

ฤทธิ์ของอนุพันธ์ชาโลนสังเคราะห์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง

ชนิด SKBR-3

Effect of Synthetic Chalcone Derivatives on Growth Inhibition and Apoptosis

Induction in Breast Cancer Cell Line (SKBR-3)

นุรดีนา จารง^{1*}, วรangkan ชุงลอก², มลติรา พรหมกันท์³ และอภิชาติ สุขสำราญ⁴

Nurdina Charong^{1*}, Warangkana Chunglok², Moltira Promkan³ and Apichart Suksamrarn⁴

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของอนุพันธ์ชาโลนสังเคราะห์ที่ปรับโครงสร้าง 2 ชนิด ได้แก่ 4-methoxychalcone และ 4-chlorochalcone ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและชักนำการตายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด SKBR-3 ด้วยวิธี MTT และ การย้อม DAPI ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าสารสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ SKBR-3 ที่ความเข้มข้น IC_{50} เท่ากับ 18.35 และ 15.93 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อนำเซลล์ SKBR-3 มาบ่มด้วยสารอนุพันธ์ชาโลนสังเคราะห์ทั้ง 2 ที่ความเข้มข้น IC_{50} เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำไปย้อมด้วย DAPI พบว่านิวเคลียสของเซลล์ SKBR-3 มีการหดตัวของโครมาติน และมีการแตกเป็นชิ้นส่วน ซึ่งเป็นลักษณะการตายแบบอะพอพโทซิส จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ชาโลนสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 โดยชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อการศึกษาต่อยอดเชิงลึกต่อไปในการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม

คำสำคัญ: ชาโลน SKBR-3 มะเร็งเต้านม

Abstract

This study aims to examine the effects of synthetic chalcone derivatives including 4-methoxychalcone and 4-chlorochalcone. Their anti-proliferative and anti-apoptotic effects on breast cancer cell line SKBR-3 were investigated by MTT and DAPI staining, respectively. Results from MTT assay indicated that 4-methoxychalcone and 4-chlorochalcone could inhibit the proliferation of SKBR-3 cell in a dose dependent manner with IC_{50} doses of 18.35 μ g/ ml and 15.93 μ g/ ml,

¹ อ.ดร., สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

² ผศ.ดร., สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

³ อ.ดร., ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

⁴ ศ.ดร., ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพมหานคร 10240

¹ Lecturer, Dr., Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80161

² Asst. Prof. Dr., Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80161

³ Lecturer, Dr., Department of Clinical Microscopy, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Nakhon Pathom, 73170

⁴ Prof. Dr., Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, 10240

* Corresponding author: Tel.: 075-672181. E-mail address: nurdina.ch@wu.ac.th

respectively. Incubation of SKBR-3 cell with IC_{50} doses of both synthetic chalcone derivatives for 24 hours was found increasing apoptosis of this cell. In addition, nuclear condensation could be visualized by DAPI staining. These preliminary results suggest that two types of synthetic chalcone derivatives could be candidate compounds for further investigations of anti-breast cancer agent.

