



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารสกัดจาก
ผลไม้ด้วยเมทานอล

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรางคณา จุ่งลก

มิถุนายน 2556

สัญญาเลขที่ MRG5380076

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารสกัดจาก
ผลไม้ด้วยเมทานอล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรางคณา จุ่งลก
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380076

ชื่อโครงการ: การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารสกัดจากผลไม้ด้วยเมทานอล

ชื่อนักวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรางคณา จุ่งลก
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

E-mail Address: cwarang@wu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 14 มิถุนายน 2553 – 14 มิถุนายน 2556

รายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพร นั้นเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็ง อย่างไรก็ตามสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมากเหล่านั้นยังไม่ได้ถูกนำมาพัฒนาและใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่นัก เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาในเชิงลึกถึงความเป็นพิษและกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ความเป็นพิษของสาร รวมถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของผลไม้และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชสมุนไพร รวมถึงสารที่มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง สารสกัดจากส่วนต่างๆ ของผลไม้ที่นำมาศึกษา ประกอบด้วยเมล็ดมะขาม ผลทับทิม เมล็ดและเปลือกลิ้นจี่ เมล็ดและเปลือกเงาะ ผลสำรองเปลือกมังคุด และใบฝรั่ง จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ดีและไม่ใช่พิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติเมื่อเปรียบเทียบกับยาต้านมะเร็ง 5-FU และสารสกัดจากผลไม้ชนิดอื่นๆ และยังเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 10 อย่างไรก็ตามพบว่าสาร catechin และ สาร procyanidin B2 ที่พบรายงานในสารสกัดจากเมล็ดมะขามพบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง สำหรับการศึกษาศักยภาพต้านมะเร็งของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติรวมถึงสารที่มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างจากพืชสมุนไพร ได้แก่ ขมิ้น ขิง แมงลักคา ฟาทะลายโจร ว่านชักมดลูก หอมแขก และโลดทะนง พบว่าสารจากหอมแขกมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีกว่าสารจากสมุนไพรชนิดอื่นๆ สารจากหอมแขกประกอบด้วยสาร ASWK023-25 จากการศึกษาพบว่าสาร ASWK024 สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งช่องปากตายแบบอะพอพโทซิสได้มากที่สุดถึงร้อยละ 47 และยังเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวัฏจักรชีวิตของเซลล์มะเร็งในระยะ G1 ส่วนสาร ASWK023 และ สาร ASWK025 พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งช่องปากตายแบบอะพอพโทซิสได้ร้อยละ 35 และ 32 ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดจากเมล็ดมะขามและสารจากหอมแขกเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในการต้านมะเร็งช่องปากซึ่งจะต้องศึกษาในเชิงลึกต่อไปในอนาคตอันใกล้

คำหลัก: สารสกัดจากผลไม้ สารจากสมุนไพร ฤทธิ์ต้านมะเร็ง การตายแบบอะพอพโทซิส

Abstract

Project Code: MRG5380076

Project Title: Effects of methanolic fruit extract in human oral cancer cells

Investigator: Asst.Prof.Dr. Warangkana Chunglok

Walailak University

E-mail Address: cwarang@wu.ac.th

Project Period: 14 June 2010 – 14 June 2113

It has been documented that antioxidants from vegetables, fruit, and herbs were the major sources of chemopreventive agents. However, the toxicity and mechanisms of actions of the chemopreventive agents remain to be elucidated. The purpose of these studies was to investigate anticancer properties, cytotoxicity, and mechanisms of actions of methanolic fruit extracts and natural compounds from herbs as well as their analogs in human mouth carcinoma cell line (CLS 354). Methanolic extracts were from seed of *Tamarindus indica* Linn., fruit of *Punica granatum* Linn., seed and pericarp of *Litchi chinensis* Sonn., seed and pericarp of *Nephelium lappaceum* Linn, fruit of *Scaphium Macropodum* Beaum, pericarp of *Garcinia mangstana* Linn. and leaf of *Psidium guajava* Linn. Methanolic extracts from seed of *Tamarindus indica* Linn. exhibited potent anticancer activity and less cytotoxic effect than did 5-FU and other fruits. The extract could induce apoptosis in CLS 354 cells by ~10%. However, catechin and procyanidin B2 from *Tamarindus indica* Linn extract did not have any effects on cancer cell proliferation. For natural compounds from herbs and their analogs, natural compounds from *Curcuma longa* L., *Zingiber officinalis*, *Murraya koenigii*, *Curcuma comosa*, *Andrographis paniculata*, *Hyptis suaveolens*, and *Trigonostemon reidioides* were chosen for anticancer testing in CLS 354 cells and in human colon carcinoma cells (Caco-2). Among them, natural compounds from *Murraya koenigii* were found to possess potent anticancer activity than other herbs. They were designed as ASWK023-25. ASWK024 revealed the greatest apoptosis induction ~47% and caused G1 arrest in CLS 354. ASWK023 and ASWK025 could induce apoptosis ~37 and 32%, respectively. Thus, methanolic extracts from seed of *Tamarindus indica* Linn. and natural compounds from *Murraya koenigii* may provide promising sources of anticancer bioactive agents which need to be further investigated in the near future

Keywords: Fruit extract, Bioactive compounds from herbs, Anticancer activity, Apoptosis

Executive Summary

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารสกัดจากผลไม้ด้วยเมทานอล

Effects of methanolic fruit extract in human oral cancer cells

โรคมะเร็งเกิดจากความผิดปกติของยีน ซึ่งยีนผิดปกติเหล่านั้นเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์และการมีชีวิตของเซลล์ทำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างไม่หยุดยั้ง เซลล์มะเร็งยังไปเบียดบังการทำงานของเนื้อเยื่อข้างเคียงและแพร่กระจายไปทั่วร่างกายจนเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในที่สุด ซึ่งในปัจจุบันพบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของคนไทยเป็นอันดับหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งที่นำกลัชนิดหนึ่งคือมะเร็งช่องปากซึ่งพบว่ามีอัตราการแพร่กระจายไปยังอวัยวะที่สำคัญต่าง ๆ เช่นที่ปอดได้สูง เนื่องจากก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กและกว่าจะพบว่าเป็นมะเร็งก็ตรวจเจอในระยะที่มีการแพร่กระจายไปแล้ว นอกจากนี้มะเร็งในช่องปากยังเป็นมะเร็งที่พบสูงในประชาชนภาคใต้เมื่อเปรียบเทียบกับภาคอื่นๆ

จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลองพบว่าการรับประทานผัก ผลไม้ ซึ่งประกอบไปด้วยเส้นใย วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ นั้นสามารถลดการเกิดมะเร็งในช่องปาก มะเร็งคอหอย และ มะเร็งหลอดอาหารได้ การศึกษาถึงประโยชน์ของสารอาหารที่สามารถป้องกันหรือมีฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดนี้จึงมีความสำคัญในการที่จะนำไปใช้ควบคุมป้องกันหรือรักษาโรคมะเร็งในช่องปาก รายงานการวิจัยที่ผ่านมาเป็นที่ยอมรับกันว่ากลไกการเกิดมะเร็งนั้นเกิดจากการกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในเซลล์มากเกินไปที่สารต้านอนุมูลอิสระจะสามารถกำจัดได้ จึงทำให้สารอนุมูลอิสระหรือเมทาบอลไลท์ที่เป็นพิษเหล่านั้นเข้าทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆที่มีความสำคัญภายในเซลล์ เช่น DNA เอนไซม์ โปรตีน และ ไขมัน ทำให้เกิดการทำลายเซลล์และนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของเซลล์กลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด ข้อมูลจากรายงานวิจัยมากมายที่สนับสนุนว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยป้องกันและรักษาโรคมะเร็งได้ ซึ่งเป็นสารที่สามารถพบได้ในอาหารโดยเฉพาะผักและผลไม้ มีคุณสมบัติในการช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งได้หลายชนิดโดยมีฤทธิ์แตกต่างกันไป เช่น ยับยั้งการเกิดสารก่อมะเร็ง ป้องกันสิ่งต่างๆ ที่ส่งเสริมให้เกิดมะเร็ง ลดอัตราการกลายพันธุ์ของเซลล์ และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังเช่นที่เคยมีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ/หรือฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของผลไม้ที่พบได้ในท้องถิ่น เช่น มะขาม เเงาะ ลิ้นจี่ และทับทิม รวมทั้งพืชสมุนไพรบางชนิดเช่น ขมิ้น ขิง หอมแขก และโสดทะนง อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของผลไม้และพืชสมุนไพรที่พบได้ในท้องถิ่นเหล่านี้รวมถึงยังไม่มีการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากจากผลไม้และพืชสมุนไพรเหล่านี้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผลไม้ได้แก่ มะขาม ทับทิม ลิ้นจี่ เเงาะ ส้ม รสสุก และฝรั่ง รวมทั้งพืชสมุนไพรได้แก่ ขมิ้น ขิง แมงลักคา หอมแขก ฟักทะลายโจร

ว่านชักมดลูก และ โลดทะนง ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก โดยเป็นพิษกับเซลล์ปกติของร่างกายต่ำและกลไกของสารในการทำลายเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้เพื่อนำไปสู่การค้นพบสารต้นแบบสำคัญที่ได้จากผลไม้และพืชสมุนไพรเหล่านี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนายาต้านมะเร็งชนิดนี้ รวมถึงการใช้เป็นข้อมูลในการเลือกบริโภคอาหารเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคมะเร็งชนิดนี้ต่อไป

งานวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาในระยะที่ 1 และ 2 ในเบื้องต้นผู้วิจัยและคณะได้ทำการศึกษาในส่วนของการสกัดสารจากผลไม้ด้วยเมทานอลและได้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากของสารสกัดจากผลไม้บางชนิดเปรียบเทียบกับยา 5-FU

การศึกษาในระยะที่ 1 เป็นศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผลไม้ด้วยเมทานอลทั้ง 7 ชนิดคือ เมล็ดมะขาม ผลทับทิม เมล็ดลิ้นจี่ เมล็ดเงาะ ผลสัระอง ใบมังคุด และใบฝรั่ง ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ตลอดจนศึกษากลไกการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิสของสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ดีในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก

การศึกษาในระยะที่ 2 เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่พบว่ามียางงานในสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งช่องปากได้ดีและการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์และแอนาลอกที่ได้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารแล้ว จากพืชสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ขมิ้น ขิง แมงลักคา หอมแขก ฟ้าทะลายโจร ว่านชักมดลูก และ โลดทะนง ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ และเซลล์มะเร็งช่องปาก ตลอดจนศึกษากลไกการหยุดวัฏจักรชีวิตของเซลล์มะเร็งและการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส

โดยมีรายละเอียดการศึกษาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผลไม้ด้วยเมทานอลทั้ง 7 ชนิดคือจากเมล็ดมะขาม ผลทับทิม เมล็ดและเปลือกลิ้นจี่ เมล็ดและเปลือกเงาะ ผลสัระอง ใบมังคุด และใบฝรั่ง ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากโดยการทดสอบ cytotoxicity test ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งจะทำให้การทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กันเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 (half maximal inhibitory concentration; IC_{50}) โดยเปรียบเทียบกับยาต้านมะเร็ง 5-FU

2. ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากผลไม้ด้วยเมทานอลทั้ง 7 ชนิดคือจากเมล็ดมะขาม ผลทับทิม เมล็ดลิ้นจี่ เมล็ดเงาะ ผลสัระอง ใบมังคุด และใบฝรั่ง ต่อการมีชีวิตของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติชนิด mononuclear cells ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งจะทำให้การทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

3. ศึกษาคุณสมบัติในการเป็น transformed cells เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งช่องปากด้วยสารสกัดจากผลไม้ที่ให้ฤทธิ์ดีที่สุดคือให้ค่า IC_{50} น้อยที่สุดและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยที่สุด โดยวิธี anchorage independent growth assay ซึ่งจะทดสอบโดยการเลี้ยงเซลล์ในอาหารกึ่งเหลว

4. ศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่พบว่ามียางงานในสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งช่องปากได้ดีและการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและแอนาลอกที่ได้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารแล้ว จากพืชสมุนไพร 7 ชนิด ได้แก่ ขมิ้น ขิง แมงลักคา หอมแขก ฟ้าทะลาย

โจร ว่านชักมดลูก และโลดทะนง ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งช่องปากโดยการทดสอบ cytotoxicity test ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งจะทำการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50

5. ศึกษากลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากของสารสกัดจากผลไม้ด้วยเมทานอลโดยศึกษาการตายแบบอะพอพโทซิสโดยการย้อมด้วย Annexin V-FITC/PI staining และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

6. ศึกษากลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งช่องปากของสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์ที่ให้ฤทธิ์ดีในการหยุดวัฏจักรชีวิตของเซลล์มะเร็งซึ่งจะทดสอบด้วยวิธี propidium iodide staining และการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิสด้วยวิธี Annexin V-FITC/PI staining และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

เนื้อหางานวิจัย

1. วัตถุประสงค์

1) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผลไม้ด้วยเมทานอลทั้ง 7 ชนิดคือ เมล็ดมะขาม ผลทับทิม เมล็ดลิ้นจี่ เมล็ดเงาะ ผลสัระอง ใบมังคุด และใบฝรั่ง ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก (human mouth carcinoma cell line; CLS-354) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ

2) ศึกษาฤทธิ์ของสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและแอนาโลกจากพืชสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ขมิ้น ขิง แมงลักคา หอมแขก ฟ้าทะลายโจร ว่านชักมดลูก และโลดทะนง ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งช่องปาก

3) ศึกษาคุณสมบัติในการเป็น transformed cells (anchorage independent growth) เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากผลไม้ชนิดต่างๆ

4) ศึกษาวัฏจักรชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยสารที่ให้ฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดี โดยวิธี propidium iodide staining

5) ศึกษาการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยสารที่ให้ฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดีด้วยวิธี Annexin V-FITC/PI staining

2. วิธีการทดลอง

- 1) ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งช่องปาก Human oral squamous carcinoma (CLS-354 cells)

1.1 เลี้ยงเซลล์มะเร็งช่องปาก (passages 24-36) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 สำหรับเซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2 เลี้ยงในอาหาร DMEM Ham's F12 ซึ่งมีองค์ประกอบของ 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin/streptomycin และ 2 mM glutamine ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95 % โดยมีจำนวนเซลล์ 1×10^6 เซลล์ใน flask ซึ่งมีพื้นที่ 75 ตารางเซนติเมตร เลี้ยงไว้จนมีปริมาณเซลล์มากกว่า 90% confluency ก่อนที่จะทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากผลไม้ต่อเซลล์

1.2 แยกเซลล์ออกจาก flask โดยการใช้ 0.25 % trypsin/EDTA

1.3 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 2500 rpm เป็นเวลา 10 นาที

1.4 นำส่วนอาหารข้างบนซึ่งมี 0.25 % trypsin/EDTA ทิ้งไปแล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเจือจางด้วยอาหารใหม่ที่มีองค์ประกอบต่างๆ ครบ

- 2) ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (normal white blood cells)

2.1 คัดเลือกอาสาสมัครผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงดีจำนวน 4 คน แล้วเจาะเลือด ปริมาตร 12 ml โดยแบ่ง ใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA ปริมาตร 3 ml (โครงการได้ผ่านการรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เลขที่ 52/036)

2.2 นำเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มีองค์ประกอบของ 10% fetal bovine serum 1% penicillin/ streptomycin และ 2 mM glutamine ในสัดส่วน 1:2 จะได้ปริมาตรรวมเป็น 24 ml

2.3 เตรียม 4 ml ของ Ficoll-Hypaque gradients (IsoPrep) ลงในหลอดทดลอง centrifuge tube ขนาด 15 ml แล้วค่อยๆ เติมเลือดที่เจือจางไว้ในข้อ 2.2 ลงไปในหลอดที่มี IsoPrep อย่างช้าๆ

2.4 นำไปปั่นที่ 3000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

2.5 แยก peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ซึ่งอยู่ในชั้น interphase ออกมาใส่หลอดใหม่และล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์อีก 2 ครั้ง

2.6 นำเซลล์ใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มีองค์ประกอบต่างๆ ครบ

- 3) ขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์

3.1 ภายใต้อาการปราศจากเชื้อ นำเซลล์มะเร็งที่เตรียมจากข้อ 1) และเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติที่เตรียมจากข้อ 2) มา 20 μ l ใส่ใน หลอด microcentrifuge tube ซึ่งมี PBS อยู่ปริมาตร 70 μ l ผสมให้เข้ากัน

3.2 เติม trypan blue ปริมาตร 10 μ l ลงไปในหลอด microcentrifuge tube ในข้อที่ 3.1 และผสมโดยการปิเปตเบาๆ

3.3 ทำความสะอาด hemacytometer

3.4 ทำ cover slip ให้ชื้นด้วยน้ำหรือลมหายใจ เลื่อน cover slip บน chamber ไปด้านหลัง และด้านหน้า ใช้การอัด โดยกดเบาๆ จนกระทั่งเกิด Newton's refraction ring (มองเห็นวงแหวนเหมือนรุ้งภายใต้ cover slip)

3.5 เติม cell suspension ลงใน chamber ทั้งสองข้าง ประมาณ 5-10 μ l และส่องภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 200 เท่า

3.6 นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (มองเห็นสว่าง) และเซลล์ที่ไม่มีชีวิต (ถูกย้อมให้เป็นสีน้ำเงิน) ประมาณ 200-500 cell/0.1 mm³ ควรนับ 2 ครั้งเพื่อเพิ่มความถูกต้องของการนับเซลล์

3.7 คำนวณปริมาตรของ suspended cells เพื่อให้มีจำนวนเซลล์มะเร็ง 3×10^4 เซลล์และเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ 1×10^5 เซลล์ ต่อพื้นที่ 1.88 ตารางเซนติเมตร (24-well plate) แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปหลุมละ 500 μ l สำหรับเซลล์มะเร็งบ่มเลี้ยงไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนทำการทดสอบกับสารสกัด ส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติทำการทดสอบกับสารสกัดได้เลย แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95 %

4) ขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติในการต้านมะเร็งช่องปากและความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของสารสกัดจากผลไม้ชนิดต่างๆ

4.1 นำสารสกัดจากเมล็ดมะขาม ผลทับทิม เมล็ดและเปลือกลิ้นจี่ เมล็ดและเปลือกเงาะ เปลือกมังคุด ผลสำรองและ ใบฝรั่ง ที่สกัดด้วยเมทานอลมาเจือจางให้ได้ 4 ความเข้มข้น แล้วนำแต่ละการเจือจางมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งและเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม คือเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารสกัดลงไป

4.2 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay

5) ขั้นตอนการศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay

5.1 หลังจากครบเวลา 24 ชั่วโมงของการบ่มสารสกัดจากผลไม้ ในข้อที่ 4.2 แล้วเตรียม 0.5 mg/ml ของ MTT ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วผสมให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ควรเตรียมไว้ในปริมาณมากและนานเนื่องจากสารไม่มีความคงตัว

5.2 นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติม 0.5 ml ของ 0.5 mg/ml MTT ลงในแต่ละหลุม

5.3 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95 % เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อที่จะให้ MTT ถูกเมทาบอลไลต์

5.4 เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MTT ออกไปแล้วคว่ำ plate ลงบนกระดาษซับเพื่อเอาอาหารที่เหลือออก

5.5 เติม 1000 μ l ของ DMSO เพื่อไปละลาย formazan (MTT metabolic product) ออกมาแล้วผสม formazan ที่ออกมาเข้ากับ DMSO ให้เข้ากัน

5.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm แล้วหักลบค่าที่ได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 670 nm

5.7 ทำการทดสอบซ้ำอีก 3 ครั้ง

6) การศึกษาคุณสมบัติของการเจริญในอาหารกึ่งเหลว (anchorage independent growth) ของเซลล์มะเร็งช่องปาก CLS-354

6.1 การเตรียม 5 % agar (เตรียม 25 มิลลิลิตร)

6.1.1 ชั่ง beacto agar 1.25 กรัม ใส่ Duran bottle

6.1.2 เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

6.1.3 หลอม agar โดยการ autoclave

6.1.4 ให้อุ่น agar ที่ 50 องศาเซลเซียส ใน water bath จนกว่าจะนำมาใช้เตรียม mixture

6.2 การเตรียม Bottom agar (0.5% agar)

6.2.1 เตรียม mixture (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สำหรับ 7 จาน ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร)

6.2.1.1 เตรียมหลอดปราศจากเชื้อ ขนาด 50 มิลลิลิตร

6.2.1.2 ปิเปตส่วนผสมดังนี้

- 2 เท่า RPMI 1640 5 มิลลิลิตร

- FCS 5 มิลลิลิตร (final concentration = 10% FCS)

- 100 เท่า P/S 0.5 มิลลิลิตร (final concentration = 1X P/S)

- 1 เท่า RPMI 1640 34.5 มิลลิลิตร

Total = 45 มิลลิลิตร

6.2.1.3 อุ่นส่วนผสมข้างต้น ไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส ใน water bath

6.2.2 เตรียม Bottom agar layer

6.2.2.1 นำ mixture และ 5% agar ที่อุ่นไว้ ออกจาก water bath

6.2.2.2 ปิเปต 5% agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมลงใน mixture ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ (Final concentration = 0.5 % agar)

6.2.2.3 ปิเปตส่วนผสมลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ได้ 7 จาน

6.2.2.4 รอให้ agar แข็ง ที่อุณหภูมิห้อง หรืออาจนำไปบ่มเก็บไว้จนกว่าจะทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้ incubator

6.3 การเตรียม Top agar 0.33 % agar

6.3.1 เตรียม Mixture (ปริมาตร 25 มิลลิลิตร)

6.3.1.1 เตรียม sterile tube ขนาด 50 มิลลิลิตร

6.3.1.2 ปิเปตส่วนผสมดังนี้

- 2X RPMI 1640 2.5 มิลลิลิตร

- FCS 2.5 มิลลิลิตร (final concentration = 10 % FCS)
- 100X P/S 250 มิลลิลิตร (final concentration = 1XP/S)
- 1X RPMI 1640 (only) 17.25 มิลลิลิตร

Total = 22.5 มิลลิลิตร

6.3.1.3 อุ่น mixture ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ใน water bath เพื่อนำมาผสมกับ 5 % agar ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร

6.3.2 เตรียม cell suspension (1 มิลลิลิตร สำหรับ duplicate)

6.3.2.1 ทำการแยกเซลล์ออกมาจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์

6.3.2.2 ปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 2×10^6 cells /ml

6.3.2.3 คำนวณปริมาตรของเซลล์ที่ต้องใช้ให้มีจำนวนเซลล์ 1×10^5 cells/ml ใน 3 มิลลิลิตร

6.3.2.4 นำ mixture และ 5% agar ออกจาก water bath แล้วปิเปต 2.5 มิลลิลิตร ของ 5% agar ผสมใน mixture ปริมาตร 22.5 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ (final concentration = 0.5 % agar) อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส

6.3.2.5 ปิเปต mixture ที่ผสม agar แล้วจากขั้นตอนที่ 6.3.2.4 ลงใน cell suspension ที่เตรียมไว้ในหลอด centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี (final concentration = 0.33 % agar)

6.3.2.6 ปิเปตส่วนผสมลงในจานที่มี 0.5% agar bottom layer ไว้จานละ 1.5 มิลลิลิตร

6.3.2.7 บ่ม agar plates ไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95 % นาน 3 สัปดาห์ และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มีองค์ประกอบต่างๆ ครบ ปริมาตร 500 µl บนผิวหน้าของ agar ทุก ๆ สัปดาห์

6.3.3 นับจำนวนโคโลนีของเซลล์ที่มีจำนวนเซลล์มากกว่าหรือเท่ากับ 20 เซลล์ เป็น 1 โคโลนี

7) การหาสารที่เป็นองค์ประกอบหลักด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

7.1 เตรียมระบบของตัวทำละลายสำหรับใช้เป็นตัวพาหรือ mobile phase โดยผสม dichloromethane: ethylacetate: methanol ในสัดส่วน 3:12:1 บรรจุใส่แท่ง TLC

7.2 ตัดแผ่น TLC ขนาดกว้าง 5 ซม. สูง 10 ซม. แล้วนำสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สนใจจุดลงบนแผ่น TLC (เหนือขอบแผ่น TLC ขึ้นมา 1 ซม.) โดยใช้หลอดแคปิลลารี จากนั้นจุดสารมาตรฐานลงไปโดยห่างจากตำแหน่งแรกประมาณ 1 ซม. รอให้จุดของสารบนแผ่น TLC แห้ง

7.3 นำแผ่น TLC ด้านที่มีจุดของสารดังกล่าวจุดลงไปในตัวทำละลายในแท่ง TLC ที่เตรียมไว้ (โดยให้จุดของสารอยู่เหนือตัวทำละลาย) จากนั้นรอให้ตัวทำละลายนำพาสารเคลื่อน

ชั้นสูงแผ่น TLC ซึ่งจะสามารถเห็นสารผสมแยกออกจากกันเป็นจุดมากกว่าหนึ่งจุด เมื่อสารเคลื่อนไปถึงขอบ TLC อีกด้าน ให้นำแผ่น TLC ออกจากแท่งและปล่อยให้แห้ง

7.4 สํารวจ chromatograms ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm และบันทึกจุดที่เห็นภายใต้แสง UV นำมาเปรียบเทียบกับตำแหน่งของสารมาตรฐาน

8) การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารบริสุทธิ์ catechin และ procyanidin B2

8.1 นำสารบริสุทธิ์ catechin และ procyanidin B2 มาเจือจางให้ได้ 6 ความเข้มข้น แล้วนำแต่ละการเจือจางมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งช่องปาก โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม คือ เซลล์ที่ไม่ได้เติมสารลงไป

8.2 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay และทำต่อในขั้นตอนที่ 5) ขั้นตอนการศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay

9) การตรวจหาปริมาณ total phenolic content

9.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid หรือสารตัวอย่าง ปริมาตร 12.5 µl ใน 96 well microtiter plate และเติมนํ้ากลั่นหลุมละ 50 µl

9.2 ปิเปต Folin-Ciocalteu phenol reagent หลุมละ 12.5 µl และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที

9.3 ปิเปต 7% of sodium carbonate และนํ้ากลั่น ลงไปหลุมละ 125 µl และ 100 µl ตามลำดับ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 45 °C นาน 45 นาที

9.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง micro plate reader

9.5 สร้างกราฟมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยกำหนดแกน y เป็น OD และแกน x เป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

9.6 คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกในตัวอย่างโดยนำมาเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid และแสดงหน่วยของฟีนอลิกเป็น gallic acid equivalent (mg GAE) ต่อสาร 1 กรัม

10) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS

10.1 นำสารละลายสต็อก ABTS^{•+} ที่เตรียมไว้มาเจือจางด้วยนํ้ากลั่น ให้มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

10.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือตัวอย่าง ปริมาตร 20 µl ลงใน 96 well microtiter plate จากนั้นปิเปตสารละลาย ABTS^{•+} ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 180 µl ผสมกับตัวอย่าง

10.3 บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm

10.4 คำนวณ % inhibition จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = (1 - OD_{\text{sample}}/OD_{\text{blank}}) \times 100$$

10.5 สร้างกราฟมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยกำหนดแกน y เป็น % Inhibition และ แกน x เป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

10.6 คำนวณความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอสของสารสมุนไพรจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน Trolox โดยหน่วยของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอสแสดงเป็นหน่วย mg Trolox /1 g extract (Trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC)

11) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

11.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานหรือสารสมุนไพรที่เตรียมไว้ปริมาตร 75 μ l ใน 96 well microtiter plate จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM ลงไปผสมปริมาตร 150 μ l แล้วนำไปป้อนไว้ในที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที

11.2 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm

11.3 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สามารถคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (\text{OD sample} / \text{OD blank})] \times 100$$

11.4 สร้างกราฟมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยกำหนดแกน y เป็น % inhibition และแกน x เป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ascorbic acid

11.5 คำนวณความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสมุนไพรจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ascorbic acid โดยหน่วยของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH แสดงเป็นหน่วย mg vitamin C/ 1 g extract (Vitamin C equivalent antioxidant capacity; VCEAC)

12) การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพรชนิดอื่นๆ

12.1 นำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพรทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ ขมิ้น ขิง แมงลักคา หอมแขก โลดทะนง มาเจือจางให้ได้ 4 ความเข้มข้น แล้วนำแต่ละการเจือจางมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม คือเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารลงไป

12.2 นำไปป้อนในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay และทำต่อในขั้นตอนที่ 5) ขั้นตอนการศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay

13) การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพรชนิดอื่นๆ และแอนาลอก

13.1 นำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพรทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ ขมิ้น แมงลักคา ฟาทะลายโจร ว่านชักมดลูก หอมแขก และโลดทะนง และ แอนาลอก มาเจือจางให้ได้ 6 ความเข้มข้น แล้วนำแต่ละการเจือจางมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งช่องปาก โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม คือเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารลงไป

13.2 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay และทำต่อในขั้นตอนที่ 5) ขั้นตอนการศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay

14) การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งช่องปากของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากหอมแขกและแอนาลอก

14.1 นำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากหอมแขกและแอนาลอกทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ ASWK023-ASWK028 มาเจือจางให้ได้ 5 ความเข้มข้น แล้วนำแต่ละการเจือจางมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งช่องปาก โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม คือเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารลงไป

14.2 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay และทำต่อในขั้นตอนที่ 5) ขั้นตอนการศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay

15) การศึกษาวัฏจักรชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยสารจากหอมแขกด้วยวิธี propidium iodide staining

15.1 เลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งช่องปาก ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM Ham's F12 และ RPMI 1640 ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95% โดยมีจำนวนเซลล์ 1.5×10^5 เซลล์ต่อพื้นที่ 9.6 ตร.ซม.ใน 6-well plate เลี้ยงไว้ 48 ชั่วโมง

15.2 บ่มสารจากหอมแขก 2 ชนิดคือ ASWK023 และ ASWK024 หรือ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายสารในปริมาตรที่เทียบเท่ากัน ร่วมกับเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

15.3 เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติม PBS ปริมาตร 250 µl แล้วบ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเป็นการล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากเซลล์ ทำให้สามารถย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ได้ง่ายขึ้น

15.4 เก็บ PBS ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ในข้อที่ 15.3 แล้ว trypsinization โดยการเติมเอนไซม์ trypsin-EDTA ปริมาตร 250 µl แล้วบ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์ที่เกาะกันอยู่ที่ก้นหลอดหลุดออกจากกัน เคาะหลอดให้เซลล์หลุดหมด

15.5 หยุดฤทธิ์ trypsin โดยการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ปริมาตร 250 µl เพื่อหยุดฤทธิ์ trypsin แล้วเก็บเซลล์มะเร็งที่ผ่านการ trypsinization มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรในข้อที่ 15.3

15.6 เติม PBS ปริมาตร 250 µl เก็บ PBS ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรในข้อที่ 14.3 เพื่อเก็บเซลล์ที่ติดอยู่ที่ก้นหลอด

15.7 นำหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรในข้อที่ 15.6 ไปปั่นในเครื่องปั่นควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนเซลล์ไว้

15.8 เติม cold PBS 1,000 μ l แล้ว resuspend ให้เป็นสารละลายแขวนลอย แล้วถ่ายใส่ microcentrifuge tube นำไปปั่นในเครื่องปั่นควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนเซลล์ไว้

15.9 เติม cold PBS 300 μ l ผสมให้เข้ากันแล้ว เติม 70% ethanol 700 μ l เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สามารถเก็บไว้ได้นาน 1 สัปดาห์)

15.10 จากนั้นปั่นในเครื่องปั่นควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

15.11 เติม cold PBS 1,000 μ l ปั่นล้างเซลล์ในเครื่องปั่นควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งให้หมด

15.12 เติมสารละลาย propidium iodide ที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย PBS ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และบ่มต่อเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง

15.13 นำไปตรวจวัดปริมาณ DNA ซึ่งแปรผันตรงกับความเข้มข้นแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสี propidium iodide ในเซลล์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ โดยนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 20,000 เซลล์

16) การทดสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งช่องปากโดยวิธี annexin V-FITC/PI staining

16.1 การเตรียม annexin V-FLUOS labeling solution

ทำการเจือจาง annexin V-Fluos labeling reagent (Roche, Germany) ปริมาตร 24 ใน incubation buffer ปริมาตร 1,152 ไมโครลิตร และเติม propidium iodide solution ปริมาตร 24 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันสำหรับตัวอย่าง 12 ตัวอย่าง

16.2 การย้อมสีเซลล์มะเร็งช่องปาก

16.2.1 เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติม PBS ปริมาตร 500 μ l แล้วบ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเป็นการล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากเซลล์ ทำให้สามารถย้อมเซลล์ด้วยเอนไซม์ได้ง่ายขึ้น

16.2.2 เก็บ PBS ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ในข้อที่ 2 แล้ว trypsinization โดยการเติมเอนไซม์ trypsin without EDTA ปริมาตร 500 μ l แล้วบ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์ที่เกาะกันอยู่ที่ก้นหลอดหลุดออกจากกัน เคาะหลอดให้เซลล์หลุดหมด

16.2.3 หยดฤทธิ์ trypsin โดยการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ปริมาตร 500 μ l เพื่อหยดฤทธิ์ trypsin แล้วเก็บเซลล์มะเร็งที่ผ่านการ trypsinization มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรในข้อที่ 16.2.2

16.2.4 เติม PBS ปริมาตร 250 μ l เก็บ PBS ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรในข้อที่ 16.2.2 เพื่อเก็บเซลล์ที่ติดอยู่ที่ก้นเพลท

16.2.5 นำหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรในข้อที่ 3.1 ไปปั่นในเครื่องปั่นควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนเซลล์ไว้

16.2.6 เติม cold PBS 1,000 μ l resuspend ให้เป็นสารละลายแขวนลอย แล้วถ่ายใส่ FACS -tube นำไปปั่นในเครื่องปั่นควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนเซลล์ไว้

16.2.7 ใส่น้ำยา annexin V-FLUOS labeling solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 2 ผสมให้กับเซลล์แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ในที่มืด

16.2.8 หลังจากนั้นใส่ incubation buffer เพิ่มอีกปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจนับเซลล์ด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ภายใน 1 ชั่วโมง โดยนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 15,000 เซลล์

17) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งช่องปากที่ทดสอบด้วยสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับที่ไม่ได้เติมสารสกัด เมื่อข้อมูลกระจายตัวแบบปกติโดยใช้สถิติ One-way ANOVA และสำหรับข้อมูลที่กระจายตัวแบบไม่ปกติใช้สถิติ Mann whitney U test เปรียบเทียบระหว่างสารแต่ละความเข้มข้นกับที่ไม่ได้เติมสาร

3. ผลการทดลอง

1) ลักษณะของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354 cells) และเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ

ในสภาวะปกติเซลล์มะเร็งช่องปาก (passages 24-36) ส่วนใหญ่มีลักษณะรูปร่างคล้าย epithelial cells (epithelial-like morphology) และบางเซลล์มีลักษณะรีคล้ายเซลล์ fibroblast (fibroblast-like morphology) ลักษณะของนิวเคลียสกลมรี ส่วนของไซโตพลาสซึมจะแผ่ขยายออก ไม่มีแวคิวโอลภายในเซลล์ เซลล์มีการกระจายตัวเรียงเตี๋ยเป็น monolayer culture และยึดติดกับจานเพาะเลี้ยง แสดงถึงลักษณะของเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวมีรูปร่างกลม ขอบเรียบ มีลักษณะวาวใส เซลล์ไม่ยึดติดกับจานเพาะเลี้ยง

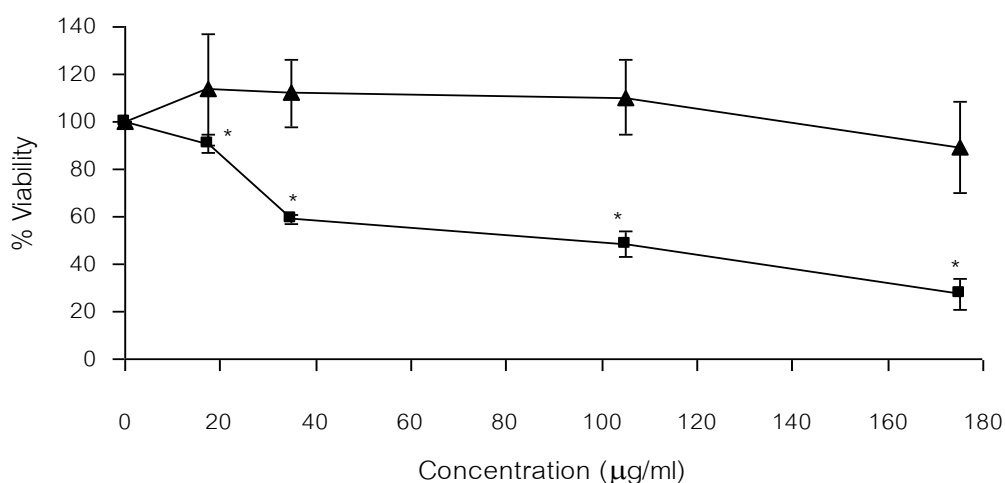
2) การคัดกรองฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารสกัดเมทานอลจากผลไม้ชนิดต่างๆ

สารสกัดจากเมล็ดมะขาม ผลทับทิม เมล็ดลิ้นจี่ เปลือกมังคุด และใบฝรั่งที่ใช้ทดสอบกับเซลล์มะเร็งและเซลล์เม็ดเลือดขาวอยู่ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 17.5-175.0 μ g/ml สำหรับสาร

สกัดจากเปลือกลิ้นจี่ เปลือกเงาะ เมล็ดเงาะ และผลสำรอง ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบกับเซลล์มะเร็งและเซลล์เม็ดเลือดขาวอยู่ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 87.5-350.0 µg/ml

2.1 สารสกัดจากเมล็ดมะขาม (tamarind seed extract)

สารสกัดจากเมล็ดมะขามในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 17.5-175.0 µg/ml สารสกัดจากเมล็ดมะขามทุกความเข้มข้นที่ทดสอบทำให้เซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารสกัด และความเข้มข้นที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 คือที่ 103.0 µg/ml ($IC_{50}=103.0$ µg/ml) (ดังแสดงในภาพที่ 1) สารสกัดจากเมล็ดมะขามทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

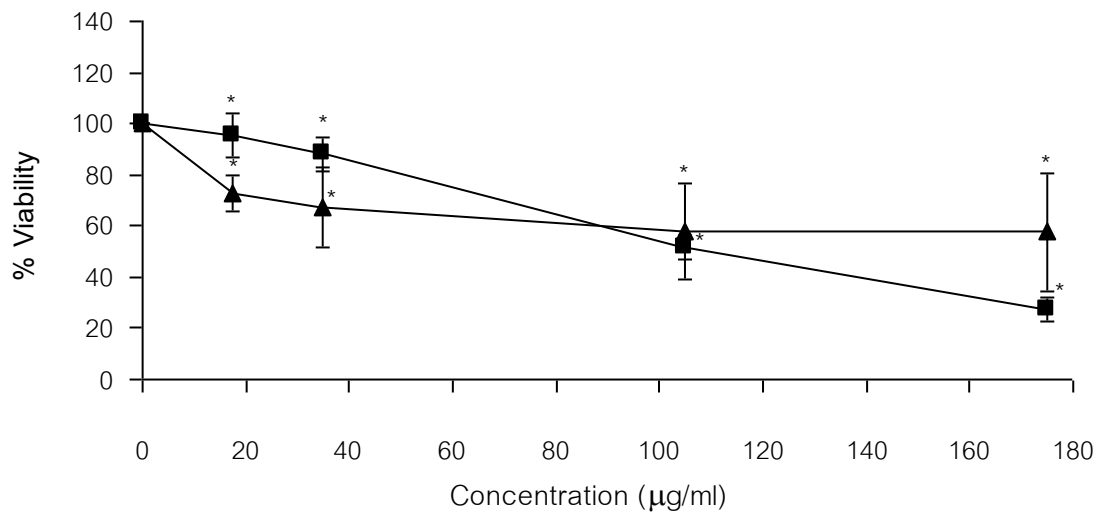


*, $p<0.05$ vs. 0 µg/ml

ภาพที่ 1 ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (▲) และเซลล์มะเร็ง (■) ของสารสกัดจากเมล็ดมะขาม

2.2 สารสกัดจากผลทับทิม (pomegranate extract)

สารสกัดจากผลทับทิมทุกความเข้มข้นที่ทดสอบทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารสกัด และความเข้มข้นที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 คือที่ 108.0 µg/ml ($IC_{50}=108.0$ µg/ml) (ดังแสดงในภาพที่ 2) สารสกัดจากผลทับทิมทุกความเข้มข้นที่ทดสอบทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

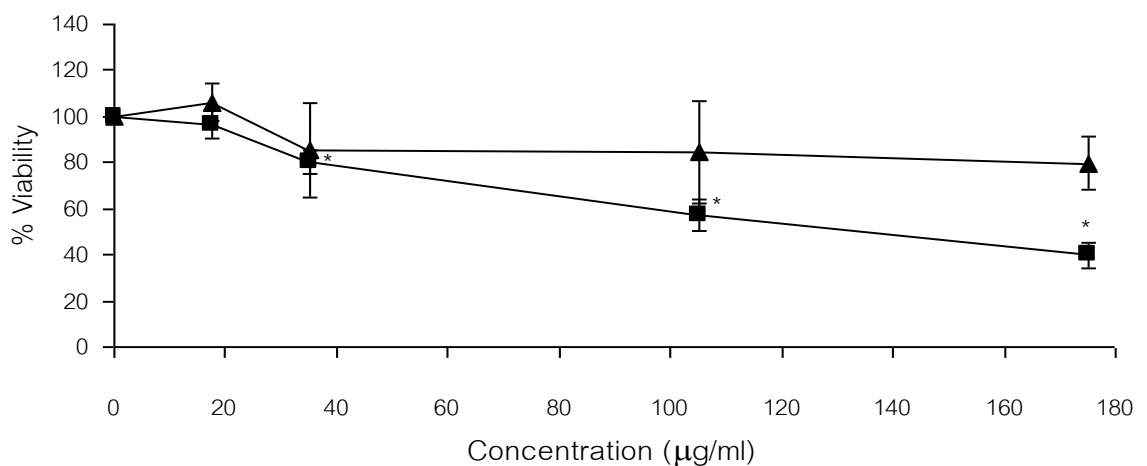


*, $p < 0.05$ vs. 0 µg/ml

ภาพที่ 2 ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (▲) และเซลล์มะเร็ง (■) ของสารสกัดจากผลทับทิม

2.3 สารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ (litchi seed extract)

สารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ที่ความเข้มข้น 35.0-175.0 µg/ml สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากทำให้เซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารสกัด และความเข้มข้นที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 คือที่ 135.0 µg/ml ($IC_{50} = 135.0$ µg/ml) (ดังแสดงในภาพที่ 3) สารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ

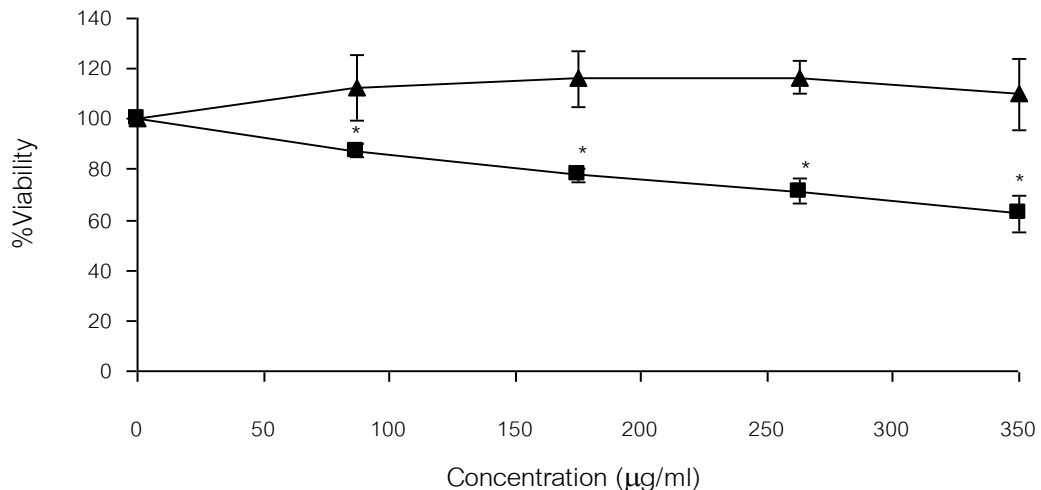


*, $p < 0.05$ vs. 0 µg/ml

ภาพที่ 3 ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (▲) และเซลล์มะเร็ง (■) ของสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่

2.4 สารสกัดจากเปลือกลิ้นจี่

สารสกัดจากเปลือกลิ้นจี่ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ได้โดยทำให้เซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารสกัด และความเข้มข้นที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 คือที่ $>350.0 \mu\text{g/ml}$ ($\text{IC}_{50}>350.0 \mu\text{g/ml}$) (ดังแสดงในภาพที่ 4) สารสกัดจากเปลือกลิ้นจี่ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่มีผลต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวปกติ

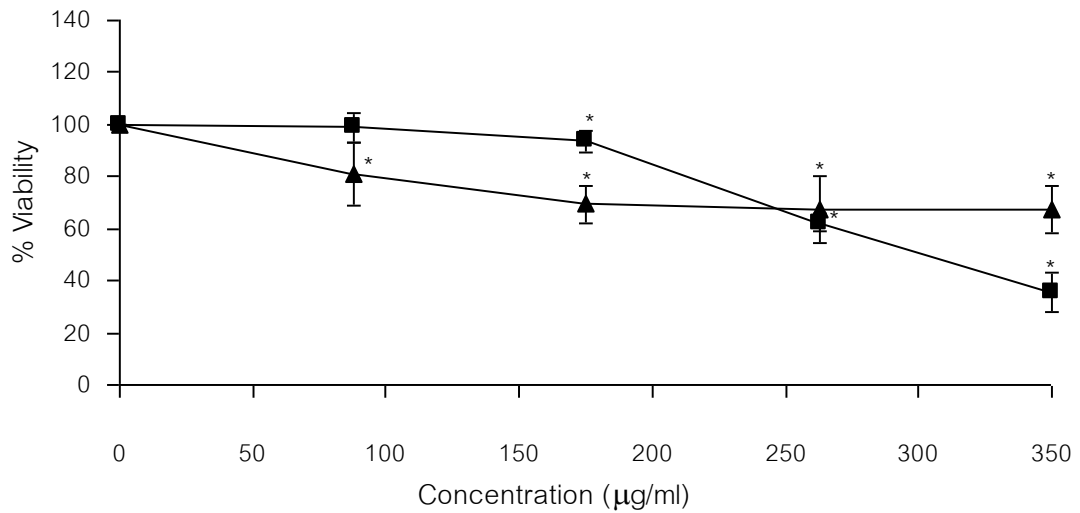


*, $p<0.05$ vs. 0 $\mu\text{g/ml}$

ภาพที่ 4 ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (▲) และเซลล์มะเร็ง (■) ของสารสกัดจากเปลือกลิ้นจี่

2.5 สารสกัดจากเมล็ดเงาะ (rambutan seed extract)

สารสกัดจากเมล็ดเงาะที่ความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 175.0 -350.0 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้เซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 308.0 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{IC}_{50}=308.0 \mu\text{g/ml}$) (ดังแสดงในภาพที่ 5) อย่างไรก็ตามสารสกัดจากเมล็ดเงาะทุกความเข้มข้นที่ทดสอบทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

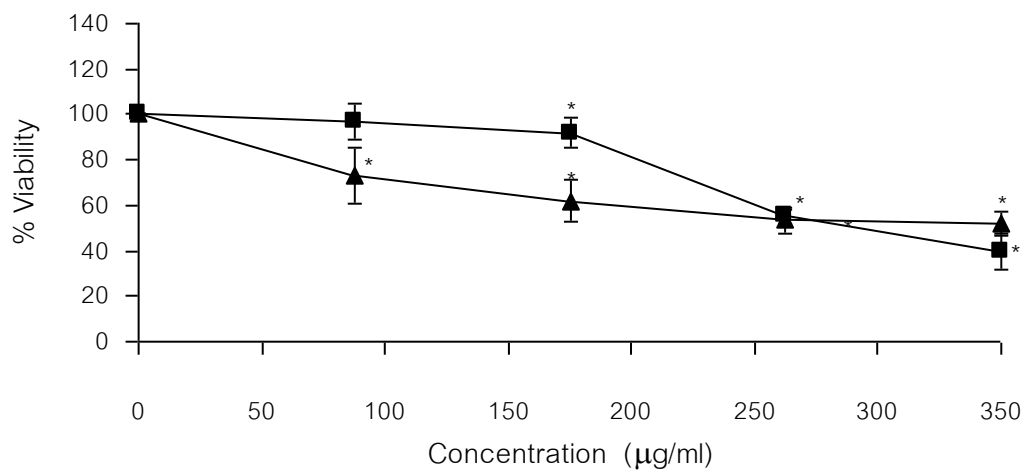


*, $p < 0.05$ vs. 0 µg/ml

ภาพที่ 5 ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (▲) และเซลล์มะเร็ง (■) ของสารสกัดจากเมล็ดเงาะ

2.6 สารสกัดจากเปลือกเงาะ (rambutan rind extract)

สารสกัดจากเปลือกเงาะที่ความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 175.0 -350.0 µg/ml ทำให้เซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 290.0 µg/ml ($IC_{50} = 290.0$ µg/ml) (ดังแสดงในภาพที่ 6) อย่างไรก็ตามสารสกัดจากจากเปลือกเงาะทุกความเข้มข้นที่ทดสอบทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

