

โปรตีนต้านเซลล์มะเร็งจากมะระจีนที่พบในประเทศไทย

Anticancer Protein from Bitter Melon Cultivated in Thailand

ฤทธิ์ วัฒนชัยยิ่งเจริญ¹, วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์^{2*}

Rith Watthanachaiyingcharoen¹, Wichet Leelamanita^{2*}

Received: 27 March 2009 Accepted: 12 May 2009

บทคัดย่อ

การศึกษาโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดมะระจีน (*Momordica charantia* L.) ที่เพาะปลูกในประเทศไทย จะประกอบด้วยโปรตีนที่มีขนาดต่างๆ กัน ซึ่งมีโปรตีนที่เป็นโปรตีนหลักได้แก่ โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 30 kDa เมื่อนำไปแยกด้วย Resource S และตามด้วย Superdex 200 HR10/30 โดยใช้เครื่อง Fast Protein Liquid Chromatography และศึกษาคุณสมบัติต่างๆ พบว่า โปรตีนที่มีขนาด 30 kDa นี้จะเป็นไกลโคโปรตีน ที่มีค่า Isoelectric point (pI) มากกว่า 8.4 ซึ่งเมื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งด้วยเซลล์ L929 (mouse fibroblasts) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยจะยับยั้งเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการ apoptosis ด้วยการวิเคราะห์การแตกสลายของ DNA และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์

คำสำคัญ: มะระจีน อะพอพอโทซิส โปรตีนต้านมะเร็ง

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2552; 5(1): 82-90

Abstract

Protein extraction from bitter melon (*Momordica charantia* L.) cultivated in Thailand composed of amount of different proteins. The major protein was 30 kDa in size. For this study, we purified the proteins by using Resource S (ion exchange column) and following by Superdex 200 HR10/30 (gel filtration) equipped with an FPLC apparatus. They were glycoproteins with Isoelectric point (pI)>8.4 and molecular weights of approximately 30 kDa. Both possessed potent anticancer activity against L929 (mouse fibroblasts) at the IC₅₀ of 1.7 µg/ml possibly via apoptotic pathways determined by DNA fragmentation and cells' morphology change methods.

Keywords: Bitter melon, *Momordica charantia*, Apoptosis, Anticancer protein

IJPS 2009; 5(1): 82-90

¹ ปร.ด. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
Ph.D., Assistant Professor, Biopharmaceutical, Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

² ปร.ด. ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
Ph.D., Assistant Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

* Corresponding author: Wichet Leelamanita, Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Phayathai, Bangkok 10400 Tel. +66 2 6448677-91 Fax. +66 2 6448693 E-mail: pywit@mahidol.ac.th

บทนำ

มะระจีนเป็นพืชอาหารและพืชสมุนไพร ที่มีการเพาะปลูกในประเทศทางเขตร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทย มะระถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรในการเตรียมเป็นยาพื้นบ้าน ทั้งเพื่อการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคไขข้ออักเสบ โรคกระเพาะอาหารอักเสบ อีกทั้งยังมีผลกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และควบคุมระบบน้ำตาลในเลือดตลอดจนการควบคุมไขมันต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งมีการทดลองในหนูทดลองด้วยการกระตุ้นให้มีระดับกลูโคสในเลือดสูง แล้วจึงให้สารสกัดด้วยเมทานอลจากมะระ พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ช่วยรักษาสมดุลของกลูโคสให้อยู่ในสภาวะปกติ ช่วยลดระดับ triglyceride และลดระดับ LDL และเพิ่มระดับ HDL ในหนูทดลองที่กระตุ้นให้เกิดโรคเบาหวาน (Ahmed et al., 2001; Chaturvedi et al., 2004; Chaturvedi, 2005) และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบของกระเพาะอาหารในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย indomethacin (Dengiz et al., 2005) รวมถึงที่มีสาเหตุจาก *Helicobacter pylori* (Yesilada et al., 1999) ส่วนการศึกษาสารสกัดโปรตีนจากเมล็ดมะระพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งต่างๆ เช่น promyelocytic leukemia (HL-60) (Kim et al., 2002) และ human bladder carcinoma (Battelli et al., 1996) ด้วยกลไกการเกิดกระบวนการ apoptosis ในเซลล์มะเร็งเหล่านี้ และยังพบว่า โปรตีนกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านไวรัสชนิดต่างๆ ด้วย เช่น HIV (Huang et al., 1995) เป็นต้น

จากการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่สกัดได้นี้พบว่า มีโปรตีนในกลุ่ม ribosome-inactivating proteins ในปริมาณมาก และยังประกอบด้วยโปรตีนในกลุ่มอื่นๆ อีกหลายชนิด เป็นต้น โปรตีนที่สำคัญและมีปริมาณมากซึ่งแยกได้จากเมล็ดมะระ คือ MAP30 (Bourinbaier et al., 1996), charantin (Parkash et al., 2002), alpha momorcharin (Ng et al., 1994), gamma-momorcharin (Pu et al., 1996), momordin a (Yoshinobu et al., 1991) และ b เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ peroxidase (MCP) ซึ่งสกัดได้จากผลมะระ มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบผ่านการขัดขวางการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Ou et al., 2003) ด้วย จากการศึกษาครั้งนี้จะแยกโปรตีนจากเมล็ดมะระเพื่อศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ และหาระดับความเข้มข้นในการยับยั้งเซลล์ ตลอดจนถึงติดตามกลไก

การทำลายเซลล์เหล่านี้ เพื่อจะพัฒนาสืบเนื่องต่อไปในการศึกษาการยับยั้งเซลล์มะเร็งและใช้เป็นยาต้านมะเร็งต่อไปอีกด้วย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุและเครื่องมือ

1.1 เมล็ดมะระจีน (*Momordica charantia* L.) สุกจากสวนในจังหวัดนนทบุรี ในระหว่างเดือนมกราคม-พฤษภาคม 2544

1.2 เซลล์ L929 (mouse fibroblasts)

1.3 สารเคมี ได้แก่ Polyacrylamide gel, ethidium bromide, disodium hydrogen phosphate, sodium acetate, Tris-HCl, NaCl และ EDTA เป็นชนิด AR grade ส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM, fetal bovine serum, bovine serum albumin (BSA) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide], Hoechst® dye 33342, Coomassie blue และสารละลาย Periodic Acid Schiff's reagent (PAS) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. การสกัดโปรตีนจากเมล็ดมะระ

แยกเอาเมล็ดมะระที่แก่หรือสุก และนำมาสกัดด้วยสารละลาย 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.3 ที่ผสมด้วย 0.15 M NaCl (Buffer A) ในอัตราส่วน 1 g เมล็ดต่อสารละลาย 2 mL นำไปปั่นบดผสมให้เข้ากันด้วย homogenizer นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C และนำไปปั่นผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 4°C ต่อมา 1 ชั่วโมง กรองแยกเอาเฉพาะสารละลายผ่านผ้าขาวบางและ centrifuge ที่ 12,000 xg นาน 10 นาที นำสารละลายใสส่วนบนที่ได้ไปผ่านกระบวนการ dialysis เพื่อแยกเอาสารละลายเกลือและโปรตีนขนาดเล็กออกจากสารละลาย ในสารละลาย 10 mM acetate buffer pH 4.5 (Buffer B) และนำสารละลายที่ได้ไปแยกด้วยเครื่อง FPLC

3. การแยกโปรตีนด้วย FPLC (Fast proteins liquid chromatography) (Amersham pharmacia, USA)

นำสารละลายโปรตีนที่สกัดได้มาแยกต่อด้วยเครื่อง FPLC โดยใช้ cationic-exchange column หรือ

Resource™ S ด้วยการเพิ่มปริมาณสารละลายของ 0.5 M NaCl จาก 0 - 100% ในสารละลาย 10 mM acetate buffer pH 4.5 ซึ่งตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยแสงที่มีความยาวคลื่น 280 nm และเก็บสารละลายโปรตีนที่ได้ในแต่ละช่วงปริมาณ 1 mL จากนั้นนำสารละลายที่มีความสูงของกราฟ (peak) ไปแยกต่อด้วยการแยกตามขนาดหรือ gel filtration โดยใช้ Superdex™ 200 HR 10/30 ในสารละลาย 10 mM acetate buffer pH 4.5 เก็บสารละลายที่มีปริมาณโปรตีนสูงตามกราฟด้วยชุดเก็บสารละลาย Fraction collector

4. การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของสารละลายโปรตีน

4.1 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย

Bradford micro-assay

นำสารละลายโปรตีนที่แยกได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณใน 96 micro-well plates โดยนำสารละลายโปรตีนมาทำให้เจือจางแบบลำดับชั้นในอัตราส่วน 1:10 โดยใช้ BSA เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐานเปรียบเทียบด้วยการสร้างสีกับสารละลาย Bradford และนำไปวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงด้วยที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (Bio-Rad, USA, model 3600)

