

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ
เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไวและดื้อต่อยาของสารสกัดผลสมอพิเภก

Anti-proliferative activity on drug-sensitive and drug-resistant erythroleukemic cells of Samor Pipek
(*Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb.) fruit extracts

■ วินิจ ช้อยประเสริฐ* วัชรารภรณ์ คำแสน พิมพชนก มาละแซม บาจรีย์ พิทาคำ
Winit Choiprasert* Watcharaporn Khumsan Pimchanok Malasaem Bajaree Phithakham

ภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

Department of Radiologic Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

* ผู้รับผิดชอบบทความ (Email: kpqgf@hotmail.com)

* Corresponding author (Email: kpqgf@hotmail.com)

Received December 2016

Accepted as revised January 2017

Abstract

Introduction: Cancer is a major cause of death in Thailand. Drug resistance in cancer is a significant obstacle to the success of chemotherapy in cancer. There are several researches indicate the potential of herb in the inhibition of cancer cell proliferation for applying in cancer treatment.

Objectives: To study anti-proliferative activity of Samor Pipek (*Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb.) fruit extracts against drug-sensitive and drug-resistant erythroleukemic cells.

Materials and methods: Samor Pipek fruits were extracted with acetonitrile, ethanol, and water. Anti-proliferative activity on drug-sensitive and drug-resistant erythroleukemic cells were determined by flow cytometer.

Results: Concentration of acetonitrile, ethanol and water extracts for inhibiting drug-sensitive erythroleukemic cell proliferation by 50% (IC₅₀) were 24.70±8.05 µg/mL, 24.02±2.51 µg/mL and 13.09±3.40 µg/mL, respectively. IC₅₀ of acetonitrile, ethanol and water extracts to inhibit drug-resistant erythroleukemic cell proliferation were 13.95±2.50 µg/mL, 20.45±10.10 µg/mL and 27.39±7.16 µg/mL, respectively. The resistance values of acetonitrile, ethanol and water extracts were 0.56, 0.85 and 2.09, respectively.

Conclusion: Acetonitrile, ethanol and water extracts could inhibit drug-sensitive and drug-resistant erythroleukemic cell proliferation in µg/mL range.

Journal of Associated Medical Sciences 2017; 50(1): 64-70. Doi: 10.14456/jams.2017.6

Keywords: Samor Pipek, erythroleukemic cell, K562, drug resistance.

บทคัดย่อ

บทนำ: มะเร็งเป็นสาเหตุการตายของประชากรไทยอันดับต้นๆ ปัญหาหลักในการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีเคมีบำบัดไม่ได้ผลคือการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง มีรายงานวิจัยหลายฉบับแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและอาจใช้รักษาโรคมะเร็งได้

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไวและดื้อยาของสารสกัดผลสมอพิเภก

วิธีการศึกษา: เตรียมสารสกัดผลสมอพิเภก โดยการสกัดด้วยอะซิโตน ไตรคล อีทานอล และน้ำ ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไว (K562) และดื้อยาดอกโซรูบิซิน (K562/adr) ของสารสกัดผลสมอพิเภกด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์

ผลการศึกษา: พบว่าค่าความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไวต่อยาดอกโซรูบิซินที่ร้อยละ 50 ของสารสกัดผลสมอพิเภกด้วยอะซิโตน ไตรคล อีทานอล และน้ำเท่ากับ 24.70 ± 8.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 24.02 ± 2.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 13.09 ± 3.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ดื้อยาดอกโซรูบิซินที่ร้อยละ 50 ของสารสกัดผลสมอพิเภกด้วยอะซิโตน ไตรคล อีทานอล และน้ำเท่ากับ 13.95 ± 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 20.45 ± 10.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 27.39 ± 7.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าปัจจัยในการดื้อยา (resistance factor; RF) ของเซลล์มะเร็งของสารสกัดผลสมอพิเภกด้วยอะซิโตน ไตรคล อีทานอล และน้ำเท่ากับ 0.56, 0.85 และ 2.09 ตามลำดับ

