

เอกสารอ้างอิง

- อภิวัฒน์. เวชศาสตร์โมเลกุล. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์จุฬา, 2546.
- ชัยพล. การศึกษาทางพิษเคมีของขมิ้นขาว. การค้นคว้าแบบอิสระเชิงวิทยานิพนธ์ สาขาการสอนเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2528.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, DG., Heuser, JE., Wang, X. and Akey, CW. "Three – dimensional structure of the apoptosome : implications for assembly, procaspase – 9 binding, and activation." Molecular Cell 2002, 9 : 423 – 32.
- Aggarwal, B., and Shishodia, S. Molecular targets of dietary agent for prevention and therapy of cancer." Biochemical Pharmacology 2006, 71 : 1397 - 1421.
- Akihisa, T., Tokuda, H., Ukiya, M., Iizuka, M., Schneider S., Ogasawara, K., Mukainaka, T., Iwatsuki, K., Suzuki, T., and Nishino, H. "Chalcones, coumarins and flavanones from the extract of *Angelica keiskei* and their chemopreventive effects." Cancer Letters 2003, 201 : 133 – 137.
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer J.P., and Mason, T.J. "Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry." Ultrasonics sonochemistry 2004, 11 : 261 – 265.
- Babu, T.D., Kuttan, G., and Padikkala, J. "Cytotoxic and anti – tumour properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) Urban." Journal of Ethnopharmacology 1995, 48 : 53 – 57.
- Badami, S., Vijayan, P., Chandrashekar, R., Godavarthi, A., Dhanaraj, S., and Suresh, B. In vitro cytotoxic properties of *Grewia Tiliaefolia* bark and lupeol." Indian Journal of Pharmacology 2003, 35 : 250 – 251.
- Bortner, C., Nicklas B. E. Oldenburg, and John A. Cidlowski. " The role of DNA fragmentation in apoptosis." Trends in cell biology 1995, 5 : 21 – 26.
- Cheng, Y., Chang, W., Lee, S., Liu, Y., Chen, C., Lin, S., Tsai, N., Yu, D., Yen, C., and Harn, H. "Acetone extract of *Angelica sinensis* inhibits proliferation of human cancer cells via inducing cell cycle arrest and apoptosis." Life Science 2004, 75 : 1579 – 1594.
- Dasgupta, T., Rao, A., and Yadava, P. "Chemomodulatory efficacy of basil leaf (*Ocimum*

basilicum) on drug metabolizing and antioxidant enzyme, and on carcinogen - induced skin and forestomach papillomagenesis." Phytomedicine 2004, 3 : 139 – 151.

Engeland,M., Nieland, L., Ramaekers, F.,and Schutte, B. "Annexin V – affinity assay : a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry 1998, 1 : 1 – 9.

Gewies, A. Introduction to Apoptosis [Online], accessed 23 February 2006. Available from [http : // www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm](http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm)

Gulcin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., and Elias, R. "Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* tuber." Phytomedicine 2006, 13 : 343 – 351.

Hennino A, Berard, M., Casamayor-Palleja, M. "Regulation of the Fas death pathway by FLICE – inhibitory protein in primary human B cells." The Journal of Immunology 2000,165 : 3023 – 3030.

Keum, Y., Kim, J., Lee, K., Park, K., Surh, Y., Lee, J., Lee, S., Yoon, J., Joo, S., Cha, I., and Yook, J. "Induction of apoptosis and caspase – 3 activation by chemopreventive (6) – paradol and structurally related compounds in KB cells." Cancer Letters 2002, 177 : 41 – 47.

Lagarkova, M., Iarovaia, O., and Razin, S. " Large – scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomer." The American Society for Biochemistry and Molecular Biology 1995, 270 : 20239 – 20241.

Lee, E., and Young, J. "Induction of apoptosis in HL – 60 cells by pungent vanilloids, (6) – gingerol and (6) – paradol." Cancer Letters1998, 134 :163 – 168.

Leist, M and Jaattela, M. " Four deaths and a funeral : from caspase to alternative mechanisms." Nature Reviews Molecular Cello Biology 2001, 8 : 589 – 598.

Lundberg, A., and Weinberg, R. "Control of the cell cycle and apoptosis." European Journal of Cancer 1999, 35 : 777 – 785.

Manosroi, J., Dhumtanom, P., and Manosroi, A. "Anti – proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 celllines." Cancer Letters 2005, : 1 – 7.

Miyoshi, N., Nakamura, Y., Ueda, Y., Abe, M., Ozawa, Y., Uchida, K., and Osawa, T.

“Dietary ginger constituents, galanals A and B, are potent apoptosis inducers in Human T lymphoma Jurkat cells.” Cancer Letters 2003,199 :113 – 119.

