ฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมาของคน : ศึกษาในหลอดทดลอง**

Cytotoxic Activity of Banaba's Extracts Against Human Melanoma Cells : In Vitro Study

ทัศนีย์ พาณิชย์กุล[1*] ปิยนุช พรมภมร[1] ณัฐพร บู๊ฮวด[1] สมพรทิพย์ ศรีแย้ม[1]
อารดี กาญจนประชาชัย[1] และมลิวัลย์ เอมแย้ม[2]
[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
[2]ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

ปัจจุบันสารสกัดจากอินทนิลน้ำหรือตะแบก (Banaba or Queen's flower) ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพและเวชศาสตร์เครื่องสำอางอย่างมากการทราบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดจึงเป็นเรื่องสำคัญ การศึกษาครั้งนี้ จึงศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมาของคนในหลอดทดลอง โดยทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมาที่ถูกเลี้ยงในอาหารชนิด ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, dulbecco's modified eagle medium) ที่มีส่วนผสมของซีรั่มลูกวัว 10% (10% of fetal bovine serum) และเซลล์ถูกเลี้ยงอยู่ในจานหลุม 96 หลุม (96-well tissue culture plate) ที่อุณหภูมิ 37 องศา และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ในการทดสอบใช้จำนวนเซลล์ $4X10^4$ เซลล์ต่อหลุม และทดสอบกับสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 125 -2000 µg/ml (เจือจางในอัตราส่วน 1 : 2) โดยหนึ่งความเข้มข้นถูกทดสอบต่อเซลล์สี่หลุม เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง โดยเซลล์ตายถูกล้างออกและเซลล์ที่มีชีวิตถูกย้อมด้วยสีคริสตอล ไวโอเลต (crystal violet) และวัดค่าดูดกลืนแสง (OD, optical density) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ค่า OD ที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และถูกนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ความเป็นพิษของสารที่ทำให้เซลล์ตายหรือยับยั้งเซลล์มีชีวิต 50% (EC_{50}, effective concentration inhibitory 50% of cell viability) ผลการศึกษาพบว่า ค่า EC_{50} ของสารสกัดอินทนิลน้ำ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 400, 230, 150 µg/ml ตามลำดับ ผลการวิจัยที่ได้ทำให้ทราบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดจากอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมาของคน เพื่อเป็น

* ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)
e-mail: tasanee__p@yahoo.com

**งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

แนวทางในความปลอดภัยที่จะนำสารสกัดนี้ไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่างๆ สำหรับสุขภาพและเครื่องสำอางต่อไป

คำสำคัญ : การทดสอบพิษ อินทนิลน้ำ เซลล์เมลาโนมา

Abstract

Extracts of banaba or queen crape myrtle from Lagerstroemia speciosa (L.) Pers have been useful in health science and cosmetic science. In this study, the cytotoxicity of extracts from banaba were tested against a melanoma cell line from human skin. Melanoma cells were cultured in dulbecco's modified eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in 96-well tissue culture plates. Melanoma cells, the cell numbers of $4X10^4$ cells/well were cultured in each well of 96-well plate overnight at 37°C with 5 % CO_2. The concentrations of banaba's extracts were 125 - 2000 mg/ml (in ratios of 1:2) and one concentration of each extract was added in quadruplicate wells and incubated for 24, 48, and 72 hours. After that dead cells were washed and the remaining cells were stained with crystal violet and determined the absorbance of optical density at 560 nm (OD 560 nm) by microplate reader. The percentage of cell viability was calculated from OD and the EC_{50} (effective concentration that inhibit/kill 50% of cell viability) of extracts was analysed from percents of cell viability. Results of cytotoxic test showed that EC_{50} of extracts against cells after 24, 48, and 72 hour were 400, 230, 150 µg/ml,respectively. This EC_{50} indicates the cytotoxic activity of banaba's extracts against human melanoma cells that is useful for safety in development of healt and cosmetic products.

Keywords : *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers, cytotoxicity, banaba, melanoma cells

บทนำ

ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหลายชนิดที่นำมาใช้ในคนที่มีส่วนประกอบที่ได้จากสารสกัดพืชสมุนไพร (Gonzales et al., 2006) ดังนั้นความปลอดภัยในการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาใช้ในคนจึงเป็นเรื่องสำคัญ จึงต้องมีวิธีการทดสอบคุณสมบัติของสารเหล่านั้นเพื่อความปลอดภัยโดยเฉพาะการทดสอบความเป็นพิษของสารซึ่งมีความสำคัญมาก ในการทดสอบความเป็นพิษของสารมีหลายวิธี เช่น การทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลอง การทดสอบโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง เป็นต้น การนำเซลล์ของคนมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติของสารหรือความเป็นพิษของสาร

เป็นวิธีที่ปัจจุบันเลือกใช้ทดสอบ มากกว่าที่จะทดสอบในสัตว์ทดลอง (McKim et al., 2012; Ribeiro et al., 2012) เช่น ทดสอบในหนู เนื่องจากการทดสอบในสัตว์ทดลองถูกจำกัดหรือมีข้อกำหนดในการปฏิบัติอย่างเข้มงวดทางด้านจริยธรรม และมีค่าใช้จ่ายสูง การทดสอบความเป็นพิษของสารโดยทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง จึงเป็นที่ยอมรับ และมีการพัฒนาทดสอบกับเซลล์ได้หลายชนิด ซึ่งเป็นข้อดีของวิธีนี้ เนื่องจากสามารถเลือกชนิดของเซลล์ที่จะใช้ทดสอบได้เหมาะสมกับฤทธิ์ของสารสกัด ตัวอย่างเซลล์ของคนที่ถูกเพาะเลี้ยงได้ในหลอดทดลอง ได้แก่ เซลล์เคอราติโนไซท์ (keratinocyte) เซลล์เมลาโนมา (melanoma) เซลล์เยื่อบุผิว (epithelium cells) เป็นต้น และเซลล์เพาะเลี้ยงบางชนิดสามารถเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้ตลอดกาล (cell lines) (Vunjak-Novakovic & Freshney, 2006)

ในปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากต้น Lagestroemia speciosa (L.) Pers ซึ่งมีชื่อสามัญเรียกว่า ตะแบกดำ หรือ อินทนิลน้ำ (banaba หรือ queen's flower) มาใช้ประโยชน์เกี่ยวกับสุขภาพหลายชนิด โดยสารสกัดที่ได้จากต้นอินทนิลน้ำ มีสารหลายชนิด ได้แก่ triterpene, corosolic acid, 31-norlagerenol acetate และ sitosterol acetate เป็นต้น ซึ่งสารสกัดจากอินทนิลน้ำมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อจุลินทรีย์ เป็นแอนติออกซิเด้นท์ และต้านเซลล์มะเร็ง (Liu et al., 2001; Faruk et al., 2002; Ragasa et al., 2005; Kim et al., 2012) จากคุณสมบัติของสารสกัดที่มีฤทธิ์หลายด้าน จึงมีการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดนี้มาใช้เป็นสารสำคัญหรือส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ

จากการศึกษาของนักวิจัยกลุ่มอื่น ได้นำเซลล์เมลาโนมา มาใช้ศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญทางเครื่องสำอาง และทางเภสัช (McKim et al., 2012; Ribeiro et al., 2012) การศึกษาครั้งนี้ จึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมาของคน (human melanoma cell line, C32) (Chen, 1978; Chen & Shaw, 1973) เพื่อความปลอดภัยในการนำสารสกัดอินทนิลน้ำไปใช้ประโยชน์สำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพหรือเครื่องสำอางต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมาของคนในหลอดทดลอง และศึกษาลักษณะเซลล์ตายที่เกิดจากฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สารสกัดสมุนไพร

สารสกัดจากต้นอินทนิลน้ำ (*Lagestroemia speciosa* (L.) Pers) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท คอสมีเทค จำกัด โดยถูกละลายและเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10,000 µg/ml ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ดีเอ็มเอสโอ (DMSO, dimethyl sulfonyloxide) 1% และนำมาทำให้ปลอดเชื้อโดยผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโคเมตร

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์เมลาโนมา

เซลล์เมลาโนมาของคน (ได้รับความกรุณาจาก ศ.ดร. รัชนีย์ อุดมแสงเพ็ชร ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) ถูกเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารชนิด ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, dulbecco's modified eagle medium) ที่มีส่วนผสมของซีรั่มลูกวัว 10% (10% of fetal bovine serum) และถูกอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 ˚C ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5% มีการให้อาหารแก่เซลล์อย่างสม่ำเสมอทุกๆ 2 วันและเซลล์จะต้องถูก subculture ทุกๆ สัปดาห์เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีคุณภาพพร้อมใช้งานและปลอดจากการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (สำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้รับความอนุเคราะห์ให้เข้าไปใช้ห้องปฏิบัติการที่ ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

การเลี้ยงเซลล์เมลาโนมาในจานหลุม 96 หลุม (96-well plate) โดยเลี้ยงเซลล์ที่จำนวนเซลล์ 2,500, 5,000, 10,000, 20,000, 40,000, 80,000 เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 10% FBS ถูกเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พร้อมกับทำการสังเกตการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องหัวกลับ (inverted microscope) หลังจากนั้น วัดปริมาณเซลล์โดยการย้อมด้วยสีคริสทอลไวโอเลต (crystal violet) และนำไปวัดค่า OD (optical density, ค่าการดูดกลืนแสงที่คลื่นแสง 560 nm) ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีเดอร์ (microplate readerรุ่น GLOMAX multi detection systemได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยวัณโรค หน่วยวิจัยชีวโมเลกุลทางการแพทย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ) และนำค่า OD มาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์

3. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษ

เซลล์เมลาโนมาถูกนำมาใช้ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษ (cytotoxic test) ของสารสกัดอินทนิลน้ำ โดยวิธีทดสอบดังนี้ เซลล์ถูกเลี้ยงในภาชนะจานหลุม96 หลุมที่มีอาหารและปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นเตรียมสารที่จะทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการทำให้เจือจางในอัตราส่วน 1 : 10 เท่าของปริมาตร มีดังนี้ 0.1, 1, 10, 100, 1000 µg/ml และ เจือจางในอัตราส่วน 1 : 2 เท่าของปริมาตร ดังนี้ 125, 250, 500, 1000, 2000 µg/ml การเตรียมสารต้องทำโดยวิธีที่ปลอดเชื้อ นำสารที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ มาใส่ในหลุมที่มีเซลล์เจริญอยู่ หลังจากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อในตู้อบ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อหาความมาเข้มข้นของสารและระยะเวลาที่สารออกฤทธิ์มีผลทำให้เซลล์ตายหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์ เซลล์ที่ตายถูกดูดออก เหลือแต่เซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในจานหลุม นำเซลล์ที่เหลือมาย้อมด้วยสีคริสตอล ไวโอเลต (crystal violet) และละลายสี นำมาวัดสีด้วยเครื่องไมโครเพลทรีเดอร์ นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่า EC_{50} (effective concentration inhibitory 50% of cell viability) หมายถึงที่ระดับความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์ตายหรือความมีชีวิตของเซลล์ลดลง 50% โดยเปรียบเทียบกับหลุมที่เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัด (Tengchaisri et al., 1998; Freshney, 1987)

4. การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ตาย

นำเซลล์ที่ถูกทดสอบกับสารสกัดมาศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่และเซลล์ตาย โดยการย้อมด้วยสีทริแพนบลู (trypan blue) และย้อมด้วยสีแดปี้ DAPI (4,6-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid) เพื่อดูลักษณะนิวเคลียสของเซลล์ที่แตกต่างของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตายหลังจากเซลล์ถูกทดสอบกับสารสกัดอินทนิลที่ความเข้มข้น 500 µg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เซลล์ถูกแบ่งเป็นสองส่วน โดยเซลล์ส่วนแรกถูกย้อมด้วยสีทริแพนบลู หยดเซลล์บนสไลด์ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตแยกจากเซลล์ตาย และเซลล์ส่วนที่สองถูกย้อมด้วยสีแดปี้ ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงที่ความยาวคลื่นแสง 430 nm (Tengchaisri et al., 1998) เพื่อดูลักษณะนิวเคลียสของเซลล์ตายและเซลล์ที่มีชีวิต

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่า OD (optical density) ที่วัดได้จากผลการทดลองถูกนำมาคิดวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นของความมีชีวิตของเซลล์ (% of cell viability) โดยเปรียบเทียบกับหลุมที่เซลล์ถูกทดสอบกับสารสกัดอินทนิลน้ำกับเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารทดสกัดอินทนิลน้ำแล้วจึงนำผลของเปอร์เซ็นของความมีชีวิตของเซลล์มาสร้างกราฟเพื่อวิเคราะห์หาค่า EC_{50} ของสารสกัดอินทนิลน้ำหมายถึงที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์ตายหรือค่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลง 50% เพื่อใช้ในการแปลผลการทดลอง

