



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลไกการยับยั้งการเจริญของมะเร็งรังไข่ที่ดื้อยา
ซิสพลาตินโดยสารไตรเทอร์ปีนอยด์ที่สกัดได้จากมะระขี้นก
ชนิดกุกวาชินเจ

โดย นางสาวพรสิริ พิจการ

มีนาคม 2559

สัญญาเลขที่ MRG5580128

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลไกการยับยั้งการเจริญของมะเร็งรังไข่ที่ดื้อยา
ซิสพลาตินโดยสารไตรเทอร์ปีนอยด์ที่สกัดได้จากมะระขี้นก
ชนิดกุกวาชินเจ

ผู้วิจัย นางสาวพรสิริ พิจการ

สังกัด ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

เอกสารแนบหมายเลข 2**Abstract**

Ovarian cancer is included in ten leading cancer sites for the estimated new cases and dead cases in female at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Thailand. The advanced stages (III and IV) of ovarian cancer have been reported to show a lower survival rate due to resistance to chemotherapeutic drugs. This study investigated whether kuguacin J promote cisplatin- and paclitaxel-induced cancer cell death in drug-resistance human ovarian cancer cells (SKOV-3) and drug-sensitive human ovarian cancer cells (A2780). Cytotoxicity testing showed that SKOV-3 cells were more resistance to cisplatin and paclitaxel compare to A2780 cells. The cytotoxicity of paclitaxel (PTX) was significantly increased when co-treated with kuguacin J in SKOV-3 cells. We previous reported multidrug resistance ability of kuguacin J in cervical cancer cells via the inhibition of P-glycoprotein, which also overexpress in SKOV-3 cells. However, the present study found that enhancement of PTX toxicity in the cells did not involve with P-glycoprotein inhibition. We next further determined which mechanism that kuguacin J increased paclitaxel sensitivity, the expression of cell death-involving proteins was analyzed by Western blot analysis. The results showed that PTX treatment increased level of anti-apoptotic protein, surviving, which may be involved with the drug resistance in SKOV-3. The co-treatment of PTX and kuguacin J dramatically decreased level of anti-apoptotic protein, survivin and markedly induced cleavage of PARP and caspase-3, which are apoptotic-induced molecules. This finding might support the possibility to use kuguacin J as an effective chemosensitizer in combination with conventional chemotherapy to promote paclitaxel sensitization in ovarian cancer patients

บทคัดย่อ

มะเร็งรังไข่จัดอยู่ใน 10 อันดับแรกของมะเร็งที่ถูกตรวจพบและเป็นสาเหตุการตายในเพศหญิง ณ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ประเทศไทย พบว่าผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ระยะที่ 3 และ 4 จะมีอัตราการมีชีวิตรอดที่ต่ำเนื่องมาจากการดื้อต่อยาเคมีบำบัด งานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาว่ากุกวาซินเจสามารถเพิ่มฤทธิ์ของยาเคมีบำบัดชนิด cisplatin และ paclitaxel ในการฆ่าเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยาได้หรือไม่ โดยพบว่าเซลล์รังไข่ดื้อยาชนิด SKOV-3 ดื้อต่อยาตั้งกล่าวทั้งสองชนิดเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ไม่ดื้อยาชนิด A2780 และเมื่อทำการบ่มเซลล์ SKOV-3 ร่วมกับยาเคมีบำบัดและ กุกวาซินเจ พบว่า กุกวาซินเจไปเพิ่มฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์ของ paclitaxel แต่ไม่มีผลต่อ cisplatin เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการศึกษาก่อนหน้านี้เราพบว่ากุกวาซินเจ ไปลดการดื้อยา paclitaxel ในมะเร็งปากมดลูกโดยการยับยั้งการทำงานของฟิกลัยโคโปรตีน ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีการแสดงออกใน SKOV-3 สูงด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าการเพิ่มฤทธิ์ของ paclitaxel โดยกุกวาซินเจในมะเร็งรังไข่ชนิด SKOV-3 นั้นไม่ได้ผ่านการยับยั้งการทำงานของฟิกลัยโคโปรตีน จึงได้ทำการศึกษากลไกของกุกวาซินเจที่ไปเพิ่มความไวของ SKOV-3 ต่อยา paclitaxel โดยดูการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวกับการตายของเซลล์ จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการบ่มเซลล์ SKOV-3 ร่วมกับ paclitaxel จะมีระดับของ survivin สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อทำการบ่มกุกวาซินเจร่วมกับ paclitaxel ในเซลล์ SKOV-3 พบว่าระดับของ survivin ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่บ่มด้วย paclitaxel เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้กุกวาซินเจยังไปเพิ่มระดับของ cleaved-PARP และ cleaved-caspase-3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่กระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะให้เห็นแนวโน้มที่จะศึกษาและพัฒนาการนำกุกวาซินเจ หรือสารสกัดใบมะระขี้นกไปใช้ร่วมกับการรักษามะเร็งรังไข่ด้วยยาเคมีบำบัด ซึ่งอาจจะช่วยลดการดื้อต่อยาเคมีบำบัด ทำให้การรักษามะเร็งรังไข่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

รหัสโครงการ : MRG5580128

ชื่อโครงการ : กลไกการยับยั้งการเจริญของมะเร็งรังไข่ที่ดื้อยาซิสพลาตินโดยสารไตรเทอร์ปีนอยด์ที่สกัดได้จากมะระขี้นกชนิดกุกวาซินเจ

ชื่อนักวิจัย : นางสาวพรสิริ พิจการ

สังกัด ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address : pornsiri.p@cmu.ac.th, pitchakarn@live.com

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2555 – 31 มีนาคม 2559

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาผลของ KuJ ต่อความไวต่อยาเคมีบำบัดชนิด PTX Dox และ Cis ของมะเร็งรังไข่ที่ติดต่อยาเคมีบำบัด
2. เพื่อศึกษาผลของ KuJ ต่อความไวต่อยา PTX Dox และ Cis ในการยับยั้งการแบ่งตัวของมะเร็งรังไข่ที่ติดต่อยาเคมีบำบัด
3. เพื่อศึกษาผลของ KuJ ต่อความไวต่อยาเคมีบำบัดในการกระตุ้นการตายแบบอะพอพโตซิสของมะเร็งรังไข่ที่ติดต่อยาเคมีบำบัด
4. เพื่อศึกษาผลของ KuJ ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัว และการตายแบบอะพอพโตซิสในมะเร็งรังไข่ที่ติดต่อยาเคมีบำบัด

วิธีทดลอง

การทดลองที่ 1

การศึกษาผลของ KuJ ยาเคมีบำบัดชนิด PTX Dox และ Cis ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาโดยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromine (MTT) Assay

1. นำเซลล์ A2780 CAOV-3 และ SKOV-3 เพาะเลี้ยงใน 96 well plate จำนวน 2,000 เซลล์/หลุม ที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลาไว้ 24 ชั่วโมง
2. เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี KuJ ยาเคมีบำบัดชนิด PTX Dox และ Cis ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลาใช้ micropipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก 100 µl/well แล้วเติม MTT-dye solution ปริมาณ 15 µl/well แล้วบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง
4. ใช้ micropipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมด แล้วเติม DMSO ปริมาณ 200 µl/well บ่มเซลล์เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงผสมสารละลายแต่ละหลุมด้วย micropipette แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วย ELISA reader (ความยาวคลื่น 540 nm และใช้ 630 nm เป็นตัวอ้างอิง)

คำนวณค่าอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ (%Survival) เทียบกับหลุมที่เป็นชุดควบคุม โดยกำหนดให้ชุดควบคุมมี %Survival เป็น 100%

$$\% \text{ Survival} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย OD จากหลุมทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ย OD จากหลุมควบคุม}}$$

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของ KuJ ต่อความไวต่อยา PTX Dox และ Cis ในการยับยั้ง
การเจริญของมะเร็งรังไข่ที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด

1. นำเซลล์ A2780 CAOV-3 และ SKOV-3 เพาะเลี้ยงใน 96 well plates จำนวน 2,000 เซลล์/หลุม ที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาเคมีบำบัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในภาวะที่มีหรือไม่มี KuJ ไปในแต่ละหลุม (ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในหลุมทดลองและหลุมควบคุมมีค่าเท่ากันและไม่เกิน 1%) บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลาใช้ micropipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก 100 µl/well แล้วเติม MTT-dye solution ปริมาณ 15 µl/well แล้วบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง
4. ใช้ micropipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมด แล้วเติม DMSO ปริมาณ 200 µl/well บ่มเซลล์เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงผสมสารละลายแต่ละหลุมด้วย micropipette แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วย ELISA reader (ความยาวคลื่น 540 nm และใช้ 630 nm เป็นตัวอ้างอิง)

คำนวณค่าอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ (%Survival) เทียบกับหลุมที่เป็นชุดควบคุม โดยกำหนดให้ชุดควบคุมมี %Survival เป็น 100%

$$\% \text{ Survival} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย OD จากหลุมทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ย OD จากหลุมควบคุม}}$$

การทดลองที่ 3 การแสดงออกของโปรตีนขับไล่อายาชนิด P-gp (ระดับโปรตีน) ใน เซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยา (SKOV-3 และ CAOV-3) และไม่ดื้อยา (A2780)

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด A2780 CAOV-3 และ SKOV-3 ใน 6 well-plate (5×10^6 cell/well) ที่ 37°C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เก็บเซลล์มาปั่นล้างด้วย PBS ที่ 10,000 rpm, 4°C นาน 2 นาที 3 ครั้ง
3. ทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer (10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 2 mM PMSF, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)
4. นำไปปั่นที่ 12,000 rpm, 4°C , 10 นาที แล้วเก็บ supernatant
5. นำโปรตีนที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford
6. นำโปรตีนที่ได้จากการแตกเซลล์ (10 $\mu\text{g}/\text{lane}$) ไปแยกตามขนาดด้วย 10% SDS-PAGE
7. ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปบน nitrocellulose membrane
8. นำ nitrocellulose membrane ไปชะด้วย 5% skimmed milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิห้องล้างด้วย 0.1% Tween-PBS 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
9. เติม primary antibody; anti-P-gp นำไปบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
10. ล้างด้วย 0.1% Tween-PBS 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
11. เติม second anti-body ; anti-mouse IgG linked to peroxidase เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิห้อง
12. ล้างด้วย 0.1% Tween-PBS 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
13. วัดการแสดงออกของฟอสโฟโปรตีนโดยใช้น้ำยา Supersignal[®] protein detection kit (ECL)
14. วิเคราะห์ผลโดยวิธี scanning densitometry

การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของ P-gp modulator ชนิด Ver ต่อความไวต่อยา PTX ในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งรังไข่ที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัดชนิด SKOV-3

1. นำเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ดื้อยาชนิด SKOV-3 เพาะเลี้ยงใน 96 well plates จำนวน 2,000 เซลล์/หลุม ที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาเคมีบำบัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในภาวะที่มีหรือไม่มี Ver ไปในแต่ละหลุม (ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในหลุมทดลองและหลุมควบคุมมีค่าเท่ากันและไม่เกิน 1%) บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลาใช้ micropipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก 100 µl/well แล้วเติม MTT-dye solution ปริมาณ 15 µl/well แล้วบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง
4. ใช้ micropipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมด แล้วเติม DMSO ปริมาณ 200 µl/well บ่มเซลล์เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงผสมสารละลายแต่ละหลุมด้วย micropipette แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วย ELISA reader (ความยาวคลื่น 540 nm และใช้ 630 nm เป็นตัวอ้างอิง)

คำนวณค่าอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ (%Survival) เทียบกับหลุมที่เป็นชุดควบคุม โดยกำหนดให้ชุดควบคุมมี %Survival เป็น 100%

$$\% \text{ Survival} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย OD จากหลุมทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ย OD จากหลุมควบคุม}}$$

การทดลองที่ 5 การศึกษาผลของ KuJ ร่วมกับ PTX ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งรังไข่ดื้อยาชนิด SKOV-3 โดยวิธี Microscopic evaluation

1. นำเซลล์มะเร็งรังไข่ดื้อยาชนิด SKOV-3 เพาะเลี้ยง 6 well plates จำนวน 250,000 เซลล์/หลุม ที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาเคมีบำบัดชนิด PTX ที่ความเข้มข้น 0 75 และ 100 µM ในภาวะที่มีหรือไม่มี KuJ ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 µM ไปในแต่ละหลุม (ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในหลุมทดลองและหลุมควบคุมมีค่าเท่ากันและไม่เกิน 1%) บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลาทำการถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 และ 200 เท่าตามลำดับ เพื่อสังเกตลักษณะที่เปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งรังไข่ เปรียบกันในแต่ละการทดลอง

การทดลองที่ 6 การศึกษาผลของ KuJ ร่วมกับ PTX ในการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ในเซลล์มะเร็งรังไข่ดื้อยาชนิด SKOV-3

1. นำเซลล์มะเร็งรังไข่ดื้อยาชนิด SKOV-3 เพาะเลี้ยง 6 well plates จำนวน 250,000 เซลล์/หลุม ที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาเคมีบำบัดชนิด PTX ที่ความเข้มข้น 0 75 และ 100 µM ในภาวะที่มีหรือไม่มี KuJ ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 µM ไปในแต่ละหลุม (ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในหลุมทดลองและหลุมควบคุมมีค่าเท่ากันและไม่เกิน 1%) บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์มาปั่นล้างด้วย PBS ที่ 10,000 rpm, 4 °C นาน 2 นาที 3 ครั้ง จากนั้นทำการเติม 70% methanol เก็บเซลล์ไว้ที่ -20 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
4. ทำการย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide (Guava® cell cycle reagent, Guava Technologies, Hayward, CA, USA)

การทดลองที่ 7

**การศึกษาผลของ KuJ ร่วมกับ PTX ต่อการแสดงออกของ Survivin
PARP และ cleaved-caspase 3 ในระดับโปรตีนในเซลล์มะเร็งรังไข่ที่คือ
ยาสชนิด SKOV-3 โดยวิธี Western blot analysis**

1. นำเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 เพาะเลี้ยง 6 well plates จำนวน 250,000 เซลล์/หลุม ที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาเคมีบำบัดชนิด PTX ที่ความเข้มข้น 0 75 และ 100 µM ในภาวะที่มีหรือไม่มี KuJ ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 µM ไปในแต่ละหลุม (ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในหลุมทดลองและหลุมควบคุมมีค่าเท่ากันและไม่เกิน 1%) บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์มาปั่นล้างด้วย PBS ที่ 10,000 rpm, 4 °C นาน 2 นาที 3 ครั้ง
4. ทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer (10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM PMSF, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) ในน้ำแข็ง 30 นาที
5. นำไปปั่นที่ 12,000 rpm, 4 °C, 10 นาที แล้วเก็บ supernatant
6. นำโปรตีนที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford
7. นำโปรตีนที่ได้จากการแตกเซลล์ (10 µg/lane) ไปแยกตามขนาดด้วย 10% SDS-PAGE
8. ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปบน nitrocellulose membrane
9. นำ nitrocellulose membrane ไปชะด้วย 5% skimmed milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
10. ล้างด้วย 0.1% Tween-PBS 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
11. เติม primary antibody; anti-survivin, anti-PARP และ anti-caspase 3 antibody นำไปบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
12. ล้างด้วย 0.1% Tween-PBS 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
13. เติม second anti-body ; anti-mouse IgG linked to peroxidase หรือ anti-rabbit IgG linked to peroxidase เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
14. ล้างด้วย 0.1% Tween-PBS 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
15. วัดการแสดงออกของฟิกส์โคโปรตีนโดยใช้น้ำยา Supersignal[®] protein detection kit (ECL)
16. วิเคราะห์ผลโดยวิธี scanning densitometry

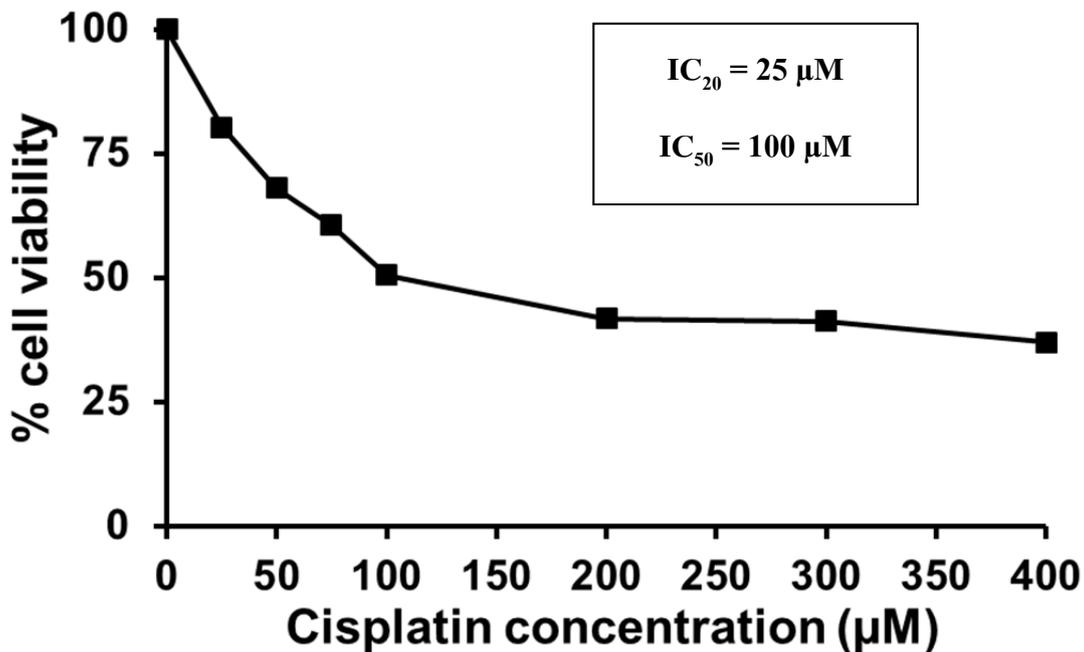
ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1 การศึกษาผลของยาเคมีบำบัดชนิด Cis, Dox, PTX และ KuJ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด SKOV-3 CAOV-3 และ A2780

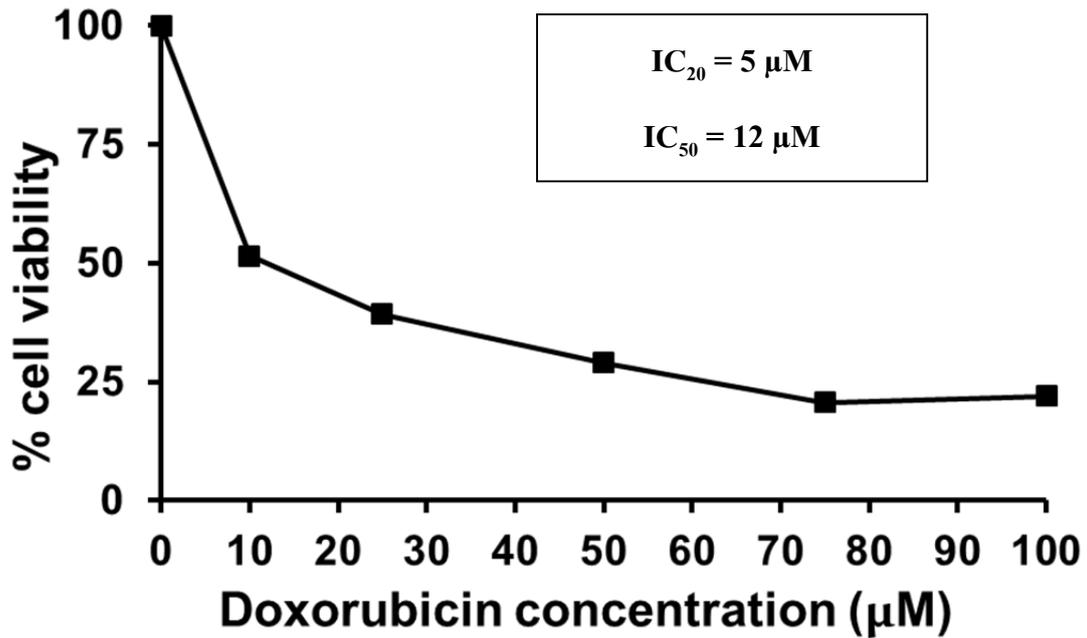
จากการทดสอบเปรียบเทียบการดื้อยาเคมีบำบัดชนิด Cis Dox และ PTX ในเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดดื้อยา SKOV-3, CAOV-3 และเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ไวต่อยา A2780 พบว่าผลของยาเคมีบำบัดทั้ง 3 ชนิดต่อเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาชนิด SKOV-3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 100 μ M, 12 μ M และมากกว่า 100 μ M ตามลำดับ ในส่วนผลของ KuJ ต่อเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาชนิด SKOV-3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 40 μ M ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 1 - 4

