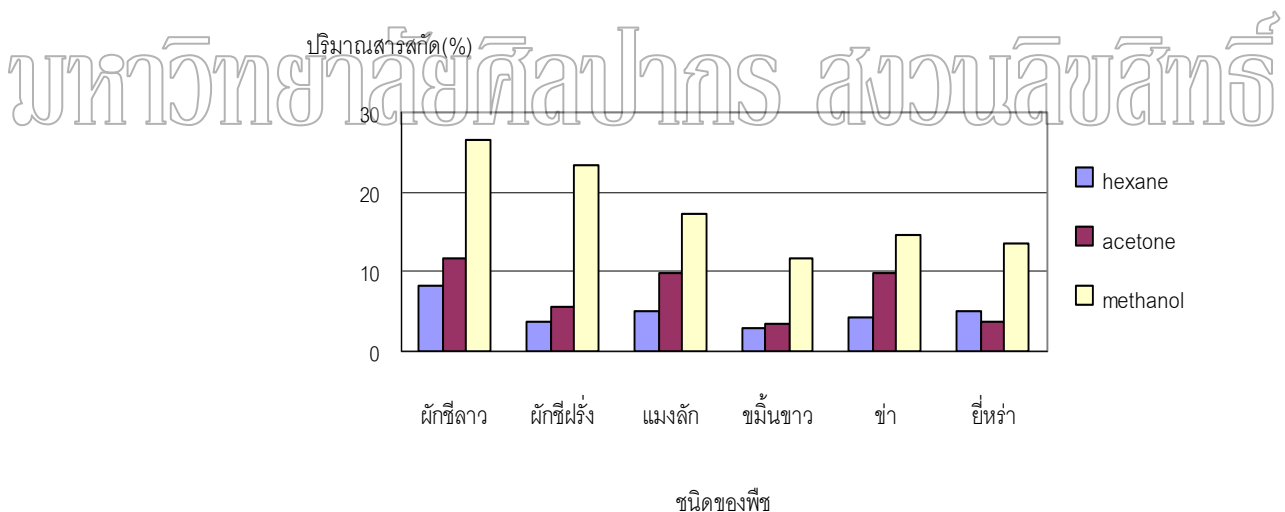


บทที่4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยวิธี Sonication ร่วมกับ Soxhlet extraction โดยใช้ตัวทำละลาย hexane, acetone และ methanol

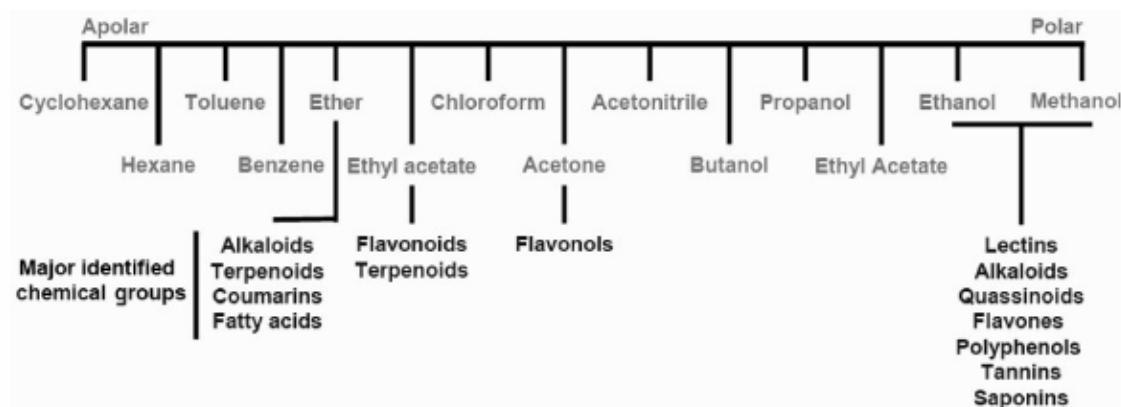
นำพืชอบแห้งบดปริมาณ 30 g มาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ปริมาตร 30 ml (hexane, acetone และ methanol) sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonication bath ที่ความถี่ 40 kHz นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นสกัดผงพืชด้วยวิธี Soxhlet extraction นาน 5 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่อง Rotary ระบบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 60°C แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C จะได้ปริมาณน้ำหนักของสารสกัดจากพืชด้วยตัวทำละลายต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 โดยกำหนดให้ปริมาณน้ำหนักเปรียบเทียบหรือปริมาณสารสกัด (%) มาจากน้ำหนักสารสกัดที่ได้ (mg) คูณ 100หารด้วยน้ำหนักแห้งของผงพืช (mg)