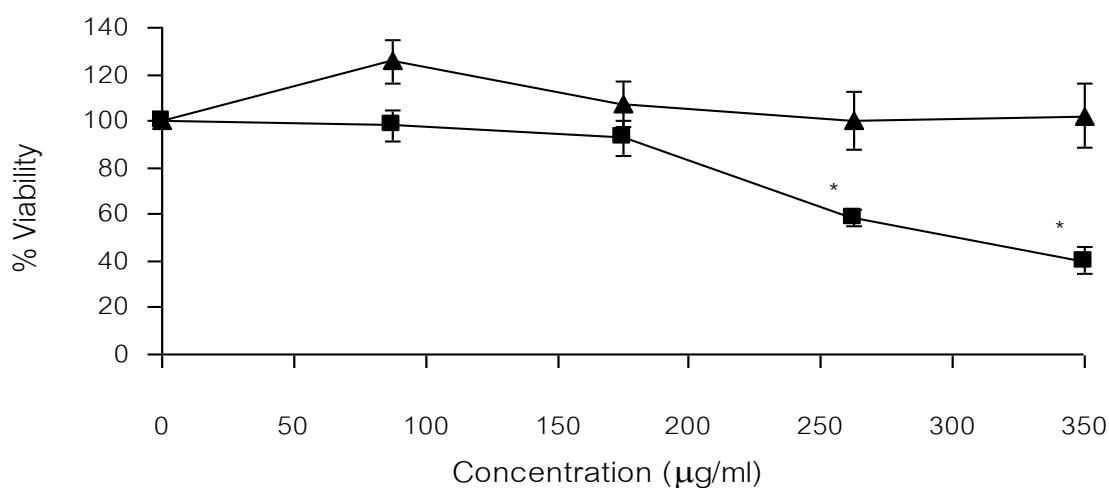


*, $p < 0.05$ vs. 0 µg/ml

ภาพที่ 6 ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (▲) และเซลล์มะเร็ง (■) ของสารสกัดจากเปลือกเงาะ

2.7 สารสกัดจากผลสํารอง (malva nut extract)

สารสกัดจากผลสํารองในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 262.5-350.0 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้เซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 300.0 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{IC}_{50}=300.0 \mu\text{g/ml}$) (ดังแสดงในภาพที่ 7) สารสกัดจากผลสํารองทุกความเข้มข้นไม่ได้ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

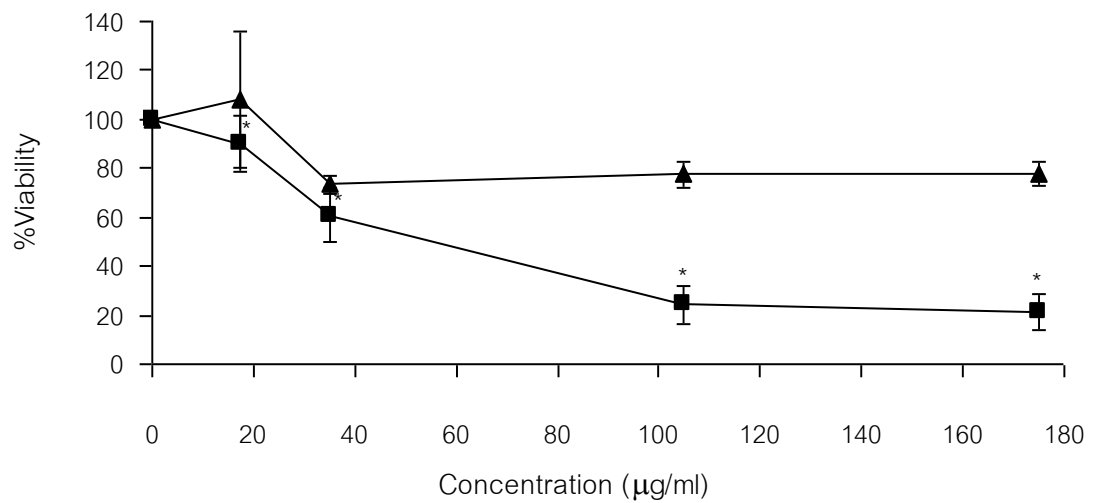


*, $p<0.05$ vs. 0 $\mu\text{g/ml}$

ภาพที่ 7 ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (▲) และเซลล์มะเร็ง (■) ของสารสกัดจากผลสํารอง

2.8 สารสกัดจากเปลือกมังคุด (mangosteen rind extract)

สารสกัดจากเปลือกมังคุดทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ 17.5-175.0 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้เซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 57.0 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{IC}_{50}=57.0 \mu\text{g/ml}$) (ดังแสดงในภาพที่ 8) สารสกัดจากเปลือกมังคุดทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ

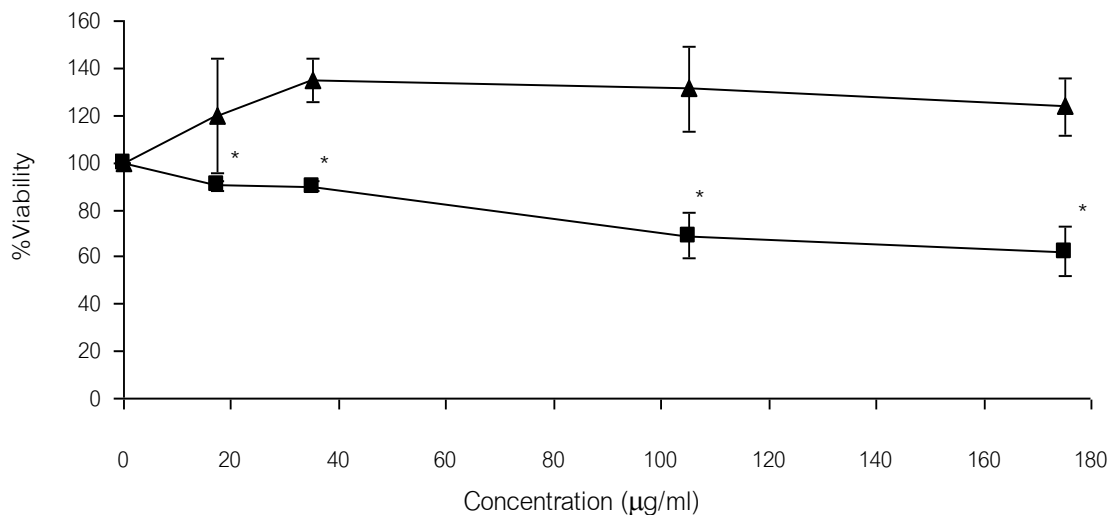


*, $p < 0.05$ vs. 0 µg/ml

ภาพที่ 8 ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (▲) และเซลล์มะเร็ง (■) ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด

2.9 สารสกัดจากใบฝรั่ง (guava leaf extract)

สารสกัดจากใบฝรั่งทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ 17.5-175.0 µg/ml ทำให้เซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น > 180.0 µg/ml ($IC_{50} > 180.0$ µg/ml) (ดังแสดงในภาพที่ 9) และสารสกัดจากใบฝรั่งทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ

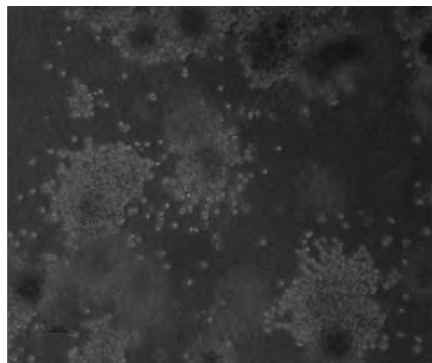


*, $p < 0.05$ vs. 0 µg/ml

ภาพที่ 9 ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (▲) และเซลล์มะเร็ง (■) ของสารสกัดจากใบฝรั่ง

3) การศึกษาคุณสมบัติของการเจริญในอาหารกึ่งเหลว (anchorage independent growth) ของเซลล์มะเร็งช่องปาก CLS-354

จากการศึกษาคุณสมบัติของการเจริญในอาหารกึ่งเหลว (anchorage independent growth) ของเซลล์มะเร็งช่องปาก CLS-354 พบว่าเซลล์มะเร็งไม่สามารถเจริญในอาหารกึ่งเหลวได้ นั่นคือไม่มีคุณสมบัติของ anchorage independent growth เมื่อเทียบกับ positive control ซึ่งใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL60) จึงไม่สามารถทดสอบการสูญเสียคุณสมบัติดังกล่าวนี้ด้วยสารสกัดเมทานอลจากผลไม้ให้ฤทธิ์ที่ดีที่สุดได้



(A)



(B)

ภาพที่ 10 การฟอร์มโคโลนีของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60) ซึ่งใช้เป็น positive control (A) และเซลล์มะเร็งช่องปากในอาหารซึ่งไม่สามารถฟอร์มโคโลนีได้ในอาหารกึ่งเหลว (B)

4) การตรวจวัดระดับ phenolic compounds ในตัวอย่างสารสกัดเมทานอลจากผลไม้ชนิดต่างๆ

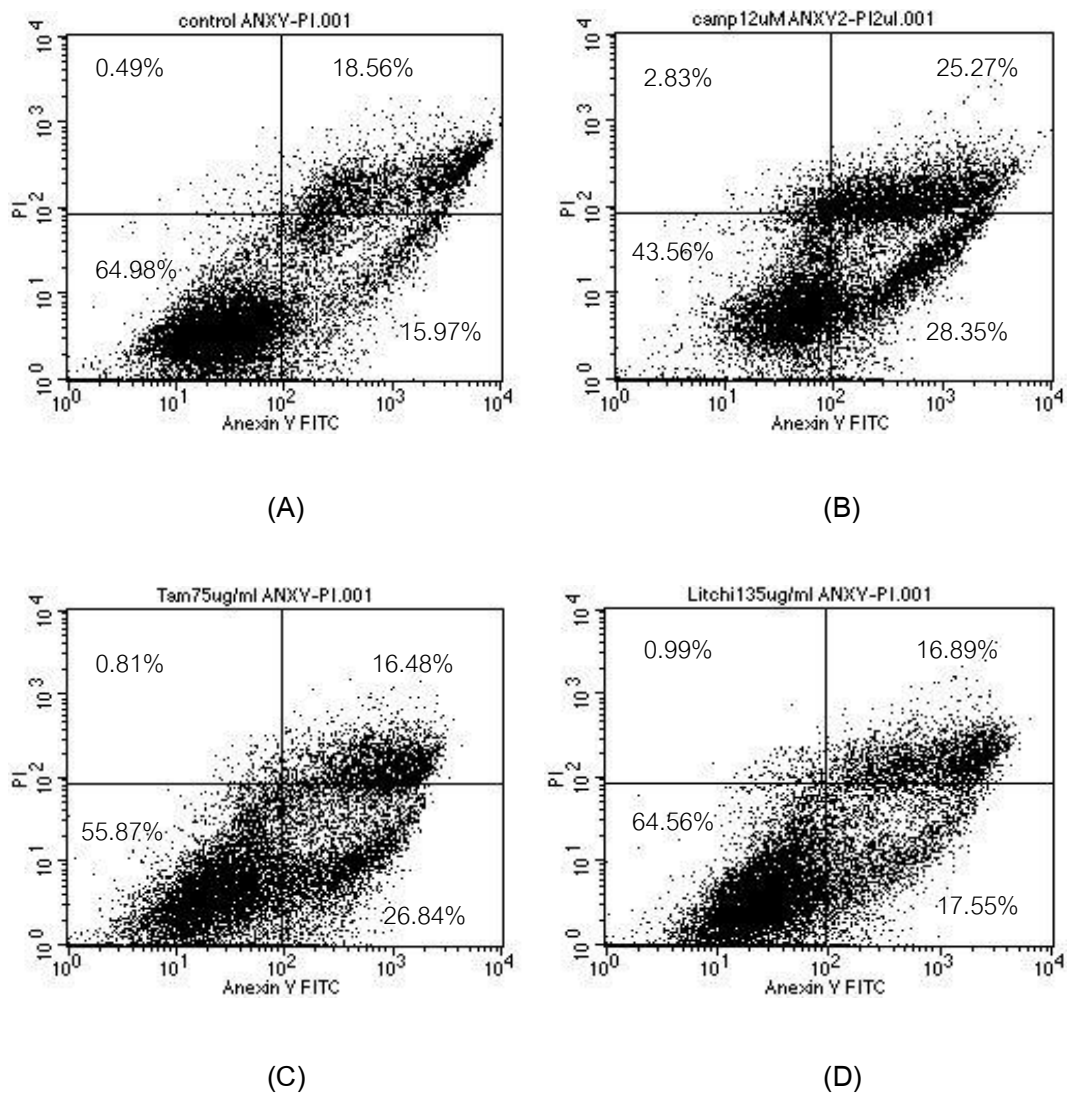
ผลการตรวจวัดระดับ phenolic compounds ในตัวอย่างสารสกัดเมทานอลจากผลไม้ทั้ง 8 ชนิดโดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent โดยใช้สารละลาย gallic acid (GAE) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าระดับ phenolic compounds เรียงจากมากไปน้อยคือ สารสกัดจากเปลือกทับทิม > เมล็ดมะขาม > ใบฝรั่ง > เมล็ดลิ้นจี่ > เปลือกลิ้นจี่ > เปลือกมังคุด > เมล็ดเงาะ > เปลือกเงาะ > ผลสำรอง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาระดับ phenolic compounds จากสารสกัดผลไม้ด้วยเมทานอล

สารสกัดจากผลไม้	ระดับ phenolic compounds (mg GAE/g)
เมล็ดมะขาม	501.95±3.40
เปลือกทับทิม	512.13±11.49
เมล็ดลิ้นจี่	341.00±26.16
เปลือกลิ้นจี่	254.63±5.48
เมล็ดเงาะ	114.25±1.41
เปลือกเงาะ	97.50±0.71
ผลส้มร่อน	36.13±1.59
เปลือกมังคุด	204.13±4.77
ใบฝรั่ง	465.00±2.83

5) ศึกษาการตายแบบอะพอพโทซิสโดยการย้อมด้วย Annexin V-FITC/PI ของการทดสอบที่ใช้สารสกัดด้วยเมทานอลที่ให้ฤทธิ์ดีที่สุด

ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกสารสกัดผลไม้ด้วยเมทานอลที่ให้ฤทธิ์ด้านมะเร็งดีที่สุดและไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบมา 2 ชนิดคือ สารสกัดจากเมล็ดมะขามและสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ มาศึกษาการตายแบบอะพอพโทซิสโดยวิธี AnnexinV/PI staining เมื่อทดสอบการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิสของสารสกัดจากเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 75 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ประมาณร้อยละ 45 พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าวทำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิสประมาณ 10% (ภาพที่ 11C) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารสกัด (ภาพที่ 11A) ส่วนสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ที่ความเข้มข้น 135 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มะเร็งตายได้ร้อยละ 50 พบว่าไม่ทำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิส (ภาพที่ 11D) ส่วน positive control ใช้ยา camptothecin ที่ความเข้มข้น 12 μM มาทดสอบกับเซลล์มะเร็งช่องปาก พบว่าทำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิสประมาณร้อยละ 19 (ภาพที่ 11B)

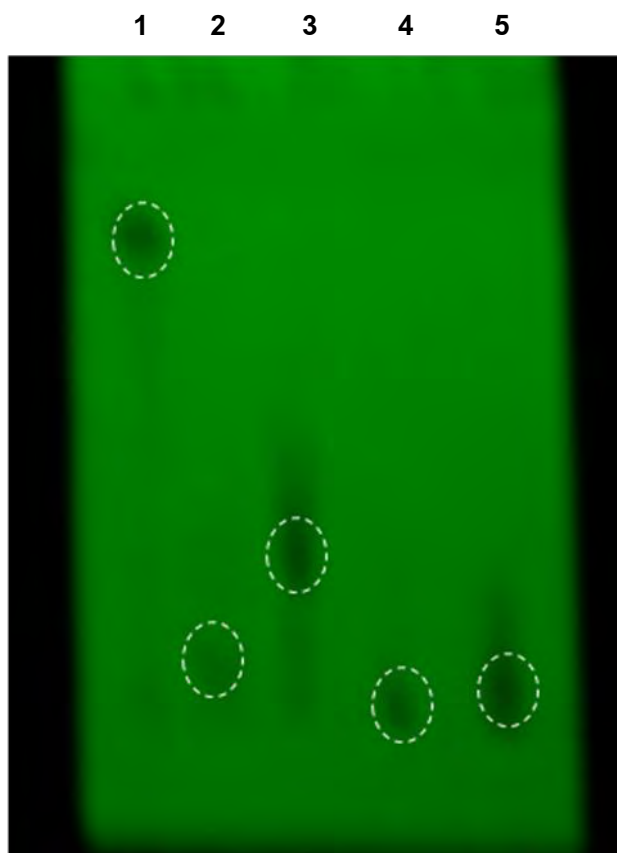


ภาพที่ 11 ร้อยละของเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งช่องปากควบคุม (A) เซลล์มะเร็งช่องปากที่ทดสอบด้วยยา 12 μ M camptothecin (B) เซลล์มะเร็งช่องปากที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 75 μ g/ml (C) และเซลล์มะเร็งช่องปากที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ที่ความเข้มข้น 135 μ g/ml (D)

6) การหาสารที่เป็นองค์ประกอบหลักจากสารสกัดจากเมล็ดมะขามด้วยวิธี TLC

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผลไม้ด้วยเมทานอลที่ให้ฤทธิ์ดีที่สุดคือสารสกัดจากเมล็ดมะขามและสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ จึงนำสารสกัดดังกล่าวมาหาสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก โดยการนำมาศึกษาด้วยวิธี TLC โดยใช้สารมาตรฐานที่เคยมีรายงานว่าเป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดจากเมล็ดมะขามและเมล็ดลิ้นจี่มาเปรียบเทียบกับคือ catechin, quercetin และ procyanidin B2 ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากเมล็ดมะขามไม่มีองค์ประกอบของสารดังกล่าวทั้ง 3 ชนิดคือ catechin, quercetin และ procyanidin B2 ภาพที่ 12 อย่างไรก็ตาม

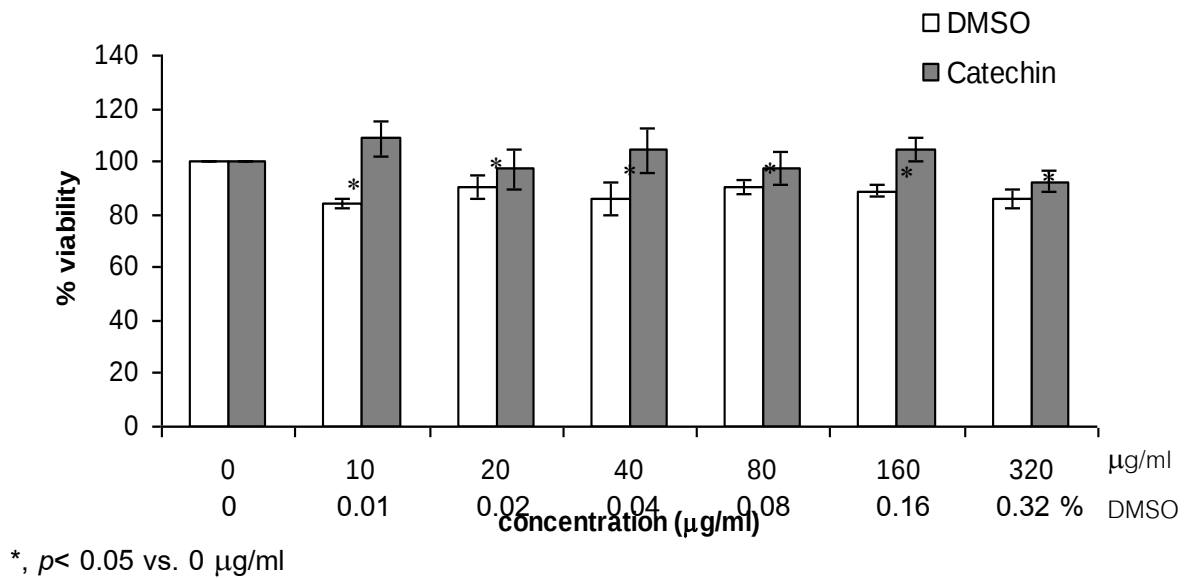
ก็ตามอาจมีสารสำคัญซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เป็นองค์ประกอบที่ทางผู้วิจัยไม่ได้ทดสอบ เนื่องจากไม่มีสารมาตรฐานที่จะนำมาใช้เปรียบเทียบ



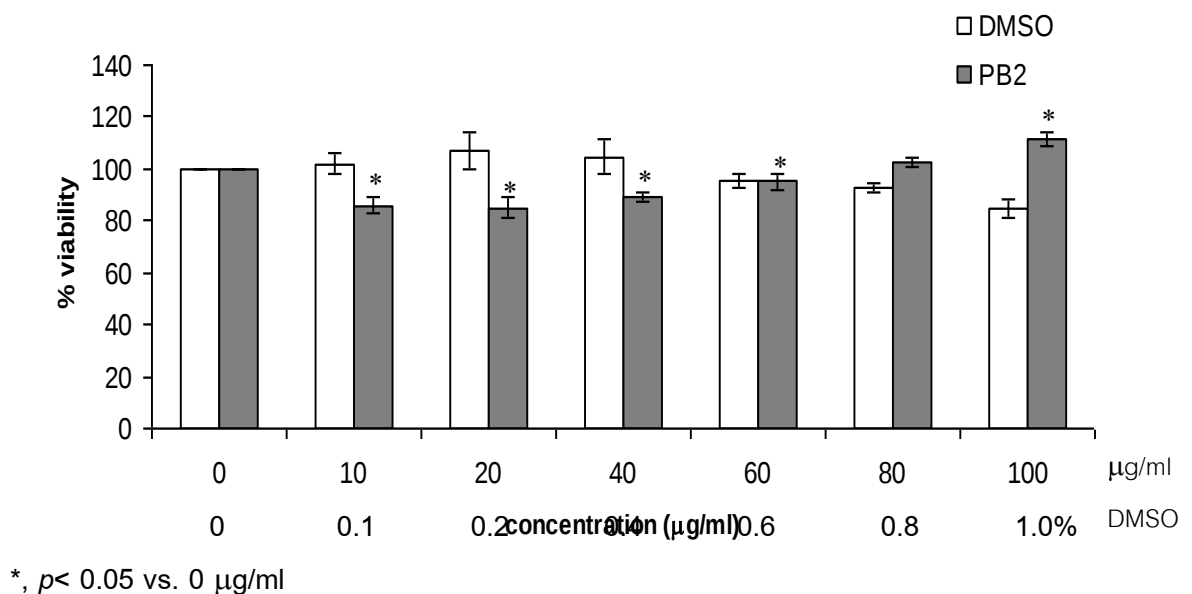
ภาพที่ 12 การหาสารประกอบหลักในสารสกัดจากเมล็ดมะขามโดยวิธี TLC โดยใช้ mobile phase คือ CH_2Cl_2 : AcOAc : MeOH (3:12:1) สารมาตรฐาน quercetin (1) สารมาตรฐาน procyanidin B2 (2) สารมาตรฐาน catechin (3) สารสกัดจากเมล็ดมะขาม (4) และสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ (5)

7) การศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ catechin และ procyanidin B2 ในการต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่เคยมีรายงานว่าเป็้องค์ประกอบหลักในสารสกัดจากเมล็ดมะขามและเมล็ดลิ้นจี่คือ catechin และ procyanidin B2 มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากพบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปากในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 13 และ 14



ภาพที่ 13 ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยสาร catechin



ภาพที่ 14 ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยสาร procyanidin B2

8) การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพรชนิดอื่นๆ จากการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพรชนิดต่างๆ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.อภิชาติ สุขสำราญ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง โดยใช้เซลล์มะเร็งลำไส้มาศึกษาแทน

เซลล์มะเร็งช่องปาก พบว่าสารจากขมิ้นให้ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 2 สารจากแมงลักคาพบว่าให้ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด ตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์จากสมุนไพร

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์จากสมุนไพร		TEAC**	IC ₅₀ values
ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	(mg Trolox/ 1 g extract)	(µg/ml)
ขมิ้น	<i>Curcuma longa</i> Linn.	1512.30±29.99	16.73±1.08
แมงลักคา	<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.	1383.28±11.44	32.28±1.43
ขิง	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe.	1099.85±11.14	44.67±1.81
โลดทะนง	<i>Trigonostemon reidiodes</i> Craib.	1104.09±64.16	50.52±1.27
หอมแขก	<i>Murraya koenigii</i> (L.) Spreng.	865.08±56.07	62.50±2.04
ฟ้าทะลายโจร	<i>Andrographis paniculata</i>	23.24±2.68	NA*
ว่านस्पฺเลือด	<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	13.43±6.26.	NA*
ว่านชักมดลูก	<i>Curcuma zanthorrhiza</i> Roxb.	6.20±2.68	NA*
มะระขี้นก	<i>Momordica charantia</i> Linn.	NA*	NA*

NA*= no activity, TEAC ** = Trolox equivalent antioxidant capacity

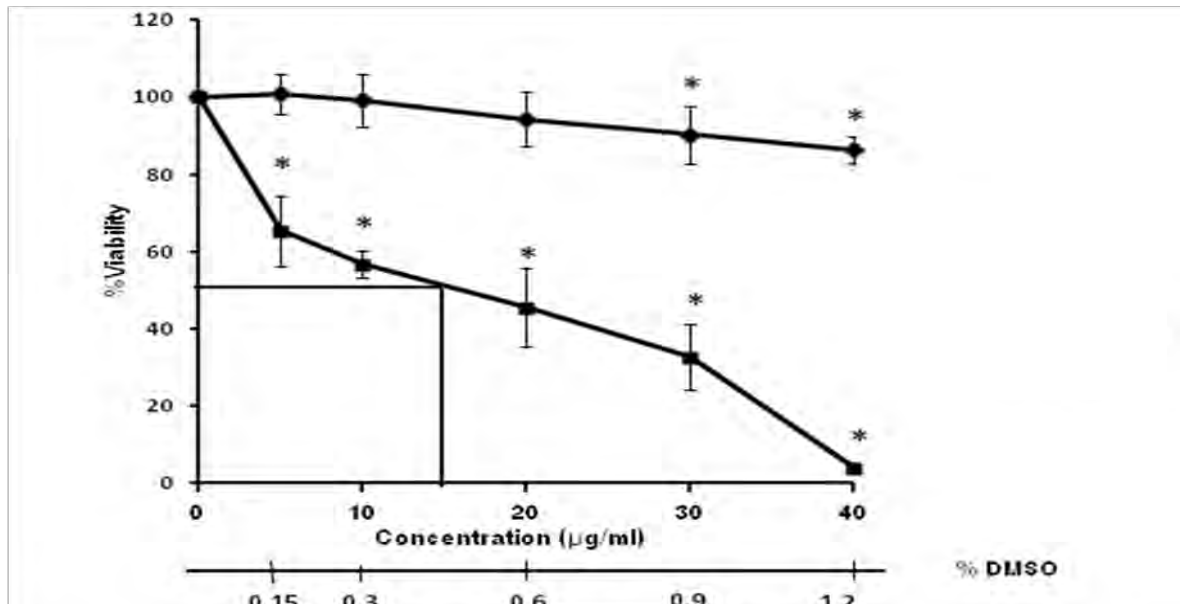
ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์จากสมุนไพร

