



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

ปริญญา

ชีววิทยา

สัตววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความเป็นพิษของสารสกัดเห็บต่อเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนังมนุษย์

Cytotoxicity of *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. Extract on Human
Keratinocyte Stem Cells

นามผู้วิจัย นางสาวอารีย์ สักขิม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กัณทิมาณี พันธุ์วิเชียร, วท.ค.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ฤทธิ วัฒนชัยยิ่งเจริญ, วท.ค.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ลักขณา หิมะคุณ, วท.ม.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กุลณสรณ์ สายขุน, ปร.ค.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สมภพ นวีภาพ, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสีทงี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความเป็นพิษของสารสกัดแห้งต่อเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนังมนุษย์

Cytotoxicity of *Cosciniium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. Extract on
Human Keratinocyte Stem Cells

โดย

นางสาวอารีย์ สักขิม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อารีย์ สักขิม 2553: ความเป็นพิษของสารสกัดแอมต่อเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนังมนุษย์
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา) สาขาชีววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์กนกทิมาณี พันธุ์เขียว, วท.ค. 77 หน้า

แอม *Coscinium fenestratum* เป็นสมุนไพรประเภทเถา นิยมนำมารับประทานอย่างแพร่หลายเพื่อรักษาโรคมะเร็ง เบาหวาน ความดันเลือดสูง และโรคอื่นๆ การวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดแอมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนังมนุษย์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/F 12 ที่มี fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยตรวจสอบการตายของเซลล์ การเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ การตายของเซลล์แบบ apoptosis และการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์จากการตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay พบว่า สารสกัดแอมด้วยน้ำทุกความเข้มข้นมีผลทำให้เซลล์ตายที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 13.30±5.42 ถึง 58.36±3.37 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) แต่เมื่อตรวจสอบโดยย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342 พบว่าที่ความเข้มข้น 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์ตายที่ 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์อยู่ในช่วง 34.81±19.34 ถึง 44.99±13.04 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 72 ชั่วโมง มีเซลล์ตายอยู่ในช่วง 33.50±7.82 ถึง 93.33±11.54 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ที่ความเข้มข้น 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดแอมทำให้เกิดความเสียหายที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบโดยย้อมเซลล์ด้วย acridine orange มีเปอร์เซ็นต์อยู่ในช่วง 33.12±15.63 ถึง 33.23±7.50 และ 53.85±8.23 ถึง 56.85±9.40 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ส่วนที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์อยู่ในช่วง 38.50±15.49 ถึง 91.11±15.39 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) เซลล์ตายแบบ apoptosis พบที่ 72 ชั่วโมง เมื่อเซลล์ได้รับสารสกัดแอมที่ความเข้มข้น 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบโดยย้อมเซลล์ด้วย Hoechst 33342 มีเปอร์เซ็นต์อยู่ในช่วง 6.63±1.07 ถึง 12.87±4.64 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) นอกจากนี้สารสกัดแอมทุกความเข้มข้นที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometry พบเซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 ยกเว้นที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M จากการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดแอมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 100, 200, 400 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อย ซึ่งความเป็นพิษจะมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นและได้รับเป็นเวลานาน

Aree Sakyim 2010: Cytotoxicity of *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. Extract on Human Keratinocyte Stem Cells. Master of Science (Biology), Major Field: Biology, Department of Zoology. Thesis Advisor: Assistant Professor Kantimane Phanwichien, Ph.D. 77 pages.

Tree turmeric *Coscinium fenestratum* is a woody climbing shrub herb which widely used to treat cancer, diabetes mellitus, hypertension and others. The aim of this research was to test the cytotoxic activities of *C. fenestratum* water extract on keratinocyte stem cells. The cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum and six concentrations of the extract, 100, 200, 400, 600, 800 and 1,000 µg/ml, were also added. Then, the cells were incubated in the incubator at 37 C^o and 5% CO₂ for 24, 48 and 72 hrs. The dead of cells, DNA damage, apoptotic activity and alteration of the cell cycle were determined. By MTT assay, the dead of cells were found in all concentrations in the range 13.30±5.42 - 58.36±3.37 % with significantly higher than that of the control (P<0.05). But by using double staining method, propidium iodide and Hoechst 33342, the percentages of dead cells were observed in the range 34.81±19.34 - 44.99±13.04 % in the concentrations of 600, 800 and 1,000 µg/ml at 48 hrs which showed significantly higher than that of the control (P<0.05). After 72 hrs, the percentages of dead cells were found in the range of 33.50±7.82 - 93.33±11.54 which also showed higher significant than that of the control (P<0.05). For the determination of DNA damage using acridine orange staining method, the damaged cells were observed in the concentrations of 800 and 1000 µg/ml at 24 and 48 hrs. With respective, the percentages of these damaged cells were in the range of 33.12±15.63 - 33.23±7.50 and 53.85±8.23 - 56.85±9.40 which were significantly higher than those of the control (P<0.05). At 72 hrs, the range of DNA damage percentage was 38.50±15.49 - 91.11±15.39 which also significantly higher than that of the control (P<0.05). Using Hoechst 33342 staining method, the apoptotic cells were noticed in two concentrations, 800 and 1000 µg/ml, at 72 hrs with significantly higher percentages than that of the control (P<0.05) which were in the range of 6.63±1.07 - 12.87±4.64. Moreover, all concentrations of the extract significantly arrested the cell cycle progression in G0/G1 phase at 24 and 48 hrs, except at 800 µg/ml, the cell cycle was arrested in G2/M phase. Those results, determined from propidium iodine stained cells detected by Flow cytometry, could be concluded that the water extract of *C. fenestratum* at 100, 200, 400 and 600 µg/ml showed lower cytotoxic activities than those higher concentrations. The long term exposure of the higher concentration of the extract, the higher cytotoxic activities was noticed.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กันทิมาณี พันธุ์เขียว ประธาน
กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฤทธิ วัฒนชัยยิ่งเจริญ กรรมการที่ปรึกษา
สาขาวิชาเอก รองศาสตราจารย์ลักขณา หิมะคุณ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กุลณสรศักดิ์
สายขุน กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชารอง ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการ
ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์
ดร. นิตยศรี แสงเดือน ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์
ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาสัตววิทยาทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้
อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบคุณหัวหน้าโครงการ
รองศาสตราจารย์ยินดี กิตติยานันท์ และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ โครงการวิจัยชีววิทยาระบบ
สืบพันธุ์ของสัตว์บกเศรษฐกิจ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดลทุกท่าน ที่ได้ให้
ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ ในภาควิชาสัตววิทยาที่เป็นกำลังใจ
และช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณอาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา นักเรียน โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ ที่ได้ให้โอกาสใน
ทุกๆ ด้าน ให้งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้
อบรมและให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

อารีย์ สักยิม

มีนาคม 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	34
ผลและวิจารณ์	40
ผล	40
วิจารณ์	53
สรุปและข้อเสนอแนะ	58
สรุป	58
ข้อเสนอแนะ	59
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	60
ภาคผนวก	74
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเซลล์และสารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์	75
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	77

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ฤทธิ์ของ berberine ในพืชสมุนไพรบางชนิด	8
2	การตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยวิธี MTT assay (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	40
3	การตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	42
4	การเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยการย้อมเซลล์ด้วย acridine orange (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	45
5	การตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	48
6	การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	51
7	การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 48 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	52

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพวาดแสดงกิ่งและผลของ <i>Coscinium fenestratum</i>	5
2	ภาพวาดแสดง a) ดอกเพศเมีย b) ใบประดับ c) กลีบเลี้ยง d) กลีบดอก e) เกสรตัวเมีย f) คาร์เพลต g) คาร์เพลตผ่าตามยาว	5
3	โครงสร้างทางเคมีของ berberin	6
4	โครงสร้างทางเคมีของ jatrorrhizine	7
5	โครงสร้างทางเคมีของ palmitine	7
6	การเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของ tetrazole เป็น formazan	25
7	การตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้น แตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยวิธี MTT assay	41
8	Keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ระดับความเข้มข้นแตกต่าง กัน (propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342, 400X)	43
9	การตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้น แตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการย้อมด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342	44
10	Keratinocyte stem cell ที่ดีเอ็นเอได้รับความเสียหาย หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ ความเข้มข้นแตกต่างกัน (acridine orange, 200X)	46
11	การเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสาร สกัดแสมที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบโดย การย้อมด้วย acridine orange	47
12	Keratinocyte stem cell ตายแบบ apoptosis หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความ เข้มข้นแตกต่างกัน (Hoechst 33342, 400X)	49
13	การตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสาร สกัดแสมที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบโดย การย้อมด้วย Hoechst 33342	50

ความเป็นพิษของสารสกัดแอมต่อเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนังมนุษย์

Cytotoxicity of *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. Extract on Human Keratinocyte Stem Cells

คำนำ

ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรมาใช้ในอุตสาหกรรมยาและอาหารจำนวนมาก ทำให้ประชาชนมีโอกาสใช้หรือได้รับสารสกัดเพิ่มขึ้น สมุนไพรบางชนิดอาจมีสารที่เป็นประโยชน์ บางชนิดมีทั้งสารที่เป็นประโยชน์และสารที่เป็นพิษอยู่ในสมุนไพรชนิดเดียวกัน ดังนั้นการนำสมุนไพรมาใช้ให้เกิดประสิทธิภาพและปลอดภัยนั้น จำเป็นต้องศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ทราบข้อมูลในหลาย ๆ ด้านของสมุนไพรอย่างเพียงพอ การศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของพืชสมุนไพรนั้น ได้ศึกษากันมากในต่างประเทศโดยเฉพาะประเทศที่ประชาชนนิยมใช้สมุนไพรรักษาโรค เช่น ประเทศจีน และอินเดีย เป็นต้น ถึงแม้ประเทศไทยมีการใช้สมุนไพรมานาน และมีการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรอยู่บ้าง แต่พบว่าสมุนไพรส่วนใหญ่ยังขาดข้อมูลทางด้านวิทยาศาสตร์ เพื่อให้มีข้อมูลการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคอย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัย จึงควรศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และสัตว์ทดลองควบคู่กันไป

แอม *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. เป็นไม้เถาเลื้อยเนื้อแข็ง ลำต้นมีสีเหลือง มีรสขม เป็นพืชที่เจริญเติบโตและพบได้ในป่าแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเอเชียใต้ ปัจจุบันประชาชนนำมารับประทานอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีความเชื่อว่า สามารถรักษาโรคมะเร็ง เบาหวาน ความดันโลหิตสูง และโรคอื่น ๆ ในประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวใช้ดื่มเหมือนชาหรือยาองเห่า เชื่อว่าสามารถรักษาโรคเบาหวาน โรคตับและโรคไตได้ จากการศึกษาสรรพคุณของสมุนไพรแอม พบว่ามีความสามารถในการลดน้ำตาลในเลือด (Punitha *et al.*, 2005) ลดความดันเลือด (Singh *et al.*, 1990) มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium tetani* ที่ก่อให้เกิดโรคบาดทะยัก (Palasuntheram *et al.*, 2005) และแบคทีเรียอื่น ๆ หลายชนิด (Nair *et al.*, 2005) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีผลในการทำลายตับหนูทดลอง (Venukumar and Latha, 2004) มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (Tran

et al., 2003) มีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดของคน (human lung A549 adenocarcinoma) และมะเร็งปอดของหนู (murine Lewis lung carcinoma, LLC) (Ueda *et al.*, 2002)

จากข้อมูลดังกล่าวทำให้เกิดความไม่มั่นใจถึงความปลอดภัยของการใช้เส้นใยเป็นสุมไนพร เนื่องจากยังขาดข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบความเป็นพิษต่อ keratinocyte stem cell เพื่อให้ทราบถึงผลที่อาจทำให้เกิดการตายของเซลล์ การเกิดความเสียหายแก่ดีเอ็นเอ (DNA damage) และวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาเผยแพร่เป็นความรู้พื้นฐานในการพัฒนา ส่งเสริมการใช้สุมไนพรนี้ให้แพร่หลาย และอาจพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้ต่อไป

วัตถุประสงค์

ศึกษาผลของสารสกัดแสมด้วยน้ำที่มีต่อ keratinocyte stem cell ดังนี้

1. การตายของ keratinocyte stem cell
2. การเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ
3. การตายของเซลล์แบบ apoptosis
4. การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์

การตรวจเอกสาร

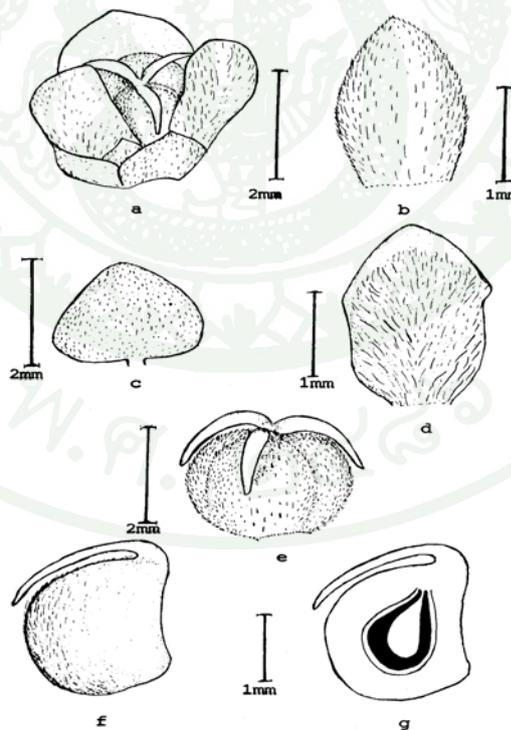
1. สมุนไพรแอม

แอมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cosciniun fenestratum* (Gaertn.) Colebr. จัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae เป็นสมุนไพรไม้เถาเลื้อยเนื้อแข็ง (ประนอม และคณะ, 2545) มีลักษณะสำคัญคือ ลำต้นกลมมีสีเหลือง มีรสขม ใบเป็นรูปรีหรือรูปไข่ยาว 11-13 เซนติเมตร ปลายใบเรียวแหลม ฐานใบมนตัดหรือรูปหัวใจ ขอบใบเรียว ผิวใบด้านบนเกลี้ยง ผิวใบด้านล่างมีขนค่อนข้างยาว เส้นกลางใบและเส้นแขนงใบมี 5-7 เส้น เรียงเป็นรูปฝ่ามือ ก้านใบยาว 8-16 เซนติเมตร ปลายก้านใบติดกับแผ่นใบ ซึ่งห่างจากขอบของฐานใบประมาณ 0.8 มิลลิเมตร มีช่อดอกเป็นกระจุกแน่นกลม มีก้านดอกยาว 6-7 มิลลิเมตร มีก้านช่อดอกยาว 10-30 มิลลิเมตร ช่อดอกอยู่เดี่ยว ๆ หรือมีปลายช่อดอกอยู่ด้วยกัน ช่อดอกยาว 5-11 เซนติเมตร ใบประดับรูปลิ้มแคบยาว 4-5 มิลลิเมตร ดอกเพศผู้มีก้านดอกยาว 1 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงรูปรีหรือรูปไข่ กลีบชั้นในแผ่ มี 3-6 กลีบ กลีบสีเหลืองยาว 1.5-2 มิลลิเมตร กลีบชั้นนอกมีขนาดเล็กละเอียด 1-1.5 มิลลิเมตร เกสรตัวผู้มี 6 อัน เรียง 2 ชั้น ชั้นนอก 3 อัน แยกกัน ชั้นใน 3 อันเชื่อมกัน ดอกเพศเมียมีกลีบเลี้ยงเหมือนดอกเพศผู้ มีเกสรดอกเพศผู้เป็นหมัน 6 อัน รูปคล้ายกระบองยาว 1 มิลลิเมตร รังไข่มี 3 คาร์เพลยาว 2 มิลลิเมตร ก้านเกสรเพศเมียเป็นรูปเส้นด้ายโค้งลง ช่อผลมีคาร์โพเฟอร์ (carpophore) ทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร มีขนยาว เป็นผลเดี่ยวแข็ง (drupe) สีน้ำตาลแกมส้ม หรือสีเหลือง รูปทรงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.8-3 เซนติเมตร ผิวมีขนยาว ส่วนเมล็ดมีสีค่อนข้างขาวรูปร่างเกือบกลม พบในป่าแลบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้



ภาพที่ 1 ภาพวาดแสดงกิ่งและผลของ *Coscinium fenestratum*

ที่มา: Warriar *et al.* (1994)

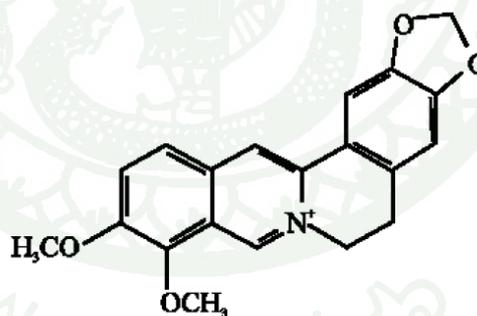


ภาพที่ 2 ภาพวาดแสดง a) ดอกเพศเมีย b) ใบประดับ c) กิ่งเลี้ยง d) กิ่งดอก

e) เกสรตัวเมีย f) คาร์เพล g) คาร์เพลผ่าตามยาว

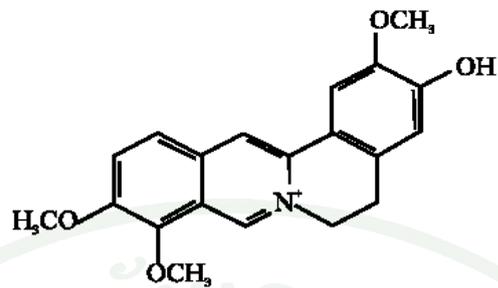
ที่มา: Warriar *et al.* (1994)

สารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของแสม พบแอลคาลอยด์ 2 กลุ่ม คือ protoberberines และ aporphines protoberberines ที่พบบ่อย ได้แก่ berberine (ภาพที่ 3) jatrorrhizine (ภาพที่ 4) และ tetrahydropalmatine ส่วน aporphines ที่พบคือ erebanine (Keawpradub, 1992) นอกจากนี้มีแอลคาลอยด์อื่นๆ เช่น berberrubine, thalifendine, palmatine (ภาพที่ 5) (Siwon *et al.*, 1980) magnoflorine และ oxyberberine (Tushar *et al.*, 2008) เป็นต้น สารที่พบบ่อยบริเวณลำต้นและรากคือ berberin (มนัสวี และ วิชชุคดา, 2544) การสกัดแสมด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์และ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีการแช่ (maceration) การกลั่น (percolation) และซอกซ์เลต (soxhlet) พบว่าการแช่ด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ berberin มากที่สุด 3.37 ± 0.30 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณ (Anonymous, 2001; Rojsanga, 2006) berberin มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง (Narasimhan and Nair, 2004) นอกจากนี้พบ ceryl-alcohol, saponin, hentriacontane, sitosterol, palmitic acid, oleic acid และ sitosterol glucoside ด้วย (Katti and Shintre, 1930; Siwon *et al.*, 1980; Anonymous, 2001; Narasimhan and Nair, 2004) นอกจากนี้แอลคาลอยด์แล้วยังมีสารประกอบกลุ่ม N,N-dimethylindacarpine (Siwon *et al.*, 1990), oxypalmitine, (-)-8-oxoisocorypalmine, (-)-8-oxothaicanine, (-)-8-oxo-3-hydroxy-2,4,9,10-tetramethoxyberberin, และ (-)-8-oxocanadine (Pinho *et al.*, 1992)



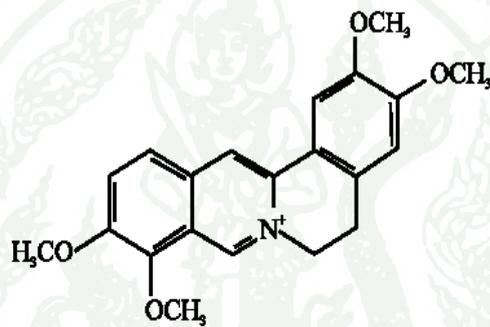
ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ berberin

ที่มา: Tushar *et al.* (2008)



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ jatrorrhizine

ที่มา: Tushar *et al.* (2008)



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ palmitine

ที่มา: Tushar *et al.* (2008)

1.1 berberine

berberine เป็นสารแอลคาลอยด์ที่พบในพืชสมุนไพร เช่น *Hydrastis canadensis*, *Coptis chinensis*, *Berberis aquifolium*, *B. vulgaris* และขมิ้นเครือ *Arcangelisia flava* เป็นต้น พบบริเวณราก ลำต้น และลำต้นใต้ดิน มีฤทธิ์ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ของ berberine ในพืชสมุนไพรบางชนิด

ฤทธิ์ของ berberine	ความเข้มข้น	ผลการยับยั้ง	อ้างอิง
ยับยั้งการเจริญ ของจุลินทรีย์ และโพรโตซัว	0.31-100 µg/ml	<i>Candida albicans</i>	Okunade et al. (1994)
	0.31-100 µg/ml	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Okunade et al. (1994)
	3.1-100 µg/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	Amin et al. (1969)
	1-100 µg/ml	<i>Babesia gibsoni</i>	Matsuura et al. (2005)
	-	<i>Escherichia coli</i>	Birdsall et al. (1997)
	-	<i>Vibrio cholera</i>	Anonymous (2000)
	-	<i>Giardia lamblia</i>	
	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	
	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	
	-	<i>Leishmania donovani</i>	
	-	<i>Chlamydia trachomatis</i>	
ความเป็นพิษต่อเซลล์	-	การทำงานของ AP-1 ใน human cell lines	Birdsall et al. (1997)
	-	การทำงานของ cyclooxygenase-2	
	>0.3 µM	transcription	Fukuda et al. (1999)
	25-100 µM/L	เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1	Xu et al. (2005)
	5, 10, 25 µg/ml	ยับยั้งการเพิ่มจำนวน murine melanoma cell line B16	Letasiova et al. (2005)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ฤทธิ์ของ berberine	ความเข้มข้น	ผลการยับยั้ง	อ้างอิง
	50 µg/ml	พิษต่อ HeLa cell เล็กน้อย คิดเป็น 17 เปอร์เซ็นต์	Youn <i>et al.</i> (2008)
	50 µM	มีความเป็นพิษต่อ hepatoma HepG2 cells	Hwang <i>et al.</i> (2005)

