Effect of monoolein on inhibition of tumor growth in cervical cancer xenografts in nude mice

Sudarut Rongpan[1], Therdkiat Trongwongsa[2], Benjamas Wongsatayanon Thanomsub[3], Amporn Jariyapongskul[4*]

[1] Biomedical Science Program, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

[2] Department of Pathology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

[3] Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

[4] Department of Physiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

Abstract

Monoolein (MO), a glycolipid biosurfactant purified from *Exophiala dermatitidis* fungus culture broth was previously demonstrated anti-proliferative activity against cervical cancer cell line. We investigated the effect of monoolein on the implanted tumor growth in nude mice. The cytotoxicity test of monoolein on HeLa cells proliferation was examined by using the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide assay (MTT assay). For *in vivo* study, HeLa cells were implanted subcutaneously into the dorsal of BALB/c-nude mice to form xenograft tumors. Mice were divided into 3 groups; control mice were treated with MO, tumor-bearing mice treated and untreated (HeLa-MO and HeLa-Vehicle group, respectively). The administration of MO was performed by injecting with 200 mg/kg BW/day whereas HeLa-Vehicle group was injected with 0.05% ethanol once daily for 30 days respectively. Tumor size was measured every two days and tumor volume was calculated. Histopathological examination by hematoxyline and eosin staining was performed. The results showed that the proliferation of cultured HeLa cells were significantly inhibited by MO in a dose-dependent manner. The half maximal inhibitory concentration (IC50) was 34.87 ± 1.13 µg/ml. Importantly, MO showed significantly lower tumor development in HeLa-MO group than that in the HeLa-Vehicle group. The histopathological analysis showed that the MO treatment significantly reduced the mitotic figure in HeLa-MO group compared with HeLa-Vehicle group ($p<0.001$). In conclusion, the present study demonstrated that monoolein significantly suppressed the HeLa cell xenograft tumor growth in nude mice model.

Keywords: monoolein, HeLa cell, tumor growth, *in vivo study,* xenograft nude mice model

Corresponding author

Amporn Jariyapongskul

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot university

114 Sukhumvit Road, Sukhumvit 23,

Wattana, Bangkok 10110, Thailand

E-mail: ampornswu@gmail.com

■ บทนำ

ข้อมูลจากสำนักงานวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer, IARC) ขององค์การอนามัยโลก ได้รายงานสถิติของผู้ป่วยมะเร็งทั่วโลกในปี พ.ศ. 2553 พบว่ามีผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ประมาณ 530,000 คนต่อปี ซึ่งประมาณร้อยละ 85 อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา[1,2] และมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูกประมาณ 275,000 คนต่อปี ซึ่งประมาณร้อยละ 88 อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนาเช่นกัน[3] สำหรับในประเทศไทยมะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบเป็นอันดับที่ 2 รองมาจากมะเร็งเต้านมและปัจจุบันยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ ในแต่ละปีมีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ประมาณ 10,000 คน และมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูกประมาณ 5,200 คน หรือประมาณร้อยละ 52[1,2] ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยจำนวนมากที่พยายามหาสารหรือวิธีการในการรักษาโรคมะเร็งหรือชะลอการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็งโดยที่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติหรืออวัยวะที่ใกล้เคียงจุดกำเนิดของมะเร็งน้อยที่สุด ดังนั้น ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่เป็นองค์ประกอบหรือผลิตขึ้นจากสิ่งมีชีวิตต่างๆ มากมาย ทั้งจากพืช สัตว์ รวมทั้งจากจุลินทรีย์ โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อหาสารจากธรรมชาติที่จะรักษาโรคมะเร็งได้และเพื่อพัฒนาเป็นยาที่สามารถใช้ในมนุษย์ได้อย่างปลอดภัย การศึกษาโดย Thanomsub และคณะ (2006) ได้รายงานผลการศึกษาในหลอดทดลองไว้ว่า rhamnolipid ซึ่งเป็นสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ลดแรงตึงผิว (biosurfactant) ตัวหนึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม[4]

การศึกษาโดย Chiewpattanakul P และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สกัดได้จากเชื้อรา *Exophiala dermatitidis* พบว่ามีโครงสร้างทางเคมีเหมือนกับสาร monoolein ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น biosurfactant การศึกษาในหลอดทดลองพบว่าสารดังกล่าว มีฤทธิ์ต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกตายแบบ apoptosis[5-7] ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของสาร monoolein ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกในรูปแบบ *in vivo* ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของสาร monoolein ทั้งในรูปแบบ *in vitro* และ *in vivo* ต่อการเจริญของมะเร็งปากมดลูก

■ วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ monoolein ต่อการเจริญของก้อนเนื้องอกมะเร็งในหนูนูดไมซ์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก

■ วิธีการศึกษา

1. สารเคมีที่ใช้

สาร monoolein (>99% purity; บริษัท Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา) ซึ่งเป็น biosurfactant ที่มีโครงสร้างทางเคมีเหมือนสาร biosurfactant ที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Exophiala dermatitidis,* (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium-bromide, a tetrazole (MTT) ; บริษัท Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา) อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) และ Fetal bovine serum และ Penicillin-streptomycin; บริษัท GIBCO, สหรัฐอเมริกา, เซลล์มะเร็งปากมดลูก Human cervical carcinoma cell lines (HeLa, HPV-18 positive) จาก the American Type Culture Collection (ATTC)

