รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษาผลของ piperine และ piperic acid ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง”

โดย อ.ดร.ศิริพร ชื้อชวาลกุล และคณะ

สิงหาคม พ.ศ. 2552

สัญญาเลขที่ MRG4880027

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "การศึกษาผลของ piperine และ piperic acid ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง"

คณะผู้วิจัย

1. อ. ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุล* หัวหน้าโครงการ
2. นางสาวษิรัชนา อาจสัญจร** ผู้ร่วมวิจัย
3. ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ*** นักวิจัยที่ปรึกษา

สังกัด

*โครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัย
ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
**หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
***ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสตับอักเสบ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และ
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ : MRG4880027

ชื่อโครงการ : การศึกษาผลของ piperine และ piperic acid ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง

ชื่อนักวิจัย : ศิริพร ชื้อชวาลกุล และคณะ, โครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Email Address: siriporn.ch@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

พิเพอรีนเป็นสารอัลคาลอยด์หลัก พบมากในพืชกลุ่มพริกไทย มีฤทธิ์ในการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและยับยั้งการเจริญของมะเร็งในหนู การศึกษาวิจัยชิ้นนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ได้ทำการทดสอบผลของพิเพอรีนต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์ (Human PBMCs) ภายหลังการกระตุ้นด้วย PHA และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง จากการศึกษาใน PBMCs พบว่า เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พิเพอรีนที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ส่งผลให้มีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 92.9 % เมื่อครบ 72 ชั่วโมง พบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 10 และ 100 µg/ml ส่งผลให้มีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็น 86.8% และ 62.3% ตามลำดับ ทั้งนี้มีแนวโน้มว่า ความเข้มข้นของพิเพอรีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) นั้น มีค่ามากกว่า 100 µg/ml อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้เป็นเพียงการศึกษาวิจัยเบื้องต้น จักต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของกลไกการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อเซลล์ปกติของมนุษย์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เพียงพอต่อการสรุปผลการวิจัยต่อไป นอกจากนี้การตรวจวัดผลของพิเพอรีนต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่างๆ ด้วย MTS assay พบว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) กล่องเสียง (HEp-2) และปากมดลูก (HeLa) ทนต่อพิเพอรีนได้แม้ในความเข้มข้นที่สูงถึง 200 µg/ml ในขณะที่พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของมะเร็งเม็ดเลือด (H9) ได้เป็นอย่างดี (IC_{50} = 14.7 ± 2.1 µg/ml) อีกทั้งยังเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย แต่จากการทดสอบใน Jurkat พบว่าพิเพอรีนที่ 20-100 µg/ml ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ใกล้เคียงกัน โดยยังคงมีเซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 43.1 ± 2.85% แต่กลับไม่พบว่าพิเพอรีนเป็นพิษต่อ Jurkat ผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ (DNA content) เพื่อบ่งชี้ระยะของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ เมื่อทดสอบที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าพิเพอรีนที่ 100 µg/ml ชักนำให้มีเซลล์ในระยะ G_0/G_1 เพิ่มขึ้นจาก 46.55%, 43.79% และ 32.47% ในกลุ่มควบคุมเป็น 56.09%, 62.50% และ 63.53% ตามลำดับ การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยการย้อมด้วย AO/EB พบว่าพิเพอรีนที่ 40 µg/ml ส่งผลให้นิวเคลียสของเซลล์เริ่มหดตัวเป็นก้อนขนาดเล็กที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็น 1% Apoptotic cells และเมื่อตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์ด้วย Annexin V-FITC เพื่อตรวจวัดด้วยโฟลไซโตมิเตอร์ พบว่า ณ เวลา 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง พิเพอรีนทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่ชักนำให้เกิด apoptosis แต่อย่างใด จากการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่าพิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ Jurkat โดยการชักนำให้เกิด cell cycle arrest แต่ไม่ชักนำให้เกิด apoptosis ทั้งนี้คณะผู้วิจัยจะได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมในระดับลึกเพื่อยืนยันการเกิด G_0/G_1 arrest ต่อไป

คำหลัก : พิเพอรีน, มะเร็งเม็ดเลือดขาว, เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง, ฤทธิ์ควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

Project Code : MRG4780018

Project Title : In vitro studies of Immunomodulatory and antitumor activity of piperine and piperic acid

Investigators : Siriporn Chuchawankul *et al*., Innovation Center for Research and Development in Medical Diagnostic Technology Project, Department of Transfusion Medicine, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University

Email Address : siriporn.ch@chula.ac.th

Project Period : 2 years

Piperine, an amide isolated from piper species, was reported to displayed immunomodulatory and anti-tumor activity towards mouse carcinomas. Our study is the first to investigate an *in vitro* immunomodulatory activity of piperine on human PBMCs after PHA stimulation and anti-tumor activity of piperine on various human tumor cells. Viability of stimulated-PBMCs with 100 µg/ml of piperine remained at 92.9 % after 24 h treatment. After 72 h, viabilities of stimulated-PBMCs with 10 and 100 µg/ml of piperine were significantly decreased to 86.8% and 62.3%, respectively. Piperine seemed to exhibit an IC_{50} value of >100 µg/ml against stimulated-human PBMCs. However, mechanisms underlying piperine's effect are being performed. In addition, human cancer cells derived from different organs were employed, and their growth affected by piperine was determined by MTS assay. We found that cancer cells derived from colon (HT-29), larynx (HEp-2) and cervic (HeLa) were less sensitive to piperine even at a high concentration tested (200 µg/ml). Interestingly, low concentration of piperine markedly inhibited the proliferation of cancer cells derived from leukocyte, H9 with IC_{50} of 14.7± 2.1 µg/ml. Moreover, piperine from 20-100 µg/ml inhibited Jurkat proliferation with similar degree observed where cell viability remained at 43.1 ± 2.85%. On the contrary, piperine did not show any toxicity towards Jurkat at all. Flow cytometric analysis for DNA content after 24, 48 and 72 h indicated that piperine at 100 µg/ml induced G_0/G_1 arrest. We found that cells in G_0/G_1 population increased from 46.55%, 43.79% and 32.47% to 56.09%, 62.50% and 63.53% compare to control. After 48 h treatment, AO/EB staining revealed condensed nuclei cells with 40 µg/ml of piperine exposure, resulting in 1% apoptotic cells. Additionally, annexin V-FITC staining for PS exposure on Jurkat was determined by flow cytometric analysis. No apoptotic cell was detected after piperine treatments for 3, 6, 9, 12 and 24 h. In conclusion, piperine's anti-tumor effect involved induction of G_0/G_1 arrest but not apoptosis. Nevertheless, further investigation to confirm G_0/G_1 arrest will be performed.

Keywords : piperine, human tumor cells, human peripheral blood mononuclear cells, anti-tumor activity, Immunomodulatory activity

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
สารบัญ	iii
รายการภาพประกอบ	iv
บทสรุปผู้บริหาร	vi
บทนำ	1
วิธีวิจัย	4
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	11
ผลการวิจัย	12
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	35
เอกสารอ้างอิง	40
Output ที่ได้จากโครงการ	45

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงการแยกเม็ดเลือดขาว	4
รูปที่ 2	แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมของเซลล์ทำให้สารประกอบ MTS เปลี่ยนเป็น formazan	5
รูปที่ 3	แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมของเซลล์ทำให้สารประกอบ tetasolium salt เปลี่ยนเป็น Formazan salt	7
รูปที่ 4	แสดงบริเวณเซลล์ในระยะต่างๆ	11
รูปที่ 5	แสดงผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์	12
รูปที่ 6	แสดงผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ HT-29, HeLa และ HEp-2	13
รูปที่ 7	แสดงผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ H9	14
รูปที่ 8	แสดงผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ H9	15
รูปที่ 9	แสดงผลของพิเพอรีนต่อ LDH activity ของ H9	16
รูปที่ 10	แสดงผลการทดสอบ H9 ในสภาวะต่างๆ โดยการตรวจนับจำนวนเซลล์และเปอร์เซนต์ cytotoxicity	17
รูปที่ 11	แสดงผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ Jurkat	18
รูปที่ 12	แสดงผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ Jurkat	19
รูปที่ 13	แสดงผลของพิเพอรีนต่อ LDH activity ของ Jurkat	20
รูปที่ 14	แสดงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ Jurkat ในสภาวะต่างๆ	21
รูปที่ 15	แสดงผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอของ Jurkat เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการย้อม propidium iodide และศึกษาจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์	23
รูปที่ 16	แสดงผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอของ Jurkat เมื่อทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยการย้อม propidium iodide และศึกษาจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์	24
รูปที่ 17	แสดงผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอของ Jurkat เมื่อทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ด้วยการย้อม propidium iodide และศึกษาจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์	25
รูปที่ 18	แสดงผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอของ Jurkat เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยการย้อม propidium iodide และศึกษาจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์	23
รูปที่ 19	แสดงผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผ่าน Fluorescent Microscope	28

รูปที่ 20 แสดงผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat เมื่อทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผ่าน Fluorescent Microscope 29

รูปที่ 21 แสดงผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat เมื่อทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผ่าน Fluorescent Microscope 30

รูปที่ 22 แสดงผลการตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย Annexin V-FITC staining 32

รูปที่ 23 แสดงผลการตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์เมื่อทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย Annexin V-FITC staining 33

รูปที่ 24 แสดงผลการตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์เมื่อทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย Annexin V-FITC staining 34

บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) การศึกษาผลของ piperine และ piperic acid ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง

(ภาษาอังกฤษ) In vitro studies of Immunomodulatory and antitumor activity of piperine and piperic acid

คณะนักวิจัย

1. อาจารย์ ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุล (Dr. Siriporn Chuchawankul) (หัวหน้าโครงการ)
   โครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์
   ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   ห้อง 315 อาคารจุฬาพัฒน์ 1 เลขที่ 154 ถ. พระราม 1 ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
   โทรศัพท์ 02-218-1081 (ต่อ 315), โทรสาร 02-218-1083
   การศึกษา ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   ปริญญาเอก Ph.D. (Microbiology and Immunology),
   Virginia Commonwealth University ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. ศาสตราจารย์ นพ. ยง ภู่วรวรรณ (Prof. Dr. Yong Poovorawan) (นักวิจัยที่ปรึกษา)
   ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสตับอักเสบ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์
   คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
   โทรศัพท์ 02-2564909, โทรสาร 02-2564929
   การศึกษา ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   แพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   วุฒิบัตรแสดงความรู้หรือความชำนาญ การประกอบวิชาชีพเวชกรรม
   สาขากุมารเวชศาสตร์ แพทยสภาแห่งประเทศไทย
3. นางสาวชิรัชนา อาจสัญจร (Miss Siratchana Ajsonjorn) (ผู้ร่วมวิจัย)
   นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
   ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   การศึกษา ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สาขาวิชาที่ทำการวิจัย

วิทยาศาสตร์การแพทย์ เน้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การศึกษาวิจัยเพื่อค้นคว้าคุณสมบัติ และประโยชน์ที่หลากหลายของพืชสมุนไพรกำลังได้รับความสนใจอย่างยิ่งในหลายๆ ประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทย ซึ่งมีภูมิประเทศในเขตร้อนชื้นส่งผลให้มีความหลากหลายของพืชที่เจริญเติบโตได้ในเขตนี้ ปัจจุบันมีการนำผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่มีสมุนไพรเป็นส่วนประกอบมาใช้ในชีวิตประจำวันกันอย่างแพร่หลาย ทั้งในเรื่องของการเสริมสร้างสุขภาพ ความงาม และการรักษาโรคภัยไข้เจ็บคุณสมบัติต่างๆ ของพืชสมุนไพรมีความสำคัญและได้รับความสนใจอย่างยิ่งในวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีรายงานหลายฉบับสนับสนุนว่าพืชสมุนไพรบางชนิดมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันด้วยขบวนการที่แตกต่างกันไป พืชสมุนไพรบางชนิดช่วยกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน (Immunostimulation) บางชนิดยับยั้งการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน (Immunosuppression) ไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มหรือลดประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน อันได้แก่เซลล์เม็ดเลือดขาว Lymphocytes ชนิด T และ B lymphocytes, Natural Killer cells, Spleen cells และ Macrophages พืชสมุนไพรหรือสารสกัดที่ได้จากพืชเหล่านี้ จึงได้รับความสนใจยิ่งเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นสารที่สามารถควบคุมและปรับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ เรียกว่าเป็น Immunomodulatory agent พืชในกลุ่มนี้มีหลายประเภท ยกตัวอย่างเช่น กระเทียม ขิง และกะเพรา พืชผักสวนครัวที่ใช้ประกอบอาหารในบ้านเรา นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วย บัวบก เทียนเกล็ดหอม สัตตบรรณ สะเดาอินเดีย อ้อย ข้าวโอ๊ต โสม มะกล่ำตาหนู ตำแยแมว หมอน้อย ดาวเรืองฝรั่ง ช่อสุวรรณ ทานตะวัน กรรณิการ์ โกฐน้ำเต้า โสก ทับทิม มะม่วง และยาสูบ นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันอีกมากมาย ที่น่าสนใจคือ กัญชา ซึ่งนอกจากจะเป็นยาเสพติดให้โทษแล้ว ยังมีรายงานการนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีการนำอนุพันธุ์ของสารสกัดจากกัญชา (Delta-9 tetrahydrocannabinol หรือ THC) โดยมีชื่อเรียกว่า Dronabinol และสารสังเคราะห์ซึ่งมีชื่อเรียกทางการค้าว่า Marinol® มาใช้ร่วมในการรักษาคนไข้โรคเอดส์ และคนไข้โรคมะเร็ง โดยมีฤทธิ์กระตุ้นให้อยากอาหาร (Chopra et al., 1957) และช่วยลดอาการคลื่นไส้ อาเจียนอันเป็นผลข้างเคียงจากการรักษาด้วยยา (Chemotherapy) ในคนไข้มะเร็ง นอกจากนี้ THC ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วย T cell mitogens, B cell mitogens และ lipopolysaccharide (LPS) (Klein et al., 1985) ยับยั้ง Costimulation activity ของ Murine peritoneal exudated cells ในหลอดทดลอง (Chuchawankul et al., 2004) ในทางตรงกันข้าม THC ที่ความเข้มข้นต่ำ (Luo et al., 1992) กลับกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ lymphocytes จากหนูทดลองและมนุษย์โดยการกระตุ้นด้วย monoclonal anti-CD3 antibody ซึ่งใช้เป็น mitogen โดยเป็นการทดสอบในหลอดทดลอง (Pross et al., 1992) พืชที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งซึ่งกำลังได้รับความนิยมอย่างยิ่งในปัจจุบัน คือ ชาเขียว พบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นส่วนประกอบซึ่งมีบทบาทในการป้องกันโรคต่างๆ ที่เกิดจากความเสื่อมไปจนถึงมะเร็ง นอกจากนี้ ชาเขียวยังเป็น immunosuppressive agent คือยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ lymphocyptes ในหลอดทดลอง (Wilasrusmee et al., 2002) เป็นต้น

งานวิจัยชิ้นนี้ คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาคุณสมบัติของพิเพอรีน หรือ Piperine (1-piperoyl peperdine) ซึ่งเป็นสาร alkaloid ที่ได้จากดีปลี (*Piper longum* Linn.) และ พริกไทยดำ หรือ Black pepper (*Piper nigrum* Linn.) โดยปกติมักใช้ในการปรุงรสอาหาร ซึ่งจะมีรสเผ็ดอันเนื่องมาจากสารพิเพอรีนนั่นเอง ในภูมิภาคต่างๆ ของโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในแถบเอเชียแปซิฟิก เช่น อินเดีย มีการนำพริกไทยมาใช้ในการรักษาโรคบางชนิด เช่น หนองใน อาการปวดประจำเดือน วัณโรค และการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (Singh, 1992) นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการรักษาอาการปวด การขับถ่ายปัสสาวะ ลดการตึงของกล้ามเนื้อ และบรรเทาอาการวิตก (Singh and Blue Menthal, 1997) มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รายงานว่า พิเพอรีนสามารถยับยั้งการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง และลดอาการอักเสบได้ (Virinder et al.,1997 และ Mittal et al., 2000) อีกทั้งยังยับยั้งการทำงานของ P450 isoenzymes (Atal et al., 1985) ยับยั้งการสังเคราะห์ prostaglandin และ leukotriene ในหลอดทดลอง (Stohr et al., 2001) จากงานวิจัยล่าสุดในสัตว์ทดลองพบว่าพิเพอรีนมีฤทธิ์ Immunomodulatory และ antitumor activity ในสัตว์ทดลอง โดยพบว่าพิเพอรีนกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์จากไขกระดูก กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงแกะ การเพิ่มจำนวนของ plaque forming cells ในม้าม และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Dalton's lymphoma ascites cells (DLA), Ehrlich ascites carcinoma cells (EAC) และ Mouse fibrosarcoma cells (L929) ในหลอดทดลอง และยังพบว่าพิเพอรีนสามารถลดขนาดและการเจริญของเซลล์มะเร็ง DLA และ EAC ในสัตว์ทดลอง (Sunila et al., 2004) และมีฤทธิ์ antimetastatic activity (Pradeep, 2002) นอกจากนี้ พิเพอรีนยังมีผลยับยั้งการสร้าง nuclear factor-kB (NF- kB), c-Fos, CREB, ATF-2 และ proinflammatory cytokine ใน B16F-10 melanoma cells (Kuttan, 2004)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานใดๆ กล่าวถึง Immunomodulatory activity ของพิเพอรีนต่อเซลล์ปกติของมนุษย์ และ Antitumor activity ของ piperine ต่อเซลล์มะเร็ง H9 (Human T cell lymphoma) : ATCC HTB-176 คณะผู้วิจัยจึงประสงค์จะทำการทดสอบคุณสมบัติ Immunomodulatory activity ของสารสกัดจากพริกไทยดำ (piperine) และสารสังเคราะห์ (piperic acid) ซึ่งคาดว่าเป็น degradation form ของ piperine โดยจะทำการศึกษาผลกระทบของสารต่อ Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย mitogens และ antigen ในหลอดทดลอง และศึกษาควบคู่ไปกับ antitumor activity ของสารต่อเซลล์มะเร็ง H9 ในหลอดทดลอง

แต่เนื่องจากปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ในขั้นตอนการวิจัย รวมทั้งปัญหาเงินทุนวิจัยที่ไม่เพียงพอต่อการทำงานวิจัยชิ้นนี้ให้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ข้างต้น ผู้วิจัยจึงได้ปรับเปลี่ยนแผนงานวิจัย และได้เสนอขอทุนวิจัยเพิ่มเติมจากแหล่งทุนอื่นๆ เพื่อศึกษาวิจัยและทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในด้านต่างๆ ของสารสกัดจากพริกไทยดำและพิเพอรีนร่วมด้วย และสรุปได้เป็นวัตถุประสงค์การวิจัยใหม่ เปรียบเทียบกับแผนงานเดิม ดังนี้

วัตถุประสงค์เดิม

1. เพื่อศึกษาผลของพิเพอรีนและสารสังเคราะห์ piperic acid ต่อการตอบสนองของ Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ในหลอดทดลอง (ทดสอบกับเซลล์จากคนปกติและเซลล์จากผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซี โดยทำการตรวจวัดโดย MTS assay)
2. เพื่อศึกษาผลของพิเพอรีนและสารสังเคราะห์ piperic acid ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง H9 (Human T cell lymphoma) ในหลอดทดลอง

วัตถุประสงค์ใหม่

1. เพื่อศึกษาผลของพิเพอรีนต่อการเจริญของ Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ในหลอดทดลอง โดยทำการตรวจวัดโดย MTS assay
2. เพื่อศึกษาผลของพิเพอรีนต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) มะเร็งเม็ดเลือดขาว (H9 และ Jurkat)
3. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) ในหลอดทดลอง

ทั้งนี้ ได้มีเงินทุนวิจัยจากแหล่งทุนอื่นที่นำมาใช้ร่วมในโครงการวิจัยชิ้นนี้ ได้แก่

ลำดับที่	สถานภาพ	หัวข้อเรื่อง	แหล่งทุน	ปีที่ได้
1	หัวหน้าโครงการ	Immunomodulatory activity of Piperine on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells	Asahi Glass Foundation (209,150 บาท)	ปีงบประมาณ 2550
2	หัวหน้าโครงการ	ฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์ชนิดต่างๆ	กองทุนคณะสหเวชศาสตร์ (64,000 บาท)	ปีงบประมาณ 2551
3	หัวหน้าโครงการ (อาจารย์ที่ปรึกษา)	การศึกษาผลของสารสกัดจากพริกไทยดำ (piperine) ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง	ทุนอุดหนุนการทำวิทยา - นิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา (20,000 บาท)	ปีงบประมาณ 2548

โดยมีรายละเอียดแผนงานวิจัยตามวัตถุประสงค์ใหม่ ดังรายละเอียดด้านล่างนี้

ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาวิจัยเรื่องการศึกษาผลของ piperine และ piperic acid ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองนั้น สามารถแบ่งการวิจัยออกได้เป็น 4 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

ขั้นที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อการเจริญของ Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ในหลอดทดลอง

1.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์

1.2 การตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ โดย MTS assay

1.3 การตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์

ขั้นที่ 2 การตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่างๆ

2.1 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) มะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa)

2.2 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด H9 และ Jurkat

ขั้นที่ 3 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อ H9 และ Jurkat

3.1 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

3.1.1 การตรวจวัด Lactate Dehydrogenase (LDH) activity

3.1.2 การตรวจวัด Cell viability ด้วย Trypan blue dye exclusion method

3.2 การศึกษาผลกระทบของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่างๆ (Cell cycle analysis)

3.3 การศึกษาฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อการเกิด Apoptosis

3.3.1 ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ (Cell morphology) ผ่าน Fluorescent Microscope

3.3.2 ตรวจสอบ DNA fragmentation โดย Gel electrophoresis

3.3.3 ตรวจสอบปริมาณ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์โดยเครื่อง Flow cytometer

ขั้นที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ประโยชน์ที่ได้รับ

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบองค์ความรู้ใหม่ที่แสดงว่าพิเพอรีนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่างๆ ในระดับที่แตกต่างกัน โดยพิเพอรีนจะยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งที่มีแหล่งกำเนิดจากอวัยวะอื่นๆ เช่น เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29) มะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa) โดยผลการทดลองที่น่าสนใจยิ่งในการศึกษาครั้งนี้ คือ พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว H9 และ Jurkat ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการยับยั้งการเจริญของ H9 นั้นมีลักษณะเป็น dose-dependent manner ซึ่งความเข้มข้นของพิเพอรีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง H9 ได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) มีค่า 14.7 $\pm$ 2.1 µg/ml ซึ่งคณะผู้วิจัยได้

นำเสนอผลการวิจัยดังกล่าวในวารสารสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย (Chuchawankul et al., 2006) ส่วนความเข้มข้นของพิเพอรีนตั้งแต่ 20 µg/ml ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญของ Jurkat ได้โดยเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตยังคงมีค่า 43.1 $\pm$ 2.85% แม้ว่าความเข้มข้นของพิเพอรีนจะสูงถึง 100 µg/ml

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาผลของพิเพอรีนต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์ (Human PBMCs) ภายหลังการกระตุ้นด้วย PHA ซึ่งเป็น mitogen เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดเท่านั้น จากการทดลองพบว่า เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า พิเพอรีนที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ส่งผลให้มีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 92.9 % เมื่อครบ 72 ชั่วโมง พบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 10 และ 100 µg/ml ส่งผลให้มีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็น 86.8% และ 62.3% ตามลำดับ ทั้งนี้มีแนวโน้มว่า ความเข้มข้นของพิเพอรีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) นั้น มีค่ามากกว่า 100 µg/ml อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้เป็นเพียงการศึกษาวิจัยเบื้องต้น จักต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของกลไกการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อเซลล์ปกติของมนุษย์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เพียงพอต่อการสรุปผลการวิจัย และหากพบว่าพิเพอรีนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ PBMCs ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย การศึกษากลไกในการยับยั้งการเจริญของ PBMCs โดยพิเพอรีนก็จะมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อประกอบการตัดสินใจว่าควรนำพิเพอรีนมาใช้ในการรักษามะเร็งในผู้ป่วยหรือไม่ และหากพบว่าพิเพอรีนไม่เป็นพิษต่อ PBMCs ด้วยแล้วก็มีความเป็นไปได้อีกทางหนึ่งในการนำพิเพอรีน มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับผลการศึกษาฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันนั่นเอง โดยอาจใช้พิเพอรีนเป็น Immunosuppressive agent เพื่อกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในรายที่มีการตอบสนองที่ไวเกินหรือใช้ประโยชน์ในการปลูกถ่ายอวัยวะต่อไป และจากการศึกษาวิจัยในมนุษย์โดยการให้พิเพอรีนปริมาณ 20 mg ร่วมกับยาโพรพราโนลอล ทีโอฟิลลีน หรือฟีไนโตอิน (Bano et al., 1991, Pattanaik et al., 2006) หรือให้พิเพอรีน 5 mg ร่วมกับโคเอนไซม์คิวเทนหรือเบต้าแคโรทีนเป็นเวลา 14 วันติดต่อกัน (Badmaev et al., 1999, Badmaev et al., 2000) ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายแต่อย่างใด จึงมีโอกาสสูงในการนำพิเพอรีนมาใช้ประโยชน์ในมนุษย์ต่อไป

