

ฤทธิ์ของ [6]-shogaol และ demethyl-[6]-shogaol ในการยับยั้งการเจริญและชักนำ การตายของเซลล์มะเร็งเต้านม

Effects of [6]-shogaol and demethyl-[6]-shogaol on Growth Inhibition and Apoptotic Induction in Breast Cancer Cell Lines

นุรดินา จารง^{1*}, อนันต์ อธิพรชัย², มลธิรา พรหมกัน³, กมลชนก เส่งโสด⁴

พงศ์พิสิษฐ์ พระธาตุ⁴, สุตรัก ช่างเรือ⁴ และอภิชาติ สุขสำราญ⁵

Nurdina Charong^{1*}, Anan Athipornchai², Moltira Promkan³, Kamonchanok Sengsod⁴,

Phongphisit Phrathart⁴, Sutrak Changruea⁴ and Apichart Suksamram⁵

บทคัดย่อ

จึงถูกนำมาใช้ในการแพทย์พื้นบ้านสำหรับการรักษาโรคหลายชนิด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบหาฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากขิงได้แก่ [6]-shogaol และ demethyl-[6]-shogaol ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงที่มีและไม่มีโปรตีนตัวรับบนผิวเซลล์ชนิด HER2/neu ได้แก่ SKBR-3 และ MDA-MB-231 ตามลำดับ ด้วยวิธี MTT ผลการทดสอบพบว่า มีเพียงสาร [6]-shogaol เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ SKBR-3 และ MDA-MB-231 ได้ โดยค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 46.37 ไมโครโมลาร์ และ 67.82 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อนำเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดที่ผ่านการบ่มด้วยสารที่ความเข้มข้น IC₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาทำการทดสอบด้วยวิธี DNA fragmentation พบว่ามีการแตกหักของชิ้นดีเอ็นเอ จึงได้สรุปได้ว่าสาร [6]-shogaol มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 และ MDA-MB-231 อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษากลไริระดับขึ้นเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: *Zingiber officinale* มะเร็งเต้านม อะพอพโทซิส

¹ อ.ดร., สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

² อ.ดร., ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

³ อ.ดร., สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

⁴ นักศึกษาปริญญาตรี., สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

⁵ ศ.ดร., ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพฯ 10240

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

² Lecturer, Dr., Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131

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

⁴ Undergraduate Student, Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80161

⁵ 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

Abstract

Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae) has been used in traditional medicine for the treatment of several diseases. The aim of this study was to examine the cytotoxicity effects of bioactive compound and its derivative extracted from *Z. officinale* on HER2/neu-positive (SKBR-3) and negative (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. Cell proliferation of all treated conditions was determined by MTT assay. Results from MTT assay indicated that [6]-shogaol, bioactive compound from *Z. officinale*, had cytotoxicity effect on SKBR-3 and MDA-MB-231 with IC₅₀ doses of 46.37 μ M and 67.82 μ M, respectively while demethyl-[6]-shogaol did not exhibit cytotoxicity toward these cell lines. DNA fragmentation, typically seen in apoptosis, could be detected in SKBR-3 and MDA-MB-231 after incubation with [6]-shogaol at IC₅₀ doses for 24 hours. Taken together, these results suggest that [6]-shogaol harboring anti-proliferative and anti-apoptotic effects against breast cancer cells line SKBR-3 and MDA-MB-231. However, the molecular mechanism of this compound should be further investigated.

