



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มมูลค่าเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนของชาใบขลุเพื่อ  
สุขภาพจากจังหวัดจันทบุรี  
Anti-cancer effect of Khlu (*Pluchea indica* Less.) tea  
and its underlying mechanism

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ผาณิตา เอี้ยวชิโป  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทรงกลด สารภูษิต

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มมูลค่าเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนของชาใบขลู่เพื่อ  
สุขภาพจากจังหวัดจันทบุรี  
(ฤทธิ์ต้านมะเร็งของชาใบขลู่และกลไกที่เกี่ยวข้อง)  
Anti-cancer effect of Khlu (*Pluchea indica* Less.) tea  
and its underlying mechanism

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ผาณิตา เอี้ยวชิโป  
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทรงกลด สารภูษิต  
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	5
วิธีการดำเนินการวิจัย	8
ผลการวิจัย	10
อภิปราย และสรุปการทดลอง	16
ผลผลิต	18
บรรณานุกรม	19
ประวัติของหัวหน้าโครงการวิจัย และผู้ร่วมวิจัยของโครงการวิจัย	22

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4-1 สารสกัดเอทานอลจากชาใบขลุ่ย (ชาย) และสารสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ย (ขวา)	10
4-2 เพอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และ MCF-7 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero หลังได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	11
4-3 เพอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa, C33-A และ SiHa เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero หลังได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	12
4-4 เพอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ จากการทดสอบด้วยวิธี MTT assay เมื่อเซลล์ ได้รับสารสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ยที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	13
4-5 เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ที่ไม่ได้รับ (ขวา) และได้รับสารสกัดเอทานอลจาก ชาใบขลุ่ย (ชาย) ที่ความเข้มข้น $\text{IC}_{50}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	14
4-6 เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ไม่ได้รับ (ขวา) และได้รับสารสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ย (ชาย) ที่ความเข้มข้น $\text{IC}_{50}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	15

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4-1 ค่า $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) ของสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลจากชาใบชลู่ต่อเซลล์ทดสอบ ทั้ง 6 ชนิด	14

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 37.3/2562

ทางผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย มา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

วิถีการใช้ชีวิตของคนในปัจจุบันเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้มีผู้ป่วยด้วยโรคที่ไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-Communicable diseases, NCDs) จำนวนมากขึ้น หนึ่งในโรค NCDs ที่สำคัญของประชากรโลก รวมถึงประเทศไทย คือ โรคมะเร็ง ซึ่งจากข้อมูลสถิติของกระทรวงสาธารณสุขของไทยที่บันทึกไว้ในปีล่าสุดพบว่า โรคมะเร็งเป็นโรคที่ทำให้คนไทยเสียชีวิตเป็นอันดับหนึ่ง โดยพบผู้เสียชีวิตจากโรคนี้นี้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในทุกๆ ปี โดยในปี พ.ศ. 2558 มีผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งถึง 73,938 ราย คิดเป็นอัตราการตาย 113.7 คนต่อประชากร 100,000 คน ในจำนวนนี้เป็นสตรี 31,340 ราย ซึ่งเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งเต้านมมากถึง 3,752 ราย และมะเร็งปากมดลูก 2,195 ราย (สถิติสาธารณสุข 2558, สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข) โรคนี้ นอกจากจะทำให้เกิดความทุกข์ทรมานต่อผู้ป่วยจนไปถึงการเสียชีวิตแล้ว ยังทำให้สูญเสียเวลาและค่าใช้จ่ายที่มากมายตลอดช่วงเวลาในการรักษา ส่งผลให้ประเทศสูญเสียทรัพยากรบุคคล สูญเสียงบประมาณในการอภิบาลรักษาและนำเข้ายารักษาโรค อันส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศได้ ดังนั้น การป้องกันและรักษาตั้งแต่ระยะเริ่มต้นจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการลดการสูญเสีย

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา เราจะเห็นได้ว่า หน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนต่างๆ ได้มีการรณรงค์ให้ประชาชนหันมาใส่ใจสุขภาพมากขึ้น ส่งเสริมให้มีการออกกำลังกาย เลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ ในสื่อโฆษณาและสื่อออนไลน์จึงมักพบเห็นผลิตภัณฑ์ที่ส่งเสริมสุขภาพในแง่ต่างๆ ออกมาวางจำหน่ายมากมาย ทำให้เกิดการขยายตัวอย่างรวดเร็วของตลาดอาหารและเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ในประเทศไทยมีรายงานว่าในปีพ.ศ. 2558 ตลาดด้านนี้มีมูลค่าสูงถึงกว่า 1.7 แสนล้านบาท (<http://www.manager.co.th/Science/ViewNews.aspx?NewsID=9590000039873>) และคาดว่าจะยังคงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ สอดคล้องกับทิศทางของประชากรที่ค่อยๆ ก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุที่ทุกคนจะหันมาใส่ใจสุขภาพตัวเองมากขึ้น

ชาสมุนไพรก็เป็นอีกหนึ่งผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ชาใบขลุ้ (Khlu tea) จากต้นขลุ้ (Pluchea indica Less.) เป็นชาสมุนไพรที่ผลิตขึ้นโดยกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลบ่อ อำเภอลำลูกกา จังหวัดจันทบุรี ตามโครงการส่งเสริมจัดทำแผนการจัดการทรัพยากรชีวภาพระดับสถาบันและท้องถิ่น โดยการนำใบขลุ้ที่มีอยู่ในหมู่บ้านจำนวนมากมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากใบขลุ้ ออกมาวางจำหน่าย ทั้งสับแห้ง ผงสไปซ์ชา ผงชา และชาใบขลุ้ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้รับตราส่งเสริมผลิตภัณฑ์จากฐานทรัพยากรชีวภาพ (องค์กรมหาชน) มี 2 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ครีมอาบน้ำและเกลือขัดผิวขลุ้ (<http://bioeconomy.asia/?p=127>) สำหรับชาใบขลุ้ นั้นจะมีความโดดเด่นอยู่ที่กลิ่นหอมของชาแบบพิเศษที่ได้จากกรรมวิธีคั่วใบชาแบบดั้งเดิม แม้ว่าหอมยา

พื้นบ้านจะพบว่าใบขลุ่ยมีสรรพคุณทางยามากมาย เช่น ลดระดับน้ำตาลในเลือด แก้เบาหวาน ลดความดัน แก้ผดผื่นคัน เพิ่มความชุ่มชื้นให้ผิว รักษาอาการขัดเบา มีฤทธิ์ขับปัสสาวะ แก้อิทธิพลของพิษไข้ แก้กระษัย ขับนิ่ว ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ กระตุ้นความอยากอาหาร แก้ไข้ แก้ไอขับเหื่อ และรักษาอาการเส้นตึง หรือนำมาทำเป็นขี้ผึ้งรักษาแผลเรื้อรัง เป็นต้น (มาโนช วามานนท์, เพ็ญญา ทรัพย์เจริญ, 2540) แต่ก็ยังขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนฤทธิ์ทางชีวภาพอีกหลายด้านมารองรับการนำไปใช้ ก่อนหน้านี้ ทีมของคณะผู้วิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของชาใบขลุ่ยและได้ศึกษากันมาอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่า สารสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ยมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและต้านอักเสบในหลอดทดลอง (Srisook et al., 2012) ส่วนสารสกัดเอทานอลจากใบขลุ่ยก็มีฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 และในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำการอักเสบด้วย carrageenan (Buapool et al., 2013) อีกทั้งยังพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ได้ด้วย (Petchlert et al., 2016) และเมื่อเร็วๆ นี้ มีค้นพบฤทธิ์เพิ่มเติมในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินและเอนไซม์ CYP2A13 ที่ย่อยสลายสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitroso-amino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ในคนจากสารสกัดจากชาใบขลุ่ย (Boonruang et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงฤทธิ์ของใบขลุ่ยและส่วนอื่นๆ ของขลุ่ยจากคณะผู้วิจัยในประเทศอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านอักเสบและการปวด (antinociceptive) ฤทธิ์ต้านวัณโรค และฤทธิ์ต้านพิษงู (*Viperu russellii*) (Andarwulan et al., 2010; Rosilda et al., 2008; Mohamad et al., 2011; Goyal and Aggarwal, 2013) สำหรับการศึกษาศักยภาพต้านมะเร็งจากขลุ่ยยังมีน้อยมาก พบเพียงรายงานที่แสดงถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากรากหรือรากผสมใบขลุ่ยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสมองชนิด GBM8401 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกชนิด NPC-TW 01 และ NPC-TW 04 ได้ (Cho et al., 2012; Kao et al., 2015) แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากใบขลุ่ย

จากฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่ได้กล่าวไปแล้วของใบขลุ่ยข้างต้น เช่น การต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYPs เป็นต้น ล้วนแล้วแต่แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มว่าสารสกัดจากชาใบขลุ่ยน่าจะสามารถต้านมะเร็งได้ เพราะกระบวนการเหล่านั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหรือการพัฒนาความรุนแรงของโรคมะเร็ง (Diakos et al., 2014; Reuter et al., 2010; Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg, 2006) อีกทั้งสารองค์ประกอบที่เคยถูกรายงานว่าเป็นองค์ประกอบอยู่ในใบขลุ่ย เช่น Caffeic acid, Chlorogenic acid, Quercetin Luteolin, Apigenin และ Kaempferol เป็นต้น เป็นสารที่เคยมีการพิสูจน์แล้วว่ามีความสามารถในการต้านมะเร็งและป้องกันการเกิดมะเร็งได้ทั้งสิ้น (Boonruang et al., 2017; Suriyaphan, 2014; Shukla and Gupta, 2010; Ye et al., 2010; Chen and Chen, 2013; Cook et al., 2016) ดังนั้น เพื่อเป็นการนำความรู้ทางวิทยาศาสตร์เข้ามาช่วยพิสูจน์และยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็งของใบขลุ่ย รวมถึงเป็นการสนับสนุนการตีพิมพ์ของชาใบขลุ่ยของไทยและเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ชาใบขลุ่ย คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากชาใบขลุ่ยนี้ โดยจะทำการศึกษากับ



เซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลายชนิด ซึ่งเป็นมะเร็งชนิดที่พบบ่อยมากในผู้หญิงทั่วโลก รวมถึงผู้หญิงไทย เปรียบเทียบผลที่ได้กับเซลล์ปกติ เพื่อพิสูจน์ถึงความจำเพาะของฤทธิ์ที่มีต่อเซลล์มะเร็งและไม่กระทบกับการเจริญของเซลล์ปกติ ซึ่งหากฤทธิ์ของซาไบซูลูเป็นเช่นนั้น จะเป็นข้อดีในการช่วยลดอาการข้างเคียงที่มักพบจากการใช้ยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งได้ ในงานวิจัยชิ้นนี้ นอกจากจะใช้สารสกัดจากซาไบซูลูที่สกัดด้วยน้ำร้อนตามวิธีการชงชา เพื่อเพิ่มคุณค่าด้านสุขภาพของผลิตภัณฑ์ซาไบซูลูแล้ว ยังสนใจที่จะทำการทดสอบสารสกัดจากซาไบซูลูที่สกัดจากตัวทำละลายเอทานอลด้วย โดยมุ่งหวังว่าน่าจะได้สารออกฤทธิ์ที่สามารถนำมาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อจำหน่ายในรูปแบบอื่นๆ เช่น อาหารเสริมจากสารสกัดซาไบซูลู ข้าวเกรียบผสมซาไบซูลู ผงซาไบซูลูโรยข้าว เป็นต้น ในช่วงท้ายของโครงการงานวิจัยชิ้นนี้ (ปีที่ 2-3) จะมีการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในซาไบซูลูที่ทำหน้าที่ต้านมะเร็ง และสารประกอบบริสุทธิ์นี้จะถูกนำมาศึกษากลไกระดับโมเลกุลว่ามีการทำงานอย่างไรและเปรียบเทียบกับยารักษามะเร็งในปัจจุบัน เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์การแพทย์และเพิ่มความปลอดภัยในการใช้ร่วมกับยาชนิดอื่นที่มีกลไกเดียวกัน นอกจากนี้ สารประกอบบริสุทธิ์ที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้อาจจะเป็นสารต้นแบบที่จะถูกนำไปพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งทดแทนยาที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นเพิ่มองค์ความรู้และเพิ่มคุณค่าให้กับซาไบซูลู เพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคพืชสมุนไพรร่วมกับยาแผนปัจจุบัน ส่งเสริมให้คนไทยมีสุขภาพตามอายุคาดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งยังเป็นการส่งเสริมการอนุรักษ์พืชซาไบซูลูที่เป็นทรัพยากรในท้องถิ่น รวมถึงกระตุ้นเศรษฐกิจในระดับชุมชนและการเกษตรท้องถิ่นเพื่อชุมชนยั่งยืนต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากซาไบซูลูที่ผลิตขึ้นโดยกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลบ่อ อำเภอลำลูกกา จังหวัดจันทบุรี ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่พบบ่อยในสตรี ได้แก่ มะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูก โดยเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำร้อนและการสกัดตัวทำละลายเอทานอล เพื่อเพิ่มเติมองค์ความรู้เกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของซาไบซูลูที่ทางทีมวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาได้ศึกษาอย่างต่อเนื่อง และเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ซาไบซูลู รวมถึงเพื่อต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพอื่น

เนื่องจากงานวิจัยชิ้นนี้ เป็นโครงการวิจัยที่วางแผนไว้ต่อเนื่อง 3 ปี (2562-2564) ซึ่งเป้าหมายของงานวิจัยในปี 2562 นี้ คือ

เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสารสกัดจากซาไบซูลูในเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก และเปรียบเทียบฤทธิ์ระหว่างสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำร้อนกับสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล รวมถึงเปรียบเทียบฤทธิ์ที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์มะเร็งกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในงานวิจัยชิ้นนี้ เริ่มต้นคณะผู้วิจัยจะใช้ทำการสกัดสารจากชาใบชู่ที่ซื้อมาจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลป่อ อำเภอลำลูก จังหวัดจันทบุรี ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำร้อนและเอทานอล จากนั้นจะนำสารสกัดที่ได้มาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 และ MDA-MB-231) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (C33A, SiHa และ Hela) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง (Vero) (รวมเซลล์ทั้งหมด 6 ชนิด) หาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50% (IC50) พร้อมทั้งตรวจสอบสัญญาณวิทยาของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากได้รับสารสกัดเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด

