นิพนธ์ต้นฉบับ • Original Article

ผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทพ์ของการดื้อยาในเซลล์มะเร็งชนิด Human Embryonic Kidney Cell Lines

ทรงยศ อนุชปรีดา[1], โกสินทร์ ไม้ประเสริฐ[1], สิงห์คำ ธิมา[1], พรงาม ลิ้มตระกูล[2]
[1]แขนงวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์
[2]ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50200

Effect of Curcuminoids on MDR Phenotype in Human Embryonic Kidney Cell Lines

Songyot Anuchapreeda[1], Kosin Maiprasert[1], Singkome Tima[1], Pornngarm Limtrakul[2]
[1]Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology,
[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

หลักการและเหตุผล: การดื้อต่อยาเคมีบำบัดของเซลล์มะเร็งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้การรักษาโรคมะเร็งไม่ประสบความสำเร็จเนื่องมาจากเซลล์มะเร็งมีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดลดลง ซึ่งมีสาเหตุประการหนึ่งมาจากเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของโปรตีนขับไล่ยาที่ผิวเซลล์มาก เช่น พี-กลัยโคโปรตีน หรือ โปรตีนเอ็มอาร์พี โดยเฉพาะเอ็มอาร์พี 1 (MRP1) ซึ่งสนใจที่นำมาศึกษาในการทดลองนี้ การศึกษานี้ได้นำสารเคอร์คิวมินอยด์บริสุทธิ์จากขมิ้นชัน (เคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายมาทดสอบเพื่อใช้เป็นตัวปรับเปลี่ยนการทำงานของโปรตีนดื้อยาชนิด multidrug resistance associated protein (MRP1/MDR modulator) ในการทำให้เซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด มีการตอบสนองต่อยาที่มากขึ้น

วัตถุประสงค์: เพื่อทดสอบผลของเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดต่อการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทพ์ของการดื้อยาในเซลล์มะเร็งชนิด HEK293pcDNA3.1MRP1 ที่ดื้อยาอิโธโปไซด์วีพี 16 (Etoposide VP16) ซึ่งมีการแสดงออกของ MRP1 ที่สูง เปรียบเทียบกับเซลล์ชนิด HEK293pcDNA3.1 ที่ไวต่อยา ซึ่งไม่มีการแสดงออกของโปรตีน MRP1

วิธีการทดลอง: ในการศึกษานี้ได้นำ เคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน มาศึกษาผลต่อ

Background: Resistance to chemotherapy chemicals is a major obstacle to sucessful treatment of cancer. Out of the mechanism of drug resistance is characterized by the overexpression of drug transporters on plasma membrane such as P-glycoprotein (Pgp), multidrug resistance associated protein (MRP), especially MRP1. Curcuminoids (curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin) were reportedly used to reverse multidrug resistance phenotype and increase chemotherapeutic sensitivity in cancer cells.

Aim: To investigate the effect of three curcuminoids on cell cytotoxicity and MDR phenotype in HEK293pc DNA3.1 MRP1 cell line (drug resistance cell line) and HEK293pc DNA3.1 cell line (parental drug sensitive cell line).

Methods: Curcuminoids were examined for the effect on MDR phenotypes of the cells by cytotoxicity assay with MTT method. Treatments of cell lines with non-toxic dose (10 μM) of curcuminoids in combination with varying doses of etoposide VP16 (0-200 μM) for 72 hr were analysed.

Results: Curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin exhibited cytotoxic activity on HEK293pc DNA3.1 MRP1 cell line with IC_{50} of 62.5, 68.7, and 56.3 μM, respectively. HEK293pc DNA3.1 showed IC_{50} of 53.1, 56.2, and 50 μM, respectively. At non-toxic dose of

การเปลี่ยนแปลงฟีโนไทพ์ โดยวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK293pcDNA3.1MRP1 และ HEK293pcDNA3.1 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (10 μM) มาทดสอบร่วมกับยาอิโธโปไซด์ วีพี 16 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-200 μM เป็นระยะเวลา 72 ชม. โดยวิธี MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)

ผลการวิจัย: จากการศึกษาความเป็นพิษ ด้วยวิธี MTT พบว่า เคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK293pcDNA3.1MRP1 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 62.5, 68.7 และ 56.3 μM ตามลำดับ ส่วน HEK293pcDNA3.1 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 53.1, 56.2 และ 50 μM ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิดต่อการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทพ์ในการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด พบว่า บีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินมีผลทำให้เซลล์ HEK293pc DNA3.1MRP1 มีความไวต่อยาเพิ่มขึ้นมากที่สุด รองลงมาคือ เคอร์คิวมิน และดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน ตามลำดับ

สรุป: บีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน เป็นเคอร์คิวมินอยด์ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทพ์ของเซลล์ HEK293pcDNA3.1MRP1 ทำให้มีความไวต่อยาเคมีบำบัดเพิ่มขึ้นในอนาคตน่าจะสามารถนำเอาเคอร์คิวมินอยด์นี้มาใช้ร่วมกับการรักษาด้วยเคมีบำบัด เพื่อทำให้ผู้ป่วยมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดมากขึ้น

bisdemethoxycurcumin exhibited the highest effect on MDR phenotype, followed by curcumin and demethoxycurcumin, respectively.