2. การเพาะเลี้ยง HeLa cell (cell culture)

เซลล์ HeLa จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งประกอบด้วย 10% fetal bovine serum และ 1% ของยาปฏิชีวนะ (เพนนิซิลลิน จี (penicillin G) 100 ยูนิต/มล. ผสมกับ สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) 100 มก./มล.) ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

3. การศึกษาฤทธิ์ของ monoolein ต่ออัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ HeLa cell line ในสภาพ *in vitro* (cell proliferation assay)

การวัดอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ ใช้วิธี MTT colorimetric assay โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Mosmann (1983)[8] วิธีการโดยย่อ: นำ HeLa cell ($1x10^4$

cell/well) ปริมาตร 90 ไมโครลิตร มาเพาะเลี้ยงใน 96-well plates เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์เริ่มต้น นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสาร monoolein ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 มก./มล. นำไปบ่มต่ออีก 24 ชม. จากนั้นเติมสาร MTT (ความเข้มข้น 5 มก./มล.) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มต่ออีก 4 ชม. ต่อมาละลายผลึก formazan ด้วยสาร dimethylsulfoxide วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Multiskan, ฟินแลนด์) ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอด (% Cell viability) นำข้อมูลที่ได้มาหาความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของ HeLa cell ได้ 50% (inhibitory concentration ที่ 50%; IC50) Cell viability (%)[9] = (absorbance of drug treated sample/absorbance of untreated sample) x 100

4. การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell inoculation)

การศึกษาครั้งนี้จะใช้หนูนูดไมซ์ (nude mice) เพศผู้น้ำหนักประมาณ 20-22 กรัม อายุ 6-7 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ตำบลศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล (งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการตรวจสอบและได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการควบคุมจริยธรรมในสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; เลขที่ใบอนุญาต 8/2556) หลังจากนั้นทำการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) โดยฉีดเซลล์มะเร็งจำนวน $2x10^7$ cells เข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังด้านขวาของสัตว์ทดลอง[10] หลังจากปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง ชั่งน้ำหนักตัว สังเกตการเกิดก้อนเนื้องอก และวัดขนาดของเนื้องอก แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว กลุ่มที่ 1; กลุ่มควบคุม (Control) ได้แก่ หนูปกติไม่ได้ปลูกถ่ายด้วย HeLa cell แต่ได้รับสาร monoolein 200 มก./กก., กลุ่มที่ 2; กลุ่มหนูที่เป็นมะเร็งโดยการปลูกถ่ายด้วย HeLa cell (HeLa-Vehicle), กลุ่มที่ 3; กลุ่มหนูที่เป็นมะเร็งและได้รับสาร monoolein (HeLa-MO) ฉีดสาร monoolein และ vehicle เมื่อทำการปลูกถ่าย HeLa cell ไปแล้ว 3 สัปดาห์ และมีก้อนเนื้องอกปรากฏขนาดประมาณ 50-100 ลูกบาศก์มิลลิเมตร[11]

5. การเตรียมสาร Monoolein

ในการศึกษานำร่องได้ทำการศึกษาหาความเข้มข้นของ monoolein ที่สามารถลดขนาดก้อนเนื้องอกได้โดยใช้ความเข้มข้นที่ 20, 120 และ 200 มก./กก. น้ำหนักตัว จากการศึกษาพบว่า monoolein ที่ความเข้มข้น 200 มก./กก. มีฤทธิ์ในการลดขนาดของก้อนมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น จึงเลือกใช้สารที่ความเข้มข้น 200 มก./กก. น้ำหนักตัว นำสาร monoolein 200 มก./กก. น้ำหนักตัว มาละลายใน 0.05% ethanol ที่เจือจางด้วย normal saline ฉีดเข้าทางผิวหนังบริเวณรอบก้อนเนื้องอก[12] หนู 2 กลุ่ม ได้แก่ Control และ HeLa-MO ได้รับการฉีดด้วยสาร monoolein เข้าทางใต้ผิวหนังทุกวันเป็นเวลา 28 วัน สำหรับหนูกลุ่ม HeLa-Vehicle ได้รับการฉีดด้วย vehicle (0.05% ethanol) เข้าทางใต้ผิวหนังทุกวันเป็นเวลา 28 วันเช่นกัน

6. การศึกษาการเจริญของก้อนเนื้องอกมะเร็งของหนูนูดไมซ์ (*in vivo* study)

วัดขนาดก้อนเนื้องอกบริเวณที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง ด้วย micro-caliper วันเว้นวัน จากนั้นคำนวณขนาดก้อนเนื้องอก (tumor volume) ร้อยละการโตขึ้นของก้อนเนื้องอก และร้อยละของการยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้องอก (% tumor inhibition) โดยใช้สูตรต่อไปนี้

- Tumor volume (V)[13] = (length x $width^2$)/2
- Tumor inhibition (%)[14] = ((average tumor weight of untreated - average tumor weight of treated)/average tumor weight of untreated) x 100
- ร้อยละการโตขึ้นของก้อนเนื้องอก คำนวณโดยเทียบกับขนาดของก้อนเนื้องอกในวันที่ 0 หลังฉีด vehicle และ MO