Keywords: Chalcone, SKBR-3, Breast Cancer

บทนำ

ประเทศไทยมีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมากเป็นอันดับหนึ่งของกลุ่มโรคมะเร็งในสตรี โดยมีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นจาก 20.5 คน เป็น 30.7 คน ต่อประชากรสตรี 100,000 คนต่อปี [1] การรักษามะเร็งเต้านมในปัจจุบันมีหลายวิธีได้แก่การผ่าตัด การฉายแสง การใช้ยาต้านฮอร์โมน และเคมีบำบัด โดยพบว่า การรักษาในระยะที่ก่อนมะเร็งยังไม่แพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น จะได้ผลดีโดยการผ่าตัดหรือฉายรังสี ส่วนมะเร็งที่มีการแพร่กระจายแล้วจะต้องทำการรักษาด้วยเคมีบำบัด [2] ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรและสารสกัดจากสมุนไพรมาใช้ในการบำบัดรักษาโรคหลายชนิดรวมถึงโรคมะเร็ง มีพัฒนาการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากสมุนไพรโดยตัวทำละลายต่างๆจนได้สารที่บริสุทธิ์ และนำมาทดสอบคุณสมบัติทางเคมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เช่น ฤทธิ์การต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง การต้านการเจริญของแบคทีเรีย รวมถึงการศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง [3] นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์และปรับโครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรต่างๆ เพื่อหาสารต้นแบบที่มีฤทธิ์ดี เพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาในอนาคต ฟลาโวนอยด์เป็นสารที่พบในผัก ผลไม้ ชา หรือไวน์ แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีกเป็น 9 กลุ่มด้วยกัน ได้แก่ flavonols flavones flavanones flavan-3-ols anthocyanidins isoflavones proanthocyanidins aurones และ chalcones [4] การศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่า การรับประทานพืช ผัก ที่มีสารฟลาโวนอยด์สามารถลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ มะเร็งปอด มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งตับอ่อน [5] การศึกษานี้ได้เลือกสารกลุ่มชาโลนมาทดสอบ เนื่องจากพบได้ในพืชหลายชนิด และนอกจากชาโลนสกัดแยกได้จากธรรมชาติแล้ว ยังสังเคราะห์ปรับโครงสร้างเนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีที่ไม่ซับซ้อน สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ง่าย โดยให้มีหมู่แทนที่ได้ที่ตำแหน่งต่างๆกันหลายตำแหน่ง ส่งผลให้สามารถสร้างสารอนุพันธ์ได้หลากหลาย การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารชาโลนสังเคราะห์มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายด้าน เช่น ฤทธิ์ต้านเบาหวาน [6] ฤทธิ์ต้านมะเร็ง [7] ฤทธิ์ต้านภาวะความดันโลหิตสูง [8] ฤทธิ์ต้านการอักเสบ [9] ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [10] และฤทธิ์ต้านมาลาเรีย [11] เป็นต้น สารอนุพันธ์ชาโลน หรือ ชาโลนที่ปรับแต่งโครงสร้างแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย สามารถแสดงฤทธิ์ที่ต่างกัน เช่น chemopreventors หรือ chemosensitizers ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารและชนิดของเซลล์ที่ใช้ทดสอบ [12] การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของอนุพันธ์ชาโลนสังเคราะห์ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ 4-methoxychalcone และ 4-chlorochalcone ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการชักนำการตายในเซลล์มะเร็งเต้านมเฉพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 ซึ่งทั้ง 2 สารสามารถสังเคราะห์ได้ง่าย มีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน มีรายงานการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดเฉพาะเลี้ยงชนิด A549 [13] แต่ยังไม่มียางานฤทธิ์การยับยั้งมะเร็งเต้านม และเนื่องจากเซลล์ SKBR3 เป็นเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีน Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) มาก การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 (HER2 Positive) มีแนวโน้มของความเสี่ยงของโรคมะเร็งเต้านม และมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 25 ถึง 30 เมื่อเทียบกับในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทั้งหมด [14] คณะผู้วิจัยจึงได้ใช้เซลล์ดังกล่าวเป็นเซลล์ตัวแทนในการศึกษาในครั้งนี้ โดยศึกษาฤทธิ์การต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งของอนุพันธ์ชาโลนสังเคราะห์ทั้งสองชนิดด้วยวิธี MTT และติดตามการชักนำการเกิดตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส โดยการย้อมนิวเคลียสของเซลล์ที่ผ่านการบ่มสารด้วยยีส DAPI เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพของอนุพันธ์ชาโลนสังเคราะห์ทั้งสองสารต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเฉพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมอนุพันธ์ชาลโคนสังเคราะห์

ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ชาลโคนที่ใช้ในการศึกษาโดยใช้ปฏิกิริยา Claisen-Schmidt condensation ตามวิธีการที่ได้รายงานมาแล้ว [15] วิธีการสั้นๆ ได้แก่ การนำสาร acetophenone กับ substituted benzaldehyde มาทำปฏิกิริยา โดยมีสารละลาย 50% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในน้ำ และมีเอทานอลเป็นตัวทำละลาย คนส่วนผสมเป็นเวลา 6-10 ชั่วโมง แล้วทำส่วนผสมของปฏิกิริยาให้มีฤทธิ์เป็นกรด กรองของแข็งที่เกิดขึ้น ล้างด้วยน้ำ และตกผลึกสารผลิตภัณฑ์ด้วยเอทานอล-น้ำ ในการสังเคราะห์ 4-methoxychalcone ใช้ acetophenone กับ 4-methoxybenzaldehyde ส่วนการสังเคราะห์ 4-chlorochalcone ใช้ acetophenone กับ 4-chlorobenzaldehyde ชาลโคนทั้งสองชนิดมีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีสอดคล้องกับที่ได้มีรายงานไว้ [16] จากนั้นนำอนุพันธ์ชาลโคนสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิด มาละลายด้วย DMSO นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วย millipore filter ที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน และเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการใช้

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด SKBR-3

เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด SKBR-3 สั่งซื้อจากบริษัท American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM สมบูรณ์ปริมาณ 10 มิลลิลิตร มีส่วนผสมของ 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% penicillin-streptomycin เพาะเลี้ยงไว้ในตู้บ่มที่ปรับสภาวะเป็น 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C จนเมื่อเซลล์เจริญถึงระดับความหนาแน่นร้อยละ 80 จะทำการเก็บเซลล์ด้วยวิธี trypsinization ทำการนับจำนวนโดยการย้อมด้วยสี trypan blue นับจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี และคำนวณปริมาณเซลล์เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3. การหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 ด้วยวิธี MTT assay

เซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ถูกเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุม (96-well plate) ในตู้บ่มที่สภาวะ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และเติมอนุพันธ์ชาลโคนสังเคราะห์ 2 ชนิด ได้แก่ 4-methoxychalcone และ 4-chlorochalcone ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ ใส่หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มต่อในตู้เพาะเลี้ยงอีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารที่ต้องการทดสอบทิ้ง แล้วเติมสาร MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม นำไปบ่มต่อที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดน้ำยา MTT ทิ้ง แล้วเติม DMSO ลงไป หลุมละ 200 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม ดูผสมให้เข้ากันเบาๆ จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำไปคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ ดังสมการ $\% \text{ cell viability} = (O.D \text{ of treated cell} / O.D \text{ of control cell}) \times 100$ และคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

4. การวิเคราะห์การเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 ด้วยวิธี DAPI staining

