



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษากลไกของการเพิ่มความไวต่อรังสีของสารสกัดจาก  
เถาวัลย์เปรียงในเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ (HT29)

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์. ดร. อรุณี เหมะธูลิน

และคณะ

เมษายน 2556

# อภิธานการ



สัญญาเลขที่ R2554B098 สำนักหอสมุด

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

การศึกษากลไกของการเพิ่มความไวต่อรังสีของสารสกัดจาก  
เถาวัลย์เปรียงในเซลล์มะเร็งของเยื่อปอดไส้(HT29)

คณะผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณี เหมะธูลิน  
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. รองศาสตราจารย์ ดร. กรกนก อิงคินันท์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 19 ก.ค. 2556
เลขทะเบียน 163274x
เลขเรียกหนังสือ 0 PS

101  
.E9  
0U125  
2554

สนับสนุนโดยทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 มหาวิทยาลัยนเรศวร

## บทคัดย่อ

การเพิ่มการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์มะเร็งโดยการใช้สารเพิ่มความไวต่อรังสีนั้น เป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษามะเร็งด้วยรังสีให้มีมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากความเป็นพิษของสารเพิ่มความไวต่อรังสีที่มีผลต่อเนื้อเยื่อปกติ ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้พบว่า สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงมีประสิทธิภาพสูงมากในการเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT29 โดยที่ไม่มีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์ปกติของเยื่อบุเรตินา RPE และยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดนี้น้อยมาก การใช้สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงร่วมกับการฉายรังสีทำให้ความสามารถในการชลอ cell cycle progression ในระยะ G2/M ของเซลล์มะเร็ง HT29 ลดลงแต่ไม่มีผลต่อเซลล์ RPE นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงเหนียวทำให้เซลล์มะเร็ง HT29 ที่ได้รับรังสีเกิดการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น ทำให้การแตกหักของนิวเคลียสของเซลล์มะเร็ง HT29 เพิ่มขึ้น และทำให้ปริมาณ activated form ของโปรตีน Akt เพิ่มขึ้นเป็นระยะเวลาสั้น นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงทำให้ปริมาณ activated form ของโปรตีน Erk1/2 ทั้งในภาวะปกติและภาวะที่ถูกทำลายด้วยรังสีลดลง ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง HT29 โดยที่มีผลกระทบต่อเซลล์ปกติของเยื่อบุเรตินา RPE ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงให้ข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์และมีความสำคัญ ในการที่จะพัฒนาสารเพิ่มความไวต่อรังสีชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะสูง เพื่อที่จะนำมาใช้ในการรักษามะเร็งร่วมกับการฉายรังสีได้ในอนาคต

คำหลัก : เถาวัลย์เปรียง สารเพิ่มความไวต่อรังสี เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT29 พิษสมุนไพรร

## Abstract

The enhancing of radioresponsiveness of tumors by using radiosensitizers is a promising approach to increase the efficacy of radiation therapy. However, success of this strategy is limited by normal tissue toxicity. In this study, we showed that the extract from the stem of *Derris scandens* Benth powerfully increases the radiosensitivity of human colon cancer HT29 cells, while being less toxic to cells of the non-cancerous retinal pigment epithelial RPE cells and not affecting their radiosensitivity. Pretreatment of the cells with *D. scandens* extract was found to reduce radiation-induced G2/M phase arrest only in HT29 cells, but not in RPE cells. Furthermore, the extract was found to enhance radiation induces apoptosis, micronuclei and nuclear fragments formation, to increase Akt activation, and to decrease Erk1/2 activation in HT29 cells. This finding indicates that *D. scandens* extract effectively sensitizes human colon cancer HT29 cells to radiation-induced cell killing. This study provides a molecular basis for developing of a new potential radiosensitizer, with a highly selective and potent efficacy for cancer treatment.

**Key words :** *Derris scandens* Benth, radiosensitizer, colon cancer cells (HT29), medicinal plant

## Executive Summary

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง ในการเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติเยื่อบุเรตินา RPE และเพื่อศึกษากลไกของการเพิ่มขึ้นของความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง HT29 เมื่อได้รับสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงร่วมกับการฉายรังสี การดำเนินการวิจัยเริ่มจากการเตรียมสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงและทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นจึงทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองโดยการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดที่ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT ทำการหาปริมาณรังสีที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากอัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังจากได้รับรังสีโดยการย้อมเซลล์ด้วยสี Trypan Blue เมื่อทราบความเข้มข้นของสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงและปริมาณรังสีที่เหมาะสม แล้วจึงทำการทดสอบหาความสามารถในการเพิ่มความไวต่อรังสีของสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงในเซลล์ที่ใช้ทดสอบทั้งสองชนิด โดยพิจารณาจากอัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังจากได้รับรังสีโดยการย้อมเซลล์ด้วยสี Trypan Blue ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง HT29 โดยที่ไม่มีผลกระทบต่อความไวต่อรังสีของเซลล์ปกติ RPE จากนั้นได้ทำการทดสอบผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงในวัฏจักรเซลล์โดยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ พบว่าการใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงให้กับเซลล์ก่อนการฉายรังสี ทำให้ความสามารถในการยับยั้งให้อยู่ในระยะ G2/M ของเซลล์มะเร็ง HT29 ลดลงแต่ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ RPE เมื่อทำการศึกษากลไกที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง HT29 เมื่อได้รับสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงร่วมกับการฉายรังสีโดยพิจารณาจาก ปริมาณการเกิดไมโครนิวเคลียสโดยใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ จำนวนนิวเคลียสที่ผิดปกติโดยการย้อมด้วยสี Hoechst 33342 จำนวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยการย้อมด้วย Annexin V และ Propidium Iodide แล้ววิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าทั้งรังสีและสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงเหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็ง HT29 เมื่อนำมาใช้ร่วมกันจะส่งผลทำให้เซลล์ HT29 มีการตายเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ การให้รังสีหรือสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงเพียงอย่างเดียว จากการทดสอบหา กลไกที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงที่มีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง HT29 โดยตรวจหาระดับ activated form ของโปรตีน p53 และ Chk2 โดยวิธี Western Blot พบว่าการตอบสนองต่อการทำลายจากรังสีของโปรตีนทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการที่ไม่ใส่สารสกัดและการใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงร่วมกับการฉายรังสี นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงไปเพิ่ม activated form ของโปรตีน Akt แต่กลับลด activated form ของโปรตีน Erk1/2

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง มีคุณสมบัติในการเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง HT29 ซึ่งเป็นผลมาจากการที่สารสกัดไปทำให้เซลล์ที่ถูกทำลายด้วยรังสีถูกหยุดในระยะ G2/M ได้น้อยลงและเกิดการตายแบบ apoptosis มากขึ้นและนอกจากนั้น

ยังไปรบกวนต่อการทำงานของโปรตีน Akt และ Erk1/2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของเซลล์จากการถูกทำลายด้วยรังสี ซึ่งผลการทดลองทั้งหมดที่ได้นับว่าเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่จะนำไปสู่การพัฒนาเอาสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงไปเป็นสารเพิ่มความไวต่อรังสีเพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็งที่มีประสิทธิภาพได้ในอนาคต



## สารบัญ

บทที่	หน้า
1. บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยและ	1
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
2. วิธีการทดลอง	
การเตรียมสารสกัดและการเพาะเลี้ยงเซลล์	3
การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดเพื่อใช้ในการทดลอง	4
การหาปริมาณรังสีที่เหมาะสม	4
การทดสอบหาความสามารถในการเพิ่มความไวต่อรังสีของสารสกัดจาก	4
เถาวัลย์เปรียงโดยการหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังจากได้รับรังสี	
การทดสอบหาความสามารถในการเพิ่มความไวต่อรังสีของสารสกัด	5
ปริมาณของการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์หลังจากได้รับรังสี	
การทดสอบผลของสารสกัดที่มีต่อการดำเนินไปในวัฏจักรเซลล์	5
การทดสอบผลของสารสกัดต่อการตายของเซลล์	6
การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Western Blot	7
3. ผลการวิจัย	
ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดเพื่อใช้ในการทดลอง	8
การหาปริมาณรังสีที่เหมาะสม	8
อัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังจากได้รับรังสี	9
ปริมาณของการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์หลังจากได้รับรังสี	9
ผลของสารสกัดที่มีต่อการดำเนินไปในวัฏจักรเซลล์	11
ผลของสารสกัดต่อการตายของเซลล์	13
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง	16

บทที่ 4 สรุปผลโครงการ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

18

Out put ที่ได้จากโครงการ

19

เอกสารอ้างอิง

19

ภาคผนวก

24



## สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1. กราฟแสดง relative cell viability ของเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 และเซลล์ปกติของเยื่อบุเรติน่า RPE เมื่อได้รับสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง ที่ความเข้มข้นต่างๆ	8
2. กราฟอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อได้รับรังสีที่ปริมาณ 0, 2, 4, และ 6 Gy โดยเปรียบเทียบระหว่างการได้รับสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นต่างๆ	10
3. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์เมื่อได้รับรังสี	11
4. แผนภาพแสดงลักษณะของวัฏจักรของเซลล์และจำนวนร้อยละของเซลล์ในแต่ละระยะ ในสภาวะที่ไม่ได้สารสกัดและการใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง	12
5. แผนภาพแสดงลักษณะของวัฏจักรของเซลล์และจำนวนร้อยละของเซลล์ในแต่ละระยะ เปรียบเทียบระหว่างการไม่ได้รับรังสีกับเมื่อได้รับรังสีปริมาณ 9 Gy	12
6-7 ภาพเซลล์ HT29 จากการย้อมเซลล์ ด้วย Annexin V และ Propidium Iodide	13
8. ภาพนิวเคลียสเซลล์ HT29 จากการย้อมด้วยสี Hoechst 33342 และกราฟแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ HT29 ที่มีการแตกหักของนิวเคลียส	15
9. ภาพแสดงปริมาณของโปรตีน Phospho-Chk2 (Thr68) และ Phospho-p53 (Ser15) ด้วยวิธี Western blot	16
10. ภาพแสดงปริมาณของโปรตีน Phospho-Erk1/2 (pErk1/2), Erk1/2, Phospho-Akt (pAkt), Akt ด้วยวิธี Western blot	17

## บทนำ

รังสีรักษาคือการนำรังสีชนิดต่างๆมาใช้ในการรักษาโรคโดยเฉพาะในการรักษามะเร็ง เมื่อรังสีผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยา ต่อสารชีวโมเลกุลที่อยู่ภายใน เซลล์ซึ่งถ้าเซลล์ได้รับรังสีในขนาดสูงสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ก็จะถูกทำลายและสูญเสียความสามารถในการทำงานปกติและนำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด (1, 2) ปัจจุบันรังสีรักษามีบทบาทเป็นอย่างมากในการรักษา มะเร็ง ซึ่งประสิทธิภาพของการรักษามะเร็งด้วยรังสีนั้นขึ้นอยู่กับ การตอบสนองต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง เซลล์มะเร็งที่ตอบสนองต่อรังสีสูงหรือที่เรียกว่ามีความไวต่อรังสีสูง (highly radiosensitive) ก็จะสามารถรักษา ด้วยรังสีได้ผลดี (3, 4) แต่ก็ยังมีเซลล์มะเร็งหลายชนิดที่มีความทนต่อรังสีมากหรือดื้อต่อรังสี (radioresistant) การรักษาด้วยรังสีก็จะไม่ได้ผลดี เนื่องจากต้องใช้รังสีในขนาดที่สูงจึงจะสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งเหล่านี้ได้ แต่ก็มีผลเสียก็คือเซลล์ปกติที่อยู่รอบๆก็จะตายไปด้วย ผู้ป่วยก็จะไม่สามารถทนทานต่อผลข้างเคียงที่เกิดจากการ ฉายรังสีได้

ความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่ง ต่อประสิทธิภาพของการรักษาด้วยรังสี การเพิ่มประสิทธิภาพของรังสีรักษาสามารถทำได้โดยการทำให้เซลล์มะเร็งมีความไวต่อรังสีมากขึ้น โดยมีหลักการที่สำคัญก็คือต้องทำการเพิ่มความไวต่อรังสีเฉพาะในเซลล์มะเร็งเท่านั้น แต่ต้องไม่มีผลหรือมีผลน้อยมากต่อเซลล์ ปกติ (5) ซึ่งก็มีค้นคว้าวิจัยมาอย่างต่อเนื่องเพื่อค้นหาสารที่สามารถเปลี่ยนแปลงการตอบสนองต่อรังสีของ เซลล์มะเร็งให้มีความไวต่อรังสีมากขึ้นสารที่มีคุณสมบัตินี้เรียกว่า Radiosensitizer (6) ส่วนกลไกที่ทำให้เกิด การเปลี่ยนแปลงของการตอบสนองต่อรังสีโดย Radiosensitizer มีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของ สารชนิดนั้นๆ กลไกเหล่านี้ได้แก่การที่สารนั้นไปเพิ่มหรือเสริมฤทธิ์ของรังสีในการทำลายสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ ที่อยู่ภายในเซลล์ (increase in initial damage) เช่น ไปทำลาย DNA หรืออาจไปรบกวนหรือยับยั้งกระบวนการ ซ่อมแซม DNA (interfere or inhibit repair of DNA damage) ไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (inhibit tumor cell regeneration) ไปรบกวนวัฏจักรของเซลล์ (interfere cell cycle control) (7) และที่สำคัญคือไป เพิ่มหรือเร่งกระบวนการตายของเซลล์ ซึ่งได้แก่ apoptosis necrosis senescence autophagy และ mitotic catastrophe (2,8) ตัวอย่างเช่น สาร tirapazamine (TPZ) ที่สามารถเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์ที่อยู่ใน ภาวะขาดออกซิเจนโดยการเข้าไปจับสาย DNA แล้วจะทำให้เกิด DNA radical สุดท้ายจะทำให้เกิดการแตกหัก ของสาย DNA แบบ double strand (9) มีการนำสารนี้มาใช้ในการรักษามะเร็งชนิด head and neck ร่วมกับการฉายรังสีและพบว่า ให้ผลการรักษาเป็นที่น่าพอใจ (10) ยังมี Radiosensitizer อีกหลายชนิด เช่น Cispatin (11), Temozolomide (12), 5-Fluorouracil (13) ที่มีกลไกการออกฤทธิ์โดยเป้าหมายที่ DNA แต่อย่างไร ก็ตามกลไกที่แท้จริงในการที่สารเหล่านี้ไปมีผลต่อการเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์ยังไม่ทราบชัด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Radiosensitizers บางชนิดไปมีผลต่อ

cell signaling pathways เช่น Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway ซึ่งการแสดงออกที่สูงกว่าปกติของยีน EGFR จะพบได้บ่อยในเซลล์ มะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะใน epithelial cancers (14) ซึ่งทำให้เซลล์มะเร็งเหล่านี้มีความต่อต่อรังสีมากกว่า สารบางชนิดเช่น Cetuximab สามารถยับยั้ง EGFR) signaling pathway (15) เมื่อทดลองใช้สารนี้ร่วมกับการ ฉาย รังสีพบว่าทำให้ความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งชนิด HNSCC เพิ่มขึ้น (15, 16)

ถึงแม้ว่าจะมีการค้นคว้าวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อค้นหาสารที่มีคุณสมบัติ เพิ่มความไวต่อ รังสีเพื่อที่จะนำมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพของรังสีรักษาให้มากขึ้น แต่เนื่องจากขบวนการตอบสนอง ต่อรังสีของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดนั้นแตกต่างกันและมีกลไกที่ซับซ้อน นอกจากนั้นในผู้ป่วยแต่ละ คนถึงแม้จะเป็นมะเร็งชนิดเดียวกันแต่ก็ยังมี การตอบสนองต่อรังสีที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ปัจจัยทางด้านพันธุกรรมและสภาพร่างกายของแต่ละบุคคล (14, 17) นอกจากนั้นสารหลายชนิดที่ ถูกค้นพบว่าสามารถเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งได้ดี แต่ในขณะ เดียวกันก็ไปมีผลในการ เพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์ปกติด้วย (1) จากรายงานการวิจัยพบว่าสารสกัดจากพืชบางชนิดเมื่อนำมาทดลองใช้ร่วมกับการฉายรังสี จะทำให้เกิดความเสียหายหรือการตายของเซลล์มะเร็งมากขึ้น ดังอย่างเช่น สารสกัดจาก Ganoderma lucidum และ Duchesnea chrysantha [18] สารจำพวก polyphenol และ flavonoids ที่สกัดได้จากพืชต่างๆเช่น ถั่วเหลือง ถั่วอัลฟาฟ่า และธัญพืชอื่นๆ (19-21)