สรุปผลการศึกษา: สารสกัดผลสมอพิเภกด้วยอะซิโตน ไตรคล อีทานอล และน้ำ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไวและดื้อยาดอกโซรูบิซินในระดับไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Journal of Associated Medical Sciences 2560; 50(1): 64-70. Doi: 10.14456/jams.2017.6

คำสำคัญ: สมอพิเภก มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 การดื้อยา

บทนำ

มะเร็งเป็นสาเหตุการตายของประชากรไทยเป็นอันดับต้นๆ ปัจจุบันการรักษามะเร็งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การผ่าตัด รังสีรักษา และเคมีบำบัด เป็นต้น การรักษา มะเร็งที่เกี่ยวข้องกับระบบหมุนเวียน (systemic system) ด้วยวิธีเคมีบำบัดมักพบปัญหาจากการดื้อยา และเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้การรักษา มะเร็งด้วยเคมีบำบัดมีประสิทธิภาพต่ำหรือไม่ได้ผล การดื้อยาของเซลล์มะเร็งสามารถแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ การดื้อยาโดยธรรมชาติ (intrinsic) เป็นการดื้อยาโดยธรรมชาติของมะเร็ง และการดื้อแบบหลายขนาน (acquired resistance or multidrug resistance, MDR) คือ เซลล์มะเร็งพัฒนาการดื้อยาที่เคยตอบสนองในเบื้องต้นหลังจากให้ยาติดต่อกัน¹⁻³ การดื้อยาคือเป็นกระบวนการป้องกันตัวเองของเซลล์ดื้อยาหรือสิ่งแปลกปลอมที่เป็นพิษ เป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อนมาก ในการเกิด MDR

จะพบปรากฏการณ์ต่างๆ เช่น 1) ปริมาณการสะสมของยาภายในเซลล์ลดลง⁴ 2) มีการเปลี่ยนแปลงพลังงานภายในเซลล์⁵ 3) มีการแสดงออกของ membrane transporters ที่ทำหน้าที่ผลักยาออกนอกเซลล์ เช่น P-glycoprotein, MRP1 protein เป็นต้น⁶ วิธีการหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาได้ คือ การสังเคราะห์หรือค้นหาโมเลกุลที่มีคุณสมบัติต้านมะเร็งและไม่ถูกผลักออกนอกเซลล์ด้วย MDR protein การศึกษาในหลอดทดลองพบโมเลกุลหลายชนิดที่สามารถแก้ปัญหา MDR ได้ เช่น verapamil, cyclosporin A,^{7,8} valspodar,⁹ zosuquidar,¹⁰ elacridar,¹¹ และ tariquidar¹² แม้โมเลกุลเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของ MDR proteins และการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง แต่การนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์อย่างมาก

ในปัจจุบันการค้นหาโมเลกุลที่เป็นสารสกัดจาก

ธรรมชาติจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง จากการศึกษาของ วิภพ สุทธนะ และคณะ¹³ ประเมินฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ไวและดื้อต่อยาด้วยสารสกัดเมล็ดมะปรางด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน พบว่าสารสกัดเมล็ดมะปรางด้วย คลอโรฟอร์ม อะซิโตน ไตรคล อีเทนอล และน้ำ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดที่ไวต่อยาดอกไซโรบินซิน ชนิด K562 ที่ดื้อต่อยาดอกไซโรบินซิน ชนิด K562/ adr และมะเร็งปอดที่ไวต่อยาดอกไซโรบินซิน ชนิด GLC4 และ ที่ดื้อต่อยาดอกไซโรบินซิน ชนิด GLC4/adr ได้ โดยเมล็ดมะปรางที่สกัดด้วยเอทานอลออกฤทธิ์ดีที่สุด

สมอพิเภกมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Terminalia bellirica* วงศ์ Combretaceae เป็นต้นไม้ผลัดใบในแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สามารถพบได้ในประเทศไทย เช่นกัน สมอพิเภกมีคุณสมบัติเชิงยา เช่น ด้านเบาหวาน¹⁴ ด้านแบคทีเรีย¹⁵ รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ¹⁶ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไวและดื้อต่อยาของสารสกัดผลสมอพิเภก