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์จากสมุนไพร		VCEAC**
ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	(mg vitamin C/ 1 g extract)
แมงลักคา	<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.	584.41±18.17
ขิง	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe.	538.47±42.29
หอมแขก	<i>Murraya koenigii</i> (L.) Spreng.	494.38±24.75
ขมิ้น	<i>Curcuma longa</i> Linn.	369.99±58.28
โลดทะนง	<i>Trigonostemon reidiodes</i> Craib.	147.69±31.47
ว่านชักมดลูก	<i>Curcuma zanthorrhiza</i> Roxb.	60.90±22.34
ว่านस्पฺเลือด	<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	NA*
ฟ้าทะลายโจร	<i>Andrographis paniculata</i>	NA*
มะระขี้นก	<i>Momordica charantia</i> Linn.	NA*

NA*= no activity, VCEAC** = Vitamin C equivalent antioxidant capacity

9) การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพรชนิดอื่นๆ

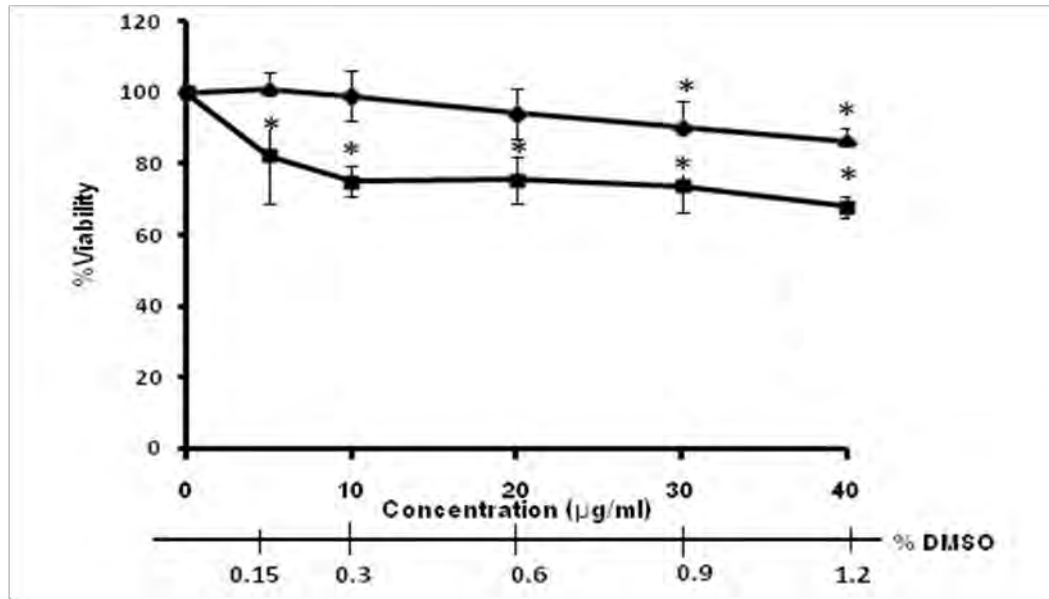
จากการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งพบว่าสารจากขมิ้นที่ความเข้มข้น 5-40 $\mu\text{g/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 16 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{IC}_{50} = 16 \mu\text{g/ml}$) โดย DMSO มีความเป็นพิษเพียงเล็กน้อย ภาพที่ 15



*, $p < 0.05$ vs. 0 $\mu\text{g/ml}$

ภาพที่ 15 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2 cells) เมื่อทดสอบด้วยสารจากขมิ้น (■) และ DMSO (◆)

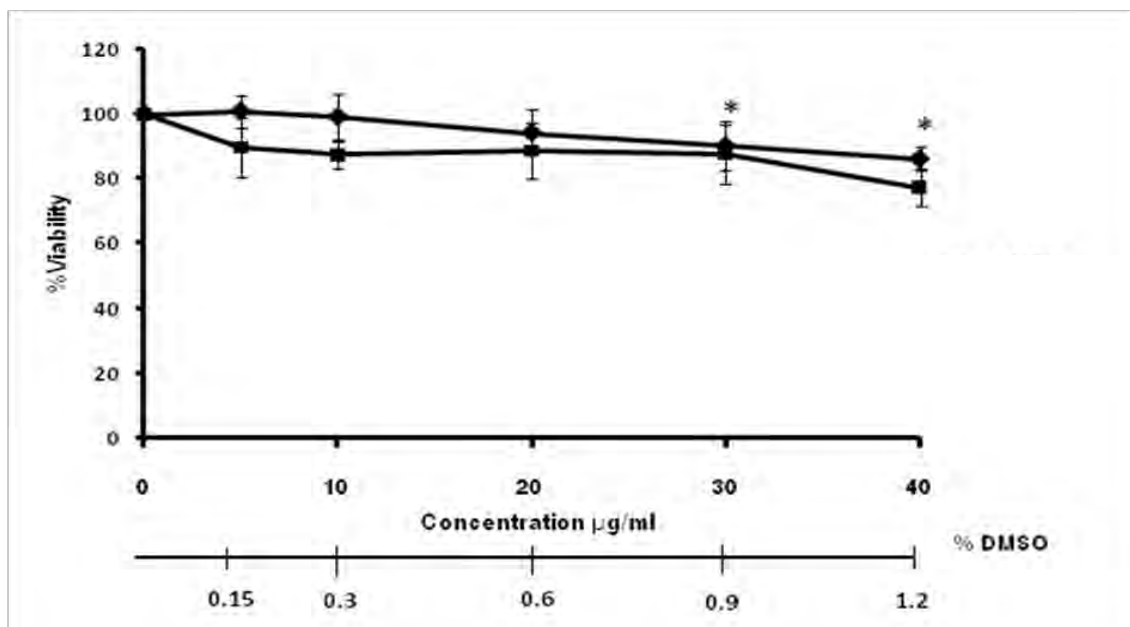
สารจากขมิ้นที่ความเข้มข้น 5-40 $\mu\text{g/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ร้อยละ 50 ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ โดย DMSO มีความเป็นพิษเพียงเล็กน้อย ภาพที่ 16



*, $p < 0.05$ vs. 0 µg/ml

ภาพที่ 16 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2 cells) เมื่อทดสอบด้วยสารจาก ขิง (■) และ DMSO (◆)

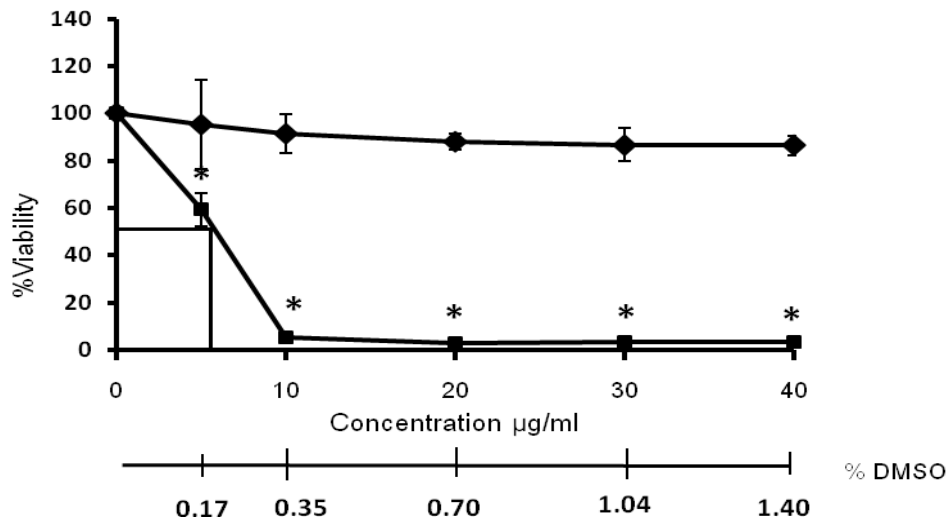
สารจากแมงลักคาที่ความเข้มข้น 5-40 µg/ml ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ โดย DMSO มีความเป็นพิษเพียงเล็กน้อย ภาพที่ 17



*, $p < 0.05$ vs. 0 µg/ml

ภาพที่ 17 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2 cells) เมื่อทดสอบด้วยสารจาก แมงลักคา (■) และ DMSO (◆)

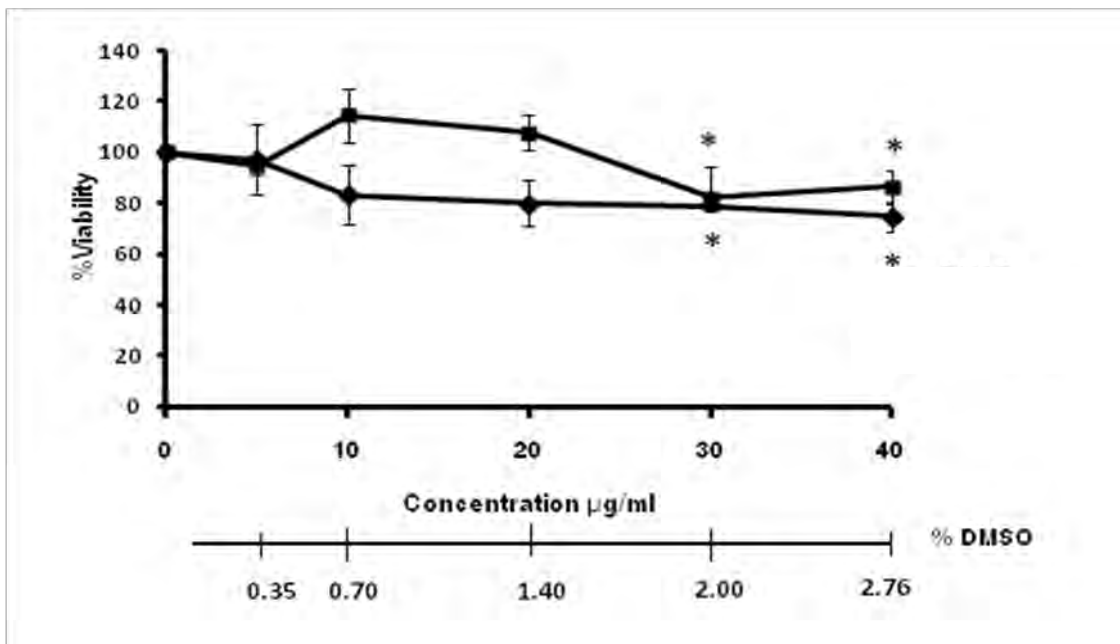
สารจากหอมแขกที่ความเข้มข้น 5-40 $\mu\text{g/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 5.80 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{IC}_{50} = 5.80 \mu\text{g/ml}$) โดย DMSO มีความเป็นพิษเพียงเล็กน้อย ภาพที่ 18



*, $p < 0.05$ vs. 0 $\mu\text{g/ml}$

ภาพที่ 18 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2 cells) เมื่อทดสอบด้วยสารจากหอมแขก (■) และ DMSO (◆)

สารจากโลดทะนงที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบแต่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ร้อยละ 50 โดย DMSO มีความเป็นพิษเพียงเล็กน้อย ภาพที่ 19



*, $p < 0.05$ vs. 0 µg/ml

ภาพที่ 19 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2 cells) เมื่อทดสอบด้วยสารจาก โลดทะนง (■) และ DMSO (◆)

10) การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์และแอนา ลอกจากสมุนไพรชนิดอื่นๆ

การคัดกรองฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด คือ ขมิ้น (*Curcuma longa* L.) ว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa*) หอมแขก (*Murraya koenigii*), แมงลักคา (*Hyptis suaveolens*) ฟ้ายะลวยโจร (*Andrographis paniculata*) และโลดทะนง (*Trigonostemon reidioides*) มีจำนวนสารบริสุทธิ์และแอนาลอกที่ทดสอบรวมทั้งหมด 36 สาร แสดงในตารางที่ 4 จากตารางพบว่าสารบริสุทธิ์จากหอมแขกให้ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก ชนิด CLS-354 cells ได้ดีที่สุด โดยเฉพาะสาร ASWK024 ให้ค่า IC_{50} น้อยที่สุดคือประมาณ 10 µM

ตารางที่ 4 แสดงค่าความเข้มข้นของสารจากสมุนไพรทั้งหมด 6 ชนิด ที่สามารถการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด human oral squamous carcinoma (CLS-354 cells) ได้ร้อยละ 50 (IC_{50})

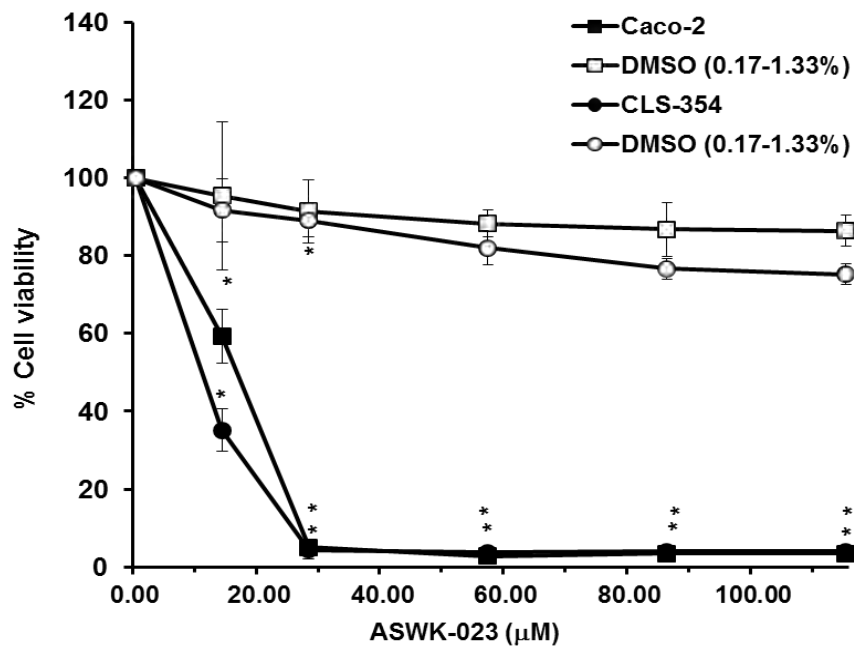
Thai Herbs	Compound (code)	IC_{50} value (μ g/ml)	IC_{50} value (μ M)
<i>Curcuma longa</i> L. (Ka-min-Chan)	ASWK-001	10.0	29.56
	ASWK-002	18.0	58.38
	ASWK-003	NA	NA
	ASWK-004	20.0	59.64
	ASWK-005	NA	NA
	ASWK-006	25.0	68.61
	ASWK-007	14.0	41.87
	ASWK-008	22.5	73.93
	ASWK-009	3.0	10.33
	ASWK-010	8.5	27.75
	ASWK-011	13.0	40.58
	ASWK-012	5.0	14.27
	ASWK-013	5.0	13.68
	ASWK-014	4.8	14.27
	ASWK-015	3.5	10.86
	ASWK-037	NA	NA
	ASWK-038	14.0	42.64
	ASWK-039	7.0	29.38
	ASWK-040	9.0	37.08
<i>Murraya koenigii</i> (Hom-khag)	ASWK-023	4.0	11.52
	ASWK-024	3.5	10.08
	ASWK-025	4.0	11.01
	ASWK-026	9.0	25.92
	ASWK-027	NA	NA
	ASWK-028	NA	NA

Thai Herbs	Compound (code)	IC ₅₀ value (µg/ml)	IC ₅₀ value (µM)
<i>Andrographis paniculata</i> (Pha-ta-lai-chone)	ASWK-041	7.0	19.98
	ASWK-042	NA	NA
	ASWK-043	NA	NA
	ASWK-044	NA	NA
	ASWK-045	NA	NA
	ASWK-046	NA	NA
	ASWK-047	NA	NA
	ASWK-048	NA	NA
<i>Hyptis suaveolens</i> (Mang-Lak-ka)	ASWK-030	NA	NA
<i>Curcuma comosa</i> (Wan-chak-mod-luke)	ASWK-049	> 40.0	>125.7
<i>Trigonostemon reidiodes</i> (Lode-ta-nong)	ASWK-051	NA	NA
Anti-cancer drug cisplatin	-	-	17.0

NA: No activity

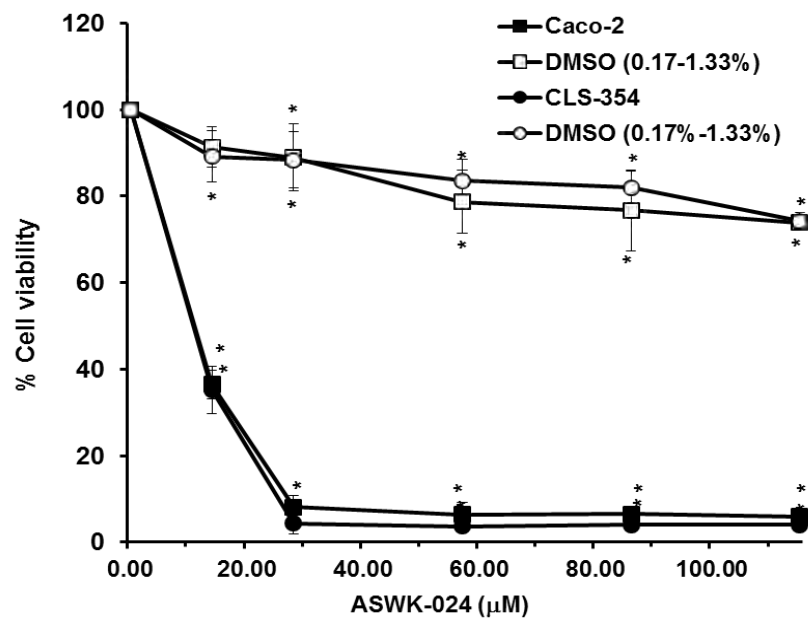
11) การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งช่องปากของสารจากหอมแขก

จากการศึกษาข้างต้นพบว่าสารจากหอมแขกมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ได้มากที่สุด ดังนั้นจึงทำการทดสอบฤทธิ์ของสารจากหอมแขกตัวอื่นๆ และแอนาลอกเพิ่มเติม ได้แก่ สาร ASWK023-ASWK028 พบว่าสารจากหอมแขกรหัส ASWK023 ASWK024 และ ASWK025 ให้ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2 ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) คือ ที่ความเข้มข้น 17 12 และ 15 µM ตามลำดับ และให้ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) ได้ที่ความเข้มข้น 12 10 และ 11 µM ตามลำดับ (ภาพที่ 20, 21 และ 22) ส่วนสาร ASWK026 ให้ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 32 และ 26 µM ตามลำดับ (ภาพที่ 23) ส่วนสาร ASWK027 และ ASWK028 พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (ตารางที่ 5) สำหรับตัวทำละลาย DMSO (0.17-1.33%) พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เพียงเล็กน้อย

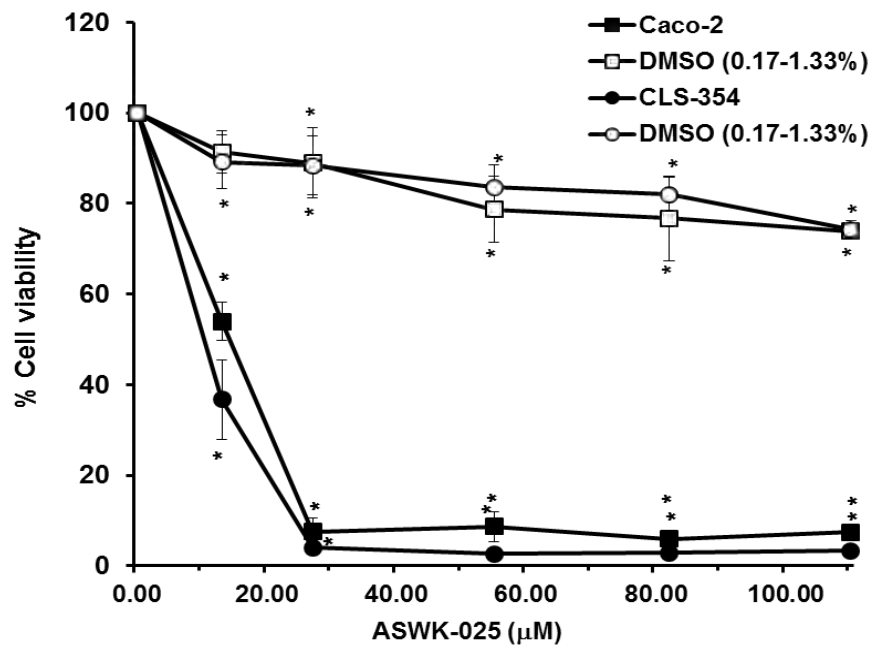


*, $p < 0.05$ vs 0 μM

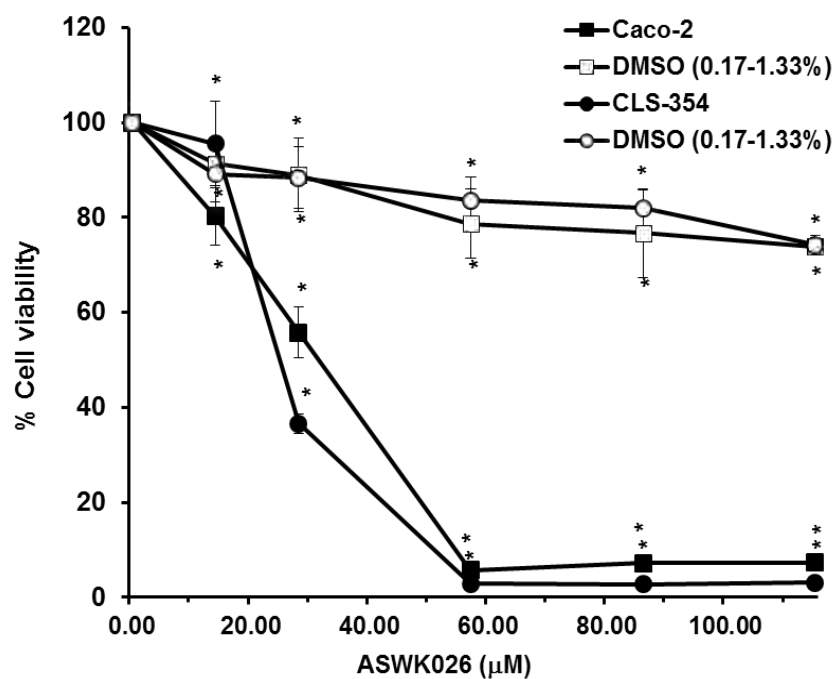
ภาพที่ 20 ความเป็นพิษของสาร ASWK023 คอเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) และเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354)



ภาพที่ 21 ความเป็นพิษของสาร ASWK024 คอเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) และเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354)



ภาพที่ 22 ความเป็นพิษของสาร ASWK025 ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) และเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354)



ภาพที่ 23 ความเป็นพิษของสาร ASWK026 ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) และเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354)

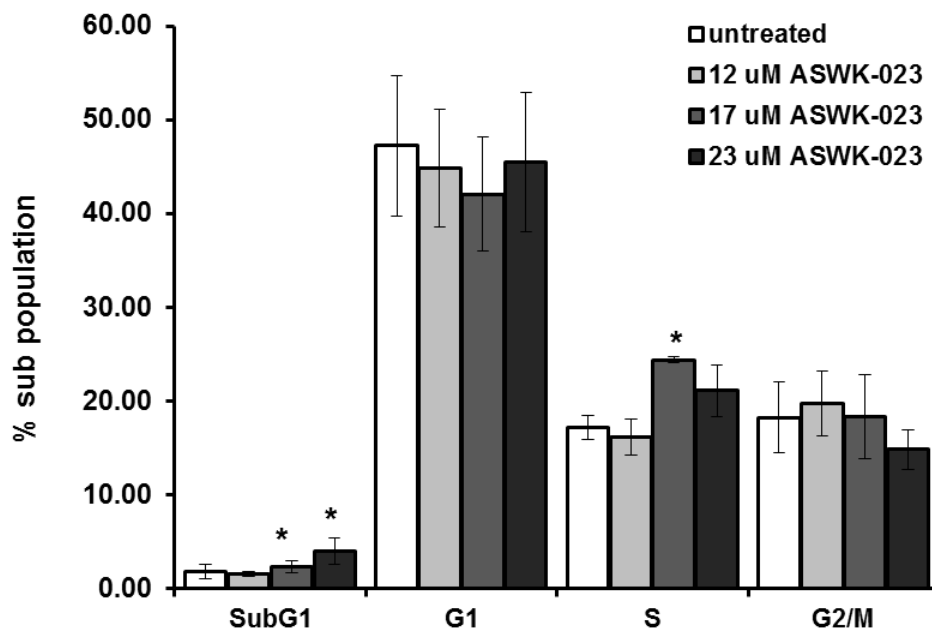
ตารางที่ 5 IC₅₀ ของสารจากหอมแขก ASWK023-ASWK028