ผลของยาเคมีบำบัดชนิด Cis Dox และ PTX ต่อเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาชนิด CAOV-3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 33 μ M, 95 nM และ 35 μ M ตามลำดับ ในส่วนผลของ KuJ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 30 μ M ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 5-8

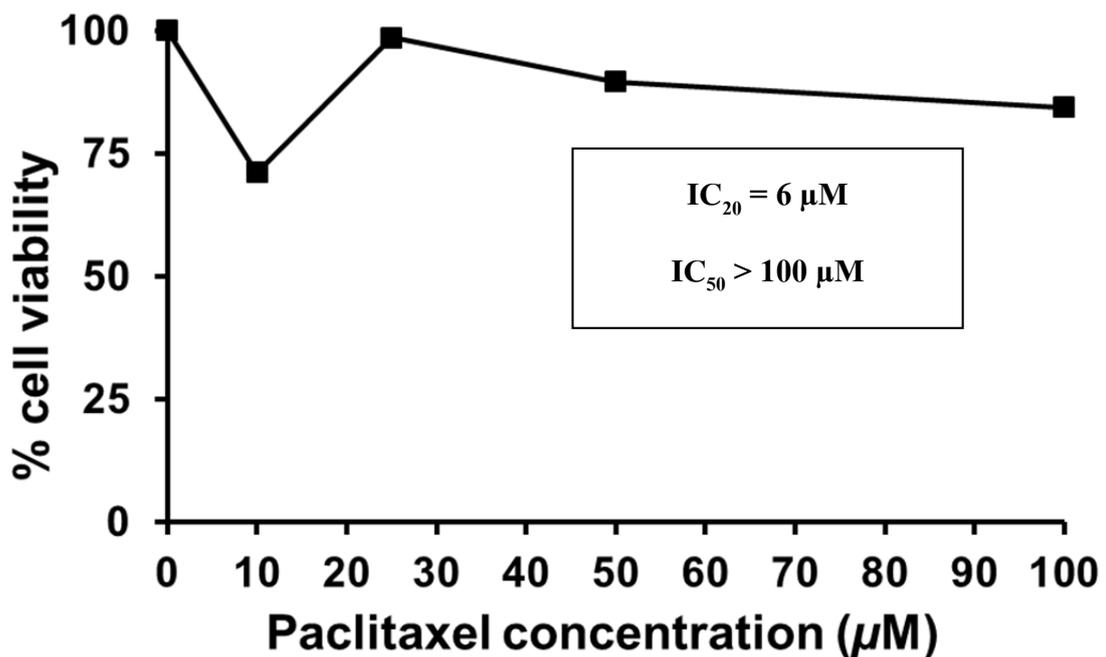
ผลของยาเคมีบำบัดชนิด Cis Dox และ PTX ต่อเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาชนิด A2780 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 20 μ M, 54 nM และ 26 nM ตามลำดับ และในส่วนผลของ KuJ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 18 μ M ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 9-12



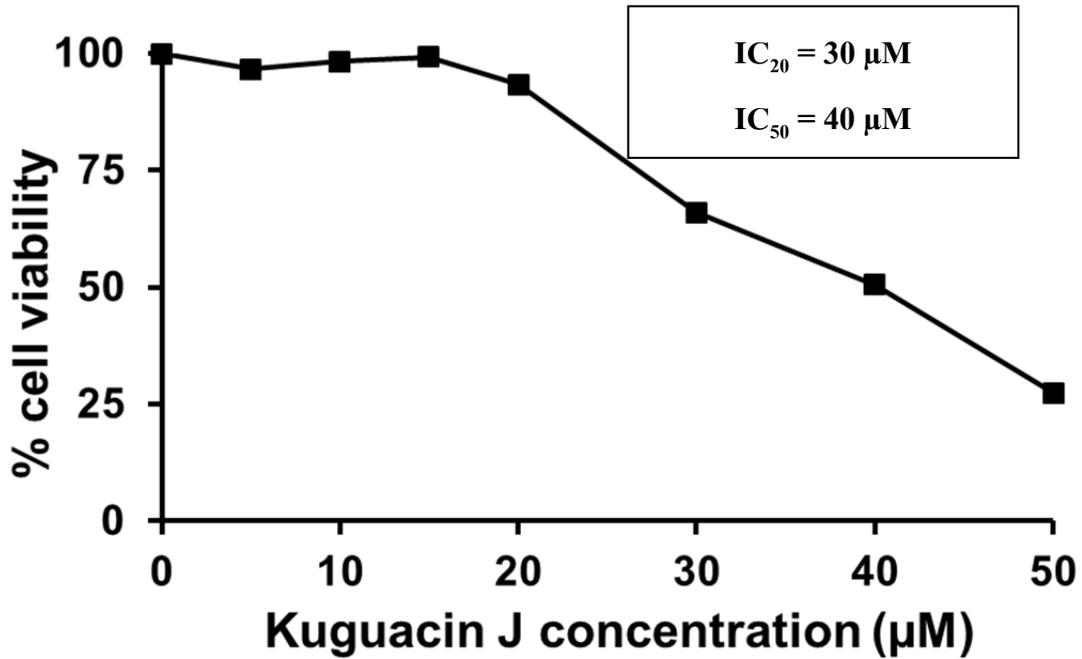
รูปที่ 1 ผลของยาเคมีบำบัดชนิด Cis ที่ความเข้มข้น 0-400 μ M ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่ไม่มนุษย์ชนิดคือยา (SKOV-3)



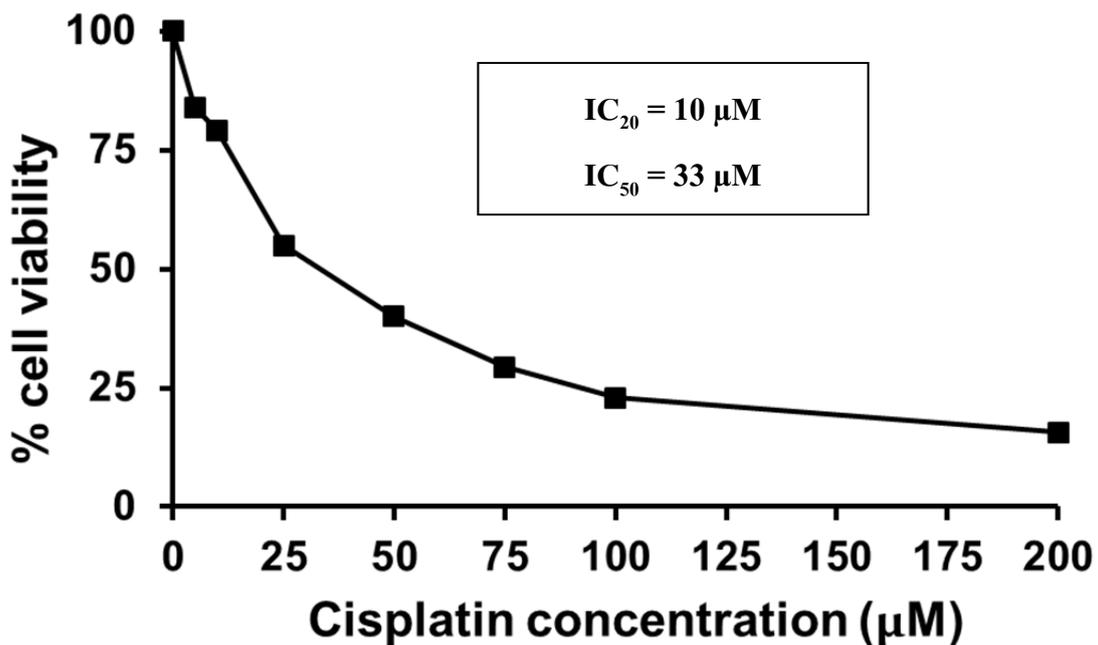
รูปที่ 2 ผลของยาเคมีบำบัดชนิด Dox ที่ความเข้มข้น 0-100 µM ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ชนิดคือยา (SKOV-3)



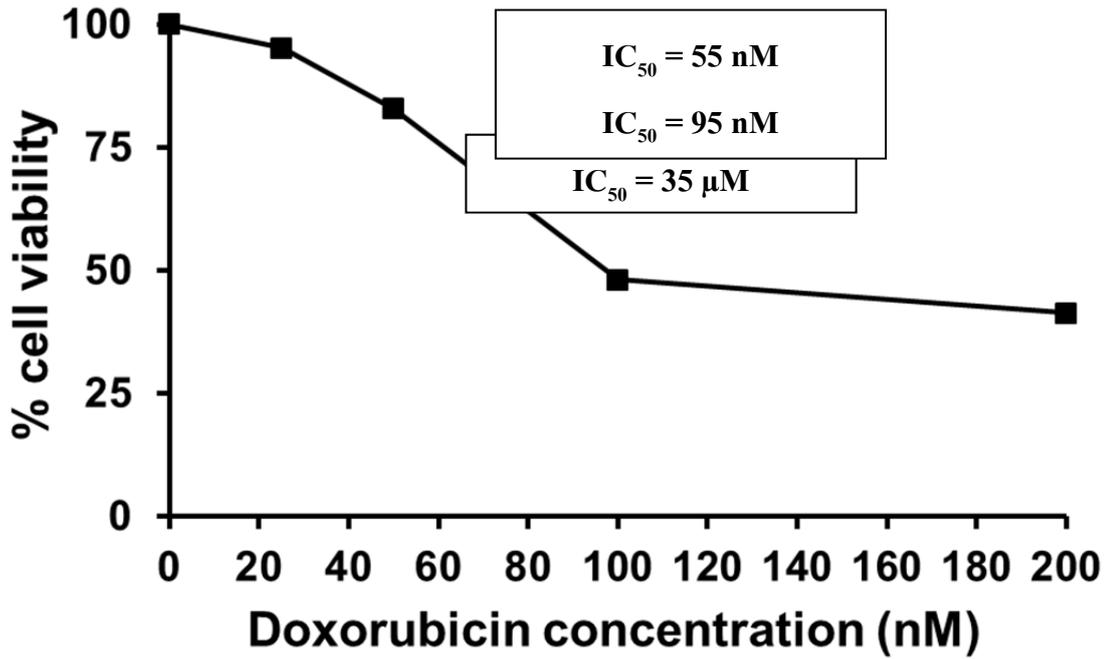
รูปที่ 3 ผลของยาเคมีบำบัดชนิด PTX ที่ความเข้มข้น 0-100 µM ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ชนิดคือยา (SKOV-3)



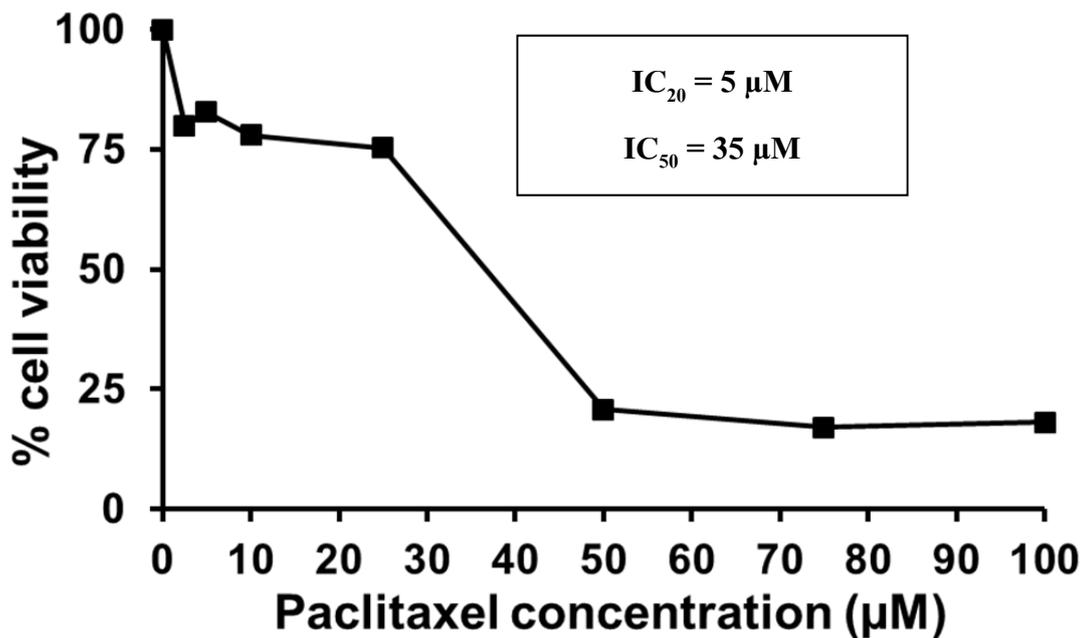
รูปที่ 4 ผลของ KuJ ที่ความเข้มข้น 0-50 μM ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่ไม่มนุษย์ชนิดดื้อยา (SKOV-3)



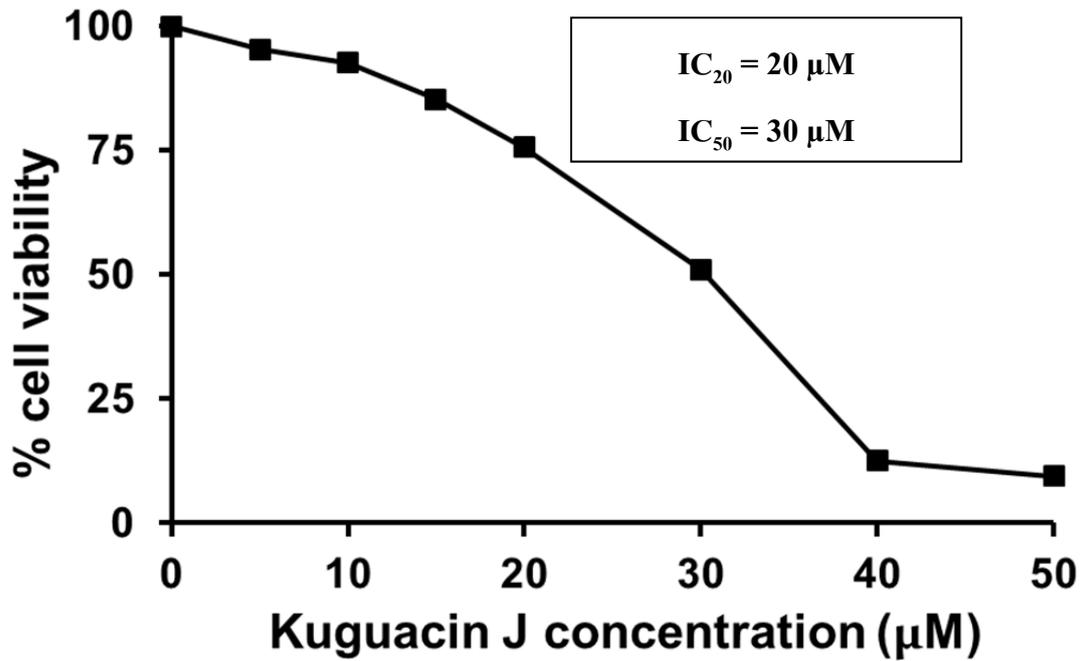
รูปที่ 5 ผลของยาเคมีบำบัดชนิด Cis ที่ความเข้มข้น 0-200 μM ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่ไม่มนุษย์ชนิดดื้อยา (CAOV-3)



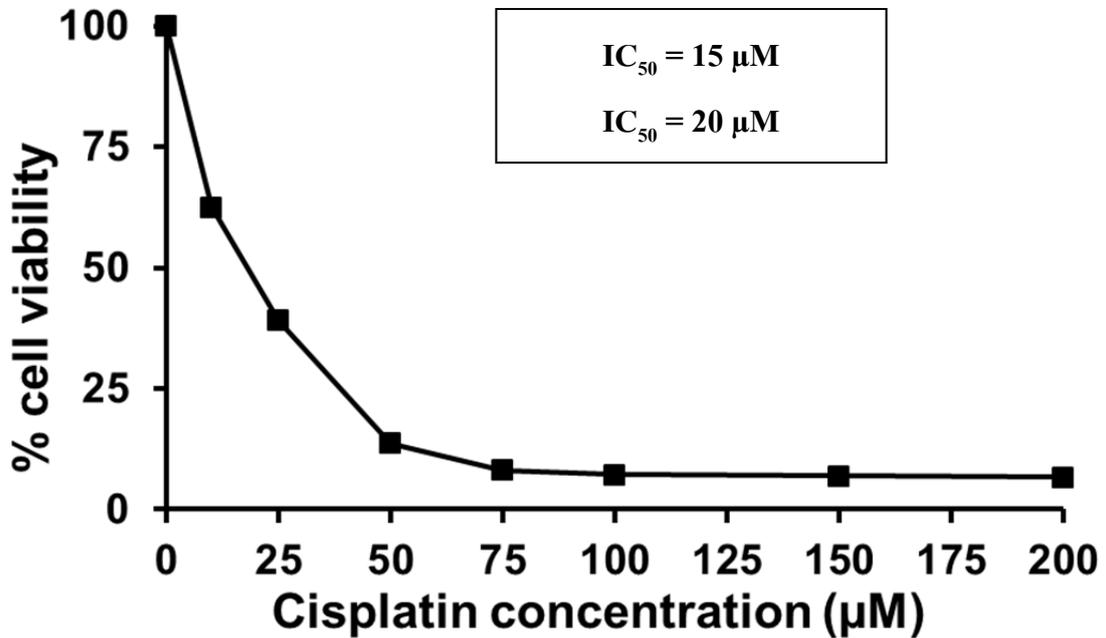
รูปที่ 6 ผลของยาเคมีบำบัดชนิด Dox ที่ความเข้มข้น 0-200 nM ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ชนิดดื้อยา (CAOV-3)



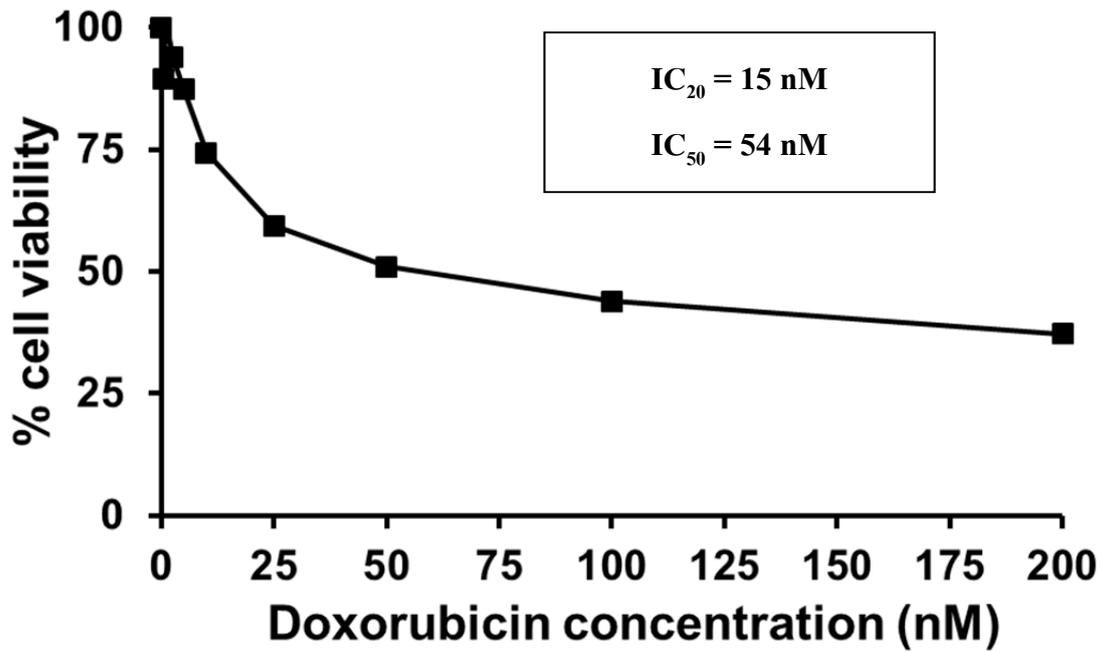
รูปที่ 7 ผลของยาเคมีบำบัดชนิด PTX ที่ความเข้มข้น 0-100 μM ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ชนิดดื้อยา (CAOV-3)