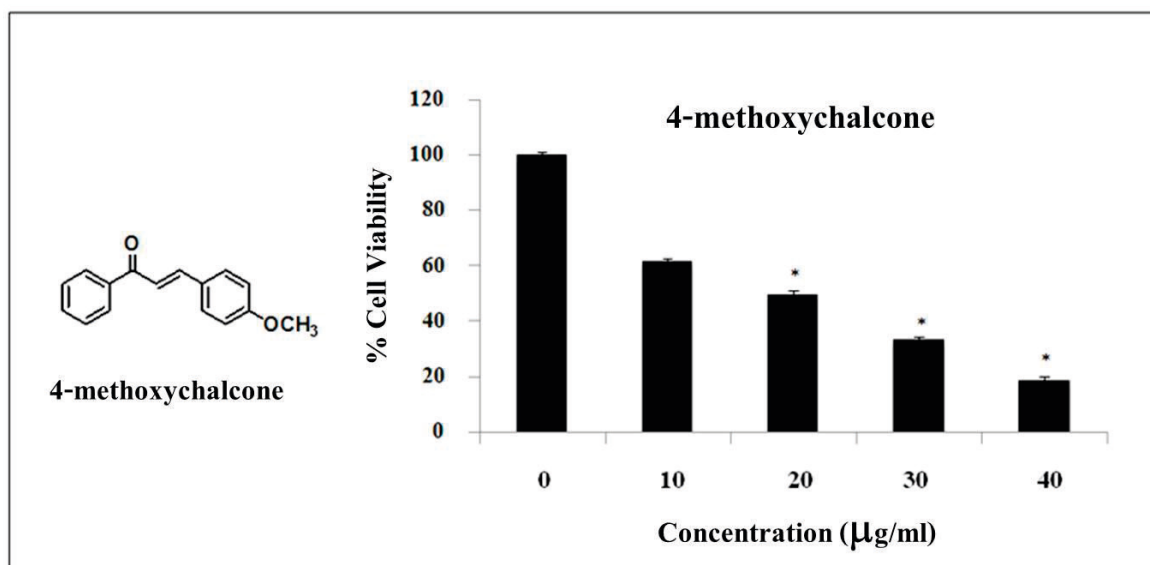
เซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 ปริมาณ 1×10^5 cells ถูกเพาะเลี้ยงบน sterile cover slip ในหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม (6-well plate) และถูกบ่มในตู้บ่มที่สภาวะ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมนุพันธ์ชาลโคนสังเคราะห์ 2 ชนิด ที่ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ หลุมละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ทำการล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ทำการตรึงเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde เตรียมสไลด์แก้ว โดยหยด 80% glycerol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ DAPI ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ เอียงแผ่นสไลด์ให้สารทั้งสองผสมกัน นำ cover slip วางบนแผ่นสไลด์แก้ว แล้วเคลือบด้วยน้ำยาทาเล็บ นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ ที่ความยาวคลื่น 350 nm ศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

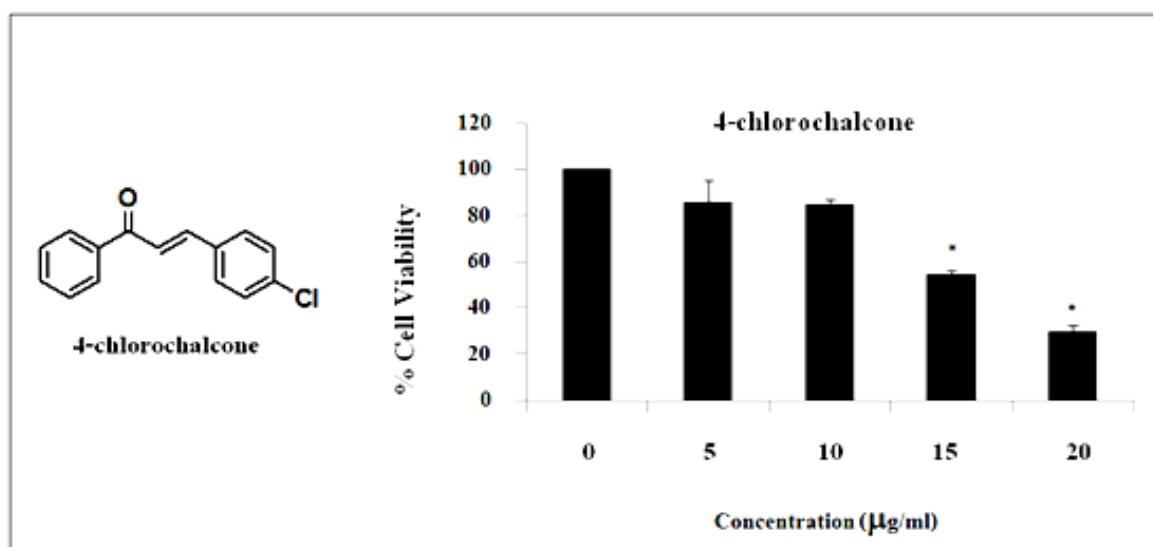
คำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์จากการทดสอบด้วยอนุพันธ์ชาลโคนสังเคราะห์ 2 ชนิด โดยแสดงผลเป็นค่าสถิติแบบ $\text{mean} \pm \text{SD}$ เปรียบเทียบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมโดยใช้สถิติแบบ One-way ANOVA ค่า $p \text{ value} < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