Compound code	IC ₅₀ (μM)	
	Caco-2	CLS-354
ASWK023	17	12
ASWK024	12	10
ASWK025	15	11
ASWK026	32	26
ASWK027	NA	NA
ASWK028	NA	NA

NA; no activity

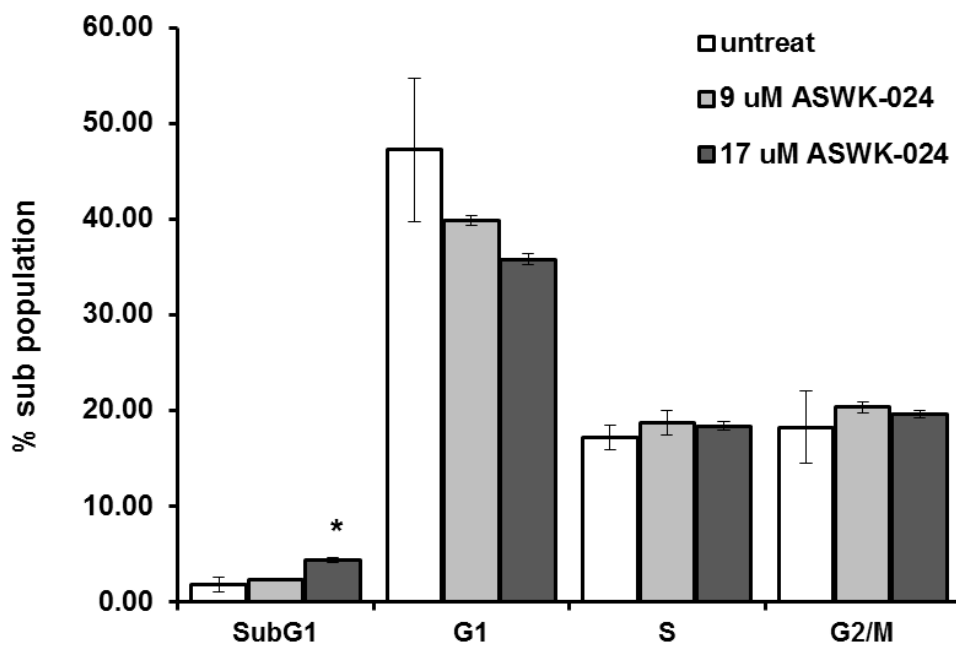
12) การศึกษาวัฏจักรชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยสารจากหอมแขก

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าสาร ASWK023-024 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงได้นำสารทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งเพื่อศึกษาวัฏจักรชีวิตของเซลล์ สาร ASWK023 เมื่อทดสอบในเซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2 ที่ความเข้มข้น 17 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะพบเซลล์ในระยะ S phase สูงขึ้น ซึ่งจะบ่งชี้ถึงการหยุดวัฏจักรชีวิตของเซลล์ในระยะ S phase นอกจากนั้นยังพบว่าความเข้มข้นของสาร ASWK023 17 และ 23 μM จะทำให้พบเซลล์ในระยะ Sub G1 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 24) สำหรับสาร ASWK024 ที่ความเข้มข้น 17 μM พบเซลล์ในระยะ Sub G1 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 25) ซึ่งจะบ่งชี้ถึงการตายแบบอะพอพโทซิส สำหรับการทดสอบในเซลล์มะเร็งช่องปาก CLS-354 พบว่าสาร ASWK023 ที่ 17 μM จะทำให้พบเซลล์ในระยะ G1 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจะบ่งชี้ถึงการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (ภาพที่ 26) ส่วนสาร ASWK024 ที่ความเข้มข้น 12 μM พบว่าทำให้เซลล์ในระยะ G1 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 27)



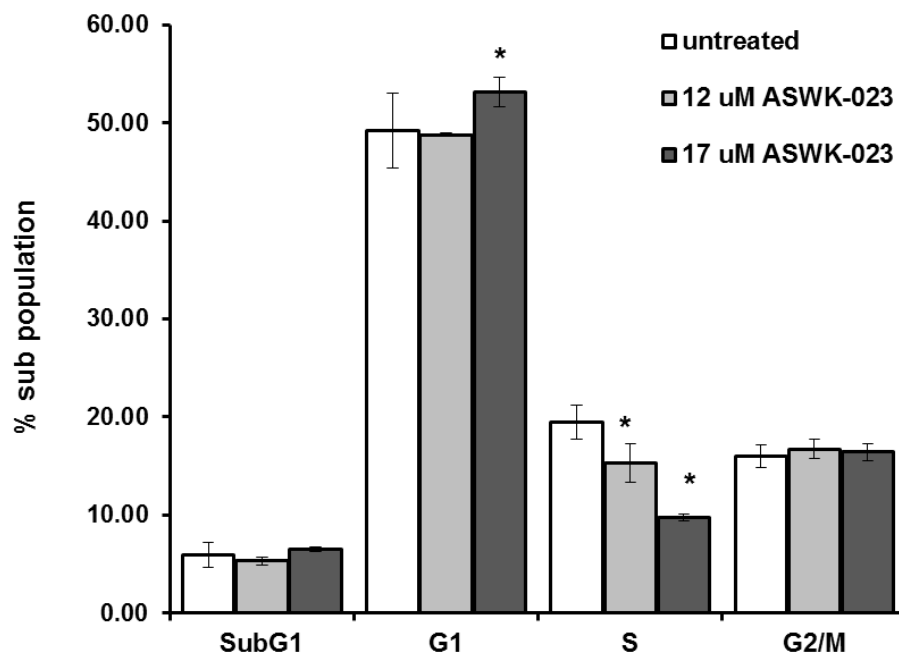
*, $p < 0.05$ vs untreated sample

ภาพที่ 24 วัฏจักรชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อทดสอบด้วยสาร ASWK023



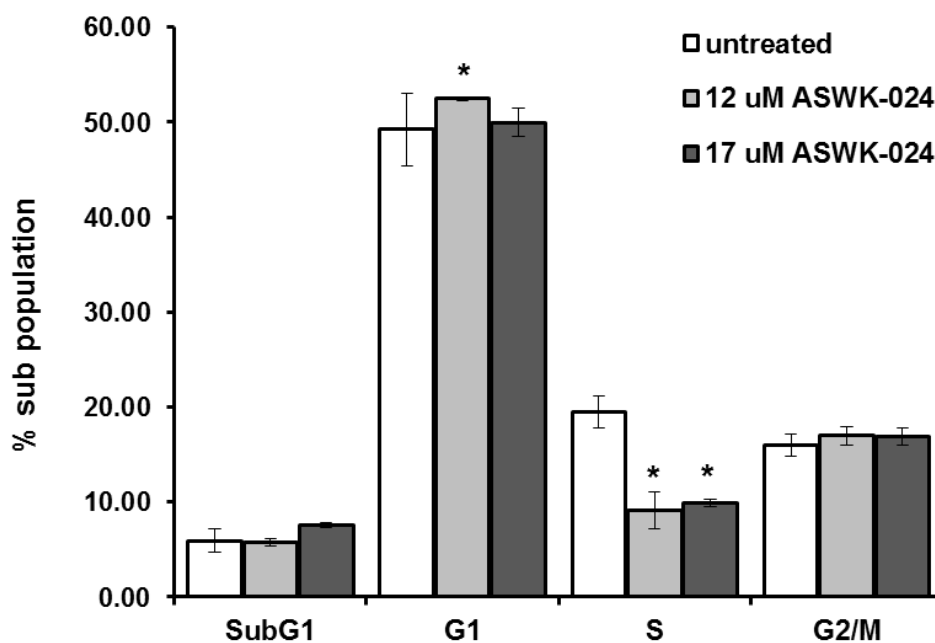
*, $p < 0.05$ vs untreated sample

ภาพที่ 25 วัฏจักรชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อทดสอบด้วยสาร ASWK024



*, $p < 0.05$ vs untreated sample

ภาพที่ 26 วัฏจักรชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยสาร ASWK023

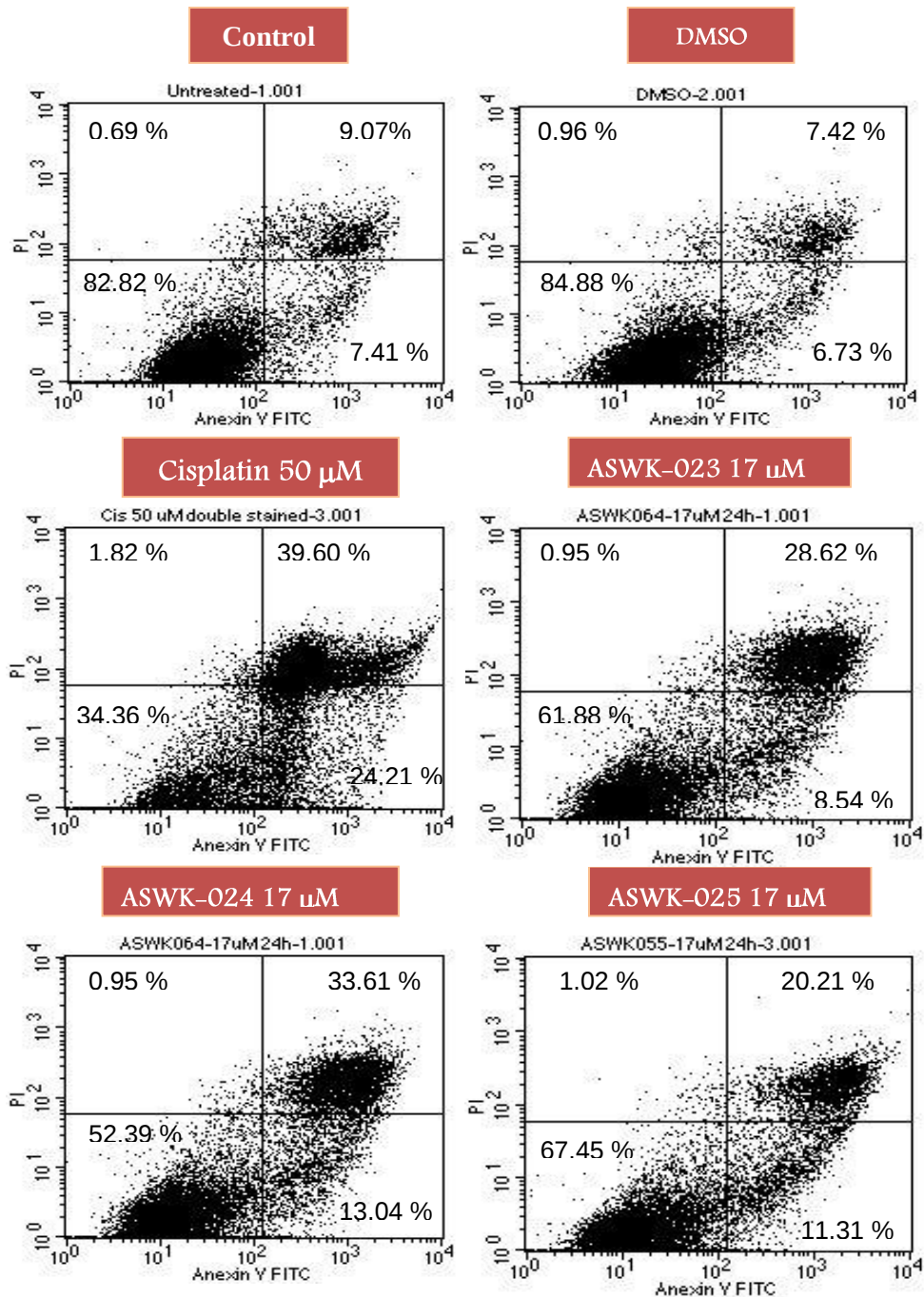


*, $p < 0.05$ vs untreated sample

ภาพที่ 27 วัฏจักรชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยสาร ASWK024

13) กลไกการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งช่องปากด้วยสารจากหอมแขก

จากการศึกษา กลไกการตายแบบอะพอพโทซิสพบว่าสาร ASWK023 ASWK024 และ ASWK025 จากหอมแขกที่ความเข้มข้น 17 μM ทำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิส ได้ร้อยละ 37.47 และ 32 ตามลำดับ สำหรับยาซิสพลาตินซึ่งใช้เป็น positive control ที่ความเข้มข้น 50 μM ทำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิสได้ร้อยละ 64 (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยสารจากหอมแขก

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1) ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากผลไม้ด้วยเมทานอล

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) ของสารสกัดจากผลไม้ด้วย เมทานอล โดยสารสกัดที่ใช้ศึกษามีดังนี้คือ เมล็ดมะขาม เปลือกทับทิม เมล็ดและเปลือกลิ้นจี่ เมล็ดและเปลือกเงาะ เปลือกมังคุด ผลสำรองและ ใบฝรั่ง โดยวิธี MTT จากการศึกษาพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากที่ดีที่สุดคือ สารสกัดจากเปลือกมังคุด > เมล็ดมะขาม > เปลือกทับทิม > เมล็ดลิ้นจี่ > เปลือกเงาะ > ผลสำรอง > เมล็ดเงาะ ส่วนเปลือกลิ้นจี่ และใบฝรั่งไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 ได้ สำหรับผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติพบว่าความเป็นพิษของสารสกัดที่ไม่มีความเป็นพิษในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบคือสารสกัดจากเปลือกมังคุด เมล็ดมะขาม เมล็ดลิ้นจี่ เปลือกลิ้นจี่ ผลสำรอง และใบฝรั่ง แต่สารสกัดจากเปลือกทับทิม เปลือกเงาะ และ เมล็ดเงาะ พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ และจากการตรวจวัดระดับ phenolic compounds ในตัวอย่างสารสกัดเมทานอลจากผลไม้ชนิดต่างๆ พบว่ามีระดับ phenolic compounds สูงเรียงจากมากไปน้อยคือ สารสกัดเมทานอลจากเปลือกทับทิม > เมล็ดมะขาม > ใบฝรั่ง > เมล็ดลิ้นจี่ > เปลือกลิ้นจี่ > เปลือกมังคุด > เมล็ดเงาะ > เปลือกเงาะ > ผลสำรอง และจากการศึกษาดายแบบอะพอพโทซิสโดยการย้อมด้วย Annexin V-FITC/PI ของการทดสอบที่ใช้สารสกัดด้วยเมทานอลที่ให้ฤทธิ์ดีที่สุด 2 ชนิดคือเมล็ดมะขามและเมล็กลิ้นจี่คือพบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 75 µg/ml สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ อะพอพโทซิสได้ประมาณ 10% และสารสกัดจากเมล็กลิ้นจี่ที่ความเข้มข้น 135 µg/ml ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส อย่างไรก็ตามเมื่อนำสารสกัดจากเมล็ดมะขามและเมล็กลิ้นจี่ซึ่งให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ดีที่สุดมาตรวจสอบพบว่าไม่มีสาร catechin quercetin และ procyanidin B2 เป็นองค์ประกอบ สารสกัดดังกล่าวอาจมีสารสำคัญซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เป็นองค์ประกอบที่ทางผู้วิจัยไม่ได้ทดสอบ และเมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่เคยมีรายงานว่า เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดจากเมล็ดมะขามและเมล็กลิ้นจี่คือ catechin และ procyanidin B2 มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากก็พบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ ฤทธิ์ต้านมะเร็งที่พบอาจเนื่องมาจากสารชนิดอื่นที่อาจยังไม่เคยพบ รายงานการวิจัยมาก่อนหรือสารที่ทางผู้วิจัยไม่ได้ทดสอบ จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดจากเมล็ดมะขามประกอบไปด้วยฟลาโวนอยด์หลายชนิดได้แก่ (+) - catechin procyanidin B2 epicatechin และ polymeric procyanidins (1) และสารเหล่านี้พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (2-4) และยังเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส (2-3) โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้จะทำให้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ cellular redox ในเซลล์ ซึ่งจะกระตุ้นโปรตีนในวิถีต่างๆ ซึ่งอาจจะทำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นหรือทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (5-6) สารโพลีฟีนอลิกจากสาร

สกัดอาจมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงสมดุล redox ภายในเซลล์และกระตุ้นการทำงานของโปรตีนในวิถีที่เหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส ส่วนสารสกัดจากเปลือกเมล็ดลิ้นจี่พบวาประกอบไปด้วย condensed tannins epicatechin procyanidin A2 cyanidin-3-rutinoside และ quercetin-3-rutinosid ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง (7). ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิดได้แก่เซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งตับ (8-9) สารสกัดเอทานอลจากเปลือกเงาะพบว่ามีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ดี (free-radical scavenging power) (10) และพบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (PBMCs) และเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด Caco-2 ในขณะที่พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเปลือกเงาะประกอบไปด้วยสารฟีนอลิกสูงถึง 2.28 ± 0.02 GAE mg/ml และยังพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งคอหอยชนิด KB และเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด Caco-2 และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (11) อย่างไรก็ตามฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากผลไม้เหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์ (12) สปีชีส์ (13) และวิธีการสกัด (14)

2) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพรชนิดอื่น ๆ

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ตรวจคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพรชนิดอื่น ๆ การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์จากสมุนไพรทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ ขมิ้น ขิง แมงลักคา หอมแขก ฟ้าทะลายโจร มะระขี้นก ว่านสบู่เลือด ว่านชักมดลูก และโลดทะนง โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสมุนไพรเมื่อคำนวณเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐานทอรอล็อกซ์แล้วพบว่า สารสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุดเรียงจากมากไปน้อยคือ สารจากขมิ้น > แมงลักคา > โลดทะนง > ขิง > หอมแขก > ฟ้าทะลายโจร > ว่านสบู่เลือด > ว่านชักมดลูก ส่วนสารจากมะระขี้นกพบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเลย สำหรับความเข้มข้นของสารสมุนไพรที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เรียงจากสารที่มีค่า IC_{50} น้อยที่สุดไปมากที่สุดคือ สารจากขมิ้น แมงลักคา โลดทะนง ขิง และหอมแขก ส่วนฟ้าทะลายโจร ว่านสบู่เลือด ว่านชักมดลูก และมะระขี้นกพบว่าไม่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ร้อยละ 50 ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสมุนไพรเมื่อคำนวณเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐานวิตามินซีพบว่าสารสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดเรียงจากมากไปน้อยคือ สารจากแมงลักคา > ขิง > หอมแขก > ขมิ้น > โลดทะนง > ว่านชักมดลูก ส่วนสารจากฟ้าทะลายโจร มะระขี้นก และว่านสบู่เลือดพบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเลย โดยจากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่าขมิ้นและแมงลักคามีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ได้ดีที่สุดตามลำดับ ซึ่งการทำปฏิกิริยาระหว่างสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของทั้งสอง โดยอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH เป็นอนุมูลอิสระในกลุ่ม reactive nitrogen species (RNS) เนื่องจากมีหมู่

ไนโตรเจนเป็นศูนย์กลาง โดยอนุมูล ABTS มีหมู่ไนโตรเจนที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ตรงส่วนที่ง่ายต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระ แต่อนุมูล DPPH มีอิเล็กตรอนเดี่ยวที่ถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากำจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาได้ช้ากว่าความเป็นจริง ดังนั้นการทำปฏิกิริยาระหว่างอนุมูล ABTS และ DPPH ขึ้นอยู่กับขนาดและสูตรโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระจากสมุนไพรทั้ง 9 ชนิด โดยสารสมุนไพรที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูล DPPH ได้ดีกว่าสารโมเลกุลขนาดใหญ่

จากรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าสาร Turmerin จากขมิ้นมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS, DPPH และ superoxide (O_2^-) ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 83 $\mu\text{g/ml}$, 48 $\mu\text{g/ml}$ และ 29 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ รวมถึงสามารถแย่งจับกับโลหะ Fe^{3+} ได้ ซึ่งโลหะไอออนเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระต่างๆ มากมาย (15) ส่วนสาร α -turmerone และ β -turmerone ที่ได้จากเหง้าสดของขมิ้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และมีความสามารถในการแย่งจับกับโลหะได้อีกด้วย (16) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าสารบริสุทธิ์จากขมิ้นที่ความเข้มข้น 16.73 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ร้อยละ 50 และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซีที่ความเข้มข้น 369.99 ± 58.28 mg/g ซึ่งให้ฤทธิ์ดีกว่าที่มีรายงานการวิจัยที่ผ่านมา ดังนั้นสารบริสุทธิ์จากขมิ้นจึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อพัฒนาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระต่อไป

รายงานการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากใบแมงลักคาพบว่า มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานทอรอล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 65.02 $\mu\text{M/mg}$ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 3.72 mg/ml (17) นอกจากนี้สารสกัดเมทานอลจากใบแมงลักคามีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 14.04 $\mu\text{g/ml}$ โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้อาจเนื่องมาจากการมีสารประกอบในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ (18) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารบริสุทธิ์จากแมงลักคามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 32.28 $\mu\text{g/ml}$ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซีที่ความเข้มข้น 584.41 ± 18.17 mg/g โดยให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาอันยังไม่เคยมีการศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์จากแมงลักคาในการต้านอนุมูลอิสระมาก่อนเลย

มีรายงานการวิจัยพบว่า สารสกัดจากใบและเหง้าของขิงอ่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยวิธี thiobarbituric acid (TBA) assay (19) สาร [6]-gingerol จากเหง้าขิงแก่และสารสกัดจากขิงโดยใช้ตัวทำละลายคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (supercritical CO_2) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสาร

มาตรฐานทรอล็อกซ์ที่ความเข้มข้น $813.33 \pm 6.67 \mu\text{mol}$ และ $724.44 \pm 7.70 \mu\text{mol}$ ตามลำดับและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH อีกด้วย (20) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าสารบริสุทธิ์จากขิงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น $44.67 \pm 1.81 \mu\text{g/ml}$ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินซี ที่ความเข้มข้น $538.47 \pm 42.29 \text{ mg/g}$

รายงานผลการศึกษาสารสกัดด้วยเอธานอลของผงยาโลดทะนงแดงพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยให้ค่าเฉลี่ยของ EC_{50} เท่ากับ 2.9 ppm (21) สำหรับสารบริสุทธิ์จากโลดทะนงยังไม่เคยมีรายงานการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาก่อน และผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดบริสุทธิ์จากโลดทะนงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น $50.52 \mu\text{g/ml}$ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินซีที่ความเข้มข้น $147.69 \pm 31.47 \text{ mg/g}$

รายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดฟีนอลจากใบของหอมแขกมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH และมีรายงานว่าสารประกอบในกลุ่ม carbazole alkaloids ในใบหอมแขก ได้แก่ viz: euchrestine B, bismurrayafoline E, mahanine, mahanimbicine, mahanimbine และ girinimbine มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี (22) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ที่พบว่า สารจากหอมแขกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น $62.50 \pm 2.04 \mu\text{g/ml}$ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินซีที่ความเข้มข้น $494.38 \pm 24.75 \text{ mg/g}$

รายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากฟ้าทะลายโจรพบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น $27 \mu\text{g/ml}$ และมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ Fe^{3+} ได้ดีเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay (23) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารในกลุ่ม andrographolide ที่ได้จากฟ้าทะลายโจรมีโครงสร้างเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม Chain breaking ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ในขั้นตอนอินิทิเอชัน และสาร Xanthones ที่แยกได้จากรากฟ้าทะลายโจรซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิล 2 ตำแหน่งสามารถยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ในชั้นอินิทิเอชันได้ (24) สำหรับการทดลองครั้งนี้พบว่าสารบริสุทธิ์จากฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานทรอล็อกซ์ที่ความเข้มข้น $23.24 \pm 2.68 \text{ mg/g}$ แต่ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ร้อยละ 50 พบว่าสารสกัดบริสุทธิ์จากฟ้าทะลายโจรไม่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารจากฟ้าทะลายโจรมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระน้อย

จากรายงานการศึกษาพบว่าสารสกัดจากवानस्पुเลียดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 0.42 mg/ml และ $1.45 \pm 0.04 \text{ mg/ml}$

ตามลำดับรวมถึงสามารถยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ได้ (25) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเมทานอลจากว่านสบู่เลือดไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี Ferric thiocyanate assay (26) ส่วนผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารบริสุทธิ์จากว่านสบู่เลือดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานทอรอล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 13.43 ± 6.26 mg/g และในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ร้อยละ 50 พบว่าสารสกัดบริสุทธิ์จากว่านสบู่เลือดไม่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระน้อย

รายงานผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเหง้าว่านชักมดลูกพบว่า สารสกัดจากว่านชักมดลูกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 0.09 mg/ml รวมถึงสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ได้ (27) นอกจากนี้สาร xanthorrhizol จากเหง้าว่านชักมดลูกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) และสามารถยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย H_2O_2 ในเซลล์ระบบประสาท จึงป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการได้รับพิษตะกั่วได้ (28) ซึ่งจากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า สารบริสุทธิ์จากว่านชักมดลูกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานทอรอล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 6.20 ± 2.68 mg/g และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซีที่ความเข้มข้น 60.90 ± 22.34 mg/g แต่ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ร้อยละ 50 พบว่าสารสกัดบริสุทธิ์จากว่านชักมดลูกไม่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบได้ เนื่องจากมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระน้อย