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การเตรียมสารสกัดผลสมอพิเภก

นำผลสมอพิเภก (*Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb.) แห้ง จำนวน 200 กรัม มาสกัดด้วยอะซิโตน ไตรคล อีเทนอล และน้ำ ใช้ตัวทำละลายปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน นำส่วนใสไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 จากนั้นนำส่วนที่กรองได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้งแบบหมุน (rotary evaporator) ผงแห้งของสารสกัดถูกเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมทำการทดลองต่อไป

การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเซลล์เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไวต่อยาดอกไซโรบินซิน (doxorubicin-sensitive erythroleukemic cell, K562) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ดื้อต่อยาดอกไซโรบินซิน (doxorubicin-resistant erythroleukemic cell, K562/adr)

การเพาะเลี้ยงและการเตรียมเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งจำนวน 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 ที่มี 10% fetal calf serum และ 1% penicillin/streptomycin ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และความชื้นสัมพัทธ์ 95% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเตรียม

และปรับเป็นความเข้มข้นของเซลล์ 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์และสภาวะดังกล่าวข้างต้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ มะเร็ง

เตรียมเซลล์มะเร็งจำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในแต่ละหลุมของ 24 wells-plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640, 10% fetal calf serum และ 1% penicillin-streptomycin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารสกัดผลสมอพิเภกที่มีความเข้มข้นต่างๆ ลงในแต่ละหลุม บ่มภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และความชื้นสัมพัทธ์ 95% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (Flow cytometer) รุ่น Coulter Epics MCL-XL จากนั้นคำนวณหาอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (% cell growth inhibition) จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{Cell growth inhibition} = \frac{(\text{จำนวนเซลล์ในหลุมควบคุม} - \text{จำนวนเซลล์ในหลุมที่เติมสารทดสอบ}) \times 100}{(\text{จำนวนเซลล์ ในหลุมควบคุม} - \text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น})}$$

สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Cell growth inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀)

การคำนวณหาปัจจัยในการดื้อยา (resistance factor; RF) ของเซลล์มะเร็ง สามารถหาได้จากสูตรต่อไปนี้

$$RF = \frac{IC_{50} \text{ ของสารสกัดในเซลล์มะเร็งชนิดที่ดื้อต่อยา}}{IC_{50} \text{ ของสารสกัดในเซลล์มะเร็งชนิดที่ไวต่อยา}}$$

RF < 1 หมายถึงสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ดื้อต่อยาได้ดีกว่าเซลล์ที่ไวต่อยา

RF = 1 หมายถึงสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ดื้อต่อยาได้เท่ากับเซลล์ที่ไวต่อยา

RF > 1 หมายถึงสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ดื้อต่อยาได้น้อยกว่าเซลล์ที่ไวต่อยา

การวิเคราะห์ทางสถิติ

หาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการศึกษา

ผลการสกัดผลสมอพิเภก

การสกัดผลสมอพิเภก แบบ liquid extraction ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน ได้แก่ อะซิโตนไไตรล์ เอทานอล และน้ำ สามารถแยกสารสกัดผลสมอพิเภกออกเป็น 3 ส่วนตามขั้วของตัวทำละลายได้แก่ สารสกัดผลสมอพิเภกที่สกัดด้วยอะซิโตนไไตรล์ เอทานอล และน้ำ

จากการสกัดสารผลสมอพิเภกพบว่า น้ำหนักของสารสกัดผลสมอพิเภกด้วยอะซิโตนไไตรล์ (acetonitrile extract) ภายหลังการทำแห้งเท่ากับ 3.22 กรัม คิดเป็น % extraction yield เท่ากับ 1.61% น้ำหนักของสารสกัดผลสมอพิเภกด้วยเอทานอล (ethanol extract) ภายหลังการทำแห้งเท่ากับ 10.81 กรัม คิดเป็น % extraction yield เท่ากับ 5.41% และน้ำหนักของสารสกัดผล