7. การศึกษาทางพยาธิวิทยา (Histological study)

ทำการวิเคราะห์การแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) โดยการนับ mitotic figure ในเนื้อเยื่อจากก้อนเนื้องอกมะเร็ง เมื่อสิ้นสุดการศึกษาตัดแยกก้อนเนื้องอกออกจากตัวหนู ตัดแบ่งก้อนเนื้องอกออกเป็น 2 ส่วน นำมาแช่ใน 10% formalin เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาฝังใน paraffin เพื่อทำเป็นบล็อกชิ้นเนื้อ ตัดด้วย microtome ความหนา 5 ไมครอน นำสไลด์ชิ้นเนื้อแช่ใน xylene เพื่อ deparaffin และ hydration ผ่านสไลด์ด้วย 95% alcohol จากนั้นอบสไลด์และย้อมสี Hematoxylin ตามด้วยสี Eosin (H&E) ตามลำดับ พารามิเตอร์ที่ทำการศึกษาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย H&E ได้แก่ การนับเซลล์ที่มีลักษณะ mitotic figure (เป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะการแบ่งตัว, มีนิวเคลียสที่ติดสีเข้มอยู่กลางเซลล์) นับ mitotic figure ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus DP12 microscope digital camera system, ญี่ปุ่น) ที่กำลังขยาย 200 เท่า รายงานผลเป็น mitotic figure (cell/field)[15]

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้นำเสนอเป็นค่า mean±standard error of mean (Mean±SEM) วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบโดยใช้ one-way ANOVA:Post Hoc multiple comparisons และตามด้วย Tukey's analysis โดยกำหนดค่าความน่าจะเป็นที่ $p \leq 0.05$ การวิเคราะห์ผลทางสถิติใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS IBM Singapore Pte Ltd. (Registration No.1975-01566-C).

■ ผลการศึกษา

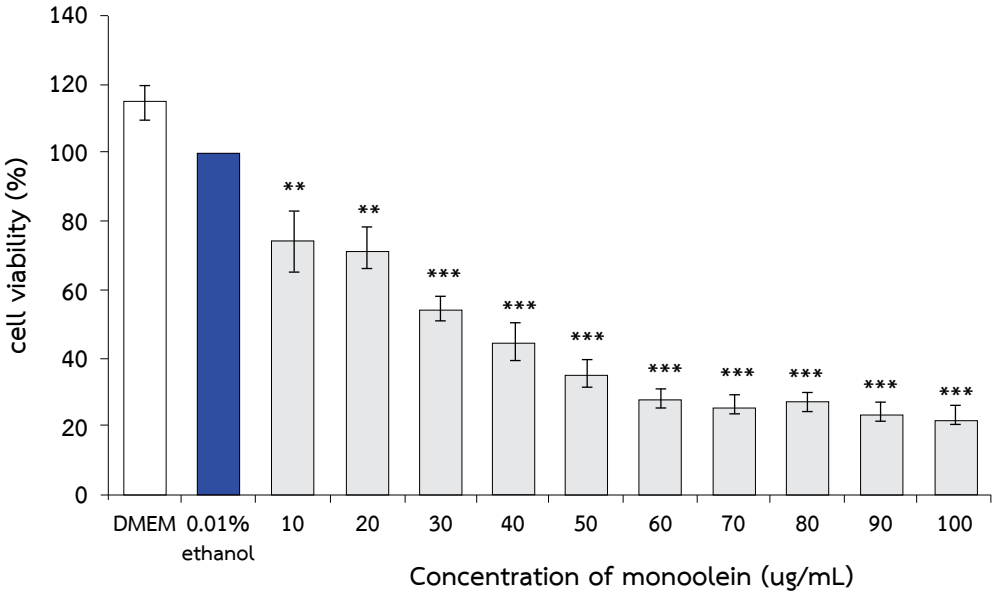
1. ฤทธิ์ของสาร monoolein ต่ออัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

ผลการศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสาร monoolein รายงานเป็นร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (% cell viability) ด้วยวิธี MTT (tetrazole (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium-bromide) และแสดงค่า IC50 ซึ่งหมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ร้อยละ 50

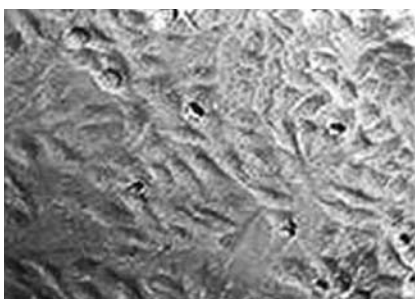
จากรูปที่ 1 A) แสดง % cell viability ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.01 ถึง 0.1 มก./มล. หรือ 10 ถึง 100 มก./มล. โดยทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร ซึ่งพบว่า % cell viability ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 มก./มล. เท่ากับ 74.30±8.89, 71.77±5.53, 54.51±4.31, 44.67±5.64, 35.28±4.25, 27.70±2.72, 25.95±2.27, 27.03±2.88, 23.48±1.84 และ 22.32±1.84 ตามลำดับ โดยเมื่อระดับความเข้มข้นของสารที่เพิ่มสูงจะมีความสามารถในการยับยั้งการอยู่รอดหรือการเจริญของเซลล์ได้มากขึ้นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$ และ $p<0.001$) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสาร monoolein เมื่อพิจารณาจากภาพถ่ายเซลล์ HeLa จะเห็นลักษณะของเซลล์ที่หลุดออกมากขึ้นเมื่อใช้สารที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (HeLa-MO 30 และ 50 มก./มล.) (รูปที่ 1 B) สำหรับเซลล์ HeLa ที่ได้รับสาร 0.01% ethanol พบว่าค่า % cell viability ไม่มีความแตกต่างกับเซลล์ HeLa ที่ไม่ได้เติมสารใดๆ

จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถหาค่าความเข้มข้นของสาร monoolein ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด (IC50) พบว่าเท่ากับ 34.87±1.13 (ตารางที่ 1)

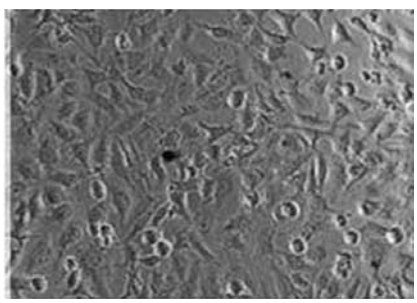
A)



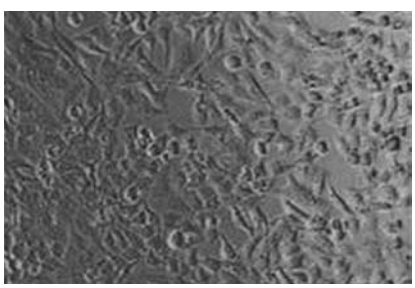
B)



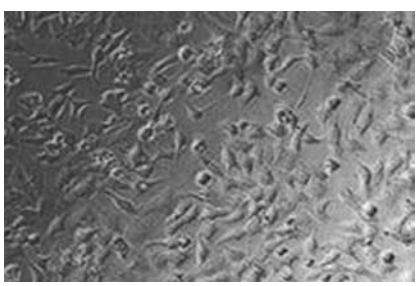
HeLa-Vehicle



HeLa-MO 10 มก./มล.



HeLa-MO 30 มก./มล.



HeLa-MO 50 มก./มล.

รูปที่ 1 A) ค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกเมื่อทดสอบกับสาร monoolein ที่ความเข้มข้นต่างๆ
B) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ phase contrast แสดงลักษณะ HeLa cells เมื่อทดสอบความเป็นพิษโดยสาร monoolein ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ข้อมูลในกราฟแสดงค่า Mean±SEM

, * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HeLa-Vehicle ที่ $p < 0.01$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ 50% จากเซลล์ทั้งหมด (IC50; มก./มล.) จากการทดลอง 3 ซ้ำ

	No. of experiment	IC50 (มก./มล.)	ค่าเฉลี่ย IC50 (มก./มล.)
HeLa cells	1	35.71±1.05	34.87±1.13
	2	33.09±1.01	
	3	35.82±1.35	

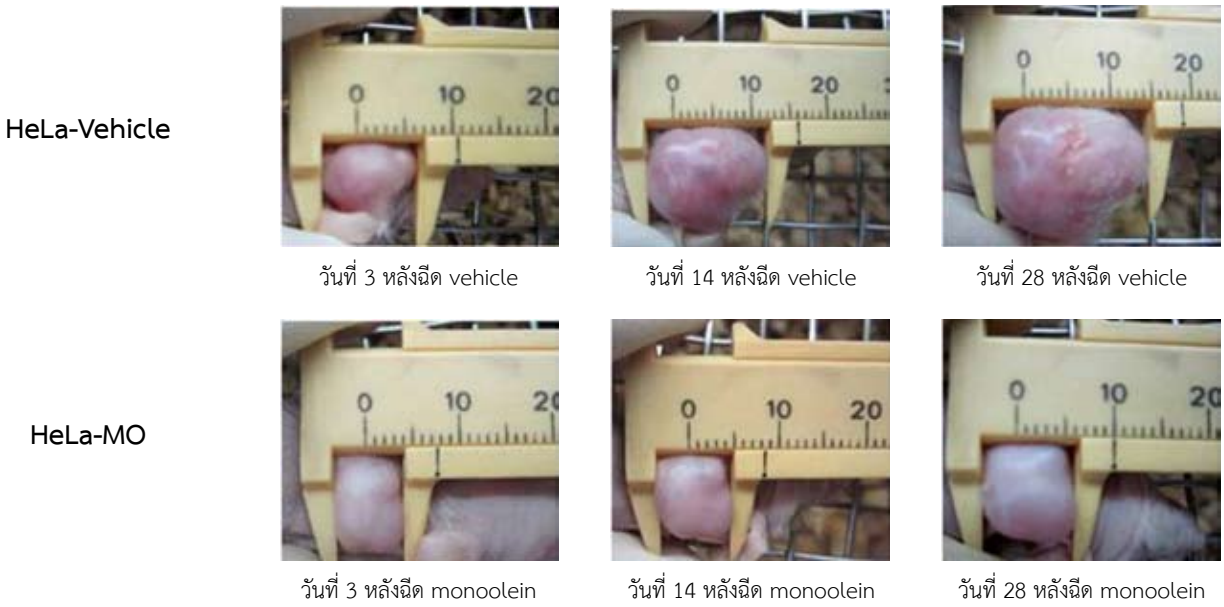
2. ฤทธิ์ของสาร monoolein ต่อการยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้องอกในหนูนูดไมซ์ ที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยเซลล์มะเร็งปากมดลูก