## บทที่ 2

### การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

จากข้อมูลสถิติของกระทรวงสาธารณสุขของไทยในปี พ.ศ. 2558 พบว่า โรคมะเร็งเป็นโรคที่ทำให้คนไทยเสียชีวิตเป็นอันดับหนึ่ง โดยตั้งแต่ปี พ.ศ.2542 เป็นต้นมา พบผู้เสียชีวิตจากโรคนี้อีกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี โดยมีผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งถึง 73,938 ราย คิดเป็นอัตราการตาย 113.7 คนต่อประชากร 100,000 คน ในจำนวนนี้เป็นสตรี 31,340 ราย ซึ่งเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งเต้านมมากถึง 3,752 ราย และมะเร็งปากมดลูก 2,195 ราย (สถิติสาธารณสุข 2558, สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข) โรคนี้นอกจากจะทำให้เกิดความทุกข์ทรมานต่อผู้ป่วยจนไปถึงการเสียชีวิตแล้ว ยังทำให้สูญเสียเวลาและค่าใช้จ่ายที่มากมายตลอดช่วงเวลาในการรักษา ส่งผลให้ประเทศสูญเสียทรัพยากรบุคคล สูญเสียงบประมาณในการอภิบาลรักษาและนำเข้ายารักษาโรค อันส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศได้

การรักษาแบบเคมีบำบัด (chemotherapy) เป็นวิธีพื้นฐานที่นิยมใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน นอกเหนือจากการฉายรังสี (radiation therapy) และการผ่าตัดเอาก้อนเนื้อมะเร็งออกไป (surgery) โดยจะเลือกใช้วิธีใดวิธีหนึ่งหรือรักษาหลายวิธีร่วมกันขึ้นกับชนิดและระยะของมะเร็ง ปัจจุบันมียาเคมีบำบัดที่ผลิตออกมามากกว่า 100 ชนิด ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นหลายประเภทตามกลไกการออกฤทธิ์ เช่น กลุ่ม Alkylating agents เป็นยาที่ออกฤทธิ์ทำลายสารพันธุกรรมทำให้หยุดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง โดยออกฤทธิ์ได้ทุกระยะของการแบ่งเซลล์ เช่น ยาในกลุ่ม platinum drugs (cisplatin, carboplatin) เป็นต้น กลุ่ม Antimetabolites ตัวยาจะเข้าไปแทนที่ในสายพันธุกรรม ส่งผลให้เกิดยับยั้งการสร้างสายพันธุกรรม โดยออกฤทธิ์ในระยะ S ของการแบ่งเซลล์ เช่น 5-fluorouracil (5-FU) และ methotrexate เป็นต้น กลุ่ม Anti-tumor antibiotics มีผลต่อเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารพันธุกรรม ซึ่งออกฤทธิ์ได้ในทุกระยะของวงจรการแบ่งเซลล์ ได้แก่ Antracyclines (เช่น Doxorubicin) และ Mitoxantrone (เช่น Actinomycin-D) กลุ่ม Topoisomerase inhibitors ยาในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ต่อเอนไซม์ Topoisomerase ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารพันธุกรรม เช่น Etoposide (VP-16) กลุ่ม Mitotic inhibitors ออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ในระยะ Mitosis และยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนสำหรับการแบ่งเซลล์ ส่งผลให้สามารถทำลายเซลล์ได้ในทุกระยะของวงจรแบ่งเซลล์ เช่น Taxanes (เช่น Paclitaxel) และ vinca alkaloids (เช่น vinblastin vincristine) เป็นต้น กลุ่ม Corticosteroids ออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งและยับยั้งการโตของก้อนมะเร็ง เช่น Dexamethasone เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีกลุ่มยาอื่นๆ เช่น กลุ่มยาที่ออกฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเท่านั้น โดยไม่ไปทำลายเซลล์ปกติของร่างกาย (targeted therapy) โดยยาในกลุ่มนี้มีออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หรือโปรตีนที่ผิดปกติไปในเซลล์มะเร็ง เช่น ยา Imatinib (Gleevec/Glivec) และ ยา Gefitinib (Iressa) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine

kinase หรือ ยา Trastuzumab (Herceptin) ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ HER2/neu ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม โดยจะเข้าจับกับโปรตีนผิวเซลล์ที่ผลิตขึ้นบนเซลล์มะเร็งเท่านั้น หรือยากุ่มฮอร์โมน เช่น ยา Tamoxifen ที่มีคุณสมบัติด้านการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน (Anti-estrogen) เป็นต้น (<http://www.chulacancer.net>)

ด้วยภูมิประเทศที่อยู่ในเขตร้อนชื้นของประเทศไทย ทำให้ประเทศไทยมีความหลากหลายทางด้านระบบนิเวศน์และพืชพรรณ พืชหลายชนิดถูกค้นพบว่ามีสรรพคุณทางยานอกเหนือจากการถูกนำมาบริโภคเป็นอาหาร อย่างไรก็ตาม สรรพคุณทางยาของพืชอีกเป็นจำนวนมากยังขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์และเภสัชวิทยาสามารถรับการนำไปใช้ รวมทั้งยังมีพืชอีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้รับการพิสูจน์ว่าสามารถนำมาใช้เป็นสมุนไพรเพื่อบำรุงร่างกายหรือใช้เป็นยารักษาโรคได้

ขลุ้ (Pluchea indica Less.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae (Asteraceae) เป็นไม้พุ่มขนาดเล็กขึ้นอยู่รวมกันเป็นกอ มีกิ่งก้านสาขามาก สูง 0.5-2 เมตร มักชอบขึ้นในเขตป่าชายเลนเพราะชอบที่ลุ่มชื้นแฉะ ริมห้วยหนอง ตามหาดทราย ด้านหลังป่าชายเลน เติบโตได้รวดเร็วในทุกฤดูกาล ใบขลุ้ยังถูกนำมารับประทานเป็นผักลวกจิ้มน้ำพริก หรือใส่ในยำหรือแกงเผ็ด (Suriyaphan, 2014) นอกจากนี้ยังเป็นสมุนไพรที่ใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐานของประเทศไทย เนื่องจากขลุ้มีสรรพคุณทางยาหลายด้าน เช่น ลดระดับน้ำตาลในเลือด แก้เบาหวาน ลดความดัน แก้ผดผื่นคัน เพิ่มความชุ่มชื้นให้ผิว รักษาอาการซัดเบา มีฤทธิ์ขับปัสสาวะ แก้อืดเสียด ทวาร แก้กษัย ขับน้ำ ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ กระตุ้นความอยากอาหาร แก้ไข้ แก้ไอขับเหงื่อ และรักษาอาการเส้นตึง หรือนำมาทำเป็นขี้ผึ้งรักษาแผลเรื้อรัง เป็นต้น (มานิช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2540) และปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์จากใบขลุ้ที่ได้รับตราส่งเสริมผลิตภัณฑ์จากฐานทรัพยากรชีวภาพ (องค์กรมหาชน) จำนวน 2 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ครีมอาบน้ำและเกลือขัดผิวขลุ้ (<http://bioeconomy.asia/?p=127>)

สารสกัดจากราก หรือรากผสมใบขลุ้เคยมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสมองชนิด GBM8401 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกชนิด NPC-TW 01 และ NPC-TW 04 ได้ (Cho et al., 2012; Kao et al., 2015) อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากใบขลุ้เพียงอย่างเดียวยังไม่พบว่ามีรายงานและข้อมูลด้านนี้ยังมีอยู่จำกัดมาก ผลจากการทดสอบสารพิษเคมีที่เป็นองค์ประกอบในใบขลุ้พบว่า ใบขลุ้ประกอบไปด้วยสารกลุ่มฟีนอลจำนวนมากและสูงกว่าที่พบในใบยอ ใบแมงลัก และใบดาหลา ถึง 8.8 12 และ 1.9 เท่า ตามลำดับ (ปริมาณกรดฟีนอลรวมที่พบในใบขลุ้เท่ากับ  $28.48 \pm 0.67$  ใบยอเท่ากับ  $3.24 \pm 0.09$  ใบแมงลักเท่ากับ  $2.23 \pm 0.06$  และใบดาหลาเท่ากับ  $15.01 \pm 1.15$  มิลลิกรัมต่อน้ำหนักใบสด 100 กรัม Andarwulan et al., 2012) ซึ่งสารประกอบฟีนอลที่เคยถูกรายงานว่าพบในใบขลุ้ เช่น Caffeic acid, Chlorogenic acid, Quercetin Luteolin, Apigenin และ Kaempferol เป็นต้น สารเหล่านี้ล้วนแล้วแต่เคยมีการพิสูจน์แล้วว่า มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและป้องกันการเกิดมะเร็งได้ (Boonruang et al., 2017; Suriyaphan, 2014; Shukla and Gupta, 2010; Ye et al., 2010; Chen and Chen,

