



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การตายของเซลล์มะเร็งแบบอะโพโทซิสโดยสารสกัด
ผักบุงทะเลที่สกัดโดยวิธีที่แตกต่างกัน

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาอังกฤษ) Apoptosis induction of human cancer cells by
beach morning glory (*Ipomoea pes-caprae*) with different extraction methods

หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.จันทวรรณ แสงแข

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ร่วมโครงการวิจัย ภาณุ.นภาพรณ เอื้อวงศ์ญาติ

รองศาสตราจารย์ ดร. ภาณุ. สุนันทา โอศิริ

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุน
จากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ 2557



รหัสโครงการเลขที่ 2557A10802134

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอโทซิสโดยสารสกัด
ผักบ่งทะเลที่สกัดโดยวิธีที่แตกต่างกัน

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาอังกฤษ) Apoptosis induction of human cancer cells by
beach morning glory (*Ipomoea pes-caprae*) with different extraction methods

หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.จันทวรรณ แสงแข

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ร่วมโครงการวิจัย ภญ.นภาพรณ เอื้อวงศ์ญาติ

รองศาสตราจารย์ ดร. ภญ. สุนันทา โอศิริ

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุน
จากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ 255

บทนำ (Introduction)

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ผักบุ้งทะเลมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.br. อยู่ในวงศ์ Convolvulaceae เป็นไม้ล้มลุก เถาเลื้อย ลำต้นทอดไปตามยาวบนพื้นทรายบริเวณชายฝั่งทะเล โดยเฉพาะในภูมิภาคประเทศเขตร้อน ผักบุ้งทะเลเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาแก้ปวด แก้อักเสบ ลดอาการหดรัดเกร็งที่ลำไส้ และต้านโรคมะเร็ง เป็นต้น (Meira et al., 2012) จากการรวบรวมวรรณกรรมของ Manigaunha และคณะ ในปี 2010 พบว่ามีส่วนประกอบสำคัญทางเคมีได้แก่ naphthalenone, (-)-mellein, eugenol, 4-vinyl-guaiacol, lipophilic glycosides, 2-methylpropanoic, (2S)-methylbutyric, n-hexanoic, n-decanoic, และ n-dodecanoic acids เนื่องจากมีสารสำคัญมากจึงมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายด้าน

ในประเทศไทย *Ipomoea pes-caprae* เป็นสมุนไพรที่เป็นภูมิปัญญาชาวบ้านใช้ใบสดแก้อักเสบจากพิษแมงกะพรุน. โรคผิวหนังอักเสบ (dermatitis) และจากหลักฐานทางวิทยาศาสตร์พบว่ากลไกที่ลดการอักเสบเกิดจากการลดการสร้าง prostaglandin และ leukotriene (Bandaranayake, 1998) น้ำที่คั้นได้จากใบสดใช้รักษาแผลที่เกิดจากพิษแมงกะพรุนไฟ สารสกัดจากใบลดอาการบวมและลดการอักเสบในหนูทดลองที่ฉีดสาร carrageenan ที่อุ้งเท้า และฉีดสาร arachidonic acid หรือ ethyl phenyl propiolate ที่บริเวณหูสัตว์ทดลอง (Pongprayoon et al., 1991) สารสกัดด้วย methanol จากส่วนลำต้นและใบ มีคุณสมบัติลดอาการปวด (antinociceptive property) ในหนูทดลองที่กระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวดด้วยเทคนิค writhing test และ formalin test เนื่องจากมีสารเคมีเหล่านี้คือ steroids, terpenoids, alkaloids และ flavonoids ซึ่งสามารถลดความเจ็บปวดและลดการอักเสบได้ มีข้อเสนอแนะจากงานวิจัยนี้ให้นำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรค dolorous processes (De Souza et al., 2000) สาร isoprenoids beta-damascenone และ E-phytol สกัดจาก *Ipomoea pes-caprae* ในประเทศไทย พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการหดรัดเกร็งของลำไส้ได้ใกล้เคียงกับยาแผนปัจจุบัน papaverine (Pongprayoon et al., 1992) อย่างไรก็ตาม การศึกษาในพืชชนิดเดียวกันในประเทศบราซิล พบว่ามีส่วนประกอบทางเคมีแตกต่างกัน และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการหดรัดตัวของลำไส้ในหนูตะเภา (Emendorfer et al., 2005)

สาร isochlorogenic acids a, b และ c สกัดจากใบของ *Ipomoea pes-caprae*, *Ipomoea batatas*, และ *Ipomoea aquatica* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ collagenase ทำให้มีความยืดหยุ่นจากเส้นใย elastic จึงสามารถนำมาใช้ป้องกันการเหี่ยวบนผิวหนังในวัยชราได้ (Teramachi et al., 2005) สารอนุมูลอิสระก่อให้เกิดภาวะ oxidative stress ภายในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่างๆจำนวนมาก ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการป้องกันการเกิดโรค

คือการใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพร ซึ่งการสกัดสารด้วย 80% ethanol extract จาก *Ipomoea pes-caprae* มี 0.84% (m/m) phenolics และ 0.23% (m/m) flavonoids ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง hydroxyl radicals และ nitric oxide (Umamaheshwari et al., 2012) การสกัดสารด้วย methanol จาก *Ipomoea pes-caprae* (100 µg/ml) จากประเทศบราซิล มีผลกระตุ้นการเจริญของ T lymphocyte และการสกัดด้วย methanol จะได้สาร triperpenes และ flavonoids ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ผลการวิจัยในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจาก *Ipomoea pes-caprae* (whole plant) มีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดจาก *Calophyllum brasiliense* (roots) ถึง 3 เท่า (Philippi et al., 2010)

การสกัดสารด้วย hexane จาก *Ipomoea pes-caprae* (aerial parts) ด้วยเทคนิค HPLC และศึกษาสูตรโครงสร้างโดย NMR spectroscopy ได้สาร lipophilic glycosides 6 ชนิด ได้แก่ pescaproside A, pescapreins I-IV และ stoloniferin III ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองหลายชนิดเช่น nasopharyngeal (KB), colon (HCT-15), squamous cell cervical (SQC-1 UISO) และ ovarian (OVCAR) carcinomas แต่มีประสิทธิผลก่อนข้างต่ำโดยมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 5-20 µg/ml (Pereda-Miranda et al., 2005) ต่อมามีการสกัดสารด้วย ethanol จาก *Ipomoea pes-caprae* แล้วนำส่วน lipophilic fraction มาแยกบริสุทธิ์ ได้ resin glycosides ชนิดใหม่ 8 ชนิด คือ pescapreins X-XVII ซึ่งออกฤทธิ์บน μ -opioid receptor และมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้าน ได้แก่ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง, แบคทีเรีย และเชื้อรา (Tao et al., 2008)

สำหรับ *Ipomoea* species นั้นมีมากถึง 600-700 ชนิด เช่น การสกัดสารด้วย methanol จาก *Ipomoea hederacea* มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง human lung (A549) และ colon (Col 2) cancer cells (Nam & Lee, 2000) การสกัดสารด้วย methanol จาก *Ipomoea aquatica* แล้วนำมาทำให้เป็นสารกึ่งบริสุทธิ์และสารบริสุทธิ์ (7-O- β -D-glucopiranosil-dihydroquercetina-3-O- β -Dglucopiranosideo) พบว่าสารบริสุทธิ์มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำกว่าสารสกัดหยาบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบมีการออกฤทธิ์ที่เสริมกันระหว่าง anthocyanins และ phenolic compounds อีกหลายชนิด และมีฤทธิ์ทางชีวภาพอีกหลายด้าน (Prasad et al., 2005a & b) สารสกัดบริสุทธิ์จากใบของ *Ipomoea squamosa* สามารถสกัดได้สาร ipomoeassins A-E ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง human ovarian (A2780) cancer cell (IC₅₀ 0.5-3.3 µM) (Cao et al., 2005)

เซลล์มะเร็งสามารถสร้าง growth signals กระตุ้นตัวเองให้แบ่งตัวตลอดเวลาและหลีกเลี่ยงการตายแบบ apoptosis เซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของ cyclooxygenase 2 (COX-2) และมีการสร้าง prostaglandin E2 มากกว่าเซลล์ปกติ ทำให้เซลล์มะเร็งแพร่กระจายและลุกลามไปอวัยวะอื่นๆ ได้อย่างรวดเร็ว (Ferrandina et al., 2002; Kilic et al., 2005) ดังนั้น cyclooxygenase-2 inhibitors หรือยาแก้อักเสบที่ใช้ในปัจจุบันอยู่ในกลุ่ม non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง COX-2 enzyme จึงทำให้การสร้าง prostaglandin E2 ลดลง จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น uterine endometrial

carcinoma (Hasegawa et al., 2005), non-small cell lung cancer cells (Hazra et al., 2007), endometrial carcinoma (Genc et al., 2007), breast cancer cells (Chen et al., 2009), head & neck carcinoma (Abraham et al., 2010), esophageal squamous cell carcinoma (Yu et al., 2011) กลไกที่เซลล์มะเร็งเหล่านี้ตายคือ apoptosis นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้ง vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) ไม่สามารถสร้างหลอดเลือด ทำให้เซลล์ไม่ได้รับสารอาหาร (Dormond et al., 2001)

ดังนั้นการพัฒนาสารสกัดจากผักบุ้งทะเล ซึ่งมีคุณสมบัติร่วมกันทั้งเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis และต้านการอักเสบ จึงเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญในการรักษาโรคมะเร็ง (Sun et al., 2004; Özalp et al., 2012) เนื่องจากประเทศไทยมีพื้นที่ติดทะเล เป็นแหล่งที่มีทรัพยากรธรรมชาติโดยเฉพาะผักบุ้งทะเล *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.br. จำนวนมาก และจากหลักฐานทางงานวิจัยที่กล่าวมานั้นพบว่า ฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งนั้นขึ้นอยู่กับตัวทำละลายและวิธีที่ใช้ในการสกัด ซึ่งวิธีการสกัดมีหลายวิธี ได้แก่ การใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล น้ำ เฮกเซน และคาร์บอนไดออกไซด์ในสถานะของไหลยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction) ซึ่งจะได้สารสกัดผักบุ้งทะเลที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน การสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในสถานะของไหลยิ่งยวด เป็นวิธีที่สามารถใช้สกัดได้สารที่มีขั้วต่ำและที่มีขั้วสูง ซึ่งแตกต่างจากวิธีสกัดอื่นๆ ที่ได้สารสำคัญที่มีขั้วต่ำหรือสูงอย่างใดอย่างหนึ่ง ทั้งนี้ต้องมีการตรวจสอบและเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ตลอดจนศึกษากลไกการตายแบบ apoptosis

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคมะเร็งเป็นโรคร้ายแรงและทุกข์ทรมาน คุณสมบัติของเซลล์มะเร็งแตกต่างจากเซลล์ปกติคือ เซลล์มะเร็งสามารถสร้าง growth signal กระตุ้นตัวเองให้แบ่งตัว เมื่อเซลล์โตและแพร่กระจายไปอวัยวะอื่นก็ยัง สามารถสร้างหลอดเลือดเพื่อส่งอาหารให้กับเซลล์ และยังกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิด โดยเฉพาะ cyclooxygenase-2 (COX 2) ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเจริญและยับยั้งการตายแบบ apoptosis มีรายงานการวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าการใช้ยา COX-2 inhibitors นั้น สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิดเช่น head & neck carcinoma (Abraham et al., 2010), non-small cell lung cancer (Hazra et al., 2007), endometrial carcinoma (Genc et al., 2007), uterine endometrial carcinoma (Hasegawa et al., 2005), esophageal squamous cell carcinoma (Yu et al., 2011) การทำงานของ COX-2 inhibitors คือการยับยั้งการสร้าง prostaglandins E2 ซึ่งจะทำให้เซลล์มะเร็งตายแล้วยังยับยั้งการงอกใหม่ของหลอดเลือด ทำให้ก่อนเนื้องอกขาดสารอาหาร (Dormond et al., 2001) ซึ่งสอดคล้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของยารักษาโรคมะเร็งแผนปัจจุบันหลายชนิดที่ออกฤทธิ์เหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis และเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญในการทำลายเซลล์มะเร็งแบบมุ่งเป้า

โรคมะเร็งเป็นโรคที่มีอัตราการตายสูง มีผู้ป่วยรายใหม่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เป็นปัญหาทางสาธารณสุขในทุกประเทศ ในปัจจุบันการรักษาโดยยาเคมีบำบัด การผ่าตัด และการฉายรังสี นั้นยังไม่ประสบความสำเร็จ ในช่วงแรกของการรักษาเซลล์มะเร็งจะตอบสนองต่อยา จากนั้นเซลล์มะเร็งจะดื้อยา ทำให้ต้องใช้ขนาดยาเพิ่มขึ้น จึงเกิดผลข้างเคียงอันเนื่องมาจากเซลล์ปกติถูกทำลายมาก นอกจากนี้ยังทำให้ประเทศไทยเสียดุลการค้าเนื่องจากต้องนำเข้ายาจากต่างประเทศ แนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาเหล่านี้คือการค้นหาสารต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งจากพืชสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย เนื่องจากมีต้นทุนต่ำ และสมุนไพรดังกล่าวควรมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเท่านั้นแต่ไม่เกิดพิษต่อเซลล์ปกติ