ถั่ววัลย์เปรียงเป็นพืชในวงศ์ Leguminosea มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า Derris scandens Benth เป็นไม้เถาขนาดใหญ่พบได้ทั่วไปในแถบร้อนชื้น ลำต้นของถั่ววัลย์เปรียงเมื่อนำมาสกัด ด้วยน้ำจะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (22) สารสกัดบิวทานอลมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต (23) และสารสกัดน้ำและเอทานอลมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (23,24) ในสารสกัดจากถั่ววัลย์เปรียงจะ พบสารประกอบประเภท isoflavone เช่น Isoscandione (25), Scandione (23), 4',5',7-trihydroxybiprenylisoflavone (Genistein) (26) และ Derriscandinoside (27) เป็นต้น ในบรรดา สารประกอบที่พบเหล่านี้เคยมีรายงานไว้ว่า Genistein ซึ่งเป็นสาร ที่พบในถั่ววัลย์เปรียงและ สามารถพบได้ใน ถั่วเหลือง และธัญพืชบางชนิด (28) สารชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของ เซลล์มะเร็งหลายชนิด โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle control) และกลไกการตายของเซลล์แบบ apoptosis (29-34) นอกจากนี้ยังพบว่า Genistein ยังสามารถ เพิ่มความไวต่อรังสีได้โดยไปยับยั้ง survival signaling pathways ของ human esophageal squamous cancer cell line (36) และเหนี่ยวนำให้เกิดการตาย แบบ apoptosis ใน CaSki Cervical cancer cell line (36)

จากการศึกษาค้นคว้าเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่า สารสกัดหยาบจากลำต้น ของถั่ววัลย์ เปรียงมีฤทธิ์ ของการเป็นสาร Radiosensitizer สูงมาก เมื่อนำสารสกัดนี้มาใส่ให้กับเซลล์เยื่อ ผนัง มะเร็งลำไส้ใหญ่ก่อนที่จะนำ เซลล์ไปฉายรังสีจะทำให้เซลล์มะเร็งเยื่อผนังลำไส้ใหญ่มีการตายมากขึ้น อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม ควบคุม การออกฤทธิ์ดังกล่าวของสกัดจากลำต้นของถั่ว

วัลย์เปรียงยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงต้องการที่จะทำการศึกษาค้นคว้าหา กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการตอบสนองต่อ รังสีของเซลล์มะเร็งเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่จะนำไปสู่การค้นพบ และพัฒนาสาร Radiosensitizer ตัวใหม่เพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็งที่มีประสิทธิภาพ ได้ใน อนาคต

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงในการเพิ่มความไวต่อรังสีของ เซลล์มะเร็งเยื่อบุ ลำไส้ใหญ่
2. เพื่อศึกษากลไกของการเพิ่มขึ้นของความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งเยื่อบุลำไส้ใหญ่เมื่อได้รับสาร สกัดจากเถาวัลย์เปรียงร่วมกับการฉายรังสี

## วิธีทดลอง

### 1. การเตรียมสารสกัดและการเพาะเลี้ยงเซลล์

การเตรียมสารสกัด ทำการเก็บตัวอย่างจากลำต้นของเถาวัลย์เปรียงมาหั่นให้เป็นชิ้น เล็กๆ แล้วทำให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดบดจนเป็นผง แล้วจึงนำไปแช่ในแอลกอฮอล์เป็นเวลา 3 วัน ทำการกรองและระเหยให้แห้งภายใต้สุญญากาศ แล้ว จึงเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบในลำดับต่อไป นอกจากนั้นยังได้เก็บ ตัวอย่างสารสกัดที่ได้ในรูปแบบ voucher specimen ไว้เป็นหลักฐานอ้างอิง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ เซลล์ที่ใช้ในการทดลองคือเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ (colon cancer epithelial cell line, HT29) และเซลล์ปกติจากเยื่อบุเรตินา (retinal epithelial pigment epithelial cell line, RPE) ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM/Ham's F-12) ซึ่งมี 10 % bovine serum, 2.5 mM glutamine, 40 U/ml Penicillin G, 40 µg Streptomycin ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO<sub>2</sub>

## 2. การหาภาวะที่เหมาะสมของการทดสอบ

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัด ความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมที่ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถหาได้โดยการทดสอบหา cell viability ด้วยวิธี MTT test โดยมีขั้นตอนการทดลองคือ ทำการเลี้ยงเซลล์ในภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม โดยใช้เซลล์จำนวน 30,000 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 400  $\mu$ l ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการเติมสารสกัดลงในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 2.5, 5, 15, 50, 100, 150  $\mu$ g/ml โดยในแต่ละความเข้มข้นจะทำแบบ triplicate แล้วจึงเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสาร MTT ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 80  $\mu$ l ลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุมแล้วเลี้ยงต่อในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดแล้วเติม MTT solvent ปริมาตร 600  $\mu$ l ทำการหุ้มภาดเลี้ยงเซลล์ด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอล์ย ทำการเขย่าโดยเครื่อง shaker เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงทำการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm บันทึกค่า นำไปหาค่าเฉลี่ยและค่า standard error แล้วนำไปสร้างกราฟและคำนวณหา ค่า IC<sub>50</sub>

การหาปริมาณรังสีที่เหมาะสม ปริมาณรังสีที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลองหาได้จากการทดสอบหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมา โดยการย้อมเซลล์ด้วยสี Tryphan Blue และทำการนับจำนวนของเซลล์ที่รอดชีวิตซึ่งมีขั้นตอนการทดลองคือ ทำการเลี้ยงเซลล์ในภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม จำนวนเซลล์ 40,000 เซลล์ต่อหลุม ทำแบบ duplicate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1.5 ml ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปฉายรังสีในปริมาณต่างๆโดยอยู่ในช่วง 1-9 Gy หลังจากนั้นจึงทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วเลี้ยงไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงทำการย้อมเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน ย้อมด้วยสี tryphan blue ความเข้มข้น 2% แล้วทำการนับเซลล์ที่มีชีวิตโดย Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ ทำการบันทึกค่าและหาค่าเฉลี่ย

## 3. การทดสอบหาความสามารถในการเพิ่มความไวต่อรังสีของสารสกัด

หาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังจากได้รับรังสี โดยที่เมื่อทราบความเข้มข้นและปริมาณรังสีที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลองแล้ว จากนั้นจึงทำการทดสอบความสามารถในการเพิ่มความไวต่อรังสีของสารสกัดจากเกววัลย์เปรียงในเซลล์มะเร็งของเยื่อปอดใหญ่ HT29 และเซลล์ปกติจากเยื่อปอด RPE โดยวัดจากอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ทั้งสองชนิดโดยวิธี tryphan blue staining ในภาวะควบคุม (ไม่ใช้สารสกัดและไม่ฉายรังสี) เปรียบเทียบกับ ภาวะที่ได้รับรังสี

หรือสารสกัดอย่างเดียว หรือการให้สารสกัดร่วมกับการฉายรังสีโดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 0, 5 และ 15  $\mu\text{g/ml}$  ปริมาณรังสี 0, 2, 4 และ 6 Gy

การทดสอบหาปริมาณการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์หลังจากได้รับรังสี โดยใช้เครื่อง Fluorescent activated cell sorting ปริมาณไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากการถูกทำลายด้วยรังสีหรือสารที่มีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมสามารถตรวจวัดได้ โดยมีขั้นตอนการทดลองคือทำการเลี้ยงเซลล์ในภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม จำนวนเซลล์ 40,000 เซลล์ต่อหลุม ทำแบบ duplicate เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1.5 ml ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการเติมสารสกัดลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0, 5, 15  $\mu\text{g/ml}$  โดยในแต่ละความเข้มข้นจะทำแบบ duplicate แล้วเลี้ยงเซลล์ต่ออีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปฉายรังสีในปริมาณ 9 Gy จากนั้นนำไปเลี้ยงไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงทำการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำเซลล์ที่ได้ไปผสมกับสารละลายปริมาตร 500  $\mu\text{l}$  ที่ประกอบด้วย 584 mg/l NaCl, 1,000 mg/l Na-citrate, 10 mg/l RNAase, 0.3 mg/l Nonidet P-40, and 50  $\mu\text{g/ml}$  Propidium iodide (PI) แล้วตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลายปริมาตร 500  $\mu\text{l}$  ที่ประกอบด้วย 15 g/l Citric acid, 0.25 mM Sucrose, and 50  $\mu\text{g/ml}$  PI ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์หาจำนวนไมโครนิวเคลียสด้วยเครื่อง Flowcytometer โดยการประเมินจาก Histogram ของ cell cycle distribution profile ซึ่งไมโครนิวเคลียสคือเซลล์ที่มีปริมาณสาร DNA น้อยกว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะ G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>

#### 4. การทดสอบผลของสารสกัดที่มีต่อวัฏจักรของเซลล์

การวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์โดยการทำ Cell cycle analysis เป็นการตรวจสอบเพื่อระบุถึงสาเหตุที่ทำให้เซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 มีความไวต่อรังสีเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง โดยมีขั้นตอนการทดสอบเหมือนกับการทดสอบหาปริมาณของการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์หลังจากได้รับรังสีโดยใช้เครื่อง Flow cytometer โดยมีขั้นตอนการทดลองคือทำการเลี้ยงเซลล์ในภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม จำนวนเซลล์ 40,000 เซลล์ต่อหลุม ทำแบบ duplicate เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1.5 ml ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการเติมสารสกัดลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0, 5, 15  $\mu\text{g/ml}$  โดยในแต่ละความเข้มข้นจะทำแบบ duplicate แล้วเลี้ยงเซลล์ต่ออีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปฉายรังสีในปริมาณ 9 Gy จากนั้นนำไปเลี้ยงไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงทำการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำเซลล์ที่ได้ไปผสมกับสารละลายปริมาตร 500  $\mu\text{l}$  ที่ประกอบด้วย 584 mg/l NaCl, 1,000 mg/l Na-citrate, 10 mg/l RNAase, 0.3 mg/l Nonidet P-40, and 50

$\mu\text{g/ml}$  Propidium iodide (PI) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเติม สารละลายปริมาตร  $500\ \mu\text{l}$  ที่ประกอบด้วย  $15\ \text{g/l}$  Citric acid,  $0.25\ \text{mM}$  Sucrose, and  $50\ \mu\text{g/ml}$  PI ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flowcytometer โดยการวิเคราะห์ด้วยจักรเซลล์จะประเมินจากความเข้มของการเรืองแสงของ Propidium iodide ในแต่ละเซลล์ ซึ่งความเข้มของการเรืองแสงนั้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ ปริมาณสาร DNA ที่มีอยู่ในเซลล์ โดยเซลล์ที่อยู่ในระยะ G0/G1 จะมีปริมาณสาร DNA เป็น ครึ่งหนึ่งของเซลล์ที่อยู่ในระยะ G2/M ส่วนเซลล์ในระยะ S จะมีปริมาณสาร DNA มากกว่าในระยะ G0/G1 แต่น้อยกว่าระยะ G2/M การวิเคราะห์จะทำได้โดยการหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ในระยะต่างๆ จาก Histogram ของ cell cycle distribution profile

#### 5. การทดสอบผลของสารสกัดต่อการตายของเซลล์

การทดสอบหา apoptosis marker ด้วยการย้อมด้วย Annexin V และ Propidium iodide เพื่อหาสาเหตุการตายของเซลล์มะเร็ง HT29 ซึ่งทำให้เซลล์มีความไวต่อรังสีเพิ่มขึ้นเมื่อ ได้รับสารสกัดจากเกวาล์ยเปรียง โดยทำการวิเคราะห์ลักษณะของเซลล์และจากการทดสอบโดยการย้อมเซลล์ HT29 ด้วย Annexin V และ Propidium iodide แล้วทำการวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งมีการทดลองดังนี้คือทำการเลี้ยงเซลล์ในภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม จำนวนเซลล์  $40,000$  เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร  $1.5\ \text{ml}$  ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ อุณหภูมิ  $37$  องศาเซลเซียส  $5\% \text{CO}_2$  เป็นเวลา  $12$  ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการเติมสารสกัดลงไป ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น  $15\ \mu\text{g/ml}$  โดยในแต่ละความเข้มข้นจะทำแบบ duplicate แล้ว เลี้ยงเซลล์ต่ออีกเป็นเวลา  $24$  ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปฉายรังสีในปริมาณ  $9\ \text{Gy}$  จากนั้นนำไปเลี้ยง ไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา  $48$  ชั่วโมงแล้วทำการย้อมเซลล์ด้วย Annexin V และ Propidium iodide แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งเมื่อเซลล์เข้าสู่ขบวนการ apoptosis ใน ระยะแรกจะย้อมติด Annexin V เพียงอย่างเดียว แต่เมื่อเข้าสู่ระยะท้ายของ apoptosis หรือ necrosis เซลล์จะย้อมติดทั้ง Annexin V และ Propidium iodide

การวิเคราะห์ลักษณะและจำนวนของนิวเคลียสที่ถูกทำลาย ด้วยการย้อมด้วยด้วยการ ย้อมสี Hoechst 33342 เพื่อหาสาเหตุการตายของเซลล์มะเร็ง HT29 ซึ่งทำให้เซลล์มีความไวต่อ รังสีเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสารสกัดจากเกวาล์ยเปรียง ซึ่งมีการทดลองดังนี้คือทำการเลี้ยงเซลล์ในภาด เลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม จำนวนเซลล์  $40,000$  เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร  $1.5\ \text{ml}$  ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ  $37$  องศาเซลเซียส  $5\% \text{CO}_2$  เป็นเวลา  $12$  ชั่วโมง หลังจากนั้นจึง ทำการเติมสารสกัดลงไป ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น  $15\ \mu\text{g/ml}$  โดยในแต่ละความเข้มข้นจะทำ แบบ duplicate แล้วเลี้ยงเซลล์ต่ออีกเป็นเวลา  $24$  ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปฉายรังสีในปริมาณ  $6\ \text{Gy}$  จากนั้นนำไปเลี้ยงไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา  $48$  ชั่วโมงแล้วทำการย้อมเซลล์ด้วยสี Hoechst

33342 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ การวิเคราะห์ลักษณะและจำนวนของนิวเคลียสที่ถูกทำลาย

## 6. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Western Blot

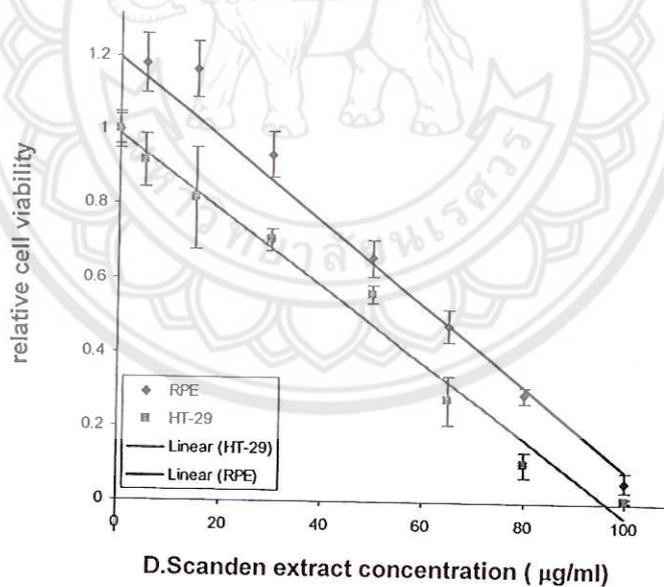
เป็นการทดสอบเพื่อหาปริมาณของโปรตีน ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเกอวาล์ยเปรียง โดยตรวจหาระดับ activated form ของโปรตีน p53, Chk2 และ Akt, Erk1/2 ทั้งในรูปของ activated form และ total protein ซึ่งมีการทดลองดังนี้คือทำการเลี้ยงเซลล์ในสภาพเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม จำนวนเซลล์ 80,000 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1.5 ml ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการเติมสารสกัดลงในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 15 µg/ml โดยในแต่ละความเข้มข้นจะทำการแบบ duplicate แล้วเลี้ยงเซลล์ต่ออีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปฉายรังสีในปริมาณ 9 Gy จากนั้นนำไปเลี้ยงไว้ในตู้เพาะเลี้ยงแล้วทำการสกัดโปรตีนที่เวลา 0, 1, 3, และ 6 ชั่วโมง หลังจากฉายรังสี นำโปรตีนที่ได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าตามวิธีมาตรฐานของการทำ SDS PAGE electrophoresis แล้วทำการย้ายโปรตีนลงสู่แผ่น PVDF ด้วยเครื่อง electro blotting (37) จากนั้นนำไปย้อมด้วยแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบและทำการบันทึกภาพที่ได้ลงบนฟิล์มเอกซเรย์

