

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จากสารสกัดบริสุทธิ์ลำบิคดงและหัวแสนปม
Anti-proliferative activities of pure compounds from *Diospyros filipendula* and
Diospyros cauliflora

ชื่อแผนการวิจัย ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์จากสมุนไพร

ชื่อผู้วิจัย นางสาวจันทร์วรรณ แสงแข¹ และ นางวาริ เนื่องจำนงค์²

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท...การวิจัยพื้นฐาน .ประจำปี...2553...จำนวนเงิน...141,500.-....

ระยะเวลาทำการวิจัย 1.2 ปี ตั้งแต่...ธันวาคม 2552.ถึง...กุมภาพันธ์...2554.....

หน่วยงาน ¹คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ²คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

244088

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

คำสำคัญ: ลำบิคดง, หัวแสนปม, HeLa cells, ยับยั้งการเจริญเติบโต, อะโพโทซิส, การแตกของ DNA

Abstract

244088

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

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