จากการทดสอบฤทธิ์ของอนุพันธ์ชาลโคนสังเคราะห์ 2 ชนิด ได้แก่ 4-methoxychalcone และ 4-chlorochalcone ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 โดยวิธี MTT assay ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ที่ไม่เติมสาร พบว่า 4-methoxychalcone ที่ความเข้มข้น 10 20 30 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ มีร้อยละการเจริญของเซลล์ลดลงในลักษณะแปรผันตรงกับความเข้มข้นที่ใช้ (ภาพที่ 1) การมีชีวิตรอดของเซลล์ SKBR-3 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 (Inhibition Concentration: IC_{50}) เท่ากับ 18.35 $\mu\text{g/ml}$ หรือ 77.01 μM สาร 4-chlorochalcone ที่ความเข้มข้นของสาร 5 10 15 และ 20 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้เช่นกัน (ภาพที่ 2) ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ SKBR-3 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อความเข้มข้นเท่ากับ 15 และ 20 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) โดยค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 15.93 $\mu\text{g/ml}$ หรือ 65.64 μM และพบว่า 4-chlorochalcone มีค่า IC_{50} ต่ำกว่า 4-methoxychalcone (ตารางที่ 1) ความเป็นพิษของ DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายอนุพันธ์ชาลโคนสังเคราะห์ ที่ความเข้มข้น 0 0.25% 0.5% 0.75% และ 1% พบร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง SKBR-3 เท่ากับ 94.61 ± 7.63 89.21 ± 7.94 , 94.24 ± 7.16 , 93.49 ± 3.64 และ 87.43 ± 3.05 ขึ้นันว่าผลดังกล่าวไม่ได้เกิดจาก DMSO



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของอนุพันธ์สังเคราะห์ 4-methoxychalcone และผลทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 ที่บ่มด้วยสารชาลโคนชนิดนี้ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
 หมายเหตุ : *, $p < 0.05$ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ 0 ไม่โครกรัมต่อมิลลิลิตร



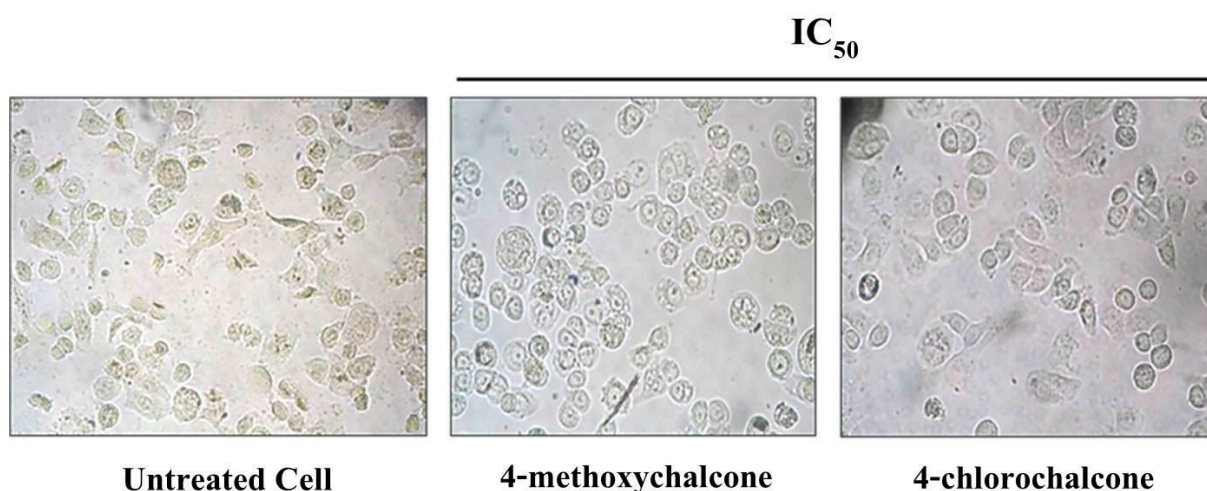
ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างของอนุพันธ์สังเคราะห์ 4-chlorochalcone และผลทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านม เพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 ที่บ่มด้วยสารซาลิโคนชนิดนี้ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
หมายเหตุ : *, $p < 0.05$ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ 0 ไม่โครกรมต่อมิลลิตร