หมายเหตุ - = ไม่ทราบความเข้มข้น

1.1.3 ความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง หนูทดลองที่ได้รับ berberine ปริมาณ 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ถ้าได้รับปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม นาน 5, 9, 12 และ 16 วัน น้ำหนักตัวหนูลดลง 3.3, 5.8, 6.6 และ 6.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้น berberine มีความเป็นพิษกับหนูทดลอง ซึ่งมีค่า LD₅₀ น้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (Letasiova *et al.*, 2005)

1.1.4 การใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การนำ berberine ไปใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษ แต่ผลข้างเคียงที่พบเมื่อได้รับ berberine ในปริมาณสูงคือ มีผลเกี่ยวกับกระเพาะอาหารและลำไส้ เกิดโรคหอบหืด ความดันเลือดต่ำ มีอาการคล้ายเป็นไข้ ถ้าได้รับ berberine ในช่วงตั้งครรภ์ จะมีผลต่อการหดตัวของมดลูกและการแท้ง และทำให้ทารกเป็นโรคดีซ่าน ดังนั้นปริมาณของ berberine ที่ใช้รักษาโรคมึขนาถ 200 มิลลิกรัม รับประทาน 2-4 ครั้งต่อวัน (Birdsall *et al.*, 1997; Anonymous, 2000)

1.2 สารสกัดแสม

ปัจจุบันมีการนำแสมมารับประทานกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว มีความเชื่อว่าเมื่อนำแสมมารับประทาน สามารถรักษาโรคเบาหวาน มะเร็ง ความดันโลหิตสูงและต่ำ ขับสารพิษตกค้างในร่างกาย ละลายไขมันอุดตันในหลอดเลือด ลดความอ้วน รักษาโรคกระเพาะอาหาร และ

โรคอื่น ๆ แต่ยังไม่มีการศึกษาสรรพคุณและความเป็นพิษของแสมต่อเซลล์ปกติและโครโมโซม ส่วนในต่างประเทศ ได้แก่ ประเทศอินเดียมีการนำลำต้น มาใช้รักษาการอักเสบของบาดแผล เบาหวาน ภาวะดีซ่าน เป็นไข้ และอาการอ่อนเพลีย (Nair, 2005) ประเทศศรีลังกา ใช้เป็นยารักษา โรคเบาหวาน (Punitha *et al.*, 2005) ในประเทศเวียดนาม นำรากมาต้มใช้ดื่มเพื่อรักษาอาการจุกเสียด โรคกระเพาะอาหาร ใช้รักษาโรคบิด (Tran and Stefan, 2001) ประเทศมาเลเซีย ใช้ดื่ม หลังจากคลอดบุตร และใช้รักษาโรคข้ออักเสบ ปวดตามข้อ (Agusta, 2003) มีรายงานฤทธิ์ของสารสกัดแสมดังนี้

1.2.1 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย รา ไวรัส และโพรโตซัว

สารสกัดแสมด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* ซึ่งทำให้เกิดโรคสแกบในองุ่น (ณรงค์ และคณะ, 2549) เช่นเดียวกับวรรณ จันทร (มปป.) รายงานว่า berberine ที่สกัดจากแสมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคพืช *Phytophthora parasitica*, *Phytium spp.*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cercospora spp.*, *Fusarium oxysporum* และ *Alternaria porri* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 48, 284, 1011, 653, 599 และ 101 ppm ตามลำดับ

การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดแสมด้วยเมธานอล สารสกัดแสมด้วยน้ำ และ สาร berberin บริสุทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย โดยวิธี filter paper disc diffusion พบว่า สาร berberin บริสุทธิ์มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดแสมด้วยเมธานอล และสารสกัดแสมด้วยน้ำ เนื่องจากสารสกัดแสมด้วยเมธานอล มีปริมาณ berberin สูง ส่วนสารสกัดแสมด้วยน้ำมี ปริมาณ berberin ต่ำกว่า (Nair *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับฤดีวรรณ (2527) พบว่าสารสกัดแสมด้วย น้ำมีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ส่วนสารสกัดอัลคาลอยด์จากแสมมีฤทธิ์ยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Propionibacterium aeruginosa* สารสกัดแสมด้วยแอลกอฮอล์ มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. acnes* และ *S. epidermidis* มีค่า MIC เท่ากับ 0.049 และ 0.165 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Kumar *et al.*, 2007) มีรายงานว่สารสกัดแสมซึ่งสกัดโดยวิธี spray dry มีฤทธิ์ยับยั้ง *Microbacterium tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra, *M. tuberculosis* MDR และ *M. avium* ATCC 25291 ได้ดีกว่าสกัด ด้วยแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3.125, 1.565, 1.565 และ 0.781 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ (ชนาวุฒิ, 2547) นอกจากนี้สาร berberin จากแสม สามารถยับยั้ง *Clostridium tetani* ได้ (Palasuntheram *et al.*, 2005)

ส่วนฤทธิ์การยับยั้งไวรัส มีรายงานว่าสารสกัดแสมด้วยแอลกอฮอล์สามารถยับยั้ง Herpe Simplex Virus type 1 (HSV-1) ใน Vero cell (Ekalaksananan, 2006) และสารสกัดแสมด้วย เมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Plasmodium falciparum* strain FCR-3 ซึ่งเป็นโพรโตซัวก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย ซึ่งมีค่า EC_{50} อย่างน้อย 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Tran *et al.*, 2003)

1.2.2 ฤทธิ์การลดน้ำตาลในเลือด

แสมมีประสิทธิภาพการลดน้ำตาลในเลือด เนื่องจากมี jatrorrhizine และ berberine เป็นองค์ประกอบหลัก (นภาพรรณ, 2546) สารสกัดแสมด้วยแอลกอฮอล์ ขนาด 250 - 1,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถลดน้ำตาลในเลือดของหนูปกติ และขนาด 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถลดน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวานด้วยวิธี oral glucose tolerance test (OGTT) โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสและซูเครส (วัลยา, 2549) เช่นเดียวกับ สุกเกต (2547) ที่พบว่าแสมขนาด 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถลดน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่เป็นเบาหวานได้ แต่ไม่ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวปกติ และไม่มีผลต่อภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงอย่างเฉียบพลันทั้งในหนูขาวที่เป็นเบาหวานและหนูปกติ หนูที่เป็นเบาหวานกลุ่มที่ได้รับอินซูลินมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น แต่กลุ่มที่ได้รับแสมน้ำหนักตัวไม่เพิ่ม ผลการศึกษาฤทธิ์ของแสมต่อโครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของอวัยวะที่สำคัญ พบว่าทำให้เซลล์ตับและเซลล์ islets ของตับอ่อนในหนูที่เป็นเบาหวาน ที่ถูกทำลายด้วย streptozotocin (STZ) ฟื้นกลับคืนได้ มีรายงานว่าสารสกัดแสมด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม มีฤทธิ์ในการลดน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวาน และมีแนวโน้มลดระดับโคเลสเตอรอลและ ไตรกลีเซอไรด์ เพิ่มระดับ High density lipoprotein (HDL) ในกระแสเลือด แต่มีผลเสียต่อการทำงานของไต (วัลยา และคณะ, 2548)

สารสกัดแสมด้วยน้ำมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้เช่นเดียวกับสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ จากการทดลองโดยวิธี glucose tolerance test พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 250, 500, 750 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลา 30 นาที หลังจากป้อนสารละลายกลูโคส ขนาด 1,000 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม คิดเป็น 10.40, 10.97, 10.80, 11.57 และ 14.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งป้อนน้ำกลั่น และเมื่อทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นในหนูขาวเพศผู้ พบว่าสารสกัดมีค่า LD₅₀ มากกว่า 2,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (อังคณา, 2545) แต่จากการศึกษาของ สาลิกา และคณะ (2547) พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 30, 60 และ 90 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน สามารถลดปริมาณกลูโคสและโคเลสเตอรอลในเลือดได้ โดยไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของไต และระบบเลือดของหนูขาว และสารสกัดแอมความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ที่ได้รับนาน 60 วัน สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคส และเพิ่มระดับอินซูลินในเลือดได้ (Umamahoswari and Prince, 2007)

1.2.3 ฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนเซลล์

สารสกัดแอมมีฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ (antiproliferation) จากการทดสอบกับ human HT-1080 fibrosarcoma ทำให้เซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป เกิดดีเอ็นเอแตกหัก เหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (Ueda *et al.*, 2002) จากการทดสอบสมุนไพรจากประเทศไทยคนนาม พบว่า สารสกัดแอมด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ Human HT-1080 Fibrosarcoma และ Murine Lewis Lung Carcinoma (LLC) โดยมีค่า EC₅₀ 11.7 และ 1.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดแอมด้วยเมทานอลต่อน้ำ อัตราส่วน 1:1 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ Human HT-1080 Fibrosarcoma, Human Lung A549 Adenocarcinoma และ Murine Lewis Lung Carcinoma มีค่า EC₅₀ 18.1, 2.88 และ 2.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Ueda *et al.*, 2002) เช่นเดียวกับ Narasimban and Nair (2005) รายงานว่าสารสกัดแอมด้วยเมทานอล มีความเป็นพิษต่อ L929 fibroblast cell มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดแอมด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 5-2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม มีฤทธิ์ยับยั้ง Hep2 cell line มีค่า IC₅₀ ที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Kamkaen *et al.*, 2006)

1.2.4 ฤทธิ์ก่อการตายของเซลล์

หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดแอมด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าเซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทโคลิเนอร์จิก (cholinergic neuron) ในสมองส่วนซีรีบรัม คอร์เทกซ์ (cerebral cortex) สตรีอะตัม (striatum) และฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ถูกทำลายอย่างมาก มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง

ถ้าสัตว์ทดลองได้รับสารสกัดแสมเพียงครั้งเดียวจะทำให้มีพฤติกรรมการทำซ้ำๆ เพิ่มขึ้น แต่ถ้าได้รับสารสกัดแสมติดต่อกัน 14 วัน อาการดังกล่าวลดลง แต่มีอาการซึมเศร้าเพิ่มขึ้น (นงนุช, 2548) เช่นเดียวกับ Wattanathorn *et al.* (2006) รายงานว่าหนูที่ได้รับสารสกัดแสมด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม นาน 14 วัน น้ำหนักตัวของหนูเพิ่มขึ้น แต่ความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในซีรีบรัม คอร์เทกซ์ ฮิปโปแคมปัส และสตรัยอะครัมลดลง ดังนั้นสารสกัดแสมมีสมบัติเป็นพิษต่อระบบประสาท และสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของหนู นอกจากนี้ฤทธิ์ของสารสกัดแสมด้วยเมธานอล สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อตับของหนูทดลองที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เมื่อได้รับนาน 90 วัน (Venukumar and Latha , 2004)

ส่วนฤทธิ์ของสารสกัดแสมด้วยน้ำ มีผลทำให้หลอดเลือดของหนูขาวคลายตัว แต่ไม่ทำให้เกิดพิษ พบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับแสมขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และอวัยวะภายในไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนสัตว์ทดลองที่ได้รับแสมขนาด 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวันเป็นเวลานาน 90 วัน พบว่าสารสกัดแสมไม่เป็นพิษต่อระบบประสาท แต่ทำให้ค่า hemoglobin (HGB) และ hematocrit (HCT) ในเลือดลดลง (Wongcome *et al.*, 2007)

1.2.5 ความเป็นพิษของสารสกัดแสม

สิทธิชัย (2546) รายงานว่าหนูขาวที่ได้รับแสมที่ขนาดความเข้มข้น 5, 50, 500 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่ก่อให้เกิดพิษแบบเฉียบพลัน และไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับ serum glutamic oxalic transaminase (SGOT), serum glutamic transaminase (SGPT), bilirubin, blood urea nitrogen (BUN), creatine และ electrolytes ในเลือด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพและจำนวนของสเปิร์ม และไม่พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของตับ ไต หัวใจ ปอด และอวัยวะ แต่พบว่าสารสกัดแสมที่ขนาด 500 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถลดน้ำหนักตัวของหนูขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนหนูที่ได้รับสารสกัดแสมมีอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีชีวิตรอดมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นแสมเป็นสารไม่ก่อให้เกิดอาการพิษและการตายของสัตว์ทดลอง เช่นเดียวกับการทดลองของ เทวรัตน์ (2547) พบว่า หนูขาวที่ได้รับแสมขนาด 100, 200, 300 และ 400 มิลลิกรัมไม่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักตัวตลอดระยะเวลาที่ได้รับสาร 30 วัน ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับ alanine

aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), bilirubin, BUN, creatine และ electrolytes ในเลือด แต่พบกลุ่มหนูขาวที่ได้รับสารสกัดแอมมีมีการเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่และการมีชีวิตรอดของสเปิร์มมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ไม่พบพยาธิสภาพของโครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของไต หัวใจ ปอด และตับอ่อน แต่เซลล์ตับมีแวคิวโอล (vacuole) เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะบริเวณโซนที่ 1 ของตับ และจำนวนชั้นของ germ cell ใน seminiferous tubule เพิ่มขึ้นด้วย

นอกจากนี้มีการนำแอมไปใช้ประโยชน์ เช่น ประเทศมาเลเซียนำผงสีเหลืองของแอมไปใช้ในการย้อมผ้า (Warrier *et al.*, 1994) ใช้เป็นส่วนผสมเครื่องสำอางค์ เช่น ยาสระผม สบู่ และ ครีมอาบน้ำ เป็นต้น และเครื่องดื่มน้ำสมุนไพร (Gunathilake and Gunathilake, 1980) รากใช้ไล่แมลง (Anonymous, 2001) ผลเป็นอาหารของลิงอุรังอุตัง ชะนี นก (Anonymous, 2000; Agusta, 2003)

2. Keratinocyte stem cell

keratinocyte เป็นเซลล์ที่พบมากบริเวณ epidermis ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ เจริญมาจาก ectoderm เซลล์มีลักษณะกลมแบน นิวเคลียสขนาดใหญ่ ทำหน้าที่สร้างโปรตีน keratin และเก็บสะสมไว้ในไซโทพลาซึม มี keratin intermediate filament อยู่ในไซโทพลาซึมเรียกว่า tonofilament เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 40-70 กิโลดาลตัน ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ keratin ที่มีความเป็นกรด (acidic keratin; Type I, k10 ถึง k20) และ keratin ที่มีความเป็นกลางถึงเป็นด่าง (basic-to-neutral keratin; Type II, k1 ถึง k9) โดยยีนที่ควบคุม keratin ที่มีความเป็นกรดอยู่ที่โครโมโซม 17q12-q21 และยีนที่ควบคุม keratin ที่มีความเป็นกลางถึงเป็นด่างอยู่ที่โครโมโซม 12q11-q13 (Miller *et al.*, 1999)

keratinocyte เกิดจากการแบ่งตัวของ basal cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ชั้นล่างสุดของ epidermis เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโต (development) และมีแปรสภาพมากขึ้น (differentiation) ก็จะเคลื่อนออกมาชั้นบนขึ้นเรื่อยๆ เพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นและแบนราบ มีการเปลี่ยนแปลงระบบเมแทบอลิซึมของเซลล์ สร้างโปรตีนและไขมันที่มีลักษณะเฉพาะ เยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลง แต่ยังคงมีโปรตีนและชั้นไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ นิวเคลียสสลายตัว รวมทั้งออร์แกเนลล์ด้วย และสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย จึงมีชื่อเรียกว่า corneocyte ซึ่งมีเฉพาะ keratin filament และ matrix protein อยู่ในเซลล์เท่านั้น หลังจากนั้น corneocyte ก็จะลอกหลุดออกไปกลายเป็นขี้ไคล (keratin) ด้วย

กระบวนการ keratinization เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงและเคลื่อนตัวออกมาชั้นบนเรื่อย ๆ ทำให้สามารถแบ่ง epidermis ออกเป็นชั้นต่าง ๆ โดยแต่ละชั้นก็จะมี keratinocyte อยู่ในระยะต่างๆ ของการเปลี่ยนแปลง ดังนี้ (กรรณิการ์, 2548)

1. stratum germinativum อยู่ชั้นล่างสุด มีโครงสร้าง basal lamina ยึดชั้นนี้ติดกับชั้น dermis ประกอบด้วย basal cell เรียงตัวชั้นเดียว เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวสูง รูปร่างเซลล์เป็นทรงกระบอก (columnar-shaped) มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ มี keratin filament ขนาดเล็กบาง จับกลุ่มอยู่รอบ ๆ นิวเคลียส และยึดติดกับ desmosome นอกจากนี้ยังยึดติดกับ hemidesmosome ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ยึดระหว่าง basal cell กับ dermis ด้านล่าง hemidesmosome นี้เป็นส่วนหนึ่งของ basal lamina ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์มีไรโบโซมจำนวนมาก แต่มี rough endoplasmic reticulum (RER) และ mitochondria น้อย ส่วน Golgi apparatus มีขนาดเล็ก

2. stratum spinosum ประกอบด้วย keratinocyte ที่มีขนาดใหญ่รูปร่างหลายเหลี่ยม มีลักษณะคล้ายหนามยื่นออกมาจากผิวเซลล์ (spine) ชั้นนี้ประกอบไปด้วยเซลล์เรียงตัวกันหนา ประมาณ 5-10 ชั้น โดยเซลล์ที่อยู่ติดกับชั้น basal cell มากที่สุดเป็นเซลล์ที่มีอายุน้อย มีรูปร่างหลายเหลี่ยม นิวเคลียสมีรูปร่างกลม ส่วนเซลล์ที่อยู่บนมีขนาดใหญ่กว่า มีลักษณะแบนราบ มีการสร้างแกรนูล ชนิดใหม่เรียกว่า lamella granule หรือ membrane-coating granule (MCG) หรือ odland bodies หรือ keratinosome กระจายอยู่ทั่วไปพบมากบริเวณใกล้ Golgi complex ทำหน้าที่สร้างไขมันที่อยู่ระหว่างเซลล์ ขอบของเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายหนาม คือ desmosome มี keratin filament มายึดติดอยู่ โดย desmosome เป็นตัวยึดเซลล์ไว้ด้วยกัน เซลล์ในชั้น stratum germinativum และ stratum spinosum รวมเรียกว่า stratum malpighi (malpighian layer) ซึ่งจะเคลื่อนตัวขึ้นไปชั้นบนกว่ากลายเป็นชั้นที่มีชื่อเรียกว่า stratum granulosum

3. stratum granulosum (granular cell layer) เป็นชั้นเซลล์ที่มีรูปร่างค่อนข้างแบน ภายในไซโทพลาสซึม ประกอบด้วย basophilic granule จำนวนมาก มีชื่อว่า keratohyaline granule ในชั้นนี้ granular cell เรียงตัวกัน 3-5 ชั้น ภายในเซลล์มี keratohyalin granule จำนวนมาก ประกอบด้วย profilaggrin, keratin, intermediate filament และ loricrin โดยที่ profilaggrin เริ่มสร้างในชั้น granular cell และถูกเปลี่ยนโดยกระบวนการ proteolysis เป็น filaggrin ตรงตำแหน่งที่เซลล์จะเปลี่ยนจาก granular cell ไปเป็น corneocyte และได้เป็น filaggrin อยู่ในชั้น stratum corneum โดยทำหน้าที่ยึดระหว่าง keratin filament ทำให้เกิดเป็นร่างแหของ keratin ที่แข็งแรง

สมบูรณ์ ส่วน loricrin เป็นโปรตีนชนิดที่ไม่ละลายน้ำอยู่ใน keratohyaline granule มี sulfur glycine/serine มาก โปรตีนนี้ถูกสร้างในชั้น granular cell ต่อไปจะกลายเป็นองค์ประกอบหลัก ประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ของเยื่อหุ้ม corneocyte ในชั้น stratum corneum เรียกว่า cornified cell envelope (CE) ทั้ง filaggrin, keratin filament และ cornified cell envelope รวมเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงของ keratin ขณะเดียวกัน MCG ซึ่งเริ่มสร้างในชั้น stratum spinosum ชั้นบน เมื่อเซลล์เคลื่อนมาอยู่ตรงตำแหน่งที่จะเปลี่ยนจาก granular cell ไปเป็น corneocyte (granular-cornified interface) จำนวน MCG จะเพิ่มมากขึ้นและเริ่มเชื่อมต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วปล่อยสารที่บรรจุอยู่ภายในออกมาอยู่ระหว่างเซลล์ (intercellular space) สารนี้ประกอบด้วย glycolipid, sterol และ phospholipid มีหน้าที่ไปเคลือบ corneocyte ไว้ (intercellular cementing substance) ช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ ทำให้เซลล์ยึดติดกันอย่างมีประสิทธิภาพ และมีผลต่อการดูดซึมยาที่ทาบนผิวหนังด้วย

4. stratum corneum (horny layer หรือ cornified layer) ประกอบด้วยเซลล์ corneocyte ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจาก granular cell เมื่อเปลี่ยนเป็น corneocyte จะสูญเสียน้ำหนักประมาณ 45-86 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เห็นขอบเขตของเซลล์ที่อยู่ติดกันคล้ายร่างแห ภายในเซลล์ไม่มีออร์แกเนลล์ ยกเว้น keratin ที่สมบูรณ์ เซลล์ในชั้นนี้มีขนาดใหญ่ที่สุดใน epidermis มีหน้าที่ปกป้องผิวจากอันตรายภายนอก ป้องกันการสูญเสียน้ำ และเป็นทางผ่านของยาหรือสารต่าง ๆ จากภายนอก ในชั้นนี้ desmosome ซึ่งยึดระหว่างเซลล์จะเริ่มถูกทำลาย ทำให้แต่ละเซลล์แยกจากกัน กระบวนการนี้เรียกว่า desquamation คือ การลอกหลุดของ corneocyte ออกไปเป็นขี้ไคล ชั้น stratum corneum นี้มีความหนาบางแตกต่างกันในแต่ละบริเวณของร่างกาย ผิวหนังที่จัดเป็น thick skin มีชั้น corneum หนา พบที่บริเวณฝ่ามือฝ่าเท้า โดยปกติถ้าชั้น corneum หนา ชั้น granular cell ก็จะหนาตามไปด้วย ส่วนบริเวณผิวหนังที่จัดเป็น thin skin มีชั้น corneum บาง ชั้น granular cell ก็จะบางไปด้วย บริเวณฝ่ามือฝ่าเท้าที่จัดเป็น thick skin นั้น มีชั้น stratum lucidum เพิ่มขึ้นไปอีก 1 ชั้น ซึ่งชั้นนี้ไม่พบใน thin skin ทั่วไป

