

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

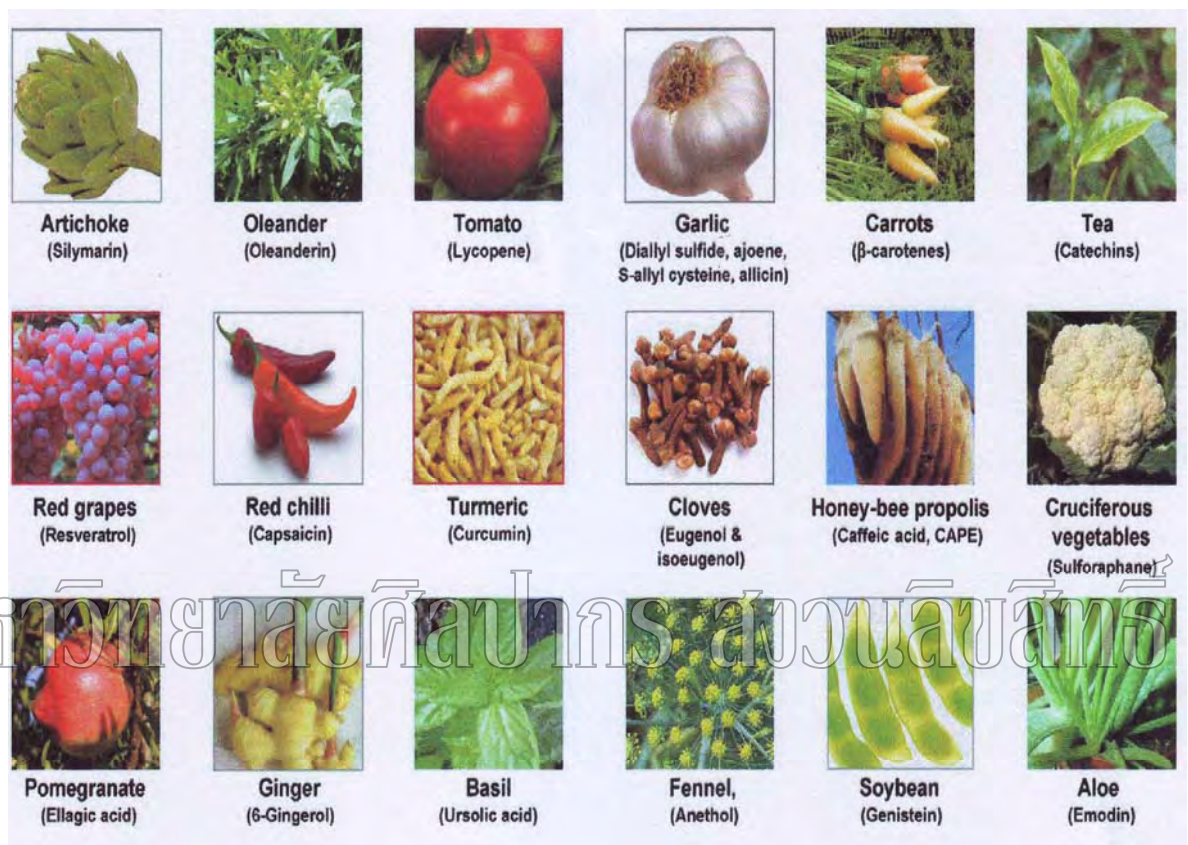
1. พืชต้านมะเร็ง

โรคมะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติในระบบควบคุมการเจริญของเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) การพัฒนาของเซลล์ (cell differentiation) และการ หลีกเลียงโปรแกรมการตายของเซลล์ (apoptosis) (อภิวัฒน์, 2546) ที่มีสาเหตุมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น พันธุกรรม การระบาดของไวรัส และการได้รับสารก่อมะเร็ง โดยการได้รับสารก่อมะเร็ง น่าจะเป็นปัจจัยนำที่ให้อัตราการเกิดโรคมะเร็งสูงขึ้น เนื่องจากเทคโนโลยีสมัยใหม่ทำให้มีการผลิต สารสังเคราะห์มากขึ้นซึ่งอาจได้รับการสัมผัสหรือการบริโภคโดยตั้งใจและไม่ตั้งใจ ดังนั้นการ ลดโอกาสการเกิดโรคมะเร็ง นอกจากจะหลีกเลี่ยงไม่รับสารก่อมะเร็งโดยตรงแล้ว การบริโภคผัก ผลไม้ที่มีสารต้านมะเร็งก็อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและลดอัตราการตายจากมะเร็งลงได้ ผักผลไม้หลายชนิดที่มีสารต้านมะเร็งได้มีการศึกษากันมานาน และได้ข้อมูลของพืชที่ให้ สารสำคัญต่อโมเลกุลเป้าหมายที่สารจะออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งดังแสดงในตารางที่ 2.1 ที่มีการ รวบรวมนำเสนอโดย Aggarwal และ Shishodia (2006)

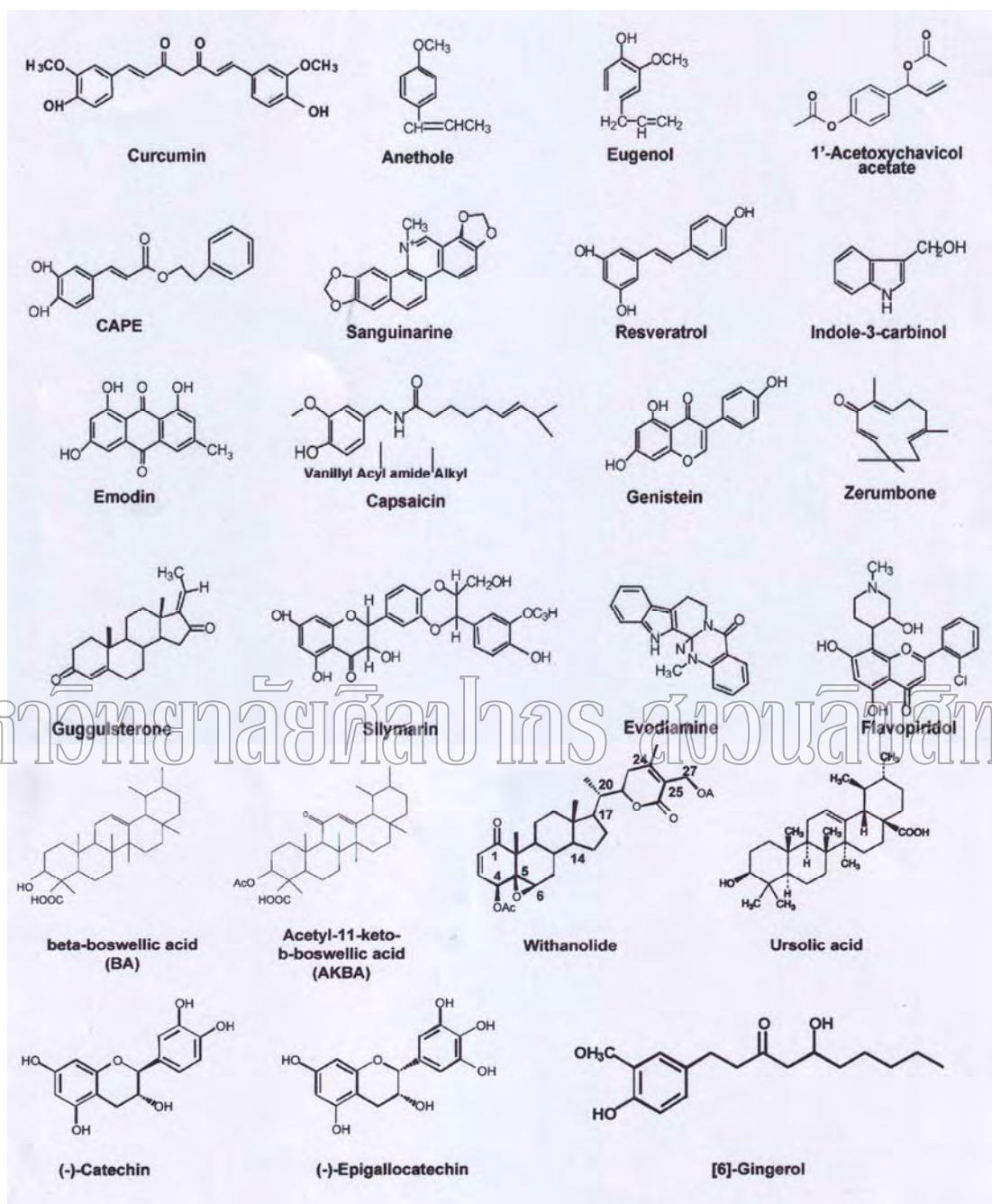
ตารางที่ 2.1 สารสกัดจากพืชที่เข้าบริโภคนิตต่างๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Aggarwal and Shishodia, 2006)

