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

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จากสารสกัดบริสุทธิ์ลำบิดดงและท้าวแสนปม

Anti-proliferative activities of pure compounds from Diospyros filipendula and Diospyros cauliflora

นางสาวจันทรวรรณ แสงแข
นางวารี เนื่องจำนงค์

EBK 0138746
AQ 007961 3
16 ส.ค. 2554
291588
เริ่มบริการ
11 ต.ค. 2554

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ 2553

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จากสารสกัดบริสุทธิ์ลำบิดดงและท้าวแสนปม
Anti-proliferative activities of pure compounds from *Diospyros* filipendula and *Diospyros* cauliflora
ชื่อแผนการวิจัย ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์จากสมุนไพร
ชื่อผู้วิจัย นางสาวจันทรวรรณ แสงแข [1] และ นางวารี เนื่องจำนงค์ [2]
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท...การวิจัยพื้นฐาน .ประจำปี...2553...จำนวนเงิน...141,500.-....
ระยะเวลาทำการวิจัย 1.2 ปี ตั้งแต่...ธันวาคม 2552.ถึง...กุมภาพันธ์...2554.....
หน่วยงาน [1] คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา [2] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

เกือบทุกส่วนของพืชสกุล *Diospyros* ถูกใช้ในทางการแพทย์แผนโบราณทั่วโลก และสกัดสารบริสุทธิ์ได้แก่ hydrocarbons, steroids, terpenoids และ naphthoquinones เป็นต้น ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระตุ้นกระบวนการ apoptosis แต่อย่างไรก็ตามพบว่าพืชในสกุล *D.* filipendula และ *D.* cauliflora ยังไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ ดังนั้นจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ และกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุล ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยทำการตกผลึกจากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดง (*D. filipendula*) ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ stigmasterol และ taraxerol และจากส่วนสกัดเฮกเซนของรากท้าวแสนปม *(D. cauliflora)* ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ lupeol ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญในเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยเทคนิค MTT ทำการสกัด DNA จากตัวอย่างและทดสอบการแตกของเส้น DNA ด้วยวิธี electrophoresis ใน 1.5% agarose gel และทดสอบการแตกของนิวเคลียสด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ DAPI และ propidium iodide (PI) ผลการทดลองพบว่าสาร stigmasterol, taraxerol และ lupeol ทำให้เซลล์ตาย ตามขนาดความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เซลล์ที่ตายมีลักษณะกลม เยื่อหุ้มเซลล์เป็นถุง (bleb) และมี apoptotic body ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีลักษณะเหยียดเป็นรูปกระสวย ความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50% เท่ากับ 37 ± 2.49, 10 ± 1.3 และ 20 ± 2.6 µg/ml ตามลำดับ พบการแตกของเส้น DNA เป็นแบบ smear band ซึ่งไม่พบลักษณะดังกล่าวในกลุ่มควบคุม เมื่อย้อมนิวเคลียสด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ พบเซลล์ในกลุ่มทดลองมี apoptotic nuclei เท่ากับ 30.27 ± 0.9, 23.8 ± 0.99 and 42.23 ± 2.51% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 3.12 ± 1.29% ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารทั้ง 3 ชนิด เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชที่ใช้เป็นอาหาร สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกตายแบบ apoptosis และน่าจะมีศักยภาพในการป้องกันหรือยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งในระยะยาว และเพื่อยืนยันกลไกการเกิด apoptosis จึงควรมีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ caspase ต่อไป

คำสำคัญ: ลำบิดดง, ท้าวแสนปม, HeLa cells, ยับยั้งการเจริญเติบโต, อะโพโทซิส, การแตกของ DNA

Abstract

Many *Diospyros* species have been reported in different traditional medicines of the world and exhibited interesting pharmacological activities. Almost all parts of these plants have been used as medicines and a great diversity of compounds has been isolated ranging from hydrocarbons, steroids, terpenoids and naphthoquinones. Many species of *Diospyros* contain compounds with cytotoxic properties and induce apoptosis but *D.* filipendula and *D.* cauliflora are still lack any medicinal record in the current literature. The objective in this study is to evaluate antiproliferative activities and their molecular mechanisms in human cervical cancer cells. Crude hexane extracts of roots of *D. filipendula* and *D. cauliflora* were purified by chromatography and crystallization. Stigmasterol and taraxerol from *D. filipendula* and lupeol from *D. cauliflor*a have been isolated. Using HeLa cells as a model system, the cytotoxic effects were measured by MTT assay. Following various treatments, DNA samples were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and apoptotic nuclei were quantified using DAPI and propidium iodide (PI) staining. Stigmasterol, taraxerol and lupeol induced HeLa cell death in a dose-dependent manner associated with rounding cells, membrane blebbing and apoptotic body compared with polygonal shape in control cells. The IC_{50} of 48 h incubation was 37 ± 2.49, 10 ± 1.3 และ 20 ± 2.6 µg/ml, respectively. DNA agarose gel electrophoresis showed typical length of DNA fragmentation where as control cells did not provide smear bands. The apoptotic nuclei in treated cells were 30.27 ± 0.9, 23.8 ± 0.99 and 42.23 ± 2.51% respectively compared with the untreated control (3.12 ± 1.29%). These results suggested that stigmasterol and taraxerol from *D. filipendula* and lupeol from *D. cauliflor*a had cytotoxicity and induction of apoptosis on HeLa cells. These substances represent dietary phytochemicals which can show different activities and have potential for cancer chemoprevention. To gain insight into mechanism of apoptosis, the role of caspase activation cascade is necessary to confirm.

Key words: *Diospyros* filipendula, *Diospyros* cauliflora, HeLa cells, Anti-proliferation, Apoptosis, DNA fragmentation

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ 0
วัตถุประสงค์โครงการวิจัย 3
ขอบเขตของการวิจัย 3
บทที่ 2 4
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 4
สรรพคุณทางการแพทย์แผนโบราณ 4
สารเคมีสำคัญของพืชในสกุล Diospyros 5
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา 5
ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 7
บทที่ 3 9
วิธีการทดลอง 9
การเก็บและการเตรียมสารตัวอย่าง 9
การแยกสารจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีและการพิสูจน์เอกลักษณ์ 9
การเลี้ยงเซลล์ (cell culture) 9
ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT 10
วิเคราะห์การแตกของ **DNA** โดย **agarose gel electrophoresis** 10
ศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย **DAPI & PI staining** 11
การแสดงข้อมูล 12
บทที่ 4 13
ผลการทดลอง 13
ผลการแยกสารจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีและการพิสูจน์เอกลักษณ์ 13
ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT 15
ผลการวิเคราะห์การแตกของ **DNA** โดย **agarose gel electrophoresis** 18
ผลการศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย **DAPI & PI staining** 19
บทที่ 5 23
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง 23
สรุปผลการทดลอง 26
ข้อเสนอแนะ 26
เอกสารอ้างอิง 27

สารบัญภาพ

รูป 1 fraction 4-6 มีสูตรโครงสร้างสารอ้างอิง กลุ่มสเตอรอยด์ ชื่อว่า stigmasterol 13

รูป 2 fraction 5.6.6 มีสูตรโครงสร้างสารอ้างอิง กลุ่มสเตอรอยด์ ชื่อว่า taraxerol 14

รูป 3 fraction 2 มีสูตรโครงสร้างสารอ้างอิง กลุ่มสเตอรอยด์ ชื่อว่า lupeol 14

รูป 4 กราฟแสดงผลของสาร stigmasterol ต่อการรอดชีวิตของ HeLa cells ผลการทดลองแสดงโดยค่า mean ± S.E.M. (n=3) 16

รูป 5 กราฟแสดงผลของสาร taraxerol ต่อการรอดชีวิตของ HeLa cells ผลการทดลองแสดงโดยค่า mean ± S.E.M. (n=3) 16

รูป 6 กราฟแสดงผลของสาร lupeol ต่อการรอดชีวิตของ HeLa cells ผลการทดลองแสดงโดยค่า mean ± S.E.M. (n=3) 17

รูป 7 กราฟแสดงผลของสาร doxorubicin ต่อการรอดชีวิตของ HeLa cells ผลการทดลองแสดงโดยค่า mean ± S.E.M. (n=3) 17

รูป 8 แสดงการเกิด DNA fragmentation ของ HeLa cells ที่บ่มด้วย stigmasterol (Sti), taraxerol (Tar), lupeol (Lup) และ doxorubicin (Dox) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} คือ 37±2.49, 10±1.3, 20±2.6 µg/ml และ 4.8±0.86 µg/ml ตามลำดับ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 18

รูป 9 แสดงลักษณะเซลล์และนิวเคลียส จากการย้อมด้วย สี DAPI และ PI, B = bleb, N = normal, E = early apoptosis, l = late apoptosis, scale bar = 10 uM 21

สารบัญตาราง

ตาราง 1 สารเคมีสำคัญในส่วนต่างๆของพืชในสกุล Diospyros 5

ตาราง 2 แสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากพืชในสกุล Diospyros 6

ตาราง 3 แสดงลักษณะการติดสี DAPI และ PI ของเซลล์ในระยะต่างๆ 12

ตาราง 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis วิเคราะห์จากการติดสี DAPI และ PI ที่นิวเคลียส 22