Conclusion: Bisdemethoxycurcumin was an excellent MDR phenotype reversing which increased drug sensitivity in drug resistance cell line (HEK293pcDNA3.1MRP1 cell line). This finding shows the possibility of using curcuminoids as an MDR modulator in cancer patients however further experiments needs to be studied to achieve this goal.

Keywords: Curcuminoids effect, MDR phenotype, Human embryonic, kidney cell lines.

ศรีนครินทร์เวชสาร 2550; 22(4): 425-33 • Srinagarind Med J 2007; 22(4): 425-33

บทนำ

การใช้ยาเคมีบำบัด (chemotherapy) มีบทบาทสำคัญมากในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะในปัจจุบัน ได้มีการพัฒนายาเคมีบำบัดให้มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งได้ดียิ่งขึ้น แต่ปัญหาที่สำคัญที่ทำให้การรักษาด้วยเคมีบำบัดไม่ประสบความสำเร็จ และไม่มีประสิทธิภาพ นั่นก็คือ เซลล์มะเร็งเกิดการดื้อยาหลังจากได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดไปในระยะหนึ่ง ซึ่งเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาจะมีลักษณะที่สำคัญประการหนึ่งคือ มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ที่มาก ส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีอัตราการอยู่รอดสูง ทั้งๆ ที่ได้รับยาเคมีบำบัด ซึ่งสามารถพบได้ในเซลล์มะเร็งหลายๆ ชนิด โดยลักษณะการเกิดการดื้อยานั้น ระยะแรกจะมีการดื้อยาเฉพาะในเซลล์มะเร็งบางเซลล์ที่ไม่มีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด และเมื่อเซลล์ที่ดื้อยามีการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนทำให้เซลล์มะเร็งดั้งเดิมกลายเป็นเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาส่งผลให้การรักษาผู้ป่วยมะเร็งด้วยเคมีบำบัดไม่ประสบความสำเร็จตามที่คาดหวังไว้ เซลล์ที่มีลักษณะของการดื้อยาจะมีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งยาออก (drug transporter protein) ที่บริเวณผิวเซลล์ (plasma membrane) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะทำหน้าที่ในการขับยาออกนอกเซลล์ ส่งผลให้การสะสมของยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งลดลงทำให้เกิดลักษณะของการดื้อยาเกิดขึ้น โปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งยาออกมี 3 ชนิดซึ่งเป็นที่น่าสนใจในปัจจุบันคือ Permeability related glycoprotein (Pgp) multidrug resistance associated protein (MRP) และ lung resistance protein (LRP)

MRP เป็นโปรตีนตัวหนึ่งที่เกี่ยวข้องในกลไกการดื้อยาหลายขนานของเซลล์มะเร็ง ถูกสร้างมาจากยีน MRP1 ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 16 (16p13.1) MRP อยู่ในกลุ่มของ ATP-binding cassette superfamily (ABC superfamily) มีโครงสร้างทางโมเลกุล ประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีน ที่แทรกอยู่ในผิวเซลล์จำนวน 18 หน่วย (18 transmembranes) และมีบริเวณของ ATP binding site ที่มี ATP มาจับอย่างจำเพาะเพื่อให้พลังงานกับโปรตีนในการขับยาออกนอกเซลล์ และยังสามารถ

จำแนก MRP ได้ 7 ชนิดด้วยกัน ซึ่งมีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน (homologues) ได้แก่ MRP1, MRP2 / cMOAT, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6 และ MRP7 บนผิวเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน MRP จะทำหน้าที่เป็นตัวขับยา หรือสารพิษ (cytotoxic agent) ที่เข้าสู่เซลล์ ให้ออกนอกเซลล์ (drug efflux pump) ทำให้เซลล์มีการสะสมของยาลดลง

กลไกการทำงานของโปรตีน MRP มีความแตกต่างจาก Pgp ตรงที่ MRP ทำหน้าที่เป็น glutathione (GSH) S-conjugates efflux pump (GS-Xpump) เนื่องจากการขับยาออกนอกเซลล์จำเป็นต้องอาศัยการคอนจูเกตกับ glutathione ก่อน จึงสามารถทำการขนส่งยาออกจากเซลล์ได้ แต่อย่างไรก็ตามกลไกของ glutathione (GSH) ที่เกี่ยวข้องในระบบของการขนส่งยาโดย MRP1 ยังไม่มีความชัดเจน แต่มีข้อสันนิษฐานที่อาจเป็นไปได้เกี่ยวกับกลไกการขนส่งยาออกนอกเซลล์อยู่หลายข้อด้วยกัน เช่น 1) GSH ไปรวมตัวกับสาร cation เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่สามารถขนส่งออกจากเซลล์ได้ง่าย 2) GSH อาจจะทำหน้าที่เป็น co-transporter กับ cationic pump ที่คอยขับยาออกนอกเซลล์

สารประกอบหลายชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งยา (drug transporter protein) ซึ่งจะไปเพิ่มประสิทธิภาพของการสะสมของยาเคมีบำบัดภายในเซลล์ให้มากขึ้นทำให้เกิดความเป็นพิษของยาเคมีบำบัดภายในเซลล์ (cytotoxicity) เพิ่มขึ้น ในการบำบัดรักษาด้วยเคมีบำบัดเพื่อลดการดื้อยาในเซลล์มะเร็งนั้น สารที่สามารถปรับเปลี่ยนลักษณะการดื้อยามีประโยชน์มากต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัด โดยสารเหล่านี้จะไปรบกวนการทำงานและหน้าที่ของโปรตีนขนส่งยา สารบางชนิดที่เป็น ตัวปรับเปลี่ยนฟีโนไทพ์ของการดื้อยา (MDR modulator) สามารถนำมาใช้ในทางคลินิกได้ แต่ MDR modulator ที่ใช้ในปัจจุบันเป็นสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น สารเหล่านี้เมื่อให้กับผู้ป่วยมะเร็งแล้วพบว่าอาจจะเกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วยมะเร็งได้สูงมาก ดังนั้นในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์หรือนักวิจัยได้พยายามที่จะหา MDR modulator ที่ได้จากธรรมชาติ ที่มีผลข้างเคียงน้อยหรือไม่มีผลข้างเคียงกับผู้ป่วย ซึ่งพบว่าพืชสมุนไพรบางชนิดสามารถนำมาใช้เป็น MDR modulator ทดแทนยา (MDR reversing agent) ที่สังเคราะห์ขึ้นมา เพื่อลดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับยาที่สังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมี มีรายงานการวิจัยว่าสารเคอร์คิวมินอยด์ ที่ได้มาจากขมิ้นชันซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่เป็นที่รู้จักกันมาแต่โบราณ มีคุณสมบัติเป็น MDR modulator หรือที่เรียกว่าเป็นตัวปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของการดื้อยาในเซลล์มะเร็ง สามารถปรับเปลี่ยนลักษณะการดื้อยาที่เกิดจากโปรตีนชนิด Pgp ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่ดื้อยาวินบลาสตีน(KB-V1)[1,2]

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* linn) เป็นพืชที่อยู่ในตระกูล Zingiberaceae เป็นพืชสมุนไพร นิยมนำส่วนของเหง้ามาใช้ประโยชน์ ซึ่งหลายๆ ประเทศในเอเชียใช้กันอย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นใช้ในการประกอบอาหาร, เป็นเครื่องสำอาง หรือใช้ในทางการแพทย์ การศึกษาสารออกฤทธิ์ที่สำคัญจากเหง้าของขมิ้นชันพบว่า เคอร์คิวมินอยด์ ซึ่งเป็นสารประเภท phenolic compound ที่มีสีเหลือง เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น free radical scavenger[3], antioxidant[4], anti-inflammation[5] และ anticancer[6] เหง้าของขมิ้นชันประกอบด้วย สารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ เป็นสารที่ออกฤทธิ์หลักและเคอร์คิวมินอยด์ยังประกอบด้วยสาร 3 ชนิดคือ เคอร์คิวมิน (curcumin), ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน (demethoxy-curcumin) และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน (bisdemethoxycur-cumin)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของนักวิจัยหลายท่านเกี่ยวกับผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อเซลล์มะเร็ง ได้แสดงให้เห็นว่าเคอร์คิวมินอยด์สามารถปรับเปลี่ยนลักษณะการแสดงออกของยีน *MDR1* ในเซลล์มะเร็งชนิด KB-V1ได้ โดยเฉพาะบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน สามารถปรับเปลี่ยนลักษณะการแสดงออกของยีน *MDR1* ในเซลล์มะเร็งชนิด KB-V1[7] และเคอร์คิวมินอยด์เป็นสารที่สามารถไปยับยั้งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวในเซลล์มะเร็งหลายชนิด[8]

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีความสนใจเกี่ยวกับผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อเซลล์มะเร็งที่มีการดื้อยา โดยได้ตั้งสมมุติฐานไว้ว่า เคอร์คิวมินอยด์น่าจะไปมีผลในการปรับเปลี่ยนลักษณะการแสดงออกของการดื้อยา (MDR phenotype) ในเซลล์มะเร็งที่มีโปรตีนขับไล่ยาชนิด MRP อยู่บนผิวเซลล์ได้เช่นเดียวกันกับโปรตีนขับไล่ยาชนิด Pgp ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ และยังสามารถบอกได้ว่าเคอร์คิวมินอยด์ชนิดใดให้ผลดีที่สุดในการปรับเปลี่ยนฟีโนไทพ์ของการดื้อยาในเซลล์ มะเร็งชนิด HEK293pcDNA 3.1 MRP1

วิธีการทดลอง

การสกัดแยกเคอร์คิวมินอยด์

เคอร์คิวมินอยด์ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เตรียมโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี และตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดยใช้ TLC และ HPLC[2]

เซลล์ที่ใช้สำหรับการทดลอง

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาเป็นเซลล์ Human Embryonic Kidney cell (HEK293 cell lines) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ 1) HEK293pc DNA3.1 cell line เป็นเซลล์ HEK293 cell lines ที่มีการใส่เฉพาะ vector เปล่า (pcDNA3.1) เข้าไปในเซลล์ เป็นเซลล์ที่มีความไว

ต่อยาอิโธโปซายด์วีพี16 (parental drug sensitive cell line) และ 2) HEK293pcDNA3.1MRP1 cell line เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง HEK293 ที่มีการใส่ vector ที่บรรจุยีน MRP1 อยู่ภายใน เข้าไปในเซลล์ทำให้เซลล์มีลักษณะของการดื้อต่อยาอิโธโปซายด์วีพี 16 โดยเซลล์ทั้ง 2 นี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Michael Gottesman (National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA) โดยเซลล์ดื้อยานั้นทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี etoposide ความเข้มข้น 50 μM

การเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293 cell lines

เซลล์ HEK293 ทั้ง 2 ชนิด คือ HEK293pcDNA 3.1 และ HEK293pcDNA 3.1 MRP1 cell lines สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีส่วนผสมของ fetal calf serum (FCS) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10, Penicillin-Streptomycin ที่ความเข้มข้น 100 units/mL และ 100 μg/mL เซลล์ HEK293pcDNA 3.1 MRP1 เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี etoposide ความเข้มข้น 50 μM เลี้ยงในสภาวะที่มี CO_2 5% อุณหภูมิ 37 ^{o}C

การทดสอบความเป็นพิษของเคอร์คิวมินอยด์ และยาเคมีบำบัดต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษของเคอร์คิวมินอยด์และยาเคมีบำบัดชนิดอิโธโปซายด์วีพี16 (etoposide VP16) ต่อ HEK293 cell lines ทั้ง 2 ชนิด ที่ไวต่อยาและที่ดื้อต่อยา ทำการทดสอบโดยใช้วิธี MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-5 diphenyltetrazolium bromide] มีหลักการคือ สาร MTT dye (สีเหลือง) ทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ succinate dehydrogenase ที่อยู่ภายในไมโตรคอนเดรียของเซลล์ จะเกิดเป็นผลึก formazan (สีม่วง) ไม่ละลายน้ำ แล้วทำการละลายผลึก formazan ด้วย DMSO นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 และ 630 นาโนเมตร ด้วย เครื่อง ELISA reader โดยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่าการดูดกลืนแสง

การศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดต่อการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทพ์ของการดื้อยา (MDR phenotype) ในเซลล์ ชนิด HEK293 cell lines

การศึกษาและทดสอบผลของของ เคอร์คิวมิน, ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน ต่อการเปลี่ยนแปลง ฟีโนไทพ์ของการดื้อยา ใน HEK293 cell line ในชนิดที่ดื้อยา เปรียบเทียบกับ ชนิด parental drug sensitive cell line โดยใช้วิธี MTT โดยการทดลองจะเป็นการทดสอบ ยาอิโธโปซายด์วีพี16 ร่วมกับ เคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดโดยใช้เคอร์คิวมินอยด์ ที่มีความเข้มข้นในช่วง IC_{20} ซึ่งจะใช้ความเข้มข้นของเคอร์คิวมินอยด์ที่ 10 μM และกระจายความเข้มข้นของยาให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.31, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 μM และใช้ MK571 ((E)-3-[[[3-[2-(7-Chloro-2-quinolinyl)ethenyl]phenyl]-[[3-dimethylamino)-3-oxopropyl]thio] methyl]thio]-propanoic Acid) เป็นยาที่มีคุณสมบัติในการปรับเปลี่ยนฟีโนไทพ์การดื้อยา สำหรับโปรตีนขับยาชนิด MRP1 หรือที่เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า MRP1 reversing agent มักใช้เพื่อเป็น positive control และการทดลองที่มีเฉพาะยาอิโธโปซายด์วีพี 16 เป็น drug control

การเปรียบเทียบผลการทดลองทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้อยู่ในรูป mean ± standard deviation (SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการเปรียบเทียบข้อมูลผลการทดสอบเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิดร่วมกับยาอิโธโปซายด์วีพี 16 กับยาอิโธโปซายด์วีพี 16 ที่ใช้เป็น drug control ทั้งในเซลล์ HEK293pcDNA 3.1 และ HEK293pcDNA 3.1 MRP1 cell lines โดยใช้สถิติแบบ one-way ANOVA analysis of variance ค่าความแตกต่างทางสถิติ แสดงค่าความเชื่อมั่นที่ 95% หรือ $p<0.05$

ผลการทดลอง

1. การทดสอบความเป็นพิษของเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิด และอิโธโปซายด์วีพี 16 ต่อ HEK293 cell lines

เมื่อทดสอบความเป็นพิษของเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0 - 250 μM ต่อ HEK293pcDNA 3.1 และ HEK293pcDNA 3.1MRP1 cell lines โดยวิธี MTT พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเคอร์คิวมินอยด์ เพิ่มขึ้น มีผล ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง แสดงให้เห็นว่าเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK293pcDNA 3.1 และ HEK293pcDNA 3.1 MRP1 cell lines พบว่าเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้ง ที่ไวต่อยา และ ดื้อต่อยา จากการทดลองเมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ที่ได้พบว่า บีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน มีความเป็นพิษมากที่สุด รองลงมาคือ เคอร์คิวมิน และดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำค่า IC_{50} วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่า เซลล์ HEK293pcDNA3.1จะมีความไวต่อยาอิโธโปซายด์วีพี16 มากกว่าเซลล์ HEK293pcDNA3.1MRP1โดยสังเกตได้จากค่า IC_{50} ของเซลล์ HEK293pcDNA3.1 ที่มีค่าน้อยกว่าค่า IC50 ของเซลล์ HEK293pcDNA3.1MRP1 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ HEK293pc DNA3.1เป็นเซลล์ที่ไม่มีลักษณะการดื้อยาแต่เซลล์ HEK293pc DNA3.1MRP1 เป็นเซลล์ที่มีการดื้อยาจริง (รูปที่ 1, 2 และตารางที่ 1) นอกจากนี้เราจะใช้ค่าที่อยู่ในช่วง IC_{20} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โดยเซลล์ยังมีชีวิตรอด