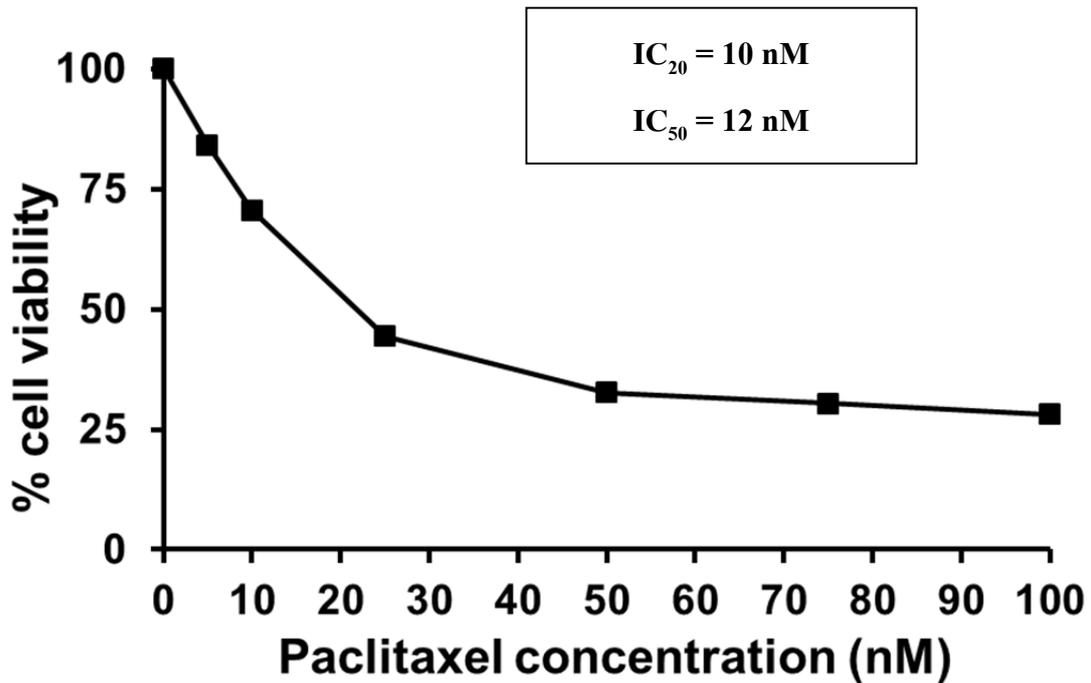
รูปที่ 8 ผลของ KuJ ที่ความเข้มข้น 0-50 μM ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ชนิดต่อเยื่อ (CAOV-3)



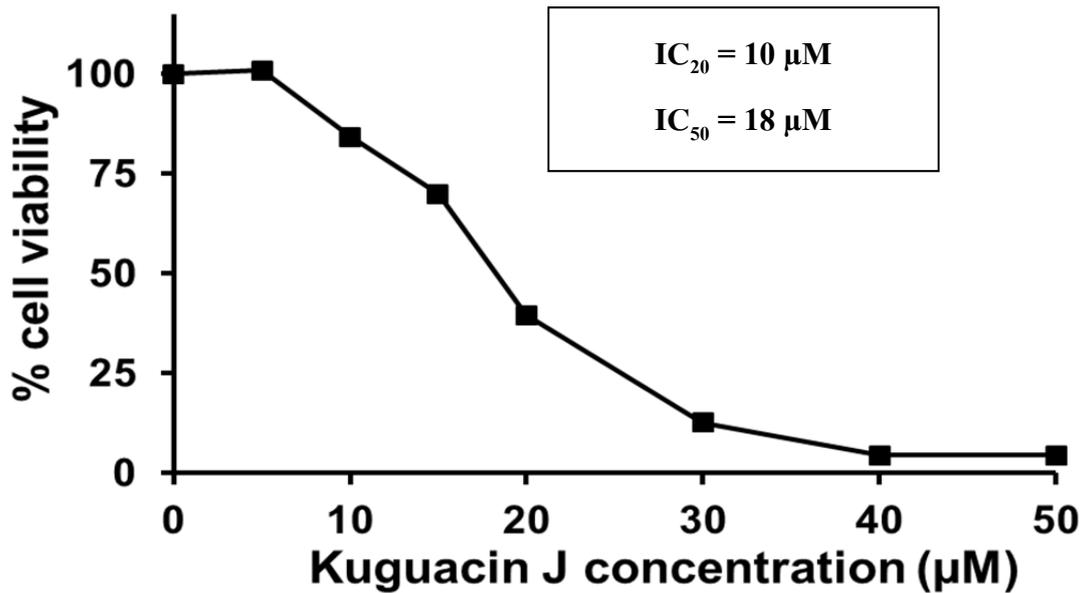
รูปที่ 9 ผลของยาเคมีบำบัดชนิด Cis ที่ความเข้มข้น 0-200 μM ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ชนิดต่อเยื่อ (A2780)



รูปที่ 10 ผลของยาเคมีบำบัดชนิด Dox ที่ความเข้มข้น 0-200 nM ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ชนิดคือยา (A2780)



รูปที่ 11 ผลของยาเคมีบำบัดชนิด PTX ที่ความเข้มข้น 0-100 nM ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ชนิดคือยา (A2780)



รูปที่ 12 ผลของ KuJ ที่ความเข้มข้น 0-50 µM ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ชนิดดื้อยา (A2780)

ตารางที่ 1 แสดงค่า IC_{20} และ IC_{50} ของยาเคมีบำบัดชนิด Cis Dox PTX และ KuJ ในเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ชนิดดื้อยา (SKOV-3 และ CAOV-3) และเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ชนิดไม่ดื้อยา (A2780) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

Treatment	SKOV-3		CAOV-3		A2780	
	IC_{20}	IC_{50}	IC_{20}	IC_{50}	IC_{20}	IC_{50}
Cis	25 µM	100 µM	10 µM	33 µM	15 µM	20 µM
Dox	5 µM	12 µM	55 nM	95 nM	15 nM	54 nM
PTX	6 µM	>100 µM	5 µM	35 µM	10 nM	26 nM
KuJ	30 µM	40 µM	20 µM	30 µM	10 µM	18 µM

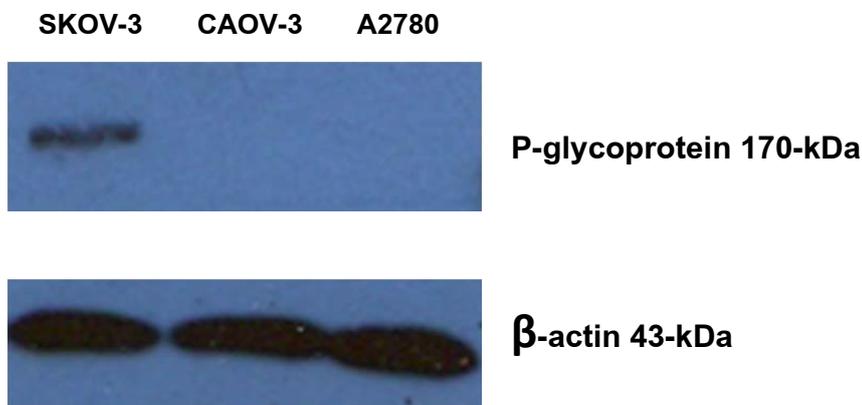
IC_{20} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 20%

IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 50%

ผลการทดลองที่ 2 การแสดงออกของ P-gp (ระดับโปรตีน) ในเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยา (SKOV-3 และ CAOV-3) และเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ไม่ดื้อยา (A2780)

จากในการทดลองที่ 1 ทางคณะผู้วิจัย มีความสนใจที่จะนำ KuJ ซึ่งเป็นสารสำคัญ มาลดการดื้อยาของเซลล์มะเร็งรังไข่ แต่อย่างไรก็ตามกลไกการดื้อยาในเซลล์มะเร็งรังไข่นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดรวมถึงผู้วิจัยนั้นได้เคยรายงานฤทธิ์ของ KuJ ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขับยาชนิด P-gp ซึ่งทำให้ยาเคมีบำบัดสะสมในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ดื้อยาเคมีบำบัด (KB-V1) และฆ่าเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้มากขึ้น ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยาเคมีบำบัด อาจจะมีการแสดงออกของโปรตีนขับไล่ยาชนิด P-gp ที่สูง ซึ่งอาจเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เซลล์มะเร็งชนิดนี้ดื้อต่อยาเคมีบำบัด ดังนั้นในการทดลองนี้ ผู้วิจัยจึงได้ทดลองเปรียบเทียบการแสดงออกของ P-gp ระหว่างเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยาชนิด SKOV-3 และ CAOV-3 และ เซลล์มะเร็งรังไข่ที่ไม่ดื้อยาชนิด A2780

จากการทดลองเปรียบเทียบการแสดงออกของ P-gp ระหว่างเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยาชนิด SKOV-3 และ CAOV-3 และ เซลล์มะเร็งรังไข่ที่ไม่ดื้อยาชนิด A2780 พบว่า เซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยาชนิด SKOV-3 มีการแสดงออกของ P-gp ที่สูงกว่าเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด A2780 และ CAOV-3 ดังแสดงผลการทดลองในรูปแบบที่ 13



รูปที่ 13 การแสดงออกของ P-gp (ระดับโปรตีน) ในเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยา (SKOV-3 และ CAOV-3) และเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ไม่ดื้อยา (A2780)

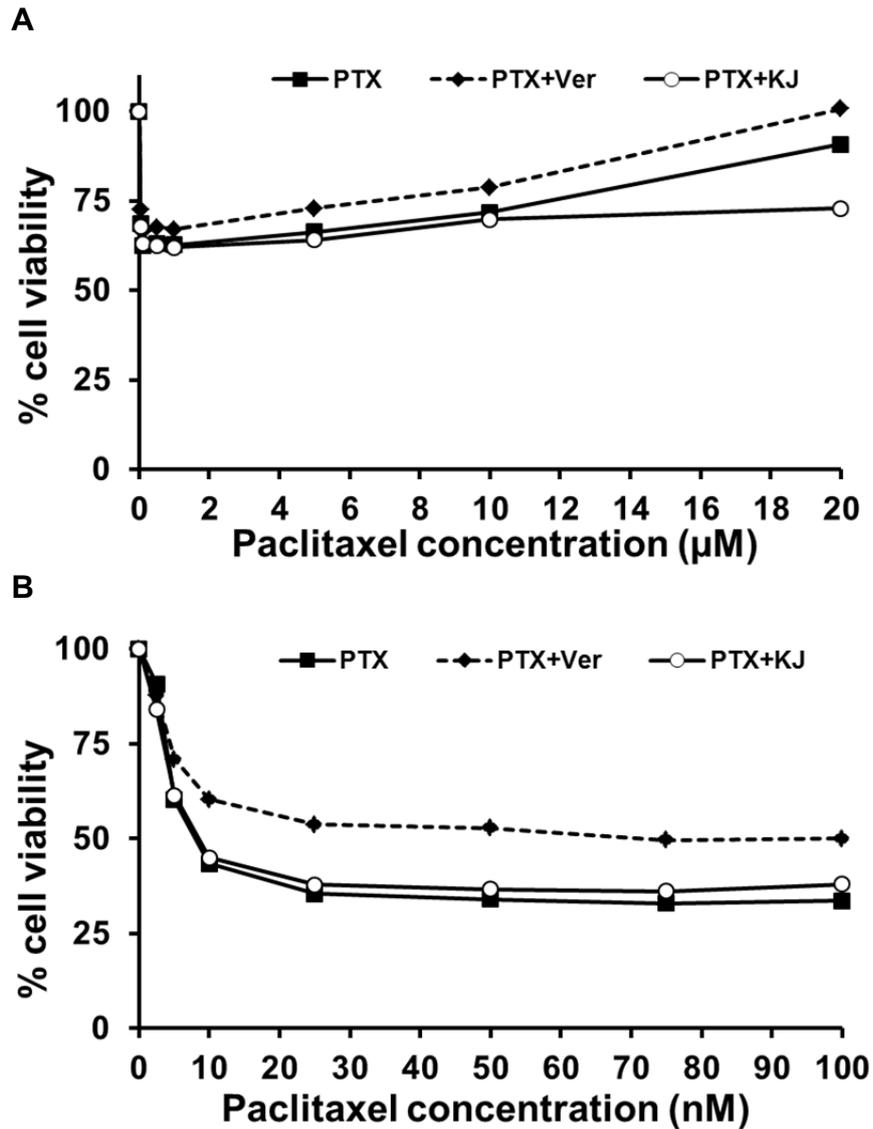
ผลการทดลองที่ 3 การศึกษาผลของ KuJ ต่อความไวต่อยา PTX ในการยับยั้งการเจริญของ มะเร็งรังไข่ที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด

จากการทดลองที่ 2 พบว่าเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยาชนิด SKOV-3 ซึ่งมีการแสดงออกของ P-gp ที่สูงกว่าเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ไม่ดื้อยาชนิด A2780 ดังนั้นการแสดงออกของโปรตีนขับไล่ยาชนิด P-gp ที่สูง อาจเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เซลล์มะเร็งชนิดนี้ดื้อต่อยาเคมีบำบัด ในการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบว่า P-gp นั้นมีบทบาทในการดื้อยาของเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด SKOV-3 หรือไม่ โดยได้นำ KuJ มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของ P-gp โดยมี Ver ซึ่งเป็นสารที่ทราบกันดีกว่าเป็นตัวยับยั้ง P-gp (P-gp modulator) และใช้เป็น ตัวควบคุมบวก (Positive control) ในการศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้งการดื้อยาผ่าน P-gp ในเซลล์มะเร็ง มาทดสอบ โดยนำ KuJ 5 μM หรือ Ver 15 μM มาบ่มร่วมกับ ยาเคมีบำบัดชนิด PTX ซึ่งเป็นสับสเตรทจำเพาะต่อ P-gp (กลุ่มทดลอง) เทียบกับการบ่มเซลล์ด้วยยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว (กลุ่มควบคุม) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลการทดลอง เมื่อนำ KuJ ความเข้มข้น 5 μM บ่มร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ที่ความเข้มข้น 0-20 μM พบว่า ไม่สามารถลดค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็งรังไข่ดื้อยาชนิด SKOV-3 และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หมายความว่า KuJ ไม่สามารถเพิ่มความไวต่อ PTX ของเซลล์มะเร็งรังไข่ดื้อยาชนิด SKOV-3 ได้

ผลการทดลอง เมื่อนำ KuJ ความเข้มข้น 5 μM บ่มร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ที่ความเข้มข้น 0-100 nM พบว่า ไม่สามารถลดค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็งรังไข่ไม่ดื้อยาชนิด A2780 และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หมายความว่า KuJ ไม่สามารถเพิ่มความไวต่อ PTX ของ เซลล์มะเร็งรังไข่ดื้อยาชนิด A2780 ได้ เช่นกัน

การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าแม้เซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยาชนิด SKOV-3 จะมีการแสดงออกของ P-gp ที่สูง กว่าเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ไม่ดื้อยาชนิด A2780 แต่การแสดงออกของ P-gp นี้ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับการ ดื้อยาเคมีบำบัดในเซลล์มะเร็งรังไข่ ดังนั้นกลไกการดื้อยาในเซลล์มะเร็งรังไข่อาจจะเกี่ยวกับการส่ง สัญญาณภายในเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 14



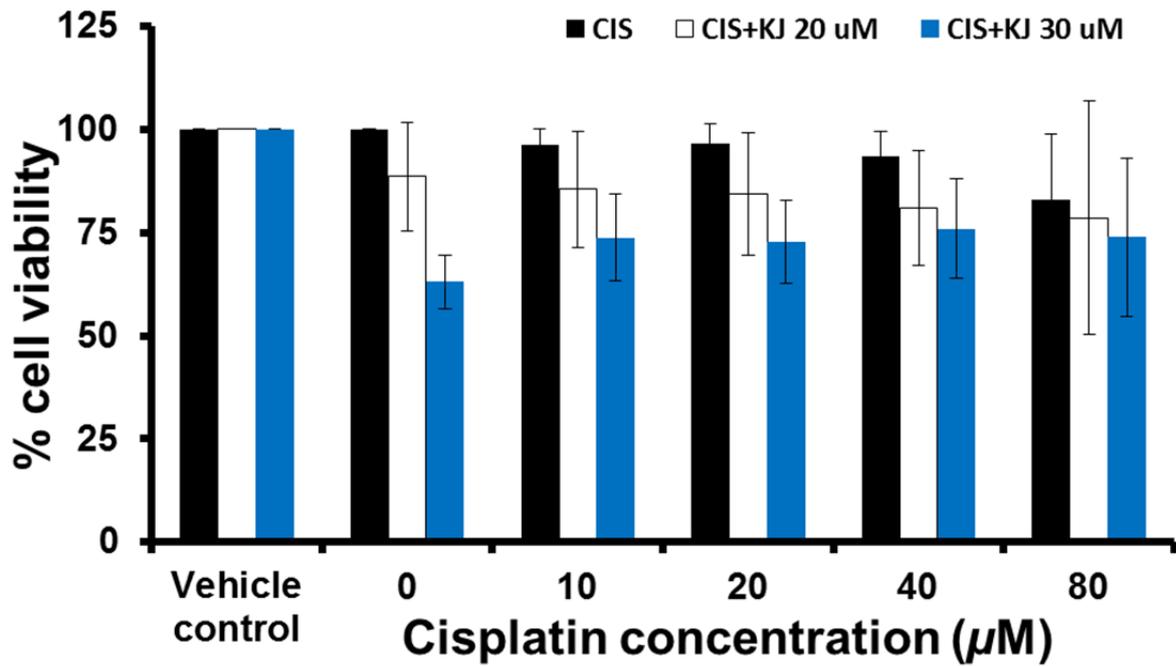
รูปที่ 14 ผลของ KuJ และ Ver ที่ความเข้มข้น 5 และ 15 μM ตามลำดับ ต่อการตอบสนองความไวของ ยารักษามะเร็งชนิด PTX ในเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ที่ดื้อยา (SKOV-3) (A) และเซลล์มะเร็งรังไข่ ที่ไวต่อยา (A2780) (B) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ผลการทดลองที่ 4 การศึกษาผลของ KuJ ร่วมกับ Cis Dox และ PTX ในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งรังไข่ที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด (SKOV-3 และ CAOV3)

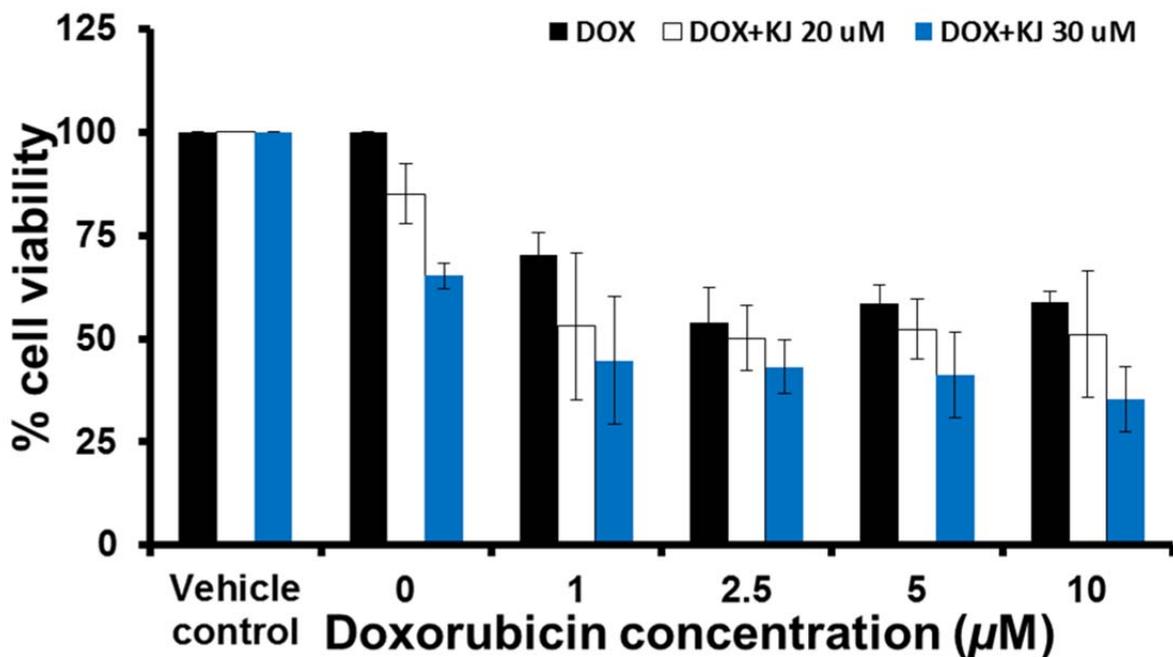
จากการศึกษาผลของ KuJ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด Cis Dox และ PTX ในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งรังไข่ที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด (SKOV-3 และ CAOV-3) และชนิดไม่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด (A2780)

