สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและอะโพโทซิส ของสารสกัดจาก *Sargassum oligocystum Montagne*

Antiproliferative activities and induction of apoptosis by the extracts of Sargassum oligocystum Montagne on cancer cells

นางสาวจันทรวรรณ แสงแข
นางสาวธิดารัตน์ น้อยรักษา
นางสาวจงกลณี จงอร่ามเรือง

ฝ่ายหนังสือ
16 ส.ค. 2554
291568

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ 2553

เริ่มยืมได้
7 ต.ค. 2554

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและอะโพโทซิส ของสารสกัดจาก *Sargassum oligocystum* Montagne

Antiproliferative activities and induction of apoptosis by the extracts of *Sargassum oligocystum* Montagne on cancer cells

ชื่อผู้วิจัย นางสาวจันทรวรรณ แสงแข [1] นางสาวธิดารัตน์ น้อยรักษา [2] นางสาวจงกลณี จงอร่ามเรือง [3]

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท...การวิจัยพื้นฐาน .ประจำปี...2553...จำนวนเงิน...153,200.-....
ระยะเวลาทำการวิจัย 1.2 ปี ตั้งแต่...ธันวาคม 2552.ถึง...กุมภาพันธ์...2554.....

หน่วยงาน [1] คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา [2] สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา [3] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

สาหร่ายสีน้ำตาลถูกใช้ในยุคโบราณ มีส่วนประกอบหลายชนิดออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่นยับยั้งเซลล์มะเร็งและกระตุ้นอะโพโทซิส การศึกษานี้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum oligocystum* Montagne (SOM) บริเวณฝั่งทะเลอ่าวไทย ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก และอะโพโตซีส ตัวอย่างสดของ SOM ถูกนำมาสกัดด้วย dichloromethane และ ethyl acetate (1:1) ได้เป็นสารสกัดหยาบ นำมาบ่มกับเซลล์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันนาน 72 ชั่วโมง ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยในเซลล์มีชีวิตมีเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ซึ่งจะเปลี่ยนสารละลาย tetrazolium salt (MTT) ได้เป็น formazan นับจำนวนนิวเคลียสที่มีลักษณะอะโพโทซิสโดยการย้อยสี DAPI และ Propidium iodide (PI) ศึกษาการแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis สารสกัด SOM ทำให้เซลล์ตาย โดยการตายเพิ่มขึ้นตามขนาดความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ที่ความเข้ม 132 ± 5.63 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50% โดยเซลล์ที่ตายหลุดจากพื้นผิวง่าย มี apoptotic body เซลล์มีลักษณะกลม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เหยียดเกาะพื้นเป็นรูปกระสวย การประเมินเชิงปริมาณโดยย้อมสีนิวเคลียสด้วย DAPI และ PI พบโครมาตินหนาแน่น นิวเคลียสแตก เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีลักษณะกลมติดสีเรียบเนียน พบเซลล์มีชีวิตที่มีลักษณะอะโพโตซีส 20 ± 3.9%, เซลล์ตายแบบอะโพโตซีสระยะหลัง 6.84 ± 0.7% และเซลล์ปกติ 40.32 ± 4.5% นอกจากนี้ยังพบการแตกของ DNA ฟุ้งกระจายใน agarose gel ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด SOM ทำให้เซลล์ตายร่วมกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่เป็นลักษณะเฉพาะของอะโพโตซีสเช่น ผนังเซลล์เป็นตุ่ม, โครมาตินหนาแน่น, นิวเคลียสและDNA แตก ซึ่งอะโพโตซีสเป็นกลยุทธ์สำคัญที่ใช้รักษาโรคมะเร็ง ในการศึกษาครั้งต่อไปควรเพิ่มรายละเอียดในกลไกของอะโพโทซิส

คำสำคัญ : *Sargassum oligocystum* Montagne, HeLa cells, ยับยั้งการเจริญเติบโต, อะโพโทซิส, การแตกของ DNA

Abstract

Brown seaweeds have been historically used and contained a wide variety of compounds with various biological activities including inhibit cell proliferation and stimulate apoptosis. In this study, we examined the anti-proliferative and apoptotic properties of *Sargassum oligocystum* Montagne (SOM) from the east coast of the Gulf of Thailand using human cervical cancer cell line (HeLa) as a model system. The fresh samples were extracted and treated with HeLa cells. The cell proliferation assay is based on metabolic reduction of soluble tetrazolium salt (MTT) by mitochondrial dehydrogenase of viable cells to formazan dye. The quantitation of apoptotic nuclear morphology was counted using fluorescenc double staining: DAPI and Propidium iodide (PI). Qualitative analysis of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis was observed. The SOM extracts inhibited the proliferation of HeLa cells in a dose-dependent manner with an IC_{50} of 132 ± 5.63 µg/ml. Morphological alteration in SOM-treated HeLa cells were detached from the surface and rounded with apoptotic body when compared with cuboid and polygonal in control cells. Nuclear morphology stained with DAPI and PI exhibited chromatin condensation and nuclear fragmentation as compared to control with rounded nuclei. Quantitative estimation was 20 ± 3.9% (apoptotic nuclei), 6.84 ± 0.7% (late apoptotic nuclei), and 40.32 ± 4.5% (normal nuclei). Qualitative DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis showed undefined outline due to DNA diffusing into agarose. These results indicated that SOM extracts induced cell death via morphological changes typical of apoptosis including membrane blebbing, chromatin condensation, nuclear and DNA fragmentation. Because apoptosis may have a major impact on the therapy of cancer, further investigation is needed to confirm and characterize the apoptotic pathway.

Key words: *Sargassum oligocystum* Montagne, HeLa cells, Anti-proliferation, Apoptosis, DNA fragmentation

สารบัญ

บทที่ 1 ..... **1**

บทนำ **1**

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย 2
ขอบเขตของการวิจัย 3

บทที่ 2 ..... **4**

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง **4**

สรรพคุณทางการแพทย์แผนโบราณ 4
สารเคมีสำคัญ 5
ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสาหร่ายสีน้ำตาล 5

บทที่ 3 ..... **8**

วิธีการทดลอง **8**

การเก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเล 8
การสกัดสารตัวอย่าง 9
การเลี้ยงเซลล์ (CELL CULTURE) 9
ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT 9
วิเคราะห์การแตกของ **DNA** โดย **AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS** 10
ศึกษาลักษณะทาง MORPHOLOGY ของ DNA โดย **DAPI & PI STAINING** 11
การแสดงข้อมูล 12

บทที่ 4 ..... **13**

ผลการทดลอง **13**

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT 13
ผลการวิเคราะห์การแตกของ **DNA** โดย **AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS** 15
ผลการศึกษาลักษณะทาง MORPHOLOGY ของ DNA โดย **DAPI & PI STAINING** 17

บทที่ 5 ..... **21**

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง **21**

สรุปผลการทดลอง 24
ข้อเสนอแนะ 24

เอกสารอ้างอิง **25**

สารบัญภาพ

รูป 1 แสดงตัวอย่างสาหร่ายทะเล *SARGASSUM OLIGOCYSTUM* MONTAGNE 8
รูป 2 กราฟแสดงผลของสารสกัด SOM ต่อการรอดชีวิตของ HELA CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± S.E.M. (N=3) 14
รูป 3 กราฟแสดงผลของสาร DOXORUBICIN ต่อการรอดชีวิตของ HELA CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± S.E.M. (N=3) 15
รูป 4 แสดงการเกิด DNA FRAGMENTATION ของ HELA CELLS ที่บ่มด้วยสารสกัด SOM และ DOXORUBICIN (DOX) ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS 16
รูป 5 แสดงลักษณะเซลล์และนิวเคลียส จากการย้อมด้วย สี DAPI และ PI, B = BLEB, C = CHROMATIN CONDENSATION, N = NORMAL, E = EARLY APOPTOSIS, L = LATE APOPTOSIS, SCALE BAR = 10 UM 19

สารบัญตาราง

ตาราง 1 แสดงลักษณะการติดสี DAPI และ PI ของเซลล์ในระยะต่างๆ.....12
ตาราง 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิด APOPTOSIS วิเคราะห์จากการติดสี DAPI และ PI ที่นิวเคลียส.....20

บทที่ 1
บทนำ

มะเร็งเป็นหนึ่งในบรรดาโรคร้ายที่ก่อให้เกิดความทุกข์ทรมาน มีผลกระทบต่อชีวิตและสังคม ปัจจุบันนี้โรคมะเร็งถือเป็นปัญหาสำคัญหนึ่งของการสาธารณสุขไทย พบอุบัติการของผู้ป่วยมะเร็งสูงขึ้นทุกปี เป็นสาเหตุในการเสียชีวิต ของคนไทยในอันดับต้นๆ และสถิติของการเกิดโรคมะเร็งในประเทศไทย พบผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 2551) โรคมะเร็งเกิดได้กับคนทุกเพศทุกวัย รวมถึงเด็กทารกด้วย แต่โอกาสเสี่ยงมักจะเพิ่มขึ้นตามอายุ โรคมะเร็งที่พบบ่อย ของคนทั่วโลกคือ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งตับ และมะเร็งปากมดลูก

นักวิจัยทั่วโลกได้พยายามค้นคว้าว่าอะไรคือสาเหตุที่ทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากปัจจัยหลายๆอย่างรวมกัน และกลไกทางชีวเคมีของโรคมะเร็งยังเป็นที่เข้าใจกันน้อย มีกลไกสลับซับซ้อนหลายขั้นตอนที่ทำให้เซลล์ปกติมีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์มะเร็ง และเติบโตเป็นก้อนมะเร็ง (Tsao *et al.*, 2004) โรคมะเร็งชนิดเดียวกันอาจจะเกิดขึ้นได้จากสาเหตุต่างๆกัน เนื่องจากในแต่ละชุมชนมีสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมือนกัน ถ้าจะกล่าวถึงสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งในประเทศใด ภูมิภาคใด หรือในท้องถิ่นหรือชุมชนใด อาจมีความแตกต่างกันหรือเหมือนกันก็ได้