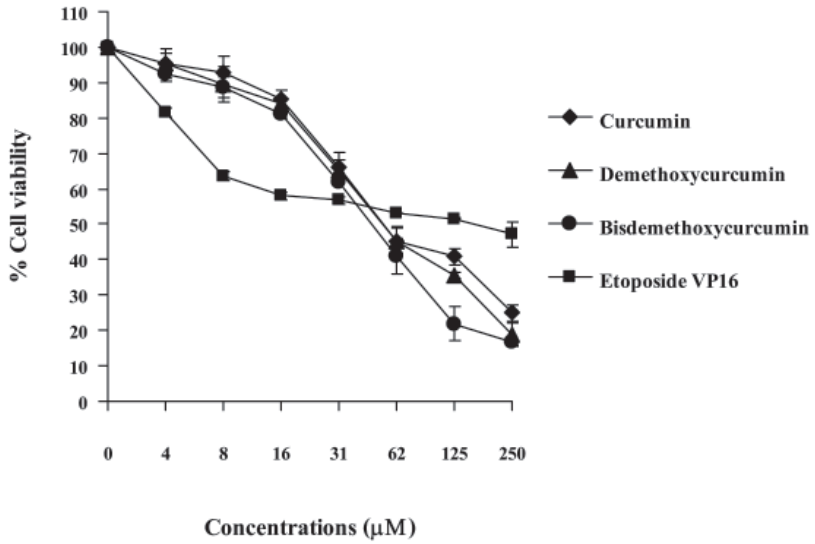
ตารางที่ 1 ค่า IC_{50} จากการทดสอบความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งชนิด HEK293pcDNA3.1 (parental drug sensitive cell line) และ HEK293pcDNA3.1 MRP1 (drug resistance) ด้วยเคอร์คิวมินอยด์ 3 ชนิด และ ยาอิโธโปซายด์วีพี 16

สารที่ใช้ทดสอบ	ค่า IC_{50} (μM) ของเซลล์ HEK293pcDNA3.1	ค่า IC_{50} (μM) ของเซลล์ HEK293pcDNA3.1MRP1
เคอร์คิวมิน	55.2 ± 5.2	60.1 ± 2.3
ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน	57.7 ± 6.0	66.7 ± 10.4
บีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน	50.0 ± 3.6	57.3 ± 5.9
ยาอิโธโปซายด์ วีพี 16	156.2 ± 10.4	234.4 ± 7.8

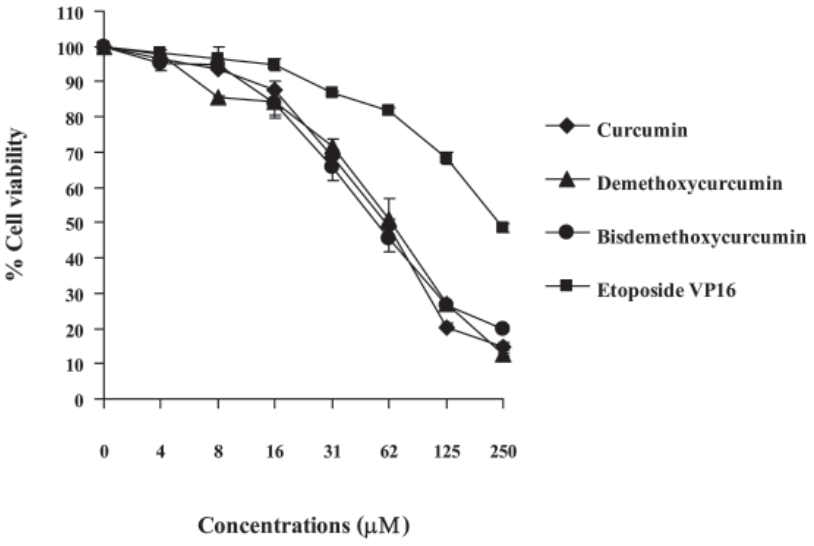
ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} จากการทดสอบผลของเคอร์คิวมินอยด์ 3 ชนิด (ความเข้มข้น IC_{20}: 10 μM) ต่อการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทพ์ (MDR Phenotype) เมื่อทำการทดสอบร่วมกับยาอิโธโปซายด์วีพี 16 ในเซลล์มะเร็งชนิด HEK293pcDNA3.1 (parental drug sensitive cell line) และ HEK293pcDNA3.1MRP1 (drug resistance)

สารที่ใช้ทดสอบ	ค่า IC_{50} (μM) ของเซลล์ HEK293pcDNA3.1	ค่า IC_{50} (μM) ของเซลล์ HEK293pcDNA3.1MRP1
เคอร์คิวมิน + ยาอิโธโปซายด์ วีพี 16	10.8 + 1.8*	41.4 + 6.9*
ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน + ยาอิโธโปซายด์ วีพี 16	27.8 + 8.6*	96.4 + 3.6*
บีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน + ยาอิโธโปซายด์ วีพี 16	5.4 + 0.8*	12.1 + 2.3*
ยาอิโธโปซายด์ วีพี 16	152.1 + 9.0	190.4 + 0.8
MK571 + ยาอิโธโปซายด์ วีพี 16	116.1 + 3.5*	17.6 + 2.5*