รูปที่ 4.1 ปริมาณสารสกัดที่ได้จากผักชีลาว ผักชีฝรั่ง แมงลัก ขมิ้นขาว ข่าและยี่หระที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

จากผลการสกัดพบว่า methanol เป็นตัวทำละลายในการสกัดที่ให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ acetone และ hexane ซึ่งอาจเป็นสาเหตุมาจากตัวทำละลายแต่ละชนิด มีความเป็นขั้วที่แตกต่างกันโดยตัวทำละลาย methanol เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงที่สุดคือ 0.95 มีอำนาจในการละลายกว้างจึงอาจสามารถละลายสารออกจากพืชได้มากกว่า acetone และ hexane ซึ่งมีขั้ว 0.56 และ 0.00 ตามลำดับ

การศึกษาของ Ramos,(2006) ที่แยกสารประกอบสำคัญในพืช โดยใช้ตัวทำละลายที่มีระดับขั้ว ต่างกันในการชะสารจากคอลัมน์ (Chromatography) พบว่าสารในกลุ่มของ Lectins, Alkaloids, Quassinoids, Polyphenols, Tannins และ Saponins จะถูกชะออกมาด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เช่น ethanol และ methanol ตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง acetone และ ethyl acetate จะชะ สารกลุ่ม flavonoids และ terpenoids ส่วนตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำจะชะสารพวก fattyacid, coumarins, terpenoids และ alkaloids บางชนิดได้ ดังรูปที่ 4.2 ดังนั้นสารจากพืชที่สกัดได้ด้วยตัว ทำละลาย methanol, acetone อาจให้สารกลุ่มทำนองเดียวกันกับการศึกษาของ Ramos ซึ่งจะมี ปริมาณสารที่มีขั้วมากกว่าไม่มีขั้วทำให้ปริมาณสารที่สกัดได้จาก methanol มีปริมาณมากที่สุด Acetone จะสกัดให้สารกลุ่ม Flavonol ส่วน hexane เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสารที่มีขั้วต่ำ หรือไม่มีขั้ว เช่น ไขมัน การที่ hexane สกัดสารได้ปริมาณน้อยที่สุดอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่มี ความเป็นขั้วต่ำมีปริมาณน้อยในพืชส่วนใหญ่ เช่น สารประเภทน้ำมันหอมระเหย ด้วยเหตุนี้การ สกัดที่ใช้ตัวทำละลายต่างชนิดจะให้สารสกัดแตกต่างกันได้และเหมาะสมสำหรับที่จะนำไปศึกษาหา สารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อไป



รูปที่ 4.2 สารประกอบของพืชที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ

สารสกัดดังกล่าว เมื่อผ่านการกำจัดตัวทำละลายจะมีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลถึงดำซึ่ง สามารถละลายได้ใน DMSO และให้ pH อยู่ในช่วง 7.5 – 7.8 ดังตารางที่ 4.1 ดังนั้นการเตรียม

stock ของสารทดสอบจึงไม่เป็นปัญหา เนื่องจากสามารถละลายและผ่านตัวกรองได้หมดและช่วง pH ของสารสกัดอาจไม่มีผลต่อเซลล์ จึงไม่ได้ทำการปรับ pH ให้เป็นกลางเมื่อทดสอบกับเซลล์

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายชนิดต่างๆและความสามารถในการละลายใน DMSO 10%