5. stratum lucidum เป็นชั้นบาง ๆ แทรกอยู่ระหว่างชั้น granular cell และ stratum corneum พบเฉพาะบริเวณฝ่ามือฝ่าเท้าเท่านั้น เซลล์ในชั้นนี้จะไม่มี nucleus และ organelles แต่จะมี keratin filaments อยู่หนาแน่น และเป็นเซลล์ที่เสื่อมสภาพแล้ว

3. กระบวนการแบ่งเซลล์

3.1 วัฏจักรเซลล์ (cell cycle)

เซลล์มีการเพิ่มจำนวนผ่านทางกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ที่เรียกว่า วัฏจักรเซลล์ ในแต่ละวัฏจักรมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์จากหนึ่งเป็นสอง วัฏจักรเซลล์ประกอบด้วยระยะอินเตอร์เฟส (interphase) และระยะการแบ่งเซลล์ ระยะอินเตอร์เฟสแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ G1 (first gap), S (synthesis) และ G2 (second gap) ระยะการแบ่งเซลล์ แบ่งออกเป็น 2 ระยะคือ การแบ่งนิวเคลียส (mitosis หรือ karyokinesis) ซึ่งประกอบด้วยระยะ prophase, metaphase, anaphase และ telophase และการแบ่งไซโทพลาซึม (cytokinesis) รวมทั้งระยะพัก (quiescence stage หรือ G0 phase) (สิทธิตศกค., 2549)

ระยะอินเตอร์เฟส เป็นระยะที่ใช้เวลานาน มีระยะต่าง ๆ ดังนี้ (ประคิษฐ์, 2546; ลัดดา, 2547)

1. ระยะ G1 เป็นระยะตั้งแต่เสร็จสิ้นการแบ่งเซลล์จนเข้าสู่ระยะ S โดยระยะเวลาของระยะ G1 แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของเซลล์ เซลล์ที่แบ่งตัวเร็วมีระยะเวลาสั้นกว่าเซลล์ที่แบ่งตัวช้า ในระยะ G1 เซลล์มีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีนที่จำเป็นสำหรับจำลองดีเอ็นเอ เช่น ฮิสโตน 5 ชนิด คือ H1, H2A, H2B, H3 และ H4 แต่มีฮิสโตนที่สังเคราะห์ใน G1 เพียง 5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ส่วนใหญ่สังเคราะห์ในระยะ S และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ เป็นต้น

2. ระยะ S เป็นระยะตั้งแต่เซลล์เริ่มมีการจำลองดีเอ็นเอจนเสร็จสิ้นได้เป็น 2 เท่า การจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA replication) เริ่มต้นด้วยเอนไซม์เฮลิเคส (helicase) ทำหน้าที่สลายพันธะไฮโดรเจน (H-bond) เพื่อให้เกลียวคู่ของดีเอ็นเอแยกออกจากกัน จากนั้น โปรตีนเฮลิคซีสเตบิลิซิง (helix stabilizing protein) จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวเพื่อป้องกันไม่ให้กลับคืนเป็นเกลียวคู่อีก และมีเอนไซม์ดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) ทำหน้าที่คลายปมเหนือจุดแยก (replication fork) โดยการตัดสายหนึ่งของดีเอ็นเอออก เพื่อทำให้เกิดการคลายเกลียวและคลายปมแล้วจึงทำหน้าที่ต่อจุดที่ตัดนั้นกลับเข้าไปดั้งเดิม บริเวณที่ไปออกของสายดีเอ็นเออันนั้นจะเป็นจุดเริ่มการจำลองโมเลกุล โดยมีเอนไซม์ไพรมาส (primase) สร้างสายอาร์เอ็นเอเริ่มต้น (RNA primer) แล้วดี

เอ็นเอพอลิเมอเรส 3 (DNA polymerase III) ทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลายด้าน 3'-OH ของสายอาร์เอ็นเอเริ่มต้นในทิศทาง 5' -> 3' ตามทิศทางของการคลายเกลียว โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดิมเป็นแม่แบบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ยาวตลอด เป็นสายนำ (leading strand)

สำหรับพอลินิวคลีโอไทด์สายใหม่อีกสายหนึ่งไม่สามารถสร้างต่อเนื่องกันเป็นสายยาวตลอดไปได้ เพราะทิศทางการสร้างสวนกับทิศทางคลายเกลียวของโมเลกุลดีเอ็นเอเดิม จึงมีการสร้างพอลินิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ เรียกว่าโอคาซากิแฟรกเมนต์ (Okazaki fragment) ซึ่งประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1,000 ถึง 2,000 นิวคลีโอไทด์ขึ้นมาก่อน แล้วจึงมาต่อกันเป็นสายยาว เพื่อให้ทิศทางสร้างเป็นแบบ 5' -> 3' เช่นกัน เรียกสายนี้ว่าสายแลกกิง (lagging strand) หลังจากนั้นเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส 1 (DNA polymerase I) ตัดสายอาร์เอ็นเอเริ่มต้นออก แล้วเติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3'-OH ของสายโอคาซากิแฟรกเมนต์ จนกระทั่งเหลือช่องว่างเฉพาะปลาย 3'-OH และ 5'-PO₄ หรือที่เรียกว่า นิก (nick) เท่านั้น สุดท้ายเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase) จะเชื่อมปลาย 3'-OH และ 5'-PO₄ เข้าด้วยกันด้วยพันธะเอสเตอร์ (ester bond) ได้ดีเอ็นเอสายยาวตลอดสาย เมื่อการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอเสร็จสิ้น โครโมโซม 1 แห่งประกอบด้วย 2 ซิสเตอร์โครมาทิด (sister chromatid) ยึดติดกันที่เซนโทรเมียร์ (centromere) จึงมีจำนวนดีเอ็นเอเป็น 2 เท่าของปกติ นอกจากนี้ในต้นระยะ S ยังมีการสังเคราะห์โปรตีนฮิสโตน และนอนฮิสโตนเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่มีการจำลองดีเอ็นเอ

3. ระยะ G2 เป็นระยะที่เริ่มหลังจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้สิ้นสุดลง ระยะนี้เซลล์มีดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า มีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ สังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อการแบ่งนิวเคลียส โปรตีนฮิสโตนประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ และสังเคราะห์ไคเนโทคอร์ (kinetochore)

ระยะการแบ่งเซลล์ เป็นการแบ่งตัวของเซลล์ร่างกาย ประกอบด้วย 2 กระบวนการคือ การแบ่งนิวเคลียส และแบ่งไซโทพลาซึม ซึ่งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสนั้นเซลล์ลูกสองเซลล์ที่ได้จะมีจำนวนและลักษณะของโครโมโซมเหมือนกับเซลล์พ่อแม่ทุกประการ สามารถแบ่งออกเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้ (ประดิษฐ์, 2546)

1. โพรเฟส (prophase) ระยะนี้โครโมโซมขดสั้นและหนาขึ้น ทำให้เห็นโครโมโซมชัดเจนอยู่ในนิวเคลียส แต่ละโครโมโซมมี 2 โครมาทิด ซึ่งติดกันตรงตำแหน่งเซนโทรเมียร์ ตำแหน่งนี้เป็นตัวกำหนดชนิดของโครโมโซมเป็น 4 ชนิด คือ metacentric, submetacentric,

acrocentric และ telocentric โดย metacentric เป็นโครโมโซมที่มีแขนทั้งสองข้างยาวเท่ากัน submetacentric เป็นโครโมโซมที่มีแขนทั้งสองข้างยาวไม่เท่ากัน acrocentric มีเซนโทรเมียร์ก่อนไปทางปลายของโครโมโซม และ telocentric มีแขนเพียงข้างเดียวเพราะมีเซนโทรเมียร์อยู่ตอนปลายของโครโมโซม ในระยะนี้คู่ของเซนทริโอล (centriole) เริ่มเคลื่อนย้ายไปยังขั้วตรงกันข้ามของเซลล์ ขณะเดียวกันมีการสร้างเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) ในตอนท้ายของระยะนี้จะไม่พบนิวคลีโอลัสเนื่องจากสลายตัวอยู่ในนิวลีโอพลาซึม และเยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มสลาย

2. เมทาเฟส (metaphase) โครโมโซมขดตัวและหนาขึ้นแล้วเคลื่อนมาอยู่บริเวณแนวกลางเซลล์ (equatorial plate) แต่ละเซนโทรเมียร์มีสายใยสปินเดิลมายึดไว้ โดยไมโครทิวบูลที่เป็นส่วนประกอบของสายใยสปินเดิลจับที่ไคเนโทคอร์ของโครโมโซมแต่ละแท่ง ไมโครทิวบูลที่จับระหว่างไคเนโทคอร์กับขั้วเรียกว่า ไคเนโทคอร์ไมโครทิวบูล (kinetochore microtubule) ส่วนไมโครทิวบูลที่จับระหว่างขั้วทั้งสองเรียกว่า พอลาร์ไมโครทิวบูล (polar microtubule) โดยปลายอีกข้างหนึ่งของสปินเดิลสิ้นสุดที่ขั้วของเซลล์ในบริเวณเซนทริโอล ระยะนี้โครโมโซมขดสั้นมากที่สุด และเป็นระยะที่เหมาะสมอย่างยิ่งในการศึกษาจำนวน และรูปร่างของโครโมโซม

3. แอนาเฟส (anaphase) เซนโทรเมียร์ของซิสเตอร์โครมาทิดทั้งสองของแต่ละโครโมโซมแยกออกจากกัน เกิดจากการหดตัวของสายใยสปินเดิล และเซนทริโอลขยับห่างออกจากกันแล้วเคลื่อนไปคนละขั้วเซลล์ ปรากฏเห็นโครโมโซมแยกเป็น 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน และแต่ละโครโมโซมประกอบด้วยโครมาทิดจำนวน 1 แท่ง กรณีเกิดความผิดปกติที่โครโมโซมที่ประกอบด้วย 2 เซนโทรเมียร์ สังเกตได้ว่ามีโครโมโซมยืดยาวเป็นสะพานเชื่อมระหว่างสองขั้วของเซลล์ ซึ่งในตอนปลายระยะแอนาเฟสโครโมโซมจะขาดออก เรียกว่า laggard การเคลื่อนที่ของโครโมโซมเข้าสู่ขั้วเซลล์เกี่ยวข้องกับ 2 กลไกคือ แอนาเฟส เอ (anaphase A) เป็นการลดความยาวของสายใยสปินเดิล ระหว่างไคเนโทคอร์กับขั้ว และแอนาเฟส บี (anaphase B) เป็นการแยกของขั้วทั้งสองให้ห่างกันมากขึ้น (ลัดดา, 2547)

4. เทโลเฟส (telophase) โครโมโซมที่แยกไปอยู่คนละขั้วเซลล์จะเริ่มคลายการขดตัวและขยายยาว เริ่มเห็นเยื่อหุ้มนิวเคลียสล้อมแต่ละกลุ่มของโครโมโซม ภายหลังเมื่อมีการแบ่งนิวเคลียสแล้วมีการแบ่งไซโทพลาซึม ในเซลล์สัตว์พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์จะคอดตรงกลางแล้วแยกออกเป็นสองเซลล์ สำหรับเซลล์พืชมีการสร้างผนังเซลล์ มีลักษณะเป็นผนังบางกั้นตรงกลาง ต่อมา

มีเซลล์โลสมาสะสมจนเปลี่ยนสภาพเป็นผนังเซลล์ที่แข็งแรง เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์ เซลล์แม่เริ่มต้น 1 เซลล์ แบ่งได้เซลล์ลูกจำนวน 2 เซลล์

วัฏจักรเซลล์และช่วงเวลาต่าง ๆ ในวัฏจักรเซลล์ ได้แก่ ระยะ G1, S, G2 และ M สามารถหาได้โดยการตรวจสอบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหรือการหาปริมาณดีเอ็นเอ ปกติเซลล์จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอในช่วงระยะ S การใส่ นิวคลีโอไทป์ที่ติดฉลากด้วยสารรังสี ได้แก่ [^3H] thymidine ที่ให้กับเซลล์ สามารถช่วยติดตามการสร้างดีเอ็นเอของเซลล์ได้โดยวัดปริมาณการนำ [^3H] thymidine ไปใช้ด้วยวิธี autoradiography จากนั้นคำนวณหา labeling index ซึ่งเป็นค่าดัชนีที่ได้จากสัดส่วนของเซลล์ที่ติดรังสี ค่านี้ใช้แทนเปอร์เซ็นต์เซลล์ในช่วงระยะ S ที่มีการนำ [^3H] thymidine เข้าเซลล์ และใช้ในการบอกการตอบสนองของประชากรเซลล์กับสารกระตุ้นพวก mitogen ได้ (กัลยาณี และ นวลอนงค์, 2548)

3.2 กลไกการควบคุมวัฏจักรเซลล์

ขั้นตอนต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์ถูกควบคุมโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ cyclin-dependent kinase (Cdk) และโปรตีน cyclin โดย cyclin เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในระยะอินเตอร์เฟส การเข้ารวมกันระหว่าง cyclin และ Cdk เรียกว่า Cdk-complex (CdkC) (Morgan, 1995) การควบคุมการเข้าสู่วัฏจักรเซลล์เรียกว่า restriction point เป็นการตรวจสอบเซลล์ให้พร้อมก่อนการแบ่งตัวของเซลล์ และในขั้นตอนระยะ G1, G2 และ M ของวัฏจักรเซลล์ ก็มีการตรวจสอบเช่นกันเรียกว่า cell cycle checkpoints ระบบควบคุมตรวจสอบดังกล่าวสามารถหยุด (arrest) เซลล์ที่ผิดปกติไว้ที่ระยะใดระยะหนึ่งของวัฏจักรเซลล์ จนกระทั่งได้รับการซ่อมแซมแก้ไขสารพันธุกรรมหรือสภาวะให้เป็นที่ปกติก่อนที่จะผ่านเข้าสู่ระยะถัดไป ถ้าความผิดปกติหรือความเสียหายของเซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมแก้ไขได้ ก็จะถูกนำเข้าสู่กระบวนการ program cell death โดยมีโปรตีนที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์อยู่ใน G1 checkpoint คือโปรตีน p53 ซึ่งเป็น tumor suppressor protein ทำหน้าที่ยับยั้งเซลล์ที่ผิดปกติไม่ให้ผ่านเข้าสู่ระยะ S แล้วทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis โปรตีน p53 เป็นโปรตีนที่เพิ่มขึ้นเมื่อดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย แล้วไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน p21 ที่ทำหน้าที่ในการยับยั้ง complex ของ Cdk 2/Cyclin E และ Cdk4,6/Cyclin D ที่มีบทบาทในการเร่งเซลล์ให้เข้าสู่ cell cycle ในเซลล์มะเร็งจะพบโปรตีน p53 เกิดการกลายแล้วไม่สามารถควบคุม cell cycle checkpoints ได้ ทำให้เซลล์ที่ผิดปกติสามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์มะเร็งได้ (ทรงยศ, 2551)

วัฏจักรเซลล์ถูกควบคุมด้วยการทำงานของโปรตีน cyclin และ เอนไซม์ cell dependent protein kinase (Cdk) ดังนั้นเอนไซม์ Cdk จะทำงานได้ต้องจับกับโปรตีน cyclin จากนั้นสารประกอบที่เกิดขึ้นระหว่าง cyclin และ Cdk จะร่วมกันทำหน้าที่ผลักดันกระบวนการควบคุมต่อไปโดยการเติมฟอสเฟต (phosphorylation) ให้แก่โปรตีนเป้าหมาย การจับกันของ cyclin และ Cdk ผลักดันให้เซลล์ก้าวสู่ระยะต่างๆ ในวัฏจักรเซลล์ โดยเมื่อผ่านระยะหนึ่งแล้ว Cdk ของระยะนั้นๆ จะกลับสู่สภาพ inactive เนื่องจากโปรตีน cyclin ในแต่ละระยะจะถูกทำลายไปในกระบวนการ degradation โดยเอนไซม์ proteasome (Darzynkiewicz *et al.*, 1996)

การที่เซลล์เข้าสู่กระบวนการแบ่งตัวถูกควบคุมโดยโปรตีนหลายชนิดซึ่งเปลี่ยนแปลงไปตามระยะต่างๆ ที่จุดเริ่มต้นระยะ G1 พบ transcription factor E2F จับกับโปรตีน Rb ซึ่งเป็นโปรตีนจาก tumor suppressor gene ทำให้การจำลองดีเอ็นเอไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เมื่อเซลล์สร้างโปรตีน cyclinD มากขึ้น โปรตีนนี้จะจับกับ Cdk4, 5 เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ในช่วงระยะ G1 ตอนกลางและตอนปลาย (G1 mid-late) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นต่อมา cyclinE/Cdk2 ร่วมกับ cyclinD/Cdk4, 6 กระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีน Rb ซึ่งทำให้โปรตีน Rb ปลดปล่อย E2F ให้หลุดออกมาเพื่อไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ transcription ทำให้เซลล์สร้างโปรตีนต่างๆ ที่จะใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ ในระยะ S cyclinE/Cdk2 ยังควบคุมการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์ โดยการสร้างโปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ Cdk4 เช่น โปรตีน p15, p16, p21 และ p57 เป็นต้น ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ควบคุมให้วัฏจักรเซลล์ชีวิตเซลล์ดำเนินไปตามปกติ หากโปรตีนเหล่านี้ทำงานไม่สมบูรณ์จะไม่สามารถควบคุมการแบ่งเซลล์ได้ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็ง การควบคุมการทำงานของ cyclinE/Cdk2 จะต่อเนื่องไปจนถึงระยะ S (Ford *et al.*, 2004)

ในระยะ S มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเกิดขึ้น cyclinA/Cdk2 จะควบคุมให้วัฏจักรเซลล์ดำเนินต่อไปจนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเสร็จสิ้นและถูกต้อง หากเกิดความผิดพลาดในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอถูกทำลายจะกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน p53 ซึ่งจะไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนที่ทำให้กระบวนการต่างๆ หยุดชั่วคราว เพื่อให้เซลล์ได้ซ่อมแซมดีเอ็นเอ หากมีความผิดพลาดมากหรือดีเอ็นเอถูกทำลายจนซ่อมไม่ได้ โปรตีน p53 จะชักนำให้เซลล์ตายโดยเข้าสู่กระบวนการ apoptosis (Stein and Pardee, 2004)

ในระยะ G2 เซลล์จะตรวจความพร้อมก่อนเข้าสู่ระยะ mitosis ช่วงแรกโปรตีน cyclinA ร่วมกับ Cdk2 กระตุ้นให้วัฏจักรเซลล์ดำเนินต่อไป ซึ่งการทำงานของ complex นี้ถูกยับยั้งได้ด้วยโปรตีน p21, p27 และ p57 ในช่วงท้ายของระยะนี้ cyclinB และ Cdk2 รวมกันเป็น maturation promoting factor (MPF) และจะถูกดึงฟอสเฟตออกด้วยเอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase) มีผลกระตุ้นให้วัฏจักรเซลล์ดำเนินไปในระยะ mitosis ทำให้เกิดการขดตัวของโครโมโซม การสลายของเยื่อหุ้มนิวเคลียส รวมทั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล (Stein and Pardee, 2004)

4. การตายแบบ apoptosis

การตายของเซลล์ แบบ apoptosis เป็นกลไกสำคัญที่ทำให้สัตว์หลายเซลล์สามารถควบคุมจำนวนเซลล์ในเนื้อเยื่อให้คงที่ การที่เซลล์เข้าสู่ apoptosis เนื่องจากเหตุผลดังต่อไปนี้ (1) เซลล์ถูกสร้างขึ้นมากเกินความจำเป็นในระหว่างที่มีการเจริญของตัวอ่อน (2) เซลล์สูญเสียหน้าที่หรือไม่มีความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ต่อไปในขณะที่เกิดเมตามอโฟซิส (3) เซลล์นั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงจนไม่สามารถซ่อมแซมได้ และเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ได้แก่ เซลล์ที่ได้รับอันตรายจากสารกัมมันตภาพรังสี (Kim and Aneas, 2002) เซลล์ที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต บี (UVB) จะทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลาย นิวคลีโอโซมมีการแตกหักเพิ่มมากขึ้น การติดเชื่อที่ก่อให้เกิดอันตรายกับสารพันธุกรรม เซลล์ที่มีอายุมากขึ้น หรือการเลี้ยงเซลล์หลาย ๆ passage มีผลทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis มากขึ้น การขาดสารที่จำเป็นต่อการเจริญ หรือปัจจัยจากภายใน ได้แก่ ภาวะ oxidative stress การทำงานอย่างผิดปกติของวัฏจักรเซลล์ โดยมีกลไกที่เกี่ยวข้อง คือ การแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ ลักษณะที่สำคัญคือ เซลล์หดตัว (cell shrink) โครมาทินอัดกันแน่น (chromatin condense) บริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียสและเยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นถุงเรียกว่า blebbing หรือ budding สุดท้ายเซลล์จะแตกและถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ เรียกว่า apoptotic body ซึ่งภายในมีโครมาทินที่อัดตัวแน่น และออร์แกเนลล์ต่าง ๆ แล้วสุดท้าย apoptotic body จะถูกกินโดย macrophage ในร่างกายได้ (Saikumar *et al.*, 1999) การตายแบบ apoptosis จึงไม่เกี่ยวข้องกับ การตอบสนองต่อการอักเสบ (inflammatory response)

การศึกษาการตายของเซลล์แบบ apoptosis นภาพร (2550) ศึกษาสารสกัดจากกากองุ่นและสารเรสเวอราทรอล (resveratrol) ต่อการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง พบว่ามีผลต่อการป้องกันของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane blebbing) การอัดแน่นของโครมาทิน และการแตกหักของดีเอ็นเอ ซึ่งสารเรสเวอราทรอลและสารสกัดจากองุ่นมีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็งในท่อน้ำดี สารสกัด

Cupressus lusitanica Mill. แสดงความเป็นพิษต่อ cell line โดยเซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis นอกจากนี้พบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจด้วย (Saraste and Kari, 2000) Yang *et al.* (2000) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด *Eugenia jambos* L. ด้วยอะซีโตน 70 เปอร์เซ็นต์ต่อ human leukemia cell (HL-60) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.8 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis

การตายแบบ apoptosis ถูกควบคุมโดยยีนหลายชนิด เช่น tumor suppressor gene คือ p53 และ Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10 (PTEN gene) และ oncogene คือ AKT และ BCL-2 เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีโมเลกุลที่เกี่ยวข้องหลายกลุ่ม เช่น กลุ่ม anti – apoptotic protein คือ Bcl-2 และ Bcl-X_L กลุ่ม apoptotic protein คือ Apaf-1 และ caspases เป็นต้น รวมทั้งไมโทคอนเดรียที่มีบทบาทในการหลั่งสารเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis เช่น cytochrome C และ apoptosis inducing factor (AIF) เป็นต้น การตายของเซลล์เกิดเมื่อมีการเชื่อมโยงสัญญาณภายในเซลล์ อาศัยเอนไซม์ caspase เป็นตัวกลาง และ pro- apoptotic protein เป็นตัวชักนำการตาย โดยมี anti – apoptotic protein เป็นตัวยับยั้งการตาย การเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis เกิดได้ 2 วิธีที่สัมพันธ์ต่อเนื่องกัน โดยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ effector caspases ที่ย่อยโปรตีนองค์ประกอบในเซลล์ต่างๆ เช่น actin, lamin A, ICAD/CAD, PARP, Rb, p27 และ p21 เป็นต้น ซึ่งนำไปสู่การตายแบบ apoptosis (ปกป้อง และคณะ, 2550) ดังนี้

1. Death receptor pathway เกี่ยวข้องกับการทำงานของ death receptor เป็นโปรตีนที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น Fas receptor (Fas R, Fas/CD95), Tumor necrosis factor receptor (TNFR) และ DR5 เป็นต้น วิธีนี้ถูกกระตุ้นด้วยการจับของลิแกนด์ (ligand) ที่จำเพาะ เช่น Fas ligand (FasL), Tumor necrosis factor - α (TNF- α) และ TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) เป็นต้น เกิดโครงสร้างที่ประกอบด้วย adaptor protein และ initiator caspase (procaspase 8 หรือ 10) เรียกว่า death – inducing signaling complexes (DISC) กระตุ้นให้ pro caspase เป็น initiator caspase ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้ effector caspases ทำงานและนำไปสู่การตายแบบ apoptosis

2. Mitochondria pathway เกี่ยวข้องกับการปล่อย cytochrome C ออกจากไมโทคอนเดรีย เกิดเมื่อมีการกระตุ้นจากสิ่งเร้า เช่น แสงอัลตราไวโอเล็ต รังสีแกมมา ภาวะ oxidative stress หรือการใช้ยาเคมีบำบัด เป็นต้น ที่ทำให้เกิดการเสียหายของดีเอ็นเอ ในสภาวะปกติเซลล์มีระบบ Mitochondria Outer membrane permeabilization (MOMP) ภายใต้การควบคุมของโปรตีนกลุ่ม

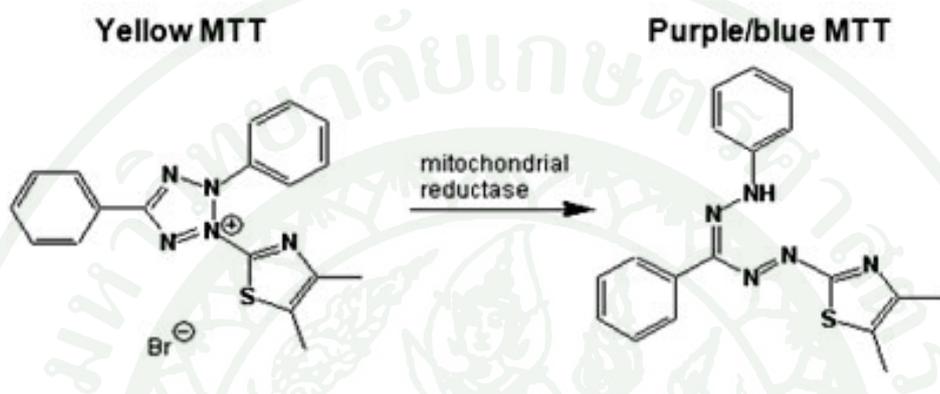
Bcl-2 ควบคุมไม่ให้สารผ่านออกมา เมื่อมีสิ่งกระตุ้นในสภาวะต่าง ๆ ทำให้เกิดการเสียดูดของ แคลเซียมไอออน ซึ่งจะรบกวน electrochemical gradient ทำให้ mitochondria permeability transition pore (PTP) เปิด จึงมีสารรั่วออกมามีผลทำให้ไมโทคอนเดรียบวม และเชื่อมุ่ภายนอกเกิด รอยร้าว ทำให้โปรตีน apoptogenic factor ได้แก่ cytochrome C, apoptosis-inducing factor (AIF), endonuclease G (Endo G), second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with a low iso-electric point (Smac/DIABLO) รั่วออกมาจากเชื่อมุ่ภายในหลังเข้าสู่ไซโทซอล โดย AIF และ Endo G จะส่งผ่านเข้าไปยังนิวเคลียสเพื่อเหนี่ยวนำให้โครมาทินหดตัว และดีเอ็นเอแตกหัก ซึ่งกระบวนการนี้ไม่ใช้พลังงาน ATP และไม่ขึ้นกับการทำงานของเอนไซม์ caspase ส่วน Smac/DIABLO มีหน้าที่ในการยับยั้ง X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAPs) เมื่อ cytochrom C หลังจากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโทซอลจะไปจับกับ apoptosis protein-activating factor 1 (Apaf-1) เกิดการไฮโดรไลซิสของ dATP/ATP ไปเป็น dADP/ADP ส่งผลให้เกิดการรวมกันของ cytochrome C, Apaf-1 และ procaspase-9 เป็นโครงสร้างเชิงซ้อนที่เรียกว่า apoptosome ทำให้ procaspase-9 สามารถแยกย่อยตัวเอง ให้เป็นเอนไซม์ที่พร้อมทำงานคือ caspase-9 และไปกระตุ้นให้ effector caspases ทำงาน และเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบ apoptosis Lopez *et al.* (2002) ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรจีน Yan Wei Kang Lui พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร และเหนี่ยวนำให้เกิด apoptotic pathway ใน cell line MGC-803 มีผลทำให้เชื่อมุ่ไมโทคอนเดรียเสียหาย เพิ่มการทำงานของโปรตีน Fas และ Bax (Li *et al.*, 2008)

5. วิธีการตรวจสอบ

5.1 Microtitration Assay (MTT Assay)

MTT Assay เป็นวิธีวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน โดยการบ่มเซลล์ที่มีการเจริญในช่วง log phase กับสารทดสอบที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยวัดการนำ (³⁵S) – methionine เข้าหรือความเข้มของสี MTT ลดลง โดย MTT เป็นสีข้อมสีเหลืองที่ละลายน้ำได้และสามารถเปลี่ยนเป็นตะกอนสีฟ้า formazan (ภาพที่ 6) โดยเซลล์มีชีวิต มีหลักการคือ เซลล์ที่มีการเจริญในช่วงการแบ่งตัวแบบทวีคูณ มีความเหมาะสมในการตรวจสอบฤทธิ์ของสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ช่วงระยะที่เซลล์สัมผัสสารพิษ คือเวลาที่ทำให้เกิดการทำลายสูงสุด ซึ่งอาจมาจากความเสถียรของสาร หลังจกนำสารทดสอบออก จะปล่อยให้เซลล์มีการเจริญ 2-3 ครั้ง โดยใส่อาหารที่มี MTT ในแต่ละหลุมแล้วบ่มในที่มืด เพื่อให้

เกิดความแตกต่างแยกออกจากกันได้ระหว่างเซลล์ที่ยังมีชีวิตและสามารถเจริญ กับเซลล์ที่ยังมีชีวิต แต่ไม่สามารถเจริญ จำนวนเซลล์ที่รอดสามารถบอกโดยทางอ้อมจากการลดลงของ MTT ซึ่งก็คือ ปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้น และเมื่อละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม ได้แก่ DMSO ก็จะสามารถ วัดปริมาณสีได้ด้วย spectrophotometer (กัลยาณี และ อรอนงค์, 2548)



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของ tetrazole เป็น formazan

ที่มา: Brescia and Banks (2009)

5.2 วิธีตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis

ทำได้หลายวิธีดังนี้

5.2.1 การตรวจรูปลักษณะ

เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะมีการหดตัว ผนังเซลล์โป่งพอง โครมาตินจับตัวแน่น และดีเอ็นเอหักเป็นท่อน ดังนั้นการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษารูปลักษณะจึงสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส และ โครงสร้างของ apoptotic body โดยการย้อมด้วยสี Haematoxylin และ Thionin การย้อมสีทั้งสองชนิดนี้ใช้กับตัวอย่างเนื้อเยื่อที่คงสภาพด้วย formaldehyde แล้วฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน นิวเคลียสของเซลล์จะติดสีฟ้า โครมาตินที่อัดกันแน่นจะติดสีค่อนข้างเข้ม เซลล์เพาะเลี้ยงสามารถย้อมนิวเคลียสด้วยสารเรืองแสงได้โดยไม่ต้องคงสภาพเซลล์ก่อน สารเรืองแสงที่นิยมใช้ ได้แก่ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Hoechst 33258, Hoechst 33342, acridine orange, ethidium bromide, propidium iodine สามารถจำแนกการ

ตายของเซลล์ได้จากการย้อมติดิสตีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่แตกต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ยอมให้สารเรืองแสงผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ การตรวจสอบด้วยวิธีนี้สามารถตรวจสอบการตายแบบ apoptosis ในระยะสุดท้ายได้ในเบื้องต้น (ปกป้อง และคณะ, 2550)

ในการจำแนกเซลล์ที่ตายแบบ necrosis ออกจาก apoptosis นั้น ทำได้โดยการย้อมด้วย Hoechst และ propidium iodide ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้ไม่ซึมผ่านเยื่อหุ้มของเซลล์ที่มีชีวิต แต่สามารถซึมผ่านเซลล์ที่ตายแบบ necrosis นอกจากนี้ Hoechst ยังสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ได้แล้วจะเข้าไปแทรกจับบริเวณ A – T rich ของดีเอ็นเอ แต่ propidium iodide ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ได้ สารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติเปล่งแสงในช่วงคลื่นที่ต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถวิเคราะห์การตายของเซลล์ว่าเป็นแบบ necrosis หรือ apoptosis (Vermes and Perger, 2000)

5.2.2 การย้อมด้วย Annexin V

ระยะแรกของการตายแบบ apoptosis จะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มเซลล์ ระยะนี้ propidium iodine ไม่สามารถผ่านได้เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ยังไม่สูญเสียคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน แต่หลังจากโครมาทินจับกันแน่นแล้ว Annexin V จะสามารถจับกับประจุลบของ phosphatidyl serine ได้ ดังนั้นหากเชื่อม Annexin V กับสารเรืองแสง สามารถตรวจสอบการตายแบบ apoptosis ได้โดยใช้ Flow cytometry และหากใช้ Annexin V กับสารเรืองแสงร่วมกับ propidium iodine สามารถแยกเซลล์ที่ตายแบบ necrosis และ apoptosis ออกจากกันได้ (Engeland *et al.*, 1998)

5.2.3 การแตกหักของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะถูกเอนไซม์ endogenous Ca^{2+} และ Mg^{2+} dependent nuclear endonuclease ตัดในตำแหน่งระหว่างนิวคลีโอโซม (linker DNA) ให้เป็นท่อนแบบ mononucleosome, oligonucleosome ในเซลล์โทมัสของหนูพบว่า endogenous endonuclease ตัดสายดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง linker ที่อยู่ระหว่างโปรตีนฮิสโตนบนโครโมโซม จึงได้ท่อนดีเอ็นเอที่พันอยู่กับโปรตีนฮิสโตนมีความยาวประมาณ 180 – 200 คู่เบส เรียกว่า apoptotic ladder นอกจากการแตกหักเป็นท่อนของดีเอ็นเอขนาด 180 – 200 คู่เบสแล้ว ยังพบการแตกหักเป็น

ท่อนขนาดใหญ่ประมาณ 50 – 300 กิโลเบสรวมด้วย (Wyllie *et al.*, 1999) ตรวจสอบได้โดยการแทรก modified nucleotides ที่ติดฉลาก (X-dUTP) โดย X เป็นส่วนที่ติดฉลาก ได้แก่ biotin, DIG หรือ สารเรืองแสง เข้ากับปลาย 3'OH termini ในสายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เอนไซม์ที่ใช้เติม X-dUTP nucleotide มี 2 ชนิด คือ (ปกป้อง และคณะ, 2550)

5.2.3.1 Terminal deoxynucleotidyl transferase (end labeling) เป็นการเติม X-dUTP ต่อเข้ากับสายทู่ของ double-strand DNA breaks โดยไม่ต้องใช้ template เรียกวิธีนี้ว่า terminal deoxynucleotide transferase (TdT)-mediated conjugated dUTP nick end-labeling (TUNEL)

5.2.3.2 DNA polymerase (nick translation) เป็นการเติม X-dUTP เข้ากับดีเอ็นเอแม่แบบ ที่ได้ถูก nicked เรียกวิธีนี้ว่า In situ nick translation (ISNT) สามารถตรวจ apoptotic DNA และ random fragmentation ของดีเอ็นเอได้

การตรวจ fragmented DNA เบื้องต้น ทำได้โดยวิธี Agarose gel electrophoresis การตรวจปริมาณของ fragmented DNA ของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ในเซลล์เดี่ยว (individual cell) โดยอาศัยการย้อมดีเอ็นเอภายในเซลล์โดยวิธี enzymatic labeling เช่น วิธี TUNEL enzymatic labeling assay หรือการย้อมดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสง เช่น วิธีการวัดปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์

5.2.4 Strand break labeling (TUNEL assay)

สายดีเอ็นเอของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะมีส่วนที่แตกขาดออกเป็นรอยแยก (nick) เนื่องจาก endonuclease ตัด การตรวจสอบทำได้โดยเติมสาร Bromodeoxyuridine (BrdU) หรือ digoxigenin – labeled nucleotide ให้กับส่วนปลายสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) สารที่ใช้เติมปลายสายดีเอ็นเอจะติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ได้แก่ streptavidin ซึ่งตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง flow cytometer

5.2.5 การตรวจวัดระดับเอนไซม์ caspase

หลักการคือ 7-amino-4-trifluoromethyl-coumarin (AFC) จะเชื่อมกับ DEVD, LETD หรือ LEHD tetrapeptide ซึ่งเป็นสารตั้งต้นจำเพาะของ caspase-3, -8 และ -9 ตามลำดับ ด้วยพันธะเปปไทด์ เมื่อ caspase-3, -8 และ -9 ทำงานจะย่อยสารประกอบเชิงซ้อนทำให้ AFC ถูกปลดปล่อยแล้วเรืองแสงซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณการทำงานของ caspase-3, -8 และ -9 (Song *et al.*, 2005)

นอกจากนี้มีการตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis จากการแสดงออกของ pro-apoptotic gene (p53) และ anti-apoptotic gene (Bcl-2) ด้วยวิธี Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยนำเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 4 ชนิด คือ BT474, HepG2, KATOIII และ SW620 และเซลล์ปกติ 2 ชนิด คือ CH-liver และ Hs27 ทดสอบกับสารแอซิติลเมโลโดรินอล (acetylmelodrinol) และเปลาโนทอล (plaunotol) ที่ความเข้มข้นที่ 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารแอซิติลเมโลโดรินอลมีฤทธิ์ทำให้ดีเอ็นเอของเซลล์ SW620 เกิดการแตกหักและการแสดงออกของยีน Bcl-2 ลดลง แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน p53 (พรทิษา, 2547)

5.2.6 วิธีการตรวจสอบปริมาณ mRNA

เมื่อเกิด apoptosis จะมีการสร้างสารชีวเคมีต่างๆ ที่ควบคุมการเกิด apoptosis เช่น Bcl-2, Bcl-XL, c-TAP-2, NAIP, XIAP, surviving, livin, β -catenin, COX-2 และ c-myc เป็นต้น การวิเคราะห์ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR เป็นวิธีที่สามารถใช้ศึกษาการเกิด apoptosis ได้ โดยสกัดอาร์เอ็นเอออกมาแล้วเปลี่ยนเป็น complementary DNA (cDNA) ด้วยเอนไซม์ Reverse transcriptase แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ซึ่งสามารถบ่งชี้การแสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดลงของยีนต่างๆ ที่ควบคุม apoptosis

5.3 การวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์โดยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี (Flow cytometry)

5.3.1 โฟลไซโทเมทรี

เป็นเทคนิคการตรวจนับหรือวัดลักษณะจำเพาะของอนุภาค (particle) หรือเซลล์ที่กำลังไหลผ่านลำแสงเป็นแถวเรียงเดียว โดยลักษณะที่สามารถนับหรือวัดได้โดยตรง คือ ขนาดของเซลล์ และการมีแกรนูลหรืออนุภาคภายในเซลล์ ส่วนลักษณะอื่น ได้แก่ surface marker และ intracellular marker ต้องใช้การย้อมด้วยสี ฟลูออเรสเซนซ์ หรือ อิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ จึงจะสามารถตรวจนับหรือวัดได้ ข้อจำกัดของ เซลล์หรืออนุภาคที่จะใช้เทคนิคโฟลไซโทเมทรีได้ ต้องเป็นอนุภาคอิสระ แขนงลอยอยู่ในของเหลวเท่านั้น ถ้าเป็นเนื้อเยื่อจะต้องทำให้แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ก่อน เครื่องมือที่ใช้ในเทคนิคนี้เรียกว่า Flow cytometer ประกอบด้วย (ยุทธนา, ม.ป.ป.)

1. Fluidic system มีหน้าที่สร้างกระแสการไหลของของเหลว หรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเซลล์หรืออนุภาคที่ต้องการจะตรวจนับหรือวัดแขวนลอยอยู่ โดยมีปั๊มที่ให้ positive pressure ลงไปทำให้เกิดการไหลของเซลล์เป็นแถวเรียงเดียว ผ่านช่องที่เรียกว่า flow cell หรือ flow chamber โดยใช้หลักการ hydrodynamic focussing ซึ่งจะมี sheath fluid ถูกปั๊มให้ไหลออกมาเป็นวงห่อหุ้มเซลล์ที่กำลังไหลด้วยความเร็วที่เท่า ๆ กัน บังคับให้เซลล์ไหลเป็นแถวเรียงเดียว ผ่านเข้าไปใน flow chamber ซึ่งเป็นที่ที่ลำแสงเลเซอร์ส่องมากระทบกับเซลล์ที่กำลังไหลผ่าน หลังจากนั้นทั้งหมดก็จะไหลไปยังถังน้ำทิ้ง (waste tank) ต่อไป

2. Optical system มีหน้าที่สร้างลำแสง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแสงเลเซอร์ เนื่องจากเป็น monochromatic และ high intensity เมื่อลำแสงนี้ส่องไปกระทบเซลล์ใน flow chamber จะเกิดการหักเหของแสง 2 แบบ คือ forward scatter (low angle) ซึ่งแปรผันตามขนาดของเซลล์ และ side scatter (high angle) แปรผันตาม granularity ของเซลล์นั้น ๆ นอกจากนี้ถ้าเซลล์ถูกย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ หรืออิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ก็จะเกิดการเรืองแสง

3. Detector system มีหน้าที่ตรวจรับสัญญาณแสงทั้ง forward scatter, side scatter และ fluorescent signal โดยมี photo-multiplier tubes หรือ light detectors ทำหน้าที่รับสัญญาณแสงแล้วแปลงไปเป็นสัญญาณไฟฟ้า

4. Data processing system มีหน้าที่รวบรวมสัญญาณไฟฟ้าที่ได้รับมาจาก detector system แล้วนำไปประมวลและเรียบเรียงให้เป็น histogram

5.3.2 หลักการของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี

ปริมาณดีเอ็นเอในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วงต่าง ๆ ของวัฏจักรเซลล์ โดยมีปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดในช่วง G2 และ M และมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยสุด ในช่วงหลังการแบ่งเซลล์หรือช่วง G1 แล้วค่อย ๆ เพิ่มปริมาณขึ้นในช่วงระยะ S สืบบางชนิด ได้แก่ ethidium bromide หรือ bisbenzimidate สามารถจับกับดีเอ็นเอแล้วเรืองแสงให้สีฟลูออเรสเซนซ์ตามปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้สามารถหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ในแต่ละระยะของการแบ่งเซลล์ และช่วงเวลาของเซลล์แต่ละระยะ ด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรีได้ การหาปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละเซลล์ เซลล์ที่ศึกษาจะถูกย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอ ปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอในแต่ละเซลล์จะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อปริมาณดีเอ็นเอในเซลล์ ปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอมี 3 ลักษณะคือ เซลล์ในระยะ G0/G1 ไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีการติดสีฟลูออเรสเซนซ์เป็น 1 arbitrary unit (2C) เซลล์ในระยะ S เริ่มมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขึ้น มีการติดสีฟลูออเรสเซนซ์เป็น intermediate คืออยู่ระหว่าง 1 arbitrary unit และ 2 arbitrary unit และเซลล์ในระยะ G2/M มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป็น 2 เท่า มีการติดสีฟลูออเรสเซนซ์เป็น 2 arbitrary unit (4C) (Crissman and Steinkamp, 1993)

สีฟลูออเรสเซนซ์ที่นิยมใช้ย้อมเซลล์มีหลายชนิด ได้แก่ propidium iodide (PI) ทำงานโดยการเข้าจับกับ major groove ของ double-stranded DNA ให้สีฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นแสง 617 นาโนเมตร ซึ่งเป็นสีแดง PI ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีชีวิตได้ ดังนั้นจึงใช้ย้อมเพื่อแยกเซลล์ที่ไม่มีชีวิต (Anonymous, 1999) และย้อมไม่ติดสีของอาร์เอ็นเอ (ปกป้อง และคณะ, 2550) acridine orange (AO) ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอพร้อมกัน โดยโมเลกุลของสีมีประจุบวกทำให้สามารถแทรกอยู่ระหว่างเบสในดีเอ็นเอ AO สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ดีเอ็นเอในนิวเคลียสจะย้อมติดสีเขียว (ปกป้อง และคณะ, 2550) ให้สีฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นแสง 525 นาโนเมตรและอาร์เอ็นเอในไซโทพลาซึมติดสีแดงส้มให้สีฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นแสงมากกว่า 630 นาโนเมตร (Darzynkiewicz, 1990; 1992) Hoechst 33342 สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตได้ย้อมดีเอ็นเอติดสีฟ้าส่วนอาร์เอ็นเอไม่ติดสี ส่วน Hoechst 33258 สามารถแพร่ผ่านเฉพาะเซลล์ที่ไม่มีชีวิตเท่านั้นย้อมดีเอ็นเอติดสีฟ้าและอาร์เอ็นเอ

