

ผลของเคอร์เซตินต่อความมีชีวิตและการตายแบบอะพอพโทซิส ของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS ในห้องปฏิบัติการ

The Effect of Quercetin on Cell Viability and Apoptotic Cell Death of Human Osteosarcoma Cell Line (U2-OS) in Vitro

กิตตินันท์ จันทระกุลวัฒน์¹, ยาวี เมฆขำ¹, ฤทธิไกร ณ ลำพูน¹,
นिरชชา ไชยสมบุญ², ฐานิต ประสิทธิ์ศักดิ์³, รุ่งอรุณ เกรียงไกร³

¹ นิสิตทันตแพทย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

² หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

³ ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

Kittinun Juntrakulwat¹, Yawee Mekhom¹, Ritthikrai Na Lampoon¹, Niratcha Chaisomboon²,

Thanit Prasitsak³, Rungarun Kriangkrai³

¹Dental Student, Faculty of Dentistry, Naresuan University

²Dental Science Research Center, Faculty of Dentistry, Naresuan University

³Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Naresuan University

ชม. ทันตสาร 2558; 36(1) : 63-74

CM Dent J 2015; 36(1) : 63-74

บทคัดย่อ

ออสติโอซาร์โคมาเป็นมะเร็งกระดูกที่พบบ่อยในกลุ่มเด็กและวัยรุ่น แต่การรักษาโดยเคมีบำบัดยังมีข้อจำกัดหลายประการ โดยเฉพาะการดื้อต่อยาที่ให้การรักษาดังนั้น ทางเลือกใหม่โดยใช้เคอร์เซตินเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาผู้ป่วยจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเคอร์เซตินต่อความมีชีวิตและการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS ผลศึกษาพบว่าเคอร์เซตินระดับความเข้มข้น 5 10

Abstract

Osteosarcoma is the most common bone cancer found in childhood and adolescents. However, major problems associated with chemotherapy still remain, particularly the frequent development of drug resistance. Hence, new therapeutic approaches that can further improve the efficiency by using quercetin are interesting. The purpose of this study was to investigate the effect of quercetin on cell

Corresponding Author:

รุ่งอรุณ เกรียงไกร

ผศ.ทพญ.ดร. ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000

Rungarun Kriangkrai

Assistant Professor Dr., Department of Oral Biology,
Faculty of Dentistry, Naresuan University,
Phisanulok, 65000 Thailand
E-mail: puirung2001@yahoo.com

25 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ลดร้อยละความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นไปตามระดับความเข้มข้นของเคอร์เซตินที่เพิ่มขึ้น เคอร์เซตินสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยพบการแตกหักของดีเอ็นเอได้เป็นชิ้นส่วนขนาดใหญ่ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเคอร์เซตินมีฤทธิ์ต้านการเจริญและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ U2-OS ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อถึงกลไกการออกฤทธิ์ของเคอร์เซตินต่อเซลล์ U2-OS เพื่อนำประโยชน์มาประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยต่อไป

คำสำคัญ: เคอร์เซติน ออสติโอซาร์โคมา ความมีชีวิตของเซลล์ การตายแบบอะพอพโทซิส

viability and apoptotic cell death of human osteosarcoma cell line (U2-OS). The results showed that quercetin at 5 10 25 50 and 100 μ M significantly decreased the percentage of viability of U2-OS cells in a dose-dependent manner. Quercetin could induce apoptosis in U2-OS cells resulting in a large DNA fragmentation. Our results suggested that quercetin can inhibit cell proliferation and induce apoptosis of U2-OS cells, and provided for further investigation of underlying mechanisms of quercetin on U2-OS cells applied for osteosarcoma therapy.

Keywords: quercetin, osteosarcoma, cell viability, apoptosis

บทนำ

ออสติโอซาร์โคมา (osteosarcoma) เป็นเนื้องอกชนิดร้ายแรงและเป็นมะเร็งกระดูกที่พบบ่อยในกลุ่มเด็กและวัยรุ่น^(1,2) ส่วนใหญ่พบมะเร็งชนิดนี้ได้ที่กระดูกยาว (long bone) ได้แก่ กระดูกต้นขา (femur) ร้อยละ 42 กระดูกแข้ง (tibia) ร้อยละ 19 และกระดูกต้นแขน (humerus) ร้อยละ 10 กระดูกบริเวณอื่นที่พบได้บ่อยได้แก่ กระดูกขากรรไกร (jaw) ร้อยละ 8 และกระดูกเชิงกราน (pelvis) ร้อยละ 8⁽²⁾ ถึงแม้การรักษาโดยเคมีบำบัด การผ่าตัดและฉายรังสีรักษาจะเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยในช่วงเวลา 5 ปี ได้ถึงร้อยละ 60 ถึง 80⁽³⁾ อย่างไรก็ตามการรักษาโดยเคมีบำบัดยังพบข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น การดื้อต่อยา (drug resistance) ของเซลล์มะเร็ง⁽⁴⁾ ความเป็นพิษ (toxicity) ของยาที่ผู้ป่วยได้รับ เช่น เมโททรีเซต (methotrexate) ซิสพลาติน (cisplatin) โดโซรูบิซิน (doxorubicin) ทั้งในระยะแรกของการใช้ยาหรือการใช้ยาดัดต่อกันเป็นเวลานาน⁽⁵⁾ ดังนั้นการรักษาแนวใหม่โดยอาศัยสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งกระดูกออสติโอซาร์โคมาจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

เคอร์เซติน (quercetin) เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบบ่อยในชาและผักผลไม้ จากการศึกษาพบว่า โพลีฟิ

