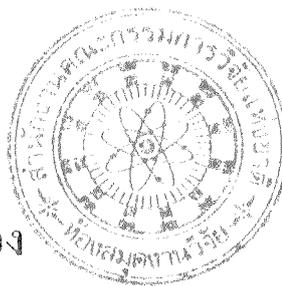


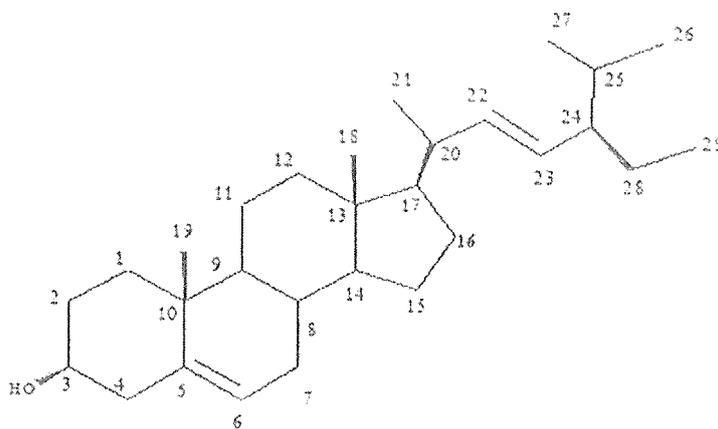
บทที่ 4

ผลการทดลอง

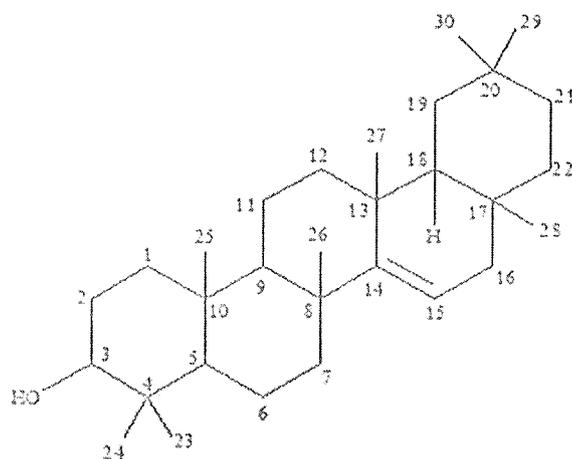


ผลการแยกสารจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีและการพิสูจน์เอกลักษณ์

จากการทดลองแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของรากลำบิดง (*Diospyros filipendula*) ซึ่งทำการสกัดด้วยเฮกเซน รากลำบิดงที่นำมาสกัดมีน้ำหนักเท่ากับ 3.00 กิโลกรัม ได้ crude extractsหนัก 5.78 กรัม แล้วนำ crude extracts มาแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากนั้นทำการตกผลึกได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ fraction 4.6 และ 5.6.6 ผลึกที่ได้มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว มีน้ำหนักเท่ากับ 0.0901 และ 0.1268 กรัม ตามลำดับ นำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$, DEPT – 135, DEPT – 90 แล้วนำข้อมูลทั้งหมดของสารบริสุทธิ์ที่ได้เทียบกับข้อมูลของ $^1\text{H NMR}$ และ $^{13}\text{C NMR}$ จากเอกสารอ้างอิงและ ChemDraw Ultra (version 10.0)¹⁰ พบว่า fraction 4.6 ส่วนใหญ่มีค่า chemical shift ใกล้เคียงกับสารอ้างอิงกลุ่มสเตอรอยด์ มีสูตรโครงสร้างที่คล้ายรูป 1 มีชื่อว่า stigmasterol (Shashi & Asish, 1994; Forgo & Kover, 2004) ส่วน fraction 5.6.6 มีค่า chemical shift ใกล้เคียงกับสารอ้างอิงกลุ่มไตรเทอร์พีน มีสูตรโครงสร้างที่คล้ายรูป 2 มีชื่อว่า taraxerol