ก่อนการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง หนูนูดไมซ์ทุกกลุ่มมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าน้ำหนักของหนูทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงอยู่ในตารางที่ 2 ระหว่างการทดลองพบหนูกลุ่มมะเร็งและไม่ได้รับการรักษา (HeLa-Vehicle) มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับขนาดของก้อนเนื้องอก ในขณะที่หนูกลุ่มมะเร็งและได้รับการรักษาด้วย monoolein (HeLa-MO) น้ำหนักค่อยๆ เพิ่ม ทั้งนี้หนูมะเร็งทั้งสองกลุ่มไม่มีอาการซึมกินอาหารและน้ำได้ตามปกติ

จากผลการศึกษาในรูปที่ 2 แสดงขนาดของก้อนเนื้องอกมะเร็งที่ถ่าย ณ วันที่ 3, 14 และ 28 หลังการฉีดด้วย vehicle และ monoolein เมื่อนำผลมาคำนวณขนาดของก้อนเนื้องอกในตารางที่ 3 พบว่า ขนาดของก้อนเนื้องอกในกลุ่ม HeLa-MO มีขนาดเล็กกว่าในกลุ่ม HeLa-Vehicle อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่วันที่ 7 หลังการฉีดสาร monoolein ($p < 0.01$) และในวันที่ 28 หลังฉีดสาร monoolein พบว่าขนาดก้อนเนื้องอกในกลุ่ม HeLa-MO มีขนาดเล็กกว่าในกลุ่ม HeLa-Vehicle และมีอัตราการยับยั้งการเจริญ (tumor inhibition) คิดเป็นร้อยละ 59.20±0.05 เมื่อพิจารณาอัตราการโตของก้อนเนื้องอกพบว่าในกลุ่ม HeLa-Vehicle ก้อนเนื้องอกจะโตขึ้นอย่างรวดเร็วตามระยะเวลาที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าในวันที่ 28 หลังฉีด vehicle (กลุ่ม HeLa-Vehicle) มีร้อยละการโตขึ้นของก้อนเนื้องอกสูงกว่าของกลุ่ม HeLa-MO ถึง 5 เท่า (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวในหนูทั้ง 3 กลุ่ม ก่อนและหลังการได้รับการฉีดสารต่างๆ ที่ผิวหนังและรอบๆ ก้อนเนื้องอก

	น้ำหนักตัวก่อนการฉีดสาร (กรัม)	น้ำหนักตัวหลังการฉีดสาร (กรัม)
Control	25.44±0.21	27.39±0.21
HeLa-Vehicle	25.06±0.5	27.00±0.45
HeLa-MO	24.64±1.03	25.10±1.1



รูปที่ 2 ขนาดของก้อนเนื้องอกมะเร็งของหนูนูดไมซ์ ที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยเซลล์มะเร็งปากมดลูกในหนูที่ได้รับการฉีดด้วย vehicle (HeLa-Vehicle) และได้รับการฉีดด้วยสาร monoolein (HeLa-MO) ณ วันที่ 3, 14 และ 28

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของขนาด, ร้อยละการโตขึ้นของก้อนเนื้องอกและน้ำหนักของก้อนเนื้องอกมะเร็งในหนูที่ได้รับการฉีดด้วย vehicle (HeLa-Vehicle) และได้รับการฉีดด้วยสาร monoolein (HeLa-MO)

วันที่หลังการฉีดสาร	HeLa-Vehicle (n=7)			HeLa-MO (n=7)		
	ขนาดก้อนเนื้องอก (Tumor volume; มม^3)	ร้อยละของการโตขึ้นของก้อนเนื้องอก (%)	น้ำหนักก้อนเนื้องอก (Tumor weight; กรัม)	ขนาดก้อนเนื้องอก (Tumor volume; มม^3)	ร้อยละของการโตขึ้นของก้อนเนื้องอก (%)	น้ำหนักก้อนเนื้องอก (Tumor weight; กรัม)
0	96.00±7.14	-	-	93.43±5.64	-	-
7	236.10±23.10	145.94	-	127.30±7.30**	36.25	-
14	552.60±56.27	475.63	-	190.60±14.04***	104.00	-
21	1,160.00±83.55	1,108.33	-	321.40±19.13***	244.00	-
28	1,832.60±88.23	1,808.95	1.57±0.25	466.60±24.63***	399.41	0.64±0.07**