สูตรการหา

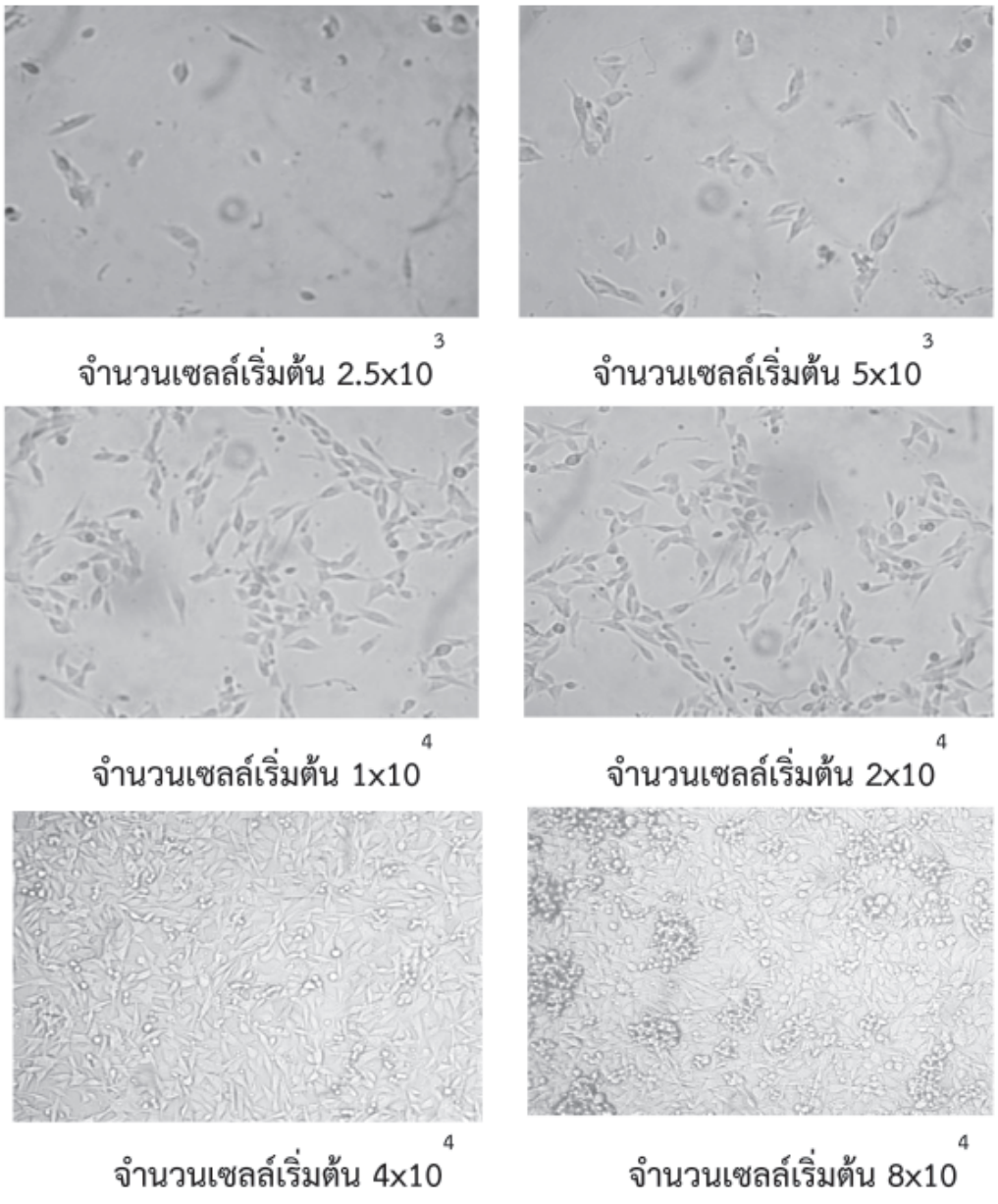
$$\text{เปอร์เซ็นของความมีชีวิตของเซลล์ (\% of cell viability)} = \frac{\text{ค่า OD ของเซลล์ในหลุมที่ทดสอบกับสาร X 100}}{\text{ค่า OD ของเซลล์ในหลุมที่ไม่มีสาร}}$$

ผลการทดลอง

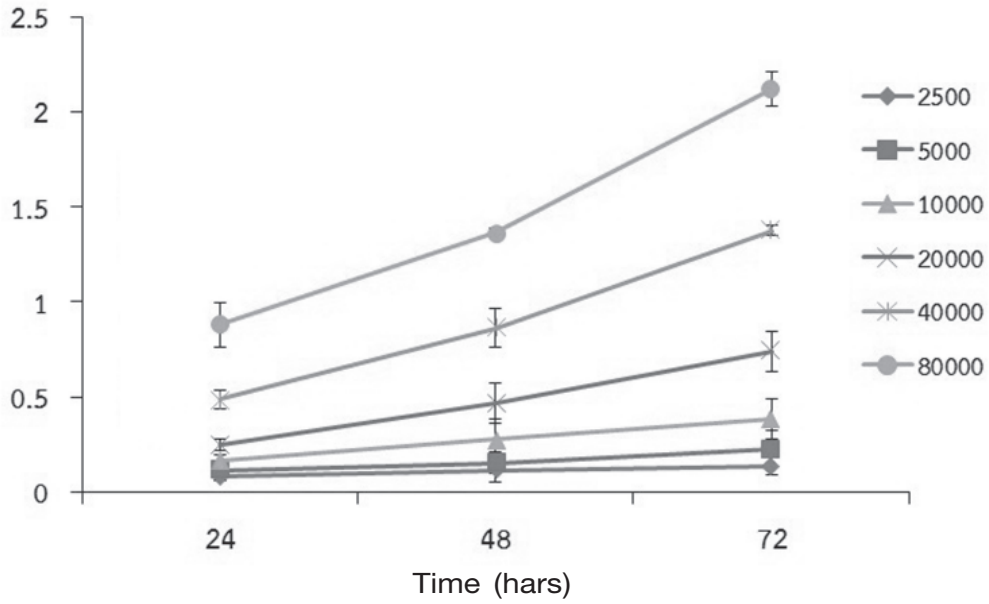
การเลี้ยงจำนวนเซลล์เมลาโนมาที่เหมาะสมในจานหลุม

