สูงจากขอบล่างขึ้นมา 0.5 ซม. ด้วยดินสอ ใช้ Capillary tube ถ่ายสารตัวอย่างลงบนเส้นที่ขีด โดยให้มีลักษณะเป็นจุด ถ้าตัวอย่างเหนียวข้นเกินไป ก็สามารถละลายตัวอย่างได้ด้วยตัวทำละลาย จากนั้นจุ่ม TLC plate ลงใน Solvent chamber, โดยใช้ 100% (v/v) CH₂Cl₂ เป็น Mobile phase, เมื่อองค์ประกอบทางเคมีเคลื่อนที่เกือบถึงด้านบนของ TLC plate ก็ทำการดึงแผ่นออกจาก Chamber, ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง สังเกตรูปแบบขององค์ประกอบทางเคมีบน TLC plate ภายใต้รังสี U.V.

การพิสูจน์โครงสร้างของสาร

ทำการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบใน Fraction ที่มีฤทธิ์และบริสุทธิ์ด้วย Mass Spectrometry (MS)

การเลี้ยงเซลล์มะเร็งและวัดอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็ง

Cell culture

ได้รับ Breast cancer BT-474 cell line (ATCC no. HTB 20) มาจากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ และพันธุวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วทำการเลี้ยงในอาหาร Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 ที่มี 5% (v/v) fetal calf serum (FCS), ทำการ Seed cells โดยทำการย้าย 1 x 10⁵ เซลล์ลงใน 5 มล. ของอาหารที่อยู่ในพลาสติกขนาด 25-cm² แล้วทำการบ่มที่ 37 °C ที่มี 5% (v/v) CO₂ ทำการ Re-passage เมื่อความหนาแน่นของเซลล์ (Confluency) ถึง 70-80%

Cytotoxicity test

ใช้ 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay เป็นตัวตรวจสอบ ทำการ Seed BT-474 cell line (5x10³ เซลล์ใน 200 µl ของอาหาร) ลงในแต่ละหลุมของ 96 well plate ทำการบ่มที่ 37 °C ที่มี 5% (v/v) CO₂ เป็นเวลา 24 ชม. ทำการละลาย Cardanol ด้วย Dimethylsulfoxide (DMSO) เพื่อเป็น Stock concentration, หลังจากนั้นใส่ 2 µl ของ Cardanol ลงไปในแต่ละหลุมโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100, 10, 1, 0.1, 0.01, และ 0.001 µg/ml, ตามลำดับ ใช้ DMSO (2 µl / หลุม) เป็นตัวควบคุม บ่มเซลล์ต่ออีก 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 10 µl ของ 5 mg/ml ของ MTT solution ลงไปในแต่ละหลุม แล้วบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการย้ายสารละลายออก เติมสารละลายที่ประกอบด้วย 150 µl ของ DMSO และ 25 µl ของ 0.1 M glycine ลงไปในแต่ละหลุมเพื่อละลาย Formazan crystal, ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm โดยใช้ Microplate reader, แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการอยู่รอดของเซลล์ โดยคำนวณจากสูตรต่อไปนี้

เปอร์เซ็นต์ของการอยู่รอดของเซลล์ = (ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง/ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม) \times 100

ทั้งนี้กำหนดให้การอยู่รอดของเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเป็น 100%, ทำการวาดกราฟ โดยกำหนดให้แกน Y แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ และแกน X แสดงความเข้มข้นของ Cardanol, ทำการลากเส้นในแนวนอนจากตำแหน่งของ 50% บนแกน Y จนกระทั่งถึงเส้นกราฟ แล้วลากเส้นกราฟลงมาในแนวตั้งจนสัมผัสกับแกน X, จุดตัดบนแกน X แสดงค่า IC₅₀ value ของ Cardanol

Growth curve

ทำการเตรียม Untreated BT-474 cells และ Treated BT-474 cells (โดยใช้ความเข้มข้นที่ค่า IC₅₀ value), ใช้ MTT assay เพื่อดูตรวจสอบผล ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ทุก ๆ 1, 2, 3, 5, และ 7 วัน วาดกราฟที่แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ (แกน Y) และเวลา (แกน X) ทำการเปรียบเทียบแนวโน้มของเส้นกราฟระหว่างตัวอย่างและตัวควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ลักษณะของเซลล์

เตรียมเซลล์ 3 กลุ่ม (2 \times 10⁵ เซลล์/มล.) กลุ่มที่ 1 คือ ตัวควบคุม กลุ่มที่ 2 เซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับ 30 μ g/ml ของ Cardanol และกลุ่มที่ 3 เซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับ 0.5 μ g/ml ของ Doxorubicin (Positive control), สังเกตลักษณะของเซลล์ในทุกกลุ่ม ทุก ๆ ระยะการบ่มที่ 0, 24, 48, และ 72 ชม. โดยใช้ Inverted microscope (Zeiss) ที่เชื่อมต่อกับ Digital camera (Cannon EOS 7D)

การตรวจสอบ Apoptosis และ Necrosis

ทำการเลี้ยง BT-474 cells (3–5 \times 10⁶ cells/ml) ใน CM ที่มีการเติม (i) DMSO ใช้เป็นตัวควบคุม, (ii) 30 μ g/ml คาร์ดานอล และ (iii) 0.5 μ g/ml doxorubicin (ตัวควบคุมแบบบวก) เมื่อถึงเวลาบ่มที่ต้องการ ทำการเก็บเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยง (3,000 \times g, 4 °C เป็นเวลา 10 นาที) ล้างเซลล์ด้วย 1 ml ของ 1 \times

phosphate buffer saline (PBS) ที่เย็น และทำการเก็บเซลล์ ละลายตะกอนใน 50 μ l ของ 1 \times binding buffer pH 7.4 (10 mM HEPES, 140 mM NaCl และ 2.5 mM CaCl₂) ทำการย้อมสีเซลล์ด้วย 1 μ l ของ Annexin V (Alexa Fluor 488 conjugate, cat. # A13201, Life Technologies) และ 5 μ l ของ 1 mg/ml propidium iodide (PI) (P4864, Sigma Aldrich) ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้ววิเคราะห์ผล ด้วย Flow cytometry

การตรวจหา Cell cycle arrest

ทำการเลี้ยง BT-474 cells (1–100 \times 10⁶ cells/ml) ในอาหาร CM ที่มีการเติม (i) DMSO ใช้เป็นตัวควบคุม, (ii) 30 μ g/ml คาร์ดานอล และ (iii) 0.5 μ g/ml doxorubicin (ตัวควบคุมแบบบวก) เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชม. ทำการเก็บเซลล์ตามที่ระบุข้างต้น ละลายตะกอนเซลล์ใน 500 μ l PBS ที่เย็นและ 200 μ l 70% (v/v) เอทานอลที่ -20 °C เป็นเวลา 1 คืนหรือแช่แข็งเป็นเวลา 4 ชม. ทำการเก็บเซลล์เหมือนกันที่ระบุไว้