โรคมะเร็งรักษาให้หายขาดได้ในระยะเริ่มต้นเท่านั้น ดังนั้นการตรวจสุขภาพร่างกายประจำปีหรือมาพบแพทย์ทันทีเมื่อมีความผิดปกติ จึงเป็นวิธีหนึ่งที่อาจป้องกันการสูญเสียจากโรคมะเร็งได้ การรักษาเริ่มด้วยการตัดก้อนมะเร็งออกให้หมด แต่ทำได้ยากเนื่องจากมีการการกระจายของมะเร็งไปอวัยวะอื่นๆ จึงต้องให้เคมีบำบัด หรือ การฉายแสง เพื่อหยุดยั้งไม่ให้เซลล์มะเร็งแบ่งตัว แต่ก็มีข้อเสียค่อนข้างมากเช่น อ่อนเพลีย คลื่นไส้อาเจียน เบื่ออาหาร ภูมิต้านทานต่ำ ติดเชื้อง่าย

ถึงแม้ว่าการแพทย์ปัจจุบัน มีความสามารถในการทำลายก้อนมะเร็งค่อนข้างสูง แต่ในขณะเดียวกัน ก็ทำลายเซลล์ปกติของร่างกายด้วย จึงก่อให้เกิดผลข้างเคียงตามมาเป็นจำนวนมาก เช่น การรักษาด้วยเคมีบำบัด โดยหลักการให้เคมีบำบัดคือทำลายเซลล์ที่แบ่งตัวเร็ว ซึ่งเซลล์มะเร็งแบ่งตัวเร็ว ดังนั้นจึงถูกทำลายมาก แต่ขณะเดียวกันยาที่ใช้นั้นจะมีผลต่อเนื้อเยื่อปกติที่มีการแบ่งตัวเร็วเช่นกัน เช่น ไขกระดูก รากผม และเยื่อบุลำไส้ (Kuo *et al.*, 2005) จึงทำให้ผู้ป่วยได้รับความทุกข์ทรมานจากการรักษาด้วยเคมีบำบัด เป็นผลทำให้ผู้ป่วยไม่ให้ความร่วมมือที่จะรักษามะเร็ง ดังนั้นในการรักษาโรคมะเร็งเพื่อให้ได้ผลการรักษาที่ดี ควรจะมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์น้อยที่สุด

2. ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

3. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุล

ขอบเขตของการวิจัย

ตัวอย่างสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *Sargassum oligocystum* Montagne ในแถบทะเลบริเวณเกาะครามและเกาะใกล้เคียง จังหวัด ชลบุรี ถูกนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเอทธิลอะซีเตด อัตรส่วน 1:1 ได้เป็นสารสกัดหยาบ จากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุล โดยใช้ human cervical cancer cell lines เป็น model ของการทดลอง

บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติเป็นแหล่งสำคัญที่ใช้ผลิต chemotherapeutic agents ที่มีประสิทธิภาพสูง ยารักษาโรคมะเร็งที่ผ่านการคัดกรองจากสถาบัน Food and Drug Administration (FDA) ประเทศสหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ปี 1960 นั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติมากกว่า 50% และตั้งแต่ปี 1996-2000 มีผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับ cytotoxic bioassay มากกว่า 400 ชนิดที่สกัดได้จากทะเล ดังนั้นแนวโน้มการวิจัยเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติจึงมุ่งไปสู่สิ่งที่มีกำเนิดอยู่ในทะเล (Kim & Park, 2002) มีคำกล่าวว่ามหาสมุทรเป็นแหล่งให้กำเนิดชีวิต «mother of origin of life» พื้นที่ในโลกเป็นส่วนที่เป็นมหาสมุทรถึง 70% แหล่งทัพยากรทางทะเลที่เกี่ยวกับ biomedical compounds ได้แก่ sponges (37%), coelenterates (21%), microorganisms (18%), algae (9%), echinoderms (6%), tunicates (6%), mulluscs (2%), bryozoans (1%) นักวิจัยทั่วโลกจึงมุ่งเน้นที่จะค้นคว้าหายาชนิดใหม่สำหรับรักษาโรคร้ายแรงในมนุษย์เช่นโรคมะเร็ง เป็นต้น (Jha & Rong, 2004)

สรรพคุณทางการแพทย์แผนโบราณ

สาหร่ายสกุล *Sargassum* มีชื่อท้องถิ่นต่างๆกัน อาทิ สาหร่ายทุ่น สาหร่ายใบ หรือ สาย ความสำคัญของสาหร่าย *Sargassum* ในระบบนิเวศ นับว่าเป็นผู้ผลิตเบื้องต้น รวมทั้งเป็นแหล่งวางไข่ อนุบาล หลบภัย และแหล่งอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อน ช่วยดูดซับสารอาหาร เป็นตัวปรับสภาพน้ำให้น้ำมีคุณภาพดีขึ้น และรักษาสมดุลของระบบนิเวศทางทะเล สาหร่าย *Sargassum* สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ อาทิ ชาวจีนเป็นชาติที่รู้จักนำสาหร่ายสกุลนี้มาใช้เป็นยานานกว่าพันปีมาแล้ว โดยใช้เป็นยารักษาคอพอก เนื่องจากมีปริมาณไอโอดีนสูง นอกจากนี้ยังนำสาหร่าย *Sargassum* ตากแห้งมาชงน้ำดื่มแก้ร้อนในและลดไข้ ร้านขายยาจีนบางร้าน ในกรุงเทพฯ ยังมีสาหร่าย *Sargassum* แห้งขาย ใช้ชื่อว่า *"ไฮเก้า"* ในประเทศที่มีสาหร่าย *Sargassum* ขึ้นอยู่หนาแน่น สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัด alginate หรือ algin ซึ่งเป็นสารแขวนลอยใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อาทิ อุตสาหกรรมนม ไอสครีม ขนมปัง ขนมหวาน และลูกกวาด อุตสาหกรรมทำกระดาษป้องกันการซึมของหมึกทำให้เห็นตัวพิมพ์ชัดเจนขึ้น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น แชมพูสระผม ครีมโกนหนวด และโลชั่นต่างๆ ทำปุ๋ยผสมในอาหารสัตว์เพื่อสร้างภูมิคุ้มกันโรคต่างๆ และยังนำส่วนของยอดอ่อนมาประกอบอาหารรับประทานได้หลายชนิด (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527; 2550)

สารเคมีสำคัญ

สาหร่ายสีน้ำตาล เป็นสาหร่ายที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในบรรดาสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว สาหร่ายสีเขียว และสาหร่ายสีแดง รงควัตถุของสาหร่ายสีน้ำตาล คือ carotenoid ชนิด fucoxanthin ในผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาลมี alginic acid เซลล์ลูโลส และ sulfated fucan (fucoidan) เป็นองค์ประกอบหลัก ในอัตราส่วนประมาณ 3:1:1 โครงสร้างของโพลิแซคคาไรด์เหล่านี้มีโครงสร้างซับซ้อนมีองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด สายโซ่กิ่งและขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกัน ดังนั้นโพลิแซคคาไรด์ที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาลหลายสกุลมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย ในสิ่งมีชีวิต สารพลิแซคคาไรด์มักรวมกับสารประกอบพวกโปรตีนหรือลิปิด มีบทบาทหน้าที่ต่างๆทางชีวภาพเช่นเป็นแหล่งพลังงาน เป็นองค์ประกอบโครงร่างของสิ่งมีชีวิต ควบคุมปฏิกิริยาทางด้านอิมมูน จึงมีความสำคัญทางชีววิทยา และสรีรวิทยาเช่น ฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ฯลฯ ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้สารประกอบกลุ่มโพลิแซคคาไรด์เพื่อการค้นหาหรือพัฒนายาใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงแต่ผลข้างเคียงต่ำ เช่น ยารักษาเอดส์ มะเร็ง เป็นต้น

ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสาหร่ายสีน้ำตาล

สาร fucoxanthin สกัดจาก *Udaria pinnatifida* สามารถยับยั้งมะเร็งลำไส้ชนิด (Caco-2) กระตุ้นกระบวนการ apotosis และยับยั้งการเกิด angiogenesis ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถสร้างเส้นเลือดและทำให้เซลล์มะเร็งตายตายเนื่องจากขาดเลือด (Sugawara *et al.*,2006) รายงานของ Satomi และ Nishino (2009) ซึ่งศึกษาผลของ fucoxanthin ต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และพบว่า fucoxanthin มีผลทำให้เซลล์หยุดแบ่งตัวใน cell cycle ระยะ G_1 เช่นกัน นอกจากนี้สาร fucoxanthin มี isomer ต่างกัน ทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างกันด้วย เช่น fucoxanthin ที่สกัดได้จาก Undaria pinnatifida นั้นประกอบไปด้วย isomer 3 แบบ ได้แก่ all-trans fucoxanthin ประมาณ 88% และเป็น 13 cis และ 13'-cis isomer ประมาณ 9% และเมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60) และมะเร็งลำไส้ (Caco-2) พบว่า สารผสมระหว่าง 13-cis และ 13'-cis isomer จะมีผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้มากที่สุด และกระตุ้น apoptosis ในเซลล์มะเร็ง (Nakazawa *et al.*, 2009)

สารในกลุ่ม fucoidan และ fucan ซึ่งเป็นสารที่มีองค์ประกอบเป็น sulfate fucose คือมีน้ำตาล fucose เป็นองค์ประกอบหลัก และมีการแทนที่ด้วยหมู่ซัลเฟตในตำแหน่งต่างๆ พบได้ในสาหร่ายสีน้ำตาลหลายชนิด และมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของสาหร่าย (Li *et al.*, 2008) การศึกษาสารสกัดหยาบ fucoidan จากสาหร่ายสีน้ำตาลในประเทศเกาหลีพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญ

ของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยมีสารสำคัญคือ sulfated fucoidan ในปริมาณมากกว่า desulfated fucoidan ซึ่งสารดังกล่าวไปจับกับ DNA ทำให้ไม่สามารถเกิด DNA replication เซลล์จึงไม่สามารถแบ่งตัวได้ การศึกษานี้ได้ให้ข้อเสนอแนะในการนำมาเป็นยาต้านมะเร็งต่อไป (Park *et al.*, 2002) การสกัดโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่าย *Sargassum pallidum* ได้สารโพลีแซค-คาไรด์ที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (MGC-803) ได้ โดยฤทธิ์ในการยับยั้งขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลและปริมาณซัลเฟตของสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ หากมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยและมีปริมาณซัลเฟตมากจะมีความสามารถในการยับยั้งมากขึ้น (Ye *et al.*, 2008) โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจาก *Sargassum latifolium* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (lymphoblastic leukemia 1301 cells) โดยยับยั้งการทำลาย DNA และกระตุ้นในเกิด apotosis ได้ (Gamal-Eldeen *et al.*, 2009)

Sulfated polysaccharides (fucoidan) ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ผ่านทางเอนไซม์ caspase-3 และcaspase-7 (Aisa *et al.*, 2005: Teruya *et al.*, 2007) และการเพิ่มปริมาณ sulfate ใน fucoidan มีผลเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านมะเร็ง และ ยับยั้งการสร้างหลอดเลือด (Koyanagi *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามสาร fucoidan จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Cladosiphon okamuranus* ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (U937) (Teruya *et al.*, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับสาร fucoidan จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Fucus evanescens* ไม่สามารถกระตุ้น apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองทั้งชนิด T cells และ B cells ถึงแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นที่สูงถึง 500 ug/ml แต่เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาใช้ร่วมกับยารักษามะเร็ง etoposide พบการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น 2 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ etoposide เพียงอย่างเดียว (Philchenkov *et al.*, 2007) จากที่กล่าวมาสรุปได้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของโพลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำตาลคือการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งฆ่าตัวตาย (apoptosis) เพิ่มการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และ ยับยั้งการสร้างหลอดเลือด

ในน่านน้ำไทย สาหร่ายสีน้ำตาลเป็นสาหร่ายกลุ่มที่พบมากที่สุด มีการแพร่กระจายเกือบทุกพื้นที่ เนื่องจากมีขนาดใหญ่กว่าสาหร่ายกลุ่มอื่น จึงพบอยู่ทั่วไปในปริมาณสูง (Noiraksa *et al.*, 2006) ตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาล 15 ชนิด จากชายฝั่งทะเลอ่าวไทยในจังหวัดชลบุรีและระยอง พบว่ามี 4 ชนิด ได้แก่ Sagassum oligocystum, Sagassum swartzii, Sagassum binderi และ Turbinaria conoides ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Saengkhae *et al.*, 2009A) ตัวอย่างสดของ Turbinaria conoides และ Sagassum binderi ถูกนำมาสกัดด้วย dichloromethane และ ethyl acetate (1:1) ได้เป็นสารสกัดหยาบ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 20 และ 90 ug/ml

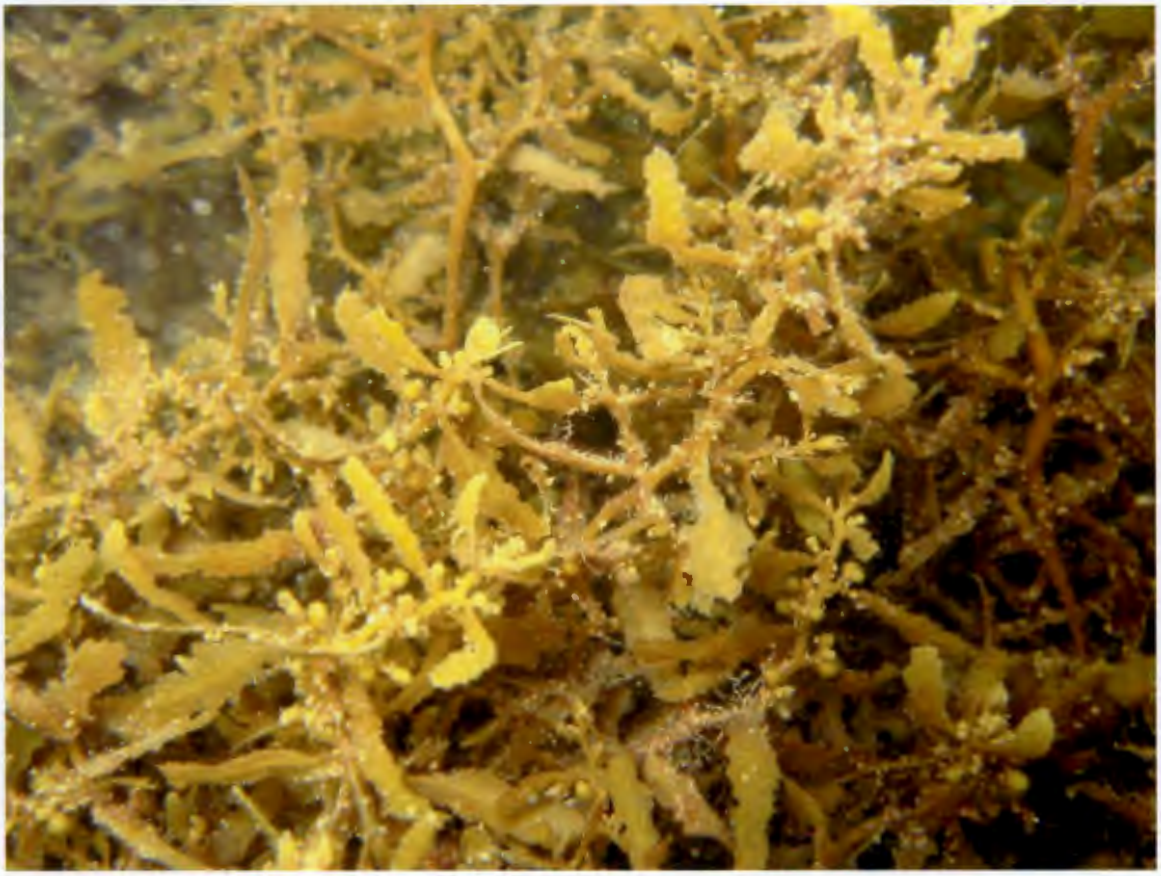
ตามลำดับพบนิวเคลียสแตก โครมาตินหนาแน่น และมีการแตกของ DNA ฟุ้งกระจายใน agarose gel ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของการตายแบบ apoptosis (Saengkhae *et al.,* 2009B; Saengkhae *et al.,* 2010) อย่างไรก็ตามจากการสำรวจพบสาหร่ายสีน้ำตาลทถูกบันทึกไว้คือ *Sargassum oligocystum* Montagne ซึ่งยังขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนโดยเฉพาะต่อเซลล์มะเร็งในระดับหลอดทดลอง

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเล

เก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเล *Sargassum oligocystum* Montagne บริเวณชายฝั่งจนถึงแนวปะการังจังหวัดชลบุรี และระยอง ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2550 ถึงเดือนเมษายน 2551 โดยใช้เครื่องช่วยหายใจใต้น้ำ (scuba diving) รักษาสภาพตัวอย่างด้วยการแช่น้ำแข็ง และนำมายังห้องปฏิบัติการเคมีเพื่อสกัดสารหยาบ ตัวอย่างสาหร่ายอีกส่วนหนึ่งถูกทำให้แห้งเพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ภายในห้องปฏิบัติการสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา



รูป 1 แสดงตัวอย่างสาหร่ายทะเล *SARGASSUM OLIGOCYSTUM* MONTAGNE

การสกัดสารตัวอย่าง

ตัวอย่างสด นำมาสกัดด้วยเมธานอล แล้วทำการแยกชั้น (partition) ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเอทธิลอะซีเตด อัตรส่วน 1:1 ระเหยตัวทำละลายออกจนได้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายทะเล *Sargassum oligocystum* Montagne extracts (SOM extracts) ละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลาย EtOH จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วย membrane nylon filter ขนาด 0.2 μM แล้วเก็บไว้ที่ -20°C

การเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติได้แก่ มะเร็งปากมดลูก (human cervical carcinoma, HeLa) การเลี้ยงเซลล์ ทำการเตรียมเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1×10^5 cells/ml ด้วย RPMI 1640 ใน culture flask ภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 โดยใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน จนมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 1×10^6 cells/ml ตรวจดูเปอร์เซ็นเซลล์ที่เกาะพื้นผิวผ่านทางกล้อง stereoscope ถ้าพบว่ามีเซลล์ที่เกาะพื้นมากกว่า 80% ของพื้นที่ทั้งหมด แสดงว่าสามารถทำการ subculture ได้

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT

เตรียมเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 2×10^4 cells/ml ลงใน 96 well plate บ่มเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 นาน 24 ชม. เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์มีชีวิตสามารถลงเกาะที่พื้นผิวภาชนะได้ จากนั้นเริ่มบ่มเซลล์กับสารสกัด SOM extracts โดยหลุมที่เป็น vehicle control บ่มด้วย EtOH (0.66%) หลุมที่ทดสอบความเป็นพิษบ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 0–250 μg/ml นาน 72 ชม. ส่วน positive control นั้นทำการทดสอบด้วย doxorubicin ที่ความเข้มข้น 0-5 μg/ml นาน 72 ชม. แล้ววิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT

การวิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT โดยมีหลักการคือภายในเซลล์ที่มีชีวิตจะมีกระบวนเมทาบอลิซึมในไมโตคอนเดรีย โมเลกุล MTT มีเป้าหมายอยู่ที่ไมโตคอนเดรีย และเนื่องจากโครงสร้างของโมเลกุล MTT เป็น tetrazolium rings ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อรับอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ succinate dehydrogenase ได้เป็นผลึก formazan สีม่วงและไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

นำสารละลาย MTT (5g/L) ปริมาตร 30 µl ลงใน well ที่ต้องการทดสอบ จากนั้นบ่มภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 นาน 4 ชม. แล้วละลายผลึก formazan ด้วย DMSO (99.99%) ปริมาตร 100 µl แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%\ Cell\ viability = \frac{Absorbance\ at\ 540\ nm\ of\ sample}{Absorbance\ at\ 540\ of\ control} \times 100$$