นอลมีคุณสมบัติที่หลากหลาย ได้แก่ คุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidative effect)⁽⁶⁾ ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect)⁽⁷⁾ ต้านต่อการเจริญของแบคทีเรีย (antimicrobial effect)⁽⁸⁾ และต้านต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ (anticancer effect) จากการศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงฤทธิ์ของเคอร์เซตินต่อการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ดังนี้เคอร์เซตินสามารถต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิด HL-60 (promyelocytic leukemic cell line, HL 60) เคอร์เซตินยับยั้งการเจริญของเซลล์ HL-60 แปรผันกับความเข้มข้นและเวลาที่ทดสอบ เคอร์เซตินที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ HL-60 ร้อยละ 17.1 27.3 40.1 และ 52.7 เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 48 72 และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ ในขณะที่เคอร์เซตินระดับความเข้มข้น 20 40 และ 60 ไมโครโมลาร์ ทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีผลทำให้วัฏจักรของเซลล์หยุดลง⁽⁹⁾ สอดคล้องไปกับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของเคอร์เซตินต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิด CEM (human leukemic T-cells, CEM) พบว่าเคอร์เซตินที่ระดับความเข้มข้น 70 ไมโครโมลาร์ ทดสอบเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ทำให้วัฏจักรการแบ่งตัวของเซลล์หยุดลงได้ถึงร้อยละ 64⁽¹⁰⁾ จากการศึกษาผลของเคอร์-

เซตินต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารของมนุษย์ชนิด HGC-27 (human gastric cancer cell line, HGC-27) พบว่าเคอร์เซตินที่ระดับความเข้มข้น 70 ไมโครโมลาร์ทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้การจำลองตัวเองของดีเอ็นเอเพื่อการแบ่งตัวของเซลล์ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 14 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและส่งผลให้วัฏจักรการแบ่งตัวของเซลล์หยุดลง⁽¹¹⁾

นอกจากนี้เคอร์เซตินยังส่งเสริมการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้ เคอร์เซตินทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิด U937 (human leukemic cell line, U937) เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสเมื่อทดสอบเคอร์เซตินที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยอาศัยเทคนิค DNA fragmentation assay⁽¹²⁾ ขณะที่เมื่อทดสอบเคอร์เซตินที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีผลกระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 (human hepatoma cell line, HepG2) โดยผ่านการกระตุ้นแคสเปสสาม (caspase) ซึ่งเป็นเอนไซม์กระตุ้นกลไกเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส⁽¹³⁾ จากการศึกษาในเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ชนิด A549 (human lung carcinoma cell line, A549) พบว่าเมื่อทดสอบเคอร์เซตินที่ระดับความเข้มข้น 20 ถึง 80 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเคอร์เซตินที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้เคอร์เซตินที่ระดับความเข้มข้น 60 ไมโครโมลาร์ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการทำงานของเซอร์วิวิน (survivin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เซลล์มะเร็งสร้างขึ้นเพื่อต่อต้านกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสและเคอร์เซตินยังส่งเสริมการแสดงออกของยีน P53 ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้⁽¹⁴⁾

นอกจากเคอร์เซตินจะมีประโยชน์ในการนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งโดยอาศัยฤทธิ์ด้านการเจริญและส่งเสริมการตายของเซลล์มะเร็งผ่านกลไกต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้ว เคอร์เซตินยังเสริมฤทธิ์ยาเคมีบำบัดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF-7 และชนิด MAD-MB 231 (human breast cancer cell line, MCF-7 and MAD-MB 231)⁽¹⁵⁾

จากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นได้ว่าเคอร์เซตินมีผลในการยับยั้งการเจริญและทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ

อะพอพโทซิสผ่านกลไกต่าง ๆ ในเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ในระดับความเข้มข้นของเคอร์เซตินและเวลาที่ที่ใช้ทดสอบแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของเคอร์เซตินต่อการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งกระดูกล้วนยังไม่ทราบแน่ชัดและกำลังเป็นที่สนใจ การศึกษานี้จึงทำการศึกษาฤทธิ์ของเคอร์เซตินต่อเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS (human osteosarcoma cell line, U2-OS) ในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบผลของเคอร์เซตินต่อความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยเทคนิค MTT assay และผลการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์โดยศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับและเทคนิค DNA fragmentation assay ผลการศึกษาจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาฤทธิ์เคอร์เซตินต่อการต้านการเจริญและการตายของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์เพื่อประยุกต์ใช้การรักษาผู้ป่วยต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. สารเคมี

เคอร์เซติน (2 - (3, 4 - Dihydroxyphenyl) -3, 5, 7 - trihydroxy -4H-1 -benzopyran -4 -one dehydrate 3, 3', 4', 5, 7 - Pentahydroxyflavone dehydrate) จากบริษัทซิกมาร์ (Q0125; Sigma[®], St. Louis, MO, USA) จะถูกละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เพื่อเป็นสารละลายตั้งต้นก่อนทำการทดสอบ นำสารละลายเคอร์เซตินตั้งต้นความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม เพื่อทำการทดสอบผลการมีชีวิตของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS ที่ระดับความเข้มข้น 1 5 10 25 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ และผลการตายของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS ที่ระดับความเข้มข้น 5 25 และ 100 ไมโครโมลาร์ ในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายเคอร์เซตินที่ใช้ในการทดสอบจะมีความเข้มข้นของ DMSO น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 0.1 กลุ่มควบคุมจะไม่ใส่สารละลายเคอร์เซตินแต่จะใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมในปริมาณที่เท่ากับกลุ่มทดลอง และมีความเข้มข้นของ DMSO ร้อยละ 0.1 (vehicle control)

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS

เซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco® BRL, New York, USA) ที่ประกอบด้วยซีรัมร้อยละ 10 (10% Fetal calf serum, Gibco® BRL) เพนนิซิลลิน/สเตรปโตมัยซินซัลเฟต และแอมโฟเทอริซินบี ร้อยละ 1 (1% Penicillin / Streptomycin sulfate and Amphotericin B; Gibco® BRL) และถูกเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ระดับความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95