สรุปได้ว่า พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ Jurkat โดยการชักนำให้เกิด cell cycle arrest ที่ระยะ G_0/G_1 แต่ไม่ชักนำให้เกิด apoptosis แต่อย่างใด ผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษากลไกในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่างๆ และการทดสอบฤทธิ์ของสารต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม รวมไปถึงการศึกษาฤทธิ์ของพิเพอรีนร่วมกับยาต้านมะเร็ง อีกทั้งยังเป็นแนวทางเพื่อการพัฒนาอนุพันธุ์สังเคราะห์ของพิเพอรีนให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากยิ่งขึ้น นอกจากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของพริกไทยดำ ซึ่งเป็นแหล่งที่มาหลักของพิเพอรีนแล้ว ยังสามารถนำองค์ความรู้ใหม่ที่ได้ไปพัฒนาสารเพื่อเป็นยารักษาโรคมะเร็งหรือสารควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไป

งบประมาณ

งบประมาณที่ใช้แล้วทั้งหมดเท่ากับ 422,000.99 บาท (สี่แสนสองหมื่นสองพันบาทเก้าสิบเก้าสตางค์) ทั้งนี้ ยังไม่รวมค่าตอบแทนงวดสุดท้ายจำนวนหกหมื่นบาทถ้วน

บทนำ

การศึกษาวิจัยเพื่อค้นคว้าคุณสมบัติ และประโยชน์ที่หลากหลายของพืชสมุนไพรกำลังได้รับความสนใจอย่างยิ่งในหลายๆ ประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทย ซึ่งมีภูมิประเทศในเขตร้อนชื้นส่งผลให้มีความหลากหลายของพืชที่เจริญเติบโตได้ในเขตนี้ ปัจจุบันมีการนำผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่มีสมุนไพรเป็นส่วนประกอบมาใช้ในชีวิตประจำวันกันอย่างแพร่หลาย ทั้งในเรื่องของการเสริมสร้างสุขภาพ ความงาม และการรักษาโรคภัยไข้เจ็บ คุณสมบัติต่างๆ ของพืชสมุนไพรมีความสำคัญและได้รับความสนใจอย่างยิ่งในวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีรายงานหลายฉบับสนับสนุนว่าพืชสมุนไพรบางชนิดมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันด้วยขบวนการที่แตกต่างกันไป พืชสมุนไพรบางชนิดช่วยกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน (Immunostimulation) บางชนิดยับยั้งการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน (Immunosuppression) ไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มหรือลดประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน อันได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาว Lymphocytes ชนิด T และ B lymphocytes, Natural Killer cells, Spleen cells และ Macrophages พืชสมุนไพรหรือสารสกัดที่ได้จากพืชเหล่านี้ จึงได้รับความสนใจยิ่งเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นสารที่สามารถควบคุมและปรับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ เรียกว่าเป็น Immunomodulatory agent พืชในกลุ่มนี้มีหลายประเภท ยกตัวอย่างเช่น กระเทียม ขิง และกะเพรา พืชผักสวนครัวที่ใช้ประกอบอาหารในบ้านเรา นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วย บัวบก เทียนเกล็ดหอม สัตตบรรณ สะเดาอินเดีย อ้อย ข้าวโอ๊ต โสม มะกล่ำตาหนู ตำแยแมว หมอน้อย ดาวเรืองฝรั่ง ช่อสุวรรณทานตะวัน กรรณิการ์ โกฐน้ำเต้า โสก ทับทิม มะม่วง และยาสูบ นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันอีกมากมาย ที่น่าสนใจคือ กัญชา ซึ่งนอกจากจะเป็นยาเสพติดให้โทษแล้ว ยังมีรายงานการนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีการนำอนุพันธุ์ของสารสกัดจากกัญชา (Delta-9 tetrahydrocannabinol หรือ THC) โดยมีชื่อเรียกว่า Dronabinol และสารสังเคราะห์ซึ่งมีชื่อเรียกทางการค้าว่า Marinol® มาใช้ร่วมในการรักษาคนไข้โรคเอดส์ และคนไข้โรคมะเร็ง โดยมีฤทธิ์กระตุ้นให้อยากอาหาร (Chopra et al., 1957) และช่วยลดอาการคลื่นไส้ อาเจียนอันเป็นผลข้างเคียงจากการรักษาด้วยยา (Chemotherapy) ในคนไข้มะเร็ง นอกจากนี้ THC ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS), T cell mitogens และ B cell mitogens (Klein et al., 1985) ยับยั้ง Costimulation activity ของ Murine peritoneal exudated cells ในหลอดทดลอง (Chuchawankul et al., 2004) ในทางตรงกันข้าม THC ที่ความเข้มข้นต่ำ (Luo et al., 1992) กลับกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ lymphocytes จากหนูทดลองและมนุษย์โดยการกระตุ้นด้วย monoclonal anti-CD3 antibody ซึ่งใช้เป็น mitogen โดยเป็นการทดสอบในหลอดทดลอง (Pross et al., 1992) พืชที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งซึ่งกำลังได้รับความนิยมอย่างยิ่งในปัจจุบัน คือ ชาเขียว พบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นส่วนประกอบซึ่งมีบทบาทในการป้องกันโรคต่างๆ ที่เกิดจากความเสื่อมไปจนถึงมะเร็ง นอกจากนี้ ชาเขียวยังเป็น immunosuppressive agent คือยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ lymphocyptes ในหลอดทดลอง (Wilasrusmee et al., 2002) เป็นต้น

งานวิจัยชิ้นนี้ คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาคุณสมบัติของพิเพอรีน หรือ Piperine (1-piperoyl peperdine) ซึ่งเป็นสาร alkaloid ที่ได้จากดีปลี (*Piper longum* Linn.) และ พริกไทยดำ หรือ Black pepper (*Piper nigrum* Linn.) โดยปกติมักใช้ในการปรุงรสอาหาร ซึ่งจะมีรสเผ็ดอันเนื่องมาจากสารพิเพอรีนนั่นเอง ในภูมิภาคต่างๆ ของโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในแถบเอเชียแปซิฟิก เช่น อินเดีย มีการนำพริกไทยมาใช้ในการรักษาโรคบางชนิด เช่น หนองใน อาการปวดประจำเดือน วัณโรค และการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (Singh, 1992) นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการรักษาอาการปวด การขับถ่ายปัสสาวะ ลดการตึงของกล้ามเนื้อ และบรรเทาอาการวิตก (Singh and Blue Menthal, 1997) มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รายงานว่า พิเพอรีนสามารถยับยั้งการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง และลดอาการอักเสบได้ (Virinder et al.,1997 และ Mittal et al., 2000) อีกทั้งยังยับยั้งการทำงานของ P450 isoenzymes (Atal et al., 1985) ยับยั้งการสังเคราะห์ prostaglandin และ leukotriene ในหลอดทดลอง (Stohr et al., 2001) จากงานวิจัยล่าสุดในสัตว์ทดลองพบว่าพิเพอรีนมีฤทธิ์ Immunomodulatory และ antitumor activity ในสัตว์ทดลอง โดยพบว่าพิเพอรีนกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์จากไขกระดูก กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงแกะ การเพิ่มจำนวนของ plaque forming cells ในม้าม และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Dalton's lymphoma ascites cells (DLA), Ehrlich ascites carcinoma cells (EAC) และ Mouse fibrosarcoma cells (L929) ในหลอดทดลอง และยังพบว่าพิเพอรีนสามารถลดขนาดและการเจริญของเซลล์มะเร็ง DLA และ EAC ในสัตว์ทดลอง (Sunila et al., 2004) และมีฤทธิ์ antimetastatic activity (Pradeep, 2002) นอกจากนี้ พิเพอรีนยังมีผลยับยั้งการสร้าง nuclear factor-kB (NF-kB), c-Fos, CREB, ATF-2 และ proinflammatory cytokine ใน B16F-10 melanoma cells (Kuttan, 2004)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานใดๆ กล่าวถึง Immunomodulatory activity ของพิเพอรีนต่อเซลล์ปกติของมนุษย์ และ Antitumor activity ของ piperine ต่อเซลล์มะเร็ง H9 (Human T cell lymphoma) : ATCC HTB-176 คณะผู้วิจัยจึงประสงค์จะทำการทดสอบคุณสมบัติ Immunomodulatory activity ของสารสกัดจากพริกไทยดำ (piperine) และสารสังเคราะห์ (piperic acid) ซึ่งคาดว่าเป็น degradation form ของ piperine โดยจะทำการศึกษาผลกระทบของสารต่อ Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย mitogens และ antigen ในหลอดทดลอง และศึกษาควบคู่ไปกับ antitumor activity ของสารต่อเซลล์มะเร็ง H9 ในหลอดทดลอง

แต่เนื่องจากปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ในขั้นตอนการวิจัย รวมทั้งปัญหาเงินทุนวิจัยที่ไม่เพียงพอต่อการทำงานวิจัยชิ้นนี้ให้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ข้างต้น ผู้วิจัยจึงได้ปรับเปลี่ยนแผนงานวิจัย และได้เสนอขอทุนวิจัยเพิ่มเติมจากแหล่งทุนอื่นๆ เพื่อศึกษาวิจัยและทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในด้านต่างๆ ของสารสกัดจากพริกไทยดำและพิเพอรีนร่วมด้วย และสรุปได้เป็นวัตถุประสงค์การวิจัยใหม่ เปรียบเทียบกับแผนงานเดิม ดังนี้

วัตถุประสงค์เดิม

1. เพื่อศึกษาผลของพิเพอรีนและสารสังเคราะห์ piperic acid ต่อการตอบสนองของ Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ในหลอดทดลอง (ทดสอบกับเซลล์จากคนปกติและเซลล์จากผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซี โดยทำการตรวจวัดโดย MTS assay)
2. เพื่อศึกษาผลของพิเพอรีนและสารสังเคราะห์ piperic acid ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง H9 (Human T cell lymphoma) ในหลอดทดลอง

วัตถุประสงค์ใหม่

1. เพื่อศึกษาผลของพิเพอรีนต่อการเจริญของ Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ในหลอดทดลอง โดยทำการตรวจวัดโดย MTS assay
2. เพื่อศึกษาผลของพิเพอรีนต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) มะเร็งเม็ดเลือดขาว (H9 และ Jurkat)
3. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) ในหลอดทดลอง

ทั้งนี้ ได้มีเงินทุนวิจัยจากแหล่งทุนอื่นที่นำมาใช้ร่วมในโครงการวิจัยชิ้นนี้ ได้แก่

ลำดับที่	สถานภาพ	หัวข้อเรื่อง	แหล่งทุน	ปีที่ได้
1	หัวหน้าโครงการ	Immunomodulatory activity of Piperine on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells	Asahi Glass Foundation (209,150 บาท)	ปีงบประมาณ 2550
2	หัวหน้าโครงการ	ฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์ชนิดต่างๆ	กองทุนคณะสหเวชศาสตร์ (64,000 บาท)	ปีงบประมาณ 2551
3	หัวหน้าโครงการ (อาจารย์ที่ปรึกษา)	การศึกษาผลของสารสกัดจากพริกไทยดำ (piperine) ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง	ทุนอุดหนุนการทำวิทยา - นิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา (20,000 บาท)	ปีงบประมาณ 2548

โดยมีรายละเอียดแผนงานวิจัยตามวัตถุประสงค์ใหม่ ดังรายละเอียดด้านล่างนี้

ระเบียบวิธีวิจัย ให้แสดงการวางแผนการวิจัย และลำดับขั้นตอนการวิจัย (ถ้ามี)

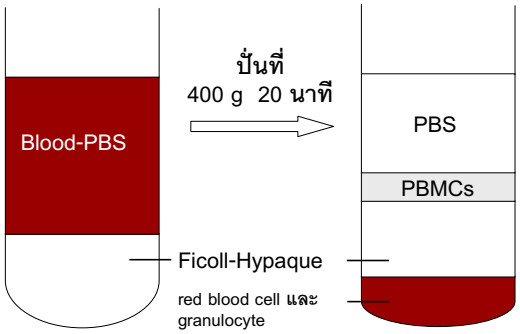
เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ งานวิจัยจะถูกแบ่งออกเป็นขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

ขั้นที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อการเจริญของ Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ในหลอดทดลอง

1.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs)

หลักการ

ในการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวปกตินั้น อาศัยหลักการ Density gradient centrifugation (Bunn et al., 2002) โดยการเจาะเลือดตัวอย่างจากเส้นเลือดดำใส่ใน EDTA tube จากนั้นเจือจางเลือดตัวอย่างด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:1 นำเลือดที่ได้ไปปั่นที่ 800 g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนน้ำเลือด (plasma) ที่อยู่ด้านบนออก เติม PBS ให้เท่ากับปริมาณ plasma ที่ดูดออก ผสมให้เข้ากันก่อนย้ายไปใส่ในหลอดที่มี Ficoll-Hypaque (Density = 1.077) โดยการปิเปตต์เลือดลงไปในน้ำยาช้าๆ ด้วยอัตราส่วนของเลือดต่อน้ำยาเท่ากับ 4:3 นำไปปั่นที่ 400 g เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดเก็บส่วน PBMCs ซึ่งอยู่ระหว่างชั้นของ Ficoll-Hypaque กับ PBS (ดังรูปที่ 1) นำไปปั่นล้างด้วย PBS ที่ 400 g เป็นเวลา 5 นาที 2 รอบ เทส่วน supernatant ทิ้งไปแล้ว resuspend เซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1-2 ml แล้วตรวจนับด้วย Trypan Blue Exclusion Method (Strober, 1991)



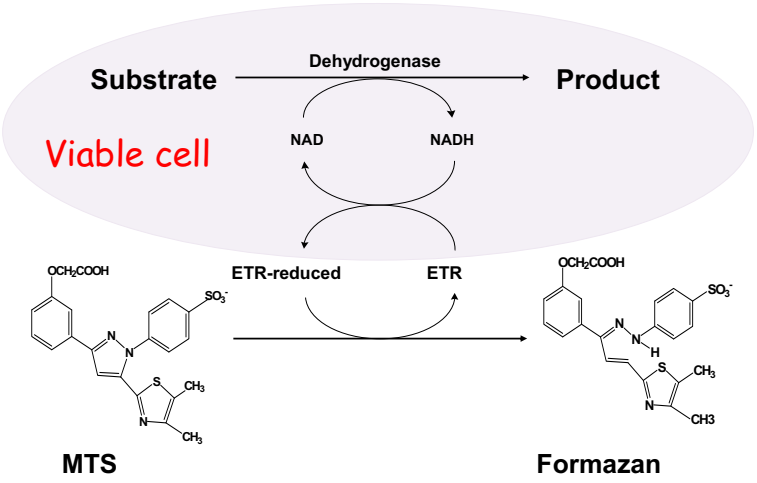
รูปที่ 1 การแยกเม็ดเลือดขาว PBMCs

1.2 การตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ชนิดต่าง ๆ โดย MTS assay

หลักการ

อาศัยหลักการทำให้เกิดสี (colorimetric method) โดยมีสารประกอบ MTS หรือ tetrazolium (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) เป็นสารตั้งต้นและ phenazine ethosulfate (PES) ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลกตรอน สารประกอบ MTS จะถูกรีดิวซ์โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ไปเป็นผลผลิต formazan ซึ่งเป็นสารที่มีสีและสามารถละลายได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เราสามารถวัดปริมาณผลผลิต formazan ที่เกิดขึ้นได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต การเปลี่ยนสาร

ประกอบ MTS ให้กลายเป็นผลผลิต formazan นั้น อาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ทำให้ Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) ถ่ายเทอิเลกตรอนให้แก่ PES โดย PES ที่ถูกรีดิวส์จะไปรีดิวส์สารประกอบ MTS ให้กลายเป็นผลผลิต formazan ในที่สุด (ดังรูปที่ 2) (Riss and Moravec, 1996) โดยงานวิจัยครั้งนี้ใช้น้ำยา CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, สหรัฐอเมริกา) ในการตรวจสอบ



รูปที่ 2 กระบวนการเมตาบอลิสมของเซลล์ทำให้สารประกอบ MTS เปลี่ยนเป็น formazan

1.3 การตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์

หลังจากแยกเม็ดเลือดขาวปกติได้แล้ว เพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวน 1 x 10^5 เซลล์ต่อ 200 µl ต่อหลุม ใน 96-well plate โดยกระตุ้นการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาวด้วย Phytohemagglutinin (PHA) 5 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำไปทดสอบด้วย 1) 0.5% DMSO (ตัวทำละลายสาร) 2) พิเพอรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1 – 100 µg/ml 3) ยา Actinomycin D 1 ug/ml (positive control) และ 4) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่ม (incubate) ในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ชนิดต่างๆ โดย MTS assay ที่กล่าวมาข้างต้น

2. การตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่าง ๆ

2.1 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) มะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa)

เตรียมเซลล์ก่อนทำการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งจำนวน 5 x 10^3 เซลล์ต่อ 200 µl ต่อหลุม ใน 96-well plate นำไปทดสอบด้วย 0.5% DMSO (ตัวทำละลายพิเพอรีน) พิเพอรีน ความ

เข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1–100 µg/ml ยา Paclitaxel 30 nM (positive control) และในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.2 มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด H9 และ Jurkat

เตรียมเซลล์มะเร็ง H9 และ Jurkat ในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ (fresh media) 24 ชั่วโมง โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งจำนวน 5 x 10^3 เซลล์ต่อ 200 µl ต่อหลุม ใน 96-well plate ทดสอบด้วย 1) 0.5% DMSO (ตัวทำละลายพิเพอรีน) 2) พิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1–100 µg/ml 3) ยา Paclitaxel 30 nM (positive control) และ 4) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาการทดสอบ เติม MTS reagent (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) 20 µl ลงในแต่ละหลุม บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อครบเวลา นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปปั่นที่ 1500 rpm 5 นาที และเก็บส่วนน้ำใสในจานเพาะเลี้ยงใหม่เพื่อนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดยใช้ 96-well plate reader จากนั้นคำนวณค่า (IC_{50}) ของพิเพอรีน หรือค่าความเข้มข้นของพิเพอรีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติและเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่างๆ ได้ 50 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ หาความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญของเซลล์กับความเข้มข้นของพิเพอรีนจากกราฟระหว่างความเข้มข้นของพิเพอรีนและค่าการดูดกลืนแสง (Barnett et al., 2002)

3. การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อ H9 และ Jurkat

3.1 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

3.1.1 การตรวจวัด Lactate Dehydrogenase (LDH) activity

หลักการ

เซลล์ตายหรือเซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย จะปล่อย LDH ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยปฏิกิริยา coupled enzymatic reaction โดย tetrazolium salt จะถูกรีดิวซ์ไปเป็นผลผลิต formazan salt ซึ่งมีสีแดง (ดังรูปที่ 3) จำนวนเซลล์ที่ตายหรือเซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย จะส่งผลให้มีปริมาณของ LDH สูงขึ้น และเป็นสัดส่วนโดยตรงกับผลผลิต formazan ที่เกิดขึ้น สามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 492 นาโนเมตร โดยใช้ 96-well plate reader

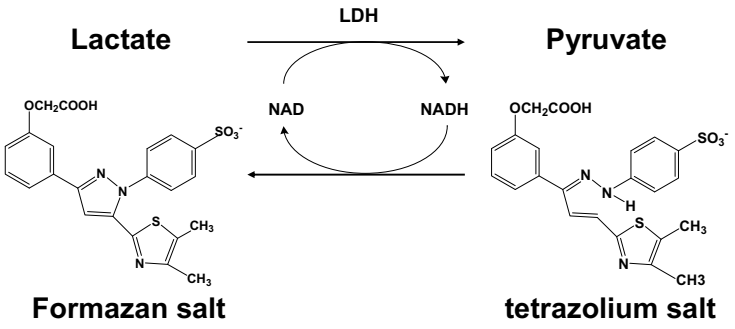
การทดลอง

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง H9 และ Jurkat จำนวน 5 x 10^3 เซลล์ต่อ 100 µl ต่อหลุม ในสภาวะต่างๆ ดังนี้ 1) 0.5% DMSO 2) พิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1–100 µg/ml 3) ยา Paclitaxel 30 nM และ Camptothecin 145 nM (positive control) และ 4) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบใดๆ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำมาตรวจสอบโดยใช้ cytotoxicity detection kit (Roche, เยอรมัน) เติม Reaction mixture 100 µl ลงในแต่ละ

หลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15-25 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม Stop solution 50 µl ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 492 นาโนเมตร โดยใช้ 96-well plate reader จากนั้นคำนวณ %cytotoxicity โดย

$$\%\text{cytotoxicity} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{sample}} - \text{Absorbance}_{\text{low control}}}{\text{Absorbance}_{\text{high control}} - \text{Absorbance}_{\text{low control}}} \times 100$$

โดย low control หมายถึง เซลล์ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ
high control หมายถึง เซลล์ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบและถูกทำลายด้วย lysis buffer



รูปที่ 3 กระบวนการเมตาบอลิสมของเซลล์ทำให้ tetrazolium salt เปลี่ยนเป็น formazan salt

3.1.2 การตรวจวัด Cell viability ด้วย Trypan blue dye exclusion method

การทดลอง

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (H9 และ Jurkat) จำนวน 2.5 x 10^4 เซลล์ต่อ 1 ml ต่อหลอด ในสภาวะต่างๆ กัน ดังนี้ 1) 0.5% DMSO 2) พิเพอรีนความเข้มข้น 20 µg/ml 3) ยา Paclitaxel 30 nM (positive control) และ 4) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบใดๆ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ไม่มีชีวิตโดยใช้ Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ที่กำลังขยาย 400 เท่าและคำนวณร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%cytotoxicity)

$$\text{ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (\%cytotoxicity)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ไม่มีชีวิต}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

นอกจากนี้ยังทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ภายหลังการทดสอบในสภาวะต่างๆ ด้วย และคำนวณจำนวนเซลล์

3.2 การศึกษาผลกระทบของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่าง ๆ (Cell cycle analysis)

หลักการ

Propidium iodide (PI) เป็นสารเรืองแสงชนิดหนึ่ง สามารถย้อมติดสีดีเอ็นเอได้ จึงทำการตรวจวัดระดับการเรืองแสง ทำให้ทราบปริมาณดีเอ็นเอและจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะได้ โดยใช้เครื่อง Flow cytometer

การทดลอง

จากรายงานการวิจัยที่ทำการทดสอบเพื่อศึกษา Cell cycle analysis พบว่ามีการศึกษาทั้งใน nonsynchronized และ synchronized cells ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาในเซลล์ทั้ง 2 แบบ ในการเตรียม nonsynchronized cells ทำได้โดยการเพาะเลี้ยง Jurkat ในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ (fresh media) 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบที่ผ่านมา ส่วน synchronized cells เตรียมโดยการไม่ให้สารอาหารแก่เซลล์ โดยการทำ serum starvation เป็นเวลา 24 ชั่งโมงก่อนทำการทดสอบ (Safadi-Chamberlain et al., 2005) ทั้งนี้ในการเตรียม synchronized cells สามารถทำได้หลายวิธี โดยเป็นการ synchronize ให้ได้เซลล์ที่เจริญอยู่ในระยะเดียวกัน เช่น การใช้ยา สารเคมี รวมถึง serum starvation (Manguikian and Barbour , 2004, Ramos-Morales et al., 2000, Gao and Dou., 2000) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกที่สุดในการ synchronized เซลล์ ผลการทดสอบไม่พบข้อแตกต่างระหว่างการใช้ nonsynchronized และ synchronized cells แต่อย่างใด อีกทั้งยังมีรายงานกล่าวถึงการทดสอบโดยใช้ synchronized cells อาจให้ผลไม่ใกล้เคียงกับการเจริญของเซลล์ตามปกติ ในการทดสอบนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ nonsynchronized cells เช่นเดียวกับการทดสอบอื่นๆ ข้างต้น

ทำการเพาะเลี้ยง Jurkat จำนวน 2.5 x 10^5 เซลล์ต่อ 5 ml ต่อหลุมในสภาวะที่มี 1) 0.5% DMSO 2) พิเพอรีนความเข้มข้น 20-100 µg/ml 3) ยา Camptothecin 145 nM (positive control) และ 4) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์ไปปั่นที่ 1500 rpm 5 นาที ทิ้งส่วน supernatant แล้วปั่นล้างด้วย PBS จากนั้นเติม 35% ethanol 1 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ย้อมด้วย 50 µg/ml propidium iodide/ 100 µg/ml RNase A solution จำนวน 500 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืด นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, สหรัฐอเมริกา) คำนวณเปอร์เซนต์ของเซลล์ในแต่ละระยะด้วยโปรแกรม CellQuest (BD Bioscience, สหรัฐอเมริกา) (Center et al., 2004)

3.3 การศึกษาฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อการเกิด Apoptosis

3.3.1 ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ (Cell morphology) ผ่าน Fluorescent Microscope

การทดลอง

เพาะเลี้ยงเซลล์ Jurkat จำนวน 2.5 x 10^5 เซลล์ต่อ 5 ml ต่อหลุม ในสภาวะที่มี 1) 0.2% DMSO 2) พิเพอรีนความเข้มข้น 40 µg/ml 3) ยา Camptothecin 2 และ 10 uM (positive control) และ 4) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปปั่นที่ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วน supernatant ปั่นล้างเซลล์ด้วย cold PBS และ resuspend ด้วย cold PBS 25 µl จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย Acridine orange / Ethidium bromide (ความเข้มข้น 100 µg/ml) 2 µl และประเมินสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยใช้กล้องฟลูออเรสเซนต์ (Olympus Optical, ญี่ปุ่น) กำลังขยาย 400X โดย Live cells หรือเซลล์ที่มีชีวิตจะพบนิวเคลียสมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันและย้อมติดสีเขียว Apoptotic cells จะมีนิวเคลียสหดเป็นก้อนหรือเห็นเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอภายใน ย้อมติดสีเขียวหรือส้ม และ Necrotic cells จะมีนิวเคลียสลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันเหมือนเซลล์ที่มีชีวิตแต่ย้อมติดสีส้ม (Ribble et al., 2005)