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

วิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis

เตรียมเซลล์ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1×10^5 cells/ml ปริมาตร 5 ml ลงใน flask ขนาด 25 cm^3 เลี้ยงเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อด้วย 0.66% EtOH, DOX [IC_{50}] และสารสกัด SOM ที่ความเข้มข้น [IC_{20}], [IC_{50}] และ [IC_{80}] ตามลำดับ นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ทั้งหมด (เซลล์เกาะพื้นและเซลล์แขวนลอย) นำมาสกัด DNA ด้วย GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (VIVANTIS) โดยเติม proteinase K ปริมาตร 20 µl เพื่อทำลายโปรตีน จากนั้นเติม lysis enhancer ปริมาตร 2 µl แล้วทำการ vortex เพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และบ่มต่อด้วย TB buffer ปริมาตร 200 µl ที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีนออกให้เหลือแต่ DNA และ RNA จากนั้นทำลาย RNA ด้วย 20 mg/ml RNaseA ปริมาตร 20 µl โดยบ่มที่ 37 °C นาน 10 นาที จากนั้นทำการตกตะกอน DNA ด้วย ice-cold absolute ethanol แล้ว load ลง column ปั่นที่ 5,000g นาน 1 นาที จากนั้นล้างด้วย wash buffer แล้วนำไปปั่นที่ 5,000g นาน 1 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นแห้งที่ 10,000g นาน 1 นาที แล้วเติม elution buffer ที่ได้ผ่านความร้อนแล้วที่ 65 °C เพื่อ elute DNA จนได้ผลผลิตสุดท้ายคือ DNA ที่บริสุทธิ์ผ่าน filter ลงมา นำไปเก็บไว้ที่ −20°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การหาความเข้มข้นของ DNA

นำ DNA ที่สกัดได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของ DNA โดยใช้สูตร ดังนี้

ความเข้มข้นของ DNA = dilution factor × 50 ng/µl × Abs_{260}

(เมื่อค่าการดูดกลืนแสง 1 มีค่าเท่ากับ 50 ng/µl)

เมื่อได้ความเข้มข้นของ DNA แล้วนำมาปรับความเข้มข้นของทุกกลุ่มเป็น 50 ng/µl โดยเจือจางกับน้ำกลั่น เพื่อนำไป load ลงเวลของ agarose ในขั้นตอนต่อไป

Agarose gel electrophoresis

นำ 50 ng/µl DNA ปริมาตร 8 µl (400 ng) ผสมกับ 6x loading dry ที่มีส่วนผสมกับ SYBR Gold (100:1 µl) ปริมาตร 2µl เพื่อใช้ดูการเคลื่อนที่ของ DNA และป้องกันไม่ให้ DNA ฟุ้งกระจาย จากนั้น load ลง 1.5% agarose gel โดยใช้กระแสไฟ 100 V นาน 45 นาที ซึ่งใช้ 0.1 µg/µl 1kb DNA ladder ปริมาตร 8 µl เป็น marker แล้ววิเคราะห์ผลโดยเครื่อง dark reader

ศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI & PI staining

เตรียมเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ปริมาตร 4 ml โดยเลี้ยงเซลล์บน cover slide ซึ่งแช่อยู่ใน 6 well plate แล้วบ่มเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อด้วย 0.66% EtOH, DOX [IC_{50}] และสารสกัด SOM ที่ความเข้มข้น [IC_{20}], [IC_{50}] และ [IC_{80}] ตามลำดับ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำ cover slide ซึ่งมีเซลล์เกาะอยู่มาย้อมสี fluorescent DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) และ PI (propidium iodide)

ขั้นตอนการย้อมสี DAPI และ PI

นำเซลล์ที่เกาะบน cover slide มา fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde pH 7.3 ปริมาตร 1 ml นาน 3 นาที จากนั้นทำลาย RNA ด้วย 20 mg/ml RNaseA ปริมาตร 20 µl โดยบ่มที่ 37 °C นาน 20 นาที และล้าง RNaseA ด้วย PBS จากนั้นนำไปย้อมด้วย PI [5 µg/ml] และ DAPI [5 µg/ml] ปริมาตรอย่างละ 700 µl นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องและปราศจากแสง จากนั้นล้างสีออกด้วย PBS

นำเซลล์บน cover slide คว่ำลงบน slide จากนั้นปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บ แล้วนำไปส่องด้วย fluorescence microscope กำลังขยาย 100 เท่า โดย DAPI มี excitation/emission ที่ 358/461 mm และ PI มี excitation/emission ที่ 535/617 mm ทำการบันทึกภาพแบบสุ่ม 3 ตำแหน่งต่อ 1 slide และในแต่ละตำแหน่งแสดงภาพ 3 แบบ คือ bright field, DAPI และ PI

การวิเคราะห์ข้อมูล โดยนับเซลล์จำนวน 500 เซลล์ แบบสุ่ม เพื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่อยู่ในลักษณะต่างๆ ซึ่งลักษณะการติดสีของเซลล์แสดงดังตารางที่ 1 และทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

ตาราง 1 แสดงลักษณะการติดสี DAPI และ PI ของเซลล์ในระยะต่างๆ

	การติดสี DAPI	**การติดสี PI**
Viable cells	ติดสีฟ้าเนียน	ไม่ติดสีแดง
Apoptotic cells	ติดสีฟ้าเป็นหย่อมๆ	ไม่ติดสีแดง
Late apoptotic หรือ Necrotic cells	ติดสีฟ้าเป็นหย่อมๆ	ติดสีแดง

การแสดงข้อมูล

ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง (n=3) การทดลองความเป็นพิษต่อ HeLa cells เขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม microcal origin 6.0 แสดงผลเป็นค่า mean ± standard error of mean (S.E.M.) การวิเคราะห์การแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmention) แสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ ± S.E.M. ร่วมกับภาพถ่าย ส่วนการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis แสดงผลเป็นภาพถ่าย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT

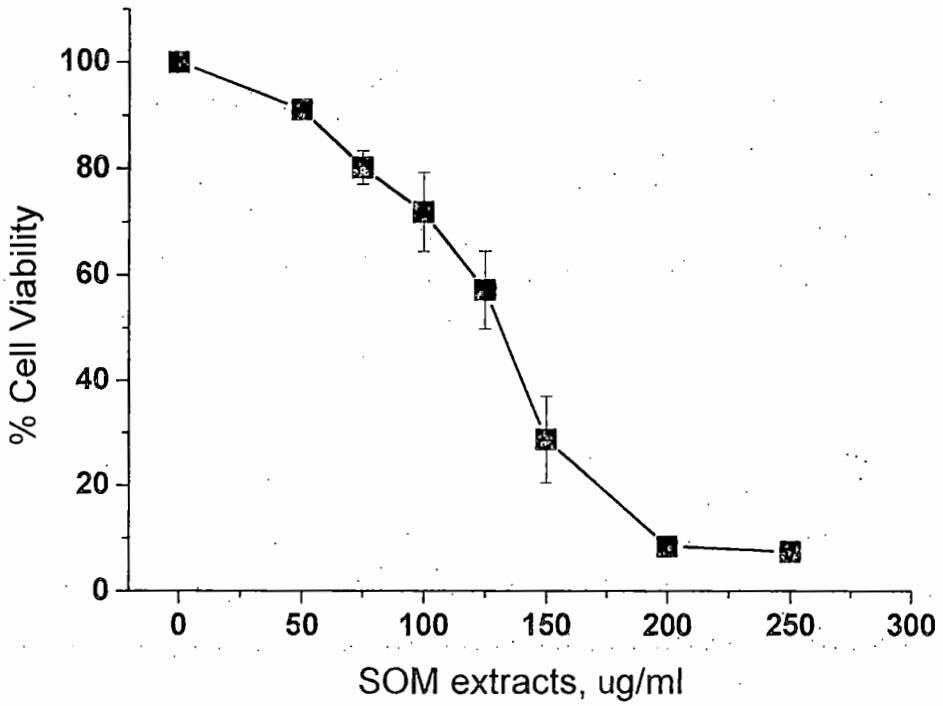
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด SOM ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) โดยเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบ่มเซลล์กับสารสกัดความเข้มข้น 0-250 μg/ml และ doxorubicin (DOX) ความเข้มข้น 0-5 μg/ml (positive control) และ 0.66% EtOH (negative control) ใน 96 well plate เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมินรูปร่างของเซลล์ ลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์ ลักษณะไซโตพลาซึม ลักษณะการเกาะที่พื้นผิว เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ลอย ภายใต้กล้อง stereoscope และนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้อง stereoscope พบว่าในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.66% EtOH เซลล์มีลักษณะปกติ เหยียดตัวเป็นรูปกระสวย เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาซึมเรียบ และมีจำนวนเซลล์เกาะพื้นมากกว่า 90% เมื่อได้รับการเขย่าแรงๆ เซลล์ยังคงไม่หลุดจากพื้นผิว เมื่อนำไปหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT พบว่า เซลล์ในกลุ่มที่ใส่ 0.66% EtOH (negative control) มีจำนวนเซลล์มีชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้บ่มด้วย EtOH