4.2 การวิเคราะห์มวลโมเลกุล (molecular weight) และคุณสมบัติการเป็นไกลโคโปรตีน (glycoproteins)

นำสารละลายโปรตีนที่แยกได้มาวิเคราะห์หาขนาดมวลโมเลกุล และไกลโคโปรตีน โดยวิธี SDS-PAGE electrophoresis (BioRad, USA) ด้วยการเตรียมชุดแยกโปรตีนด้วยอีเลกโตรโฟรีซิสแนวตั้งให้มีความเข้มข้นของแผ่นโพลีอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide) 12% SDS-PAGE ที่กระแสไฟฟ้าคงที่ 70 โวลท์ นาน 1.5 ชั่วโมงหรือ 16.5% SDS-PAGE ที่ 10 mA นาน 10-12 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายโปรตีนเปรียบเทียบสารละลายโปรตีนมาตรฐานจำนวน 2 ชุด และเมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าแล้ว นำแผ่นโพลีอะคริลาไมด์มาตัดแบ่งตัวอย่างทั้ง 2 ชุดออกจากกันและนำไปย้อมด้วยสารละลาย Coomassie blue 1 ชุด ส่วนชุดที่ 2 นำไปย้อมด้วยสารละลาย Periodic Acid Schiff's reagent (PAS) เมื่อย้อมสีทั้งสองชนิดแล้วนำแผ่นโพลีอะคริลาไมด์ทั้งสอง

มาเทียบกัน เพื่อให้ทราบถึงขนาดของไกลโคโปรตีนและทราบถึงมวลโมเลกุลของโปรตีนนั้นด้วย

4.3 การวิเคราะห์ Isoelectric focusing electrophoresis (IEF) หรือค่า pI (Isoelectric point) ของโปรตีนด้วยเครื่อง PhastSystem™ (Amersham pharmacia, USA)

นำสารละลายโปรตีนที่แยกได้มาวิเคราะห์ค่า pI ของโปรตีน ด้วยการใช้แผ่นโพลีอะคริลาไมด์สำเร็จรูปแบบ IEF 3-9 ซึ่งใช้สำหรับวิเคราะห์ค่า pI นำไปติดตั้งบนด้วยเครื่อง PhastSystem™ และหยดใส่สารละลายด้วยชุดใส่สารละลายโปรตีนเทียบกับสารละลายมาตรฐาน และเปิดเครื่องให้กระแสไฟฟ้าผ่านเพื่อแยกตามค่า Iso-electric focusing ของโปรตีน

4.4 การตรวจวิเคราะห์ความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดสอบ คือ L929 (mouse fibroblasts) เติมสารละลายเซลล์ลงใน 96 micro-well plates ให้มีความเข้มข้นของเซลล์ 2.0×10^5 เซลล์/หลุม (100 μ L) และนำไปบ่มเพาะในตู้ CO₂ incubator (Contherm, New Zealand) ที่มี CO₂ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อเซลล์เกาะติดแล้วให้เติมสารละลายโปรตีนที่ใช้ทดสอบ ซึ่งมีการเจือจางลำดับชั้นในอัตราส่วน 1:10 ลงไปปริมาณ 50 μ L และนำไปบ่มเพาะต่อในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง ทำการย้อมสี MTT (Mosmann, 1983; Nishimura et al., 2007) โดยเติมสารละลาย MTT (1 μ g/mL) ปริมาณ 50 μ L บ่มเพาะต่อในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3-5 ชั่วโมง และทำการตรวจวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่ทำให้เซลล์ตาย 50%

4.5 การตรวจวิเคราะห์กลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการย้อมสี

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดสอบคือ L929 (mouse fibroblasts) เติมสารละลายเซลล์ลงใน 24 microwell plates โดยให้มีความเข้มข้นของเซลล์ 2.5×10^5 เซลล์/หลุม และนำไปบ่มเพาะในตู้ CO₂ incubator ที่มี CO₂ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง จำนวน 2 ชุด เมื่อเซลล์เกาะติดแล้วให้เติมสารละลาย