Keywords: *Zingiber officinale*, Breast Cancer, Apoptosis

บทนำ

ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยยามะเร็งที่พัฒนาจากพืชสมุนไพรหลากหลายชนิดโดยมุ่งเน้นการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญและการแพร่ของเซลล์มะเร็งรวมถึงส่งผลให้เกิดอาการข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อยควบคู่กับการศึกษาสารที่มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งให้ดียิ่งขึ้นจึง (*Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae) เป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณประโยชน์มากมายนอกเหนือจากการนำมาใช้ประกอบอาหาร การศึกษาวิจัยลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดจากขิง พบว่าประกอบไปด้วยสารที่มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน โดยมี Phenolic Ketones เป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ gingerol shogaol zingerone gingerdiones gingerdiols เป็นต้น [1] มีการรายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารสกัดจากขิงว่ามีฤทธิ์หลากหลาย เช่น ฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด [2] ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ [3] การลดระดับ Fasting Blood Sugar Hemoglobin A1c Apolipoprotein B Apolipoprotein A-I และ Malondialdehyde [4] ลดการอักเสบในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 และลดโอกาสการเกิดพังพืดในตับ [5] รวมทั้งสามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas aeruginosa* ได้ [6] เป็นที่น่าสนใจว่า สารสกัดจากขิงยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเยื่อโพรงมดลูก เซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากโดยชักนำให้เกิดการตายภายในเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส [7] การศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากขิง คือ [6]-shogaol และ Hydroxy-Derivative คือ demethyl-[6]-shogaol ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม 2 ชนิดได้แก่ เซลล์ SKBR-3 และ MDA-MB-231 โดยเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิดนี้มีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนตัวรับบนผิวเซลล์มะเร็งชนิด HER2/neu แตกต่างกัน กล่าวคือ พบการแสดงออกบนผิวเซลล์มะเร็งชนิด SKBR-3 แต่ไม่พบการแสดงออกบน MDA-MB-231 ซึ่งส่งผลต่อการตอบสนองต่อการรักษาด้วยวิธีปัจจุบันที่แตกต่างกัน โดยงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า [6]-shogaol สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการที่เกี่ยวข้อง เช่น การเคลื่อนที่ การรุกราน และความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ในเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 [8-10] และยังพบว่า [6]-shogaol ยับยั้งการรุกรานโดยการลด MMP-9 transcription ผ่านสัญญาณ Nuclear Factor-KB (NF-KB Pathway) [9] สำหรับ demethyl-[6]-shogaol นั้นยังไม่มี การรายงานฤทธิ์การต้านมะเร็ง อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า Hydroxy-Derivative ของสาร Colchicine ที่ได้

จากคองคิง (*Colchicum autumnale*) ที่ผลิตจากกระบวนการ Microbial Transformation ได้แก่ 3-demethyl colchicine มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า Colchicine และส่งเสริมฤทธิ์การต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว และ Solid Tumor [11] ดังนั้นผลการทดลองที่ได้จะทำให้ทราบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากขิง คือ [6]-shogaol และ demethyl-[6]-shogaol มีประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงแตกต่างกันหรือไม่ และยังศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ของสารที่ให้ทดสอบกับความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนตัวรับบนผิวเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมด้วย จากข้อมูลที่มีการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ายังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของสาร [6]-shogaol และ demethyl-[6]-shogaol ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 และ MDA-MD-231 ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้วิธี MTT Assay ในการทดสอบหาความเข้มข้นที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษของสารดังกล่าวต่อการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเมื่อผ่านการบ่มด้วยสารสมุนไพรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดตามการเปลี่ยนแปลงด้านรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดสอบฤทธิ์การชักนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสผ่านการติดตามการแตกหักของสารพันธุกรรม (Apoptotic DNA fragmentation) ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้ถือเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปสู่การศึกษาเพิ่มเติมและการศึกษาในเชิงกลไกเกี่ยวกับฤทธิ์การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมของสารจากขิงต่อไปในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1. การเตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากขิง [6]-shogaol และ demethyl-[6]-shogaol

แยกสาร [6]-shogaol จากเหง้าขิง แล้วนำส่วนหนึ่งมาทำปฏิกิริยา Demethylation โดยใช้ Boron Tribromide ในไดคลอโรมีเทน แล้วทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ demethyl-[6]-shogaol พิสูจน์เอกลักษณ์สารทั้งสองชนิดด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี นำสารทั้งสองชนิดมาเตรียมเป็นสารละลายด้วย DMSO จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วย Millipore Filter ที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอนนำสารละลายไปเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการใช้