Plant name	Active compound	Molecular target
Turmeric (<i>Curcuma longa</i>)	Curcumin, curcuminoids	↓NF-κB, ↓AP-1, ↓Egr-1, ↓STAT1, ↓STAT3, ↓STAT5, ↑PPARγ, ↓EpRE, ↓CBP, ↓B-catenin, ↑Nrf2, ↑IKK, ↓EGFR, ↓HER2, ↓Akt, ↓Src, ↓JAK2, ↓TYK2, ↓JNK, ↓PKA, ↓PKC, ↓VCAM-1, ↓Bcl-2, ↓Bcl-xL, ↓ICAM-1, ↓TF, ↓AR/ARP, ↓p53, ↓MDR, ↓ELAM-1, ↓FTase, ↑GST, ↑GSH-px, ↓uPA, ↑HO, ↓XOD, ↓cyclin D1, ↓5-LOX, ↓COX-2, ↓INOS, ↓MMP-9, ↓TNF, ↓IL-6, ↓IL-8, ↓IL-12 ↓COX-2, ↓INOS, ↓JNK, ↓MEK, ↓AP-1, ↓NF-κB, ↑P21 Cip1/WAF1, ↑p53, ↑Bax, ↑caspases, ↓survivin, ↓cyclin D1, ↓cyclin E, ↓Bcl-2, ↓Bcl-xL, ↓CIAP, ↓Egr-1, ↓PKC, ↓PKD, ↓casein kinase II, ↓5-LOX, ↓VEGF, ↓IL-1, ↓IL-6, ↓IL-8, ↓AR, ↓PSA, ↓CYP1A1, ↓TypeII-PtdIns-4kinase, ↓Cdc2-tyr15 ⁺ , ↑HO-1, ↑Nrf2, ↓endothelin-1
Grapes (<i>Vitis vinifera</i>)	Resveratrol	↓NF-κB, ↓AP-1, ↓Egr-1, ↓PKC, ↓PKD, ↓casein kinase II, ↓5-LOX, ↓VEGF, ↓IL-1, ↓IL-6, ↓IL-8, ↓AR, ↓PSA, ↓CYP1A1, ↓TypeII-PtdIns-4kinase, ↓Cdc2-tyr15 ⁺ , ↑HO-1, ↑Nrf2, ↓endothelin-1
Guggulu (<i>Commiphora mukul</i>)	Guggulsterone	↓NF-κB, ↓AP-1, ↓XAP, ↓Bcl-1/A1, ↓Bcl-2, ↓cFLIP, ↓survivin, ↓cyclin D1, ↓c-Myc, ↓MMP-9, ↓COX-2, ↓VEGF, ↓BAR, ↓CYP7A1, ↓FXR, ↓CYP3A, ↓Cyp2b10
Pinecone ginger (<i>Zingiber zerumbet</i>)	Zerumbone	↓NF-κB, ↓AP-1, ↓XAP, ↓Bcl-1/A1, ↓Bcl-2, ↓cFLIP, ↓survivin, ↓cyclin D1, ↓c-Myc, ↓MMP-9, ↓COX-2, ↓TRAF1
Aloe (<i>Aloe vera</i>)	Emodin	↓NF-κB, ↓HER-2/neu, ↑caspase-3, ↓AR, ↓MMP-9, ↓CYP1A1, ↑CYP1B1
Boswellia (<i>Salai guggul</i>) (<i>Boswellia serrata</i>)	Boswellic acids	↓NF-κB, ↑p42 MAPK, ↑p38 MAPK, ↓5-LOX, ↓survivin, ↓cyclin D1, ↓Bcl-2, ↓Bcl-xL, ↓CIAP
Cruciferous vegetables (<i>Brassica</i> sp.)	Sulforaphane, indole-3-carbinol	↓NF-κB, ↓survivin, ↓cyclin D1, ↓Bcl-2, ↓Bcl-xL, ↓CIAP, ↓Cdc25, ↓Cdk1, ↓Bcl-2, ↓Bcl-xL
Quince (<i>Cydonia oblonga</i>)	Caffeoylquinic acids	↓IFN-γ, ↓IL-2, ↓ERK1/2, ↓AKT ^α , ↓NF-κB, ↓NO, ↓iNOS
Rohitukine (<i>Dysoxylum binectrifolium</i>)	Flavopiridol	↓NF-κB, ↓COX-2, ↓cyclin D1, ↓MMP-9, ↓Bcl2
Coriander (<i>Coriandrum sativum</i>)	Linalool, monoterpene	↓NF-κB, ↓AP-1, ↓JNK, ↓MAPK
Sweet Fennel (<i>Foeniculum vulgare</i>)	Anethole	↓NF-κB, ↓AP-1, ↓JNK, ↓MAPK
Ashwagandha (<i>Withania somnifera</i>)	Withanolides	↓NF-κB, ↓COX-2, ↓cyclin D1, ↓MMP-9, ↓survivin, ↓cyclin E, ↓Bcl-2, ↓Bcl-xL, ↓CIAP
Pomegranate (<i>Punica granatum</i>)	Ellagic acid	↓NF-κB, ↓COX-2, ↓cyclin D1, ↓MMP-9, ↓PDGF, ↓VEGF, ↑p21/WAF1, ↑p53
Soyabean (<i>Glycine max</i>)	Genistein	↓NF-κB, ↑caspase-12, ↑p21/WAF1, ↑glutathione peroxidase
Basil (<i>Ocimum sanctum</i>)	Ursolic acid	↓NF-κB, ↓COX-2, ↓cyclin D1, ↓MMP-9
Parthenium (<i>Tanacetum parthenium</i>)	Sesquiterpene lactones, parthenolides	↓NF-κB, ↑p53, ↑reactive oxygen species
Prunes and plums	Ursolic acid, oleanolic acid, triterpenoids	↓NF-κB, ↓COX-2, ↓cyclin D1, ↓MMP-9
Oleander (<i>Nerium oleander</i>)	Oleandrin	↓NF-κB, ↓AP-1, ↓JNK, ↓COX-2, ↓cyclin D1, ↓MMP-9
Tea (<i>Camellia sinensis</i>)	Flavonoids, catechins	↓NF-κB, ↓AP-1, ↓JNK, ↓COX-2, ↓cyclin D1, ↓MMP-9, ↑HO-1, ↓IL-6, ↓VEGF, ↓IGF, ↑p53, ↓Bcl-2, ↑p21/WAF1
Silymarin (<i>Silybum marianum</i> L.)	Silybinin	↓NF-κB, ↓AP-1, ↓JNK, ↓COX-2, ↓cyclin D1, ↓MMP-9
Citrus fruits, apple (<i>Citrus</i> sp.)	Quercetin	↓NF-κB, ↑Bax, ↓Bcl-2, ↓cyclin D1, ↑caspase, ↑PARP, ↑Gadd 45
Red chilli (<i>Capsicum annum</i>)	Capsaicin	↓NF-κB, ↓survivin, ↓cyclin D1, ↓Bcl-2, ↓Bcl-xL, ↓CIAP, ↓Cdc25, ↓Cdk1, ↓Bcl-2, ↓Bcl-xL
Cloves (<i>Eugenia caryophyllus</i>)	Eugenol, isoeugenol	↓NF-κB
Cardamon (<i>Elettaria cardamomum</i>)	Limonene	↓COX-2, ↓iNOS
Ginger (<i>Zingiber officinale</i>)	Gingerol, paradol	↓TNF, ↓NF-κB, ↓AP-1, ↓COX-2, ↓ODC, ↓iNOS, ↑p38MAPK, ↓HIF, ↓VEGF, ↑caspase-3, ↓Bcl2
Galanga (<i>Alpinia officinarum</i>)	Yakuchinone A&B	↓COX2, ↓iNOS, ↓NF-κB, ↓adhesion molecules, ↓TNF, ↓AP-1, ↓5-HETE
Kokum (<i>Garcinia indica</i>)	Garcinol	↓NF-κB, ↓COX-2, ↓iNOS, ↓HAT
Licorice (<i>Glycyrrhiza echinata</i>)	Dibenzoylmethane	↓COX2, ↓LOX, ↓HIF, ↓VEGF

สารสำคัญในพืชบริเวณที่พบมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งนั้นมีหลายชนิด เช่น curcumin, lycopene, 6 - gingerol, anethol เป็นต้น โดยสารดังกล่าวพบได้ในผักผลไม้ชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูป 2.1 และมีโครงสร้างทางเคมีดังรูป 2.2



รูปที่ 2.1 ตัวอย่างพืชที่มีรายงานของสารต้านมะเร็ง (Aggarwal and Shishodia, 2006)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของสารสกัดจากพืชบริเวณใต้ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง
(Aggarwal and Shishodia, 2006)

พืชเมื่อถูกบริโภคจะให้สารอาหารที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมายที่ต่างกันไป โดยโมเลกุลเป้าหมายสำคัญที่พืชให้ฤทธิ์ต้านมะเร็งส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์ยับยั้งต่อ NF- κ B (Nuclear factor – kappa B) ซึ่งเป็น signal transcription factor ที่ควบคุมให้เซลล์พัฒนาเกิดเป็นมะเร็งได้ และพบได้ใน cytoplasm สารที่ก่อให้เกิดเป็นมะเร็ง เช่น free radicals, inflammatory, cytokines, carcinogens tumor promoters, endotoxin, รั้งสีแถมมา, แสงอัลตราไวโอเล็ต และรั้งสีเอ็กซ์ จะกระตุ้นให้ NF – κ B ทำงานทั้งนี้ NF – κ B มีบทบาทกระตุ้นการทำงานของโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการตายแบบ apoptosis เช่น Bcl – 2 และ Bcl – xl นอกจากนี้ NF – κ B ยังกระตุ้นให้เกิดการ transformation, proliferation, invasion, metastasis ในระดับที่สูงกว่าปกติซึ่งทำให้เซลล์แบ่งตัวรวดเร็วแต่สารสกัดจากพืชหลายชนิดให้สารสำคัญที่ยับยั้งการทำงานของ NF – κ B ได้ทั้งนี้กลไกการยับยั้ง NF – κ B ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าสารสำคัญเหล่านี้จะยับยั้งการทำงานของ NF – κ B ได้ในหลายขั้นตอนเช่น NF- κ B signaling cascade หรือการเคลื่อนที่ของ NF- κ B จาก cytoplasm ไปยัง nucleus เป็นต้น สารสำคัญที่ยับยั้งการทำงานของ NF – κ B ได้ดังแสดงในตารางที่ 2.2

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 2.2 สารในพืชบริเวณที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NF-kB (Aggarwal and Shishodia, 2006)

Compound	Source	Botanical name
Polyphenols		
Apigenin	Plant seeds and vegetables	Scutellaria spp. (include in Chinese herbal mixture, PCSPES, Huang-Qi; Qingkailing; Shuanghuanglian, etc.); Cirisium spp.; Crotalaria spp.; Quercus nutgall; Matricaria recutita; Saussurea medusa; Lantana montevidensis Briq.
Baicalein and its derivatives (includes baicalein, wogonin 6-methoxy-baicalein)	Skullcap	Scutellaria spp. (include in Chinese herbal mixture, PCSPES, Huang-Qi; Qingkailing; Shuanghuanglian, etc.); Scutellaria lateriflora L.
Blueberry and berry mix	Blueberry, black currant, raspberry, strawberry Eggpl	Rubus spp.; Vaccinium spp.; Vaccinium corymbosum L.; Vaccinium myrtillus; Fragaria ananassa; Solanum melongena
Bakuchiol (drupanol)		Psoralea corylifolia
Cannabinol		Cannabis spp.
Capsaicinoids (include capsaicin and analogues)	Pepper, red chilli	Capsaicum spp.; Euphorbia spp.; C. annum; C. frutens
Carnosol	Rosemary	Rosmarinus officinalis
Gatechin and theaflavins (include (-)-epicatechin, 3-epicatechin-3-gallate)	Green and black teas, berries, spotted knapweed, shea, cocoa, carob, grape	C. sinensis; Centarea maculosa Lam; Vitellaria paradoxa; Theobroma cacao; Polygonum cuspidatum
Ellagic acid	Avocado, red berries, grapes, strawberries, raspberries	Persea americana; P. mill; Physalis polygonum; Cuspidatum root; F. ananassa; Rubus idaeus
Emodin	Aloe vera, cassia obtusifolia, kidachi aloe	Polygonum spp.; Cassia obtusifolia Moghat; Glossostemon bruguier; Rheum spp.; Rhubarb; Astartataricus; Radix rhei; Hovenia dulcis; Polygonum emodin; Leguminosae; Aloe arborescens var. Psidium guajava; L. rodium glaucophyllum; Melaleuca quinquenervia
Gallic acid	Guava, geraniaceae	Pueraria labata radix; Cicer arietinum; Desmodium uncinatum; G. max
Genistein	Soybeans, chickpea, kudzu root	Lycopersicon esculentum; Ginkgo biloba
Kaempferol	Tomato	Scutellaria spp.
Luteolin	Tea, fruits and vegetables	Piper nigrum; Quercus sp. nutgall
Purpurogallin	Black tea	Aglaia spp.
Rocaglamides		Morus spp.
Sanggenon C	Mulberry	Cynara scolymus; S. marianum
Silymarin (includes silybin, silibinin, silidian, silychrist)	Milk thistle, artichokes, wild artichokes	Alpinia oxyphylla
Yakuchinones A and B		
Terpenes		
Anethol and analogues (eugenol, bis-eugenol, isoeugenol, anetholdithiolthione)	Broccoli, anise, cloves cashew	Brassica oleracea italica; Illicum verum; Ocimum selloi; Benth syzygium aromaticum; Anacardium occidentale; Hibiscus sabdariffa
Artemisinin extract (Qinghaosu)		Artemisia annua
Avicins (include avicins D and G)		Acacia victoriae
Azadirachtin	Neem tree	Azadirachta indica A.
β-Carotene	Carrot, citrus fruits, pumpkin	Daucus carota sativus; Citrus unshiu marc; Curcubita moschata
β-Cryptoxanthin	Orange, berries	Carcica papaya L. Physalis
Betulinic acid	Birch tree, almond hulls	Betula spp.; Betula alba; Quisqualis fructus; Coussarea paniculata; Alangium lamarckii
G. biloba extract		G. biloba
Glycyrrhizin	Licorice root	Glycyrrhiza glabra; Glycyrrhiza radix; Glycyrrhiza uralensis
Limonene	Lemon, sweet orange, grapefruit	Citrus limon; Citrus paradisi; Citrusaurantium
Lutein	Tomato	L. esculentum
Lycopene	Tomato	L. esculentum
Parthenolide	Feverfew	T. parthenium and T. larvatum; Michelia champaca; Talauma ovata; Magnolia grandiflora; Artemisia myriantha