2013; Cook et al., 2016) ซึ่งให้เห็นว่าสารสกัดจากใบขลุ่ยน่าจะแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้จากการที่มีสารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ

ก่อนหน้านี้ ทีมของคณะผู้วิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของชาใบขลุ่ยและได้ศึกษากันมาอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่า สารสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ยมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและต้านอักเสบในหลอดทดลอง (Srisook et al., 2012) สารสกัดเอทานอลจากใบขลุ่ยมีฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 และในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำการอักเสบด้วย carrageenan (Buapool et al., 2013) มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ได้ (Petchlert et al., 2016) และเมื่อเร็วๆ นี้ มีการรายงานถึงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินและเอนไซม์ CYP2A13 ที่ย่อยสลายสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitroso-mino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ในคนจากสารสกัดจากชาใบขลุ่ย (Boonruang et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงฤทธิ์ของใบขลุ่ยและส่วนอื่นๆ ของขลุ่ยจากคณะผู้วิจัยในประเทศอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านอักเสบและการปวด (antinociceptive) ฤทธิ์ต้านวัณโรค และฤทธิ์ต้านพิษงู (*Viperu russellii*) (Andarwulan et al., 2010; Rosilda et al., 2008; Mohamad et al., 2011; Goyal and Aggarwal, 2013) สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งจากใบขลุ่ยที่อยู่ในรูปของใบชาและการค้นหาสารออกฤทธิ์ ยังไม่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ทางชีวภาพของใบขลุ่ยที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มว่าสารสกัดจากใบขลุ่ยจะมีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้เป็นอย่างดี เนื่องจากทั้งการอักเสบ อนุมูลอิสระ รวมถึงเอนไซม์ในกลุ่ม CYPs เคยมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งหรือการพัฒนาความรุนแรงของโรคมะเร็ง (Diakos et al., 2014; Reuter et al., 2010; Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg, 2006)

ดังนั้น เพื่อเป็นการสนับสนุนและเพิ่มมูลค่าให้กับชาใบขลุ่ยซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของไทยและผลิตขึ้นเองจากวิสาหกิจชุมชนของจังหวัดจันทบุรี การพิสูจน์ความสามารถในการต้านมะเร็งของใบชาขลุ่ยซึ่งยังขาดอยู่จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก อีกทั้ง ผลที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่นำมาพัฒนาใบขลุ่ยไปเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพด้านอื่นๆ ได้ด้วย เช่น อาหารเสริมจากใบขลุ่ย ข้าวเกรียบผสมใบขลุ่ย ผงใบขลุ่ยโรยข้าว เป็นต้น รวมถึงเป็นการกระตุ้นการเกษตรท้องถิ่นที่สามารถพัฒนาไปปลูกขลุ่ยในเชิงพาณิชย์และกระตุ้นเศรษฐกิจในระดับชุมชนเพื่อชุมชนยั่งยืนในอนาคต

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การสกัดสารจากชาใบชา

ใบชาชโล่งที่ใช้ในการทดสอบจะถูกซื้อมาจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชน เขตเทศบาลตำบลบ่ออำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี และจะถูกนำมาเตรียมสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอล ตามวิธีดังต่อไปนี้

##### 3.1.1 การเตรียมสารสกัดน้ำของชาใบชา

ใบชาชโล่ง จะถูกนำมาสกัดด้วยน้ำร้อนตามคำแนะนำของผู้ผลิต โดยต้มด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจะทำการกรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 1 ทำการระเหยตัวทำละลายเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่อง freeze dryer ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้และจดบันทึก

##### 3.1.2 การเตรียมสารสกัดเอทานอลของชาใบชา

ใบชาชโล่งจะถูกนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วนำผงแห้งของใบชาชโล่งที่ได้มาห่อด้วยผ้าขาวบางเป็นชั้นๆ นำไปแช่ในสารละลายเอทานอลในอัตราส่วน 1 กรัม ต่อสารละลาย 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน กรองสารสกัดที่ได้ แล้วนำผงเดิมมาสกัดซ้ำด้วยเอทานอลอีก 2 รอบ ทำการระเหยตัวทำละลายเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่อง freeze dryer ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้และจดบันทึก

#### 3.2 การเลี้ยงเซลล์ไลน์

เซลล์ที่ใช้ศึกษา ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 และ MDA-MB-231) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (C33A, SiHa และ Hela) และเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง (Vero) เซลล์ทั้งหมดจะถูกเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่ผสม 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) เลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

#### 3.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay (Wanichwatanadecha P *et al.*, 2012)

เซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งจะถูกเลี้ยงใน 96-well plate ในสภาวะที่เหมาะสมและบ่มไว้ 24 ชั่วโมงก่อนเริ่มทดสอบ จากนั้นจะใส่สารทดสอบซึ่งละลายด้วย DMSO ได้แก่ สารสกัดเอทานอล สารสกัดน้ำ หรือยาต้านมะเร็ง ผสมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการ (ตัวอย่างละ 4 ความเข้มข้น; สารสกัดจะใช้เข้มข้น 0-400 µg/ml; ยาต้านมะเร็งจะใช้ความเข้มข้น 0-50 µM) หลังจากนั้นบ่มเซลล์ไว้ 72 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อครบกำหนดเวลาจะเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงที่มีสารละลาย MTT 5

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X PBS แล้วนำเซลล์กลับไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสต่ออีก 4 ชั่วโมง จากนั้นละลายผลึกสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย 200  $\mu$ l DMSO นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรด้วย microplate reader แสดงผลที่ได้ในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารสกัด/ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารสกัด) X 100 เมื่อกำหนดให้การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สภาวะที่ไม่มีสารสกัด (อาหารผสม 0.2% (v/v) DMSO) เท่ากับ 100% ทำการทดลองครั้งละ 3 ซ้ำ อย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วรายงานผลการยับยั้งของสารสกัดด้วยค่า IC<sub>50</sub> (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50%)

#### 3.4 การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ (cell morphology) หลังได้รับสารสกัดหรือสารประกอบบริสุทธิ์ด้วย phase contrast microscopy (Syed Abdul Rahman SN *et al.*, 2013)

เซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งจะถูกเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตรในอาหารที่ผสมสารสกัดโดยใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาในการบ่มที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี MTT ข้างต้น ที่เห็นผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด จากนั้นเซลล์จะถูกล้างด้วยสารละลาย 1X PBS และนำไปตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted phase contrast ที่กำลังขยาย 200 เท่า เปรียบเทียบกับลักษณะเซลล์ที่ได้จากสภาวะที่เลี้ยงในอาหารไม่ผสมสารสกัด (negative control) และสภาวะที่มียาต้านมะเร็ง (positive control)