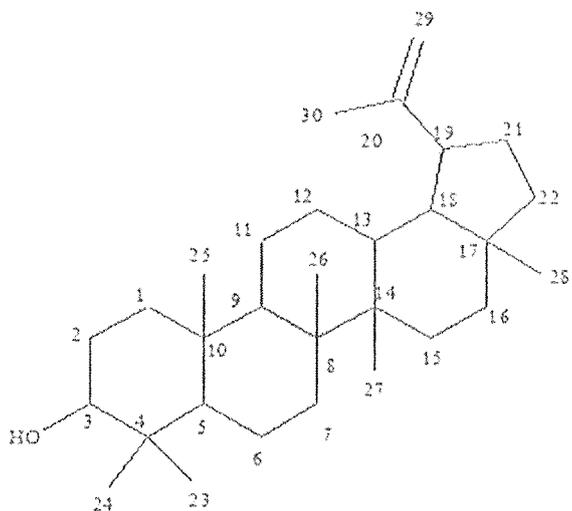


รูป 1. FRACTION 4-6 มีสูตรโครงสร้างสารอ้างอิง กลุ่มสเตอรอยด์ ชื่อว่า STIGMASTEROL



รูป 2 FRACTION 5.6.6 มีสูตร โครงสร้างสารอ้างอิง กลุ่มสเตอรอยด์ ชื่อว่า TARAXEROL

การสกัดแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากรากของท้าวแสนปม ทำการทดลองเช่นเดียวกับรากลำบีด
 ดง สารบริสุทธิ์ที่ได้จากการสกัดหนัก 0.1861 กรัม มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว มีค่า chemical shift
 ใกล้เคียงกับสารอ้างอิงกลุ่มเทอร์พีน มีสูตร โครงสร้างที่คล้ายรูป 3 มีชื่อว่า lupeol (Haque *et al.*, 2006)



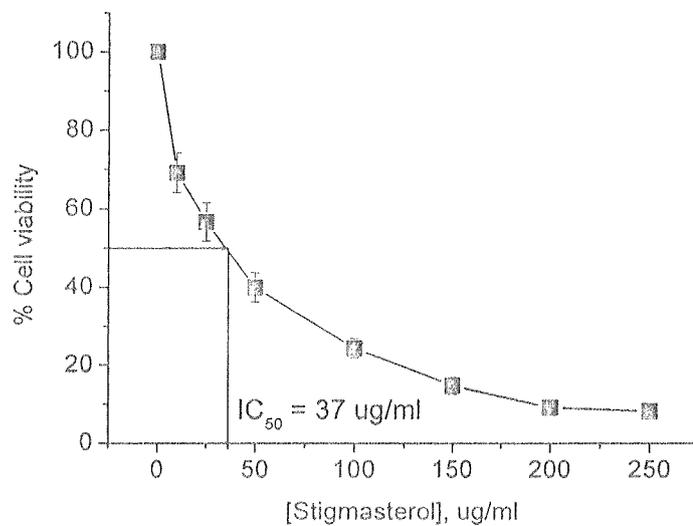
รูป 3 FRACTION 2 มีสูตร โครงสร้างสารอ้างอิง กลุ่มสเตอรอยด์ ชื่อว่า LUPEOL

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT

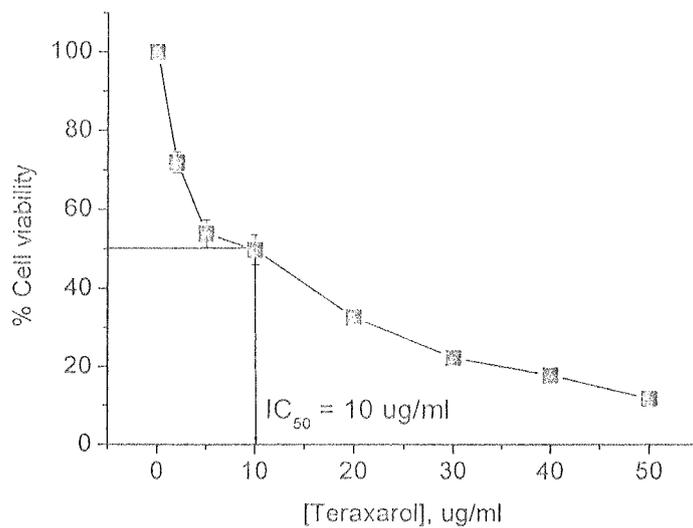
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) โดยเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบ่มเซลล์กับสารสกัดความเข้มข้น 0-250 $\mu\text{g/ml}$ และ doxorubicin (DOX) ความเข้มข้น 0-10 $\mu\text{g/ml}$ (positive control) และ 0.5% DMSO (negative control) ใน 96 well plate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมินรูปร่างของเซลล์ ลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์ ลักษณะไซโทพลาซึม ลักษณะการเกาะที่พื้นผิว เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ลอย ภายใต้กล้อง stereoscope และนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้อง stereoscope พบว่าในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% DMSO เซลล์มีลักษณะปกติ เขี่ยตัวเป็นรูปกระสวย เยื่อหุ้มเซลล์และไซโทพลาซึมเรียบ และมีจำนวนเซลล์เกาะพื้นมากกว่า 90% เมื่อได้รับการเขย่าแรงๆ เซลล์ยังคงไม่หลุดจากพื้นผิว แตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัด คือเซลล์มีรูปร่างกลมไม่เขี่ย เยื่อหุ้มเซลล์และไซโทพลาซึมขรุขระ ลักษณะการเกาะพื้นผิวไม่แน่น เมื่อเขย่าเบาๆ เซลล์หลุดจากพื้นผิวได้ง่าย ส่วนกลุ่มที่บ่มด้วย DOX พบว่าเซลล์มีลักษณะกลม เยื่อหุ้มเซลล์และไซโทพลาซึมขรุขระ การเกาะพื้นผิวไม่แน่น พบเซลล์ลอยจำนวนมาก และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT พบว่าเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัด และ DOX มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% DMSO อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการนับเซลล์มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT มีความสัมพันธ์กับการศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยกล้อง stereoscope