ตารางที่ 1 แสดงค่าความเข้มข้นของอนุพันธ์ซาลิโคนสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิดได้แก่ 4-methoxychalcone และ 4-chlorochalcone ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 ได้ร้อยละ 50 (Inhibition Concentration: IC_{50}) เมื่อผ่านการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

อนุพันธ์สังเคราะห์	Inhibition Concentration: IC_{50}
4-methoxychalcone	18.35 µg/ ml
4-chlorochalcone	15.93 µg/ ml

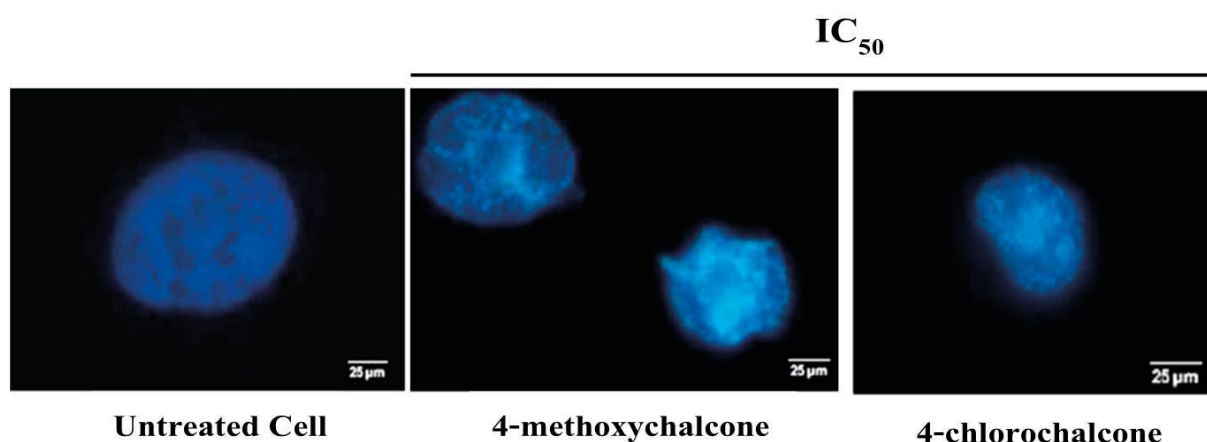
การทดสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสาร 4-methoxychalcone และ 4-chlorochalcone สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ SKBR-3 ได้ มีรายงานการทดสอบสารซาลิโคนกับเซลล์ SKBR-3 เพียงหนึ่งการศึกษาพบว่า Flavokawain A (FKA) ซึ่งเป็นซาลิโคนที่สกัดแยกมาจากพืชควา คาวา สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงหลายชนิดรวมถึง SKBR-3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 10 µM [17] นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า methoxy-chalcone derivatives สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิด A357 ได้ [18] ในขณะที่ 4-chlorochalcone มีรายงานฤทธิ์การลดระดับโคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในซีรัม [19]

การทดสอบฤทธิ์ของอนุพันธ์ซาลิโคนสังเคราะห์ 2 ชนิด ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 พบความเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากผ่านการบ่มด้วยสารทั้ง 2 ชนิด ที่ IC_{50} เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่างและปริมาณ โดยรูปร่างเซลล์เปลี่ยนเป็นลักษณะกลม หดตัวเล็ก ปริมาณเซลล์ที่ติดเกาะกับพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงลดลง และพบเซลล์ที่ตายหลุดลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ฤทธิ์ของอนุพันธ์ชาลโคน 4-methoxychalcone และ 4-chlorochalcone ที่ IC₅₀ ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและลักษณะของเซลล์มะเร็งเต้านมเฉพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 เมื่อผ่านการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated cell) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20X