3.3.2 ตรวจสอบ DNA fragmentation โดย Gel electrophoresis

หลักการ

การตายแบบอะพอพโทซิสเป็นรูปแบบการตายที่มีการแตกหักของดีเอ็นเอร่วมด้วย สามารถตรวจวิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอได้โดยการสกัดดีเอ็นเอ และนำไปตรวจวัดชิ้นส่วนบนแผ่นวุ้นอะกาโรสด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส

การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยง Jurkat จำนวน 3 x 10^6 เซลล์ต่อ15 ml ในสภาวะที่มี 1) 0.2% DMSO 2) พิเพอรีนความเข้มข้น 40 µg/ml 3) ยา Camptothecin 2 และ 10 µM (positive control) และ 4) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอ Flexigene DNA kit (บริษัท QIAGEN GmbH, เยอรมัน) โดยการปั่นตกตะกอนเซลล์ นำเซลล์ที่ได้ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml เติม Buffer FG1 100 µl ลงไปแล้วผสมโดยการปิเปตขึ้นลง จากนั้นเติม Buffer FG2 /QIAGEN Protease 100 µl ผสมโดยการกลับหลอดไปมา 3 ครั้ง นำไปบ่มในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (heat block) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที เติม 100% isopropanol 200 µl แล้วผสมโดยการกลับหลอดไปมา จนเห็นตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitate) นำไปปั่นที่ 10,000x g เป็นเวลา 3 นาที เทส่วน supernatant ทิ้งไป แล้วคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชู เติม 70% Ethanol 200 µl และผสมโดยใช้เครื่องเขย่าผสม 5 วินาที นำไปปั่นที่ 10,000x g เป็นเวลา 3 นาที เทส่วน supernatant ทิ้งแล้วคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูนานอย่างน้อย 5 นาที จากนั้นปั่นแห้งอย่างน้อย 5 นาที เติม Buffer FG3 30 µl ผสมโดยใช้เครื่องเขย่าผสมที่ความเร็วต่ำ 5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาเติมน้ำกลั่น 70 µl ลงในดีเอ็นเอที่สกัดได้ เติม Sodium

acetate ความเข้มข้น 3 mol/l จำนวน 10 µl และ 100% Ethanol 220 µl ผสมโดยใช้เครื่องเขย่าผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปปั่น 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วน supernatant ทิ้งแล้วปั่นล้างด้วย 70% Ethanol จากนั้นเทส่วน supernatant ทิ้ง นำไปปั่นแห้งแล้วเติมน้ำกลั่น 20 µl บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้และทำอิเลคโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้นอะกาโรสต่อไป

การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm (OD_{260}) จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสูตร (Sambrook et al., 1989)

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (µg/ml) = OD_{260} x dilution factor x 50

คำนวณปริมาณของดีเอ็นเอที่ต้องการในแต่ละตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากัน เพื่อนำไปทำอิเลคโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้นอะกาโรส

การทำอิเลคโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้นอะกาโรส (Agarose Gel Electrophoresis)

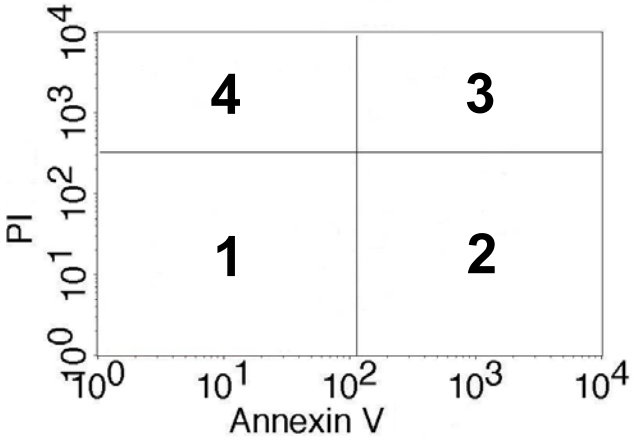
เตรียม 1% agarose ใน 0.5X TBE buffer โดยการชั่ง agarose จำนวน 1 g เติม 0.5X TBE buffer ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วละลายโดยใช้เครื่องไมโครเวฟ จากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 5 นาที จึงเท 1% agarose ลงในถาดเทเจล วางซี่หวี (comb) และปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว เทบัฟเฟอร์ลงไปเล็กน้อย ค่อยๆ ดึงซี่หวีออก เติมบัฟเฟอร์ให้ท่วมแผ่นเจล โดยให้สูงเหนือแผ่นเจลประมาณ 1-2 cm ผสมดีเอ็นเอที่สกัดไว้กับสีย้อม (loading dye) ให้เข้ากัน หยอดลงในหลุมของแผ่นวุ้นอะกาโรสที่เตรียมไว้ โดยเว้นหลุมแรกสำหรับหยอดดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) จากนั้นให้กระแสไฟขนาด 90 โวลต์เข้าในเครื่องเป็นเวลา 50 นาที ดีเอ็นเอจะเคลื่อนย้ายไปยังขั้วแอโนดตามขนาดของน้ำหนักโมเลกุล เมื่อครบเวลา ย้อมดีเอ็นเอบนแผ่นเจลด้วย Ethidium Bromide เป็นเวลา 20 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที นำแผ่นเจลที่ผ่านการย้อมแล้วไปตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่องตรวจสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Documentation System)

3.3.3 ตรวจสอบปริมาณ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์โดยเครื่อง Flow cytometer

หลักการ

การตรวจสอบเซลล์ที่ membrane ถูกทำลายสามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Annexin V assay เมื่อเซลล์เริ่มเกิด Apoptosis จะส่งผลให้ PS ซึ่งอยู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์เคลื่อนที่ไปยังด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ Annexin V ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับประจุลบของ PS ได้ดี (high affinity) จึงถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบครั้งนี้ เมื่อเชื่อม annexin V กับสารเรืองแสง (fluorescein) เช่น FITC ร่วมกับการใช้ PI ซึ่งสามารถย้อมติดดีเอ็นเอจะช่วยในการตรวจสอบการตายแบบอะพอพโทซิสโดยใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ได้ โดยเซลล์ที่อยู่ในช่องที่ 1

(Annexin V ^{neg} – PI ^{neg}) หมายถึงเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่อยู่ในช่องที่ 2 (Annexin V ^{pos} – PI ^{neg}) หมายถึงเซลล์ที่อยู่ในระยะ Early Apoptosis เซลล์ที่อยู่ในช่องที่ 3 (Annexin V ^{pos} – PI ^{pos}) หมายถึงเซลล์ที่อยู่ในระยะ Late Apoptosis และเซลล์ที่ตายแล้ว (ดังรูปที่ 4) (Koopman et al., 1994, Martin 1995, Vermes et al., 1995)



รูปที่ 4 แสดงบริเวณเซลล์ในระยะต่างๆ

การทดลอง

ทำการเพาะเลี้ยง Jurkat จำนวน 2.5 x 10^5 เซลล์ต่อ 5 ml ในสภาวะที่มี 1) 0.5% DMSO 2) พิเพอรีน ความเข้มข้น 20 - 100 µg/ml 3) ยา Camptothecin 145 nM (positive control) และ 4) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการย้อมเซลล์ด้วยน้ำยา Annexin V staining (BD Biosciences, สหรัฐอเมริกา) โดยปั่นที่ 1500 rpm 5 นาที ปั่นล้างด้วย cold PBS 2 ครั้ง แล้ว resuspend ด้วย 1x binding buffer 100 µl จากนั้นเติม Annexin V-FITC 5 µl และ propidium iodide 5 µl ค่อยๆ ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาทีในที่มืด เติม 1x binding buffer 400 µl จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, สหรัฐอเมริกา) คำนวณเปอร์เซนต์ของเซลล์ในแต่ละระยะด้วยโปรแกรม CellQuest (BD Bioscience, สหรัฐอเมริกา)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ค่าที่ได้จากการทดสอบจะนำเสนอในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบซ้ำ (Tripicate) และทำการทดลองซ้ำอย่างน้อยสามครั้งในแต่ละการทดลอง การวิเคราะห์ทางสถิติจะใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of varience, ANOVA) ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบหลายๆ กลุ่ม และ Post Hoc test ของ Dunnett โดยค่า *p-value* < 0.05 จึงจะถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

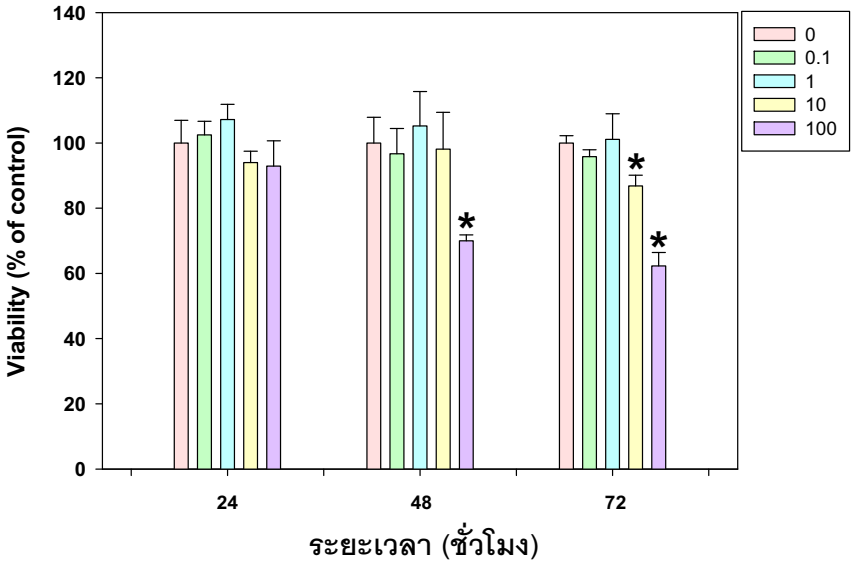
ผลการวิจัย

1. ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์

พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์ (PBMCs) ในหลอดทดลอง

จากการทดสอบผลกระทบของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์ (PBMCs) ในสภาวะที่มี mitogen และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีพิเพอรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิต โดยวิธี MTS assay ผลการทดลอง พบว่าพิเพอรีนสามารถยับยั้งการเจริญของ PBMCs ได้ ดังแสดงในรูปที่ 5

ทั้งนี้เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ยับยั้งการเจริญของ PBMCs ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 70.0% และ 62.3% ตามลำดับ ในขณะที่พิเพอรีนที่ความเข้มข้น 10 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ PBMCs ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 86.8% พิเพอรีนที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบคือ 100 µg/ml ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ H9 ได้โดยมีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 17.7 $\pm$ 2.9% (รูปที่ 7) และยับยั้งการเจริญของ Jurkat ได้โดยมีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 43.1 $\pm$ 2.85% ซึ่งออกฤทธิ์ได้ดีกว่าการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ PBMCs (รูปที่ 11) คณะผู้วิจัยกำลังอยู่ในระหว่างการศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อ PBMCs



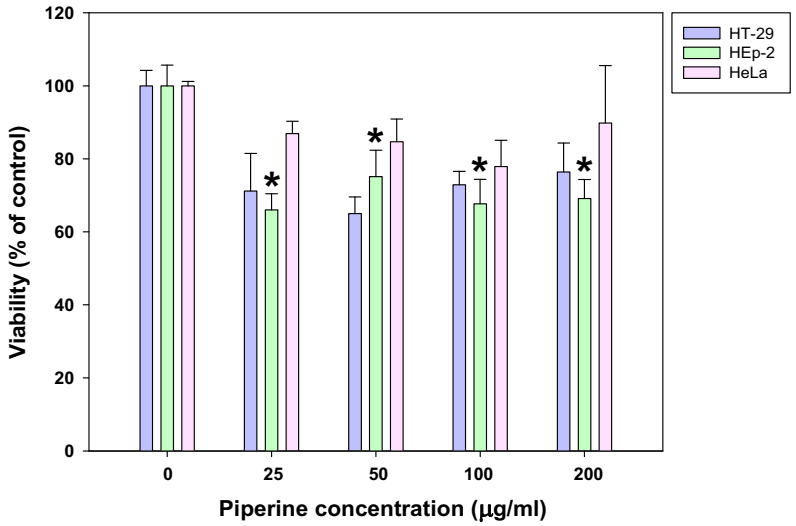
รูปที่ 5 แสดงผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์ เพาะเลี้ยงเซลล์1 x 10^5 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม โดยกระตุ้นการแบ่งตัวของ PBMCs ด้วย PHA 5 µg/ml และทดสอบด้วยพิเพอรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1-100 µg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงเมื่อครบเวลา

ตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี MTS assay และคำนวนเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีพิเพอรีน ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ

พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ HT-29, HEp-2 และ HeLa ได้เพียงเล็กน้อย

ผลการทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ HT-29, HEp-2 และ HeLa ในหลอดทดลอง ภายหลังการบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และตรวจสอบการเจริญของเซลล์ โดยวิธี MTS assay ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 6

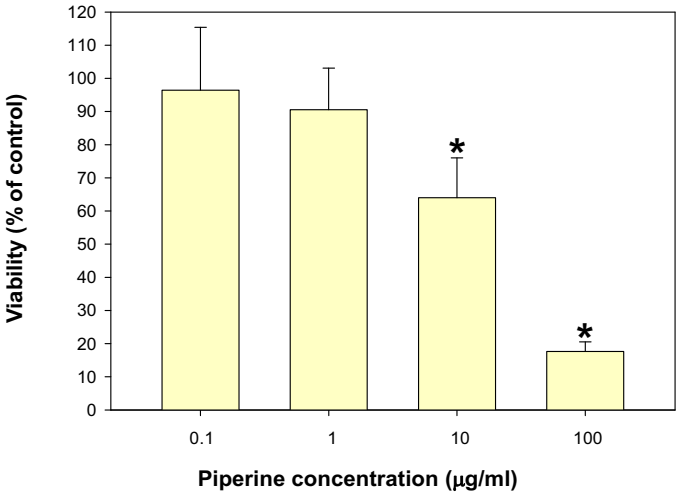


รูปที่ 6 แสดงผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ HT-29, HeLa และ HEp-2 เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มี พิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 25-200 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี MTS assay และคำนวนเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีพิเพอรีน ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการทดลองพบว่า พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ HT-29, HeLa และ HEp-2 ได้เพียงเล็กน้อยเมื่อทดสอบด้วยพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 200 µg/ml พบว่ายังคงมีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 76.4 %, 69.1% และ 89.8 % ตามลำดับ ทั้งนี้พิเพอรีนตั้งแต่ความเข้มข้น 25-200 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ HEp-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อ HEp-2 ไม่ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นแต่อย่างใด

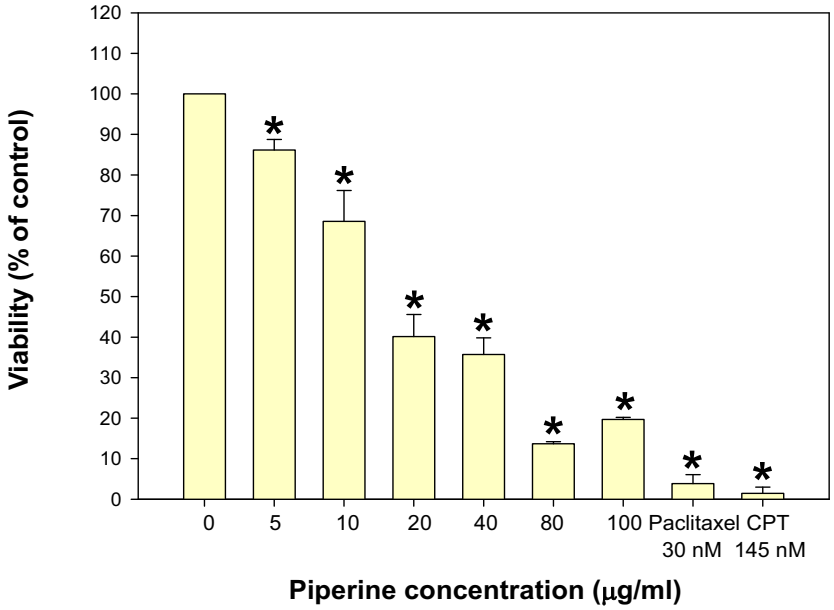
3. **พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ H9 ในหลอดทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ**

การทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1–100 µg/ml ในการยับยั้งการเจริญของ H9 ในหลอดทดลอง โดยบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และตรวจสอบการเจริญของเซลล์ โดยวิธี MTS assay ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ H9 เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มีพิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1-100 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเซลล์โดยวิธี MTS assay ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการทดสอบใน H9 พบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 100 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ H9 ได้ โดยมีเซลล์รอดชีวิตคิดเป็น 17.7 $\pm$ 2.9% เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าการยับยั้งการเจริญของ H9 มีลักษะเป็น Dose-dependent effect โดยจะออกฤทธิ์ดีขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและมีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.7 $\pm$ 2.1 µg/ml ซึ่งเป็นการค้นพบการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นครั้งแรก ทั้งนี้พิเพอรีนที่ความเข้มข้นเพียง 5 µg/ml ก็สามารถยับยั้งการเจริญของ H9 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ H9 เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5x 10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มีพิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 5-100 μg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเซลล์โดยวิธี MTS assay ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ CPT หมายถึง Camptothecin

2. **ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์** (Cytotoxicity)

2.1 **พิเพอรีนเป็นพิษต่อ** H9

2.1.1 **ตรวจสอบความเป็นพิษต่อ** H9 **โดยการตรวจวัด** LDH activity

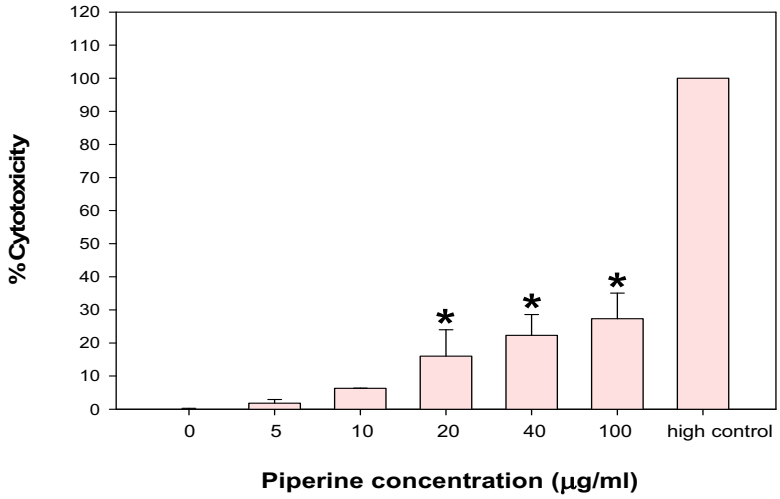
เซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย จะปล่อย LDH ออกมามากขึ้น LDH เป็นเอนไซม์ที่ไปย่อย lactate ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Formazan salt ที่เกิดสี ดังนั้นLDH activity จึงมีค่าแปรผันตามปริมาณ Formazan salt ที่เกิดขึ้น และสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของผลผลิตที่ 492 นาโนเมตรและคำนวณ %cytotoxicity ได้จากสมการ

$$\%\text{cytotoxicity} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{sample}} - \text{Absorbance}_{\text{low control}}}{\text{Absorbance}_{\text{high control}} - \text{Absorbance}_{\text{low control}}} \times 100$$

โดย low control หมายถึง เซลล์ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ

high control หมายถึง เซลล์ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบและถูกทำลายด้วย lysis buffer

จากการทดลองพบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 100 µg/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์ คิดเป็น 16.0%, 22.3% และ 27.3% cytotoxicity ตามลำดับ โดยเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของพิเพอรีน แสดงว่าพิเพอรีนเป็นพิษต่อ H9 ส่งให้มี LDH activity มากขึ้น ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 ผลของพิเพอรีนต่อ LDH activity ของ H9 เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มีพิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบ LDH activity โดยใช้ LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche, เยอรมัน) ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบซ้ำ 5 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.1.2 **ตรวจสอบความเป็นพิษต่อ** H9 **โดยวิธี** Trypan Blue Exclusion Method

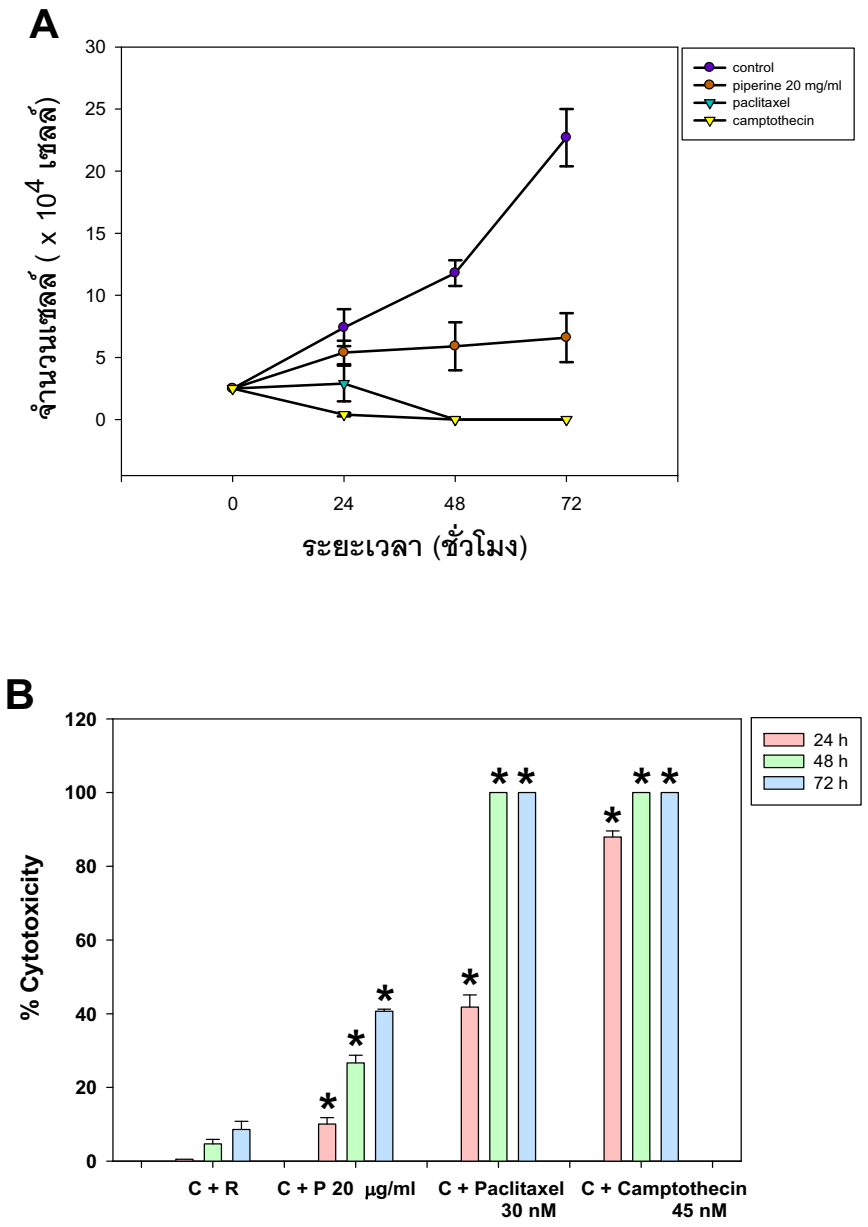
การศึกษาความเป็นพิษของพิเพอรีนต่อ H9 ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะต่างๆ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย trypan blue stain นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ไม่มีชีวิต และคำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%cytotoxicity)

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell/ml) = เซลล์ที่มีชีวิต x dilution factor x10^4 cell/ml

$$\text{ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์} = \frac{\text{เซลล์ที่ไม่มีชีวิต}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จำนวน H9 ที่มีชีวิตในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบคิดเป็น 22.7 $\pm$ 2.31 x10^4 เซลล์ ส่วนพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20 µg/ml ส่งผลให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงโดยมีค่าเท่ากับ 6.6 $\pm$ 1.97 x10^4เซลล์ ยืนยันได้ว่าพิเพอรีนมีผลทำให้จำนวนเซลล์ลดลง (ดังแสดงในรูปที่ 10A)

เมื่อทดสอบ H9 และพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20 µg/ml เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง พบว่า %cytotoxicity มีค่าเท่ากับ 12.5 $\pm$ 5.19%, 26.6 $\pm$ 2.1% และ 40.7 $\pm$ 0.58% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าพิเพอรีนมีความเป็นพิษต่อ H9 เพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น (time-dependent effect) (ดังรูปที่ 10B)