ผักบุ้งทะเล (Beach Morning Glory) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br. วงศ์ Convolvulaceae พบอยู่ทั่วไปตามชายฝั่งทะเล เป็นไม้เลื้อยล้มลุก เลื้อยไปตามผิวทรายหรือดิน โดยทั่วไปใช้แก้อาการอักเสบจากพิษแมงกะพรุนไฟ จากรายงานวิจัย (Meira et al., 2012) พบว่าสารสกัดผักบุ้งทะเลมีสรรพคุณหลายด้าน มีการพบฤทธิ์ลดการอักเสบ (Pongprayoon et al., 1992) ฤทธิ์แก้ปวด (De Souza et al., 2000) ยับยั้งการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (Rogers et al., 2000) ลดการสลายตัวของคอลลาเจนที่ผิวหนัง (Teramachi et al., 2005) ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Pereda-Miranda et al., 2005) และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย (Umamaheswari et al., 2012) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตัวทำละลายและวิธีที่ใช้ในการสกัด จึงจำเป็นต้องศึกษาวิธีการสกัดผักบุ้งทะเลให้ได้สารสำคัญที่มีคุณสมบัติกระตุ้นเซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis ซึ่งวิธีการสกัดมีหลายวิธีได้แก่ การใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล น้ำ เฮกเซน และคาร์บอนไดออกไซด์ในสถานะของไหลยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction) ซึ่งจะได้สารสกัดผักบุ้งทะเลที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารดังกล่าว โดยมุ่งเน้นการค้นหาและการทดสอบสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ใช้บำบัดโรคซึ่งยังเป็นปัญหาหลักของประเทศ โดยเฉพาะสารต้านมะเร็ง (anti-cancer) เพื่อให้มหาวิทยาลัยบูรพาพัฒนาเป็นผู้นำทางทะเลชายฝั่งตะวันออกและเพื่อนำไปสู่การพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมใหม่ ใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติอย่างยั่งยืน ทำให้ประเทศไทยพัฒนาความรู้ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสามารถพึ่งพาตนเองได้ มีความก้าวหน้าใกล้เคียงกับประเทศที่พัฒนาแล้ว

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ของสารสกัดผักบุ้งทะเลแห่งที่ได้จากวิธีสกัดแตกต่างกันคือ เอทานอล & น้ำ, เฮกเซน, และคาร์บอนไดออกไซด์ในสถานะของไหลยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction)

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาเชิงทดลอง (Experimental study) ในห้องปฏิบัติการ โดยการนำผักบุงทะเลมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วยวิธีการต่างๆ คือ เอทานอล & น้ำ, เฮกเซน, และคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะของไหลยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction) แล้วทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตลอดจนศึกษากลไกการตายแบบ apoptosis ใน human cancer cell lines เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี

ยาต้านมะเร็งที่ใช้ในปัจจุบันมีข้อจำกัด มีปัญหาการดื้อยา ทำให้ต้องเพิ่มขนาดยามากขึ้น ส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงไม่พึงประสงค์ นักวิจัยจึงมีความพยายามที่จะค้นหาสารจากธรรมชาติในการป้องกันและรักษามะเร็งเพิ่มขึ้น โดยสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้จะกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งฆ่าตัวตายแบบ apoptosis ซึ่งมีลักษณะแสดงคือเซลล์เกิดการสูญเสียปริมาตรของเซลล์ (loss of cell volume) เยื่อหุ้มเซลล์หดรัด (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่ม (chromatin aggregation) และ DNA ถูกย่อยเป็นชิ้นเล็ก (DNA fragmentation) และขบวนการนี้อาศัยเอนไซม์ caspase เป็นตัวกลาง (caspase-mediated events) ดังนั้นวิธีดำเนินการวิจัยเริ่มจากทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จากนั้นศึกษากลไกการตายระดับ DNA และเอนไซม์ caspase ร่วมกับการศึกษารูปร่างเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- บูรณาการศาสตร์ทางด้านเภสัชศาสตร์กับศาสตร์ทางด้านเภสัชวิทยาของเซลล์มะเร็ง
- ใช้กระบวนการวิจัยแลกเปลี่ยนเรียนรู้ร่วมกันเพื่อสร้างงานทางวิชาการ
- มหาวิทยาลัยและสถาบันต่าง ๆ นำผลการวิจัยนี้ไปพัฒนาต่อยอด เช่น การทำให้สารบริสุทธิ์และหาโครงสร้างทางเคมี การทดสอบฤทธิ์ชีวภาพอื่น ๆ เพิ่มเติม ที่สามารถพัฒนาสู่อุตสาหกรรมได้
- เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ และนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการ แก่นักวิชาการ นักวิจัย ได้นำไปใช้ประโยชน์ในส่วนงานที่เกี่ยวข้องซึ่งเป็นการตอบสนองต่อยุทธศาสตร์ชาติในด้านการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพ
- เป็นส่วนหนึ่งในงานด้านการเรียนการสอนวิชา วิศวกรรมวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีวเวชศาสตร์
- เป็นส่วนหนึ่งในงานด้านการเรียนการสอนวิชา Molecular cell biology หลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต

เนื้อเรื่อง (Main body)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บผักบุ้งทะเลและพิสูจน์เอกลักษณ์

ผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae*) ทั้งส่วนที่เป็นลำต้นและใบ เก็บจากชายฝั่งทะเลอ่าวไทย จังหวัดชลบุรี ผ่านการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยนักชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา จากนั้นนำตัวอย่างสดมาตากให้แห้งหรืออบในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส จะต้องได้ตัวอย่างแห้งอย่างน้อย 10 กิโลกรัม

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล ชายฝั่งทะเลอ่าวไทย จังหวัดชลบุรี

การสกัดสารจากผักบุ้งทะเล

สกัดผักบุ้งทะเลด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ เอทานอล & น้ำ, เฮกเซน และ ในปัจจุบัน มีเทคโนโลยีใหม่ในการสกัดสารจากสมุนไพรเรียกว่า การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้สภาวะของไหลยิ่งยวด (Supercritical carbon dioxide extraction, SCO_2) เป็นการสกัดที่อาศัยหลักการที่ว่า เมื่อเพิ่มความดันและอุณหภูมิให้กับสาร จนถึงจุดวิกฤต (Critical point) สารนั้นจะอยู่ในสถานะของไหลยิ่งยวด (Supercritical fluid) คือมีคุณสมบัติอยู่ระหว่างของเหลวและก๊าซ ภายใต้สภาวะของไหลยิ่งยวด ตัวทำละลายที่ปกติละลายสารต่างๆ ได้น้อยกลับกลายเป็นตัวทำละลายที่ดีขึ้น

คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide) มีอุณหภูมิวิกฤต (Critical temperature) ต่ำ คือที่ 31.1°C ไม่ทำให้เกิดการสลายตัวด้วยความร้อนของสารสกัด ไม่ติดไฟ สามารถกำจัดออกจากสารสกัดได้ง่าย ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถสกัดได้ปริมาณสารสำคัญได้มากกว่าวิธีการสกัดอื่นๆ และสามารถสกัดแยกสารที่มีขั้วต่ำได้ดี ไม่มีตัวทำละลายตกค้าง

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ

โครงการนี้ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยบูรพา เอกสารที่ 84/2556 เตรียมผู้เชี่ยวชาญในการเจาะเลือด ซึ่งเป็นอาจารย์ในสาขาเทคนิคการแพทย์ที่มีใบอนุญาตประกอบวิชาชีพ และใช้ห้องปฏิบัติการของสาขาเทคนิคการแพทย์เป็นสถานที่เจาะเลือด ทำการเจาะเลือดด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อที่เส้นเลือดดำของแขนด้านใน (ข้อพับบริเวณข้อศอก) จำนวน 10 ml ใส่หลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นใส่น้ำยา Ficoll Isopaque ที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.077 นำหลอดเลือดไปปั่นเพื่อแยกเม็ดเลือดแดงให้ตกตะกอน ส่วน peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ซึ่งประกอบด้วย T

lymphocytes, B lymphocytes, NK cells, และ monocytes จะเห็นเป็นวงสีขาวตรงกลางระหว่างชั้น plasma และ น้ำยา Ficoll Isopaque จากนั้นนำเซลล์ที่อยู่บริเวณวงสีขาวมาเลี้ยงใน RPMI 1640 ที่มี 2 mM L-glutamine, 20% Inactivated Fetal Bovine Serum, 1% penicillin/streptomycin

สถานที่ทำการทดลอง คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

การเตรียมเซลล์มะเร็ง (Human cancer cell lines)

Model ที่ใช้ในการทดลองเป็น Human cancer cell lines จากอวัยวะต่างๆ ที่มีสถิติการเกิดสูงเช่น เซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก (KB cells) และได้รับความอนุเคราะห์จาก สถาบันมะเร็งแห่งชาติ อาหารเลี้ยงเซลล์ คือ RPMI 1640 ที่มี 2 mM L-glutamine, 10% Inactivated Fetal Bovine Serum, 1% penicillin/streptomycin ปรับ pH เป็น 7.25 เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มที่มี 95% air และ 5% CO₂ และเปลี่ยนถ่ายเซลล์ (subculture) ทุกๆ 3 วัน โดยเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นในวันแรกมีจำนวนเซลล์ 1×10^5 cells/ml เมื่อครบ 3 วัน เซลล์จะอยู่ในระยะ exponential growth เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้น 10 เท่า และมีจำนวนประมาณ 1×10^6 cells/ml

สถานที่ทำการทดลอง คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ

เลี้ยงเซลล์ (เซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง) ความเข้มข้นเริ่มต้น 5×10^5 cells/ml ลงใน 96 well plate แล้วบ่มเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 95% air และ 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อด้วยสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ doxorubicin (DOX) (positive control) ที่ความเข้มข้น 0-10 µg/ml นาน 48 ชั่วโมง วิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT) โดยใส่สารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 g/L ปริมาตร 30 µl ลงใน 96 well plate ที่ต้องการทดสอบ จากนั้นบ่มภายใต้ อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ นาน 4 ชั่วโมง โดยเซลล์ที่มีชีวิตไม่โตคอนเดรียมีกระบวนการเมตาบอลิซึม ส่งผลให้มีการถ่ายทอดอิเล็กตรอน ซึ่งโครงสร้างของโมเลกุล MTT เป็น tetrazolium ring เมื่อเกิดปฏิกิริยา reduction กับ complex II (succinate dehydrogenase) ได้เป็นผลึก formazan ที่ละลายน้ำอยู่ในเซลล์ สามารถนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหา % cell viability โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ Cell Viability} = [A_{570} \text{ test sample} / A_{570} \text{ control}] \times 100$$

จากนั้นสร้างกราฟระหว่าง % cell viability (แกน y) กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (แกน x) จากกราฟนี้สามารถคำนวณหา ขนาดความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 50% (inhibit concentration at 50%, IC₅₀)

สถานที่ทำการทดลอง: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

วิเคราะห์การแตกของ DNA โดยวิธี agarose gel electrophoresis

บ่มเซลล์ด้วยสารตัวอย่าง นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ทั้งหมด ใส่ centrifuge tube ขนาด 15 ml และปั่นเหวี่ยงนาน 5 นาที เทส่วน supernatant ที่ จะได้ตะกอนเซลล์อยู่ก้นหลอด จากนั้นละลายตะกอนด้วย PBS ประมาณ 1.5 ml แล้วย้ายไปใส่ eppendorf tube จากนั้นนำมาสกัด DNA ด้วย GF-1 tissue DNA extraction kit (VIVANTIS) โดยเติม proteinase K ปริมาตร 20 μ l เพื่อทำลายโปรตีน จากนั้นเติม lysis enhancer ปริมาตร 2 μ l แล้วทำการ vortex เพื่อทำลายเชื้อหุ้มเซลล์ และบ่มต่อด้วย TB buffer ปริมาตร 200 μ l ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีนออกให้เหลือแต่ DNA และ RNA จากนั้นทำลาย RNA ด้วย 20 mg/ml RNaseA ปริมาตร 20 μ l บ่มที่ 37°C นาน 10 นาที จากนั้นทำการตกตะกอน DNA ด้วย ice-cold absolute ethanol แล้ว load ลง column บ่มที่ 5,000 g นาน 1 นาที จากนั้นล้างด้วย wash buffer แล้วนำไปปั่นที่ 5,000 g นาน 1 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นแห้งที่ 10,000 g นาน 1 นาที แล้วเติม elution buffer ที่ได้ผ่านความร้อนแล้วที่ 65°C เพื่อ elute DNA จนได้ผลผลิตสุดท้าย คือ DNA ที่บริสุทธิ์ผ่าน filter ลงมา นำไปเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

นำ DNA ที่สกัดได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm ค่า DNA ที่บริสุทธิ์มีค่าสัดส่วนการดูดกลืนแสง A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.7-1.9 แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของ DNA โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของ DNA} = \text{dilution factor} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times A_{260}$$

(เมื่อ 1 คือค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าเท่ากับ 50 ng/ μ l)

เมื่อได้ความเข้มข้นของ DNA แล้วนำมาปรับความเข้มข้นของทุกกลุ่มเป็น 100 ng/ μ l โดยเจือจางกับน้ำกลั่น นำ 100 ng/ μ l DNA ปริมาตร 8 μ l (800 ng) ผสมกับ 6x loading dye ที่มีส่วนผสมกับ SYBR Gold (100:1 μ l) ปริมาตร 2 μ l เพื่อใช้ดูการเคลื่อนที่ของ DNA และ glycerol ที่อยู่ใน loading dye จะช่วยป้องกันไม่ให้ DNA ฟุ้งกระจาย จากนั้น load ลง 1.5% agarose gel โดยใช้กระแสไฟ 100 V นาน 45 นาที ซึ่งใช้ 0.1 μ g/ μ l 1kb DNA ladder ปริมาตร 8 μ l เป็น marker แล้ววิเคราะห์ผลโดยเครื่อง dark reader

สถานที่ทำการทดลอง: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI staining

เตรียมเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ปริมาตร 4 ml โดยเลี้ยงเซลล์บน cover slide ซึ่งแช่อยู่ใน 6 well plate แล้วบ่มเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อด้วย EtOH (vehicle control), DOX [IC₅₀] และสารสกัด [IC₅₀] ตามลำดับนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำ cover slide ซึ่งมีเซลล์เกาะอยู่มากมาย ย้อมสี fluorescent DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) โดย fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde pH 8.3 ปริมาตร 1

ml นาน 3 นาที จากนั้นทำลาย RNA ด้วย 20 mg/ml RNaseA ปริมาตร 20 μ l โดยบ่มที่ 37°C นาน 20 นาที และล้าง RNaseA ด้วย PBS จากนั้นนำไปย้อมด้วย PI [5 μ g/ml] และ DAPI [5 μ g/ml] ปริมาตรอย่างละ 700 μ l นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องและปราศจากแสง จากนั้นล้างสีออกด้วย PBS จากนั้นนำเซลล์บน cover slide คิวาลงบน slide ปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บ แล้วนำไปส่องด้วย fluorescent microscope กำลังขยาย 100 เท่า โดย DAPI มี excitation/emission ที่ 358/461 nm ทำการบันทึกภาพแบบสุ่ม 3 ตำแหน่งต่อ 1 slide และในแต่ละตำแหน่งแสดงภาพ 2 แบบ คือ bright field, DAPI

การวิเคราะห์ข้อมูล โดยนับเซลล์จำนวน 500 เซลล์ แบบสุ่ม เพื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่อยู่ในลักษณะต่างๆ ซึ่งเซลล์มีชีวิตจะพบนิวเคลียสติดสีฟ้าเนียน ขณะที่ apoptotic cells จะพบนิวเคลียสติดสีฟ้าไม่เรียบเนียน แต่เป็นหย่อมๆ โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

การวัดความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย

บ่มเซลล์ด้วยสารตัวอย่างนาน 48 ชั่วโมง และเลี้ยงบน cover slide จากนั้นย้อมด้วย 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) ซึ่งมีคุณสมบัติ lipophilic cationic dye ในเซลล์ปกติ JC-1 เมื่อเข้าไปสะสมในไมโทคอนเดรียจะอยู่ในรูป aggregate form (excitation/emission = 540/570 nm) และให้การเรืองแสงสีแดง ในทางตรงข้ามเซลล์ที่เกิด apoptosis มีความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียลดลง JC-1 ไม่เข้าไปสะสมในไมโทคอนเดรีย และจะอยู่ในรูป monomer form (excitation/emission = 485/535 nm) และให้การเรืองแสงสีเขียว วิเคราะห์ผลการทดลองโดย fluorescence microscopy

สถานที่ทำการทดลอง: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase 3

ลักษณะของ apoptosis (programmed cell death) คือการที่เซลล์มีกระบวนการทำลายตัวเองหากพบว่ามี ความผิดปกติเกิดขึ้น โดยจะเปลี่ยนโปรตีน “procaspase 3” เป็น “caspase 3” ส่งสัญญาณให้เซลล์ฆ่าตัวเอง ในกรณีที่สารบริสุทธ์ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ caspase 3 จึงส่งผลให้เซลล์ฆ่าตัวเอง สามารถวัด caspase 3 activity โดยใช้เทคนิค caspase 3 colorimetric assay ทำการทดลองโดยบ่มเซลล์กับสารตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วย cold lysis buffer, 30 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g, 10 นาที นำ 100 μ g โปรตีน มาบ่มกับ 50 μ l ของ reaction buffer และ 5 μ l ของ colorimetric tetrapeptides: Asp-Glu-Val-Asp DEVD-p-nitroaniline (pNA) ที่ 37°C, 2 ชั่วโมง ในกรณีที่เอนไซม์ caspase 3 จะได้ pNA ซึ่งติดตามโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm

สถานที่ทำการทดลอง: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis

บ่มเซลล์กับสารตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด จากนั้นทำลายผนังเซลล์ และแยก total protein ออกมา จากส่วนอื่นๆที่ไม่ต้องการโดยใช้ชุดสกัดโปรตีน (BioRad protein assay) ทำการแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุล โดยเทคนิค gel electrophoresis (SDS-polyacrylamide gel) ย้ายโปรตีนจาก gel ไปยัง nitrocellulose membrane และ block nonspecific โปรตีนด้วย 5% skim milk บ่มด้วย primary antibody ซึ่งเป็น antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน caspase-3 และ cytochrome c เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อด้วย enzyme-linked secondary antibody วิเคราะห์ผล โดย chemiluminescent detection

สถานที่ทำการทดลอง: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาในแต่ละการทดลอง

การแสดงข้อมูล

ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ($n = 3$) การทดลองความเป็นพิษต่อ KB cells เขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม microcal origin 6.0 แสดงผลเป็นค่า mean \pm standard error of mean (SEM) การวิเคราะห์การแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) แสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ \pm SEM ร่วมกับภาพถ่าย ส่วนการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis แสดงผลเป็นภาพถ่าย การเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลสองชุดใช้ unpaired Student's t-test และการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลมากกว่าสองชุดใช้ one-way ANOVA ตามด้วย Fisher test โดยค่า p value < 0.05 แสดงว่ามีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย (Results)

การเตรียมวัตถุดิบผักบุ้งทะเล

เก็บตัวอย่างผักบุ้งทะเล (รูปที่ 1) จากชายทะเลบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี ที่บริเวณชุมชนหาดวอนนภาศัพท์ ซึ่งมีผักบุ้งทะเลขึ้นอยู่เป็นจำนวนมาก และมีอยู่ในทุกฤดูกาล เมื่อเก็บใบและยอดอ่อนผักบุ้งทะเลก็จะแตกยอดใหม่ขึ้นทดแทน จากนั้นเก็บใบผักบุ้งทะเล ทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่าเพื่อล้างทรายและสิ่งสกปรกออก นำไปผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปใส่ในถาดเข้าอบในตู้อบระบบลมร้อนสำหรับอบแห้งสมุนไพร ในตู้ มีพัดลม (Blower) ช่วยกระจายลมร้อนให้ทั่วถึงทั้งตู้ ช่วยให้การอบสมุนไพรแห้งได้อย่างทั่วถึง อบให้แห้งด้วยอุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้อบสมุนไพร ที่ภาควิชาแพทย์แผนไทย วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธรจังหวัดชลบุรี 29 หมู่ 4 ตำบลบ้านสวน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ทำการจัดเก็บวัตถุดิบผักบุ้งทะเลอบแห้งจำนวน 10 กิโลกรัม เพื่อใช้ในการสกัดหลายวิธี โดยทยอยเก็บผักบุ้งทะเลสดหลายครั้ง ประมาณสัปดาห์ละครั้งๆ ละประมาณ 7-8 กิโลกรัม ให้เหมาะสมกับขนาดของตู้อบสมุนไพรขนาดใหญ่ 2 ประตู ใช้ระยะเวลาการอบแห้งครั้งละ 2-3 วัน ใช้ระยะเวลาทั้งสิ้นประมาณ 2 เดือน แล้วจึงรวบรวมผักบุ้งทะเลอบแห้งส่งไปสกัดที่ ศูนย์พัฒนายาไทยและสมุนไพร หน่วยปฏิบัติการที่ 1 โรงงานต้นแบบ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย



รูปที่ 1 ผักบุ้งทะเล (*IPOMOEA PES-CAPRAE*)

การสกัดผักนึ่งทะเล

1. ผักนึ่งทะเลแห้งสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล : น้ำ อัตราส่วน 1 : 1 (สารสกัด A) หมักผักนึ่งทะเลแห้งบดหยาบแล้ว น้ำหนัก 1,000 กรัม กับตัวทำละลายผสมระหว่าง 95% เอทานอล & น้ำ อัตราส่วน 1:1 จำนวน 5,000 กรัม (อัตราส่วนวัตถุดิบต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1: 5) เป็นเวลา 7 วัน ในภาชนะปิดสนิท กันแสง กรองสารสกัดที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในภาชนะปิด ทึบแสง จากนั้นนำกากที่เหลือมาหมักซ้ำรอบที่สองด้วยวิธีการเดิม จนครบ 7 วัน แล้วกรองสารสกัดที่ได้รอบที่สอง นำมารวมกับสารสกัดรอบแรก กรองสารสกัดที่ได้ทั้งหมดคอกกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไประเหยไล่ตัวทำละลายออกจนหมด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ควบคุมความดัน โดยใช้เครื่องมือ rotary evaporator ได้สารสกัดสีเขียวเข้มเป็นของเหลวปริมาณ 379.5 กรัม คิดเป็น %yield เท่ากับ 37.95% โดยน้ำหนัก

2. ผักนึ่งทะเลแห้งสกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน (สารสกัด B) หมักผักนึ่งทะเลแห้งที่บดหยาบแล้ว น้ำหนัก 500 กรัม กับเฮกเซน 2,500 กรัม (อัตราส่วนวัตถุดิบต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1: 5) เป็นเวลา 7 วัน ในภาชนะปิดสนิท กันแสง จากนั้น กรองสารสกัดที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไประเหยไล่ตัวทำละลายออกจนหมด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องมือ rotary evaporator ได้สารสกัดสีเขียวเข้มเป็นของเหลวปริมาณ 9.5 กรัม คิดเป็น %yield เท่ากับ 1.9% โดยน้ำหนัก

3. ผักนึ่งทะเลแห้งสกัดด้วย คาร์บอนไดออกไซด์ในสถานะของไหลยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction)

3.1 การสกัดด้วย pure carbon dioxide ในสถานะ supercritical: ใช้วัตถุดิบผักนึ่งทะเลแห้ง บดละเอียด น้ำหนัก 4 กิโลกรัม

สภาวะการสกัด

ถึงสกัด : ความดัน 18-22 MPa อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส

ถึงเก็บที่ 1 (polar extract) : ความดัน 8 MPa อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ถึงเก็บที่ 2 (non-polar extract) : ความดัน 5 MPa อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

การสกัดด้วย pure carbon dioxide ในสถานะ supercritical ไม่สามารถสกัดสารจากผักนึ่งทะเลแห้งได้ แม้ว่าจะใช้เวลาในการสกัดนานถึง 4 ชั่วโมง หรือเพิ่มอุณหภูมิและความดันในถึงสกัดแล้วก็ตาม ดังนั้นการสกัดด้วย pure carbon dioxide ในสถานะ supercritical ไม่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารในผักนึ่งทะเลแห้ง

3.2 การสกัดด้วย carbon dioxide ร่วมกับ 95% เอทานอล ในสถานะ supercritical: ใช้วัตถุดิบผักนึ่งทะเลแห้ง บดละเอียด น้ำหนัก 4 กิโลกรัม

สภาวะการสกัด

ถึงสกัด : ความดัน 28 MPa อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ดึงเก็บที่ 1 (polar extract) : ความดัน 8 MPa อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (สารสกัด C)
 ดึงเก็บที่ 2 (non-polar extract) : ความดัน 5 MPa อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (สารสกัด D)
 ปริมาณของ 95% เอทานอลที่ใช้ 1,500 กรัม
 ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง
 ปริมาณสารสกัดที่ได้ :
 ดึงเก็บที่ 1 (polar extract) 52.06 กรัม คิดเป็น %yield เท่ากับ 1.30% โดยน้ำหนัก
 ดึงเก็บที่ 2 (non-polar extract) 20.25 กรัม คิดเป็น %yield เท่ากับ 0.51% โดยน้ำหนัก

จากผลการทดลองสกัดผักนึ่งทะเลแห้งเปรียบเทียบกับตัวทำละลายพบว่า ผักนึ่งทะเลที่ทำให้แห้งบดหยาบ สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอลได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุดคือ 37.95% รองลงมาคือการสกัดด้วยเฮกเซนได้ปริมาณสารสกัด 1.90% ส่วนการสกัดด้วยตัวทำละลาย supercritical carbon dioxide (SCO₂) เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถแยกสารสกัดผักนึ่งทะเลแห้งออกจากวัตถุดิบได้ จำเป็นต้องใช้ 95% เอทานอลช่วยในการสกัดด้วยจึงจะสามารถเก็บสารสกัดผักนึ่งทะเลแห้งได้เป็นสองส่วนคือ ส่วนมีขี้ได้ปริมาณสารสกัดมากกว่าคือ 1.30% และส่วนขี้ต่ำได้สารสกัดเพียง 0.51% (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดผักนึ่งทะเลที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

วิธีการสกัดผักนึ่งทะเลแห้ง	ปริมาณสารสกัด (กรัม)	% yield (w/w)
หมักด้วยน้ำและเอทานอล (สารสกัด A)	379.50	37.95
หมักด้วยเฮกเซน (สารสกัด B)	9.50	1.90
สกัดด้วย SCO ₂	ไม่ได้สารสกัด	ไม่ได้สารสกัด
สกัดด้วย SCO ₂ และเอทานอล (สารสกัดส่วนมีขี้) (สารสกัด C)	52.06	1.30
สกัดด้วย SCO ₂ และเอทานอล (สารสกัดส่วนขี้ต่ำ) (สารสกัด D)	20.25	0.51

รายงานเอกลักษณ์ (specification sheet) ของสารสกัดผักนึ่งทะเล

Specification Sheet

General Information

Botanical name Ipomoea pes-caprae (L.) R.Br.