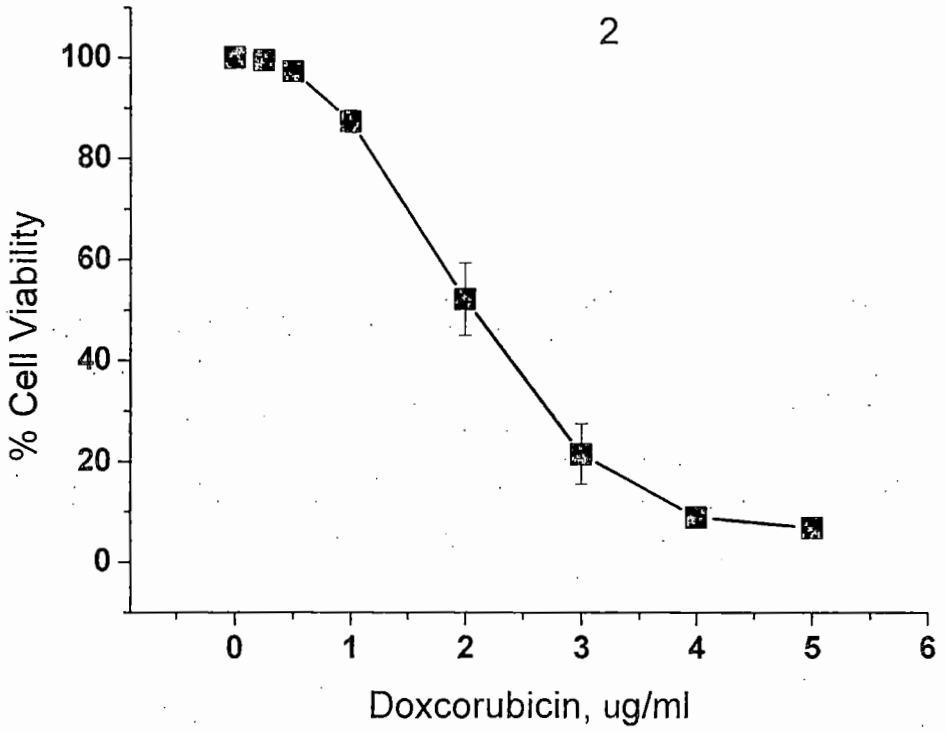
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบจากสาหร่ายจากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *Sargassum oligocystum* Montagne (SOM extracts) พบว่าแตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้บ่มด้วยสารสกัด คือเซลล์มีรูปร่างกลม ไม่เหยียด ไซโตพลาซึมขรุขระ ลักษณะการเกาะพื้นผิวไม่แน่น เมื่อเขย่าเบาๆเซลล์หลุดจากพื้นผิวได้ง่าย เมื่อนำไปหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT พบว่า มีจำนวนเซลล์ที่เกาะพื้นผิวจะลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ดูภายใต้กล้อง stereoscope สารสกัดSOM ที่ความเข้มข้น 50 μg/ml เริ่มยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง 20, 50 และ 80% (Inhibitory concentration at 20%: IC_{20}, IC_{50} และ IC_{80}) มีค่าเท่ากับ 76 ± 3.11, 132 ± 5.63 และ 172 ± 7.34 μg/ml ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากกว่า 85% ที่ความเข้มข้นมากกว่า 200 μg/ml (รูป 2)

ส่วนกลุ่มที่บ่มด้วย DOX พบว่าเซลล์มีลักษณะกลมไม่เหยียดออกเป็นรูปกระสวย ไซโตพลาซึมขรุขระ การเกาะพื้นผิวไม่แน่น สามารถหลุดออกจากผิวที่ยึดเกาะได้ง่ายเมื่อเขย่าเบา ๆ พบเซลล์ลอยจำนวนมาก และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT พบว่าเซลล์ที่บ่มด้วย DOX มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น แตกต่างจากกลุ่มที่บ่มด้วย 0.66%

EtOH อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการนับเซลล์มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT มีความสัมพันธ์กับการศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยกล้อง stereoscope ความเข้มข้นของ Dox ที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง 50% (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 2 ± 0.35 µg/ml และที่ความเข้มข้น 4 µg/ml การตายของเซลล์มากกว่า 85% (รูป 3)



รูป 2 กราฟแสดงผลของสารสกัด SOM ต่อการรอดชีวิตของ HELA CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± S.E.M. (N=3)



รูป 3 กราฟแสดงผลของสาร DOXORUBICIN ต่อการรอดชีวิตของ HELA CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± S.E.M. (N=3)

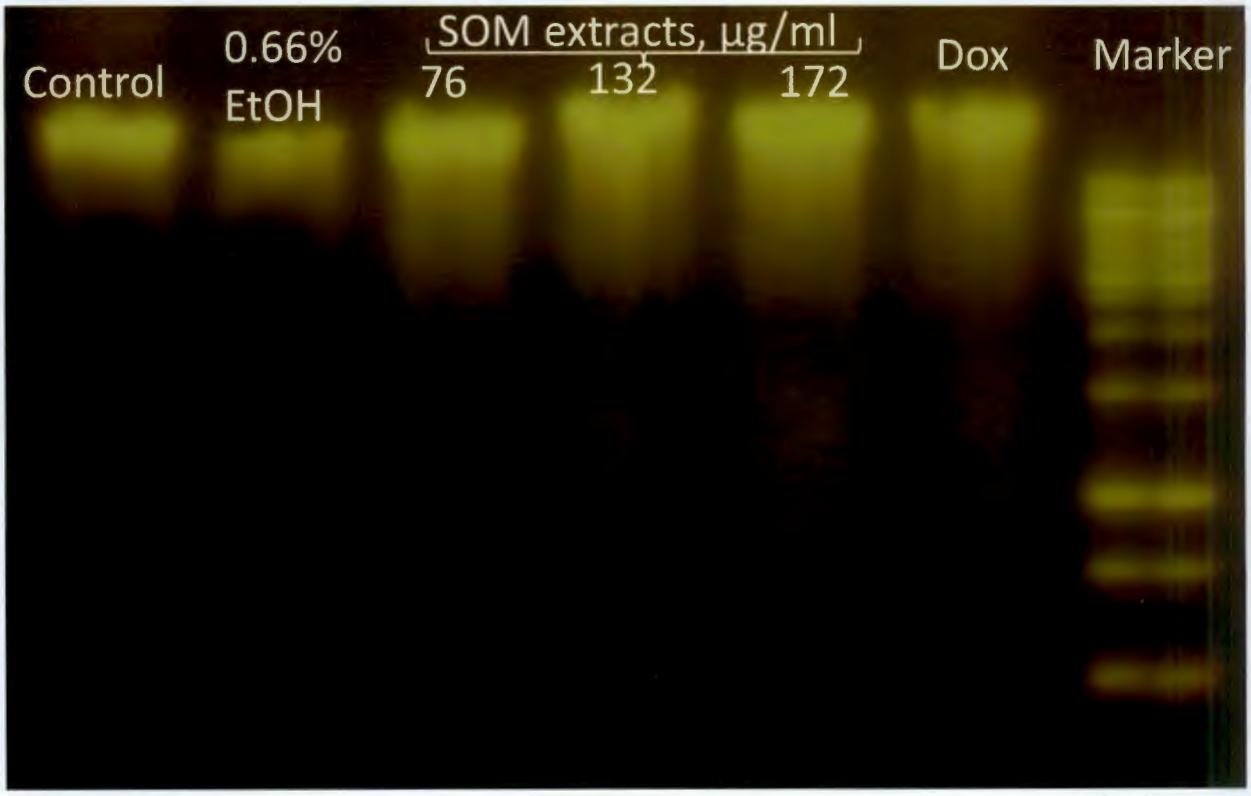
ผลการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis

ทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อการแตกของ DNA โดยเลี้ยง HeLa cells ความเข้มข้น $1x10^5$ cells/ml ให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด SOM ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{20}, IC_{50} และ IC_{50} คือ 76 ± 3.11, 132 ± 5.63 และ 172 ± 7.34 µg/ml ตามลำดับ บ่มด้วย doxorubicin (Dox) (positive control) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} คือ 2 ± 0.35 µg/ml และบ่มด้วย 0.66% EtOH (negative control) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใน flask ปริมาตร 25 cm^3 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 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

เมื่อนำ DNA มาแยกบนตัวกลางที่มีกระแสไฟฟ้า ตัวกลางที่ใช้คือวุ้นอะกาโรส (agarose gel) เนื่องจาก DNA มีประจุเป็นลบ จึงสามารถเคลื่อนไปยังขั้วบวกในสนามไฟฟ้า เมื่อเจลแข็งตัวจะมี

ลักษณะเป็นรูพรุนอยู่ภายใน ซึ่งขนาดของรูพรุนดังกล่าวจะขึ้นกับความเข้มข้นของเจล ซึ่งถ้าหากเจลมีความเข้มข้นมากรูพรุนจะเล็กทำให้ DNA เคลื่อนผ่านได้ยาก ในขณะเดียวกันถ้าหากเจลมีความเข้มข้นน้อยรูพรุนจะขนาดใหญ่ทำให้ DNA เคลื่อนผ่านได้ง่ายกว่า โดย DNA จะเคลื่อนไปในสนามไฟฟ้าตามขนาดของโมเลกุล โดยที่สารโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารโมเลกุลใหญ่ หลังจากที่ DNA ถูกแยกบนเจลแล้ว สามารถอ่านผลการแตกของ DNA ที่ติดกับสารเรืองแสง SYBR Gold ด้วยเครื่อง dark reader แล้วบันทึกภาพของดีเอ็นเอ

เมื่อวิเคราะห์การแตกของ DNA แล้วพบว่า กลุ่มที่บ่มด้วย 0.66% EtOH เกิดแถบ (band) หนาเพียง 1 แถบ แสดงว่ามี DNA ขนาดใหญ่จึงเคลื่อนที่ได้ไม่ไกล แตกต่างจากในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด SOM โดยพบแถบหนา 1 แถบและมีลักษณะเป็น smear band ยาวลงมา โดยความยาวเพิ่มตามขนาดความเข้มข้นของสารสกัด SOM ที่เพิ่มขึ้น แสดงว่ากลุ่มที่บ่มเซลล์ด้วยสารสกัด เกิดการแตกของ DNA ทำให้มีขนาดของ DNA แตกต่างกันไป (DNA fagmentation) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับกลุ่มที่บ่มเซลล์ด้วย DOX ที่พบว่าเกิด smear band ที่ยาวเช่นกัน (รูป 4)



รูป 4 แสดงการเกิด DNA FRAGMENTATION ของ HELA CELLS ที่บ่มด้วยสารสกัด SOM และ DOXORUBICIN (DOX) ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS

ผลการศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI & PI staining

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด SOM ต่อการเกิด nuclear fragmentation โดยเลี้ยง HeLa cells ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ให้เกาะบน cover slide ซึ่งแช่ใน 6 well plate นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด SOM ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{20}, IC_{50} และ IC_{80} คือ 76 ± 3.11, 132 ± 5.63 และ 172 ± 7.34 µg/ml ตามลำดับ บ่มด้วย doxorubicin (Dox) (positive control) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} คือ 2 ± 0.35 µg/ml และบ่มด้วย 0.66% EtOH (negative control) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำ cover slide ที่มีเซลล์เกาะอยู่ย้อมด้วย DAPI และ PI และศึกษาลักษณะนิวเคลียสภายใต้กล้อง fluorescence microscopy ซึ่ง DAPI และ PI มีเป้าหมายเหมือนกันคือที่ nucleic acid เมื่อถูก excitation ด้วยแสงความยาวคลื่น 358 nm และ 535 nm จะ emission ได้แสงสีน้ำเงิน (461 nm) และสีแดง (617 nm) ตามลำดับ

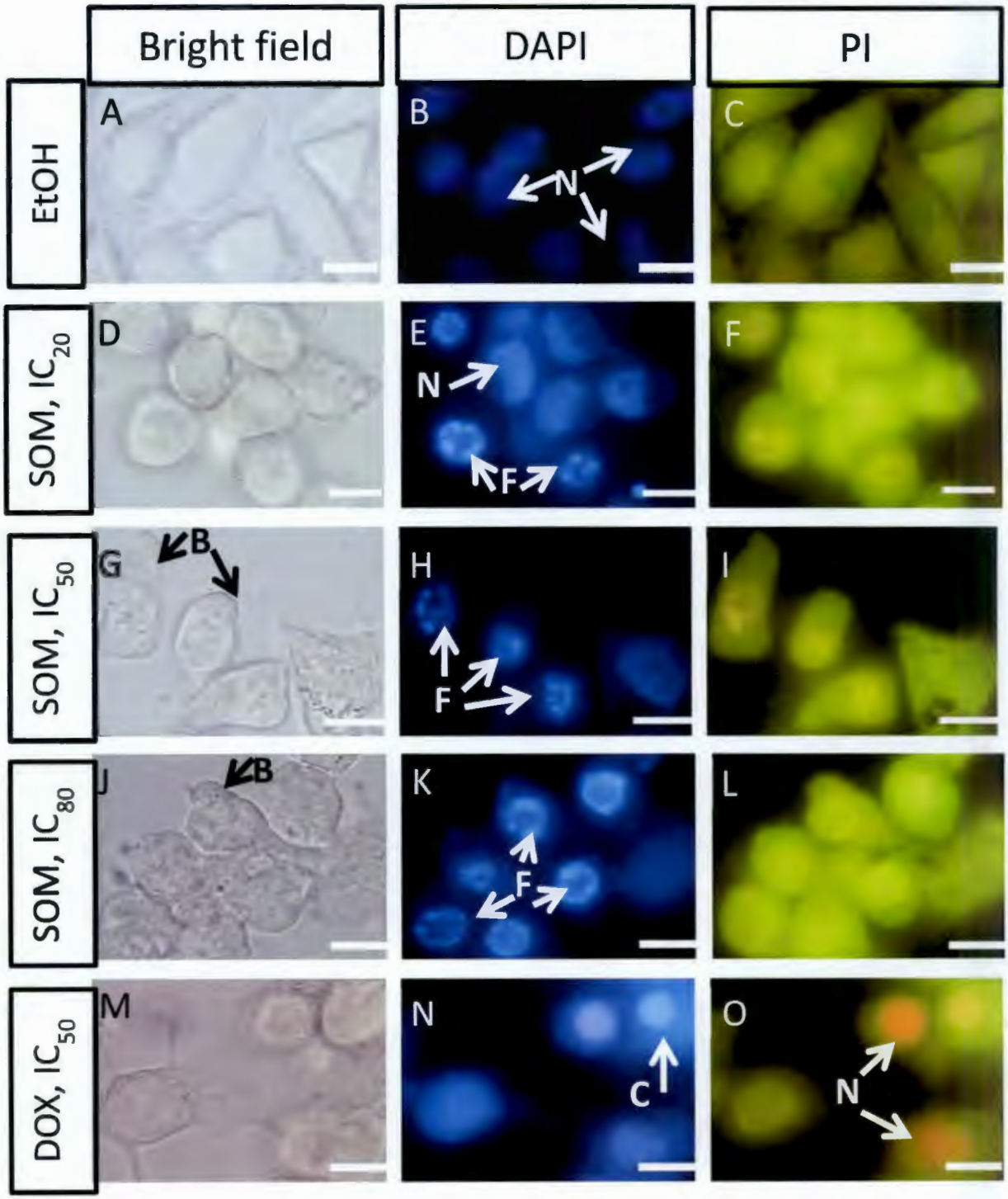
DAPI และ PI มีเป้าหมายที่ nuclear DNA เหมือนกัน แต่จะแตกต่างกันคือ DAPI มีคุณสมบัติเป็น membrane permeability หรือคุณสมบัติในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ โดยที่ PI นั้นมีคุณสมบัติเป็น membrane impermeability หรือคุณสมบัติในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ได้ ดังนั้นในเซลล์ที่มีชีวิต เยื่อหุ้มเซลล์ยังมีความสมบูรณ์ PI จึงไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปได้ แต่ในทางตรงข้ามถ้าหากเซลล์ตายมีรูที่เยื่อหุ้มเซลล์เกิดขึ้น (late apoptosis หรือ necrosis) จะพบสีแดงของ PI เข้าไปสะสมอยู่ภายใน DNA ดังนั้นในการทดลองจึงใช้ PI เป็นตัวบ่งชี้ระหว่างเซลล์มีชีวิตกับเซลล์ตาย (Moore, 1998) ถ้าหากเป็นเซลล์ที่มีชีวิตมี DNA ที่สมบูรณ์ เมื่อย้อมพร้อมกัน 2 สี จะติดสีเฉพาะสีของ DAPI เพียงอย่างเดียว จะมีการกระจายของสีสม่ำเสมอ (homogenous) ตลอดทั่วทั้งนิวเคลียส แต่ถ้ามีการเกิด early apoptosis ขึ้น จะพบนิวเคลียสติดสี DAPI เพียงอย่างเดียวเท่านั้น (ไม่พบการติดสี PI) แต่สีของ DAPI เข้ม และนิวเคลียสมีขนาดเล็กกว่าปกติ เนื่องจากการรวมกลุ่มของโครมาติน (condensed chromatin) หรือถ้านิวเคลียสแตกเป็นส่วนๆจะพบการติดสี DAPI เป็นหย่อม ๆ ไม่สม่ำเสมอ (nuclear fragmentation) ในกรณีที่เป็น late apoptosis จะพบการติดสี PI และ DAPI ทั้ง 2 สี โดยในการทดลองครั้งนี้นับเซลล์ประมาณ 500 เซลล์ และรายงานผลเป็นเปอร์เซนต์ mean± S.E.M (ตาราง 2)

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์แบบ bright field ในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.66% EtOH พบว่าผิวเซลล์มีลักษณะเรียบ ขอบเขตชัดเจน ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์เหยียดยาวเป็นรูปกระสวย (รูป 5 A) ลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI (รูป 5 B) และ PI (รูป 5 C) พบว่าเซลล์ทั้งหมดติดสีน้ำเงินของ DAPI โดยพบเซลล์ปกติ 100% ซึ่งนิวเคลียสติดสีน้ำเงินแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ กระจายทั่วนิวเคลียส (homogenous) และไม่พบเซลล์ที่มีการติดสีแดงของ PI

เซลล์ในกลุ่มที่บ่มสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *Sargassum oligocystum* Montagne (SOM extracts) ที่ความเข้มข้น 76 (IC_{20}), 132 (IC_{50}) และ 172 (IC_{80}) µg/ml ตามลำดับ เมื่อดูเซลล์แบบ

bright field พบว่ามีจำนวนเซลล์ลดลงตามขนาดความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น มีตุ่มที่ผนังเซลล์ (membrane blebing) ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 200 µg/ml พบว่าเซลล์ขอบเขตไม่ชัดเจน ซัยโตพลาสมขรุขระมีลักษณะไม่เรียบ (รูป 5 D, G & J) เมื่อดูการติดสีของ DAPI ในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 76 (IC_{20}), 132 (IC_{50}) และ 172 (IC_{80}) µg/ml พบว่ามีเซลล์ปกติลดลงตามขนาดความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ลักษณะเซลล์ปกติคือนิวเคลียสติดสี DAPI สม่ำเสมอจำนวน 88.75 ± 7.4%, 73.15 ± 11.0% และ 40.32 ± 4.5% ตามลำดับ ในทางตรงข้ามเซลล์ที่เกิด early apoptosis เพิ่มขึ้นตามขนาดความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น มีจำนวน 8.75 ± 0.4%, 20 ± 3.9% และ 51.54 ± 4.1% ตามลำดับ โดยลักษณะนิวเคลียสติดสี DAPI แบบไม่สม่ำเสมอ แต่ไม่ติดสี PI มีการรวมกลุ่มของเส้นใยโครมาตินหนาแน่น ขนาดของนิวเคลียสที่เล็กลงกว่าปกติและพบการแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) (รูป 5 E, H & K) เช่นเดียวกันเซลล์ที่เกิด late apoptotic หรือ necrotic cells จำนวน 2.5 ± 0.6%, 6.84 ± 0.7% และ 8.12 ± 1.0% ตามลำดับ โดยจะพบนิวเคลียสติดสีแดงของ PI (รูป 5 F, I & L)