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด SKBR-3 และ MDA-MB-231

เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด SKBR-3 และ MDA-MB-231 สั่งซื้อจากบริษัท American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM สมบูรณ์ปริมาณ 10 มิลลิลิตร มีส่วนผสมของ 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) และ 1 % Penicillin-Streptomycin เพาะเลี้ยงไว้ในตู้บ่มที่ปรับสภาพเป็น 5 % CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วันจนเมื่อเซลล์เจริญถึงระดับความหนาแน่นร้อยละ 80 จะทำการเก็บเซลล์ ด้วย 0.25% Trypsin/EDTA ทำการนับจำนวนโดยการย้อมด้วยสี Trypan Blue นับจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี และคำนวณปริมาณเซลล์เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป โดยเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบจะอยู่ระหว่างรุ่นที่ 3-4

3. การหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง SKBR-3 และ MDA-MB-231 ด้วยวิธี MTT Assay

เซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 และ MDA-MB-231 จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ถูกเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุม (96-Well Plate) ในตู้บ่มที่สภาพ 5 % CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และเติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากขิง คือ [6]-shogaol และ demethyl-[6]-shogaol ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ ใส่หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มต่อในตู้เพาะเลี้ยงอีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารที่ต้องการทดสอบทิ้ง แล้วเติมสาร MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม นำไปบ่มต่อที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูค่า MTT ที่แล้วเติม DMSO ลงไป หลุมละ 200 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม ดูค่า MTT ให้เข้ากันเบาๆ จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น

570 นาโนเมตร นำไปคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ ดังสมการ $\% \text{ cell viability} = (\text{O.D of treated cell} / \text{O.D of control cell}) \times 100$ และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

4. การวิเคราะห์การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 และ MDA-MB-231 ด้วยวิธี DNA Fragmentation

เซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง SKBR-3 และ MDA-MB-231 ปริมาณ 1×10^5 cells ถูกเพาะเลี้ยงในจานขนาด 6 หลุม (6-Well Plate) ในตู้บ่มที่สภาวะ 5 % CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำ [6]-shogaol ในอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ IC_{50} หลุมละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ทำการล้างด้วย PBS 2 ครั้ง เก็บเซลล์ด้วยวิธี Trypsinization และนำไปสกัด ดีเอ็นเอ ด้วยชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Vivantis, มาเลเซีย) ดีเอ็นเอที่ได้ถูกแยกด้วย 1.5 % Agarose Gel Electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นย้อม Agarose Gel ด้วย Ethidium Bromide 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ตรวจดูขนาดของดีเอ็นเอบนแผ่น gel ภายใตแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้เครื่อง Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System (Biorad, สหรัฐอเมริกา)