ไม่ติดสีเช่นเดียวกัน (ปกป้อง และคณะ, 2550) DAPI (4, 6-Diamidino-2-phenylindole) สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่ไม่มีชีวิตเท่านั้น ย้อมดีเอ็นเอติดสีฟอสฟอรัสส่วนอาร์เอ็นเอไม่ติดสี (ปกป้อง และคณะ, 2550) DAPI จะจับกับ AT-rich region ของดีเอ็นเอสามารถให้สีฟลูออเรสเซนส์ที่ความยาวคลื่นแสง 459 นาโนเมตร ethidium bromide สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่ไม่มีชีวิตเท่านั้น ย้อมดีเอ็นเอติดสีส่วนอาร์เอ็นเอติดสีค่อนข้างแดง การนำวิธีการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอมาใช้ในการวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน แต่มีข้อด้อยคือ ไม่สามารถตรวจสอบกลไกการทำงานในวัฏจักรเซลล์ได้ (โกวิทย์, 2539; Gong *et al.*, 1993)

การศึกษาวัฏจักรเซลล์โดยเทคนิคฟลูออโรมิเตอร์ เพื่อศึกษาผลของสัคตจากพืชและสารเคมีที่มีต่อเซลล์ ซึ่งสารแต่ละชนิดมีผลต่อเซลล์ในระยะแตกต่างกันไปดังนี้

berberine สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง และเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 โดยยับยั้งการทำงานของ cyclin D1, D2 และ E และ Cdk2, Cdk4 และ Cdk6 แต่กระตุ้นการแสดงออกของ Cdk inhibitors (Cip1/p21 และ Kip1/p27) แล้วเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis โดยกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Bax/Bcl-2 ทำให้เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียเสียหาย กระตุ้นการทำงานของโปรตีน caspase-9, caspase-3 และ poly (ADP-ribose) polymerase มีการทดลองพบว่า berberine ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ androgen-insensitive (DU 145, PC 3) และ androgen-sensitive (LNCaP) prostate cancer cell ที่เวลา 48 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เซลล์ DU 145 เข้าสู่ระยะ G0/G1 คิดเป็น 52, 59 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน berberine ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ PC 3 เข้าสู่ระยะ G2/M ที่เวลา 24 ชั่วโมง berberine ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลต่อลิตร ไม่เหนี่ยวนำให้ PWR-1E ซึ่งเป็น normal cell line เปลี่ยนแปลง ส่วนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลต่อลิตร เหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (Mantena *et al.*, 2006) การทดลองของ Lin *et al.* (2006) รายงานว่า berberine ความเข้มข้น 25-200 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ และสามารถเหนี่ยวนำให้ human gastric carcinomar SNU-5 cell เข้าสู่ระยะ G2/M ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีผลทำให้โปรตีน p53, Wee1 และ Cdk1 เพิ่มขึ้น ส่วนโปรตีน cyclin B ลดลง และทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น โดยกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Bax ลดการทำงานของ โปรตีน Bcl-2 ทำให้เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียเสียหาย มีการปลดปล่อย cytochrome C ออกมายังไซโทพลาซึม และกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 ทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis Mantena *et al.* (2006) พบว่า berberine ความเข้มข้น 5-75 ไมโคร

โมลต่อลิตร สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ human epidermal carcinoma A431 cell และเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 ที่ความเข้มข้น 15, 25, 50 และ 75 ไมโครโมลต่อลิตร คิดเป็น 59.3, 65.2, 68.9 และ 71.01 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง และทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis 31-60 เปอร์เซ็นต์ การทดลองของ Hwang (2005) พบว่า berberine ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร ทำให้ HepG2 cell ตายแบบ apoptosis เกิดดีเอ็นเอแตกหัก berberine จากพืชสมุนไพร ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเหนี่ยวนำให้ leukemia HL-60 cell เปลี่ยนแปลงรูปร่าง ดีเอ็นเอแตกหัก มีวัฏจักรเซลล์ช้าประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เซลล์ที่เข้าสู่ระยะ S มีจำนวนลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และ berberine เข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ในระยะ G2/M (Yang *et al.*, 1996) ดังนั้นในการทดลองที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่า berberine สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 และทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 25 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 ได้ และพบว่าที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์เพิ่มขึ้น

ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดบัวบกซึ่งลดการแบ่งเซลล์มะเร็งอย่างแปรผันตรงตามความเข้มข้นและเวลาอย่างมีนัยสำคัญ กลไกการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เกิดขึ้นผ่านทางการหยุดวัฏจักรของเซลล์ ซึ่งสารสกัดบัวบกเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งชนิด Caco-2 หยุดการเจริญไว้ที่ระยะ S และระยะ G2-M และพบเซลล์ตาย โดยสารสกัดบัวบกเพิ่มการสะสมโปรตีน cyclin B1 ภายในเซลล์ (Bunpo *et al.*, 2005) สาร polyphenolic จากน้ำยางของผลมะเดื่อ (fig fruit latex) ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด human glioblastoma, hepatocellular carcinoma และเซลล์ตับ ทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น มีวัฏจักรเซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 ส่วนในระยะ S และ G2/M มีจำนวนเซลล์ลดลง (Wang *et al.*, 2008)

colchicine เป็นสารที่ได้จากพืชในวงศ์ Colchicum มีฤทธิ์ในการทำลายไมโครทิวบูล ซึ่ง colchicine จะจับกับทิวบูลินซึ่งเป็นโปรตีนหลักของไมโครทิวบูลและทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ G2/M สารเคมีนี้ส่งเสริมการทำงานช่วง tubulin depolymerization มีผลยับยั้งกระบวนการเกิดระยะ mitosis ของเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ (Salmon *et al.*, 1984)

สาร isoliquiritigenin (ISL) ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ human hepatoma cell และทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M คิดเป็น 33.6 เปอร์เซ็นต์ ที่

เวลา 24 ชั่วโมง มีกลไกกระตุ้นการทำงานของโปรตีน p53, p21/WAF, Fas/APO-1 receptor, Fas ligand, Bax และ NOXA และทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis (Hsu *et al.*, 2005)



อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเซลล์และสารสกัดแอสเอ็ม

1.1 วิธีการเตรียม keratinocyte stem cell

เตรียม keratinocyte stem cell ของมนุษย์โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 4×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/F 12 (Gibco) ที่มี fetal bovine serum (Gibco) 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วเลี้ยงในภาชนะตามความเหมาะสมของแต่ละการทดลอง นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์นาน 48 ชั่วโมง ตรงกับ log phase พอดี (กัลยาณี และอรอนงค์, 2548) หรือครบ 48 ชั่วโมงแล้วรอเซลล์เข้าสู่ log phase ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการทดสอบสาร

1.2 การเตรียมสารสกัดแอสเอ็ม

สารสกัดแอสเอ็มในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. ฤทธิ วัฒนชัยยิ่งเจริญ สาขาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ การเตรียมมีขั้นตอนดังนี้ ตัดลำต้นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมาต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองแยกกากออกจากตัวทำละลายเอาเฉพาะส่วนใส แล้วนำสารสกัดน้ำไประเหยน้ำออกให้แห้ง ซึ่งน้ำหนักรสที่ได้บันทึกผลเก็บผงสารสกัดในภาชนะแห้ง ปิดสนิท ทึบแสง และควบคุมความชื้น ในการทดสอบเตรียมสารสกัดแอสเอ็มที่ระดับความเข้มข้น 0, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การตรวจสอบการตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแอสเอ็ม โดยวิธี MTT assay

2.1 วิธีการทดสอบ

เลี้ยง keratinocyte stem cell ใน 96 well plate จำนวนเซลล์ 4×10^5 เซลล์ต่อหลุม ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F 12 ซึ่งประกอบด้วย fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์และสารสกัดแอสเอ็มที่ระดับความเข้มข้น 0, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งหลุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัดแอสเอ็ม ให้เป็น

กลุ่มควบคุม แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ซ้ำ นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

2.2 การตรวจหาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต

เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบชั่วโมงที่ 24, 48 และ 72 แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์โดยดูดอาหารเดิมออก เติมน้ำละลาย phosphate buffer saline (PBS, NaCl 2 กรัม KCl 0.048 กรัม Na₂HPO₄ 0.112 กรัม KH₂PO₄ 0.048 กรัม) ที่มี penicillin+ streptomycin 2 มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อล้างสารอาหารเดิมและสิ่งสกปรกออกจากเซลล์ แล้วเติม DMEM/F12 ที่ไม่มี fetal bovine serum ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำ dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ 570 นาโนเมตร บันทึกผลการอ่านค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง microplate reader (ELISA Spectra 250) แล้วแปลผลเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมดังสูตร

$$\frac{\text{OD ที่ทดสอบ}}{\text{OD กลุ่มควบคุม}} \times 100$$

3. การตรวจสอบการตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแอสม์ โดยวิธีการย้อมด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342

3.1 วิธีการทดสอบสารสกัด

เลี้ยง keratinocyte stem cell โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 4×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 75 ตารางเซนติเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เมื่อเซลล์เจริญในช่วง log phase ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F 12 ซึ่งประกอบด้วย fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์และสารสกัดแอสม์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จานที่ไม่ได้ใส่สารสกัดแอสม์ให้เป็นกลุ่มควบคุม โดยแบ่งการทดลอง

ออกเป็น 3 ชั่วโมง นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

3.2 การตรวจหาการตายของเซลล์

เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบชั่วโมงที่ 24, 48 และ 72 เก็บเกี่ยวเซลล์โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก เติม trypsin 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในงานเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที หลังจากนั้นดูดเซลล์ที่หลุดออกมาใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 2,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเพาะเลี้ยง แล้วดูดเอาส่วนใสตอนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน จากนั้นเติมสารละลาย PBS ที่มี penicillin+ streptomycin ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเบาๆ บนเครื่องเขย่า (vortex) เพื่อให้ตะกอนกระจายไม่จับเป็นก้อน ต่อมาย้อมเซลล์ keratinocyte stem cell โดยเติม propidium iodide (Sigma cat no. 4170) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ Hoechst 33342 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางใน PBS ที่มี penicillin+ streptomycin ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พร้อมกับเขย่าแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยเซลล์ที่ตายนิวเคลียสจะติดสีแดงของ propidium iodide และเซลล์ที่ยังมีชีวิตนิวเคลียสติดสีน้ำเงินของ Hoechst 33342 โดยนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 4,568 เซลล์ แล้วแปลผลเป็นเปอร์เซ็นต์

4. การตรวจสอบการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดเห็บ

4.1 วิธีการทดสอบสารสกัด

เตรียมวิธีเดียวกับข้อ 3.1

4.2 วิธีการตรวจสอบการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ

เมื่อเลี้ยงเซลล์จำนวน 4×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ครบชั่วโมงที่ 24, 48 และ 72 แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก เติม trypsin 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในงานเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที

หลังจากนั้นดูดเซลล์ที่หลุดลอกออกมาใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยกที่ความเร็ว 2,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเพาะเลี้ยง แล้วดูดเอาน้ำส่วนใสตอนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน จากนั้นเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเบา ๆ บนเครื่องเขย่า เพื่อให้ตะกอนกระจายไม่จับเป็นก้อน ต่อมาข้อมเซลล์โดยเติม acridine orange (Sigma) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางใน PBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พร้อมกับเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยเซลล์ที่มีดีเอ็นเอปกติจะเห็นนิวเคลียสติดสีเขียว ขณะที่เซลล์ที่มีการเสียหายของดีเอ็นเอจะติดสีแดง โดยนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 3,247 เซลล์ แล้วแปลผลเป็นเปอร์เซ็นต์

5. การตรวจสอบการตายแบบ apoptosis ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแอม

5.1 วิธีการทดสอบสารสกัด

เตรียมวิธีเดียวกับข้อ 3.1

5.2 วิธีการตรวจสอบเซลล์ตายแบบ apoptosis

เมื่อเลี้ยงเซลล์จำนวน 4×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ครบชั่วโมงที่ 24, 48 และ 72 แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก เติม trypsin 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที หลังจากนั้นดูดเซลล์ที่หลุดลอกออกมาใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยกที่ความเร็ว 2,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยง แล้วดูดเอาน้ำส่วนใสตอนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน จากนั้นเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเบา ๆ บนเครื่องเขย่า เพื่อให้ตะกอนกระจายไม่จับเป็นก้อน ต่อมาข้อมเซลล์ keratinocyte โดยเติม Hoechst 33342 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางใน PBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พร้อมกับเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis จะมีการหดตัวของนิวเคลียส (nuclear condensation) โดยนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 1,238 เซลล์ แล้วแปลผลเป็นเปอร์เซ็นต์

6. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัด แอม

6.1 วิธีการทดสอบสารสกัด

เตรียมวิธีเดียวกับข้อ 3.1

6.2 วิธีเก็บเกี่ยวเซลล์

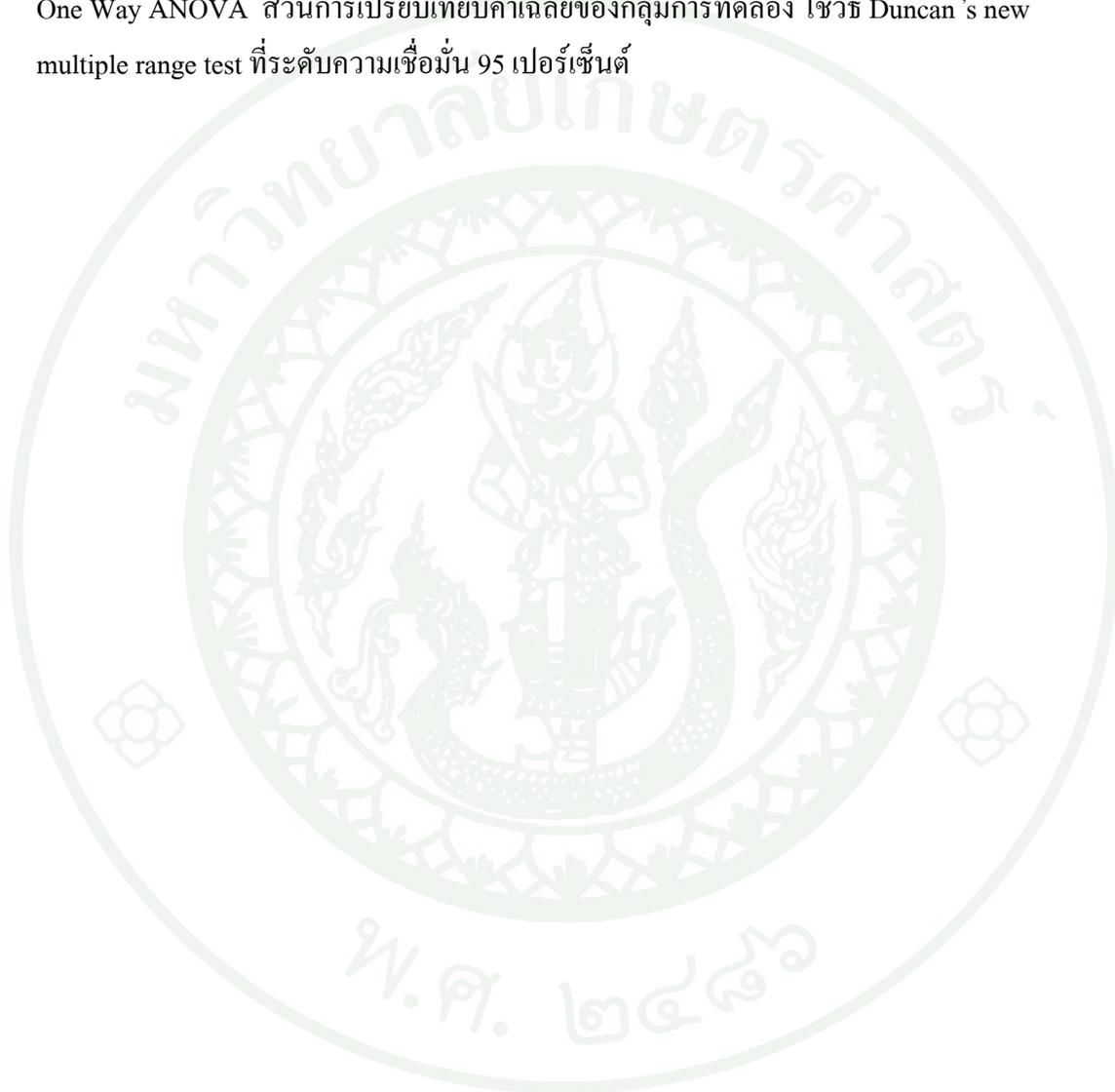
เมื่อเลี้ยงเซลล์จำนวน 4×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ครบชั่วโมงที่ 24, 48 และ 72 แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก เติม trypsin 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที หลังจากนั้นดูดเซลล์ที่หลุดลอกออกมาใส่หลอด นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยกนาน 5 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยง แล้วดูดเอาน้ำส่วนใสตอนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน จากนั้นเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างคราบอาหารและสิ่งสกปรกออกจากเซลล์ นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยกที่ความเร็ว 2,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอาน้ำส่วนใสตอนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมสารละลาย PBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าเซลล์ให้กระจาย แล้วเติมเมทานอล ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาต่อไป

6.3 วิธีศึกษาการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์

นำเซลล์ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นแยกที่ความเร็ว 2,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากสารละลาย แล้วดูดเอาน้ำส่วนใสตอนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน หลังจากนั้นเติมสารละลาย PBS เพื่อล้างเซลล์ แล้วเติม RNase (Invitrogen, U.S.A.) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วเติม propidium iodide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มต่อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นกรองเซลล์ โดยใช้ตาข่ายไนลอนขนาด 40 ไมโครเมตร (Spectrum, Los Angeles, CA) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA)

7. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบการตายของ keratinocyte stem cell การเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ การตายของเซลล์แบบ apoptosis และการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดแสม โดยใช้วิธี One Way ANOVA ส่วนการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มการทดลอง ใช้วิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ผลและวิจารณ์

ผล

1. การตรวจสอบการตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแอสเม โดยวิธี

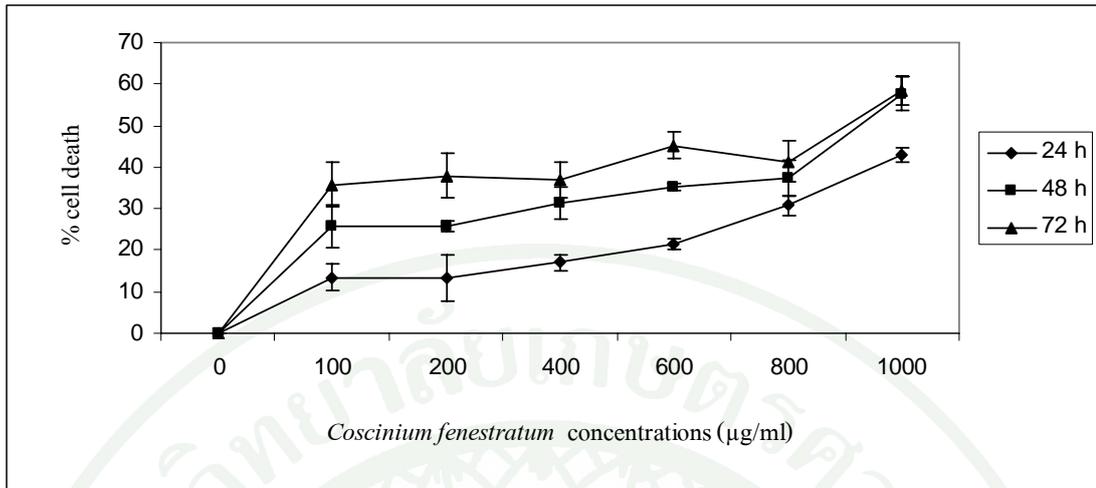
MTT assay

ผลการตรวจสอบการตายของ keratinocyte stem cell โดยวิธี MTT assay หลังจากได้รับสารสกัดแอสเมที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า keratinocyte stem cell ที่ได้รับสารสกัดแอสเมทุกระดับความเข้มข้น นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 7

ตารางที่ 2 การตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแอสเมที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยวิธี MTT assay (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
0	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
100	13.43 \pm 3.31 ^b	25.75 \pm 5.31 ^b	35.83 \pm 5.27 ^b
200	13.30 \pm 5.42 ^b	25.74 \pm 1.14 ^b	37.91 \pm 5.25 ^{b,c}
400	17.01 \pm 2.08 ^{b,c}	31.43 \pm 3.87 ^{b,c}	36.95 \pm 4.30 ^{b,c}
600	21.48 \pm 1.09 ^c	35.16 \pm 0.79 ^c	45.30 \pm 3.13 ^c
800	30.86 \pm 2.37 ^d	37.50 \pm 4.32 ^c	41.43 \pm 4.87 ^{b,c}
1,000	42.90 \pm 1.80 ^c	57.62 \pm 4.05 ^d	58.36 \pm 3.37 ^d

หมายเหตุ a, b, c, d, e แสดงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้นในช่วงเวลาเดียวกัน



ภาพที่ 7 การตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแห้งที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยวิธี MTT assay

จากการทดลองหาค่า IC_{50} ของสารสกัดแห้งต่อ keratinocyte stem cell ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 800-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