Moongkarndi, P., Kosem, N., Kaslungka, S., Luanratana, O., Pongpan, N., and Neungton, N. “Antiproliferation, antioxidant and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line.” Journa Ethnopharmacology 2004, 90 : 161 – 166.

Murakami, A., Jiwajinda, S., Koshimizu, K., and Ohigashi, H. “Screening for in vitro anti – tumor promoting activities of edible plants from Thailand.” Cancer Letters 1995, 95 : 139 – 146.

Okada, N., Hirata, A., Murakami, Y., Shoji, M., Sakagami, H., and Fujisawa, S. “Induction of cytotoxicity and apoptosis and inhibition of cyclooxygenase – 2 gene expression by eugenol – related compounds.” Anticancer Research 2005, 25 : 3263 – 3269.

Prakash, J., and Gupta, S. “Chemopreventive activity of *Ocimum sanctum* seed oil.” Journal of Ethnopharmacology 2000, 72 : 29 – 34.

Prashar, R., Kumar, A., Banerjee, S., and Rao, A. “Chemopreventive action by an extract from *Ocimum sanctum* on mouse skin papillomagenesis and its enhancement of skin glutathione S – transferase activity and acid soluble sulfydryl level.” Anticancer Drugs 1994, 5 : 567 – 572.

Ramos, R. Bioactive Phyto compounds [Online], accessed 23 February 2006. Available. From [www.media. weley. Com/product_data/excerpt/06/35273153/3527315306.pdf](http://www.media.weley.com/product_data/excerpt/06/35273153/3527315306.pdf).

Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V. “Apoptosis : definition, mechanisms, and relevance to disease. The American Journal of Medicine 1999, 107 : 489 – 506.

Salisova, M., Toma, S.,and Manson, T. Sonochemistry 1997, 4 :131.

Selma, R. “Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques.” Annals of the Brazilian Academy of Sciences 2004, 3.

Shawkat, M., Banskota, A., Tezuka, Y., Saiki, I., and Kadota, S. “Antiproliferative Activity of Diarylheptanoids from the Seeds of *Alpinialepharocalyx*.” Biological & Pharmaceutical Bulletin 2001, 5 : 525 – 528.

Van, C. and Broeck, V. " Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis." Anatomia Histologia Embryologia 2002, 31 : 214 - 223.

Vermes, H. and Perger, R. "Flow cytometry of apoptotic cell death." Journal of Immunological Method 2000,21 :167 – 190.

Vieira, R., Grayer, R., Paton, A., and Simon, J." Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers." Biochemical Systematics and Ecology 2001, 3 : 287- 304.

Wyllie, A. Apoptosis and cell proliferation. Roche Molecular Biochemicals Germany : 1 – 25.

Ya – Ling, H., Kuo, P., and Lin, C. "The proliferative inhibition and apoptotic mechanism of Saikosaponin D in human non – small cell lung cancer A549 cells." Life Science 2004,1 – 12.

Yan, B. A novel role of DNA fragmentation factor as a tumor suppressor through maintaining genomic stability [Online], accessed 23 February 2006. Available. From [http : // www.bnl.gov/usercenter/Thesis/2006/Thesis_Yan.pdf](http://www.bnl.gov/usercenter/Thesis/2006/Thesis_Yan.pdf).

Yooa, C., Hana, K., Chob, K., Hab, J., Parkc, H., Namc, J., Kild, U., and Leea, K." Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species – mediated apoptosis in HL– 60 human promyelocytic leukemia cells." Cance Letters 2005, 225 : 41 - 52.

Zheng, G., Kenney, P., Zhang, J., and Lam, L. "Inhibition of benzo(a) pyrene – induced tumorigenesis by myristicin,a volatile aroma constituent of parsley leaf oil." Carcinogenesis 1992,10 : 1921 –1923.

Zheng, G., Kenney, P., and Lam, L. "Anethofuran, Carvone, and Limonene : Potential Cancer Chemopreventive Agent from Dill weed oil and Caraway oil." Planta Medica 1992, 58 : 338 – 341.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเซลล์และสารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1. ละลายอาหารผง (RPMI 1640, MEM) 1 ซอง ในน้ำบริสุทธิ์ 800 ml จนเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ละลาย NaHCO_3 ในน้ำบริสุทธิ์ 50 ml (RPMI 1640 ใช้ 2 g/l, MEM ใช้ 2.2 g/l) เเทลงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. เติม serum ที่ผ่านการ inactivate แล้ว (56°C , 30 นาที) ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1 ลิตร
4. กรองอาหารผ่าน membrane ขนาด $0.2\ \mu\text{m}$ ในตู้ปลอดเชื้อ เก็บอาหารที่อุณหภูมิ 4°C

การเตรียม Phosphate buffered saline (PBS, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Free)