3. การสร้างกราฟมาตรฐาน

หว่านเซลล์ที่ทราบจำนวนลงในจานเพาะเลี้ยงจำนวน 20,000 40,000 60,000 80,000 และ 100,000 เซลล์ต่อจานเพาะเลี้ยง แล้วนำเข้าสู่ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัดจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay แล้วนำผลมาหาค่าความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับจำนวนเซลล์ซึ่งทราบจำนวนแน่นอนที่ได้ทำการหว่านข้างต้น จะทำให้ได้ความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R²) เข้าใกล้ 1

4. ศึกษาผลของเคอร์เซตินต่อความมีชีวิตของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS โดยเทคนิค MTT assay

การวัดผลโดยเทคนิค MTT assay⁽¹⁶⁾ เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อ 0.5 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่ไม่มีซีรัมและนำเข้าสู่ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ต่อมาเซลล์จะถูกทดสอบด้วยเคอร์เซตินความเข้มข้น 1 5 10 25 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยกลุ่มควบคุมของแต่ละการศึกษาจะไม่มีเคอร์เซตินอยู่แต่มี DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายอยู่ร้อยละ 0.1 หลังจากนั้นเซลล์จะถูกล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) 2 ครั้งและอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มี Phenol red และมี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphen-

yltetrazolium bromide, a tetrazole; USB® , Claveland, OH, USA) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีสุดท้ายของการทดสอบ จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกดูดออกและใส่ DMSO จำนวน 800 ไมโครลิตรลงในแต่ละ หลุมของจานเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลึก formazan ที่เซลล์สร้างขึ้นจากสารละลาย MTT จากนั้นจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer (Genesys G10-S, Thermo Fisher Scientific, Inc., Mandison-Wisconsin, USA) ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเทียบค่าจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่กับเส้น กราฟมาตรฐาน โดยในแต่ละกลุ่มการทดลองจะทำซ้ำกัน 3 ครั้ง โดยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ในแต่ละการทดลองมีค่าเท่ากับ (จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในแต่ละกลุ่มทดลองต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดในกลุ่มควบคุม) คูณด้วย 100

5. ศึกษาลักษณะการตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS โดยเคอร์เซตินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ

เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ ต่อ 0.5 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่ไม่มีซีรัมและ นำเข้าสู่ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ต่อมาเซลล์ จะถูกทดสอบด้วยเคอร์เซติน ความเข้มข้นที่ 100 ไมโคร-โมลาร์ เป็นเวลา 48 54 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปส่อง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted System Microscope, IX70, Olympus)

6. ศึกษาผลของเคอร์เซตินต่อการตายแบบอะพอพ-โทสิสของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS โดยเทคนิค DNA fragmentation assay

เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ ต่อ 0.5 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่ไม่มีซีรัมและนำ เข้าสู่ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ต่อมาเซลล์จะถูกทดสอบด้วยเคอร์เซตินระดับความเข้มข้น 5 และ 25 เป็น เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง และระดับความเข้มข้น 100 ไมโคร-

โมลาร์ เป็นเวลา 48 54 และ 72 ชั่วโมง โดยกลุ่มควบคุมของแต่ละการศึกษาจะไม่มีเคอร์เซตินอยู่แต่มี DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายอยู่ร้อยละ 0.1 จากนั้นทำการตรวจสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสโดยเทคนิค DNA fragmentation assay โดยใช้ Apoptotic DNA Ladder Detection (Milipore®) ดังนี้ ทำการเก็บเซลล์ทดสอบจำนวน 5×10^5 เซลล์ ใส่ในหลอด microcentrifuge ทำการปั่นเหวี่ยงเซลล์ด้วยความเร็วประมาณ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และล้างเซลล์ PBS จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใส่ TE Lysis buffer และกำจัดอาร์เอ็นเอ (RNA) ด้วย enzyme A (RNAase A) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการย่อยโปรตีนที่ไม่ต้องการออกโดยการเติม enzyme B (Proteinase K) ผสมกันอย่างนุ่มนวล และปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอมโมเนียมอะซิเตท (ammonium acetate) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง นำดีเอ็นเอที่สกัดมาได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และปล่อยให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วย DNA suspension buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาแยกในสนามไฟฟ้าที่ 90 V โดยเทคนิค DNA electrophoresis ผ่านตัวกลางคือ 1% Tris-acetate agarose gel เป็นเวลา 55 นาที จากนั้นย้อมด้วยเอททิดีียม-โบรไมด์ (TE/ethidium bromide) เป็นเวลา 10 ถึง 15 นาที และตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการ ทรานซิลลูมินนซ์ (Transillumination) ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet) ความยาวคลื่นแสง 302 นาโนเมตร

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

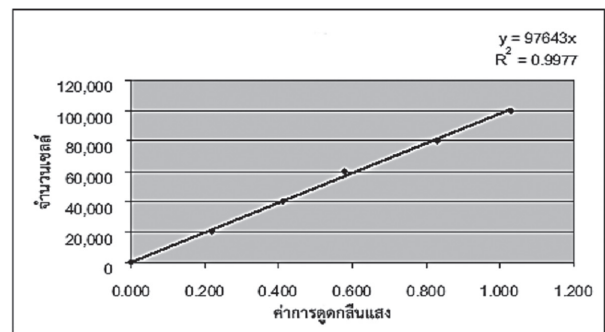
แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (means \pm standard errors) ของร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์ในแต่ละกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยอาศัยสถิติความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (One-way ANOVA) และ Post Hoc Tests (Tukey HSD) การวิเคราะห์ใช้โปรแกรม SPSS 16.0 (SPSS Inc.,

Chicago, IL, USA) นัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์ที่ แสดงผลที่ $P < 0.05$

ผลการศึกษา

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ออสทีโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS โดยเทคนิค MTT assay