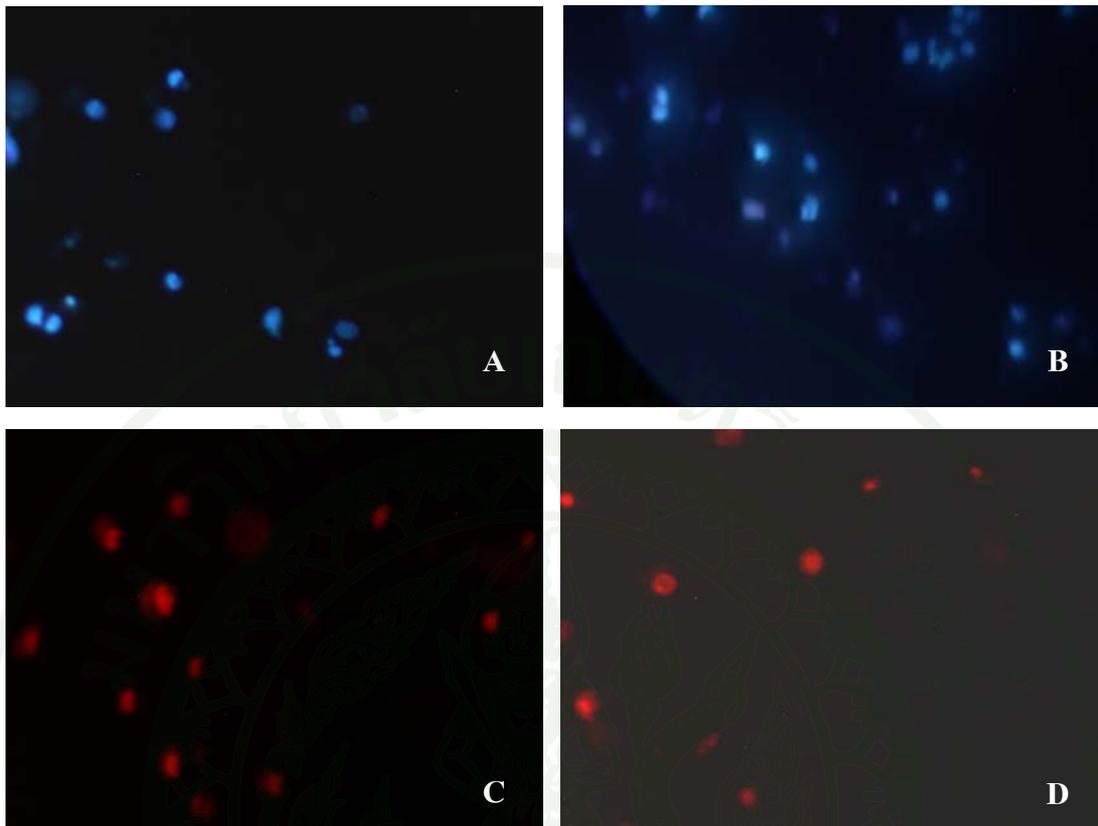
2. การตรวจสอบการตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแอมป์ โดยการย้อมด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342

ผลการตรวจสอบการตาย ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแอมป์ ที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342 (ภาพที่ 8) พบว่า keratinocyte stem cell ที่ได้รับสารสกัดแอมป์ทุกระดับความเข้มข้น นาน 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ระดับความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ที่ได้รับสารสกัดแอมป์ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่เซลล์ที่ได้รับสารสกัดแอมป์ที่ระดับความเข้มข้น 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงกว่ากลุ่มควบคุม เซลล์ที่ได้รับสารสกัดแอมป์ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 200 ขึ้นไป นาน 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงกว่ากลุ่มควบคุม และมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 9

ตารางที่ 3 การตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแอมป์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยการย้อมด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342 (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

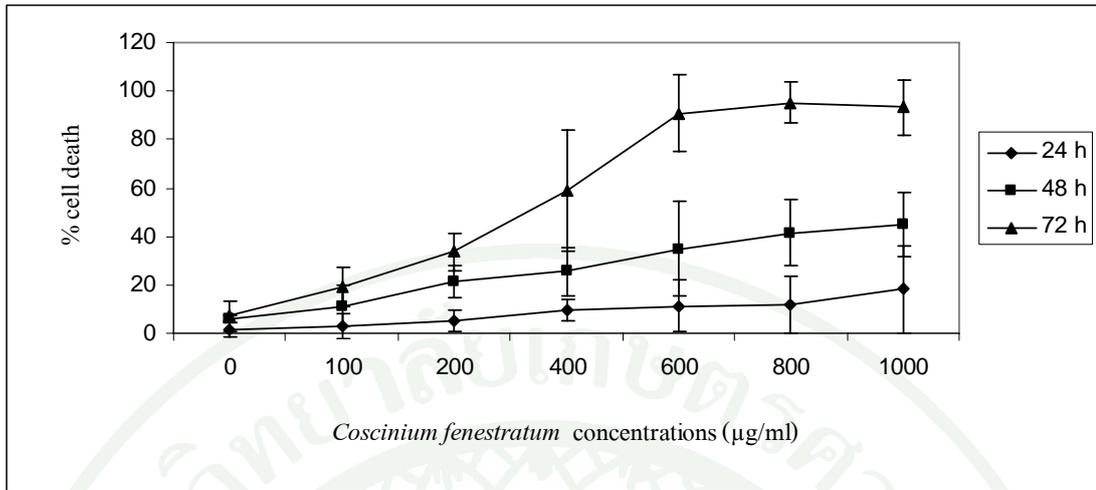
ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
0	1.70 \pm 2.95	5.56 \pm 1.47 ^a	7.03 \pm 6.15 ^a
100	2.96 \pm 5.12	11.12 \pm 8.43 ^a	18.88 \pm 8.03 ^{a,b}
200	5.01 \pm 4.35	21.42 \pm 6.66 ^{a,b}	33.50 \pm 7.82 ^b
400	9.34 \pm 4.44	25.53 \pm 9.83 ^{a,b,c}	59.16 \pm 25.04 ^c
600	11.38 \pm 10.47	34.81 \pm 19.34 ^{b,c}	90.75 \pm 16.00 ^d
800	11.78 \pm 11.44	41.48 \pm 13.51 ^{b,c}	95.23 \pm 8.25 ^d
1,000	18.22 \pm 18.02	44.99 \pm 13.04 ^c	93.33 \pm 11.54 ^d

หมายเหตุ a, b, c, d แสดงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้นในช่วงเวลาเดียวกัน



ภาพที่ 8 Keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดเห็บที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน (propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342, 400X)

- A. เซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็บ เซลล์มีชีวิต นิวเคลียสติดสีน้ำเงินของ Hoechst 33342
- B. เซลล์ที่ได้รับสารสกัดเห็บความเข้มข้น 600 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 24 ชั่วโมง เซลล์ที่มีชีวิตนิวเคลียสติดสีน้ำเงินของ Hoechst 33342
- C. เซลล์ที่ได้รับสารสกัดเห็บความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 72 ชั่วโมง เซลล์ที่ตายนิวเคลียสติดสีแดงของ propidium iodide
- D. เซลล์ที่ได้รับสารสกัดเห็บความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 72 ชั่วโมง เซลล์ที่ตายนิวเคลียสติดสีแดงของ propidium iodide



ภาพที่ 9 การตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแห้งที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการย้อมด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342

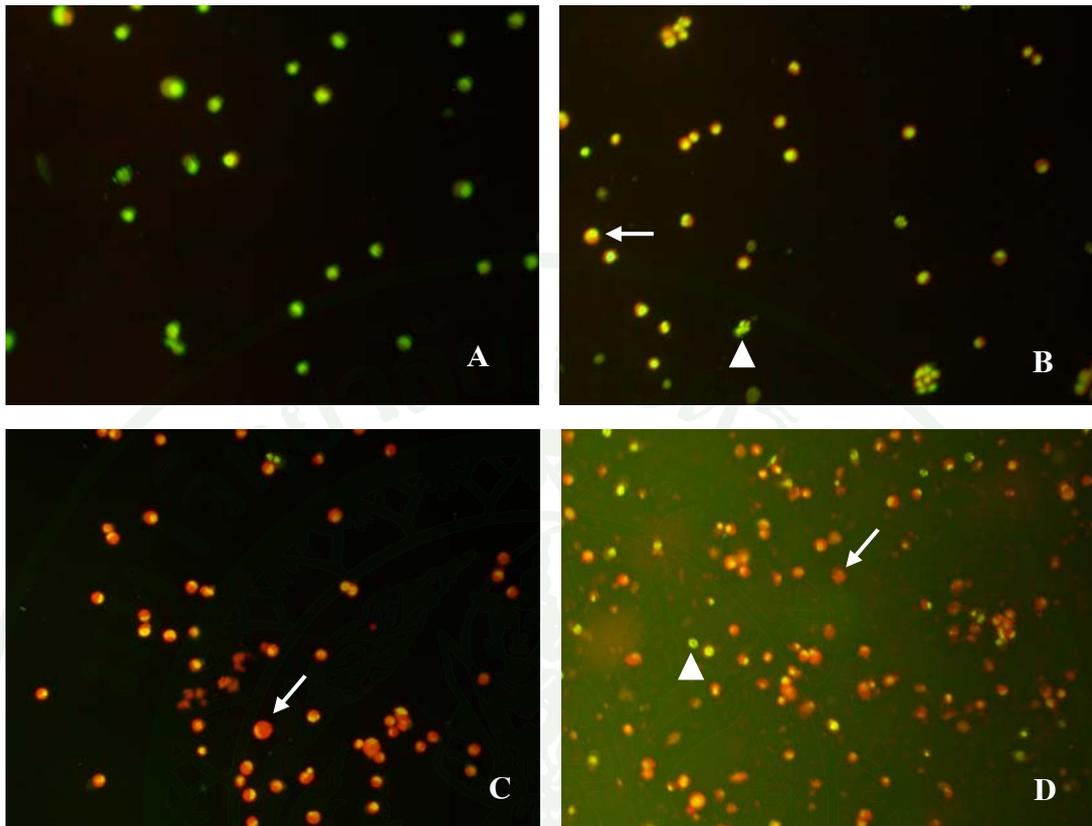
3. การตรวจสอบการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแฮ้ม

ผลการตรวจสอบการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแฮ้ม ที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยย้อมเซลล์ด้วย acridine orange (ภาพที่ 10) พบว่า keratinocyte stem cell ที่ได้รับสารสกัดแฮ้มระดับความเข้มข้น 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 และ 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอสูงกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนเซลล์ที่ได้รับสารสกัดแฮ้มที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป นาน 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอสูงกว่ากลุ่มควบคุม และมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 11

ตารางที่ 4 การเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแฮ้มที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยการย้อมย้อมเซลล์ด้วย acridine orange (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

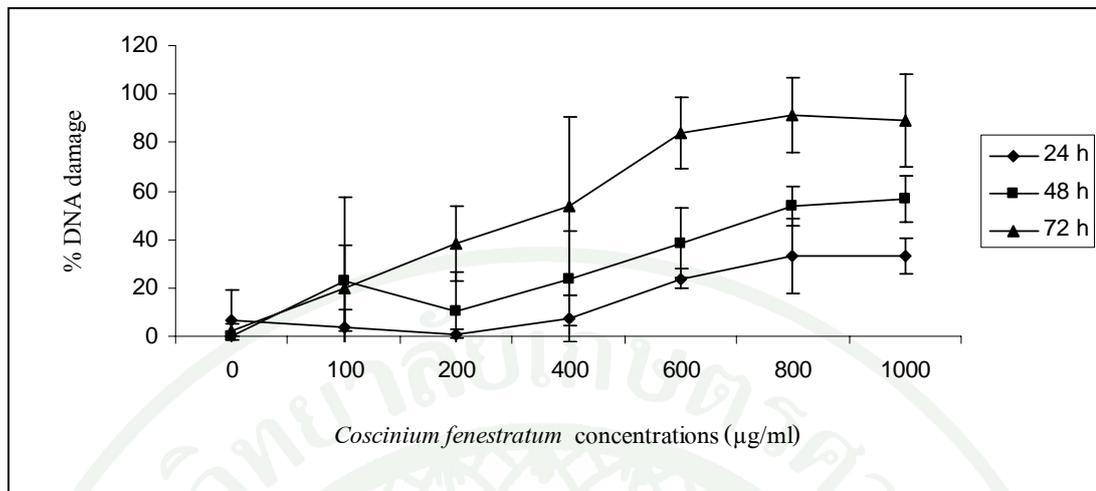
ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
0	6.94 \pm 12.02 ^{a,b}	0.00 ^a	1.96 \pm 3.39 ^a
100	3.92 \pm 6.78 ^a	22.91 \pm 34.42 ^{a,b,c}	19.90 \pm 17.95 ^{a,b}
200	1.01 \pm 1.74 ^a	10.38 \pm 15.80 ^{a,b}	38.50 \pm 15.49 ^b
400	7.66 \pm 9.61 ^{a,b}	23.91 \pm 19.25 ^{a,b,c,d}	53.16 \pm 37.05 ^{b,c}
600	23.80 \pm 4.19 ^{b,c}	38.63 \pm 14.60 ^{a,b,c,d}	83.80 \pm 14.66 ^c
800	33.12 \pm 15.63 ^c	53.85 \pm 8.23 ^{b,c,d}	91.11 \pm 15.39 ^c
1,000	33.23 \pm 7.50 ^c	56.85 \pm 9.40 ^d	88.89 \pm 19.24 ^c

หมายเหตุ a, b, c, d แสดงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้นในช่วงเวลาเดียวกัน



ภาพที่ 10 Keratinocyte stem cell ที่ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย หลังจากได้รับสารสกัดแฮมที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน (acridine orange, 200X)

- A. เซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดแฮม ดีเอ็นเอปกติ นิวเคลียสติดสีเขียว
- B. เซลล์ที่ได้รับสารสกัดแฮมที่ความเข้มข้น 600 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 48 ชั่วโมง ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายเล็กน้อย นิวเคลียสติดสีแดง (ลูกศร) และดีเอ็นเอปกติ นิวเคลียสติดสีเขียว (หัวลูกศร)
- C. เซลล์ที่ได้รับสารสกัดแฮมที่ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 72 ชั่วโมง ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย นิวเคลียสติดสีแดง (ลูกศร)
- D. เซลล์ที่ได้รับสารสกัดแฮมที่ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 72 ชั่วโมง ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย นิวเคลียสติดสีแดง (ลูกศร) และดีเอ็นเอปกติ นิวเคลียสติดสีเขียว (หัวลูกศร)



ภาพที่ 11 การเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัด
 แห้วที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยการย้อม
 ด้วย acridine orange

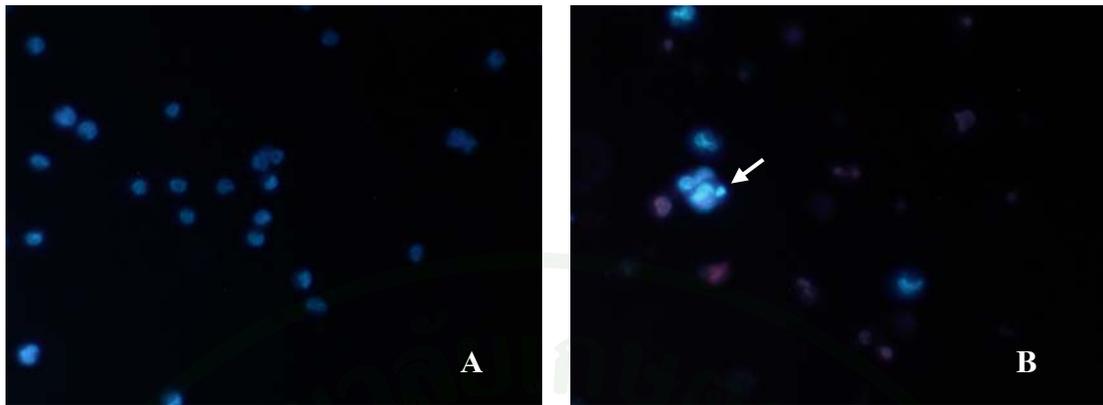
4. การตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแอม

ผลการตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแอม ที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยย้อมเซลล์ด้วย Hoechst 33342 (ภาพที่ 12) พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดแอมทุกระดับความเข้มข้น นาน 24 และ 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์แบบ apoptosis ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่เซลล์ที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์แบบ apoptosis สูงกว่ากลุ่มควบคุม และมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 13

ตารางที่ 5 การตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแอมที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์แบบ apoptosis		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
0	0.00	0.00	0.00 ^a
100	0.00	0.00	0.00 ^a
200	0.00	1.33 \pm 2.30	2.77 \pm 4.80 ^{a,b}
400	0.00	0.00	1.66 \pm 2.88 ^{a,b}
600	0.00	0.00	0.00 ^a
800	0.00	0.00	6.63 \pm 1.07 ^b
1,000	3.33 \pm 5.77	0.00	12.87 \pm 4.64 ^c

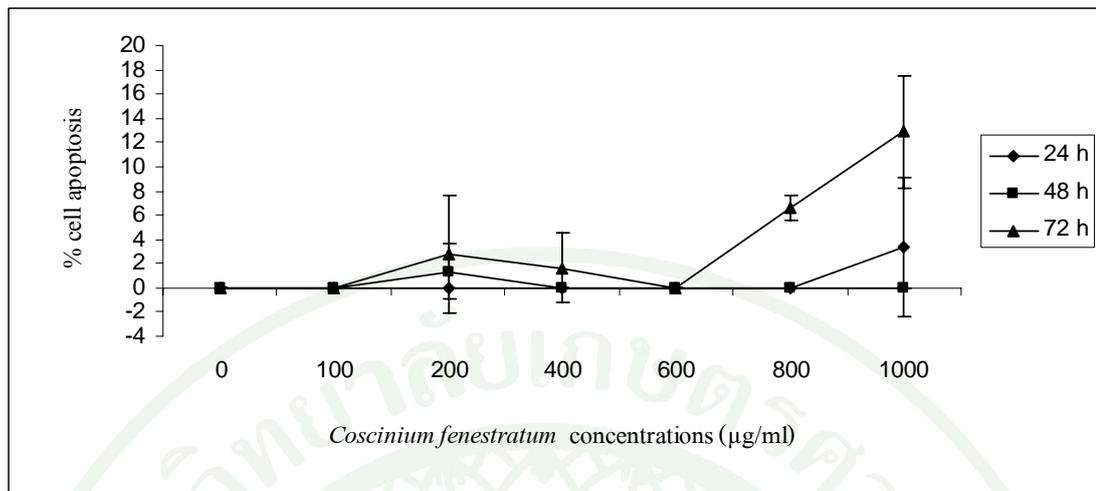
หมายเหตุ a, b, c แสดงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้นในช่วงเวลาเดียวกัน



ภาพที่ 12 Keratinocyte stem cell ตายแบบ apoptosis หลังจากได้รับสารสกัดแอมที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (Hoechst 33342, 400X)

A. เซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดแอม เซลล์ไม่ตาย ไม่มีการหดตัวของนิวเคลียส

B. เซลล์ที่ได้รับสารสกัดแอมความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 72 ชั่วโมง ตายแบบ apoptosis เกิด apoptotic bodies (ลูกศร) มีการหดตัวของนิวเคลียส



ภาพที่ 13 การตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัด
 แสมที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยการย้อมด้วย
 Hoechst 33342

5. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัด แฮม

ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ของ keratinocyte stem cell ครั้งนี้ไม่นำเซลล์ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาตรวจสอบ เนื่องจากสารสกัดแฮมที่ความเข้มข้นสูง ทำให้เซลล์ตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแฮมที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Flow cytometry พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดแฮมทุกระดับความเข้มข้นนาน 24 ชั่วโมง เกิดการตายแบบ apoptosis และเข้าสู่ระยะ GO/G1 ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนเซลล์ที่ได้รับสารสกัดระดับความเข้มข้น 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเข้าสู่ระยะ S น้อยกว่ากลุ่มควบคุม และเซลล์ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเข้าสู่ระยะ G2/M มากกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 ดังแสดงในตาราง 6

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแฮมที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 24 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง			
	Apoptosis	GO/G1	S	G2/M
0	1.07 \pm 0.75	70.83 \pm 3.01 ^{a,b}	12.26 \pm 0.59 ^a	16.42 \pm 3.25 ^a
100	0.36 \pm 0.02	62.66 \pm 7.07 ^a	13.98 \pm 2.34 ^a	19.24 \pm 1.49 ^{a,b}
200	0.85 \pm 0.71	69.58 \pm 9.30 ^{a,b}	10.04 \pm 4.30 ^{b,c}	16.88 \pm 1.36 ^a
400	0.57 \pm 0.07	78.19 \pm 3.11 ^b	6.62 \pm 2.82 ^{b,c}	12.62 \pm 2.51 ^a
600	1.05 \pm 0.72	79.52 \pm 0.39 ^b	3.73 \pm 0.12 ^c	15.82 \pm 0.36 ^a
800	0.49 \pm 0.39	72.32 \pm 2.40 ^{a,b}	4.43 \pm 0.29 ^c	22.39 \pm 3.12 ^b

หมายเหตุ a, b, c แสดงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้น

ส่วนเซลล์ที่ได้รับสารสกัดแสมทุกระดับความเข้มข้นนาน 48 ชั่วโมง เกิดการตายแบบ apoptosis ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เซลล์ที่ได้รับสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เข้าสู่ระยะ GO/G1 มากกว่ากลุ่มควบคุม และมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่เซลล์ที่ได้รับสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเข้าสู่ระยะ S น้อยกว่ากลุ่มควบคุม และมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ที่ได้รับสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเข้าสู่ระยะ G2/M น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M มากกว่ากลุ่มควบคุม และมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 48 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมง			
	Apoptosis	GO/G1	S	G2/M
0	1.14 \pm 0.33	69.57 \pm 0.62 ^a	13.56 \pm 0.25 ^a	16.68 \pm 0.90 ^a
100	0.82 \pm 0.19	86.45 \pm 0.09 ^b	4.86 \pm 1.32 ^b	7.91 \pm 1.25 ^b
200	1.05 \pm 0.18	88.70 \pm 0.65 ^b	3.68 \pm 0.08 ^{b,c}	6.73 \pm 0.55 ^b
400	0.95 \pm 0.15	88.86 \pm 0.42 ^b	2.92 \pm 0.56 ^c	7.60 \pm 0.56 ^b
600	0.77 \pm 0.15	78.99 \pm 1.37 ^c	3.87 \pm 0.66 ^{b,c}	16.63 \pm 2.36 ^a
800	0.76 \pm 0.22	74.39 \pm 3.54 ^d	4.06 \pm 0.70 ^{b,c}	21.28 \pm 2.71 ^c