โปรตีนที่ใช้ทดสอบในระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% และนำไปบ่มเพาะต่อในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12 และ 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยง แบ่ง 1 ชุด มาย้อมด้วยสารละลายสี Hoechst® dye 33342 (Kim et al., 2008; Wu et al., 2004) (1 µg/mL ของ bisbenzimidazole dye ในสารละลาย Hank's balanced salt) และนำไปบ่มเพาะต่อในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที ส่วนอีกชุดหนึ่งจะย้อมด้วย ethidium bromide โดยเติมเอทานอลและนำไปแช่ที่ -20°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย RNase (10 µg/mL) นาน 30 นาที ย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide (Jerome et al., 2000) (10 µg/mL) นาน 5 นาที และล้างด้วยสารละลาย phosphate buffer pH 6.3 ก่อนนำเซลล์ที่ย้อมสีทั้งสองชุดไปตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence และถ่ายภาพการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

4.6 การตรวจวิเคราะห์กลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งด้วยกระบวนการ Apoptosis

เป็นวิธีการวิเคราะห์เพื่อดูการเกิดกระบวนการแตกสลายของสารพันธุกรรม (DNA fragmentation) (Mullauer et al., 2009; Zhang et al., 2004) เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดสอบคือ L929 (mouse fibroblasts) เติมสารละลายเซลล์ลงใน 6 micro-well plates โดยให้มีความเข้มข้นของเซลล์ 6.0×10^6 เซลล์/หลุม และนำไปบ่มเพาะในตู้ CO₂ incubator ที่มี CO₂ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อเซลล์เกาะติดแล้วให้เติมสารละลายโปรตีนที่ใช้ทดสอบในระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายมากกว่า 50% และนำไปบ่มเพาะต่อในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12 และ 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงล้างเก็บเซลล์ด้วยสารละลาย phosphate buffer pH 6.3 มา centrifuge ที่ 10,000 xg นาน 5 นาที และนำมาย่อยด้วยสารละลาย lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl and 10 mM EDTA) และ RNase (10 µg/mL) ที่ 50°C นาน 2 ชั่วโมง เติมสารละลาย proteinase K (20 µg/mL) นำสารละลายเซลล์ที่ได้มาสกัดด้วยสารละลาย chloroform/isoamyl alcohol (ในอัตราส่วน 24:1, v/v) 600 µL และ centrifuge แยกเอาสารละลายใสส่วนบนที่ 10,000 xg

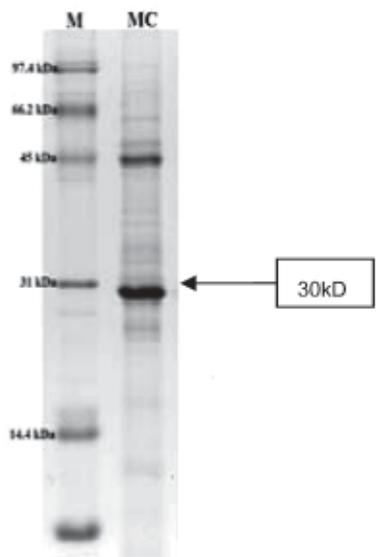
นาน 5 นาที จากนั้นนำไปแยก DNA บน 2% agarose gel electrophoresis (BioRad, USA) ที่ 100 V นาน 2 ชั่วโมง และย้อมด้วย ethidium bromide นาน 5 นาที แล้วนำไปถ่ายภาพแผ่น agarose gel ภายใตแสงอัลตราไวโอเล็ต

ผลการศึกษาวิจัย

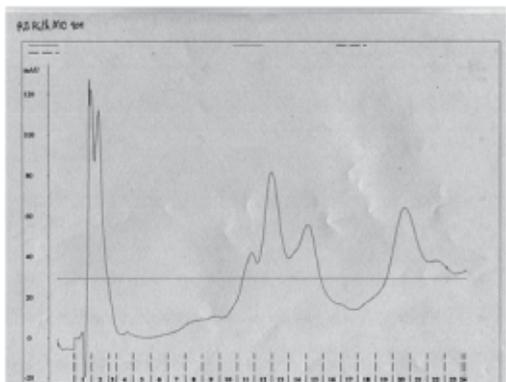
จากภาพ SDS-PAGE electrophoresis ของสารละลายโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดมะระจีน (รูปที่ 1) จะเห็นได้ว่า มีโปรตีนขนาดแตกต่างกันอย่างมาก และมีโปรตีนหลักที่สำคัญได้แก่ โปรตีนที่มีขนาด 30 kDa และโปรตีนขนาด 45 kDa และเมื่อแยกสารละลายโปรตีนโดยใช้ cationic-exchange column chromatography ทำให้ได้กราฟแสดงโปรตีนในแต่ละช่วงที่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 2 ซึ่งจะเห็นได้ว่า โปรตีนที่ fraction ที่ 13 มีความเข้มข้นสูงสุด ซึ่งจะนำไปแยกต่อด้วย Gel filtration ด้วย Superdex™ 200 HR 10/30 เพื่อแยกโปรตีนในสารละลายตามมวลโมเลกุลของโปรตีนนั้น ซึ่งเมื่อแยกผ่านแล้วได้สารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ดังรูปที่ 3