จากการเลี้ยงเซลล์เมลาโนมาในจานหลุม 96 หลุม ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นดังนี้ $2.5x10^3$, $5x10^3$, $1x10^4$, $2x10^4$, $4x10^4$ และ $8x10^4$ เซลล์ต่อหลุม ดังแสดงในภาพที่ 1เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้น $2x10^3$, $5x10^3$, และ $1x10^4$ เซลล์ต่อหลุม มีการเจริญของเซลล์น้อยเมื่อเปรียบเทียบ จำนวนเซลล์เริ่มต้น $4x10^4$ เซลล์ต่อหลุม มีการเจริญเพิ่มจำนวน 80-100% ในขณะที่หลุมเริ่มต้นจำนวนเซลล์ $8x10^4$ เซลล์ต่อหลุม มีการเจริญของเซลล์และมีเซลล์บางส่วนตายสำหรับภาพที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์กราฟการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ที่แปรผันตามค่า OD (optical density) พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้น $4x10^4$ เซลล์ต่อหลุมมีเซลล์เพิ่มจำนวนโดยวัดค่า OD ได้ 0.487±0.049 (ค่าเฉลี่ย±SD) ที่ 24 ชั่วโมง และเมื่อครบเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงเซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นแปรผันตามค่า OD ดังนี้ 0.861±0.152 และ 1.376±0.027 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าจำนวนเซลล์ที่ $4x10^4$

เซลล์ต่อหลุมเป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมเนื่องจากเซลล์เจริญได้พอเหมาะกับพื้นที่ในหลุม และไม่พบเซลล์ตาย จึงถูกเลือกนำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อไป



ภาพที่ 1 การเจริญของเซลล์ที่จำนวนเซลล์ในจานหลุม 96 หลุม เป็นเวลา 72 ชั่วโมงดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับที่กำลังขยาย X 200



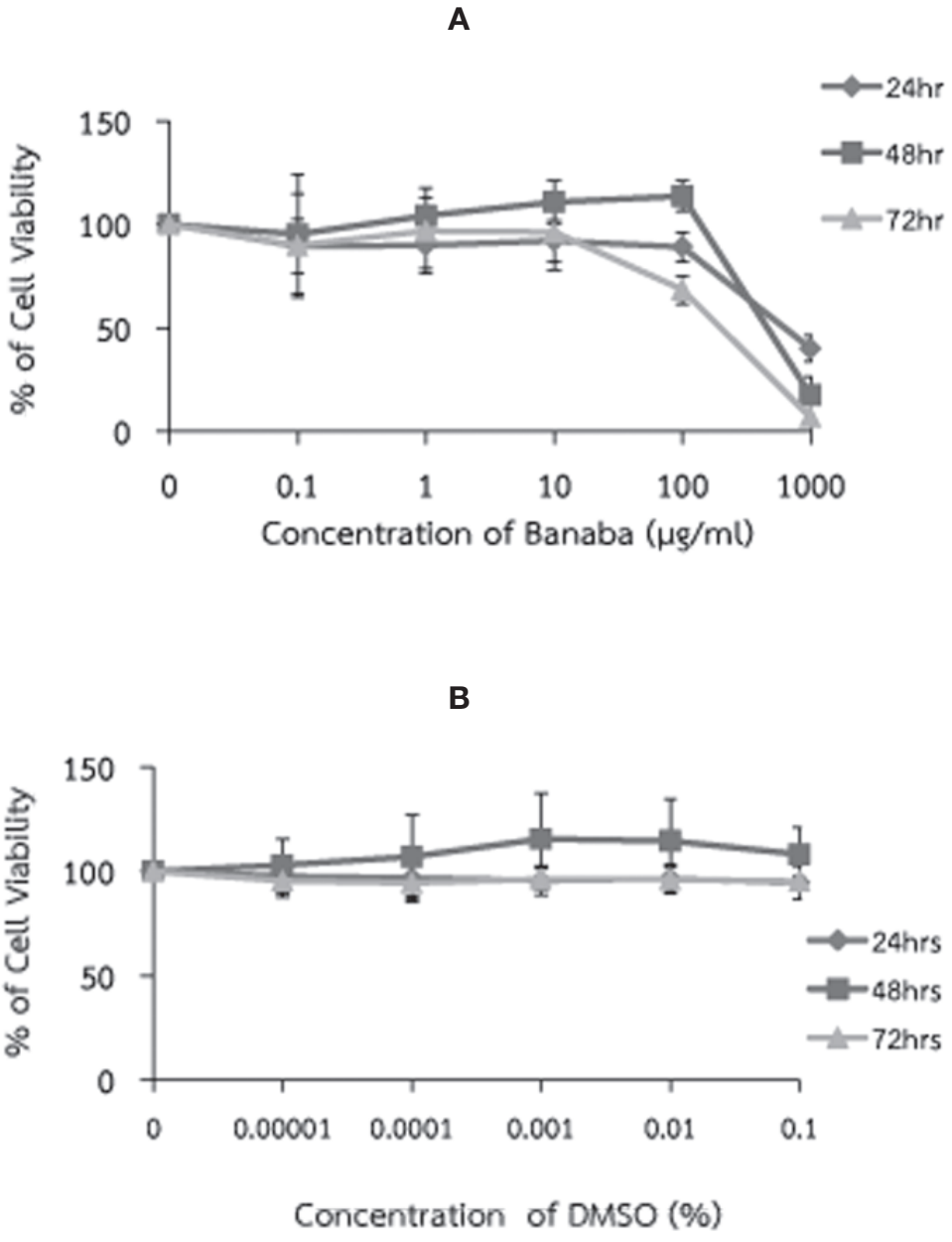
ภาพที่ 2 จำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่ถูกเลี้ยงในจานหลุม 96 หลุมเป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง ค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสง (optical density) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยคำนวณจากสามการทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมา

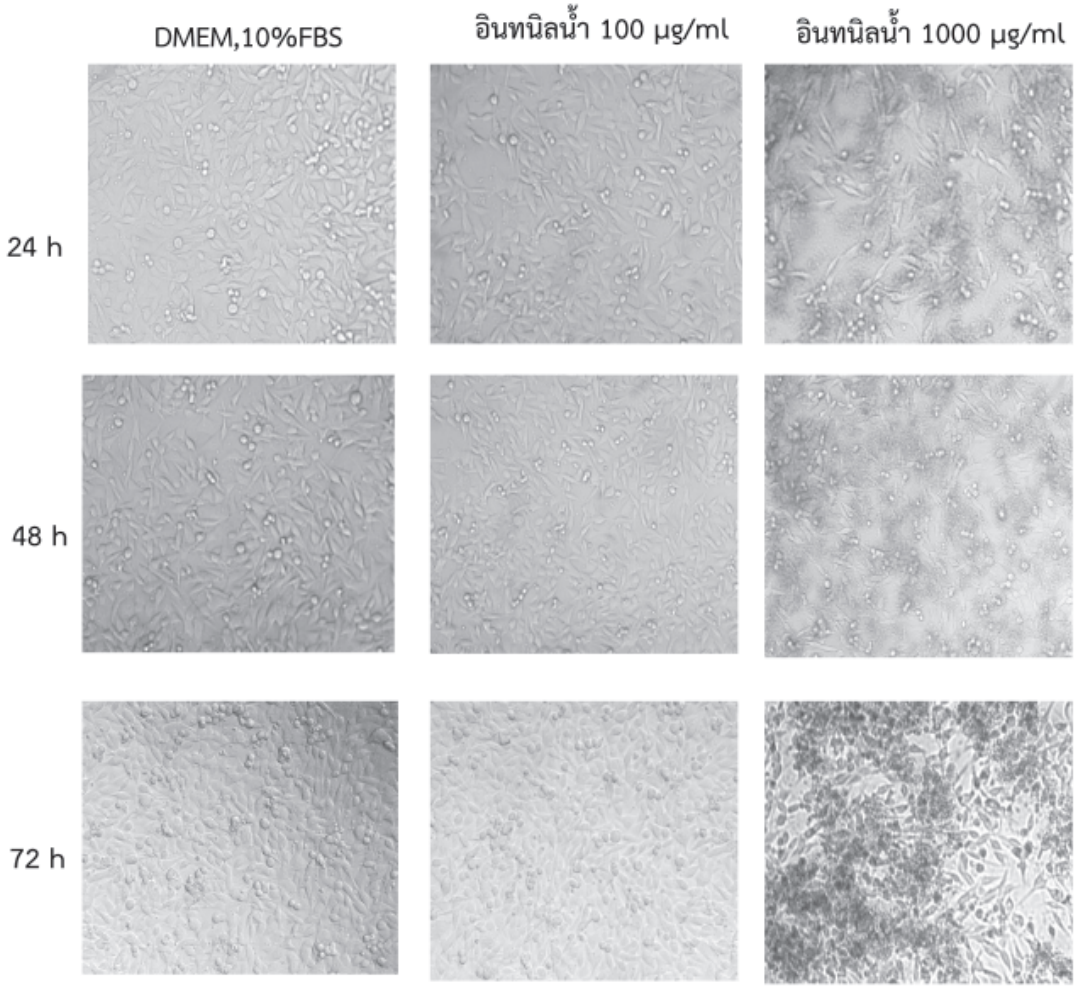
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมา ในภาพที่ 3 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำที่ถูกเจือจางในอัตราส่วน 1 : 10 (0.1-1000 µg/ml) ซึ่งถูกละลายในสารดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.00001 - 0.1% และทดสอบเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากภาพที่ 3 (A) ผลการทดสอบพบว่า เซลล์ที่อยู่ในหลุมที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 0.1 - 10 µg/ml เมื่อเวลาผ่านไป 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ค่าความมีชีวิตของเซลล์อยู่ระหว่าง 89±13 - 110±10% เมื่อเทียบกับค่าความมีชีวิตของเซลล์ในหลุมที่ไม่มีอินทนิลน้ำ ซึ่งแสดงว่าสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 0.1 - 10 µg/ml ไม่ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/ml ค่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือ 68±6% เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมงและที่ระดับความเข้มข้น 1000 µg/ml ค่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือ 39±6, 17±9 และ 6±5% เมื่อเวลาผ่านไป 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 (A) แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำอยู่ที่ความเข้มข้นระหว่าง 100 - 1000 µg/ml ในขณะที่สารดีเอ็มเอสโออย่างเดียวที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.00001 - 0.1% พบว่าผลการทดสอบกับเซลล์ค่าความมีชีวิตของเซลล์อยู่ที่ 97±6 - 102±5% เมื่อเวลาผ่านไป 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

แสดงให้เห็นว่าดีเอ็มเอสโอที่ระดับความเข้มข้น 0.00001 - 0.1% ไม่มีฤทธิ์ในการลดค่าความมีชีวิตของเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ในหลุมที่ไม่มีสารดีเอ็มเอสโอดังแสดงในภาพที่ 3 (B) ดังนั้นผลการทดสอบนี้เป็นการแสดงผลของฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำอย่างชัดเจน

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมาที่ความเข้มข้น 100 และ 1000 µg/ml ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1,000 µg/ml มีผลทำให้เซลล์ตายตั้งแต่ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ไม่มีผลทำให้เซลล์ตายหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 48 ชั่วโมงแต่ที่เวลา 72 ชั่วโมงพบว่าเซลล์การเจริญน้อยกว่าโดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในหลุมที่ถูกเลี้ยงในอาหาร (DMEM, 10% FBS) ที่ไม่มีสารอินทนิลน้ำดังแสดงในภาพที่ 4