มีรายงานการศึกษาพบว่า สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากมะระขี้นกที่ความเข้มข้น 129.94 μ g/ml และ 156.78 μ g/ml ตามลำดับ สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 ซึ่งให้ผลดีกว่าวิตามินอี รวมถึงมีความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ Fe^{3+} และสามารถยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ได้ (29) และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (30) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารบริสุทธิ์จากมะระขี้นกไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารบริสุทธิ์จากมะระขี้นกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนสารสกัดจากมะระขี้นกมีองค์ประกอบของสารอยู่หลายชนิดปนกัน ซึ่งสารสำคัญหนึ่งในนั้นก็คือน้ำตาลต้านอนุมูลอิสระจึงให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้

3) ฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งช่องปากของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพรชนิดอื่น ๆ

การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2) ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์จากสมุนไพรทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ ขมิ้น ขิง แมงลักคา หอมแขก และโลดทะนง โดยช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบคือตั้งแต่ 5-40 μ g/ml พบว่าสารจากขมิ้น

ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 16 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{IC}_{50}=16 \mu\text{g/ml}$) และสารจากหอมแขกมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 5.08 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{IC}_{50}= 5.08 \mu\text{g/ml}$) ส่วนสารจากขิงที่ความเข้มข้น 5-40 $\mu\text{g/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ร้อยละ 50 ได้ สารจากแมงลักคาไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และสารจากโอดทะนงที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/ml}$ และ 40 $\mu\text{g/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ร้อยละ 50 ได้

สำหรับการคัดกรองฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารจากสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด คือ ขมิ้น (*Curcuma longa* L.) ว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa*) หอมแขก (*Murraya koenigii*), แมงลักคา (*Hyptis suaveolens*) ฟาทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และโอดทะนง (*Trigonostemon reidioides*) พบว่าสารจากหอมแขกให้ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด CLS-354 cells ได้ดีที่สุด

มีรายงานการศึกษาพบว่าสาร curcumin analogues สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้เพาะเลี้ยงและยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็ง (31) สาร curcumin จากขมิ้นมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด tongue squamous cell carcinoma (SAS) ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลอง (32) ขมิ้นสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็งได้ (33-34) สาร curcumin ในขมิ้นสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด CAL-27 โดยการยับยั้งวิถีของ Notch-1 และ NF-KB (34) และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 และ HL-60 ได้ร้อยละ 54.5 และ 49.8 ตามลำดับ (35) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่า สารจากขมิ้นสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (caco-2) ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 16 $\mu\text{g/ml}$

รายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสาร girinimbine และสาร mahanine จากหอมแขกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (36-37) นอกจากนั้นยังพบว่าสาร mahanine ที่ได้มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างซึ่งมาจากหอมแขกมีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อมลูกหมากในสัตว์ทดลองได้ (38) ซึ่งจากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าสารจากหอมแขกสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (caco-2) ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 5.08 $\mu\text{g/ml}$

มีรายงานการศึกษาพบว่าสารสกัดเอทานอลจากขิงมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT 116, HT 29) ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น $496 \pm 34.2 \mu\text{g/ml}$ และ $455 \pm 18.6 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (39) และจากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดจากขิงมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ดับโดยเหี่ยวนำไปให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (40) สาร [6]-Gingerol ในเหง้าขิงมีฤทธิ์ลดความสามารถในการเกาะพื้นผิว การเคลื่อนที่ การบุกรุก และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) ได้ (41) รวมถึงสาร 6-Paradol ในขิงยังสามารถเหี่ยวนำไปให้เซลล์มะเร็งโคนลิน (KB cells) เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (40) สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารจากขิงมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ แต่ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ร้อยละ 50 ได้

รายงานการศึกษาพบว่าสารสกัดคลอโรฟอร์มที่ได้จากราก ก้าน และใบแมงลักคา มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิดได้แก่ เซลล์มะเร็งโคนลิน (KB cell) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HF6) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7) (42) แต่สำหรับผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารจากแมงลักคาที่ความเข้มข้นในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 5-40 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

จากรายงานวิจัยพบว่าสาร rediocide G จากรากต้นโสดทะนงมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (HuCCA-1) และเซลล์มะเร็งโคนลิน (KB cell) (43) สำหรับผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารจากโสดทะนงที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/ml}$ และ 40 $\mu\text{g/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ร้อยละ 50 ได้

4). กลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากของสารจากหอมแขก

จากการศึกษาพบว่าสารจากหอมแขกมีผลต่อการหยุดวัฏจักรชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งช่องปากและยังเหี่ยวนำไปให้เซลล์มะเร็งช่องปากตายแบบอะพอพโทซิสซึ่งกลไกการเหี่ยวนำไปให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิสและการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรของเซลล์นั้นได้มีรายงานพบในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 เมื่อทดสอบด้วยสาร mahanine จากหอมแขก (44) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารในกลุ่ม carbazole alkaloids ประกอบด้วย mahanine pyrayafoline-D และ murrafoline-I สามารถเหี่ยวนำไปให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 แบบอะพอพโทซิสโดยการกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 และ caspase 9 กระตุ้นโปรตีน poly(ADP-ribose) polymerase cleavage เหี่ยวนำไปให้เกิดการหลั่ง cytochrome C ในไซโตพลาสซึม (45) ฤทธิ์ในการเหี่ยวนำไปให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสน่าจะเกิดมาจากคุณสมบัติในการเป็น pro-oxidant ของสารในกลุ่มดังกล่าวเนื่องจากการรายงานพบว่าสาร mahanine สามารถกระตุ้น reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ (44-46). การเพิ่มขึ้นของ ROS โดยการเหี่ยวนำไปของสาร mahanine น่าจะทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์และกระตุ้นโปรตีนในวิถีที่ทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในที่สุด

5. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารในเชิงลึกในระดับการแสดงออกของโปรตีนและยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส หรือกลการตายแบบอื่นเช่น autophagy-associated cell death หรือ การยับยั้งกระบวนการ epithelial to mesenchymal transition (EMT) หรือกลไกการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นต้น

ผลผลิต (output) ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1) เรื่อง Antioxidant and antiproliferative activities of non-edible parts of tropical fruits ส่งตีพิมพ์ในวารสาร Sain Malaysiana อยู่ในระหว่างดำเนินการอ่านโดยผู้ทรงคุณวุฒิ (ภาคผนวก ก)

2) เรื่อง Antineoplastic potential of Carbazole Alkaloids from *Murraya koenigii* กำลังเตรียม manuscript เพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสาร Phytotherapy Research

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1) ในเชิงวิชาการ คือมีการพัฒนาเข้ากับการเรียนการสอนในระดับบัณฑิตศึกษา โดยมีนักศึกษาปริญญาเอก หลักสูตรชีวเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ 1 คน ที่ขณะนี้กำลังศึกษาค้นคว้าวิจัยงานวิจัยต่อยอดจากงานวิจัยชิ้นนี้

3. อื่นๆ

1) นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ (ภาคโปสเตอร์)

1.1) ยุทธนา สุดเจริญ มณฑล เลิศคณาวณิชกุล และ วรางคณา จุ่งลก. เรื่อง “ฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่” และได้รับรางวัลดีเด่น การนำเสนอผลงานวิจัยภาคโปสเตอร์ ด้านวิทยาศาสตร์ ในการประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 20 ประจำปี 2553; 16-18 กันยายน 2553. โรงแรม เจ บี หาดใหญ่. จ. สงขลา. (ภาคผนวก ข)

1.2) นันทวัน อุทัยพันธ์ มยุรา สมจิตร มณฑล เลิศคณาวณิชกุล ยุทธนา สุดเจริญ และ วรางคณา จุ่งลก. เรื่อง “Cytotoxicity and apoptotic induction property of Tamarind seed extract in human oral cancer cell line” ในการประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยในงาน “วลัยลักษณ์วิจัย” ครั้งที่ 3; 16 มิถุนายน 2554 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ (ภาคผนวก ค)

2) การตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการภายในประเทศ

ยุทธนา สุดเจริญ มณฑล เลิศคณาวณิชกุล และ วรางคณา จุ่งลก. ฤทธิ์ต้านมะเร็ง
ช่องปากของสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 2011, 14(1), 30-35.
(ภาคผนวก ง)

เอกสารอ้างอิง

1. Sudjaroen Y, Haubner R, Wurtele G, Hull WE, Erben G, Spiegelhalder B, Changbumrung S, Bartsch H, Owen RW. (2005). Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp, *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 1673–1682.
2. Miura T, Chiba M, Kasai K, Nozaka H, Nakamura T, Shoji T, Kanda T, Ohtake Y, Sato T. (2008). Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3. *Carcinogenesis*, 29 (3), 585-593.
3. Al-Hazzani AA, Alshatwi AA. (2011). Catechin hydrate inhibits proliferation and mediates apoptosis of SiHa human cervical cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49(12), 3281-3286.
4. Wang Y, Zhang H, Holmgren A, Tian W, Zhong L. (2008). Inhibitory effect of green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate on mammalian thioredoxin reductase and HeLa cell viability. *Oncology Reports*, 20(1), 1479-1487.
5. Owuor ED, Kong AT. (2002). Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochemical Pharmacology*, 62, 765-770.
6. Jiang Z, Fletcher NM, Ali-Fehmi R, Diamond M P, Abu-Soud HM, Munkarah AR, Saed GM. (2011). Modulation of redox signaling promotes apoptosis in epithelial ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology*, 122(2), 418-23.
7. Sarni-Manchado P, Le Roux E, Le Guernevé C, Lozano Y, Cheynier V. (2000). Phenolic composition of litchi fruit pericarp. *J Agric Food Chem*, 48(12), 5995-6002.
8. Wang X, Wei Y, Yuan S, Liu G, Zhang YLJ, Wang W. (2006a). Potential anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 239, 144-150.
9. Wang X, Yuan S, Wang J, Lin P, Liu G, Lu Y, Zhang J, Wang W, Wei Y. (2006b). Anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against human breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 215, 168-178.
10. Okonogi S, Duangrat C, Anuchpreeda S, Tachakittirungrod S, Chowwanapoonpohn S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103, 839-846.
11. Khonkarn R, Okonogi S, Ampasavate C, Anuchapreeda S. (2010). Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and

- antiproliferative activities against human cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2122-2129.
12. Rupasinghe H. P. V, Clegg S. (2007). Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 133-137.
 13. Abeysinghe D, Li X, Sun C, Zhang W, Zhou C, Chen K. (2007). Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus 62 four species. *Food Chemistry*, 104(4), 1338-1344.
 14. Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. *J. Agric. Food Chem*, 50, 7449-7454.
 15. Lekshmi PC, Arimboor R, Raghu KG, Menon AN. (2012). Turmerin, the antioxidant protein from turmeric (*Curcuma longa*) exhibits antihyperglycaemic effects. *Nat Prod Res*, 26(17), 1654-1658.
 16. Singh G, Kapoor IPS, Singh P, Heluani CSd, Lampasona MPd, Catalan CAN. (2010). Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Food Chem Toxicol*, 48, 1026–1031.
 17. Gavani U, Paarakh PM. (2008). Antioxidant activity of *Hyptis suaveolens* Poit. *Int J pharmacol*, 4(3), 227-229.
 18. Nantitanon W, Chowwanapoonpohn S, Okonogi S. (2007). Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Hyptis suaveolens* Essential Oil. *Sci Pharm*, 75, 35-46.
 19. Ghasemzadeh A, Jaafar HZE. (2011). Antioxidant potential and anticancer activity of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) grown under different CO₂ concentration. *J Med Plant Res*, 5(14), 3247-55.
 20. Puengphian C, Sirichote A. (2008). [6]-gingerol content and bioactive properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts from supercritical CO₂ extraction. *As J Food Ag-Ind*, 1(1), 29-36.
 21. Srichayanurak C, Wichayawiwattana P, Phadungkit M, Priprem A. Effect of temperature and time of hot air drying process on free radical scavenging activity of Iodthanongdaeng. 35th Congress on Science and Technology of Thailand; 2009 October 15-17; Burapha University. Chonburi.
 22. Sasidharan I, Menon AN. (2010). A study of antioxidant properties of different extract of curry leaf (*Murraya koenigii* L.). *EJEAF Chem*, 9(6), 1036-46.

23. Tripathi R, Kamat JP. (2007). Free radical induces damages to rat liver subc 65
organelles: Inhibition by *Andrographis paniculata* extract. *Indian J Expe
Biol*, 45, 959-67.
24. Dua VK, Ojha VP, Roy R, Joshi BC, Valecha N, Devi CU, et al. (2004).
Anti-malarial activity of some xanthonones isolated from the roots of *Andrographis
paniculata*. *J Ethnopharmacol*, 95(2-3), 247-51.
25. Povichit N, Phrutivorapongkul A, Suttajit M, Chaiyasut C, Leelapornpisid P.
(2010). Phenolic content and in vitro inhibitory effects on oxidation and protein
glycation of some Thai medicinal plants Pak. *J Pharm Sci*, 23(4), 403-8.
26. Shahwar D, Shafiq-ur R, Ahmad N, Ullah S, Raza MA. (2010). Antioxidant
activities of the selected plants from the family Euphorbiaceae, Lauraceae,
Malvaceae and Balsaminaceae. *African J Biotech*, 9(7), 1086-96.
27. Jariyawat S, Thammaprati P, Suksen K, Wanitchakool P, Nateewattana J,
Chairoungdua A, et al. (2011). Induction of apoptosis in murine leukemia by
diarylheptanoids from *Curcuma comosa* Roxb. *Cell Biol Toxicol*, 27(6), 423-423.
28. Lim CS, Jin DQ, Mok H, Oh SJ, Lee JU, Hwang JK, et al. (2005).
Antioxidant and antiinflammatory activities of xanthorrhizol in hippocampal
neurons and primary cultured microglia. *J Neurosci Res*, 82(6), 831-8.
29. Wua SJ, Lean-Teik Ng. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of
wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan.
LWT - Food Sci Tech, 41, 323–30.
30. Nanasombat S, Teckchuen N. (2009). Antimicrobial, antioxidant and anticancer
activities of Thai local vegetables. *J Med Plant Res*, 3(5), 443-9.
31. Chen C, Liu Y, Chen Y, Xu J. (2011). C086 a novel analog of curcumin induces
growth inhibition and down-regulation of NF- κ B in colon cancer cells and
xenograft tumors. *Cancer Biol Ther*, 12(9), 797-807.
32. Garg R, Ingle A, Maru G. (2008). Dietary turmeric modulates DMBA-induced p21ras,
MAP kinases and AP-1/NF-kappaB pathway to alter cellular responses during
hamster buccal pouch carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 232(3), 428-39.
33. Chang KW, Hung PS, Lin IY, Hou CP, Chen LK, Tsai YM, et al. (2010).
Curcumin upregulates insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) and
C/EBPalpha during oral cancer suppression. *Int J Cancer*, 127(1), 9-20.

34. Azuine MA, Bhide SV. (1994). Adjuvant chemoprevention of experimental cancer catechin and dietary turmeric in forestomach and oral cancer models. *J Ethnopharmacol*, 44(3), 211-7.
35. Li-Xian W, Jian-Hua X, Guo-Hua W, Yuan-Zhong C. (2003). Inhibitory effect of curcumin on proliferation of K562 cells involves down-regulation of p210bcr/abl initiated Ras signal transduction pathway1. *Acta Pharmacol Sin*, 24(11), 1155-60.
36. Syam S, Abdul AB, Sukari MA, Mohan S, Abdelwahab SI, Wah TS. (2011). The growth suppressing effects of girinimbine on HepG2 involve induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Molecules*; 16(8): 7155-70.
37. Roy MK, Thalang VN, Trakoontivakorn G, Nakahara K. (2004). Mechanism of mahanine-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60). *Biochem Pharmacol*, 67(1), 41-51.
38. Ramsewak RS, Nair MG, Strasburg GM, DeWitt DL, Nitiss JL. (1999). Biologically active carbazole alkaloids from *Murraya koenigii*. *J Agric Food Chem*, 47(2), 444-7.
39. Abdullah S, Zainal Abidin SA, Murad NA, Makpol S, Wan Ngah WZ, Mohd Yusof YA. (2010). Ginger extract (*Zingiber officinale*) triggers apoptosis and G0/G1 cells arrest in HCT 116 and HT 29 colon cancer cell lines. *Afr J Biochem Res*, 4(5), 134-42.
40. Yasmin Anum MY, Shahriza ZA, Looi ML, Shafina Hanim MH, Harlianshah H, Noor Aini AH, et al. (2008). Ginger extract (*Zingiber officinale* Roscoe) triggers apoptosis in hepatocarcinogenesis induced rats. *Med Health*, 3(2), 263-74.
41. Lee HS, Seo EY, Kang NE, Kim WK. (2008). [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J Nutr Biochem*, 19(5), 313-9.
42. Grassi P, Urías Reyes TS, Sosa S, Tubaro A, Hofer O, Zitterl-Eglseer K. (2006). Anti-inflammatory activity of two diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. *Z Naturforsch C*, 61(3-4), 165-70.
43. Tempeam A, Thasana N, Pavaro C, Chuakul W, Siripong P, Ruchirawat S. (2005). A new cytotoxic daphnane diterpenoid rediocide G from *Trigonostemon reidioides*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 53(10), 1321-3.
44. Roya MK, Thalang VN, Trakoontivakornb G, Nakaharaa K. (2004). Mechanism of mahanine-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60). *Biochemical Pharmacology*, 67, 41-51.

45. Itoa C, Itoigawa M, Nakaoa K, Muratac T, Tsuboic M, Kanedac N, Furukawa H. (2006). Induction of apoptosis by carbazole alkaloids isolated from *Murraya koenigii*. *Phytomedicine*, 13, 359-365.
46. Bhattacharya K, Samanta SK, Tripathi R, Mallick A, Chandra S, Pal BC, Shaha C, Mandal C. (2010). Apoptotic effects of mahanine on human leukemic cells are mediated through crosstalk between Apo-1/Fas signaling and the Bid protein and via mitochondrial pathways. *Biochemical Pharmacology*, 79, 361-372.

ภาคผนวก

Antioxidant and Antiproliferative Activities of Non-Edible Parts of Tropical Fruits

Warangkana Chunglok ^{1*}, Nantawan Utaipan ¹, Mayura Somchit ¹, Monthon Lertcanawanichakul ¹, Yuttana Sudjaroen ²

¹ School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, Thailand

² Faculty of Science and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University, Bangkok, Thailand

* Corresponding author: Warangkana Chunglok, School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Nakhon-Si-Thammarat, 80160, Thailand

E-mail address: cwarang@wu.ac.th Tell: +6675672197

Keywords: tropical fruits; non-edible parts; antioxidant capacity; antiproliferation

ABSTRACT

It is of interest that seeds and pericarps of tropical fruits contain phytochemicals being the components of various biological activities for beneficial health effects. This study was aimed to evaluate antioxidant and anticancer activities of the methanolic extracts from seeds and pericarps of three selected tropical fruits including Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.), Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) and Tamarind (*Tamarindus indica* L.) Total phenolic content was determined by using the Folin-Ciocalteu method. Antioxidant capacity was evaluated based on the ability of the fruit extracts to scavenge ABTS and DPPH radicals. MTT reduction assay and Annexin V-FITC/PI staining were carried out for cytotoxicity and apoptosis induction, respectively. Total phenolic contents of the seeds and pericarps of the tropical fruits ranged from 104.60 to 501.95 mg/g DW. All extracts were found to have significant antioxidant activities. Among them, tamarind seed extract contained the highest total phenolic contents and possessed the highest antioxidant capacities. Tamarind seed extract showed the highest cytotoxicity to human mouth carcinoma (CLS-354) cells and had no toxicity to PBMCs. Staining with annexin V-FITC/PI revealed that this apoptosis occurred early in this cell type with 10.0% of the cells undergoing apoptosis. Tamarind seed extract might have potential anticancer activity which could be attributed, in part, to selectively inhibit the growth of CLS-354 cells and induce apoptosis. This research would be the valuable information to identify major constituents of the extracts and mechanisms underlying anticancer activity which could be attributed to dietary health supplements or cancer chemoprevention from fruits.

INTRODUCTION

Oral cancer accounts for 2% to 3% of all cancers. Incidence rates of oral cancer vary internationally worldwide. In developing countries, incidence and mortality had been ranked as ninth and tenth, respectively (Jemal et al. 2011). Epidemiological studies have shown that high incidence rates were documented in Asian regions, including the South and Southeast Asia (Warnakulasuriya 2009). Life style behaviors and socio-cultural habits have been associated with oral precancer and oral cancer (Zain 2001; Petti 2009). The habits of tobacco smoking, betel-quid chewing, and alcohol consumption have been shown as major risk factors of oral cancer (Ko et al. 1995; Petti 2009). Other factors include poor nutritional status, low intake of fruits and vegetables, and drinking beverages at high temperatures (Islami et al., 2009; De Stefani et al., 2005). The exposure to those risk factors induces oxidative stress, a high level of reactive oxygen species (ROS) status, which implicates oral carcinogenesis (Zain 2001; Petti 2009; Ko et al. 1995). ROS such as superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) and peroxy radical ($ROO^{\bullet}$) causes cellular macromolecule damages, including DNA, lipid, and proteins, resulting in mutation, changes in cell physiology, and subsequent cancer formation (Lopaczynski & Zeisel 2001).

It has been documented that plant antioxidants can help scavenging free radicals and oxidants against oxidative stress-related diseases including cancer. Fruits contain a variety of phytochemicals which mainly are polyphenolic compounds, such as flavonoids and phenolic acids (Kähkönen et al. 1999). Many fruit phenolic compounds have been a considerable attention for being the components of antioxidants (Lotito & Frei 2006). Interestingly, antioxidant compounds vary in different parts of fruits such as non-edible (seed and peel) and edible parts and also vary among cultivars and species (Abeyasinghe et al. 2007; Singh et al. 2002; Khanizadeh et al. 2008). Currently, discovery of natural products exerting high antioxidants in order to search a powerful chemotherapeutic agent is rising interested.

Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.), Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.), and Tamarind (*Tamarindus indica* L.) are the tropical fruits that have been widely consumed in Thailand and Asia countries. It is of interest that non-edible parts of these tropical fruits contain antioxidant compounds and possess anticancer activity. Peel extracts of rambutan had been documented to have high antioxidant capacity, antimicrobial activity and cytotoxicity against colon cancer cells (Khonkarn et al. 2010; Thitilertdecha et al. 2008). The peel extract of litchi could inhibit proliferation of hepatocellular carcinoma cells (Wang et al. 2006). Tamarind seed extract contained phenolic substances and possessed antioxidant activity (Sudjaroen et al. 2005). However, there has been no report of anti-oral cancer activity from the seed and pericarp of these tropical fruits. The aim of this study was to investigate antioxidant capacity and anticancer activity of the fruit extracts in human oral cancer cells. Cytotoxicity to normal peripheral blood mononuclear cells was also investigated for screening non-toxic fruit extracts in order to select a potentially chemopreventive agent against oral cancer in the further study.

MATERIALS AND METHODS

CHEMICALS

2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was purchased from Calbiochem (Germany). Folin–Ciocalteu reagent, 2,20-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), sodium carbonate, gallic acid, ascorbic acid, and Trolox were purchased from Sigma–Aldrich (USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from LAB-Scan Corporation Ltd. (Thailand). Ficoll-Hypaque gradient reagent (Lymphoprep) was purchased from Robbins Scientific Corporation (Norway). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Biochrom AG (Germany). 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

(MTT), RPMI 1640, Phosphate buffer saline, trypsin–EDTA, and penicillin–streptomycin were purchased from PAA (Austria).

PREPARATION OF TROPICAL FRUIT EXTRACTS

Three species of tropical fruits including Rambutan (*Nephelium lappaceum* L. cv. Rong Rean), Litchi (*Litchi chinensis* Sonn. cv. Hong Huay), and Tamarind (*Tamarindus indica* L. cv. Thailand Sweet) were collected from local markets in Thailand. Fruit pericarps and seeds were separated and air-dried. Dried materials were blended to power before extraction. Extraction of fruit materials was modified previously (Sudjaroen et al. 2005). Air-dried material (50 g) was extracted with hexane in a soxhlet apparatus (3 h) to remove lipid. After drying, the solid was extracted with methanol (3x3h). Organic solvent was removed by rotary evaporation at 35°C in vacuo. The extracts of methanolic fraction were dissolved in DMSO and kept at -20 °C until use.

MEASUREMENT OF TOTAL PHENOLIC CONTENT

Total phenolic content was measured using Folin-Ciocalteu assay modifying by the method of Singleton VL, 1999 (Singleton et al. 1999). Folin-Ciocalteu reagent (phosphomolybdic phosphotungstic acid reagent) together with fruit extracts (1.0 mg/ml) were added into 96-well plate. The mixture was incubated at room temperature for 6 min. After incubation, 7% sodium carbonate were then added and further incubated at 45 °C for 45 min. The absorbance was taken to 765 nm by using microtiter plate reader. The standard curve was linear between 50-250 mg/L gallic acid. Total phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid equivalent (mg GEA) per 1 g of dried extract.