บทที่ 1
บทนำ

โรคมะเร็งเป็นโรคร้ายแรงที่เกิดได้กับคนทุกเพศ ทุกวัย เป็นโรคที่ทำให้เกิดความทุกข์ทรมาน มีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต ผลกระทบต่อครอบครัว สังคม และประเทศชาติในหลายๆด้าน มีอัตราการเสียชีวิตก่อนเวลาอันควรซึ่งเป็นการสูญเสียทรัพยากรมนุษย์ที่ประเมินเป็นเงินไม่ได้ นอกจากนี้ยังเสียค่ารักษาซึ่งแพงมากเพราะเป็นยาที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ประเทศไทยต้องเสียดุลการค้าเรื่องเครื่องมือแพทย์และยาสำหรับโรคมะเร็งอย่างต่อเนื่อง มีผู้ป่วยจำนวนมากไม่สามารถเข้ารับการรักษาได้ จึงเป็นปัญหาทางสาธารณะสุขในระดับประเทศและระดับโลก ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลกรายงานอัตราการตายของผู้ป่วยโรคมะเร็งมากถึง 7.4 ล้านคน คิดเป็น 13% ของการตายทั้งหมด อัตราการตายด้วยโรคมะเร็งยังมีแนวโน้วสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง องค์การอนามัยโลกได้คาดการถึง 12 ล้านคน ในปี 2030 (Parkin et al., 2005)

โรคมะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์ โดยเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตได้อย่างไม่หยุดยั้ง มักตรวจพบหลังจากโรคได้ดำเนินไประยะหนึ่งแล้ว ทำให้การรักษาทำได้ยาก ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ และมักพบการเกิดซ้ำในอวัยวะส่วนอื่น สาเหตุที่ทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง เชื่อว่าเกิดจากปัจจัยหลายๆอย่างรวมกัน ในเซลล์มะเร็งมีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมที่ซับซ้อน ทำให้เซลล์แบ่งตัว และเจริญเติบโตอย่างไม่หยุดยั้ง มีกระบวนการเกิด apoptosis ที่ผิดปกติ ทำให้ตั้งสมมุติฐานได้ว่า ในเซลล์มะเร็งพบการเพิ่มสัญญาณของ anti-apoptotic signals ขณะเดียวกันก็ลดสัญญาณของ pro-apoptotic signals เซลล์จึงผ่านเข้าสู่วัฏจักรเซลล์ และเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าเซลล์ปกติ จนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (Kasibhatla & Tseng, 2003; Hu & Kavanagh, 2003) ถ้าเราสามารถพัฒนายาหรือสมุนไพรที่ออกฤทธิ์กระตุ้นกระบวนการเกิด apoptosis ได้ ก็น่าจะประสบความสำเร็จในการควบคุมหรือรักษาโรคมะเร็งได้เช่นกัน โดยมุ่งเป้าที่เอนไซม์ caspases ในเซลล์มะเร็ง โดยเอนไซม์ caspases ที่ถูกกระตุ้นให้ทำงานจะทำลายโปรตีนที่เป็นโครงสร้าง ทำลายโปรตีนที่เป็นเอยไซม์ซ่อมแซมดีเอนเอ และทำลายดีเอนเอ ทำให้เซลล์มะเร็งแบ่งตัวไม่ได้ (Kaufmann & Earnshaw , 2000; Reed, 2001; Vermeulen *et al.*, 2005)

ในปัจจุบันมียาออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด แต่ยาเหล่านี้มีพิษค่อนข้างสูง หลังจากใช้ยาไปแล้วระยะหนึ่งเซลล์มักจะเกิดการดื้อยาที่ใช้รักษาและดื้อต่อยาอีกหลายชนิด (multidrug resistance) (Chau *et al.*, 2006) ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงพยายามพัฒนาตำหรับยาสมุนไพรไทยที่มีประสิทธิภาพการรักษาสูง หรือเสริมประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยาแผนปัจจุบัน ทำให้ขนาดยาที่

รักษาน้อยลงแต่ได้ประสิทธิภาพสูงขึ้น และมีผลไม่พึงประสงค์น้อยลง (Shoeb, 2006; Johnson, 2007) พืชสมุนไพรมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรค และใช้มาเป็นเวลาหลายพันปีมาแล้ว ในลักษณะของภูมิปัญญาไทยและภูมิปัญญาท้องถิ่น นับวันจะลดน้อยถอยลงตามลำดับ เพราะถูกแทนที่โดยการแพทย์แผนปัจจุบัน มีพืชสมุนไพรจำนวนมากถูกพัฒนาเป็นยาแผนปัจจุบัน (Kappor, 1990; Samuelsson, 1999) การค้นพบสารต้านมะเร็ง Vinblastine (Vincaleukoblastine) และ Vincristine (leurocristine) จากต้นแพงพวยฝรั่ง (Cragg & Newman, 2005) เป็นความสำเร็จที่ยิ่งใหญ่ และเป็นจุดที่กระตุ้นให้มีการค้นคว้าหาสารต้านมะเร็งจากพืชอื่นๆต่อไป องค์การอนามัยโลกประมาณการว่า ประชากรในโลกประมาณ 80% ใช้สมุนไพรสำหรับการดูแลสุขภาพเบื้องต้น (primary health care) (Farnsworth *et al.*, 1985) การใช้สมุนไพรในการรักษา หรือบรรเทาอาการของโรคมะเร็ง เป็นแนวทางหนึ่งที่ผู้ป่วยให้ความนิยมและเลือกใช้มานาน

เนื่องจากประเทศไทยมีภูมิปัญญาท้องถิ่นด้านการแพทย์แผนไทย มีพืชพันธ์หลากหลายที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาได้ เพื่อยกระดับคุณภาพชีวิตของคนไทย การใช้ประโยชน์จากสมุนไพรจึงมีความจำเป็นสำหรับการพึ่งตนเองในระยะยาว ในโรคที่เป็นปัญหาด้านสุขภาพของประชาชนชาวไทย แต่อย่างไรก็ตาม การนำสมุนไพรไปใช้รักษาและป้องกันโรคมะเร็งยังขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์หรือทางการแพทย์ เพื่อยืนยันสรรพคุณ กลไกการออกฤทธิ์ และปริมาณที่เหมาะสมในการบริโภค หากมีการผลิตและใช้สมุนไพรอย่างเป็นระบบ ก็จะทำให้การพึ่งพายาจากต่างประเทศลดน้อยลง การทดสอบบทบาทของสมุนไพรในการทำลายเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ จึงเป็นงานสำคัญส่วนหนึ่งในการพัฒนาความรู้และผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากสมุนไพร

พืชในสกุล Diospyros เป็นพืชสมุนไพรที่ มีประวัติในการรักษาโรคต่างๆตามภูมิปัญญาชาวบ้านมากมายเช่น Diospyros rhodocalyx Kurz (ตะโกนา, 2550) ส่วนรากแก้โรคผอมแห้งหลังจากคลอดบุตรอยู่ไฟไม่ได้ บำรุงน้ำนม ส่วนลำต้นใช้แก้ผื่นคัน และผลแก้ท้องร่วง Diospyros anisandra (Borges-Argaez, *et al.*, 2007) ใช้รักษาโรคที่เกี่ยวกับผิวหนัง Diospyros crassiflora (Hien) (Tangmouo *et al.*, 2006) สารที่สกัดได้ใช้ต่อต้านแบคทีเรียและยีสต์ Diospyros assimillis (Ganapaty *et al.*, 2006) ใช้เป็นยารักษาโรคเรื้อน โรคหิด แผลพุพองและหนองใน Diospyros villosiuscula (Khan *et al.*, 1999) ใช้รักษาอาการประจำเดือนมาไม่ปกติ อาการปวดท้อง แผลเปื่อย Diospyros mollis Griff.(สำนักงานข้อมูลสมุนไพร, 2550) ใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆของสารบริสุทธิ์จากพืชในสกุล Diospyros ลำบิดดง (Diospyros filipendula) (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2550) และ ท้าวแสนปม Diospyros cauliflora เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่อยู่ในวงศ์นี้ ภูมิปัญญาชาวบ้านใช้รักษาโรคซาง

พืชในสกุล Diospyros มีสารสำคัญ (active ingredient) หลายชนิดได้แก่ naphthoicacid naphthaaldehyde, naphthoquinone, steroid และ terpenoids (Tangmouo *et al.*, 2006; (Ganapaty *et al.*, 2006) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (anticancer) ซึ่งสารสำคัญดังกล่าวน่าจะปรากฏในลำบิดดง (Diospyros filipendula) และ ท้าวแสนปม Diospyros cauliflora เช่นกัน จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของลำบิดดงและท้าวแสนปมที่จะพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็ง แต่ยังขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุน

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

ศึกษาสารสกัดบริสุทธิ์จากส่วนรากของบิดดงและท้าวแสนปมเพื่อ

1. พัฒนาศักยภาพของสมุนไพรไทยเพื่อประโยชน์ด้านรักษาโรคมะเร็ง
2. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง
3. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของสารสกัดบริสุทธิ์

ขอบเขตของการวิจัย

ส่วนรากของลำบิดดงและท้าวแสนปมถูกนำมาสกัดให้บริสุทธิ์ และหาสูตรโครงสร้างเคมี สารสกัดบริสุทธิ์ที่ได้จะนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งและกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลที่เหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย

บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติเป็นแหล่งสำคัญที่ใช้ผลิต chemotherapeutic agents ที่มีประสิทธิภาพสูง ยารักษาโรคมะเร็งที่ผ่านการคัดกรองจากสถาบัน Food and Drug Administration (FDA) ประเทศสหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ปี 1960 นั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติมากกว่า 50% ในทางการแพทย์แผนไทยมีสมุนไพรหลายชนิด ที่เป็นมรดกอันล้ำค่าของภูมิปัญญาชาวบ้านนำมาใช้รักษาโรคมะเร็งอย่างแพร่หลายเป็นระยะเวลานาน โดยนำมาต้มกับน้ำ หรือนำมาดองด้วยแอลกอฮอล์ อย่างไรก็ตามหลักฐานดังกล่าวเป็นการถ่ายทอดจากบรรพบุรุษ ซึ่งยังไม่มีหลักฐานทางเภสัชวิทยาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยเฉพาะจากส่วนรากของลำบิดดงและท้าวแสนปม ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย ซึ่งปริมาณสารสำคัญนั้นขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างเช่น สายพันธุ์ ดินที่ปลูก ระยะเวลาในการปลูก ฤดูที่เก็บเกี่ยว ดังนั้นจึงควรมีการวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการแยกและสกัดสารสำคัญ เพื่อนำมาเป็นสารมาตรฐานในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อไป