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) สารสำคัญในพืชบริเวณที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NF-kB

Compound	Source	Botanical name
Ursolic acid	Basil, salvia, rosemary, berries	Rosemarinus officinalis; O. sanctum; Aronia melanocarpa; Oxycoccus quadripetalus; Origanum majorana; Diospyros melanoxylon; Salvia przewalskii Maxim
Withanolides		Withania somnifera
Alkaloids		
Conophylline		Tabernaemontana spp.; Ervatamia microphylla
Cucurbitacin	Cucurbitaceae	Cucurbita andreana; Trichosanthes kirilowii; Elaecarpus mastersii
Higenamine	Ranunculaceae, lianas	Aconitum japonicum; Argemone mexicana; Gnetum parvifolium
Mahanimbine	Rutaceous	Murraya koenigii; Clausena dunniana; Murraya siamensis
Mahanine	Rutaceous	M. koenigii; Micromelum minutum
Morphine and its analogues (include KT 90 and sanguinarine)		Rapaver spp.; Opium poppy
Piperine	Black pepper	Garcinia xanthochymu; Piper longum
Flavonoids		
Cirsimaritin	Basil, sage, rosemary	O. sanctum; Salvia officinalis; Rosemaribus officinalis
Flavopiridol		Dysoxylum binectariferum
Hesperidine	Oranges	Gamellia sinensis O.Ktze.
Morin	Almond	P. guajava L.; Prunus dulcis (Mill.)
Nobiletin	Citrus	C. u. marc
Pycnogenol	Citrus fruit	Citrus reticulata; Pinus maritima
Perseone A	Tomato, avocado	L. esculentum; Persea americana P. Mil
Phenolics		
Ethyl gallate	Grapes, tea, red maple	Paconia spp.; Sophora japonica; Acer rubrum; Haematoxylon campechianum; V. vinifera; V. paradoxa; Camellia sinensis
Gingerol	Ginger	Z. officinale Roscoe
Morellin	Indica fruit	Garcinia purpurea; Garcinia hanburyi
Rosemarinic acid	Rosemary, sage	R. officinalis; Salvia officinalis
Others		
Allicin (allyl-thiosulfinate)	Garlic	Allium sativum
Allixin (phytoalexin)	Garlic	A. sativum Linn
Aucubin (iridoid glycoside)	Algae	Eucommia spp.; Veronica spp.; Vitex spp.; Globularia spp. Polypodium spp.
Calagualine (saponin)		Apis mellifera capensis
CAPE (caffeic acid phenethyl ester)	Honey bee propolis	A. sativum
Diallyl sulfide	Garlic, Chinese leek	Piper methysticum
Flavokavine	Kava kava	A. sativum Linn; Garcinia huillensis; G. purpurea
Garcinol and its analogue (polyisoprenylated benzophenone)	Indica fruit, African plant	
Indole-3-carbinol (indole)	Onions, cabbage, Brassicaceae	Allium cepa; B. o. capita; Brassica genus
Lapachone (benzo[a]phenazine)	Indian ginseng, lapacha tree, trunkwood	Tabebuia avellanaeae genus; Tabebuia heptaphylla
Plumbagin (naphthoquinone)		Plumbago zeylanica
Resveratrol and analogues e.g. pisetannol (stilbene)	Grapes, cranberries, etc.	P. cuspidatum; Veratrum spp.
Rotenone (benzopyranone)		Derris spp.
Sulforaphane (glucosinolate)	Broccoli, cauliflower	B. o. italica; B. o. italica
1'-Acetoxychavicol acetate	Ginger family	Languas galanga
α -Lipoic acid	Asparagus, wheat, potato	
Aged garlic extract; garlic	Garlic	A. sativum
Cirsilineol	Basil, Verbenaceae, thyme	O. sanctum; L. montevidensis Briq.; Thymus vulgaris
Isothymonin	Basil	O. sanctum
Trans-asarone	Carrot	Daucus carota L.
S-Allylcysteine	Allium	A. sativum
Procyanidin	Apple, grape, pear	Braeburn cultivar; Vitis vinifera L.; Prunus perisiccol
Vitamin C	Fruits and vegetables	
Vitamin E	Plant seeds and vegetables	

● Murakami และคณะ (1995) พบสารสกัดจากผักและผลไม้หลายชนิดที่สกัดด้วย methanol ที่ให้ฤทธิ์ด้านการเกิดเนื้องอกต่อเซลล์ Raji ที่มีสาเหตุเกิดจาก Epstein – Barr Virus (EBV) โดย Murakami และคณะกระตุ้นให้เซลล์เกิดเนื้องอกด้วย EBV และ 12 – O – Hexadecanoylphorbol – 13 – acetate (HPA) จากนั้นทดสอบหาสารสกัดที่ต้านมะเร็งด้วยการบ่มเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นกับ สารสกัดที่ความเข้มข้น 200 µg/ml นาน 48 ชั่วโมงก่อนตรวจวัดระดับของ early antigen (IE) ด้วย วิธี indirect immunofluorescence ในเซลล์ซึ่งพบว่าสารสกัดหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเนื้องอกใน ระดับมากกว่า 70% (Inhibition effect $\geq$ 70%) ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 พืชและสารสกัดจาก methanol ที่มีฤทธิ์ด้านการเกิดเนื้องอก

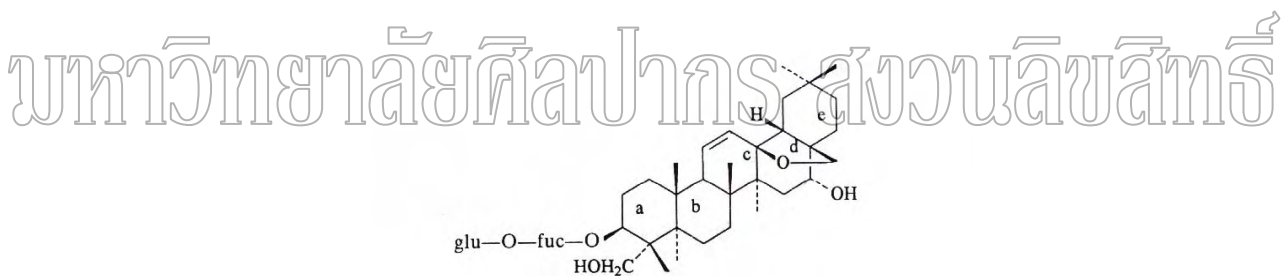
(Murakami และคณะ, 1995)

วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ชื่อไทย	ส่วนที่ใช้
Alizoaceae	<i>Glinus oppositifolius</i>	Phak khuang	ผักขวง	ใบ
Amaranthaceae	<i>Amaranthus gracilis</i> Desf.	Amaranth	ผักโขม	ใบ
Anacardiaceae	<i>Mangifera foetida</i> Lour.	mango	มะม่วง	ใบ
Bignoniaceae	<i>Oroxylum indicum</i> Vent.	India trumpet flower	เพกา	ฝักอ่อน
Compositae	<i>Artemisia lactiflora</i> var gennina	Sage brush	ดอกแก้วเมืองจีน	ใบ
Cruciferae	<i>Brassica oleracea</i> L.	Kanaeng Kaluum	แขนงกะหล่ำ	ใบ
Gnetales	<i>Gnetum cremona</i> L.	Spinach joint fir	ผักเซียง	ใบ
Guttiferae	<i>Garcinia cowa</i> Roxb.	Cowa	ชะมวง	ใบ
Labiatae	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Common basil	โหระพา	ใบ
	<i>Ocimum canum</i> Sins	Hairy basil	แมงลัก	ใบ
	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Tree basil	ยี่ห่วย	ใบ
Leguminosae	<i>Pisum sativum</i> L.	Garden bean	ถั่วลันเตา	เมล็ด
	<i>Sesbania grandiflora</i> Desv.	Swamp pea	แค	ใบ
Marsileaceae	<i>Marsilea crenata</i> Presl	Water clover	ผักแว่น	ใบ
Melastomataceae	<i>Diplectria barbata</i>			ดอก
Meliaceae	<i>Aglaia odorata</i> Lour.		ประยงค์	ใบ
Piperaceae	<i>Piper nigrum</i> L.	Pepper	พริกไทย	ผล
	<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	Pepper	ชะพลู	ใบ
	<i>Piper betel</i> L.	Betel pepper	พลู	ใบ
Polygonaceae	<i>Polygonum odoratum</i> Lour.	Knoryweed	ผักไผ่	ใบ
Rubiaceae	<i>Morinda citrifolia</i> Linn.	Indian mulberry	ยอ	ใบ
Rutaceae	<i>Citrus hystrix</i> D.C.	Bitter orange	มะกรูด	ใบ
	<i>Zanthoxylum limonella</i>		มะเคียง	ผลแห้ง
Saruraceae	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	Baikuntong	พลูคาว	ใบ
Scrophulariaceae	<i>Limnophila aromatica</i> Merrill		ผักแขยง	ใบ
Umbelliferae	<i>Apium graveolens</i> ver. Dulce Pers L.	Celery	คื่นฉ่าย	ใบ
	<i>Centella asiatica</i> Urban	Indian pennywort	ใบบัวบก	ใบ
	<i>Coriandrum sativum</i> L.	Coriander	ผักชี	ใบ
	<i>Coriandrum</i> sp.		ผักชีลาว	ใบ
	<i>Erygium foetidum</i> L.		ผักชีฝรั่ง	ใบ
	<i>Trachyspermum roxburghianum</i> crib		หอมใหญ่	ใบ
Zingiberaceae	<i>Boesenbergia pandurata</i> Holtt.		กระชาย	ราก
	<i>Languas galangal</i> Swartz	Great galangal	ขิง	ลำต้น

จากตารางที่ 2.3 พบว่าพืชในวงศ์ Bupleurum (Umbelliferae), Labiatae, และ Zingiberaceae มีพืชหลายชนิดที่พบฤทธิ์การต้านเนื้องอก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการวิจัยตรวจหาฤทธิ์การต้านมะเร็งของพืช 3 วงศ์นี้

1.1 สารต้านมะเร็งจากพืชวงศ์ Bupleurum (Umbelliferae) พืชวงศ์นี้ให้สารสกัดที่มีแนวโน้มเป็นสารต้านมะเร็งได้จากงานวิจัยต่างๆ ดังนี้