กราฟมาตรฐานแสดงแนวแกน Y คือจำนวนเซลล์และแนวแกน X คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (absorbance) 570 นาโนเมตร พบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ U2-OS คือ $Y = 97643X$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9977 (รูปที่ 1) กราฟมาตรฐานจะถูกนำมาใช้เทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแต่ละการศึกษาโดยเทคนิค MTT assay เป็นจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่



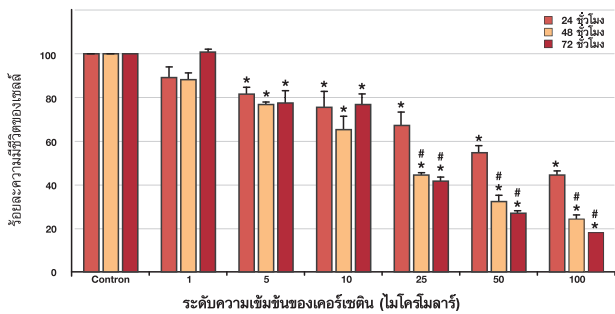
รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ออสทีโอซาร์โคมาชนิด U2-OS

Figure 1 Standard curve showed the relation between an absorbance and number of osteosarcoma cell line, U2-OS.

ผลของเคอร์เซตินต่อความมีชีวิตของเซลล์ออสทีโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS โดยเทคนิค MTT assay

ผลการศึกษาพบว่าเคอร์เซตินความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ในทุกช่วงเวลาทำการทดสอบ ไม่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่เคอร์เซตินความเข้มข้น 5 10 25 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ในทุกช่วงเวลาทำการทดสอบมีผลลดร้อยละความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม

ควบคุม และร้อยละความมีชีวิตเซลล์มีค่าลดลงไปตามระดับความเข้มข้นของเคอร์เซตินที่เพิ่มขึ้น (เครื่องหมาย * ในรูปที่ 2) ร้อยละความมีชีวิตเซลล์ลดลงมากกว่า 50 เมื่อเซลล์ถูกทดสอบด้วยเคอร์เซตินระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละความมีชีวิตเซลล์ลดลงเท่ากับ 55.089) ที่ระดับความเข้มข้น 25 50 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ร้อยละความมีชีวิตเซลล์ลดลงเท่ากับ 54.898, 66.723, 74.898 ตามลำดับ) และที่ระดับความเข้มข้น 25 50 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ร้อยละความมีชีวิตเซลล์ลดลงเท่ากับ 57.419, 72.130, 81.424 ตามลำดับ) เคอร์เซตินมีผลลดร้อยละความมีชีวิตของเซลล์แปรผันไปตามเวลาที่ทำการทดสอบที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทาง



รูปที่ 2 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS เมื่อทดสอบด้วยเคอร์เซตินที่ระดับความเข้มข้น 1 5 10 25 50 และ 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง * $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการทดสอบด้วยเคอร์เซตินในระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง # $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง กับ 48 และ 72 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 25 50 และ 100 ไมโครโมลาร์

Figure 2 % cell viability of osteosarcoma cell line, U2-OS after treated with the varied concentrations of quercetin at 24, 48 and 72 h. * $P < 0.05$ quercetin treatments compared with control at 24, 48 and 72 h. # $P < 0.05$ compared between 24 h and, 48 and 72h of quercetin treatments in concentration of 25, 50 and 100 μM.

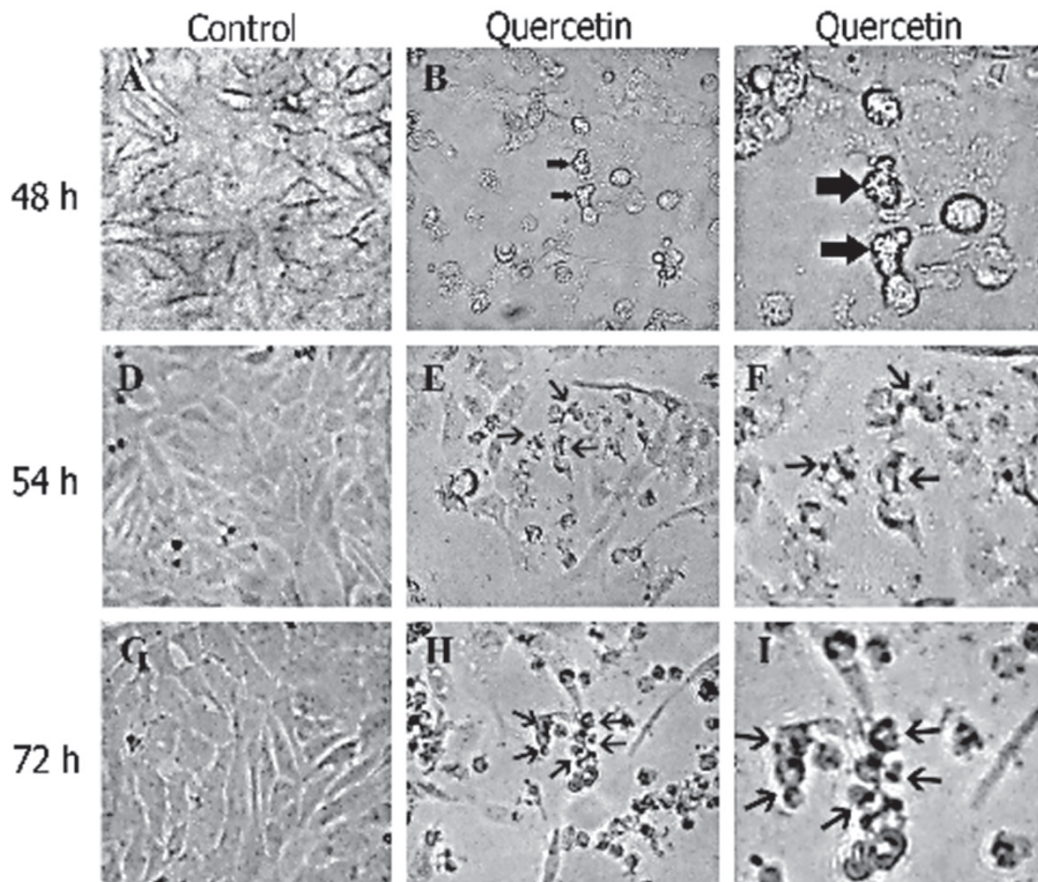
สถิติ ในระหว่างการทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง กับ 48 และ 72 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 25 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ (เครื่องหมาย # ในรูปที่ 2)