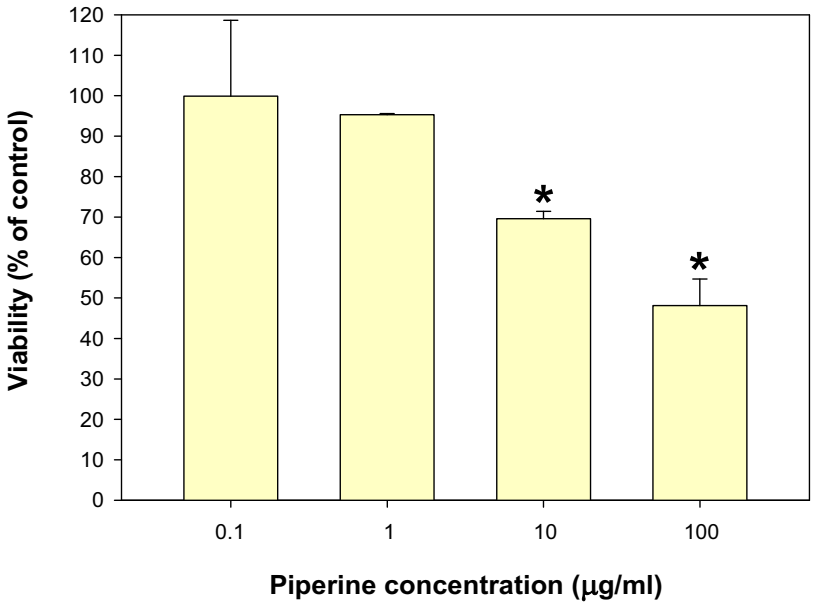
รูปที่ 10 แสดงผลการทดสอบ H9 ในสภาวะต่างๆ ได้แก่ 1) พิเพอรีน 20 µg/ml 2) ยา Paclitaxel 30 nM และ Camptothecin 145 nM (positive control) และ 3) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบใดๆ (negative control) เป็น

เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบซ้ำ 4 ครั้ง * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสาคัญทางสถิติ A) แสดงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในสภาวะต่างๆ ภายหลังการทดสอบ B) แสดง % cytotoxicity ในสภาวะต่างๆ ภายหลังการทดสอบ

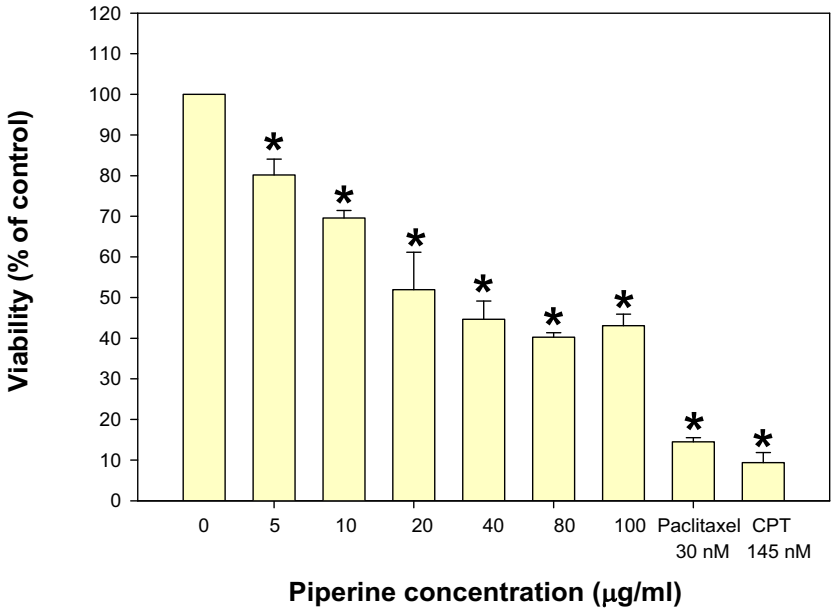
******* เมื่อทำการทดสอบมาถึงขั้นนี้ พบว่าเซลล์ H9 ตายไม่ทราบสาเหตุ ผู้วิจัยไม่สามารถหาเซลล์ H9 มาทำการทดลองต่อได้จึงเปลี่ยนไปทำการทดสอบกับ Jurkat แทน *******

4. พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ Jurkat ในหลอดทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1–100 µg/ml ในการยับยั้งการเจริญของ Jurkat ในหลอดทดลอง โดยบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และตรวจสอบการเจริญของเซลล์โดยวิธี MTS assay พบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น10 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ Jurkat ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 69.6 $\pm$ 1.82% ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ Jurkat เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5 x 10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มีพิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1-100 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเซลล์โดยวิธี MTS assay ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



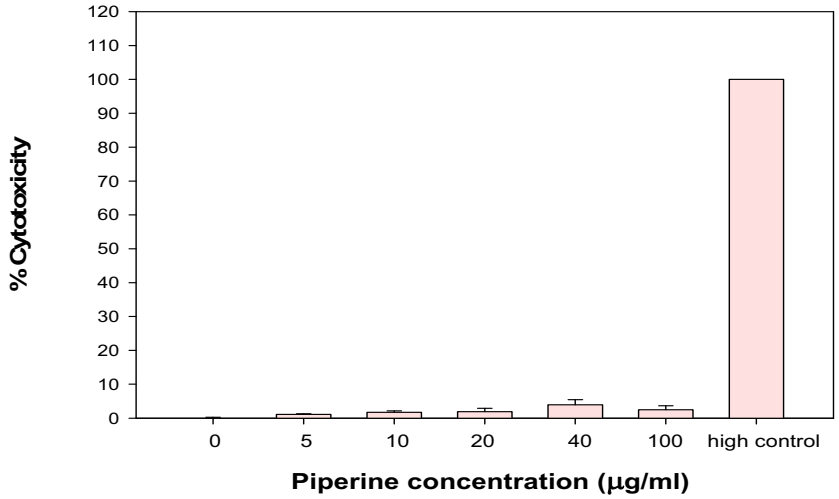
รูปที่ 12 ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ Jurkat เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มีพิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 5-100 μg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเซลล์โดยวิธี MTS assay ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ CPT หมายถึง Camptothecin

การทดสอบใน Jurkat พบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 5 μg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ Jurkat ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นตั้งแต่ 20-100 μg/ml ไม่พบว่าการยับยั้งเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยพบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 และ 100 μg/ml ส่งผลให้มีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 51.9 $\pm$ 9.22%, 44.7 $\pm$ 4.50%, 40.3 $\pm$ 1.08% และ 43.1 $\pm$ 2.85% ตามลำดับ ซึ่งการยับยั้งการเจริญของ Jurkat ที่ความเข้มข้น 20-100 μg/ml นั้นไม่แตกต่างกันเมื่อทดสอบค่าทางสถิติ ดังรูปที่ 12

2.2 **พิเพอรีนไม่เป็นพิษต่อ** Jurkat

2.2.1 **ตรวจสอบความเป็นพิษต่อ** Jurkat **โดยการตรวจวัด** LDH activity

เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจวัด LDH activity จากการทดลองพบว่า LDH activity มีค่าต่ำแม้ความเข้มข้นของพิเพอรีนจะสูงถึง 100 μg/ml แสดงให้เห็นว่าพิเพอรีนไม่มีความเป็นพิษต่อ Jurkat ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 13



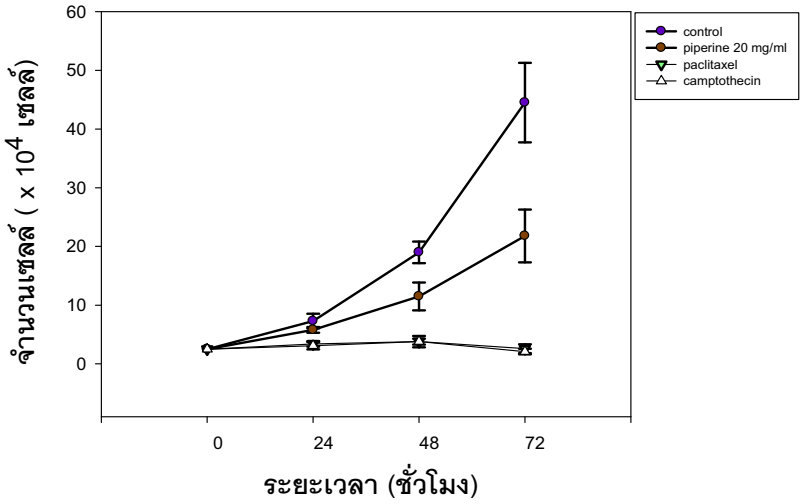
รูปที่ 13 ผลพิเพอรีนต่อระดับ LDH activity ของ Jurkat เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มีพิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบ LDH activity ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบซ้ำ 4 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.2.2 **ตรวจสอบความเป็นพิษต่อ** Jurkat **โดยวิธี** Trypan Blue Exclusion Method

ศึกษาความเป็นพิษของพิเพอรีนต่อ Jurkat โดยบ่มเซลล์ที่สภาวะต่างๆ กันเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการย้อมเซลล์ด้วย trypan blue stain และตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ไม่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%cytotoxicity) ดังสมการข้างต้น ผลที่ได้แสดงดังรูป 14

จากการทดลองพบว่า เมื่อบ่มเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบและในสภาวะที่มีพิเพอรีน 20 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าเท่ากับ $44.5 \pm 6.76\%$ และ $21.8 \pm 4.50\%$ ตามลำดับ แสดงว่าพิเพอรีนมีผลทำให้จำนวนเซลล์ลดลง (ดังรูปที่ 14)

นอกจากนี้ยังพบว่าในทุกสภาวะการทดสอบ ไม่พบเซลล์ที่ไม่มีชีวิต และมี %Viability เท่ากับ 100 ในทุกสภาวะ แสดงว่าพิเพอรีนมีผลทำให้การเจริญของเซลล์ลดลงโดยมิได้เป็นพิษต่อเซลล์แต่อย่างใด



รูปที่ 14 แสดงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ Jurkat ในสภาวะต่างๆ ได้แก่ 1) พิเพอรีน 20 µg/ml 2) ยา Paclitaxel 30 nM และ Camptothecin 145 nM (positive control) และ 3) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบใดๆ (negative control) เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบซ้ำ 4 ครั้ง * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปได้ว่า เมื่อทดสอบด้วยพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20 µg/ml จะส่งผลให้จำนวน H9 ลดลง และพิเพอรีนมีความเป็นพิษต่อ H9 ทำให้เซลล์ตายเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามเมื่อทดสอบด้วยพิเพอรีนที่ความเข้มข้นเดียวกันกลับพบว่าจำนวน Jurkat ลดลงแต่พิเพอรีนไม่เป็นพิษต่อ Jurkat แต่อย่างใด เช่นเดียวกับการออกฤทธิ์ของ Paclitaxel และ Camptothecin พบว่ายาทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของ Jurkat ได้ แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์แต่อย่างใด ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาวิจัยผลกระทบของพิเพอรีนต่อกลไกการเจริญของ Jurkat โดยการตรวจสอบผลกระทบของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่างๆ

3. ผลกระทบของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่าง ๆ

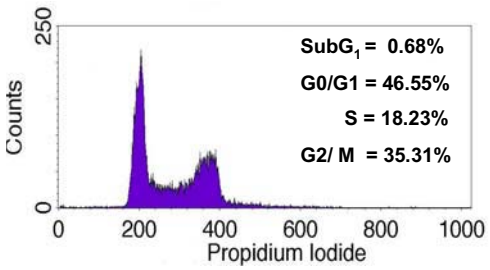
จากการทดสอบข้างต้นพบว่าพิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ Jurkat ได้โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการหยุดยั้งการเจริญของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle) ซึ่งตรวจสอบได้โดยการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ (DNA content) ของเซลล์ โดยทำการบ่มเซลล์ในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอและจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะภายหลังการย้อมด้วย Propidium Iodide โดยใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

จากการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 และ 100 µg/ml หยุดยั้งการเจริญของ Jurkat ได้ ส่งผลให้เซลล์ในระยะ G_0/G_1 เพิ่มขึ้นเป็น 50.54%, 52.02%, 50.86% และ 56.09% ตามลำดับ เทียบกับ 46.55% ในสภาวะควบคุม (ดังรูปที่ 15) เมื่อบ่มเซลล์ครบ 48 ชั่วโมงพบว่า พิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 และ 100 µg/ml หยุดยั้งการเจริญของ Jurkat ได้ ส่งผลให้การเจริญของเซลล์

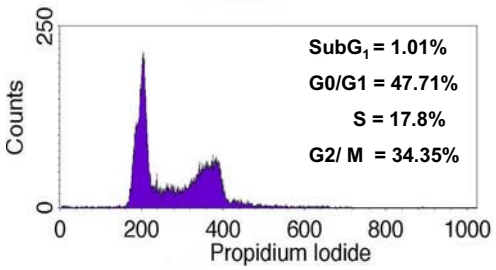
ในระยะ G_0/G_1 เพิ่มขึ้นเป็น 46.05%, 65.57%, 63.11% และ 62.50% ตามลำดับ เทียบกับ 43.79% ในสภาวะควบคุม (ดังรูปที่ 16) และเมื่อบ่มเซลล์ครบ 72 ชั่วโมง พบว่าเพอรีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 และ 100 µg/ml ส่งผลให้การเจริญของเซลล์ในระยะ G_0/G_1 เพิ่มขึ้นเป็น 45.49%, 62.63%, 66.26% และ 63.53% ตามลำดับ เทียบกับ 32.47% ในสภาวะควบคุม (ดังรูปที่ 17) จะเห็นได้ว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง พิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 และ 100 µg/ml หยุดยั้งการเจริญของ Jurkat ไว้ที่ระยะ G_0/G_1 ได้ 13.02%, 30.16%, 33.79% และ 31.06% ตามลำดับ

3.1 ผลของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่าง ๆ ที่เวลา 24 ชั่วโมง

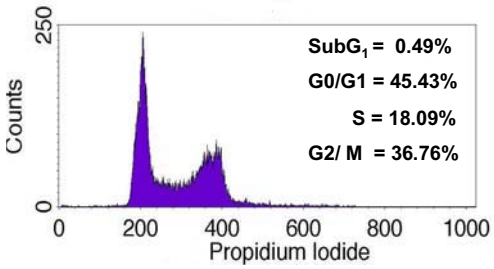
A) control



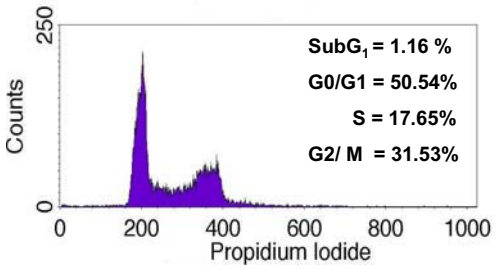
B) 0.2% DMSO



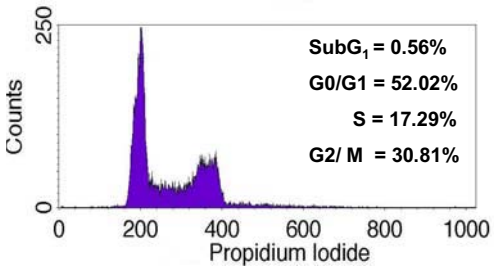
C) 0.5% DMSO



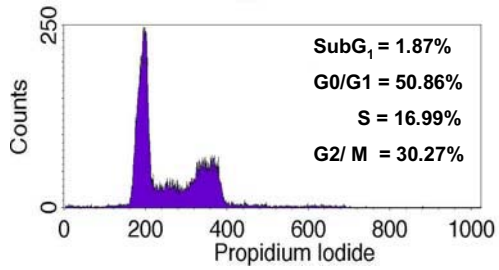
D) พิเพอรีน 20 µg/ml



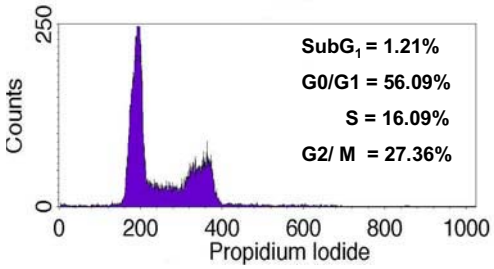
E) พิเพอรีน 40 µg/ml



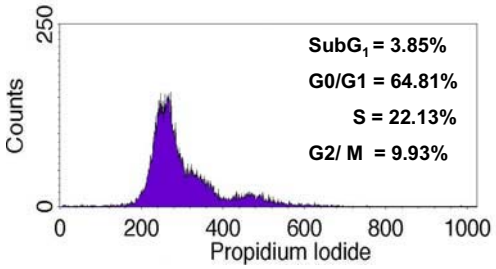
F) พิเพอรีน 80 µg/ml



G) พิเพอรีน 100 µg/ml



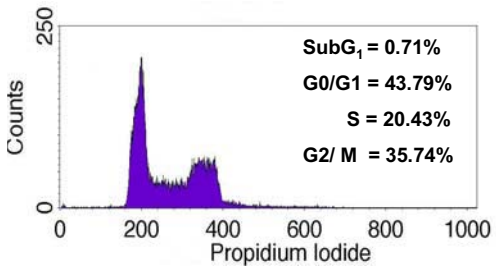
H) Camptothecin 145 nM



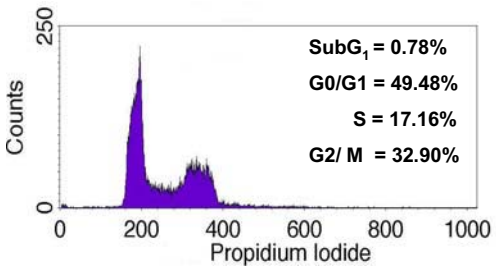
รูปที่ 15 แสดงผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยการย้อม propidium iodide และศึกษาจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ผลที่ได้แสดงในรูปของเปอร์เซนต์เซลล์ในแต่ละระยะ จากการทดสอบ 1 ใน 2 ครั้ง

3.2 ผลของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง

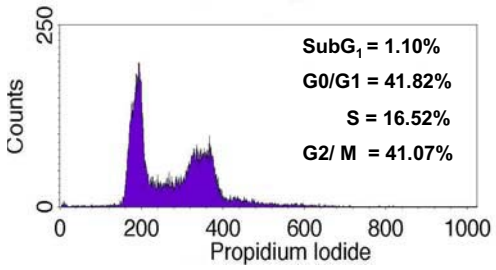
A) control



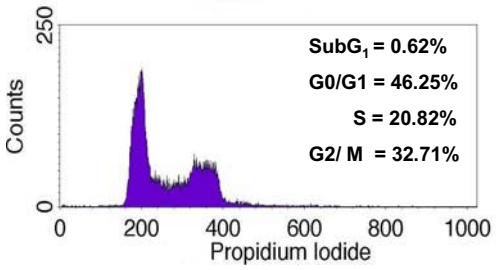
B) 0.2% DMSO



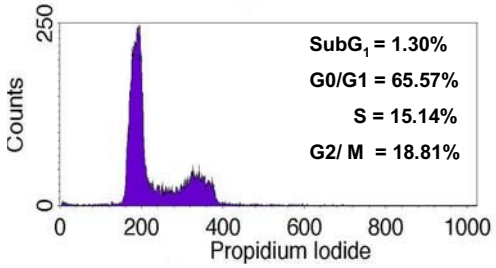
C) 0.5% DMSO



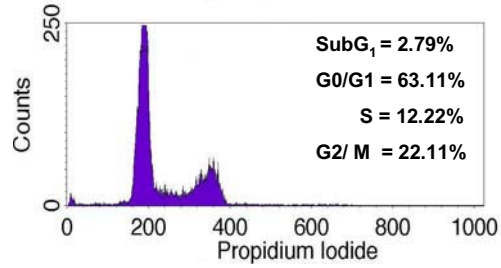
D) พิเพอรีน 20 µg/ml



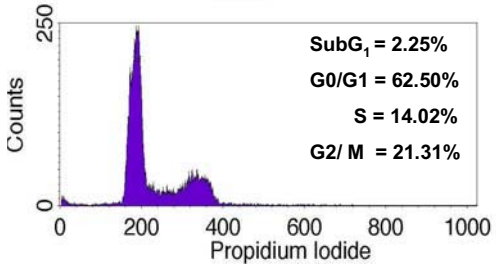
E) พิเพอรีน 40 µg/ml



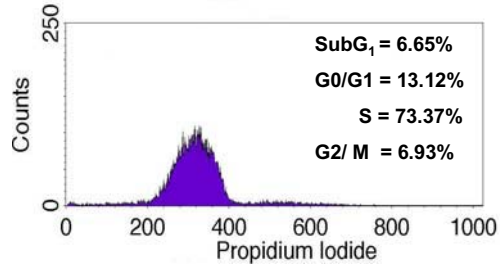
F) พิเพอรีน 80 µg/ml



G) พิเพอรีน 100 µg/ml



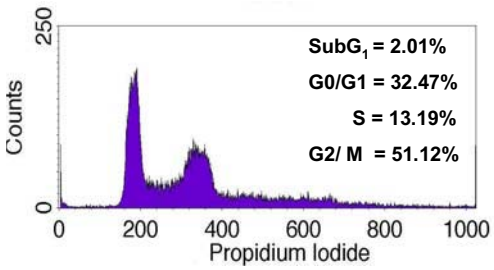
H) Camptothecin 145 nM



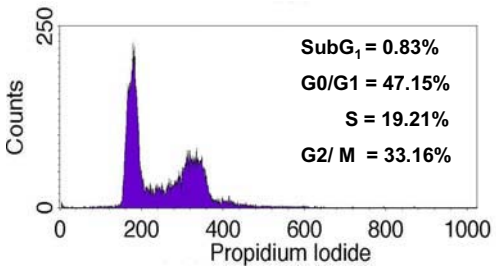
รูปที่ 16 แสดงผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยการย้อม propidium iodide และศึกษาจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ผลที่ได้แสดงในรูปของเปอร์เซนต์เซลล์ในแต่ละระยะ จากการทดสอบ 1 ใน 2 ครั้ง

3.3 ผลของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่าง ๆ ที่เวลา 72 ชั่วโมง

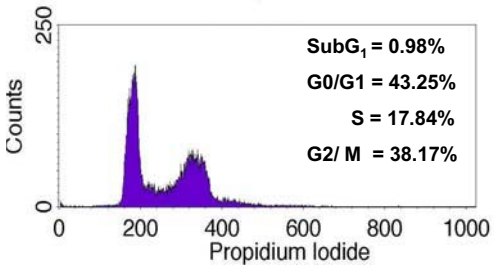
A) control



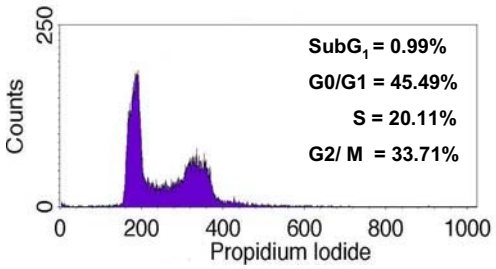
B) 0.2% DMSO



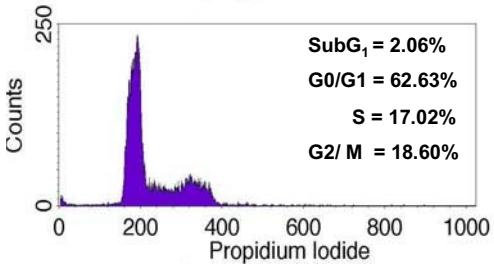
C) 0.5% DMSO



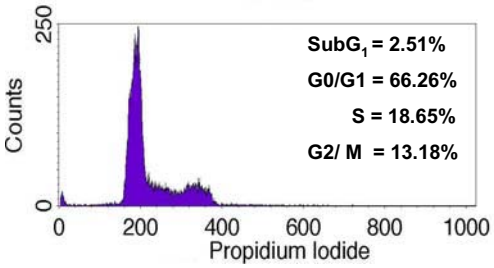
D) พิเพอรีน 20 µg/ml



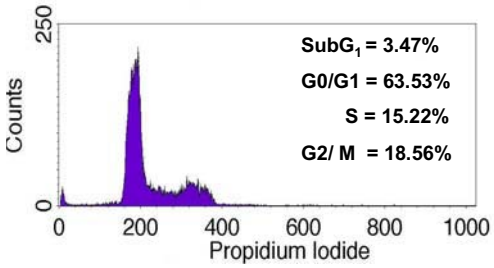
E) พิเพอรีน 40 µg/ml



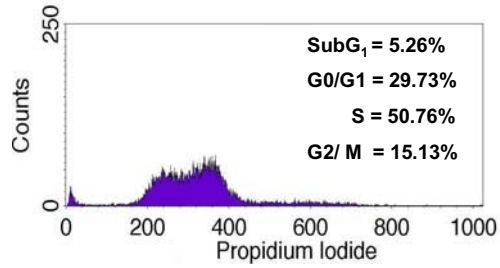
F) พิเพอรีน 80 µg/ml



G) พิเพอรีน 100 µg/ml

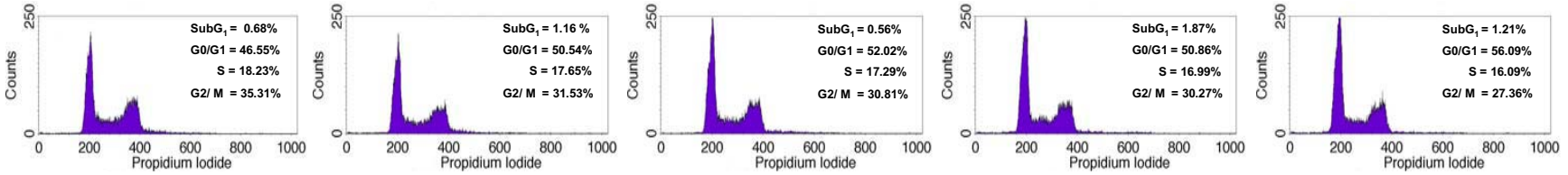


H) Camptothecin 145 nM

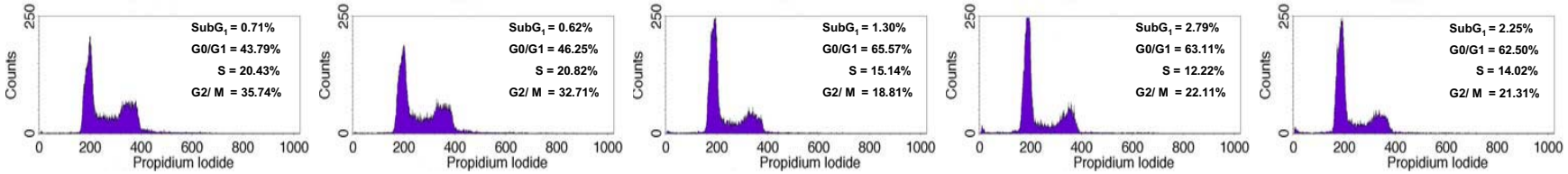


รูปที่ 17 แสดงผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยการย้อม propidium iodide และศึกษาจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ผลที่ได้แสดงในรูปของเปอร์เซนต์เซลล์ในแต่ละระยะ จากการทดสอบ 1 ใน 2 ครั้ง