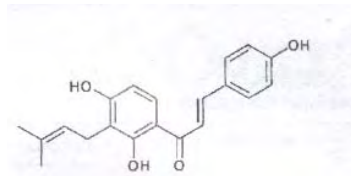
- Ya – Ling, Kuo และ Lin (2004) รายงานว่าพืชที่อยู่ในวงศ์ Bupleurum (Umbelliferae) หลายชนิดอาทิ ผักชี คื่นช่าย และหอมหัวใหญ่ มีสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำคัญสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้คือ Saikosaponin D (รูปที่ 2.3) โดยพบว่า Saikosaponin D ความเข้มข้น 20 μ M สามารถยับยั้งการเจริญ (antiproliferation) ของเซลล์มะเร็งปอดได้ (Human non - small cell lung cancer A549 cells) โดยจะยับยั้งวงจรชีวิตของเซลล์ให้อยู่ในระยะ G1 ซึ่งเป็นระยะก่อนการสังเคราะห์ DNA อีกทั้งมีการตรวจพบมีระดับโปรตีน p21/WAF 1 เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่หยุด cell cycle ให้คงอยู่ในช่วง G1/S ได้ นอกจากนี้ Saikosaponin D ยังกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase - 8 ซึ่งเกิดจากการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง Fas receptor กับ Fas ligand ที่ผิวเซลล์ แล้วชักนำให้เซลล์เกิด apoptosis



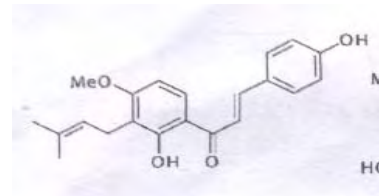
รูปที่ 2.3 โครงสร้างสาร Saikosaponin D

- Babu, Kuttan และ Padikkala (1995) รายงานถึงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์เนื้องอก จากสารสกัดหยาบของโบบัวบกซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Bupleurum (Umbelliferae) โดยพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ 62 μ g/ml และ 75 μ g/ml ให้ค่า IC_{50} ต่อเซลล์ Ehrlich ascites tumour cells (EAC) และ Dalton's lymphoma ascites tumour cells (DLA) ตามลำดับ หลังจากนำสารสกัดหยาบมาผ่านการทำกิ่งบริสุทธิ์ด้วย silica gel column แล้วทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ EAC และ DLA อีกครั้ง พบว่าค่า IC_{50} เท่ากับ 17 μ g/ml และ 22 μ g/ml ต่อเซลล์ EAC และ DLA ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นเดียวกันนี้ไม่เกิดพิษต่อเซลล์ปกติ (normal human lymphocytes)

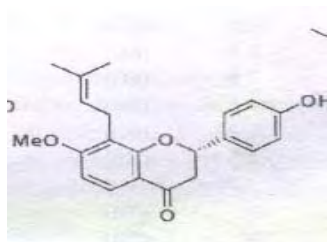
- Akihisa และคณะ (2003) ศึกษาการยับยั้งการเกิดเนื้องอกของสาร Chalcones 5 ชนิด ประกอบด้วย Xanthoangrolol, Xanthoangelol F, Isobavachalcone, 4-hydroxyderricin, Xanthoangelol H และสาร Flavanone 3 ชนิดคือ Manduleafvanone A, Prostratol F และ 4'-O-Geranylnaringenin ซึ่งสารทั้งหมดนี้เป็นสารสกัดจากของเหลวที่ได้จากลำต้นของต้น *Angeluca keiskei* สารดังกล่าวเมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการกระตุ้นการเกิดเนื้องอกที่เกิดจาก Epstein - Barr virus (EBV) ในเซลล์ Riji ซึ่งถือเป็นการทดสอบ antitumor - promoters เบื้องต้นจากการวิจัยพบว่าสาร Chalcones 2 ชนิดคือ Isobavachalcone, 4 - hydroxyderricin และสาร Flavanone ทั้ง 3 ชนิดคือ Manduleafvanone A, Prostratol F และ 4' - O - Geranylnaringenin (รูปที่ 2.4) มีฤทธิ์ยับยั้งเนื้องอกที่เกิดจาก EBV ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1×10^{-3} mol/TPA



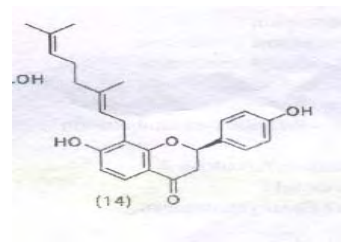
Isobavachalcone



4 - hydroxyderricin

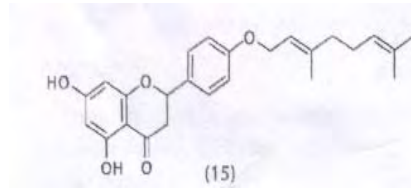


Manduleafvanone A



Prostratol F

รูปที่ 2.4 โครงสร้างสาร Chalcones และ Flavanon

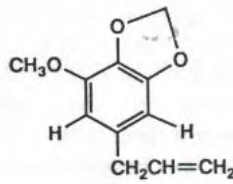


4' - O - Geranylnaringenin

รูปที่ 2.4 (ต่อ) โครงสร้างสาร Chalcones และ Flavanon

- Cheng และคณะ (2004) นำสารสกัดหยาบจากรากของต้น *Angelica sinensis* Diels มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญต่อเซลล์มะเร็งปอด (A549 cells) พบว่าค่าการยับยั้ง IC_{50} ที่ได้จากการบ่มเซลล์มะเร็งอยู่ที่ช่วง 35 - 50 $\mu\text{g/ml}$ โดยการยับยั้งที่ระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง จะให้การยับยั้งมากกว่าที่ระยะบ่ม 24 ชั่วโมง และความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะบ่มนาน 72 ชั่วโมง จะให้เซลล์มีชีวิตรอดเพียงประมาณ 24 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบวงจรชีวิตของเซลล์พบว่า สารสกัดนี้สามารถชักนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 เพิ่มขึ้นหรืออยู่ในระยะ S phase ลดลง นอกจากนี้สารสกัดยังสามารถยับยั้งการทำงานของ caspase - inhibitor (Z - VAD - fmk) จึงมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase - 9 และ caspase - 3 ที่ไปกดการแสดงออกของ Bcl - 2 oncoprotein และทำให้ระดับของ cdk4 ลดลง ดังนั้นสารสกัดจาก *Angelica sinensis* Diels จึงเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งในวงศ์ Bupleurum (Umbelliferae) ที่ชักนำให้วงจรชีวิตของเซลล์มะเร็งปอด (A549 cells) หยุดในช่วง G1/S และกระตุ้นกลไกการเกิด apoptosis ได้

- Zheng และคณะ (1992) ทดสอบนำสาร myristicin (โครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.6) ซึ่งสกัดได้จากผักชีฝรั่ง (*Petroselinum sativum* Hoffm) มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเนื้องอกที่มีสาเหตุจากการชักนำของสาร benzo[a] pyrene (B [a] P) ในหนูทดลอง ผลพบว่า myristicin สามารถยับยั้งการเกิดเนื้องอกได้ 31% หลังจากให้ myristicin 10 mg/dose จำนวน 3 dose แก่หนูทดลองโดย myristicin จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Glutathione - S - transferase (GTS) ในเซลล์ตับและลำไส้เล็กให้เพิ่มขึ้นเป็น 4.3 เท่าเมื่อเทียบกับตัวควบคุมซึ่งให้ค่า 3.2 เท่า ดังนั้น myristicin จากผักชีฝรั่งจึงมีแนวโน้มเป็นสารป้องกันมะเร็ง (cancer chemopreventive agent) ได้อีกตัวหนึ่ง โดยอาจทำให้ฤทธิ์เอนไซม์ GTS เพิ่มขึ้นแล้วมีผลให้มีปริมาณ glutathione ที่ต้านยาเคมีบำบัดในการรักษามะเร็งลดลงและยับยั้งการเกิดเนื้องอกได้



รูปที่ 2.5 โครงสร้างสาร Myristicin

- Zheng, Kenney และ Lam (1991) ได้ทดสอบสาร Anethofuran และ Carvone ซึ่งสกัดจากน้ำมันเมล็ดผักชีลาวมาฉีดหนูทดลอง A/J mice ที่ความเข้มข้น 20 mg/dose โดยฉีดทุกๆ 2 วัน เป็นจำนวน 3 dose และหลังจากการฉีด dose สุดท้ายเป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง จะนำตับ กระเพาะอาหารส่วนต้น ปอด เยื่อผนังลำไส้ส่วนต้น และเยื่อผนังลำไส้ส่วนปลายมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Glutathione - S - transferase (GST) ที่เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่ทำลายสารพิษ (detoxify enzyme) สารก่อมะเร็งและ glutathione ผลพบว่า GST specific activity ที่ได้หลังจากฉีดด้วย Anethofuran ในเซลล์ตับ กระเพาะอาหารส่วนต้น ปอด เยื่อผนังลำไส้ส่วนต้น และเยื่อผนังลำไส้ส่วนปลายของหนูมีค่า GST specific activity เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (ไม่ได้ฉีด Anethofuran) เพิ่มขึ้นเป็น 2.44, 1.35, 1.17, 2.68 และ 0.95 เท่า ตามลำดับ ส่วนการฉีดสาร Carvone เข้าหนูทดลองเทียบกับเซลล์ควบคุมพบว่า GST specific activity มีค่าเพิ่มเป็น 2.69, 1.78, 1.21, 3.83 และ 2.16 เท่า ตามลำดับ แสดงว่า Carvone สามารถชักนำให้ค่า GST specific activity สูงกว่า Anethofuran ซึ่งอาจเป็นผลการทำงานปฏิกิริยากับ sulfhydryl group ของ GST ที่กระตุ้นให้กิจกรรมของเอนไซม์ Glutathione - S - transferase สูงขึ้นมาก และอาจมีแนวโน้มที่เป็นสารต้านมะเร็งได้ ดังนั้นพืชในวงศ์ Bupleurum(Umbelliferae) เป็นวงศ์ที่น่าสนใจในการหาสารต้านมะเร็ง

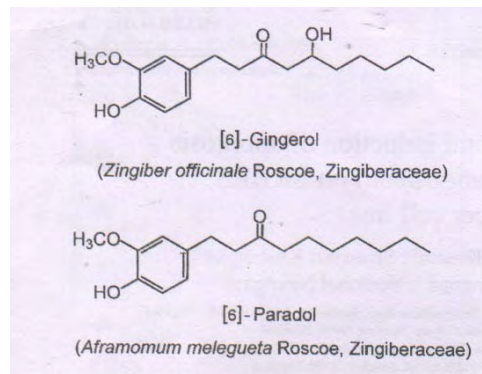
1.2 สารต้านมะเร็งในพืชวงศ์ Zingiberaceae งานวิจัยต่างๆที่แสดงดังข้างล่างได้แสดงให้เห็นเช่นกันว่าพืชวงศ์ Zingiberaceae จะเป็นแหล่งที่ให้สารต้านมะเร็งได้

- Shawkat และคณะ (2001) ศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของ epicalyxin F และ calyxin B ที่สกัดได้จากเมล็ด *Alpinia blepharocalyx* ที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ต่อเซลล์ human HT - 1080 fibrosarcoma และเซลล์ murine colon 26 - L5 carcinoma cells ผลพบว่า epicalyxin F สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ดังกล่าวได้ที่มีความเข้มข้น ED_{50} เท่ากับ 1.7 μ M และ 0.89 μ M