1. ชั่ง NaCl 8 g, KCl 0.2 g, 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. นำไปทำไ้เชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่ 121°C นาน 20 นาที
5. เก็บสารละลาย PBS ในตู้เย็น

การเตรียม Trypsin EDTA 0.25%

1. ชั่ง Trypsin (1:250) 0.25 g และ $\text{EDTA}(\text{Na}_2)$ 3.74 g ละลายในสารละลาย PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Free) 100 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.4-7.6
2. กรองผ่านตัวกรองขนาด $0.2\ \mu\text{m}$ ลงในขวดปลอดเชื้อ

การเตรียม Crystal violet (0.1%) (W/V)

1. เตรียมสารละลาย citric acid 0.1 M 100 ml
2. ชั่ง crystal violet 0.1 g ละลายในสารละลาย citric acid 0.1 M 100 ml เก็บในขวดสีชา

ภาคผนวก ข
การนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer

Hemocytometer เป็นแผ่นสไลด์แก้วที่มีตารางเป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็กๆ 9 ช่อง แต่ละช่องมีพื้นที่ 1 mm^2 เมื่อปิดด้วย cover slip เฉพาะของมันเป็นตำแหน่งที่ถูกต้อง จะให้ความลึก 0.1 mm . ดังนั้นปริมาตรใน 1 ช่องตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสเท่ากับ 0.1 mm^3 ซึ่งก็คือจำนวนเซลล์ในปริมาตร 1 cm^3 เท่ากับ $n \times 10^4$ เมื่อ n คือจำนวนเซลล์ที่นับได้ใน 1 ช่อง การนับเซลล์ควรนับทั้ง 5 ช่อง เพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้องมากขึ้น

วิธีคำนวณจำนวนเซลล์

$$\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ (cell/ml)} = (\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} / 5) \times 10^4$$

กรณีที่เซลล์ถูกเจือจาง

$$\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ (cell/ml)} = (\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} / 5) \times 10^4 \times \text{dilution factor}$$

$$\text{dilution factor} = (\text{ปริมาตรเซลล์} + \text{ปริมาตรสารละลายที่เจือจาง}) / \text{ปริมาตรของเซลล์}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต} = (\text{จำนวนเซลล์มีชีวิต} / \text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}) \times 100$$

มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนวนลิขสิทธิ์
ตัวอย่างการคำนวณจำนวนเซลล์ที่เลี้ยง

ตัวอย่างการคำนวณจำนวนเซลล์ที่เลี้ยงใน 24 well plate

จำนวนเซลล์ที่ใช้ $2 \times 10^4 \text{ cell/ml}$ ปริมาตร well ละ 2 ml

เมื่อนับเซลล์ที่เลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ได้ความหนาแน่นของเซลล์ $26.4 \times 10^4 \text{ cell/ml}$

เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 88 %

$$\text{ต้องการเซลล์ทั้งหมด} \quad 2 \times 10^4 \times 2 \times 24 = 96 \times 10^4 \text{ cell}$$

$$\text{เซลล์มีความมีชีวิต} \quad = 88.8 \%$$

$$\text{เซลล์มีชีวิตทั้งหมด} \quad 96 \times 10^4 \text{ cell มาจากสัดส่วนของเซลล์} \quad = (100 \times 96 \times 10^4) / 88.8$$

$$= 108.11 \times 10^4 \text{ cell}$$

ต้องใช้เซลล์จากเซลล์ตั้งต้น

$$= (108.11 \times 10^4) / 26.4 \times 10^4$$

$$= 4.09 \text{ ml}$$

ต้องใช้เซลล์ตั้งต้น 4.09 ml ใส่อาหาร 43.91 ml เลี้ยงใน 24 well plate ปริมาตร well ละ 2 ml

ภาคผนวก ค

การเตรียม Taxol ความเข้มข้น 100 nM

1. ชั่ง Taxol 0.0008 g ละลายใน DMSO 1 ml เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ 9 ml จะได้สารละลาย Taxol ความเข้มข้น 1 μ M (100X)
2. ดูดสารละลายในข้อ (1) มา 0.1 ml ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ 9.9 ml จะได้สารละลาย Taxol ความเข้มข้น 1 μ M (1X)
3. ดูดสารละลายในข้อ (2) มา 1 ml เติมหอาหาร 9 ml จะได้สารละลาย Taxol ความเข้มข้น 100 nM ปริมาตร 10 ml

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวเปรมวดี สกุลสม
ที่อยู่	50/8 หมู่ 3 ตำบลท่ามะกา อำเภوتاมะกา จังหวัดกาญจนบุรี 71120
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2544	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยรามคำแหง
พ.ศ. 2546	ศึกษาต่อระดับปริญญาโท (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยศิลปากร

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์