เมื่อนำสารละลายโปรตีนที่ได้มาทำการศึกษาคูณสมบัติต่างๆ พบว่า โปรตีนนี้มีขนาดประมาณ 30 kDa และมีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนด้วยการเกิดสีแดงเมื่อย้อมด้วย Periodic Acid Schiff's reagent (PAS) (Cadot et al., 2006) และนำไปวิเคราะห์หาค่า pI ด้วย PhastSystem™ ได้ค่ามากกว่า 8.4 เมื่อเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งเมื่อนำไปศึกษาการยับยั้งเซลล์ L929 (mouse fibroblasts) โดยวิธี MTT จะได้ค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% เท่ากับ 1.7 µg/mL และตรวจสอบกระบวนการยับยั้งเซลล์นี้ด้วยกลไกการเกิด apoptosis จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ L929 เป็นเซลล์กลุ่ม fibroblast ซึ่งในสภาวะปกติจะมีลักษณะยาวคล้ายกระสวย เมื่อสัมผัสหรือรับเอาสารละลายโปรตีนเข้าสู่เซลล์ทำให้เกิดการหดตัวสั้นลง และมีการหดเข้าของผนังเซลล์ (bebbing) ที่เป็นขั้นตอนหนึ่งของการตายแบบ apoptosis (Meshkini et al., 2009; Tavakkol-Afshari et al., 2008) ดังรูปที่ 4

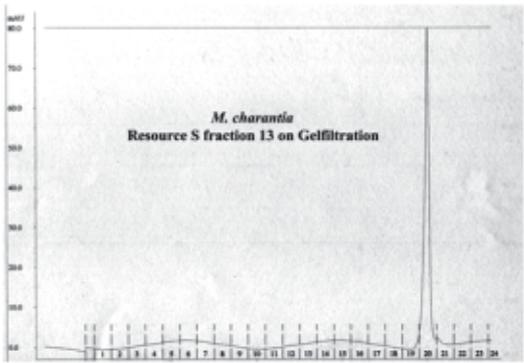
ส่วนเซลล์ที่ย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งจะมีการเข้าเกาะและจับตัวกับ DNA ของ ethidium bromide ซึ่งเป็นสารที่เรืองแสง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence จะมีการเรืองแสงสีแดงของสารพันธุกรรม



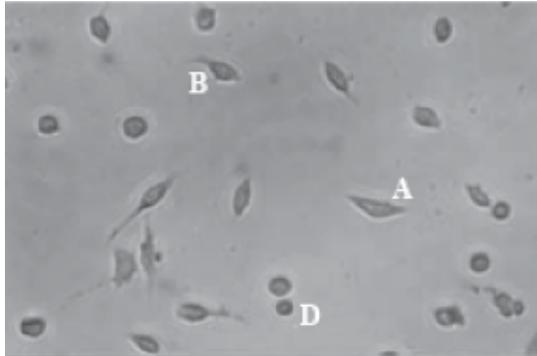
รูปที่ 1 โปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดมะระจีน
M = โปรตีนมาตรฐาน MC = โปรตีนสกัดจากเมล็ดมะระจีน (16.5% SDS-PAGE)



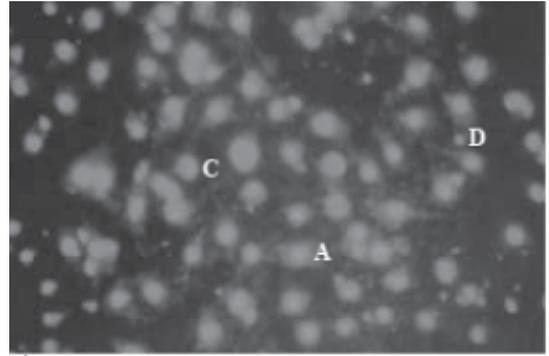
รูปที่ 2 แสดงการแยกโปรตีนที่แยกด้วย cationic-exchange column chromatography