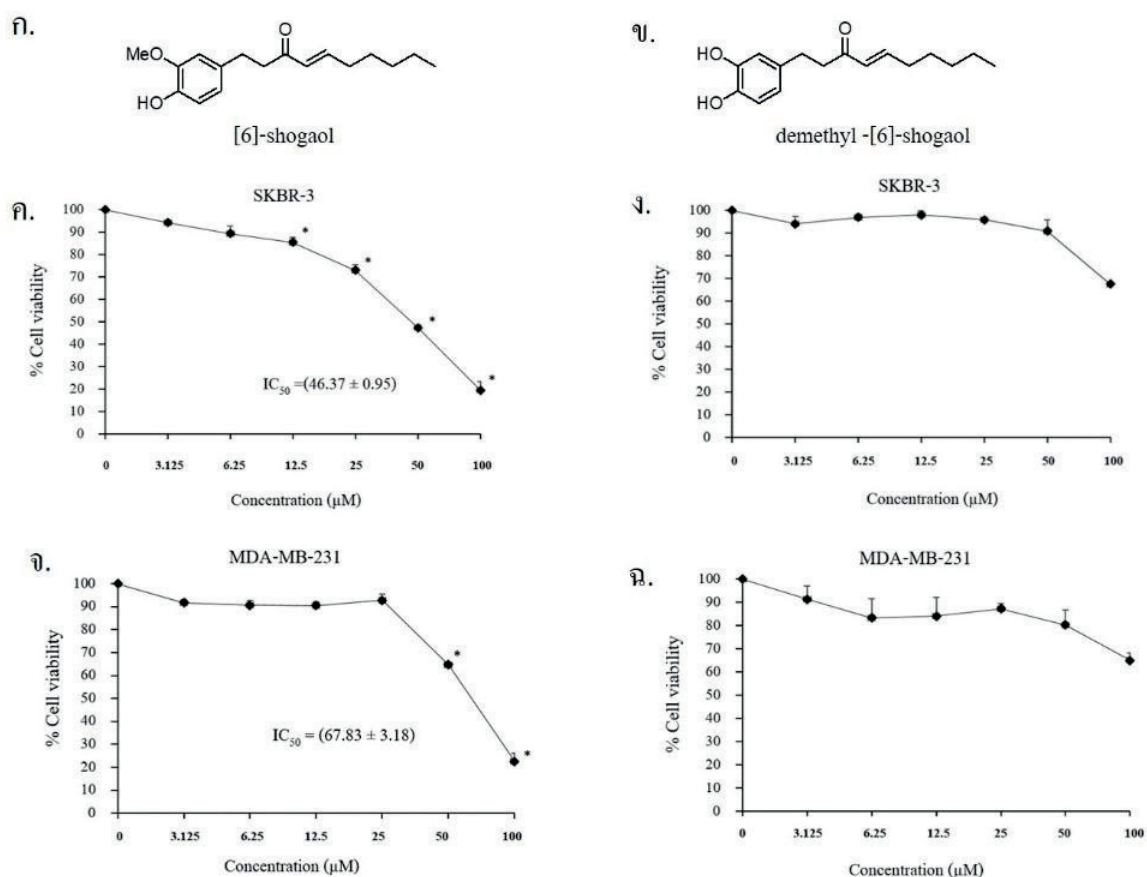
5. การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์จากการทดสอบด้วยสาร สกัดจากขิง โดยแสดงผลเป็นค่าสถิติแบบ mean $\pm$ SD คำนวณค่า IC_{50} โดยโปรแกรม GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., สหรัฐอเมริกา) เปรียบเทียบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมโดยใช้สถิติแบบ One-way ANOVA กำหนดค่า p value < 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