ข้างต้น ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 250 μ l PBS ที่มี 0.1 mg/ml RNase ทำการบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากเก็บเซลล์ ละลายเซลล์ด้วย 12.5 μ l ของ 1 mg/ml PI ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้ววิเคราะห์ผลด้วย Flow cytometry ทำการแปลผลในรูปแบบของ (1) sub G₁ phase (apoptotic cells), (ii) G₁ phase (diploid chromosome content), (iii) S phase (DNA synthesis) และ (iv) G₂/M subphase (double diploid)

การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน

ในระดับ Transcription

ทำการเลี้ยง BT-474 cells (1–100 $\times 10^6$ cells/ml) ในอาหาร CM ที่มีการเติม (i) DMSO ใช้เป็นตัวควบคุม, (ii) 30 μ g/ml คาร์ดานอล และ (iii) 0.5 μ g/ml doxorubicin (ตัวควบคุมแบบบวก) เป็นเวลา 72 ชม. แล้วทำการเก็บเซลล์ ทำการสกัด Total RNA ด้วย RNeasy Plus Mini Kit (Cat. # 74134, Qiagen) ทำการชะ RNA ด้วย 20 μ l RNase-free H₂O และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm (A₂₆₀ และ A₂₈₀ ตามลำดับ) คำนวณหาความเข้มข้นของ RNA ตามสมการต่อไปนี้

$$\text{ความเข้มข้นของ RNA } (\mu\text{g/ml}) = (A_{260}) \times \text{dilution factor} \times (40)$$

ความบริสุทธิ์ของ RNA ที่สกัดได้ คำนวณจาก A₂₆₀/A₂₈₀ ratio เก็บรักษา RNA ที่สกัดได้ที่ -20 °C

ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้ qRT-PCR เลือกศึกษายีน 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็น Death receptor group ที่เกี่ยวข้องกับ Apoptosis ได้แก่ *B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)*, *Mcl-1*, *mitogen activating protein-kinase activating death domain (MADD)*, *cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP)* และ *Human death receptor 5 (DR5)* กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับ Cell cycle ได้แก่ *p21*, *cyclin D1*, *cyclin E*, *cyclin A*, *cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)*, *CDK6* และ *CDK2*

เตรียมปฏิกิริยาโดยใช้ One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (cat. # TKR-R-RR064A, Takara) แต่ละปฏิกิริยา (20 μ l สำหรับปริมาตรสุดท้าย) ประกอบด้วย Total RNA (10 ng), 10 μ l 2x one step SYBR RT-PCR buffer, 1 μ l Prime Script 1 step enzyme mix, 0.5 μ l ของแต่ละ Forward และ Reverse PCR primer (20 μ M stock) และ RNase-free d-H₂O รายละเอียดของ Forward และ Reverse primers อยู่ในตารางที่ 1 ภาวะที่ PCR ทำงาน คือ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 40 รอบของ 94 °C เป็นเวลา 15 วินาที, x °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที ค่า x แสดงไว้ในตารางที่ 1 ระดับ

การแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของ β -actin ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม คำนวณหาระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้ Crossing point (Cp) ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ระดับการแสดงออก} = 2^{(Cp \text{ actin} - Cp \text{ target})}$$

ค่า Cp value มีความสัมพันธ์กับตัวต้นแบบเริ่มต้นและบ่งบอกถึงระดับการแสดงออกของ mRNA [19]

ตารางที่ 1 แสดง Forward and reverse primers (5' → 3') ที่ใช้ใน qRT-PCR.

Gene	Nucleotide sequence of F primer	Nucleotide sequence of R primer	Annealing temp. (°C)	Reference
<i>β-actin</i>	GACCTGACTGACTACCTCATGA	AGCATTTCGGGTGGACGATGGAG	55	Lirdprapamongkol et al. [19]
<i>MADD</i>	TCAACCCACTCATCTATGGCAATG	GCGGAATTGAAGAACCGTACCA	60	Li et al. (2011)
<i>c-FLIP</i>	CCAGAGTGTGTATGGTGGAT	TCTCCCATGAACATCCTCCTGAT	60	Li et al. (2011)
<i>Bcl2</i>	TGGGATGCGGGAGATGTG	CGGGATGCGGCTGGAT	60	Li et al. (2011)
<i>Mcl1</i>	AGCAGAGGAGGAGGAGGAC	GCCTGCTCCCAGAGGTA	55	Lirdprapamongkol et al. (2013)
<i>DR5</i>	TGCTGCTCAAGTGGCGC	GGCATCCAGCAGATGGTTG	60	Pillai et al. (2011)
<i>P21</i>	CACTCCAACGCCGGCTGATCTTC	TGTAGAGCGGGCCTTTGAGGCCCTC	55	Weglarz et al. (2006)
<i>E2F1</i>	GCCACTGACTCTGCCACCA	GGACAACAGCGGTTCTTGCT	60	Galanti et al. (2008)
<i>Cyclin A</i>	GAAGACGAGAGGGTTGCA	AGGAGGAACGGTGACATGCT	60	Galanti et al. (2008)
<i>Cyclin D1</i>	AATGACCCCGCAGATTTTC	TCAGGTTCAGGCCTTGACAC	60	Ullmannova et al. (2003)
<i>Cyclin E</i>	TTCTTGAGCAACCCCTCTTCTGCAGCC	TCGCCATATACCGGTCAAAGAAATCTTGTC	58	Potemski et al. (2006)
<i>CDK2</i>	TTTGGAGTCCCTGTTCTGAC	TGCGATAACAAGTCCGCTCC	58	Chiang et al. (2010)
<i>CDK4</i>	CTTTGACCTGATTGGGCTGC	GGAGAGGTGGGAGGGGAATG	58	Chiang et al. (2010)
<i>CDK6</i>	TCTTGCTCCAGTCCAGCTAC	AGCAATCCTCCACAGCTCTG	60	Ullmannova et al. (2003)

ในระดับโปรตีน

ใช้วิธีการของ Western blot analysis โดยปรับปรุงวิธีจาก Lirdprapamongkol et al. [20] ทำการเลี้ยง BT-474 cells ($1-100 \times 10^6$ cells/ml) ในอาหาร CM ที่มีการเติม (i) DMSO ใช้เป็นตัวควบคุม, (ii) 30 $\mu\text{g/ml}$ คาร์ดานอล และ (iii) 0.5 $\mu\text{g/ml}$ doxorubicin (ตัวควบคุมแบบบวก) เป็นเวลา 3 ชม. ทำการเก็บเซลล์และ Lyse ด้วย 150 μl radioimmunoprecipitation assay buffer ที่ประกอบด้วย 1x halt protease phosphatase และ phosphatase inhibitor cocktail ที่มี EDTA (catalog# 78440, Thermo Scientific, USA), บนน้ำแข็ง วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