ผลลักษณะการตายแบบอะพอโทสิสของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS โดยเคอร์เซตินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ

ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกทดสอบด้วยเคอร์เซติน เซลล์แสดงลักษณะปกติในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 48 54 และ 72 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 3A, D, และ G ตามลำดับ เมื่อเซลล์ถูกทดสอบด้วยเคอร์เซตินจะมีการหดตัวและฟลอบ มีความหนาแน่นของเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงลดลง เซลล์มีการหลุดออกจากผิวงานเพาะเลี้ยงเซลล์ ลักษณะดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเป็นไปตามความเข้มข้นและเวลาที่เซลล์ถูกทดสอบเพิ่มขึ้น เซลล์แสดงลักษณะการตายแบบอะพอโทสิสเมื่อถูกทดสอบด้วยเคอร์เซตินที่ 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป โดยพบเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการบวมเป็นตุ่มหรือหน่อขึ้น (plasma membrane blebbing) เมื่อเซลล์ถูกทดสอบด้วยเคอร์เซตินที่ 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 3B, C ลูกศรชี้) ต่อมาพบการรวมตัวกันแน่นของนิวเคลียส (nuclear condensation) และมีการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) เมื่อเซลล์ถูกทดสอบด้วยเคอร์เซตินที่ 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 54 ชั่วโมง (รูปที่ 3E, F ลูกศรชี้) และเมื่อเซลล์ถูกทดสอบด้วยเคอร์เซตินที่ 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์จะมีการแยกสลายเป็นเม็ดเล็กๆ ซึ่งมีชื่อเรียกเฉพาะว่า อะพอโทติก บอดี ซึ่งบรรจุดีเอ็นเอที่แตกหักอยู่ภายใน (รูปที่ 3H, I ลูกศรชี้)

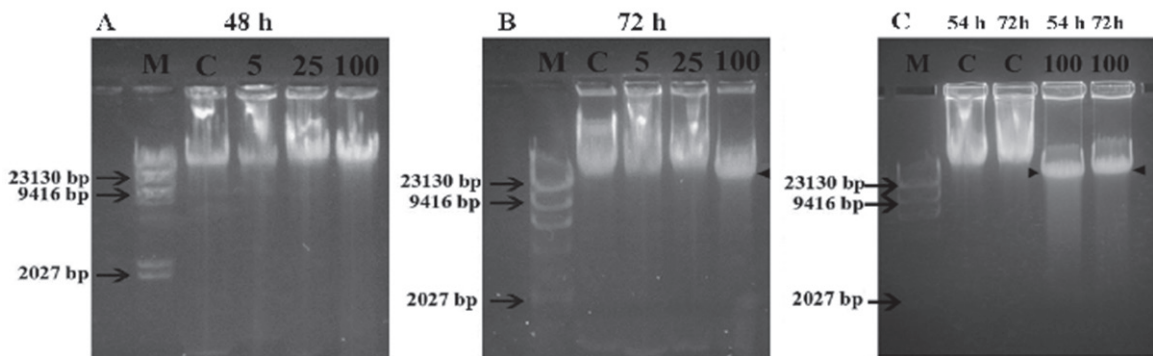
ผลของเคอร์เซตินต่อการตายแบบอะพอโทสิสของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS โดยเทคนิค DNA fragmentation assay

เพื่อสนับสนุนผลการศึกษาลักษณะการตายแบบอะพอโทสิสของเซลล์โดยเคอร์เซตินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ กลุ่มวิจัยจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของเคอร์เซตินต่อการตายแบบอะพอโทสิสของเซลล์โดยอาศัยเทคนิค DNA fragmentation assay ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเซลล์ถูกทดสอบด้วยเคอร์เซตินระดับความเข้มข้น 5 25 และ 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4A) และความเข้มข้น 5 และ 25 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ 4B)



รูปที่ 3 ลักษณะการตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์ U2-OS เมื่อทดสอบด้วยเคอร์เซตินที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 48 54 และ 72 ชั่วโมงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ รูป A, B, D, E, G, H กำลังขยาย 200 เท่า (C, F, I เป็นภาพขยายจาก B, E, H, ตามลำดับ) A, D, G แสดงลักษณะของเซลล์กลุ่มควบคุม B, C แสดงลักษณะของเซลล์เมื่อถูกทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ลูกศรแสดงลักษณะของ plasma membrane blebbing E, F แสดงลักษณะของเซลล์เมื่อถูกทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 54 ชั่วโมง ลูกศรแสดงลักษณะการแตกหักของดีเอ็นเอ H, I แสดงลักษณะของเซลล์เมื่อถูกทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ลูกศรแสดงลักษณะของ apoptotic body ซึ่งบรรจุดีเอ็นเอที่แตกหักอยู่ภายใน

Figure 3 Morphological changes of U2-OS cells after treated with 100 μ M of quercetin for 48, 54 and 72 h observed by using Inverted System Microscope. A, B, D, E, G, H (x200) and C, F, I are higher magnification from B, E, H, respectively. A, D, G are control cells. Arrows in B, C indicated membrane blebbing after treated with 100 μ M of quercetin for 48 h. Arrows in E, F, indicated DNA fragmentation after treated with 100 μ M of quercetin for 54 h. Arrows in H, I indicated apoptotic body containing fragmented DNA after treated with 100 μ M of quercetin for 72 h.