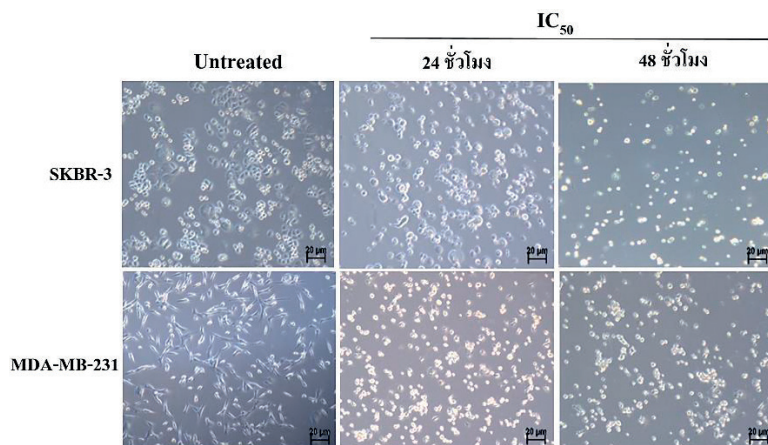
จากการทดสอบหาความเป็นพิษของ DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากขิง คือ [6]-shogaol และ อนุพันธ์ ได้แก่ demethyl-[6]-shogaol ความเข้มข้น ร้อยละ 0.03125 0.0625 0.125 0.25 0.5 และ 1 เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง SKBR-3 เท่ากับ 108.17 ± 4.11 112.62 ± 4.31 112.79 ± 2.38 111.87 ± 1.93 113.73 ± 3.71 และ 96.41 ± 3.47 ตามลำดับ และพบว่า ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง MDA-MB-231 เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 93.96 ± 1.94 90.87 ± 1.60 92.98 ± 6.07 94.89 ± 3.81 91.88 ± 0.67 และ 88.11 ± 2.06 ตามลำดับ ดังนั้นทุกความเข้มข้นของ DMSO ที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่มีผลต่อร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สรุปได้ว่า ความเข้มข้นของ DMSO ที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง SKBR-3 และ MDA-MB-231 เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง SKBR-3 ของสารออกฤทธิ์ [6]-shogaol (ภาพที่ 1ก) โดยวิธี MTT ที่ความเข้มข้น 3.125 6.25 12.5 25 50 และ 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสารควบคุมคือ อาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ที่ไม่ได้เติมสาร (ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 0 μM) พบว่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง (% Cell Viability) เมื่อทำการบ่มเซลล์ด้วยสารเท่ากับ 97.55 ± 2.62 92.74 ± 0.30 103.08 ± 6.22 66.89 ± 1.94 42.44 ± 1.90 และ 18.61 ± 1.18 ตามลำดับ สรุปได้ว่า เซลล์มะเร็งมีร้อยละการมีชีวิตรอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 12.5 25 50 และ 100 μM โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 46.37 μM (ภาพที่ 1ค) เมื่อทดสอบสารกับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง MDA-MB-231 พบว่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ 97.44 ± 2.01 94.81 ± 5.55 93.75 ± 8.93 91.37 ± 3.10 64.68 ± 1.01 และ 22.50 ± 3.63 ตามลำดับ เซลล์มะเร็งมีร้อยละการมีชีวิตรอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 μM โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 67.83 μM (ภาพที่ 1จ) ในขณะที่สาร demethyl-[6]-shogaol (ภาพที่ 1ข) ไม่มี

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิดในทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพที่ 1ง 1ฉ) เมื่อทดสอบเซลล์ทั้งสองชนิดด้วยสารออกฤทธิ์ [6]-shogaol ที่ความเข้มข้นเท่ากับ IC_{50} เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าทั้งสองช่วงเวลานั้น เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงด้านรูปร่างและปริมาณ โดยรูปร่างเซลล์เปลี่ยนเป็นลักษณะกลม เซลล์หดตัวเล็กลง ปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะกับพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงลดน้อยลง และพบเซลล์หลุดลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งที่ไม่ได้ผ่านการบ่มด้วยสารสกัดโดยเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีปริมาณเซลล์ที่เกาะติดกันจานเพาะเลี้ยงน้อยกว่า และมีจำนวนเซลล์ที่หลุดลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นจำนวนมากกว่าเซลล์ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยพบลักษณะดังกล่าวได้ในทั้งสองเซลล์มะเร็งที่ทำการทดสอบ (ภาพที่ 2)

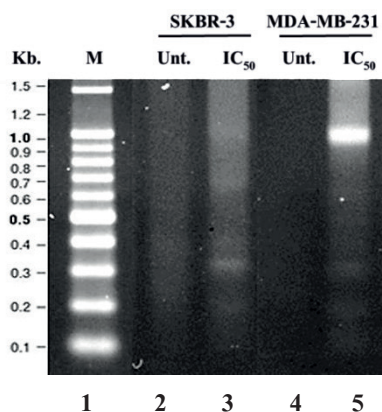


ภาพที่ 1 โครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากขิง [6]-shogaol (ก) และ demethyl-[6]-shogaol (ข) ผลทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง SKBR-3 (ค, ง) และ MDA-MB-231 (จ, ฉ) ที่บ่มด้วยสารที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (*, $p < 0.05$ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

ผู้วิจัยทำการทดสอบหากระบวนการชักนำการตายภายในเซลล์โดยสาร [6]-shogaol เพิ่มเติม ด้วยวิธีการตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA Fragmentation) ในเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง SKBR-3 และ MDA-MB-231 ที่ผ่านการบ่มด้วยสาร [6]-shogaol โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ IC_{50} เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอ แล้วแยกดีเอ็นเอที่ได้ด้วย Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 1 kb Ladder DNA เป็น Marker โดยเปรียบเทียบควบคุมกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ที่ไม่ใส่สาร พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดที่ผ่านการบ่มด้วยสาร [6]-shogaol เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนั้น มีการเปลี่ยนแปลงความยาวให้เห็นอย่างชัดเจน โดยแสดงผล DNA Fragment Length ดังรูปภาพที่ 3



