บทความวิจัย

ความเป็นพิษและกลไกการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis โดยสารสกัดจากเปลือกมังคุดในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

พิเชษฐ์ เกียรติพรศักดา[1] วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม[2] สิรินันท์ นิลวรางกูร[2]
สุนิตย์ สุขสำราญ[3] และ รมิดา วัฒนโภคาสิน[2*]

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งต่อมลูกหมากเป็นโรคที่พบได้ในผู้ชาย การรักษาโรคมะเร็งต่อมลูกหมากต้องอาศัยเคมีบำบัด ซึ่งมีข้อจำกัด คือ มีค่าใช้จ่ายสูง และมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย ดังนั้นการใช้สารสกัดจากพืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 โดยมีค่า IC_{50} ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่พบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด และจากการย้อมนิวเคลียสด้วย Hoechst 33342 และการทำ gel electrophoresis แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหดตัวของ chromatin และการแตกหักของชิ้น DNA ซึ่งเป็นรูปแบบของกระบวนการ apoptosis ยิ่งกว่านั้นการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase พบการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 และ caspase-8 ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิด apoptosis จึงเป็นไปได้ว่ากระบวนการเกิด apoptosis ที่พบในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากจากการเหนี่ยวนำของสารสกัดกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดอาจเกิดขึ้นผ่าน death receptor pathway

คำสำคัญ: xanthone apoptosis มะเร็งต่อมลูกหมาก มังคุด

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[2]ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[3]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: ramidawa@yahoo.com

Cytotoxicity and Apoptotic Induction Mechanism by Mangosteen Extract in Prostate Cancer Cells

Pichet Kirttipornsakda[1], Wanlaya Tanechpongtamb[2], Sirinun Nilwarangkoon[2], Sunit Suksamran[3] and Ramida Watanapokasin[2*]

ABSTRACT

Prostate cancer is commonly diagnosed in men, since chemotherapeutic are quite limited due to high cost and side effects therefore, phytochemical therapy might be the choice for prostate cancer treatment. The objective of this project was to study the effect of xanthone isolated from pericarp of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) on cytotoxicity in prostate cancer PC-3 cells. The result showed that xanthone induced cytotoxic effect with IC_{50} at 10μg/ml. The viability assay showed a time-dose dependent growth inhibitory effect. Hoechst 33342 nuclear staining and nucleosomal DNA gel electrophoresis revealed that xanthone could induce nuclear condensation and DNA fragmentation, typically seen in apoptosis. In addition expression of caspase-3 and caspase-8 were detected indicating the apoptosis induction of PC-3 cells by xanthone extract occurs via death receptor pathway.

Keywords: xanthone, apoptosis, prostate cancer, *Garcinia mangostana*

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

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

[3]Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

[*]Corresponding author, email: Ramidawa@yahoo.com

บทนำ

ในปัจจุบันมะเร็งจัดว่าเป็นโรคที่เป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญยิ่ง โดยพบว่ามีผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นเป็น 9 ล้านคน และคาดการณ์ว่าจะเพิ่มขึ้นเป็น 15 ล้านคน ในปี พ.ศ. 2563 ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นประชากรในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาและในประเทศไทย โรคมะเร็งจัดว่าเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สำคัญโรคหนึ่ง [1] สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งนั้นเกิดขึ้นได้จากหลายๆ ปัจจัย ทั้งปัจจัยจากภายนอกร่างกาย เช่น สารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในอาหาร อากาศ เครื่องดื่ม ยารักษาโรค การได้รับรังสี เชื้อไวรัส เชื้อแบคทีเรีย และปัจจัยภายในร่างกาย เช่น ความผิดปกติทางพันธุกรรม ความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน และภาวะทุพโภชนา เป็นต้น ซึ่งโรคมะเร็งชนิดเดียวกันอาจเกิดได้จากสาเหตุต่างๆ กัน เนื่องจากในแต่ละชุมชนมีสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน และการได้รับปัจจัยเสี่ยงหลายๆ อย่างรวมกันจะทำให้เกิดเป็นโรคมะเร็งได้เร็วขึ้น ส่งผลให้อัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย โรคมะเร็งในระยะแรกสามารถรักษาให้หายได้ โดยการผ่าตัดหรือการฉายรังสี (radiotherapy) แต่มักไม่ค่อยได้ผล เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่จะทราบว่าตนเองเป็นโรคมะเร็งก็ต่อเมื่อมีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะต่างๆ แล้ว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยการรักษาด้วยเคมีบำบัด (chemotherapy) หรือใช้การรักษาด้วยเคมีบำบัดร่วมกับการรักษาวิธีอื่น [2] ซึ่งยาเคมีบำบัดนอกเหนือจากจะทำลายเซลล์มะเร็งแล้วยังทำลายเซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียงด้วย ส่งผลทำให้ผู้เข้ารับการรักษาเกิดอาการข้างเคียงจากการรักษา ซึ่งผลข้างเคียงของการรักษาด้วยเคมีบำบัดพบได้หลายอาการ โดยความรุนแรงและอาการข้างเคียงจะขึ้นอยู่กับชนิดของยาเคมีบำบัดและปฏิกิริยาตอบสนองต่อยาของร่างกายผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา [3] ผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นนั้นส่งผลให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลายรายไม่ยอมเข้ารับการรักษา ทำให้โรคมะเร็งแพร่กระจายไปเรื่อยๆ และทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในที่สุด

ปัจจุบันมีหลายงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากพืชเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็ง โดยเป้าหมายของการพัฒนายาต้านมะเร็งนั้นต้องการให้ยามีผลกระทบต่อเซลล์ปกติใกล้เคียงน้อยที่สุด ดังนั้นกลไกที่ได้รับความสนใจในปัจจุบันที่ต้องการให้เป็นเป้าหมายของยา คือ การกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายด้วยกระบวนการ apoptosis ซึ่งจะไม่ทำให้เซลล์ข้างเคียงเกิดการอักเสบเหมือนกับที่พบในการตายแบบ necrosis [4] สำหรับการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis นั้นเกิดขึ้นได้จาก 2 กลไก คือ mitochondrial pathway และ death receptor pathway โดยจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากธรรมชาตินั้นสามารถกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ได้ในทั้งสองกลไกดังกล่าว [5] ซึ่งเป็นที่น่าสนใจและมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากพืชผัก ผลไม้ บางชนิดสามารถนำมาพัฒนา ปรับปรุง จนสามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งได้ พืชที่มีการศึกษาแล้วพบว่ามีสารที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ในระดับดีมีอยู่หลายชนิด เช่น สาร curcumin และ curcuminoid ที่สกัดจากขมิ้นชัน [6] นอกจากนั้นพืชและผลไม้อื่นๆ ก็มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้เช่นกัน สำหรับสารสกัดจากพืชที่มีการนำมาใช้เป็นยาในปัจจุบัน ได้แก่ Vincristine และ Vinsblastine ที่สกัดได้จากต้นแพงพวยฝรั่งถูกนำมาใช้รักษามะเร็งชนิด Hodgkin's lymphoma และ non-Hodgkin's lymphoma [7] และสาร Taxol ที่สกัดจากต้นยิว *(Taxus brevifolia)* นำมาใช้เป็นยารักษามะเร็งปอดและมะเร็งเต้านม [8] เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสารสกัดจากพืชอีกชนิดที่น่าสนใจ คือ สารในกลุ่ม xanthone ที่สกัดจากเปลือกมังคุด โดยสารสกัดกลุ่ม xanthone มีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง ทั้งการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย [9, 10] มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [11, 12] ลดการอักเสบ [13] และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิด รวมทั้งเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากด้วย [14]

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดกลุ่ม xanthone ที่ได้จากเปลือกมังคุดในการเป็นสารต้านมะเร็ง รวมทั้งกลไกที่ทำให้เซลล์มะเร็งตายด้วยกระบวนการ apoptosis โดยเลือกใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากในการทดลอง เนื่องจากเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยในประเทศไทย และมีอัตราการเกิดโรคเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง

วิธีการทดลอง

เซลล์มะเร็งและสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ใช้ในการทดลอง

เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ได้มาจากสถาบัน ATCC (Cat.No. CRL-1435)

สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดได้รับจากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซึ่งสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส [15]

การเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3

เลี้ยงเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม fetal bovine serum เข้มข้น 10% ใน culture flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ตรวจดูการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จนเซลล์เจริญเต็ม culture plate แล้วจึงขยายเพิ่มจำนวนเซลล์โดยใช้สารละลาย trypsin/ EDTA pH 7.3

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

ใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 2×10^4 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อหลุมของ 96 well culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ออก แล้วเติมสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

} บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 4 ชั่วโมง

ทดสอบความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากด้วยวิธี MTT [16] เพื่อตรวจหาเซลล์ที่ยังมีชีวิต โดยวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ซึ่งความเข้มของสีจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาค่า IC_{50}

การทดลองหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในการฆ่าเซลล์มะเร็ง

ใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 2 x 10^6 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อหลุมของ 6 well culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ออก แล้วเติมสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 โดยใช้ค่า IC_{50} ที่ได้มาใช้อ้างอิงในการปรับค่าความเข้มข้นเป็น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (1-5 เท่า ของค่า IC_{50}) บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5% เป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาย้อมด้วยสีย้อม trypan blue อัตราส่วน 1: 1 นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเปรียบเทียบกับความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ทดสอบ เพื่อที่จะหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ใช้ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ นิวเคลียส

ใช้สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ความเข้มข้น 30, 40, และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงใน 6 well culture plate ที่มีเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 2×10^6 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% แล้วตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ที่ช่วงเวลานั้นๆ นำเซลล์ที่ได้ย้อมด้วยสีย้อม Hoechst 33342 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาปั่นล้างเซลล์ด้วย 1X PBS จำนวน 2 ครั้ง แล้วจึงตรวจดูรูปร่างลักษณะของนิวเคลียสบนแผ่นสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence [17]

การแตกหักของ DNA (DNA fragmentation)

เติมสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ความเข้มข้น 20, 30, 40, และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน 6 well culture plate ที่มีเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 2 x 10^6 เซลล์ต่อหลุม บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 5 ชั่วโมง สกัด DNA ด้วย phenol chloroform จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA โดยวิธี agarose gel electrophoresis [18]

การแสดงออกของเอนไซม์ caspase โดยวิธี Western blotting

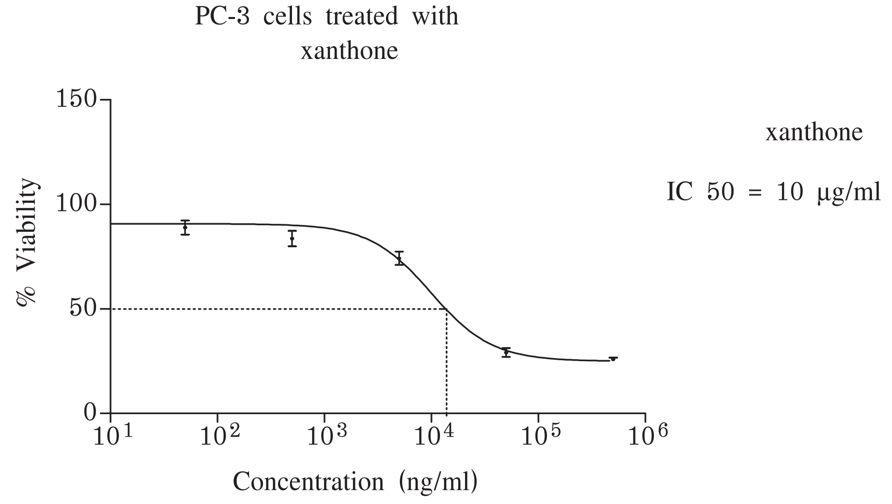
ใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 1×10^6 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต่อหลุมของ 6 well culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ออกแล้วเติมสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้

กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเก็บเซลล์แล้วล้างด้วย PBS ทำให้เซลล์แตกด้วยการบด แล้วจึงปั่นแยกที่ 500×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำ supernatant ส่วนหนึ่งมาตรวจดูความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี Bradford อีกส่วนนำไปแยกโปรตีนบน 15% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 130 โวลต์ ย้ายโปรตีนจาก gel ลงสู่ PVDF membrane (polyvinylidene fluoride) ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำ PVDF membrane แช่ 5% นม ใน PBS ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS เป็นเวลา 10 นาที บ่ม PVDF membrane ด้วย anti-caspase-3 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน แล้วล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที นำไปบ่มใน anti-Mouse IgG, HRP-linked Antibody เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 10,000 ในสารละลาย 2.5% นม ใน PBS ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นตรวจหาแถบโปรตีน โดยอาศัยเทคนิค Autoradiography ในกรณีของ caspase-8 และ caspase-9 ใช้วิธีการเดียวกัน เพียงแต่เปลี่ยน primary antibody ที่จำเพาะต่อ caspase-8 และ caspase-9