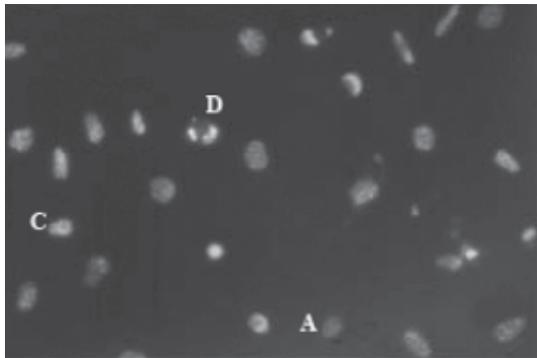
รูปที่ 3 แสดงการแยกโปรตีนด้วย Gel filtration chromatography



รูปที่ 4 การเกิด apoptosis โดยเซลล์จะหดตัวลง (100X) apoptosis (100X) (A = เซลล์ปกติ, B = เซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง, D = apoptotic body)



รูปที่ 5 การย้อมสีด้วย ethidium bromide ดูเซลล์ (A = เซลล์ปกติ, C = เซลล์ที่เกิด chromatin condensation, D = apoptotic body)



รูปที่ 6 การย้อมสีด้วย Hoechst® dye 33342 ดูเซลล์ apoptosis (100X) (A = เซลล์ปกติ, C = เซลล์ที่เกิด chromatin condensation, D = apoptotic body)



รูปที่ 7 การเกิด DNA fragmentation ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

หรือโครโมโซมในนิวเคลียสชัดเจนขึ้น เนื่องจากการลดตัวสั้นลง ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการ apoptosis และบางเซลล์มีการแตกสลายตัว เป็นชิ้นขนาดเล็กของสายโครโมโซม ดังรูปที่ 5 และรูปที่ 6 เป็นรูปนิวเคลียสของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงในส่วนของโครโมโซมจากเซลล์ที่ย้อมติดสีไม่ชัดเจน เนื่องจากสายโครโมโซมในสภาพปกติจะมีการคลายตัวเป็นสายยาว ซึ่งสี Hoechst เกาะอยู่กับ DNA ที่มีการคลายตัวออกจึงทำให้เห็นการเรืองแสงของสี Hoechst ต่ำ เมื่อเซลล์เข้าสู่กระบวนการ apoptosis จะเกิดการหดตัวเป็นโครโมโซมจึงทำให้เกิดเป็นกลุ่มก้อนของสีที่มีการเรืองแสงสว่างขึ้น และเมื่อมีการแตกสลายของสายพันธุกรรมหรือโครโมโซม จะเห็นเป็นกลุ่มของสารพันธุกรรมขนาดเล็กๆ แยกออกจากกัน นอกจากนั้นการวิเคราะห์ด้วยวิธีการตรวจการแตกสลาย

ของสายพันธุกรรมด้วยวิธี DNA fragmentation นั้น จะพบการเกิดลักษณะที่เรียกว่า DNA Ladder (Lopez et al., 2002) ซึ่งเกิดจากการแตกเป็นชิ้นหรือสาย DNA ที่มีขนาดสั้นๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการ apoptosis ดังรูปที่ 7

อภิปรายผลและสรุป

การสกัดโปรตีนจากเมล็ดมะระจีนทำให้ได้โปรตีนต่างๆ จากเมล็ดสุกของมะระ ด้วยการใส่สารละลาย 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.3 ซึ่งเมื่อนำไปใช้ในการแยกโปรตีนตามคุณสมบัติความเป็นกรด-ด่างของโปรตีน หรือประจุของโปรตีนนั้นด้วย cationic-exchange column chromatography ซึ่งสามารถจับโปรตีนที่มีประจุบวกไว้ได้ และเมื่อให้ปริมาณ 0.5 M NaCl

เพิ่มมากขึ้นในระบบ จะทำให้สามารถแยกโปรตีนตามปริมาณประจุบนโปรตีนและเกิดการแยกโปรตีนที่มีประจุต่างกันออกจากกันได้ โดยพบว่าใน fraction ที่ 13 (รูปที่ 2) มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด และเมื่อนำไปผ่าน Gel filtration column chromatography โดยอาศัยคุณสมบัติของโปรตีนตามความแตกต่างของมวลโมเลกุลโปรตีนแต่ละชนิด ทำให้เห็นได้ว่า มีโปรตีนเพียงชนิดเดียวในสารละลายนั้นดังรูปที่ 2 ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรตีนนั้นพบว่า เป็นไกลโคโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลขนาด 30 kDa และมีค่า $pI > 8.4$ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของโปรตีนในกลุ่ม ribosome inactivating proteins (Barbieri et al., 1993) ดังนั้นโปรตีนที่ได้จากการสกัดแยกดังที่กล่าวมาแล้ว น่าจะเป็นโปรตีนในกลุ่ม ribosome inactivating proteins ด้วย