ตามลำดับ ในขณะที่ calyxin B ให้การยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ความเข้มข้นของสาร ED_{50} เท่ากับ 0.69 μM และ 4.24 μM ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับยาต้านมะเร็งที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก คือ 5 - fluorouracil ซึ่งให้ค่า ED_{50} เท่ากับ 0.53 μM ต่อเซลล์ human HT - 1080 fibrosarcoma และ 8.00 μM ต่อเซลล์ murine colon 26 - L5 carcinoma cells จากผลแสดงได้ว่า epicalyxin F และ calyxin B มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดีและสามารถใช้ที่ความเข้มข้นของสารต่ำกว่า 5 - fluorouracil ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน

- Keum และคณะ (2002) ทดสอบการเกิด apoptosis ในเซลล์ oral squamous carcinoma cell line (KB) จากการชักนำของ 6 - paradol ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในขิงและพืชวงศ์ Zingiberaceae รวมทั้งทดสอบอนุพันธ์ของ 6 - paradol ได้แก่ 3 - paradol, 10 - paradol, 3 - dehydroparadol, 6 - dehydroparadol และ 10 - dehydroparadol แล้ววิเคราะห์ผลด้วยวิธี MTT assay ผลพบว่า 6 - dehydroparadol ให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่า 45 μM ซึ่งต่ำกว่าสารอีกทั้ง 5 ชนิด และผลวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา พบการเกิด DNA fragmentation และเกิดการกระตุ้น procaspase - 3 เป็น caspase - 3 จึงกล่าวได้ว่า 6 - dehydroparadol สามารถชักนำให้เกิด apoptosis ด้วยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase - 3

- 6 - Gingerol (1 - [4'- hydroxy- 3' - methoxyphenyl] - 5 - hydroxy - 3 - decanone) และ 6 - Paradol (1 - [4'- hydroxy - 3' - methoxyphenyl] - 3 - decanone (โครงสร้างทางเคมีของ 6 - Gingerol และ 6 - Paradol แสดงดังรูปที่ 2.7) เป็นส่วนประกอบหลักที่พบในขิง และพืชวงศ์ Zingiberaceae โดย 6 - Gingerol มีฤทธิ์ยับยั้ง cyclooxygenase ส่วน 6 - Paradol มีฤทธิ์ต้านจุลชีพและช่วยบรรเทาอาการปวด สารสกัดทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง HL - 60 (human promyelocytic leukemia cells) เกิด apoptosis จากการตรวจสอบการสังเคราะห์ DNA ของเซลล์หลังผ่านการบ่มกับสารสกัด ด้วยการวัดหาปริมาณ [3H] thymidine ผลพบว่า 6 - Gingerol ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 μM สามารถยับยั้งการใช้ [3H] thymidine ของเซลล์ได้ 44 และ 86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดย 6 - Paradol ที่ความเข้มข้นเดียวกันจะยับยั้งการใช้ [3H] thymidine ของเซลล์ได้ 74 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้การย้อมเซลล์ด้วย DAPI พบการเกิด chromatin condensation และ nuclear fragmentation เกิดขึ้น ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า 6 - Gingerol และ 6 - Paradol สามารถชักนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ HL - 60 ได้ (Lee and Young, 1998)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของ 6 - Gingerol และ 6 – Paradol

- Miyoshi และคณะ (2003) ตรวจสอบความเป็นพิษของ galanals A และ galanals B ซึ่งเป็น diterpene ที่สกัดได้จากดอกตูมของ Janpanese ginger ต่อ Jurkat human T - cell leukemia cells พบว่าระดับความเข้มข้นที่ IC_{50} ของ galanals A อยู่ที่ 18 μM และของ galanals B อยู่ที่ 32 μM หลังบ่มได้นาน 6 ชั่วโมง โดยระดับความเข้มข้นที่ 20 μM จะทำให้เกิด DNA fragmentation แต่การบ่มเซลล์กับสารทดสอบรวมกับการใส่ Z - VAD - fmk ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ caspase จะไม่พบการเกิด DNA fragmentation และเมื่อทำ immunoblot analysis พบว่ามีการเกิด proteolytic cleavage ของ pro - caspase จากขนาด 116 kDa เป็น caspase - 3 หรือ PARP ขนาด 85 kDa

การศึกษาการปลดปล่อย cytochrome c จาก mitochondria ด้วย anti - cytochrome c antibody พบว่าทั้ง galanals A และ galanals B ที่ความเข้มข้น 20 μM ทำให้ mitochondrial transmembrane เสียสภาพแล้วปลดปล่อย cytochrome c สู่ cytosol และเมื่อวัดระดับการแสดงออกของ Bcl - 2 และ Bax protein พบว่า galanals A และ galanals B สามารถลดระดับการแสดงออกของ Bcl - 2 protein ที่เป็น anti - apoptotic regulators ได้ ขณะที่เพิ่มการแสดงออกของ Bax protein ที่ทำหน้าที่ชักนำให้เกิดการ ปลดปล่อย cytochrome c เพิ่มมากขึ้น แสดงว่า Bax protein กดการแสดงออกของ Bcl - 2 protein ส่งผลให้ mitochondria ผิดปกติ จากผลการเกิด DNA fragmentation การกระตุ้นการทำงานของ caspase - 3 การปลดปล่อย cytochrome c ตลอดจนถึงการเพิ่มระดับการแสดงออกของ Bax protein แสดงว่า galanals A และ galanals B ที่สกัดจากดอกตูมของ Janpanese ginger กระตุ้นการเกิด apoptosis ของ Jurkat human T - cell leukemia cells.

1.3 สารต้านมะเร็งในพืชวงศ์ Labiatae

● Manosroi และ คณะ (2005) ทดสอบหาความเป็นพิษของเซลล์มะเร็ง human mouth epidermal carcinoma (KB) และ murine leukemia P(388) cell lines ด้วยการบ่มเลี้ยงร่วมกับ น้ำมันหอมระเหยซึ่งสกัดโดยวิธี steam distillation จากพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดประกอบด้วย กระเพรา (*Ocimum sanctum* L.) ข่าลิง (*Alpinia officinarum*) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) ตะไคร้ (*Cymbopogon citrates* Stapf) ลาเวนเดอร์ (*Lavendula angustifolia* P.) หญ้าแฝกหอม (*Vetiveria zizanioides*) ใพล (*Zingiber montanum*) พริกไทยดำ (*Piper nigrum* L.), ตะไคร้หอม (*Cymbopogon nardus* L.) ใบโหระพา (*Ocimum basilicum* L.) ใบมะกรูด (*Cymbopogon hystrix* DC.) ใบพลู (*Piper betel* L.) พฤกษ์ (*Albizzia lebbek*) ใบสาระแน (*Mentha piperita*) และ ใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) พบว่าสารสกัดจากพืชจะให้ค่า IC_{50} ที่แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 เป็นสารสกัดที่ให้ IC_{50} น้อยกว่า 0.125 mg/ml กลุ่มที่ 2 ให้ IC_{50} อยู่ระหว่าง 0.125 - 5 mg/ml และกลุ่มที่ 3 ให้ IC_{50} มากกว่า 5 mg/ml ซึ่ง 2 กลุ่มแรกถือเป็นกลุ่มที่อยู่ในเกณฑ์มีแนวโน้มพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งได้ โดยพบว่าพืชในวงศ์ Labiatae ให้ค่า IC_{50} ที่อยู่ในเกณฑ์ 2 กลุ่มแรก ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ค่า IC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในวงศ์ Labiatae ต่อ KB และ P388

ชนิดพืช	IC_{50} (mg/ml) KB	IC_{50} (mg/ml) P388
กระเพรา (<i>Ocimum sanctum</i> L.)	0.0951	0.0848
ลาเวนเดอร์ (<i>Lavendula angustifolia</i> P.)	0.4453	0.206
โหระพา (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	0.3033	0.0362
สาระแน (<i>Mentha piperita</i>)	0.0647	0.0613
Vincristine *	0.166	0.1156
5 – Fluorouracil *	1.77	0.00285

* ยารักษาโรคมะเร็ง (ตัวควบคุมเชิงบวก)

จากตารางที่ 2.4 พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชแต่ละชนิดมีความสามารถยับยั้งการเจริญ (antiproliferation) ของเซลล์มะเร็งที่ต่างชนิดกัน ในความเข้มข้นของสารที่ต่างกัน

- Prakash และ Gupta (2000) ศึกษาการต้านเนื้องอกของน้ำมันสกัดจากเมล็ดกระเพรา (*Ocimum sanctum*) โดยการกระตุ้นบริเวณต้นขาของหนู Swiss albino ด้วย 20-methylcholanthrene (MCA) ให้เป็นเนื้องอกซึ่งพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ MCA จะเริ่มเกิดเนื้องอกในสัปดาห์ที่ 5 และเพิ่มเป็น 96% ในสัปดาห์ที่ 15 ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำมันสกัดจากเมล็ดกระเพราทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนที่จะได้รับ MCA จะพบเนื้องอกในสัปดาห์ที่ 7 และเพิ่มเป็น 64% ในสัปดาห์ที่ 15 โดยหนูอีก 36% ยังคงเป็นปกติ เมื่อพิจารณาการรอดชีวิตของหนูทดลองทั้งหมด 25 ตัว เมื่อครบ 15 สัปดาห์ พบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับ MCA มีชีวิตรอดเพียง 14 ตัว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 56% ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับทั้ง MCA และ น้ำมันสกัดจากเมล็ดกระเพรารอดชีวิตถึง 20 ตัวคิดเป็น 80 % ซึ่งใกล้เคียงกับหนูในกลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ได้รับ ทั้ง MCA และวิตามิน E คือ 84% นอกจากนี้ผลการตรวจระดับของเอนไซม์ glutathione - S - transferase, superoxide dismutase และ catalase จากหนูที่ได้รับน้ำมันสกัดจากเมล็ดกระเพราพบว่ามีค่าสูงขึ้น 1.55, 0.57 และ 1.50 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับน้ำมันสกัดจากเมล็ดกระเพราแสดงว่าสารสกัดจากเมล็ดกระเพราช่วยต้านการเกิดเนื้องอกได้จากเอนไซม์ดังกล่าว

- Prashar และคณะ (1994) พบว่าสารสกัดจากใบกระเพรา (*Ocimum sanctum*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ป้องกัน skin papilloma ในหนู Swiss albino ที่เกิดจากการชักนำของ 7,12-dimethylbenz(a)anthracene โดยมีผลให้เกิดการลดลงของ glutathione ถึง 2 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในระยะเวลา 15 วัน ซึ่งในขณะเดียวกันพบกิจกรรมของเอนไซม์ glutathione-S-transferase สูงขึ้น 25%

- Dasgupta, Rao และ Yadava (2004) พบสารสกัดจากใบโหระพา (*Ocimum basilicum*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลผสมน้ำ (80 : 20) ที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีฤทธิ์ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลอิสระเช่น Glutathione-S-transferase, DT- diaphorase, Superoxide dismutase และช่วยลดการเกิด lipid peroxidation ในหนูที่ถูกทำให้เกิดมะเร็งด้วย Benzo(a)pyrene และ 7,1dimethylbenz(a)anthracene

จากผลการวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นแสดงว่าพืชหลายชนิดในวงศ์ Bupleurum (Umbelliferae) วงศ์ Zingiberaceae และ วงศ์ Labiatae มีสารทำลายเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการวิจัยของสารต้านมะเร็งในผักชีลาว ผักชีฝรั่ง [วงศ์ Bupleurum (Umbelliferae)] ขมิ้นขาว ข่า (วงศ์ Zingiberaceae) ใบยี่หระและใบแมงลัก (วงศ์ Labiatae) ดังนั้นพืชเหล่านี้จึงเป็นพืชที่น่าสนใจนำไปทดสอบหาสารมะเร็งในการวิจัยนี้