#### 3.5 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ด้วย ANOVA และ Tukey's Honestly Significant Difference โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 การสกัดสารจากชาใบขลุ่ย

จากการสกัดผงชาใบขลุ่ยด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ เอทานอลและน้ำกลั่น (ร้อน) โดยใช้ผงชาใบขลุ่ยแห้งน้ำหนัก 615 g และ 400 g ตามลำดับ เมื่อทำการระเหยแห้งตัวทำละลายออกจะได้สารสกัดเอทานอลจากชาใบขลุ่ย 80.24 g มีลักษณะทางกายภาพ คือ มีความหนืดเหมือนมีน้ำมันปน เหนียวข้นและมีสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 4-1) สำหรับสารสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ยได้น้ำหนักทั้งหมด 61.64 g มีลักษณะทางกายภาพเป็นของแข็ง เกาะเป็นก้อนมีความหนืดเล็กน้อย มีสีน้ำตาล (ภาพที่ 4-1) ซึ่งคิดเป็นร้อยละผลผลิต (% Yield) ได้เท่ากับ 13.05% และ 15.41% ตามลำดับ



ภาพที่ 4-1 สารสกัดเอทานอลจากชาใบขลุ่ย (ซ้าย) และสารสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ย (ขวา)

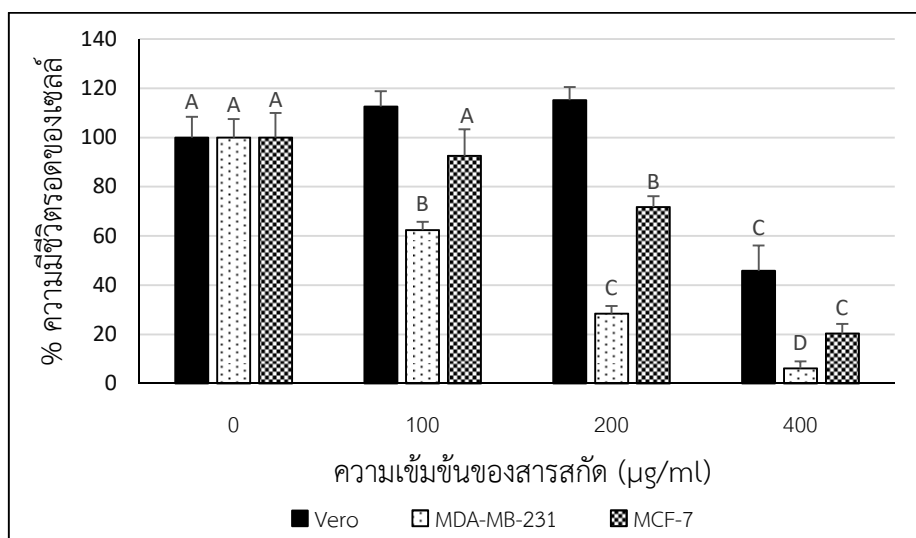
### 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay

#### 4.2.1 ผลของสารสกัดเอทานอลจากชาใบขลุ่ย

จากการตรวจสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero ด้วยวิธี MTT พบว่า เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และ MCF-7 หลังได้รับสารสกัดเอทานอลจากชาใบขลุ่ยที่ความเข้มข้น 0-400  $\mu\text{g/ml}$  บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด และเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิดมีการรอดชีวิตที่น้อยกว่าเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero (ภาพที่ 4-2) เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มเซลล์มะเร็งเต้านม พบว่าเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 มีการตอบสนองต่อสารสกัดได้มากกว่าเซลล์ MCF-7 โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400  $\mu\text{g/ml}$  สามารถลดความมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ได้ 37.64%, 71.6% และ 93.89% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 จะมีการตอบสนองต่อสารสกัดเอทานอลจากชาใบขลุ่ยที่ความเข้มข้น 200  $\mu\text{g/ml}$  ขึ้นไป ซึ่งสาร



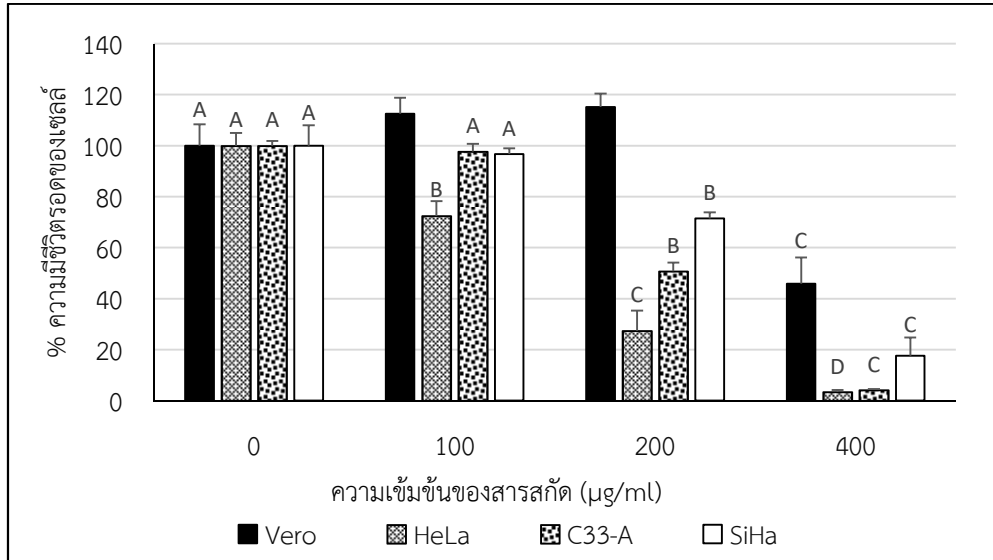
สกัดที่ความเข้มข้น 200 และ 400  $\mu\text{g/ml}$  สามารถลดความมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ได้ 28.32% และ 79.69% ตามลำดับ โดยเมื่อพิจารณาการรอดชีวิตของเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero ที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 และ 200  $\mu\text{g/ml}$  ไม่พบว่าสารสกัดส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ ในขณะที่สารสกัดที่ความเข้มข้น 400  $\mu\text{g/ml}$  แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero โดยลดความมีชีวิตรอดได้ 54.20% (ภาพที่ 4-1) ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200  $\mu\text{g/ml}$  สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง



**ภาพที่ 4-2** เปรียบเทียบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และ MCF-7 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero หลังได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษ (A-D) ที่แตกต่างกันบนกราฟแท่งแสดงถึงการลดของการมีชีวิตรอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มเซลล์ชนิดเดียวกันที่ได้รับสารสกัดเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด ( $p < 0.05$ ) ( $n \geq 9$ )

สำหรับผลทดสอบความมีชีวิตรอดด้วยวิธี MTT assay ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสามชนิด แสดงดังภาพที่ 4-3 ซึ่งพบว่าสารสกัดสามารถลดการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้งหมดได้ โดยเซลล์ชนิด HeLa มีการตอบสนองต่อสารสกัดเอทานอลจากชาใบชู่มากที่สุด เมื่อได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400  $\mu\text{g/ml}$  พบการรอดชีวิตของเซลล์เพียง 72.47%, 27.44% และ 3.39% ตามลำดับ สำหรับเซลล์ C33A และ SiHa พบการตอบสนองต่อสารสกัดเมื่อใช้ความเข้มข้น 200  $\mu\text{g/ml}$  ขึ้นไป โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 200 และ 400  $\mu\text{g/ml}$  สามารถลดความมีชีวิตรอดของเซลล์ C33A ได้ 49.27% และ 95.82% ตามลำดับ และสามารถลดความมีชีวิตรอดของเซลล์ SiHa ได้ 25.52% และ 82.41% ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 400  $\mu\text{g/ml}$  เท่านั้นที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200  $\mu\text{g/ml}$  สารสกัดเอทานอลจากชาใบชู่สามารถยับยั้งการ

เจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสามชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง

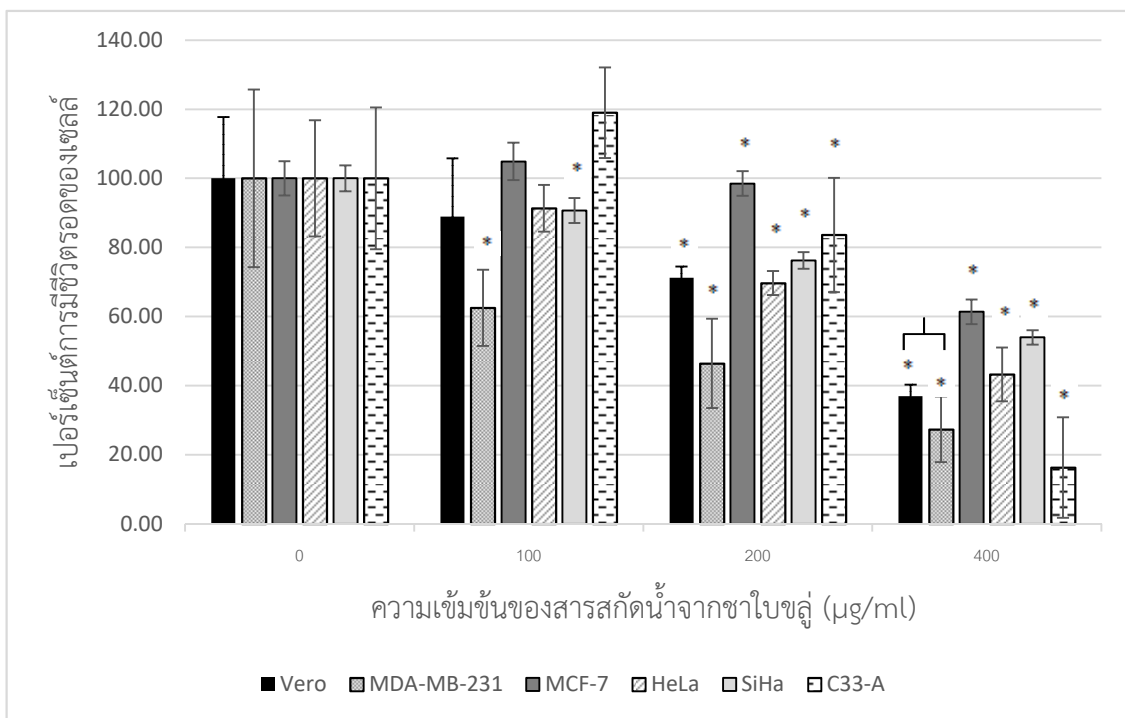


ภาพที่ 4-3 เปรอ์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa, C33-A และ SiHa เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero หลังได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษ (A-D) แตกต่างกันบนกราฟแท่งแสดงถึงการลดของการมีชีวิตรอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มเซลล์ชนิดเดียวกันที่ได้รับสารสกัดเมื่อเทียบเซลล์กับที่ไม่ได้รับสารสกัด ( $p < 0.05$ ) ( $n \geq 9$ )

#### 4.2.2 ผลของสารสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ย

จากการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์หลังได้รับสารสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ยที่มีความเข้มข้น 0-400 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231 และ MCF-7) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (SiHa, HeLa และ C33-A) รวมทั้งเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง (Vero) โดยกำหนดให้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารผสม 0.3% DMSO มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเท่ากับ 100% ผลจากการทดสอบด้วยวิธี MTT แสดงดังภาพที่ 4-4 ซึ่งจะเห็นได้ว่า สารสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ยสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ทดสอบได้ทุกชนิดและแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มมากขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 100, 200, 400 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 ได้ 37.48%, 53.55% และ 72.64% ตามลำดับ ซึ่งยับยั้งได้มากกว่าเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่จะถูกยับยั้งได้ก็ต่อเมื่อใช้สาร 200 µg/ml ขึ้นไป ในขณะที่เซลล์มะเร็งชนิด HeLa ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดได้มากที่สุดในกลุ่มของมะเร็งปากมดลูก ยับยั้งได้ 8.67%, 30.31 และ 56.73% ตามลำดับ เซลล์ SiHa ถูกยับยั้งได้ 9.30%, 23.73% และ 46.03% ตามลำดับ และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33-A ถูกยับยั้งได้ 0%, 16.39% และ 83.70% ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จะเห็นได้ว่าสารสกัดน้ำจากชาใบชู่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 มากที่สุด โดยยับยั้งตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  และสารสกัดที่ความเข้มข้นนี้ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero (เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเท่ากับ 88.97%) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 400  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ Vero ลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ลดลง 63.05%) อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นนี้ สารสกัดยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33-A ได้มากกว่าเซลล์ Vero อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



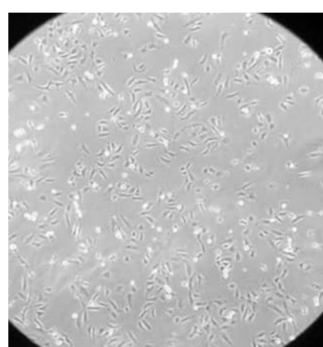
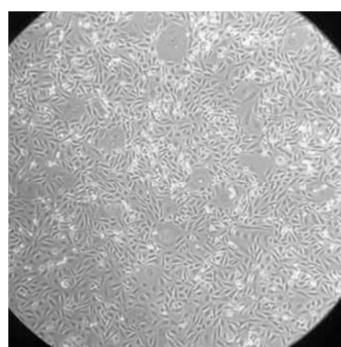
ภาพที่ 4-4 เปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ จากการทดสอบด้วยวิธี MTT assay เมื่อเซลล์ได้รับสารสกัดน้ำจากชาใบชู่ที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (\* และ # แสดงถึงการลดลงของการมีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ของเซลล์ชนิดเดียวกันที่ได้รับสารสกัดเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด และเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งที่ความเข้มข้นเดียวกัน ตามลำดับ ) ( $n \geq 12$ )

### 4.2.3 ค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดต่อเซลล์ทดสอบ

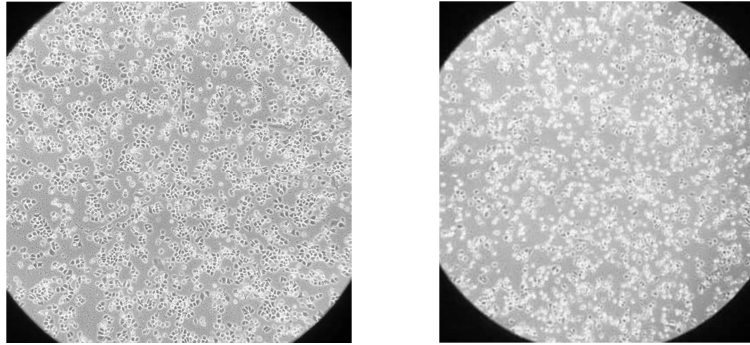
จากการผลศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด และเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero เมื่อเซลล์ได้รับสารทดสอบในข้างต้น สามารถหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50% (ค่า IC<sub>50</sub>) ได้ผลดังที่แสดงในตารางที่ 4-1 โดยภาพเซลล์มะเร็งที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC<sub>50</sub> แสดงดังภาพที่ 4-5 และ 4-6

