

ความสามารถในการยับยั้งการดื้อยาแบบหลายขนาน (Multidrug resistance) ของโมเลกุลสกัดจากมะเมี (*Antidesma*) ในเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาชนิด K562/*adr* และ GLC4/*adr*

ชัชชนก เลิศชูตินาถ และ สารี มั่นเขตต์กรณ์

หน่วยวิจัยเคมีฟิสิกส์ ชีววิทยาระดับเซลล์และโมเลกุล

ภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่50200

e-mail: samlee@chiangmai.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเนื้อไม้มะเมีหลวงที่สกัดด้วย 60% เมธานอลด้วยเทคนิค HPLC แล้วทำการแยกสารสกัดหยาบเป็นส่วน ๆ ด้วยเทคนิค Preparative HPLC ด้วยคอลัมน์ชนิด RP ของ Innertsil preparative และชะด้วยตัวชะที่ความเร็ว 1 มิลลิลิตร/นาที โดยเพิ่มปริมาณแบบเป็นสัดส่วนโดยตรงเริ่มจาก 10% CH_3CN ในสารละลาย 3.16 mM HCl จนถึง 40 % CH_3CN เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 40 นาทีโดยเก็บสารได้ 12 กลุ่ม และนำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์นำไปทำแห้งและเก็บในตู้ความคุมความชื้นต่ำเพื่อการศึกษาขั้นต่อไป สารกลุ่มที่มีปริมาณมากพบว่าเป็นสารในกลุ่มแอนติเดสโมน โดยเฉพาะโมเลกุล F4 ถึง F8 สารสกัดหยาบและโมเลกุลทั้ง 12 กลุ่มออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 และมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก GLC4 ที่ไวและดื้อต่อยาหลายขนานโดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ดื้อยาแบบหลายขนานใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไวต่อยา ในช่วงความเข้มข้นในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โมเลกุล F4 ถึง F8 ได้ถูกคัดเลือกเพื่อศึกษาอัตรการ ที่เกิดขึ้นโดยตรงกับโปรตีน P-glycoprotein และ โปรตีน MRP1 โดยการวัดประสิทธิภาพในการยับยั้งการปั๊มยาฟิราลูปีซินออกนอกเซลล์ของโปรตีน และตรวจสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการสูญเสียความสามารถในการทำงานของโปรตีนเนื่องจากถูกจับด้วย EDP 86 (สารอนุพันธ์ของเวราฟามิล) ที่สามารถจับแบบถาวรกับโปรตีน P-glycoprotein ด้วยการฉายรังสียูวี ผลการทดลองพบว่า สาร F4 ถึง F8 สามารถป้องกันโปรตีน P-glycoprotein จากการถูกจับด้วย EDP 86 แบบอ่อน ๆ ใกล้เคียงกับฟลาโวนอยด์ แสดงถึงโมเลกุลเหล่านี้เข้าจับกับ P-glycoprotein ในตำแหน่งจำเพาะที่แตกต่างจาก EDP 86 ผลการทดลองแสดงอย่างชัดเจนว่าโมเลกุล F4 ถึง F8 ถูกรู้จักโดย P-glycoprotein และ MRP1 protein และที่มากกว่านั้นโมเลกุล F4 ถึง F8 สามารถลดระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้อย่างทันทีทันใดหลังจากเติมลงในสารแขวนลอยของเซลล์มีผลทำให้ไมโทคอนเดรียของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาทำงานมากขึ้นจนเป็นสาเหตุให้เกิดสารอนุมูลอิสระภายในไมโทคอนเดรียสูงขึ้น เป็นต้นเหตุของการชักนำเซลล์ให้เข้าสู่กระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส คณะผู้วิจัยเสนอว่ามะเมีเป็นพืชที่มีศักยภาพสูงและเป็นแหล่งวัตถุดิบเพื่อการพัฒนาฯ ถ้าได้รับการศึกษาอย่างลึกซึ้งโมเลกุลที่แยกบริสุทธิ์จากพืชชนิดนี้น่าจะได้รับการพิจารณาเป็นยารักษามะเร็งแบบใหม่ทั้งนี้เนื่องจากโมเลกุลเหล่านี้สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนดื้อยาและชักนำเซลล์ที่ไวและดื้อต่อให้เข้าสู่กระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสได้ใกล้เคียง

คำสำคัญ: Multidrug resistance (MDR), crude extract of mamoa (*Antidesma thwaitesianum* Müell. Arg) wood extracts, apoptosis, P-gp substrates, antioxidant, antidesmone fractions

Multidrug Resistance reversing properties of molecules derived from Mamoa (*antidesma*) in multidrug resistant K562 and GLC4/adr cells

Chatchanok Loetchutinart and Samlee Mankhetkorn

Laboratory of Physical Chemistry, Molecular and Cellular Biology, Department of Radiologic Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University 50200, Thailand; e-mail: samlee@chiangmai.ac.th

Abstract

The chemical composition of Mamoa Laung crude extract obtained by maceration using 60% methanol was analysed by using photodiode array HPLC. The crude extract was purified by using preparative HPLC using RP Innertsil preparative column. The column was eluted by 1 mL.min⁻¹ flow rate, with linear gradient starting with 10 % CH₃CN in 3.16 mM HCl and ending with 40% CH₃CN over 40 minutes. Twelve fractions were obtained then lyophilized and stored in low humidified cabinet until use. The abundant fractions obtained from the preparative column particularly F4 to F8 were antidesmone. The crude extracts and fractions efficiently inhibited cancer cell growth at microgram per mL with similar efficacy in drug-sensitive and –resistant cancer cells. The F4 to F8 were selected for studying their direct interaction with MDR proteins including P-glycoprotein and MRP 1 proteins by measuring the efficiency of the proteins mediated-efflux of pirarubicin out of cells. The ability of F4 and F8 to protect P-glycoprotei from photolabeling of EDP86 was applied for confirming the direct interaction of molecules with the protein. The results showed that all molecules efficiently decreased in the MDR protein function to pump pirarubicin out of cells. The molecules weakly protected P-glycoprotein from photolabeling of EDP 96 signified that the molecules probably bound to P-glycoprotein at different binding site with those of EDP86. The results clearly showed that the F4 to F8 were recognized by both P-glycoprotein and MRP1 protein. In addition, these molecules exhibited intracellular antioxidant activity, once reached at cytoplasm they immediately eliminated the intracellular reactive oxygen species causing the cells to be found in pro-oxidative conditions, triggering an up-regulation of mitochondrial function, the origin of apoptosis induction. We proposed that Mamoa is very high potential raw material for pharmaceutical molecules and the molecules purified from the plant could be considered as high potential anticancer molecules since they can inhibit MDR protein function as well as induced cellular apoptosis of both drug-sensitive and –resistant cells.

Key words: Multidrug resistance (MDR), crude extract of mamoa (*Antidesma thwaitesianum* Müell. Arg) wood extracts, apoptosis, P-gp substrates, antioxidant, antidesmone fractions