## ผลการทดลอง

### 1. ภาวะที่เหมาะสมของการทดสอบ

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัด จากการทดสอบผลของสารสกัดต่อการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดย MTT Test พบว่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงที่ทำให้เซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 มีการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (IC50) คือ 47.8  $\mu\text{g/ml}$  และที่ทำให้เซลล์เยื่อบุเรตินามีการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (IC50) คือ 62.9  $\mu\text{g/ml}$  ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1 และเป็นที่น่าสนใจว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 สูงกว่าต่อเซลล์ปกติของเยื่อบุเรตินา RPE

จากผลการทดลองที่ได้ผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงที่ 5  $\mu\text{g/ml}$  และ 15  $\mu\text{g/ml}$  ในการทดสอบในลำดับต่อไป เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ปกติของเยื่อบุเรตินา RPE และทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 ต่ำกว่าร้อยละ 20



รูปที่ 1. กราฟแสดง relative cell viability ของเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 และเซลล์ปกติของเยื่อบุเรตินา RPE เมื่อได้รับสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นต่างๆ

ปริมาณรังสีที่เหมาะสม จากการทดสอบโดยการนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากการฉายรังสีโดยวิธี tryphan blue staining พบว่าปริมาณรังสี 2 Gy, 4 Gy, และ 6 Gy ทำให้เซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 มีการตายร้อยละ 80.6 $\pm$ 5.9, 61.5 $\pm$ 9.7, และ 55.6 $\pm$ 10.8

ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ปกติของเยื่อบุเรติน่า RPE มีการตายร้อยละ 47.6±1.7, 38.3±2.4, 27.9±2.0 ตามลำดับ ส่วนปริมาณรังสีที่ 9 Gy และ 12 Gy ทำให้เกิดการตายของเซลล์ปกติของเยื่อบุเรติน่า RPE สูงกว่าร้อยละ 80

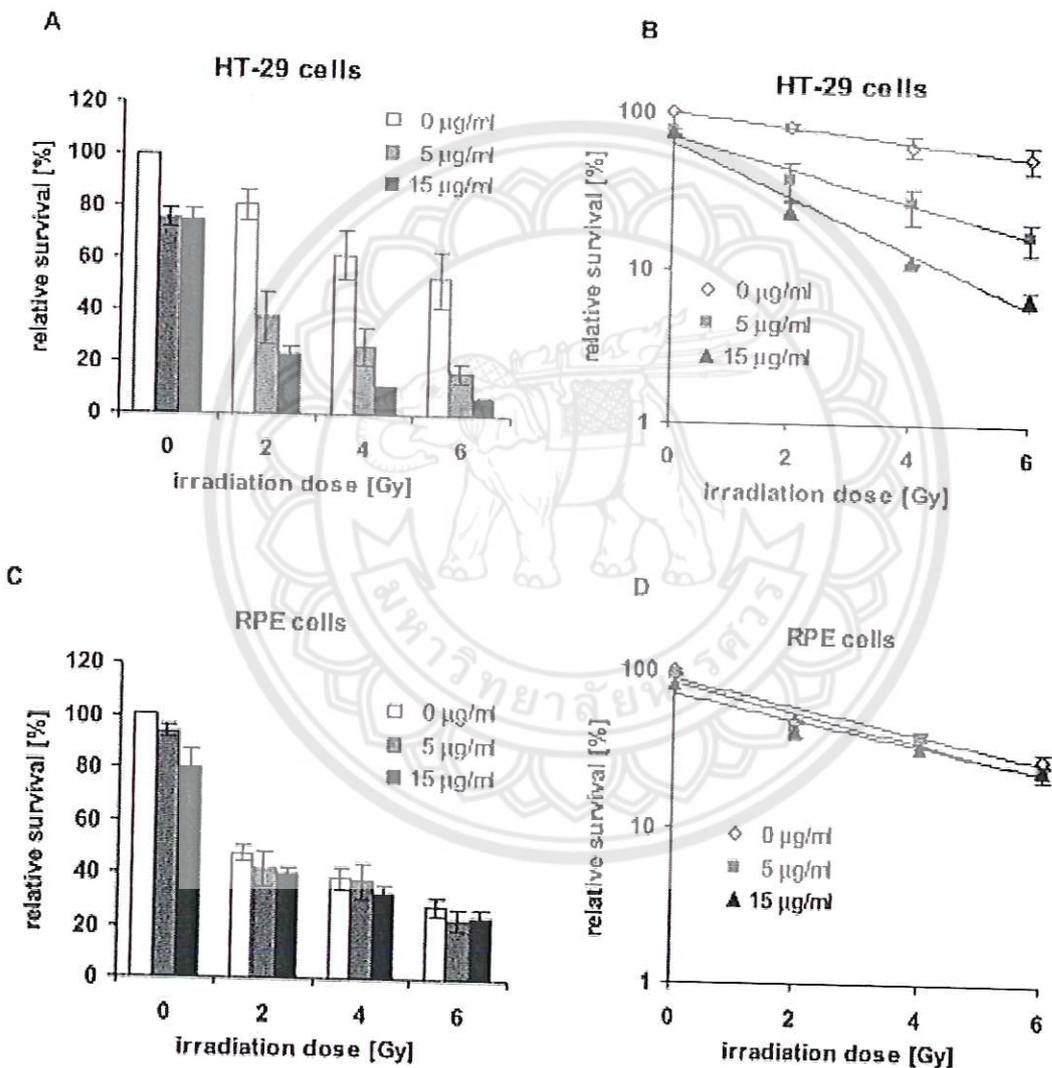
จากผลการทดลองที่ได้ผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ปริมาณรังสี 2 Gy, 4 Gy, และ 6 Gy ในการหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์โดยวิธี trypan blue staining และใช้ปริมาณรังสี 9 Gy ในการหาปริมาณของการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ ในการทดลองในลำดับต่อไป

## 2. ความสามารถในการเพิ่มความไวต่อรังสีของสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง

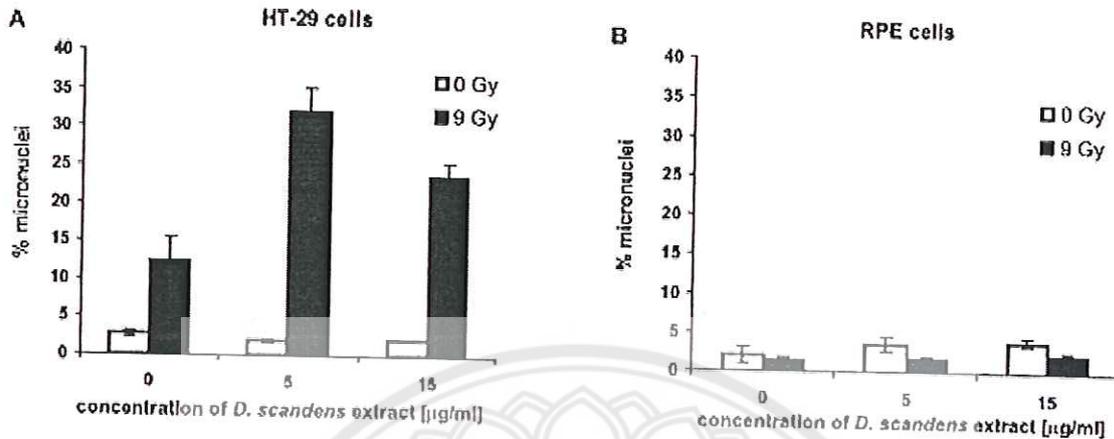
อัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังจากได้รับรังสี จากการทดสอบหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์โดยวิธี trypan blue staining พบว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงทำให้ความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (5 µg/ml,  $p < 0.05$  และ 15 µg/ml,  $p < 0.01$ ) โดยที่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HT29 ที่ปริมาณรังสี 2 Gy (SF2) มีค่าลดลงจาก 0.80±0.04 เป็น 0.50±0.06 และจาก 0.34±0.20 เมื่อใช้สารสกัดความเข้มข้น 5 µg/ml และ 15 µg/ml ตามลำดับ ส่วนปริมาณรังสีที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HT29 ลดลงเป็น 0.37 (D37) คือ 9.1 Gy + 0.6 Gy, 4.9 Gy + 0.3 Gy, และ 2.8 Gy + 0.2 Gy ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0 µg/ml, 5 µg/ml และ 15 µg/ml ตามลำดับ และมีค่า radiation enhancement ratio ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 5 µg/ml เป็น 1.6 และ 1.8 เมื่อคำนวณจากค่า SF2 และ D37 ตามลำดับ ส่วนค่า radiation enhancement ratio ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 15 µg/ml คือ 2.4 และ 3.3 เมื่อคำนวณจากค่า SF2 และ D37 ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 2 A และ B) ถึงแม้ว่าในภาวะปกติเซลล์ปกติของเยื่อบุเรติน่า RPE จะมีความไวต่อรังสีสูงกว่าเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์โดยใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงแล้วนำไปฉายรังสีก็ไม่พบว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงไปมีผลในการเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์ปกติของเยื่อบุเรติน่า RPE แต่อย่างใด (ดังแสดงในรูปที่ 2C และ D)

ปริมาณของการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์หลังจากได้รับรังสี ปริมาณของไมโครนิวเคลียสเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์ จากการถูกทำลายโดยรังสีหรือจากสารที่มีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมื่อใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงเพียงอย่างเดียวให้กับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดสอบทั้งสองชนิด สารสกัดไม่ได้ทำให้ปริมาณของไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติที่ไม่ใส่สารสกัด (ดังแสดงในรูปที่ 3A และ 3B) เมื่อทำการฉายรังสีให้กับเซลล์เพาะเลี้ยงในปริมาณ 9 Gy พบว่าปริมาณไมโครนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 สูงขึ้นเป็น 4 เท่า และเมื่อใส่สารสกัดลงไปในเซลล์ HT29 ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml หรือ 15 µg/ml พบว่าปริมาณไมโครนิวเคลียสสูงขึ้นไปถึง 13 และ 10

เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับสภาวะปกติที่ไม่ใส่สารสกัดและไม่ฉายรังสี (ดังแสดงในรูปที่ 3A) ส่วนในเซลล์ปกติของเยื่อบุเรติน่า RPE พบว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงไม่ทำให้ปริมาณของไมโครนิวเคลียสสูงขึ้น ทั้งในสภาวะที่ใส่สารสกัดอย่างเดียวหรือใส่สารสกัดก่อนที่จะฉายรังสี (ดังแสดงในรูปที่ 3B) ผลการทดลองทั้งจากการหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์และจากปริมาณไมโครนิวเคลียสที่เพิ่มขึ้น สรุปได้ว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ในการเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติของเยื่อบุเรติน่า RPE



รูปที่ 2 กราฟอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อได้รับรังสีที่ปริมาณ 0, 2, 4, และ 6 Gy โดยเปรียบเทียบระหว่างการได้รับสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นต่างๆ : A และ B แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29, C และ D แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ปกติของเยื่อบุเรติน่า RPE



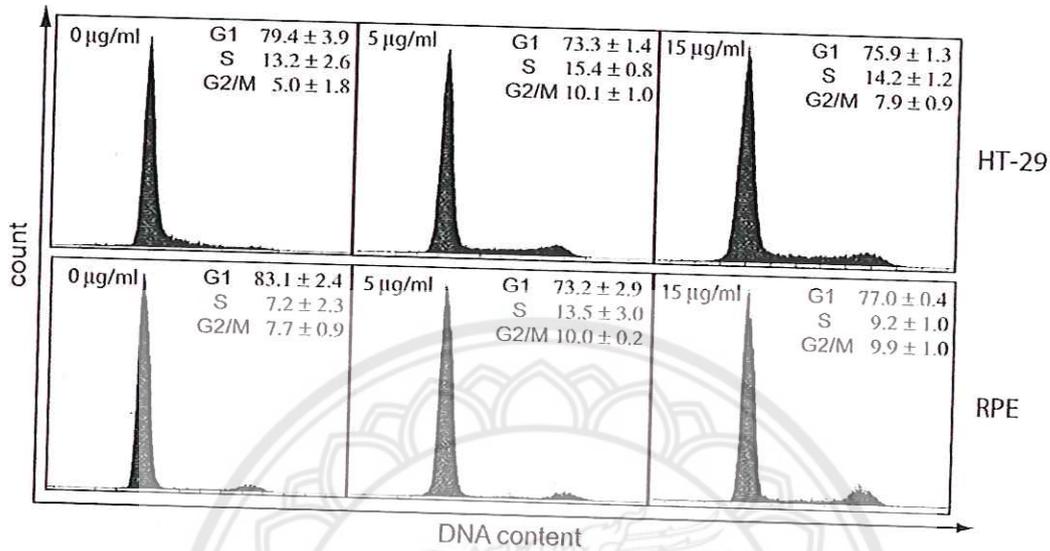
รูปที่ 3 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์เมื่อได้รับรังสี 9 Gy โดยเปรียบเทียบระหว่างที่ไม่ใส่สารสกัดและการใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/ml}$  และ 15  $\mu\text{g/ml}$  : A แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 และ B แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ปกติของเยื่อบุเรติน่า RPE

### 3. ผลของสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงที่มีต่อวัฏจักรของเซลล์

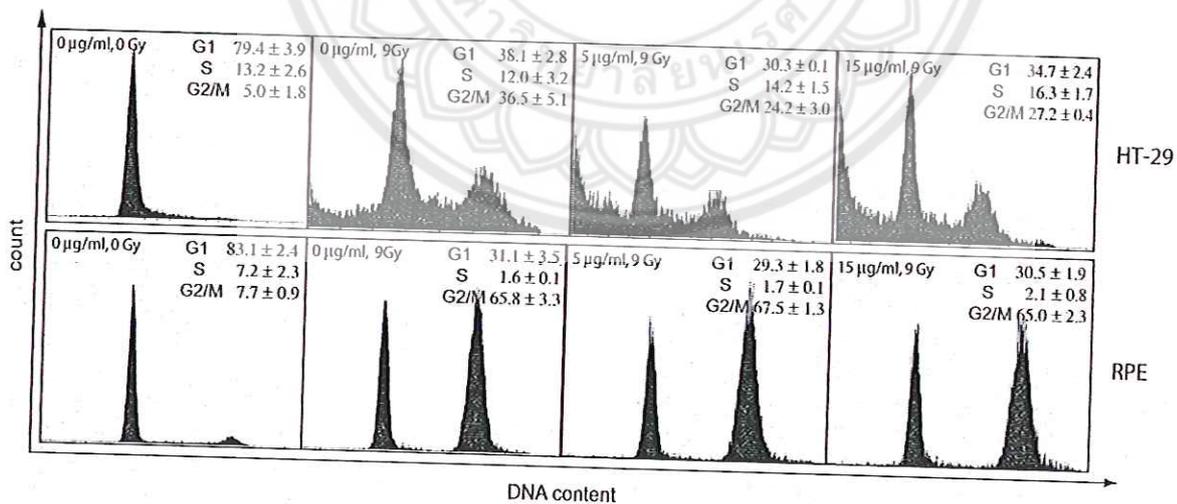
จากการวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์โดยการทำ Cell cycle analysis เมื่อใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงให้กับเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 3  $\mu\text{g/ml}$  และ 15  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดทำให้จำนวนของเซลล์ที่อยู่ในระยะ G2/M เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ดังแสดงในรูปที่ 4) เมื่อพิจารณาในส่วนของเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 พบว่าเมื่อฉายรังสีให้กับเซลล์ในปริมาณ 9 Gy จำนวนของเซลล์ที่อยู่ในระยะ G2/M มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 5% เป็น 36% และเมื่อทำการใส่สารสกัดที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/ml}$  หรือ 15  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการฉายรังสี พบว่าจำนวนของเซลล์ที่อยู่ในระยะ G2/M มีการลดลงเหลือเพียง 24% และ 27% ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 5 บน) เมื่อพิจารณาในส่วนของเซลล์ปกติของเยื่อบุเรติน่า RPE พบว่าเมื่อฉายรังสีให้กับเซลล์ในปริมาณ 9 Gy จำนวนของเซลล์ที่อยู่ในระยะ G2/M มีค่าเพิ่มขึ้นสูงมาก จาก 8% เป็น 66% และเมื่อทำการใส่สารสกัดที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/ml}$  หรือ 15  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการฉายรังสี พบว่าจำนวนของเซลล์ที่อยู่ในระยะ G2/M มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (ดังแสดงในรูปที่ 5 ล่าง)

จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรของเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดและเป็นที่น่าสังเกตว่า การชลอหรือการยับยั้ง

การดำเนินไปตามวัฏจักรของเซลล์ที่ระยะ G2 เนื่องจากการถูกทำลายจากรังสีในเซลล์ปกติของเยื่อ  
บุเรติน่า RPE นั้นเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่กลไกนี้มีประสิทธิภาพต่ำกว่าในเซลล์มะเร็ง  
ของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 และอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงนั้นส่งผลให้กลไก  
ดังกล่าวมีประสิทธิภาพลดลงไปอีก



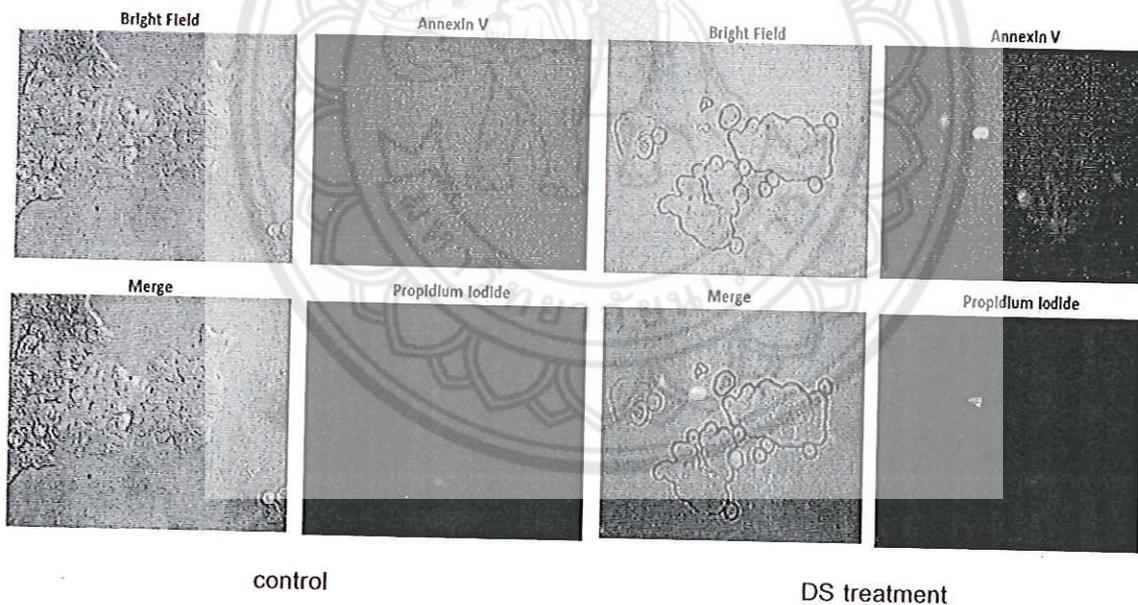
รูปที่ 4 แผนภาพแสดงลักษณะของวัฏจักรของเซลล์และจำนวนร้อยละของเซลล์ในแต่ละระยะ ใน  
สภาวะที่ไม่ใส่สารสกัดและการใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้น 5 µg/ml และ 15 µg/ml  
: ภาพบน แสดงเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 ภาพล่างแสดงเซลล์ปกติของเยื่อบุเรติน่า  
RPE



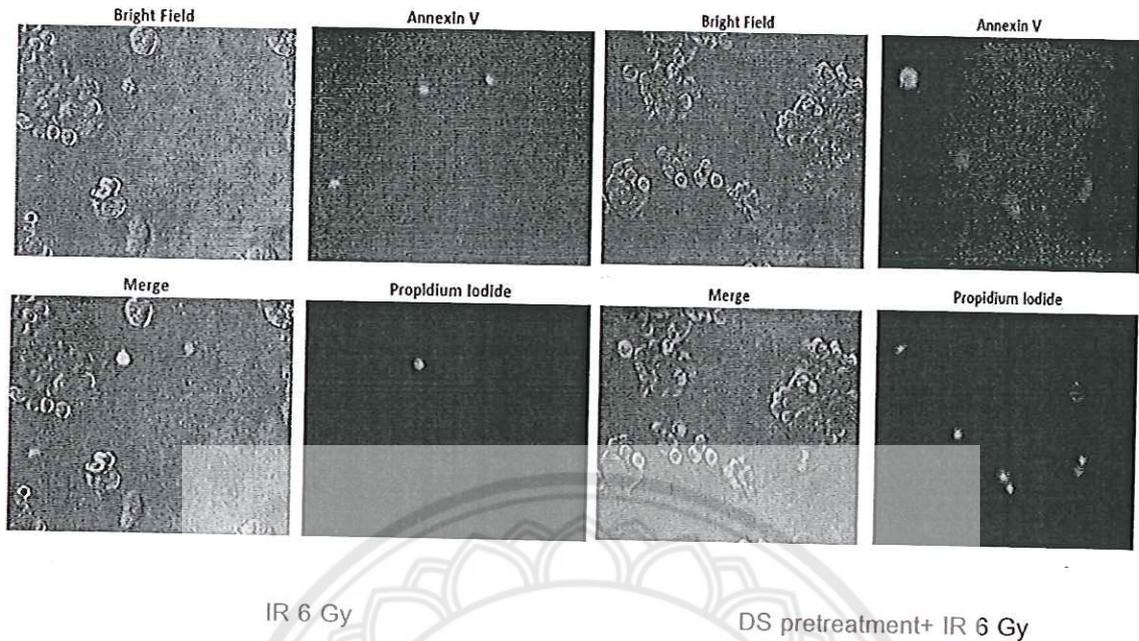
รูปที่ 5 แผนภาพแสดงลักษณะของวัฏจักรของเซลล์และจำนวนร้อยละของเซลล์ในแต่ละระยะ  
เปรียบเทียบระหว่างการไม่ได้รับรังสี กับเมื่อได้รับรังสีปริมาณ 9 Gy ในสภาวะที่ไม่ใส่สารสกัดและ  
การใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้น 5 µg/ml และ 15 µg/ml : ภาพบน แสดง  
เซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 ภาพล่างแสดงเซลล์ปกติของเยื่อบุเรติน่า RPE

## 5. ผลของสารสกัดต่อการตายของเซลล์

**Apoptosis marker** จากการทดสอบหา apoptosis marker เพื่อหาสาเหตุที่ทำให้เซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 มีความไวต่อรังสีเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง โดยทำการวิเคราะห์ลักษณะของเซลล์และจากการทดสอบโดยการย้อมเซลล์ HT29 ด้วย Annexin V และ Propidium Iodide แล้วทำการวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งเมื่อเซลล์เข้าสู่ขบวนการ apoptosis ในระยะแรกจะย้อมติด Annexin V เพียงอย่างเดียว แต่เมื่อเข้าสู่ระยะท้ายของ apoptosis หรือ necrosis เซลล์จะย้อมติดทั้ง Annexin V และ Propidium Iodide ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อฉายรังสีปริมาณ 6 Gy หรือการใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงเพียงอย่างเดียว จะเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis และหรือ necrosis เกิดขึ้นในเซลล์ HT29 แต่เมื่อทำการใส่สารสกัดร่วมกับการฉายรังสีพบว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis และหรือ necrosis เพิ่มมากขึ้นเป็นจำนวนสองเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการฉายรังสีหรือใส่สารสกัดเพียงอย่างเดียว ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 6 และ 7



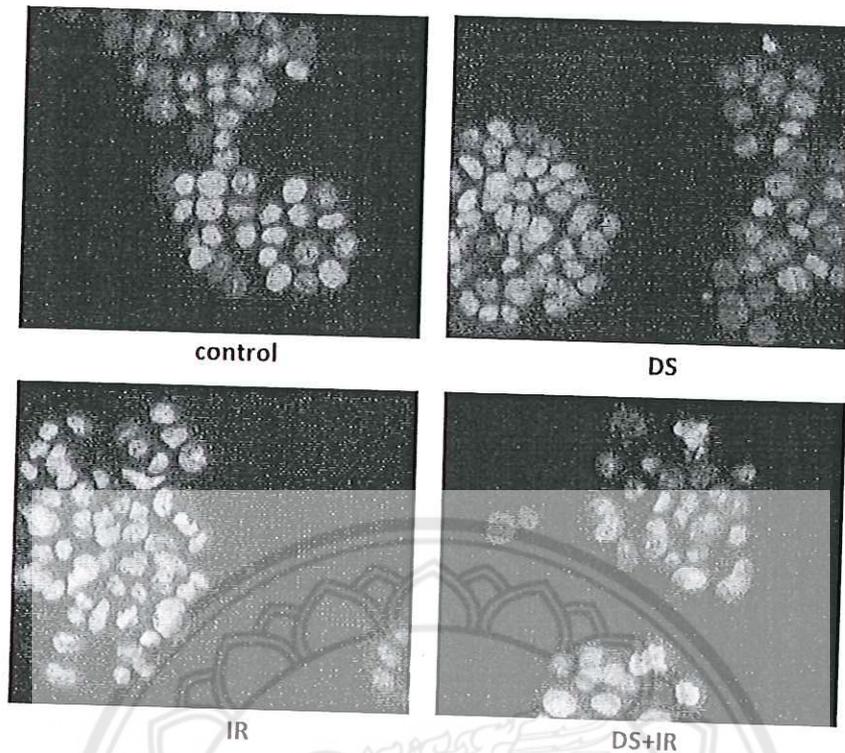
รูปที่ 6 ภาพเซลล์ HT29 จากการย้อมเซลล์ ด้วย Annexin V (สีเขียว) และ Propidium Iodide (สีแดง) โดย control คือเซลล์ HT29 ที่เลี้ยงในภาวะปกติ ; DS treatment คือเซลล์ที่เลี้ยงโดยใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง 25 ug/ml



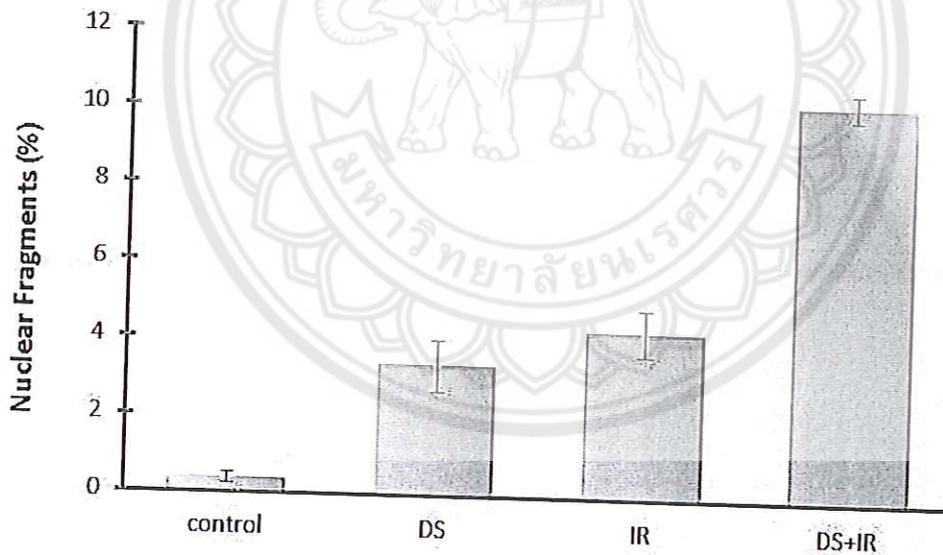
รูปที่ 7 ภาพเซลล์ HT29 จากการย้อมเซลล์ ด้วย Annexin V (สีเขียว) และ Propidium Iodide (สีแดง) โดย control คือเซลล์ HT29 ที่เลี้ยงในภาวะปกติ ; IR 6 Gy คือเซลล์ที่ถูกฉายรังสีแกมมา ปริมาณ 6 Gy ; DS pretreatment + IR 6 Gy คือเซลล์ที่เลี้ยงโดยใส่สารสกัดจากเห็ดว็อลฟ์เปรียง 25 ug/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปฉายรังสีแกมมาปริมาณ 6 Gy

ลักษณะและจำนวนของนิวเคลียสที่ถูกทำลาย เมื่อทำการตรวจหาอัตราของการที่สารพันธุกรรมของเซลล์ถูกทำลายด้วยการวิเคราะห์การแตกหักของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) ด้วยการย้อมสี Hoechst 33342 จากนั้นทำการวิเคราะห์และนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เมื่อทำการใส่สารสกัดจากเห็ดว็อลฟ์เปรียงหรือฉายรังสีปริมาณ 6 Gy เพียงอย่างเดียว จะเกิดการแตกหักของสารพันธุกรรมภายในนิวเคลียสของเซลล์ HT29 ร้อยละ  $3.36 \pm 0.66$  และ  $4.29 \pm 0.58$  ตามลำดับ และเมื่อทำการใส่สารสกัดร่วมกับการฉายรังสีพบว่ามีเกิดการแตกหักของสารพันธุกรรมภายในนิวเคลียสของเซลล์ HT29 เพิ่มมากขึ้นเป็นร้อยละ  $10.22 \pm 0.33$  ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 8

(A)



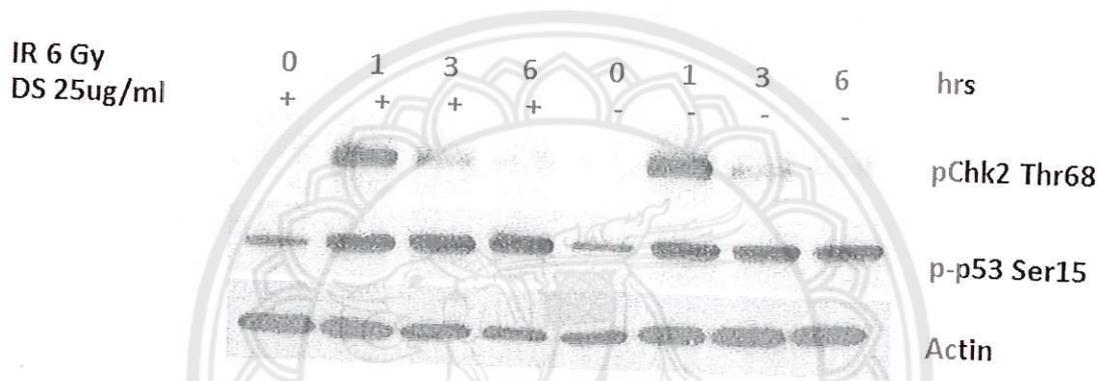
(B)



รูปที่ 8 (A) ภาพนิวเคลียสเซลล์ HT29 จากการย้อมด้วยสี Hoechst 33342 ; (B) กราฟแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์ (average + standard error) ของเซลล์ HT29 ที่มีการแตกหักของนิวเคลียสโดย control คือเซลล์ HT29 ที่เลี้ยงในภาวะปกติ ; DS treatment คือเซลล์ที่เลี้ยงโดยใส่สารสกัดจากเหาวัลย์เปรียง 25 ug/ml ; IR 6 Gy คือเซลล์ที่ถูกฉายรังสีแกมมาปริมาณ 6 Gy ; DS pretreatment+ IR 6 Gy คือเซลล์ที่เลี้ยงโดยใส่สารสกัดจากเหาวัลย์เปรียง 25 ug/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปฉายรังสีแกมมาปริมาณ 6 Gy

## 6. โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง

จากการทดสอบหากลไกที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงที่มีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 โดยตรวจหาระดับ activated form ของโปรตีน p53 และ Chk2 โดยวิธี Western Blot ซึ่งเมื่อเซลล์ได้รับอันตรายและ DNA ถูกทำลาย มีจะการตอบสนองของโปรตีน p53 โดยการเติมฟอสเฟสที่ตำแหน่ง Ser 15 และของโปรตีน Chk2 ที่ตำแหน่ง Thr68 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าการตอบสนองต่อการทำลายจากรังสีของโปรตีนทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการที่ไม่ใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงและการใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงร่วมกับการฉายรังสี ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 9