สมอพิเภกด้วยน้ำ (water extract) ภายหลังการทำแห้งเท่ากับ 10.80 กรัม คิดเป็น % extraction yield เท่ากับ 5.40% จากผลการศึกษาเห็นได้ว่าตัวทำละลายเอทานอลและน้ำสามารถสกัดสารผลสมอพิเภกได้มากกว่าอะซิโตนไไตรล์

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

การทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ของสารสกัดผลสมอพิเภกทั้ง 3 ส่วนต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไวต่อยา (K562) และดื้อต่อยาดอกไซรูบิซิน (K562/adr) พบว่าสารสกัดผลสมอพิเภกทั้ง 3 ส่วนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง K562 (Figure 1) และ K562/adr (Figure 2) ได้ ตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดผลสมอพิเภกทั้ง 3 ส่วน บ่งชี้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งแปรผันตามความเข้มข้น นอกจากการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ของสารสกัดผลสมอพิเภกแล้ว ยังมีรายงานวิจัยที่บ่งชี้ให้เห็นว่าสมอพิเภกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น PC-3, DU-145, MCF-7¹⁷

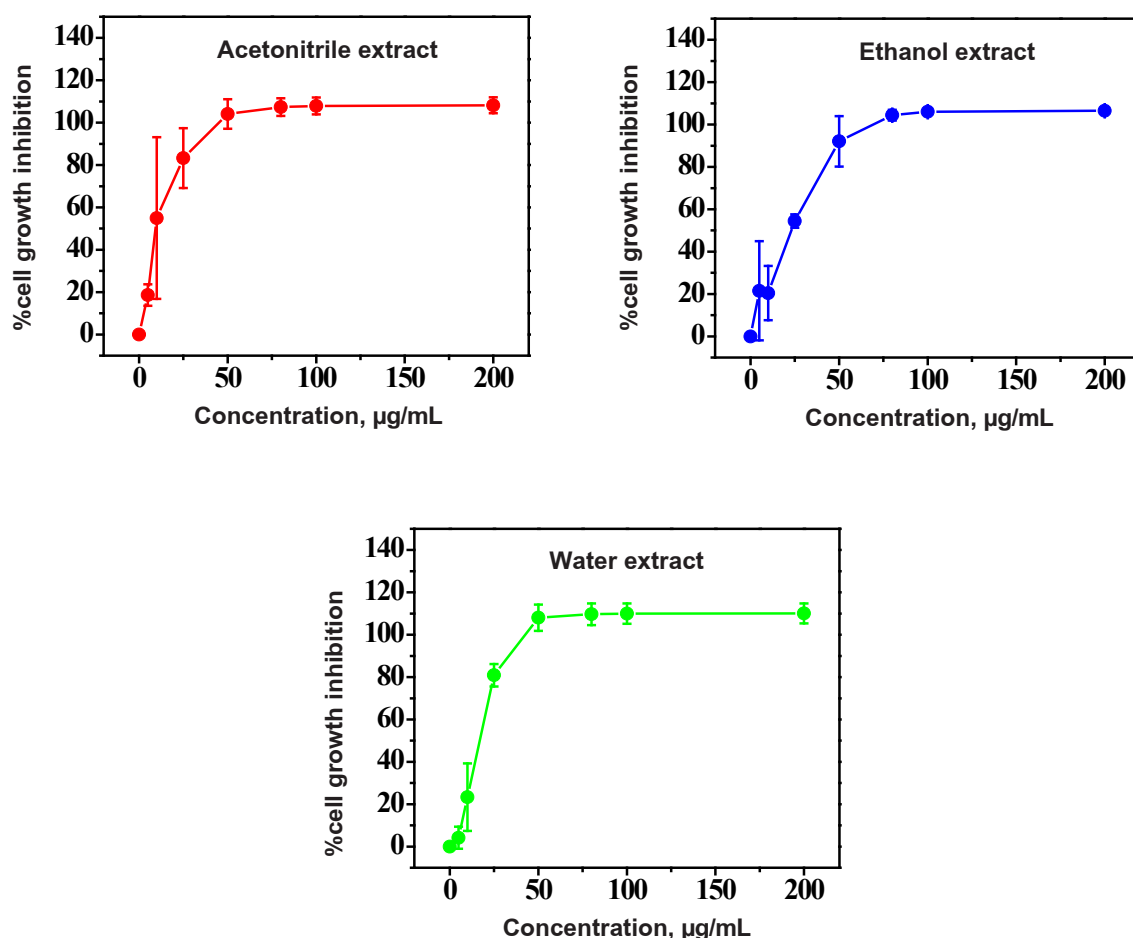


Figure 1. The percentage of cell growth inhibition of acetonitrile extract, ethanol extract and water extract on K562 cells.

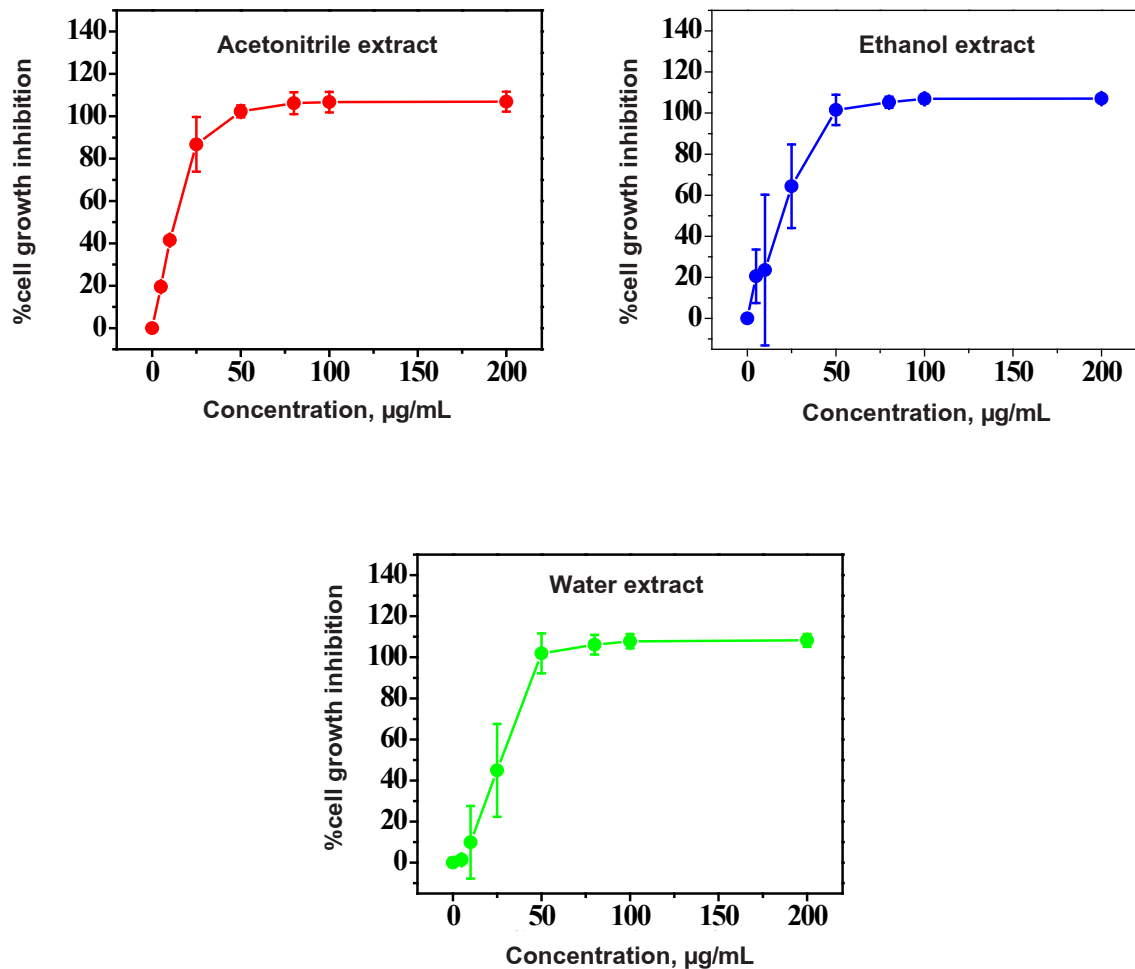


Figure 2. The percentage of cell growth inhibition of acetonitrile extract, ethanol extract and water extract on K562/adr cells.