2. การสกัดสารจากพืช

สารสำคัญจากพืชสามารถสกัดจากพืชได้หลายวิธีเช่น soxhlet extraction, sonication, maceration, distillation และ microwave เป็นต้น โดยวิธี soxhlet extraction ร่วมกับ sonication จะเป็นวิธีที่เลือกเพื่อสกัดสารสำคัญในงานวิจัยนี้เนื่องจากให้ผลการสกัดที่ดีและมีข้อมูลรายงานเกี่ยวกับการสกัดสารดังต่อไปนี้

- Albu และคณะ (2004) ได้ศึกษาการสกัด carnosic acid ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากใบของ Rosemary โดยการเปรียบเทียบการใช้ใบสดและใบแห้ง วิธีสกัดต่างๆ คือ shaking water bath, ultrasonic probe และ ultrasonic bath โดยใช้ตัวทำละลายต่างๆ คือ butanone, ethyl acetate และ ethanol พบว่าใบแห้งจะให้ปริมาณสารสกัดมากกว่าใบสด ส่วนวิธีการสกัดแบบ ultrasonic bath และ ultrasonic probe ด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 จะใช้เวลาน้อยกว่าวิธี shaking water bath นั่นคือการใช้ ultrasonic bath และ ethanol จะสกัดได้ carnosic acid 18 mg/g ในเวลา 1 ชั่วโมง การใช้ ultrasonic probe และ ethanol ในเวลาเท่ากันจะให้ carnosic acid 16mg/g การใช้ shaking water bath ร่วมกับ ethanol จะได้ปริมาณ carnosic acid 15 mg/g และใช้เวลาจนถึง 3 ชั่วโมง ดังนั้นการใช้ ultrasonic bath และ ultrasonic probe จะได้ปริมาณสารใกล้เคียงกันในระยะเวลาเท่ากันแต่การใช้ shaking water bath จะให้ปริมาณสารน้อยกว่า 2 วิธี นั่นเล็กน้อยและใช้เวลานานกว่าถึง 2 ชั่วโมง การที่ ultrasonic bath และ ultrasonic probe สามารถสกัดสารได้มากเนื่องจากคลื่น ultrasonic ทำให้ฟองอากาศที่อยู่ใกล้ผนังเซลล์พืชแตกแล้วให้ตัวทำละลายเข้าไปละลายสารที่ต้องการออกมาได้ง่าย

- Salisova และคณะ (2004) ศึกษาการสกัด cineole, thujone, borneol โดยวิธี ultrasonic probe, ultrasonic bath และ ultrasonic stirring bath เปรียบเทียบกันพบว่า ultrasonic probe สามารถสกัดสารได้มากที่สุดให้ cineole 24.3 mg/kg, thujone 167.2 mg/kg และ borneol 5.8 mg/kg ในเวลาสกัด 2 ชั่วโมง ส่วน ultrasonic stirring bath สกัดสารได้ 22.7, 141.9 และ 6.3 mg/kg

ตามลำดับในเวลาสกัด 3 ชั่วโมงขณะที่ ultrasonic bath สามารถสกัดสารได้ 16.5, 118.1 และ 3.6 mg/kg ในเวลา 3 ชั่วโมง

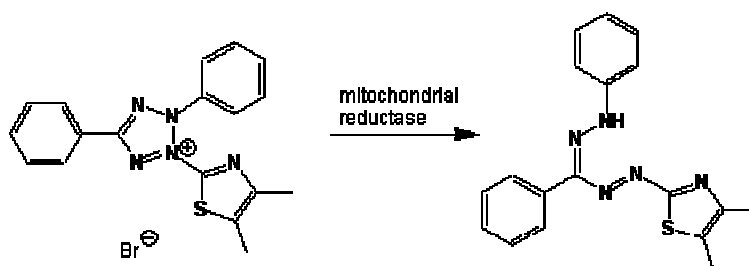
- Selma (2004) ทดลองหาวิธีสกัด plumbagin ที่ให้ฤทธิ์ต้านมะเร็งจากรากของ *Plumbago scandes* L. ด้วยวิธีสกัดต่างๆคือ static maceration, dynamic maceration, ultrasonic waves และ soxhlet apparatus พบว่า soxhlet apparatus สามารถสกัด plumbagin ได้มากที่สุดคือ 1.56 mg/ml, ultrasonic waves 0.44 mg/ml, dynamic maceration 0.33 mg/ml และ static maceration สกัด plumbagin ได้น้อยที่สุดคือ 0.18 mg/ml

เนื่องจากการสกัดสารด้วยวิธี sonication และ soxhlet extraction ใช้เวลาน้อยและได้ปริมาณสารมากกว่าวิธี shaking water bath และ maceration ดังนั้นในการศึกษารั้งนี้จึงใช้วิธี sonication ร่วมกับ soxhlet extraction ในการสกัดสารจากพืชที่วิจัย เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งต่อไป

3. การศึกษาหาสารต้านมะเร็ง

การตรวจหาความมีชีวิตของเซลล์ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการหายาต้านมะเร็งมีด้วยกันหลายวิธีเช่น

3.1 MTT assay โดย MTT (3 – (4,5 – Dimethylthiazol – 2 – yl) – 2,5 – diphenyl tetrazolium bromide) ซึ่งเรียกว่า tetrazole เป็นสีย้อมสีเหลืองที่ละลายน้ำได้และจะถูกเปลี่ยนเป็นตะกอนสีฟ้าของ formazan โดย mitochondria reductase enzyme จากเซลล์ที่มีชีวิต (ดังรูปที่ 2.7) จากนั้น formazan จะถูกละลายใน DMSO เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 500 – 600 nm ทั้งนี้การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์จะวัดจำนวนเซลล์ที่รอดหลังการบ่มกับสารทดสอบด้วยการดูการลดลงของ MTT ที่เปลี่ยนเป็น formazan เทียบกับสถานะที่ไม่มีสารทดสอบ



รูปที่ 2.7 การเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของ tetrazole เป็น formazan โดย mitochondria reductase

3.2 SRB assay (Sulforhodamine B assay) เป็นการวัดปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ด้วยสีที่เป็น anionic protein stain โดยโมเลกุลของสีมี sulfonic group 2 หมู่ จะจับกับโปรตีนในสภาวะที่เป็นกรดอ่อนๆ วิธีนี้สามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งเซลล์เกาะผิวและเซลล์แขวนลอย โดยหลังจากตรึงเซลล์ด้วย TCA และบ่มกับ SRB ใน acetic acid หลังจากนั้นจะล้างสีส่วนเกินออกทิ้งไว้ให้แห้งแล้วสกัดสีที่จับอยู่กับโปรตีนภายในเซลล์ด้วย Tris base buffer ความเข้มข้น 10 mM แล้วนำไปวัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 495 nm ทั้งนี้ความเข้มของสีจะมีความสัมพันธ์กับความมีชีวิตของเซลล์

3.3 Dry inclusion เช่น Neutral red assay โดยสี neutral red ย้อมติดเซลล์มีชีวิตโดยสีจะเข้าไปรวมตัวใน lysosomes ของเซลล์มีชีวิต ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วหรือขาดเยื่อหุ้มเซลล์จะเข้าไปจับไม่ได้ จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกแล้วจึงละลายสีที่เข้าไปจับในเซลล์ออกมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมจะแตกต่างกันไปเนื่องจากเซลล์แต่ละชนิดจะจับกับสีย้อมได้ในปริมาณที่ไม่เท่ากัน

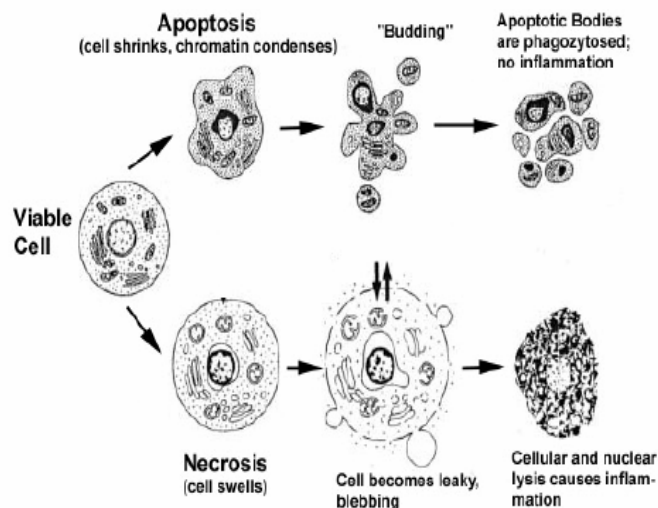
3.4 Dry exclusion เช่น การย้อมเซลล์ด้วย trypan blue ซึ่งเป็นการตรวจสอบการเป็นเนื้อเดียว (integrity) ของเซลล์เมมเบรน เซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถป้องกันไม่ให้สีเข้าไปภายในเซลล์ ดังนั้นเซลล์ที่ตายจะติดสีฟ้าของ trypan blue โดยวิธีดังกล่าวเป็นการตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่ง่ายและใช้เวลาน้อย

3.5 colony formation assay เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการบอกความสามารถอยู่รอดและการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่เนื่องจากเซลล์มักให้จำนวนโคโลนีลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารพิษมากขึ้นจึงต้องใส่เซลล์เริ่มต้นให้มากขึ้นเพื่อไม่ให้ความหนาแน่นของเซลล์ส่งผลกระทบต่อ การอยู่รอดและการเกิดโคโลนีได้ชัดเจน

4. การตายแบบ Apoptosis

Apoptosis หรือ Programmed cell death เป็นการตายอย่างจำเพาะของเซลล์ตามที่กำหนดไว้ใน genome โดยเกิดจากการชักนำหรือสัญญาณจากภายในเซลล์ หรือจากเซลล์อื่นๆ โดยทั่วไปแล้วการตายของเซลล์แบ่งเป็น 2 แบบ คือ Apoptosis และ Necrosis เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสำคัญคือ เซลล์หดตัว (cell shrinks) ซึ่ง chromatin อัดกันแน่น (chromatin condenses) บริเวณ nuclear membrane และ plasma membrane มีลักษณะเป็นถุงเรียกว่า blebbing หรือ budding สุดท้ายเซลล์จะแตกและถูกห่อหุ้มด้วย membrane เรียกว่า apoptotic bodies ซึ่งภายในจะมี condensed chromatin และ organelles ต่างๆ แล้วสุดท้าย apoptotic bodies จะถูกกินโดย macrophage ในร่างกายได้ (Saikuman, Dong and Mikhailov,

1999) การตายแบบ apoptosis จึงไม่กระทบต่อ inflammatory response ส่วนการตายแบบ necrosis เยื่อหุ้มเซลล์จะเสียสภาพ เซลล์บวมและแตก ดังนั้นองค์ประกอบภายในเซลล์จะถูกปลดปล่อยสู่เซลล์ข้างเคียง ทำให้เซลล์อื่นได้รับความเสียหายไปด้วย และเกิดการตอบสนองของ inflammatory response อย่างรุนแรงต่อเนื่อง (Leist and Jaattela, 2001)