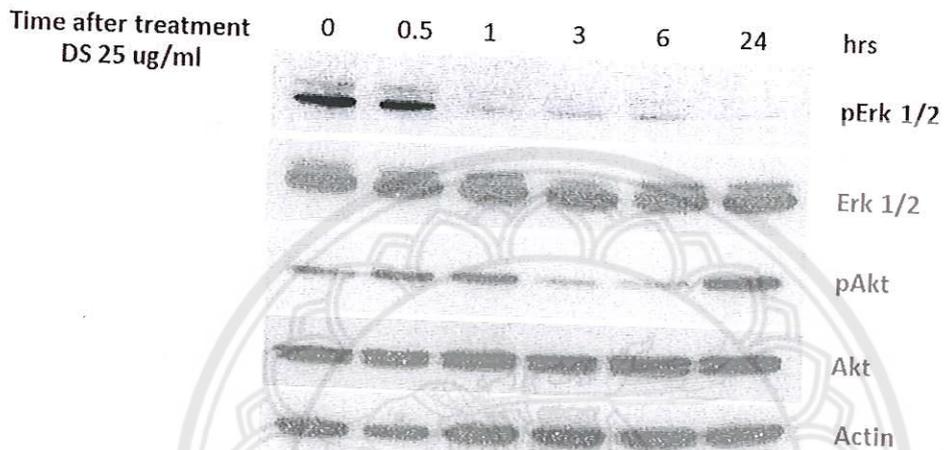


รูปที่ 9 ภาพแสดงปริมาณของโปรตีน Phospho-Chk2 (Thr68) และ Phospho-p53 (Ser15) ด้วยวิธี Western blot จากโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ HT29 ที่ใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง 25 ug/ml ร่วมกับการฉายรังสี หรือฉายรังสีอย่างเดียว ที่เวลา 0 1 3 และ 6 ชั่วโมง หลังจากถูกฉายรังสีแกมมาปริมาณ 6 Gy ปริมาณโปรตีน Actin ใช้เป็นโปรตีนเปรียบเทียบมาตรฐาน

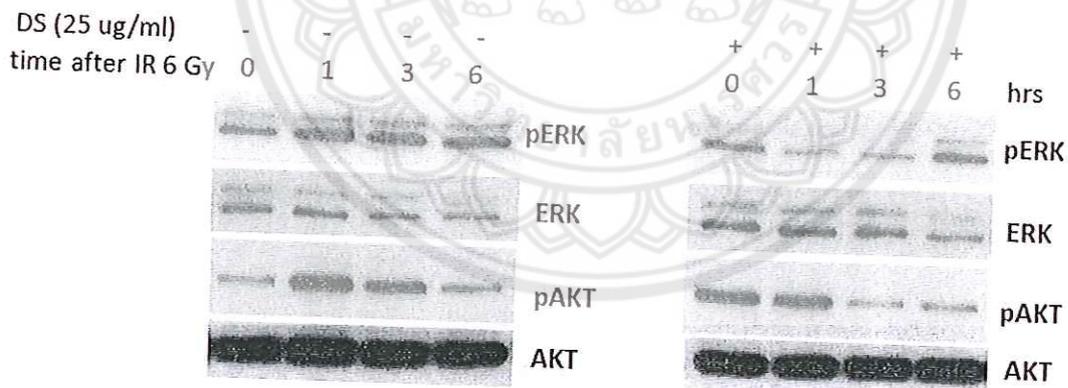
นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนสำคัญใน cell survival signaling pathway ซึ่งได้แก่โปรตีน Erk1/2 และ Akt ทั้งในรูป Total protein และ Activated form โดยวิธี Western blot พบว่าเมื่อทำการใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ HT29 มีผลทำให้ปริมาณ Activated form (Phosphorylated) ของโปรตีน Erk1/2 ลดลงอย่างมากและลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งสังเกตได้ภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากการใส่สารสกัด และยังคงลดลงอย่างต่อเนื่องดังที่ทำการตรวจสอบที่ 24 ชั่วโมงหลังการใส่สารสกัด โดยที่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Total Protein Erk1/2 แต่อย่างใด ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 10 ในการตรวจสอบปริมาณโปรตีน Akt พบว่า เมื่อทำการใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ HT29 มีผลทำให้ปริมาณ Activated form (Phosphorylated) ของโปรตีน Akt ลดลงอย่างเห็นได้ชัดที่เวลา 3 ชั่วโมงเป็นต้นไปแต่หลังจากนั้นปริมาณจะเริ่มกลับมาสูงขึ้นและสูงขึ้นเรื่อยๆเมื่อทำการตรวจสอบ

ที่ 24 ชั่วโมงหลังการฉายรังสีพบว่าปริมาณ Activated form ของโปรตีน Akt เพิ่มขึ้นสูงกว่าการที่ไม่ใส่สารสกัด โดยที่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Total Protein Akt แต่อย่างไร ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 10

(A)



(B)



รูปที่ 10 ภาพแสดงปริมาณของโปรตีน Phospho-Erk1/2 (pErk1/2), Erk1/2, Phospho-Akt (pAkt), Akt ด้วยวิธี Western blot จากโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ HT29 หลังใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง 25 ug/ml เวลา 0, 0.5, 1, 3, 5, และ 24 ชั่วโมง : (A) และจากการฉายรังสีอย่างเดียว หรือใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงร่วมกับการฉายรังสี ที่เวลา 0 1 3 และ 6 ชั่วโมง หลังจากถูกฉายรังสีแกมมาปริมาณ 6 Gy : (B) ปริมาณโปรตีน Actin ใช้เป็นโปรตีนเปรียบเทียบมาตรฐาน

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความไวต่อรังสี ของเซลล์มะเร็งของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ HT29 โดยที่ไม่มีผลกระทบต่อความไวต่อรังสีของเซลล์ปกติจากเยื่อบุเรตินา RPE และสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงเพียงอย่างเดียวทำให้วัฏจักรของเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยการใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงเมื่อให้ร่วมกับกับการฉายรังสี ทำให้ความสามารถในการชลอ cell cycle progression ในระยะ G2/M ของเซลล์มะเร็ง HT29 ลดลง ทำให้ผลการทำลายของรังสีที่ทำให้เกิดการแตกหักของนิวเคลียสของเซลล์มะเร็ง HT29 เพิ่มมากขึ้นและเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis และหรือ necrosis เพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์มะเร็ง HT29 พบว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงทำให้เกิดการลดลงของ activated form ของโปรตีน Erk1/2 ทั้งในภาวะปกติและภาวะที่ถูกทำลายด้วยรังสี ซึ่งโปรตีนนี้เป็นโปรตีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับ survival pathway ซึ่งช่วยให้เซลล์รอดชีวิตจากการทำลายด้วยรังสี นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงไปกระตุ้นให้มีเพิ่มขึ้นของ activated form ของโปรตีน Akt เป็นระยะเวลาสั้น

การใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงให้กับเซลล์ก่อนการฉายรังสี ทำให้ความสามารถในการชลอ cell cycle progression ในระยะ G2/M ของเซลล์มะเร็ง HT29 ลดลง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลทำให้เซลล์มะเร็ง HT29 มีความไวต่อรังสีมากขึ้น โดยที่สารสกัดอาจไปมีผลรบกวนการทำงานของ G2 checkpoint ของเซลล์มะเร็ง HT29 ซึ่งโดยปกติแล้ว G2 checkpoint จะมีหน้าที่ในการยับยั้ง cell cycle progression ของเซลล์ที่สารพันธุกรรมภายในเซลล์ถูกทำลายด้วยรังสีเพื่อชลอให้เซลล์ทำการซ่อมแซมตัวเองก่อนที่จะแบ่งตัว (38) ซึ่งหาก G2 checkpoint ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติจะส่งผลให้เซลล์ที่มีสารพันธุกรรมที่ถูกทำลาย ทำการแบ่งตัวต่างๆที่มีความผิดปกติจึงทำให้เกิดการตายของเซลล์ในระยะต่อมา ซึ่งผลการทดลองก็สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์นิวเคลียสที่ถูกทำลาย ที่พบว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงทำให้ผลการทำลายของรังสีที่ทำให้เกิดการแตกหักของนิวเคลียสของเซลล์ของเซลล์มะเร็ง HT29 เพิ่มมากขึ้นและเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis และหรือ necrosis เพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถอธิบายได้ว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงไปมีผลต่อการทำงานของ G2 checkpoint ของเซลล์มะเร็ง HT29 ได้อย่างไร เนื่องจากเมื่อทำการวิเคราะห์หาระดับ activated form ของโปรตีน p53 และ Chk2 ซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่ทำหน้าที่ใน G2 checkpoint พบว่าการตอบสนองต่อการทำลายจากรังสีของโปรตีนทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการฉายรังสีอย่างเดียวและการใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงร่วมกับการฉายรังสี

โปรตีน Erk1/2 และ Akt เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญใน cell survival signaling pathway ซึ่งด้านขบวนการตายของเซลล์เมื่อเซลล์ได้รับอันตราย โดยเฉพาะการตายแบบ apoptosis ในผลจากงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงไปทำให้ระดับ Activated form ของโปรตีน Erk1/2 ลดลงอย่างมากและลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งสังเกตได้ภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากการใส่สารสกัดและ

ยังคงลดลงอย่างต่อเนื่องดังที่ทำการตรวจสอบที่ 24 ชั่วโมงหลังการใส่สารสกัด โดยที่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Total Protein Erk1/2 แต่อย่างใด ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงไปยับยั้งการทำงานของ Erk 1/2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อได้รับอันตราย จึงทำให้เซลล์มะเร็ง HT29 ที่ได้รับสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงก่อนที่จะนำไปฉายรังสีมีการตายมากขึ้นจึงเป็นผลทำให้เซลล์มีความไวต่อรังสีมากขึ้น นอกจากนี้ในการทดลองนี้ยังพบว่าเมื่อทำการใส่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงให้กับเซลล์มะเร็ง HT29 มีผลทำให้ปริมาณ Activated form ของโปรตีน Akt ลดลงอย่างเห็นได้ชัดที่เวลา 3 ชั่วโมงเป็นต้นไป แต่หลังจากนั้นปริมาณจะเริ่มกลับมาสูงขึ้นและสูงขึ้นเรื่อยๆเมื่อทำการตรวจสอบที่ 24 ชั่วโมงหลังการฉายรังสีพบว่าปริมาณ Activated form ของโปรตีน Akt เพิ่มขึ้นสูงกว่าการที่ไม่ใส่สารสกัด โดยที่สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Total Protein Akt โดยปกติแล้ว Akt เป็นโปรตีนที่ทำงานด้านการตายแบบ apoptosis (anti apoptosis) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการวิจัยพบว่า หาก Akt ถูกกระตุ้นเป็นเวลานานจะส่งผลให้เซลล์มีการตายเกิดขึ้นได้ (39) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงมีผลทำให้โปรตีน Akt อยู่ในภาวะที่ถูกกระตุ้นนานเกินไป จึงมีผลทำให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง HT29 เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับอันตรายจากรังสี

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับ

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ผลงานอยู่ในระหว่าง Review Process ของวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่มี Impact factor

### เอกสารอ้างอิง

1. Eric J. Hall, A.J.G., Radiobiology for the radiologist, 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
2. Jonathan, E.C., E.J. Bernhard, and W.G. McKenna, How does radiation kill cells? Curr Opin Chem Biol, 1999. 3(1): p. 77-83.

3. Richard Pazdur, L.D.W., Kevin A. Camphausen, and William J. Hoskins, *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach, Medical, Surgical & Radiation Oncology*, 11th edition. the journal ONCOLOGY, 2008.
4. Torres-Roca, J.F. and C.W. Stevens, Predicting response to clinical radiotherapy: past, present, and future directions. *Cancer Control*, 2008. 15(2): p. 151-6.
5. De Schutter, H. and S. Nuyts, Radiosensitizing potential of epigenetic anticancer drugs. *Anticancer Agents Med Chem*, 2009. 9(1): p. 99-108.
6. Katz, D., E. Ito, and F.F. Liu, On the path to seeking novel radiosensitizers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009. 73(4): p. 988-96.
7. Okada, H. and T.W. Mak, Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(8): p. 592-603.
8. Milas, L., et al., Chemoradiotherapy: emerging treatment improvement strategies. *Head Neck*, 2003. 25(2): p. 152-67.
9. Brown, J.M., SR 4233 (tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours. *Br J Cancer*, 1993. 67(6): p. 1163-70.
10. Rischin, D., et al., Tirapazamine, Cisplatin, and Radiation versus Fluorouracil, Cisplatin, and Radiation in patients with locally advanced head and neck cancer: a randomized phase II trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group (TROG 98.02). *J Clin Oncol*, 2005. 23(1): p. 79-87.
11. Eastman, A. and M.A. Barry, Interaction of trans-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation of monofunctional adducts and their reaction with glutathione. *Biochemistry*, 1987. 26(12): p. 3303-7.
12. Hickman, M.J. and L.D. Samson, Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(19): p. 10764-9.

13. Grem, J.L., 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drugs*, 2000. 18(4): p. 299-313.
14. Sartor, C.I., Biological modifiers as potential radiosensitizers: targeting the epidermal growth factor receptor family. *Semin Oncol*, 2000. 27(6 Suppl 11): p. 15-20; discussion 92-100.
15. Bonner, J.A., et al., Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 2006. 354(6): p. 567-78.
16. Nasu, S., et al., C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody enhances tumor radiocurability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001. 51(2): p. 474-7.
17. Williams, J.R., et al., A quantitative overview of radiosensitivity of human tumor cells across histological type and TP53 status. *Int J Radiat Biol*, 2008. 84(4): p. 253-64.
18. Kim, K.C., et al., Enhancement of radiation response with combined *Ganoderma lucidum* and *Duchesnea chrysantha* extracts in human leukemia HL-60 cells. *Int J Mol Med*, 2008. 21(4): p. 489-98.
19. Chendil, D., et al., Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. *Oncogene*, 2004. 23(8): p. 1599-607.
20. Hara, T., et al., Flavopiridol potentiates the cytotoxic effects of radiation in radioresistant tumor cells in which p53 is mutated or Bcl-2 is overexpressed. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008. 71(5): p. 1485-95.
21. Zoberi, I., et al., Radiosensitizing and anti-proliferative effects of resveratrol in two human cervical tumor cell lines. *Cancer Lett*, 2002. 175(2): p. 165-73.
22. Laupattarakasem, P., P.J. Houghton, and J.R. Houlst, Anti-inflammatory isoflavonoids from the stems of *Derris scandens*. *Planta Med*, 2004. 70(6): p. 496-501.
23. Mahabusarakam, W., et al., A benzil and isoflavone derivatives from *Derris scandens* Benth. *Phytochemistry*, 2004. 65(8): p. 1185-91.

24. Sriwanthana, B. and P. Chavalittumrong, In vitro effect of *Derris scandens* on normal lymphocyte proliferation and its activities on natural killer cells in normals and HIV-1 infected patients. *J Ethnopharmacol*, 2001. 76(1): p. 125-9.
25. Rukachaisirikul, V., et al., Isoflavone glycosides from *Derris scandens*. *Phytochemistry*, 2002. 60(8): p. 827-34.
26. Rao, S.A., et al., Isolation, characterization and chemobiological quantification of alpha-glucosidase enzyme inhibitory and free radical scavenging constituents from *Derris scandens* Benth. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007. 855(2): p. 166-72.
27. Dianpeng, L., Mingan, O., Jansakul, C., Chongren, Y., Two isoflavonoid glycosides from *Derris scandens*. *Yao Xue Xue Bao*, 1999. 34: p. 43-45.
28. You, L., Phytoestrogen genistein and its pharmacological interactions with synthetic endocrine-active compounds. *Curr Pharm Des*, 2004. 10(22): p. 2749-57.
29. Hughes, C.L., et al., Effects of genistein or soy milk during late gestation and lactation on adult uterine organization in the rat. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2004. 229(1): p. 108-17.
30. Jeong, M.H., et al., The modulation of radiation-induced cell death by genistein in K562 cells: activation of thymidine kinase 1. *Cell Res*, 2004. 14(4): p. 295-302.
31. Lin, F., et al., Effects of dose and glycosylation on the transfer of genistein into the eggs of the Japanese quail (*Coturnix japonica*). *J Agric Food Chem*, 2004. 52(8): p. 2397-403.
32. Park, O.J., Comparison of estrogen and genistein in their antigenotoxic effects, apoptosis and signal transduction protein expression patterns. *Biofactors*, 2004. 21(1-4): p. 379-82.
33. Park, O.J. and J.I. Shin, Proapoptotic potentials of genistein under growth stimulation by estrogen. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1030: p. 410-8.