พบว่า KuJ ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 μM ใช้ร่วมกับ PTX ที่ความเข้มข้นต่ำ (0-25 μM) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ SKOV-3 (ระหว่าง PTX 0 μM กับ PTX 0 μM + KJ 30 μM , $P<0.05$, ระหว่าง PTX 10 μM กับ PTX 10 μM +KJ 30 μM , $P<0.01$, ระหว่าง PTX 25 μM กับ PTX 25 μM + KJ 20 μM และ PTX 25 μM กับ PTX 25 μM + KJ 30 μM ตามลำดับ, $P<0.05$) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ KuJ ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 μM ใช้ร่วมกับ PTX ที่ความเข้มข้นสูง (50-100 μM) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ SKOV-3 (ระหว่าง PTX 50 μM กับ PTX 50 μM + KJ 20 μM และ PTX 50 μM + KJ 30 μM ตามลำดับ, $P<0.05$, ระหว่าง PTX 100 μM กับ PTX 100 μM + KJ 20 μM และ PTX 100 μM + KJ 30 μM ตามลำดับ, $P<0.05$) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพยาเคมีบำบัดชนิด Cis และ Dox ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 15-17

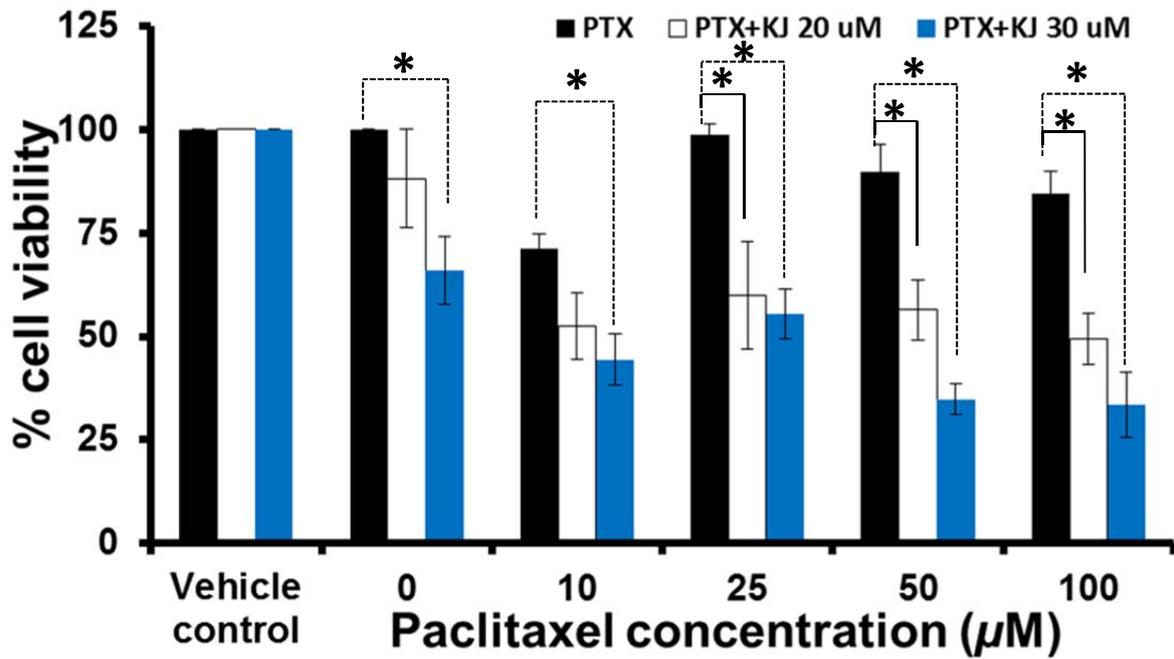
ในส่วนของเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดดื้อยา (CAOV-3) และไม่ดื้อยา (A2780) ไม่พบว่า KuJ ทั้งที่ความเข้มข้น 20 และ 30 μM เมื่อใช้ร่วมกับ Cis Dox และ PTX ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นั้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 18-23



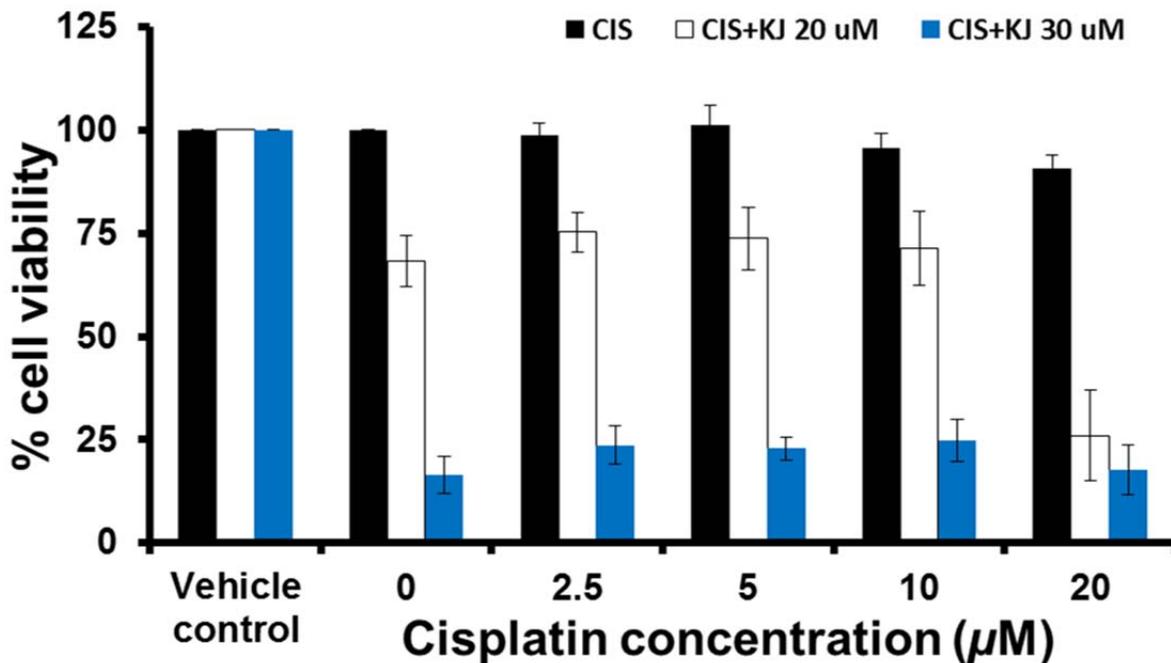
รูปที่ 15 ผลของ KuJ ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 μM ตามลำดับ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด Cis ที่ความเข้มข้น 0-80 μM ในเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ที่ดีอยา (SKOV-3) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง



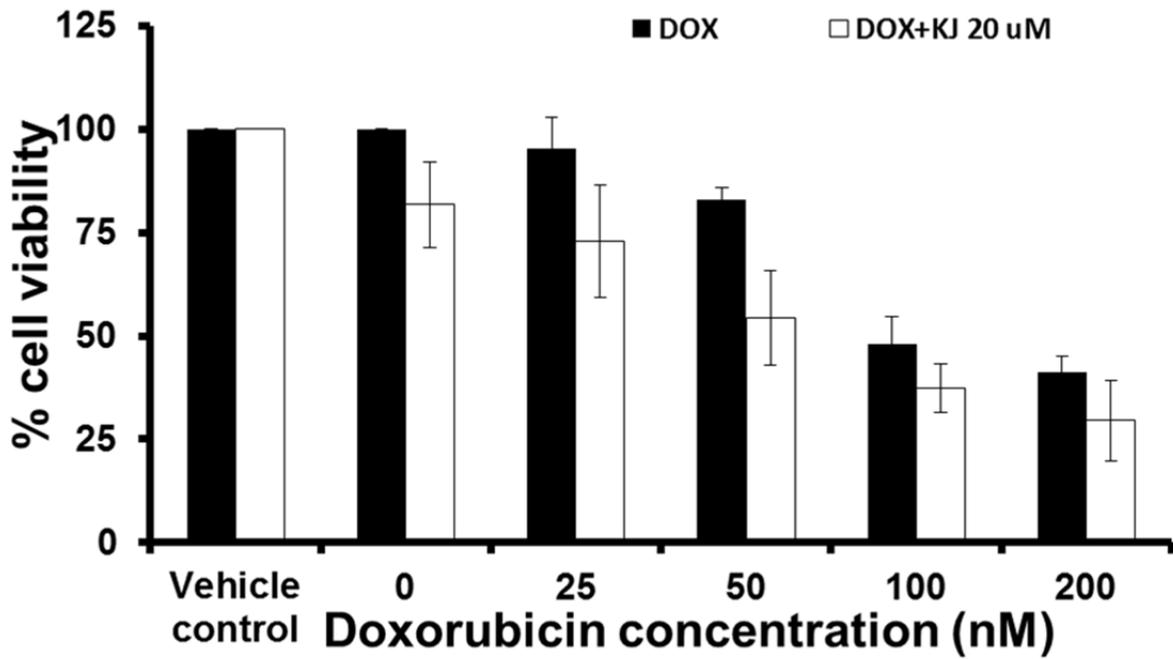
รูปที่ 16 ผลของ KuJ ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 μM ตามลำดับ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด Dox ที่ความเข้มข้น 0-10 μM ในเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ที่ดีอยา (SKOV-3) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง



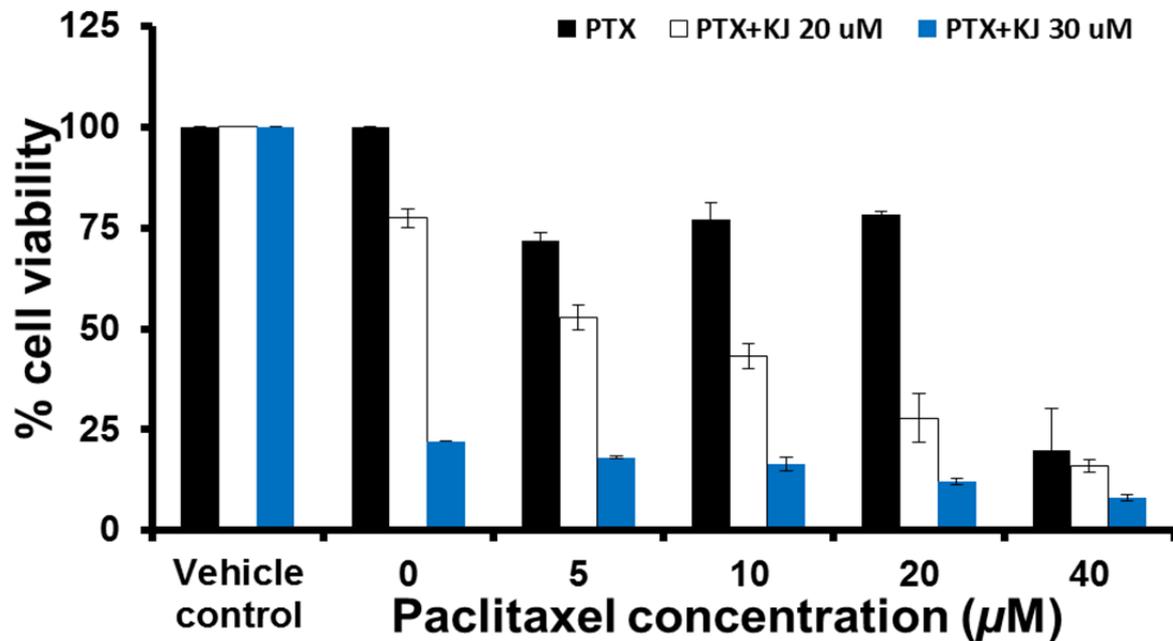
รูปที่ 17 ผลของ KuJ ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 μM ตามลำดับ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ที่ความเข้มข้น 0-100 μM ในเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ที่ดื้อยา (SKOV-3) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง (**, $P < 0.01$ และ ***, $P < 0.05$)



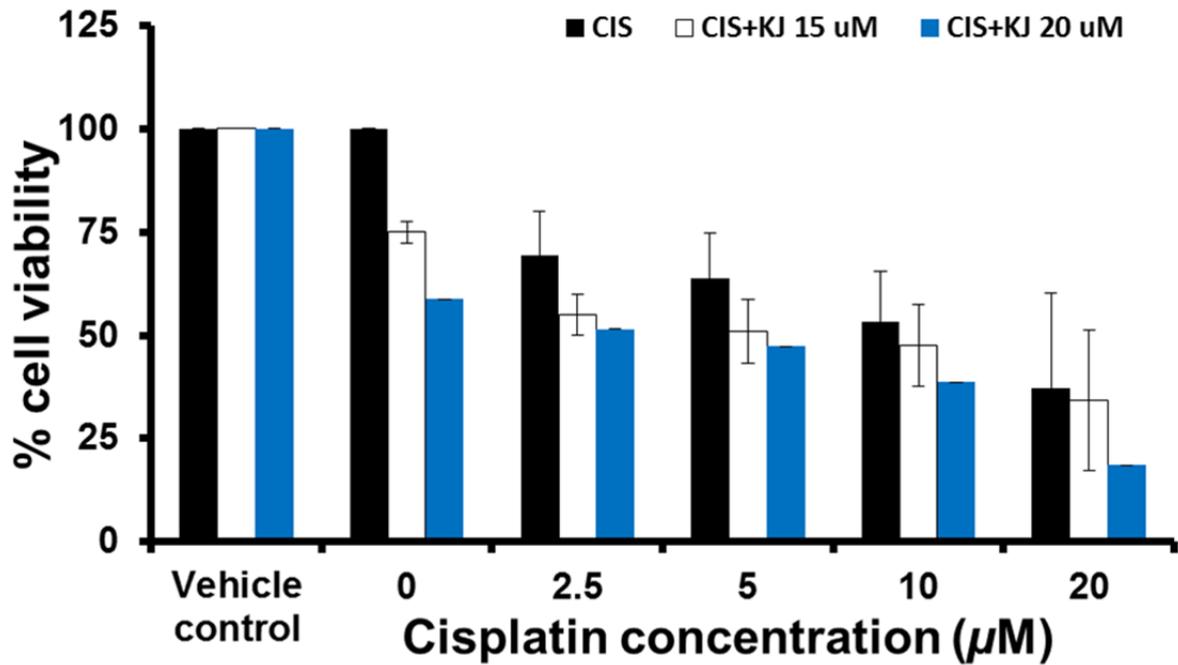
รูปที่ 18 ผลของ KuJ ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 μM ตามลำดับ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด Cis ที่ความเข้มข้น 0-20 μM ในเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ที่ดื้อยา (CAOV-3) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง



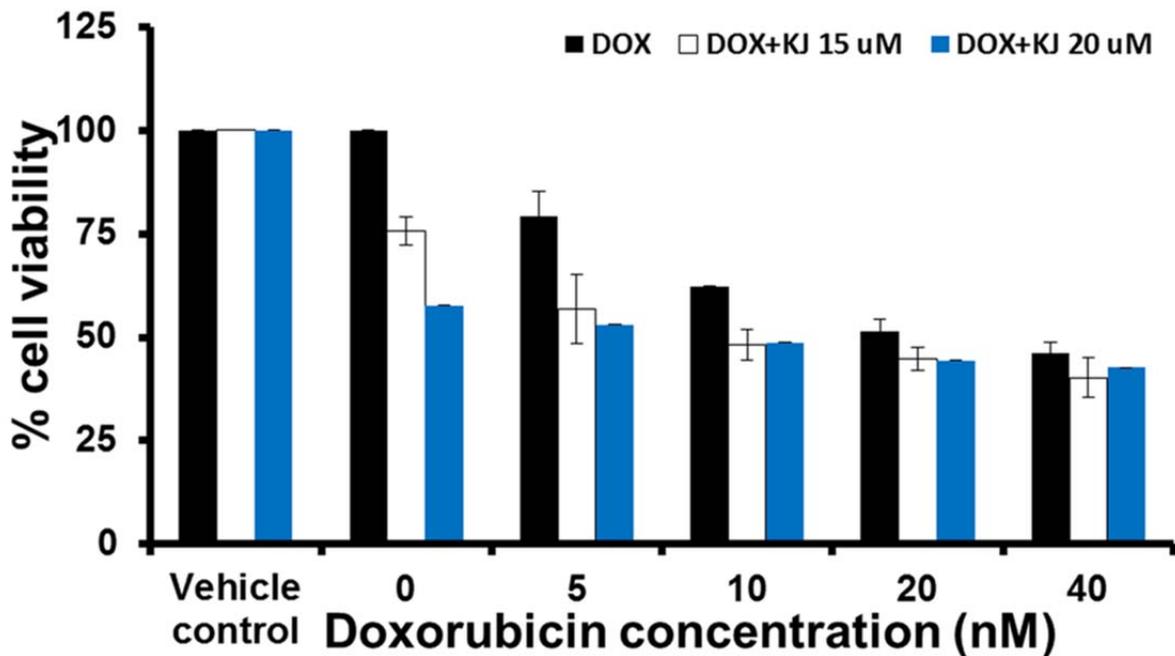
รูปที่ 19 ผลของ KuJ ที่ความเข้มข้น 20 μM ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด Dox ที่ความเข้มข้น 0-200 nM ในเซลล์มะเร็งรังไข่ไม่หุຍที่ดื้อยา (CAOV-3) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง



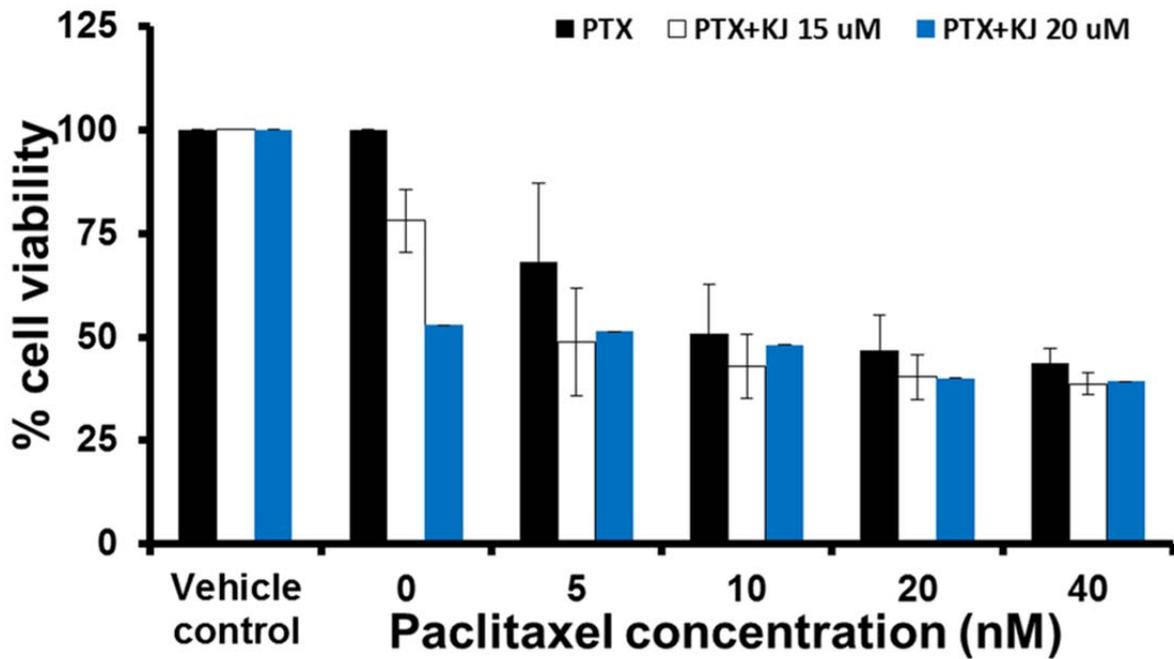
รูปที่ 20 ผลของ KuJ ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 μM ตามลำดับ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ที่ความเข้มข้น 0-40 μM ในเซลล์มะเร็งรังไข่ไม่หุຍที่ดื้อยา (CAOV-3) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 21 ผลของ KuJ ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 μM ตามลำดับ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด Cis ที่ความเข้มข้น 0-20 μM ในเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ที่ไม่ดี้อยา (A2780) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 23 ผลของ KuJ ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 μM ตามลำดับ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด Dox ที่ความเข้มข้น 0-40 nM ในเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ที่ไม่ดี้อยา (A2780) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