สารสกัด	ตัวทำละลายสกัดสาร	ลักษณะของสารสกัดที่ได้
แมงลัก	hexane	สารสกัดที่ได้มีสีน้ำตาลปนดำ ละลายใน DMSO ค่อนข้างยาก เมื่อกรองผ่าน ascordisc ได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อนปนเขียว pH มีค่า 7.68
	acetone	สารสกัดที่ได้เป็นของแข็งและเหนียวแต่ไม่เหนียว สีดำเข้ม ละลายใน DMSO ง่าย เมื่อกรองผ่าน ascordisc ได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C นานประมาณ 2 สัปดาห์ เกิดการแยกชั้นสีดำที่ก้นขวดแต่เมื่อเขย่าแล้วจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน pH มีค่า 7.61
	methanol	สารสกัดที่ได้มีลักษณะแข็งมากแต่ละลายใน DMSO ง่ายและกรองผ่าน ascordisc ง่าย เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C นานประมาณ 2 สัปดาห์ เกิดตะกอนสีดำ แต่เขย่าแล้วจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน pH มีค่า 7.55
ขมิ้นขาว	hexane	สารสกัดมีสีน้ำตาลอ่อน มีลักษณะใส วาว และแข็ง ละลายใน DMSO ง่ายมากแต่เมื่อใส่อาหารเกิดลักษณะขุ่นเป็น colloid สีน้ำตาล กรองผ่าน ascordisc ได้สารละลายสีออกชมพู pH มีค่า 7.48
	acetone	สารสกัดเป็นของแข็งสีน้ำตาลใสละลายใน DMSO ง่ายมากแต่เมื่อใส่อาหารเกิดลักษณะขุ่นเป็น colloid สีน้ำตาล กรองผ่าน ascordisc ได้ง่าย เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C นานประมาณ 2 สัปดาห์ เกิดตะกอนสีขาวแต่เมื่อเขย่าแล้วจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน pH มีค่า 7.54
	methanol	สารสกัดเป็นของแข็งสีน้ำตาลใส เหนียวและแข็งมาก ละลายใน DMSO ค่อนข้างง่ายแต่เมื่อใส่อาหารเกิดลักษณะขุ่นเป็น colloid สีน้ำตาล กรองผ่าน ascordisc ได้ง่าย pH มีค่า 7.62
ผักชีฝรั่ง	hexane	สารสกัดมีลักษณะเหนียว สีดำเงา ละลายใน DMSO ง่าย กรองผ่าน ascordisc ง่าย ได้สารละลายสีเหลือง pH มีค่า 7.53
	acetone	สารสกัดมีลักษณะเหนียว สีดำเงา ละลายใน DMSO ง่าย กรองผ่าน ascordisc ง่าย ได้สารละลายสีเหลือง pH มีค่า 7.58
	methanol	สารสกัดมีลักษณะเหนียว สีน้ำตาลปนดำ แข็ง เหนียวและเหนียว ละลายใน DMSO ง่าย กรองผ่าน ascordisc ง่ายได้สารละลายสีเหลืองเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C นานประมาณ 2 สัปดาห์ เกิดตะกอนสีดำแต่เมื่อเขย่าแล้วจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน pH มีค่า 7.55

ตารางที่ 4.1(ต่อ) ลักษณะของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายชนิดต่างๆและความสามารถในการละลายใน DMSO10%

สารสกัด	ตัวทำละลายสกัดสาร	ลักษณะของสารสกัดที่ได้
ข้า	hexane	สารสกัดที่ได้มีสีน้ำตาลอ่อน มีลักษณะคล้ายน้ำมัน ละลายใน DMSO ง่ายมาก กรองผ่าน ascordisc ง่าย ได้สารละลายสีเหลืองอ่อน pH มีค่า 7.56
	acetone	สารสกัดที่ได้มีสีน้ำตาลแดง มีลักษณะคล้ายน้ำมัน ละลายใน DMSO ง่ายมากกรองผ่าน ascordisc ง่ายได้สารละลายสีเหลืองอ่อน pH มีค่า 7.64
	methanol	สารสกัดที่ได้มีสีน้ำตาล ลักษณะแข็งมาก ละลายใน DMSO ค่อนข้างยาก กรองผ่าน ascordisc ง่ายได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน pH มีค่า 7. 58
ผักชีลาว	hexane	สารสกัดที่ได้มีสีน้ำตาลดำ มีลักษณะเหนียวมาก ละลายใน DMSO ง่าย กรองผ่าน ascordisc ง่ายได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน pH มีค่า 7.75
	acetone	สารสกัดที่ได้มีสีดำและเหนียว ละลายใน DMSO ค่อนข้างยาก กรองผ่าน ascordisc ง่ายได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน pH มีค่า 7.59
	methanol	สารสกัดที่ได้มีลักษณะเหนียวแข็งสีดำและมีผลึกโปร่งใสเล็กน้อย ละลายใน DMSO ค่อนข้างง่าย กรองผ่าน ascordisc ง่ายได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน pH มีค่า 7.57
ยี่ห่วย	hexane	สารสกัดที่ได้มีลักษณะเหมือนน้ำมัน สีน้ำตาลอ่อน ละลายใน DMSO ง่าย กรองผ่าน ascordisc ง่ายได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อนเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C นานประมาณ 2 สัปดาห์ เกิดตะกอนสีดำ แต่เมื่อเขย่าแล้วจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน pH มีค่า 7.54
	acetone	สารสกัดที่ได้มีสีเขียวออกดำ ละลายใน DMSO ง่ายมาก กรองผ่าน ascordisc ง่ายได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน pH มีค่า 7.52
	methanol	สารสกัดที่ได้มีสีน้ำตาลปนดำ ลักษณะเหนียวมาก ละลายใน DMSO ง่าย กรองผ่าน ascordisc ง่าย ได้สารละลายสี น้ำตาลอ่อน pH มีค่า 7.61