ผลการทดลอง

ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3

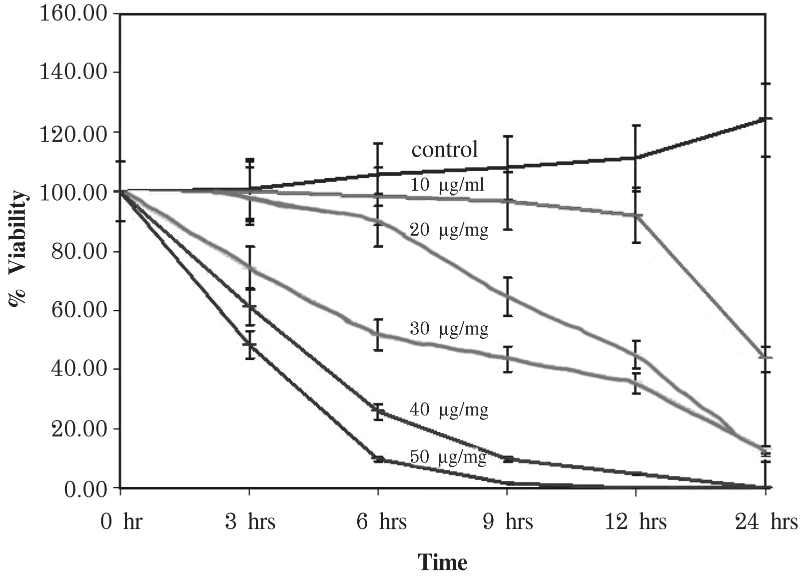
หลังจากทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดพบว่าสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ได้ที่ค่า IC_{50} ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากโปรแกรม GraphPad Prism Version 3.03 (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงความสามารถของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone ในการฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดต่อร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต หลังจากได้รับสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดจะได้ค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ได้ 50%)

ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

การทดลองเพื่อหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเซลล์มะเร็ง พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ที่ 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีในช่วงเวลา 3 ถึง 6 ชั่วโมง และหลังจากเวลา 6 ชั่วโมงไปแล้ว พบว่า อัตราการตายของเซลล์มะเร็งจะเกิดขึ้นได้ช้าลง (รูปที่ 2)



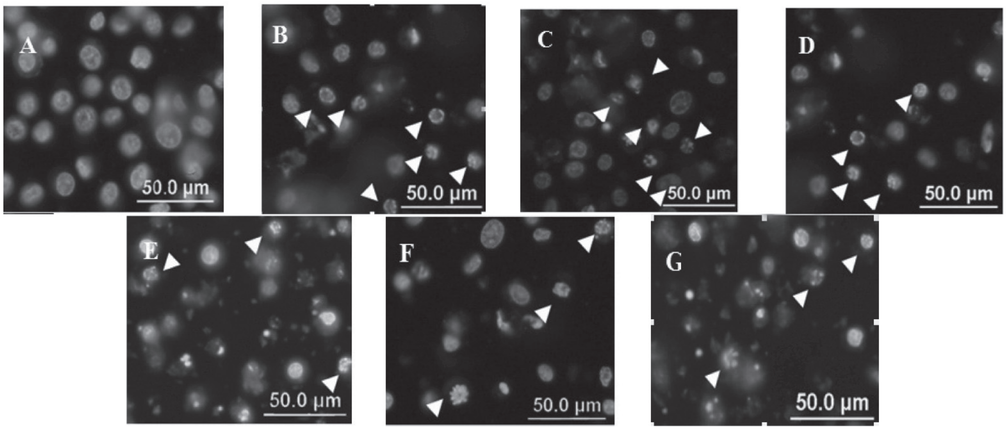
รูปที่ 2 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด และเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ณ ช่วงเวลาต่างๆ ซึ่งปรับค่าความเข้มข้นจากค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดได้ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง

การศึกษาการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส

หลังจากบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดได้ 3 ชั่วโมง พบว่า เซลล์มะเร็งเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียสไปในรูปแบบของการเกิด apoptosis โดยนิวเคลียสจะเริ่มมีการหดตัวและมีการรวมตัวกันของ chromatin (chromatin condensation) ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลงและมีการรวมตัวกันของ chromatin ภายในเซลล์ โดยความเข้มข้นสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจพบว่ามีเซลล์ที่มีขนาดเล็กลงและมีการรวมตัวกันของ chromatin เป็นจำนวนมาก และเห็นได้ชัดเจนที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง (รูปที่ 3B และ 3C) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ไม่ได้รับสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ซึ่งใช้เป็น control (รูปที่ 3A) ความเข้มข้นสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 40 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร ยังสามารถตรวจพบเซลล์ที่มีขนาดเล็กลงและมีการรวมตัวกันของ chromatin เกิดขึ้น แต่ตรวจพบได้น้อยกว่าความเข้มข้นสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่เวลา 3 ชั่วโมง ตรวจพบเซลล์ที่มีขนาดเล็กลงและมีการรวมตัวกันของ chromatin ได้ และเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 3D) แต่ที่เวลา 6 ชั่วโมง ตรวจพบเซลล์ที่มีขนาดเล็กลงและมีการรวมตัวกันของ chromatin ได้ลดลง และเห็นได้ไม่ชัดเจน (รูปที่ 3E) ความเข้มข้นสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจพบเซลล์ที่มีขนาดเล็กลงและมีการรวมตัวกันของ chromatin เกิดขึ้น แต่ตรวจพบได้เล็กน้อยและเห็นได้ไม่ชัดเจน (รูปที่ 3F และ 3G) แสดงว่า ณ ช่วงเวลา 3 ถึง 6 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis ได้ดีที่สุด โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมที่สุด คือ ความเข้มข้นที่ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่า เมื่อความเข้มข้นที่มากกว่า 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว จึงตรวจพบเซลล์ที่กำลังเกิดกระบวนการ apoptosis ได้ลดลง พบได้เพียงเศษของเซลล์ที่ถูกทำลายไปแล้ว