สรรพคุณทางการแพทย์แผนโบราณ

พืชในสกุล Diospyros ได้ถูกนำมาใช้ในการแพทย์แผนโบราณทั่วโลก เช่น อายุรเวชและยูนานิของประเทศอินเดีย (Ayurveda and Yunani), การแพทย์พื้นบ้านของทวีปอฟริกา (African folklore) และ การแพทย์พื้นบ้านของประเทศจีน (Chinese folklore) สิ่งที่เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือเกือบทุกส่วนของพืชชนิดนี้สามารถนำมาใช้เป็นยาได้ เช่น ใบเหมาะสำหรับแก้โรคปวดหลัง (backache) ส่วนผล ใช้เป็นยาแก้ท้องอืด (carminative agent) แก้ปวดท้อง (astringent) ส่วนเมล็ดใช้เป็นยานอนหลับ (sedative agent) ส่วนเปลือกมีรสขมใช้แก้ปวดท้องเช่นกัน การแพทย์แผนโบราณประเทศอินเดียมีพืชในสกุล Diospyros ถูกใช้อย่างแพร่หลายถึง 12 ชนิด การแพทย์แผนโบราณอายุรเวชนำน้ำคั้นจากส่วนเปลือกและใบของ *D. peregrina* มารักษาแผลที่เกิดจาดงูกัด ส่วนดอกที่ตากแห้งของ *D. melanoxylon* ถูกนำมาใช้ใน การแพทย์แผนโบราณประเทศอินเดีย (Yunani) โดยใช้เป็นยาขับปัสสาวะ เป็นยาต้านการอักเสบของม้าม ในประเทสไทย *D. mollis* และ *D. rhodocalyx* ถูกใช้เป็นยาขับปัสสาวะ ยาแก้ท้องเสีย ยาฆ่าพยาธิ ในทวีปอฟริกาใต้ *D. hirsute* ใช้รักษาโรคหนองใน และ *D. lucida* ใช้แก้ปวดท้องประจำเดือน (Mallavadhani *et al.*, 1998)

สารเคมีสำคัญของพืชในสกุล Diospyros

เกือบทุกส่วนของพืชในสกุล Diospyros ได้มีการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี และพบสารสำคัญในส่วนต่างๆดังแสดงในตาราง 1 พบว่า triterpenoids และ naphthoquinones กระจายเกือบทุกส่วนของพืชชนิดนี้ สารในกลุ่ม terpenoids พบว่า 90% ของพืชใน Diospyros species เป็นชนิด triterpenes: pentacyclic core ได้แก่ lupine, ursane, oleanane, taraxerane, friedelane ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer), ต้านโรคเอดส์ (anti-HIV) และต้านการอักเสบ (anti-inflammation) (Mallavadhani *et al.*, 1998)

สารสกัดชั้นคลอโรฟอร์มของส่วนเปลือกไม้ของต้นจันทน์ (*Diospyros decandra*) สามารถแยกสารบริสุทธิ์ชนิดใหม่ในกลุ่มสารประกอบไตรเทอร์ปีนได้ 5 ชนิด ซึ่งเป็นสาร 24-nor-, 24-nor-2,3-seco-, และ 3,24-dinor-2,4-seco-ursane triterpenes รวมทั้ง betulinic acid นอกจากนี้สารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จาก methanol extract ส่วนกิ่งของ *D. discolor* ได้แก่ lanostane-type triterpenes, triterpenes, betulinaldehyde, betulinic acid, methyl ester และ ursaldehyde (Chen *et al.*, 2007)

ตาราง 1 สารเคมีสำคัญในส่วนต่างๆของพืชในสกุล Diospyros

Class of compounds	Part of the species
Carotenoids	Fruit
Tannins	Fruit, leaf
Sugars	Fruit, seed, root
Hydrocarbons	Fruit, seed, leaf
Lipids	Fruit, seed, bark
Aromatics	Fruit, root, bark
Flavonoids:coumarins	Fruit, leaf, root, sapwood
Terpenoids	Fruit, leaf, calyx, seed, root, bark, heartwood, ebony
Steroids	Leaf, root, bark, heartwood
Naphthoquinones	Fruit, leaf, root, bark, heartwood

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

การศึกษาสารสกัดจาก พืชวงศ์ *Diospyros* ทั้งใน *in vivo* และ *in vivo* เริ่มตั้งแต่ปี 1952 จนถึงปัจจุบัน เป็นข้อมูลที่แสดงถึงศักยภาพของพืชชนิดนี้ ในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคในอนาคต ตัวอย่างเช่น สารในกลุ่ม flavonol glycosides ที่สกัดได้จาก *D. cathayensis* และ *D. rhombifolia* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ในหลอดทดลอง (Furusawa *et al.*, 2005) สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเปลือกลำต้นของ *D. fischerin* ไม่สามารถยับยั้งการชัก (convulsion) ที่เหนี่ยวนำด้วยสาร picrotoxin ในหนู mice อย่างไรก็ตามสารที่สกัดด้วย 80% ethanol ขนาด 100-3,200 mg/kg

สามารถยับยั้งการชักแบบ dose-dependent manner และมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้งที่ $GABA_A$-receptor ซึ่งพืชชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดในทวีปอฟริกา ประเทศ Tanzania และสอดคล้องกับการแพทย์แผนโบราณที่รับประทานสมุนไพรชนิดนี้ในการรักษาโรคลมชักมาเป็นเวลานาน (Moshi *et al.*, 2007) สารสกัดหยาบด้วย methanol จากส่วนเปลือกลำต้นของ *D. sanza-minika* มีสารประกอบสำคัญคือ norbergenin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย (antimalarial activity) ชนิด Plasmodium falciparum K1 ในระดับหลอดทดลอง (Tangmouo *et al.*, 2010) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากพืชในสกุล Diospyros แสดงในตาราง 2 (Mallavadhani *et al.*, 1998)

ตาราง 2 แสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากพืชในสกุล Diospyros

Species	Part	Extract	Pharmacological activity
D. chloroxylon	PER	50% EtOH	Antiviral
D. cordifolia	NS	Alcohol	Anti-inflammation, anti!pyretic, analgesia, depressant
D. embryopteris	Leaves	80% EtOH	Abolition of libido in male rats
D. exsculpta	PER Seeds	50% EtOH	Showed activity on cardiovascular system, CNA depressant and anti-bacterial activities
D. insignis	PER	50% EtOH	Antifertility
D. kaki	Fruit Leaves Leaves	- Tannin MeOH	Strong detoxyfying activity, anti-bacterial activities Increases life span and decreases brain haemorrhage and infarction in stroke prone spontaneously hypertensive rats Scavenging action towards active oxygen free radicals Inhibited lipid peroxidation Hypotensive activity against urethane anaesthatised rats
D. leucomelas	Leaves	CH_2Cl_2 & MeOH	Anti-infammatory activity in the carrageenan & serotonin paw edema tests and TPA and EPP ear edema tests
D. melanoxylon	Seed	-	Antibacterial
D. mespiliformis	Seed	-	Antibacterial
D. montana	Leaves Bark Bark	Pet. Ether, CC_4, C_6H_6 90% EtOH Alcohol	Antibacterial Inhibited the growth of Ehrlich ascites carcinoma in mice, anti-infammatory and anti-pyretic activities CNS depressant activity
D. morrisiana	Stem	Hexane	Cytotoxicity against *in vitro* tissue culture cells of human KB and A!438 lung carcinoma, HCT-8 colon tumor and murine P-377 and L-1210 lymphocytic leukaemia
D. peregrina	Fruit NS PER	Ether Alcohol 50% EtOH	Antibacterial Anti-amoebic, anti-viral, hypoglycaemic activities Diuretic activity Anti-stress, prevent gastric ulcer, hepatotoxicity
D. virginiana	Fruit	-	Cholesterol lowering activity
D. zombensis	Root bark	Petrol & $CHCl_3$	Cytotoxicity against human colon carcinoma cells
D.sanza-minika	Bark	MeOH	Antimalarial activity
D. fischeri Gurke	Bark	80% EtOH	Anticonvulsion activity
D. cathayensis *D. rhombifolia*	Leaves	MeOH	Antoxidant activity
D. Seychellarum	Leaves	70% EtOH	Cytotoxicity against Jurkat T lymphocytes

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการสกัดสารสำคัญจากพืชวงศ์ Diospyros พบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้หลากหลาย โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งมีดังนี้ ในปี 1989 Yan และคณะได้แยก isodiospyrin, -amylin และ olean-12-en-3-on จาก *Diospyros morrisiana* พบว่า isodiospyrin มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT-8), มะเร็งเม็ดเลือดขาว (P-388) โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 4.9 และ0.59 mg/ml ตามลำดับ (Yan *et al.*, 1989) ต่อมา Kuo และคณะ (1997) ได้แยก isodiospyrin, 8'-hydroxyisodiospyrin, friedelin, epifridelinol, Lupiol, luponone, betulin และ lup-20(29)-en-3B, 30-diol จากส่วนสกัด hexane ของ Diospyros ferra พบว่าสารบริสุทธิ์เหล่านี้ต้านเซลล์มะเร็งในระดับหลอดทดลองได้ 4 cell lines โดยที่ isodiospyrin และ 8'-hydroxyisodiospyrin ต้านเซลล์มะเร็งตับ (Heb-3B), มะเร็งช่องปาก (KB), มะเร็งลำไส้ใหญ่ (COLO-205) และมะเร็งปากมดลูก (Hela) โดยมีค่า ED_{50} ของ isodiospyrin เท่ากับ 0.17, 1.72, 0.16 และ 0.21 mg/ml ตามลำดับ และค่า ED_{50} ของ 8'-hydroxyisodiospyrin เท่ากับ 1.31, 1.75, 1.96 และ1.79 mg/ml ตามลำดับ (Kuo *et al.*, 1997)