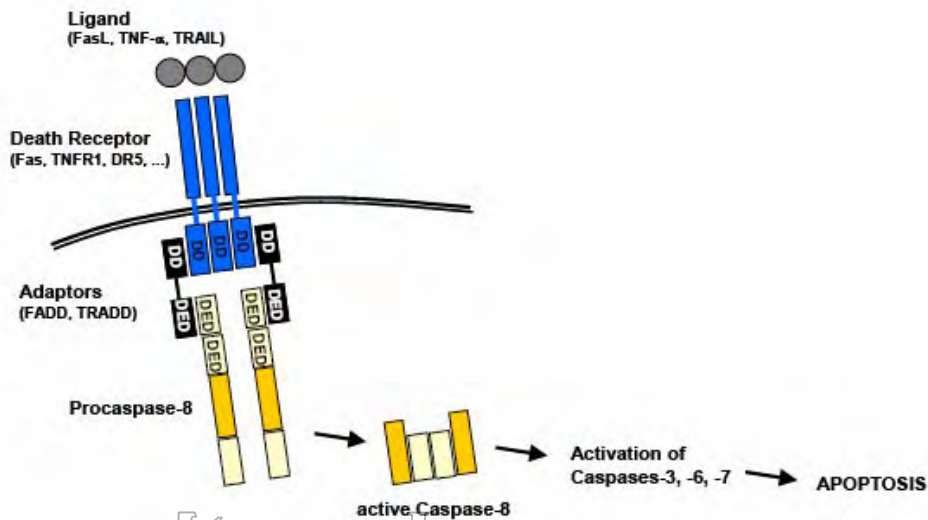
รูปที่ 2.8 ลักษณะโครงสร้างของเซลล์ที่ตายแบบ Apoptosis และ Necrosis (Van and Broeck, 2002)

การตายของเซลล์แบบ apoptosis จะเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยคำสั่งหรือสัญญาณการชักนำให้เกิดการตาย ทั้งนี้คำสั่งหรือสัญญาณนั้นมีที่มา 2 แบบ คือ คำสั่งหรือสัญญาณที่มาจากภายนอกเซลล์ (Extrinsic apoptosis) และ คำสั่งหรือสัญญาณที่มาจากภายในเซลล์ (Intrinsic apoptosis) ทั้งนี้การตายแบบ apoptosis มีกลไกการทำงานที่สัมพันธ์กันหลาย pathway เป็น network ดังนี้

1. Death receptor pathway

Death receptor pathway เป็นการทำงานของตัวรับสัญญาณเรียกว่า Death receptors ส่วนมากจะเป็นโปรตีนที่ฝังอยู่บนผนังเซลล์ เช่น Fas receptor (Fas R, Fas/CD95), Tumor necrosis factor receptor (TNFR) และ DR5 เป็นต้น ตัวสัญญาณที่จะเหนี่ยวนำเรียกว่า Ligand เช่น Fas ligand (FasL), Tumor necrosis factor - α (TNF- α) และ TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) เป็นต้น การจับกันของ receptor และ ligand ทำให้เกิดลักษณะการเชื่อมต่อกันของ Death domain (DD) และ Death effector domain (DED) เกิดกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่า Death – inducing signaling complexes (DISC) (Hennino and Berard, 2000) ซึ่ง DISC จะไปย่อย procaspase – 8 ให้เป็น caspase – 8 ซึ่งทำหน้าที่ไปกระตุ้นเอนไซม์ caspase ตัวอื่นต่อไป นอกจาก caspase – 8 ไปกระตุ้นเอนไซม์ caspase ตัวอื่นแล้ว caspase – 8 ยังไปตัดโปรตีน BH3

interacting domain death agonist (BID) ให้เป็น -BID ทั้งนี้ -BID ที่ได้จะไปจับกับ Bcl2 – associated X protein (BAX) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผิวของ mitochondria แล้วกระตุ้นการตายผ่าน Mitochondria pathway ต่อไป



มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 2.9 การกระตุ้น Apoptosis ผ่านทาง Ligand-Receptor

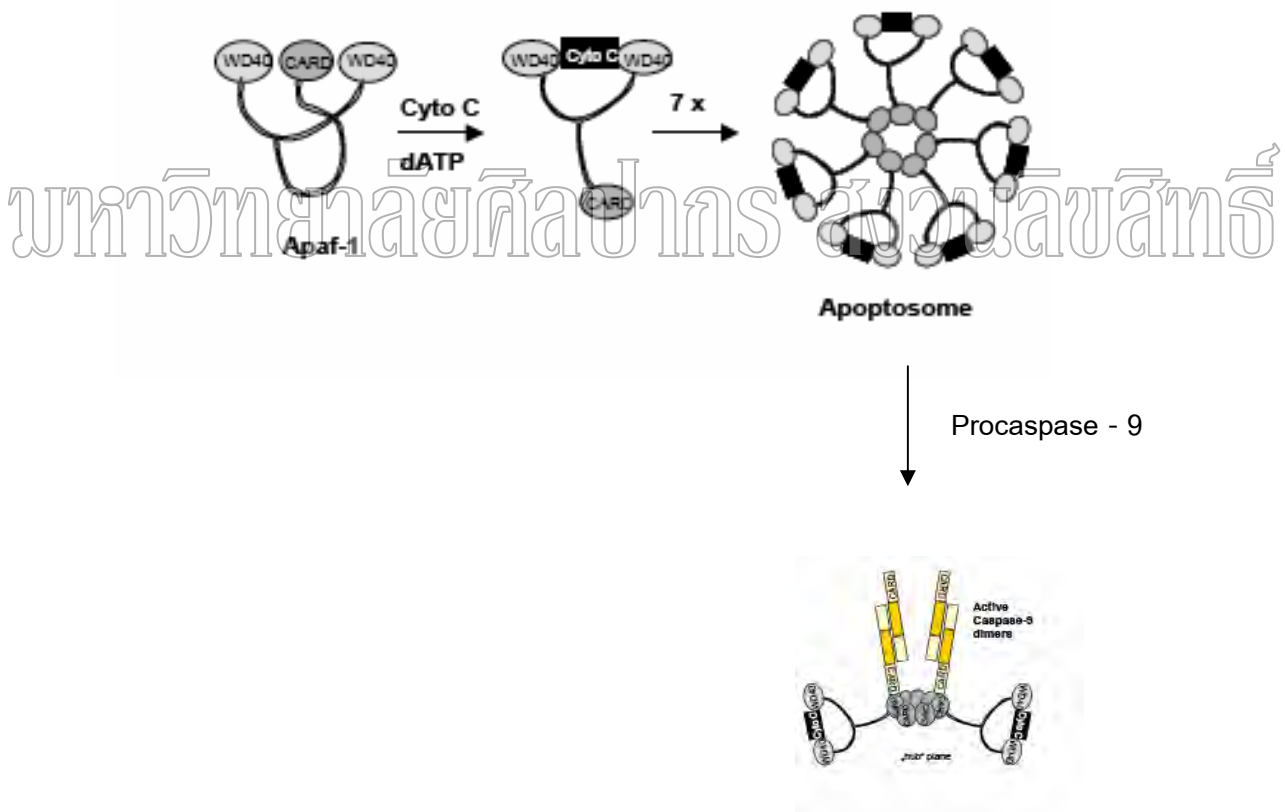
2. Mitochondria pathway สามารถเกิดผ่าน caspase dependent pathway และ caspase independent pathway ดังนี้

Caspase-dependent pathway เป็นกลไกที่เกิดขึ้นจากความผิดปกติของ DNA และโปรตีนภายในเซลล์ที่ก่อให้เกิดการกระตุ้นให้ระดับโปรตีน p53 เพิ่มขึ้น เนื่องจาก murine double minute 2 (mdm2) ไม่สามารถจับกับ p53 ได้เพราะถูกขัดขวางด้วย p19 protein และ Alternative reading frame (p19 ARF) จึงทำให้ p53 เป็นอิสระมีปริมาณเพิ่มขึ้น ความผิดปกติของโปรตีนนี้ส่งผลให้ p53 มากคล้ายกับความผิดปกติของ DNA แต่ความผิดปกติของโปรตีนนั้นเกิดจากการทำงานที่ผิดปกติของ Transcription factor E2F (Lundberg and Weinberg, 1999) ซึ่งจะกระตุ้นการทำงานของ p19^{ARF} ซึ่งจะขัดขวางการจับของ mdm2 กับ p53 แล้วทำให้ p53 เป็นอิสระมีปริมาณมาก จากนั้น p53 จะเป็น Transcription factor ในการสร้างโปรตีน p21WAF 1 และ BAX โปรตีนโดย p21WAF 1 จะทำหน้าที่หยุด cell cycle ส่วน BAX จะจับที่ผิวของไมโทคอนเดรียทำให้เกิด mitochondria transmembrane potential ซึ่งมีผลเกิดการปล่อย cytochrome C ในไมโทคอนเดรียออกมาจับกับ

Apaf - 1 (Apoptosis protease activating factor 1) เกิดเป็นโครงสร้างใหม่ที่เรียกว่า apoptosome โดย apoptosome จะไปกระตุ้น procaspase - 9 เป็น caspases - 9 แล้วจึงไปกระตุ้น procaspase - 3 เป็น caspase - 3 และ caspase - 6 ให้มีฤทธิ์ทำลายโปรตีนทั้งในเซลล์และในนิวเคลียสได้ (Saikumar, Dong and Mikhailov, 1999)

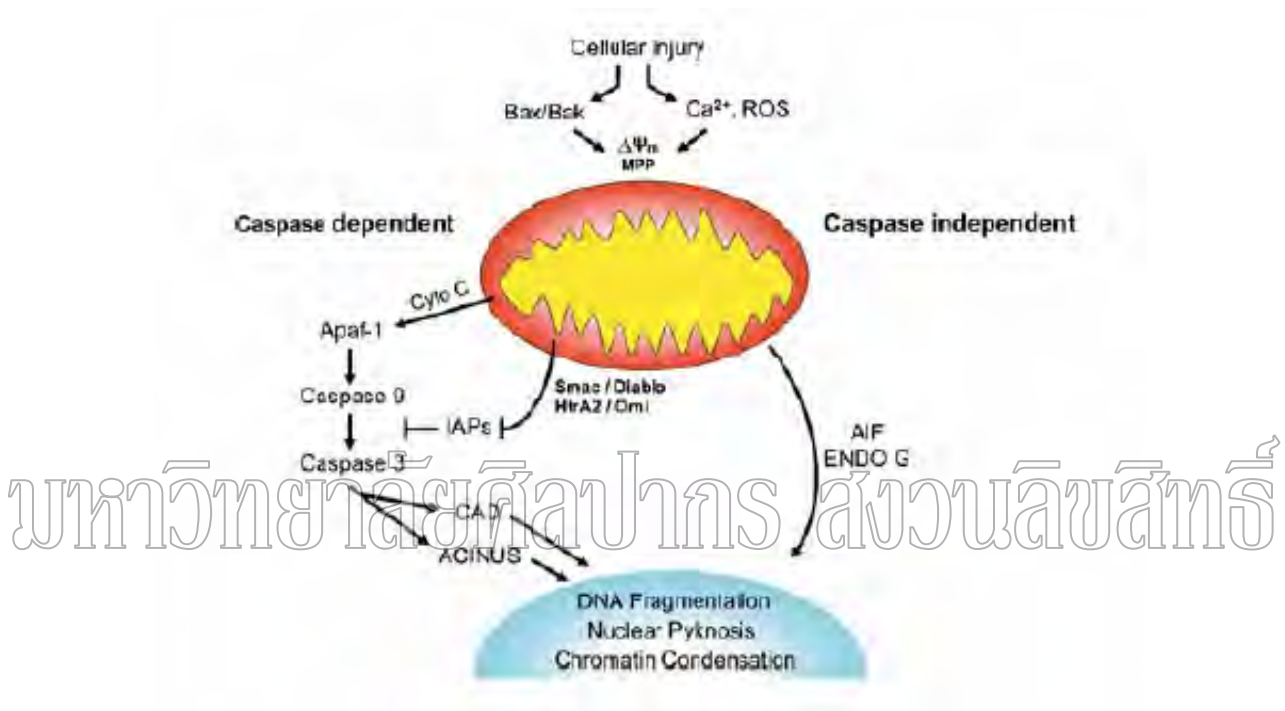


รูปที่ 2.10 Apoptosis ที่เกิดผ่าน mitochondria pathway (Acehan และคณะ, 2002)