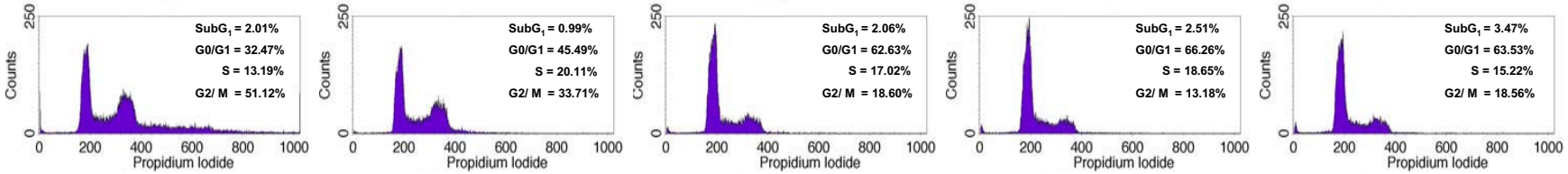
A) 24 ชั่วโมง



B) 48 ชั่วโมง



C) 72 ชั่วโมง



control พิเพอรีน 20 µg/ml พิเพอรีน 40 µg/ml พิเพอรีน 80 µg/ml พิเพอรีน 100 µg/ml

รูปที่ 18 แสดงผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยการย้อม propidium iodide และศึกษาจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ เมื่อบ่มเซลล์ในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา A) 24 ชั่วโมง B) 48 ชั่วโมง C) 72 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในรูปของเปอร์เซนต์เซลล์ในแต่ละระยะ จากการทดสอบ 1 ใน 2 ครั้ง

แสดงว่าพิเพอรีนมีผลทำให้เกิดการหยุดชะงักของเซลล์ที่ระยะ G_0/G_1 นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อบ่มเซลล์ด้วยพิเพอรีน 100 µg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มี Apoptotic cells ซึ่งจัดอยู่ในระยะ Sub G_1 เพิ่มขึ้นเป็น 1.20%, 2.25% และ 3.47% ตามลำดับ

4. ผลการศึกษาฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อการเกิด Apoptosis

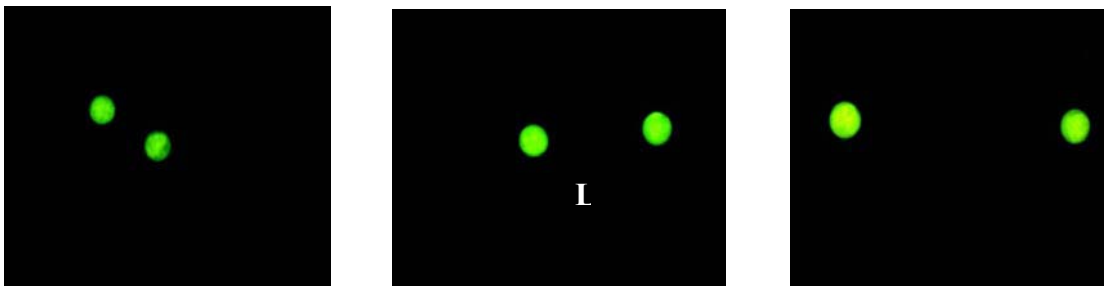
4.1 ผลการตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ (Cell morphology) **ผ่าน** Fluorescent Microscope

การศึกษาผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat ทำได้โดยการย้อมเซลล์ด้วย Acridine orange/Ethidium bromide ภายหลังการบ่มเซลล์ด้วยพิเพอรีนเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และตรวจสอบรูปร่างและลักษณะของเซลล์ภายใต้ Fluorescent Microscope พบว่า Live cells หรือเซลล์ที่มีชีวิตจะเห็นนิวเคลียสมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันและย้อมติดสีเขียว (L) ส่วน Apoptotic cells จะเห็นนิวเคลียสมีลักษณะหดเป็นก้อนหรือมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเออยู่ภายใน ย้อมติดสีเขียวหรือส้ม (A) และ Necrotic cells เห็นนิวเคลียสมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันเหมือนเซลล์ที่มีชีวิต หากแต่ย้อมติดสีส้ม (N)

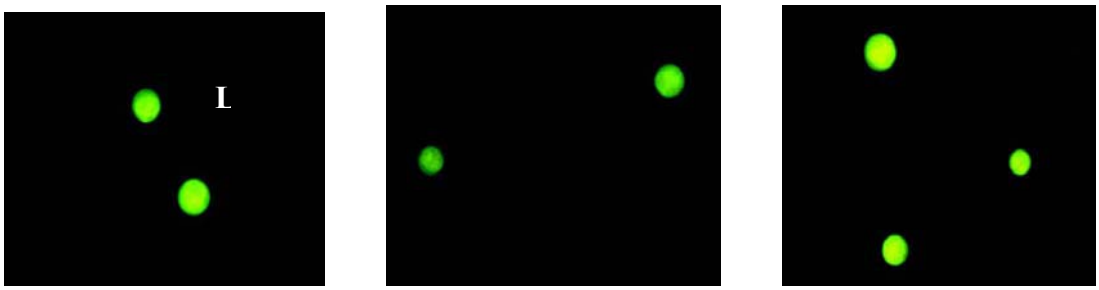
เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยพิเพอรีน 20 µg/ml ไม่พบ Apoptotic cells แต่อย่างใด (ไม่ได้แสดงข้อมูล) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพิเพอรีนเป็น 40 µg/ml ณ เวลา 24 ชั่วโมง ก็ไม่พบ Apoptotic cells เช่นเดียวกัน แต่เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่ามี Apoptotic cells คิดเป็น 1% และ 3% ตามลำดับ (ดังรูปที่ 19-21)

4.1.1 ผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

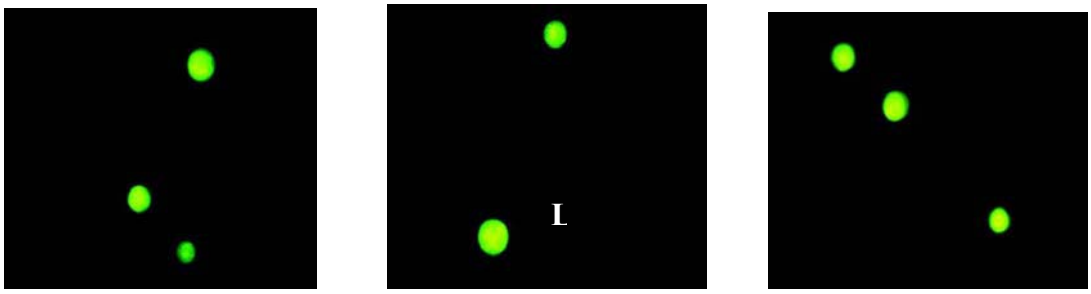
A) control



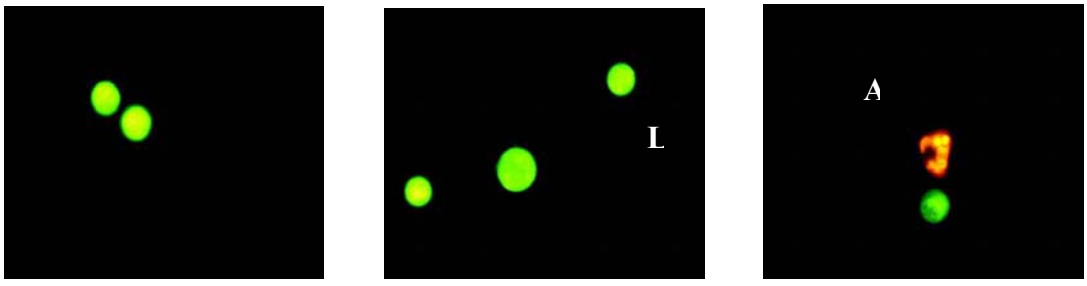
B) 0.2% DMSO



C) พิเพอรีน 40 µg/ml



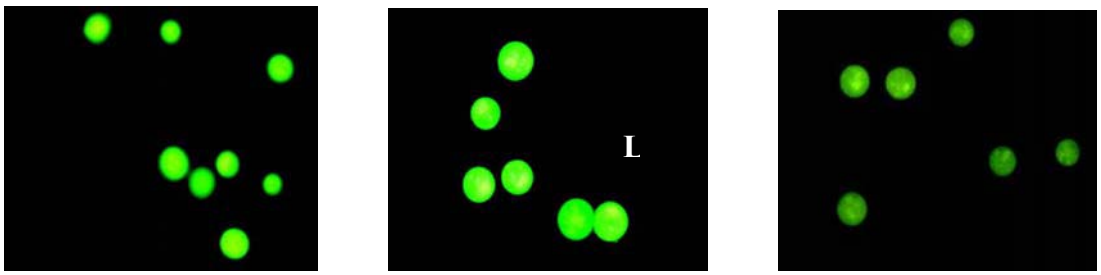
D) Camptothecin 2 µM



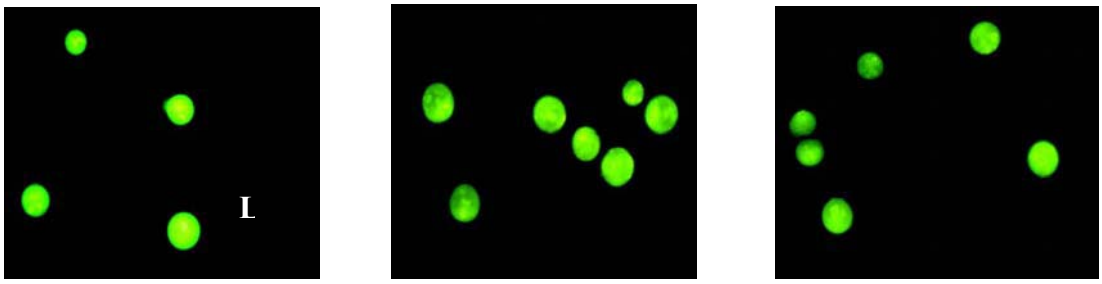
รูปที่ 19 แสดงผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat ผ่าน Fluorescent Microscope

4.1.2 ผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

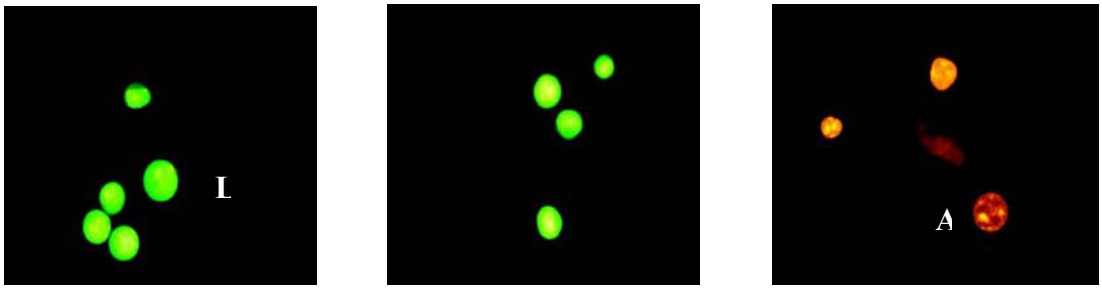
A) control



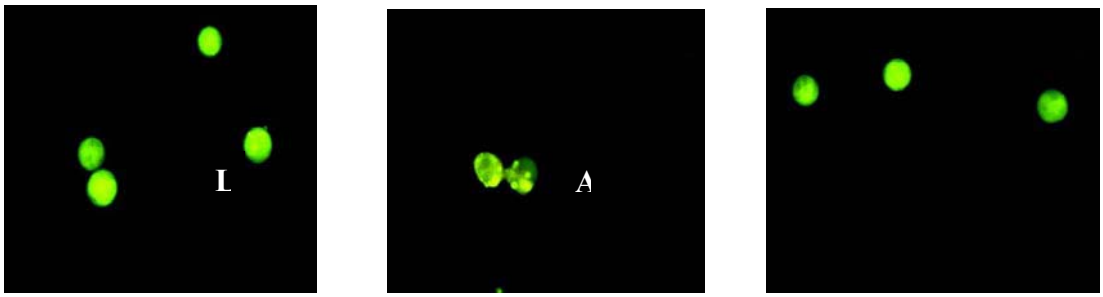
B) 0.2% DMSO



C) พิเพอรีน 40 µg/ml



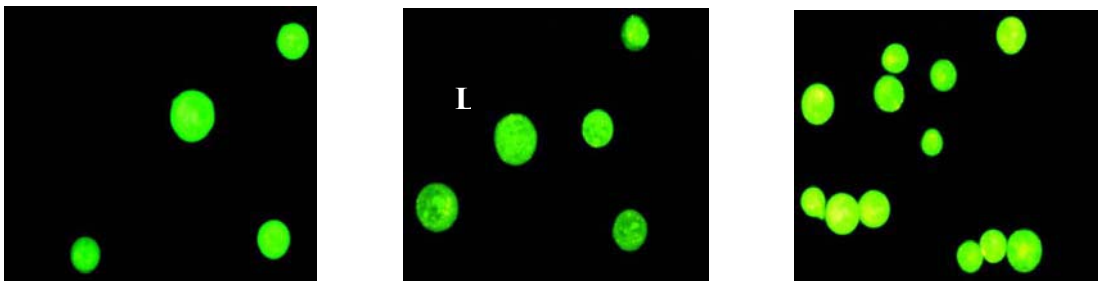
D) Camptothecin 2 µM



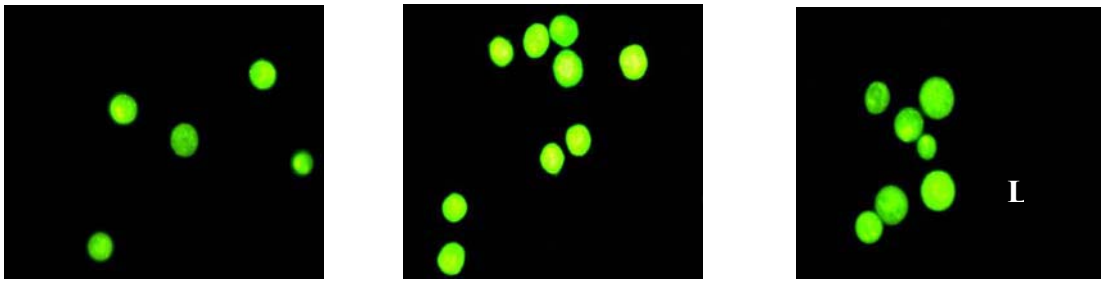
รูปที่ 20 แสดงผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat ผ่าน Fluorescent Microscope

4.1.3 ผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

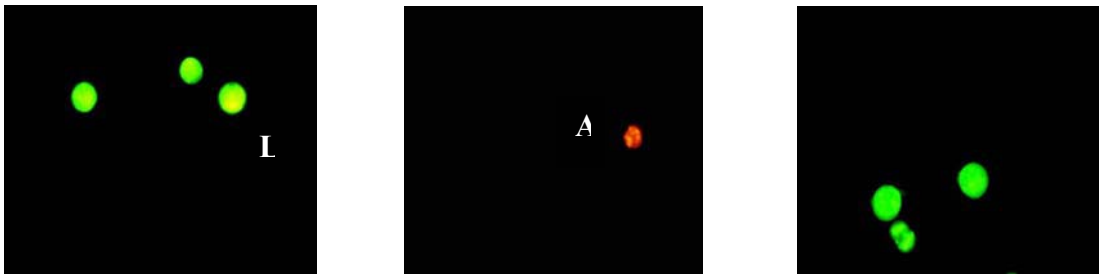
A) control



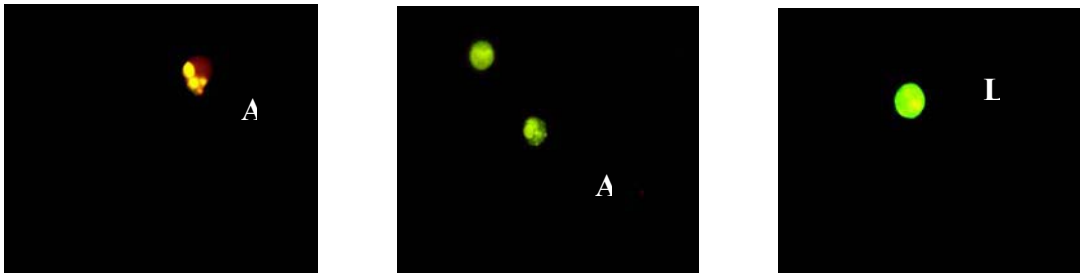
B) 0.2% DMSO



C) พิเพอรีน 40 µg/ml



D) Camptothecin 2 µM



รูปที่ 21 แสดงผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat ผ่าน Fluorescent Microscope

4.2 การตรวจสอบ DNA fragmentation โดย Gel electrophoresis

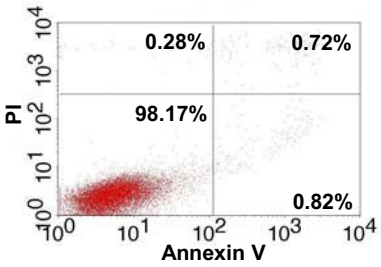
เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการชักนำให้เกิด apoptosis โดยการตรวจสอบการเกิด DNA fragmentation โดย gel electrophoresis เพิ่มเติม ทำการเพาะเลี้ยง Jurkat จำนวน 3 x 10^6 เซลล์ ในสภาวะที่มี 1) 0.2% DMSO 2) พิเพอรีน 40 µg/ml 3) ยา Camptothecin 2 และ 10 µM (positive control) และ 4) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) เป็นเวลา 6, 12, 18, 24 และ 48 ชั่วโมง สกัดดีเอ็นเอและนำไปตรวจสอบ จากผลการทดสอบ ไม่พบว่ามีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (DNA fragment) ในทุกสภาวะของการทดสอบรวมไปถึง positive control แต่อย่างใด และแม้ว่าจะเพิ่มระยะเวลาและความเข้มข้นของ positive control ในการทดสอบแล้วก็ตาม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเทคนิคหรือชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอ Flexigene DNA kit (QIAGEN, เยอรมัน) ที่เลือกใช้ไม่สามารถตกตะกอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กได้ จึงไม่สามารถตรวจวัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้โดยเทคนิคดังกล่าว ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการปรับเปลี่ยนเทคนิควิธีและน้ำยาที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

4.3 การตรวจสอบ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์

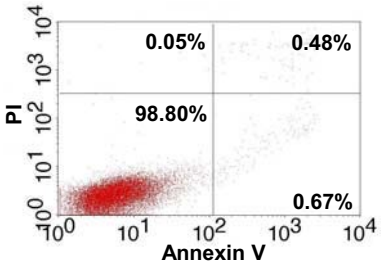
การตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์โดย Annexin V-FITC staining เพื่อยืนยันการเกิด Apoptosis ซึ่งสามารถตรวจสอบได้แม้ในระยะแรกๆ ของการเกิด apoptosis ทำได้โดยการบ่มเซลล์ในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 3, 6, 9, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ย้อมเซลล์ด้วย Annexin V-FITC staining (BD Biosciences, สหรัฐอเมริกา) ตรวจสอบ PS บนผิว Jurkat โดยการตรวจวัดด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ จากผลการทดลองพบว่าพิเพอรีนทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่ชักนำให้เกิด Apoptosis แต่อย่างใด (ดังรูปที่ 22-24)

4.3.1 **ผลการตรวจสอบ** Phosphatidylserine (PS) **บนผิวเซลล์เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา** 24 **ชั่วโมง**

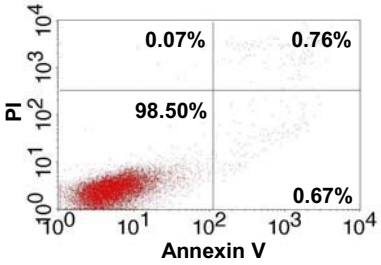
A) control



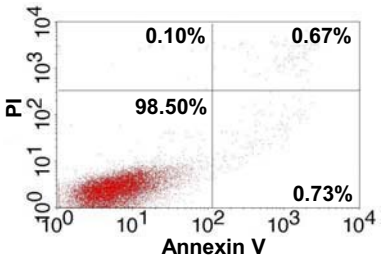
B) 0.5% DMSO



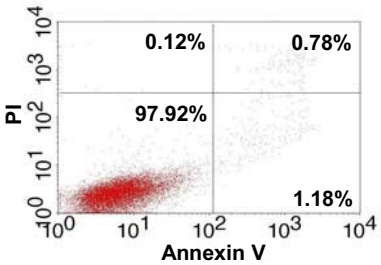
C) พิเพอรีน 20 µg/ml



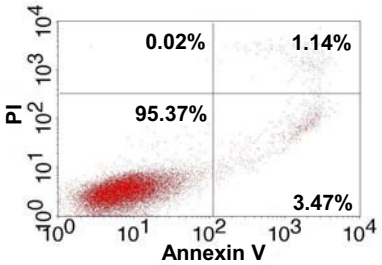
D) พิเพอรีน 40 µg/ml



E) พิเพอรีน 80 µg/ml



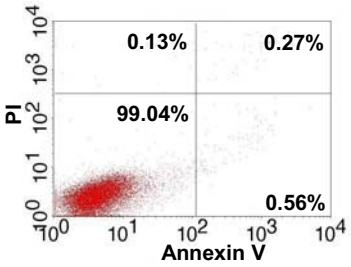
F) Camptothecin 145 nM



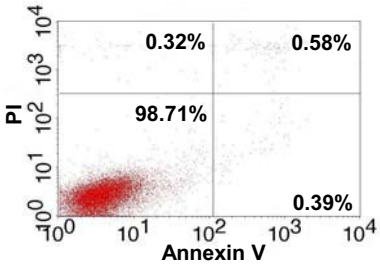
รูปที่ 22 แสดงผลการตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์โดย Annexin V-FITC staining

4.3.2 **ผลการตรวจสอบ** Phosphatidylserine (PS) **บนผิวเซลล์เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา** 48 **ชั่วโมง**

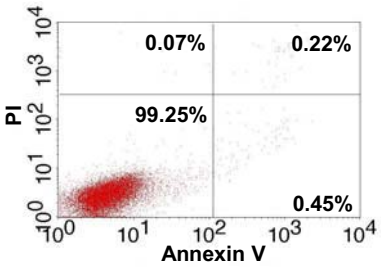
A) control



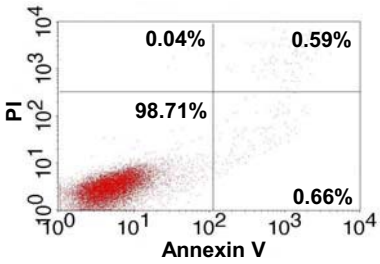
B) 0.5% DMSO



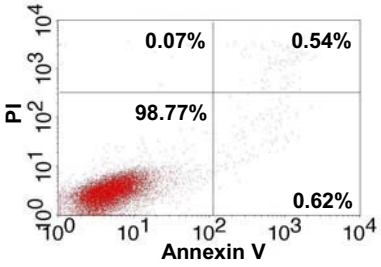
C) พิเพอรีน 20 µg/ml



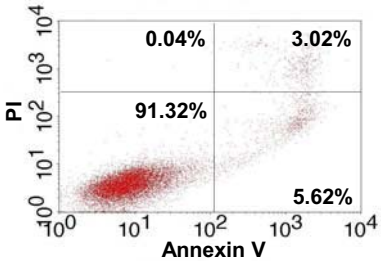
D) พิเพอรีน 40 µg/ml



E) พิเพอรีน 80 µg/ml



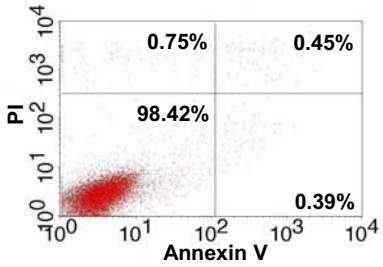
F) Camptothecin 145 nM



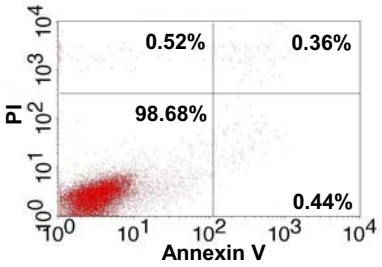
รูปที่ 23 แสดงผลการตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์โดย Annexin V-FITC staining

4.3.3 **ผลการตรวจสอบ** Phosphatidylserine (PS) **บนผิวเซลล์เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา** 72 **ชั่วโมง**