ทำการ Load 20 μg โปรตีนลงในแต่ละหลุมของ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) ที่มี 7 และ 4% (w/v) acrylamide separating และ stacking gel ตามลำดับ หลังจากการทำ Electrophoresis ที่ 15 mA เป็นเวลา 105 นาที จึงทำการย้ายโปรตีนสู่ Immobilon-P nylon membrane (Millipore, Bedford, MA, USA) ด้วยวิธี Electroblotting ที่ 100 V เป็นเวลา 90 นาที ทำการ Blocked ด้วย 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA) พร้อมเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. ทำการ Probe ด้วย Primary antibodies (Cell Signaling Technology) ที่เจือจางใน 3% (w/v) BSA ให้เป็น 1: 1000 (ยกเว้น anti-pERK ที่ทำให้เจือจางเป็น 1: 5000) เป็นระยะเวลา 1 คืนที่ 4 °C ในที่มืด ล้าง Membrane ด้วย 1x TBS/T, pH 7.6 (20 mM Tris และ 137 mM NaCl) ทำการบ่มร่วมกับ Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (catalog# W4021 and W4011, Promega, USA) ใน TBS/T ที่มี 5% (w/v) skim milk (1: 10000 mouse, 1: 5000 rabbit) พร้อมเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. ดูผลโดยใช้ Western bright ECL reagents (Advansta, Menlo Park, CA, USA) และ Image Quant LAS 4,000 mini instrument (GE Healthcare Life Sciences)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำเสนอผลในรูปแบบของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (1 S.D.) ในแต่ละการทดลองมีการทำซ้ำ 3 ครั้ง ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย One way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย Tukey's test โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ทุกการวิเคราะห์ใช้ SPSS program version 19.0

4) สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

พื้นที่ จังหวัดน่าน

5) ผลการดำเนินงาน

สารสกัดอย่างหยาบของพรอพอลิสจาก *A. mellifera*

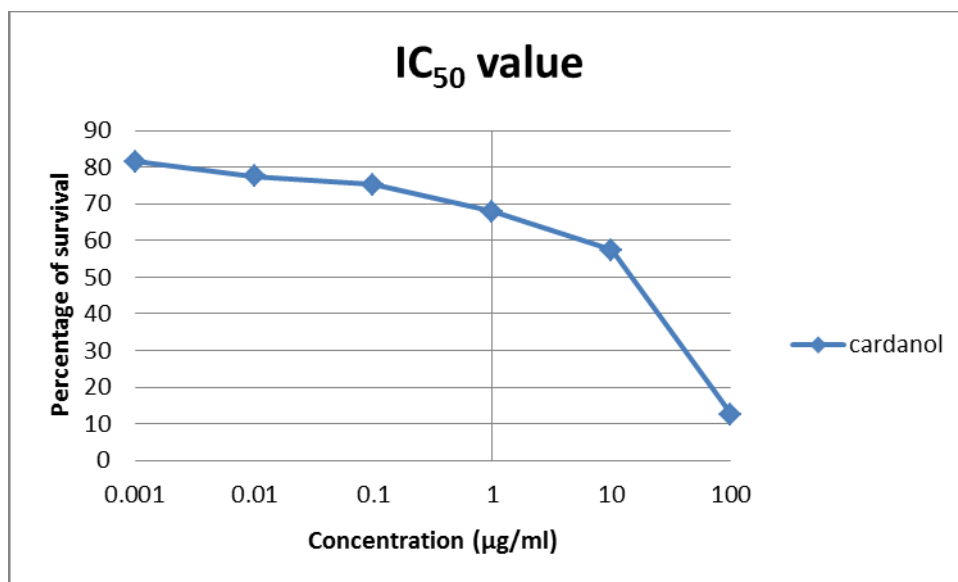
หลังจากทำการสกัดพรอพอลิสของ *A. mellifera* (90 กรัม) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด (MeOH, CH_2Cl_2 , และ hexane), ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Yield ที่สูงที่สุดได้จาก CHE (21,600 mg), สีของเม็ตสีถูกกำจัดทิ้งใน CHE จึงทำให้เห็นว่าตัวอย่างนี้มีสีน้ำตาลที่จางลง ในขณะที่ตัวอย่างที่เหลือยังคงมีสีน้ำตาลที่ยังเข้มอยู่ ถึงแม้ว่า Crude extract ทั้งหมดแสดง Antiproliferative activity ต่อ BT-474, แต่ CDE มีฤทธิ์สูงที่สุด ($\text{IC}_{50} = 29.97 \pm 6.17 \mu\text{g/ml}$) ดังนั้นจึงนำ CDE ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยใช้โครมาโตกราฟี

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะและ IC₅₀ value ของ Crude extract (CME, CDE, และ CHE)

Crude extract	น้ำหนัก (mg)	% yield ของพรอพอลิส	ลักษณะ	IC ₅₀ (µg/ml)
CME	600	0.33	ชั้นเหนียวและมีสีน้ำตาลเข้ม	38.26 ± 4.28
CDE	1,540	1.71	ชั้นเหนียวและมีสีน้ำตาลอ่อน	29.97 ± 6.17
CHE	21,600	24	สีเหลืองอ่อน	39.18 ± 6.27

ผลของ Cardanol

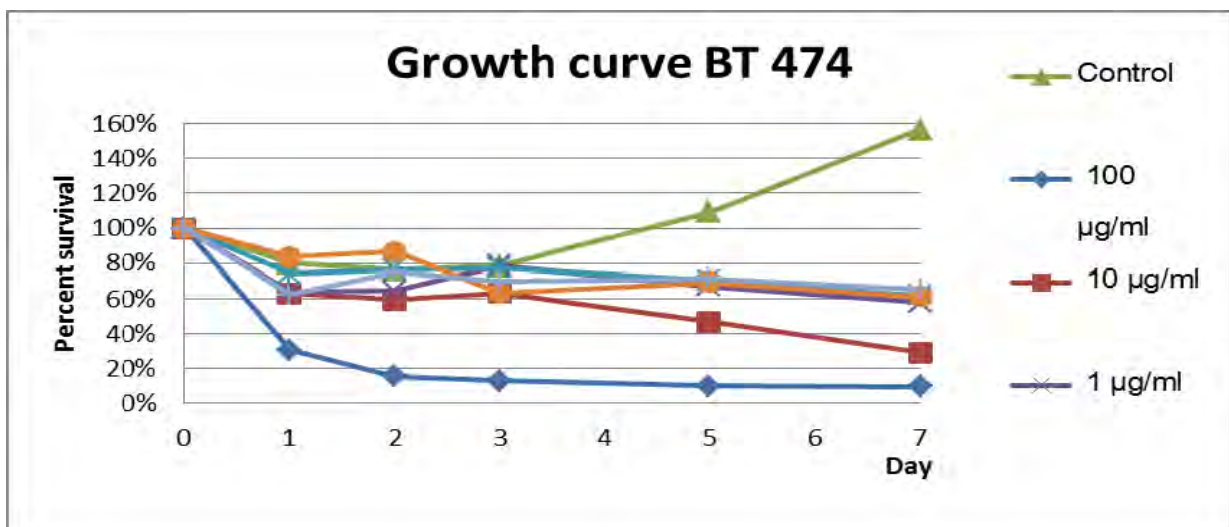
เนื่องจาก CDE (1,540 mg) มีฤทธิ์สูงสุด จึงทำการสกัดบริสุทธิ์ต่อโดยใช้ Quick column chromatography และ Adsorption chromatography, พิสูจน์ว่าเป็น Cardanol โดยพิจารณาจาก Rf value บน TLC plate และค่า Spectrum ของ Mass spectrometry, ผลพบว่าได้ Cardanol ที่บริสุทธิ์ 0.52 mg จากพรอพอลิสเริ่มต้นที่ 90 กรัม คำนวณได้ IC₅₀ value ที่ 15.57 ± 1.73 µg/ml (รูปที่ 1) โดยมีค่าใกล้เคียงกับที่เคยรายงานไว้ใน Teerasriprecha et al. (2012), ซึ่งเคยรายงานไว้ว่ามี IC₅₀ value ของ Cardanol ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ BT-474 cell lines ที่ 13.95 ± 0.9 µg/ml