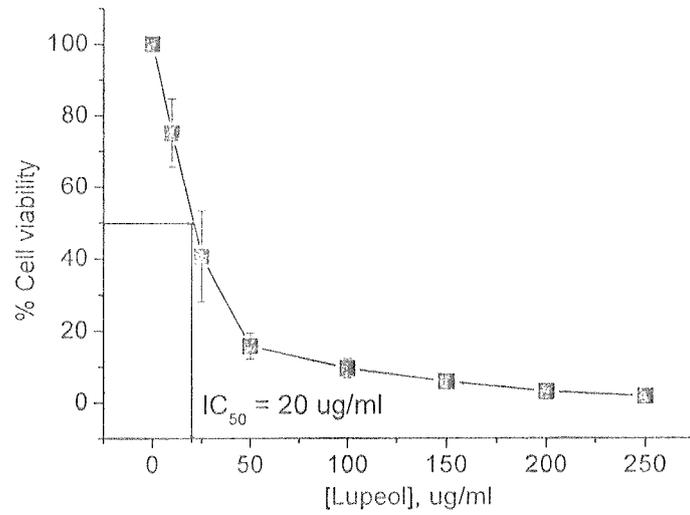
ประสิทธิภาพของสาร stigmasterol, taraxerol และ lupeol ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก มีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% (Inhibitory concentration at 50%; IC_{50}) เท่ากับ 37 ± 2.49 , 10 ± 1.3 และ 20 ± 2.6 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ในขณะที่ DOX มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.8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



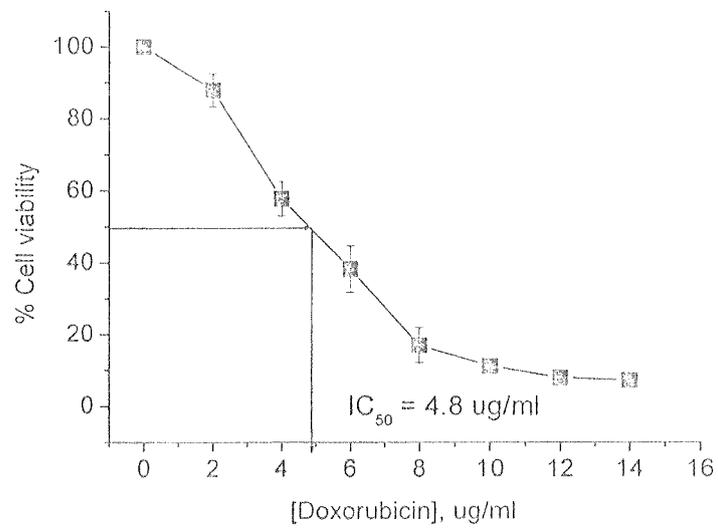
รูป 4 กราฟแสดงผลของสาร STIGMASTEROL ต่อการรอดชีวิตของ HELA CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M. (N=3)