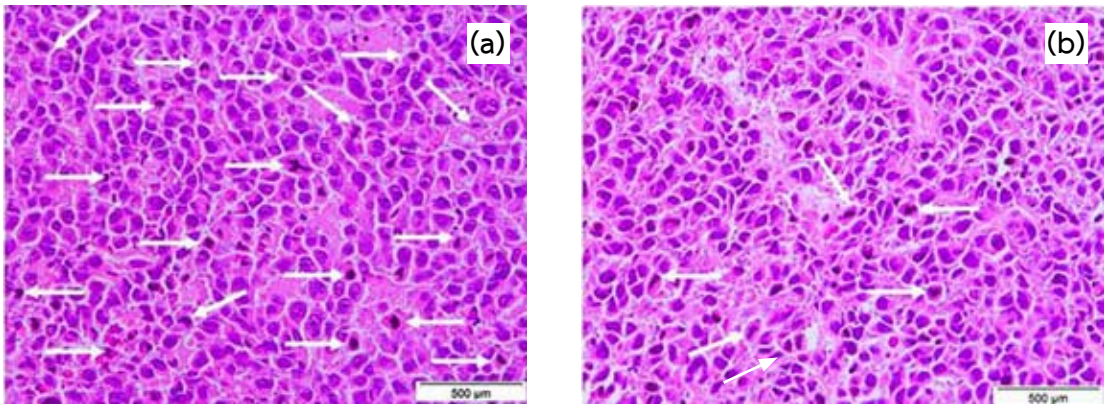
ข้อมูลแสดงค่า Mean±SEM

, * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HeLa-Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน ที่ $p < 0.01$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ

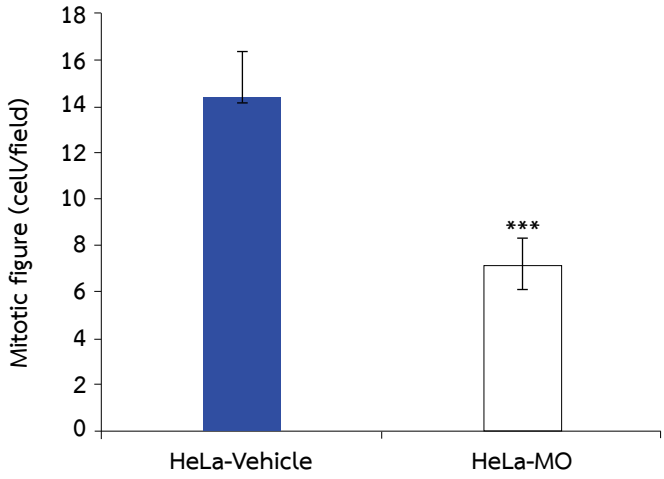
3. ผลของ monoolein ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาโดยการย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin

การวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อมะเร็งศึกษาจากสไลด์ชิ้นเนื้อมะเร็งที่ย้อมสี H&E โดยทำการนับเซลล์ที่มีการแบ่งตัว (mitotic figure) เพื่อประเมินการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่บ่งบอกว่ามีเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว อาจกล่าวได้ว่าเซลล์มะเร็งกำลังมีการเจริญและเพิ่มจำนวน จากผลการศึกษาในรูปที่ 3 A; a) และ b) เป็นภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า แสดงให้เห็นว่าภายในเนื้อเยื่อของหนูกลุ่ม HeLa-Vehicle มีเซลล์มะเร็งเรียงตัวกันอยู่อย่างหนาแน่น และจากการวิเคราะห์พบว่ามีค่าเฉลี่ยจำนวน mitotic figure (14.17±2.11 cell/field) มากกว่ากลุ่มหนูมะเร็ง HeLa-MO (7.20±1.13 cell/field) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3B)

A)



B)



รูปที่ 3 A) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า แสดงลักษณะของเซลล์มะเร็งภายในเนื้อเยื่อ

a) กลุ่ม HeLa-Vehicle และ

b) กลุ่ม HeLa-MO ลูกศรสีขาวแสดงลักษณะ mitotic figure ที่มีการขดตัวกันแน่นของโครโมโซมภายในนิวเคลียส

B) แสดงจำนวน mitotic figure ในเนื้อเยื่อจากก้อนเนื้องอกของหนูมะเร็งกลุ่ม HeLa-Vehicle และกลุ่ม HeLa-MO

ข้อมูลในกราฟแสดงค่า Mean±SEM

*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HeLa-Vehicle ที่ $p < 0.001$

อภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานการศึกษาแรกที่พบว่าสาร monoolein มีฤทธิ์ในการชะลอการเจริญและโตของก้อนเนื้องอกมะเร็งที่เกิดจากการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell (HPV-18) ในหนูนูดไมซ์

ผลการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าสาร monoolein มีความเป็นพิษต่อ HeLa cell ในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้นของสาร โดยมีค่าการยับยั้งการเจริญของ HeLa cell ได้ร้อยละ 50 (IC50) เท่ากับ 34.81±1.13 มก./มล. ซึ่งผล IC50 ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Chiewpattanakul และคณะ ที่ทำการศึกษาทดสอบความเป็นพิษของสาร monoolein ต่อเซลล์มะเร็ง HeLa ที่ได้ค่า IC50 เท่ากับ 32.67±1.32 มก./มล.[3] เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร monoolein ในการยับยั้งการโตของเซลล์มะเร็งแบบ *in vivo* study การศึกษาในครั้งนี้ได้ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกเข้าใต้ผิวหนังของหนูนูดไมซ์และฉีดสาร monoolein ขนาด 200 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นระยะเวลา 28 วัน รอบๆ ก้อนมะเร็งพบว่า สาร monoolein