รูปที่ 1 แสดง IC₅₀ value ของ Cardanol ที่มีต่อ BT 474 cell line

Growth curve

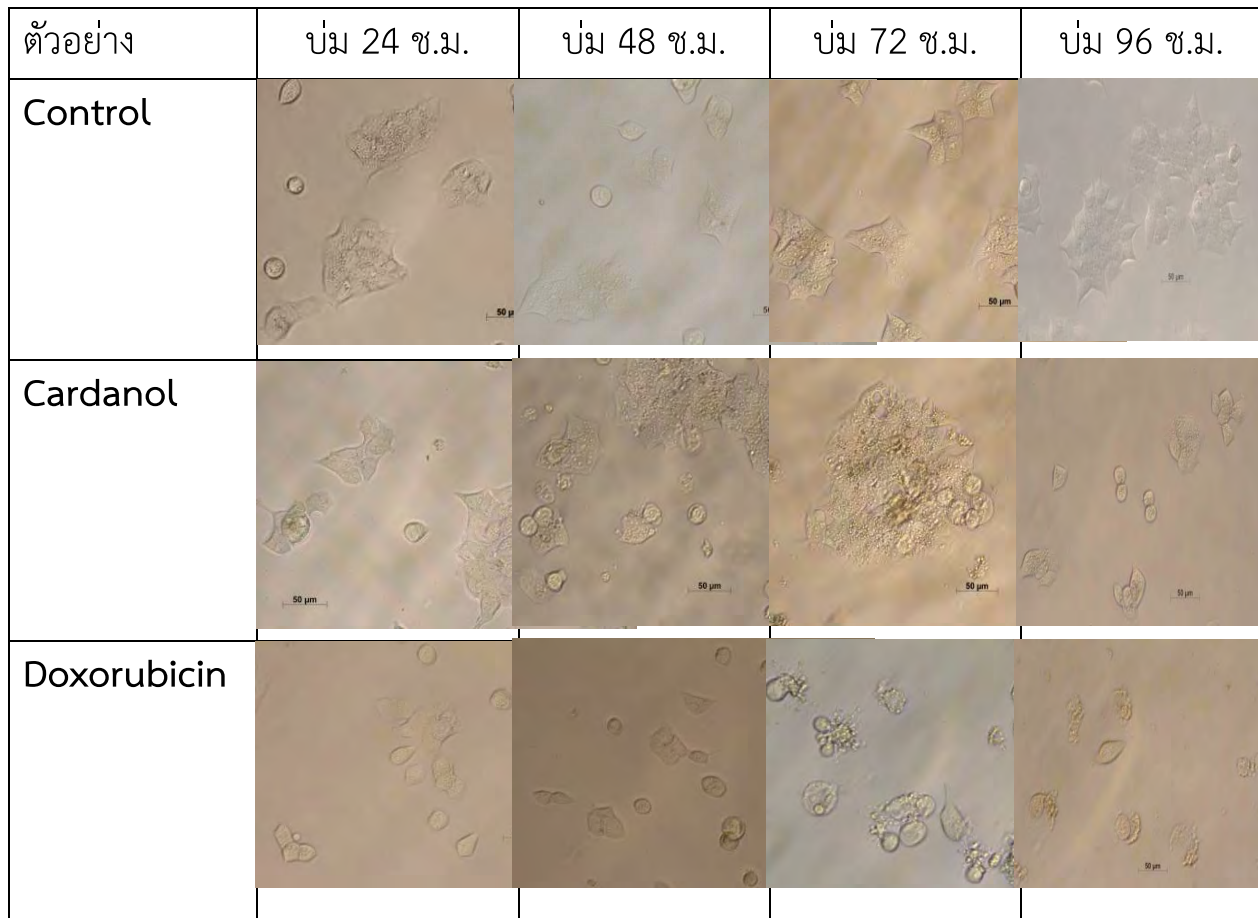
การเติบโตของ Untreated BT-474 cells และ Treated BT-474 cells ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ Cardanol (0.001-100 $\mu\text{g/ml}$) แสดงในรูปที่ 2, เมื่อพิจารณาทั้ง 4 ระยะของ Growth curve, จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ของการอยู่รอดของเซลล์ถูกบันทึกเริ่มจาก Lag phase ไปจนถึง Log phase เพราะหลังจากนั้นจะเริ่มเห็นการตายของเซลล์ที่อยู่ในกลุ่ม Treated BT-474 cells, พบว่า Cardanol ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของ BT-474 ดีที่สุด ในภาพรวมจะเห็นได้ว่า Cardanol มีฤทธิ์ยับยั้งในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับเวลาและความเข้มข้น



รูปที่ 2 Growth curve of untreated and treated BT-474 cell line.

การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของ BT-474 cells

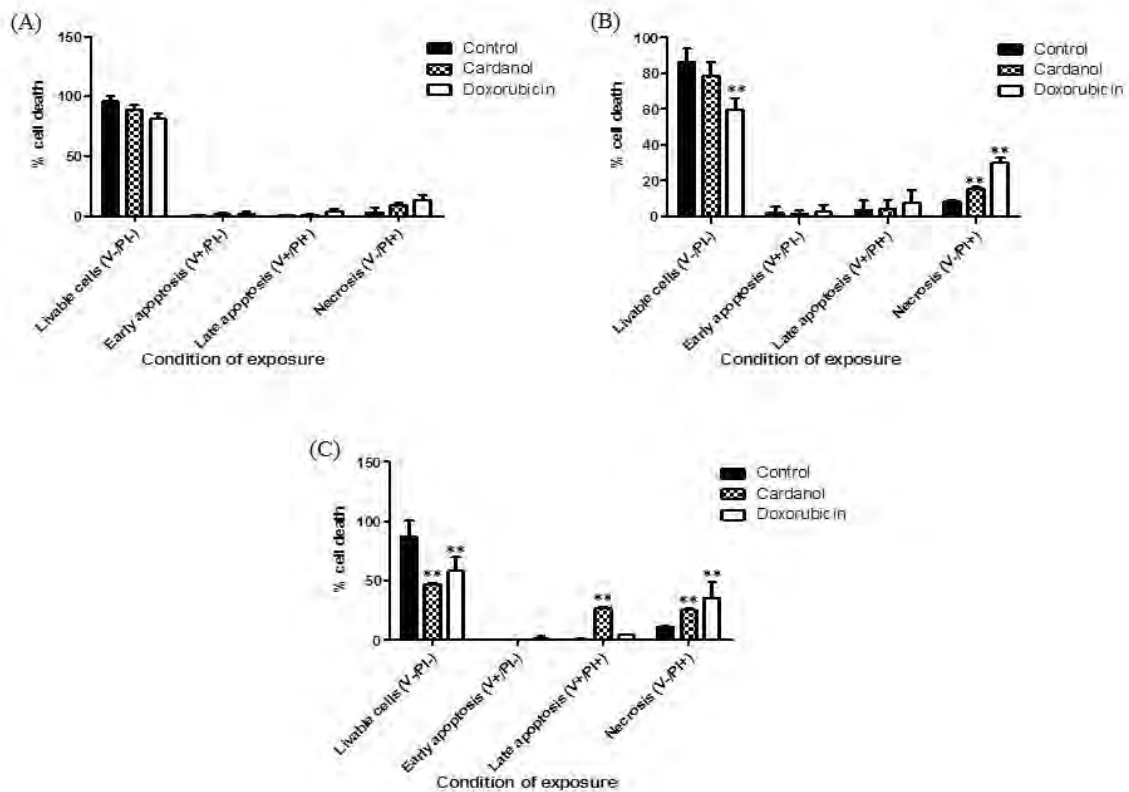
ทำการบ่ม Untreated BT-474 cells และ Cardanol treated BT-474 cells (IC_{50} value conc.) เป็นเวลา 96 ชม. ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของเซลล์ทุก ๆ 24 ชม. ผลของการเปลี่ยนแปลงแสดงในรูปที่ 4, ในภาพรวมของ Untreated BT-474 cells, สังเกตเห็นว่าเซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่ มีรูปร่างแบนและยึดติดกับพื้นผิว แต่สัณฐานของ Cardanol treated cells มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันออกไป โดยเฉพาะแตกต่างจากกลุ่มควบคุม หลังการบ่ม 24 ชม. สังเกตเห็นเซลล์ลอย เกิดการหดตัวของเซลล์ หลังการบ่ม 48 ชม. สังเกตเห็นเซลล์มารวมกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ และหลังจากการบ่ม 72 ชม. เห็นจำนวนเซลล์น้อยลงมาก สำหรับการทดลองนี้ ใช้ Doxorubicin (0.5 $\mu\text{g/ml}$), ซึ่งเป็น Chemotherapeutic drug, มาเป็น Positive control, สัณฐานของ Doxorubicin treated BT-474 cells มีการเปลี่ยนแปลงจากกลุ่มควบคุมเป็นอย่างมาก แต่มีลักษณะของการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายกับ Cardanol treated BT-474 cells, แต่อย่างไรก็ตาม สังเกตเห็นการรวมกันเป็นกลุ่มเล็ก ๆ ของเซลล์ มีรูปร่างคล้ายขมพู่ สังเกตได้ชัดเจนว่ามีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่น้อยลงมาก (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงสัณฐานของ Cardanol treated BT-474 cells หลังการบ่มที่ 24, 48, 72, และ 96 ช.ม. ใช้กำลังขยายที่ 200x, ภาพมาจากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การชักนำให้เกิด Apoptosis และ Necrosis

ทำการย้อมสีเซลล์โดยใช้ Annexin V และ PI แล้วสังเกตผลด้วย Flow cytometry ผลแสดงดังในรูปที่ 4 พบเซลล์มีชีวิตอยู่มากในกลุ่มควบคุม (98 % ที่ 24 ช.ม. ถึง 78 % ที่ 72 ช.ม.) พบการตายแบบ Apoptosis บ้างเล็กน้อย ในทางตรงกันข้ามเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับคาร์ดานอลมีการตายแบบ Late apoptosis จำนวนมากที่ 72 ช.ม. (27.2 ± 1.1 %) ในขณะที่พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับ Doxorubicin มีการตายแบบ Necrosis เริ่มตั้งแต่ 48 ช.ม. และพบการตายที่มากขึ้นหลังจาก 72 ช.ม. (35.8 ± 13.0 %)



รูปที่ 4 การชักนำให้เกิดการตายแบบ Apoptosis และ Necrosis ใน BT-474 cells เมื่อทำการเลี้ยงใน CM ที่มีแต่ DMSO (กลุ่มควบคุม), 30 µg/ml คาร์ดานอล และ 0.5 µg/ml doxorubicin เป็นระยะเวลา (A) 24 ช.ม., (B) 48 ช.ม. และ (C) 72 ช.ม. เครื่องหมาย “***” แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.01) ระหว่างกลุ่มควบคุมและ Treated cells แสดงข้อมูลในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (1 SD) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

Cell cycle arrest

ในวัฏจักรของเซลล์ในระยะ Interphase มีระยะย่อย G₁, S และ G₂/M ซึ่งสามารถประเมินได้จาก DNA content ซึ่งวิเคราะห์ได้จาก Flow cytometry หลังย้อมสีเซลล์ด้วย PI ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3

ในกลุ่มควบคุมหลัง 24–72 ช.ม. พบเซลล์ประมาณ 17–19.3 % อยู่ในระยะย่อย G₂/M และ 66–71.5 % อยู่ในระยะ G₁ ของวัฏจักรของเซลล์ ในกลุ่มที่เซลล์เลี้ยงร่วมกับคาร์ดานอลพบว่าเซลล์อยู่ในระยะย่อย G₁ มากกว่ากลุ่มควบคุมในทั้ง 3 ช่วงเวลา คือ จาก 66.2 % ถึง 72.9 %, 67.2 % ถึง 74.6 % และ 71.5 % ถึง 80.7 % ที่ 24, 48 และ 72 ช.ม. ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าคาร์ดานอลชักนำให้เกิด Cell cycle arrest ของ BT-474 cells ที่ระยะย่อย G₁ นอกจากนี้ยังพบว่า Doxorubicin ช่วยเพิ่มให้เซลล์อยู่ในระยะย่อย G₂/M เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในทั้ง 3 ช่วงเวลา คือ จาก 19.3 % ถึง 20.6 %, 20.1 % ถึง 30.0 %, และ 17.0 % ถึง 41.3 % ที่ 24, 48 และ 72 ช.ม. ตามลำดับ จึงกล่าวได้ว่า Doxorubicin ชักนำให้เกิด Cell cycle arrest ของ BT-474 cells ที่ระยะย่อย G₂/M