รูปที่ 4 ผลการสกัดดีเอ็นเอของเซลล์ U2-OS โดยเทคนิค DNA fragmentation assay เมื่อถูกทดสอบด้วยเคอร์เซติน ความเข้มข้น 5 25 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (A) และ 72 ชั่วโมง (B) และที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 54 และ 72 ชั่วโมง (C) พบการแตกหักของดีเอ็นเอเมื่อเซลล์ถูกทดสอบด้วยเคอร์เซตินความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 54 และ 72 ชั่วโมง (หัวลูกศรรูป B และ C) (M= marker Hind III แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลดีเอ็นเอ; C= กลุ่มควบคุม; 5 25 100= เคอร์เซตินความเข้มข้น 5 25 100 ไมโครโมลาร์; bp= base pairs หน่วยของน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอ)

Figure 4 Extracted DNA of U2-OS cells observed by DNA fragmentation assay, after U2-OS cells were treated with 5, 25 and 100 μM of quercetin for 48 h (A) and 72 h (B), and 100 μM of quercetin for 54 h and 72h (C). Large DNA fragments were found after U2-OS cells were treated with 100 μM of quercetin for 54 h and 72h (arrow heads in B and C) (M = marker Hind III; C= control group; 5 25 100= 5, 25 and 100 μM of quercetin; bp= base pairs)

ไม่พบการแตกหักของดีเอ็นเอของเซลล์ น้ำหนักดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ในขณะที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยเคอร์เซตินระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 54 และ 72 ชั่วโมง พบการแตกหักของดีเอ็นเอเป็นผลให้น้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และมีน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แตกหักมากกว่า 23,130 bp ขึ้นไป (รูป 4B, C, หัวลูกศรชี้) ผลการศึกษาสอดคล้องไปกับการศึกษาลักษณะการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์โดยเคอร์เซตินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ โดยพบว่าเคอร์เซตินเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสและมีการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) เมื่อเซลล์ถูกทดสอบด้วยเคอร์เซตินที่ 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 54 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง (รูปที่ 3E, F ลูกศรชี้และรูปที่ 3H, I ลูกศรชี้)

บทวิจารณ์

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเคอร์เซตินมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเข้มข้น 5 10 25 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ลดลงเป็นไปตามระดับความเข้มข้นของเคอร์เซตินที่เพิ่มมากขึ้น เคอร์เซตินที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและระดับความเข้มข้น 25 50 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงมีผลลดร้อยละความมีชีวิตเซลล์ได้มากกว่า 50 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาที่การศึกษาผลของเคอร์เซตินต่อเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิดอื่น ๆ พบว่าเคอร์เซตินระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีผลลดร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด HOS-143B น้อยกว่า 40⁽¹⁷⁾ และเคอร์เซตินระดับความเข้มข้น 160 ไมโครโมลาร์ทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีผลลดร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด MG-63 ได้เท่ากับ 50⁽¹⁸⁾ ขณะที่การศึกษานี้เมื่อเปรียบเทียบเวลาในการทดสอบที่ 48 ชั่วโมง พบว่าเคอร์เซตินระดับความเข้มข้นที่ 25 ไมโครโมลาร์มีผลลดร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ U2-OS ได้มากกว่า 50 จะเห็นได้ว่า

เซลล์ U2-OS มีความไว (sensitivity) ต่อเคอร์เซติน สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HOS-143B และ MG-63 เคอร์เซตินมีผลต่อเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์แตกต่างกันไป อาจเป็นผลมาจากคุณลักษณะของเซลล์ที่ต่างกัน เซลล์ HOS-143B มีลักษณะที่ลุกลามสูง (invasion) และสามารถแพร่กระจาย (metastasis) ไปยังเนื้อเยื่ออื่น ๆ ได้ ในขณะที่เซลล์ U2-OS มีลักษณะที่ลุกลามสูงเช่นกัน แต่ไม่มีการแพร่กระจายของเซลล์ ส่วนเซลล์ MG-63 ไม่มีลักษณะการลุกลามและการแพร่กระจาย⁽¹⁹⁾ จากความไวของเซลล์ U2-OS ต่อเคอร์เซตินแสดงให้เห็นว่าเคอร์เซตินน่าจะให้ผลดีในการรักษาผู้ป่วยในระยะที่เซลล์ออสติโอซาร์โคมามีคุณลักษณะที่ลุกลามสูง แต่ไม่มีการแพร่กระจายของเซลล์ ทั้งนี้เพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการออกฤทธิ์ของเคอร์เซตินในปริมาณที่ต่ำสุดที่ใช้ในการรักษา เนื่องจากมีรายงานการศึกษาพบว่าเคอร์เซตินมีผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูกปกติของหนูทดลองชนิด M3T3E1 ได้เช่นเดียวกันโดยระดับความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์มีผลด้อยละความมีชีวิตของเซลล์กระดูกได้เท่ากับ 55⁽²⁰⁾ ดังนั้นการใช้เคอร์เซตินในปริมาณที่สูงอาจมีผลเสียต่อเซลล์กระดูกปกติของผู้ป่วยได้

การตายของเซลล์ เป็นกลไกที่กำจัดเซลล์เสื่อมสภาพตามอายุขัยหรือเสื่อมสภาพจากการถูกทำลายจนไม่สามารถซ่อมแซมได้ การตายของเซลล์แบบอะพอพโทสิสเกิดขึ้นได้ 2 วิธี คือ (1) วิธีภายนอกหรือ death-receptor-induced extrinsic pathway เกิดเมื่อตัวรับสัญญาณการตายหรือ death receptors (DRs) เช่น tumor necrosis factor receptor (TNFR), Fas receptor (FasR), TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAILR) เป็นต้น ตัวรับสัญญาณการตายเหล่านี้จะถูกกระตุ้นด้วยการจับของลิแกนด์ (ligand) ที่จำเพาะทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยโปรตีนตัวปรับ (adaptor proteins) กระตุ้นการทำงานของกลุ่มเอนไซม์แคสเปส (caspases) ที่ทำหน้าที่สลายโปรตีนโครงสร้างของเซลล์ สลายออร์แกเนลล์ (organelles) และเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) (2) ส่วนวิธีภายในหรือ mitochondrial-apoptosome-mediated apoptotic intrinsic pathway ซึ่งจะถูกรับรู้โดยความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย (mitochondria outer membrane permeabilization) เมื่อมีสิ่งกระตุ้น เช่น สารเคมีที่เป็นพิษ อนุมูลอิสระ การเสียสมดุล