สามารถชะลอการโตของก้อนเนื้องอกมะเร็งได้เมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับการปลูกถ่าย HeLa cell ที่ไม่ได้รับสาร monoolein เมื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อจากก้อนเนื้องอกมะเร็งพบว่าในกลุ่มที่ได้รับสาร monoolein มีจำนวนเซลล์ mitotic figure ต่ำกว่ากลุ่มมะเร็งที่ไม่ได้รับสาร monoolein ซึ่งลักษณะของ mitotic figure นั้นบ่งชี้ว่าเซลล์มะเร็งอยู่ในระหว่างการแบ่งตัว[16] ดังนั้น จึงยืนยันได้ว่าสาร monoolein มีฤทธิ์ยับยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว โดยสามารถเข้าไปเปลี่ยนแปลงหรือรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้มีการสลายเยื่อหุ้มเซลล์ เพิ่มการซึมผ่านและเกิดการรั่วไหลของสาร และกระตุ้นการหลั่งของแคลเซียมภายในเซลล์ จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่กระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์[17] Monoolein เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภท glycolipid ชนิดหนึ่งที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทางธรรมชาติ มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น เป็นตัวเพิ่มประสิทธิภาพของสารหรือยาในการแทรกซึมผ่านทางผิวหนัง (skin penetration enhancer)[18] มีการศึกษาที่ใช้ monoolein เป็น penetration enhancer ที่ช่วยนำพายา cyclosporin A ซึ่งเป็นยาสำคัญในการรักษาโรคที่เกี่ยวกับ “autoimmune skin disorders” เป็นต้น[19] ที่น่าสนใจยิ่ง ได้แก่ การศึกษาโดย Barta และคณะ พบว่า monoolein มีผลในการยับยั้งการแสดงออกของ P-glycoprotein ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด Caco-2 Cell[20] นอกจากนั้นการศึกษาในหลอดทดลองในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (human leukemic cells) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell พบว่า monoolein biosurfactants ที่ผลิตโดยเชื้อรา *Exophiala dermatitidis* มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด โดยชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis[5-7] โดยที่ monoolein ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และจากคุณสมบัติที่ biosurfactant สามารถเปลี่ยนแปลงปริมาณลิปิด เช่น phosphatidylcholine และ sphingomyelin ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งถูกทำลายได้ง่าย อาจเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายเกิดขึ้นได้[17]

แม้ว่าการศึกษาของข้าพเจ้าและคณะในครั้งนี้ จะพบฤทธิ์ของสาร monoolein มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa และยังมีฤทธิ์ในการชะลอการโตของก้อนเนื้องอกมะเร็ง โดยลดจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระหว่างการแบ่งตัว ซึ่งกลไกหนึ่งอาจเกิดจากสารไปชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องต่อไป ซึ่งในอนาคต monoolein อาจเป็นตัวเลือกหนึ่งในการนำมาใช้เป็นยาต้านมะเร็งหรือเสริมยาต้านมะเร็งที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากจุดเด่นของสาร monoolein นอกจากเป็นพิษเฉพาะต่อเซลล์มะเร็งแล้วยังไม่มีผลที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ปกติด้วย

สรุปผล

สาร monoolein มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกและยังสามารถชะลอการโตของก้อนมะเร็งที่เกิดจากการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกในหนูทดลองได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้คณะแพทยศาสตร์ประจำปี 2557 (สัญญาทุนเลขที่ 302/2557) และได้รับความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ จากภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

เอกสารอ้างอิง

1. Wilailak S. Epidemiologic report of gynecologic cancer in Thailand. J Gynecol Oncol 2009;20 (2):1-3.
2. Khuhaprema T. Current cancer situation in Thailand. Thai J Toxicol 2008;23(2):1-2.
3. Wang W, Sima N, et al. Selective targeting of HPV-16 E6/E7 in cervical cancer cells with a potent oncolytic adenovirus and its enhanced effect with radiotherapy *in vitro* and *vivo*. Cancer Lett 2010;291(1):1-8.
4. Thanomsub B, Pumeechockchai W, Limtrakul A, et al. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. Bioresour Technol 2006;97(18):1-4.
5. Chiewpattanakul P, Phonnok S, Durand A, et al. Bioproduction and anticancer activity of biosurfactant produced by the Dematiaceous Fungus *Exophiala dermatitidis* SK80. J Microbiol Biotechnol 2010;20(12):1-7.
6. Philippoussis F, Arguin C, Mateo V, et al. Monoglycerides induce apoptosis in human leukemic cells while sparing normal peripheral blood mononuclear cells. Blood 2003;101(1):291-4.
7. Philippoussis F, Przybytkowski E, Fortin M, et al. Derivatives of monoglycerides as apoptotic agents in T-cells. Cell Death Diffe 2001;8(11):1103-12.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65(1-2):55-63.
9. Lai L, Fu Q, Liu Y, et al. Piperine suppresses tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* in a 4T1 murine breast cancer model. Acta Pharmacol Sin 2012;33(4):523-30.
10. Marie Engel A, Schou M. Assay of tumorigenicity in nude mice. In: Celis JE, editor. Cell Biology, Four-Volume Set, 3rd ed. pp. 353-7. Academic Press; 2006.
11. Teicher BA. Tumor models for efficacy determination. Mol Cancer Ther 2006;5(10):2435-43.
12. Nishimura K, Nonomura N, Satoh E, et al. Potential mechanism for the effects of dexamethasone on growth of androgen independent prostate cancer. J Natl Cancer Inst 2001;93(22):1739-46.
13. Miller EE, Evans AE, Cohn M. Inhibition of rate of tumor growth by creatine and cyclocreatine. Proc Natl Acad Sci 1993;90(8):3304-8.
14. Li L, Wang ZX, Wang ZH. Combination of IL-24 and cisplatin inhibits cervical cancer growth in a xenograft nude mice model. Asian Pac J Cancer Prev 2011;12(12):3293-8.
15. Medri L, Volpi A, Nanni O, et al. Prognostic relevance of mitotic activity in patients with node-negative breast cancer. Mod Pathol 2003;16(11):1067-75.
16. Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. Am J Clin Pathol 1995 Jul;104(1):42-9.
17. Janek T, Krasowska A, Radwanska A, et al. Lipopeptide biosurfactant pseudofactin II induced apoptosis of melanoma A 375 cells by specific interaction with the plasma membrane. PLoS One2013;8(3): e57991.