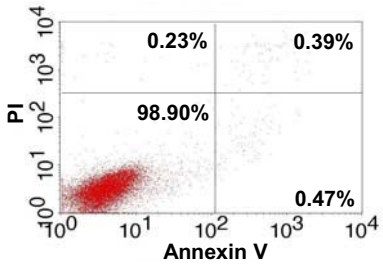
A) control



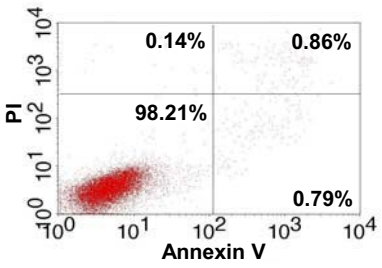
B) 0.5% DMSO



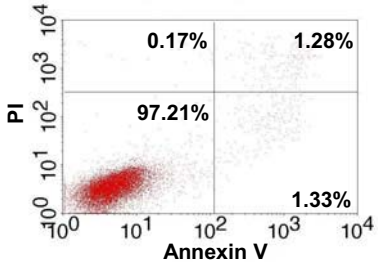
C) พิเพอรีน 20 µg/ml



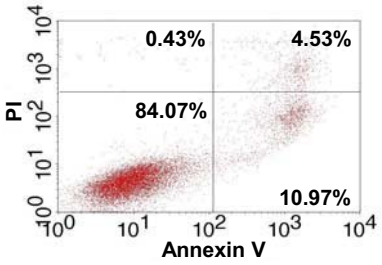
D) พิเพอรีน 40 µg/ml



E) พิเพอรีน 80 µg/ml



F) Camptothecin 145 nM



รูปที่ 24 แสดงผลการตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์โดย Annexin V-FITC staining

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ปัจจุบันพืชสมุนไพรมีบทบาทในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ มากขึ้น รวมถึงโรคมะเร็งซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับต้นๆ ของประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาวิจัยผลของพืชสมุนไพรต่อเซลล์มะเร็ง จึงนับว่ามีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนายา เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในอนาคต ขณะนี้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับพืชสมุนไพรที่คนไทยนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายรวมไปถึงพริกไทยดำ ซึ่งมีสารพิเพอรีนเป็นส่วนประกอบหลักและมีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆ รวมไปถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหนูทดลอง การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยชิ้นแรก ที่ทำการศึกษาผลของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง และเป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่ทำการศึกษาผลของพิเพอรีนต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์ในหลอดทดลอง รวมไปถึงการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร โดยทำการศึกษาวิจัยใน HT-29, HEp-2, HeLa, H9, Jurkat และ Human PBMCs

จากการศึกษาพบว่าพิเพอรีนยับยั้งการแบ่งตัวของ HT-29, HEp-2 และ HeLa ได้เพียงเล็กน้อย โดยมีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตหลังจากทดสอบด้วยพิเพอรีนที่ความเข้มข้นสูงถึง 200 µg/ml คิดเป็น 76.4 %, 69.1% และ 89.8 % ตามลำดับ ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ขึ้นอยู่กับตัวทำละลาย DMSO ซึ่งจากการทดลองพบว่า หากตัวทำละลาย DMSO มีค่าสูงเกิน 1% จะส่งผลกระทบต่อ HT-29, HEp-2 และ HeLa โดยตรง ในขณะที่ตัวทำละลาย DMSO เพียง 0.5% ส่งผลกระทบต่อ H9, Jurkat และ Human PBMCs โดยตรงได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่ใช้ในการทดลองด้วย เช่น จากรายงานวิจัยของ Georges และคณะพบว่า DMSO ที่ความเข้มข้นสูง ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อ Caco2/TC7 (Da Violante et al., 2002) แต่กระตุ้นให้ HL-60 มีการเจริญเพิ่มขึ้น (Nishizawa et al., 1998) ผลจากการทดลองในครั้งนี้จะเป็นแนวทางเบื้องต้นในการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาสารออกฤทธิ์ โดยการนำพิเพอรีนไปเป็นสารต้นแบบในการเตรียมอนุพันธุ์สังเคราะห์ของพิเพอรีน ให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดังกล่าวข้างต้นให้ดียิ่งขึ้น อีกทั้งยังเป็นแนวทางในการทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนร่วมกับยาต้านมะเร็งที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ซึ่งอาจช่วยลดปริมาณหรือขนาดของยาต้านมะเร็งที่ใช้ในผู้ป่วยและลดอาการข้างเคียงอันเนื่องมาจากฤทธิ์ของตัวยาต้านมะเร็งโดยตรงได้ ดังจะเห็นได้จากรายงานการวิจัยโดย Bezerra และคณะพบว่าเมื่อใช้พิเพอรีนหรือพิพลาทีน (Piplartine)ร่วมกับ 5-fluorouracil (5-FU) จะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้มากขึ้น โดยมีค่า IC_{50} ของ 5-FU ลดลง (Barnett et al., 2002) อีกทั้งยังมีรายงานที่สนับสนุนว่าพิเพอรีนมีฤทธิ์ช่วยในการดูดซึมสารอื่นๆ และยาได้เป็นอย่างดี และช่วยในการดูดซึมยาให้คงอยู่ในกระแสเลือดได้ดีขึ้นด้วย (Badmaev et al., 1999, Badmaev et al., 2000)

ผลการทดลองที่น่าสนใจยิ่งในการศึกษาครั้งนี้ คือ พิเพอรีนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว H9 และ Jurkat ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการยับยั้งการเจริญของ H9 นั้นมีลักษณะเป็น dose-dependent manner ซึ่งความเข้มข้นของพิเพอรีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง H9 ได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 14.7 $\pm$ 2.1 µg/ml ซึ่งคณะผู้วิจัยได้นำเสนอผลการวิจัยดังกล่าวในวารสารสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย (Chuchawankul et al., 2006) ส่วนความเข้มข้นของพิเพอรีนตั้งแต่ 20 µg/ml ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญของ Jurkat ได้โดยเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตยังคงมีค่า 43.1 $\pm$ 2.85% แม้ว่าความเข้มข้นของพิเพอ

รีนจะสูงถึง 100 µg/ml ก็ตาม คณะผู้วิจัยได้นำเสนอผลงานวิจัยส่วนนี้ในรูปของบทคัดย่อในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 6 (Ajsonjorn and Chuchawankul, 2006) จากการทดลองนี้ สรุปได้ว่าพิเพอรีนมีฤทธิ์อย่างจำเพาะในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่มาจากแหล่งกำเนิดอื่นๆ ได้ไม่ดีนัก ขึ้นอยู่กับชนิดหรือแหล่งที่มาของเซลล์มะเร็งนั้นๆ อย่างไรก็ตามนอกจากพิเพอรีนจะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดทั้งสองชนิดนี้แล้ว คณะผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิดอื่นๆ ได้แก่ Molt-4, K562 และ U937 และศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนเพิ่มเติมต่อไป นอกจากนี้ การออกฤทธิ์ของพิเพอรีนที่มีลักษณะเป็น dose-dependent manner ดังจะเห็นได้ชัดเจนในการยับยั้งการเจริญของ H9 แต่ไม่พบผลดังกล่าวในการยับยั้งการเจริญของ Jurkat ทั้งนี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนผ่าน receptors ที่จำเพาะบนผิวเซลล์ (H9) จึงส่งผลให้ความรุนแรงของผลกระทบเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ หรืออาจเป็นการออกฤทธิ์ร่วมกันชนิดที่ผ่านและไม่ผ่าน receptors ในขณะที่ความรุนแรงของผลกระทบจากพิเพอรีนต่อ Jurkat มิได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารแต่อย่างใด โดยจะหยุดที่ความเข้มข้น 20 µg/ml ขึ้นไป ทั้งนี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20 µg/ml นั้นเพียงพอและครอบคลุม receptors ที่จำเพาะทั้งหมดบนผิว Jurkat จึงส่งผลให้ความเข้มข้นของพิเพอรีนที่เพิ่มสูงขึ้นนั้น ไม่มีผลกระทบเพิ่มเติมต่อการเจริญของเซลล์เมื่อตรวจสอบโดย MTS assay ทั้งนี้ ยังไม่มีรายงานการค้นพบการแสดงออกของ receptors ที่จำเพาะต่อพิเพอรีนแต่อย่างใด หากแต่เมื่อ ปี ค.ศ. 2005 มีรายงานการวิจัยพบว่าพิเพอรีนสามารถกระตุ้น vanilloid receptors (McNamara et al.,2005) ซึ่งต่อมาเรียกว่า Transient receptor potential vanilloid (TRPV1) ซึ่งเป็น receptor ของ capsaicin ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดประมาณ 95 kDa มีลักษณะเป็น six transmembrane domain มี N และ C terminal อยู่ใน intracellular ทั้งคู่ loop ที่ 5 และ 6 และเชื่อมต่อกันด้วย intramembranous loop และเป็นตัวทำให้เกิดการ form ตัวเป็นรู อย่างไรก็ตาม มิได้มีแต่เพียงเฉพาะ capsaicin เท่านั้นที่สามารถกระตุ้น TRPV1 ได้ ยังมีสารต่างๆ ทั้งที่เป็น endogenous และ exogenous molecules อื่นๆ ที่สามารถกระตุ้น TRPV1 ได้ เช่น Lipoxygenase products, anadamide และ N-oleoyldopamine นอกจากนี้ยังมีการค้นพบ antagonist หรือสารที่สามารถป้องกันการจับของ capsaicin ต่อ receptor นี้ ได้แก่ capsazepine (Docherty et al., 1997, Liu and Simon,1997, Walpole et al., 1994, Walker et al., 2003) และมีรายงานการวิจัยพบว่าพิเพอรีนสามารถกระตุ้น vanilliod receptors ในสมองและส่วนอื่นๆ ของระบบประสาท ส่งผลให้การเผาผลาญพลังงานอันเนื่องมาจากความร้อน (thermogenesis) เพิ่มขึ้นได้มากกว่าผลของ capsaicin จากพริก อีกทั้งยังมีงานวิจัยเพื่อพัฒนาพิเพอรีนซึ่งเป็นสารต้นแบบให้เป็น agonist ที่มีประสิทธิภาพในการจับกับ TRPV1 ที่ดียิ่งๆ ขึ้นอีกด้วย (McNamara et al., 2005) ซึ่งจากงานวิจัยของ Suresh และ Srinivasan พบว่าโครงสร้างพิเพอรีนและแคปไซซินนั้นมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน (Suresh and Srinivasan, 2006)

นอกจากพิเพอรีนแล้วยังมีสารที่ให้รสเผ็ดชนิดอื่นๆ ได้แก่ 6-Shoagol, 6-Gingerol, Zingerone และ Allicin ที่มาจากขิงและกระเทียม ซึ่งจัดเป็น agonists ที่มาจากธรรมชาติของ TRPV1 อีกด้วย มากไปกว่านั้นความร้อนจากภายนอกสามารถกระตุ้น TRPV1 และส่งผลต่อการระงับปวดได้ (McGaraughty et al., 2003) ดังเช่น การระงับอาการปวดแบบภูมิปัญญาพื้นบ้านโดยการประคบด้วยถุงน้ำร้อน ซึ่งความร้อนนี้เองจะไปกระตุ้น

กลไกต่างๆ ผ่าน TRPV1 และที่น่าสนใจยิ่ง คือ Christopher และคณะพบว่าการกระตุ้น BEAS-2B และ A549 (human lung epithelial cell lines) และ HepG2 (human hepatoma cell line) ด้วย capsicin ส่งผลให้เกิด cytotoxicity ต่อเซลล์ตามระดับของ TRPV1 transcripts ที่ตรวจพบในเซลล์นั้นๆ เนื่องจากพิเพอรีนเป็นอีกหนึ่ง agonist ที่สำคัญของ TRPV1 จึงอาจตั้งสมมติฐานได้ว่า พิเพอรีนอาจมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ H9 และ Jurkat ผ่านทาง TRPV1 และเพื่อตรวจสอบสมมติฐานข้างต้น สามารถทำได้โดยการตรวจวัดระดับของ TRPV1 transcripts โดยวิธี RT-PCR ในเซลล์ดังกล่าว นอกจากนี้แล้วพิเพอรีนยังอาจส่งผลต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมได้ด้วย เช่น มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งกระเพาะอาหารและลำไส้ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ หรือมะเร็งรังไข่ หากเซลล์ต่างๆ เหล่านั้นมีการปรากฏของ TRPV1 ดังเช่น BEAS-2B, A549 และ HepG2 ซึ่งยังคงรอการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมต่อไป ทั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของพิเพอรีนต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์ (Human PBMCs) ภายหลังการกระตุ้นด้วย PHA ซึ่งเป็น mitogen เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งเม็ดเลือดเท่านั้น จากการทดลองพบว่า เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พิเพอรีนที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ส่งผลให้มีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 92.9 % เมื่อครบ 72 ชั่วโมง พบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ug/ml ส่งผลให้มีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็น 86.8% และ 62.3% ตามลำดับ ทั้งนี้มีแนวโน้มว่า ความเข้มข้นของพิเพอรีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) นั้น มีค่ามากกว่า 100 µg/ml อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้เป็นเพียงการศึกษาวิจัยเบื้องต้น จักต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของกลไกการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อเซลล์ปกติของมนุษย์เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เพียงพอต่อการสรุปผลการวิจัย และหากพบว่าพิเพอรีนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ PBMCs ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย การศึกษากลไกในการยับยั้งการเจริญของ PBMCs โดยพิเพอรีนก็จะมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อประกอบการตัดสินใจว่าควรนำพิเพอรีนมาใช้ในการรักษามะเร็งในผู้ป่วยหรือไม่ อย่างไรและหากพบว่าพิเพอรีนไม่เป็นพิษต่อ PBMCs ด้วยแล้ว ก็มีความเป็นไปได้อีกทางหนึ่งในการนำพิเพอรีนมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับผลการศึกษาฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันนั่นเอง โดยอาจใช้พิเพอรีนเป็น Immunosuppressive agent เพื่อกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในรายที่มีการตอบสนองที่ไวเกิน หรือใช้ประโยชน์ในการปลูกถ่ายอวัยวะต่อไป และจากการศึกษาวิจัยในมนุษย์โดยการให้พิเพอรีนปริมาณ 20 mg ร่วมกับยาโพรพราโนลอล ทีโอฟิลลีน หรือฟีไนโตอิน (Bano et al., 1991, Pattanaik et al., 2006) หรือให้พิเพอรีน 5 mg ร่วมกับโคเอนไซม์คิวเทน หรือเบต้าแคโรทีน เป็นเวลา 14 วันติดต่อกัน (Badmaev et al., 1999, Badmaev et al., 2000) ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายแต่อย่างใด จึงมีโอกาสสูงในการนำพิเพอรีนมาใช้ประโยชน์ในมนุษย์ต่อไป

จากการศึกษาวิจัยข้างต้นพบว่า พิเพอรีนสามารถยับยั้งการเจริญของ H9 และ Jurkat ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่งผลให้ผู้วิจัยสนใจศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดนี้ ทั้งนี้ ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ (Cytotoxicity) โดยการตรวจวัด LDH activity ด้วยชุดน้ำยา Cytotoxicity Detection Kit ^{PLUS} (Roche, เยอรมัน) และตรวจวัดความเป็นพิษด้วย Trypan blue dye exclusion method พบว่าพิเพอรีนเป็นพิษต่อ H9 และส่งผลให้เซลล์ที่มีชีวิตหลังจากทำการทดสอบมีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์นั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาด้วย (time-dependent

manner) ส่วนการทดสอบใน Jurkat กลับพบว่าพิเพอรีนไม่เป็นพิษต่อเซลล์แต่อย่างใดแม้ในความเข้มข้น 100 µg/ml แต่พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในสภาวะที่มีพิเพอรีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบเช่นเดียวกับที่พบใน H9 คาดว่าพิเพอรีนอาจมีผลในการยับยั้งการเจริญของ Jurkat ในวัฏจักรเซลล์ หรืออาจชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis

คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ (DNA content) เพื่อบ่งชี้ระยะของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ โดยการย้อม Jurkat ด้วย Propidium iodide และตรวจวัดโดยโฟลไซโตมิเตอร์ เมื่อทดสอบที่เวลาต่างๆ กัน พบว่าพิเพอรีนที่ 40, 80 และ 100 µg/ml หยุดยั้งการเจริญของ Jurkat ไว้ที่ระยะ G_0/G_1 ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์เตรียมความพร้อมเพื่อเข้าสู่ระยะ S เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อไป ทั้งนี้พิเพอรีนจะมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาทดสอบ โดยตรวจพบเซลล์ที่ระยะ G_0/G_1 เพิ่มขึ้นจาก 52.02%, 50.86% และ 56.09% (24 ชั่วโมง) เป็น 65.57%, 63.11% และ 62.50% (48 ชั่วโมง) และ 62.63%, 66.26% และ 63.53% (72 ชั่วโมง) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 18 แต่ผลกระทบดังกล่าวข้างต้นไม่ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารแต่อย่างใด การตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่จำเพาะในวัฏจักรเซลล์จะเป็นการยืนยันอีกขั้นหนึ่งว่าพิเพอรีนชักนำให้เกิด G_0/G_1 arrest โดยโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ในระยะนี้ ได้แก่ Cyclin A ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค western blot นอกจากนี้แล้ว การตรวจสอบโดยการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอข้างต้น ยังสามารถจำแนก Apoptotic cells ได้อีกด้วย โดยจะจัดว่าอยู่ในระยะ sub G_1 ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่า เมื่อทดสอบด้วยพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 40, 80 และ 100 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบ apoptotic cells คิดเป็น 2.06%, 2.51% และ 3.47% ตามลำดับ

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยการย้อมด้วย AO/EB และตรวจสอบโดย Fluorescent microscope พบว่ามี Apoptotic cells คิดเป็น 1% และ 3% เมื่อบ่มเซลล์ด้วยพิเพอรีนเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ (ดังรูปที่ 19-21) บ่งชี้ได้ว่าเซลล์มีการตายแบบ apoptosis แต่พบได้ในปริมาณน้อย

อย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจสอบ DNA fragment โดย Gel electrophoresis กลับไม่พบชิ้นส่วน DNA แม้ในการทดสอบด้วย campthothecin ที่ 10 µM หรือเพิ่มระยะเวลาในการทดสอบแล้วก็ตาม ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากเทคนิควิธีและชุดน้ำยาที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (Flexigene DNA kit) นั้นไม่สามารถสกัดและตกตะกอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กๆ ได้ หรือ apoptotic cells แม้ในสภาวะ positive control เองอาจไม่มากพอที่จะนำมาตรวจวัดโดยเทคนิคดังกล่าวข้างต้นได้ ทั้งนี้ พิเพอรีนเองชักนำให้เกิด apoptosis ได้แต่ในปริมาณน้อยและอาจไม่ชักนำให้เกิด DNA fragmentation คณะผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการปรับเปลี่ยนเทคนิควิธีและน้ำยาที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้น้ำยา Phenol-chloroform extraction (Lazzè et al., 2004) หรือใช้ชุดน้ำยา Apoptotic DNA Ladder Extraction Kit (Biovision, สหรัฐอเมริกา) และปรับเปลี่ยน positive control และตรวจสอบกลไกระดับโมเลกุลในการเกิด DNA fragmentation ของสารต่อไป

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบผลของพิเพอรีนต่อผนังเซลล์ชั้นนอกซึ่งเป็นตัวชี้วัดการตายแบบ apoptosis โดยการย้อม Phophatidylserine บนผิวเซลล์ด้วย Annexin V-FITC และ PI เพื่อตรวจสอบด้วยโฟลไซโตมิเตอร์ ผลการทดสอบที่เวลา 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าพิเพอรีนทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่ชักนำให้เกิด Apoptosis

สรุปได้ว่า พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ Jurkat โดยการชักนำให้เกิด cell cycle arrest ที่ระยะ G_0/G_1 แต่ไม่ชักนำให้เกิด apoptosis แต่อย่างใด ผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษากลไกในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่างๆ และการทดสอบฤทธิ์ของสารต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม รวมไปถึงการศึกษาฤทธิ์ของพิเพอรีนร่วมกับยาต้านมะเร็ง อีกทั้งยังเป็นแนวทางเพื่อการพัฒนาอนุพันธุ์สังเคราะห์ของพิเพอรีนให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากยิ่งขึ้น นอกจากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของพริกไทยดำ ซึ่งเป็นแหล่งที่มาหลักของพิเพอรีนแล้ว ยังสามารถนำองค์ความรู้ใหม่ที่ได้ไปพัฒนาสารเพื่อเป็นยารักษาโรคมะเร็งหรือสารควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Ajsonjorn S, Chuchawankul S. Piperine's inhibition on proliferation of human tumor cells. The 6th National Symposium on Graduate Research; 2006. p. 274.

Atal, C.K., Dubey, R.K., Singh, J.J., et al., Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine, evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism. *J Exp Ther* 1985; 232: 258-262.

Badmaev V, Majeed M, Norkus EP. Piperine, an alkaloid derived from black pepper increases serum response of beta-carotene during 14-days of oral beta-carotene supplementation. Nutri Res. 1999;19(3):381-8.

Badmaev V, Majeed M, Prakash L. Piperine derived from black pepper increases the plasma levels of coenzyme q10 following oral supplementation. *J Nutri Biochem*. 2000;11(2):109-13.

Bano G, Raina RK, Zutshi U, Bedi KL, Johri RK, Sharma SC. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 1991;41(6):615-7.

Barnett KT, Fokum FD, Malafa MP. Vitamin E Succinate Inhibits Colon Cancer Liver Metastases. Journal of Surgical Research. 2002;106(2):292-8.

Bezerra DP, de Castro FO, Alves A, Pessoa C, Odorico M. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *J Appl Toxicol*. 2007.

Bunn HJ, Hewitt CRA, Grigg J. Suppression of autologous peripheral blood mononuclear cell proliferation by alveolar macrophages from young infants. *Clin Exp Immunol.* 2002;128(2):313-7.

Center DM, Cruikshank WW, Zhang Y. Nuclear Pro-IL-16 Regulation of T Cell Proliferation: p27KIP1-Dependent G0/G1 Arrest Mediated by Inhibition of Skp2 Transcription1. *J Immunol*. 2004;172(3):1654-60.

Chopra, I.C., Chopra, R.N. The use of the cannabis drugs in India. *Bull Narcotics* 1957; 9: 4-29.

Chuchawankul, S., Ajsonjorn, S., Khorana, N., Pooworawan, Y. Anti-proliferative effect of piperine on human tumor cells. *J Med Tech Assoc Thailand*. 2006;34:1496-505.

Chuchawankul, S., Shima, M., Buckley, N.E., Hartmann, C.B., McCoy, K.L. Role of cannabinoid receptors in inhibiting macrophage costimulatory activity. *Int Immunopharmacol* 2004; 4: 265-78.

Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. *Biol. Pharm. Bull.* 2002;25(12):1600-3.

Deborah, A.L., Maribel, D., Elgilda, M., Shalom, Z.H., Richard, J.A. CXCR4 and CCR5 expression by H9 T-cells is down regulated by a peptide-nucleic acid immunomodulator. *Immunol Lett.* 2000 Nov 1;74(3):189-195.

Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br J Pharmacol*. 1997;121(7):1461-7.

Gao G, Dou QP. G1 Phase-Dependent Expression of Bcl-2 mRNA and Protein Correlates with Chemoresistance of Human Cancer Cells. *Mol Pharmacol*. 2000;58(5):1001-10.

Klein, T.W., Newton, C.A., Widen, R., Friedman, H. The effect of delta-9-tetrahydrocannabinol and11-hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol on T-lymphocyte and B-lymphocyte mitogen responses. *J Immunol Pharmacol* 1985; 7: 451-466.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994;84(5):1415.

Koul, I.B., Kapil, A. Evaluation of the liver protective potential of piperine, an active principle of black and long peppers. *Planta Med* 1993; 59(5):413-7.

Kuttan, G., Pradeep, C.R. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor-kB (NF-kB), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. *Int Immunopharmacol* 2002; 1795-1803.

Lazzè MC, Savio M, Pizzala R, Cazzalini O, Perucca P, Scovassi AI, et al. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis*. 2004;25(8):1427-33.

Liu L, Simon SA. Capsazepine, a vanilloid receptor antagonist, inhibits nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Neurosci Lett*. 1997;228(1):29-32.

Luo, Y.D., Patel, M.K., Wiederhold, M.D., Ou, D.W. Effects of cannabinoids and cocaine on the mitogen-induced transformations of lymphocytes of human and mouse origins. *Int J Immunopharmacol* 1992; 14: 49-56.

Manguikian AD, Barbour SE. Cell Cycle Dependence of Group VIA Calcium-independent Phospholipase A2 Activity. *J Biol Chem*. 2004;279(51):52881.

Martin SJ. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by over expression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995;.56-1545:(5)182

McGaraughty S, Chu KL, Bitner RS, Martino B, Kouhen RE, Han P, et al. Capsaicin Infused Into the PAG Affects Rat Tail Flick Responses to Noxious Heat and Alters Neuronal Firing in the RVM. *J Neurophysiol.* 2003;.10-2702:(4)90

McNamara FN, Randall A, Gunthorpe MJ. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV .(1*Br J of Pharmacol.* 2005;.90-781:(6)144

Mittal, R., Gupta, R.L. In vitro antioxidant activity of piperine. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2000; 22: 271-274.

Nishizawa Y, Saeki K, Hirai H, Yazaki Y, Takaku F, Yuo A. Potent inhibition of cell density-dependent apoptosis and enhancement of survival by dimethyl sulfoxide in human myeloblastic HL-60 cells. *J Cell Physiol.* 1998;174(1):135-43.

Pattanaik S, Hota D, Prabhakar S, Kharbanda P, Pandhi P. Effect of piperine on the steady-state pharmacokinetics of phenytoin in patients with epilepsy. *Phytother Res*. 2006;20:683-6.

Pradeep, C.R., Kuttan, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. *Clin Exp Metastasis* 2002;19: 703-708.

Pross, S.H., Nakano, Y., Widen, R., McHugh, S., Newton, C.A., Klein, T.W., Friedman, H. Differing effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on murine spleen cell populations dependent upon stimulators. *Int J Immunopharmacol 1992;* 14: 1019-1027.