เมื่อทำการย้อมเซลล์ที่ผ่านการบ่มด้วยอนุพันธ์ชาลโคนสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นที่ IC₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยสี DAPI (DAPI staining) และวิเคราะห์ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์พบว่า เซลล์มะเร็งกลุ่มควบคุมมีลักษณะการติดสีของนิวเคลียสเรียบเสมอกัน เมื่อบ่มด้วยสารทั้ง 2 ชนิดพบว่าการติดสีนิวเคลียสแตกต่างออกไป ตรวจพบการแตกหักของ genomic DNA และการหดแน่นของโครมาติน ดังภาพที่ 4 งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า 4-methoxychalcone สามารถยับยั้งวิถีส่งสัญญาณ Nrf2/ARE ในเซลล์มะเร็งปอดเฉพาะเลี้ยงชนิด A597 ส่งผลให้เซลล์ดังกล่าวมีความไวต่อการรักษาด้วยยา cisplatin โดยชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ดีกว่าการใช้ยา cisplatin เพียงอย่างเดียว [13] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า HER2 สามารถเพิ่มการแสดงออกของ Nrf2 จึงส่งผลให้เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด HER2-positive คือต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด [20] ดังนั้นการศึกษาหาฤทธิ์ของสารที่สามารถลดแสดงออกของ Nrf2 รวมถึงการควบคุมวิถีส่งสัญญาณ Nrf2/ARE จะทำให้สามารถรู้กลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 และเพิ่มประสิทธิภาพยาเคมีบำบัดในการรักษามะเร็งได้



ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์การเกิดอะพอพโทซิส ของเซลล์มะเร็งเต้านมเฉพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 ด้วยวิธี DAPI staining และดูลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (กำลังขยาย 100x)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของอนุพันธ์ชาโลนสังเคราะห์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 โดยอนุพันธ์ชาโลนสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ได้แก่ 4-methoxychalcone และ 4-chlorochalcone สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 และชักนำเซลล์มะเร็งให้ตายแบบอะพอพโทซิสได้ โดยสาร 4-chlorochalcone สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ SKBR-3 ได้ดีกว่าสาร 4-methoxychalcone จึงสรุปในเบื้องต้นได้ว่าอนุพันธ์ชาโลนสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิดอาจเป็นประโยชน์ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 มาก อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสาร 4-methoxychalcone และ 4-chlorochalcone ต่อการแสดงออกของระดับยีน และกลไกระดับโมเลกุลเชิงลึกหรือการเสริมฤทธิ์เมื่อใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็งต่างๆ เพื่อพัฒนาสารดังกล่าวเป็นยาต้านมะเร็งเต้านมต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยวิจัยอนุชีววิทยาและมะเร็ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่สนับสนุนงบประมาณในการดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- [1] Virani, S., Sriplung, H., Rozek, L.S. and Meza, R. (2014). "Escalating burden of breast cancer in southern Thailand: analysis of 1990-2010 incidence and prediction of future trends", **Cancer Epidemiology**. 38, 235-243.
- [2] Jordan, V.C. (2008). "Tamoxifen: Catalyst for the change to targeted therapy", **European Journal of Cancer**. 44, 30-38.
- [3] Lee, C.C. and Houghton, P. (2005). "Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer", **Journal of Ethnopharmacology**. 100, 237-243.
- [4] Mahapatra, D.K., Bharti, S.K. and Asati, V. (2015). "Anti-cancer chalcones: structural and molecular target perspectives", **European Journal of Medical Chemistry**. 98, 69-114.
- [5] Praksah, O., Kumar A. and Kumar P. (2013). "Ajeet, anticancer potential of plants and natural products: a review", **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 6, 104-115.
- [6] Dimmock, J.R., Elias, D. W., Beazely, M. A. and Kandepu, N.M. (1999). "Bioactivities of chalcones", **Current Medicinal Chemistry**. 6, 1125-1149.
- [7] Romagnolo, D.F. and Selmin, O.I. (2012). "Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence", **Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics**. 31, 206-238.
- [8] Detsi, A., Majdalani, M., Kontogiorgis, C.A., Hadjipavlou-Litin, D. and Kefalas P. (2009). "Natural and synthetic 20-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity", **Bioorganic and Medical Chemistry**. 17, 8073-8085.
- [9] Israf, D.A., Khaizurin, T.A., Syahida, A., Lajis, N.H. and Khorizah, S. (2007). "Cardamonin inhibits COX and iNOS expression via inhibition of p65NF-kB nuclear translocation and Ik-B phosphorylation in RAW264.7 macrophage cells", **Molecular Immunology**. 44, 673-679.