ลักษณะของเซลล์ในกลุ่ม positive control (Doxorubicin) เมื่อดูเซลล์แบบ bright field พบว่าเซลล์ขอบเขตไม่ชัดเจน ซัยโตพลาสมขรุขระมีลักษณะไม่เรียบ (รูป 5 M) เมื่อดูการติดสีของ DAPI พบว่า มีเซลล์ปกติจำนวน 57.74 ± 8.4% โดยเห็นนิวเคลียสติดสี DAPI ลักษณะเรียบเนียน สม่ำเสมอ พบเซลล์ที่เกิด early apoptosis จำนวน 1.4 ± 0.3% โดยจะพบขนาดของนิวเคลียสที่เล็กลงกว่าปกติ มีการรวมกลุ่มของเส้นใยโครมาติน พบการแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) (รูป 5 N) และพบเซลล์ที่เกิด late apoptosis คือมีการติดสีแดงของ PI จำนวน 45.07 ± 3.6% (รูป 5 O)



รูป 5 แสดงลักษณะเซลล์และนิวเคลียส จากการย้อมด้วย สี DAPI และ PI, B = BLEB, C = CHROMATIN CONDENSATION, N = NORMAL, E = EARLY APOPTOSIS, L = LATE APOPTOSIS, SCALE BAR = 10 UM

ตาราง 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิด APOPTOSIS วิเคราะห์จากการติดสี DAPI และ PI ที่นิวเคลียส

	%Normal cells (homogenous DAPI)	**%Early apoptotic cells (condensed or fragment DAPI)**	**%Late apoptotic or necrotic cells (PI)**
0.66% EtOH (negative control)	100	0	0
SOM extracts (IC_{20}) [76 ± 3.11µg/ml]	88.75 ± 7.4	8.75 ± 0.4	2.5 ± 0.6
SOM extracts (IC_{50}) [132 ± 5.63 µg/ml]	73.15 ± 11.0	20 ± 3.9	6.84 ± 0.7
SOM extracts (IC_{80}) [172 ± 7.34 µg/ml]	40.32 ± 4.5	51.54 ± 4.1	8.12 ± 1.0
Doxorubicin (IC_{50}) [2 ± 0.35 µg/ml] (positive control)	57.74 ± 8.4	1.4 ± 0.3	45.07 ± 3.6

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *Sargassum oligocystum* Montagne บริเวณจังหวัดชลบุรีและจังหวัดระยองช่วงระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2550 ถึงเดือนเมษายน 2551 นำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทธิลอะซีเตด ในอัตราส่วน 1:1 ได้เป็นสารสกัดหยาบ (SOM extracts) จากนั้นทำการประเมินประสิทธิภาพของสารสกัด SOM ต่อการต้านการเจริญเติบโตต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela cells) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 132 ± 5.6 µg/ml เมื่อเปรียบเทียบผลของ Doxorubicin ที่ใช้เป็นยารักษามะเร็งในปัจจุบัน พบว่ามี Doxorubicin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัด SOM โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2 ± 0.35 µg/ml โดย Doxorubicin เป็นสารบริสุทธิ์ แต่สารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลเป็นสารสกัดหยาบมีโมเลกุลหลายชนิดรวมอยู่ด้วยกัน อาจจะทำให้มีการออกฤทธิ์เสริมกัน (synergist) หรือหักล้างกัน (agonist) โดยการทดลองครั้งนี้ Doxorubicin มีเป้าหมายการออกฤทธิ์ที่ DNA บริเวณหมู่น้ำตาลใน minor groove ทำให้เอ็นไซม์ topoisomerase II ที่ทำหน้าที่ในการคลายเกลียวของ double helix ไม่สามารถทำงานได้ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจึงหยุดลง และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (Fornari *et al.*, 1994) และเมื่อให้ Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 2 µg/ml พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์และติดสีแดงของ PI จำนวนมาก สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก Doxorubicin เป็นยารักษามะเร็งที่มีประสิทธิภาพสูง ดังนั้นเมื่อบ่มในเวลาที่เท่ากับสารสกัด SOM ในระบบหลอดทดลอง (*in Vitro*) ซึ่งไม่มีเซลล์กลุ่ม macrophage (*in vivo*) ที่คอยจับกินเซลล์ผิดปกติ ดังนั้นจึงทำให้เซลล์พัฒนาเป็น late apoptosis หรือ necrosis ได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัด SOM

การศึกษาการแตกของ DNA ใน agarose gel ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (quanlitative analysis) มีลักษณะของ smear band และความยาวของ smear band จะมีสัมพันธ์กับความเข้มข้นสารสกัด SOM ที่เพิ่มขึ้น (dose-dependent) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สาเหตุที่ DNA แตกหักนั้นน่าจะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม endonuclease (caspase-activated DNase; CAD) ซึ่งจะตัดสาย DNA ระหว่าง nucleosome (internucleosomal region) ซึ่งจะได้สาย DNA มีความยาวต่างกันประมาณ 180-200 base pairs (BP) (Linfert *et al.*, 1997) ดังนั้น การวิเคราะห์โดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis จะได้ลักษณะเป็น 'ladder' ในแต่ละช่วงต่างกันประมาณ 200 BP ซึ่งในทางตรงข้ามการเกิด late apoptosis หรือ necrosis จะได้ลักษณะเป็น 'smear' บน agarose gel เพราะมีเอนไซม์หลายชนิดทำหน้าที่ตัด chromatin DNA แบบสุ่มเป็นลักษณะของ random DNA fragmentation (Walker *et al.*, 1999)

การศึกษากลไกการตายที่เหนี่ยวนำโดยสารสกัด SOM โดยศึกษาลักษณะของนิวเคลียสด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์คือ DAPI และ PI พบว่าในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด SOM มีการเปลี่ยนแปลงทางด้าน surface morphology คือ เซลล์มีลักษณะกลมไม่เหยียดออกเป็นรูปกระสวย การเกาะที่พื้นผิวไม่แน่นสามารถหลุดจากพื้นผิวได้ง่าย มีตุ่มที่ผนังเซลล์ (membrane blebing) มี apoptotic bodies กระจายอยู่ในซัยโต พลาสมหรือออกมานอกเซลล์ ในการศึกษาเชิงปริมาณ (quantitation) โดยการวิเคราะห์ทาง nuclear morphology ของสารสกัด SOM พบว่า มีการรวมกลุ่มกันของเส้นใยโครมาติน (condensed chromatin) และมีการแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) ซึ่งลักษณะที่พบนี้แสดงถึงเซลล์ติดสี DAPI แต่ไม่ติดสี PI เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ยังคงมีความสมบูรณ์ สี PI จึงไม่สามารถผ่านได้ จึงเรียกว่าเป็นการตายแบบ early apoptosis (ติดสี DAPI เป็นหย่อม ๆ) ส่วนในกลุ่มที่บ่มด้วยของ Doxorubicin พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่มีการติดสีของ PI เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูรั่วทำให้สีของ PI เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ที่ตายแบบ late apoptosis หรือ necrosis

การเกิด apoptosis ในระบบร่างกาย (*in vivo*) จะมีส่งสัญญาณให้มีการกำจัดเซลล์ที่ตายด้วยกระบวนการ phagocytosis โดยมี macrophage จะมาเก็บกินซากเซลล์ที่ตาย แต่ในระบบหลอดทดลอง (*in vitro*) เซลล์ที่อยู่ในกระบวนการเกิด apoptosis ไม่ถูกทำลายโดย macrophage จึงเข้าสู่ระยะ late apoptosis ซึ่งไม่ต่างกับ necrosis ซึ่งมีการบวมของ organelles ต่างๆ รวมถึงการบวมของเซลล์ด้วย ในการทดลองครั้งนี้ ภายในภาชนะเลี้ยงเซลล์อันเดียวกันสามารถมีเซลล์ที่เกิด apoptosis ในระยะที่แตกต่างกัน (heterogeneity) ผสมอยู่ในภาชนะเดียวกัน ผลการทดลองที่ได้จากการแตกของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) บน agarose gel จึงเป็นผลรวมระหว่าง early apoptosis กับ late apoptosis (Linfert *et al.*, 1997)

ผลการทดลองครั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีน้ำตาล ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่นเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) (Park *et al*, 2002), เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว humen pro-myelocytic leukemia (HL-60) (Bhaskar *et al.*, 2004) กลไกการออกฤทธิ์ของสาร fucoxanthin สกัดจากสาหร่ายชนิด *Undaria pinnatifida* คือกระตุ้น DNA fragmentation และ apoptosis ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่หลายชนิดเช่น Caco-2, HT-29 และ DLD-1 (Hosokawa *et al.*, 2004) สารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจาก *Sargassum latifolium* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (lymphoblastic leukemia 1301 cells) โดยยับยั้งการทำลาย DNA และกระตุ้นในเกิด apotosis ได้ (Gamal-Eldeen *et al.*, 2009) และยังสอดคล้องกับการศึกษาสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีน้ำตาล Turbinaria conoides และ Sagassum binderi มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 20 และ 90 ug/ml ตามลำดับพบนิวเคลียสแตก โครมาตินหนาแน่น และมี

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การแตกของ DNA ฟุ้งกระจายใน agarose gel ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของการตายแบบ apoptosis (Saengkhae *et al.*, 2009B; Saengkhae *et al.*, 2010)

รงควัตถุของสาหร่ายสีน้ำตาล คือ carotenoid ชนิด fucoxanthin ในผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาลมี alginic acid เซลล์ลูโลส และ sulfated fucan (fucoidan) เป็นองค์ประกอบหลักมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เช่นต้านอนุมูลอิสระ (Sachindra *et al.*, 2007) ลดภาวะโรคอ้วน (antiobesity) (Maeda *et al.*, 2005; Hosokawa *et al.*, 2010) ลดการเป็นเบาหวาน (Maeda *et al.*, 2009) และยับยั้งการอักเสบ (Shiratori et al., 2005) สารประกอบในกลุ่มซัลเฟตโพลีแซคคาไรด์ เช่น fucan) และ fucoidan พบมากในสาหร่ายสีน้ำตาล และเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลฟูโคส (fucose) เป็นองค์ประกอบหลักในโมเลกุล มีการแทนที่หมู่ไฮดรอกซิลด้วยซัลเฟตที่ตำแหน่งต่างๆ ทำให้สารดังกล่าวมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เช่นกัน