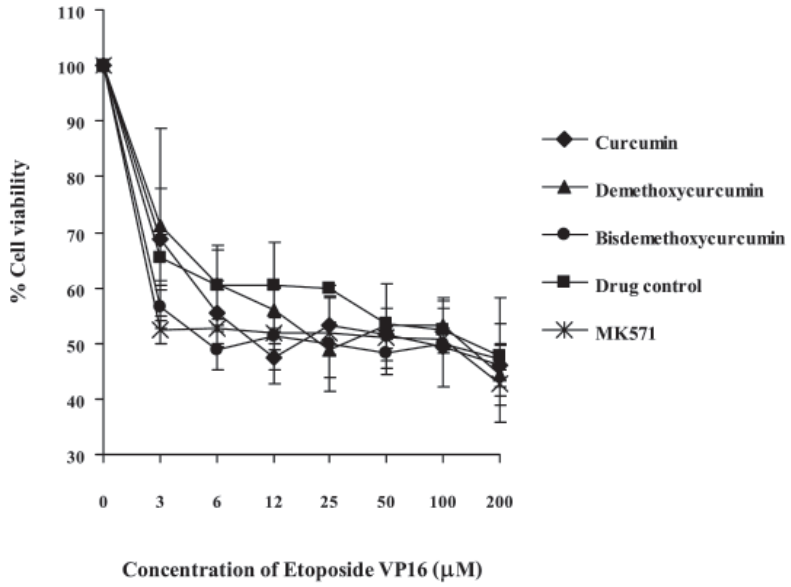
*แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก drug control (etoposide VP 16) ที่ค่าความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)



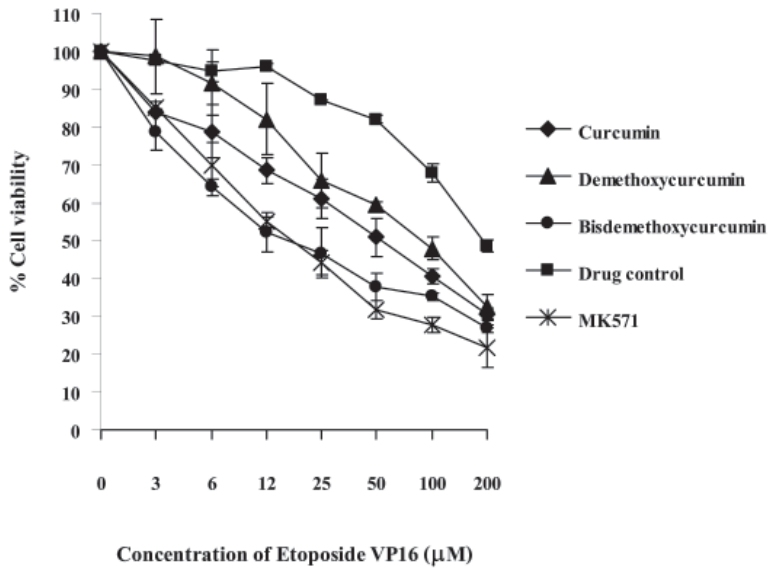
รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละ cell viability กับค่าความเข้มข้นของ เคอร์คิวมิน, ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และยาอิโธโปซายด์วีพี16 ในเซลล์ชนิด HEK293pcDNA3.1 cell line



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละ cell viability กับค่าความเข้มข้นของเคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และ ยาอิโธโปซายด์วีพี16 ในเซลล์ชนิด HEK293pcDNA3.1MRP1 cell line



รูปที่ 3 ผลของเคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน ต่อMDR phenotype ใน HEK293pcDNA3.1 cell line



รูปที่ 4 ผลของเคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน ต่อMDR phenotype ใน HEK293pc DNA3.1 MRP1 cell line

มากกว่าร้อยละ 80 มาเป็นค่าความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการเปลี่ยนแปลงของ MDR phenotype ใน HEK 293 cell line ทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้น 10 μM เพื่อใช้ศึกษา โดยความเข้มข้นนั้นจะต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งทำให้เราพิสูจน์ได้ว่าเซลล์ HEK293 ชนิด drug resistance cell line มีความไวต่อยาเคมีบำบัดเพิ่มขึ้นหรือไม่

การศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทพ์ของการดื้อยา (MDR phenotype) ในเซลล์ ชนิด HEK293 cell lines

จากการศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์ ที่ความเข้มข้น 10 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ผสมรวมกับยาอิโธโปซายด์ วีพี 16 ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μM เพื่อศึกษาดูว่าเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดสามารถไปปรับเปลี่ยนลักษณะการแสดงออกของฟีโนไทพ์ของการดื้อยาในเซลล์ที่ดื้อยาได้หรือไม่ จากการทดลองนี้คาดหวังว่าเคอร์คิวมินอยด์น่าจะมีผลทำให้เซลล์ที่ดื้อยามีความไวต่อยาหรือมีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดเพิ่มขึ้น จากการทดลองใน HEK293pcDNA3.1 cell line เมื่อนำเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 μM ผสมรวมกับยาอิโธโปซายด์ วีพี 16 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าเคอร์คิวมิน ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน มีผลทำให้เซลล์มีความไวต่อยาเพิ่มขึ้น เนื่องจากเคอร์คิวมินอยด์นั้นไปเสริมฤทธิ์กับยาอิโธโปซายด์วีพี 16 ทำให้สามารถทำลายเซลล์ HEK293pcDNA3.1 ได้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสามารถเรียกปรากฏการณ์ที่เกิดนี้ได้ว่า "synergistic effect" ซึ่งพบว่าบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินเสริมฤทธิ์ได้ดีที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.4 μM รองลงมา คือ เคอร์คิวมิน และดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 10.8 และ 27.8 μM ตามลำดับ (รูปที่ 3 และ ตารางที่ 2) ในเซลล์ HEK293/pcDNA3.1MRP1 พบว่าลักษณะของเส้นกราฟของเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดมีการขยับ (shift) มาทางด้านซ้ายอย่างชัดเจนโดยมีเส้นกราฟของยาอิโธโปซายด์วีพี 16 อย่างเดียวและเปรียบเทียบกับ MK571 ซึ่งเป็น positive control แสดงให้เห็นว่า เคอร์คิวมินอยด์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทพ์ของการดื้อยา (MDR phenotype) ทำให้เซลล์ HEK293pcDNA3.1MRP1 มีความไวต่อยาเพิ่มมากขึ้นโดยพบว่าบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินเป็นเคอร์คิวมินอยด์ที่มีผลทำให้เซลล์มีความไวต่อยาเพิ่มขึ้นมากที่สุดรองลงมาคือเคอร์คิวมิน และดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินตามลำดับโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.1, 41.4 และ 96.4 μM โดยคิดเทียบเป็นร้อยละที่ลดลงเท่ากับร้อยละ 93.6, 78.2 และ 49.4 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการใช้ยาอิโธโปซายด์วีพี 16 เพียงอย่างเดียว (IC_{50} เท่ากับ 190.4) (รูปที่ 4 และตารางที่ 2)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดสอบความเป็นพิษของเคอร์คิวมินอยด์ต่อเซลล์ HEK293 cell lines ทั้งชนิด HEK293pcDNA3.1 cell line (parental drug sensitive cell line) และ HEK293pcDNA3.1MRP1

cell line (drug resistance cell line) โดยมียาอิโธโปซายด์วีพี 16 เป็นตัวเปรียบเทียบ เมื่อความเข้มข้นของเคอร์คิวมินอยด์หรือยาอิโธโปซายด์วีพี 16 เพิ่มขึ้นมีผลทำให้เซลล์ HEK293 ทั้งชนิดที่ไวต่อยาและดื้อต่อยา มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง แต่อย่างไรก็ตาม ค่า IC_{50} ของเคอร์คิวมิน, ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินที่ได้ ทั้งในเซลล์ชนิดที่ไวต่อยาและดื้อต่อยา ไม่มีความแตกต่างกัน เช่นเดียวกับการทดสอบ ความเป็นพิษของเคอร์คิวมินอยด์ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ซึ่งผลของเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดนั้นไม่แตกต่างกัน[9] ซึ่งความไม่แตกต่างนี้สามารถอธิบายได้ว่าเคอร์คิวมินอยด์ไม่ได้เป็นสับสเตรทในกลไกการขนส่งยาหรือสารพิษออกโดยโปรตีน MRP จึงไม่มีการคอนจูเกตกับ GSH หรือ glucuronide ก่อนการขับออกนอกเซลล์ แต่เคอร์คิวมินอยด์ไปจับที่บริเวณ drug transporter เท่านั้น ทำให้ยาอิโธโปซายด์วีพี 16 ไม่สามารถถูกขับออกนอกเซลล์ได้ จึงทำให้มีการสะสมยาภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งการศึกษานี้มีผลที่คล้ายกับ Chearwae และคณะ[2] ที่พบว่าเคอร์คิวมินอยด์ไม่ได้เป็นสับสเตรท เช่นเดียวกับที่พบในกลไกการขับยาหรือสารพิษโดยพี-กลัยโคโปรตีน (P-glycoprotein)