Ademiyi และคณะ (2003) ได้แยก Diospyrone ซึ่งเป็น naphthoquinone จากเปลือกรากของ *Diospyros mespiliformis* และ *Diospyros tricolor* ซึ่ง Diosquinone มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้ 10 cell lines โดยเซลล์มะเร็งสมอง (U 373) มีค่า ED_{50} เท่ากับ 4.5 mg/ml กลไกการออกฤทธิ์ที่ได้เสนอแนะในการทดลองนี้คือการยับยั้งฮอร์โมน LNCaP (Adeniyi *et al.*, 2003) ในปี 2004 Gu และคณะได้ศึกษาองค์ประกอบของเปลือก Diospyros maritime พบว่ามีสารประกอบชนิด naphthoquinone 4 ชนิดคือ plumbagin, maritinone, chitranone และ zeylanone ในขณะเดียวกันพบว่ามีสารประกอบชนิด coumarin อีก 3 ชนิด โดย naphthaquinone ทั้งหมดออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและต้านจุลินชีพได้ (Gu *et al.*, 2004) ต่อมาในปี 2006 Ganapaty และคณะได้แยกอนุพันธ์ของแนฟทาลีน 6 ตัวจากรากของ Diospyros assimillis ซึ่งอนุพันธ์เหล่านี้มีฤทธิ์ต้านโปรโตซัวและต้านเซลล์มะเร็ง (Ganapaty *et al.*, 2006) สารสกัดด้วย 70% EtOH จากส่วนใบของ *Diospyros Seychellarum* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ Jurkat T lymphocytes โดยจำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มตามขนาดความเข้มข้น (dose-dependent response) มีกลไกการตายแบบ apoptosis คือ สูญเสียความต่างศักดิ์ในไมโตคอนเดรีย และมี chromatin condensation (Buenz *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามสารเมตาโบลัยซ์ ในพืชวงศ์ Diospyros นั้นขึ้นกับสภาพภูมิประเทศและสิ่งแวดล้อมด้วย (Gu *et al.*, 2004)

จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของพืชวงศ์ Diospyros ที่จะพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็ง แต่ยังขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนโดยเฉพาะต่อมะเร็งในมนุษย์ในระดับหลอดทดลอง และกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุล

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

การเก็บและการเตรียมสารตัวอย่าง

นำส่วนรากของลำบิดดงและท้าวแสนปม มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ตากให้แห้ง แล้วบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก บรรจุใส่ถุงผ้าที่สะอาด มัดให้แน่น หลังจากนั้นนำไปแช่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนเป็นเวลา 7 วัน ในถังสแตนเลสที่มีฝาปิด แล้วไขตัวทำละลายออกมา เพื่อนำไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน ทำการสกัดซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วนำ crude extracts ที่ได้ทั้ง 3 ครั้งมารวมกันทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศ เมื่อแห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก ส่วนใบทำเช่นเดียวกับราก

การแยกสารจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีและการพิสูจน์เอกลักษณ์

การแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์ ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีและทำการตกผลึกได้สารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดง (*Diospyros filipendula*) ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดและ จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากท้าวแสนปม *(Diospyros cauliflora)* ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด นำสารบริสุทธิที่ได้ทั้งหมดมาพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยวิธีทางสเปคโตรสโคปี ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 และเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปคโตรสโคปีกับสารอ้างอิง พบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดงคือ stigmasterol; taraxerol และ จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากท้าวแสนปมคือ lupeol

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 โดยหลุมที่เป็น vehicle control บ่มด้วย DMSO (0.5%) หลุมที่ทดสอบความเป็นพิษบ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 0–250 µg/ml นาน 48 ชม. ส่วน positive control นั้นทำการทดสอบด้วย doxorubicin ที่ความเข้มข้น 0-10 µg/ml นาน 48 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 0.5% DMSO, DOX [IC_{50}] และสารสกัด [IC_{50}] ตามลำดับ นาน 48 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 100 ng/µl โดยเจือจางกับน้ำกลั่น เพื่อนำไป load ลงเวลของ agarose ในขั้นตอนต่อไป

Agarose gel electrophoresis

นำ 100 ng/µl DNA ปริมาตร 8 µl (800 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 0.5%DMSO, DOX [IC_{50}] และสารสกัด [IC_{50}] ตามลำดับนาน 48 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 8.3 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 3 และทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

ตาราง 3 แสดงลักษณะการติดสี DAPI และ PI ของเซลล์ในระยะต่างๆ

	การติดสี DAPI	การติดสี PI
Viable cells	ติดสีฟ้าเนียน	ไม่ติดสีแดง
Apoptotic cells	ติดสีฟ้าไม่เรียบเนียน แต่เป็นหย่อมๆ	ไม่ติดสีแดง
Late apoptotic หรือ Necrotic cells	ติดสีฟ้าไม่เรียบเนียน แต่เป็นหย่อมๆ	ติดสีแดง

การแสดงข้อมูล

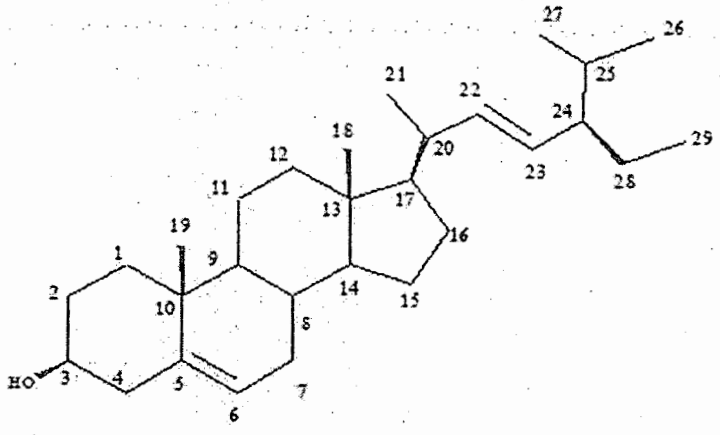
ในแต่ละการทดลอง ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง (n=3) การทดลองความเป็นพิษต่อ HeLa cells เขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม microcal origin 6.0 แสดงผลเป็นค่า mean ± standard error of mean (S.E.M.) การวิเคราะห์การแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmention) แสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ ± S.E.M. ร่วมกับภาพถ่าย ส่วนการวิเคราะห์การแตกของ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

บทที่ 4

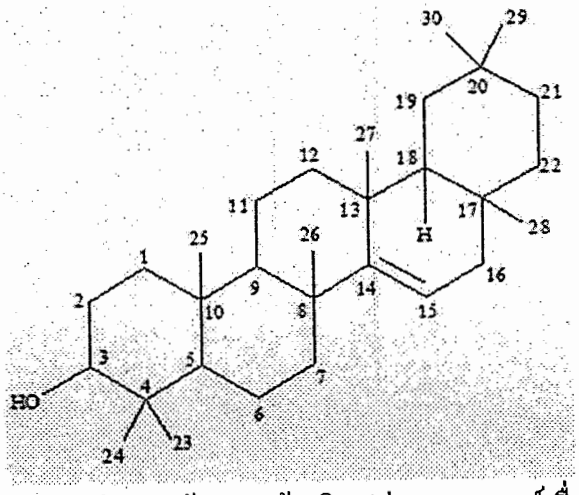
ผลการทดลอง

ผลการแยกสารจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีและการพิสูจน์เอกลักษณ์

จากการทดลองแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจของรากลำบิดดง (*Diospyros filipendula*) ซึ่งทำการสกัดด้วยเฮกเซน รากลำบิดดงที่นำมาสกัดมีน้ำหนักเท่ากับ 3.00 กิโลกรัม ได้ crude extracts หนัก 5.78 กรัม แล้วนำ crude extracts มาแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากนั้นทำการตกผลึกได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ fraction 4.6 และ 5.6.6 ผลึกที่ได้มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว มีน้ำหนักเท่ากับ 0.0901 และ 0.1268 กรัม ตามลำดับ นำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT – 135, DEPT – 90 แล้วนำข้อมูลทั้งหมดของสารบริสุทธิ์ที่ได้เทียบกับข้อมูลของ ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR จากเอกสารอ้างอิงและ ChemDraw Ultra (version 10.0) ® พบว่า fraction 4.6 ส่วนใหญ่มีค่า chemical shift ใกล้เคียงกับสารอ้างอิงกลุ่มสเตอรอยด์ มีสูตรโครงสร้างที่คล้ายรูป 1 มีชื่อว่า stigmasterol (Shashi & Asish, 1994; Forgo & Kover, 2004) ส่วน fraction 5.6.6 มีค่า chemical shift ใกล้เคียงกับสารอ้างอิงกลุ่มไตรเทอร์พีน มีสูตรโครงสร้างที่คล้ายรูป 2 มีชื่อว่า taraxerol