DPPH RADICAL SCAVENGING ASSAY

The DPPH radical scavenging assay was performed by using DPPH assay kit. The 2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was dissolved in methanol to a final concentration of 0.2 mM. The extract solutions (0.2-0.25 mg/ml) were mixed with 150 µl of DPPH solution in

96-well plate. The mixture was incubated at room temperature for 30 min. Then the absorbance was taken at 515 nm using a microtiter plate reader. The standard curve was linear between 2-10 mg/100 ml ascorbic acid (vitamin C). The percentage of DPPH discoloration was calculated following below equation. DPPH radical scavenging activity was expressed as milligrams of vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) per 1 g of dried extract.

$$\% \text{ radical scavenging activity} = \left(1 - \frac{OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

ABTS CATION RADICAL SCAVENGING ASSAY

2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) solution was prepared following the method of Re R, 1999 (Re et al. 1999). Briefly, the stock solution containing 7.4 mM ABTS and 2.6 mM potassium persulfate was prepared in deionized water and was allowed to stand for 12 h in dark at 4 °C before performing experiment. The working ABTS^{•+} solution was prepared by mixing the stock solution with deionized water until the absorbance was 0.7±0.02 at 734 nm. Fruit extracts (0.1 mg/ml) were mixed with 180 µl of working ABTS^{•+} solution. The mixture was incubated in the dark for 3 min. Then the absorbance was read at 734 nm using a microtiter plate reader. The standard curve was linear using Trolox between 0.5- 5.0 mg/100ml. The percentage of ABTS radical scavenging activity was calculated. The unit of radical scavenging activity was defined as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) per 1 g of dried extract.

CULTURE OF HUMAN MOUTH CARCINOMA CELLS (CLS-354)

CLS-354 cells (Cell Line Service) at passage number 28-33 were cultured in complete media containing RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin and 2 mM stable glutamine for 48 h at 37 °C in humidified 5% CO₂

atmosphere. Cells were then trypsinized and plated at a density of 1.6×10^4 cells/cm² in order to perform cytotoxicity test.

PREPARATION OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS (PBMCs)

EDTA blood was collected from 4 healthy volunteers. All the subjects consented to take part in the study. This project had been reviewed and approved by Committee on Human Rights Related to Researches Involving Human Subjects, Walailak University (No. 52/036). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by using Ficoll-Hypaque gradients technique and cells were suspended in complete media. PBMCs were then seeded at a density of 5.0×10^4 cells/cm² and incubated at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere for cytotoxicity test.

CYTOTOXICITY TEST

CLS-354 cells and PBMCs were treated with crude methanolic extracts at various concentrations. For vehicle control, cells were treated with varied volumes of DMSO. Cells were incubated for 24 h at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere. After treatment, spent medium was removed and replaced with complete RPMI-1640 for overnight. Cell viability was performed by MTT assay based on the conversion of 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan crystals by mitochondrial dehydrogenases from viable cells. Briefly, MTT was dissolved in cultured medium to a final concentration of 0.5 mg/ml. After spent medium was removed, 500 µl of MTT solution was added into each well and incubated at 37°C in CO₂ incubator for 4 h. The solution was removed and 500 µl of DMSO was then added to dissolve the formazan crystals. Absorbance was read at 560 nm with subtraction of background at 670 nm using a microplate reader.

APOPTOSIS ASSAY

Cells at a density of 2.4×10^4 cells/cm² were incubated with Tamarind seed extract at 75 µg/ml for 24 h. All adhering and floating cells were harvested and washed twice with PBS

before transferred to a sterile centrifuge tube. The cell pellet was then suspended in binding buffer at a concentration of 0.5×10^6 cells/ml. A sample of this cell suspension (2×10^5 cells) was transferred to a 5 ml tube, the cells were stained with annexin V-FITC and PI according to the manufacturer's instructions (Roche, Germany). The cells were gently vortexed and incubated for 15 min at room temperature in the dark. Fluorescence intensity was immediately determined by flow cytometry (BD, USA). For each measurement, at least 15,000 cells were counted. The results were analysed using CellQuestPro software.

STATISTICAL ANALYSIS

All measurements were performed in three-independent experiment in triplicate. The results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation. One-Way ANOVA was analyzed by using SPSS version 16.0. Significant differences were considered at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Oral carcinogenesis is associated with oxidative stress, induced by the exposure to risk factors, such as tobacco, smoking, alcohol drinking, and betel-quid chewing (Zain 2001; Ko et al. 1995; Petti 2009). The increasing risk of oral cancer has been related to low intake of fresh fruits and vegetables (De Stefani et al. 2005; Cartmel 2005). Consumption of fruits and vegetables has been possessed reduction in the risk of developing a variety of cancers (Surh 2003; Kris-Etherton et al. 2002). Currently, it is of interest that a number of non-edible parts of fruits contain antioxidant compounds that possess anticancer activity (Kaˆhkoˆnen et al. 1999; Akhtar et al. 2009; Xiao et al. 2009).

In this study, methanolic extracts from seeds and pericarps of three selected tropical fruits including Rambutan, Litchi, and Tamarind were subjected for their antioxidant and anticancer properties. The percent yield of methanolic extracts from Tamarind, Litchi and Rambutan were shown in **Table 1**. The highest yield (12.93 %) was obtained from Tamarind seeds, while the lowest yield (5.47 %) was obtained from Rambutan pericarps.

Table 1

Phenolic compounds were purposed to be major constituents of fruit extracts. Tamarind seed extract contained the highest levels of total phenolic content (501.95 ± 3.40 mg GAE/g) (**Table 2**) using Folin-Ciocalteu assay. Rambutan pericarp extract showed the lowest levels in phenolic content (104.60 ± 0.87 mg GAE/g), while others showed moderate levels of total phenolic content.

Methanolic fruit extracts potentially possessed free radical scavenging activity, which was an important mechanism of antioxidants. As compared among each other, Tamarind seed extract contained the highest antioxidant activity, which was determined by ABTS assay (1105.49 ± 17.45 mg TEAC/g) and DPPH assay (535.85 ± 5.88 mg VCEAC/g) as shown in **Table 2**. Rambutan pericarp extract showed the lowest antioxidant activity (167.17 ± 6.86 mg TEAC /g and 334.77 ± 1.51 mg VCEAC /g). In this present study, it was found that the amount of total phenolic content was consistent with yield of extract and antioxidant activities. This result indicated here that phenolic compounds may play an important role in antioxidant capacity of the extracts.

Table 2

The effects of methanolic extracts from fruit seeds and peels on the growth of CLS-354 and PBMCs were examined by MTT assay. The percent viability of CLS-354 cells exposed to the extracts was decreased in a dose-dependent manner (**Figure 1**). The Tamarind seed extract had the highest cytotoxicity against CLS-354 cells with the lowest IC_{50} value of $100 \mu\text{g/ml}$, followed by Litchi seed extract ($135 \mu\text{g/ml}$) (**Table 3**). The extracts from seeds of Tamarind and Litchi showed lower IC_{50} values than 5-FU (**Table 3**) indicating a potential cytotoxicity. Rambutan pericarp, Rambutan seed, and Litchi seed showed weak cytotoxicity

against CLS-354 cells. Moreover, the effects of the extracts on the growth of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were investigated. The results showed that PBMCs were not significantly decreased upon the exposure to the extracts from Tamarind seed, Litchi pericarp, and Litchi seed ($p < 0.05$), whereas the extracts of Rambutan seed and pericarp significantly reduced PBMCs viability ($p < 0.05$) (**Figure 1**). It was indicated that the extracts of Rambutan had toxicity to PBMCs. Among the extracts tested, Tamarind and Litchi seed extracts appeared to be selectively cytotoxic to oral cancer cells.

Figure 1 and Table 3

Cells in early and late apoptosis have been extensively distinguished by using the combination of annexin V-FITC with propidium iodide. During early apoptosis, phosphatidylserine, which is usually located in the inner membrane of cells, is transported into the outer portion of the membrane, and this can be detected by its strong affinity for annexin V-FITC, a phospholipid binding protein. While, the dead cells can be detected by the binding of propidium iodide to the cellular DNA in cells where the cell membrane has been damaged. Viable cells were negative for both annexin V and PI (lower left quadrant); early apoptotic cells were positive for annexin V and negative for PI (lower right quadrant); late apoptotic displayed positive annexin V and PI (upper right quadrant); necrotic cells were negative for annexin V and positive for PI (upper left quadrant). Treatment with Tamarind seed extract at 75 $\mu\text{g/ml}$ obviously increased the proportion of cells in early apoptosis with values of 11% compared to camptothecin, pro-apoptotic drug with values of 12% (**Figure 2**). The total apoptosis was increased up to 43% and 54% in Tamarind seed extract and camptothecin treatments, respectively. No significant apoptosis was demonstrated in Tamarind treated cells with IC_{50} values of 50 $\mu\text{g/ml}$ (data not shown). This result suggested that the cytotoxic effect of Tamarind seed extract was mediated by the induction of apoptosis.

Figure 2

Polyphenolic compounds are the major bioactive components responsible for antioxidation and antiproliferation. Natural antioxidants have been proved to inhibit tumor growth selectively, because of different redox status between normal cells and cancer cells (Nair et al. 2007). Methanolic extract of Tamarind seed contained many flavonoids such as (+) -catechin, procyanidin B2, epicatechin, and polymeric procyanidins (Sudjaroen et al. 2005). These compounds have been demonstrated to inhibit cell growth of many cancer types (Miura et al. 2008; Al-Hazzani & Alshatwi 2011; Wang et al. 2008) and mediate apoptosis induction (Miura et al. 2008; Al-Hazzani & Alshatwi 2011). The changes in cellular redox status has been shown to influence cancer growth through activation of signaling pathways leading to proliferation or apoptosis (Owuor & Kong 2002; Jiang et al. 2011). These polyphenolic compounds may play a role in modulating cellular redox state via regulating signaling pathway mediated apoptotic induction. The major components of Litchi pericarp extract were condensed tannins, epicatechin, and procyanidin A2, that possessed anticancer activity on human breast cancer and hepatocellular carcinoma (Wang et al. 2006a, b). Ethanolic extract from Rambutan peel possessed free-radical scavenging power and exhibited non-toxic activity to both PBMCs and Caco-2 cells (Okonogi et al. 2007). Ethyl acetate fraction from Rambutan peel crude extract contained the highest levels of phenolic content (2.28 ± 0.02 GAE mg/ml) among other fractions and possessed antiproliferative property in KB and CaCo-2 cells with non-toxicity to PBMCs (Khonkarn et al. 2010). However, antioxidants and cytotoxic activities in different fruit extract materials were varied among cultivars (Rupasinghe & Clegg 2007), species (Abeysinghe et al. 2007), and extraction methods (Sun et al. 2002).

CONCLUSION

In conclusion, Tamarind seed extract contained the highest levels of total phenolic content and possessed the highest potential antioxidant capacity, but low levels obtained from the extracts from Rambutan seed and pericarp. The amount of total phenolic content in investigated fruit extracts was related to their antioxidant capacity and cytotoxicity to oral cancer cells. The extracts of Tamarind and Litchi seed could inhibit CLS-354 cell growth with low IC_{50} values and had less toxicity to normal PBMCs. Moreover, cytotoxic effect of Tamarind seed extract was mediated by the induction of cells in early and late apoptosis. The materials of these fruits will be potential source of antioxidant and chemopreventive agents. However, compound identification and mechanism(s) underlying antiproliferation have to be elucidated by our further investigation.

ACKNOWLEDGEMENT

The author gratefully acknowledges Prof. Dr. Voranunt Suphiphat, School of Medicine, Walailak University and Assoc. Prof. Dr. Walee Chamulitrat, University of Heidelberg Hospital, Heidelberg, Germany in their help in various aspects of this research.

DECLARATION OF INTEREST

This research was granted by Thailand Research Fund/ Office of the Higher Education Commission/ Walailak University (No. MRG5380076).

REFERENCES

- Abeyasinghe, D., Li, X., Sun, C., Zhang, W., Zhou, C. & Chen, K. 2007. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chem.* 104: 1338-1344.
- Akhtar, S., Meeran, S.M., Katiyar, N. & Katiyar, S.K. 2009. Grape Seed Proanthocyanidins Inhibit the Growth of Human Non-Small Cell Lung Cancer Xenografts by Targeting

- Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3, Tumor Cell Proliferation, and Angiogenic Factors. *Clin. Cancer Res.* 15: 821-831.
- Al-Hazzani, A.A. & Alshatwi, A.A. 2011. Catechin hydrate inhibits proliferation and mediates apoptosis of SiHa human cervical cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 49: 3281-3286.
- Cartmel, B. 2005. A Randomized Trial of an Intervention to Increase Fruit and Vegetable Intake in Curatively Treated Patients with Early-Stage Head and Neck Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 2848-2854.
- De Stefani, E., Boffetta, P., Ronco, A.L., Correa, P., Oreggia, F., Deneo-Pellegrini, H., Mendilaharsu, M. & Leiva, J. 2005. Dietary Patterns and Risk of Cancer of the Oral Cavity and Pharynx in Uruguay. *Nutr. Cancer.* 51: 132-139.
- Islami, F., Boffetta, P., Ren, J.S., Pedoeim, L., Khatib, D. & Kamangar, F. 2009. High-temperature beverages and foods and esophageal cancer risk-A systematic review. *Int. J. Cancer.* 125: 491-524.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D. 2011. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61: 69-90.
- Jiang, Z., Fletcher, N.M., Ali-Fehmi, R., Diamond, M. P., Abu-Soud, H.M., Munkarah, A.R. & Saed, G.M. 2011. Modulation of redox signaling promotes apoptosis in epithelial ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 122: 418-423.
- Kaˆhkoˆnen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. & Heinonen M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3954-3962.
- Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M.T. & Vasantha Rupasinghe, H.P. 2008. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *J. Food Compost. Anal.* 21: 396-401.
- Khonkarn, R., Okonogi, S., Ampasavate, C. & Anuchapreeda, S. 2010. Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines. *Food Chem. Toxicol.* 48: 2122-2129.
- Ko, Y.C., Huang, Y.L., Lee, C.H., Chen, M.J., Lin, L.M. & Tsai, C.C. 1995. Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J. Oral Pathol. Med.* 24: 450-453.

- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E. & Etherton, T.D. 2002. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *Am. J. Med.* 113: 71-88.
- Lopaczynski, W. & Zeisel, S.H. 2001. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutr. Res.* 21: 295-307.
- Lotito, S.B. & Frei, B. 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?'. *Free Radic. Biol. Med.* 41: 1727-1746.
- Miura, T., Chiba, M., Kasai, K., Nozaka, H., Nakamura, T., Shoji, T., Kanda, T., Ohtake, Y. & Sato, T. 2008. Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3. *Carcinogenesis*. 29: 585-593.
- Nair, S., Li, W. & Kong, A.T. 2007. Natural dietary anti-cancer chemopreventive compounds: redox-mediated differential signaling mechanisms in cytoprotection of normal cells versus cytotoxicity in tumor cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 28: 459-472.
- Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S. & Chowwanapoonpohn, S. 2007. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chem.* 103: 839-846.
- Owuor, E.D. & Kong, A.T. 2002. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 62: 765-770.
- Petti, S. 2009. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol.* 45: 340-350.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- Rupasinghe Vasantha H.P. & Clegg, S. 2007. Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *J. Food Compos. Anal.* 20: 133-137.
- Singh, R.P., Murthy C, K.N. & Jayaprakasha, G.K. 2002. Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. *J. Agric. Food Chem.* 50: 81-86.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.* 299; 152-178.

- Sudjaroen, Y., Haubner, R., Wurtele, G., Hull, W.E., Erben, G., Spiegelhalter, B., Changbumrung, S., Bartsch, H. & Owen, R.W. 2005. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food Chem. Toxicol.* 43: 1673–1682.
- Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X. & Liu, R.H. 2002. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7449-7454.
- Surh, Y.J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer.* 3: 768-780.
- Thitilertdecha, N., Teerawutgulrag, A. & Rakariyatham, N. 2008. Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. *LWT-Food Sci. Technol.* 41: 2029-2035.
- Wang, X., Wei, Y., Yuan, S., Liu, G., Zhang, Y.L.J. & Wang, W. 2006a. Potential anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 239: 144-150.
- Wang, X., Yuan, S., Wang, J., Lin, P., Liu, G., Lu, Y., Zhang, J., Wang, W. & Wei, Y. 2006b. Anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against human breast cancer in vitro and in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 215: 168-178.
- Wang, Y., Zhang, H., Holmgren, A., Tian, W. & Zhong, L. 2008. Inhibitory effect of green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate on mammalian thioredoxin reductase and HeLa cell viability. *Oncol. Rep.* 20: 1479-1487.
- Warnakulasuriya, S. 2009. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 45: 309-316.
- Xiao, H., Yang, C.S., Li, S., Jin, H., Ho, C.T. & Patel, T. 2009. Monodemethylated polymethoxyflavones from sweet orange (*Citrus sinensis*) peel inhibit growth of human lung cancer cells by apoptosis. *Mol. Nutr. Food Res.* 53: 398 – 406.
- Zain, R.B. 2001. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer - a brief overview. *Oral Oncol.* 37: 205-210.



มหาวิทยาลัยทักษิณ

ขอมอบเกียรติบัตรฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

อาจารย์ ดร.วรางคณา จุ่งลก

ผลงานเรื่อง

ฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่

ได้รับรางวัล ดีเด่น การนำเสนอผลงานวิจัยภาคโปสเตอร์ ด้านวิทยาศาสตร์

ในการประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ ๒๐ ประจำปี ๒๕๕๓

ให้ไว้ ณ วันที่ ๑๗ กันยายน ๒๕๕๓

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ สายธนู)

อธิการบดีมหาวิทยาลัยทักษิณ

Cytotoxicity and Apoptotic Induction Property of Tamarind Seed Extract in Human Oral Cancer Cell Line

Nantawan Utaipan¹, Mayura Somchit¹, Monthon Lertcanawanichakul¹, Yuttana Sudjaroen², Warangkana Chunglok^{1*}

¹ School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Nakhonsithammarat 80160

² Faculty of Science and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University, Bangkok 10300

*E-mail address: cwarang@wu.ac.th

ABSTRACT

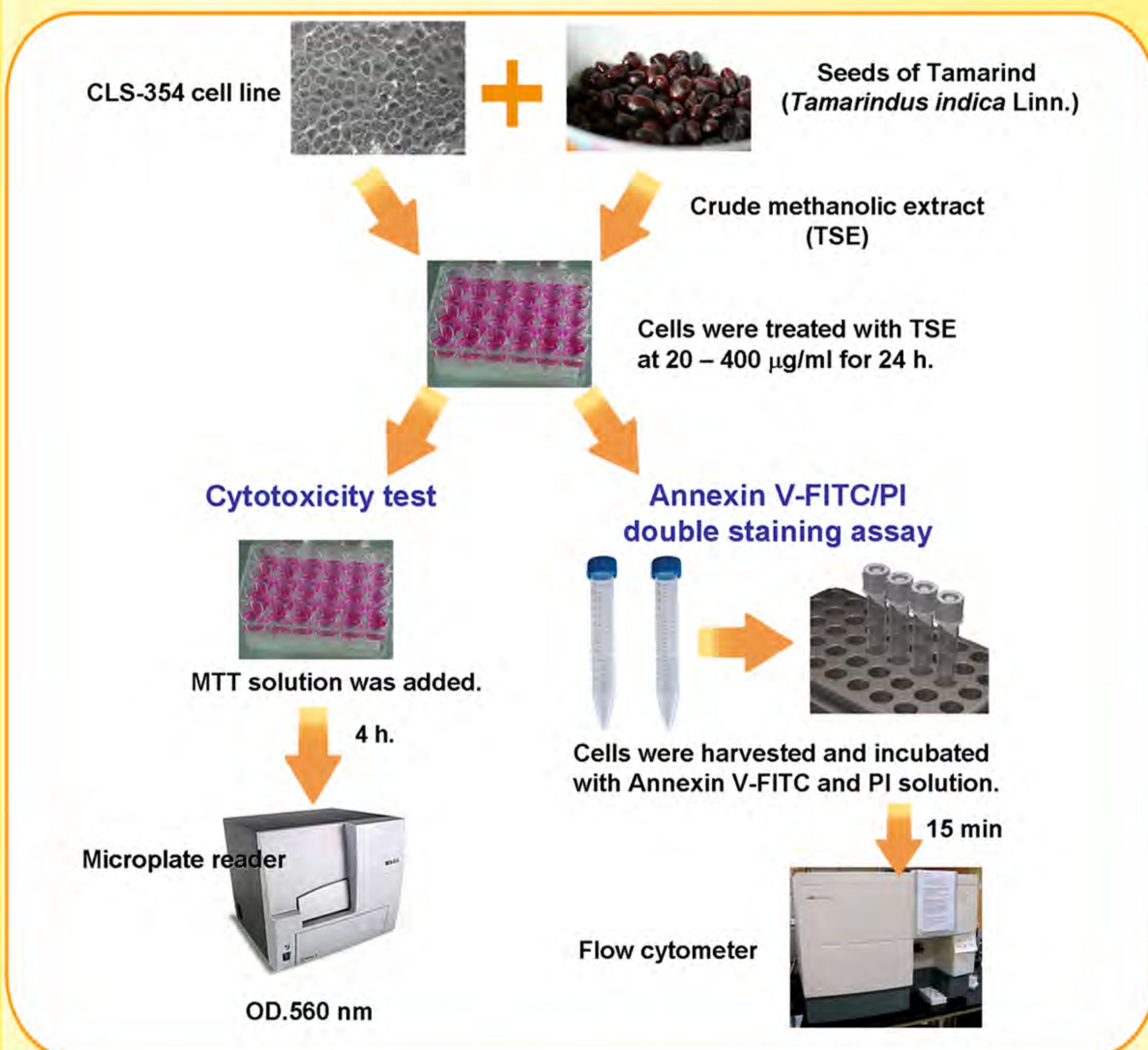
It has become evident that methanolic extract of Tamarind seed contains high contents of antioxidant phytochemicals. The present study was conducted to investigate the anticancer activity of Tamarind seed extract in human oral cancer cell line CLS-354. Cells were treated with crude methanolic extract of Tamarind Seed (TSE) for 24 h. Cytotoxicity and apoptosis induction were investigated by MTT and AnnexinV-FITC/PI double staining assay, respectively. The results showed that cell viability was significantly decreased upon TSE treatment at concentrations ranged from 160 - 400 $\mu\text{g/ml}$ in comparison with control without TSE treatment ($p < 0.05$). TSE caused toxicity in CLS-354 cells with IC_{50} value of 400 $\mu\text{g/ml}$. Staining with AnnexinV-FITC and propidium iodide could induce apoptosis by 10% at a dose of 75 $\mu\text{g/ml}$. Apoptotic cell death may due to alteration of apoptotic related proteins modulating by flavonoids in TSE. Thus, anticancer activity of Tamarind seed extract may provide a new therapeutic agent for oral cancer treatment in the future.

INTRODUCTION

Tamarind is an important food resource and traditional medicinal plant for Thai population. Methanolic extract of Tamarind seed had been documented to have high content of flavonoids and possess antioxidant activity¹. Antioxidant activity of flavonoids was correlated with anti-cancer, thus leading to apoptosis induction of cancer cells². Although Tamarind seeds contain antioxidant substances, there has been no report of anticancer activity. The aim of this study purposes to investigate methanolic extract of Tamarind seed on oral cancer cell cytotoxicity and apoptotic induction.

Key word: Tamarind seed extract, oral cancer, cytotoxicity, apoptosis

MATERIALS AND METHODS



DISCUSSION AND CONCLUSION

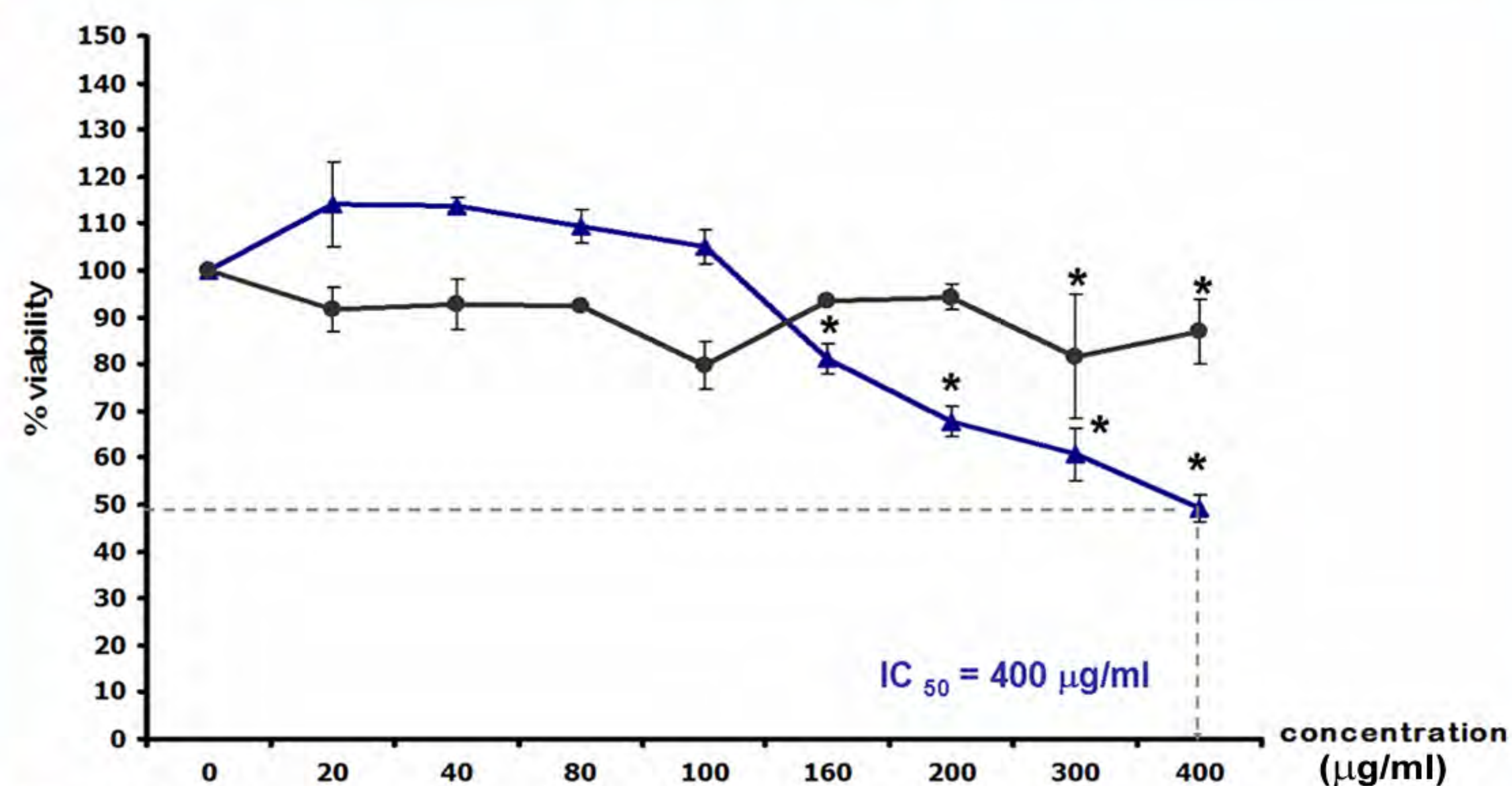
Tamarind seed extract contained high levels of flavonoids including procyanidin tetramer, procyanidin hexamer, procyanidin trimer, procyanidin pentamer, procyanidin B2 and epicatechin¹. Many of these compounds had been shown to inhibit growth of various cancer cell lines via apoptotic induction^{2, 3}. Apoptotic induction of cancer cells upon flavonoid treatment may due to the alteration of intracellular apoptotic related proteins such as downregulation of Bcl-2 and upregulation of caspase enzymes. In conclusion, the treatment of oral cancer cells by TSE resulted in oral cancer cell death via apoptotic induction. Thus, anticancer activities of Tamarind seed extract may provide a new therapeutic agent for oral cancer treatment in the future.