Common name Beach Morning Glory

Thai name ผักนึ่งทะเล

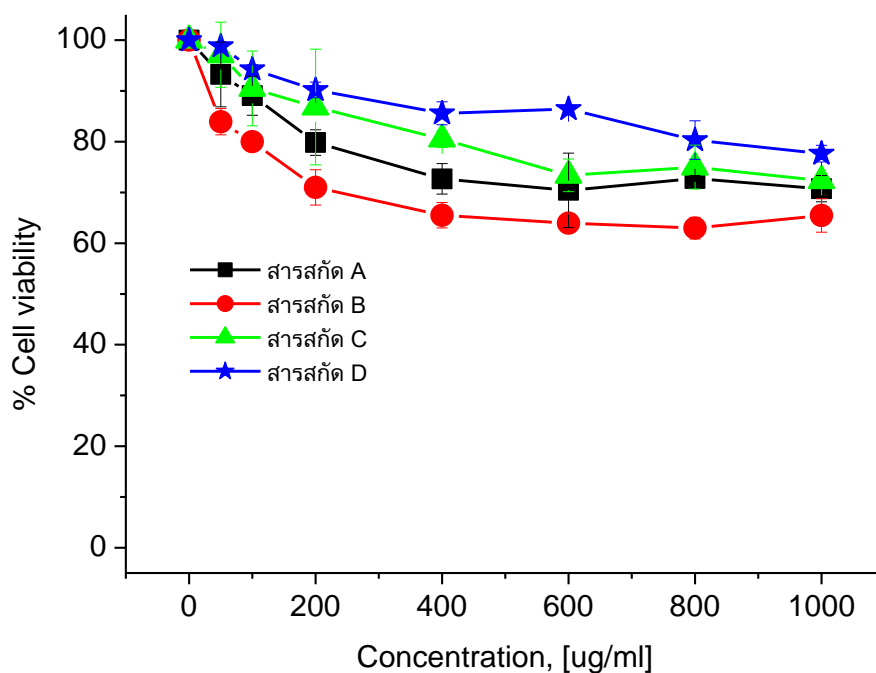
Type of extract	crude extract		
Plant part used	leaf		
Source	Chonburi, Thailand		
Storage sealed package, protect from light			
Heavy metal tests	Cadmium	:	Less than 0.3 ppm
	Lead	:	Less than 10 ppm
	Mercury	:	Less than 0.5 ppm
Microbiological profiles	Aerobic plate count	:	Less than 5,000 cfu/g
	Yeast and mold	:	Less than 1,000 cfu/g
	Enterobacteria	:	Less than 5,000 cfu/g
	Escherichia coli	:	Less than 10 cfu/g
	Salmonella spp.	:	Not found
	Clostridium spp.	:	Not found
	Staphylococcus aureus	:	Not found

การตรวจสอบสิ่งปนเปื้อน ที่ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด เพื่อตรวจสอบสิ่งปนเปื้อนที่เป็น โลหะหนัก และ เชื้อจุลินทรีย์ในสารสกัดผักนึ่งทะเล ไม่พบสิ่งปนเปื้อนโลหะหนักในสารสกัดผักนึ่งทะเล เช่น แคดเมียม (Cadmium : Cd) ตะกั่ว (Lead : Pb) และปรอท (Mercury : Hg) ทุกรายการผ่านการทดสอบตามเกณฑ์มาตรฐานของ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข (อย.)

การตรวจสอบสิ่งปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในสารสกัดผักนึ่งทะเล Aerobic Plate Count ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ Clostridium perfringens, Enterobacteriaceae, Escherichia coli, Salmonella spp., Staphylococcus aureus, Yeast and Mould ทุกรายการผ่านการทดสอบตามเกณฑ์มาตรฐานของ United States Pharmacopeia (USP)

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติ (PBMC)

แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ได้แก่ lymphocytes และ monocytes ออกจาก peripheral blood โดยไม่ปะปนกับเซลล์เม็ดเลือดแดง เลี้ยงเซลล์ PBMC ในสภาพที่ยังมีชีวิต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อด้วยสารสกัดผักนึ่งทะเลแห้ง ความเข้มข้น 0-1000 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่างนั้นมีความเป็นพิษน้อยมากต่อเซลล์ปกติ PBMC โดยที่ความเข้มข้น > 500 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีผลให้เซลล์ PBMC ลดลงเพียงเล็กน้อย (30%) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ประสิทธิภาพของสารสกัด A, B, C และ D ต่อการการเจริญของ PBMC ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm SEM (N=3)

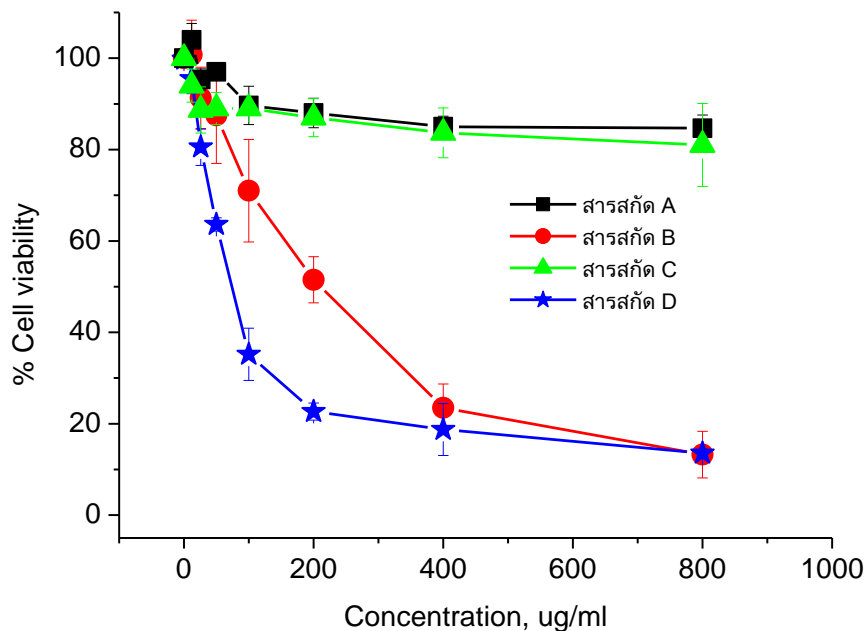
ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก (KB cells) โดยเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบ่มเซลล์กับสารสกัดความเข้มข้น 0-1000 $\mu\text{g/ml}$ และ doxorubicin (DOX) ความเข้มข้น 0-10 $\mu\text{g/ml}$ (positive control) และ 0.5% EtOH (negative control) ใน 96 well plate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมินรูปร่างของเซลล์ ลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์ ลักษณะไซโตพลาซึม ลักษณะการเกาะที่พื้นผิว เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ลอย ภายใต้กล้อง stereoscope และนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

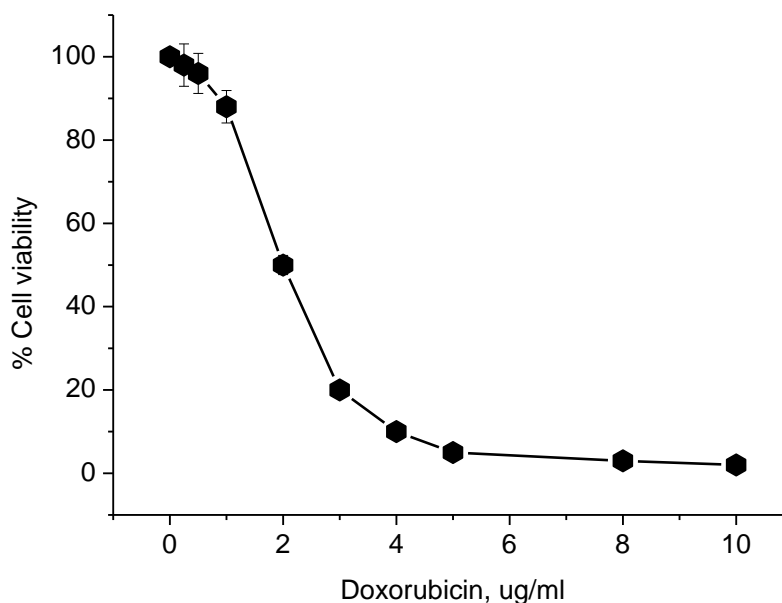
เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้อง stereoscope พบว่าในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% EtOH, สารสกัด A และสารสกัด C พบเซลล์มีลักษณะปกติ เขี่ยคตัวเป็นรูปกระสวย เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาซึมเรียบ และมีจำนวนเซลล์เกาะพื้นมากกว่า 90% เมื่อได้รับการเขย่าแรงๆ เซลล์ยังคงไม่หลุดจากพื้นผิว แตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัด B และสารสกัด D พบเซลล์มีรูปร่างกลม เยื่อหุ้มเซลล์เป็นถุงน้ำ (bleb) และไซโตพลาซึมขรุขระ ลักษณะการเกาะพื้นผิวไม่แน่น เมื่อเขย่าเบาๆ เซลล์หลุดจากพื้นผิวได้ง่าย ส่วนกลุ่มที่บ่มด้วย DOX พบว่า

เซลล์มีลักษณะกลม เยื่อหุ้มเซลล์และไซโทพลาซึมขรุขระ การเกาะพื้นผิวไม่แน่น พบเซลล์ลอยจำนวนมาก และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT พบว่าเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัด B, สารสกัด D และ DOX มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% EtOH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ซึ่งผลการนับเซลล์มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT มีความสัมพันธ์กับการศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยกล้อง stereoscope

ประสิทธิภาพของสารสกัด B ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก พบว่าสารสกัด B ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/ml}$ เริ่มยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ และความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง 20, 50 และ 80 (inhibitory concentration; IC_{20} , IC_{50} และ IC_{80}) มีค่าเท่ากับ 70 ± 3.6 , 200 ± 12.3 และ 600 ± 42.4 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เกือบ 100% ที่ความเข้มข้น 800 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 3) และประสิทธิภาพของสารสกัด D ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก พบว่าสารสกัด D ที่ความเข้มข้น 12 $\mu\text{g/ml}$ เริ่มยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ และความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง 20, 50 และ 80 (inhibitory concentration; IC_{20} , IC_{50} และ IC_{80}) มีค่าเท่ากับ 25 ± 1.4 , 70 ± 4.2 และ 400 ± 17.4 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เกือบ 100% ที่ความเข้มข้น 800 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 3) ในขณะที่ doxorubicin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.0 ± 0.08 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 ประสิทธิภาพของสารสกัด A, B, C และ D ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm SEM (N=3)

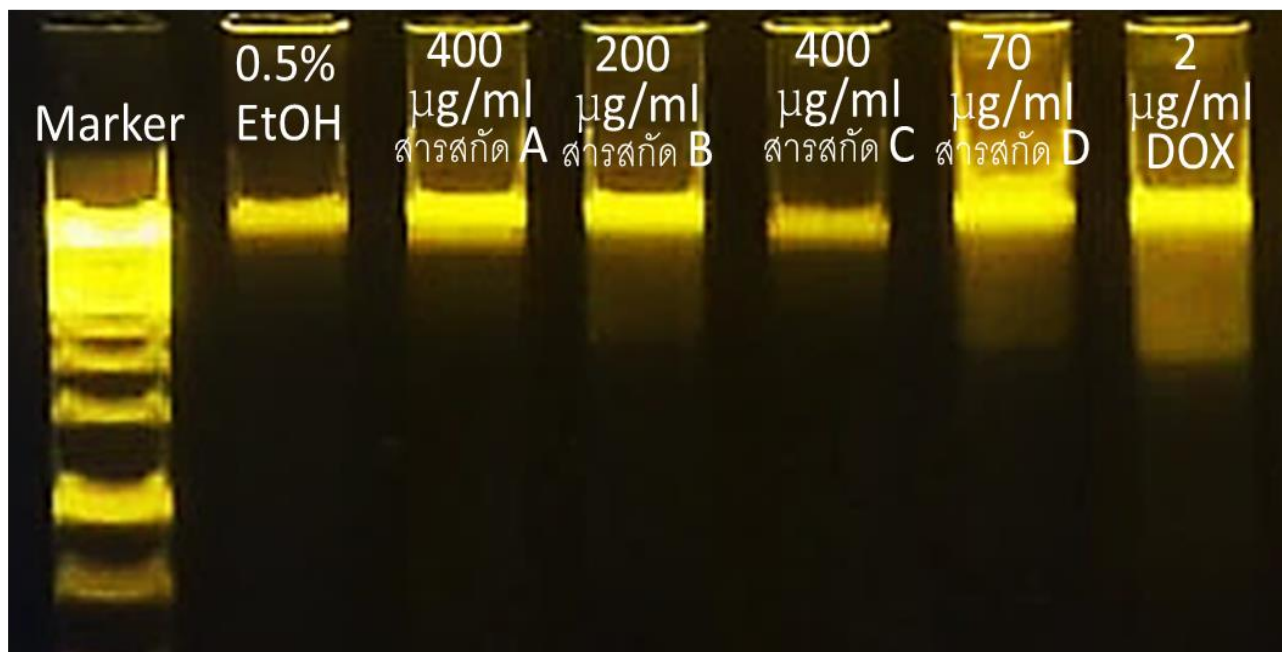


รูปที่ 4 ประสิทธิภาพของ DOXORUBICIN ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm SEM (N=3)

ผลการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis

ทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัด A, B, C และ D ต่อการแตกของ DNA โดยเลี้ยง KB cells ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด A และ C (400 $\mu\text{g/ml}$), สารสกัด B (200 $\mu\text{g/ml}$), สารสกัด D (70 $\mu\text{g/ml}$) DOX (2 $\mu\text{g/ml}$) และ 0.5% EtOH (negative control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน flask ปริมาตร 25 cm^3 จากนั้นนำเซลล์ทั้งหมด (เซลล์เกาะพื้นและเซลล์แขวนลอย) มาสกัด DNA ด้วย GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (VIVANTIS) แล้วนำมาวิเคราะห์การแตกของ DNA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 volt นาน 45 นาที

เมื่อวิเคราะห์การแตกของ DNA แล้วพบว่า กลุ่มที่บ่มด้วย 0.5 % EtOH, สารสกัด A และ C เกิดแถบ (band) หนาเพียง 1 แถบ แสดงว่าสารดังกล่าวไม่มีผลต่อการแตกของดีเอ็นเอ จึงพบ DNA ขนาดใหญ่เคลื่อนที่ได้ไม่ไกล และไม่พบการฟุ้งกระจายของดีเอ็นเอใน agarose gel แตกต่างจากในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด B และ D ซึ่งพบแถบหนา 1 แถบและมีลักษณะเป็น smear band ยาวลงมา แสดงว่ากลุ่มที่บ่มเซลล์ด้วยสารสกัด เกิดการแตกของ DNA ทำให้มีขนาดของ DNA แตกต่างกันไป (DNA fragmentation) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับกลุ่มที่บ่มเซลล์ด้วย DOX (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การเกิด DNA FRAGMENTATION ของ KB CELLS ที่บ่มด้วยสารสกัด A, B, C, D และ DOX วิเคราะห์ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS

ผลการศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI staining

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด A, B, C และ D ต่อการเกิด nuclear fragmentation โดยเลี้ยง KB cells ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ให้เกาะบน cover slide ซึ่งแช่ใน 6 well plate นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด A และ C (400 $\mu\text{g/ml}$), สารสกัด B (200 $\mu\text{g/ml}$), สารสกัด D (70 $\mu\text{g/ml}$) DOX (2 $\mu\text{g/ml}$) และ 0.5% EtOH (negative control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำ cover slide ที่มีเซลล์เกาะอยู่ย้อมด้วย DAPI ซึ่งสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ และศึกษาลักษณะนิวเคลียสภายใต้กล้อง fluorescence microscopy ซึ่ง DAPI มีเป้าหมายที่ nucleic acid เมื่อถูก excitation ด้วยแสงความยาวคลื่น 358 nm จะ emission ได้แสงสีน้ำเงิน (461 nm) เซลล์ที่มีชีวิตจะพบลักษณะการติดสี DAPI กระจายอย่างสม่ำเสมอ (homogenous) ตลอดทั้งนิวเคลียส ในขณะที่ apoptotic cell จะมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนของเส้นใยโครมาติน (chromatin condensation) จึงติดสีน้ำเงินของ DAPI หนาแน่น และมีนิวเคลียสขนาดเล็กกว่าปกติ และเมื่อพบการแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) จึงพบการติดสีแบบกระจายเป็นหย่อมๆ

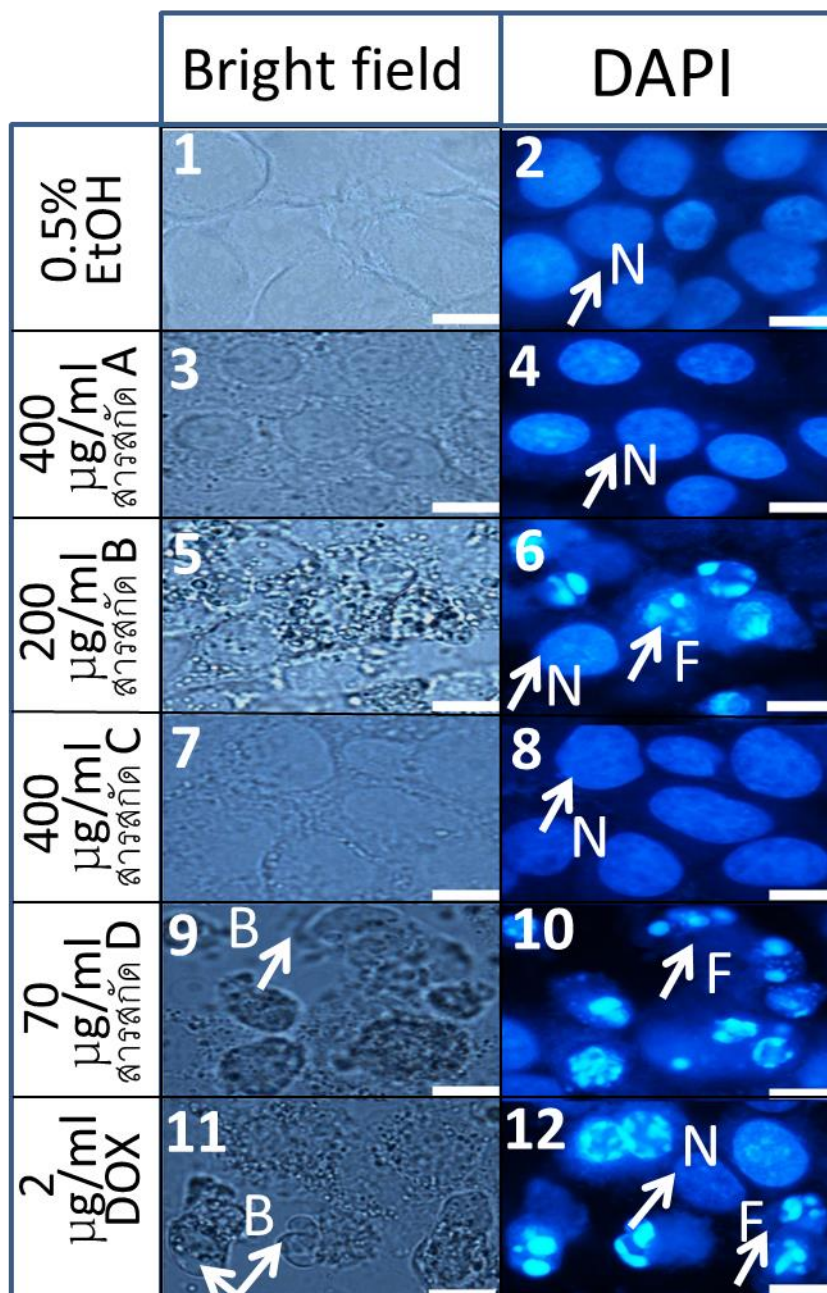
เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์จาก bright field ในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% EtOH พบว่าเซลล์มีลักษณะเหยียดเยื่อหุ้มเซลล์เรียบมีขอบเขตชัดเจน (รูปที่ 6 (1)) ลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI (รูปที่ 6 (2)) พบว่าเซลล์ทั้งหมด (100%) มีนิวเคลียสติดสีฟ้าของ DAPI แบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์

ปกติ เช่นเดียวกับกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด A และ C (400 µg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีลักษณะเหยียดก่อนข้างกลม ซัยโตพลาสซึมขรุขระเล็กน้อย (รูปที่ 6 (3, 7)) และนิวเคลียสติดสีฟ้าของ DAPI แบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ (รูปที่ 6 (4, 8)) จากการนับเซลล์แบบสุ่มในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด A พบเซลล์ปกติ $91 \pm 5.46\%$ ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) เป็นจำนวน $9 \pm 0.65\%$ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด C พบเซลล์ปกติ $88 \pm 6.16\%$ ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) เป็นจำนวน $12 \pm 0.55\%$ (ตารางที่ 2)

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์แบบ bright field ในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด B (200 µg/ml), สารสกัด D (70 µg/ml) และ DOX (2 µg/ml) พบเซลล์ส่วนมากมีลักษณะเซลล์กลม ไม่เหยียด เยื่อหุ้มเซลล์เป็นตุ่มพอง (bleb) ซัยโตพลาสซึมขรุขระ และมีจำนวนของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 6 (5, 9,11)) เมื่อศึกษาลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI พบว่ากลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด B (200 µg/ml) (รูปที่ 6 (6)) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ $39 \pm 2.35\%$ ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) เป็นจำนวนถึง $61 \pm 4.26\%$ การทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด D (70 µg/ml) (รูปที่ 6 (10)) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ $35 \pm 2.89\%$ ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) เป็นจำนวนถึง $65 \pm 3.58\%$ สำหรับ DOX (2 µg/ml) (รูป 6 (12)) พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ $30 \pm 5.93\%$ ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) หรือติดสีฟ้าแน่น (nuclear condensation) เป็นจำนวนถึง $70 \pm 8.66\%$ (ตารางที่ 2) กลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด B, D และ DOX มีจำนวน apoptotic cells เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 2 เปรอ์เซ็นต์การเกิด APOPTOSIS โดยสารสกัด A, B, C, D และ DOX จากการย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI, * = $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

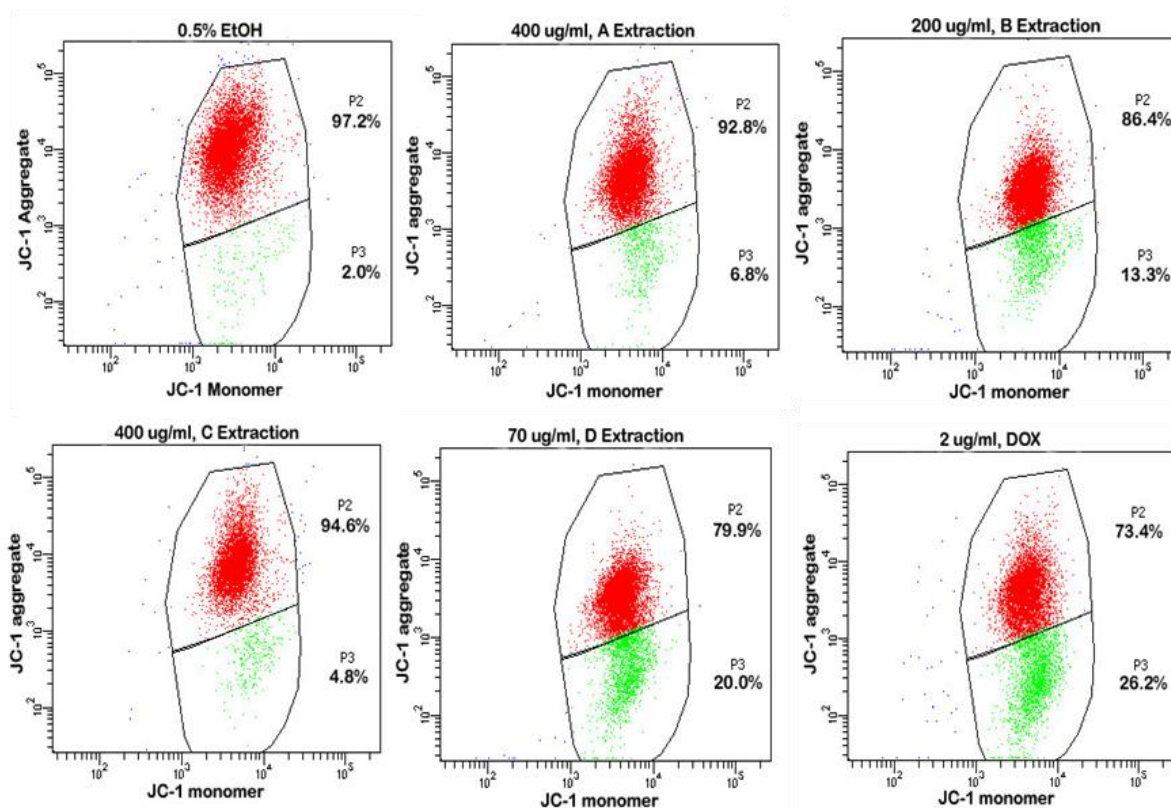
	%Normal cells (homogenous DAPI)	%Apoptotic cells (condensed or fragment DAPI)
0.5% EtOH (negative control)	100	0
สารสกัด A [400 µg/ml]	91 ± 5.46	9 ± 0.65
สารสกัด B [200 µg/ml]	$39 \pm 2.35^*$	$61 \pm 4.26^*$
สารสกัด C [400 µg/ml]	88 ± 6.16	12 ± 0.55
สารสกัด D [70 µg/ml]	$35 \pm 2.89^*$	$65 \pm 3.58^*$
DOX [2 µg /ml] (positive control)	$30 \pm 5.93^*$	$70 \pm 8.66^*$



รูปที่ 6 แสดงลักษณะเซลล์และนิวเคลียสจากกล้องจุลทรรศน์ 1 & 2 = 0.5% ETOH, 3 & 4 = สารสกัด A (400 $\mu\text{G/ML}$), 5 & 6 = สารสกัด B (200 $\mu\text{G/ML}$), 7 & 8 = สารสกัด C (400 $\mu\text{G/ML}$), 9 & 10 = สารสกัด D (70 $\mu\text{G/ML}$), 11 & 12 = DOX (2 $\mu\text{G/ML}$) โดยการย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI, N = NORMAL, F = NUCLEAR FRAGMENTATION, SCALE BAR = 10 μM

ผลการวิเคราะห์การวัดความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย

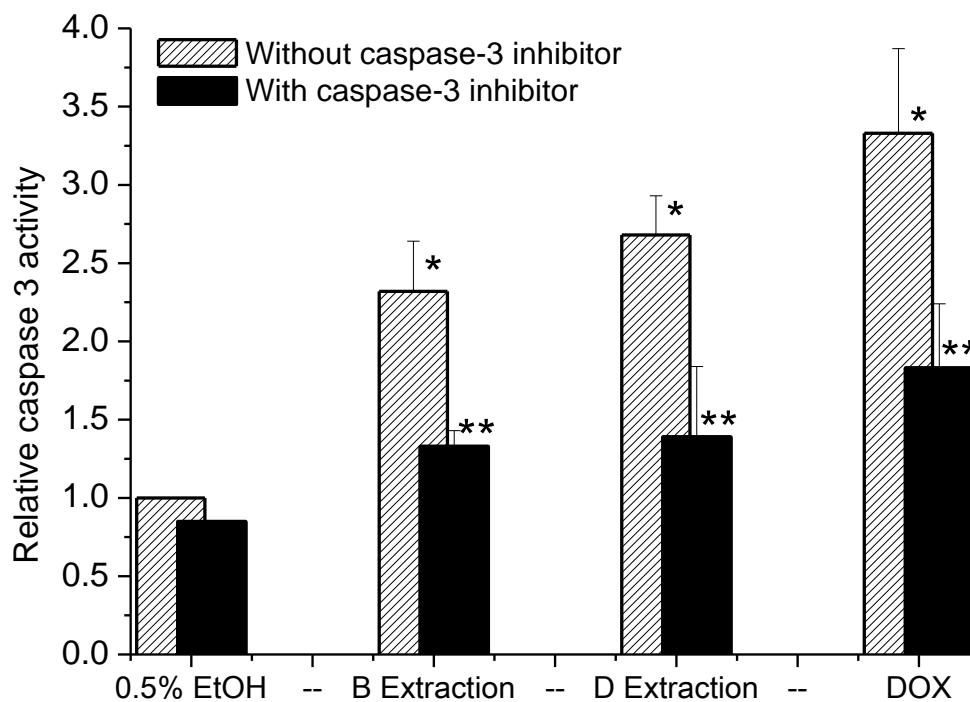
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด A, B, C และ D ต่อการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย โดยเลี้ยง KB cells ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ให้เกาะบน 24-well plate นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด A และ C (400 $\mu\text{g/ml}$), สารสกัด B (200 $\mu\text{g/ml}$), สารสกัด D (70 $\mu\text{g/ml}$), DOX (2 $\mu\text{g/ml}$) และ 0.5% EtOH (negative control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาย้อมด้วยสี JC-1 เมื่อผสมเซลล์ JC-1 ถูก excitation ด้วยแสงความยาวคลื่น 488 nm จะให้การเรืองแสง (emission) 2 ลักษณะดังนี้ ถ้าเป็นเซลล์ปกติมีความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย สี JC-1 จะอยู่ในรูป JC-1 aggregate ให้การเรืองแสงสีแดง (red fluorescence spectrum; ~ 590 nm) แต่ถ้าเซลล์ที่เกิด apoptosis เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียสูญเสียความต่างศักย์ สี JC-1 จะอยู่ในรูป JC-1 monomer ให้การเรืองแสงสีเขียว (green fluorescence spectrum; ~ 529 nm) ในเซลล์กลุ่มที่บ่มสารสกัด B, และ DOX พบจำนวนเซลล์ในรูปของ JC-1 monomer ให้การเรืองแสงสีเขียวเพิ่มขึ้นถึง 13.3, 20, และ 26.2% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีเพียง 2% และในเซลล์กลุ่มที่บ่มสารสกัด A และ C พบจำนวนเซลล์ในรูปของ JC-1 aggregate ให้การเรืองแสงสีเขียว 6.8 และ 4.8% ตามลำดับซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 แสดงความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย จากการติดสี JC-1 โดย JC-1 AGGREGATE ให้การเรืองแสงสีแดง ส่วน JC-1 MONOMER ให้การเรืองแสงสีเขียว

ผลการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase-3

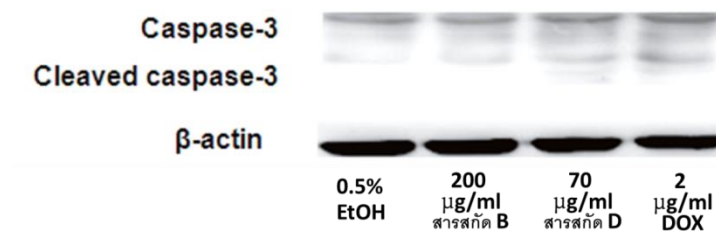
การวัดการทำงานของเอนไซม์ caspase 3 ในเซลล์ โดยนำ KB cells มาบ่มด้วยสารสกัด สารสกัด B (200 $\mu\text{g/ml}$), สารสกัด D (70 $\mu\text{g/ml}$), DOX (2 $\mu\text{g/ml}$) และ 0.5% EtOH (negative control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดย lysis buffer นำส่วน supernatant มาทำปฏิกิริยากับ substrate: Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA) ผลการทดลองพบว่าค่า relative activity ของ caspase-3 ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด B (200 $\mu\text{g/ml}$), สารสกัด D (70 $\mu\text{g/ml}$) และ Dox (1 $\mu\text{g/ml}$) เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 2.32 ± 0.32 , 2.68 ± 0.25 และ 3.33 ± 0.54 เท่าตามลำดับ ซึ่งเป็นการเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ค่า relative activities ของ caspase-3 นั้นถูกยับยั้งโดย DEVD-fmk (caspase-3 inhibitor) โดยมีค่า relative activity ของ caspase-3 ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด B, สารสกัด D และ Dox ลดลงใกล้เคียงกลุ่มควบคุม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.33 ± 0.1 , 1.39 ± 0.45 และ 1.83 ± 0.41 ตามลำดับ ซึ่งเป็นการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ caspase-3 inhibitor แสดงว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัด B และ D นั้นผ่านทาง caspase-3 (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ค่า RELATIVE ACTIVITIES ของ CASPASE-3 จากสารสกัด B, D และ DOX ค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 และค่าที่วัดได้ในกลุ่มอื่นเป็นค่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, ** $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด B, D และ DOX ร่วมกับ CASPASE 3 INHIBITOR

ผลการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis

การวัดโปรตีน caspase 3 ด้วยเทคนิค western blot โดยนำ KB cells มาบ่มด้วยสารสกัด สารสกัด B (200 $\mu\text{g/ml}$), สารสกัด D (70 $\mu\text{g/ml}$), DOX (2 $\mu\text{g/ml}$) และ 0.5% EtOH (negative control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบการแสดงออกของโปรตีน cleaved caspase-3 ในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด B, D และ DOX เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 การแสดงออกของโปรตีน CASPASE-3 และ CLEAVED CASPASE-3 โดย WESTERN BLOT

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

ตัวอย่างผักนึ่งทะเลที่ขึ้นอยู่กับชายฝั่งทะเล บริเวณชุมชนหาดวอนนภาศัพท์ชายทะเลบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี นำไปอบในตู้อบบรรยากาศร้อนสำหรับอบแห้งสมุนไพร แล้วนำผักนึ่งทะเลแห้งมาสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ เอทานอล & น้ำ (1:1), เฮกเซน (hexane; C_6H_{14}) และคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะของไหลยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction, SCO_2) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดพบว่า ผักนึ่งทะเลแห้งบดหยาบสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล & น้ำ ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุดคือ 37.95% รองลงมาคือการใช้เฮกเซนได้ปริมาณสารสกัด 1.90% ส่วนการใช้ตัวทำละลาย SCO_2 เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถแยกสารสกัดผักนึ่งทะเลแห้งออกจากวัตถุดิบได้ จำเป็นต้องใช้ 95% เอทานอลช่วยในการสกัดด้วยจึงจะสามารถเก็บสารสกัดผักนึ่งทะเลแห้งได้เป็นสองส่วนคือ ส่วนมีขี้ได้ปริมาณสารสกัดมากกว่าคือ 1.30% และส่วนขี้ต่ำได้สารสกัดเพียง 0.51%

สารประกอบทางเคมีที่พบในสารสกัดผักนึ่งทะเล โดยการทดสอบด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS) (ไม่ได้แสดงข้อมูล) พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซน และ SCO_2 + เอทานอล ได้สารประกอบทางเคมีค่อนข้างใกล้เคียงกัน เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่มีขี้ค่อนข้างต่ำ ทำให้ได้สารขี้ต่ำในสารสกัดมากกว่า สามารถตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-MS ส่วนสารสกัดที่ได้จากการหมักด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล เมื่อใช้วัตถุดิบแห้ง พบสารประกอบทางเคมีขี้ต่ำน้อยมาก ส่วนใหญ่พบเหลือสารเคมีที่ขี้ค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตาม ควรนำสารสกัดผักนึ่งทะเลทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้ ตรวจจับวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นร่วมด้วย เนื่องจาก GC-MS สามารถวิเคราะห์ได้เฉพาะสารที่ระเหยได้ง่ายเท่านั้น ยังคงมีสารประกอบเคมีที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ ที่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค GC-MS

การสกัดด้วย SCO_2 โดยมีเอทานอลเป็นตัวช่วยสกัด (co-solvent) สามารถสกัดสารทั้งสองกลุ่ม คือ สารสกัดที่มีขี้สูง เช่น ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ แทนนิน ฯลฯ และ สารสกัดที่มีขี้ต่ำ เช่น น้ำมันหอมระเหย คลอโรฟิลล์ ฟิกเมนต์ ฯลฯ ได้ในเวลาเดียวกัน ในด้านความปลอดภัย การสกัดด้วย SCO_2 โดยมีเอทานอลเป็นตัวช่วยสกัด มีความปลอดภัยกว่าการสกัดด้วยเฮกเซน ในการกำจัดตัวทำละลายออกจากสารสกัด เนื่องจาก carbon dioxide จะระเหยออกจากสารสกัดหมดเมื่ออยู่ในสภาวะปกติ และเอทานอลที่ใช้ช่วยในการสกัดก็ปลอดภัยต่อการบริโภคมากกว่าเฮกเซน ซึ่งเป็นปัญหาเรื่องการขจัดตัวทำละลายออกจากสารสกัด เนื่องจากตัวทำละลายที่หลงเหลืออยู่แม้เพียงเล็กน้อยอาจจะเป็นอันตรายต่อร่างกายได้

จากผลการทดลองเปรียบเทียบวิธีสกัดผักนึ่งทะเลด้วยตัวทำละลายมีขี้คือ เอทานอล & น้ำ (สารสกัด A) และตัวทำละลายไม่มีขี้คือเฮกเซน (สารสกัด B) เปรียบเทียบกับการสกัดด้วย SCO_2 โดยมีเอทานอลเป็นตัวทำละลายช่วยในการสกัด (co-solvent) ได้สารสกัด 2 ส่วนคือ สารสกัดส่วนมีขี้ (สารสกัด C) และสารสกัดส่วนขี้

ต่ำ (สารสกัด D) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัด B มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกในระดับต่ำ ($IC_{50} = 200 \pm 12.3 \mu\text{g/ml}$) ส่วนสารสกัด D มีประสิทธิภาพปานกลาง ($IC_{50} = 70 \pm 3.6 \mu\text{g/ml}$) ซึ่งกำหนดโดย American National Cancer Institute (NCI) (Geran et. al., 1972) ในขณะที่สารสกัด A และ C ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก ในขณะที่ DOX มีประสิทธิภาพในระดับสูงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก เนื่องจาก DOX มีโครงสร้างเป็น quinone-containing anthracycline ซึ่งมีเป้าหมายออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจงที่ DNA บริเวณหมู่น้ำตาลใน minor groove ทำให้เอนไซม์ topoisomerase II ซึ่งทำหน้าที่ในการคลายเกลียวของ double helix ไม่สามารถทำงานได้ การสังเคราะห์ DNA จึงหยุดลง และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (Lee et. al., 2002; Wang et. al., 2004) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ DOX ยังมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์มาก เนื่องจากออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ปกติด้วย จึงยังมีข้อจำกัดในการใช้ (Ecuyer et. al., 2006) สำหรับสารสกัด B และ D นั้นมีแนวโน้มทำลายเซลล์มะเร็ง แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (PBMC) ซึ่งงานวิจัยด้านการพัฒนาต้านโรคมะเร็งนั้นได้มุ่งค้นหาโมเลกุลจากพืชสมุนไพร ที่สามารถต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง ขณะเดียวกันก็มีผลข้างเคียงต่ำ

การศึกษากลไกของสารสกัด B และ D ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายนั้น พบว่าสกัด B และ D กระตุ้นให้เกิดสัญญาณ apoptosis ภายในเซลล์ ส่งผลทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเฉพาะ คือ เซลล์หดตัว (cell shrinkage) เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นถุง (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่ม (chromatin condensation) DNA ถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ (DNA fragmentation) และในระยะสุดท้ายส่วนของเซลล์มีการแตกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ เรียก apoptotic bodies ซึ่งหากอยู่ในร่างกาย ส่วนของ apoptotic bodies จะถูกกำจัดโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ macrophage จึงไม่เกิดการกระจายของพยาธิสภาพไปยังเซลล์ข้างเคียง คือไม่ทำให้เกิดการอักเสบเหมือนกับการตายแบบ necrosis (Elmore, 2007) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์จากการศึกษาด้วย microscopy เหมือนกับที่กล่าวมาข้างต้น แต่เป็นการทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งเซลล์ไม่ถูกกำจัดโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นเซลล์ที่เกิด apoptosis ในการทดลองครั้งนี้อาจพัฒนาต่อไปเป็น late apoptosis และ necrosis ได้

การศึกษาด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) พบว่า B และ D ทำให้เกิดการแตกของ DNA โดยพบลักษณะของ smear band เช่นเดียวกับเซลล์ที่บ่มด้วย DOX ซึ่ง smear band เป็นตัวบ่งชี้ว่า DNA ถูกตัดโดยไม่มีแบบแผน (non-random digestion) ซึ่งเป็นลักษณะของการตายแบบ necrosis (Lieberthal et. al., 1996) แต่การตายแบบ apoptosis จะพบลักษณะ ladder band ซึ่งเกิดจากการทำงานของ caspase 3 และ caspase activated DNase (CAD) ไปตัดสาย DNA ที่บริเวณ internucleosome ได้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 180-200 bp จึงมีสาย DNA ปรากฏทั้ง mono-nucleosome และ oligo-nucleosome เพราะฉะนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ ทำให้เซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกตายแบบ apoptosis และสุดท้ายเซลล์

เปลี่ยนแปลงเป็น secondary necrotic cells จึงพบ smear band ที่เกิดจาก DNA fragmentation ของ late apoptotic cells (Gerschenson & Rotello, 1992) และคาดว่าน่าจะพบ ladder band ที่เกิดจาก DNA fragmentation ของ early apoptotic cells ร่วมด้วย แต่เห็นได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรทำการศึกษาที่เวลาต่างๆ กันเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้เกิด ladder band และจากผลการทดลองนี้พบว่า ลักษณะการแตกของ DNA ใน agarose gel นั้นสอดคล้องกับการศึกษาการแตกของนิวเคลียสด้วยวิธี DAPI staining ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) พบว่าสารสกัด B, D และ DOX ทำให้เกิด apoptotic cells โดยมีนิวเคลียสแตก (nuclear fragmentation) พบการติดสี DAPI ไม่สม่ำเสมอ มีการรวมกลุ่มของเส้นใยโครมาติน (chromatin condensation) ทำให้ติดสี DAPI เข้มกว่าปกติและมีขนาดเล็ก