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



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

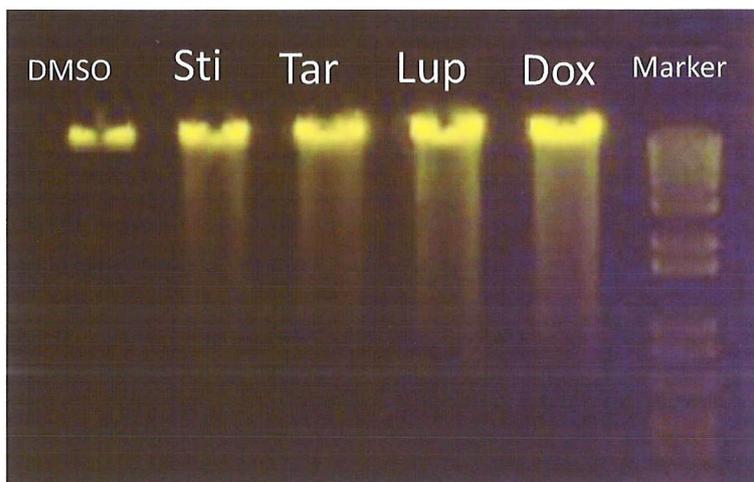


รูป 7 กราฟแสดงผลของสาร DOXORUBICIN ต่อการรอดชีวิตของ HELA CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M. (N=3)

ผลการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis

ทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อการแตกของ DNA โดยเลี้ยง HeLa cells ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด stigmasterol (Sti), taraxerol (Tar), lupeol (Lup) และ doxorubicin (Dox) (positive control) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} คือ 37 ± 2.49 , 10 ± 1.3 , 20 ± 2.6 $\mu\text{g/ml}$ และ 4.8 ± 0.86 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และ 0.5% DMSO (negative control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน flask ปริมาตร 25 cm^3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ทั้งหมด (เซลล์เกาะพื้นและเซลล์แขวนลอย) มาสกัด DNA ด้วย GF- 1 Tissue DNA Extraction Kit (VIVANTIS) แล้วนำมาวิเคราะห์การแตกของ DNA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 volt นาน 45 นาที

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



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

ผลการศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI & PI staining

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการเกิด nuclear fragmentation โดยเลี้ยง HeLa cells ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ให้เกาะบน cover slide ซึ่งแช่ใน 6 well plate นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด stigmasterol (Sti), taraxerol (Tar), lupeol (Lup) และ doxorubicin (Dox) (positive control) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} คือ 37 ± 2.49 , 10 ± 1.3 , 20 ± 2.6 $\mu\text{g/ml}$ และ 4.8 ± 0.86 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และ 0.5% DMSO (negative control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำ cover slide ที่มีเซลล์เกาะอยู่ย้อมด้วย DAPI และ PI และศึกษาลักษณะนิวเคลียสภายใต้กล้อง fluorescence microscopy ซึ่ง DAPI และ PI มีเป้าหมายเหมือนกันคือที่ nucleic acid เมื่อถูก excitation ด้วยแสงความยาวคลื่น 358 nm และ 535 nm จะ emission ได้แสงสีน้ำเงิน (461 nm) และสีแดง (617 nm) ตามลำดับ

DAPI สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ในขณะที่ PI ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่มีชีวิต และ early apoptotic cells ยังมีความสมบูรณ์ (intact membrane) จึงย้อมไม่ติดสีแดงของ PI แต่ติดสีน้ำเงินของ DAPI โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะพบลักษณะการติดสีกระจายอย่างสม่ำเสมอ (homogenous) ตลอดทั้งนิวเคลียส ในขณะที่ early apoptotic cell จะมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนของเส้นใยโครมาติน (chromatin condensation) จึงติดสีน้ำเงินของ DAPI หนาแน่น และมีนิวเคลียสขนาดเล็กกว่าปกติ และเมื่อพบการแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) จึงพบการติดสีแบบกระจายเป็นหย่อมๆ ส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ของ late apoptotic cell จะเป็นรูจิ้งย้อมติดทั้งสีแดงของ PI และสีน้ำเงินของ DAPI ซึ่งพบลักษณะของ nuclear fragmentation ได้เช่นกัน

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

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์แบบ bright field ในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด stigmasterol (Sti), taraxerol (Tar), lupeol (Lup) และ doxorubicin (Dox) ที่ความเข้มข้น 37 ± 2.49 , 10 ± 1.3 , 20 ± 2.6 $\mu\text{g/ml}$ และ 4.8 ± 0.86 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ พบเซลล์ส่วนมากมีลักษณะเซลล์กลม ไม่เหยียด เยื่อหุ้มเซลล์เป็นคุ่มพอง (bleb) ชัยโคพลาสมขรุขระ และมีจำนวนของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูป 9 D, G, J & M) (ตาราง 4)

เมื่อศึกษาลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI และ PI พบว่ากลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด stigmasterol พบเซลล์ปกติ $39.73 \pm 0.99\%$ โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงินแบบเรียบเนียน

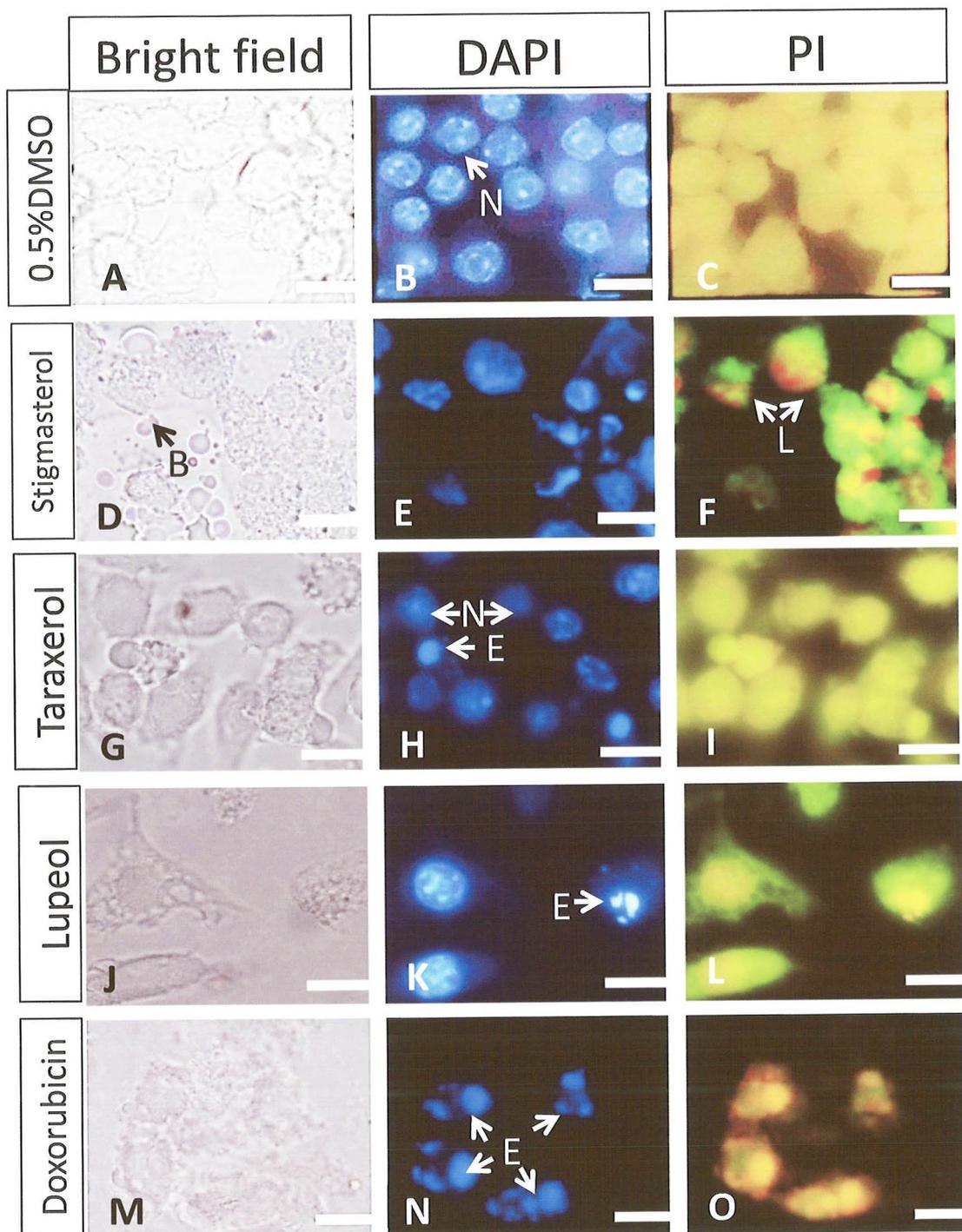
สมำเสมอแต่ไม่ติดสี PI พบเซลล์มีลักษณะ early apoptosis cells $30.27 \pm 0.9\%$ โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงิน (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) แต่ไม่ติดสี PI (รูป 9 E) และพบ late apoptotic cells $30 \pm 2.59\%$ โดยเซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีน้ำเงิน (DAPI) ร่วมกับสีแดง (PI) เป็นหย่อมๆ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

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

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

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





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

ตาราง 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิด APOPTOSIS วิเคราะห์จากการติดสี DAPI และ PI ที่นิวเคลียส

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