ตารางที่ 3 สรุปเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่ในระยะย่อย Interphase

Subphase	Control			Cardanol treated cells			Doxorubicin treated cells		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Early G ₁	1.1 ± 0.7	1.3 ± 0.9	1.1 ± 1.0	1.7 ± 1.2	2.5 ± 0.6	2.0 ± 1.3	2.0 ± 0.9	3.5 ± 1.1	5.3 ± 3.9
G ₁	66.2 ± 11.4	67.2 ± 6.3	71.5 ± 8.7	72.9 ± 10.2	74.6 ± 3.4	80.7 ± 4.1	59.5 ± 11.5	46.9 ± 3.4	31.8 ± 7.9
S	10.2 ± 1.1	7.7 ± 0.5	7.3 ± 1.7	8.5 ± 4.5	6.5 ± 7.2	5.8 ± 2.2	13.9 ± 1.8	14.4 ± 7.2	14.0 ± 2.2
G ₂ /M	19.3 ± 10.2	20.1 ± 6.5	17.0 ± 8.2	14.3 ± 6.7	13.2 ± 8.2	9.2 ± 5.8	20.6 ± 10.4	30.0 ± 8.2	41.3 ± 1.4

ข้อมูลแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (1 SD) ข้อมูลมาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

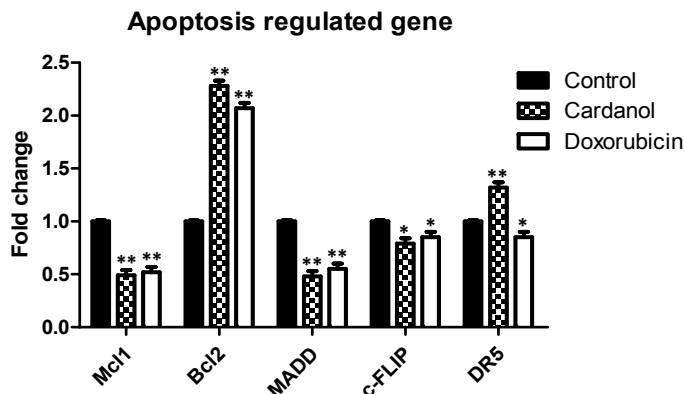
การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน

สืบเนื่องมาจากคาร์ดานอลชักนำให้เกิดการตายของ BT-474 cells แบบ Late apoptosis หลังเลี้ยงร่วม 72 ชม. จึงทำการสกัด Total RNA จาก BT-474 cells ที่ช่วงเวลาดังกล่าว เพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Apoptosis และวัฏจักรของเซลล์โดยใช้ qRT-PCR

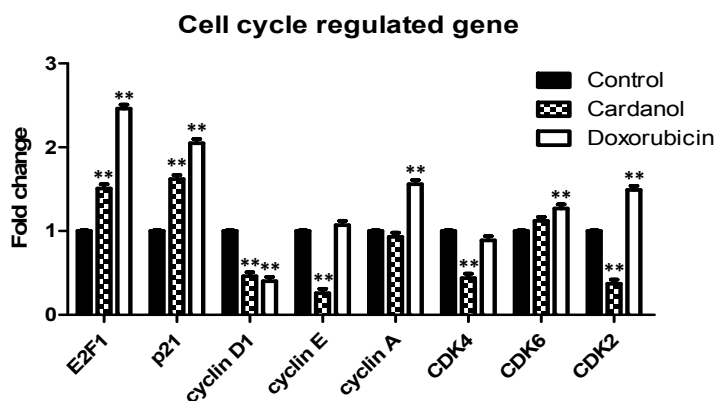
เมื่อมาพิจารณายีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับ Apoptosis พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับคาร์ดานอลมีระดับการแสดงออกของยีน *DR5* และ *Bcl-2* ที่สูงขึ้น แต่มีระดับการแสดงออกของยีน *Mcl-1*, *MADD* และ *c-FLIP* ที่ลดลง ในส่วนของเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับ Doxorubicin มีระดับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ที่สูงขึ้น แต่มีการแสดงออกของยีน *Mcl-1*, *MADD*, *c-FLIP* และ *DR5* ที่ลดลง (รูปที่ 5A)

เมื่อมาพิจารณายีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับและวัฏจักรของเซลล์ พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับคาร์ดานอลมีระดับการแสดงออกของยีน *p21* และ *E2F1* ที่สูงขึ้นแต่มีระดับการแสดงออกของยีน *cyclin D1*, *cyclin E*, *CDK4* และ *CDK2* ที่ลดลง ในขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับ Doxorubicin มีระดับการแสดงออกของยีน *E2F1*, *p21*, *cyclin E*, *cyclin A*, *CDK4*, *CDK6* และ *CDK2* ที่สูงขึ้น (รูปที่ 5B)

(A)



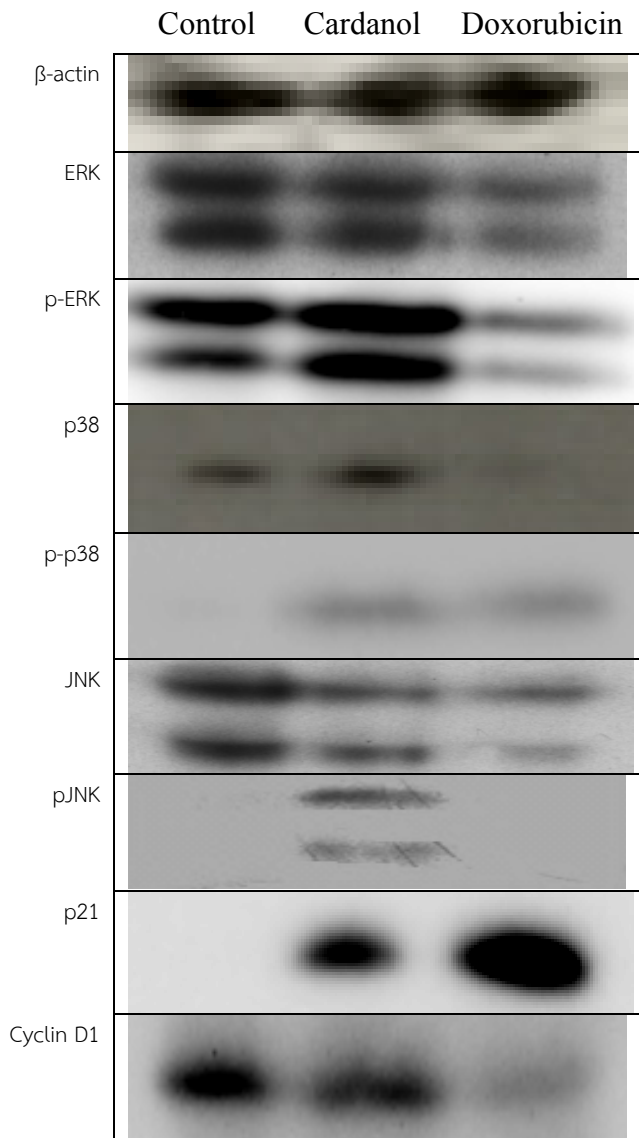
(B)



รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม (A) death receptor group (ควบคุม Apoptosis) และ (B) วัฏจักรของเซลล์ ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (1 SD) มาจากการทำการทดลอง 3 ครั้ง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มควบคุมกับ Treated cells แสดงโดยใช้ (**) เมื่อ $p < 0.01$ และ (*) เมื่อ $p < 0.05$

การเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีน

ทำการวัดระดับของโปรตีน ERK, JNK และ p38 MAPK รวมทั้งรูปแบบที่ถูก Phosphorylated (active) ของโปรตีนดังกล่าว (p-ERK, p-JNK and p-P38) รวมทั้ง p21 และ Cyclin D1 ใน BT-474 cells ที่เลี้ยงร่วมกับ 30 $\mu\text{g/ml}$ คาร์ดานอล หรือ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin หลังจากระยะเวลาเลี้ยง 24 ชม. (รูปที่ 6) พบว่าคาร์ดานอลสามารถกระตุ้น ERK, JNK และ p38 MAPK ได้ ซึ่งส่งผลให้มีการเพิ่มระดับของ p21 และ cyclin D1 ทั้งนี้ในภาพรวม กล่าวได้ว่าระยะพักในระยะย่อย G_1 ซึ่งถูกชักนำโดยคาร์ดานอลนั้นเป็นผลมาจากการกระตุ้นของ MAPK-p21 pathway



รูปที่ 6 Western blot analysis เพื่อแสดงระดับโปรตีนใน BT-474 cells ในอาหาร CM ที่มีการเติม DMSO เท่านั้น (กลุ่มควบคุม) หรือเลี้ยงร่วมกับ 30 µg/ml คาร์ดานอล หรือ 0.5 µg/ml doxorubicin เป็นเวลา 24 ช.ม. ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

6) สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

พรอพอลิสของ *Apis mellifera* ที่เก็บจากจังหวัดน่าน เมื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ MeOH, CH₂Cl₂, และ Hexane จะได้ CME, CDE, และ CHE, ทั้งนี้พบว่า CDE มีฤทธิ์ Antiproliferative activity ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม BT-474 cells ได้ดีที่สุด โดยมี IC₅₀ value เท่ากับ 29.97 ± 6.17 µg/ml

CDE ถูกนำไปสกัดบริสุทธิ์โดยใช้ Quick column chromatography และ Adsorption chromatography, จนกระทั่งในที่สุดได้ Cardanol ที่บริสุทธิ์ ทั้งนี้พิจารณาจาก Rf value เมื่อทำ Thin layer

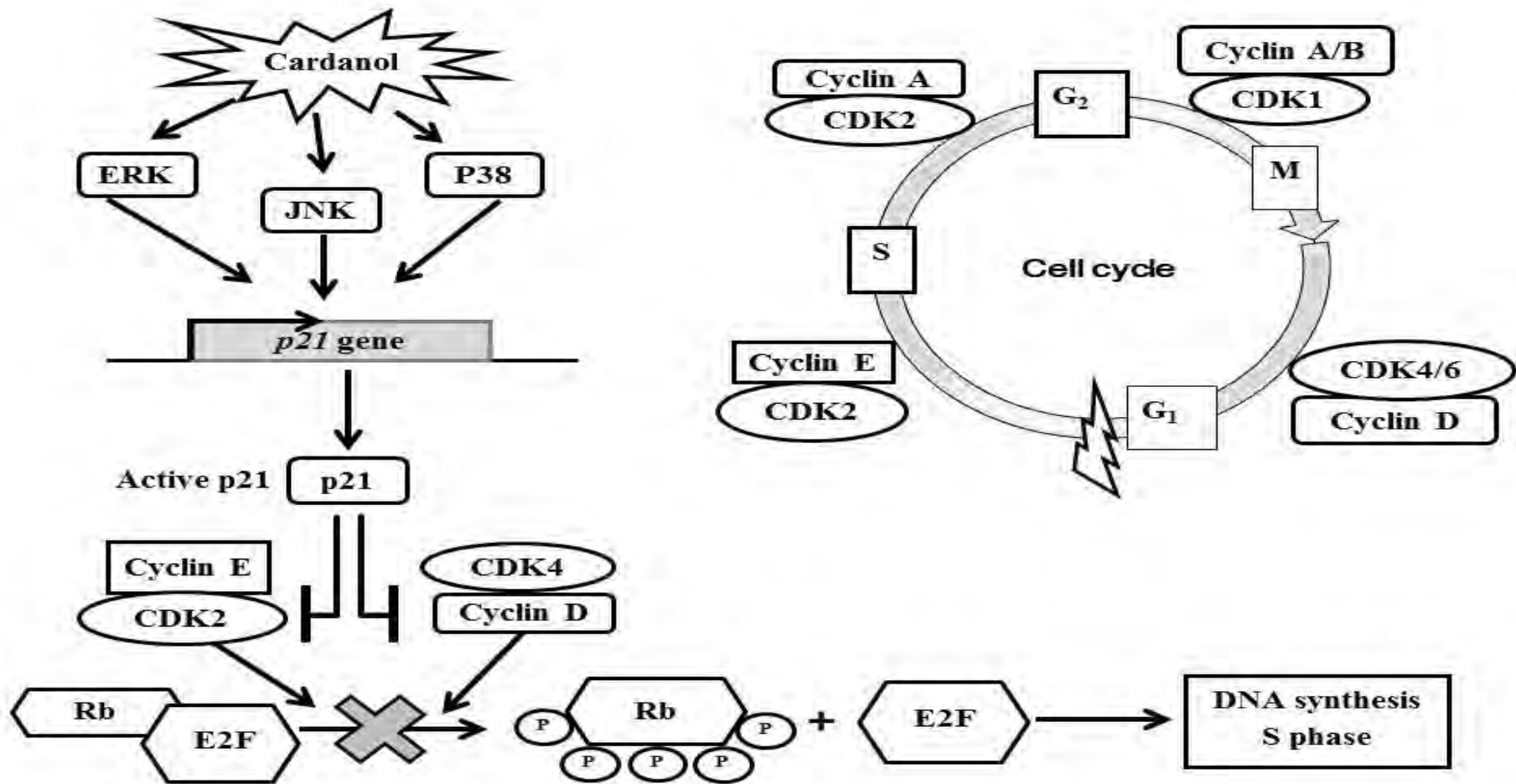
chromatography และจากการทำ Mass spectrometry, จากการทำ MTT assay, พบว่า Cardanol มี IC₅₀ value ที่ $15.57 \pm 1.73 \mu\text{g/ml}$