หมายเหตุ a, b, c, d แสดงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้น

วิจารณ์

1. การตรวจสอบการตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสม

การตรวจสอบการตายของเซลล์ หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 800-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าสารสกัดแสมด้วยน้ำมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ (Narasimham and Nair, 2004) แต่การตายของเซลล์อาจเป็นผลมาจาก berberine ซึ่งเป็นสารอัลคาลอยด์ที่พบมากในแสมและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่ง berberine สกัดออกได้ปริมาณมากที่สุดด้วยแอลกอฮอล์ (มนัสวี และวิษุตา, 2544) และมีความเป็นพิษต่อ Hep2 cell line สูง ($IC_{50} = 5$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (Kamkaen *et al.*, 2006) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ Human HT-1080 Fibrosarcoma และ Murine Lewis Lung Carcinoma (LLC) โดยมีค่า EC_{50} 11.7 และ 1.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดแสมด้วยเมทานอลต่อน้ำ อัตราส่วน 1:1 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ Human HT-1080 Fibrosarcoma, Human Lung A549 Adenocarcinoma และ Murine Lewis Lung Carcinoma ได้น้อยกว่าสารสกัดแสมด้วยเมทานอลเพียงอย่างเดียวโดย มีค่า EC_{50} 18.1, 2.88 และ 2.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Ueda *et al.*, 2002) แสดงให้เห็นว่า berberine มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ในการศึกษาครั้งนี้การสกัดสารด้วยน้ำได้ปริมาณ berberine น้อยเช่นเดียวกับการทดลองของ Deevanhxay *et al.* (2009) พบว่า การสกัดแสมด้วยแอลกอฮอล์ 60 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 83 องศาเซลเซียสมีปริมาณ berberine สูงเท่ากับ 25.20 มิลลิกรัมต่อกรัม แต่การสกัดแสมด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที มีปริมาณ berberine เท่ากับ 20.31 มิลลิกรัมต่อกรัม ดังนั้นการสกัดแสมด้วยน้ำจึงมีปริมาณ berberine น้อย ความเป็นพิษต่อเซลล์จึงน้อยกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น

การตรวจสอบการตายของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี MTT assay และการย้อมด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342 พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดแสมทุกความเข้มข้นนาน 24 และ 48 ชั่วโมงจากการตรวจสอบทั้ง 2 วิธีมีเปอร์เซ็นต์แตกต่างกัน โดยวิธี MTT assay มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์สูงกว่าการย้อมด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342 เพราะวิธี MTT assay จะจำแนกเซลล์ที่มีชีวิตแต่ไม่สามารถเติบโตอยู่ในกลุ่มของเซลล์ที่ไม่มีชีวิต เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ mitochondrial reductase ลดลง ทำให้เซลล์ที่

ได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้นสูงและระยะเวลาานมีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์สูงขึ้น ส่วนการตรวจสอบโดยการย้อมด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342 แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์พบเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์น้อยกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay เนื่องจาก propidium iodide มีคุณสมบัติในการแพร่ผ่านเซลล์ที่ไม่มีชีวิตเท่านั้นจึงไม่สามารถแพร่ผ่านเซลล์มีชีวิตที่ขาดความสามารถในการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นเซลล์ที่ได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้นต่ำ และระยะเวลาดสั้น จึงยังคงมีชีวิตอยู่แม้ว่าความสามารถในการเจริญลดลง แต่เมื่อตรวจสอบเซลล์ที่ได้รับสารสกัดแสมนาน 72 ชั่วโมงโดยย้อมด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342 พบเปอร์เซ็นต์การตายสูงกว่าวิธี MTT assay เนื่องจากเวลาที่เซลล์สัมผัสสารสกัดแสมนานขึ้น ทำให้เซลล์ได้รับสารในระดับความเข้มข้นสูงขึ้นด้วย จึงทำให้เซลล์ตายเพิ่มขึ้นแสดงว่าสารสกัดแสมที่ระดับความเข้มข้นสูง มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อได้รับเป็นเวลานาน

2. การตรวจสอบการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสม

การตรวจสอบการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยย้อมเซลล์ด้วย acridine orange พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดแสมความเข้มข้นสูง มีผลทำให้ดีเอ็นเอได้รับความเสียหายมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอกับการตายของเซลล์ พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดแสมทุกความเข้มข้นที่เวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดดีเอ็นเอเสียหายสูงกว่าการตายของเซลล์ แสดงว่าเซลล์ที่ดีเอ็นเอเสียหายบางส่วน ยังคงมีชีวิตอยู่จึงย้อมติดสี acridine orange เพราะคุณสมบัติของสีย้อมสามารถย้อมได้ทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต แต่ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง การตายของเซลล์และการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอมีเปอร์เซ็นต์สูงขึ้น แสดงว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลานานขึ้นทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายส่งผลให้เซลล์ตาย การเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอและการตายของเซลล์อาจเป็นผลมาจาก berberine ซึ่งที่ความเข้มข้น 5-200 ไมโครโมลเหนี่ยวนำให้ nasopharyngeal carcinoma cell ตาย ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย และไม่สามารถซ่อมแซมได้ (Savio *et al.*, 2002) ที่ความเข้มข้น 5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ดีเอ็นเอของ leukemia H-L 60 cell เกิดการแตกหักประมาณ 180-200 คู่เบส เซลล์จึงเข้าสู่ระยะ S และ G2/M ซ้ำลง (Kua and Yung, 1993) และ berberine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมล ทำให้ดีเอ็นเอของเซลล์ HaCaT Keratinocyte เสียหายและเซลล์ตายเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ (Inbaraj *et al.*, 2001)

3. การตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสม

การตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสม พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้น 100, 200, 400 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เกิดการตายแบบ apoptosis ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงว่าสารสกัดแสมด้วยน้ำไม่ทำให้เซลล์ตาย แต่การตายของเซลล์ที่พบอาจเกิดจากภาวะของเซลล์เอง ซึ่งในกลุ่มควบคุมก็พบการตายด้วยเช่นกัน ส่วนที่ความเข้มข้น 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลา 72 ชั่วโมง เกิดการตายแบบ apoptosis แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณ berberine เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้จึงมีผลให้เซลล์บางส่วนตาย ซึ่งเหมือนกับการทดลองของ Youn *et al.* (2008) ที่ berberine ในพืชสมุนไพร *Coptidis rhizoma* ทำให้ HeLa cell ตายแบบ apoptosis โดยมีกลไกเหนี่ยวนำให้เชื้อหุ้มไมโทคอนเดรียเสียหาย มีการปลดปล่อย cytochrome C ออกมา และยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน anti-apoptotic คือ Bcl-2 และ Bcl-X_L กระตุ้นการแสดงออกของ caspase เช่นเดียวกับการทดลองของ Mantena *et al.* (2006) พบว่า berberine ที่ความเข้มข้น 0, 15, 25, 50 และ 75 ไมโครโมลาร์ ทำให้ human epidermoid carcinoma A431 cell ตายแบบ apoptosis ที่เวลา 72 ชั่วโมงเท่ากับ 11.7, 31, 39, 47 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ berberine ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ leukemia HL-60 เปลี่ยนรูปร่าง ดีเอ็นเอแตกหัก เซลล์ตายแบบ apoptosis (Kuo *et al.*, 1995) berberine ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โครมาทินในนิวเคลียสขดตัวสั้น และเซลล์มีขนาดเล็กลง (Yang *et al.*, 1996)

4. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสม

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์ของ keratinocyte stem cell หลังจากได้รับสารสกัดแสมที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่ตรวจสอบ เนื่องจากสารสกัดแสมมีความเข้มข้นสูง ทำให้เซลล์ตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบเซลล์ที่ได้รับสารสกัดแสมความเข้มข้น 100, 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เข้าสู่ระยะ G₀/G₁ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม เนื่องจากวัฏจักรเซลล์ปกติใช้เวลา 24 ชั่วโมง (กัลยา และอนงค์, 2548) และเป็นระยะ

ที่เสร็จสิ้นจากการแบ่งเซลล์ ทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะพัก และไม่พบการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น ส่วนที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในระยะ G0/G1 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จึงเข้าสู่ระยะ S น้อยลง แสดงว่าสารสกัดแสมมีผลทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย สอดคล้องกับรายงานของ Mantena *et al.* (2006) ที่ berberine สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA topoisomerase I และ II จึงทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ นอกจากนี้ berberine สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง และเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 โดยยับยั้งการทำงานของ cyclin D1, D2 และ E และ cyclin-dependent kinase (Cdk2, Cdk4 และ Cdk6) และกระตุ้นการแสดงออกของ Cdk inhibitors (Cip1/p21 และ Kip1/p27 (Mantena *et al.*, 2006) berberine ที่ความเข้มข้น 1-100 ไมโครโมลต่อลิตร ทำให้ HepG2 cell หยุดที่ระยะ G0/G1 เท่ากับ 42.29-78.49 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน p53 และ Cyclin D1 ลดลง (Zhang *et al.*, 2007) จากการตรวจสอบแสดงให้เห็นว่าการที่เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 เป็นจำนวนมากเนื่องจากสารสำคัญในแสมมีความสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน cyclin และ cyclin-dependent kinase ซึ่งร่วมกันทำหน้าที่ผลักดันกระบวนการควบคุมวัฏจักรเซลล์ (ทรงยศ, 2551) และเมื่อดีเอ็นเอของเซลล์เสียหายจากสารสกัดแสม เซลล์มีกลไกตรวจสอบและแก้ไขความเสียหายที่เกิดขึ้น จึงเหนี่ยวนำให้เซลล์สู่ระยะ G0/G1 (Wang *et al.*, 2008)

การทดลองเซลล์ที่ได้รับสารสกัดแสมความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนเซลล์ในระยะ G2/M เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสารดังกล่าวยับยั้งการทำงานของโปรตีน cyclin B และ cyclin-dependent kinase (Cdk1) เช่นเดียวกับการทดลองของ Tsang *et al.* (2009) รายงานว่า berberine จาก *Coptidis rhizome* ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ทำให้ human nasopharyngeal carcinoma cell (HONE1) หยุดที่ระยะ G2/M และยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยกระตุ้นการทำงานของ poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), caspase 3 และ caspase 9 เช่นเดียวกับเซลล์ leukemia HL-60 หยุดที่ระยะ G2/M (Kuo *et al.*, 1995) berberine ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ human prostate carcinoma cell (PC 3) โดยเข้าสู่ระยะ G2/M ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเหนี่ยวนำให้เซลล์เชื่อมต่อกันจนหลวมปกติ เข้าสู่ระยะ G2/M มากกว่ากลุ่มควบคุมและไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Mantena *et al.*, 2006)

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดแสมต่อ keratinocyte stem cell เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารสกัดแสมที่ 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับระยะเวลาที่เซลล์ได้รับสารสกัด คือ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 800 และ 1,000

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากขึ้น เมื่อได้รับเป็นเวลานาน โดยทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis และดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย มากกว่ากลุ่มควบคุมตามลำดับ

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดแสมต่อ keratinocyte stem cell ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่าสารสกัดแสมสกัดด้วยน้ำมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อย ดังนั้นการนำแสมมาต้มกับน้ำดื่มเพื่อรักษาโรค ได้แก่ ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Punitha *et al.*, 2005) ลดความเป็นพิษต่อตับ ต้านอนุมูลอิสระ ลดความดัน (Singh *et al.*, 1990) จึงสามารถทำได้ แต่ควรเป็นแสมแห้งที่หั่นเป็นชิ้นบางเพื่อลดปริมาณน้ำและได้ปริมาณสารมากขึ้น ขนาดรับประทานประมาณ 5 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ถ้าเป็นแสมผงหรือห่อสำเร็จรูปขนาดรับประทาน 1 ซ้อนชา ต่อน้ำ 200 มิลลิลิตร ต้องระมัดระวังการปลอมปนของสมุนไพรอื่นๆ ที่มีสีเหลืองด้วย เพราะทำให้ไม่ได้ berberine ตามที่ต้องการ และสารสเตียรอยด์ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2552) เพราะสารชนิดนี้มีคุณสมบัติในการลดอักเสบและบรรเทาปวดในกระดูกและข้อ แต่มีอันตรายต่อร่างกายหากใช้ขนาดสูงต่อเนื่อง เป็นระยะเวลานาน อย่างไรก็ตามในแสมมี berberine เป็นสารสำคัญ จึงควรระมัดระวังในการกินอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน เพราะอาจมีพิษต่อระบบเลือด ตับ และหัวใจได้ (Hwang *et al.*, 2002)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดแอมต่อเซลล์ต้นกำเนิดผิวหนังมนุษย์ ที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สรุปได้ดังนี้

1. สารสกัดแอมด้วยน้ำมีผลทำให้ keratinocyte stem cell ตาย ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดแอมทุกความเข้มข้นทำให้เซลล์ตาย ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อยู่ในช่วง 13.30 ± 5.42 ถึง 58.36 ± 3.37 แต่เมื่อตรวจสอบโดยย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342 พบว่าเฉพาะที่ความเข้มข้น 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์ตายที่เวลา 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อยู่ในช่วง 34.81 ± 19.34 ถึง 44.99 ± 13.04 และที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์ตายที่เวลา 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อยู่ในช่วง 33.50 ± 7.82 ถึง 93.33 ± 11.54 เมื่อเปรียบเทียบการตายของเซลล์ทั้งสองวิธีที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าการตรวจสอบโดยวิธี MTT assay มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงกว่าการตรวจสอบด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342 อยู่ในช่วง 13.30 ± 5.42 ถึง 57.62 ± 4.05 ส่วนที่เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบด้วย propidium iodide ร่วมกับ Hoechst 33342 พบเปอร์เซ็นต์การตายสูงกว่าตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay ซึ่งอยู่ในช่วง 33.50 ± 7.82 ถึง 93.33 ± 11.54

2. สารสกัดแอมด้วยน้ำมีผลทำให้ดีเอ็นเอของ keratinocyte stem cell เกิดความเสียหายที่ความเข้มข้น 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อยู่ในช่วง 33.12 ± 15.63 ถึง 33.23 ± 7.50 และ 53.85 ± 8.23 ถึง 56.85 ± 9.40 ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมง สารสกัดแอมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อยู่ในช่วง 38.50 ± 15.49 ถึง 91.11 ± 15.39

3. สารสกัดแอมด้วยน้ำมีผลทำให้ keratinocyte stem cell ตายแบบ apoptosis เฉพาะที่ความเข้มข้น 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมงเท่านั้น มีเปอร์เซ็นต์การตาย

มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อยู่ในช่วง 6.63 ± 1.07 ถึง 12.87 ± 4.64 ส่วนที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เซลล์ไม่ตายเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

4. สารสกัดแสมด้วยน้ำมีผลทำให้วัฏจักรเซลล์ keratinocyte stem cell เปลี่ยนแปลงโดยทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 200, 400 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ที่เวลา 48 ชั่วโมง สารสกัดแสมด้วยน้ำทุกความเข้มข้นทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จึงทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S น้อยลง นอกจากนี้ที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงว่าสารสกัดแสมทุกความเข้มข้นที่ 24 และ 48 ชั่วโมง มีผลทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย เซลล์จึงหยุดการแบ่งเซลล์

ข้อเสนอแนะ

สามารถนำสารสกัดแสมด้วยน้ำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไปได้ เช่น ยารักษาโรคมะเร็ง ยารักษาโรคเบาหวาน ลดความดันเนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ แต่ต้องระมัดระวังในการกินอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน เพราะอาจมีพิษต่อระบบเลือด ตับ และหัวใจได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์ และ นวลอนงค์ จิรกาญจนากิจ. 2548. ความรู้พื้นฐานของเทคโนโลยีเซลล์
สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.

กรรณิการ์ อรรถปัญญานิช. 2548. Integumentary system. เอกสารประกอบการบรรยาย **Human
Anatomy (415211)**. แหล่งที่มา:

<http://www.medsci.nu.ac.th/Thai/DeptAnatomy/2548/human%20anatomy/sheet/IntegHuman%20%20Anatomy.pdf>, 10 มกราคม 2552.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2552. ข่าวกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กรม
วิทยาศาสตร์เตือนอันตรายจาก สมุนไพร “แห้ว”. แหล่งที่มา:

<http://www.ryt9.com/s/bmnd/725315>, 13 ตุลาคม 2552.

โกวิทย์ พัฒนาปัญญาสัตย์. 2539. โพลีไซโทเมทรี. วงตะวัน, กรุงเทพฯ.

ณรงค์ สິงห์บะอุม, เอนก กิจจา, เลขา มาโนช และ อรุมา เขียมจิตต์. 2549. พืชสมุนไพรที่ใช้
ควบคุมโรคพืช. นิตยสาร “บนเส้นทางงานวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์”.

แหล่งที่มา: http://www.rdi.ku.ac.th/kasetfair49/Plant/p_40/p_40.htm, 24 มิถุนายน 2549.

ทรงยศ อนุชปรีดา. 2552. เอกสารประกอบการสอนวิชา 501701 (Advanced Hematology and
Clinical Microscopy). **Signal Transduction** ในมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemias).

แหล่งที่มา:

<http://www.ams.cmu.ac.th/depts/clinmcrs/Signal%20transduction%20in%20leukemia%20501701.doc>, 25 ตุลาคม 2552.

เทวรัตน์ คุ่มจันทิก. 2547. การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของสมุนไพรแอมต้อต๊ับ หัวใจปอด ตับอ่อน
และอวัยวะในหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ธนาวุฒิ วรุณ โชติกุล. 2547. ผลของสารสกัดแห้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Mycobacteria*.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นงนุช เอื้อบัณฑิต. 2548. ผลของแห้งในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท และผลต่อระบบ
ประสาทส่วนกลาง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นภาพร แก้วดวงดี. 2550. การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และการชักนำการตายแบบอะพอพโตซิส
ของเรสเวออะทอลและกากองุ่นแดงต่อมะเร็งท่อน้ำดีของคน. *Agricultural Sci. J.* 38 (6):
6-10.

นภาพรรณ พงษ์พวงเพชร. 2546. องค์ประกอบที่มีศักยภาพลดน้ำตาลในเลือดจากแห้ง.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปกป้อง ประสงค์, นาดิชา วีระปรียากุล และ สหพัฒน์ บัณฑิตรักษ์. 2551. อะพอพโตซิส:วิถีและ
การตรวจวัด. *Journal Health Res.* 21 (3): 227-238.

ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ. 2546. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.

ประนอม เดชวิศิษฎ์สกุล, รพีพล ภาโววาท, ไพริน ทองคุ้ม และ ตถาพร ไม้สน. 2545. ลักษณะทาง
เภสัชเวทของแห้ง. *วารสารวิทยาศาสตร์การแพทย์* 44 (1): 1-10.

พรทิดา โสลูพิมาน. 2547. ผลของแอซิทิลเมโดรินอลและเปลาโนทอลต่อเซลล์มะเร็ง. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มนัสวี จารุสาธิต และ วิชชุดา ธรรมนิคยสกุล. 2544. การสกัดและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ
สีเหลืองจากแห้ง. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ยุทธนา หมั่นดี. ม.ป.ป. Flow cytometer in Hematology. **Flow cytometry.**

แหล่งที่มา: <http://www.ams.cmu.ac.th/depts/clinmcrs/b25.doc>, 30 พฤศจิกายน 2551.

ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547. **ชีววิทยาของเซลล์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

วัลยา จิตตประสาทศีล. 2549. **ฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดแห้ง ต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวาน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วัลยา จิตตประสาทศีล, วิจิตร บรรณาราม, ดำรง สมมิตร, มณีรัตน์ พัฒนชัย และ ศรินทร หยิบ โชคอนันต์. 2548. **ฤทธิ์กึ่งเฉียบพลันของสารสกัดเอทานอลจากแห้งต่อระดับน้ำตาล ไขมัน และค่าเคมีในเลือดของของหนูปกติและหนูที่เหนียวน้ำให้เป็นเบาหวานด้วยสเตปโตไซโตซิน**. *Thai Journal Pharmacol* 27 (3): 110-120.

วรรณจันทร์ นพนิชม, อุดม ก๊กผล และ วิรินทร ชวศิริ. ม.ป.ป. **สารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคพืชที่มีพื้นฐานเบอเบอริน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศุภเกต แสนทวีสุข. 2547. **ฤทธิ์ของสมุนไพรเสมในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวาน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สาธิตา อริชชาติ, สุลักษณ์ วุทธิรพล และ กนกพร แสนเพชร. 2547. **การวิเคราะห์ทางเคมีและโลหิตวิทยาของหนูวิสตาร์ที่ได้รับน้ำสกัดแห้ง**. ปัญหาพิเศษ, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สิทธิชัย เอี่ยมสะอาด. 2546. **การศึกษาพิษแบบเฉียบพลันของสมุนไพรต่อตับ หัวใจ ปอด และอวัยวะในหนูขาวเพศผู้**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สิทธิศักดิ์ หารยาเวก. 2549. **เซลล์ชีววิทยาทางการแพทย์ 2 กลไกการทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อ**. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

อรุณรัตน์ เก้าเจริญ. ม.ป.ป. **ฤทธิ์การต้านทานแบคทีเรียของสารสกัดแห้งและบอระเพ็ด**. ปัญหาพิเศษ, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- อังคณา เผ่าเผด็จการ. 2545. ผลของสารสกัดด้วยน้ำจากเห้มต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ฤดีวรรณ ตั้งประดิษฐ์, สรศักดิ์ เหลี้ยวไชยพันธุ์ และ สุรีย์ ฟูตระกูล. 2547. **Antibacterial Activity of Water and Alkaloid Extracts from *Coscinium fenestratum***. ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. แหล่งที่มา:
http://www.phtnet.org/research/view-abstract.asp?research_id=ah262, 16 ธันวาคม 2551.
- Agusta, A. 2003. *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. Plant Resources of South East Asia. **Med. Poisonous Plants**. 3: 139-140.
- Ameisen, J.C. 2002. On the origin evolution and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. **Cell Death and Differentiation** 9: 367-393.
- Ameisen, J.C. and A. Capron. 1991. Cell dysfunction and depletion in AIDS: The programmed cell death hypothesis. **Immunol.** 12: 102-105.
- Amin, A.H., T.V. Subbaiah and K.M. Abbasi. 1969. Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. **Can J Microbiol.** 15: 1067-1076.
- Anonymous. 2000. berberine. **Alternative Medicine Review.** 5 (2): 175-177.
- Anonymous. 2001. **The Wealth of India. First Supplement Series (Raw materials)**. NISCAIR, CSIR, New Delhi.
- Birdsall, T.C.N.D. and G.S.N.D. Kelly. 1997. Berberine: Therapeutic Potential of an Alkaloid Found in Several Medicinal plants. **Alternative Medicine Review.** 2 (2): 94-103.