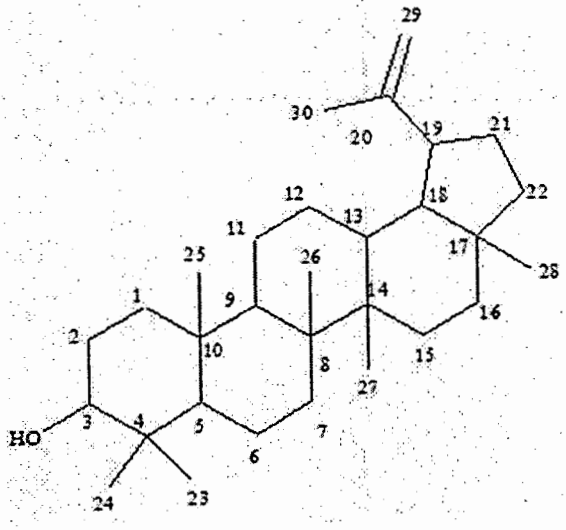


รูป 1 FRACTION 4-6 มีสูตรโครงสร้างสารอ้างอิง กลุ่มสเตอรอยด์ ชื่อว่า STIGMASTEROL



รูป 2 FRACTION 5.6.6 มีสูตรโครงสร้างสารอ้างอิง กลุ่มสเตอรอยด์ ชื่อว่า TARAXEROL

การสกัดแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากรากของท้าวแสนปม ทำการทดลองเช่นเดียวกับรากลำบิดดง สารบริสุทธิ์ที่ได้จากการสกัดหนัก 0.1861 กรัม มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว มีค่า chemical shift ใกล้เคียงกับสารอ้างอิงกลุ่มเทอร์พีน มีสูตรโครงสร้างที่คล้ายรูป 3 มีชื่อว่า lupeol (Haque *et al.*, 2006)



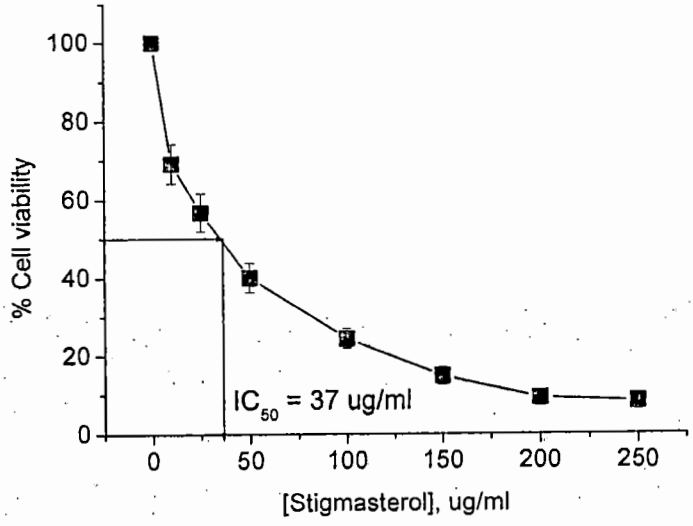
รูป 3 FRACTION 2 มีสูตรโครงสร้างสารอ้างอิง กลุ่มสเตอรอยด์ ชื่อว่า LUPEOL

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT

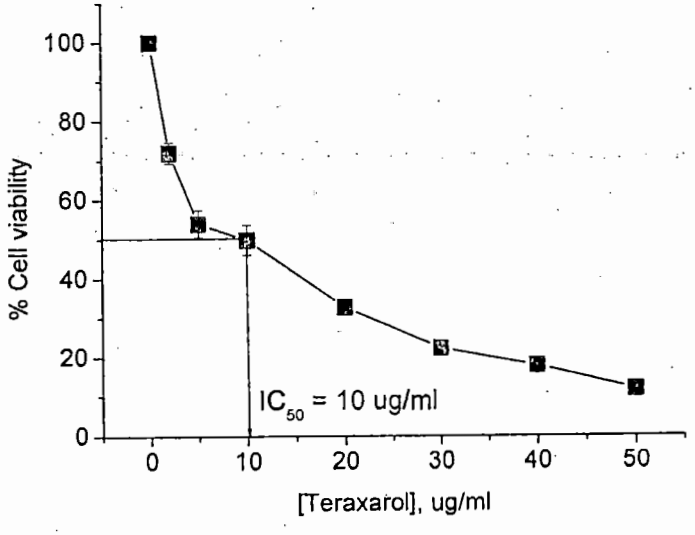
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) โดยเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบ่มเซลล์กับสารสกัดความเข้มข้น 0-250 µg/ml และ doxorubicin (DOX) ความเข้มข้น 0-10 µg/ml (positive control) และ 0.5% DMSO (negative control) ใน 96 well plate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมินรูปร่างของเซลล์ ลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์ ลักษณะไซโตพลาซึม ลักษณะการเกาะที่พื้นผิว เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ลอย ภายใต้กล้อง stereoscope และนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้อง stereoscope พบว่าในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% DMSO เซลล์มีลักษณะปกติ เหยียดตัวเป็นรูปกระสวย เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาซึมเรียบ และมีจำนวนเซลล์เกาะพื้นมากกว่า 90% เมื่อได้รับการเขย่าแรงๆ เซลล์ยังคงไม่หลุดจากพื้นผิว แตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัด คือเซลล์มีรูปร่างกลมไม่เหยียด เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาซึมขรุขระ ลักษณะการเกาะพื้นผิวไม่แน่น เมื่อเขย่าเบาๆเซลล์หลุดจากพื้นผิวได้ง่าย ส่วนกลุ่มที่บ่มด้วย DOX พบว่าเซลล์มีลักษณะกลม เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาซึมขรุขระ การเกาะพื้นผิวไม่แน่น พบเซลล์ลอยจำนวนมาก และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT พบว่าเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัด และ DOX มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% DMSO อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการนับเซลล์มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT มีความสัมพันธ์กับการศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยกล้อง stereoscope

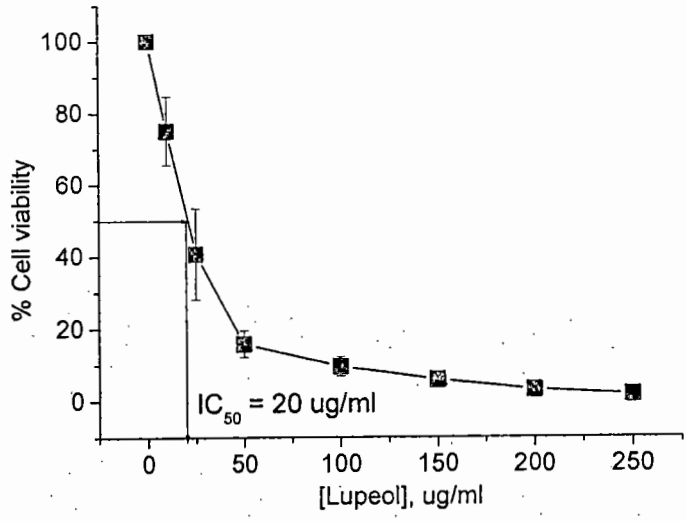
ประสิทธิภาพของสาร stigmasterol, taraxerol และ lupeol ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก มีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% (Inhibitory concentration at 50%; IC_{50}) เท่ากับ 37 ± 2.49, 10 ± 1.3 และ 20 ± 2.6 µg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ DOX มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.8 ± 0.86 µg/ml แสดงในรูป 4 ถึง รูป 7 ตามลำดับ



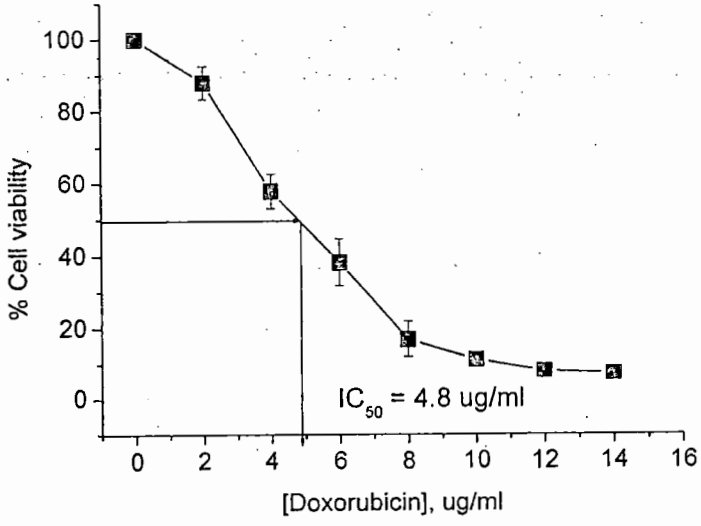
รูป 4 กราฟแสดงผลของสาร STIGMASTEROL ต่อการรอดชีวิตของ HELA CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± S.E.M. (N=3)



รูป 5 กราฟแสดงผลของสาร TARAXEROL ต่อการรอดชีวิตของ HELA CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± S.E.M. (N=3)



รูป 6 กราฟแสดงผลของสาร LUPEOL ต่อการรอดชีวิตของ HELA CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± S.E.M. (N=3)

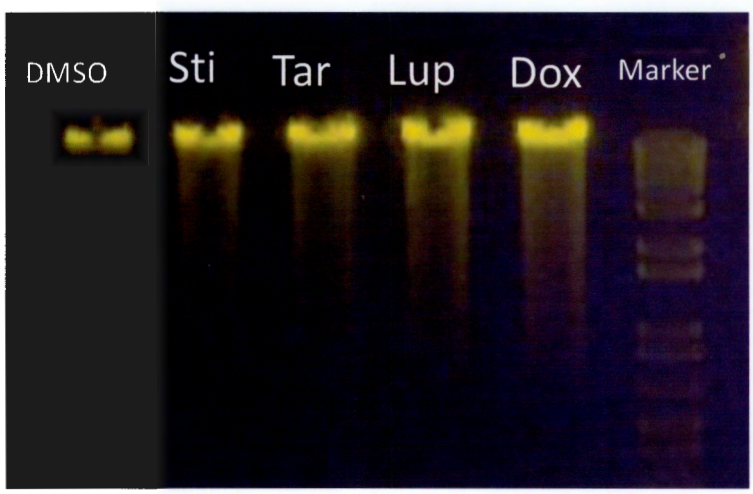


รูป 7 กราฟแสดงผลของสาร DOXORUBICIN ต่อการรอดชีวิตของ HELA CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN ± S.E.M. (N=3)

ผลการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis

ทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อการแตกของ DNA โดยเลี้ยง HeLa cells ความเข้มข้น $1x10^5$ cells/ml ให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด stigmasterol (Sti), taraxerol (Tar), lupeol (Lup) และ doxorubicin (Dox) (positive control) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} คือ 37±2.49, 10±1.3, 20±2.6 µg/ml และ 4.8±0.86 µg/ml ตามลำดับ และ 0.5% DMSO (negative control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน flask ปริมาตร 25 cm^3 เป็นเวลา 48 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

เมื่อวิเคราะห์การแตกของ DNA แล้วพบว่า กลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% DMSO เกิดแถบ (band) หนาเพียง 1 แถบ แสดงว่ามี DNA ขนาดใหญ่จึงเคลื่อนที่ได้ไม่ไกล แตกต่างจากในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด โดยพบแถบหนา 1 แถบและมีลักษณะเป็น smear band ยาวลงมา แสดงว่ากลุ่มที่บ่มเซลล์ด้วยสารสกัดเกิดการแตกของ DNA ทำให้มีขนาดของ DNA แตกต่างกันไป (DNA fagmentation) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับกลุ่มที่บ่มเซลล์ด้วย DOX ที่พบว่าเกิด smear band ที่ยาวเช่นกัน (รูป 8)



รูป 8 แสดงการเกิด DNA FRAGMENTATION ของ HELA CELLS ที่บ่มด้วย STIGMASTEROL (STI), TARAXEROL (TAR), LUPEOL (LUP) และ DOXORUBICIN (DOX) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} คือ 37±2.49, 10±1.3, 20±2.6 µG/ML และ 4.8±0.86 µG/ML ตามลำดับ ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS

ผลการศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI & PI staining

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการเกิด nuclear fragmentation โดยเลี้ยง HeLa cells ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ให้เกาะบน cover slide ซึ่งแช่ใน 6 well plate นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด stigmasterol (Sti), taraxerol (Tar), lupeol (Lup) และ doxorubicin (Dox) (positive control) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} คือ 37 ± 2.49, 10 ± 1.3, 20 ± 2.6 µg/ml และ 4.8 ± 0.86 µg/ml ตามลำดับ และ 0.5% DMSO (negative control) เป็นเวลา 48 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 สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ในขณะที่ PI ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่มีชีวิต และ early apoptotic cells ยังมีความสมบูรณ์ (intact membrane) จึงย้อมไม่ติดสีแดงของ PI แต่ติดสีน้ำเงินของ DAPI โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะพบลักษณะการติดสีกระจายอย่างสม่ำเสมอ (homogenous) ตลอดทั้งนิวเคลียส ในขณะที่ early apoptotic cell จะมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนของเส้นใยโครมาติน (chromatin condensation) จึงติดสีน้ำเงินของ DAPI หนาแน่น และมีนิวเคลียสขนาดเล็กกว่าปกติ และเมื่อพบการแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) จึงพบการติดสีแบบกระจายเป็นหย่อมๆ ส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ของ late apoptotic cell จะเป็นรูจึงย้อมติดทั้งสีแดงของ PI และสีน้ำเงินของ DAPI ซึ่งพบลักษณะของ nuclear fragmentation ได้เช่นกัน

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์แบบ bright field ในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% DMSO พบว่าเซลล์มีลักษณะเหยียด เยื่อหุ้มเซลล์เรียบมีขอบเขตชัดเจน (รูป 9 A) ลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI (รูป 9 B) และ PI (รูป 9 C) พบว่าเซลล์ทั้งหมดติดสีน้ำเงินของ DAPI โดยพบเซลล์ปกติ 96.88 ± 1.29% ซึ่งนิวเคลียสติดสีน้ำเงินแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอและพบ early apoptotic cells จำนวนน้อยมาก เพียง 3.12 ± 1.29% แต่ไม่พบเซลล์ที่ย้อมติดสีแดงของ PI (late apoptosis cells)

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์แบบ bright field ในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด stigmasterol (Sti), taraxerol (Tar), lupeol (Lup) และ doxorubicin (Dox) ที่ความเข้มข้น 37 ± 2.49, 10 ± 1.3, 20 ± 2.6 µg/ml และ 4.8 ± 0.86 µg/ml ตามลำดับ พบเซลล์ส่วนมากมีลักษณะเซลล์กลม ไม่เหยียด เยื่อหุ้มเซลล์เป็นตุ่มพอง (bleb) ซัยโตพลาสมขรุขระ และมีจำนวนของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูป 9 D, G, J & M) (ตาราง 4)

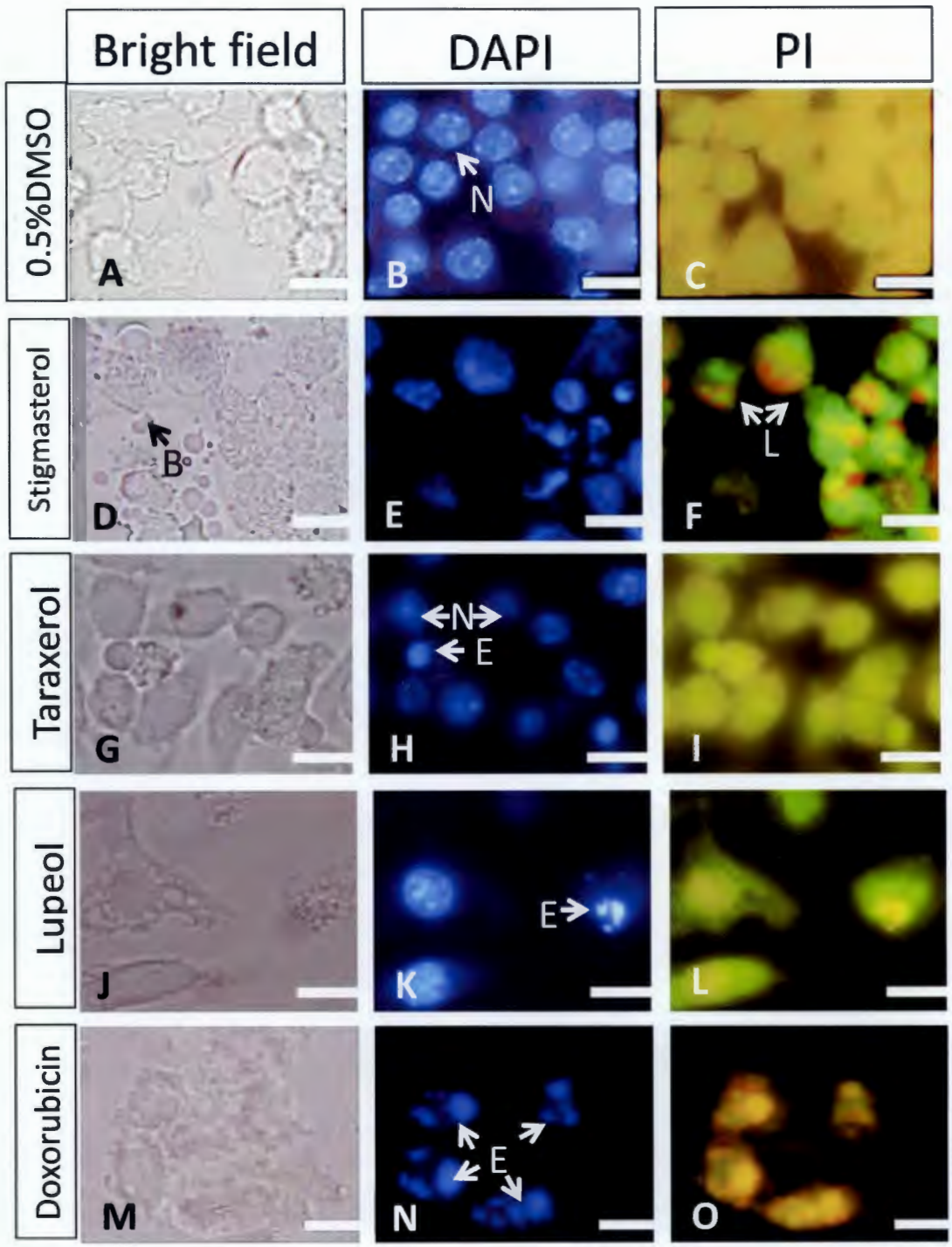
เมื่อศึกษาลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI และ PI พบว่ากลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด stigmasterol พบเซลล์ปกติ 39.73 ± 0.99% โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงินแบบเรียบเนียน

สม่ำเสมอแต่ไม่ติดสี PI พบเซลล์มีลักษณะ early apoptosis cells 30.27 ± 0.9% โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงิน (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) แต่ไม่ติดสี PI (รูป 9 E) และพบ late apoptotic cells 30 ± 2.59% โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงิน (DAPI) ร่วมกับสีแดง (PI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) (รูป 9 F) (ตาราง 4)

เซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด taraxerol พบเซลล์ปกติ 64.7 ± 12.09% โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงินแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอแต่ไม่ติดสี PI พบเซลล์มีลักษณะ early apoptosis cells 23.8 ± 0.99% โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงิน (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) แต่ไม่ติดสี PI (รูป 9 H) และและพบ late apoptotic cells 11.5 ±1.37% โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงิน (DAPI) ร่วมกับสีแดง (PI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) (รูป 9 I) (ตาราง 4)

เซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด lupeol พบเซลล์ปกติ 45.95 ± 1.50% โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงินแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอแต่ไม่ติดสี PI พบเซลล์มีลักษณะ early apoptosis cells 42.23 ± 2.51% โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงิน (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) แต่ไม่ติดสี PI (รูป 9 K) และพบ late apoptotic cells 11.82 ± 6.01% โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงิน (DAPI) ร่วมกับสีแดง (PI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) (รูป 9 L) (ตาราง 4)

เซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยสาร doxorubicin พบเซลล์ปกติเพียง 5.39 ± 0.89 % โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงินแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอแต่ไม่ติดสี PI พบเซลล์มีลักษณะ early apoptosis cells 74.39 ± 4.3% โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงิน (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) แต่ไม่ติดสี PI (รูป 9 K) และและพบ late apoptotic cells 20.22 ± 2.01% โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงิน (DAPI) ร่วมกับสีแดง (PI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) (รูป 9 L) (ตาราง 4)



รูป 9 แสดงลักษณะเซลล์และนิวเคลียส จากการย้อมด้วย สี DAPI และ PI, B = BLEB, N = NORMAL, E = EARLY APOPTOSIS, L = LATE APOPTOSIS, SCALE BAR = 10 UM

ตาราง 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิด APOPTOSIS วิเคราะห์จากการติดสี DAPI และ PI ที่นิวเคลียส

	%Normal cells (homogenous DAPI)	**%Early apoptotic cells (condensed or fragment DAPI)**	**%Late apoptotic or necrotic cells (PI)**
0.5% DMSO (negative control)	96.88 ± 1.29	3.12 ± 1.29	0
Stigmasterol (Sti) [37±2.49 µg/ml]	39.73 ± 0.99	30.27 ± 0.9	30 ± 2.59
Taraxerol (Tar) [10±1.3 µg /ml]	64.7 ± 12.09	23.8 ± 0.99	11.5 ±1.37
Lupeol (Lup) [20±2.6 µg/ml]	45.95 ± 1.50	42.23 ± 2.51	11.82 ± 6.01
Doxorubicin [4.8±0.86 µg/ml] (positive control)	5.39 ± 0.89	74.39 ± 4.3	20.22 ± 2.01

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

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์ ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี และทำการตกผลึกจากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดง (*Diospyros filipendula*)ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด และจากส่วนสกัดเฮกเซนของรากท้าวแสนปม *(Diospyros cauliflora)* ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด นำสารบริสุทธิที่ได้ทั้งหมดมาพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยวิธีทางสเปคโตรสโคปี ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 และเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปคโตรสโคปีกับสารอ้างอิง พบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดงคือ stigmasterol, taraxerol และ จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากท้าวแสนปมคือ lupeol

จากผลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสรรพคุณทางยา พบว่า เกือบทุกส่วนของพืชในสกุล Diospyros ได้มีการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี และพบสารสำคัญในส่วนต่างๆดังแสดงในตาราง 1 พบว่า triterpenoids และ naphthoquinones กระจายเกือบทุกส่วนของพืชชนิดนี้ สารในกลุ่ม terpenoids พบว่า 90% ของพืชใน Diospyros species เป็นชนิด triterpenes: pentacyclic core ได้แก่ lupine, ursane, oleanane, taraxerane, friedelane ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer), anti-HIV และ anti-inflammation (Mallavadhani *et al.*, 1998) ดังนั้นสารจากพืชในสกุล Diospyros จึงได้รับความสนใจในการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยารักษามะเร็ง ซึ่งแนวทางหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็งคือการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพของสารบริสุทธิ์ ที่ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดงคือ stigmasterol, taraxerol และจากส่วนสกัดเฮกเซนของรากท้าวแสนปมคือ lupeol ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) การแตกของนิวเคลียส และการแตกของ DNA

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสาร stigmasterol, taraxerol และ lupeol ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก และใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย จึงทดสอบด้วย 0.5% DMSO เป็นกลุ่ม negative control ส่วน doxorubicin ซึ่งเป็นยารักษาโรคมะเร็งที่ใช้ในปัจจุบัน (Primeau *et al.*, 2005) พบว่าสาร stigmasterol, taraxerol และ lupeol ทั้ง3 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ตามขนาดความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น (dose dependent) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 37 ± 2.49, 10 ± 1.3 และ 20 ± 2.6 µg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ DOX มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.8 ± 0.86 µg/ml

Doxorubicin ประสิทธิภาพดีกว่าสาร stigmasterol, taraxerol และ lupeol มาก เนื่องจาก doxorubicin มีโครงสร้างเป็น quinone-containing anthracycline ซึ่งมีเป้าหมายออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจงที่

615.19
ป 276ก
291588

DNA บริเวณหมู่น้ำตาลใน minor groove ทำให้เอนไซม์ topoisomerase II ซึ่งทำหน้าที่ในการคลายเกลียวของ double helix ไม่สามารถทำงานได้ การสังเคราะห์ DNA จึงหยุดลง และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (Fornari *et al.*, 1994) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ doxorubicin ยังมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์มาก เนื่องจากออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ปกติด้วย จึงยังมีข้อจำกัดในการใช้ แต่สารจากพืชในสกุล Diospyros มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายชนิดดังแสดงในตาราง 2 และอาจมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาแผนปัจจุบัน อย่างไรก็ตามสารเมตาโบลัยซ์ในพืชวงศ์ Diospyros นั้นขึ้นกับวิธีการสกัด สภาพภูมิประเทศและสิ่งแวดล้อมด้วย (Gu *et al.*, 2004)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสาร naphthoquinone สกัดได้จาก *Diospyros maritime* (Higa *et al.*, 2002) มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ในระดับหลอดทดลอง และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (Chakrabarty *et al.*, 2002) ผ่านทางการยับยั้งเอนไซม์ DNA topoisomerases (Ting *et al.*, 2003) การศึกษาสารสกัดด้วย 70% EtOH จากส่วนใบของ *Diospyros Seychellarum* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ Jurkat T lymphocytes โดยจำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มตามขนาดความเข้มข้น (dose-dependent response) มีกลไกการตายแบบ apoptosis คือ สูญเสียความต่างศักดิ์ในไมโตคอนเดรีย และมี chromatin condensation (Buenz *et al.*, 2007)

การที่เซลล์เกิด apoptosis ซึ่งเกิดจากการชักนำให้เกิดสัญญาณภายในเซลล์แล้วให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเฉพาะ คือ เซลล์หดตัว (cell shrinkage) เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นถุง (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่ม (chromatin aggregation) DNA ถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ (DNA fragmentation) และในระยะสุดท้ายส่วนของเซลล์มีการแตกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ เรียก apoptotic bodies ซึ่งหากอยู่ในร่างกาย ส่วนของ apoptotic bodies จะถูกกำจัดโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ macrophage จึงไม่เกิดการกระจายของสารไปยังเซลล์ข้างเคียง คือไม่ทำให้เกิดการอักเสบเหมือนกับการตายแบบ necrosis ที่จะพบลักษณะของเซลล์บวม ไม่มีการหดตัวของโครมาติน เยื่อหุ้มเซลล์แตกออกและทำให้ของเหลวรั่วออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (Elmore, 2007) ดังนั้นการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis จึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจสำหรับการพัฒนายารักษาโรคมะเร็ง ซึ่งยารักษามะเร็งที่มีกลไกในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis ได้แก่ doxorubicin (Wang et al., 2004) เป็นต้น

การศึกษาด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) พบว่าสาร stigmasterol, taraxerol และ lupeol ทำให้เกิดการแตกของ DNA โดยพบลักษณะของ smear band เช่นเดียวกับเซลล์ที่บ่มด้วย doxorubicin ซึ่ง smear band เป็นตัวบ่งชี้ว่า DNA ถูกตัดแบบไม่มีแบบแผนสุ่ม (non-random digestion) ซึ่งเป็นลักษณะของการตายแบบ necrosis (Lieberthal *et*

al., 1996) แต่การตายแบบ apoptosis จะพบลักษณะ ladder band ซึ่งเกิดจากการทำงานของ caspase 3 และcaspase activated DNase (CAD) ไปตัดสาย DNA ที่บริเวณ internucleosome ได้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 180-200 bp จึงมีสาย DNA ปรากฏทั้ง mono-nucleosome และ oligo-nucleosome เพราะฉะนั้น จึงเป็นไปได้ว่าสารทั้ง 3 ชนิด ทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกตายแบบ apoptosis และสุดท้ายเซลล์เปลี่ยนแปลงเป็น secondary necrotic cells จึงพบ smear band ที่เกิดจาก DNA fragment ของ late apoptotic cells และคาดว่าน่าจะพบ ladder band ที่เกิดจาก DNA fragment ของ early apoptotic cells ร่วมด้วย แต่เห็นได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรทำการศึกษาที่เวลาต่างๆ กันเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้เกิด early apoptotic cells และ ladder band จึงจะบ่งชี้ได้แน่ชัดว่าเซลล์ตายแบบ apoptosis

การศึกษาการแตกของนิวเคลียสด้วยวิธี DAPI & PI staining ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) พบว่าในกลุ่มเซลล์ที่บ่มด้วยสารทั้ง 3 ชนิด พบ early apoptotic cells (นิวเคลียสแตก และติดสี DAPI แต่ไม่ติดสี PI) ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์มีชีวิต (สี PI เข้าเซลล์ไม่ได้) มีการรวมกลุ่มของเส้นใยโครมาติน และเกิดการแตกของนิวเคลียส ขณะเดียวกับพบ late apoptotic cells หรือ necrotic cells เช่นกัน โดยการทดลองนี้เป็นการทดลองในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) จึงไม่มีกระบวนการกำจัด early apoptotic cells โดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Kurosaka *et al.*, 2003) จึงทำให้ early apoptotic cells เปลี่ยนแปลงเป็น late apoptotic cells (Hebert *et al.*, 1996) และเยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพ (loss of membrane integrity) มี permeability เพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์เหมือน necrotic cells ทำให้ late apoptotic cells ติดสี PI ที่นิวเคลียส ซึ่งไม่สามารถแยก late apoptotic cell และ necrotic cells ออกจากกันได้ด้วยการย้อมสี PI