Ramos-Morales F, Domٍinguez A, Romero F, Luna R, Multon MC, Pintor-Toro JA, et al. Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg proto-oncogene product. *Oncogene*. 2000;19(3):403-409.

Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. BMC Biotechnology. 2005;5:12

Riss T, Moravec R. Improved non-radioactive assay to measure cellular proliferation or toxicity: The CellTiter 96 Aqueous one solution cell proliferation assay. Promega Notes. 1996;59:19-23.

Safadi-Chamberlain F, Wang LP, Payne SG, Lim CU, Stratford S, Chavez JA, et al. Effect of a membrane-targeted sphingosine kinase 1 on cell proliferation and survival. *Biochem J*. 2005;388:827-34.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboraty Press; 1989.

Schmidt, S., Moric, E., Schmidt, M., Sastre, M., Feinstein, D.L., Heneka, M.T. Anti-inflammatory and antiproliferative actions of PPAR-gamma agonists on T lymphocytes derived from MS patients. *J Leukoc Biol*. 2004;75(3): 478-85.

Singh, Y.N. Kava, an overview. *J Ethanopharmacol* 1992; 37: 18-45.

Singh, Y.N., Blue Menthal, M. Kava, an overview. *Herbal Gram* 1997; 39: 34-55.

Stohr, J.R., Xiaso, P.G., Bauer, R., Constituents of Chinese piper spices and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis in vitro. *J Ethanopharmacol* 2001; 75: 13-139.

Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. Current Protocols in Immunology. 1991:3.–4.

Sunila E.S., Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. *J Ethnopharmacol* 2004; 90: 339-46.

Suresh D, Srinivasan K. Influence of curcumin, capsaicin, and piperine on the rat liver drug-metabolizing enzyme system in vivo and in vitro. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84(12):1259-65.

Talwar, G.P., In: Talwar, G.P. (ed.), Hand Book of Practical Immunology. National Book Trust, New Delhi, 1974; pp. 339-336.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184(1):39-51.

Virinder, S.P., Subash, C.J., Kirpal, S.B., Rajani, J., et al. Phytochemistry of genus Piper. *Phytochemistry* 1997; 46: 597-673.

Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, et al. The VR1 Antagonist Capsazepine Reverses Mechanical Hyperalgesia in Models of Inflammatory and Neuropathic Pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304(1):56-62.

Walpole CSJ, Bevan S, Bovermann G, Boelsterli JJ, Breckenridge R, Davies JW, et al. The Discovery of Capsazepine, the First Competitive Antagonist of the Sensory Neuron Excitants Capsaicin and Resiniferatoxin. *J Med Chem*. 1994;37(13):1942-54.

Wilasrusmee, C., Siddiqui, J., Bruch, D., Wilasrusmee, S., Kittur, S., Kittur, D.S. In vitro immunomodulatory effects of herbal products. *Am Surg* 2002; 68: 860-864.

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร 4455, 4493 ต่อ 14

ที่ วจ360/2548 วันที่ 12 ตุลาคม พ.ศ. 2548

เรื่อง แจ้งผลพิจารณาจริยธรรมการวิจัย

เรียน อ.ดร..ศิริพร ชื้อชวาลกุล

จากการประชุมคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ครั้งที่ 13/2548 ในวันจันทร์ ที่ 10 ตุลาคม พ.ศ. 2548 ได้พิจารณาโครงการวิจัย ดังรายละเอียดต่อไปนี้

เรื่อง การศึกษาผลของ piperine และ piperic acid ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง

หัวหน้าโครงการวิจัย อ.ดร..ศิริพร ชื้อชวาลกุล

คณะกรรมการมีมติให้ผ่านจริยธรรมการวิจัยได้

จึงเรียนมาเพื่อทราบ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

รองคณบดีฝ่ายวิจัย

ปฏิบัติราชการแทนคณบดี คณะแพทยศาสตร์

สำเนาเรียน คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

เพื่อทราบ

Output **จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.**

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

   อยู่ในระหว่างการทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อให้มีข้อมูลเพียงพอสำหรับการเขียนผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

   ผลิตบัณฑิตในระดับปริญญามหาบัณฑิต 1 คน คือ **นางสาวษิรัชนา อาจสัญจร** ซึ่งสำเร็จ การศึกษาเมื่อปีการศึกษา 2550 จากหลักสูตรชีวเคมีคลินิและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวช-ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการศึกษาวิจัยบางส่วนในโครงการนี้ ภายใต้วิทยานิพนธ์ เรื่อง การศึกษาผลของสารสกัดจากพริกไทยดำ (piperine) ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง

   ปัจจุบันทำงานที่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, AFRIMS)

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

   3.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ

   Chuchawankul S., Ajsonjorn S., Khorana N., Pooworawan Y., **2006.** Anti-proliferative effect of piperine on human tumor cells. *J. Med. Tech. Assoc. Thailand.* 34, 1496-1505.

   เอกสารประกอบ : ภาคผนวก 1 สำเนาผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ

   3.2 การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

   3.2.1 การเสนอผลงานแบบลายลักษณ์ในที่ประชุม The 6th Princess Chulabhorn International Science Congress (Bangkok, Thailand)

   เรื่อง : In vitro Inhibitory Activity of Black Pepper Extracts and Piperine on Human leukemic cell Proliferation

   ผู้แต่ง : Siriporn Chuchawankul, Nantaka Khorana, Siratchana Ajsonjorn, Yong Poovorawan

   วันที่ : 25-29 พฤศจิกายน 2550

   เอกสารประกอบ : ภาคผนวก 2

3.2.2 การเสนอผลงานแบบลายลักษณ์ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 6 (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)

เรื่อง : Piperine's inhibition on Proliferation of Human Tumor cells

ผู้แต่ง : ษิรัชนา อาจสัญจร, ศิริพร ชื้อชวาลกุล

วันที่ : 13-14 ตุลาคม 2549

เอกสารประกอบ : ภาคผนวก 3

รางวัลที่ได้รับ : รางวัลการนำเสนอผลงานวิจัยด้วยโปสเตอร์ ระดับดี กลุ่มสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ภาคผนวก 1

วารสารเทคนิคการแพทย์
Journal of the Medical Technologist Association of Thailand

Vol. 34 No. 2 August 2006 ปีที่ 34 ฉบับที่ 2 สิงหาคม 2549

CONTENTS

Review Article

- Major Histocompatibility Complex (MHC) class I-related chain A (MICA) : ความสำคัญทางด้านการแพทย์ 1487
  อัญชลี ศิษยนรนทร์

Original Article

- Anti-proliferative effect of Piperine on Human Tumor Cells 1496
  Siriporn Chuchawankul et al.
- Urine Sediment Photographs in External Quality Assessment Scheme 1506
  Boonsong Preechaborisutkul et al.
- Synergistic Effect of Medicinal Plant Extracts and Antibiotics Against Gram Negative Bacteria and Yeast 1513
  Wisatre Kongcharoensuntorn and Jiraphorn Arrayasillapathon
- Comparison of three decontamination methods in the preparation of sputum for *Mycobacteria* culture in Hadyai Hospital 1528
  Jareerat Yodsawat et al.
- Differentiation of myeloid leukemia by novel monoclonal antibodies specific to human liver heparan sulfate proteoglycans 1535
  Tajarungsee P et al.
- Urine Blood Cell Examination : Comparison of Dipstick, Microscopic Examination and the iQ200 Automated Urine Microscopy Analyzer 1542
  Pornvaree Lamchiagdhase et al.
- A Whole Blood Control for Automated Blood Cell Counter : Coulter MaxM 1554
  Kritsana Pathepchotiwong et al.
- Immuno Memo : Achievement Motivation Development for Immunology Learning 1565
  Sarawut Suttirat and Taweeporn Phanpanich

Note

- การประเมินคุณภาพบทเรียนคอมพิวเตอร์ช่วยสอน เรื่องความผิดปกติของโครโมโซม ของนักศึกษาแพทยศาสตร์ 1575
  อรุณ วงก์คำปวง
- Restrospective study of deep neck infection in Thammasat University Hospital 1584
  Mongkol Tangnggkkee

Special Article

- ประสบการณ์ 40 ปี ในวงการวิจัยวิทยาศาสตร์ 1592
  ศาสตราจารย์เกียรติคุณ สนิท มกรแก้วเกยูร

0125-2682

ISSN 0125-2682

An Official Publication of The Association of Medical Technologist of Thailand

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย

ผลของพิเพอรีนต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมนุษย์

ศิริพร ชื้อชวาลกุล[1]* ษิรัชนา อาจสัญจร[2] นันทกา โกรานา[3] และ ยง ภู่วรวรรณ[4]

[1]ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด, [2]หลักสูตรปริญญาโท สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330
[3]ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000
[4]ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

บทคัดย่อ

พิเพอรีนเป็นสารอัลคาลอยด์หลัก พบมากในพืชกลุ่มพริกไทย มีการรายงานว่าสารเอไมด์สกัดนี้ออกฤทธิ์ในการกดประสาทส่วนกลาง ลดไข้ และแก้อักเสบได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า พิเพอรีนมีฤทธิ์ในการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและยับยั้งการเจริญของมะเร็งที่เกิดขึ้นในหนู การศึกษานี้เป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่ทำการทดสอบผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมนุษย์ในหลอดทดลอง โดยทำการทดสอบสารกับเซลล์มะเร็งมนุษย์ที่มีต้นกำเนิดมาจากอวัยวะต่าง ๆ กัน 4 แหล่ง และตรวจวัดผลของสารในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยอาศัยหลักการ MTS จากการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งจากมดลูก (HeLa) กล่องเสียง (HEp-2) และลำไส้ใหญ่ (HT-29) ทนต่อพิเพอรีนแม้ในระดับความเข้มข้นที่สูงถึง 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดคิดเป็น 90%, 70% และ 66% ตามลำดับ ผลการทดลองที่น่าสนใจคือ พิเพอรีนที่ความเข้มข้นเพียง 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (H9) ได้เป็นอย่างดี จากการศึกษาพบว่าฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ H9 ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารด้วย โดยความเข้มข้นของสารในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ให้ลดลง 50% มีค่าเท่ากับ 17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองนี้ สรุปได้ว่าพิเพอรีนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่มีแหล่งกำเนิดมาจากเม็ดเลือดขาว แสดงว่าสารออกฤทธิ์อย่างจำเพาะในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่มาจากแหล่งกำเนิดต่างกัน อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพิเพอรีนต่อไป

คำหัส : พิเพอรีน ฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง H9

* corresponding author. Tel.: 02-218-1082; Fax: 02-218-1083
E-mail address: siriporn.ch@chula.ac.th

J. Med. Tech. Assoc. Thailand, Vol. 34 No. 2, August 2006 *Original Article*

Anti-proliferative effect of Piperine on Human Tumor Cells

Siriporn Chuchawankul[1]*, Siratchana Ajsonjorn[2], Nantaka Khorana[3] and Yong Pooworawon[4]

[1]Department of Transfusion medicine, [2]M.Sc. program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

[3]Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naraesuan University, Phitsanulok 65000

[4]Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

Abstract

Piperine, a major alkaloid of most *Piper* species, was an amide isolated and reported to exhibit central nervous system depression, anti-pyretic and anti-inflammatory activity. Several studies showed immunomodulatory and antitumor activity of piperine towards mouse carcinomas. Our study is the first to investigate whether piperine has those effects on human tumor cells. Human cancer cells derived from four different organs were employed, and their growths affected by piperine were determined by MTS assay. We found that cancer cells derived from cervix (HeLa), larynge (HEp-2) and colon (HT-29) were less sensitive to piperine even at a high concentration (200 μg/mL) where cell viabilities were remained at about 90%, 70% and 66%, respectively. Interestingly, the proliferation of cancer cells derived from leukocyte (H9) was markedly inhibited by piperine even at a low concentration (40 μg/mL). We also demonstrated a concentration dependent effect of piperine on H9, with 50% inhibition (IC_{50}) of proliferation at 17 μg/mL. These studies suggest the effect of piperine on inhibiting the growth of cell line derived from specific origin, indicating that the inhibition by piperine is selective. However, further studies should be carried out to explore the biological activities of this compound.

Key words : Piperine, antitumor activity, H9

*corresponding author. Tel.: 02-218-1082; Fax: 02-218-1083

E-mail address: siriporn.ch@chula.ac.th

Introduction

Piperine (1-piperoyl piperidine, as shown in Figure 1) is a major alkaloid found in *Piper nigrum* (black pepper), *Piper longum* (long pepper) and several plants in the Piperaceae family. It is an amide derivative which was demonstrated the neurodepressant, analgesic, insecticide, anti-pyretic, anti-allergic and anti-inflammatory activity.[1-4] The compound exhibited *in vitro* inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene synthesis.[5] Anti-microbial and anti-parasitic activities with piperine have also been reported.[6] Others reported immunotoxicological effects of piperine in mice when administered at a high dose. Sunila and Kuttan showed that piperine at the dose of 1.14 mg could inhibit the solid tumor development in mice induced with Dalton's lymphoma ascites (DLA) cells and increase the life span of mice bearing Ehrlich ascites carcinoma (EAC) tumor to 37.3% and 58.8%, respectively.[7] However, piperine at the dose of 1.12 mg/kg might be taken as a no observed adverse effect level (NOAEL) for animal.[8] In addition, Kuttan also reported that piperine could inhibit the metastasis induced by B16F10 melanoma cells.[9,10]

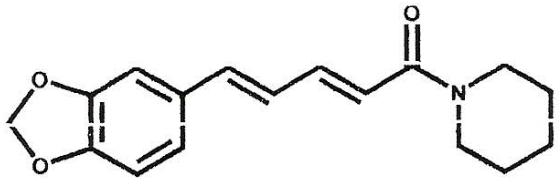


Fig. 1 The chemical structure of piperine (1-piperoyl piperidine).

Cancer is the major cause of death in both men and women around the world. Therefore, research and development of more effective and less toxic drugs by the pharmaceutical companies have been constantly increased in the past few years. Many compounds derived from dietary and medicinal plants are known to be effective chemopreventive and anti-tumor agents in a number of experimental models of carcinogenesis. Dietary fibers, vegetables and fruits have been shown to induce a chemopreventive action on the gastrointestinal tract[11] and mammary organ.[12] Epigallocatechin gallate (EGCG) as the major polyphenolic constituent of green tea, has been claimed to provide protective effects against gastrointestinal cancer.[11] Grape seed extract given with genistein is chemopreventive in an animal model of breast cancer.[12] A high consumption of fruits and vegetables has been shown to reduced the risk of various cancers such as oral cancer[13, 14] and prostate carcinoma, the most common tumor in men.[15] Therefore, anti-proliferative screening models *in vitro* should provide important preliminary data to help selecting

plant extracts or compounds with potential anti-neoplastic properties for future study.

The reports of piperine as an anti-cancer agent have been rising. Additionally, piperine could effectively inhibit B(a) P-induced lung carcinogenesis in albino mice by not only offering protection from protein damage, but also suppressing cell proliferation.[16] However, no anti-tumor activity of piperine towards human tumor cells has been reported. Therefore, we are the first to investigate an *in vitro* anti-proliferative activity of piperine using various human tumor cells.

Material and Methods

Piperine

Compound was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) as 2 mg/mL stock solution, and further diluted to the desired concentrations with culture medium.

Chemicals and reagents

Piperine was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). 0.25% Trypsin-EDTA (HyClone Laboratories, Inc.; Logan, UT), $Ca^{2+}Mg^{2+}$-free Dulbecco's phosphate-buffered saline (Promega Corp.; Madison, WI), 0.4% Trypan blue dye (GIBCO, Invitrogen, NY).

Cell lines and culture conditions

H9 (Human T cell lymphoma: ATCC HTB-176) was a gift from Dr. Pornthep Tiensiwakul (Viruses and Cell Cultures Repository Center, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Thailand). Cells were maintained in RPMI-1640 (GIBCO, Invitrogen, NY) containing 2 mM glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (HyClone Laboratories, Inc.; Logan, UT), 50 units/ml of penicillin , 50 μg/ml of streptomycin and anti-mycotic (GIBCO, Invitrogen, NY) in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO_2.

HeLa (cervix carcinoma: ATCC CCL-2), HT-29 (colon carcinoma: ATCC HTB-38) and HEp-2 (larlynge carcinoma: ATCC CCL-23) were kindly provided by Dr. Apiwat Mutirangura (Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand). Cells were maintained in DMEM (HyClone Laboratories, Inc.; Logan, UT) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 50 units/ml of penicillin, 50 μg/ml of streptomycin and antimycotic in a 5% CO_2 humidified incubator at 37°C. Tumor cell numbers and cell viability were determined by hemocytometer counting and viability was assessed by trypan blue dye exclusion method.[17]

MTS assay

The procedure for MTS assay followed the method described in CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Prolifearion Assay Technical Bulletin #TB112 (Promega Corp.; Madison, WI) with only minor modifications. Cells were seeded into 96-well plates (Corning Costar; Corning, NY). Adherent cells were allowed to attach overnight. The next day, cells were exposed to DMSO (1%, as vehicle) or with different concentrations of piperine for

72 h. After treatment, MTS tetrazolium compound (Owen's reagent) 20 μl were directly added to 100 μl culture wells and incubate for 4 h. in a 5% CO_2 humidified incubator at 37°C. The MTS tetrazolium compound was bioreduced by metabolically active cells into a colored formazan product that was soluble in tissue culture medium. In this assay, the quantity of formazan product formed is directly proportional to the number of viable cells in the cultures. The colored formazan is correlative with the metabolic state of the cells and cell viability.[18] Absorbance was recorded at 490 nm by ELISA reader (Anthos, model zenyth 340).

Determination of piperine's effect on the inhibition of tumor cell proliferation

All human tumor cells were treated with culture medium containing different concentrations of piperine (5-200 μg/mL). DMSO was used as a (vehicle control) solvent dissolve the compound tested. The DMSO concentration (1%) was held constant in all experiments, and this concentration does not cause any cytotoxicity on tumor cells. Cell viabilities in samples treated with piperine were normalized to percent of control and the mean and standard deviations were calculated.

Determination of the *in vitro* cytotoxic activity of piperine to H9

H9 (1×10^6 cells) were incubated with various concentrations of piperine (10-200 μg/mL) in a final volume of 1 mL at 37°C overnight. After incubation the viability of cell were determined by the trypan blue dye exclusion method.[17]

Statistical analysis

Each experiment was performed at least three times and the results are presented as the mean ± S.D. The Student's unpaired *t*-test was used to compare the means of two groups. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results

Effect of piperine on tumor cell proliferation

As shown in Figure 2, piperine slightly affected the viability of HeLa, HEp-2 and HT-29 cells even at a high concentration (200 μg/mL) where cell viability still remained at about 90%, 70% and 66%, respectively. Results were expressed in percentage of cell viability in treated cells to that of untreated cells.

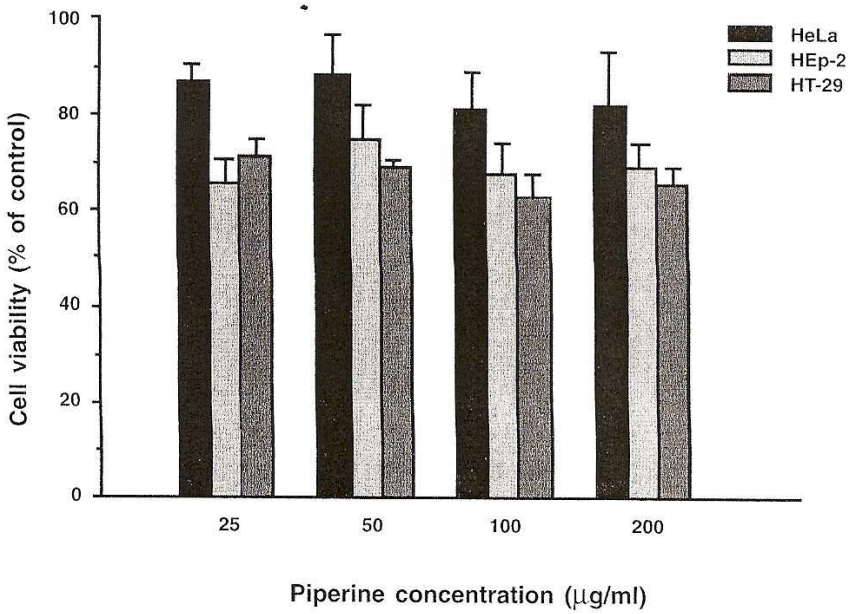


Fig. 2 Effect of piperine on the proliferation of HeLa, HEp-2 and HT-29 tumor cells. Cells grown in 96-well plates were cultured in various concentrations of the compound for 72 h. Cells growth was assessed by MTS assay. The results are presented as mean ± S.D.

Interestingly, piperine at low concentration (40 μg/mL) markedly inhibited H9 proliferation where cell viability remained at only 36% ($p < 0.05$). Our result demonstrated that piperine provided differential anti-proliferative property on the cervix, larynge, colon and leukemia cell lines. Among these cell lines, H9 was the most susceptible to piperine treatment while HeLa was the least. Moreover, piperine was shown to inhibit H9 proliferation in a concentration-dependent manner (Figure 3), and the concentration found to reduce 50% proliferation (IC_{50}) was about 17 μg/mL (Figure 4).

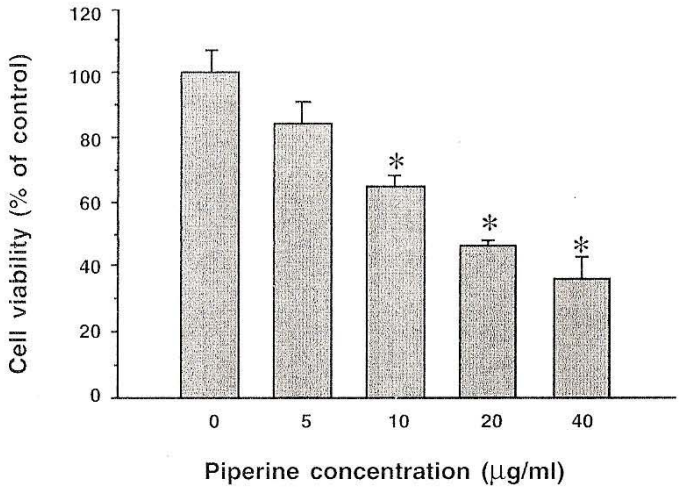


Fig. 3 Effect of piperine on the proliferation of H9. Cells grown in 96-well plates were cultured in various concentrations of the compound for 72 h. Cell growth was assessed by MTS assay. The results are presented as mean ± S.D. * $P < 0.05$.

Cytotoxicity of piperine towards H9 cell in culture

Piperine was found to be cytotoxic towards H9 in culture. The compound demonstrated to be toxic was at a concentration of 10 μg/mL and piperine at a concentration of 200 μg/mL (maximal dose tested) induced the cell death 90% (data not shown).

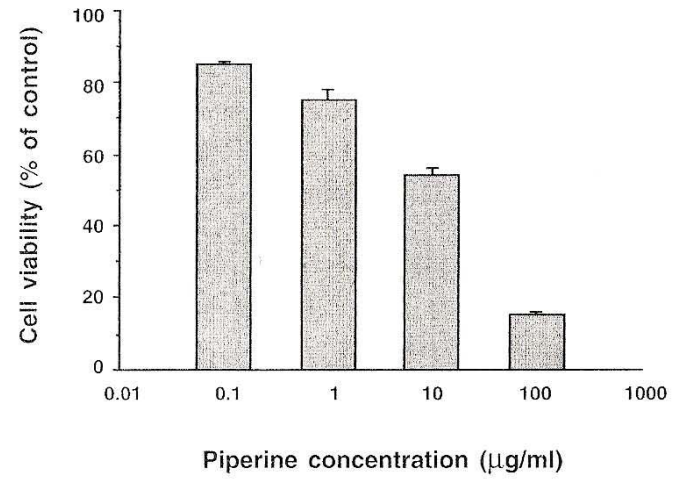


Fig. 4 Effect of piperine on the proliferation of H9. The percentage of cell viability was assessed by MTS. The results are presented as mean ± S.D.

Discussion

Although many of herbal products have been used traditionally for cancer treatment for a long time, few scientific reports are available about their efficacies, active principles, modes of action, side effects and possible adverse interactions with conventional anti-tumor drugs. Therefore, investigation the effects of herbal compounds *in vitro* on cancer cell lines is the preliminary study to help understanding their mechanisms of action and maybe helpful for further study using animal model.

The main objective of this study was to focus on the *in vitro* anti-tumor activity of piperine. We found that piperine ineffectively inhibited proliferation of HeLa, HEp-2 and HT-29 tumor cells even at a highest concentration tested (200 μg/mL). In our studies, the maximal concentration of piperine was limited due to its solubility. Also, percentage of vehicle (DMSO) solubilizing the compound could not exceed 1% for all concentrations tested. To overcome this limitation, we have tested tumor cells with piperine in numerous types of solvent. None of them gave a better solubility with non-toxicity to the cells themselves. Therefore, the maximal dosages of piperine selected in our model were on the basis of its solubility. Higher concentration of piperine (>200 μg/mL) might efficiently inhibit the three tumor cell proliferation or maybe toxic to those cells.

Researcher reported that the *in vitro* inhibitory effect of fagopyrum cymosum (fago-c) from Fagopyrum cymosum (Trev.) on tumor growth is selective.[19] The growth of cancer cells from lung, liver, colon, leukocytes and bone is inhibited by Fago-c. However, cancer cells derived from prostate, cervix, ovary and brain are not sensitive to Fago-c. Current studies show that piperine inhibits the growth of cell line derived from specific origin, leukocyte. On the other hand, cancer cells from cervix, larynge and colon are less sensitive to piperine. Therefore, the mechanism and the cellular target of piperine should be further investigated.