34. Park, O.J. and Y.J. Surh, Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. *Toxicol Lett*, 2004. 150(1): p. 43-56.
35. Akimoto, T., et al., Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, enhanced radiosensitivity in human esophageal cancer cell lines in vitro: possible involvement of inhibition of survival signal transduction pathways. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001. 50(1): p. 195-201.
36. Shin, J.I., et al., Sensitization of the apoptotic effect of gamma-irradiation in genistein-pretreated CaSki cervical cancer cells. *J Microbiol Biotechnol*, 2008. 18(3): p. 523-31.
37. Hematulin A, Sagan D, Eckardt-Schupp F, Moertl S. NBS1 is required for IGF-1 induced cellular proliferation through the Ras/Raf/MEK/ERK cascade. *Cell Signal*. 2008 Dec;20(12):p.2276-85
38. Morrison C, Rieder CL. Chromosome damage and progression into and through mitosis in vertebrates. *DNA Repair (Amst)*. 2004 Aug-Sep;3(8-9):p.1133-9.
39. Van Gorp AG, Pomeranz KM, Birkenkamp KU, Hui RC, Lam EW, Coffey PJ. Chronic protein kinase B (PKB/c-akt) activation leads to apoptosis induced by oxidative stress-mediated Foxo3a transcriptional up-regulation. *Cancer Res*. 2006 Nov 15;66(22):p.10760-9

ร632714x

๑ BS  
2๐1  
· ๕๑  
๑๔๒5  
2554



สำนักหอสมุด

19 ก.ค. 2556

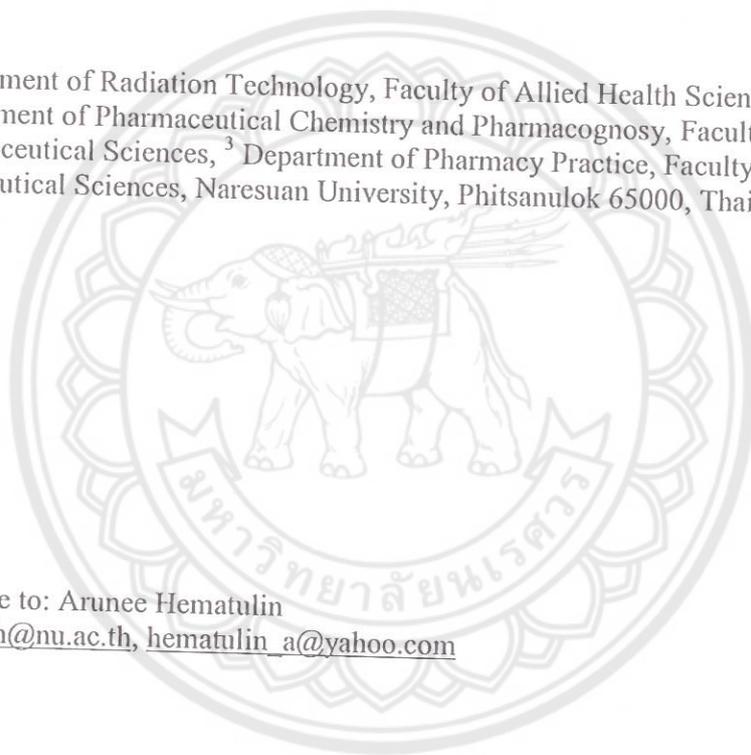
ภาคผนวก



**Ethanollic Extract from *Derris scandens* Benth Mediated Radiosensitization via two Distinct Modes of Cell Death in Human Colon Cancer HT-29 Cells**

**Arunee Hematulin<sup>1\*</sup>, Kornkanok Ingkaninan<sup>2</sup>, Nanteetip Limpeanchob<sup>3</sup>, Daniel Sagan<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Radiation Technology, Faculty of Allied Health Sciences,  
<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of  
Pharmaceutical Sciences, <sup>3</sup> Department of Pharmacy Practice, Faculty of  
Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand.



Correspondence to: Arunee Hematulin  
E-mail: [aruneeh@nu.ac.th](mailto:aruneeh@nu.ac.th), [hematulin\\_a@yahoo.com](mailto:hematulin_a@yahoo.com)

## Abstract

Enhancing of radioresponsiveness of tumors by using radiosensitizers is a promising approach to increase the efficacy of radiation therapy. However, success of this strategy is limited by normal tissue toxicity. Recently, the ethanolic extract of the medicinal plant, *Derris scandens* Benth has been identified as a potent radiosensitizer of human colon cancer HT29 cells, while being less toxic to and not affecting the radiosensitivity of non-cancerous RPE cells. Here, we show that treatment of HT-29 cells with *Derris scandens* Benth extract in combination with gamma irradiation synergistically sensitizes HT-29 cells to cell lethality by apoptosis and mitotic catastrophe. Furthermore, the extract was found to decrease Erk1/2 activation. These suggest mechanism for *D. scandens* extract-mediated radiosensitization via at least two distinct modes of cell death and by silencing pro-survival signaling of HT-29 cells.

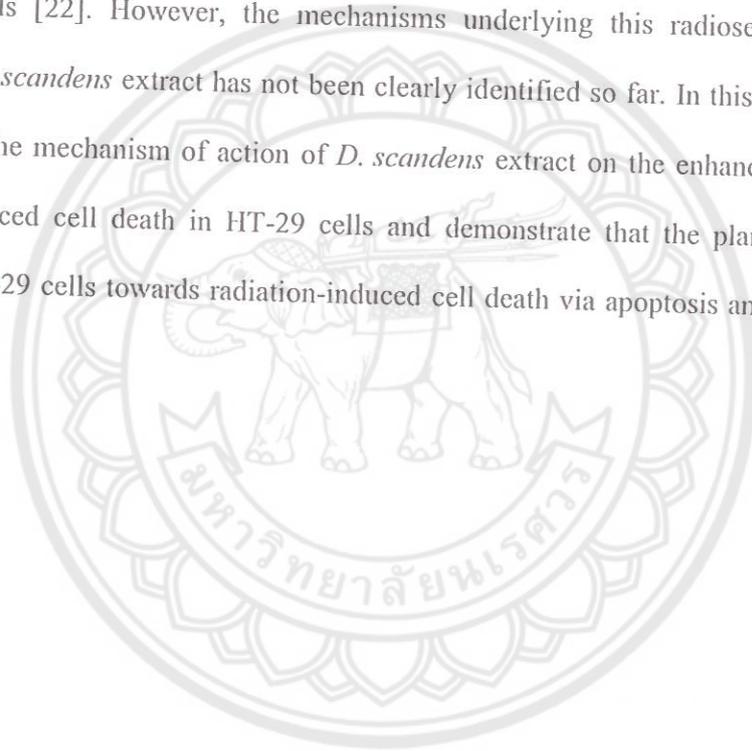
Keywords: radiosensitizer, *Derris scandens* Benth, radiotherapy, apoptosis, mitotic catastrophe

## Introduction

Radiotherapy is the most common treatment for human cancers worldwide [1]. Its efficacy depends on the tumor's responsiveness to the fatal effects of radiation [2]. However, several malignancies are relatively radioresistant, leading to treatment failure. Radiosensitizers are agents to enhance the sensitivity of cancer cells towards radiotherapy [3]. The enhancement of radioresponsiveness of tumors by using radiosensitizers is suggested to be a promising strategy to improve radiotherapy efficiency [4-6]. Since decades, numerous studies have been attempting to search for novel radiosensitizers. Nevertheless, only very few substances are clinically used due to lack of efficacy [7-9].

Frequently, cancer cells encompass multiple defects in failsafe mechanisms such as cell cycle arrest and cell death pathways leading to the resistance of cancer to radiation-induced cell death [10,11]. Indeed, lethality of cancer cells in response to radiation damage processes via different modes of cell death including apoptosis and mitotic catastrophe [1,10-13]. It is a challenging strategy to search for substances for combined use with radiation to trigger those programs of cell death that are still intact in cancer cells. Interestingly, the radiosensitizing potential of numerous botanicals and their derivatives is reported in several studies for cancer cells [14-18]. Notably, their radiosensitizing activities are found to process via several mechanisms including disturbing of cell cycle regulation, cell survival or cell death pathways. Since the radioresponsiveness of a tumor is influenced by multiple factors, further studies are needed to not only search for new radiosensitizers, but also to provide essential information of the mechanisms of their actions.

The Asian plant *Derris scandens* Benth (*D. scandens*) has been widely used in traditional medicine [19]. Its stem extract has been used for the treatment of several diseases such as arthritis, muscular pain, and inflammation. Moreover, *D. scandens* extract has been report to inhibit  $\alpha$ -glucosidase activity, scavenge free radicals, and inhibit migration of several cell lines [20,21]. Recently, we demonstrated that *D. scandens* extract powerfully increases the radiosensitivity of human colon cancer HT-29 cells, while not influencing the radiosensitivity of normal retinal pigment epithelial cells [22]. However, the mechanisms underlying this radiosensitization activity of *D. scandens* extract has not been clearly identified so far. In this study we investigated the mechanism of action of *D. scandens* extract on the enhancement of radiation-induced cell death in HT-29 cells and demonstrate that the plant extract sensitizes HT-29 cells towards radiation-induced cell death via apoptosis and mitotic catastrophe.



## Materials and Methods

### Chemicals and antibodies

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12) and fetal bovine serum were purchased from Gibco (Invitrogen, USA). RNase A, Hoechst 33342, and Giemsa were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). Amersham ECL Plus™ was purchased from GE Healthcare (Buckinghamshire, England). Antibodies were obtained from the following companies: actin (I-19 sc-1616) and alpha tubulin (sc-5286) from Santa Cruz Biotechnology (California, USA), Erk1/2 (4695), phospho-T202/Y204-Erk1/2 (9101), phospho-T68-Chk2 (2661), phospho-Y15-Cdc2 (9111), and phospho-S15-p53 (9284) from Cell Signaling (Beverly, MA).

### Cell culture

HT-29 human colon cancer cells (ATCC, HTB-38) were maintained at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in DMEM/F12, containing 2.5 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum, 0.25% sodium bicarbonate, 40 units/ml penicillin G, and 40 µg/ml streptomycin.

### Preparation of *D. scandens* extract

The stem of *D. scandens* was collected at Bangkratum province, Phitsanulok, Thailand. The stem was sliced into small pieces, dried at 60°C, then ground with a mixer grinder. The dried powder was macerated in 95% ethanol for 3 days. The extracts were subsequently filtered, evaporated till dryness under reduced pressure. A thin layer chromatography fingerprint of the extract was made and kept as a reference. The plant extracts are kept at -20°C.

### **Treatment of cells with *D. scandens* extract and gamma- irradiation**

For *D. scandens* extract treatment, the medium was aspirated from the culture plates and then replaced with fresh medium containing 5 or 15 µg/ml of *D. scandens* extract diluted in DMSO. The treated cells were incubated for 24 hours before gamma-irradiation. For gamma-irradiation, a Cobalt-60 source (Theratron Phoenix) with a dose rate of 2.1 Gy/min was used for irradiating cells with a single dose of 0, 2, 4, or 6 Gy at room temperature. The source to sample distance was 80 cm. After irradiation, cells were maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere and collected at different time points for further experiments.

### **Clonogenic cell survival assays**

Exponentially growing cells were seeded in duplicate into 6-well plates. The cell number seeded per plate varies with the radiation dose, so that the colonies can be counted conveniently. The seeded cells treated with or without 5 or 15 µg/ml of *D. scandens* extract for 24 hours were irradiated with a single dose of 0, 2, 4, or 6 Gy at room temperature. The cells were allowed to grow for 10-14 days until the surviving cells produced macroscopically visible colonies that could be counted easily. The cells were fixed with 95% ethanol for 10 minutes and then stained with Giemsa for 10 minutes. Colonies containing more than 50 cells were counted and survival fractions were calculated as ratio of the amount of colonies formed from treated cells and untreated cells, corrected for plating efficiency.

### **Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay**

HT-29 cells were seeded onto sterile glass cover slips and cultured in 6-well plates overnight. The cells were treated with 15 µg/ml of *D. scandens* extract alone or

combined treatment with 6 Gy gamma-irradiation. Forty-eight hours after irradiation, a TUNEL assay was performed according to manufacturer's protocol (Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® 647 Imaging Assay, Invitrogen). The stained cells were visualized by fluorescence microscopy (Zeiss). For each treatment condition, the number of TUNEL-positive stained cells was counted from randomly selected fields and expressed as a percentage of the total number of nucleated cells.

#### **Cell cycle analysis and micronuclei assessment**

Approximately  $8 \times 10^4$  cells of exponentially growing HT-29 cells were seeded into 6-well plates and cultivated for 12 hours. Twenty-four hours prior irradiation, the cells were treated with or without 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of *D. scandens* extract. Subsequently, the treated cells were gamma-irradiated with a single dose of 0 or 6 Gy. For cell cycle analysis, the treated cells were trypsinized and collected 24 hours after irradiation and DNA staining was performed as described previously [23]. For micronuclei measurement, the treated cells were collected 48 and 24 hours after irradiation and DNA staining of isolated nuclei was performed. Flow cytometry (Becton-Dickinson) was used to analyze cell cycle distribution and quantify micronucleus formation of propidium iodide-stained, isolated nuclei.

#### **Immunostaining for analysis of nuclear morphology**

Approximately  $8 \times 10^4$  cells of exponentially growing HT-29 cells were seeded onto sterile glass cover slips and cultured overnight. Then, the cells were treated with or without 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of *D. scandens* extract for 24 hours. Subsequently, the cells were gamma-irradiated with a single dose of 0 or 6 Gy. Forty-eight hours after irradiation, immunostaining against  $\alpha$ -tubulin followed by staining with a rhodamine-labelled secondary antibody was performed. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342

as described previously [24]. The stained cells were visualized by fluorescence microscopy.

### **Western blot analysis**

Total protein was extracted from HT-29 cells at indicated time points after each treatment as described [23]. Thirty  $\mu\text{g}$  of protein from each sample were separated by SDS-polyacrylamide gels electrophoresis and electro-blotted onto PVDF membranes. The membranes were blocked in TBS-T containing 5% nonfat skim milk for 1 h at room temperature. After that, the membranes were probed with a primary antibody diluted in 3% BSA in TBS-T overnight at 4°C. After washing 3 times with TBS-T, the membranes were incubated with a horseradish peroxidase-labeled secondary antibody diluted in blocking buffer for 1 h. The membranes were washed 3 times with TBS-T and bands were detected by chemiluminescence on X-ray films.

### **Statistical analyses**

The mean  $\pm$  standard error was calculated from at least three independent experiments. Effects of plant extract treatment, gamma-radiation and combined effects of both factors on cellular survival were tested by two-way ANOVA analysis of the ln-transformed values for surviving fractions (SPSS, version 17.0).

## Results

### ***D. scandens* extract synergistically sensitizes HT-29 cells to radiation-induced cell death**

Clonogenic survival of HT-29 cells after irradiation is decreased by pre-treatment of the cells with *D. scandens* extract at concentrations of 5 µg/ml and 15 µg/ml (Figure 1). These concentrations cause less than 20% cytotoxic effects to HT-29 cells after 48 h exposure time as determined by MTT assay (data not show). Consequently, treatment of the cells with plant extract only (without irradiation) reduces cellular survival to 97% and 89% at a dose of 5 and 15 µg/ml, respectively, compared to untreated control cells. Both factors, plant extract treatment ( $p=2 \times 10^{-9}$ ) and gamma-radiation ( $p=6 \times 10^{-14}$ ) significantly impact cellular survival. Notably, a significant effect of the combination of both factors is observed ( $p=0.03$ ) on cellular survival. Synergistic enhancement of radiosensitivity by plant extract pre-treatment is reflected by decreased D37 values (radiation dose at which 37 % of cells survive compared to untreated cells) of 7.1, 5.7, and 3.0 Gy for plant extract doses of 0, 5, and 15 µg/ml, respectively. Thus, plant extract treatment radiosensitizes the cells by a factor of 1.2 and 2.4 for concentrations of 5 and 15 µg/ml of plant extract, respectively.