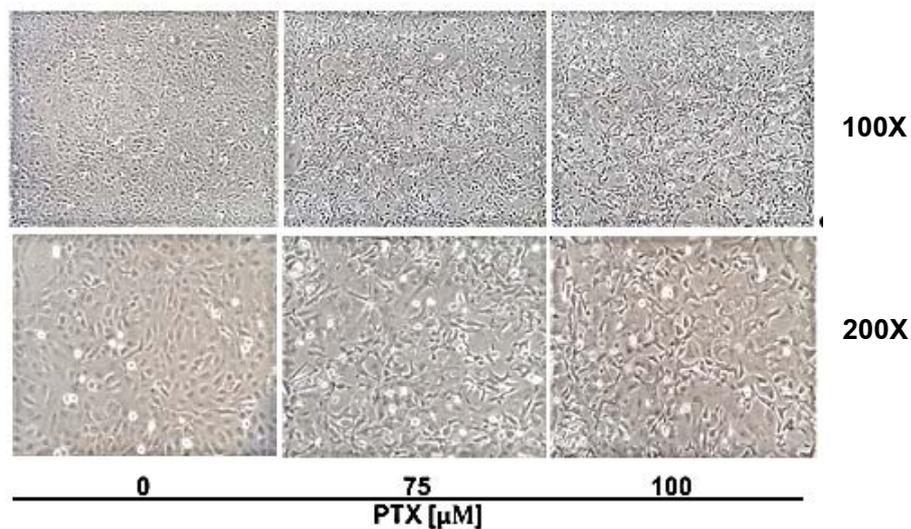


รูปที่ 22 ผลของ KuJ ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 μM ตามลำดับ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ที่ความเข้มข้น 0-40 nM ในเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ไวต่อยา (A2780) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

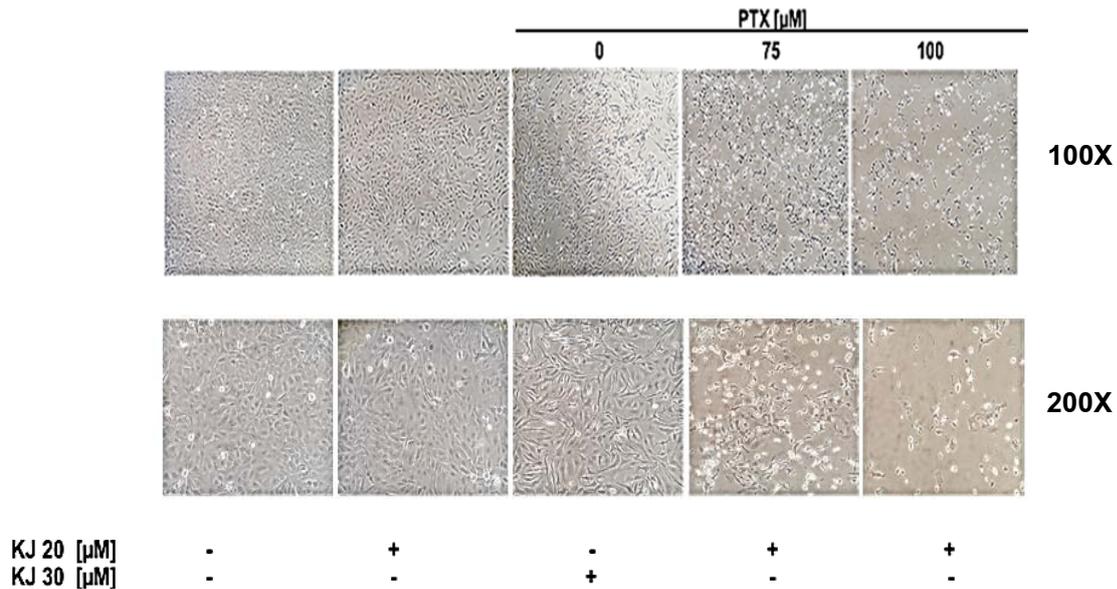
การทดลองที่ 5 การศึกษาผลของ KuJ ร่วมกับ PTX ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งรังไข่ต่อยาสกัดชนิด SKOV-3 โดยวิธี Microscopic evaluation

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อยาเคมีบำบัดชนิด PTX ความเข้มข้น 0-100 μM ในเซลล์มะเร็งรังไข่ต่อยาสกัด SKOV-3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยสังเกตจำนวนเซลล์ (cell numbers) และลักษณะรูปร่างของเซลล์ (cell morphology) โดยวิธี Microscopic evaluation ด้วยกล้อง phase contrast microscope พบว่า เมื่อมีการเติมยาเคมีบำบัดชนิด PTX ลงไปพร้อมกับเซลล์ SKOV-3 จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงในด้านจำนวนเซลล์และลักษณะรูปร่างของเซลล์เพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้บำบัดด้วยยาเคมีบำบัด ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 23

จากการผลการทดลองข้างต้น เมื่อนำ KuJ ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 μM มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ความเข้มข้น 0-100 μM ในเซลล์มะเร็งรังไข่ ชนิด SKOV3 โดยสังเกตจำนวนเซลล์ (cell numbers) และลักษณะรูปร่างของเซลล์ (cell morphology) โดยวิธี Microscopic evaluation พบว่า เมื่อมีการเติม KuJ ที่ความเข้มข้น 20 μM ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ลงไปพร้อมกับเซลล์ SKOV-3 จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงในด้านจำนวนเซลล์และลักษณะรูปร่างของ เซลล์อย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่บ่มด้วยยาเคมีบำบัดอย่างเดียว โดยการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ KuJ ที่ความเข้มข้น 30 μM มีผลทำให้เซลล์เปลี่ยนรูปร่าง จึงตั้งสมมติฐานไว้ว่า เป็นความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ จึงเลือกใช้ KuJ ที่ความเข้มข้น 20 μM ในการทดลองถัดไป ดังแสดงผลการทดลองใหญ่รูป ที่ 24



รูปที่ 23 ผลของ PTX ที่ความเข้มข้นที่ 0-100 μM ตามลำดับ ในเซลล์มะเร็งรังไข่ตัวยานชนิด SKOV-3 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย 100 และ 200 เท่า)



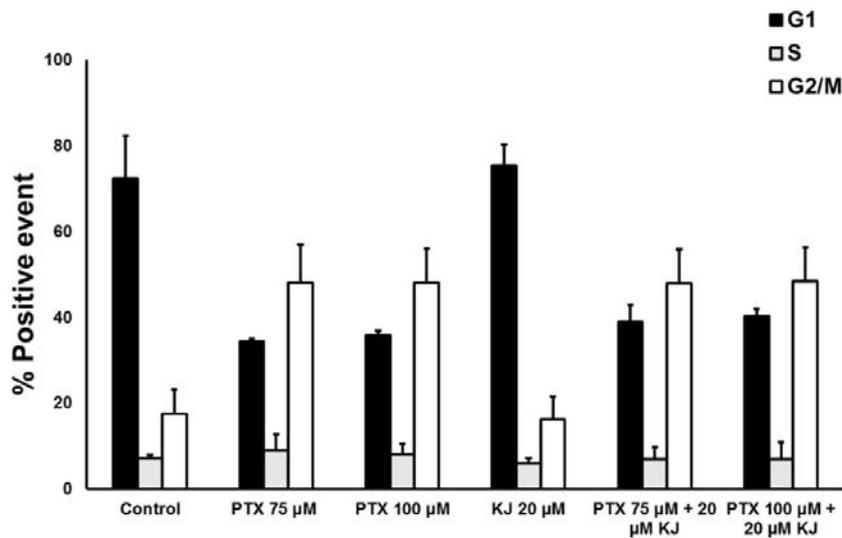
รูปที่ 24 ผลของ KuJ ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 μM ตามลำดับ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ที่ความเข้มข้น 0-100 μM ในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง(ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่กำลังขยาย 100 และ 200 เท่า)

การทดลองที่ 6 การศึกษาผลของการใช้สาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ในการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3

จากการทดลองที่ 5 พบว่าการใช้สาร KuJ ที่ความเข้มข้น 20 μM ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX มีผลทำให้เกิดเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และจำนวนเซลล์ลงซึ่งเป็นไปได้ว่า เมื่อใช้สาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX จะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของวัฏจักรของเซลล์ในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 ดังนั้นในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของการใช้สาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ต่อการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อป้อนเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 กับยาเคมีบำบัดชนิด PTX มีผลทำให้เกิดการหยุดของเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 อยู่ที่ระยะ G2/M ของวัฏจักรเซลล์ ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับกลไกการฆ่าเซลล์มะเร็งของยาเคมีบำบัดชนิด PTX อยู่แล้ว ต่อมาเมื่อทำการป้อนเซลล์กับสาร KuJ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสาร KuJ ไม่มีผลต่อการดำเนินไปของวัฏจักรของเซลล์ในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3

SKOV-3 เมื่อพิจารณาผลของการบ่มเซลล์มะเร็งรังไข่ด้วยยาชนิด SKOV-3 ด้วยสาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX พบว่ามีผลในเกิดการดำเนินวัฏจักรของเซลล์หยุดอยู่ที่ระยะ G2/M และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วยยาเคมีบำบัดชนิด PTX อย่างเดียวพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการใช้สาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ในเซลล์มะเร็งรังไข่ด้วยยาชนิด SKOV-3 ไม่มีผลต่อการดำเนินของวัฏจักรเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 25

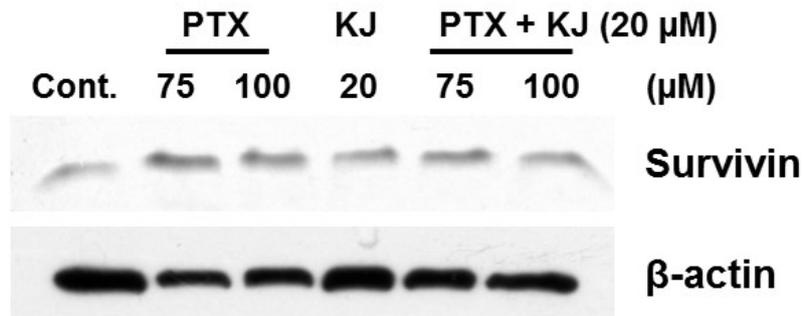


รูปที่ 25 ผลของการใช้สาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ต่อการดำเนินวัฏจักรของเซลล์ในเซลล์มะเร็งรังไข่ด้วยยาชนิด SKOV-3

การทดลองที่ 7 การศึกษาผลของการใช้สาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ต่อการ แสดงออกของโปรตีน Survivin PARP และ cleaved-caspase 3 ใน เซลล์มะเร็งรังไข่ที่ดื้อยาชนิด SKOV-3 โดยวิธี Western blot analysis

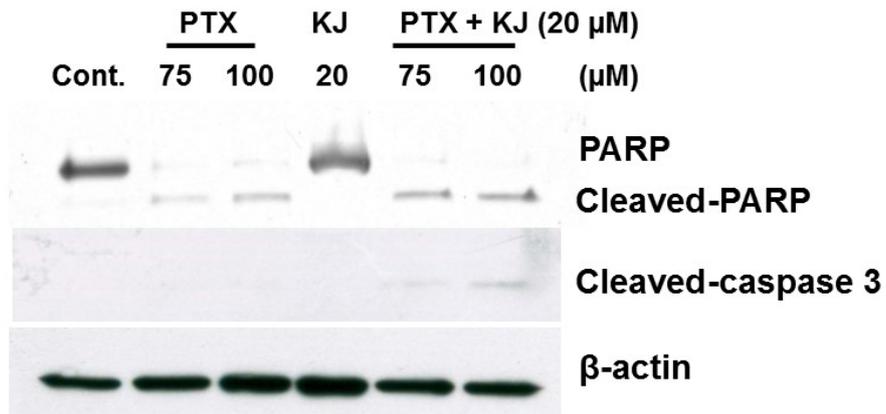
การดื้อยาเคมีบำบัดสามารถเกิดขึ้นได้โดยผ่านหลาย ๆ กลไกด้วยกัน หนึ่งในกลไกที่สำคัญ คือ การเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่ยับยั้งกระบวนการของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Anti-apoptosis molecules) และลดการแสดงออกของโปรตีนที่กระตุ้นการเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Pro-apoptosis molecules) โปรตีนเซอร์ไววิน (Survivin) โปรตีนในกลุ่ม inhibitor of apoptosis (IAP) family ทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของ caspase ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มที่ทำให้เกิดการตายของ เซลล์แบบอะพอพโทซิส จากการศึกษาก่อนหน้าโดยนักวิจัยหลาย ๆ กลุ่ม พบว่าโปรตีน survivin เกี่ยวข้องกับการดื้อยาเคมีบำบัดชนิด PTX ในเซลล์มะเร็งหลาย ๆ ชนิด โดยที่ยาเคมีบำบัดจะไปกระตุ้น ให้เซลล์มะเร็งเกิดการแสดงออกของโปรตีน survivin ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลให้เซลล์มะเร็งสามารถหลบ หลีกการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสโดยการกระตุ้นของยาเคมีบำบัดชนิด PTX ได้ ดังนั้นในการ ทดลองนี้ทางผู้วิจัยได้สนใจศึกษาผลของสาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ต่อการ แสดงออกของโปรตีน survivin ในเซลล์มะเร็งรังไข่ดื้อยาชนิด SKOV-3

จากการทดสอบพบว่าเมื่อทำการบ่มเซลล์มะเร็งรังไข่ดื้อยาชนิด SKOV-3 ร่วมกับยาเคมีบำบัด ชนิด PTX พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน survivin เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ในเซลล์ ที่ทำการบ่มด้วยสาร KuJ กลับไม่พบการแสดงออกของโปรตีน survivin ที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อทำการบ่มเซลล์ด้วยสาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX การแสดงออกของ โปรตีน survivin ในเซลล์มะเร็งรังไข่ดื้อยาชนิด SKOV-3 ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อทำการเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งที่ทำการบ่มด้วยยาเคมีบำบัดชนิด PTX อย่างเดียว **ดังแสดงในรูปที่ 26** จากผลการ ทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่ากลไกการดื้อยาเคมีบำบัดชนิด PTX ในเซลล์มะเร็งรังไข่ดื้อยาชนิด SKOV-3 อาจเป็นผลมาจากการแสดงออกของโปรตีน survivin ที่เพิ่มในเซลล์มะเร็งหลังจากได้รับยาเคมี บำบัดชนิด PTX แต่เมื่อทำการบ่มเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดดื้อยาชนิด SKOV-3 ด้วยสาร KuJ ร่วมกับยา เคมีบำบัดชนิด PTX พบว่าการแสดงออกของโปรตีน survivin ลดลง แสดงว่าสาร KuJ สามารถไปยับยั้ง การเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน survivin ทำให้เซลล์มะเร็งรังไข่ดื้อยาชนิด SKOV-3 กลับมา ตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดชนิด PTX ได้



รูปที่ 26 ผลของสาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ต่อการแสดงออกของโปรตีน survivin ในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3

ต่อมาทางผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของสาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ต่อการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม pro-apoptotic คือ cleaved-caspase 3 และ cleaved-PARP ซึ่งการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิด apoptosis ในที่สุด จากการทดลองพบว่าการบ่มเซลล์ด้วยยาเคมีบำบัดชนิด PTX หรือ สาร KuJ เพียงอย่างเดียวไม่พบการแสดงออกของโปรตีน cleaved-caspase 3 ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของโปรตีน survivin ที่ไปยับยั้งไม่ให้มีการกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 ดังนั้น จึงไม่พบการแสดงออกของโปรตีน cleaved-caspase 3 ส่วนในเซลล์มะเร็งกลุ่มที่บ่มด้วยสาร KuJ ความเข้มข้นที่ใช้ (20 μ M) เป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงไม่กระตุ้นให้เซลล์เกิด apoptosis แต่เมื่อทำการบ่มเซลล์โดยใช้สาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX พบการแสดงออกของโปรตีน cleaved-caspase 3 ซึ่งอาจจะเป็นผลจากการที่สาร KuJ ไปยับยั้งการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน survivin ทำให้ไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ cleaved-caspase 3 ได้ นอกจากนี้ทางผู้วิจัยได้วัดการแสดงออกของ cleaved-PARP พบว่าเซลล์มะเร็งที่บ่มด้วยยาเคมีบำบัดชนิด PTX เพียงอย่างเดียว มีการแสดงออกของโปรตีน cleaved-PARP เพียงเล็กน้อย ส่วนเซลล์ที่บ่มด้วยสาร KuJ เพียงอย่างเดียวไม่มีการแสดงออกของโปรตีน cleaved-PARP แต่ในเซลล์ที่ทำการบ่มด้วยสาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน cleaved-PARP ที่เพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 27 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสาร KuJ ไปยับยั้งการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน survivin โดยยาเคมีบำบัดชนิด PTX เป็นผลให้เซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 เกิดการตายแบบ apoptosis เป็นผลให้การตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดชนิด PTX ในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด PTX ดีขึ้น



รูปที่ 27 ผลของสาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ต่อการแสดงออกของโปรตีน cleaved-caspase 3 และ cleaved-PARP ในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสกัด SKOV-3

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

จากผลการทดสอบความเป็นพิษของยาเคมีบำบัดชนิด Cis Dox และ PTX กับเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ 3 ชนิด คือ SKOV-3 CAOV3 และ A2780 พบว่า เซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ทั้ง 3 ชนิด ตี้อต่อยาเคมีบำบัด Cis ($IC_{50} = 100, 33$ และ $20 \mu M$ ตามลำดับ) ส่วนในยาเคมีบำบัดชนิด Dox และ PTX พบว่า เซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ A2780 จะค่อนข้างไวต่อยาทั้ง 2 ชนิด ($IC_{50} = 54$ และ $26 nM$ ตามลำดับ) และผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ของ KuJ พบว่า SKOV-3 CAOV3 และ A2780 มีความไวต่อ KuJ น้อยไปหามากตามลำดับ (มีค่า $IC_{50} = 40, 30$ และ $18 \mu M$ ตามลำดับ) จากผลการทดลองข้างต้นสามารถแบ่งเซลล์มะเร็งรังไข่มนุษย์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ออกเป็นสองกลุ่ม คือ เซลล์มะเร็งรังไข่ที่ตี้อยาชนิด SKOV-3 และ CAOV3 และอีกกลุ่มหนึ่งคือ เซลล์มะเร็งรังไข่ที่ไวต่อยาชนิด A2780