กลไกในระดับไซโตพลาซึมโดยเฉพาะความสำคัญของไมโทคอนเดรียต่อการเกิด apoptosis นั้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัด B, D และ DOX เหนี่ยวนำให้สูญเสียความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (mitochondria depolarization) ทำให้ไมโทคอนเดรียรวม เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียเกิดรอยรั่ว mitochondria permeability transition pore (PTP) สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงนี้ได้จากการย้อมไมโทคอนเดรียด้วยสี JC-1 ซึ่งเป็น lipophilic cation เมื่อเซลล์สูญเสียความต่างศักย์ สี JC-1 จะสะสมในรูป JC-1 monomer (Elmore, 2007) เมื่อ PTP เปิด จะมีโปรตีน apoptogenic factors เช่น cytochrome C รั่วออกมาจากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโตซอล กระตุ้นให้ effector caspases ทำงาน และเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบ apoptosis โดยเอนไซม์ caspases (Cysteine aspartyl-specific proteases) ในส่วนที่เป็น effector caspases ได้แก่ caspase-3 เมื่อถูกกระตุ้นให้ทำงาน จะย่อยโปรตีนโครงสร้างต่างๆ ได้แก่ actin, fodrin, และ lamin ทำให้เซลล์หดตัวมีขนาดเล็กลง (shrinkage) นอกจากนี้ caspase-3 ยังส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ caspase-activated DNase ทำให้เกิด DNA fragmentation (Stennicke & Salvesen, 1998) การศึกษานี้ได้แสดงถึงสารสกัด B, D และ DOX สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกเกิด apoptosis ผ่านการกระตุ้น caspase-3 และภายใต้เงื่อนไขเดียวกัน กลุ่มที่ได้รับ caspase-3 inhibitor (DEVD-fmk) สามารถยับยั้งการเกิด apoptosis ได้ ซึ่งเป็นกลไกที่เรียกว่า caspase3-dependent pathway ซึ่งสอดคล้องกับ ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน caspase-3 โดยเทคนิค Western blotting

สารสกัด B และ D ที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซน และ SCO_2 + เอทานอล น่าจะได้สารประกอบทางเคมีบางชนิดใกล้เคียงกัน เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วค่อนข้างต่ำ เมื่อใช้สาร eugenol เป็นสารตัวแทนในการวิเคราะห์ พบปริมาณสารสกัด (%yield) จากเฮกเซนใกล้เคียงกันกับสารสกัดด้วย SCO_2 + เอทานอล (ไม่ได้แสดงข้อมูล) จากหลักฐานงานวิจัยที่ผ่านมา โดยนำ *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. (Convolvulaceae) ส่วนที่ลอยเหนือดิน (aerial parts) มาทำให้แห้งแล้วหมักด้วย hexane จากนั้นทำสารให้ถึงบริสุทธิ์ด้วย silica gel column chromatography มีตัวทำละลายเป็น CHCl_3 - Me_2CO (7:3) สารตัวอย่างถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC พบ

สารกลุ่ม resin glycosides: lipophilic oligosaccharides (jalapinic acid) ได้แก่ pescaproside B และ pescapreins V-IX ซึ่งสารดังกล่าวนี้ขึ้นอยู่กับส่วนสกัดที่เป็น low-polarity resin glycosides (Escobedo-Martínez & Pereda-Miranda, 2007) ต่อมา Yu และคณะในปี 2011 ศึกษา *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. (Convolvulaceae) โดยนำส่วนที่ลอยเหนือดิน (aerial parts) มาทำให้แห้งแล้วหมักด้วย 95% EtOH ที่ 80 C จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย silica gel column chromatography มีตัวทำละลายเป็น CH_2Cl_2 -MeOH (100:2 to 100:30, v/v) ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน พบสาร Pescapreins XXI-XXX (1-10) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม pentasaccharide resin glycosides สารดังกล่าวออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมที่คือต่อยา doxorubicin (MCF-7/ADR) และที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/mL}$ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของยา doxorubicin ได้ถึง 1.5-3.7 เท่า

Resin glycosides (glycolipids หรือ lipo-oligosaccharides) พบมากในพืช family Convolvulaceae มีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย สำหรับ genus *Ipomoea* นั้นมี 300 species กระจายอยู่ตามภูมิภาคเขตร้อน (tropical regions) ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญของสาร tetra และ pentasaccharide resin glycosides ซึ่งมีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายเช่น cytotoxicity และ ยับยั้งการคือยา (Yu et. al., 2011; Figueroa-Gonzalez et. al., 2012), antibacterial และ bacterial multidrug efflux pumps blocking (Pereda-Miranda et. al., 2006) เป็นต้น นอกจากนี้มีหลักฐานจากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า essential oils ได้แก่ limonene, α -terpineol, α -humulene, α -thujene, α -pinene, eugenol, และ β -myrcene ซึ่งพบในพืชหลายชนิดนั้น มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ (Afoulous et. al., 2011) เช่นเดียวกันในใบของ *Ipomoea pes-caprae* ก็มี essential oils หลายชนิดเช่นกัน (Daniel et. al., 2011) ซึ่งน่าจะมียฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ แต่ยังไม่มียารายงานดังกล่าว จากหลักฐานที่กล่าวมาข้างต้นนั้นสอดคล้องกับสารสกัด B และ D ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกและเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis นั้นมีสารที่ออกฤทธิ์ละลายอยู่ในตัวทำละลายที่มีขั้วค่อนข้างต่ำ จึงควรมีการศึกษาในขั้นต่อไปเพื่อแยกเป็นสารบริสุทธิ์

อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่ขัดแย้งกับผลการวิจัยในครั้งนี้ Manigauha และคณะในปี 2015 ได้ฉีดสารสกัด (ตัวทำละลายแตกต่างกัน) *Ipomoea pes-caprae* ขนาด 25 และ 50 mg/kg/ body wt. เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) ของ C57BL mice (melanoma cancer) ร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด (chemotherapy) และรังสีรักษา (radiotherapy) พบว่าก่อนเนื้องอกในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด *Ipomoea pes-caprae* นั้นมีขนาดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเนื้องอกมีขนาดใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา Dacarbazine และประสิทธิภาพของการยับยั้งก่อนเนื้องอกขึ้นกับตัวทำละลายที่แตกต่างกันตามลำดับดังนี้ methanolic extract > aqueous extract > swaras > petroleum ether extract แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์ได้ดีที่สุดใน การทดลองนี้คือสารที่มีขั้ว (polar) ได้แก่ alkaloids, flavonoids, tannins, terpenoids, และ glycosides ซึ่งมีมากในสารที่สกัดด้วยตัวทำละลาย methanol และ aqueous ถึงแม้ว่าสารสกัด B และ D ละลายอยู่ในตัวทำละลายที่มีขั้ว

ค่อนข้างต่ำ ซึ่งตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เพราะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลไม่มีขั้ว เป็นแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) เหมือนกัน แต่จะไม่ละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว แต่ถ้าในกรณีที่ สารชนิดอื่นๆ ในสารสกัด B และ D มีขั้วสูงกว่าอีกสารตัวหนึ่ง ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่มี ขั้วต่ำก็ลดลง หรืออาจจะละลายได้เพียงบางส่วนเท่านั้น อีกส่วนที่เหลือละลายในสารละลายที่มีขั้ว

งานวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็งในปัจจุบันเน้นไปทางด้าน cancer biology อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยยา แผนปัจจุบันมีข้อจำกัดมาก เนื่องจากผู้ป่วยมักจะตอบสนองต่อการรักษาในระยะแรกเท่านั้น ต่อมาเกิดการดื้อยา ทำให้ต้องเพิ่มขนาดยาขึ้น ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงต้องค้นหาสารชนิดใหม่จากธรรมชาติอยู่ตลอดเวลา เพื่อ เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายด้วยกระบวนการ apoptosis ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัด D มีประสิทธิภาพ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกดีกว่าสารสกัด B อาจเกิดจากชนิดและจำนวนของสารออกฤทธิ์ แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดจากผักบึงทะเลที่นำมาศึกษานั้นยังเป็นสารสกัดหยาบซึ่ง มีโมเลกุลหลาย ชนิดรวมอยู่ด้วยกัน ซึ่งอาจมีทั้งสารที่ออกฤทธิ์ และไม่ออกฤทธิ์ จึงยังไม่ทราบถึงคุณลักษณะของสารสำคัญที่ ออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งจะได้มีการศึกษาในขั้นต่อไป

สรุปและเสนอแนะ

สรุป

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผักบึงทะเลแห้ง ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก พบว่า สารสกัดด้วย SCO_2 + เอทานอล (สารสกัดส่วนขี้ด้า) มีประสิทธิภาพปานกลาง, สารสกัดด้วยเฮกเซนมีประสิทธิภาพต่ำ และสารสกัดด้วย เอทานอล & น้ำ และ SCO_2 + เอทานอล (สารสกัดส่วนมีข้าว) นั้นไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก จากการวิเคราะห์การแตกของ DNA ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าทำให้ DNA แตกเป็น smear band การวิเคราะห์การแตกของนิวเคลียสด้วยเทคนิค DAPI staining พบว่าทำให้เกิด chromatin condensation และ nuclear fragmentation และสอดคล้องกับการสูญเสียความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (mitochondria depolarization) ทำให้ไมโทคอนเดรียวมเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียเกิดรอยร้าว มีกลไกระดับซัยโตพลาสมเป็น caspase 3-dependent pathway ซึ่งจากหลักฐานดังกล่าวนี้พอที่จะสรุปได้ว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งช่องจมูกตายแบบ apoptosis

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับ โปรตีน เพื่อยืนยันการตายแบบ apoptosis
2. ควรมีการทดลองในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นและในสัตว์ทดลอง
3. ควรนำมาสกัดเป็นสารบริสุทธิ์
4. ควรนำมาทดลองร่วมกับยาแผนปัจจุบัน

ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัย

สารสกัดที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเพื่อใช้ร่วมกับเคมีบำบัดเป็นการรักษาแบบผสมผสาน (complementary therapies) ลดการการพัฒนาลูกกลมของเซลล์มะเร็ง และลดผลข้างเคียงที่จะเกิดจากการรักษาด้วยเคมีบำบัด หรืออาจใช้เป็นสารจากธรรมชาติ เพื่อป้องกันหรือยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งในระยะยาว (chemopreventive agent)

บรรณานุกรม (Bibliography)

- Abraham AC, Castilho RM, Squarize CH, et al. A role for COX2-derived PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. *Oral Oncol.* 2010, 46; 880–7.
- Afoulous S, Ferhout H, Raelison EG, Valentin A, Moukarzel B, Couderc F, et al. Helichrysum gymnocephalum essential oil: Chemical composition and cytotoxic, antimalarial and antioxidant activities, attribution of the activity origin by correlations. *Molecules.* 2011,16; 8273–91.
- Bandaranayake WM. Traditional and medicinal uses of mangroves. *Mangroves Salt Marshes.* 1998, 2; 133-48.
- Cao S, Guzza RC, Wisse JH, Miller JS, Evans R, Kingston DGI. Ipomoeassins A-E, cytotoxic macrocyclic glycoses from the leaves of *Ipomoea squamosa* from the Suriname rainforest. *J Nat Prod.* 2005, 68; 487-92.
- Chen B, Su B, Chen S. A COX-2 inhibitor nimesulide analog selectively induces apoptosis in Her2 overexpressing breast cancer cells via cyto-chrome c dependent mechanisms. *Biochem Pharmacol.* 2009, 77; 1787–94.
- Daniel EP, Brkic D, Joelle QL. GC-MS Analysis of the leaf essential oil of *Ipomea pes-caprae*, a traditional herbal medicine in mauritius. *Nat Prod Commun.* 2007, 2; 1225–8.
- De Souza MM, Madeira A, Berti C, Krogh C, Yunes RA, Cechinel-Filho V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. *J Ethnopharmacol.* 2000, 69; 85–90.
- Dormond O, Foletti A, Paroz C, Guegg C. NSAIDs inhibit alpha V beta 3 integrin mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nature Med.* 2001, 7; 1041–7.
- Ecuyer TL, Sanjeev S, Thomas R, Novak R, Das L, Campbell W, Heide V. DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006, 29; H1273–H1280.
- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007, 35; 495–516.
- Emendorfer F, Emendorfer F, Bellato F, Noldin V F, Niero R, Cechinel-Filho V, Cardozo AM. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 2005, 8; 63-8.
- Escobedo-Martínez C & Pereda-Miranda R. Resin Glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. *J Nat Prod.* 2007, 70; 974-8.

- Ferrandina G, Legge F, Ranelletti RO, et al. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial carcinoma: correlation with clinicopathological parameters and clinical outcome. *Cancer*. 2002, 95; 801–7.
- Figueroa-Gonzalez G, Jacobo-Herrera N, Zentella-Dehesa A, Pereda-Miranda R. Reversal of Multidrug Resistance by Morning Glory Resin Glycosides in Human Breast Cancer Cells. *J Nat Prod*. 2012, 75; 93–7.
- Genc, S, Attar E, Gu" rdo" 1 F, et al. The effect of COX-2 inhibitor, nimesulide, on angiogenic factors in primary endometrial carcinoma cell culture. *Clin Exp Med*. 2007, 1; 6–10.
- Geran RI, Greenberg NH, Macdonald MM, Shumacher AM, Abbott BJ. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemoth Rep*. 1972, 3: 1-103.
- Gerschenson LE & Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J*. 1992, 6; 2450-5.
- Hasegawa K, Ohashi Y, Ishikawa K, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in uterine endometrial cancer and anti-tumor effects of a selective COX-2 inhibitor. *Int J Oncol*. 2005, 26; 1419–28.
- Hazra S, Dubinett S. Ciglitazone mediates COX-2 dependent suppression of PGE2 in human non-small cell lung cancer cells. *Prostagl Leukotr Ess Fatty Acids*. 2007, 77; 51–8.
- Kilic G, Gurates B, Garon J, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in endometrial adenocarcinoma. *Eur J Gynaeco Onco*. 2005, 26; 271–4.
- Lee S, Baek M, Kim HY, Ha JH & Jeoung DI. Mechanism of doxorubicin-induced cell death and expression profile analysis. *Biotechnol Lett*. 2002, 24; 1147–51.
- Lieberthal W, Triaca V and Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1996, 270(4); 700–8.
- Manigaunha A, Ganesh N & Kharya MD. Morning glory: A new thirst in-search of de-novo therapeutic approach. *Int J Phytomed*. 2010, 2; 18-21.
- Manigauha A, Kharya MD, Ganesh N. *In vivo* antitumor potential of *Ipomoea pes-caprae* on melanoma cancer. *Pharmacogn Mag*. 2015, 11(42); 426–33.
- Meira M, Pereira da Silva E, David JM, David JP. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Brazilian J Pharmaco*. 2012, 22(3); 682-713.
- Nam KA, Lee SK. Evaluation of cytotoxic potential of natural products in cultured human cancer cells. *Nat Prod Sci*. 2000, 6; 183-8.