รูปที่ 2.11 การกระตุ้น caspase ด้วย apoptosome (Acehan และคณะ, 2002)

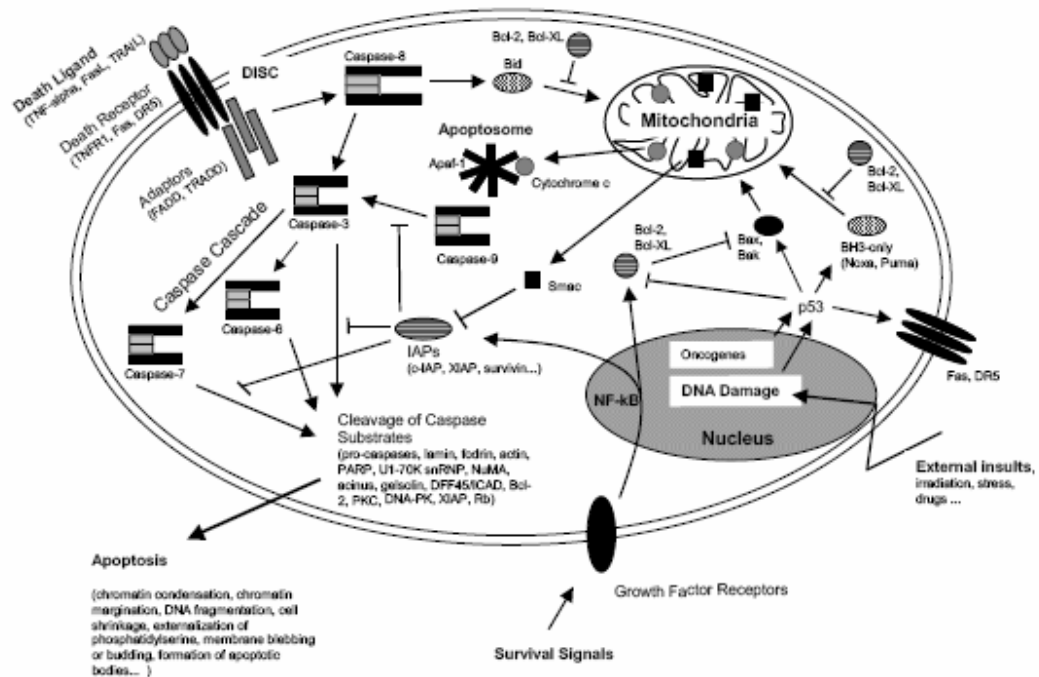
นอกจากนี้ยังมีการตายที่เกิดผ่าน caspase independent pathway ซึ่งทำให้ mitochondria ปลดปล่อย apoptosis-inducing factor (AIF) และ Endonuclease G (EndoG) สู่นucleus โดย AIF ทำให้เกิด chromatin condensation และ DNA fragment ขนาดใหญ่ EndoG ชักนำให้เกิด nucleosome DNA fragment รวมทั้งมีการปลดปล่อย AIF และ EndoG จาก mitochondria พร้อมกับการกระตุ้นผ่านทาง caspase



รูปที่ 2.12 Apoptosis ที่เกิดผ่าน caspase-dependent และ caspase-independent pathway

3. Granzyme B-mediated pathway

จากการตอบสนองของ Cytotoxic T lymphocyte (CTL) เมื่อร่างกายติดเชื้อไวรัสหรือเป็นโรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน CTL จับกับเซลล์เป้าหมาย ทำให้ granzymes (A,B) เข้าสู่เซลล์ทาง perforin และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase ให้เกิดการตายแบบ apoptosis ต่อไป



มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนนิสิต

รูปที่ 2.13 กลไกโดยรวมของ apoptosis pathway (Gewies, 2006)

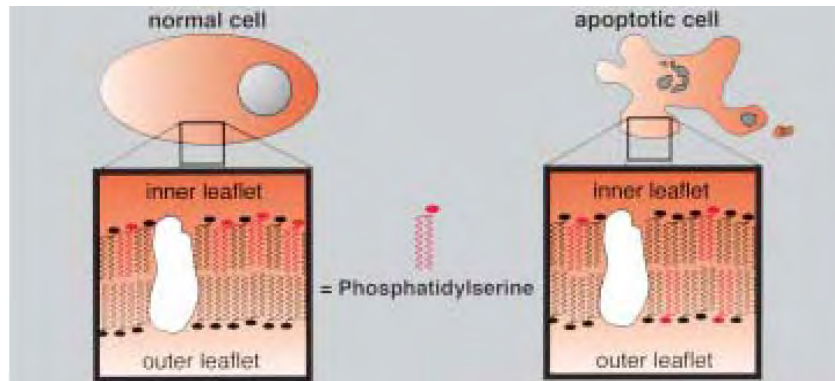
วิธีตรวจการตายแบบ apoptosis

1. Hoechst และ Propidium iodide staining

Hoechst และ Propidium iodide ไม่ซึมผ่าน membrane ของเซลล์ที่มีชีวิต แต่สารทั้ง 2 ชนิด จะซึมผ่านเซลล์ที่ตายแบบ necrosis นอกจากนี้ Hoechst สามารถซึมผ่าน membrane ของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis แล้วจะไปเข้าแทรกจับบริเวณ A – T rich ของ DNA แต่ Propidium iodide ผ่าน membrane ของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ไม่ได้ สารทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติเปล่งแสงในช่วงคลื่นที่ต่างกัน ดังนั้นการวิเคราะห์ว่าเซลล์ตายแบบ necrosis หรือ apoptosis จึงทำได้โดยการย้อมเซลล์ด้วยสารทั้ง 2 ชนิด (Vermes and Perger, 2000)

2. Annexin V staining

ระยะแรกของการตายแบบ apoptosis จะเกิด Membrane alteration โดยพบความเปลี่ยนแปลงของ plasma membrane ซึ่งโดยปกติส่วนของ phosphatidylserine (PS) จะอยู่ด้านในของ plasma membrane แต่เมื่อเซลล์เกิด apoptosis ส่วนของ PS นี้จะพบอยู่ด้านนอกของ plasma membrane ดังรูปที่ 2.14



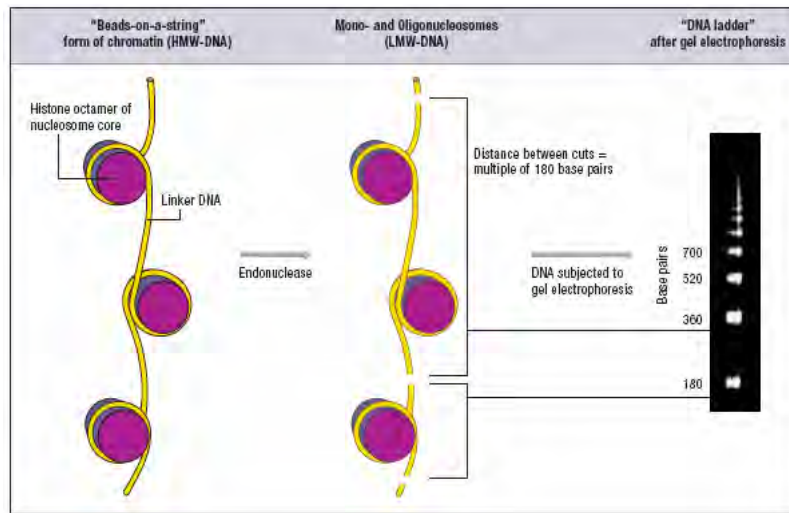
รูปที่ 2.14 การเกิด membrane alteration ในการตายแบบ apoptosis

phosphatidylserine (PS) มีคุณสมบัติเป็น anionic phospholipids ปกติจะอยู่ด้าน inner membrane เมื่อเซลล์ตายแบบ apoptosis มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่ทำให้ phosphatidylserine ย้ายจาก inner membrane ออกมาอยู่ด้าน outer membrane ซึ่งสามารถจับกับ annexin V ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ทั้งนี้อาจใช้การย้อมเซลล์ด้วย Propidium iodide ร่วมด้วยเพื่อแยกเซลล์ที่ตายแบบ necrosis และ apoptosis (Engeland และคณะ, 1998)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

3. DNA fragmentation

Genomic DNA จะถูก endogenous Ca^{2+} , Mg^{2+} dependent nuclear endonuclease ตัดสายของ DNA ในตำแหน่งระหว่าง nucleosomal units (linker DNA) ให้เป็นท่อน DNA แบบ mono – oligonucleosome และ oligonucleosomal DNA Wyllie และคณะ (1999) ศึกษาการตายแบบ apoptosis ใน rat thymocytes พบว่า endogenous endonuclease ตัดสาย DNA ตรง linker region ที่อยู่ระหว่าง histones บนโครโมโซม จึงได้ท่อน DNA ที่พันอยู่กับโปรตีน histones มีความยาวประมาณ 180 – 200 bp โดยทั่วไปเรียกว่า apoptotic ladder ดังรูป 2.15 นอกจากการเกิด DNA fragment ขนาด 180 – 200 bp แล้วยังอาจพบ DNA fragment ขนาดใหญ่ประมาณ 50 – 300 kb ร่วมด้วย



(a)

1 2 3



(b)

รูปที่ 2.15 ลักษณะ DNA ladder ในการตายแบบ apoptosis

(a) การตัดของเอนไซม์ที่ได้ DNA ladder ขนาดต่างๆ (Wyllie และคณะ, 1999)

(b) ลักษณะการเกิด DNA ladder บน 2% agarose gel Electrophoresis (Moongkarndi และคณะ, 2004)

1 = DNA marker

2 = DNA ของเซลล์ปกติ

3 = DNA ของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis

4. Strand break labeling (TUNEL assay)

เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis สาย DNA จะมีส่วนที่เป็น strand break (nick) เนื่องจากการตัดของ endonuclease การตรวจสอบจึงทำได้โดยเติมสารพวก BrdU, biotinylated BrdU หรือ digoxigenin – labeled nucleotide ให้กับส่วนปลายสาย DNA ด้วยเอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) สารที่ใช้เติมปลายของสาย DNA จะติดฉลากด้วยสารเรืองแสงเช่น streptavidin ซึ่งตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง flow cytometer

5. การตรวจวัดระดับเอนไซม์ caspase

เอนไซม์ caspase (Cytosolic Aspartate-Specific Proteases) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบ apoptosis มีหลายชนิดเช่น caspase-3, caspase-8 และ caspase-9 เป็นต้น

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์