4.2 การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัด

สารสกัดจากพืชทั้ง 6 ชนิดได้แก่ ใบแมงลัก ขมิ้นขาว ผักชีฝรั่ง ข่า ผักชีลาว และใบยี่หระ จาก 4.1 ได้ถูกนำมาศึกษาความเป็นพิษเบื้องต้นต่อเซลล์มะเร็ง 4 ชนิดคือ HeLa, KB, P388 และ SW620 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1 mg/ml ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูล แนวโน้มการเป็นสารยับยั้งมะเร็งจากสารสกัดต่างๆ

การทดสอบที่ใช้สารสกัดเข้มข้น 1 mg/ml เป็นข้อมูลแนวทางการตรวจสอบสารสกัดหายาจาก พืชที่ประยุกต์มาจากการงานของ Manosroi และคณะ (2005) ที่กล่าวว่า พืชที่ให้ค่า IC_{50} อยู่ในช่วงน้อยกว่า 0.125 mg/ml และ 0.125 – 5 mg/ml จะเป็นพืชที่มีแนวโน้มมีสารต้านมะเร็งได้ นอกจากนี้ หากการยับยั้งสามารถออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งได้หลายๆชนิดก็จะมีแนวโน้มการเป็นสารต้านมะเร็ง สูง ดังนั้นในที่นี้จึงบ่มเลี้ยงเซลล์มะเร็งในอาหารนาน 48 ชั่วโมง ให้อยู่ในระยะ log phase ซึ่งเป็นระยะเหมาะสมที่สุดต่อการตอบสนองของสารทดสอบต่อเซลล์ จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารทดสอบที่มีสารสกัดต่างๆ และบ่มเลี้ยงต่อนาน 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี trypan blue exclusion เทียบกับสภาวะปกติของเซลล์มะเร็งที่ไม่มีสารทดสอบแต่มี DMSO เข้มข้น 1% ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัด ซึ่งให้ผลความมีชีวิตของเซลล์ดังแสดงในตารางที่ 4.2–4.5

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ HeLa หลังบ่มเลี้ยงร่วมกับสารสกัดชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 1 mg/mlนาน 48 ชั่วโมง

สารสกัด	ตัวทำละลายสกัดสาร	% ความมีชีวิต	% ความมีชีวิตเทียบกับเซลล์ควบคุม
อาหารเลี้ยงเซลล์	-	87.65 ± 2.81	100
อาหารเลี้ยงเซลล์ + 1% DMSO	-	86.10 ± 0.47	98.24 ± 0.53
แมงลัก	hexane	76.84 ±14.29	87.45 ± 13.49
	acetone	51.85 ± 3.058	59.13 ± 1.61
	methanol	69.69 ± 2.02	81.36 ± 2.36
ขมิ้นขาว	hexane	25.81 ± 7.49	29.6 ± 9.5
	acetone	40.00 ± 5.62	44.56 ± 4.95
	methanol	67.47 ± 3.29	76.96 ± 1.29
ผักชีฝรั่ง	hexane	82.25 ± 8.21	94.04 ± 12.39
	acetone	82.46 ± 3.40	94.07 ± 0.86
	methanol	73.97 ± 6.02	84.33 ± 4.15
ข่า	hexane	58.82 ± 3.43	67.21 ± 6.07
	acetone	86.96 ± 1.48	99.29 ± 4.87
	methanol	75.81 ± 4.38	86.62 ± 7.78
ผักชีลาว	hexane	72.46 ± 4.73	82.79 ± 8.06
	acetone	83.33 ± 6.11	95.23 ± 10.02
	methanol	90.77 ± 0.65	100
ยี่หระ	hexane	48.00 ± 4.59	54.88 ± 7.0
	acetone	0	0
	methanol	84.01 ± 1.73	95.86 ±1.97

ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ HeLa ที่บ่มกับสารสกัดชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 1 mg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดจากใบยี่หระที่ใช้ acetone เป็นตัวทำละลายสามารถทำให้เซลล์มะเร็ง HeLa มีความมีชีวิตเป็นศูนย์ โดยไม่เป็นผลจากฤทธิ์ของ DMSO 1% ซึ่งใช้ละลายสารสกัด ทั้งนี้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของ DMSO 1% มีชีวิตสูงถึง 98.24 ± 0.53% เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติ นอกจากนี้การตรวจสอบการตกค้างของตัวทำละลายที่ใช้สกัดได้ถูกทดสอบด้วยเช่นกัน โดยการนำตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดคือ hexane, acetone และ methanol ที่สภาวะเดียวกันกับการสกัดสารไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator จนหมดแล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายสิ่งนี้อาจตกค้างจากการระเหยตัวทำละลายไปทดสอบ

ความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า การระเหยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดไม่เหลือสารตกค้างที่เป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับอาหารที่ละลายสิ่งที่อาจตกค้างใน flask ที่ระเหย hexane, acetone และ methanol มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 97.79 ± 1.82 , 98.16 ± 2.38 และ 99.92 ± 9.37 ตามลำดับเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติ

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซนต์การมีชีวิตของเซลล์ KB หลังบ่มเลี้ยงร่วมกับสารสกัดชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml นาน 48 ชั่วโมง

สารสกัด	ตัวทำละลายสกัดสาร	% ความมีชีวิต	% ความมีชีวิตเทียบกับเซลล์ควบคุม
อาหารเลี้ยงเซลล์	-	91.23 ± 2.43	100
อาหารเลี้ยงเซลล์ + 1% DMSO		73.94 ± 3.32	81.03 ± 1.48
แมงลัก	hexane	66.2 ± 3.46	72.67 ± 5.73
	acetone	0	0
	methanol	66.67 ± 2.03	73.08 ± 0.28
ขมิ้นขาว ผักชีฝรั่ง	hexane	15.38 ± 3.67	16.92 ± 4.48
	acetone	0	0
	methanol	0	0
	hexane	75.49 ± 6.42	82.87 ± 9.24
	acetone	76.04 ± 5.81	83.47 ± 8.59
	methanol	85.71 ± 3.95	93.93 ± 1.83
ข่า	hexane	83.33 ± 17.39	91.63 ± 21.51
	acetone	79.61 ± 4.45	87.36 ± 7.21
	methanol	70.27 ± 6.01	77.14 ± 8.64
ผักชีลาว	hexane	80.56 ± 2.14	88.31 ± 0.00
	acetone	83.89 ± 9.54	92.13 ± 12.91
	methanol	19.61 ± 5.16	21.58 ± 6.23
ยี่หระ	hexane	57.97 ± 5.4	63.65 ± 7.61
	acetone	0	0
	methanol	75.97 ± 7.24	83.19 ± 5.72

จากตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ KB หลังจากบ่มเลี้ยงในอาหารร่วมกับสารสกัดชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดจากใบแมงลัก ใบยี่หระ และขมิ้นขาวที่สกัดด้วย acetone เป็นตัวทำละลาย สามารถทำให้เซลล์มะเร็ง KB มีความมีชีวิตเป็นศูนย์ โดยเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับอาหารที่มีความเข้มข้นของ DMSO 1% เซลล์มีความมีชีวิตสูงถึง

81.03 ± 1.48 เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติอีกทั้งไม่มีสารตกค้างของตัวทำละลายมามีผลต่อการวิเคราะห์เนื่องจากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับอาหารที่ละลายสิ่งที่อาจตกค้างจากการระเหยของ hexane, acetone และ methanol ให้มีความมีชีวิต 92.67 ± 5.09, 96.94 ± 0.83 และ 93.71 ± 1.17 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซนต์การมีชีวิตของเซลล์ P388 หลังบ่มเลี้ยงร่วมกับสารสกัดชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 1 mg/ml นาน 48 ชั่วโมง