### ***D. scandens* extract induces apoptosis in HT-29 cells**

Apoptosis is one of the most common forms of cell death induced by ionizing radiation. To investigate whether *D. scandens* extract induces apoptosis in HT-29 cells, treated cells were analyzed by TUNEL assay.. TUNEL-positive cells were determined by fluorescence microscopy. Treatment of the cells with *D. scandens* extract alone for 48 h significantly induces  $12 \pm 1$  % of the cells to undergo apoptosis, whereas 6 Gy of gamma-radiation induce apoptosis in  $3.1 \pm 0.1$ % cells only.

Treatment with 6 Gy of gamma-irradiation in combination with *D. scandens* extract induces apoptosis in  $5.9 \pm 0.4\%$  of the cells (Figure 2A, B). Thus, *D. scandens* extract is a more potent inducer of apoptosis than ionizing radiation.

### **Mitotic catastrophe is a predominant form of cell death in HT-29 cells as response to irradiation**

Mitotic catastrophe is another main form of cell death induced by ionizing radiation [12]. The most prominent morphological characteristic of mitotic catastrophe is the appearance of giant cells with gross nuclear alterations such as micronuclei, multinucleated, and multilobulated nuclei [13]. To investigate whether mitotic catastrophe might be a major mode of cell death in HT-29 cells in response to radiation damage, nuclear morphology of the cells was analyzed. Cells pre-treated with or without 15  $\mu\text{g/ml}$  of *D. scandens* extract were irradiated with a single dose of 6 Gy. Two days later, the cells were stained with an  $\alpha$ -tubulin antibody and Hoechst 33342 and visualized by fluorescence microscopy. Treatment of the cells with radiation alone predominantly induces mitotic catastrophe in HT-29 cells indicated by the presence of micronuclei and giant cells with multiple nuclei. Treatment of cells with plant extract alone induces apoptosis reflected by the presence of fragmented or condensed nuclei, while mitotic catastrophe was not observed. As expected, cell populations that received a combined treatment with plant extract and irradiation, contained cells with features of mitotic catastrophe as well as apoptotic cells (Figure 3).

In addition, DNA staining of isolated nuclei for micronuclei measurement by flow cytometry was performed. The result shows that micronuclei-formation in HT-29 cells treated with *D. scandens* extract alone was slightly increased ( $9.7 \pm 0.7\%$ ) as

compared to control cells ( $7.1 \pm 1$  %). Remarkably, a strong increase of the micronuclei population was observed after irradiation alone ( $27.1 \pm 2.2\%$ ) and combined treatment of cells with *D. scandens* extract and irradiation ( $20.0 \pm 0.2\%$ ) (Figure 4).

Taken together, these observations indicate that mitotic catastrophe is the predominant mode of cell death of HT-29 cells induced by irradiation.

#### ***D. scandens* extract decreases phosphorylation of Erk1 and Erk2 (Erk1/2)**

Erk1/2 are effector proteins of the MAP3 kinase pathway that mediate cell survival through inhibition of the apoptosis cascade [25]. Immunoblotting of total lysates of HT-29 cells was performed to examine the impact of *D. scandens* extract on the activity of Erk1/2. Treatment of HT-29 cells with *D. scandens* extract strongly decreased the phosphorylation level of Erk1/2 within 1 hour after treatment and the level remained lesser than that of control cells during the observation period of 24 hour after treatment (Figure 5A). The phosphorylation level of Erk1/2 significantly increased in HT-29 cells that were treated with radiation alone. In contrast, increasing of phosphorylation level of Erk1/2 was not observed in cells that were treated with *D. scandens* extract before irradiation (Figure 5B).

#### **HT-29 cells do not arrest at G2/M in response to radiation damage**

In response to ionizing radiation-induced DNA damage, activation of DNA damage checkpoint signaling is crucial for human cells to prevent cells with damaged DNA from entering mitosis [26]. To investigate the efficiency of DNA damage checkpoints of HT-29 cells in response to gamma-irradiation, the cell cycle and the levels of phospho-p53, phospho-Chk2 kinase, and phospho-Cdc2 kinase were analyzed. The

G<sub>2</sub>/M population of HT-29 cells upon 6 Gy irradiation was slightly increased as compared to unirradiated cells. Treatment of the cells with *D. scandens* extract had no impact on cell cycle distribution of HT-29 cells (Figure 6A). Induction of phospho-p53 and phospho-Chk2 kinase were clearly observed in response to gamma-irradiation, whereas the level of phospho-Cdc2 was only slightly altered (Figure 6B). Notably, treatment of the cells with *D. scandens* extracts alone or in combination with irradiation had no effect on the activation of p53, Chk2 kinase, or Cdc2.

Taken together, these findings indicate that the G<sub>2</sub> checkpoint of HT-29 cells in response to radiation damage is not fully effective.

## Discussion

In the present study, we clearly demonstrated that *D. scandens* extract synergistically potentiates radiation-induced cell death of human colon cancer HT-29 cells. This effect was dose dependent as demonstrated by a radiation dose reduction factor (for D37) of 1.2 and 2.4 for 5 and 15 µg/ml of *D. scandens* extract, respectively. This long-term survival result obtained by clonogenic survival is consistent with the finding generated from a short-term cell viability assay (trypan blue staining) in our previous study [22].

*D. scandens* extract was found to induce apoptosis in HT-29 cells. Notably, the apoptosis-inducing potential of *D. scandens* extract alone is stronger than that of gamma-irradiation or gamma-irradiation combined with *D. scandens* extract treatment. On the other hand, data from clonogenic survival assay show that combination of the extract with irradiation is the most potent approach to persuade the death of HT-29 cells. Since the clonogenic survival assay measures the sum of all

modes of cell death, it is most likely that apoptosis is not the only mode of cell death in HT-29 cells in response to radiation damage generated in *D. scandens* extract pre-treated cells.

Mitotic catastrophe is claimed to be the main form of cell death induced by ionizing radiation, especially in cancer cells that encompass checkpoint defects [12,13]. The result from our study indicates that G2 checkpoint of HT-29 cells in response to radiation damage is not fully effective. This could be an explanation why mitotic catastrophe is a major form of cell death in HT-29 cells in response to gamma-irradiation. Mitotic catastrophe is predominantly induced by gamma-irradiation, whereas apoptosis is the predominant mode of cell death of HT-29 cells induced by *D. scandens* extract. Thus, the combined application of irradiation and plant extract treatment leads to cell lethality by at least these two distinct modes of cell death.

The mechanism of interaction between *D. scandens* extract and radiation remains to be elucidated. Activation of ERK cascade has been reported to promote cell survival by regulating the expression or activity of pro-apoptotic proteins and anti-apoptotic members [27,28]. The evidence that *D. scandens* extract decreases Erk1/2 activation in HT-29 cells suggests an inhibitory activity of the extract on this pro-survival pathway.

In conclusion, treatment of cells with *D. scandens* extract prior to irradiation synergistically sensitizes the HT-29 cells to radiation-induced cell death by enabling the cells to die by apoptosis and by mitotic catastrophe and by silencing pro-survival signaling.

## Acknowledgements

This research was supported by grants from the Thailand research fund (grant number MRG5380197) and Naresuan University research fund (grant number R2554B098). We thank the radiation therapy department, Buddchachinaraj hospital for providing the radiation source.

## Conflict of Interests

The authors have declared that there is no conflict of interests.

## References

1. Balcer-Kubiczek, E.K. Apoptosis in radiation therapy: a double-edged sword. *Exp Oncol*, **34**, 277-85.
2. Coventry, B.J. and Ashdown, M.L. Complete clinical responses to cancer therapy caused by multiple divergent approaches: a repeating theme lost in translation. *Cancer Manag Res*, **4**, 137-49.
3. Girdhani, S., Bhosle, S.M., Thulsidas, S.A., Kumar, A. and Mishra, K.P. (2005) Potential of radiosensitizing agents in cancer chemo-radiotherapy. *J Cancer Res Ther*, **1**, 129-31.
4. De Schutter, H. and Nuyts, S. (2009) Radiosensitizing potential of epigenetic anticancer drugs. *Anticancer Agents Med Chem*, **9**, 99-108.
5. Katz, D., Ito, E. and Liu, F.F. (2009) On the path to seeking novel radiosensitizers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **73**, 988-96.
6. McGinn, C.J. and Lawrence, T.S. (2001) Recent advances in the use of radiosensitizing nucleosides. *Semin Radiat Oncol*, **11**, 270-80.
7. Habr-Gama, A., Perez, R.O., Sao Juliao, G.P., Proscurshim, I. and Gama-Rodrigues, J. The need for effective radiosensitizing agents: experience in patients with complete pathological response. *Anticancer Drugs*, **22**, 308-10.
8. Verheij, M., Vens, C. and van Triest, B. Novel therapeutics in combination with radiotherapy to improve cancer treatment: rationale, mechanisms of action and clinical perspective. *Drug Resist Updat*, **13**, 29-43.
9. Wilson, G.D., Bentzen, S.M. and Harari, P.M. (2006) Biologic basis for combining drugs with radiation. *Semin Radiat Oncol*, **16**, 2-9.
10. Schmitt, C.A. (2003) Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 286-95.
11. Weaver, B.A. and Cleveland, D.W. (2005) Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell*, **8**, 7-12.
12. Vakifahmetoglu, H., Olsson, M. and Zhivotovsky, B. (2008) Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*, **15**, 1153-62.

13. Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M. and Kroemer, G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 385-92.
14. Chendil, D., Ranga, R.S., Meigooni, D., Sathishkumar, S. and Ahmed, M.M. (2004) Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. *Oncogene*, **23**, 1599-607.
15. Hara, T., Omura-Minamisawa, M., Kang, Y., Cheng, C. and Inoue, T. (2008) Flavopiridol potentiates the cytotoxic effects of radiation in radioresistant tumor cells in which p53 is mutated or Bcl-2 is overexpressed. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **71**, 1485-95.
16. Kim, K.C., Jun, H.J., Kim, J.S. and Kim, I.G. (2008) Enhancement of radiation response with combined Ganoderma lucidum and Duchesnea chrysantha extracts in human leukemia HL-60 cells. *Int J Mol Med*, **21**, 489-98.
17. Park, O.J. and Shin, J.I. (2004) Proapoptotic potentials of genistein under growth stimulation by estrogen. *Ann NY Acad Sci*, **1030**, 410-8.
18. Sandur, S.K., Deorukhkar, A., Pandey, M.K., Pabon, A.M., Shentu, S., Guha, S., Aggarwal, B.B. and Krishnan, S. (2009) Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible NF-kappaB activity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **75**, 534-42.
19. Tiangburanatham, W. (ed.) (1996) *Dictionary of Thai Medicinal Plants*. Prachumtong Printing, Bangkok.
20. Rao, S.A., Srinivas, P.V., Tiwari, A.K., Vanka, U.M., Rao, R.V., Dasari, K.R. and Rao, M.J. (2007) Isolation, characterization and chemobiological quantification of alpha-glucosidase enzyme inhibitory and free radical scavenging constituents from Derris scandens Benth. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **855**, 166-72.
21. Pisamai Laupattarakasem, Banchob Sripa and Laupattarakasem, W. (2007) Antimigration of Cancer Cells by Derris scandens on Cholangiocarcinoma Cells. *Srinagarind Med J* **22**, 339-345.
22. Hematulin A, I.K., Limpeanchob N, Sagan D (2011) Derris Scandens Benth Extract Radiosensitizes HT-29 Colon Cancer Cells. *Siriraj Med J*, **63**, 85-88.
23. Hematulin, A., Sagan, D., Eckardt-Schupp, F. and Moertl, S. (2008) NBS1 is required for IGF-1 induced cellular proliferation through the Ras/Raf/MEK/ERK cascade. *Cell Signal*, **20**, 2276-85.
24. Hematulin, A., Meethang, S., Ingkaninan, K. and Sagan, D. Derris scandens Benth extract potentiates radioresistance of Hep-2 laryngeal cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, **13**, 1289-95.
25. Cagnol, S. and Chambard, J.C. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J*, **277**, 2-21.
26. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K. and Linn, S. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, **73**, 39-85.
27. Ewings, K.E., Wiggins, C.M. and Cook, S.J. (2007) Bim and the pro-survival Bcl-2 proteins: opposites attract, ERK repels. *Cell Cycle*, **6**, 2236-40.
28. Junttila, M.R., Li, S.P. and Westermarck, J. (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*, **22**, 954-65.

## Legends to the figures

### Figure 1:

*D. scandens* extract and gamma-radiation synergistically induce cell death in HT-29 colon cancer cells. Cellular radiosensitivity of untreated HT-29 cells (diamond), cells treated with 5  $\mu\text{g/ml}$  of *D. scandens* extract (square) or treated with 15  $\mu\text{g/ml}$  of *D. scandens* extract (triangle). Cells were seeded into 6-well plates and pre-treated with or without *D. scandens* for 24 hours before gamma-irradiation. Clonogenic survival of gamma-irradiated cells was determined at day twelve after gamma-irradiation. The plot shows the mean surviving fraction  $\pm$  standard error from three independent experiments. Significant effects of gamma-radiation, plant extract treatment and combined treatment were tested by two-way ANOVA (see text).

### Figure 2:

*D. scandens* extract predominantly induces apoptosis in HT-29 colon cancer cells. HT-29 cells were pre-treated with or without *D. scandens* extract for 24 hours before gamma-irradiation. Forty-eight hours after irradiation, TUNEL imaging was performed to detect apoptotic DNA fragments (red). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Representative fluorescence microscopic images of control cells that received no treatment (control), 15  $\mu\text{g/ml}$  of *D. scandens* extract treated cells (DS), 6 Gy gamma-irradiated cells (IR), 15  $\mu\text{g/ml}$  of *D. scandens* extract treated and 6 Gy gamma-irradiated cells (IR+DS) (A). The percentages of TUNEL-positive cells counted from a minimum of 800 cells are shown as mean  $\pm$  standard error (B).

**Figure 3:**

Mitotic catastrophe is a predominant form of cell death in HT-29 cells in response to irradiation. HT-29 cells were pre-treated with or without *D. scandens* extract for 24 hours before irradiation. Forty-eight hours after 6 Gy of gamma-irradiation nuclear morphology was assessed by fluorescence microscopy. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue), alpha-tubulin (red) was stained by appropriate antibodies. Representative fluorescence microscopic images of normal nuclei of control cells that received no treatment (control), 15 µg/ml *D. scandens* extract treated cells (DS), 6 Gy gamma-irradiated cells (IR), 15 µg/ml of *D. scandens* extract treated and 6 Gy gamma-irradiated cells (IR+DS). Cell with fragmented nuclei (circle), giant cell with multiple micronuclei and multilobulated nuclei (arrowheads) are shown.

**Figure 4:**

Micronuclei formation of HT-29 cells in response to irradiation and *D. scandens* extract treatment. HT-29 cells were pre-treated with or without *D. scandens* extract for 24 hours before irradiation. Forty-eight hours after 6 Gy of gamma-irradiation, micronuclei frequencies were quantified by flow cytometry. The percentages of micronuclei fractions of control cells that received no treatment (control), 15 µg/ml of *D. scandens* extract treated cells (DS), 6 Gy gamma-irradiated cells (IR), 15 µg/ml of *D. scandens* extract treated and 6 Gy gamma-irradiated cells (IR+DS) are presented as mean ± standard error from three independent experiments.

**Figure 5:**

**Impact of *D. scandens* extract on the activation of Erk1/2** Treated cells were collected at different time points for total cell lysates extraction. The levels of proteins were determined by Western blot analysis. Levels of phospho-Erk1/2 and total Erk1/2 in cells that were treated with 15 µg/ml of *D. scandens* extract (A). Levels of phospho-Erk1/2 and total Erk1/2, phospho-Chk2 in cells that were treated with (+) or without (-) 15 µg/ml of *D. scandens* extract for 24 h followed by 6 Gy of irradiation (B). Detection of actin was used as a loading control.

**Figure 6:**

**Impact of *D. scandens* extract on the activation of DNA damage checkpoint signaling.** Treated cells were collected at different time points for cell cycle analysis and total cell lysate extraction. Cell cycle distribution profiles were assessed by flowcytometry (A). Levels of proteins were determined by Western blot analysis. Levels of phospho-Chk2, phospho-p53, phospho-Cdc2 in cells that were treated with (+) or without (-) 15 µg/ml of *D. scandens* extract for 24 h followed by 6 Gy of irradiation (B). Detection of actin was used as a loading control.