REFERENCES

1. Sudjaroen Y, et al. *Food and Chemical Toxicology*. 2005 ,43,1673–1682.
2. Tyagi A, et al. *Oncogene*. 2003,22(9),1302-1316.
3. Miura T, et al. *Carcinogenesis*. 2008, 29 (3),585-593.

RESULTS

Upon TSE treatment for 24 h, cell viability was significantly decreased at concentrations ranged from 160 – 400 $\mu\text{g/ml}$. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of the TSE was 400 $\mu\text{g/ml}$. DMSO vehicle control minimally affected viability of cells (Figure 1).



* $p < 0.05$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$

Figure 1 Cell viability of CLS-354 cells upon TSE treatment (▲) and DMSO (●) for 24 h.

TSE treatment for 24 h could induce apoptosis in CLS-354 cells by AnnexinV-FITC/PI staining assay. Early apoptotic cells were increased by 10% at a concentration of 75 $\mu\text{g/ml}$ compared with untreated cells (Figure 2).

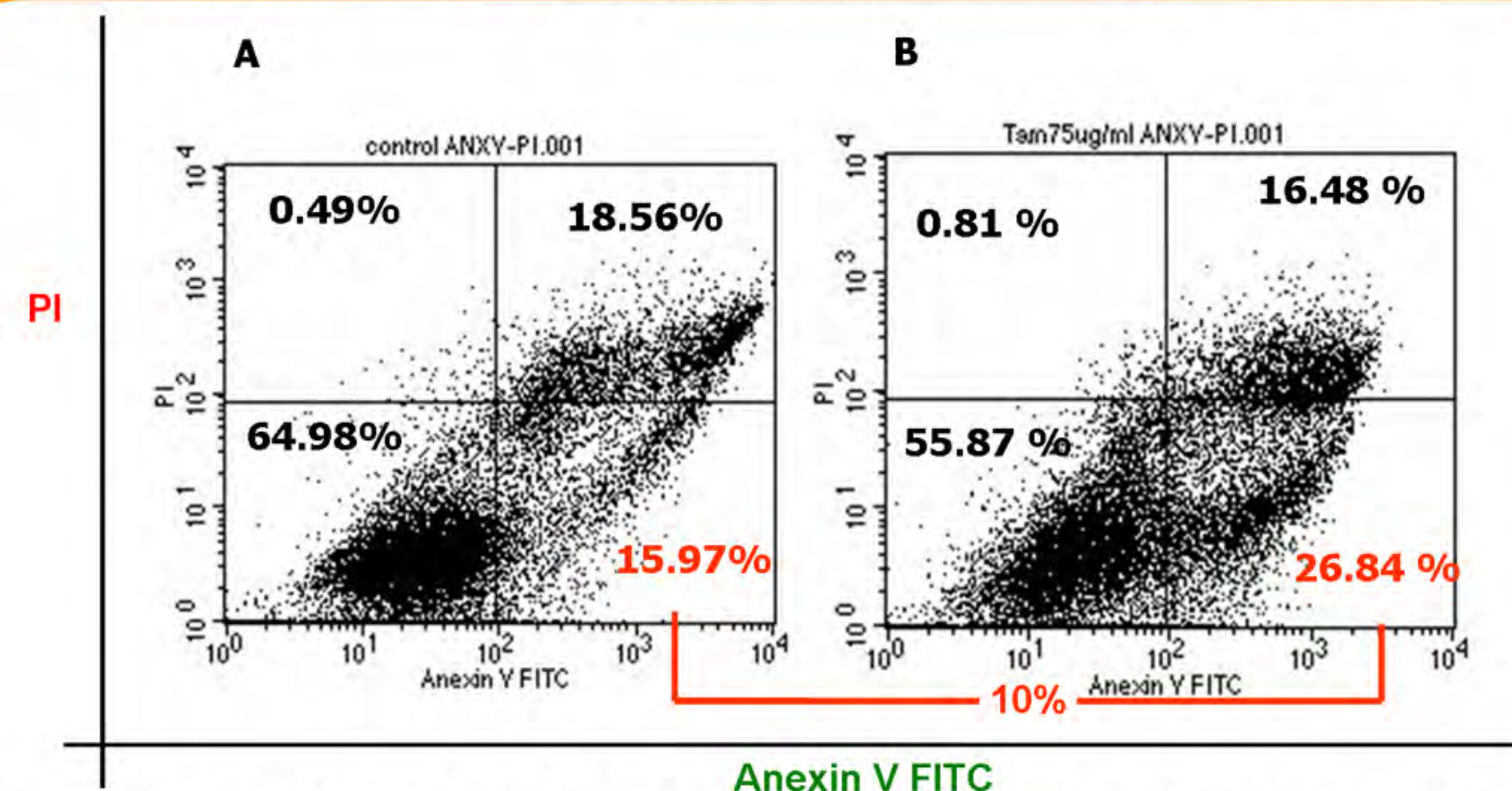


Figure 2 Apoptosis of CLS-354 cells by annexinV-FITC/PI double staining assay (A) untreated control cells and (B) TSE treated cells.

ฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ [preliminary study]

Anticancer Activity of Litchi Seed Extract against Human Mouth Carcinoma Cell Line

ยุทธนา สูดเจริญ¹ มณฑล เลิศคนาวนิชกุล² และ วรางคณา จุ่งลก^{2*}

Yuttana Sudjaroen¹ Monthon Lertcanawanichakul² and Warangkana Chunglok^{2*}

บทคัดย่อ

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผักและ ผลไม้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถป้องกันและรักษา โรคมะเร็งบางชนิดได้ การศึกษาครั้งนี้ จึงเป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดลิ้นจี่ และ ความเป็นพิษของสารสกัดดังกล่าวต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ โดยการศึกษาร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT จากการศึกษพบว่าสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 135.0 µg/ml ($IC_{50} = 135.0 \text{ µg/ml}$) และในช่วงความเข้มข้น 35.0-175.0 µg/ml พบว่าทำให้เซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติพบว่า สารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูงสุดเท่านั้นที่ใช้ทดสอบคือ 175.0 µg/ml ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก และมีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติเพียงเล็กน้อย งานวิจัยครั้งนี้เป็นการคัดกรองฤทธิ์ต้านมะเร็งเบื้องต้นของสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่เพื่อที่จะนำไปสู่การค้นพบสารต้นแบบที่สำคัญสำหรับรักษาโรคมะเร็งช่องปากได้ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : สารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ ฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปาก

¹ อาจารย์ ดร. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา กรุงเทพฯ 10300

Dr., Faculty of Science and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University, Bangkok 10300

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จ. นครศรีธรรมราช 80160

Assistant Professor Dr., School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80160

² อาจารย์ ดร., สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จ. นครศรีธรรมราช 80160

Dr., School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80160

* Corresponding author : โทรศัพท์ 075 672197 โทรสาร 075 672106 E-mail: cwarang@wu.ac.th

Abstract

Fruits and vegetables are major sources of antioxidants that have been documented for the treatment and prevention of some cancers. The aim of this study was to determine anticancer activity against human mouth carcinoma cell line and cytotoxicity against normal lymphocytes of litchi seed extract. Percentage of cell viability was determined by MTT assay. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of the litchi seed extract was 135.0 $\mu\text{g/ml}$. Cell viability was decreased significantly at a concentration range of 35.0-175.0 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$). The extract from litchi seed did not significantly decrease the viability of normal lymphocytes except the highest concentration at 175.0 $\mu\text{g/ml}$. This indicated that methanolic seed extract of litchi specifically inhibited cancer cells and caused minimal effects on normal lymphocytes. Thus, anticancer activity of the extract would be the preliminary information for the development of these recipes to anti-oral cancer modern medicines.

Keywords : Litchi seed extract Anti-oral cancer activity

คำนำ

ในปัจจุบันนี้โรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของทั่วโลก ซึ่ง รวมถึงประเทศไทยที่พบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่ง จากข้อมูลสถานการณ์โรคมะเร็งที่พบบ่อยในประเทศไทยเป็นลำดับต้นๆ คือ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งเต้านม (Deerasamee *et al.*, 1999) ส่วนมะเร็งช่องปากเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์น้อย อย่างไรก็ตามก็พบมากในภาคใต้โดยเฉพาะจังหวัดสงขลา (Thongsuksai, 1997) โดยทั่วไปแล้วการรักษาโรคมะเร็งนั้นจะใช้วิธีผสมผสานโดยการศัลยกรรม รังสีรักษา และเคมีบำบัด แต่เนื่องจากการรักษาด้วยวิธีเหล่านี้มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย จึงได้มีการศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อนำมาทดแทนการใช้สารเคมีต่างๆ ข้อมูลรายงานการวิจัยที่ผ่านมาสนับสนุนว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยป้องกันและรักษาโรคมะเร็งได้ สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถพบได้ในอาหาร โดยเฉพาะในผักและผลไม้ สารต้านอนุมูลอิสระถูกพบว่ามีความสัมพันธ์ในการช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งได้หลายชนิด โดยมีกลไกที่แตกต่างกันไป เช่น ยับยั้งการเกิดสารก่อมะเร็ง ป้องกันสิ่งต่างๆ ที่ส่งเสริมให้เกิดมะเร็ง ลดอัตราการกลายพันธุ์ของเซลล์และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Aggarwal, 2006) อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามียานวิจัยเพียงส่วนน้อยที่รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ด้านมะเร็งช่องปากของผลไม้ที่พบได้ในท้องถิ่นของประเทศไทย

ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) เป็นไม้ผลกิ่งเมืองร้อนประเภทผลเดี่ยวมีผลรูปปร่างกลมรี ผิวผลขรุขระ ลักษณะเปลือกสีแดง เป็นผลไม้ที่มีรสชาติดอห้อย หวาน หอม สีสวย จึงทำให้เป็นที่ต้องการทั้งภายในและต่างประเทศ นอกจากจะใช้รับประทานสดแล้ว ยังสามารถแปรรูปเป็นลิ้นจี่บรรจุกระป๋องจึงถือว่าเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ลิ้นจี่เป็นผลไม้ที่อุดมไปด้วยสารอาหารและสรรพคุณด้านสมุนไพรต่างๆ มากมายเช่นสรรพคุณเป็นยาช่วยย่อยอาหาร บำรุงอวัยวะภายในต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นม้าม หรือระบบประสาท นอกจากนี้ ลิ้นจี่ยังช่วยในการบรรเทาอาการกระหายน้ำได้ และหากนำเนื้อลิ้นจี่ตากแห้งมาดื่มกินเป็นประจำ ก็จะช่วยบรรเทาอาการปวดอันเนื่องมาจากโรคไตเสื่อม และยังช่วย

รักษาโรคโลหิตจางได้อีกด้วย (กองสุขาภิบาลอาหาร กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2551) นอกจากนั้นรายงานการวิจัยที่ผ่านมายังพบว่าสารสกัดจากเปลือกลิ้นจี่มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (Zhao, 2006; Wang *et al.*, 2006) และเซลล์มะเร็งตับ (Wang, 2006) อย่างไรก็ตามพบว่าในส่วนของเมล็ดลิ้นจี่นั้นยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน จากคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากลิ้นจี่ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ด้านมะเร็งมะเร็งช่องปากของสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ การวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นการคัดกรองฤทธิ์ด้านมะเร็งเบื้องต้นของสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่เพื่อนำผลการทดสอบที่ได้ไปใช้พัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งและไม่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติได้ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ Human mouth carcinoma (CLS-354 cells)

เลี้ยงเซลล์ CLS-354 (Cell Line Service, Germany) (passage 24) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (PAA, Austria) ซึ่งมีองค์ประกอบต่างๆ ครอบคลุมคือ 10% fetal bovine serum (Biocrom AG, Germany) และ 1% penicillin/streptomycin (PAA, Austria) และ 2 mM glutamine (PAA, Austria) ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95 % โดยมีจำนวนเซลล์ 1 x 10⁶ เซลล์ใน flask ซึ่งมีพื้นที่ 75 ตารางเซนติเมตร เลี้ยงไว้เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมงก่อนที่จะทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากผลไม้และสมุนไพรต่อเซลล์

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (normal lymphocytes)

คัดเลือกอาสาสมัครผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงดีจำนวน 4 คน ที่ประสงค์ยินยอมเข้าร่วมวิจัย (โครงการนี้ได้ผ่านการพิจารณาเห็นชอบ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เลขที่ 52/036) หลังจากนั้นจะเลือดอาสาสมัครใส่หลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) แล้วนำเลือดดังกล่าวมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มีองค์ประกอบต่างๆ ครอบคลุมในสัดส่วน 1:2 หลังจากนั้นค่อยๆ เติมน้ำที่เจือจางไว้ลงไป ในหลอดที่มีน้ำยา IsoPrep (Robbins Scientific Corporation, USA) อย่างช้าๆ หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ 3000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาแยก peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ซึ่งอยู่ระหว่างชั้น (interphase) ออกมาใส่หลอดใหม่และล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์อีก 2 ครั้ง แล้วจึงนำเซลล์มาแบ่งให้เท่ากัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มีองค์ประกอบต่างๆ ครอบคลุม หลังจากนั้นนำเซลล์มาบ่มเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95 %

ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากและความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่

นำสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ที่สกัดด้วยเมทานอลโดยวิธีการสกัดสารแบบต่อเนื่อง (continuous extraction) และตามด้วยการทำสารสกัดให้เข้มข้นโดยวิธีการกลั่นในภาวะสุญญากาศ (distillation in vacuum) มาเจือจางแล้วนำแต่ละการเจือจางมาทดสอบกับเซลล์มะเร็ง ช่องปากและเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่มีจำนวนเซลล์ 3 x 10⁴ และ 1 x 10⁵ เซลล์ตามลำดับ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม (24-well plate) โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมคือเซลล์ที่เติม dimethyl sulfoxide (DMSO) ซึ่งใช้เป็นตัวแทนทำละลายของสารสกัด แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5%

และ ความชื้น 95 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay.

ขั้นตอนการศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay

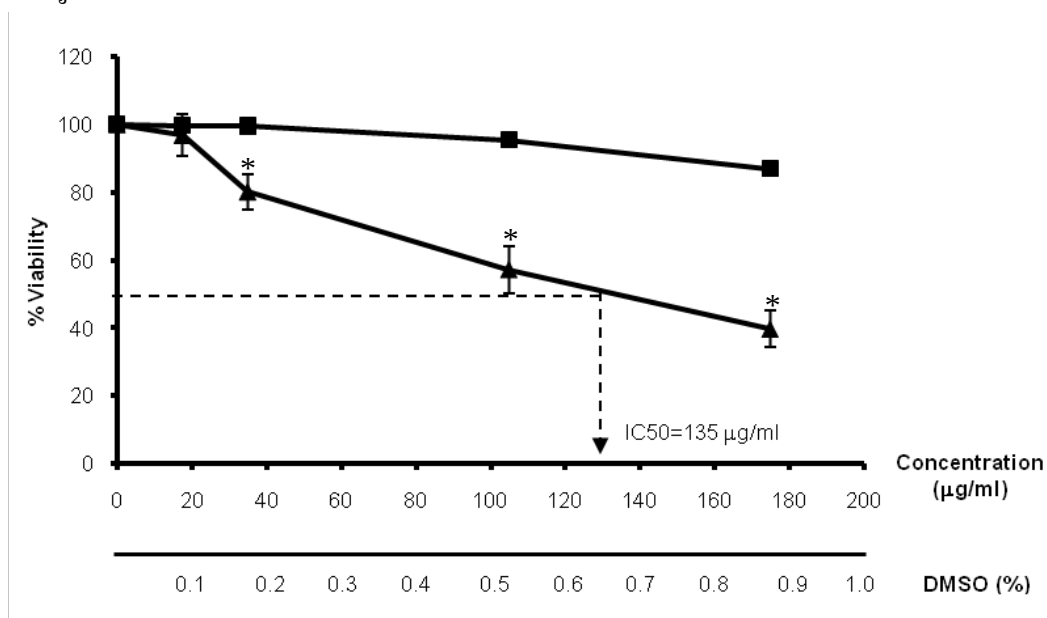
เมื่อ ครบเวลา 24 ชั่วโมงของการบ่มสารสกัดจาก เมล็ดลิ้นจี่กับ เซลล์มะเร็ง ช่องปากหรือ เซลล์เม็ดเลือดขาว นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติม 0.5 ml ของ 0.5 mg/ml MTT ที่ผสมกับอาหารลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95 % เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อที่จะให้ MTT ถูกเมทาบอลไลท์ เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MTT ออก แล้วคว่ำ plate ลงบนกระดาษซับเพื่อเอาอาหารที่เหลือออก แล้วเติม DMSO ลงไปเพื่อไปละลาย formazan (MTT metabolic product) ออกมาหลังจากนั้นผสม formazan ที่ออกมา กับ DMSO ให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm โดยทำการทดสอบซ้ำอีก 3 ครั้งแต่ละครั้งทำการทำสอบซ้ำอีก 3 การทดสอบย่อย

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปากของสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ในช่วงความเข้มข้น 17.5-175 µg/ml พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 135.0 µg/ml (IC₅₀=135.0 µg/ml) และในช่วงความเข้มข้น 35-175 µg/ml พบว่าทำให้เซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 1) ส่วนตัวทำละลาย DMSO ที่ใช้ทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.1-1.0 % พบว่าไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก จากผลการศึกษารั้งนี้เป็นการศึกษาแรกที่พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดลิ้นจี่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าเปลือกของสารสกัดจากลิ้นจี่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (Zhao, 2006; Wang *et al.*, 2006) และเซลล์มะเร็งตับ (Wang, 2006) โดยสารสกัดเอทานอลจากเปลือกลิ้นจี่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 80.0 µg/ml (Wang, 2006) สารสกัดจากเปลือกลิ้นจี่ประกอบไปด้วยสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมคือ epicatechin และ procyanidin B2 โดยสารทั้งสองสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 102 µg/ml และ 99 µg/ml ตามลำดับ (Zhao, 2006) ส่วนกลไกการทำลายเซลล์มะเร็งเกิดจากการทำลาย DNA การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (Wang, 2006) นอกจากนั้นรายงานการวิจัยที่ผ่านมาซึ่งพบอีกว่าสารสกัดจากเปลือกลิ้นจี่สามารถยับยั้งก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลองได้อีกด้วย (Wang *et al.*, 2006)

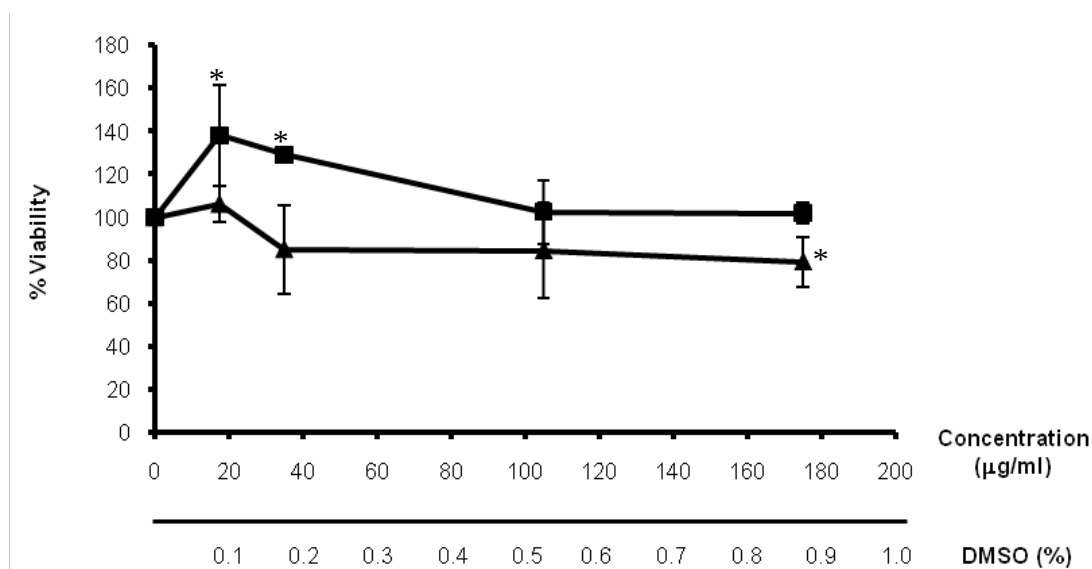
สารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 17.5-105.0 µg/ml ไม่ได้ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือ 175.0 µg/ml ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 2) ส่วนตัวทำละลาย DMSO ในช่วงความเข้มข้น 0.1-1.0 % พบว่าไม่มีผลต่อจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ ผลการศึกษารั้งนี้แตกต่างจากงานวิจัยหนึ่งที่พบว่าสารสกัดที่ได้จากเปลือกลิ้นจี่ช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกัน โดยสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ ที่ความเข้มข้น 12.5 µg/ml (Zhao, 2006) ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างกันขององค์ประกอบจากเปลือกและเมล็ด ระยะเวลา ความเข้มข้นของสารสกัด ชนิดของเซลล์และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติในครั้งนี้เป็นข้อมูลที่

สำคัญในการศึกษาถึงความปลอดภัยที่จะนำสารสกัดดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้ต่อไปในอนาคต



* $p < 0.05$ vs. 0 µg/ml

ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งช่องปากที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ (▲) และที่ทดสอบด้วยตัวทำละลาย DMSO (■)



* $p < 0.05$ vs. 0 µg/ml

ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ (▲) และที่ทดสอบด้วยตัวทำละลาย DMSO (■)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก และความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ด้วยเมทานอล โดยศึกษาร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT จากการศึกษาพบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปากโดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 135.0 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50} =135.0 $\mu\text{g/ml}$) และมีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติเพียงเล็กน้อย การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากเมล็ดลิ้นจี่ในครั้งนี้เป็นการนำผลไม้ที่พบในประเทศไทยมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์โดยอาจนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาเป็นสารต้นแบบเพื่อรักษาโรคมะเร็งช่องปากได้ต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์และทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่จากสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษากับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สัญญาเลขที่ MRG5380076)

เอกสารอ้างอิง

- Deerasamee, S., Martin, N., Sontipong, S., Sriamporn, S., Sriplung, S., Srivatanakul, P., *et al.* (1999). Cancer in Thailand Vol. II, 1992-1994., In **IARC Technical report no. 34**. Lyon.
- Thongsuksai, P., Sriplung, H., Phunggrassami, T., Prechavittayakul P. (1997). Cancer incidence in Songkhla, southern Thailand, 1990-1994, **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. 28, 1-10.
- Aggarwal, B. B., Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer, **Biochem Pharmacol**. 71, 1397-421.
- กองสุขาภิบาลอาหาร กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. (2551). **ผลไม้ไทยได้ประโยชน์**. สืบค้นเมื่อวันที่ 4 ตุลาคม 2552, จาก <http://www.apichoke.com/index.php?topic=757.0>.
- Zhao, M., Yang, B., Wang, J., Liu, Y., Yu, L., Jiang, Y. (2006). Immunomodulatory and anticancer activities of flavonoids extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn) pericarp, **Int Immunopharmacol**. 7, 162-6.
- Wang, X., Yuan, S., Wang, J., Lin, P., Liu, G., Lu, Y., *et al.* (2006). Anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against human breast cancer in vitro and in vivo, **Toxicol Appl Pharmacol**. 215, 168-78.
- Wang, X., Wei, Y., Yuan, S., Liu, G., Zhang, Y. L., Wang, W. (2006). Potential anticancer activity of lichi fruit pericarp extract against hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **Cancer Lett** . 239, 144-150.