สำหรับการตรวจสอบ Growth curve, หลังการบ่ม Cardanol treated cells ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 0.001 - 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็นระยะเวลา 7 วัน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า Cardanol มีผลในการยับยั้งการเติบโตของ BT-474 cells ในรูปแบบที่ขึ้นอยู่กับเวลาและความเข้มข้น

เมื่อทำการสังเกตสัณฐานของ Untreated BT-474 cells และ Cardanol treated BT-474 cells, ผลพบว่ารูปร่างของเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างกัน ในกลุ่ม Cardanol treated BT-474 cells, สังเกตเห็นการลอยของเซลล์ การหดตัว การรวมเป็นกลุ่มขนาดใหญ่และการลดจำนวนลงอย่างมากของเซลล์

หลังจากการเลี้ยง BT-474 cells ร่วมกับคาร์ดานอล 72 ชม. พบการตายของเซลล์ในช่วง Late apoptosis จากการพิจารณาระดับการแสดงออกของยีนกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ Apoptosis และ Cell proliferation สามารถกล่าวได้ว่า MAPK ควบคุมระยะพักของเซลล์ที่ระยะย่อย G₁ โดยเกี่ยวข้องกับ p21

ในภาพของการสรุป จึงสามารถเสนอกลไกการทำงานของคาร์ดานอลที่มีต่อ BT-474 cells ได้ดังในรูปที่ 7 อธิบายได้ว่าคาร์ดานอลเพิ่มการเกิด Phosphorylation ของ ERK, JNK และ p38 MAPK ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้น p21, ทั้งนี้ p21 ที่ถูกกระตุ้นสามารถยับยั้ง CDK4/cyclin D และ cyclin E/CDK2 และป้องกันการเกิด Hyperphosphorylation ของโปรตีน Retinoblastoma อันส่งผลให้ระงับ DNA synthesis และป้องกันการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้าสู่ระยะย่อย S จึงเข้าสู่ระยะพักที่ระยะย่อย G₁



รูปที่ 7 โมเดลแสดงกลไกการทำงานของคาร์ดานอลที่สามารถชักนำ Cell cycle arrest ที่ระยะย่อย G₁ และนำไปสู่การตายของเซลล์ใน BT-474 cancer cells

7) เอกสารอ้างอิง

- [1] Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol.* 1998;36:347-63.
- [2] Popova M, Dimitrova R, Al-Lawati HT, Tsvetkova I, Najdenski H, Bankova V. Omani propolis: chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. *Chem Cent J.* 2013;7:158.
- [3] Diaz-Carballo D, Ueberl K, Kleff V, Ergun S, Malak S, Freistuehler M, et al. Antiretroviral activity of two polyisoprenylated acylphloroglucinols, 7-epi-nemorosone and plukenetione A, isolated from Caribbean propolis. *Int J Clin Pharm Th.* 2010;48:670-7.
- [4] Hu F, Hepburn HR, Li Y, Chen M, Radloff SE, Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol.* 2005;100:276-83.
- [5] Sulaiman GM, Al Sammarrae KW, Ad'hiah AH, Zucchetti M, Frapolli R, Bello E, et al. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. *Food Chem Toxicol.* 2011;49:2415-21.
- [6] Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, Sforcin JM. Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. *J Ethnopharmacol.* 2010;129:314-8.
- [7] Bufalo MC, Bordon-Graciani AP, Conti BJ, De Assis GM, Sforcin JM. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. *J Pharm Pharmacol.* 2014;66:1497-504.
- [8] Lotfy M. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2006;7:22-31.
- [9] Zang T, Verma K, Chen M, Jin Y, Trippier PC, Penning TM. Screening baccharin analogs as selective inhibitors against type 5 17β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3). *Chem Biol Interact.* 2014;doi:10.1016/j.cbi.2014.12.015.
- [10] Lee MS, Kim YH, Lee BR, Kwon SH, Moon WJ, Hong KS, et al. Novel antidepressant-like activity of caffeic acid phenethyl ester is mediated by enhanced glucocorticoid receptor function in the hippocampus. *Evid-Based Compl Alt Med.* 2014;doi:10.1155/2014/646039.
- [11] Soroy L, Bagus S, Yongkie IP, Djoko W. The effect of a unique propolis compound (Propoelix™) on clinical outcomes inpatients with dengue hemorrhagic fever. *Infect Drug Resist.* 2014;7:323-9.

- [12] Hsu TH, Chu CC, Hung MW, Lee HJ, Hsu HJ, Chang TC. Caffeic acid phenethyl ester induces E2F-1-mediated growth inhibition and cell-cycle arrest in human cervical cancer cells. *FEBS J.* 2013;280:2581-93.
- [13] Ahad A, Ganai AA, Mujeeb M, Siddiqui WA. Chrysin, an anti-inflammatory molecule, abrogates renal dysfunction in type 2 diabetic rats. *Toxicol Appl Pharm.* 2014;doi:10.1016/j.taap.2014.05.007.
- [14] Teerasripreecha D, Puthong S, Kimura K, Okuyama M, Mori H, Kimura A, et al. In vitro antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:27.
- [15] Ola A. Molecular identification and anticancer activity of alkylphenol from cashew nut shell oil (*Anacardium occidentale*) grown in Timor Island. *Indonesian J Pharm.* 2008;19:137-44.
- [16] Gopalakrishnan S, Nevaditha NT, Mythili CV. Antibacterial activity of azo compounds synthesized from the natural renewable source, cardanol. *J Chem Pharm Res.* 2011;3:490-7.
- [17] Trevisan MT, Pfundstein B, Haubner R, Wurtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H, et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:188-97.
- [18] Suwisith N, Hanucharunkul S, Dodd M, Vorapongsathorn T, Pongthavorakamol K, Asavametha N. Symptom clusters and functional status of women with breast cancer. *Thai Journal of Nursing Research.* 2008;12:153-65.
- [19] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 2001;25:402-8.
- [20] Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Abdelhamed S, Yokoyama S, Athikomkulchai S, Viriyaroj A, et al. Chrysin overcomes TRAIL resistance of cancer cells through Mcl-1 downregulation by inhibiting STAT3 phosphorylation. *Int J Oncol.* 2013;43:329-37.

(ลงชื่อ) จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

(นางสาวจันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 29 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2558