การศึกษาความเป็นพิษของโปรตีนที่สกัดแยกได้จากเมล็ดมะระต่อเซลล์ L929 เพื่อหาค่าเข้มข้นของโปรตีนที่ทำให้เซลล์ตาย 50% โดยมีค่าเท่ากับ 1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จากค่าดังกล่าวทำให้ทราบว่า สารละลายโปรตีนนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ L929 ได้ดีทั้งที่ใช้ความเข้มข้นของโปรตีนในระดับต่ำเพียงระดับไมโครกรัมเท่านั้น แต่เมื่อศึกษากลไกการตายของเซลล์จากการสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงรูปร่างพบว่า เซลล์บางส่วนเข้าสู่กระบวนการตายแบบ apoptosis และเมื่อทำการย้อมสีเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พบว่า มีการเกิดขึ้นตอนหดตัวของสายโครโมโซมที่เรียกว่า DNA condensation (Nadova et al., 2008) ซึ่งสังเกตเห็นได้จากการย้อมสีที่เรืองแสงของโครโมโซมรูปที่ 5 และรูปที่ 6 นอกจากนี้ยังพบว่า เซลล์ L929 เข้าสู่กระบวนการตายแบบ apoptosis จากการรับโปรตีน จากการที่เซลล์บางเซลล์เกิดการแตกของโครโมโซมออกเป็นชิ้นเล็กๆ และเกิด apoptotic body (Yang et al., 2006) ซึ่งจะทำให้การตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันการตายของเซลล์ด้วยกระบวนการ apoptosis จากการเกิด DNA fragmentation ในการแยกด้วย agarose gel electrophoresis (Xiao et al., 2008)

จากการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่า ไกลโคโปรตีนที่แยกได้จากเมล็ดมะระจีน ซึ่งมีขนาด 30 kDa และมี pI มากกว่า 8.4 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ L929 โดยผ่านกระบวนการตายแบบ apoptosis ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการนำโปรตีนนี้ไปศึกษาและพัฒนาเป็น

สารต้านเนื้องอกหรือเซลล์มะเร็งทดแทนการฉายาที่เป็นสารเคมี ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายและลดการทำเข้ายาที่เป็นสารเคมีจากต่างประเทศเพื่อมาใช้ในการรักษาโรคนี้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Ahmed I, Lakhani MS, Gillett M, et al. Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of anti-diabetic *Momordica charantia* (Karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res. Clin. Pract* 2001; 51(3): p.155–161.
- Barbieri L, Battelli MG, Stripe F. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993; 1154: p.237–282.
- Battelli MG, Polito L, Bolognesi A, et al. Toxicity of ribosome-inactivating proteins-containing immunotoxins to a human bladder carcinoma cell line. *Int J Cancer* 1996; 65(4): p.485–490.
- Bourinbaier AS, Lee-Huang S. The activity of plant-derived antiretroviral proteins MAP30 and GAP31 against herpes simplex virus in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219(3): p.923–929.
- Bolognesi A, Tazzari PL, Olivieri F, et al. Induction of apoptosis by ribosome-inactivating proteins and related immunotoxins. *Int J Cancer* 1996; 68(3): p.349–355.
- Cadot Y, Miñana-Castelló MT, Chevalier M. Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during fruit development. *J Agric Food Chem* 2006; 54(24): p.9206–9215.
- Chaturvedi P, George S, Milinganyo M, et al. Effect of *Momordica charantia* on lipid profile and oral glucose tolerance in diabetic rats. *Phytother Res* 2004; 18(11): p.954–956.