Figure 1

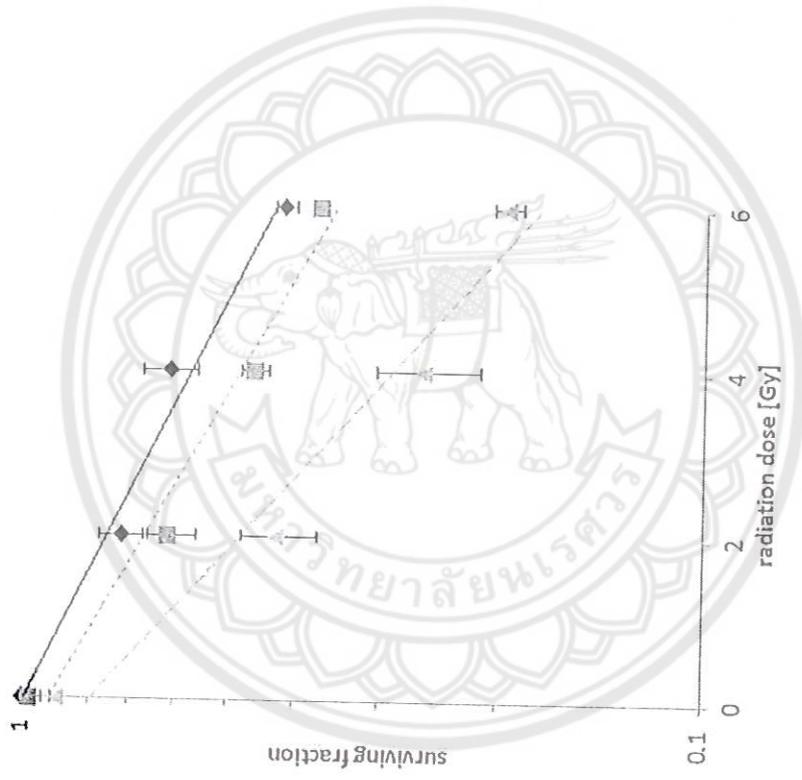
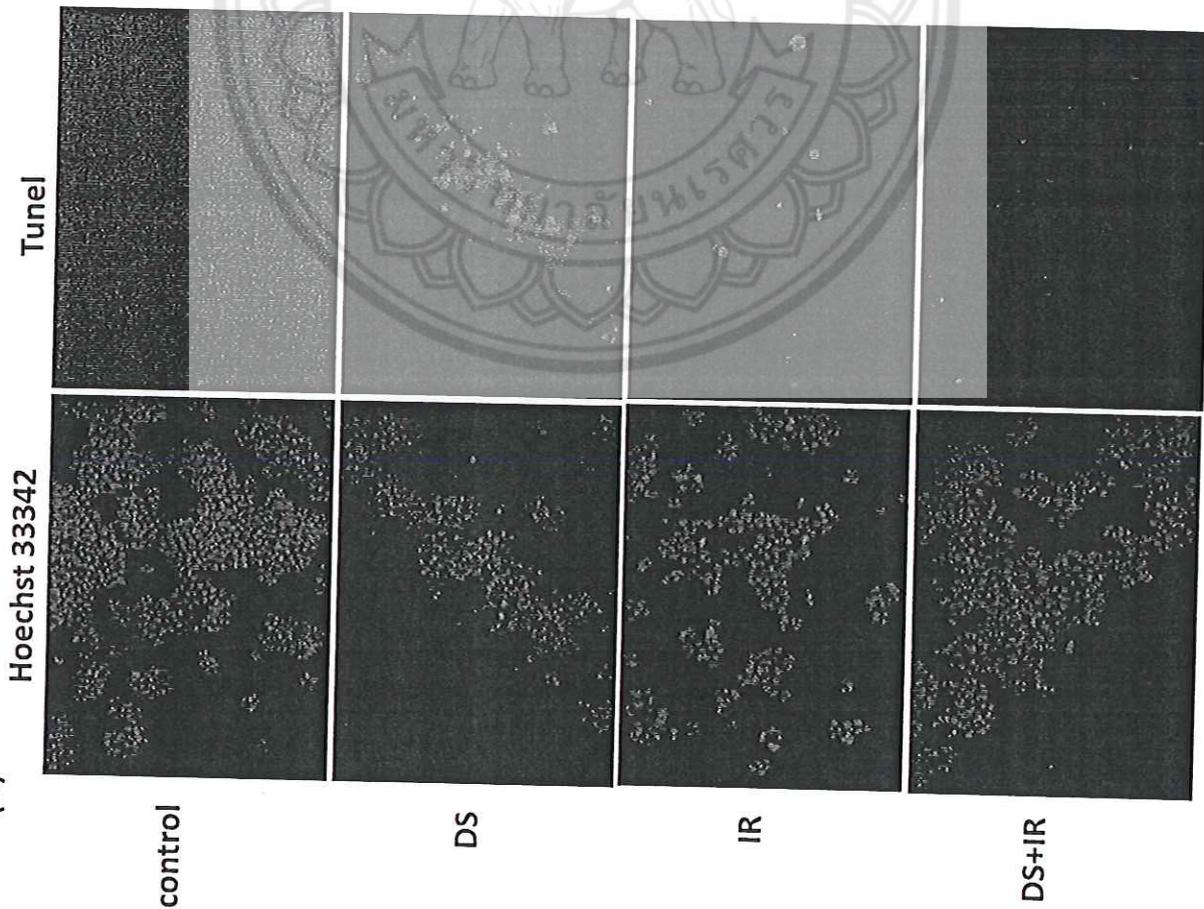


Figure 2

(A)



(B)

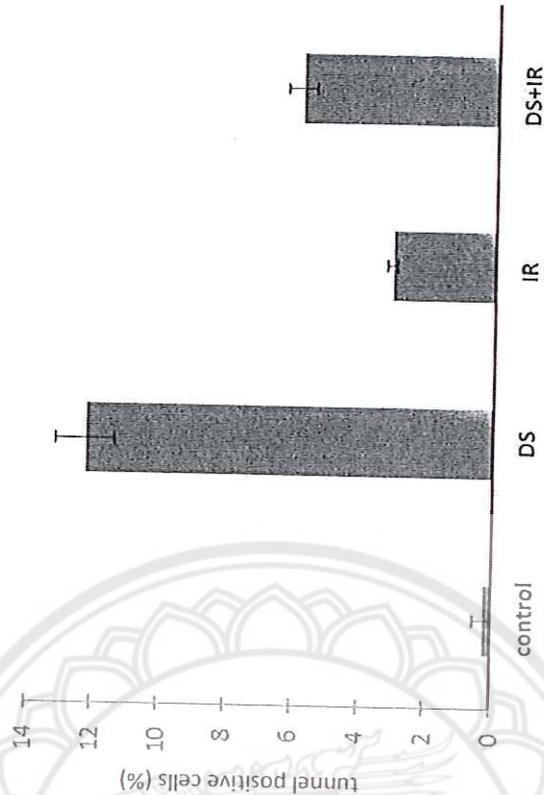


Figure 3

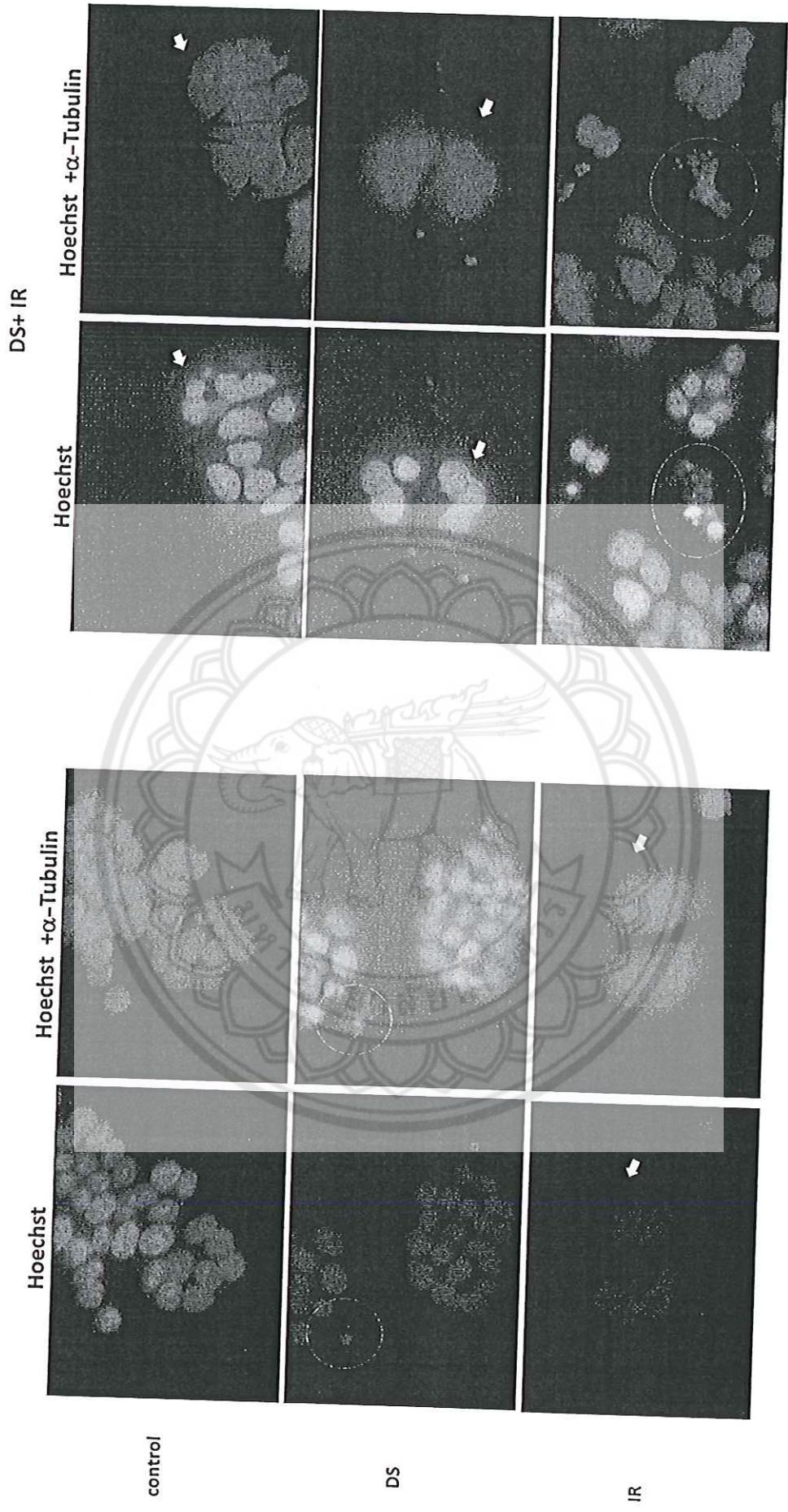


Figure 4

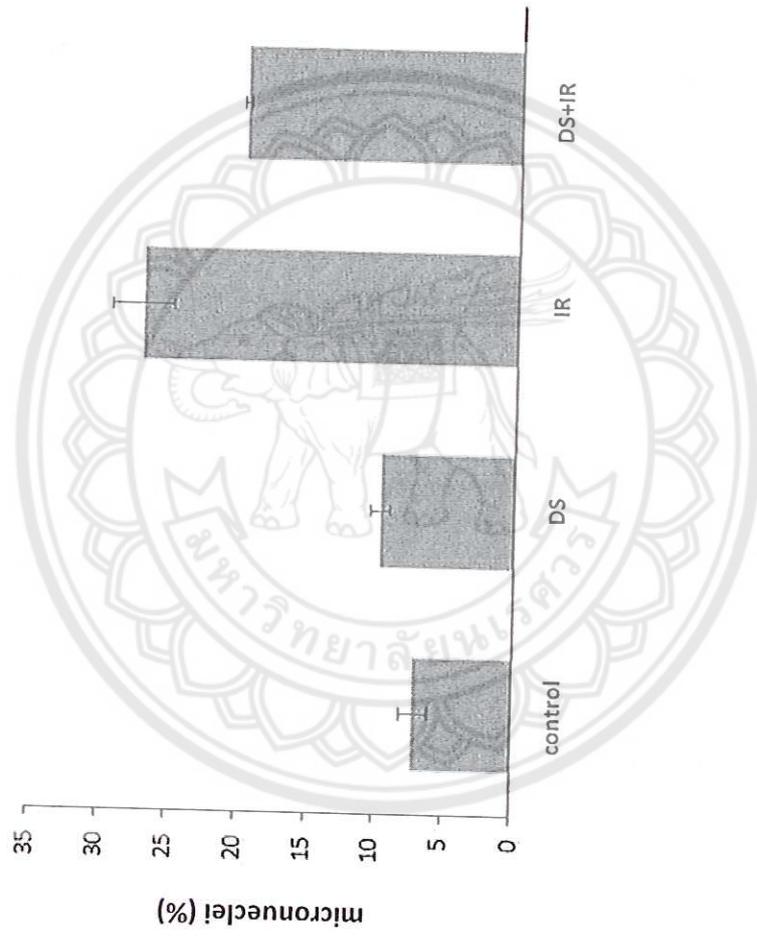


Figure 5

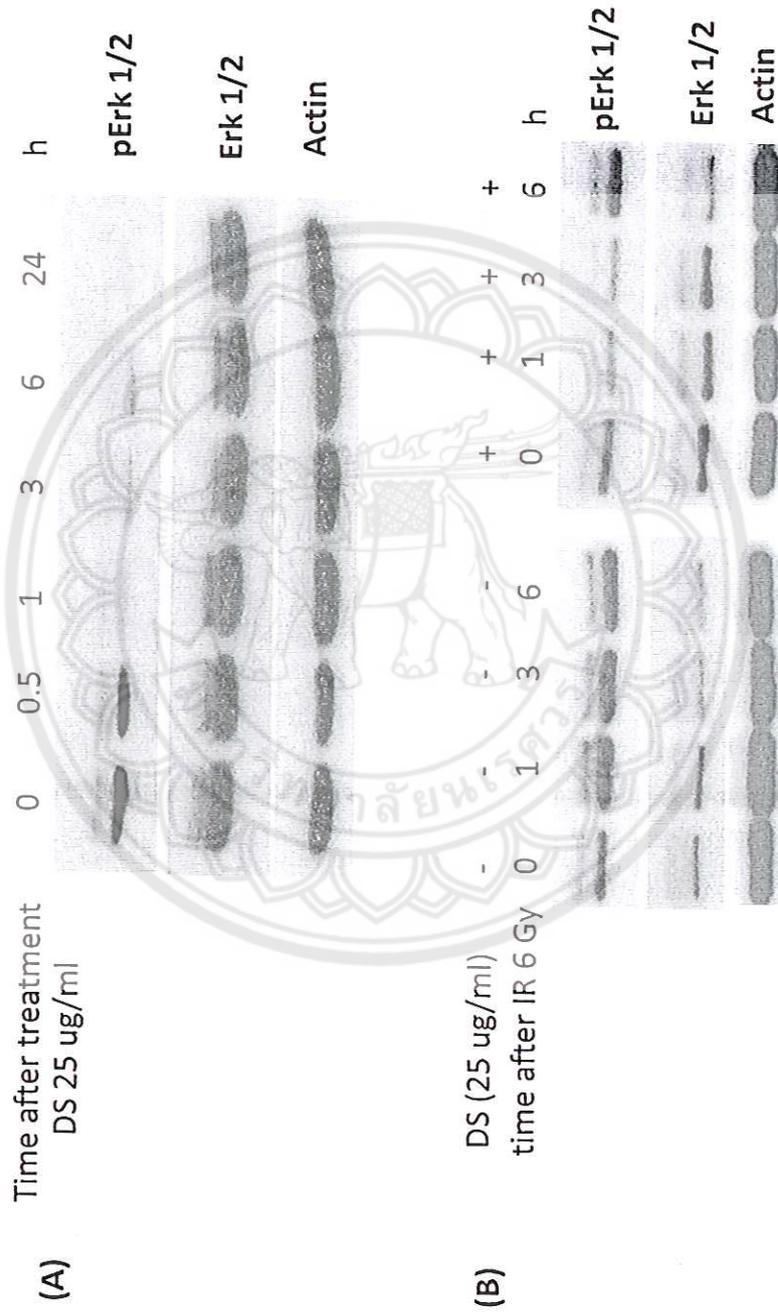


Figure 6