สารสกัดธรรมชาติที่มีโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis)¹³ เนื่องจากสมอพิเภกมีสารกลุ่มโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ^{18,19} จึงเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ของสารสกัดผลสมอพิเภกต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งอาจเกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส Gbate NB และคณะ²⁰ ศึกษาฤทธิ์ของสมอพิเภกสกัดด้วย 70% เมทานอลต่อการต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 และ มะเร็งเต้านมชนิด MCF7 พบว่าสมอพิเภกสกัดด้วย 70% เมทานอลสามารถต้านเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ และยังพบอีกว่ากลไกการต้านเซลล์มะเร็งของสมอพิเภกสกัดด้วย 70% เมทานอลเกี่ยวข้องกับการชักนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิสผ่านทางโปรตีน Bcl-2 (Bcl-2 family proteins)

จากการหาความเข้มข้นของสารสกัดผลสมอพิเภกด้วยอะซิโตนไตรล เอทานอลและน้ำในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ต่อเซลล์มะเร็ง K562 และ K562/adr

(Table 1) พบว่าสารสกัดผลสมอพิเภกด้วยน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง K562 ได้ดีที่สุด ในขณะที่สารสกัดผลสมอพิเภกด้วยอะซิโตนไตรลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง K562/adr ได้ดีที่สุด

จากการหาค่าปัจจัยในการดื้อยา (resistance factor, RF) ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นอัตราส่วนของค่า IC₅₀ ของสารสกัดผลสมอพิเภกในเซลล์มะเร็งชนิดที่ดื้อและไวต่อยา แสดงดังตารางที่ 1 พบว่า ค่า RF ของสารสกัดผลสมอพิเภกด้วย อะซิโตนไตรล และเอทานอลมีค่าน้อยกว่า 1 ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่า สารสกัดสามารถเอาชนะการดื้อยาของเซลล์มะเร็งได้ ในขณะที่ค่า RF ของสารสกัดผลสมอพิเภกด้วยน้ำมีค่ามากกว่า 1 ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่า สารสกัดไม่สามารถชนะการดื้อยาของเซลล์มะเร็งได้

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดผลสมอพิเภกมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ไวและดื้อต่อยา และสารสกัดผลสมอพิเภกด้วยอะซิโตนไตรล และเอทานอลอาจเป็นทางเลือกใหม่สำหรับช่วยแก้ปัญหาการดื้อต่อยาแบบหลายขนานของเซลล์มะเร็งได้

Table 1 Show IC₅₀ and RF of acetonitrile extract, ethanol extract and water extract on K562 and K562/adr (mean±SD from triplicate experiments)

Samor Pipek fruit	IC ₅₀ (µg/mL)		RF
	K562	K562/adr	
Acetonitrile extract	24.70±8.05	13.95±2.50	0.56
Ethanol extract	24.02±2.51	20.45±10.10	0.85
Water extract	13.09±3.40	27.39±7.16	2.09