ภาพที่ 2 ฤทธิ์ของสาร [6]-shogaol ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม SKBR-3 และ MDA-MB-231 เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น IC_{50} เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้บ่มด้วยสาร



ภาพที่ 3 การแตกหักของดีเอ็นเอจากการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด SKBR-3 และ MDA-MB-231 เมื่อทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis DNA Fragmentation

การอภิปรายผล

การศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากขิง (*Zingiber officinale*) ระหว่าง [6]-shogaol และ สารอนุพันธ์ ได้แก่ demethyl-[6]-shogaol ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมเฉพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือ SKBR-3 และ MDA-MB-231 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนตัวรับบนผิวเซลล์มะเร็งชนิด HER2/neu ที่แตกต่างกัน ซึ่งโปรตีนดังกล่าวสนับสนุนการเจริญเติบโตของมะเร็งหากมีการผลิตในปริมาณที่มากเกินไป การพบ HER2 Positive ในมะเร็งเต้านมจะส่งผลให้มีแนวโน้มของความรุนแรงของโรคมะเร็ง และตอบสนองต่อการรักษาโดยใช้ฮอร์โมนน้อยลง สำหรับเซลล์มะเร็งเต้านมเฉพาะเลี้ยง SKBR-3 ที่นำมาทดสอบในครั้งนี้เป็นชนิดที่มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 มาก ในขณะที่เซลล์ MDA-MB-231 ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน HER2 บนผิวเซลล์ [12] ผลการทดสอบพบว่าสาร [6]-shogaol มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมเฉพาะเลี้ยงได้ทั้งสองชนิด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด SKBR-3 ได้ดีที่สุด เมื่อผ่านการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนสาร demethyl-[6]-shogaol ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 2 ชนิดในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ เมื่อพิจารณาถึงลักษณะโครงสร้างของสาร พบว่ามีความคล้ายกับสารสกัดบริสุทธิ์จากขิงชนิด Shogaol และให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Kim SM. และคณะ ที่รายงานว่าสารสกัดจากขิง เช่น Shogaol สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการชักนำให้เซลล์มะเร็งเต้านมเฉพาะเลี้ยง MDA-MB-231 ตายแบบอะพอพโทซิสได้ [13] นอกจากนี้ ในปี 2017 Liu CM. และคณะ รายงานว่าสาร Shogaol ที่สกัดได้จากขิงมีฤทธิ์