As shown in Figure 3, piperine inhibits H9 proliferation in a dose-dependent manner with the concentration required to reduce 50% of the growth is about 17 μg/mL. In studies the compound's cytotoxicity, treatment of the H9 cells using piperine at 10 μg/mL and 20 μg/mL overnight resulted in the cell death 18% and 24%, respectively, indicating this compound is in fact cytotoxic to H9.

These results may be beneficial for the search of new herbal product for T cell lymphoma treatment. Moreover, additional studies on other tumor cells derived from leukocyte and immunomodulatory activity of piperine such as the effect on lymphocyte proliferation, cell-mediated cytotoxicity and cytokine production is undergoing in our laboratory.

Conclusion

In conclusion, our experimental evidence shows that piperine exhibits interesting anti-proliferative effect on several human tumor

cells. Our works showed differential anti-proliferative effect on tumor cells derived from different organs; cervix, larynge, colon and leukemia cell lines, with the highest activity on H9 lymphoma. The exact mechanism of action responsible for the anti-tumor proliferation and the effects of a substance targeted specific organs in the body should be studied further. In summary, these findings suggest that piperine may be useful as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, and may justify further investigation of other possible beneficial biological properties.

Acknowledgement

This work was supported by Thailand Research Fund 2005. (grant number MRG 4880027) and partly supported by Grant for Development of New Faculty Staff, Chulalongkorn University. The authors would like to thank Dr. Tewin Tencomnao for his helpful discussion. We would also like to express our gratitude to the Halal Science Center and Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University for allowing us to use their facilities.

References

1. Szolesanyi J. Tetrodotoxin resistant non-cholinergic neurogenic contraction evoked by capsaicinoids and piperine on the guinea pig trachea. Neurosci Lett 1983; 4 : 3-86.
2. Virinder SP, Subash CJ, Kirpal SB, Rajani J, et al. Phytochemistry of genus Piper. Phytochemistry 1997; 46 : 597-673.
3. Mittal R. and Gupta RL. In vitro antioxidant activity of piperine. Methods Find Exp Clin Pharmacol 2000; 22 : 271-4.
4. Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T. Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their anti-allergic actions, Chem Pharm Bull 1992; 40 : 1439-42.
5. Stohr JR, Xiaso PG, Bauer R. Constituents of Chinese Piper species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis *in Vitro*, J Ethanopharmacol 2001; 75 : 133-9.
6. Raay B, Medda S, Mukhopathyay S, Busu MK. Targeting of piperine interrelated in mamose coated liposomes in experimental leishmaniasis. Indian J Biochem Biophys 1999; 36 : 248-51.
7. Sunila ES and Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn and piperine. J Ethanopharmacol 2004; 90 : 339-46.
8. Ram KSD, Santosh K, Ravi S. Immunotoxicological effects of piperine in mice. Toxicology 2004; 196 : 229-36
9. Pradeep, C.R., Kuttan, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. Clin Exp Metastasis 2002; 19 : 703-8.
10. Pradeep CR and Kuttan G. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor-kB (NF-kB), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflamatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. Int J Immunopharmacol 2004; 4 : 1795-803.

11. Borrelli F, Capasso R, Russo A, Ernest E. Systematic review: green tea and gastrointestinal cancer risk. Aliment Pharmacol Ther 2004; 19 : 497-510.
12. Kim H, Hall P, Smith M, et al. Chemoprevention by Grape Seed Extract and genistein in Carcinogeninduced Mammary Cancer in Rats Is Diet Dependent. J Nutr 2004; 134(12 Suppl) : 3445S-3452S.
13. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. Oral Oncology 1997; 33 : 302-12.
14. Morse DE, Pendrys DG, Katz RV, et al. Food group intake and the risk of oral epithelial dysplasia in a United States population. Cancer Causes Control 2000; 11 : 713-20.
15. Thompson IM, Coltman Jr. CA, Crowley J. Chemoprevention of prostate cancer: the prostate cancer prevention trial. Prostate 1997; 33 : 217-21.
16. Karuppaiyah S, Syed MB, Dhanapal S. Protective effect of piperine on benzo(a) pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice Clin Chim Acta 2004; 350 : 73-8.
17. Talwar GP. In: Talwar GP (ed.). Hand Book of Practical Immunology. National Book Trust, New Delhi, 1974; pp. 336-9.
18. Wiepz GJ, Edwin F, Patel T, Bertics PJ. Methods for determining the proliferation of cells in response to EGFR ligands. Methods Mol Biol 2006; 327 : 179-87.
19. Pui-Kwong C. Inhibition of tumor growth in vitro by the extract of fagopyrum cymosum (fago-c). Life Sci 2003; 72 : 1851-8.

IN VITRO INHIBITORY ACTIVITY OF BLACK PEPPER EXTRACTS AND PIPERINE ON HUMAN LEUKEMIC CELL PROLIFERATION

Siriporn Chuchawankul[1], **Nantaka Khorana**[2], **Siratchana Ajsonjorn**[3] **and Yong Pooworawan**[4]

[1]Department of Transfusion medicine, [2]M.Sc. program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330. Thailand; [3]Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naraesuan University, Phitsanulok, 65000. Thailand; [4]Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330. Thailand

ABSTRACT

Black pepper (*Piper nigrum*) is one of the most common spices highly consumed worldwide. Peppers have been used traditionally due to their various biological activities. A major alkaloid and active component of most *Piper* spp. is piperine. Black pepper and piperine were reported to exhibit CNS depression, anti-pyretic and anti-inflammatory activity. Several studies showed their immunomodulatory and anti-tumor activity towards mouse carcinomas. In our study on various human tumor cells evaluated using MTS assay, anti-proliferative effect of tested cell lines was revealed by piperine at different degree of inhibition. Interestingly, the proliferation of human leukemic cell lines including H9, Jurkat, Molt-4 and K562 were inhibited by piperine with 50% inhibition (IC_{50}) of proliferation at 17, 19, 33 and 57 µg/mL, respectively. These cell lines were more susceptible to piperine as compared to HEp-2, HeLa and HT-29 (IC_{50} > 200 µg/ml). Additionally, crude extracts of black pepper were investigated for their anti-proliferative effect towards human tumor cells. We found that methanol and diethylether extracts inhibited proliferation of Molt-4 more effectively as compared to K562. In conclusion, certain tested compounds were evident to suppress all human leukemic cells. Further analysis on the progression of the cell cycle and apoptotic mechanism is underway. Importantly, thorough investigation of the modulatory role of piperine in human PBMCs is ongoing.

OBJECTIVE

To investigate an *in vitro* anti-proliferative activity of piperine and black pepper extracts on various human leukemic cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Piperine
was dissolved in DMSO as 2 mg/mL stock solution, and further diluted to the desired concentrations with culture medium.

Black pepper extraction
Black pepper seeds from Mueng Mai Market, Chaing Mai, Thailand, were grounded and subsequently macerated with water, methanol, dichloromethane, hexane or diethylether for 24 h. The filtrates were collected and maceration process were repeated twice. Finally, all filtrates were collected and evaporated to result in crude extracts.

Figure 2: Pepper plants

Cell lines and culture conditions Jurkat, K562 and Molt-4 were maintained in RPMI-1640 (GIBCO, Invitrogen, NY), supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 50 units/ml of penicillin, 50 µg/ml of streptomycin and anti-mycotic in a 5% CO_2 humidified incubator at 37 °C.

MTS assay were performed following the method described in CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin #TB112 (Promega Corp.; Madison, WI) with only minor modifications. Cells were seeded into 96-well plates (Corning Costar; Corning, NY) and exposed to DMSO (0.5%, as vehicle) or with different concentrations of piperine and Black pepper extracts for 72 h. After treatment, MTS tetrazolium compound 20 µl were directly added to 100 µl culture wells and incubate for 4 h in a 5% CO_2 humidified incubator at 37 °C. The colored formazan is correlative with the metabolic state of the cells and cell viability. Absorbance was recorded at 492 nm by ELISA reader (Anthos, zenyth 340).

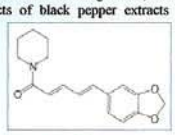
ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Thailand Research Fund 2005 (grant number MRG 4880027) and partly supported by Grant for Development of New Faculty Staff and Research Grant from Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University.

INTRODUCTION

Piper plants and piperine have been reported to exhibit a variety of biological activities including central nervous system depression, anti-pyretic activity, anti-inflammatory activity, anti-oxidant activity.[1-4] Piperine (1-piperoyl piperidine, as shown in **Figure 1**) is a major alkaloid found in *Piper nigrum* (black pepper), *Piper longum* (long pepper) and several plants in the Piperaceae family. Several studies showed immunomodulatory and anti-tumor activity of piperine and black pepper towards mouse carcinomas.[4] Sunila and Kuttan showed that piperine at the dose of 1.14 mg could inhibit the solid tumor development in mice induced with Dalton's lymphoma ascites (DLA) cells and increase the life span of mice bearing Ehrlich ascites carcinoma (EAC) tumor to 37.3% and 58.8%, respectively.[5] In addition, they reported that piperine could inhibit the metastasis induced by B16F10 melanoma cells.[6,7] Our previous study showed the anti-proliferative effect of piperine on various human tumor cells.[8] Interestingly, the proliferation of human leukemic cell line, H9 was markedly inhibited by piperine (IC_{50} = 17µg/mL). In this study, we performed a Non-Radioactive Cell Proliferation Assay to investigate piperine's effect on various human leukemic cells including Jurkat, Molt-4 and K562. Additionally, the anti-proliferative effects of black pepper extracts on leukemic cells were examined.

Figure 1: The chemical structure of piperine



RESULTS AND DISCUSSIONS

Anti-proliferative effect of piperine on various human leukemic cells

As demonstrated in **Table 1**, our previous report showed that piperine slightly affected the viability of HeLa, HEp-2 and HT-29 cells even at the highest concentration (200 µg/mL) tested where cell viability still remained at about 90%, 70% and 66%, respectively. [8] On the contrary, 17 µg/mL of the compound inhibited 50% of H9 proliferation.

Table 1: IC_{50} values of piperine on a variety of human tumor cells

Cell lines	Piperine (µg/ml)
HT-29[8]	>200
Hep-2[8]	>200
HeLa[8]	>200
H9[8]	17
Jurkat	19
Molt-4	33
K562	57

In this study, we examined piperine's effect on additional human leukemic cells. As shown in **Table 1**, Jurkat, Molt-4 and K562 were treated with piperine. Proliferations of tested cell lines were observed by MTS assay. We demonstrated that the compound at 19, 33 and 57 µg/mL inhibited 50% proliferation of Jurkat, Molt-4 and K562, respectively.

Table 2: IC_{50} values of black pepper extracts on human leukemic cells

Black pepper extracts	IC_{50} (µg/ml)	
	Molt-4	K562
Methanol	10	46
Di-ethylether	23	42

We also investigated inhibitory effect of black pepper extracts on human leukemic cells. As shown in **Table 2**, methanol and diethylether extracts inhibited proliferation of Molt-4 more effectively as compared to K562.

In conclusion, our experimental evidence shows that piperine and black pepper extracts exhibit interesting anti-proliferative effect on human leukemic cells. The exact mechanism of action responsible for the anti-tumor proliferation should be studied further. These findings suggest that piperine and black pepper extracts may be useful as cancer chemopreventive and chemotherapeutic agents, and may justify further investigation of other possible beneficial biological properties. Further analysis on the progression of the cell cycle and apoptotic mechanism is underway. Importantly, thorough investigation of the modulatory role of piperine in human PBMCs is ongoing.

REFERENCES

1. Szolcsanyi J. *Neurosci Lett* 1983; 4: 3-86.
2. Virudar SP, Subash CJ, Kirpal SB, Rajani J, *et al. Phytochemistry* 1997; 46: 597-673.
3. Mittal R, and Gupta RL. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2000; 22: 271-274.
4. Kabegawa H, Matsumoto H, Satoh T. *Chem Pharm Bull* 1992; 40: 1430-1442.
5. Sunila ES and Kuttan G. *J Ethanopharmacol* 2004; 90: 339-346.
6. Pradeep CR and Kuttan G. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 703-708.
7. Pradeep CR and Kuttan G. *Int J Immunopharmacol* 2004; 4: 1795-1803.
8. Chuchawankul S, Ajsonjorn S, Khorana N, Pooworawan Y. *J Med Tech Assoc Thailand* 2006 ; 34 : 1496-1505.

The Sixth

Princess Chulabhorn International Science Congress

THE INTERFACE OF CHEMISTRY AND BIOLOGY IN THE "OMICS" ERA: ENVIRONMENT & HEALTH AND DRUG DISCOVERY

ABSTRACTS FOR POSTER SESSION

November 25-29, 2007

Bangkok, Thailand

organized by

Chulabhorn Research Institute

VOLUME II

PT-24

IN VITRO INHIBITORY ACTIVITY OF BLACK PEPPER EXTRACTS AND PIPERINE ON HUMAN LEUKEMIC CELL PROLIFERATION

Siriporn Chuchawankul[1], Nantaka Khorana[2], Siratchana Ajsonjorn[3] and Yong Pooworawan[4]

[1]Department of Transfusion medicine, [3]M.Sc. program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand; [2]Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naraesuan University, Phitsanulok, 65000 Thailand; [4]Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand

Black pepper (*Piper nigrum*) is one of the most common spices highly consumed worldwide. Peppers have been used traditionally due to their various biological activities. A major alkaloid and active component of most *Piper* spp. is piperine. Black pepper and piperine were reported to exhibit CNS depression, anti-pyretic and anti-inflammatory activity. Several studies showed their immunomodulatory and anti-tumor activity towards mouse carcinomas. In our study on various human tumor cells evaluated using MTS assay, anti-proliferative effect of tested cell lines was revealed by piperine at different degree of inhibition. Interestingly, the proliferation of human leukemic cell lines including H9, Jurkat, K562 and Molt-4 were inhibited by piperine with 50% inhibition (IC_{50}) of proliferation at 17, 19, 33 and 57 μg/mL, respectively. These cell lines were more susceptible to piperine as compared to HEp-2, HeLa and HT-29 (IC_{50} > 200 μg/mL). Additionally, crude extracts of black pepper were investigated for their anti-proliferative effect towards human tumor cells. We found that methanol and diethylether extracts inhibited proliferation of Molt-4 more effectively as compared to K562. In conclusion, certain tested compounds were evident to suppress all human leukemic cells. Further analysis on the progression of the cell cycle and apoptotic mechanism is underway. Importantly, thorough investigation of the modulatory role of piperine in human PBMCs is ongoing.

ภาคผนวก 3

INHIBITORY EFFECT OF PIPERINE ON PROLIFERATION OF HUMAN TUMOR CELLS

Siratchana Ajsonjorn[1] and Siriporn Chuchawankul[2]

[1]M.Sc. program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine, [2]Department of Transfusion medicine
Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

ABSTRACT

Piperine, an amide isolated from piper species, was reported to display central nervous system depression, antipyretic and anti-inflammatory activity. Several studies showed immunomodulator and antitumor activity of piperine towards mouse carcinomas. Our study is the first to investigate whether piperine has those effects on human tumor cells. Human cancer cells derived from different organs were employed, and their growths affected by piperine were determined by MTS assay. We found that cancer cells derived from colon (HT-29) and larynx (HEp-2) were less sensitive to piperine even at a high concentration (200 μg/ml) where cell viabilities were remained at about 70% and 66%, respectively. Interestingly, the proliferation of cancer cells derived from leukocyte, H9 and Jurkat, were markedly inhibited by piperine even at a low concentration (20 μg/ml). In addition, piperine was shown to inhibit H9 proliferation in a concentration dependent manner, with 50% inhibition (IC_{50}) of proliferation at 17 μg/ml. In contrast, cell viability of Jurkat was remained at about 43% even at a higher concentration (100 μg/ml). This study suggests the effect of piperine on inhibiting the growth of cell lines derived from specific origin, indicating that the inhibition by piperine is selective. Further experiments should be studied to explore the mechanism of anti-proliferative effect of piperine on H9 and Jurkat.

INTRODUCTION

Cancer is one of the major cause of death in Thailand. The number of people with cancer is increasing everyday. There are various cancer treatment but they all have side effects that decrease the quality of life of patients. Current research has concentrate on extraction of medicinal plants to prevent and treat cancer because those plants are easy to find, inexpensive and have less side effects when compare to traditional therapy. Piperine ($C_{17}H_{19}NO_3$, as shown in figure 1) is an amide isolated from *Piper nigrum* (black pepper), *Piper longum* (long pepper) and some plants in Piperaceae family. Piperine stimulates the body's natural ability to generate heat, assists in the absorption of selenium, vitamin B and β-carotene and enable more efficient absorption of needed or targeted nutrients during the digestive process.[1,2] Piperine was reported to display central nervous system depression, antipyretic and anti-inflammatory activity. Several studies showed immunomodulator and antitumor activity of piperine towards mouse carcinomas.[3] Furthermore, piperine could inhibit the metastasis induced by B16F-10 melanoma cells.[4,5] Our study is the first to investigate whether piperine has those effects on human tumor cells.

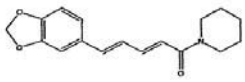


Figure 1. The chemical structure of piperine

OBJECTIVE

To study inhibitory effect of piperine on proliferation of human tumor cells.

MATERIALS AND METHODS

Reagent

Piperine was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). 0.25% Trypsin-EDTA (Hyclone Laboratories, Inc.; Logan, UT), $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -free Dulbecco's phosphate-buffered saline (Promega Corp.; Madison, WI)

Cell culture

H9 and Jurkat (Human T cell lymphoma) were cultured in RPMI-1640 (GIBCO, Invitrogen, NY), while HT-29 (colon carcinoma) and HEp-2 (larynx carcinoma) were cultured in DMEM (Hyclone Laboratories, Inc.; Logan, UT). All media were supplemented with 10% FBS (Hyclone Laboratories, Inc.; Logan, UT), 100 U/ml of penicillin, 100 μg/ml of streptomycin and antimycotic (GIBCO, Invitrogen, NY) at 37°C in 5%CO_2 incubator.

MTS assay

The procedure followed the method described in CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corp.; Madison, WI). Cells were seeded into 96-well plates (Corning Costar; Corning, NY) and adherent cells were allowed to attach overnight. Then cells were exposed to DMSO (1%, as vehicle) or different concentration of piperine (5-200 μg/ml) and incubated for 72 h. After incubation, MTS tetrazolium compound 20 μl were added to 100 μl culture wells and incubate for 4 h at 37 °C in 5%CO_2 incubator. The MTS tetrazolium compound was bioreduced by metabolically active cells into a colored formazan product that directly proportional to the number of viable cells in the cultures and analysed on a microplate reader at a wavelength of 490 nm.

Statistical analysis

The experiments were repeated at least three times and the results were presented as mean ± S.D. The Student's unpaired *t*-test was used to compare the means of two groups. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

RESULTS

As shown in Figure 2, cancer cells derived from colon (HT-29) and larynx (HEp-2) were less sensitive to piperine even at a high concentration (200 μg/ml) where cell viabilities were remained at about 70% and 66%, respectively. The results were presented in percentage of cell viability in treated cells to that of untreated cells.

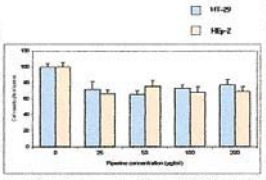


Fig. 2. Effect of piperine on the proliferation of HT-29 and HEp-2 tumor cells. Cells grown in 96-well plates were cultured in various concentration of the compound (25-200 μg/ml) for 72 h. Cells growth was assessed by MTS assay. The results are presented as mean ± S.D.

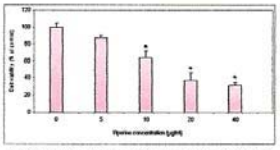


Fig. 3. Effect of piperine on the proliferation of H9 tumor cells. Cells grown in 96-well plates were cultured in various concentration of the compound (5-40 μg/ml) for 72 h. Cells growth was assessed by MTS assay. The results are presented as mean ± S.D. *$P < 0.05$.

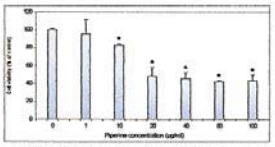


Fig. 4. Effect of piperine on the proliferation of Jurkat tumor cells. Cells grown in 96-well plates were cultured in various concentration of the compound (1-100 μg/ml) for 72 h. Cells growth was assessed by MTS assay. The results are presented as mean ± S.D. *$P < 0.05$.

Interestingly, the proliferation of cancer cells derived from leukocyte, H9 and Jurkat, were markedly inhibited by piperine even at a low concentration (20 μg/ml). In addition, piperine was shown to inhibit H9 proliferation in a concentration dependent manner (Figure 3), with 50% inhibition (IC_{50}) of proliferation at 17 μg/ml. In contrast, cell viability of Jurkat was remained at about 43% even at 100 μg/ml (Figure 4).

DISCUSSION & CONCLUSION

Medicinal herbs are increasingly being used for cancer therapy, therefore investigations into the effects of herbal compounds on tumor cells and their mechanism will be beneficial. The objective of this study is to focus on the in vitro antitumor activity of piperine on human tumor cells. We found that HT-29 and HEp-2 tumor cells were less sensitive to piperine even at a highest concentration (200 μg/ml) which was limited by its solubility. In our research, the percentage of vehicle (DMSO) could not exceed 1% for all test because higher concentrations may be toxic to cells.

Researcher reported that the in vitro inhibitory effect of fagopyrum cymosum (fago-c) from Fagopyrum cymosum (Trev.) on tumor growth is selective.[6] The growth of cancer cells from lung, liver, colon, leukocytes and bone is inhibited by Fago-c. However, cancer cells derived from prostate, cervix, ovary and brain are not sensitive to Fago-c. Currently, our studies show that piperine inhibits the growth of cell line derived from specific origin, leukocyte. In contrast, cancer cells from colon and larynx are less sensitive to piperine.

As shown in figure 3, piperine inhibits H9 proliferation in a concentration-dependent manner and a concentration of 17 μg/ml reduced growth by 50%. In contrast to Jurkat cell viability which remained at about 43% in a higher concentration (100 μg/ml) of piperine. This study suggests the selective effect of piperine on inhibiting the growth of cell lines derived from specific origins. Further experiments should be studied to explore the mechanism of anti-proliferative effect of piperine on H9 and Jurkat.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Thailand Research Fund 2005. (grant number MRG 4880027) The authors sincerely thank Dr. Pornthep Tiensiwakul for providing H9 and HEp-2 tumor cells, Dr. Weera wongkham for providing HT-29 tumor cells, Dr. Apiwat Mutirangura for providing Jurkat tumor cells, Dr. Nantaka Korana and Dr. Tewin Tencomnao for their kind help and valuable suggestions.

REFERENCES

1. Sibley David. "piperine" [http://www.dekoro.com/Articles/piperine-multiplies.html]
2. Cochran Tim. "piperine" In "Cochran foundation of medical research" [http://www.cochranfoundation.com/reports/piperin.html]
3. Sunila ES and Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. J EthnoPharmacol 2004; 90: 339-346.
4. Pradeep, C.R., Kuttan G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. Clin Exp Metastasis 2002; 19: 703-708.
5. Pradeep CR and Kuttan G. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor-kB (NF-kB), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. Int J Immunopharmacol 2004; 4: 1795-803.
6. Pei-Kwong C. Inhibition of tumor growth in vitro by the extract of fagopyrum cymosum (fago-c). Life Sci 2003; 72: 1851-8.

รวมบทคัดย่อ

การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 6

The 6th National Symposium on Graduate Research

ณ อาคารมหิตลาธิเบศร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่ 13-14 ตุลาคม 2549

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ร่วมกับ

ที่ประชุมคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยของรัฐ(ทคบร.)

Title	**PIPERINE'S INHIBITION ON PROLIFERATION OF HUMAN TUMOR CELLS**
Author	*Siratchana Ajsonjorn*[1*]
Advisor	*Siriporn Chuchawankul*[2]
Affiliation	[1]*M.Sc. program in Clinical Biochemistry and molecular medicine,* [2]*Department of Transfusion medicine Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University*
E-mail Address	*dao_aj@yahoo.com*
Keywords	*Piperine, H9, Jurkat*

Abstract

Piperine, an amide isolated from piper species, was reported to display central nervous system depression, antipyretic and anti-inflammatory activity. Several studies showed immunomodulator and antitumor activity of piperine towards mouse carcinomas. Our study is the first to investigate whether piperine has those effects on human tumor cells. Human cancer cells derived from different organs were employed, and their growths affected by piperine were determined by MTS assay. We found that cancer cells derived from colon (HT-29) and larynx (HEp-2) were less sensitive to piperine even at a high concentration (200 µg/ml) where cell viabilities were remained at about 70% and 66%, respectively. Interestingly, the proliferation of cancer cells derived from leukocyte, H9 and Jurkat, were markedly inhibited by piperine even at a low concentration (20 µg/ml). In addition, piperine was shown to inhibit H9 proliferation in a concentration dependent manner, with 50% inhibition (IC_{50}) of proliferation at 17 µg/ml. In contrast, cell viability of Jurkat was remained at about 43% even at a higher concentration (100 µg/ml). This study suggests the effect of piperine on inhibiting the growth of cell lines derived from specific origin, indicating that the inhibition by piperine is selective. Further experiments should be studied to explore the mechanism of anti-proliferative effect of piperine on H9 and Jurkat.

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มอบเกียรติบัตรฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

นางสาวพิรัชนา อาจสัญจร

ได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานวิจัยด้วยโปสเตอร์ ระดับดี

กลุ่มสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ ๖

ระหว่างวันที่ ๑๓-๑๔ ตุลาคม พุทธศักราช ๒๕๔๙

ณ อาคารมหิตลาธิเบศร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ให้ไว้ ณ วันที่ ๑๔ ตุลาคม พุทธศักราช ๒๕๔๙

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประธานที่ประชุมคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยของรัฐ(ทคบว.)