ในการทดลองครั้งนี้ได้เน้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่ลักษณะนิวเคลียสและ DNA เท่านั้น จึงไม่สามารถตอบคำถามถึงกลไกในระดับไซโตพลาซึม และไมโตคอนเดรียได้ เช่น caspase และ Bcl2-family เป็นต้น อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยครั้งนี้พบว่าสารทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการแตกของนิวเคลียส และเกิดการแตกของ DNA ที่เป็นลักษณะหนึ่งที่สำคัญในกระบวนการเกิด apoptosis ซึ่งแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มที่บ่มเซลล์ด้วย 0.5% DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลาย และได้พิสูจน์แล้วว่าขนาดความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก

สารบริสุทธิ์ที่ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดงคือ stigmasterol, taraxerol และ จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากท้าวแสนปมคือ lupeol น่าจะมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนา เพื่อให้ร่วมกับเคมีบำบัดเป็นการรักษาแบบผสมผสาน (complementary therapies) ลดการการพัฒนาลุกลามของ

เซลล์มะเร็ง และลดผลข้างเคียงที่จะเกิดจากการรักษาด้วยเคมีบำบัด หรืออาจใช้เป็นสารจากธรรมชาติเพื่อป้องกันหรือยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งในระยะยาว (chemopreventive agent) ซึ่งสอดคล้องกับการรับประทานผักและผลไม้ จะมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งบางชนิดน้อยกว่าผู้ที่ไม่รับรับประทานผักและผลไม้ เนื่องจากผักและผลไม้เหล่านี้เป็นอาหารจึงไม่มีพิษต่อเซลล์ปกติ

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบสาร stigmasterol, taraxerol และ lupeol ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้แบบ dose-dependent และเมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารทั้ง 3 ชนิด จากการวิเคราะห์การแตกของ DNA ด้วยเทคนิค agarose gel eletrophoresis พบว่าทำให้ DNA แตก โดยเห็นเป็น smear band ซึ่งเป็นลักษณะของการตายแบบ apoptosis (late apoptosis) และสอดคล้องการวิเคราะห์การแตกของนิวเคลียสด้วยเทคนิค DAPI & PI staining พบว่าทำให้เกิด chromatin condensation และ nuclear fragmentation ซึ่งจากหลักฐานดังกล่าวนี้พอที่จะสรุปได้ว่าสารทั้ง 3 ชนิดที่นำมาทดลองมีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกตายแบบ apoptosis

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารทั้ง 3 ชนิด ในระดับไซโตพลาซึมหรือไมโตคอนเดรีย เพื่อยืนยันการตายแบบ apoptosis
2. ควรมีการทดลองในเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับการทดลองในเซลล์มะเร็ง
3. ควรมีการทดลองในเซลล์มะเร็งชนิดอื่น

เอกสารอ้างอิง

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.(2550). สมุนไพร . มติชนสุดสัปดาห์, ปีที่ 27 ฉบับที่ 1410, 66.

ตะโกนา. วันที่ค้นข้อมูล 3 ตุลาคม พ.ศ. 2550, เข้าถึงได้จาก http://www.anodard.co.th/info/2.doc

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. วันที่ค้นข้อมูล 3 ตุลาคม พ.ศ. 2550, เข้าถึงได้จาก http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/diospy.html#index

Adeniyi BA, Robert MF, Chai H & Fong HS. In vitro cytotoxicity activity of diosquinone, a naphthoquinone epoxide. *Phytother Res.* 2003, 17(3); 282-84.

Borges-Argaez R, Canche-Chay CI, Pena-Rodiguez LM, Said-Fernandez SG, Molina-Salinas GM. Antimicrobial activity of Diospyros anisandra. *Fitoterapia.* 2007, 78; 370-72.

Buenz EJ, Brent AB, Timothy JM, & Limburg PJ. Cytotoxic properties of *Diospyros Seychellarum* extract. *J Toxicol Sci.* 2007, 32(5); 487-93.

Chakrabarty S, Roy M, hazra B, & Bhattacharya RK. Induction of apoptosis in human cancer cell lines by diospyrin, a plant-derived bisnaphthoquinonoid, and its synthetic derivatives. *Cancer let.* 2002, 188; 85-93.

Chau GY, Lui WY, Tsay SH, Chao Y, King KL, Wu CW. Postresectional adjuvant intraportal chemotherapy in patients with hepatocellular carcinoma: a case-control study. *Ann Surg Oncol.* 2006, **13**; 1329-1337.

Chen CR, Cheng CW, Pan MH, Liao YW, Tzeng CY, & Chang CI. Lanostane-type Triterpenoids from Diospyros discolor. *Chem Pharm Bull.* 2007, 55(6); 908-11.

Cragg GM & Newman DJ. Plants as source of anticancer agents. *J Ethnopharmacol.* 2005, 100; 72-79.

Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007, 35; 495–516.

Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD & Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ.* 1985, 63; 965-81.

Forgo P, & Kover KE. Gradient enhanced selective experiments in the ^{1}H NMRchemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative *Steroids.* 2004, 69; 43–50.

Kuo YH, Li SY, Shen CC, Yang LM, Huang HC, Liao WB, Chang CI, Kuo YH & Chen CF. Cytotoxic constituents from the fruit of Diospyros ferrea. *Chin Pharml Jl (Taipei).* 1997, 49(4); 207-16.

Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, and Kobayashi Y. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *J Immunol.* 2003, 4672–79.

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.

Mallavadhani UV., Panda AK., & rao YR. Pharmacology and chemotaxonomy of Diospyros. *Phytochemistry.* 1998, 49; 901-51.

Moshi MJ, Masimba PJ, Nondo RS, Mbwambo ZH, Kapingu MC, Mohamed M, Kimbokota F. Anticonvulsant activity of extracts of *Diospyros fischeri* stem bark. *Afr J Trad CAM.* 2007, 4(1); 94-8.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005, 55; 74-108.

Primeau AJ, Rendon A, Hedley D, Lilge L and Tannock IF. The distribution of the anticancer drug doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. *Clin cancer res.* 2005, 11(24); 8782–88.

Reed JC. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med.* 2001, 7; 314–319..

Samuelsson G. Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy. 4th ed., Stockholm, Swedish *Pharmaceu-tical Press,* 1999.

Shashi BM, & Asish PK. Review article number 98: ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient fratures. *Phytochemistry.* 1994, 37(6); 1517-75.

Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh J Pharmacol.* 2006, 1; 35-41.

Tangmouo J, Meli AL, Komguem J, Kuete V, Nguonou FN, Lontsi D, Beng VP, Choudhary MI, Sondengum BL, Crassiflorone, a new naphthoquinone from Diospyros crassiflora (Hien). *Tetrahedron Letts.* 2006, 47; 3067-70.

Tangmouo JG, Ho R, Matheeussen A, Lannang AM, Komguem J, Messi BB, Maes L, & Hostettmann K. Antimalarial activity of extract and norbergenin derivatives from the stem bark of Diospyros sanza-minika A. Chevalier (Ebenaceae). *Phytother Res.* 2010, 24(11); 1676-9.

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.

Furusawa M, Tanaka T, Ito T, Nakaya K, Ohyama M, Ilnuma M, Murata H, Inatomi Y, Inada A, Nakanishi T, Matsushit S, Kubota Y, Sawa R, & Takahashi Y. Flavonol Glycosides in Leaves of Two *Diospyros* Species. *Chem Pharm Bull.* 2005, **53**(5); 591- 93.

Ganapaty S, Thiomus PS, Karagianis GP, Waterman G, Brun R. Antiprotozoal and cytotoxic naphthalene derivative from Diospyros assimilis. *Phytochemistry*. 2006, 67; 1950-56.

Gu JQ, Graf TN, Lee DC, Hee-Byung MQ, Kardono LB, Setyowati FM, Ismail RR, Farnsworth NR, Cordell GA, Pezzuto JM, Swanson SM, David JF, Joseph O, Wall ME, Wani MC, Kinghorn AD, Oberlies NH. Cytotoxic and Antimicrobial Constituents of the Bark of Diospyros maritima Collected in Two Geographical Locations in Indonesia. *J Nat Prod.* 2004, 67(7); 1156-61.

Haque ME, Shekhar HU, Mohamed AU, Rahman H, Islam AM, & Hossain MS. Triterpenoids from the Stem Bark of *Avicennia officinalis*. *J Pharm Sci.* 2006, 5(1-2); 53-7.

Hebert MJ, Takano T, Holthofer H and Brady HR. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. *J Immunol.* 1996, 157(7); 3105–15.

Higa M, Noha N, Yokaryo H, & Yogi S. Three new naphthoquinone derivatives from *Diospyros maritime* Blume. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 2002, 50; 590-93.

Hu W & Kavanagh JJ. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol.* 2003, 4; 721–29.

Johnson IT. Phytochemicals and cancer. *Proc Nutr Soc.* 2007, 66; 207-215.

Kappor LD. CRC Handbook of ayurvedic medicinal plants. *Boca Raton, Florida*, CRC Press, 1990, pp 416-17.

Kasibhatla S & Tseng B. Why Target Apoptosis in Cancer Treatment? *Mol Cancer Ther.* 2003, 2; 573–580.

Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res.* 2000, 256; 42–49.

Khan MR, Timi D. Constituents of the root and stem bark of Diospyros villosiuscula. *Fitoterapia*. 1999, 70; 209-11.

Ting CY, Hsu CT, Hsu Su, Su JS, Chen TY, Tarn WY, Kuo YH, Whang-Peng J, Liu LF, & Hwang J. Isodiopyrin as a novel human DNA topoisomerase I inhibitor. *Biochem Pharmacol.* 2003, 66; 1981-91.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman Z N. Apoptosis: Mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol.* 2005, 84; 627–639.

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.

Yan XZ, Kuo YH, Lee TJ, Shih TS, Chen CH, McPhail DR, McPhail AT & Lee KH. Antitumor agent. Part 106. Cytotoxic components of Diospyros morrisiana. Phytochemistry 1989; 28(5): 1541-3.