ยับยั้งการเจริญเติบโต และการชักนำให้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากเพาะเลี้ยงชนิด PC-3 มีการตายแบบอะพอพโทซิสได้เช่นกัน [14] ส่วนสาร demethyl-[6]-shogaol ยังไม่พบการรายงานในเซลล์มะเร็งชนิดใด การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่า การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ [6]-shogaol โดยการแทนที่หมู่ Methyl ด้วย Hydrogen อะตอม ที่ Carbon ตำแหน่งที่ 5 ของ Benzene Ring นั้นไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ [6]-shogaol ได้ ดังนั้นควรเลือกสารที่มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างในตำแหน่งอื่นเพิ่มเติมเพื่อหาสารที่มีประสิทธิภาพต่อไป นอกจากนี้หากพิจารณาถึงความแตกต่างของโปรตีนตัวรับที่แสดงออกบนผิวเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดพบว่าสาร [6]-shogaol สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง SKBR-3 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกโปรตีนตัวรับบนผิวเซลล์มะเร็ง HER2/neu ปริมาณมากได้ดีกว่าเซลล์ MDA-MB-231 ที่ไม่มีโปรตีนตัวรับชนิดนี้ ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2010 ของ Dawood, S. และคณะ ที่รายงานว่าเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของ HER2/neu ปริมาณมาก มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาทราสทูซูแมบได้ดีกว่าชนิดที่ไม่มีโปรตีนตัวรับ HER2/neu [15] ถึงแม้ว่าค่า IC_{50} ของ [6]-shogaol จากการทดสอบครั้งนี้สูงกว่ายาทราสทูซูแมบ แต่ค่า IC_{50} ของ [6]-shogaol ในการยับยั้งเซลล์ SKBR-3 น้อยกว่า เซลล์ MDA-MB-231 ดังนั้นผลการทดสอบนี้จึงอาจนำไปสู่การศึกษาเพิ่มเติมถึงความจำเพาะของ [6]-shogaol กับโปรตีนตัวรับ HER-2 ต่อไป นอกจากนี้เมื่อทำการบ่มเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงด้วย [6]-shogaol ที่ ความเข้มข้น IC_{50} เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าเซลล์มีลักษณะหดเล็กลง และมีเซลล์ลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่เติมสาร แสดงให้เห็นถึงเซลล์มีการตายเพิ่มขึ้นหลังจากบ่มด้วยสาร อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถยืนยันรูปแบบการตายของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้อย่างชัดเจน ทางผู้วิจัยจึงทำการเก็บเซลล์ที่ผ่านการบ่มมาส่งคัดเอนเอ และตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA Fragmentation) ด้วย Agarose Gel ดังในการศึกษาที่ผ่านมาของ Saadat [16] ที่ใช้เทคนิคดังกล่าวในการทดสอบการเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิด NIH/3T3 Fibroblasts ซึ่งสามารถตรวจการตายแบบอะพอพโทซิสในเบื้องต้นได้ จากการทดสอบครั้งนี้พบว่าเซลล์ที่บ่มด้วย [6]-shogaol มีการหดเล็กลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อบ่มด้วยสารที่ความเข้มข้นเท่ากับ IC_{50} และเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA Ladder สันนิษฐานฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งผ่านการชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสของ [6]-shogaol ได้ อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ศึกษาการแสดงออกของระดับ mRNA ของยีนตัวอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ ตลอดจนศึกษาการแสดงออกของระดับโปรตีน หรือทำการทดสอบอื่นเพิ่มเติม เช่น ทดสอบการตายแบบอะพอพโทซิสโดยใช้ DAPI Staining และ/หรือ Flow Cytometry Assay เป็นต้น เพื่อยืนยันถึงผลการทดสอบที่ได้ รวมทั้งศึกษาความสามารถของการเสริมฤทธิ์ของสาร [6]-shogaol ร่วมกับยารักษามะเร็งชนิดอื่นเพื่อลดระดับความเข้มข้นของสาร และประสิทธิภาพของปรับแต่งโครงสร้างอื่นๆ เพิ่มเติม ทั้งนี้เพื่อนำไปสู่การพัฒนาสารดังกล่าวเป็นยารักษามะเร็งได้ในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากขิง [6]-shogaol สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด SKBR-3 และ MDA-MB-231 ได้ดีกว่าสาร demethyl-[6]-shogaol และออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง SKBR-3 ที่มีโปรตีนตัวรับบนผิวเซลล์ HER2/neu ได้ดีกว่า MDA-MB-231 ซึ่งไม่มีโปรตีนตัวรับดังกล่าว โดยผ่านการชักนำการตายแบบอะพอพโทซิส ผลการทดลองในครั้งนี้สามารถนำไปสู่การประยุกต์และพัฒนาสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ในการพัฒนาโรคมะเร็งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- [1] Shukla, Y. and Singh, M. (2007). "Cancer Preventive Properties of Ginger: A Brief Review", **Food and Chemical Toxicology**. 45, 683-690.