18. Lee J, Kellaway IW. Liquid crystalline phases of glyceryl mono-oleate as oral mucosal drug delivery systems. Modified-Release Drug Delivery Technology 2003;1(1):1-5.
19. Lopes LB, Collett JH, Bentley M. Topical delivery of cyclosporin A: an in vitro study using monoolein as a penetration enhancer. Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2005;60(1):1-5.
20. Barta CA, Sachs-Barrable K, Feng F, et al. Effects of monoglycerides on p-glycoprotein: modulation of the activity and expression in caco-2 cell monolayers. Molecular Pharmaceutics 2008;5(5):1-12.

ผลของโมโนโอเลอีนต่อการยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้องอกมะเร็งในหนูนูดไมซ์ ที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยเซลล์มะเร็งปากมดลูก

สุดารัตน์ รองปาน[1] เทิดเกียรติ ตรงวงศา[2] เบญจมาส วงศ์สัตยนนท์[3] อัมพร จาริยะพงศ์สกุล[4]

[1] หลักสูตรชีวภาพการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[2] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[3] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[4] ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

โมโนโอเลอีน (monoolein) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้จากเชื้อรา *E. dermatitidis* ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของโมโนโอเลอีนต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) ในรูปแบบของ *in vitro* และ *in vivo* study โดยทดสอบด้วยวิธี 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide assay (MTT assay) และการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกเข้าใต้ผิวหนังของหนูนูดไมซ์ ตามลำดับ สำหรับการศึกษาในสัตว์ทดลอง ได้แบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มหนูปกติที่ได้รับโมโนโอเลอีน (กลุ่ม control) กลุ่มหนูมะเร็งที่ได้รับโมโนโอเลอีน (HeLa-MO) และไม่ได้รับโมโนโอเลอีน (HeLa-Vehicle) หลังจากการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งแล้ว 3 สัปดาห์ สารโมโนโอเลอีนขนาด 200 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู จะถูกฉีดเข้ารอบๆ ก้อนเนื้องอกทุกวัน (กลุ่ม HeLa-MO) เป็นเวลา 28 วัน และวัดขนาดของก้อนเนื้องอกด้วย micro-caliper วันเว้นวัน เพื่อคำนวณขนาดของก้อนเนื้องอก เมื่อสิ้นสุดการศึกษาก้อนเนื้อมะเร็งจะถูกตัดและชั่งน้ำหนัก และนำมาศึกษาทางพยาธิวิทยาด้วยการย้อม Hematoxyline & Eosin จากผลการศึกษา สารโมโนโอเลอีนมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa โดยมีค่า IC50 เท่ากับ 34.87±1.13 มก./มล. ที่น่าสนใจโมโนโอเลอีนความเข้มข้น 200 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู สามารถชะลอการโตของก้อนเนื้องอกและมีอัตราการยับยั้งการเจริญคิดเป็นร้อยละ 59.20±0.05 อีกทั้งการศึกษาทางพยาธิวิทยาแสดงให้เห็นว่าสารโมโนโอเลอีนลดการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มมะเร็งที่ไม่ได้รับสารโมโนโอเลอีน ผลการศึกษาสรุปได้ว่าสารโมโนโอเลอีนมีพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก และยังสามารถชะลอการโตของก้อนมะเร็งที่เกิดจากการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกในหนูทดลองได้

คำสำคัญ: โมโนโอเลอีน เซลล์มะเร็งปากมดลูก การโตของก้อนเนื้องอกมะเร็ง การศึกษาในสัตว์ทดลอง การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งในหนูนูดไมซ์

ผู้นิพนธ์หลัก

อัมพร จาริยะพงศ์สกุล

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

114 ถนนสุขุมวิท ซอยสุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพ 10110

อีเมล์: ampornswu@gmail.com