ของแคลเซียมไอออนจะรบกวน electrochemical gradient ทำให้เยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรียสูญเสียการควบคุมและปล่อยไซโทโครม ซี (cytochrome c) ออกจากไมโทคอนเดรีย ไซโทโครม ซี จะกระตุ้นการทำงานของกลุ่มเอนไซม์แคสเปส (caspases) นำไปสู่การตายแบบอะพอพโทสิส อย่างไรก็ตามการนำสัญญาณการตายของทั้งสองวิธีนี้อาจเป็นอิสระต่อกันหรืออาจเหนี่ยวนำสัญญาณการตายร่วมกันได้ การตายของเซลล์แบบอะพอพโทสิสจะมีลักษณะรูปร่างที่จำเพาะสามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ โดยเซลล์จะเกิดการหดตัวเนื่องจากมีการทำลายโปรตีนโครงสร้างของเซลล์ เช่น เส้นใยแอกติน (actin filaments) ในไซโทพลาสซึม ทำให้ไซโทพลาสซึม ออร์แกเนลล์และนิวเคลียสเกิดการรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่มกัน (chromatin aggregation) เยื่อหุ้มเซลล์เกิดบวมเป็นตุ่มหรือหน่อขึ้น (plasma membrane blebbing) ในระยะท้ายของกระบวนการดีเอ็นเอจะถูกย่อยเป็นชิ้นส่วนต่างๆ (endonucleocytic degradation of DNA into nucleosomal fragments) จากนั้นเซลล์จะแยกสลายออกเป็นเม็ดเล็กๆ หรือเวสิเคิล (vesicle) ซึ่งมีชื่อเรียกเฉพาะว่า อะพอพโทติก บอดี (apoptotic body) ซึ่งต่อมาจะถูกจับกินโดยเซลล์อื่นๆ โดยวิธีฟาโกไซโตสิส (phagocytosis) การแตกหักของดีเอ็นเอจากการถูกย่อยสลายมีรูปแบบที่ชัดเจน ดังนี้ 1. ได้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ (large DNA fragments) ที่มีขนาดโมเลกุล 50-300 kbp 2. ได้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายสั้นๆ (small DNA fragments) ที่มีขนาด 180-200 bp หรือ 3. ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่และชิ้นส่วนสายสั้นๆ ร่วมกัน ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกหักสามารถแยกได้ตามน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)^(21,22)

นอกจากเคอร์เซตินจะออกฤทธิ์ต้านการเจริญโดยมีผลด้อยละความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเข้มข้น 5 25 50 ไมโครโมลาร์แล้ว ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นของเคอร์เซตินที่ 100 ไมโครโมลาร์ ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทสิสได้ โดยสำรวจพบเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการบวมเป็นตุ่ม เมื่อถูกทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ต่อมาเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอและอะพอพโทติก บอดีเมื่อเซลล์ถูกทดสอบเป็นเวลา 54 และ 72 ชั่วโมง รูปแบบการแตกหักของดีเอ็นเอได้เป็นชิ้นส่วนขนาดใหญ่มี

น้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 23,130 bp หรือ 23.13 kbp โดยกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอโทสิสเป็นไปตามระยะเวลาที่เซลล์ถูกทดสอบเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามเซลล์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอโทสิสในเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ผ่านวิถีใดนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด^(12,14,23) จากการศึกษาที่ใกล้เคียงแสดงถึงกลไกส่งเสริมวิถีการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอโทสิสของเซลล์ต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ พบว่า เซลล์ที่ส่งเสริมฤทธิ์ ลิแกนด์ที่เรียกว่า TRAIL ผ่านตัวรับสัญญาณการตายที่เรียกว่า TRAILR ซึ่งเป็นการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์จากวิถีภายนอก ในการกระตุ้นการตายแบบอะพอโทสิสของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT-29 SW-620 และ Caco-2⁽²⁴⁾ และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากของมนุษย์ชนิด DU-145 และ PC-3⁽²⁵⁾ และการศึกษาที่แสดงผลของเซลล์ที่สัมพันธ์กับการกระตุ้นการตายแบบอะพอโทสิสของเซลล์มะเร็งผ่านวิถีภายใน ในเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2⁽¹³⁾ และเซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มชนิด KB และ KBv200⁽²⁶⁾ จากการศึกษาฤทธิ์การเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอโทสิสของเซลล์-เซตินต่อเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ พบว่าเซลล์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอโทสิสในเซลล์ HOS-143B และเซลล์ MG-63 วิถีการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์ HOS-143B โดยเซลล์เซตินยังไม่ทราบแน่ชัด ขณะที่การตายของเซลล์ MG-63 โดยเซลล์เซตินสัมพันธ์กับการเหนี่ยวนำวิถีภายใน ในขณะที่วิถีการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์ U2-OS โดยเซลล์เซตินยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดและยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากการศึกษาแสดงถึงฤทธิ์ของเซลล์เซตินต่อการต้านการเจริญและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอโทสิสในเซลล์มะเร็งออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ การศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยต่อไป การนำเซลล์เซตินไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยอาจจะมีข้อจำกัดโดยตรงของเซลล์เซตินในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งเพื่อลดการใช้ยาเคมีบำบัด ซึ่งมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ ปัจจุบันมีการพัฒนาการขนส่งเซลล์เซตินเข้าสู่ร่างกายให้อยู่ในรูปแบบของนาโนพาติเคิล (nanoparticle) ซึ่งจะทำให้ร่างกายดูดซึมเซลล์เซตินได้ดีขึ้น ลดปริมาณการใช้เซลล์เซติน และเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของเซลล์เซติน โดยเซลล์เซตินจะถูกนำส่งโดยตรง

ไปยังเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์⁽²⁷⁾ การใช้เซลล์เซตินเพื่อการรักษาผู้ป่วยมะเร็งอาจใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัด เนื่องจากมีรายงานการศึกษาพบว่าเซลล์เซตินเพิ่มประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัดได้แก่ โทโปทีแคน ไฮโดรคลอไรด์ (topotecan hydrochloride) ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ 1.4 เท่าในเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF-7 และ 1.3 เท่าในเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MAD-MB 231 เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว⁽¹⁵⁾ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเซลล์เซตินน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ในการนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยเซลล์มะเร็งออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ลดปริมาณการใช้ยาเคมีบำบัด ซึ่งมีข้อจำกัดเรื่องความเป็นพิษและการดื้อต่อยาเคมีบำบัดของผู้ป่วย อย่างไรก็ตามการเลือกใช้เซลล์เซตินในการรักษาผู้ป่วยยังคงต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมต่อไป

บทสรุป

ผลการศึกษาพบว่าเซลล์เซตินมีฤทธิ์ต้านการเจริญและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอโทสิสของเซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเซลล์เซตินและเวลาที่เซลล์ได้รับ เซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS ซึ่งมีคุณสมบัติการลุกลามสูงแต่ไม่แพร่กระจายไปอวัยวะข้างเคียง ดังนั้นเซลล์เซตินน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยในระยะที่เซลล์มีพฤติกรรมเทียบเคียงได้กับเซลล์ U2-OS อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการออกฤทธิ์ของเซลล์เซตินต่อการต้านการเจริญและการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอโทสิสของเซลล์ U2-OS เพื่อนำผลมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาผู้ป่วยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนวิจัยและเครื่องมือในการศึกษาวิจัย และขอขอบพระคุณ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ ให้เซลล์ออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ชนิด U2-OS เพื่อการศึกษาวินิจฉัย

เอกสารอ้างอิง

1. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int J Cancer* 2009; 125: 229-234.
2. Ottaviani G., Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. In: *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*. Edited by Norman Jaffe, Oyvind S. Bruland, Stefan Bielack. New York: Springer; 2009. pp. 3-13.
3. Oertel S, Blattmann C, Rieken S, et al. Radiotherapy in the treatment of primary osteosarcoma--a single center experience. *Tumori* 2010; 96: 582-588.
4. Won KY, Lee CH, Kim YW, Park YK. Primary giant-cell-rich osteosarcoma of the urinary bladder: usefulness of osteocalcin and osteonectin immunohistochemical staining and literature review. *Pathology* 2011; 43: 161-164.
5. Bielack SS, Carrle D, Hards J, Schuck A, Paulussen M. Bone tumors in adolescents and young adults. *Curr Treat Options Oncol* 2008; 9: 67-80.
6. Mei Y, Wei D, Liu J. Reversal of multidrug resistance in KB cells with tea polyphenol antioxidant capacity. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 468-473.
7. Muldoon MF, Kritchevsky SB. Flavonoids and heart disease. *BMJ* 1996; 312: 458-459.
8. Taguri T, Tanaka T, Kouno I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 1965-1969.
9. Kang TB, Liang NC. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 1013-1018.
10. Yoshida M, Yamamoto M, Nikaido T. Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* 1992; 52: 6676-6681.
11. Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, et al. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 1990; 260: 10-13.
12. Lee TJ, Kim OH, Kim YH, et al. Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. *Cancer Lett* 2006; 240: 234-242.
13. Granado-Serrano AB, Martin MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Nutr* 2006; 136: 2715-2721.
14. Kuo PC, Liu HF, Chao JI. Survivin and p53 modulate quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 55875-55885.
15. Akbas SH, Timur M, Ozben T. The effect of quercetin on topotecan cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB 231 human breast cancer cells. *J Surg Res* 2005; 125: 49-55.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
17. Berndt K, Campanile C, Muff R, Strehler E, Born W, Fuchs B. Evaluation of quercetin as a potential drug in osteosarcoma treatment. *Anticancer Res* 2013; 33: 1297-1306.

18. Liang W, Li X, Li C, et al. Quercetin-mediated apoptosis via activation of the mitochondrial-dependent pathway in MG-63 osteosarcoma cells. *Mol Med Rep* 2011; 4: 1017-1023.
19. Mohseny AB, Machado I, Cai Y, et al. Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. *Lab Invest* 2011; 91: 1195-1205.
20. Nam TW, Yoo CI, Kim HT, Kwon CH, Park JY, Kim YK. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits migration through a MAPK-dependent mechanism in osteoblasts. *J Bone Miner Metab* 2008; 26: 551-560.
21. Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1995; 5: 21-26.
22. Stadelmann C, Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 2000; 301: 19-31.
23. Haghiaç M, Walle T. Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells. *Nutr Cancer* 2005; 53: 220-231.
24. Psahoulia FH, Drosopoulos KG, Doubravska L, Andera L, Pintzas A. Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 2591-2599.
25. Kim YH, Lee DH, Jeong JH, Guo ZS, Lee YJ. Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: involvement of the ERK signal transduction pathway. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 1946-1958.
26. Zhang JY, Yi T, Liu J, Zhao ZZ, Chen HB. Quercetin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in KB and KBv200 cells. *J Agric Food Chem* 2013; 61: 2188-2195.
27. Men K, Duan X, Wei XW, et al. Nanoparticle-delivered quercetin for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; 14: 826-832.