- [2] Shih, H.C., Kuo, P.C., Wu, Y.C., Chan Y.Y., Liao, Y.R. and Wu, T.S., et al. (2014). "Synthesis of Analogues of Gingerol and Shogaol, the Active Pungent Principles from the Rhizomes of *Zingiber officinale* and Evaluation of Their Anti-Platelet Aggregation Effects", **International Journal of Molecular Sciences**. 15, 3926-3951.
- [3] Chen, C., Chang, A.Y., Lin, Y.T., Hseu Y.C. and Wang, H.M. (2012). "10-Shogaol an Antioxidant from *Zingiber officinale* for Skin Cell Proliferation and Migration Enhancer", **International Journal of Molecular Sciences**. 13, 1762-77.
- [4] Nafiseh, F.S., Rajab, A., Rahideh, T., Hossein, P. and Taherif, M.M. (2015). "The Effects of Ginger on Fasting Blood Sugar, Hemoglobin A1c, Apolipoprotein B, Apolipoprotein A-I and Malondialdehyde in Type 2 Diabetic Patients", **The Iranian Journal of Pharmaceutical Research**. 14, 131-140.
- [5] Sepide, A.O., Mobasser, M., Attari, V.E. and Payahoo, L. (2013). "Anti-Inflammatory Effects of *Zingiber Officinale* in Type 2 Diabetic Patients", **Advanced Pharmaceutical Bulletin**. 3, 273-276.
- [6] Chakotiya, A.S., Tanwar, A., Narula, A. and Sharma, R.K. (2017). "*Zingiber officinale*: Its Antibacterial Activity on *Pseudomonas aeruginosa* and Mode of Action Evaluated by flow Cytometry", **Microbial Pathogenesis**. 107, 254-260.
- [7] Bernard, M.M., McConnery, J.R. and Hoskin, D.W. (2017). "[10]-Gingerol, A Major Phenolic Constituent of Ginger Root, Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer Cells", **Experimental and Molecular Pathology**. 102, 370-376.
- [8] Lee, H.S., Seo, E.Y., Kang, N.E. and Kim W.K. (2008). "[6]-Gingerol Inhibits Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells", **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 19, 313-319.
- [9] Ling, H., Yang, H., Tan, S.H., Chui, W.K. and Chew, E.H. (2010). "6-Shogaol, An Active Constituent of Ginger, Inhibits Breast Cancer Cell Invasion by Reducing Matrix Metalloproteinase-9 Expression Via Blockade of Nuclear Factor- KB Activation", **British Journal of Pharmacology**. 161, 1763-1777.
- [10] Hong, B.H., Wu, C.H., Yeh, C.T. and Yen, G.C. (2013). "Invadopodia-Associated Proteins Blockade as A Novel Mechanism for 6-Shogaol and Pterostilbene to Reduce Breast Cancer Cell Motility and Invasion", **Molecular Nutrition & Food Research**. 57, 886-895.
- [11] Dubey, K.K., Ray, A.R. and Behera, B.K. (2008). "Production of Demethylated Colchicine Through Microbial Transformation and Scale-Up Process Development", **Process Biochemistry**. 43, 251-257.
- [12] 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.

- [13] Kim, S.M., Kim, C., Bae, H., Lee, J.H., Baek, S.H. and Nam, D., et al. (2015). “[6]-shogaol Exerts Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effects Through the Modulation of STAT3 and MAPKs Signaling Pathways”, **Molecular Carcinogenesis**. 54, 1132-1146.
- [14] Liu, C.M., Kao, C.L., Tseng, Y.T., Lo, Y.C. and Chen, C.Y. (2017). “Ginger Phytochemicals Inhibit Cell Growth and Modulate Drug Resistance Factors in Docetaxel Resistant Prostate Cancer Cell”, **Molecules**. 22, 5-9.
- [15] Dawood, S., Broglio, K., Buzdar, A.U., Hortobagyi, G.N. and Giordano, S.H. (2010). “Prognosis of Women With Metastatic Breast Cancer by HER2 Status and Trastuzumab Treatment: An Institutional-Based Review”, **Journal of Clinical Oncology**. 28, 92-98.
- [16] Saadat, Y.R., Saeidi, N., Vahed, S.Z., Barzegari, A. and Barar, J. (2015). “An update to DNA Ladder Assay for Apoptosis Detection”, **Bioimpacts**. 5, 25–28.