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ

A คือ เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ไม่ได้รับสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ซึ่งใช้เป็น control

B ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลา 3 ชั่วโมง

C ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลา 6 ชั่วโมง

D ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลา 3 ชั่วโมง

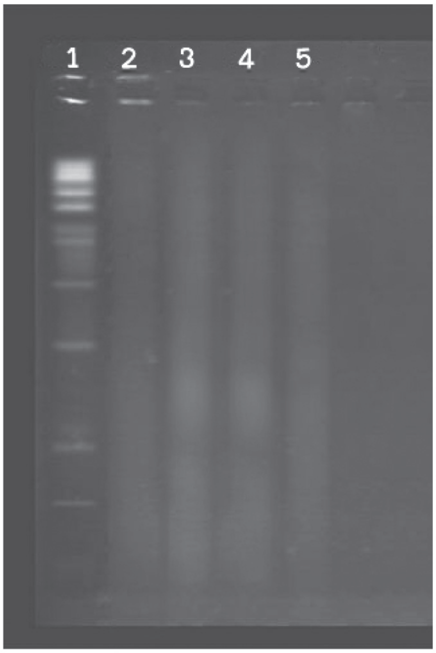
E ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลา 6 ชั่วโมง

F ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลา 3 ชั่วโมง

G ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลา 6 ชั่วโมง

การตรวจสอบการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation)

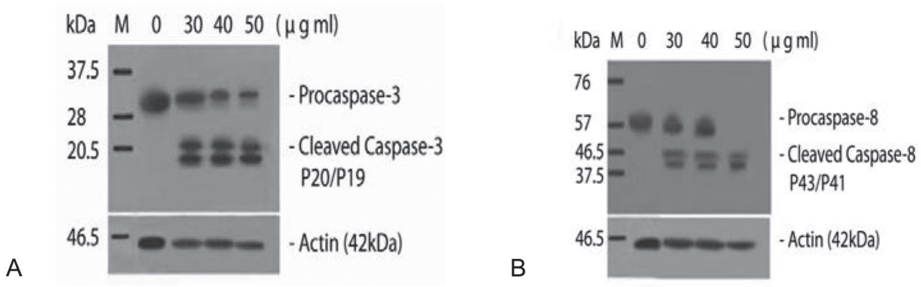
ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่สามารถตรวจพบการแตกหักของ DNA ได้ คือ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบการแตกหักของ DNA ได้ชัดเจนที่สุด โดยการแตกหักที่เกิดขึ้นเป็นไปอย่างมีระเบียบและชิ้น DNA พบได้หลายขนาด ทำให้เกิด band ที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันไดเรียกว่า DNA ladder ซึ่งเป็นรูปแบบของการเกิด apoptosis (รูปที่ 4) แสดงว่าสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 เกิดกระบวนการ apoptosis ได้ โดยที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบการแตกหักของชิ้น DNA ที่เกิดจากน้อยถึงมากที่สุด ส่วนที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบการแตกหักของชิ้น DNA ได้ลดลง เนื่องจากเซลล์บางส่วนได้ผ่านกระบวนการ apoptosis ไปแล้ว จึงตรวจพบได้ลดลง



รูปที่ 4 การแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ซึ่งทำการสกัด DNA จากเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 2×10^6 เซลล์ เลนที่ 1 คือ 1 kb ladder DNA เลนที่ 2-5 แสดงการแตกหักของ DNA ที่ความเข้มข้น 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การแสดงออกของเอนไซม์ caspase โดยวิธี Western bloting

หลังจากบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดเป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้ว นำไปตรวจสอบหาความจำเพาะของโปรตีนต่อ anti-caspase-3, anti-caspase-8 และ anti-caspase-9 โดยวิธี Western blotting พบว่าสามารถตรวจพบแถบโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อ anti-caspase-3 (รูปที่ 5A) และ anti-caspase-8 (รูปที่ 5B) โดยปฏิกิริยาของ anti-caspase-3 ที่จับกับแถบของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดของ procaspase-3 และพบปฏิกิริยาของ anti-caspase-3 ที่จับกับแถบของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 19 และ 20 กิโลดาลตัน เป็นขนาดของ cleaved caspase-3 โดยที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจพบปฏิกิริยาของ anti-caspase-3 ได้มากที่สุด (รูปที่ 5A) ส่วนปฏิกิริยาของ anti-caspase-8 ที่จับกับแถบของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55 กิโลดาลตัน เป็นขนาดของ anti-caspase-8 และพบปฏิกิริยาของ anti-caspase-8 ที่จับกับแถบของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 43 และ 44 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดของ cleaved caspase-3 โดยที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจพบปฏิกิริยาของ anti-caspase-3 ได้มากที่สุด และที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบเพียง caspase-8 แต่ไม่พบ pro-caspase-8 อาจเป็นไปได้ว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าว กระบวนการ apoptosis เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว มีผลทำให้เซลล์ตายอย่างรวดเร็ว ซึ่งเวลาที่ตรวจสอบกระบวนการเกิด apoptosis ได้ดำเนินมาในระยะที่ procaspase-8 ถูกตัดส่วน prodomain ไป แล้วเปลี่ยนเป็น caspase-8 จนหมด (รูปที่ 5B) แสดงว่ากลไกการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone ที่สกัดได้จากเปลือกมังคุดอาจเกิดผ่าน death receptor pathway



รูปที่ 5 การแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 และ caspase-8 ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดย A คือ การแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 และ B คือ การแสดงออกของเอนไซม์ caspase-8

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone ที่สกัดได้จากเปลือกมังคุด โดยใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 เป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ได้ค่า IC_{50} ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากได้ในระดับที่น่าพอใจ และเมื่อนำข้อมูลค่า IC_{50} ข้างต้นมาปรับเพื่อหาช่วงเวลาที่สารสกัดสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด พบว่าสารสกัดสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุดที่ช่วงเวลา 3 ถึง 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากในระยะเวลา 3 ถึง 6 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ถูกเหนี่ยวนำโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด และลดลงอย่างช้าๆ เมื่อผ่านช่วงเวลา 6 ชั่วโมงไปแล้ว ดังนั้นในการทดลองจึงนำเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้น 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้น โดยคาดว่าลักษณะการตายที่เกิดขึ้นจะเป็นการตายแบบ apoptosis [7]

ในการตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 โดยการตรวจสอบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสซึ่งถูกย้อมด้วย Hoechst 33342 พบเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่มีขนาดที่เล็กลง เนื่องมาจากการที่มีการหดตัวของ chromatin ในนิวเคลียส และจับตัวกันแน่นจนกลายเป็นก้อน ซึ่งเป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด โดยการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสในลักษณะดังกล่าวเป็นขั้นตอนแรกๆ ของกระบวนการ apoptosis ซึ่งในการเปลี่ยนแปลงไปในรูปแบบของการตายแบบ apoptosis ขั้นต่อไป คือ การที่ membrane ของเซลล์จะเกิดการเหี่ยวฝ่อลง (membrane blebbing) และห่อหุ้ม chromatin และสารต่างๆ ในเซลล์ที่หดตัวลงแล้วรวมตัวกันเป็นก้อน (apoptotic body) [7] โดยพบการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสได้บ้างที่ความเข้มข้น 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นไปได้ว่า ที่ความเข้มข้น 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มะเร็งถูกกระตุ้นให้มีการตายอย่างรวดเร็ว ทำให้ ณ เวลาเดียวกันที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบเซลล์เข้าสู่ระยะแรกๆ ของการตายแบบ apoptosis ได้มาก ในขณะที่ความเข้มข้น 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้น เซลล์ได้เข้าสู่ระยะหลังๆ ของการตายแบบ apoptosis แล้ว และบางเซลล์ได้ตายและสลายตัวไปแล้ว

ในการตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 โดยการตรวจสอบลักษณะการแตกหักของชิ้น DNA (DNA fragmentation) พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจพบการแตกหักของ DNA เป็นชิ้นๆ ในลักษณะขั้นบันได (DNA ladder) โดยการแตกหักของชิ้น DNA ที่ตรวจพบอาจเกิดจากการที่ DNA ถูกย่อยเป็นท่อนสั้นๆ โดย endonuclease ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งในการเกิด apoptosis ในระยะแรก ซึ่งจะเกิดขึ้นเป็นระยะที่จะเกิดขึ้นพร้อมๆ กับการหดตัวของ chromatin โดยที่สาย DNA จะถูกย่อยให้เป็นสายสั้นๆ โดย endonuclease [7] ในการตรวจสอบ จึงอาศัยเทคนิค agarose gel electrophoresis เพื่อแยกเอาสาย DNA ที่ถูกย่อยออกจากกัน ทำให้เห็นลักษณะที่เรียกว่า DNA ladder บน gel โดยพบการแตกหักของชิ้น DNA ได้มากที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบได้เล็กน้อยที่ความเข้มข้น

40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นไปได้ว่า ที่ความเข้มข้น 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้น เซลล์บางส่วนได้ตายและสลายตัวไปแล้ว จึงไม่สามารถตรวจพบชิ้น DNA ได้

ในการตรวจสอบกลไกการเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 หลังจากถูกกระตุ้นให้เกิด apoptosis โดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ cysteine protease ที่มีชื่อว่า caspase [18] ซึ่งเป็นโปรตีนจำเพาะที่จะพบได้ในขั้นตอนการเกิด apoptosis เท่านั้น โดยอาศัยเทคนิค Western blotting ตรวจพบปฏิกิริยาของ anti-caspase-3 ที่จับกับแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดของ procaspase-3 และพบปฏิกิริยาของ anti-caspase-3 ที่จับกับแถบของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 19 และ 20 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดของ cleaved caspase-3 โดยที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจพบปฏิกิริยาของ anti-caspase-3 ได้มากที่สุด

ปฏิกิริยาของ anti-caspase-8 ที่จับกับแถบของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดของ procaspase-8 และพบปฏิกิริยาของ anti-caspase-8 ที่จับกับแถบของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 43 และ 44 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดของ cleaved caspase-3 โดยที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจพบปฏิกิริยาของ anti-caspase-3 ได้มากที่สุด และที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบเพียง caspase-8 แต่ไม่พบ pro-caspase-8 อาจเป็นไปได้ว่า ณ ที่ความเข้มข้นดังกล่าว กระบวนการเกิด apoptosis เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว มีผลทำให้เซลล์ตายอย่างรวดเร็ว ซึ่ง ณ เวลาที่ตรวจสอบกระบวนการเกิด apoptosis ได้ดำเนินมาในระยะที่ procaspase-8 ถูกตัดส่วน prodomain ไป แล้วเปลี่ยนเป็น caspase-8 จนหมด [19]

จากการตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ cysteine protease พบปฏิกิริยาของ caspase-3 และปฏิกิริยาของ caspase-8 เท่านั้น ซึ่งผลที่ได้ในงานวิจัยนี้แตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่ากลไกการเกิด apoptosis เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 3,3'-diindolylmethane เกิดผ่าน mitochondrial pathway โดยตรวจพบ caspase-3 และ caspase-9 [14] ซึ่งงานวิจัยนี้ตรวจพบเพียงการแสดงออกของ caspase-3 และ caspase-8 จึงมีความเป็นไปได้ว่า การเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 นอกจากจะเกิดผ่าน mitochondrial pathway แล้วยังอาจสามารถเกิด apoptosis ผ่านทาง death receptor pathway ได้อีกด้วย

จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ cysteine protease แสดงให้เห็นว่ากลไกการเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ถูกกระตุ้นโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดผ่านทาง death receptor pathway ซึ่งควรมีการตรวจสอบเพิ่มเติม คือ ควรทำการตรวจหาการแสดงออกของ cytochrom c เพื่อยืนยันผลที่ชัดเจนจากผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดยังสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ได้เช่นกัน โดยที่เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 เป็นเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากที่เป็น high metastasis potential ซึ่งเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากที่รุนแรงที่สุดในกลุ่มมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยมีผลกระทบกับเซลล์ปกติ (gingival cell) น้อยมาก (ค่า IC_{50} มากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ได้ จึงมีความเป็นไปได้ที่เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิดอื่นจะถูกฆ่าได้ด้วยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดได้เช่นกัน

จากงานวิจัยนี้มีข้อเสนอแนะว่าควรนำสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ได้ไปทดลองในสัตว์ทดลองเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดที่สกัดได้ นอกจากนี้ควรทำการทดสอบร่วมกับยาต้านมะเร็งหรือสารสกัดอื่นเพื่อตรวจสอบผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นเมื่อมีการพัฒนาสารสกัดจากเปลือกมังคุดไปเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้รับทุนจากฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