- [10] Mishra, L., Sinha, R., Itokawa, H., Bastow, K. F., Tachibana, Y., Nakanishi, Y., et al. (2001). "Anti-HIV and cytotoxic activities of Ru(II)/Ru(III) polypyridyl complexes containing 2,6-(20-Benzimidazolyl) pyridine/chalcone as co-ligand", **Bioorganic and Medical Chemistry**. 9, 1667-1671.
- [11] Chen, M., Brøgger Christensen, S., Zhai, L., Rasmussen, M.H, Theander, T.G., Frøkjær, S., et al. (1997). "The novel oxygenated chalcone, 2,4-Dimethoxy-40-Butoxychalcone, exhibits potent activity against human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* in vitro and rodent Parasites *Plasmodium berghei* and *Plasmodium yoelii* in vivo", **Journal of Infectious Diseases**. 176, 1327-1333.
- [12] Yadav, V.R., Prasad, S., Sung, B. and Aggarwal, B.B. (2011). "The role of chalcones in suppression of NF-kappaB-mediated inflammation and cancer", **International Immunopharmacology**. 11, 295-309.
- [13] Lim, J., Lee, S.H., Cho, S., Lee, I.S., Kang, B.Y. and Choi, H.J. (2013). "4-methoxychalcone enhances cisplatin-induced oxidative stress and cytotoxicity by inhibiting the Nrf2 /ARE-mediated defense mechanism in A549 lung cancer cells", **Molecules and cells**. 36, 340-346.
- [14] Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. and McGuire, W.L. (1987). "Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene", **Science**. 235, 177-182.
- [15] Kunthalert, D., Baothong, S., Khetkam, P., Chokchaisiri, S. and Suksamrarn, A. (2014). "A chalcone with potent inhibiting activity against biofilm formation of nontypeable *Haemophilus influenza*", **Microbiology and Immunology**. 58, 581-589.
- [16] Yadav H.L., Gupta P., Pawar R.S., Singour P.K. and Patil U.K. (2011). "Synthesis and biological evaluation of anti-inflammatory activity of 1,3-diphenyl propenone derivatives", **Medecinal Chemistry Research**. 20, 461-465.
- [17] Jandial, D., Krill, L., Chen, L., Wu, C., Ke, Yu., Xie, Jun., et al. (2017). "Induction of G2M Arrest by Flavokawain A, a Kava Chalcone, Increases the Responsiveness of HER2-Overexpressing Breast Cancer Cells to Herceptin", **Molecules**. 22, 462-475.
- [18] Henmi, K., Hiwatashi, Y., Hikita, E., Toyama, N., and Hirano, T. (2009). "Methoxy- and Fluoro-chalcone Derivatives Arrest Cell Cycle Progression and Induce Apoptosis in Human Melanoma Cell A375", **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 32, 1109-1113.
- [19] Santos, L., Curi Pedrosa, R., Correa, R., Cechinel Filho, V., Nunes, R. J. and Yunes, R. A. (2006). "Biological evaluation of chalcones and analogues as hypolipidemic agents", **Archiv Der Pharmazie**. 339, 541-546.
- [20] Cai-McRae, X. and Karantza V. (2015) "p62: a hub of multiple signaling pathways in HER2-induced mammary tumorigenesis", **Molecular and Cellular Oncology**. 2, e975035.