ถึงแม้ว่าสารสกัด SOM จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่ำกว่ายาแผนปัจจุบัน ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษกับเซลมะเร็งที่กำลังเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่ขณะเดียวกัน ก็ทำลายเซลล์ปกติที่กำลังเติบโตอย่างรวดเร็วในไขกระดูก ทำลายระบบทางเดินอาหาร ฯลฯ และเป็นสาเหตุทำให้เกิดผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ ประเทศไทยอุดมสมบูรณ์ไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติ มีสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย และมีการใช้สาหร่ายทะเลต่อเนื่องเป็นเวลานานนับพันปีเพื่อใช้เป็นยารักษาโรค เนื่องจาก มีแร่ธาตุสำคัญหลายชนิดโดยเฉพาะธาตุไอโอดีน ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น นม ไอศกรีม ขนมปัง และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง นอกจากนี้ยังใช้ประกอบอาหารรับประทานได้หลายชนิด ซึ่งเป็นหลักฐานที่แสดงถึงความเป็นพิษค่อนข้างต่ำ (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527; 2550) และจากหลักฐานทางวิทยาศาสตร์พบว่า การที่สาหร่ายสีน้ำตาลมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เช่น เพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ต้านอนุมูลอิสระ ถ้าร่างกายมีภูมิต้านทานที่ดีมีความสมบูรณ์ แข็งแรง ก็จะสามารถต่อสู้กับโรคมะเร็งได้ ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายสีน้ำตาลอย่างเป็นระบบ เพื่อนำมาใช้ร่วมกับยาแผนปัจจุบัน ทำให้ใช้ขนาดยาแผนปัจจุบันลดลง (Philchenkov *et al.*, 2007)

อย่างไรก็ตามการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้มุ่งหวังเพื่อหา novel compound เนื่องจากต้องใช้งบประมาณ กำลังคน เครื่องมือ เป็นจำนวนมหาศาล และจะใช้เวลานานในการพัฒนาผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาสารสกัดหยาบ (crude) จึงไม่ทราบว่าฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela cells) เกิดจากสารสำคัญเพียงตัวเดียวหรือเกิดจากหลายตัวทำงานร่วมกัน ซึ่งสาหร่ายชนิดเดียวกันแต่เก็บมาจากสถานที่ที่แตกต่างกัน พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ต่างกัน อาจเนื่องมาจากสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ว15.329
ก 283ก 291568

นั้น อาจเป็นสารทุติยภูมิที่เกิดขึ้นในธรรมชาติระหว่างกระบวนการเติบโต ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่เฉพาะ สาหร่ายชนิดเดียวกันที่เกิดในสิ่งแวดล้อมต่างกัน จึงมีการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันได้ ดังนั้นก่อนที่จะนำสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *Sargassum oligocystum* Montagne มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ ควรมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ให้แน่ชัด โดยนำมาทดลองกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ และในสัตว์ทดลองด้วย

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดหยาบจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *Sargassum oligocystum* Montagne ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเอทธิลอะซีเตด อัตรส่วน 1:1 สามาถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 132 ± 5.63 µg/ml มีการแตกของ DNA เป็น smear band ใน agarose gel เซลล์มีลักษณะกลม มีตุ่มที่ผนังเซลล์ มี apoptotic bodies กระจายอยู่ในซัยโต นิวเคลียสติดสี DAPI เป็นหย่อม ๆ ไม่สม่ำเสมอ (nuclear fragmentation)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ ในระดับไซโตพลาซึมหรือไมโตคอนเดรีย เพื่อยืนยันการตายแบบ apoptosis
2. ควรมีการทดลองในเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับการทดลองในเซลล์มะเร็ง
3. ควรมีการทดลองในเซลล์มะเร็งชนิดอื่น

เอกสารอ้างอิง

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527. สาหร่าย คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 343 หน้า.

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2550. จากวันนั้นถึงวันนี้...6 ปีที่ผ่านไป. ใน: โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ บรมราชกุมารี, จากยอดเขาถึงใต้ทะเล 2 สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว.. สู่ .. ประโยชน์แท้แก่มหาชน. หน้า 42-72.

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ.สถิติมะเร็ง. วันที่ค้นข้อมูล 1 กันยายน 2553, เข้าถึงได้จาก http://www.nci.go.th/knowledge/ahatis.html

Aisa Y, Miyakawa Y, Nakazato T, Shibata H, Saito K, Ikeda Y & Kizaki M. Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *AM J Hematol.* 2005, 78(1); 7-14.

Bhaskar N, Hosakawa M & Miyashita K. Growth inhibition of human pro-myelocytic leukemia (HL-60) cells by lipid extracts of marine alga Sargassum marginatum (Fucales, Phaeophyta) harvested off Goa (west coast of India) with special reference to fatty acid composition. *Ind J Mar Sci.* 2004, 33(4); 355-60.

Fornari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK and Gewirtz DA. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol,* 1994, 45 (4), 649-56.

Gamal-Eldeen AM, Ahmed EF & Abo-Zeid MA. In vitro cancer chemopreventive properties of polysaccharide extract from the brown alga, *Sargassum latifolium. Food Chem Toxic.* 2009, 47; 1378–84.

Hosokawa M, Miyashita T, Nishikawa S, Tsukui T, Beppu F, Okada T & Miyashita K. Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK-A^y mice. *Arc. Biochem Biophy.* 2010. (in press)

Hosokawa M, Wanezaki S, Miyauchi K, Kurihara H, Kohno H & Kawabata J. Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell HL-60. *Food Sci Technol Res.* 1999, 5; 243-6.

Hosokawa M, Kudo M, Maeda H, Kohno H, Tanaka T & Miyashita K. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPARgamma ligand, troglitazone, on colon cancer cells. ***BBA***. 2004, 1675; 113-9.

Jha RK & Rong XZ. Biomedical compounds from marine organisms. *Mar Drug.* 2004, 2; 123-46.

Kim J & Park EJ. Cytotoxic anticancer candidates from natural resources. *Curr Med Chem.* 2002, 2; 725-37.

Koyanagi S, Tanigawa N, Nakagawa H, Soeda S & Shimeno H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumao activities. *Biochem Pharm.* 2003, 65; 173-79.

Kuo PL, Hsu YL & Lin CC. The chemopreventive effects of natural products against human cancer cells. *Int J Appl Sci Eng.* 2005, 3; 203-14.

Li B, Lu F, Wei X & Zhao R. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules.* 2008, 13; 1671-95.

Linfert D.R, Chen C, Ma L, Lai T & Tsongalis GJ. Internucleosomal DNA Fragmentation in Apoptotic Myocytes . *Clinical Chemistry.* 1997, 43; 2431-34.

Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K &. Miyashita K. Fucoxanthin from edible brown seaweed, Undaria pinnatifida shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *BRRC.* 2005, 332;392-97.

Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama-Murakami K & Miyashita K. Antiobesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in murine model. *Mol Med Rep.* 2009, 2; 897-902.

Moore A, Donahue CJ, Bauer KD & Mather JP. Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. *Methoda Cell Biol.* 1998, 57; 265-78.

Nakazawa Y, Sashima T, Hosokawa M & Miyashita K. Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomer of fucoxanthin in human cancer cell lines. *J Functional Food.* 2009, 1; 88-99.

Noiraksa T, Ajisaka T & kaewsuralikhit C. Species of *Sagassum* in the east coast of the gulf of Thailand. *ScienceAsia.* 2006, 32(1); 99-106.

Park JS, Kim A, Kim EH, Suh HS & Choi WC. Increased Anticancer Activity by the Sulfated Fucoidan from Korean Brown Seaweeds. *J Korean Chem Soci* . 2002, 46(2); 151-6.

Philchenkov A, Zavelevich M, Imbs T, Zvyagintseva T & Zaporozhets T. Sensitization of human malignant lymphoid cells to etoposide by fucoidan, a brown seaweed polysaccharide. *Exp Oncol.* 2007, 3; 181-85.

Sachindra NM, Airanthi MK, Hosokawa M & Miyashita K. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of extracts from Indian seaweeds. *J Food Sci Technol.* 2007, 47; 94–9.

Saengkhae C, Jongaramruong J & Noiraksar T. Cytotoxic activities of crude extract from seaweeds along the gulf of Thailand on cancer cells. *Burapha Sci J.* 2009A, 2; 88-98.

Saengkhae C, Jongaramruong J, Noiraksar T & Piekpia J. Anti-proliferative and apoptosis-inducing activities of extracts from *Sagassum binderi* Sonder on human cervical cancer cells. *Burapha Sci J.* 2010, 15; 3-12.

Saengkhae C, Noiraksar T, Jongaramruong J & Palee P. Anti-proliferative and induction of apoptosis by extract of *Turbinaria conoides* (J. Agardh) Kutzing on human cervical cancer cell line. Chula Med *J.* 2009B, 53; 1-12.

Satomi Y & Nishino H. Implication of mitogen-activated protein kinase in the induction of G1 cell cycle arrest and gadd45 expression by the carotenoid fucoxanthin in human cancer cells. **BBA.** 2009, 1790; 260-66.

Shiratori K, Ohgami K, Ilieva I, Jin XH, Koyama Y, Miyashita K, Kase S & Ohno S. Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Exp Eye Res.* 2005, 81; 422-8.

Sugawara T, Matsubara K, Akagi R, Mori M & Hirata T. Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol. *J Agr Food Chem.* 2006, 54; 9810-50.

Teruya T, Konishi T, Uechi S, Tamaki H & Tako M. Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured Cladosiphon okamuranus TOKIDA in U937 cells. *Int J Biol Macromol.* 2007, 41(3); 221-6.

Tsao AS, Kim ES & Hong WK. Chemopreventive of cancer. *CA Cancer J Clin.* 2004, 54; 150-80.

Walker PR, leblance J, Smith B, Pandey S & Sikorska. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Meth in Enzymo.* 1999, 17; 329-38.

Ye H, Wang K, Zhou C, Liu J & Zeng X. Purification, antitumor, antioxidant activity *in vitro* of polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum pallidum* . *Food Chem.* 2008, 111; 428-32.