กลไกการตี้อยาในเซลล์มะเร็งรังไข่นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ซึ่งการตี้อยาในเซลล์มะเร็งรังไข่ อาจเป็นผลมาจากการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนขับไล่อยา การลดการนำยาเข้าสู่เซลล์ การหลีกเลี่ยงการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส การเปลี่ยนแปลงกระบวนการกำจัดสารพิษภายในเซลล์ การเพิ่มการซ่อมแซมดีเอ็นเอ กลไกดังกล่าวข้างต้นเซลล์มะเร็งได้ใช้เพื่อหลบหลีกผลของยาเคมีบำบัดซึ่งอาจจะมียกลไกแตกต่างกันไปในยาเคมีบำบัดแต่ละชนิด จากการที่ผู้วิจัยได้เคยรายงานฤทธิ์ของสาร KuJ ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขับยาชนิด P-gp ซึ่งทำให้ยาเคมีบำบัดสะสมในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ตี้อยาเคมีบำบัดและฆ่าเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้มากขึ้น ดังนั้นทางผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนขับไล่อยาชนิด P-gp ในเซลล์มะเร็งรังไข่ทั้งสามชนิด พบว่าเฉพาะเซลล์มะเร็งรังไข่ตี้อยาชนิด SKOV-3 เท่านั้นที่พบการแสดงออกของโปรตีน P-gp ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่าการตี้อยาเคมีบำบัดชนิด PTX และ Dox ในเซลล์มะเร็งดังกล่าวอาจจะเป็นผลมาจากการแสดงออกของโปรตีนขับไล่อยาชนิด P-gp เนื่องจากยาเคมีบำบัดทั้งสองชนิดเป็น substrate ที่ของโปรตีน P-gp ดังนั้นผู้วิจัยได้นำสาร KuJ มาทดสอบร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ที่เป็น specific substrate ในเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิดตี้อยา SKOV-3 เปรียบเทียบกับชนิดไม่ตี้อยา A2780 พบว่า KuJ ไม่สามารถเพิ่มความไวของเซลล์มะเร็งรังไข่ตี้อยาชนิด SKOV-3 ต่อยาเคมีบำบัดชนิด PTX ได้เลย แม้ในการทดลองได้มีการใช้ Ver ซึ่งเป็น positive control ในการยับยั้งการทำงานของ P-gp ก็ไม่สามารถเพิ่มความไวของเซลล์มะเร็งต่อยาเคมีบำบัดชนิด PTX ได้ จึงสรุปได้ว่ากลไกการตี้อยาเคมีบำบัดชนิด PTX ของ SKOV-3 นั้น ไม่ได้ผ่านกลไกการทำงานของ P-gp แม้ว่าจะมีการแสดงออกของ P-gp ที่สูงก็ตาม

ในการทดลองต่อมา ผู้วิจัยได้ปรับวิธีการใช้ KuJ ในขนาดที่ไม่เป็นพิษที่เซลล์มะเร็ง (IC₂₀) และขนาดที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (IC₅₀) ร่วมกับยาเคมีบำบัดทั้ง 3 ชนิด คือ Cis Dox และ PTX ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่า ในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV- 3 สาร KuJ สามารถไปเพิ่มประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัดชนิด PTX ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด Cis และ Dox กลับไม่มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งคือยาสชนิด SKOV-3 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การใช้ KuJ ทั้ง 2 ขนาดร่วมกับยาเคมีบำบัดทั้ง 3 ชนิดในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด CAOV3 และเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ไวต่อยา A2780 ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า การเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยาเคมีบำบัดชนิด PTX เมื่อใช้ร่วมกับสาร KuJ ในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 อาจจะเป็นผลมาจากการควบคุมการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรของเซลล์ หรือการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ดังนั้นทางผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของการใช้ KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ต่อการดำเนินไปของวัฏจักรของเซลล์ในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 แต่พบว่าการใช้สาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ไม่มีผลต่อการดำเนินไปของวัฏจักรของเซลล์เลย แต่จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าการใช้ KuJ ที่ความเข้มข้น 20 μ M ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนของเซลล์ และรูปร่างของเซลล์ยังเปลี่ยนแปลงไป คือเซลล์มีลักษณะเซลล์ blabbing และ vesicle เกิดขึ้นอย่างมาก ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ที่เกิด apoptosis มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 ที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิด PTX เพียงอย่างเดียว และ เซลล์มะเร็งที่ได้รับ KuJ ที่ความเข้มข้น 20 μ M ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งจำนวน และรูปร่าง (สาร KuJ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการเพิ่มประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัดชนิด PTX ในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 ของ KuJ เป็นผลมาจากการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis

การควบคุมการเจริญเติบโต การแบ่งตัว จำเป็นต้องการความสมดุลกันระหว่าง โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis (Pro-apoptosis) เช่น Bax, Bad, Cytochrom C, p53 หรือ กลุ่มโปรตีน caspase ต่าง ๆ เป็นตัวควบคุมให้เซลล์ไม่เกิดการแบ่งตัวอย่างเกินขีดจำกัด และโปรตีนที่ยับยั้งการเกิด apoptosis (Anti-apoptosis) เช่น Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, หรือ survivin ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งไม่ให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ซึ่งเป็นการทำงานแบบยับยั้งซึ่งกันและกัน ซึ่งการทำงานของโปรตีนทั้งสองกลุ่มนี้ต้องสมดุลกัน หากมีการทำงานมากในกลุ่มโปรตีนใดโปรตีนหนึ่งจะทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ตามมา ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทางผู้วิจัยได้สนใจศึกษาโปรตีน survivin ซึ่งมีการ

รายงานก่อนหน้านี้นี้ว่า ยาเคมีบำบัดชนิด PTX สามารถไปกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของโปรตีน survivin ในเซลล์มะเร็งที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิดดังกล่าว เป็นผลให้เซลล์มะเร็งเกิดการดื้อต่อยาเคมีบำบัดชนิด PTX ขึ้น และในการศึกษาเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน survivin ที่มากขึ้นในกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิด PTX ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่ากลไกการดื้อต่อยาเคมีบำบัดดังกล่าวในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 มาจากการเพิ่มการแสดงออกของ survivin ซึ่งเป็นผลให้เกิดการยับยั้งการเกิด apoptosis ในกลุ่มเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 ที่ได้รับ KuJ ร่วมกับ PTX พบว่าการแสดงออกของโปรตีน survivin ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดชนิด PTX เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ในเซลล์กลุ่มที่ได้รับ KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม pro-apoptosis ที่มากขึ้น คือ cleaved-caspase 3 และ cleaved-PARP แสดงว่าสาร KuJ ไปกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 เกิด apoptosis เมื่อใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX เป็นผลให้เกิดการเพิ่มประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัดดังกล่าวในเซลล์มะเร็งรังไข่คือยาสชนิด SKOV-3 ซึ่งสามารถทำให้เซลล์มะเร็งดังกล่าวกลับมาตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้อีกครั้ง ดังนั้นการศึกษาดังนี้จึงเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการใช้สาร KuJ ซึ่งเป็นสารที่ได้จากการสกัดสมุนไพรพื้นบ้านมะระขี้นก ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิด PTX เพื่อให้เซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัดกลับมาตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้อีกครั้ง ซึ่งส่งผลต่อการรักษาผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ที่ดื้อยา ทำให้โอกาสรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งเพิ่มมากขึ้น

การรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง แม้ในระยะต้นจะสามารถกำจัดเซลล์มะเร็งออกไปได้มาก โดยการรักษาแบบผ่าตัด ร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัดหรือฉายรังสี แต่อย่างไรก็ตาม เราจะไม่สามารถกำจัดเซลล์มะเร็งได้ครบทุกเซลล์ ซึ่งเซลล์ในส่วนที่เหลือนั้น จะอยู่อย่างสงบนิ่งเป็นเวลานาน บางทีอาจถึง 10 ปี โดยเซลล์มะเร็งนั้น มีการพัฒนาตัวเองให้มีความสามารถต่อการยาเคมีบำบัด และยังสามารถแบ่งตัวและรุกรานเซลล์ข้างเคียงหรือรุกรานไปสู่ระบบท่อน้ำเหลือง เพื่อไปสู่อวัยวะสำคัญอื่น ๆ ได้ หลังจากนั้น ผู้ป่วยจะไม่สามารถใช้การรักษาแบบเดิมไปทำลายเซลล์มะเร็งได้อีกต่อไป ดังนั้นการใช้สาร KuJ ร่วมกับยาเคมีบำบัดจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาผู้ป่วยมะเร็ง

Keywords : Bitter melon, Kuguacin J, Ovarian cancer, Chemotherapy, Drug resistance

เอกสารแนบหมายเลข 3

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ร่าง manuscript เรื่อง “Kuguacin J Enhances Paclitaxel Sensitivity in Human Ovarian Cancer Cells” ซึ่งคาดว่าจะส่งตีพิมพ์ในวารสาร Toxicology letter
2. การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference 2014” 2-3 เมษายน 2557 กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
3. การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association” 25-27 กันยายน 2557 เมืองโยโกฮาม่า ประเทศญี่ปุ่น

Kuguacin J Enhances Paclitaxel Sensitivity in Human Ovarian Cancer Cells

Pornsiri Pitchakarn^{1,*}, Sonthaya Umsumarng¹, Sariya Mapoung¹, Pisamai Ting², Piya Temviriyankul², Wanisa Punfa¹, Wilart Pompimon³, Pornngarm Limtrakul^{1,*}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

²Food and Nutritional Toxicology Unit, Institute of Nutrition, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand

³Laboratory of Natural Products, Department of Chemistry, Faculty of Science, Lampang Rajabhat University, Lampang, Thailand

*Corresponding authors

Pornsiri Pitchakarn

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine, Chiang Mai University

110 Intawaroros Rd., T. Suthep, A. Maung,

Chiang Mai 50200, Thailand

Tel. +66 53 949437-9 Ext. 216, Fax: +66 53 894031

E-mail: pornsiri.p@cmu.ac.th

or

Pornngarm Limtrakul

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine, Chiang Mai University

110 Intawaroros Rd., T. Suthep, A. Maung,

Chiang Mai 50200, Thailand

Tel. +66 53 949437-9 Ext. 218, Fax: +66 53 894031

E-mail: pornngarm.d@cmu.ac.th

Abstract

Ovarian cancer is included in ten leading cancer sites for the estimated new cases and dead cases in female at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Thailand. The advanced stages (III and IV) of ovarian cancer have been reported to show a lower survival rate due to resistance to chemotherapeutic drugs. This study investigated whether kuguacin J promote cisplatin- and paclitaxel-induced cancer cell death in drug-resistance human ovarian cancer cells (SKOV-3) and drug-sensitive human ovarian cancer cells (A2780). Cytotoxicity testing showed that SKOV-3 cells were more resistance to cisplatin and paclitaxel compare to A2780 cells. The cytotoxicity of paclitaxel (PTX) was significantly increased when co-treated with kuguacin J in SKOV-3 cells. We previous reported multidrug resistance ability of kuguacin J in cervical cancer cells via the inhibition of P-glycoprotein, which also overexpress in SKOV-3 cells. However, the present study found that enhancement of PTX toxicity in the cells did not involve with P-glycoprotein inhibition. We next further determined which mechanism that kuguacin J increased paclitaxel sensitivity, the expression of cell death-involving proteins was analyzed by Western blot analysis. The results showed that PTX treatment increased level of anti-apoptotic protein, survivin, which may be involved with the drug resistance in SKOV-3. The co-treatment of PTX and kuguacin J dramatically decreased level of anti-apoptotic protein, survivin and markedly induced cleavage of PARP and caspase-3, which are apoptotic-induced molecules. This finding might support the possibility to use kuguacin J as an effective chemosensitizer in combination with conventional chemotherapy to promote paclitaxel sensitization in ovarian cancer patients.

Keywords: Ovarain cancer, Kuguacin J, Chemotherapy, Paclitaxel, Drug resistance

1. Introduction

Ovarian cancer is a major cause of death among gynecological malignancies. In 2007, there were 4,919 cases of new cancer at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. From the report, ovarian cancer is included in ten leading cancer sites for the estimated new cases and dead cases in female. Ovarian cancer at its early stages (I/II) is difficult to diagnose until it spreads and advances to later stages (III/IV). This is because most symptoms are non-specific and thus of little use in diagnosis. Surgical treatment may be sufficient for malignant tumors that are well-differentiated and confined to the ovary. Addition of chemotherapy may be required for more aggressive tumors that are confined to the ovary. For patients with advanced disease a combination of surgical reduction with a combination chemotherapy regimen is standard.

Chemotherapy has been a general standard of care for ovarian cancer for decades, which highly variable protocols depends on the histology of the tumor. There has been some improvement in the survival time since the introduction of platinum (Cisplatin or Carboplatin) and Paclitaxel therapy. However, the success rate of treating women with advanced, recurrent, or persistent ovarian cancers has remained largely unchanged for four decades (Dunton, 1997). Therefore, there is a need to consider the use of second-line chemotherapeutic options for this cancer (Gershenson et al., 1998; Markman et al., 1998a; Markman et al., 1998b; Rose et al., 1998; Shapiro et al., 1996; ten Bokkel Huinink et al., 1997).

Chemoresistance is the importance cause of treatment failure in cancer patients and bring about to patients death. Resistance to chemotherapeutic drugs could occur by primary resistance that cancer cells already resisted before therapy or acquired resistance which cancer cells adjusted to survival during drugs treatment. (Wilson et al., 2006) Many drug-resistant mechanisms of cancer cells have been previous described that difference in cancer type and chemotherapeutic occurs drug-resistance by difference mechanism.(Hamilton and Rath, 2014; Kigawa, 2013) Drug of choices for ovarian cancer patient is platinum-based combined with taxan, thus the resistance mechanism in this cancer type might be involved with decreasing of drug concentration in the cancer cells, increased DNA repair mechanism and deregulation in apoptosis pathway. (Kigawa, 2013) Reduction of drug accumulation in the cancer cells can be caused by decreased drugs uptake or increased drugs efflux. Water-soluble chemotherapeutic drugs such as cisplatin and nucleoside analogs can transports across cell membrane using transporter or carriers, thus decreased of transporter expression or mutation of the carriers would results in impair drugs uptake and develop chemoresistance.

Hydrophobic drugs such as paclitaxel, vinblastine, doxorubicin and etoposide are freely across the membrane, the activation of active drug-transporters play a critical role to decrease drugs concentration in the cells. (Ambudkar et al., 2003; Hamilton and Rath, 2014)

Apoptosis is program cells death regulated mediated by extrinsic pathway, activation of death receptors and intrinsic pathway, release cytochrome C to cytoplasm. Therefore, deregulation of these pathways can reduced chemotherapy sensitivity in cancer cells. Inactivation of pro-apoptosis molecules, Bax, Bak, Bid, Bim and Bad and activation of anti-apoptosis molecules, Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, XIAP, cIAP-1 and survivin could promote resistance to apoptosis is the importance mechanism in drugs resistance cancer cells. (Huang and Sadee, 2006) Up-regulation of anti-apoptosis, Bcl-2 and survivin and down-regulated pro-apoptosis molecules, Bax enhance paclitaxel resistance in ovarian cancer cell line. (Ling et al., 2004; Liu et al., 2014; Zhan et al., 2015)

Momordica charantia or bitter melon has long been used in various Asian traditional medicine systems and is commonly consumed as a vegetable (Giron et al., 1991; Lans and Brown, 1998). Anti-cancer activities of bitter melon extracts against lymphoid leukemia, lymphoma, choriocarcinoma, melanoma, breast cancer, skin tumors, prostatic cancer, squamous carcinoma of the tongue and larynx, human bladder carcinomas and Hodgkin's disease have been reported (Basch et al., 2003; Battelli et al., 1996; Ganguly et al., 2000; Licastro et al., 1980; Ng et al., 1994; Sun et al., 2001). We previously reported that bitter melon leaf extract (BMLE) increased the sensitivity of cervical carcinoma KB-V1 cells to the chemotherapeutic agent vinblastine (Limtrakul et al., 2004), inhibited invasion and migration of an androgen-independent rat prostate cancer cell line (PLS10) *in vitro* while decreasing lung metastasis *in vivo* (Pitchakarn et al., 2010) and suppressed the growth of an androgen-dependent human prostate cancer cell line (LNCaP) *in vitro* (Pitchakarn et al., 2011b). Using bioguided fractionation, we identified the active component of BMLE as kuguacin J (Pitchakarn et al., 2011a; Pitchakarn et al., 2011b). We found that kuguacin J inhibited P-glycoprotein-mediated multidrug resistance (MDR) leading to increase sensitivity to vinblastine and paclitaxel in KB-V1 cells (Pitchakarn et al., 2011a) and caused G1 arrest and induced apoptosis in human prostate cancer LNCaP cells (Pitchakarn et al., 2011b). Therefore, kuguacin J might be a promising candidate new chemopreventive and chemotherapeutic agent for cancer therapy. To provide a basis for the use of kuguacin J as a chemotherapeutic agent for drug resistant cancer, this study investigated whether kuguacin J could enhance sensitivity of chemotherapeutic drugs, cisplatin and PTX, in a drug-resistant ovarian cancer

cell line (SKOV-3). This study will support the possibility to use this compound as an effective chemosensitizer in combination with conventional chemotherapy for cancer patients.

2. Materials and Methods

2.1 Plant material

Leaves of bitter melon were collected in Lampang province, Thailand. A voucher specimen (BKF no. 15602) has been deposited at the Forest Herbarium, Department of National Park, Wildlife and Plant Conservation, Ministry of Natural Resources and Environment, Bangkok, Thailand.

2.2 Extraction and purification of kuguacin J

The fresh leaves were dried at 30 – 45°C, and then were ground. Dried powdery plant samples (1 kilogram) were extracted exhaustively with 4 liters of 80% ethanol by maceration at 37°C for 16 h. The mixture was filtered and re-extracted with 4 L of ethanol. The combined filtrate will be bleached with 160 g of active charcoal, filtered and concentrated by rotary evaporation to 120 ml before filtering to remove precipitates. The filtrate will be rotary evaporated and lyophilized. 100 g of residue (BMLE) will be re-dissolved in 1 L of 50% methanol and successively partitioned with hexane, diethyl ether, chloroform, ethyl acetate and an aqueous layer.

The diethyl ether fraction was separated by column chromatography. The diethyl ether extract (15 g) will be separated by column chromatography over silica gel (Merck, 70-230 mesh ASTM, cat. No. 7734) 100 g, eluting with various proportions of ethyl acetate-hexane, followed by the increasing volume of methanol in ethyl acetate and finally with pure methanol. Fractions (50 mL each) will be collected and combined on the basis of TLC behavior. Further separation by column chromatography over silica gel 50 g will be performed to afford kuguacin J. The compound will be identified as kuguacin J by comparing its physical and HPLC, IR, MS and NMR data with those reported in the literature (Chen et al., 2008; Chen et al., 2009; Mekuria et al., 2005; Puspawati, 2008).

2.3 Cells and cell culture

The chemotherapeutic drug sensitive human ovarian carcinoma A2780 cell line was purchased from European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). The chemotherapy-resistant human ovarian adenocarcinoma SKOV-3 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). The cell lines were cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium, (RPMI-1640) with 4.5 g of glucose/l, 5 mM l-glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin plus 10% fetal bovine serum (FBS); The cell line will be maintained in a humidified incubator with an atmosphere

comprising 95% air and 5% CO₂ at 37°C. When the cells reached 70-80% confluence, they will be harvested and plated either for subsequent passages or for drug treatments.

2.4 Cytotoxicity testing

SKOV-3 and A2780 cells were plated at 4.0×10^3 cells per well in 96-wells plate. After 24 h, various concentrations of kuguacin J or paclitaxel or cisplatin was added and incubated for 48 h at 37°C. Cell survival was assessed by means of the MTT colorimetric assay. In each experiment, determinations were carried out in triplicate.

2.5 Combination treatment

SKOV-3 and A2780 cells were plated at 4.0×10^3 cells per well in 96-wells plate. After 24 h, kuguacin J (20 and 30 μ M) and various concentrations of cisplatin or paclitaxel were added. The cells were incubated for 48 h at 37°C, and cell growth was assessed by means of the MTT colorimetric assay. In each experiment, determinations were carried out in triplicate.

2.6 Cell cycle analysis

SKOV-3 cells were plated at 2.5×10^5 cells per well in 6-wells plate overnight. After that, the cells were treated with paclitaxel (75 and 100 μ M) with or without kuguacin J (20 μ M) for 48 h. Next, cells suspension was prepared and stained with propidium iodide (Guava cell cycle reagent, Guava Technologies, Hayward, CA, USA) according to the Guava Cell Cycle Assay protocol. Cell cycle phase distributions were determined on a Guava PCA Instrument using CytoSoft Software. In each experiment, determinations were carried out in triplicate.

2.7 Western blotting

SKOV-3 cells were plated at 2.5×10^5 cells per well in 6-wells plate overnight. After that, the cells were treated with paclitaxel (75 and 100 μM) with or without kuguacin J (20 μM) for 48 h. The cells were harvested and washed with ice-cold PBS, then 200 μl of RIPA buffer containing protease inhibitor was added. The samples were stand on ice, then vortex every 5 minutes for 30 minutes and centrifuged at 15,000xg for 10 minutes at 4°C. Supernatants were transferred to new tubes and the debris pellet was discarded. Protein concentration was determined by Bradford method.