เอกสารอ้างอิง

1. Sriplung, H., Khuhaprema, T., Srivatanakul, P., Attasdara, P., Wiangnon, S., and Sumitsawan, Y. 2003. Cancer in Thailand, Bangkok. *Medical Publisher* 3(2): 7-69.
2. Haskell, C.M. 1985. Principles of Cancer Chemotherapy. In: Haskell, C. M., Editor. Cancer Treatment. 2nd Edition. Philadelphia. W.B. Saunders. p. 21-42.
3. สุมิตรา ทองประเสริฐ และ สิริกุล นภาพันธ์. 2545. โรคมะเร็ง: แนวทางการรักษา = Practical Points in Oncology. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่. ธนบรรณการพิมพ์.
4. Studzinski, G. P. 1995. Cell growth and Apoptosis: A Practical Approach. *General Pharmacology: The Vascular System.* 3(28): 442.
5. Majno, G., and Joris, I. 1995. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. *The American Journal of Pathology* 146(1): 3-15.
6. Yegnanarayana, R., Sarat, A. P., and Balwani, J. H. 1976. Comparsion of Anti-Inflammatory Activity of Various Extracts of *Curcumin longa. Indian Journal of Medical Research* 64: 601-608.
7. Chan, J. D. 1998. Pharmacokinetic Drug Interactions of Vinca Alkaloids: Summary of Case Reports. *Pharmacotherapy* 18(6): 1304-1307.
8. Woo, H. L., Swenerton, K. D., and Hoskins, P. J. 1996. Taxol is Active in Platinum Resistant Endometrial Adenocareinoma. *American Journal of Clinical Oncology* 19(3): 290-291.
9. Sakagami, Y., linuma, M., Piyasena, K. G. N. P., and Dharmaratne, H. R. W. 2003. Antibacterial Activity of α-Mangostin against Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) and Synergism with Antibiotics. *Phytomedicine* 3(12): 203-208.
10. Chomnawang, M. T., Surasmo, S., Nukoolkarn, V. S., and Kritsanapan, W. 2005. Antimicrobial Effects of Thai Medicinal Plant against Acne-Inducing Bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* 101(1-3): 330-333.
11. Leong, L.P., and Shui, G. 2002. Aninvestigation of Antioxidant Capacity of Fruits in Singapore Markets. *Food Chemistry* 76: 69-75.

12. Limei, Y., Zhao, M., Yang, B., Zhao, Q., and Jiang, Y. 2007. Phenolics from Hull of *Garcinia mangostana* Fruit and their Antioxidant Activities. *Food Chemistry* 104: 176-181.
13. Nakatani, K., Nakahata, N., Arakawa, T., Yasuda, H., and Ohizumi, Y. 2002. Inhibition of Cyclooxygenase and Prostaglandin E_2 Synthesis by γ-Mangostin, a Xanthone Derivative in Mangosteen, in C6 Rat Glioma Cells. *Biochemical Pharmacology* 63(1): 73-79.
14. Nachshon-Kedmi, M., Yannai, S., and Fares, F.A. 2004. Induction of Apoptosis in Human Prostate Cancer Cell Line, PC-3, by 3,30'-Diindolylmethane through the Mitochondrial Pathway. *British Journal of Cancer* 91:1358-1363.
15. Watanapokasin, R., Jarinthanan, F., Jerusalmi, A., Suksamrarn, S., NaKamura, Y., Sukseree, S., Uthaisang-Tanethpongtamb, W., Ratananukul, P., and Sano, T. 2010. Potential of Xanthones from Tropical Fruit Mangosteen as Anti-cancer Agents: Caspase-dependent Apoptosis Induction *in Vitro* and in Mice. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162(4): 1080-1094.
16. Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
17. Ramonede, B. M., and Tomas, R. P. 2002. Activation of Protein Kinase C for Protection of Cells against Apoptosis Induced by the Immunosuppressor Prodigiosin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 63: 463-469.
18. Adrain, C., Creagh, E. M., and Martin, S. J. 2002. Caspase Cascades in Apoptosis Caspases-their Role in Cell Death and Cell Survival. In: Moleculare Biology Intelligence Unit 24. Los, M., and Walczak, H., Editors. Totowa, New Jersey. Humama Press. p. 41-51.
19. Rao, R. V., Peel, A., Logviniva, A., Rio, G. D., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P. C., Ellerby, L. M., Elerby, H. M. and Bredesen, D. E. 2001. Coupling Endoplasmic Reticulum Stress to the Cell Death Program. *Journal of Biological Chemistry* 277(26): 21836-21842.

ได้รับบทความวันที่ 28 มีนาคม 2554
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 7 กันยายน 2554