- Dengiz GO, Gursan N. *Effects of Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) on indomethacin-induced ulcer model in rats. *Turk J Gastroenterol* 2005; 16(2): p.85-88.
- Fong WP, Poon YT, Wong TM, et al. A highly efficient procedure for purifying the ribosome-inactivating proteins α - and β -momorcharins from *Momordica charantia* seeds, N-terminal sequence comparison and establishing of their N-glycosidase activity. *Life Sci* 1996; 59(11): p.901-909.
- Hwang YYH, Lee JJW, Hahm EER, et al. Momordin I, an inhibitor of AP-1, suppressed osteoclastogenesis through inhibition of NF-kappaB and AP-1 and also reduced osteoclast activity and survival. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337(3): p.815-823.
- Jerome KR, Chen Z. Apoptosis in HL-60 Cells and Topoisomerase I In Vivo. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(6): p.802-803.
- Kim JB, Ko E, Han W, et al. Berberine diminishes the side population and ABCG2 transporter expression in MCF-7 breast cancer cells. *Planta Med* 2008; 74(14): p.1693-1700.
- Kim JH, Ju EM, Lee DK, et al. Induction of apoptosis by momordin I in promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Anticancer Res* 2002; 22(3): p.1885-1889.
- Lee-Huang S, Huang PL, Chen HC, et al. Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon. *Gene* 1995; p.151-156.
- Lopez L, Villavicencio MA, Albores A, et al. *Cupressus Lusitanica* (Cupressaceae) leaf extract induces apoptosis in cancer cells. *J Ethnopharmacol* 2004; 80(2-3): p.115-120.
- Meshkini A, Yazdanparast R, Haidari M. Differentiation and Apoptosis of U-937 Leukemia Cells by an Active Compound from *Dendrostellera lessertii*. *Iran Biomed J* 2009; 13(1): p.35-42.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: p.55-63.
- Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP. Betulinic acid induces cytochrome c release and apoptosis in a Bax/Bak-independent, permeability transition pore dependent fashion. *Apoptosis* 2009; 14(2): p.191-202.
- Nadova S, Miadokova E, Alfoldiova L, et al. Potential antioxidant activity, cytotoxic and apoptosis-inducing effects of *Chelidonium majus* L. extract on leukemia cells. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29(5): p.649-652.
- Nielsen K, Boston RS. Ribosome-inactivating protein: A plants perspective. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; 52: p.785-816.
- Nishimura R, Tabata K, Arakawa M, et al. Isobavachalcone, a chalcone constituent of *Angelica keiskei*, induces apoptosis in neuroblastoma. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(10): p.1878-1883.
- Ng TB, Liu WK, Sze SF, et al. Action of alpha-momorcharin, a ribosome inactivating protein, on cultured tumor cell lines. *Gen-Pharmacol* 1994; 25(1): p.75-77.
- Ou L, Kong LY, Zhang XM, et al. Oxidation of Ferulic Acid by *Momordica charantia* Peroxidase and Related Anti-inflammation Activity Changes. *Biol Pharm Bull* 2003; 26, p.1511-1516.
- Parkash A, Ng TB, Tso WW. Purification and characterization of charantin, a napin-like ribosome-inactivating peptide from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds. *J Peptide Res* 2002; 59: p.197-202.

- Pu Z, Lu BY, Liu WY, et al. Characterization of the enzymatic mechanism of gamma-momorcharin, a novel ribosome-inactivating protein with lower molecular weight of 11,500 purified from the seeds of bitter melon (*Momordica charantia*). *Biochem-Biophys-Res-Commun* 1996; 229(1): p.287-294.
- Tavakkol-Afshari J, Brook A, Mousavi SH. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(11): p.3443-3447.
- Tse PMF, Ng TB, Fong WP, et al. New ribosome-inactivating proteins from seeds and fruits of the bitter melon *Momordica charantia*. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 895-901.
- Wang H, Ng TB. Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds: sequence comparison with related proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 253(1): p.143-146.
- Wu CA, Yang YW. Induction of cell death by saponin and antigen delivery. *Pharm Res* 2004; 21(2): p.271-277.
- Xiao Y, Yang FQ, Li SP, et al. Essential oil of *Curcuma wenyujin* induces apoptosis in human hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14(27): p.4309-4318.
- Yang ZG, Sun HX, Ye YP. 2006. Ginsenoside Rd from *Panax notoginseng* is cytotoxic towards HeLa cancer cells and induces apoptosis. *Chem Biodivers* 3(2): p.187-197.
- Yoshinobu K, Yuji M, Toshihiko T, et al. 1991; Primary Structures of N-Linked Oligosaccharides of Momordin-a, a Ribosome-inactivating Protein from *Momordica charantia* Seeds (Biological Chemistry). *Agricultural and Biological Chemistry* 55(8): p.2031-2036.
- Zhang Q, Wu J, Hu Z, et al. 2004. Induction of HL-60 apoptosis by ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* fungal mycelium. *Life Sci* 75: p.2911-2919.