- Özalp SS, Eren CY, Bostancıoğlu RB, Koparal AT. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by the cyclooxygenase enzyme blocker-nimesulide in the Ishikawa endometrial cancer cell line. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012, 164(1); 79-84.
- Pereda-Miranda R, Escalante-Sa'nchez E, & Escobedo-Martí'nez C. Characterization of Lipophilic Pentasaccharides from Beach Morning Glory (*Ipomoea pes-caprae*). *J Nat Prod.* 2005, 68; 226-30.
- Pereda-Miranda R, Kaatz GW, Gibbons S. Polyacylated Oligosaccharides from Medicinal Mexican Morning Glory Species as Antibacterials and Inhibitors of Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus* *J Nat Prod.* 2006, 69; 406-9.
- Philippi ME, Duarte BM, Da Silva CV, De souza MT, Niero R, Filho VC & Bueno EC. Immunostimulatory activity of *Calophyllum Brasiliense*, *Ipomoea Pes-caprae* and *Matayba Elaeagnoides* demonstrated by human peripheral blood mononuclear cells proliferation. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research.* 2010, 67(1); 69-73.
- Pongprayoon U, Baeckstrom P, Jacobsson U, Lindstrom M, Bohlin L. Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Medica.* 1992, 58(1); 19-21.
- Pongprayoon U, Bohlin L, Soonthornsaratune P, Wasuwat S. Anti-Inflammatory activity of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. *Phytother Res.* 1991, 5 (2); 63-6.
- Prasad KN, Ashok G, Raghu C, Shivamurthy GR, Vijayan P, Aradhya SM. In vitro cytotoxic properties of *Ipomoea aquatica* leaf. *Indian J Pharmacol.* 2005a, 37; 397-98.
- Prasad KN, Divakar S, Shivamurthy GR, Aradhya SM. Isolation of a free radical-scavenging antioxidant from water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk). *J Sci Food Agric.* 2005b, 85; 1461-68.
- Rogers KL, Grice ID, Griffiths LR. Inhibition of platelet aggregation and 5-HT release by extracts of Australian plants used traditionally as headache treatments. *Eur J Pharm Sci.* 2000, 9; 355-63.
- Stennicke HR and Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta.* 1998, 1387; 17-31.
- Sun SY, Hail JRN, Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004, 96; 662-72.
- Tao H, Hao X, Liu J, Ding J, Fang Y, Gu Q, & Zhu W. Resin Glycoside Constituents of *Ipomoea pes-caprae* (Beach Morning Glory). *J Nat Prod.* 2008, 71; 1998-2003.
- Teramachi F, Koyano T, Kowithayakor T, Hayashi M, Komiyama K, Ishibashi M. Collagenase inhibitory quinic acid ester from *Ipomoea pes-caprae*. *J Nat Prod.* 2005, 68; 794-96.

- Umamaheshwari G, Ramanathan T, & Shanmugapriya R. Antioxidant and Radical Scavenging effect of *Ipomoea pes-caprae* Linn. R.BR. Int J PharmTech Res.2012, 4(2); 848-51.
- Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S and Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. J Biol Chem. 2004, 279(24); 25535–43.
- Yu BW, Luo JG, Wang JS, Zhang DM, Yu SS, Kong LY. Pentasaccharide resin glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. J Nat Prod. 2011, 74(4); 620-8.
- Yu L, Chen M, Li Z, et al. Celecoxib antagonizes the cytotoxicity of cisplatin in human esophageal squamous cell carcinoma cells by reducing intracellular cisplatin accumulation. Mol. Pharmacol. 2011, 79; 608–17.

บทคัดย่อ

บทนำ โรคมะเร็งหลังโพรงจมูกเป็นโรคร้ายแรง ยาหลายชนิดออกฤทธิ์เหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการทำลายเซลล์มะเร็งแบบมุ่งเป้า การค้นหาสมุนไพรต้านมะเร็งโดยเฉพาะผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae*) เป็นสิ่งจำเป็นเนื่องจากมีต้นทุนต่ำ และมีสรรพคุณหลายด้าน เช่นลดการอักเสบ, แก้ปวด, ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตัวทำละลายและวิธีที่ใช้ในการสกัด

วัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ของสารสกัดผักบุ้งทะเลแห่งที่ได้จากวิธีสกัดแตกต่างกันคือ เอทานอล & น้ำ, เฮกเซน, และคาร์บอนไดออกไซด์ในสถานะของไหลยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction, SCO_2)

วิธีการทดลอง เตรียมสารสกัดผักบุ้งทะเลแห่งตามชนิดของตัวถูกละลายได้แก่ เอทานอล & น้ำ (สารสกัด A), เฮกเซน (สารสกัด B), SCO_2 + เอทานอล (สารสกัดส่วนมีขี้) (สารสกัด C), และ SCO_2 + เอทานอล (สารสกัดส่วนขี้ต่ำ) (สารสกัด D) นำสารสกัดมาบ่มกับเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก (KB cells) นาน 48 ชั่วโมง ศึกษาการเจริญของเซลล์ด้วย MTT assay นับจำนวนนิวเคลียสที่มีอะโพโทซิสโดยการย้อมสี DAPI วิเคราะห์ผลด้วย fluorescent microscopy ศึกษาการแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis ศึกษาความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียโดยการย้อมสี JC-1 วิเคราะห์ผลด้วย flow cytometry จากนั้นวัด caspase-3 activity และการแสดงออกของโปรตีน caspase-3

ผลการทดลอง สารสกัด A และ C ไม่เป็นพิษต่อ KB เซลล์ ขณะที่สารสกัด B มีพิษระดับต่ำ ($IC_{50} = 200 \pm 12.3 \mu\text{g/ml}$) และ สารสกัด D มีพิษระดับปานกลาง ($IC_{50} = 70 \pm 4.2 \mu\text{g/ml}$) พบว่าเซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเซลล์ที่ตายหลุดจากพื้นผิวง่าย มี apoptotic body พบโครมาตินหนาแน่น นิวเคลียสติดสี DAPI เป็นหย่อมๆ มี DNA ฟูกระจายใน agarose gel เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการการสูญเสียความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (mitochondria depolarization) การแสดงออกของโปรตีน caspase-3 และ caspase-3 activity ที่เพิ่มขึ้น

สรุป สารสกัด B และ D สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขี้ก่อนข้างต่ำ ออกฤทธิ์เหนี่ยวนำให้ KB เซลล์ตายด้วย apoptosis ผ่านทาง caspase-3 dependent pathway และการสกัดด้วย SCO_2 โดยมีเอทานอลเป็นตัวช่วยสกัด (co-solvent) สามารถสกัดสารต้านมะเร็งได้ดีกว่าการสกัดด้วยเฮกเซน จึงมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเพื่อใช้ร่วมกับเคมีบำบัดเป็นการรักษาแบบผสมผสาน (complementary therapies)

คำสำคัญ: *Ipomoea pes-caprae*, KB cells, คาร์บอนไดออกไซด์ในสถานะของไหลยิ่งยวด, อะโพโทซิส, การแตกของ DNA, แคสเปส-3

Abstract

Background Nasopharyngeal cancer is a major health problem. The concurrent therapy also leads to apoptotic cancer cell death that presents a target for molecular therapeutics. Research in the development of medicinal plant especially *Ipomoea pes-caprae* has been focused on screening because they are inexpensive and rich resources of biological activity like antiinflammation, antinociception, anticancer and antioxidant. These activities are depending on solvent and method of extraction.

Objectives To compare the anti-cancer activities and apoptotic mechanisms of the different solvent extraction from *Ipomoea pes-caprae* against human carcinoma of nasopharynx (KB cells).

Methods The dry plant was powdered and extracted by maceration with ethanol & water (A extraction), hexane (B extraction). Supercritical carbon dioxide (SCO₂) + ethanol are used as the extraction solvent for polarity extraction (C extraction) and low polarity extraction (D extraction). A-D extractions were treated with KB cells. The viable cell number is based on MTT colorimetric assay. Apoptosis was assessed by nuclear staining with DAPI, agarose gel electrophoresis for DNA fragmentation assay. The mitochondria membrane potential was analyzed by flow cytometry of cells stained with JC-1. Protein caspase-3 and caspase-3 activity were analyzed.

Results The A and C extraction were non-toxic but the B and D extraction inhibited KB cells with IC₅₀ of 200 ± 12.3 and 70 ± 4.2 which were low and moderate activities. The molecular mechanisms of cell death were associated with the increasing of chromatin condensation, DNA fragmentation and mitochondria membrane depolarization compared with control cells. Apoptosis enhancement was accompanied by increasing in caspase-3 protein and the relative activity of caspase-3 which was significantly attenuated in a caspase-3 inhibitor.

Conclusions The B and D extraction were extracted using low-polarity solvents and the induction of apoptosis involved the activation of effector caspases-3. The SCO₂ + ethanol (low polarity extraction) exhibited stronger anti-cancer activity as compared to hexane extraction. Thus, D extraction would represent a promising source for its ability to discovery of interesting anticancer compounds. The elucidation of low-polarity phytoconstituents will be addressed in future studies.

Key words *Ipomoea pes-caprae*, KB cells, Supercritical carbon dioxide, Apoptosis, DNA fragmentation, Caspase-3

สารบัญเรื่อง

บทนำ (INTRODUCTION)	1
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	3
วัตถุประสงค์โครงการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	5
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
เนื้อเรื่อง (MAIN BODY)	6
วิธีดำเนินการวิจัย.....	6
การเก็บผักบั้งทะเลและพิสูจน์เอกลักษณ์	6
การสกัดสารจากผักบั้งทะเล	6
ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ.....	6
การเตรียมเซลล์มะเร็ง (Human cancer cell lines)	7
ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ	7
วิเคราะห์การแตกของ DNA โดยวิธี agarose gel electrophoresis	8
ศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI staining	8
การวัดความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย.....	9
ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase 3	9
ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis	10
การแสดงข้อมูล	10
ผลการวิจัย (RESULTS).....	11
การเตรียมวัตถุดิบผักบั้งทะเล	11
การสกัดผักบั้งทะเล	12
รายงานเอกลักษณ์ (specification sheet) ของสารสกัดผักบั้งทะเล.....	13
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติ (PBMC).....	14
ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT.....	15
ผลการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis	17
ผลการศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI staining	18
ผลการวิเคราะห์การวัดความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย	21
ผลการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase-3	22
ผลการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis.....	23
อภิปราย/วิจารณ์ (DISCUSSION)	24
สรุปและเสนอแนะ	29
สรุป.....	29
ข้อเสนอแนะ	29
ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัย	29
บรรณานุกรม (BIBLOGRAPHY)	30
บทคัดย่อ	ก
ABSTRACT	ข

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดผักนึ่งทะเลที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	13
ตารางที่ 2 เปอร์เซนต์การเกิด APOPTOSIS โดยสารสกัด A, B, C, D และ DOX จากการย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI, * = $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม	19

สารบัญภาพ

รูปที่ 1	ผักบุงทะเล (<i>IPOMOEA PES-CAPRAE</i>).....	11
รูปที่ 2	ประสิทธิภาพของสารสกัด A, B, C และ D ต่อการการเจริญของ PBMC ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm SEM (N=3).....	15
รูปที่ 3	ประสิทธิภาพของสารสกัด A, B, C และ D ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm SEM (N=3).....	16
รูปที่ 4	ประสิทธิภาพของ DOXORUBICIN ต่อการยับยั้งการเจริญของ KB CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm SEM (N=3).....	17
รูปที่ 5	การเกิด DNA FRAGMENTATION ของ KB CELLS ที่บ่มด้วยสารสกัด A, B, C, D และ DOX วิเคราะห์ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS	18
รูปที่ 6	แสดงลักษณะเซลล์และนิวเคลียสจากกล้องจุลทรรศน์ 1 & 2 = 0.5% ETOH, 3 & 4 = สารสกัด A (400 μ G/ML), 5 & 6 = สารสกัด B (200 μ G/ML), 7 & 8 = สารสกัด C (400 μ G/ML), 9 & 10 = สารสกัด D (70 μ G/ML), 11 & 12 = DOX (2 μ G/ML) โดยการย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI, N = NORMAL, F = NUCLEAR FRAGMENTATION, SCALE BAR = 10 μ M	20
รูปที่ 7	แสดงความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียจากการติดสี JC-1 โดย JC-1 AGGREGATE ให้การเรืองแสงสีแดง ส่วน JC-1 MONOMER ให้การเรืองแสงสีเขียว	21
รูปที่ 8	ค่า RELATIVE ACTIVITIES ของ CASPASE-3 จากสารสกัด B, D และ DOX ค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 และค่าที่วัดได้ในกลุ่มอื่นเป็นค่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, ** $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด B, D และ DOX ร่วมกับ CASPASE 3 INHIBITOR.....	22
รูปที่ 9	การแสดงออกของโปรตีน CASPASE-3 และ CLEAVED CASPASE-3 โดย WESTERN BLOT.....	23

คำอธิบายสัญลักษณ์

Caspase	Cysteine aspartyl-specific proteases
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DOX	Doxorubicin
EtOH	Ethanol
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
KB cells	Human carcinoma of nasopharynx cell
MAG	Mineral Agar Gause
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide tetrazole
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidium iodide
SEM	Standard error of mean
SCO ₂	Supercritical carbon dioxide
USP	United States Pharmacopeia