จากผลการทดลองที่ศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทพ์ของการดื้อยาในเซลล์มะเร็งชนิด HEK 293 cell line พบว่าเมื่อนำเคอร์คิวมินอยด์ผสมรวมกับยาอิโธโปซายด์วีพี 16 แล้วนำไปทดสอบกับเซลล์ HEK293pcDNA3.1 พบว่าเคอร์คิวมินอยด์มีผลไปเสริมฤทธิ์ให้กับยาอิโธโปซายด์วีพี 16 แล้วมีผลทำให้เซลล์มีการตอบสนองต่อยาอิโธโปซายด์วีพี 16 เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับผลจากของยาอิโธโปซายด์วีพี 16 เพียงอย่างเดียวซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "synergistic effect" เนื่องจากเซลล์ที่เป็น parental drug sensitive cell line นั้น ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน MRP ที่ผิวเซลล์เพื่อทำหน้าที่ขับยาออกนอกเซลล์ และเนื่องจากการทดลองแต่ละการทดลองได้มีชุดควบคุม ซึ่งเป็นทั้ง vehicle control และ drug control (ยาอิโธโปซายด์วีพี 16) อยู่ด้วย พบว่าชุดควบคุมซึ่งเป็น drug control นั้น ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันในการทดสอบความเป็นพิษของเคอร์คิวมินอยด์ และยาอิโธโปซายด์วีพี 16 และเมื่อนำเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดมารวมกับยาอิโธโปซายด์วีพี 16 ทดสอบในเซลล์ชนิดไวต่อยา พบว่ามีการเสริมฤทธิ์กันมีผลทำให้เซลล์ถูกทำลายเพิ่มมากขึ้น ส่วนในเซลล์ชนิด HEK293pcDNA3.1MRP1 cell line ซึ่งดื้อต่อยา เมื่อนำเคอร์คิวนอยด์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 10 μM ผสมรวมกับยาอิโธโปซายด์วีพี 16 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วง 0-200 μM แล้วนำไปทดสอบกับเซลล์พบว่า เซลล์มีความไวต่อยาเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินมีผลทำให้เซลล์ที่ดื้อยามีความไวต่อยาเพิ่มมากที่สุด รองลงมาคือเคอร์คิวมินโดยมีเปอร์เซ็นต์ของการลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เป็น drug control และพบว่าให้ผลที่ดีกว่า MK571 ซึ่งเป็นยา MDR modulator ที่ใช้เป็น positive control ดังนั้นแสดงว่า เคอร์คิวมินอยด์มีผลในการปรับเปลี่ยนลักษณะการแสดงออกของการดื้อยาในเซลล์ที่ดื้อต่อยาทำให้เซลล์มีความไวต่อยาเพิ่มขึ้น โดยการทดลองนี้ให้ผลการทดลองที่แตกต่างจากการศึกษาในเซลล์ KB-V1 ซึ่งพบว่าเคอร์คิวมินเป็นเคอร์คิวมินอยด์ที่ให้ผลที่ดีที่สุดในการปรับเปลี่ยนฟีโนไทพ์ของการดื้อยา ให้มีการตอบสนองต่อการดื้อยาเพิ่มขึ้น[2]

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้ได้นำเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิดคือ เคอร์คิวมิน, ดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมิน ที่มีความบริสุทธิ์สูงถึงร้อยละ 100 ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีมาศึกษาผลต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัดอิโธโปซายด์วีพี 16 ให้มีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดมากขึ้น โดยพบว่าเคอร์คิวมินอยด์ที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถปรับเปลี่ยนลักษณะการแสดงออกของการดื้อยาทำให้เซลล์ HEK293pcDNA3.1MRP1 cell line มีความไวต่อยาเพิ่มขึ้นโดยมีบีสดีเมตทอกซีเคอร์คิวมินให้ผลดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินอยด์สามารถเสริมฤทธิ์ยาอิโธโปซายด์วีพี 16 ทำให้เซลล์HEK293pcDNA3.1 cell line มีความไวต่อยาเพิ่มขึ้นด้วยเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "synergistic effect" ดังนั้นในอนาคตเราอาจจะสามารถนำเคอร์คิวมินอยด์มาใช้เพื่อการรักษาร่วมกับยาเคมีบำบัดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาด้วยเคมีบำบัดเพื่อช่วยลดอัตราการดื้อยาในผู้ป่วยโรคมะเร็งหรือลดผลข้างเคียงจาก MDR modulator สังเคราะห์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันเพื่อให้การรักษาด้วยเคมีบำบัดมีประสิทธิภาพอย่างสูงสุดแก่ผู้ป่วยมะเร็ง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) และทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

1. Anuchapreeda S, Leechanachai P, Smith M, Ambudkar SV, Limtrakul P. Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug resistance human KB cells. Biochem Pharmacol 2002; 64: 573-82.
2. Chearwae W, Anuchapreeda S, Nandigama K, Ambudkar SV, Limtrakul P. Biochemical mechanism of modulation of human

P-glycoprotein (ABCB1) by curcuminI, II, and III purified from Turmeric powder. Biochem Pharmacol 2004; 68: 2043-52.

3. Kunchady E, Rao MAN. Oxygen radical scarvenging activity of curcumin. Int J Phar 1990; 58: 237-40.
4. Selvam R, Subramanian L, Gayathri R, Anyayrkanni N. The antioxidant of turmeric (curcumu longa). J Ethnopharmacol 1995; 47: 59-67.
5. Huang HC, Jan TR, Yeh SF. Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflamatory actions of curcumin and boswillic acid. J Ethopharmacol 1993; 38:113-9.
6. Saudamini KK, Kuttan R. Inhibition of chemical carcinogenesis by curcumin. J Ethopharmacol 1989; 27: 227-33.
7. Anuchapreeda S, Muangmoonchai R, Limtrakul P. Effect of curcuminoids on MDR-1 gene promoter activity in human cervical carcinoma cells. Chiang Mai Med Bull 2002; 41: 189-203.
8. Limtrakul P, Chearwae W, Anuchapreeda S. The effect of curcumin on the proliferation of cancer cell lines. Chiang Mai Med Bull 1999; 38: 55-61.
9. Anuchapreeda S, Sadjapong W, Duangrat C, Limtrakul P. The cytotoxic effect of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin purified from Turmeric powder on leukemic cell lines. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2006; 39: 60-71.