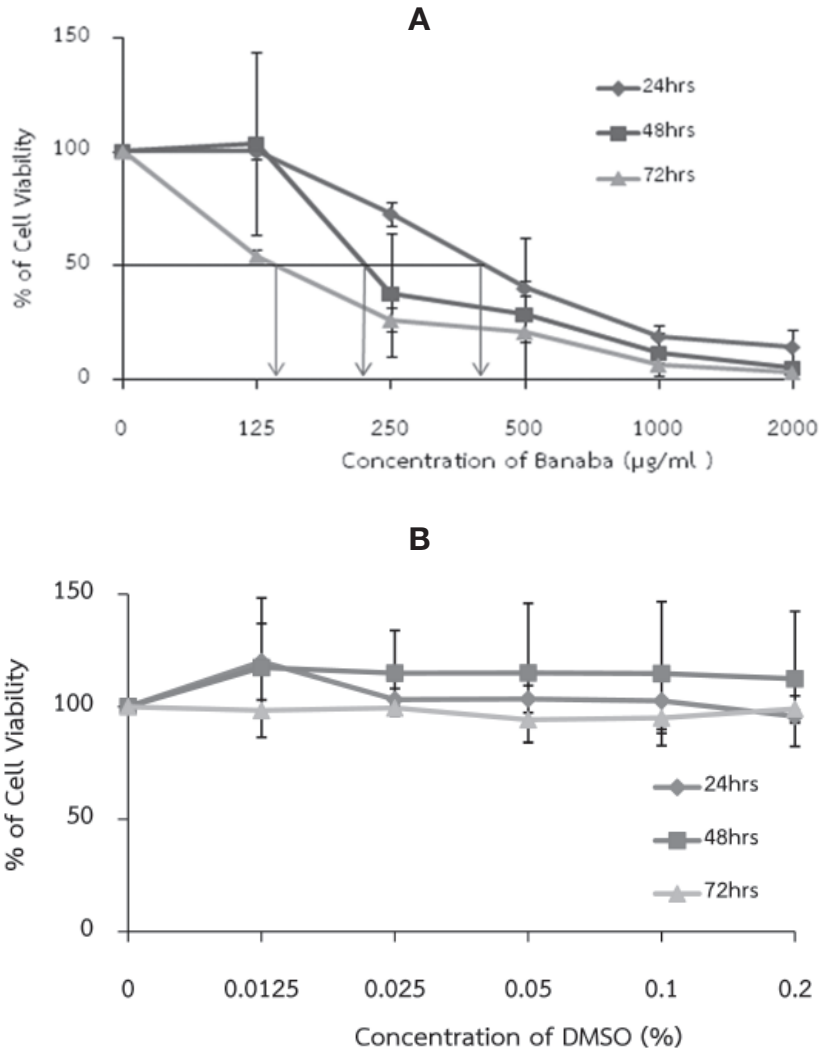
ภาพที่ 3 ฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำ A) สารสกัดอินทนิลน้ำเจือจางที่อัตราส่วนหนึ่งต่อสิบ และ B) ดีเอ็มเอสโอ (DMSO) เจือจางที่อัตราส่วนหนึ่งต่อสิบต่อเซลล์เมลาโนมาเป็นระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของค่าความมีชีวิตของเซลล์ (% of cell viability) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยคำนวณจากสามการทดลอง



ภาพที่ 4 ภาพเซลล์เมลาโนมาที่เลี้ยงในอาหาร (DMEM 10% FBS) ที่มีและไม่มีสารสกัดอินทนิลน้ำ ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับที่กำลังขยาย X 200

การทดสอบสารอินทนิลน้ำเพื่อหาค่า EC_{50} (effective concentration inhibitory 50% of cell viability) คือการหาความเข้มข้นของสารสกัดอินทนิลน้ำที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษทำให้เซลล์ตายหรือลดค่าความมีชีวิตของเซลล์เหลือ 50% จากการทดสอบสารอินทนิลน้ำที่ถูกเจือจาง 1 : 10 ในข้างต้นทราบว่าฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำอยู่ระหว่างความเข้มข้น 100 - 1000 µg/ml ดังนั้นจึงทำการทดสอบโดยการเจือจางสารในอัตราส่วน 1 : 2 ดังนี้ 125, 250, 500, 1000 และ 2000 µg/ml และนำความเข้มข้นดังกล่าวมาทดสอบกับเซลล์เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบว่าฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำโดยการวิเคราะห์หาค่า EC_{50} ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 400, 230 และ 130 µg/ml ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 5 (A) นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารดีเอ็มเอสโอ

ที่ความเข้มข้น 0.0125 - 0.2% ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ใช้ละลายสารอินทนิลน้ำในการทดสอบครั้งนี้ ผลการทดสอบพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็มเอสโอ 0.0125 - 0.2% ต่อเซลล์เมลาโนมา ไม่มีผลลดความมีชีวิตของเซลล์หรือค่าความมีชีวิตเท่ากับ 100% เมื่อเทียบกับเซลล์ในหลุมที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารดีเอ็มเอสโอเมื่อเวลาผ่านไป 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 5 (B) ดังนั้น ผลการลดค่าความมีชีวิตของเซลล์หรือทำให้เซลล์ตายนั้นเกิดจากฤทธิ์ความเป็นพิษของสารอินทนิลน้ำ



ภาพที่ 5 ฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำอัตราส่วนหนึ่งต่อสองทดสอบกับเซลล์เมลาโนมา ผลการวิเคราะห์ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมงค่า EC_{50} เท่ากับ 400 µg/ml (ลูกศรสีฟ้า) 230 µg/ml (ลูกศรสีแดง) และ 130 µg/ml (ลูกศรสีเขียว) ตามลำดับ B) ฤทธิ์ของสารดีเอ็มเอสโอ (DMSO) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.0125-0.2%, ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของค่าความมีชีวิตของเซลล์ (% of cell viability) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน คำนวณจากสามการทดลอง

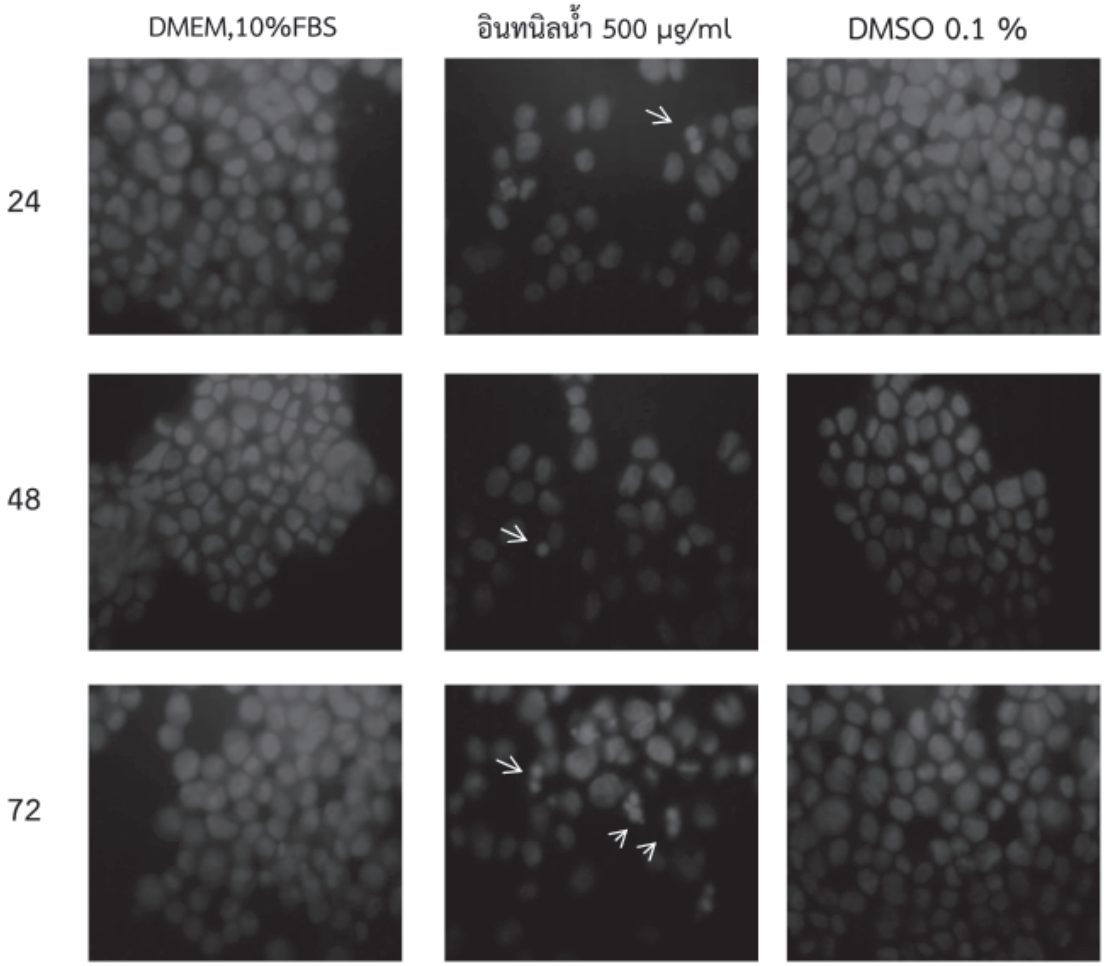
การตายของเซลล์เมลาโนมาเกิดจากฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำ

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 500 µg/ml เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมงเซลล์ที่มีชีวิตถูกวัดโดยการย้อมด้วยสีทริปแพนบลู (trypan blue) และวิเคราะห์เป็นค่าความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ดังแสดงในตารางที่ 1 จะเห็นว่า เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อเวลาเพิ่มจาก 24 ชั่วโมง ถึง 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ได้ย้อมเซลล์ด้วยสีแดปี้ (DAPI, 4, 6-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid) ซึ่งเป็นสีย้อมนิวเคลียสของเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 6 จะเห็นได้ว่าสารสกัดอินทนิลน้ำมีฤทธิ์ทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโตซิส (apoptosis) โดยเซลล์ที่ตายมีลักษณะของนิวเคลียสหดตัวและขนาดเล็กลง (ภาพที่ 6, ลูกศรชี้) ในขณะที่สารละลายดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.1% และเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหาร (DMEM 10% FBS) ไม่พบเซลล์ตายแบบอะพอพโตซิส

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์หลังจากถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดอินทนิลน้ำ

	% of cell viability*		
	24 ชั่วโมง	**48 ชั่วโมง**	**72 ชั่วโมง**
DMEM, 10% FBS	100	100	100
อินทนิลน้ำ 500 µg/ml	60.3 ± 7	25.7 ± 5	18.5 ± 4
DMSO 0.1 %	100 ± 5	100 ± 6	98 ± 7

*ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของค่าความมีชีวิตของเซลล์ (% of cell viability) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยคำนวณจากสามการทดลอง



ภาพที่ 6 ภาพเซลล์ตายของเซลล์เมลาโนมาจากฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำ เซลล์ที่ตายมีลักษณะการตายแบบ อะพอพโตซิส (apoptosis) นิวเคลียสของเซลล์ขนาดเล็กลง (ลูกศรชี้) ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงที่กำลังขยาย X 400

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมาใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษ (cytotoxicity assay) ต่อเซลล์ในหลอดทดลอง หลักการทำงานของ วิธีการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษคือเซลล์ซึ่งยังมีชีวิตอยู่ หรือยังมีเมตาบอลิซึม (metabolically active) เท่านั้นที่ถูกย้อมสีคริสทอล ไวโอเลท (crystal violet) ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงินและมีความสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 560 nm (Tengchaisri et al., 1998) ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของสีม่วงน้ำเงิน อันแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้น จึงสามารถวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่

ข้อดีของวิธีนี้ สามารถทำได้ง่ายและสะดวก ไม่มีสารที่ก่อให้เกิดอันตราย เช่น สารกัมมันตภาพรังสี เป็นต้น และราคาไม่สูง นอกจากนี้ สีคริสทอลไวโอเลทสามารถถูกเก็บไว้ได้นาน และประยุกต์ใช้ในการศึกษาในเซลล์ชนิดอื่นๆ ได้ เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ ที่ใช้การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษของสาร เช่น MTT (3-4, 5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium romide test) และ MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) เป็นต้น ซึ่งมีข้อจำกัดคือ ขั้นตอนมีหลายขั้นตอน สารฟลูออเรสเซ้น หรือสารที่ใช้มีฤทธิ์ก่อมะเร็งซึ่งเป็นอันตราย และราคาแพง (Mosmann, 1983; Denizot & Lang,1986; Cory et al., 1991, Mao et al., 2012) ในปี ค.ศ. 2012 ได้มีการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำ พบว่า ฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำทดสอบกับเซลล์ 3T3-L1 adipocytes พบว่าสารมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ 50% ที่ความเข้มข้น 2154 microg/ml (Kesavanarayanan et al., 2012). จากการสืบค้น พบว่า มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของคนค่อนข้างน้อย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมา โดยประยุกต์การเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานหลุม 96 หลุม (96-well tissue culture plate) เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารได้จำนวนมากแต่ใช้เซลล์จำนวนน้อย และเป็นการเพิ่มศักยภาพการทดสอบและลดการใช้ทรัพยากรให้น้อยลง

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมา พบว่า ค่า EC_{50} เท่ากับ 400, 230, 130 µg/ml ที่เวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการทดสอบ เมื่อเพิ่มเวลาการทดสอบสารจะออกฤทธิ์แรงมากขึ้น นั้นหมายถึงระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้ลดลง ซึ่งข้อมูลพื้นฐานนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์และพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดอินทนิลน้ำเป็นสารที่ถูกนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน รวมทั้งด้านสุขภาพและความงาม ดังนั้นจึงมีความสำคัญในการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดก่อนนำไปใช้ เพื่อความปลอดภัยต่อผู้ใช้ การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นวิธีทดสอบที่ปฏิบัติได้ไม่ยุ่งยาก โดยประยุกต์การทดสอบในจานหลุม 96 หลุมซึ่งใช้จำนวนเซลล์น้อยแต่สามารถทดสอบตัวอย่างสารเพิ่มขึ้น และการใช้สีคริสทอล ไวโอเลต (crystal violet) ย้อมโปรตีนของเซลล์ซึ่งมีราคาถูกและไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้

ในการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมาของคน จากการศึกษาได้ทำการทดลองหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม เพื่อที่จะนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสาร โดยในการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลาที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลที่ได้จาการทดลองหาความเข้มข้นของสารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษโดยวิเคราะห์จากค่า EC_{50} หรือมีฤทธิ์ที่ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ลดลง 50% จากการศึกษาพบว่า สารสกัดอินทนิลน้ำมีค่า EC_{50} เท่ากับ 400, 230, 130 µg/ml ที่เวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับในขณะที่สาร ดีเอ็มเอสโอ (DMSO) ที่ใช้เป็น

ตัวทำละลายสารสกัดอินทนิลน้ำ ได้ถูกนำมาทดสอบเช่นกัน พบว่า ดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้นมากกว่า 1% มีฤทธิ์ที่ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลง ที่เวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง แต่ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 1% ดีเอ็มเอสโอไม่มีฤทธิ์ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ความเข้มข้นของดีเอ็มเอสโอน้อยกว่า 1% ดังนั้นฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดที่มีผลต่อเซลล์เมลาโนมา เกิดจากฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำ ไม่ได้เกิดจากดีเอ็มเอสโอ

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในด้านอื่นๆ และการทดสอบของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์หลายชนิดเพิ่มขึ้น

2. สารที่จะถูกนำมาทดสอบเป็นชนิดผงจะสามารถปรับระดับความเข้มข้นได้โดยไม่มีฤทธิ์ของตัวทำละลายมารบกวนในการทดสอบและในการทำการทดลองควรระวังการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองอุปกรณ์ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Chen TR, Shaw MW. (1973). Stable chromosome changes in human malignant melanoma. *Cancer Res,* 33, 2042-2047.

Chen TR. (1978). Evolution in vitro of stemlines with minimal karyotypic deviations in a human heteroploid cell line. *J Natl Cancer Inst,* 61, 277-284.

Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G. (1991). Use of a aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun,* 3, 207-212.

Denizot F., Lang R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods,* 89, 271-277.

Faruk M.J.A., Nahar N., Aziz M.A., Mosihuzzaman M., Rashid M.A. (2002). Two new ellagic acids from *Lagerstromia speciosa* Linn. Plant. *J Bangladesh Chemical Society,* 15, 73-78.

Freshney R.I. (1987). *Culture of animal cells* (2nd eds.). New York : Wiley-Liss.

Gonzales G.F., Valerio Jr. L.G. (2006). Medicinal plants from Peru : a review of plants as potential agents cancer. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry,* 6, 429-444.

Kesavanarayanan K.S., Sathiya S., Ranju V., Sunil A.G., Ilavarasan R., Saravana Babu C., Kavimani S., Prathiba D. (2012). In vitro cytotoxic, antioxidative and alpha-glucosidase inhibitory potential of a herbal mixture comprised of Allium sativum and Lagerstroemia speciosa. *Eur Rev Med Pharmacol Sci,* 16, 58-68.

Kim HJ, Yoon KH, Kang MJ, Yim HW, Lee KS, Vuksan V, Sung MK. (2012). A six-month supplementation of mulberry, korean red ginseng, and banaba decreases biomarkers of systemic low-grade inflammation in subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Evid Based Complement Alternat Med,* 735191.

Liu F., Kim J., Li Y., Liu X., Li J., Chen X. (2001). An extract of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *J Nutr,* 131, 2242-2247.

Mao W., Chen X., Yang T., Yin Y., Ge M., Luo M., Chen D., Qian X. (2012). A rapid fluorescent screening method for cellular sensitivity to anti-cancer compound. *Cytotechnology,* 64, 451-457.

McKim JM Jr, Keller DJ 3rd, Gorski JR. (2012). An in vitro method for detecting chemical sensitization using human reconstructed skin models and its applicability to cosmetic, pharmaceutical, and medical device safetytesting. *Cutan Ocul Toxicol,* 1-4.

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods,* 65, 55-63.

Ragasa C.Y., Ngo H.T., Rideout J.A. (2005). Terpenoids and sterols from *Lagerstroemia speciosa*. J *Asia Natural Products Res,* 7, 7-12.

Ribeiro S.S., de Jesus A.M., Dos Anjos C.S., da Silva T.B., Santos A.D., de Jesus J.R., Andrade M.S., Sampaio T.S., Gomes W.F., Alves P.B., Carvalho A.A., Pessoa C., de Moraes M.O., Pinheiro M.L., Prata A.P., Blank A.F., Silva-Mann R., Moraes V.R., Costa E.V., Nogueira P.C., Bezerra D.P. (2012). Evaluation of the cytotoxic activity of some brazilian medicinal plants. *Planta Med,* 78, 1601-1606.

Tengchaisri T., Chawengkirttikul R., Rachaphaew N., Reutrakul V., Sahgsuwan R., Sirisinha S. (1998). Antitumor activity of triptolide against cholangiocarcinoma growth in vitro and in hamster. *Cancer Lett,* 133, 169-175.

Vunjak-Novakovic G., Freshney R.I. (2006). *Culture of cells for tissue engineering.* New Jersey: John Wiley & Sons.

คณะผู้เขียน

ผศ.ดร. ทัศนีย์ พาณิชย์กุล
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
204/3 ถ.สิรินธรเขตบางพลัดกรุงเทพฯ 10700
e-mail:tasanee__p@yahoo.com

ดร. ปิยนุช พรมภมร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
204/3 ถ.สิรินธรเขตบางพลัดกรุงเทพฯ 10700
e-mail: piyanuch__ppm@hotmail.com

ณัฐพร บู๊ฮวด
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
204/3 ถ.สิรินธรเขตบางพลัดกรุงเทพฯ 10700
e-mail: NATTAPORN2608@gmail.com

สมพรทิพย์ ศรีแย้ม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
204/3 ถ.สิรินธร เขตบางพลัดกรุงเทพฯ 10700
e-mail: memory__jubu@hotmail.com

อารดี กาญจนประชาชัย
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
204/3 ถ.สิรินธร เขตบางพลัดกรุงเทพฯ 10700
e-mail: memory__jubu@hotmail.com

มลิวัลย์ เอมแย้ม
ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถ.พระราม6 เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400