Aliquots of lysates were mixed with 4x sample buffer and heated for 5 minutes at 95°C and then subjected to 10%SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane with a glycine transferring buffer [20 mM Tris base, 0.2 M glycine, 20% v/v methanol (pH 8.5)]. After blocking nonspecific site with 5% skim milk, the membrane was probed with specific antibodies at 4°C overnight. The secondary antibody consisting of horse radish peroxidase-conjugated IgG was used for the detection. The band was visualized by the ECL detection system.

2.8 Genotoxicity evaluation of BMLE

The method intensively has been used to determine mutagenic potential of chemicals intensively and was described by Ulrich Graf (REF 1-3). In brief, to generate trans-heterozygous larvae (*mwh flr⁺/mwh TM3*), males of *mwh/mwh* and females of *ORR;flr³/In(3LR) TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S, Ser* were mated. Then, One hundred of 3 days old trans-heterozygous larvae were cultured on standard medium containing (i) water, (ii) BMLE dissolved in 0.25% DMSO (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), (iii) 20 mM urethane (positive control) and (iv) 0.25% DMSO (solvent control, negative control). Before taking the wings off, the flies were fixed with 70% ethanol. Only the round wings were mounted with Faure's solution and determined the phenotypes according to (REF2). Lastly, the statistical analysis was performed as described (REF4).

2.9 Statistical analysis

All experiments were performed at least in triplicate to confirm reproducibility. Statistical analyses were performed with mean \pm S.D. values using one-way ANOVA by Prism 5.0 software. Statistical significance was concluded with * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$.

3. Results

3.1. Effects of cisplatin, paclitaxel and kuguacin J on the growth of A2780 and SKOV-3 cells

MTT assay results showed that SKOV-3 cells were more resistance to cisplatin and paclitaxel than A2780 cells as shown in (Figure 1 A-D). The IC₅₀ of cisplatin was more than 200 μ M and 15 μ M in SKOV-3 and A2780 cells, respectively. The IC₅₀ of paclitaxel was more than 300 μ M and 25 nM in SKOV-3 and A2780 cells, respectively. kuguacin J treatment at high concentration reduced the growth of SKOV-3 and A2780 cells (Fig.1 E-F) with an IC₅₀ of 35 and 17.5 μ M, respectively.

3.2. The effect of kuguacin J on cytotoxicity of cisplatin and paclitaxel in human ovarian cancer cells

Based on the growth inhibitory effects of kuguacin J on SKOV-3 cells, sub-toxic concentrations of kuguacin J (20 and 30 μ M) were selected for further *in vitro* mechanistic studies. We examined the effects of kuguacin J to enhance efficiency of cisplatin and paclitaxel inhibiting cell growth of SKOV-3 and A2780. Co-treatment between paclitaxel and kuguacin J in SKOV-3 cells showed dramatically higher proportion of SKOV-3 cells death compared with the single treatments as show in Figure 2 A-B. The cell survival of SKOV-3 cells was significant reduced by the co-treatment of paclitaxel and kuguacin J, while this effect was not found in A2780 cells. (Figure 2C) Whereas, the kuguacin J was not enhance the cytotoxicity of cisplatin in both SKOV-3 and A2780 cells lines. (Figure 2 D-E). These data suggested that the resistance to paclitaxel and cisplatin in SKOV-3 cells might be regulated by difference pathways such as increased drug efflux by ABC-transporter protein or insensitivity to drug-induced apoptosis.

3.3. Paclitaxel resistance in SKOV-3 cells is not involved with an over-expression of P-glycoprotein

Paclitaxel is well known as a specific P-glycoprotein (P-gp) substrate. It could be pumped out of the cancer cells by P-glycoprotein that leads to multidrug resistance (MDR). Our previous study reported that kuguacin J could inhibit P-glycoprotein function which caused the accumulation of paclitaxel and vinblastine in KB-V1 cells. (Pitchakarn, 2011 #22) Therefore, the reversal of paclitaxel resistance by kuguacin J in SKOV-3 cells might be associated with inhibition of P-glycoprotein function or an induction of cell death. We next analyzed the expression of P-glycoprotein in SKOV-3 and A2780 cells by Western blotting. The result showed the over-expression of P-glycoprotein in SKOV-3 cells, while the protein could not be detected in A2780 cells as shown in Figure 3A. We then determined whether paclitaxel resistance in SKOV-3 cells is involved with an over-expression of P-glycoprotein. The cells were treated with various concentrations of paclitaxel with or without the well-known P-glycoprotein inhibitors, verapamil and stemofoline. (Thomas and Coley, 2003; Umsumarng et al., 2013) We found that the P-glycoprotein inhibitors did not modulate the drug resistance in SKOV-3 cells. (Figure 3 B-C) The results suggested that paclitaxel resistance in SKOV-3 cells is not involved with an over-expression of P-glycoprotein.

3.4. The reversal of paclitaxel resistance by kuguacin J in SKOV-3 cells not involved with cell cycle arrest

Paclitaxel interacts with microtubules causing repressing dynamic instability of spindle microtubules and inhibiting mitosis, thus causing G2/M arrest and finally induced apoptosis. Thus, in this experiment the effect of co-treatment of kuguacin J and paclitaxel on cells cycle was determined. The results showed that paclitaxel treatment alone induced G2/M arrest, whereas kuguacin J treatment alone did not alter cell cycle of SKOV-3 cells. Cell cycle distribution of SKOV-3 in the co-treatment compared to paclitaxel single treatment did not differ (Figure 4). From this experiment suggested that the reversal of paclitaxel cytotoxicity by kuguacin J might not via induction of cell cycle arrest.

3.5. The reversal of paclitaxel resistance by kuguacin J might via the alteration of cell survival-related protein levels

It has been reported that paclitaxel resistance in ovarian cancer associated with the up-regulation of survivin. (Ling et al., 2004) In this experiment, the expression of survivin in SKOV-3 cells was determined by western blot analysis. The results found that survivin

expression was increased after paclitaxel single treatment, while kuguacin J treatment alone did not affect survivin level (Figure 5A). After co-treatment of paclitaxel and kuguacin J in SKOV-3 cells, the survivin expression was decreased compared to the PTX-treated cells, suggesting that kuguacin J could inhibit PTX-stimulated survivin expression. Moreover, the expression of apoptotic-involved molecules after the co-treatment of paclitaxel and kuguacin J was observed by western blot analysis. The paclitaxel treatment alone slightly increased cleaved-PARP expression in SKOV-3 cells, but not cleaved-caspase-3. While kuguacin J treatment did not alter the expression of these molecules. Interestingly, the co-treatment of the cells with paclitaxel and kuguacin J could essentially increase cleaved-caspase 3 and cleaved-PARP protein levels (Figure 5B). The results suggest that the enhancement of PTX sensitivity in SKOV-3 cells by kuguacin J might be mediated by the inhibition of PTX-induced up-regulation of survivin and the induction of apoptosis via a caspase-dependent mechanism.

3.5. BMLE does not cause DNA mutations and DNA breaks

To assess the genotoxic properties of BMLE, the *in vivo* wing spot test (SMART) was used. This *in vivo* test is conducted in special *Drosophila melanogaster*, which has the recessive markers, flare (*flr*³) and multiple wing hair (*mwh*). The trans-heterozygous flies allow us to detect genome damages on the wings. Furthermore, they possess the same biotransformation process resulting in the activation of pro-mutagens or pro-carcinogens, like mammals (REF1). Therefore, the assay allows detection of several types of DNA mutations, such as nucleotide deletions, point mutations, DNA breaks and failure of recombination (REF 2 and 3).

As shown in Table 1, the non-toxic dose of urethane (20 mM) (Table 1) significantly induced DNA damages (indicated by total spot/wing), which is along the lines with previous study (REF5). Urethane can act as mutagen and carcinogen after biotransformation by cytochrome P450 (REF6). Before investigation the mutagenic potential of BMLE, three concentrations of BMLE dissolved in 0.25% DMSO were used to determine toxicity in the flies. The data (Table survival) shows that BMLE is safe, even at the highest concentration (500 µg/ml). Thus, this dose was subsequently used to treat the indicated flies. As shown in Table mutagenic, when the statistical calculation was applied (REF 4), BMLE did not induce DNA damages compared to either the negative control. In conclusion, these data suggest that BMLE, after *in vivo* mammalian-like biotransformation, is genetically safe.

4. Discussion

Ovarian cancer is the most lethal gynecological cancer due to lack of effective screening for early stage and patients found in advance stage as well as cancer developed chemoresistance along cancer progression. (Davidson and Trope, 2014) First line drug in ovarian cancer is platinum-base combination with paclitaxel but patient would relapse with drugs resistance within 3-5 years. Drugs resistance is the large problems in cancer treatments leading to treatment failed and patient death. (Gabra, 2014) Cancer cells could be already resistance to drugs before receive treatment due to genetics alteration which is intrinsic resistance or cancer cells developed resistance to drugs after treatments, acquired resistance. Unfortunately, not all patients can continue with platinum combination therapies due to loss of activity or toxicity. The second-line chemotherapy must take into account factors such as platinum-free (PFI). (Gabra, 2014) Natural bioactive compounds have been investigated to use as combination with conventional chemotherapeutic drugs to increase drugs sensitivity in cancer cells and also decrease adverse effects of drugs. Fruits, vegetables, and common beverages, as well as several herbs and plants with diversified pharmacological properties, have been shown to be rich sources of natural bioactive compounds with the potential to prevent human cancers. (Khan et al., 2010; Thangapazham et al., 2006) In a previous study, we demonstrated that kuguacin J, bioactive compound from *Momordica charantia* or bitter melon inhibited cell growth via induction of cell cycle arrest and apoptosis in androgen-dependent prostate LNCaP cells. (Pitchakarn et al., 2011b) Moreover, kuguacin J isolated from bitter melon increased drugs sensitivity in MDR cancer cell lines by inhibited P-gp function. Thus, this study investigated whether kuguacin J promote cisplatin- or paclitaxel-induced cancer cell death in human ovarian cancer cells. Cytotoxicity testing showed that SKOV-3 cells were more resistance to cisplatin and paclitaxel compare to A2780 cells. Co-treatment the drugs with kugucin J significantly enhanced the cytotoxic effects of paclitaxel but not cisplatin in SKOV-3 cells. Due to paclitaxel is a specific substrate for P-gp protein, which overexpression in SKOV-3, thus the paclitaxel resistance mechanism might be via P-gp function. The combination treatment of paclitaxel and known P-gp inhibitors did not enhance the drug sensitivity suggested that paclitaxel resistance in SKOV-3 did not involve in P-gp overexpression. Paclitaxel binding with tubulin and stabilizes the microtubule polymer that cause cell cycle arrest in G2/M phase and finally induced apoptosis. Thus the effects of co-treatment of kuguacin J and paclitaxel on cell cycle progression was observed and found that the co-treatment did not induce cell cycle arrest in SKOV-3 cells. Whereas the

microscopic observation showed co-treatment of kuguacin J and paclitaxel obviously decreased the cell number and induced cell morphological change suggested that kuguacin J may increase paclitaxel toxicity by induced apoptosis signaling in SKOV-3 cells.

Defection of cellular death signaling is the importance in drugs resistance mechanism found in cancer.(Duiker et al., 2010; Wilson et al., 2006) Apoptosis is regulated by balance of pro-apoptosis proteins, including Bid, Bim and Bad and anti-apoptosis proteins, including Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 and inhibitors of apoptosis protein (IAPs) including, XIAP, cIAP-1, cIAP-2 and survivin also. (Indran et al., 2011) Previous studies showed acquired paclitaxel resistance in ovarian cancer was associated with the up-regulation of survivin. (Ling et al., 2004) In this study we focus on survivin expression and paclitaxel sensitivity in SKOV-3 cells.

Survivin is a member of the IAP family of proteins which regulated both cell cycle distribution and apoptosis. It is not detectable in normal adult tissue but its re-expression in cancer tissues which correlated with poor prognosis. (Ling et al., 2004; Zaffaroni et al., 2002) The overexpression of survivin in advance ovarian carcinoma significantly correlation with clinical resistance to paclitaxel treatment.(Salzano et al., 2015; Zaffaroni et al., 2002) Survivin expression is regulated by cell cycle-dependent manner and increased in G2/M phase. Paclitaxel treatment induced cell cycle arrest at G2/M phase, thus the survivin expression could be up-regulated by paclitaxel treatment. (Ling et al., 2004; Zaffaroni et al., 2002) Previous study reported inhibition of survivin expression could increase paclitaxel sensitivity in both primary ovarian cancer cells and ovarian cancer cellline. (Dong et al., 2013; Kar et al., 2015) It was previously reported that survivin inhibited apoptosis via directly binding with caspase-3.(Altieri, 2003) Our results showed paclitaxel treatment caused increasing of survivin expression suggested that the acquired paclitaxel resistance in SKOV-3 cells might via the regulation of survivin. Besides, we found that paclitaxel treatment alone did not induce expression of cleaved-caspase-3 that maybe involved with the up-regulation of survivin. Co-treatment of paclitaxel and kuguacin J decreased survivin level and increased cleaved-caspase-3 level. The improvement of paclitaxel sensitivity in SKOV-3 cells by kuguacin J might be via the inhibition of survivin expression leading to an activation of apoptosis.

Bitter melon is widely consumed as a vegetable and especially as a traditional medicine in Asian countries. Our previous studies reported kuguacin J isolated from bitter melon leaf extract (BMLE), exerted anti-cancer progression properties. (Pitchakarn et al., 2010; Pitchakarn et al., 2011a) Moreover, the present study revealed chemoadjuvant potential of

kuguacin J in human ovarian cancer cells. To develop and explore the use of BMLE in daily life we tested the genotoxic properties of BMLE and found that BMLE, after *in vivo* mammalian-like biotransformation, is genetic safety.

This finding might support the possibility to use kuguacin J as an effective chemosensitizer in combination with conventional chemotherapy to promote paclitaxel sensitization in ovarian cancer patients.

Acknowledgement

This work was supported by the Thailand Research Fund (MRG no.5580128), the office of the higher education commission, the National Research Council of Thailand, and the Faculty of Medicine Research Fund, Faculty of Medicine, and Chiang Mai University.

References

- Altieri, D.C., 2003. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 22, 8581-8589.
- Ambudkar, S.V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z.E., Gottesman, M.M., 2003. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22, 7468-7485.
- Basch, E., Gabardi, S., Ulbricht, C., 2003. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. *Am J Health Syst Pharm* 60, 356-359.
- Battelli, M.G., Polito, L., Bolognesi, A., Lafleur, L., Fradet, Y., Stirpe, F., 1996. Toxicity of ribosome-inactivating proteins-containing immunotoxins to a human bladder carcinoma cell line. *Int J Cancer* 65, 485-490.
- Chen, J., Tian, R., Qiu, M., Lu, L., Zheng, Y., Zhang, Z., 2008. Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. *Phytochemistry* 69, 1043-1048.
- Chen, J.C., Liu, W.Q., Lu, L., Qiu, M.H., Zheng, Y.T., Yang, L.M., Zhang, X.M., Zhou, L., Li, Z.R., 2009. Kuguacins F-S, cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia*. *Phytochemistry* 70, 133-140.
- Davidson, B., Trope, C.G., 2014. Ovarian cancer: diagnostic, biological and prognostic aspects. *Women's health* 10, 519-533.
- Dong, Z., Yang, L., Lai, D., 2013. KLF5 strengthens drug resistance of ovarian cancer stem-like cells by regulating survivin expression. *Cell proliferation* 46, 425-435.
- Duiker, E.W., van der Zee, A.G., de Graeff, P., Boersma-van Ek, W., Hollema, H., de Bock, G.H., de Jong, S., de Vries, E.G., 2010. The extrinsic apoptosis pathway and its prognostic impact in ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 116, 549-555.
- Dunton, C.J., 1997. New options for the treatment of advanced ovarian cancer. *Semin Oncol* 24, S5-2-S5-11.
- Gabra, H., 2014. Introduction to managing patients with recurrent ovarian cancer. *EJC supplements : EJC : official journal of EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer [et al]* 12, 2-6.
- Ganguly, C., De, S., Das, S., 2000. Prevention of carcinogen-induced mouse skin papilloma by whole fruit aqueous extract of *Momordica charantia*. *Eur J Cancer Prev* 9, 283-288.
- Gershenson, D.M., Burke, T.W., Morris, M., Bast, R.C., Guaspari, A., Hohneker, J., Wharton, J.T., 1998. A phase I study of a daily x3 schedule of intravenous vinorelbine for refractory epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 70, 404-409.
- Giron, L.M., Freire, V., Alonzo, A., Caceres, A., 1991. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *J Ethnopharmacol* 34, 173-187.
- Hamilton, G., Rath, B., 2014. A short update on cancer chemoresistance. *Wiener medizinische Wochenschrift* 164, 456-460.
- Huang, Y., Sadee, W., 2006. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer letters* 239, 168-182.
- Indran, I.R., Tufo, G., Pervaiz, S., Brenner, C., 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 1807, 735-745.
- Kar, R., Palanichamy, J.K., Banerjee, A., Chattopadhyay, P., Jain, S.K., Singh, N., 2015. Survivin siRNA increases sensitivity of primary cultures of ovarian cancer cells to paclitaxel. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 17, 737-742.
- Khan, N., Adhami, V.M., Mukhtar, H., 2010. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer. *Endocrine-related cancer* 17, R39-52.
- Kigawa, J., 2013. New strategy for overcoming resistance to chemotherapy of ovarian cancer. *Yonago acta medica* 56, 43-50.

- Lans, C., Brown, G., 1998. Observations on ethnoveterinary medicines in Trinidad and Tobago. *Prev Vet Med* 35, 125-142.
- Licastro, F., Franceschi, C., Barbieri, L., Stirpe, F., 1980. Toxicity of *Momordica charantia* lectin and inhibitor for human normal and leukaemic lymphocytes. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 33, 257-265.
- Limtrakul, P., Khantamat, O., Pintha, K., 2004. Inhibition of P-glycoprotein activity and reversal of cancer multidrug resistance by *Momordica charantia* extract. *Cancer Chemother Pharmacol* 54, 525-530.
- Ling, X., Bernacki, R.J., Brattain, M.G., Li, F., 2004. Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest. *The Journal of biological chemistry* 279, 15196-15203.
- Liu, Z., Tong, Y., Liu, Y., Liu, H., Li, C., Zhao, Y., Zhang, Y., 2014. Effects of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) combined with paclitaxel (PTX) on paclitaxel-resistant ovarian cancer cells and insights into the underlying mechanisms. *Cancer cell international* 14, 112.
- Markman, M., Blessing, J.A., Moore, D., Ball, H., Lentz, S.S., 1998a. Altretamine (hexamethylmelamine) in platinum-resistant and platinum-refractory ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group phase II trial. *Gynecol Oncol* 69, 226-229.
- Markman, M., Kennedy, A., Sutton, G., Hurteau, J., Webster, K., Peterson, G., Kulp, B., Belinson, J., 1998b. Phase 2 trial of single agent ifosfamide/mesna in patients with platinum/paclitaxel refractory ovarian cancer who have not previously been treated with an alkylating agent. *Gynecol Oncol* 70, 272-274.
- Mekuria, D.B., Kashiwagi, T., Tebayashi, S., Kim, C.S., 2005. Cucurbitane triterpenoid oviposition deterrent from *Momordica charantia* to the leafminer, *Liriomyza trifolii*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 1706-1710.
- Ng, T.B., Liu, W.K., Sze, S.F., Yeung, H.W., 1994. Action of alpha-momorcharin, a ribosome inactivating protein, on cultured tumor cell lines. *Gen Pharmacol* 25, 75-77.
- Pitchakarn, P., Ogawa, K., Suzuki, S., Takahashi, S., Asamoto, M., Chewonarin, T., Limtrakul, P., Shirai, T., 2010. *Momordica charantia* leaf extract suppresses rat prostate cancer progression in vitro and in vivo. *Cancer Sci* 101, 2234-2240.
- Pitchakarn, P., Ohnuma, S., Pintha, K., Pompimon, W., Ambudkar, S.V., Limtrakul, P., 2011a. Kuguacin J isolated from *Momordica charantia* leaves inhibits P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance. *J Nutr Biochem*.
- Pitchakarn, P., Suzuki, S., Ogawa, K., Pompimon, W., Takahashi, S., Asamoto, M., Limtrakul, P., Shirai, T., 2011b. Induction of G1 arrest and apoptosis in androgen-dependent human prostate cancer by Kuguacin J, a triterpenoid from *Momordica charantia* leaf. *Cancer letters* 306, 142-150.
- Puspawati, N., 2008. Isolation and identification momordicin I from leaves extract of *Momordica charantia* L. *JURNAL KIMIA* 2, 53-56.
- Rose, P.G., Blessing, J.A., Mayer, A.R., Homesley, H.D., 1998. Prolonged oral etoposide as second-line therapy for platinum-resistant and platinum-sensitive ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 16, 405-410.
- Salzano, G., Navarro, G., Trivedi, M.S., De Rosa, G., Torchilin, V.P., 2015. Multifunctional Polymeric Micelles Co-loaded with Anti-Survivin siRNA and Paclitaxel Overcome Drug Resistance in an Animal Model of Ovarian Cancer. *Molecular cancer therapeutics* 14, 1075-1084.
- Shapiro, J.D., Millward, M.J., Rischin, D., Michael, M., Walcher, V., Francis, P.A., Toner, G.C., 1996. Activity of gemcitabine in patients with advanced ovarian cancer: responses seen following platinum and paclitaxel. *Gynecol Oncol* 63, 89-93.