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนในด้านงบประมาณในการจัดซื้อสารเคมี และเครื่องมือสำหรับการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Stavrovskaya AA, Stromskaya TP. Transport Proteins of the ABC Family and Multidrug Resistance of Tumor Cells. *Biochemistry (Moscow)* 2008; 73(5): 592-604.
2. Wu C-P, Calcagno AM, Ambudkar SV. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: Evaluation of current strategies. *Curr Mol Pharmacol* 2008; 1(2): 93-105.
3. Lage H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 3145-67.
4. Mankhetkorn S, Garnier-Suillerot A. The ability of verapamil to restore intracellular accumulation of anthracyclines in multidrug resistant cells depends on the kinetics of their uptake. *Eur J Pharmacol* 1998; 343(2-3): 313-21.
5. Reungpatthanaphong P, Dechsupa S, Meesungnoen J, Loetchutinat C, Mankhetkorn S. Rhodamine B as a mitochondrial probe for measurement and monitoring of mitochondrial membrane potential in drug-sensitive and -resistant cells. *J Biochem Biophys Methods* 2003; 57(1): 1-16.
6. Meesungnoen J, Jay-Gerin JP, Mankhetkorn S. Relation between MDR1 mRNA levels, resistance factor, and the efficiency of P-glycoprotein-mediated efflux of pirarubicin in multidrug-resistant K562 sublines. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80(11): 1054-63.
7. Slater L, Sweet P, Wetzel M, Stupecky M, Osann K. Comparison of cyclosporine A, verapamil, PSC-833 and cremophor EL as enhancing agents of VP-16 in murine lymphoid leukemias. *Leuk Res* 1995; 19: 5438.
8. B-artlett NL, Lum BL, Fisher GA, Brophy NA, Ehsan MN, Halsey J, Sikic BI. Phase I trial of doxorubicin with cyclosporine as a modulator of multidrug resistance. *J Clin Oncol* 1994; 12: 835-42.

9. Giaccone G, Linn SC, Welink J, Catimel G, Stieltjes H, van der Vijgh WJ, Eeltink C, Vermorken JB, Pinedo HM. A dose-finding and pharmacokinetic study of reversal of multidrug resistance with SDZ PSC 833 in combination with doxorubicin in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 2005-15.
10. Dantzig AH, Law KL, Cao J, Starling JJ. Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. *Curr Med Chem* 2001; 8: 39-50.
11. Kruijtz CM, Beijnen JH, Rosing H, ten Bokkel Huinink WW, Schot M, Jewell RC, Paul EM, Schellens JH. Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2943-50.
12. Martin C, Berridge G, Mistry P, Higgins C, Charlton P, Callaghan R. The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 403-11.
13. Suttana W, Dechsupa N, Mankhetkorn S. Preparation of Maprang Seed Extracts and Evaluation of Their Anti-Proliferative Activity against Drug-Sensitive and Drug-Resistant Leukemic and Lung Cancer Cells. *Srinagarind Med J* 2013; 28:100-9. (in Thai)
14. Sabu MC, Kuttan R. Antidiabetic and antioxidant activity of *Terminalia belerica* Roxb. *Indian J Exp Biol* 2009; 47: 270-5.
15. Aqil F, Ahmad I. Antibacterial properties of traditionally used Indian medicinal plants. *Method Find Exp Clin* 2007; 29: 79-92.
16. Hazra B, Sarkar R, Biswas S, Mandal N. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of *Terminalia chebula*, *Terminalia belerica* and *Emblica officinalis*. *BMC Complement Altern Med* 2010; 10: 20.
17. Kaur S, Michael H, Arora S, Harkonen PL, Kumar S. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala—an Indian herbal drug. *J Ethnopharmacol* 2005; 97: 15-20.
18. Kumudhavalli MV, Vyas M, Jayakar B. Phytochemical and pharmacological evaluation of the plant fruit of *Terminalia belerica* Roxb. *Int J Pharm Life Sci* 2010; 1: 1-11.
19. Meshram G, Patil B, Shinde D, Metangale G. Effect of Epigallocatechin gallate isolated from *Terminalia bellerica* fruit rind on glucoamylase activity in vitro. *J Appl Pharm Sci* 2011; 1: 115-7.
20. Ghate NB, Hazra B, Sarkar R, Chaudhuri D, Mandal N. Alteration of Bax/Bcl-2 ratio contributes to *Terminalia belerica*-induced apoptosis in human lung and breast carcinoma. *In Vitro Cell Dev Biol—Animal* 2014; 50: 527-37.