- Brescia, P. and P. Banks. 2009. Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch Microplate Spectrophotometer. **Application Note. BioTek.** 1-3.
- Bunpo, P., K. Kataoka, H. Arimochi, H. Nakayama, T. Kuwahara, Y. Ohnishi and O. Vinitketkumnien. 2005. *Centella asiatica* Extract induces cell cycle arrest in CaCo-2 human colon cancer cells. **Chiang Mai Med Bull** 44 (1): 21-23.
- Cissman, H.A. and J.A. Steinkamp. 1993. Rapid simultaneous measurement of DNA, protein and cell volume in single cells from large mammalian cell population. **J Cell Biol** 59: 766.
- Darzynkiewicz Z. 1990. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. **Methods in Cell Biology** 33: 285-98.
- Darzynkiewicz Z., S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M.A. Hotz, P. Lassota and F. Traganos 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry** 13 (8): 795-808.
- Darzynkiewicz, Z., J. Gong, G. Juan, B. Ardelit and F. Traganos. 1996. Cytometry of cyclin proteins. **Cytometry** 25: 1-13.
- Deevanhxay, P., M. Suzuki, N. Maeshibu and S. Hirose. 2009. Microwave-Assisted Extraction of Protoberberine Alkaloids from *Cosciniium fenestratum*. **Journal of Chemical Engineer of Japan.** 42 (10): 752-759.
- Ekalaksananan, T., C. Pientong, U. Tattawasart and B. Kongyingyoes. 2006. **In vitro anti-herpes simplex virus type 1 activity of *Cosciniium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. and *Stephania venosa* (Blume) Spreng.** The 10th Int. Cong. Ethnobiol.(ICE), Chiang Rai, Thailand.

- Engeland, M., L. Nieland, F. Ramaekers and B. Schutte. 1998. Annexin V– affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry** 1: 1 – 9.
- Eom, K.S., J.M. Hong, M.Y. Youn, H.S. So, R. Park, J.M. Kim and T.Y. Kim. 2008. Berberine induces G1 Arrest and Apoptosis in Human Glioblastoma Ta8G cell through Mitochondrial/Caspase Pathway. **Biol. Pharm.** 31 (4): 558-562.
- Ford, H.L., R.A. Sclafani and J. Degregori. 2004. Cell cycle regulatory cascades. In: Stein GS, Pardee AB, editors. **Cell cycle and growth control: biomolecular regulation and cancer**. 2nd ed. Hoboken (NJ): Wiley-Liss.
- Forman, L.L. 1991. **Menispermaceae. In: Flora of Thailand. Vol. 5 (Part 3)**, The Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok.
- Fukuda, K., Y. Hibiya and M. Mutoh. 1999. Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. **J Ethnopharmacol.** 66: 227-233.
- Gong J., F. Traganos and Z. Darzynkiewicz. 1993. Simultaneous analysis of cell cycle kinetics at two different DNA ploidy levels based on DNA content and cyclin B measurements. **Cancer Res** 53: 5096-5099.
- Gunathilake, C.V.S. and I.A.U.N. Gunathilake. 1980. The Floristic composition of Sinharaja-a rain forest in Sri lanka with special reference to endemics. **Sri Lanka For.** 44: 386-396.
- Hsu, Y.L., P.L. Kuo and C. C. Lin. 2005. Isoliquiritgenin induces apoptosis and cell cycle arrest through p53-dependent pathway in Hep G2 cells. **Life Sciences** 77: 279-292.

- Hwang, J.M., H.C. Kuo, T.H. Tseng, J.Y. Liu and C.Y. Chu. 2005. Berberine induces apoptosis through a mitochondria/caspases pathway in human hepatoma cell. **Archives of Toxicology** 80: 62-73.
- Inbaraj, J.J., B.M. Kukielczak, P. Bilski, S.L.Sandvik and C.F. Chingell. 2001. Photochemistry and Phytocytotoxicity of Alkaloids from Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) Berberine. **Chem. Res. Toxicol.** 14 (11): 1529-1534
- Kamkaen, N., J. M. Wilkinson and H. M. A. Cavanagh. 2006. Cytotoxic Effect of Four Thai Edible Plants on Mammalian cell Proliferation. **Thai Pharmaceutical and Health Science Journal** 1 (3): 187-195.
- Katti and Shintre. 1930. **Arch Pharm.** 268: 314-321.
- Keawpradub, S. 1992. **The alkaloids from the stems of *Coscinium fenestratum* Colebr.** M.S. Thesis, Chulalongkorn University.
- Kim, N. and A. Strasser. 2002. Apoptosis Signaling by Ionizing Radiation and Cytotoxic Drugs. **J. Exp. Med.** 191 (1): 195-200.
- Kumar, G.S., K.N. Jayaveena, C.K. Kumar, U.P. Sanjai, B.M. Swamy and D.V. Kumar. 2007. Antimicrobial effect of Indian medicinal plants against acne inducing bacteria. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** 6 (2): 717-723.
- Kumar, G.S., K.N. Jayaveena, C.K. Ashok Kumar, P. Sanjay. 2008. Evaluation of Antiacne Activity of Alkaloidal Fraction of *Coscinium fenestratum*.
- Kua, C.L., B.Y.M. Yung. 1993. Study of Biochemical Mechanism of the Anticancer Drugs in Chinese Medicine.

- Kuo C.L., C.C. Chou and B.Y. Yung. 1995. Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. **Cancer Lett.** 93: 193-200.
- Lee. H.J., D.H. Son, S.K. Lee, J. Lee, C.D. Jun, B.H. Jeon, S.K. Lee and E.C. Kim. 2006. Extract of *Coptidis rhizome* induces cytochrom-C dependent apoptosis in immortalized and malignant human oral keratinocyte. **Phytotherapy Research.** 20 (9): 773-779.
- Lemmens, R. H. M. J. And N. Bunyaphratharsa. 2003. **Plant Resources of South-East Asia 12(3) Medicinal and Poisonous Plant 3.** Backhuys Publishers, Leiden, Natherland.
- Letasiova, S., S. Jantova, M. Muckova and M. Theiszova. 2005. Antiproliferative activity of Berberine in vitro and in vivo. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc. Czech. Repub.** 149 (2): 461-463.
- Li, J., G.Z. Sun, H.S. Lin, Y. X. Pic, X.Q., C. An, J. Yu and B. J. Hua. 2008. The herb medicine formula “Yang Wei Kang Lui” improves the survival of late stage gastric cancer patients and induces the apoptosis of human gastric cancer cell line through Fas/Fas ligand and Bax/Bcl-2 pathways. **International Immunopharmacology** 8: 1196-1206.
- Lin, J.P., J.S. Yang, J.H. Lee, W.T. Hsich and J.G. Chung. 2006. Berberine induces cell cycle arrest and apoptotis in human gastric carcinoma SNU-5 cell line. **World Gastroenterol** 21 (1): 21-28.
- Lopez, L., M. A. Villavicencio, A. Albors, M. Martinez, J. Melendez-Zajgla and V. Maldonado. 2002. *Cupressus lusitanica* (Cupressaceae) leaf extract induces apoptosis in cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology** 80: 115-120.
- Luo, Y., Y. Hao, T.P. Shi, W.W. Deng and N. Li. 2008. Berberine inhibits cyclin D1 expression via suppressed binding of AP-1 transcription factors to CCND1 AP-1 motif. **Acta Pharmacol Sin.** 29(5): 628-633.

- Mantena, K.S., S.D. Sharma and S.K. Katiyar. 2006. Berberine inhibits growth, induces G1 arrest and apoptotic in human epidermoid carcinoma A431 cells by regulating Cdk1-Cdk-cyclin cascade, disruption of mitochondrial membrane potential and cleavage of caspase3 and PARP. **Carcinogenesis**. 27 (10): 2018-2027.
- Matsuura, S.H., K. Takahashi, M. Yamasaki, O. Yamato, Y. Maede, K. Katakura, M. Suzuki, Trimurningsih, Chairul and T. Yoshuhara. 2005. Antibabesial Activity of Protoberberine Alkaloids and 20-hydroxyecdysone from *Arcangelisia flava* against *Babesia gibsoni* in Culture. **J. Vet. Med. Sci.** 67 (2): 223-227.
- Miller, A. B., M. Breen and K. E. Murphy. 1999. Chromosomal localization of acidic and basic keratin genes of the domestic dog. **Mammalian Genome** 10 (4): 371-375.
- Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. **Nature** 374: 131-134.
- Nair, G.M., S. Narasimhan, S. Shiburaj and T.K. Abraham. 2005. Antibacterial effects of *Cosciniium fenestratum*. **Fitoterapia** 76: 585-587.
- Narasimhan, S. and G. M. Nair. 2004. Release of berberin and its crystallization in liquid medium of cell suspension cultures of *Cosciniium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. **Curr Sci.** 86 (10): 1369-1371.
- Narasimhan, S. and G.M. Nair. 2005. Cytotoxic of *Cosciniium fernestratum* (Gaerth). Colebr. and Its active principle berberine on L929 cells. **Medicinal Chemistry Research** 14 (2): 118-124.
- Palasuntheram, C., K.S. Iyer, L.B. D. Silva and T. D. Silva. 2005. Antibacterial activity of *Cosciniium fenestratum* Colebr against *Clostridium tetani*. **Indian J Med Res.**

- Pinho, P.M.M., M.M.M. Pinto, A. Kijjoa, K. Phradai, J.G. Diaz and W. Herz. 1992. Protoberberine alkaloids from *Coscinium fenestratum*. **Phytochemistry** 31 (4): 1403-1407.
- Potten C. and J. Wilson. 2005. **Apoptosis The Life and Death Cells**. Cambridge University, New York, USA.
- Punitha, I.S.R., K. Rajiendran, A. Shirwaikar and A. Shirwaikar. 2005. Alcoholic Stem Extract of *Coscinium fenestratum* Regulates Carbohydrate Metabolism and Improves Antioxidant Status in Streptozotocin-Nicotinamide Induced Diabetic Rats. **eCAM** 2 (3): 375-381.
- Rojsanga, P., W. Gritsanapan and L. Suntornsuk. 2006. Determination of Berberine Content in the Stem Extracts of *Coscinium fenestratum* by TLC Densitometry. **Medical Principles and Practice** 15: 373-378.
- Saikumar, P., Z., Dong and V. Mikhailov. 1999. Apoptosis : definition, mechanisms, and relevance to disease. **The American Journal of Medicine** 107: 489 – 506.
- Salmon, E.D., M. McKeel and T. Hays. 1984. Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle in vivo measured by blocking polymerization with colchicines. **The Journal of Cell Biology**. 99: 1066-1075.
- Saraste, Antti and Kari Pulkki. 2000. Morphologic and Biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**. 45 (3): 528-537.
- Savio, S., C.M.N. Yow and K.W. Fung. 2002. Characterization of berberine on human cancer cells in culture. **Turkish Journal of Medical Science**. 32 (5): 363-368.

- Shirwaikar, A., A. Shirwaikar and I.S.R. Punitha. 2007. Antioxidant Studies on the Methanol Stem Extract of *Coscinium fenestratum*. **Natural Product Science** 13 (1): 40-45.
- Shirwaikar, A., K. Rajendran, I.S.R. Punitha. 2005. Antidiabetic activity of alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. **Ethnopharmacology** 97: 369-374.
- Singh, G.B., S. Singh, S. Bani and S. Malhotra. 1990. Hypotensive action of a *Coscinium fenestratum* stem extract. **Ethnopharmacol** 30 (2): 151-155.
- Siwon, J., R. Verpoorte, G. F. A. van Essen, A. Baerheim Svendsen. 1980. Studies on Indonesian Medicinal Plants III: The Alkaloids of *Coscinium fenestratum*. **Planta Med.** 38: 24-32
- Song, T.Y., S.L. Hsu and G.C. Yen. 2005. Induction of apoptosis in human hepatoma cells by mycelia of *Antrodia camphorate* in submerged culture. **J. Ethnopharmacol.** 100(1): 158-167.
- Stein, G.S. and A.B. Pardee. 2004. **Cell cycle and growth control**, 2nd ed. Biomolecular regulation and cancer/ edited by Hoboken, N. J., Wiley-Liss.
- Traganos, F., Z. Darzynkiewicz and T. Sharpless. 1977. Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. **J Histochem Cytochem** 25: 46.
- Tran Q.L., Y. Tezuka, J.Y. Ueda, N. T. Nguyen, Y. Maruyama, K. Begum, S.H. Kim, Y. Wataya, Q.R. Tran and S. Kadota. 2003. In vitro antiplasmodial activity of antimalarial medicinal plants used in Vietnamese traditional medicine. **Ethnopharmacology** 86 (2): 249-252.

- Tran, T.A. and S. Ziegler. 2001. Utilization of medicinal plants in Bach Ma National Park, Vietnam. Newsletter of the Medicinal Plant Specialist Group of the IUCN Species Survival Commission. 7: 3-4.
- Tsang, C.M., E.P. Lau , K. Di , P.Y. Cheung , P.M. Hau , Y.P. Ching , Y.C. Wong , A.L. Cheung , T.S. Wan , Y. Tong , S.W. Tsao and Y. Feng . 2009. Berberine inhibit Rho GTPases and cell migration at low doses but induces G2 arrest and apoptosis at high doses in human cancer cells. **Int J Mol Med.** 24 (1): 131-138.
- Tushar, K.V., S. George, A.B. Remashree and I. Balachandran. 2008. *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. – A Review on this Rare, Critically Endangered and Highly-Traded Medicinal Species. **Journal of Plant Sciences** 3 (2): 133-145
- Ueda, J.Y., Y. Tezuka, A. H. Banskota, Q. L. Tran, Q. K. Tran, Y. Harimaya, I. Saiki and S. Kadota. 2002. Antiproliferative Activity of Vietnamese Medicinal Plant. **Biol. Pharm. Bull.** 25 (6): 753-760.
- Umamahoswari, S. and P.S. Prince. 2007. Antihyperglycaemic effect of “Ilogen-Excel”, an ayurvedic herbal formulation in streptozotocin induced diabetes mellitus. **Acta Pol Pharm** 64 (1): 53-61.
- Vermes, H. and R. Perger. 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Method** 21: 167–190.
- Venukumar, M. R. and M. S. Latha. 2002. Antioxidant effect of *Coscinium fenestratum* in carbon tetrachloride treated rats. **Indian J. Pharmacol** 46: 223-228.
- Venukumar, M. R. and M. S. Latha. 2004. Effect of *Coscinium fenestratum* on hepatotoxicity in rats. **Indian J. Exp Biol.** 42 (8): 792-797.

- Wang, J., X. Wang, S. J. P. Lin, J. Zhang, Y. Lu, Q. Wang, Z. Xiong, Y. Wu, J. Ren and H. Yang. 2008. Cytotoxicity of fig fruit latex against human cancer cells. **Food and Chemical Toxicology** 46: 1025-1033.
- Warrier, P.K., V.P.K. Nambiar and C. Ramankutty. 1994. Indian Medicinal Plants, a Compendium of 500 species. **Orient Longman Limited**. 2: 191-193.
- Warrier, P.K., V.P.K. Nambiar and P.M. Ganapathy. 1994. *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. (Menispermaceae). **Some Important Medicinal Plants of the Western Ghats India: A Profile**. Available Source: http://www.idrc.ca/en/ev-21622-201-1-DO_TOPIC.html. March 3, 2009.
- Wattanathorn, J., N. Uabundit, W. Itarat, S. Mucimapura, P. Laopatarakasem and B. Sripanidkulchai. 2006. Neurotoxicity of *Coscinium fenestratum* stem, a medicinal plant used in traditional medicine. **Food and Chemical Toxicology**. 44 (8): 1327-1333.
- Wongcome, T., A. Panthong, S. Jesadanont, D. Kanjanapothi, T. Taesotikul and N. Lertprasertsuke. 2007. Hypotensive effect and toxicology of the extract from *Coscinium fenestratum* (Gaerth.) Colebr. **Journal of Ethnopharmacology**. 111 (3): 468-475.
- Wyllie, A. Apoptosis and cell proliferation. Roche **Molecular Biochemicals Germany** : 1 – 25.
- Xu, L., Y. Lui and X. He. 2005. Inhibitory Effect of Berberine on the Activation and Cell Cycle Progression of Human Peripheral Lymphocytes. **Cellular & Molecular Immunology** 2 (4): 295-300.
- Yang, L. L., C.Y. Lee and K.Y. Yen. 2000. Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Letters** 157: 65-75.

Yang, I.W., C.C. Chou and B.Y. Yung. 1996. Dose-dependent effects of berberine on cell cycle pause and apoptosis in Balb/c 3T3 cells. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 354: 102-108.

Youn, M.J., H.S. So, H.J. Cho, H.J. Kim, Y. Kim, J.H. Lee, J.S. Sohn, Y.K. Kim, S.Y. Chung and R. Park. 2008. Berberine, a Natural Product, Combined with Cisplatin Enhanced Apoptosis Through a Mitochondria/Caspase-Mediated Pathway in HeLa cells. **Biol. Pharm. Bull.** 31 (5): 789-795.

Zhang, Y., Z. He, L. Zhang, X. Wang, C.Y. Fitzpatric. 2007. Growth inhibition and stimulated apoptosis of HepG2 induce by Berberine.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเซลล์และสารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

1. ละลายอาหารผง (DMEM F 12) ปริมาณ 2.4 กรัม ในน้ำบริสุทธิ์ 178 ml จนเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ละลาย NaHCO_3 เติลงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. เติม serum ที่ผ่านการ inactivate แล้ว (56°C , 30 นาที) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร
4. เติม penicillin-streptomycin ปริมาณ 2 มิลลิลิตร
5. ปรับ pH 7.2-7.4
6. กรองอาหารผ่าน membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตรในตู้ปลอดเชื้อ เก็บอาหารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม Phosphate buffered saline (PBS)

1. ชั่ง NaCl 8 กรัม, KCl 0.2 กรัม, Na_2HPO_4 1.25 g และ KH_2PO_4 0.2 g
2. นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำบริสุทธิ์ 1 ลิตร
3. ปรับ pH ให้ได้ 7.4
4. กรองสารละลายผ่าน membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตรในตู้ปลอดเชื้อ เก็บสารละลาย PBS ในตู้เย็น

การเตรียม Propidium iodide

Stock solution 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Propidium iodide	25	มิลลิกรัม
PBS	25	มิลลิลิตร

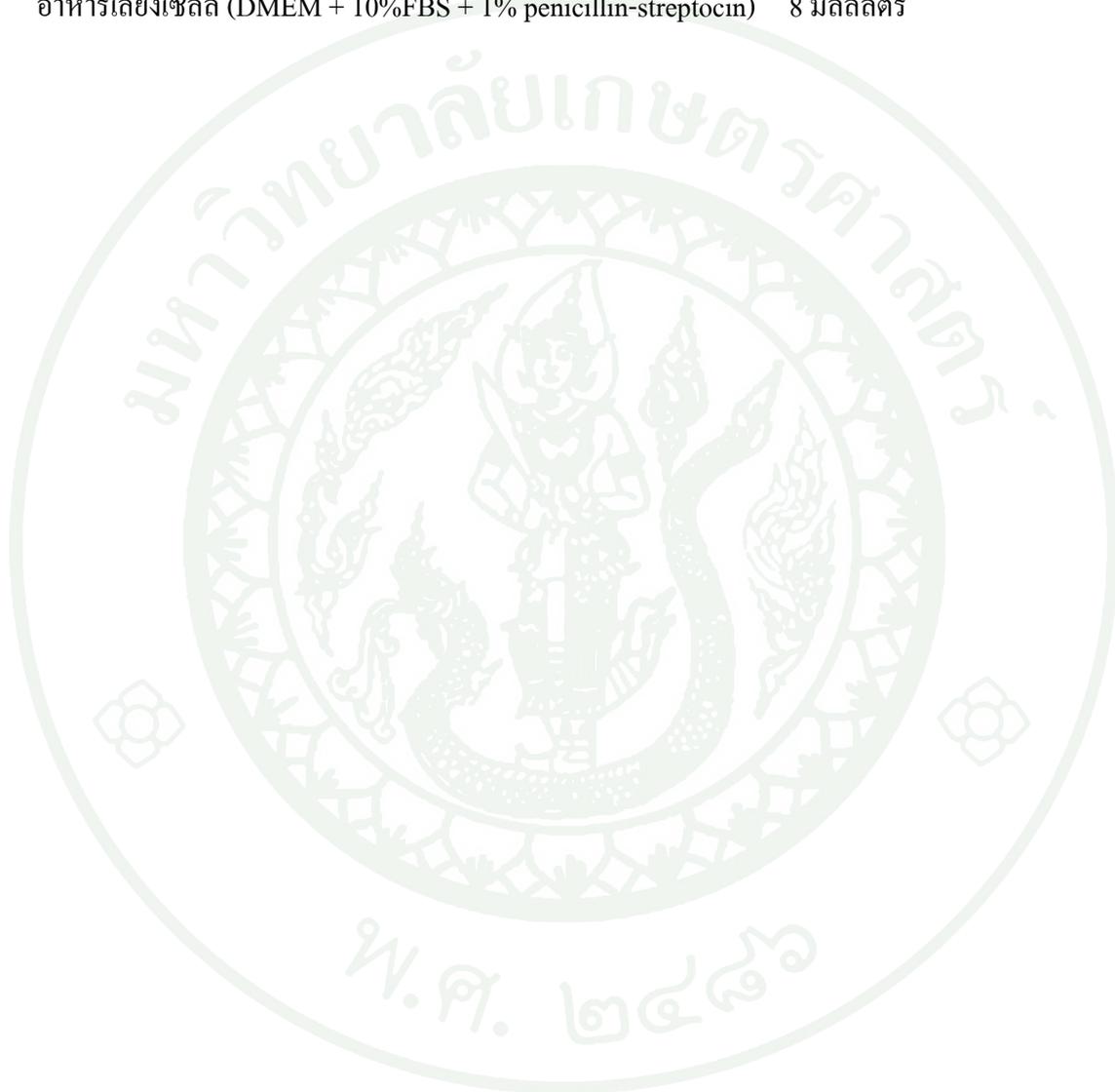
เก็บให้พ้นแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายในการแช่แข็งเซลล์

10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Dimethyl sulfoxide 20 เปอร์เซ็นต์ 2 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM + 10%FBS + 1% penicillin-streptocin) 8 มิลลิลิตร



ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ -นามสกุล	นางสาวอารีย์ สักยิม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	10 ธันวาคม 2521
สถานที่เกิด	อำเภอปากพะยูน จังหวัดพัทลุง
ประวัติการศึกษา	วท.บ (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยทักษิณ
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ครูวิชาการสาขาวิชาชีววิทยา
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ จังหวัดนครปฐม
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-