Sun, Y., Huang, P.L., Li, J.J., Huang, Y.Q., Zhang, L., Lee-Huang, S., 2001. Anti-HIV agent MAP30 modulates the expression profile of viral and cellular genes for proliferation and apoptosis in AIDS-related lymphoma cells infected with Kaposi's sarcoma-associated virus. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 983-994.

ten Bokkel Huinink, W., Gore, M., Carmichael, J., Gordon, A., Malfetano, J., Hudson, I., Broom, C., Scarabelli, C., Davidson, N., Spaczynski, M., Bolis, G., Malmstrom, H., Coleman, R., Fields, S.C., Heron, J.F., 1997. Topotecan versus paclitaxel for the treatment of recurrent epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 15, 2183-2193.

Thangapazham, R.L., Sharma, A., Maheshwari, R.K., 2006. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *The AAPS journal* 8, E443-449.

Thomas, H., Coley, H.M., 2003. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 10, 159-165.

Umsumarng, S., Pintha, K., Pitchakarn, P., Sastraruji, K., Sastraruji, T., Ung, A.T., Jatisatienr, A., Pyne, S.G., Limtrakul, P., 2013. Inhibition of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by stemofoline derivatives. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 61, 399-404.

Wilson, T.R., Longley, D.B., Johnston, P.G., 2006. Chemoresistance in solid tumours. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 17 Suppl 10, x315-324.

Zaffaroni, N., Pennati, M., Colella, G., Perego, P., Supino, R., Gatti, L., Pilotti, S., Zunino, F., Daidone, M.G., 2002. Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59, 1406-1412.

Zhan, Y., Xiang, F., Wu, R., Xu, J., Ni, Z., Jiang, J., Kang, X., 2015. MiRNA-149 modulates chemosensitivity of ovarian cancer A2780 cells to paclitaxel by targeting MyD88. *Journal of ovarian research* 8, 48.

Figure legends

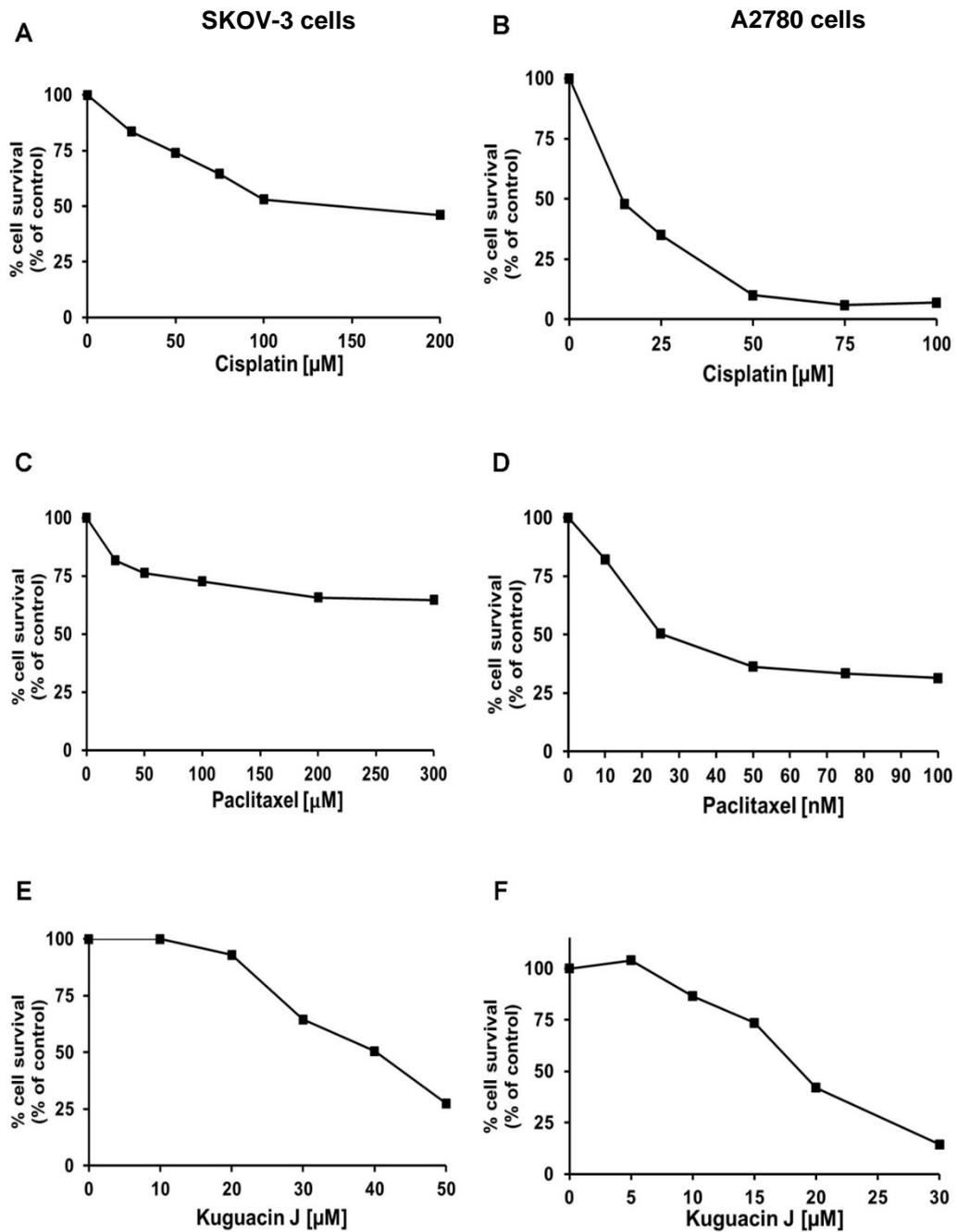


Fig. 1. Cytotoxicity of cisplatin (A-B), paclitaxel (C-D) and kuguacin J (E-F) on SKOV-3 and A2780 cells. SKOV-3 cells and A2780 Cells were treated with the drugs or kuguacin J for 48 h and the cell survival was determined by the MTT assay. The values are presented as the means \pm S.D. of three independent experiments.

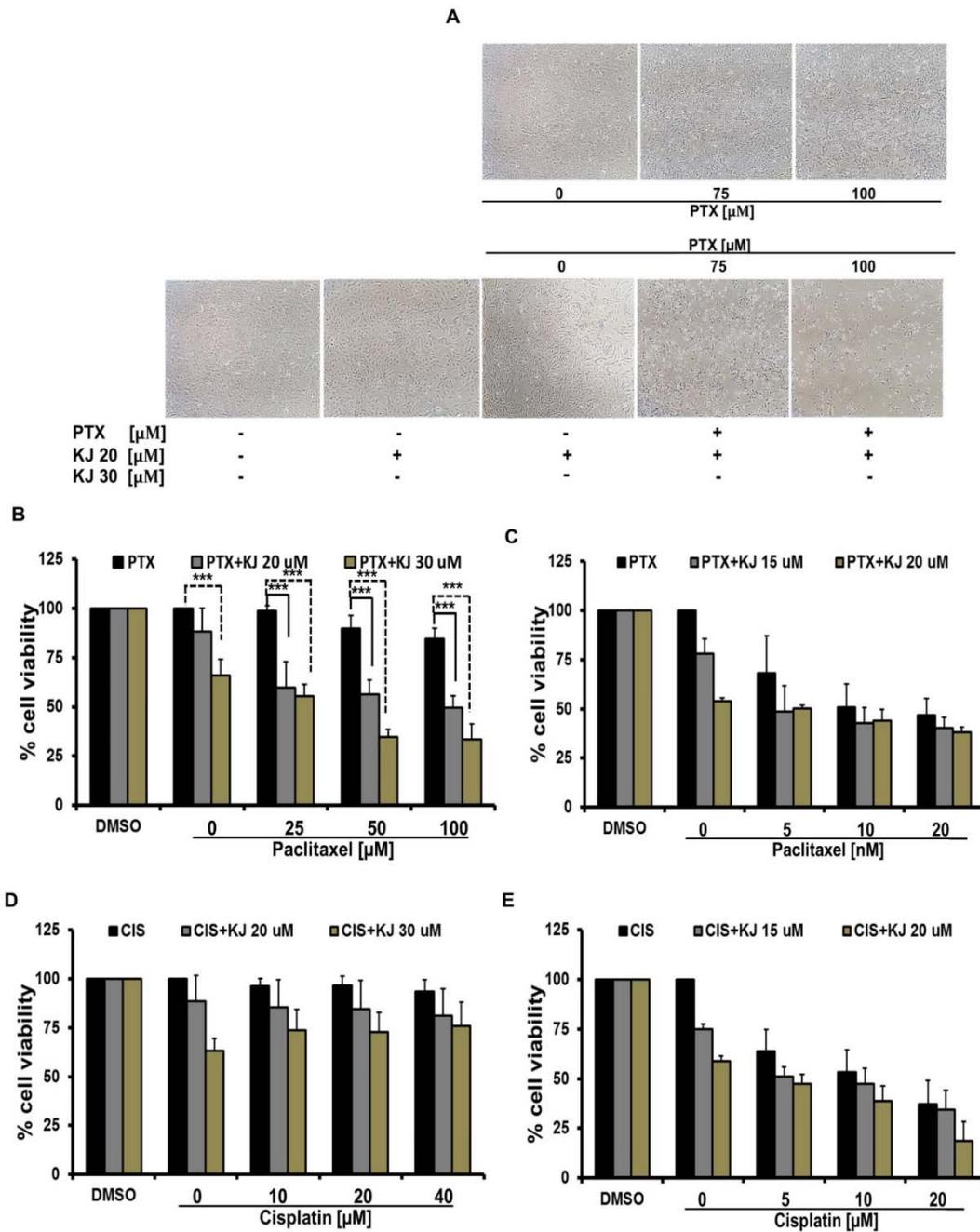


Fig. 2. Kuguacin J enhanced the cytotoxicity of paclitaxel in SKOV-3 cells (A-B), but not A2780 cells (C). Kuguacin J did not increase cisplatin sensitivity in SKOV-3 (D) and A2780 (E) cells. SKOV-3 cells and A2780 Cells were treated with paclitaxel or cisplatin with or without kuguacin J for 48 h and the cell survival was determined by the MTT assay. The values are presented as the means \pm S.D. of three independent experiments. *** $p < 0.001$, vs. the control treated without kuguacin J

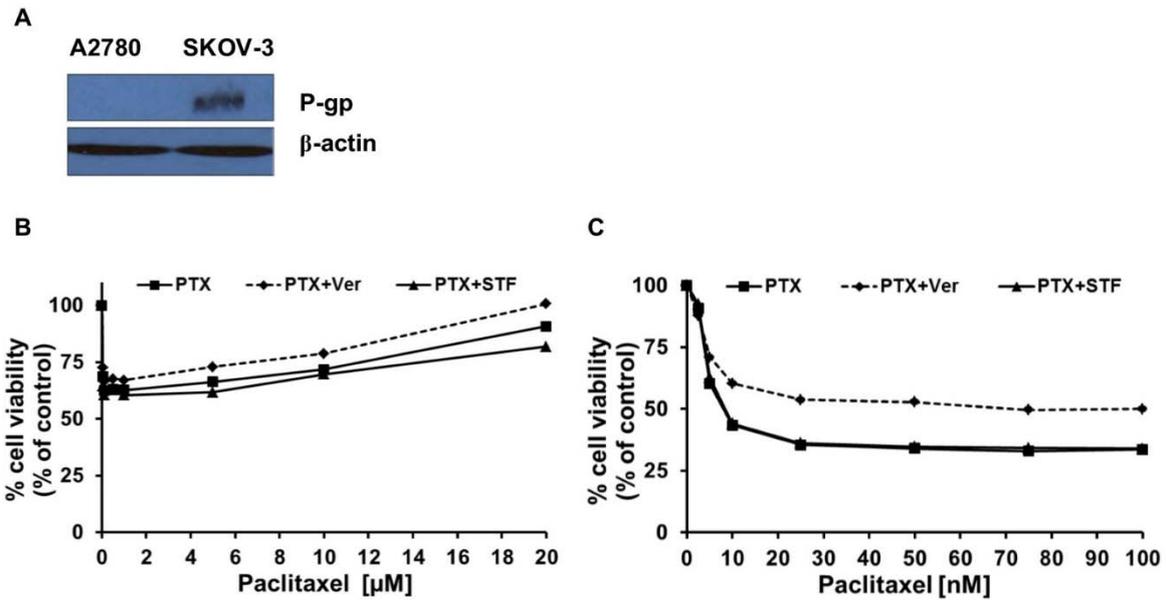


Fig. 3. P-glycoprotein over-expression was not related to PTX resistance in SKOV-3. The P-gp expression in SKOV-3 cells and A2780 cells was determined by western blot analysis (A). Effect of P-glycoprotein inhibitors, verapamil (B) and stemofoline (C) on cytotoxicity of paclitaxel in SKOV-3 cells. SKOV-3 cells were treated with paclitaxel with or without P-gp modulators, verapamil or stemofoline, for 48 h. The cell survival was determined by the MTT assay and the values are presented as the means \pm S.D. of three independent experiments.

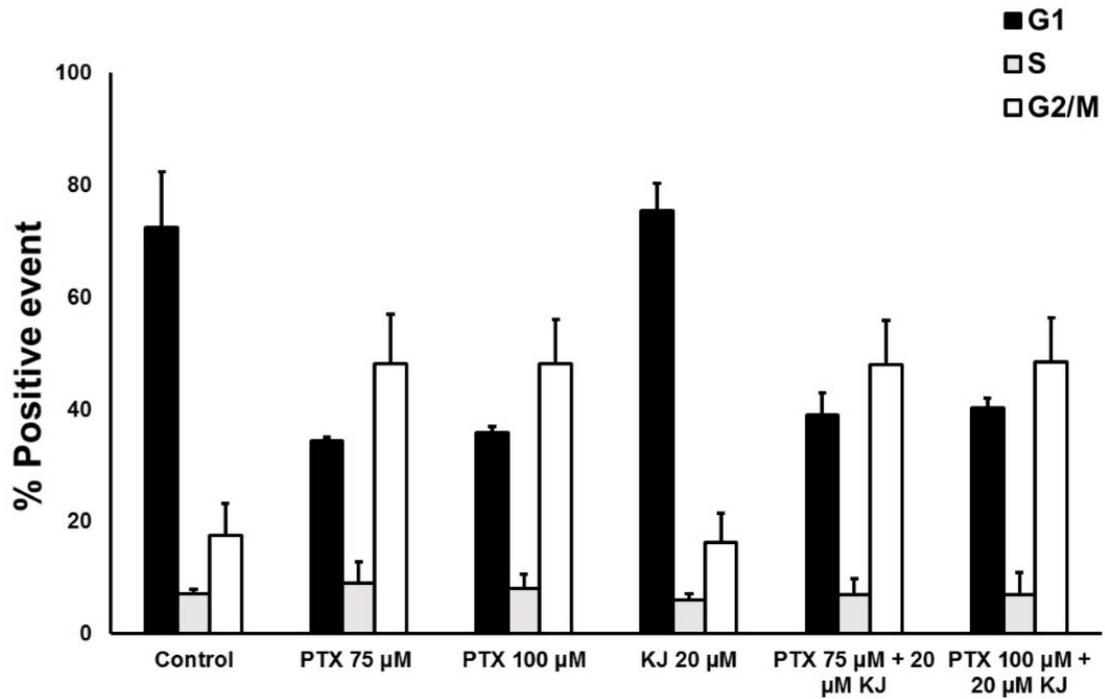


Fig. 4. Kuguacin J did not alter cell cycle arrest in the co-treatment with paclitaxel. SKOV-3 cells were treated with paclitaxel with or without kuguacin J for 48 h. The cells were harvested for analysis of cell cycle distribution. The values are presented as the means \pm S.D. of three independent experiments.

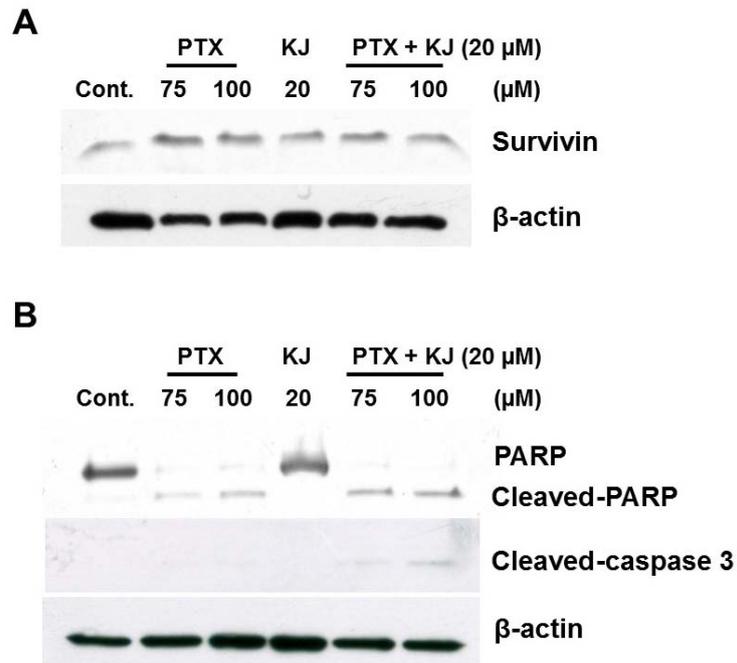


Fig 5. The co-treatment of paclitaxel and kuguacin J decreased survivin expression (A) and induced the expression of cleaved-PARP and cleaved-caspase 3 (B) in SKOV-3 cells. The SKOV-3 cells were treated with paclitaxel with or without kuguacin J for 48 h. The protein expression was determined by western blot analysis. The immunoblots shown here are representative of three independent experiments with similar results. β -actin was employed as a loading control.

Table 1 The survival data of adult flies obtained from trans-heterozygous flies

Sample	Concentration	Percentage of surviving flies	
		Experiment 1	Experiment 2
water	-	100	100
Urethane	20 mM	96	93
0.25% DMSO	-	92	94
BMLE	500 µg/ml	92	100
BMLE	200 µg/ml	99	100
BMLE	100 µg/ml	90	100

Table 2 The effect of BMLE on genome stability reported as wing spot formation on *Drosophila melanogaster*.

Experiment	Treatment		Spot per wing (Number of spots from 40 wings) ^a			
	Sample	Concentration	Small single (m = 2)	Large single (m = 5)	Twin spot (m = 5)	Total spot (m = 2)
1	Negative control	-	0.30 (12)	0 (0)	0.05 (2)	0.35 (14)
	Urethane	20 mM	9.13 (365)+	3.98 (159)+	2.08 (83)+	15.18 (607)+
	BMLE	500 µg/ml	0.20 (8)-	0.03 (1)i	0 (0)i	0.23 (9)-
2	Negative control	-	0.30 (12)	0.03 (1)	0 (0)	0.33 (13)
	Urethane	20 mM	8.10 (324)+	2.08 (83)+	1.10 (44)+	11.28 (451)+
	BMLE	500 µg/ml	0.38 (15)i	0.05 (2)i	0 (0)i	0.43 (17)i

^a Statistical diagnoses using estimation of spot frequencies and confidence limits according to Frei and Würigler (1988) for comparison with deionized water; + = Positive; - = Negative; i = Inconclusive. Probability levels: $\alpha = \beta = 0.05$. One-sided statistical test “m” is an increased mutation frequency compared with the spontaneous frequency (m times).