ตารางที่ 4-1 ค่า IC<sub>50</sub> (µg/ml) ของสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลจากชาใบชู่ต่อเซลล์ทดสอบทั้ง 6 ชนิด

เซลล์ทดสอบ	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	สารสกัดน้ำ	สารสกัดเอทานอล
Vero	311	388
MDA-MB-231	175	130
MCF-7	>400	241
HeLa	295	144
SiHa	>400	259
C33A	270	181



ภาพที่ 4-5 เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ที่ไม่ได้รับ (ขวา) และได้รับสารสกัดเอทานอลจากชาใบชู่ (ซ้าย) ที่ความเข้มข้น IC<sub>50</sub> เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับที่กำลังขยายรวม 100X



ภาพที่ 4-6 เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ไม่ได้รับ (ขวา) และได้รับสารสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ย (ซ้าย) ที่ความเข้มข้น  $IC_{50}$  เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับที่กำลังขยายรวม 100X

## บทที่ 5

### อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

#### 5.1 อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำจากชาใบชู่ต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านม 2 ชนิด ได้แก่ MDA-MB-231 และ MCF-7 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก 3 ชนิด ได้แก่ HeLa, C33A และ SiHa เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งชนิด Vero ผลจากการทดสอบด้วยวิธี MTT แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำจากชาใบชู่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ทั้งเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ทดสอบ โดยที่สารสกัดเอทานอลสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากกว่าสารสกัดน้ำ เนื่องจากแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero น้อยกว่า ในขณะที่ เซลล์มะเร็งที่ถูกสารสกัดจากชาใบชู่ทั้งสองชนิดยับยั้งได้มากที่สุด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดเอทานอลเท่ากับ 130  $\mu\text{g/ml}$  และของสารสกัดน้ำ เท่ากับ 175  $\mu\text{g/ml}$

การที่เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ตอบสนองต่อสารสกัดได้ดีและดีกว่าเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 อาจเนื่องมาจาก เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 เป็นเซลล์มะเร็งเต้านมแบบ triple negative breast cancer (TNBC) ซึ่งจะไม่มิตัวรับสัญญาณ (receptor) 3 ชนิด ได้แก่ ไม่มีตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen receptor, ER-) ไม่มีตัวรับสัญญาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone receptor, PR-) และไม่มีการผลิตโปรตีน human epidermal growth factor receptor-2 (Her2-) (Chavez, Garimella & Lipkowitz, 2010) ในขณะที่เซลล์มะเร็งเต้านม ชนิด MCF-7 มีตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน (ER+) และตัวรับสัญญาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (PR+) (Jia et al., 2016) ซึ่งเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด TNBC นี้พบว่ามี การตอบสนองต่อยาในกลุ่ม anthracyclines ได้ดี เช่น ยาเคมีบำบัด Doxorubicin หรือ epirubicin และตอบสนองต่อยากลุ่ม taxanes ได้มากกว่าเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มี hormone receptor (Isakoff, 2010) อีกทั้งยังมีรายงานว่า เซลล์ MDA-MB-231 มีการตอบสนองต่อสาร เช่น curcumin ได้ดีกว่าเซลล์ MCF-7 เช่นกัน (Tao et al., 2014) จากเหตุผลเหล่านี้จึงอาจเป็นผลให้เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 มีความไวต่อสารสกัดจากชาใบชู่ที่ทำการทดสอบมากกว่าเซลล์ MCF-7 นั้นเอง

สำหรับเซลล์มะเร็งปากมดลูก จากผลการทดสอบ MTT และค่า  $IC_{50}$  (ตาราง 4-1) จะเห็นได้ว่า เซลล์ชนิด SiHa มีความทนทานต่อสารสกัดจากชาใบชู่ทั้งสองชนิดได้มากที่สุด ทั้งนี้ ส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะ SiHa เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HPV positive คือมีชิ้นส่วนของยีนไวรัส HPV ชนิด 16 (HPV-16) เช่นเดียวกับเซลล์ HeLa ที่เป็น HPV positive ชนิด HPV-18 โดยในเซลล์มะเร็งเหล่านี้จะมีการผลิตโปรตีน E6\* ซึ่งได้มาจากการตัดแต่ง mRNA ของยีน E6 และเคยมีรายงานว่ายีน E6\* ช่วยส่งเสริมให้เซลล์เกิดการดีเอด (Wanichwatanadecha et al., 2012) จึงอาจทำให้เซลล์ชนิด SiHa และ HeLa สามารถทนทานต่อสารสกัด

ได้มากกว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่มีชิ้นส่วนของไวรัส HPV (HPV negative) ดังเช่นเซลล์ C33A นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa มีการแสดงออกของ antioxidant enzyme ในระดับที่สูงกว่าเซลล์มะเร็งอีกสองชนิด ซึ่งหากว่าสารสกัดจากใบขลุ่ยมีกลไกออกฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งผ่านการเพิ่ม reactive oxygen species (ROS) (กำลังอยู่ในระหว่างทดสอบ) ก็จะทำให้เซลล์ SiHa สามารถกำจัด ROS ที่สารสกัดสร้างขึ้นได้มากกว่าเซลล์ HeLa และ C33-A จึงทำให้เซลล์ SiHa ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดได้น้อยที่สุดนั่นเอง ดังเช่นผลที่ได้จากการทดสอบเซลล์ทั้งสามชนิดนี้ด้วยยา Doxorubicin ซึ่งพบผลไปในทำนองเดียวกันคือสามารถทนต่อยา doxorubicin ได้มากกว่าเซลล์ HeLa และ C33A (Filippova et al., 2014)

ถึงแม้ว่าผลจากการทดลองนี้จะยังไม่ได้ค้นหากลุ่มสารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากชาใบขลุ่ยทั้งสองชนิดว่าเป็นสารกลุ่มใดที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบได้ อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยก่อนหน้าได้มีการวิเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ในใบขลุ่ย พบสารกลุ่มฟีนอล ฟลาโวนอยด์ เช่น Caffeic acid, Chlorogenic acid, Quercetin, Luteolin, Apigenin และ Kaempferol เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้เคยมีการพิสูจน์แล้วว่ามียฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและป้องกันการเกิดมะเร็งได้ (Boonruang et al., 2017; Suriyaphan, 2014; Shukla and Gupta, 2010; Ye et al., 2010; Chen and Chen, 2013; Cook et al., 2016) หรืออาจจะเป็นสารกลุ่มอื่นที่ทำหน้าที่ต้านมะเร็งนี้ ซึ่งผู้วิจัยจะได้ทำการค้นหาสารออกฤทธิ์ต่อไป

## 5.2 สรุปผลการทดลอง

1. สารสกัดจากชาใบขลุ่ยที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำ มีร้อยละผลผลิต (% Yield) เท่ากับ 13.05% และ 15.41% ตามลำดับ
2. สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ย สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ทดสอบได้ โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้
3. สารสกัดเอทานอลสามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าสารสกัดน้ำ โดยมีค่า  $IC_{50}$  ต่อเซลล์มะเร็งอยู่ในช่วง 130-259  $\mu\text{g/ml}$
4. เซลล์มะเร็งที่ถูกยับยั้งได้มากที่สุดด้วยสารสกัดจากชาใบขลุ่ยทั้งสองชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดเอทานอลเท่ากับ 130  $\mu\text{g/ml}$  และของสารสกัดน้ำ เท่ากับ 175  $\mu\text{g/ml}$
5. เซลล์มะเร็งที่ถูกยับยั้งได้น้อยที่สุดด้วยสารสกัดจากชาใบขลุ่ยทั้งสองชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม SiHa ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดเอทานอลเท่ากับ 259  $\mu\text{g/ml}$  และของสารสกัดน้ำ เท่ากับ >400  $\mu\text{g/ml}$
6. สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำจากชาใบขลุ่ยมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero ต่ำ โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 388 และ 311  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ

## ผลผลิต (Output)

Manuscript เรื่อง Anti-proliferative effect of *Pluchea indica* extracts on woman-related cancers. โดย lawsipo, P\*, Sarapusit S, Mutapat, P., and Meejom, A. อยู่ในระหว่างเตรียมเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์ระดับนานาชาติ Food Bioscience



## บรรณานุกรม

- มาโนช วามานนท์, เพ็ญภา ทรัพย์เจริญ, บรรณาธิการ. ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. พิมพ์ครั้งที่ 2. ม.ป.ท.: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2540.
- สถิติสาธารณสุข. 2558. สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข.
- Andarwulan, N., Kurniasih, D., Apriady, R.A., *et al.* (2012). Polyphenols, carotenoids and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. *J Funct Foods*. 4:339-347. doi:10.1016/j.jff.2012.01.003.
- Boonruang, S., Prakobsri, K., Pouyfung, P., Srisook, E., Prasopthum, A., Rongnoparut, P., *et al.* (2017). Inhibition of human cytochromes P450 2A6 and 2A13 by flavonoids, acetylenic thiophenes and sesquiterpene lactones from *Pluchea indica* and *Vernonia cinerea*. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 32(1):1136-1142. doi: 10.1080/14756366.2017.1363741.
- Buapool, D., Mongkol, N., Chantimal, J., Roytrakul, S., Srisook, E., & Srisook, K. (2012). Molecular mechanism of anti-inflammatory of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW264.7 and its action in animal models of inflammation. *J Enthopharmacol*. 146:495-504. doi.org/10.1016/j.jep.2013.01.0140
- Chavez, K.J., Garimella, S.V., & Lipkowitz, S. (2010). Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*, 32(1-2), 35-48. doi:10.3233/BD-2010-0307
- Chen, A.Y. & Chen, Y.C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem*. 138(4):2099-107. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.139.
- Cho, J.J., Cho, C.L., Kao, C.L., *et al.* (2012). Crude aqueous extracts of *Pluchea indica* (L.) Less. inhibit proliferation and migration of cancer cells through induction of p53-dependent cell death. *BMC Complement Altern Med* 12: 265-276.
- Cook, M.T., Liang, Y., Besch-Williford, C., & Hyder, S.M. (2016). Luteolin inhibits lung metastasis, cell migration, and viability of triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer* (Dove Med Press). 9:9-19. doi: 10.2147/BCTT.S124860.
- Diakos, C.I., Charles, K.A., McMillan, D.C., & Clarke, S.J. (2014). Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol*. 15(11):e493-503. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70263-3.
- Filippova, M., Filippov, V., Williams, V. M., Zhang, K., Kokoza, A., Bashkirova, S., *et al.* (2014). Cellular levels of oxidative stress affect the response of cervical cancer cells to chemotherapeutic agents. *BioMed Research International*, 2014.

- Goyal, P.K. & Aggarwal, R.R. (2013). A review on phytochemical and biological investigation of plant genus *Pluchea*. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 3(4): 3373-3392.
- <http://bioeconomy.asia/?p=127>
- [http://osthailand.nic.go.th/files/social\\_sector/SDP\\_health291057-new6.pdf](http://osthailand.nic.go.th/files/social_sector/SDP_health291057-new6.pdf) [สืบค้นเมื่อ กันยายน 2560]
- <http://www.chulacancer.net>
- <http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/227/ใบขลุ่ย-ประโยชน์-โทษ-ฤทธิ์-ความเป็นพิษ/>
- <http://www.thaihealth.or.th/microsite/categories/5/ncds/2/173/176-กลุ่มโรค+NCDs.html>
- Isakoff, S.J. (2010). Triple-negative breast cancer: role of specific chemotherapy agents. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 16(1), 53-61. doi:10.1097/PPO.0b013e3181d24ff7
- Jia, M., Li, Y., Xin, H.L., Hou, T.T., Zhang, N.D., Xu, H.T. *et al.* (2016). Estrogenic activity of osthole and imperatorin in MCF-7 cells and their osteoblastic effects in Saos-2 cells. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(6), 413-420. doi: 10.1016/S1875-5364(16)30037-1
- Kao, C.L., Cho, J., Lee, Y.Z., Cheng, Y.B., Chien, C.Y., Hwang, C.F., *et al.* (2015). Ethanolic extracts of *Pluchea indica* induce apoptosis and antiproliferation effects in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Molecules*. 20(6):11508-23. doi: 10.3390/molecules200611508.
- Mohamad, S., Zin, N.M., Wahab, H.A., *et al.* (2011). Antituberculosis potential of some ethanobotanically selected Malaysian plants. *J. Enthamopharmacol*. 133: 1021-1026. doi:10.1016/j.jep.2010.11.037.
- Petchlert, C., Tabtim, R., Apirat, O., & Boonbai, R. (2016). Antimutagenic and anti-oxidized LDL properties of *Pluchea indica* tea. In *proceedings of the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 6)*. January 21-23, 2016 at Pullman Raja Orchid Hotel Khonkaen, Thailand. 239-244.
- Reute,r S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., & Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 49(11):1603-16. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
- Rodriguez-Antona, C, & Ingelman-Sundberg, M. (2006). Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*. 25(11):1679-91.
- Rosilda, A.H., Erazuliana, A.K., & Zuraini, N. (2008). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract of *Pluchea indica* (L) Less. Leaf. *Pharmacogyonline*.2:349-360.

- Shukla, S & Gupta, S. (2010). Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res.* 27(6):962-78. doi: 10.1007/s11095-010-0089-7.
- Suriyaphan O. (2014). Nutrition, Health Benefits and Applications of *Pluchea indica* (L.) Less Leaves. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences.* 41(4):1-10.
- Srisook, K., Buapool, D., Boonbai, R., Simmasut, P., Charoensuk, Y., & Srisook, K. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less herbal tea. *J Med Plants Res.* 6:4077-4081. doi:10.5897/JMPR12.773.
- Syed Abdul Rahman, S.N., Abdul Wahab, N., & Abd Malek, S.N. (2013). In vitro morphological assessment of apoptosis induced by antiproliferative constituents from the rhizomes of *Curcuma zedoaria*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:257108. doi: 10.1155/2013/257108.
- Tao, J., Li, Z., Yale, D., Min, Z., Gang, W., Jun, Z., *et al.* (2014). The differential susceptibilities of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to the cytotoxic effects of curcumin are associated with the PI3K/Akt-SKP2-Cip/Kips pathway. *Cancer Cell Int*, doi: 10.1186/s12935-014-0126-4.
- Wanichwatanadecha, P., Sirisrimangkorn, S., Kaewprag, J., & Ponglikitmongkol, M. (2012). Transactivation activity of human papillomavirus type 16 E6\*1 on aldo-keto reductase genes enhances chemoresistance in cervical cancer cells. *J Gen Virol.* 93(Pt 5):1081-92.
- Ye, J.C., Hsiao, M.W., Hsieh, C.H., *et al.* (2010). Analysis of caffeic acid extraction from *Ocimum gratissimum* Linn. by High performance liquid chromatography and its effects on a cervical cancer cell line. *Taiwan J Obstet Gynecol*; 49(3): 266-271.