สารสกัด	ตัวทำละลายสกัดสาร	% ความมีชีวิต	% ความมีชีวิตเทียบกับเซลล์ควบคุม
อาหารเลี้ยงเซลล์	-	97.17 ± 5.52	100
อาหารเลี้ยงเซลล์ + 1% DMSO		87.79 ± 1.59	90.45 ± 3.50
แมงลัก	hexane	83.67 ± 5.03	86.09 ± 0.28
	acetone	5.00 ± 2.14	5.09 ± 1.92
	methanol	67.50 ± 6.71	69.91 ± 11.07
ขมิ้นขาว	hexane	0	0
	acetone	0	0
	methanol	59.38 ± 5.52	61.37 ± 9.17
ผักชีฝรั่ง	hexane	92.50 ± 7.25	95.57 ± 12.90
	acetone	85.92 ± 4.49	88.59 ± 0.19
	methanol	87.06 ± 2.27	89.68 ± 2.76
ข่า	hexane	14.81 ± 3.28	15.17 ± 2.51
	acetone	72.86 ± 4.75	75.25 ± 9.17
	methanol	77.38 ± 5.79	79.59 ± 1.43
ผักชีลาว	hexane	89.13 ± 4.51	91.74 ± 0.57
	acetone	90.42 ± 6.91	93.41 ± 12.42
	methanol	86.52 ± 5.71	89.02 ± 0.81
ยี่หระ	hexane	86.24 ± 3.54	88.79 ± 1.40
	acetone	0	0
	methanol	0	0

ตารางที่ 4.4 แสดงเปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ P388 หลังจากบ่มเลี้ยงในอาหารร่วมกับสารสกัดชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 1 mg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดจากใบยี่หระที่สกัดด้วยตัวทำละลาย acetone, methanol และสารสกัดจากขมิ้นขาวที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane, acetone ทำให้เซลล์มะเร็ง P388 มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตเป็นศูนย์ โดยความมีชีวิตของเซลล์ในอาหารที่มีความเข้มข้นของ DMSO 1% เซลล์มีความมีชีวิตสูงถึง 90.45 ± 3.50 เมื่อเทียบกับเซลล์ที่

เลี้ยงในอาหารปกติ อีกทั้งไม่มีความเป็นพิษของสารตกค้างของสารละลายมาบงกการวิเคราะห์ เนื่องจากความมีชีวิตของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับอาหารที่ละลายสิ่งที่อาจตกค้างจากสารละลาย hexane, acetone และ methanol ให้ค่าความมีชีวิตเป็น 90.37 ± 9.24 , 91.68 ± 12.18 และ 88.25 ± 9.56 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซนต์การมีชีวิตของเซลล์ SW620 หลังบ่มเลี้ยงร่วมกับสารสกัดชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml นาน 48 ชั่วโมง

สารทดสอบ	ตัวทำละลายสกัดสาร	% ความมีชีวิต	% ความมีชีวิตเทียบกับเซลล์ควบคุม
อาหารเลี้ยงเซลล์	-	95.45 ± 2.3	100
อาหารเลี้ยงเซลล์ + 1% DMSO	-	92.18 ± 2.99	96.57 ± 0.81
แมงลัก	hexane	84.18 ± 2.96	91.26 ± 9.48
	acetone	0	0
	methanol	36.67 ± 5.71	38.34 ± 5.05
ขมิ้นขาว ผักขีฝรั่ง	hexane	53.16 ± 4.62	55.77 ± 6.19
	acetone	0	0
	methanol	90.24 ± 2.89	94.53 ± 0.76
	hexane	86.07 ± 5.64	90.33 ± 3.45
	acetone	94.37 ± 5.16	98.83 ± 3.01
	methanol	90.64 ± 0.93	94.98 ± 1.31
ข่า	hexane	79.87 ± 5.16	83.64 ± 3.38
	acetone	82.98 ± 3.50	87.01 ± 5.77
	methanol	85.72 ± 4.31	$89.78 \pm .34$
ผักชีลาว	hexane	92.04 ± 1.66	96.42 ± 1.74
	acetone	92.71 ± 2.93	97.13 ± 3.06
	methanol	80.00 ± 9.84	83.96 ± 12.34
ยี่หระ	hexane	85.44 ± 2.75	89.51 ± 0.72
	acetone	0	0
	methanol	75.42 ± 5.23	79.11 ± 7.38

ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ SW620 หลังบ่มในอาหารที่มีสารสกัดชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดจากใบแมงลัก ใบยี่หระและขมิ้นขาวที่สกัดด้วยตัวทำละลาย acetone ทำให้เซลล์มะเร็ง SW620 มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตเป็นศูนย์ โดยความมีชีวิตของเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับอาหารที่มีความเข้มข้นของ DMSO 1% ให้ความมีชีวิตสูงถึง 96.57 ± 0.81 เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติโดยสารละลายที่ใช้ในการสกัดสาร

ไม่มีสารตกค้างที่ก่อความเป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากค่าความมีชีวิตของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับอาหารที่ละลายสิ่งนี้อาจตกค้างจากสารละลาย hexane, acetone และ methanol มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 92.96 ± 0.37 , 96.82 ± 3.99 และ 88.29 ± 1.13 ตามลำดับเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติ

จากตารางที่ 4.2 – 4.5 การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดความเข้มข้น 1 mg/ml จากพืชทั้ง 6 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน เมื่อนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็ง HeLa, KB, P388, SW620 พบว่าชนิดพืช ชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และชนิดของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบจะให้ผลแตกต่างกันโดยเมื่อพิจารณาเฉพาะที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเป็นศูนย์จะได้ชนิดพืชและสารละลายที่ใช้ในการสกัดที่อาจให้สารต้านมะเร็งสรุปได้ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 สารสกัดจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเป็นศูนย์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติ

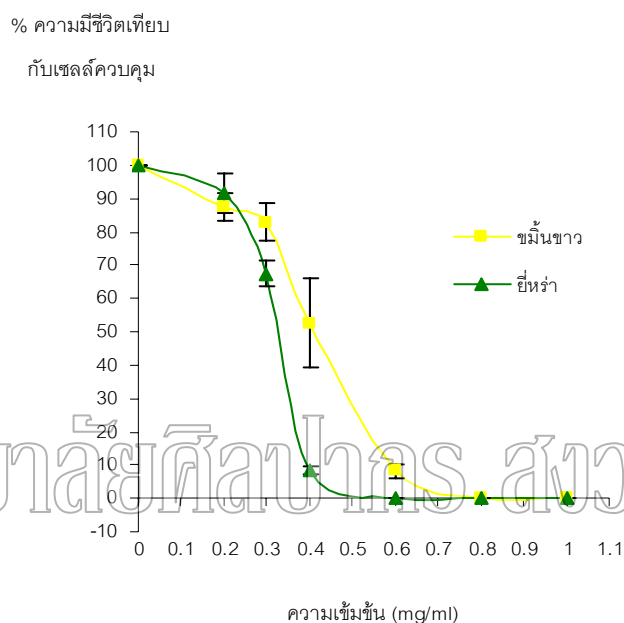
ชนิดของพืช	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	เซลล์
แมงลัก	acetone	KB, SW620
ยี่หระ	acetone	HeLa, KB, P388, SW620
ขมิ้นขาว	hexane	HeLa, KB
ขมิ้นขาว	acetone	HeLa, KB, P388, SW620
ขมิ้นขาว	methanol	KB
ผักชีลาว	methanol	KB

ตารางที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่า acetone เป็นสารละลายเหมาะสมที่สามารถให้สารสกัดที่มีแนวโน้มเป็นสารต้านมะเร็งมากกว่าตัวทำละลาย methanol และ hexane โดยขมิ้นขาวมีแนวโน้มให้สารต้านมะเร็งหลายกลุ่มทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว จึงเหมาะเป็นอาหารที่ป้องกันโรคมะเร็งได้ดีกว่าพืชทดสอบชนิดอื่นเมื่อใช้บริโภคทั่วไป อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงผลการยับยั้งต่อเซลล์มะเร็งต่างๆ พบว่าสารสกัดจากขมิ้นขาวและยี่หระที่สกัดด้วยตัวทำละลาย acetone จะมีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งทุกชนิดที่ทดสอบ จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดดังกล่าวมีกลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งหรือมีความเป็นพิษต่อเซลล์ในลักษณะเดียวกัน ทั้งนี้ Murakami และคณะ (1995) พบว่าสารสกัดจากยี่หระที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ด้านการเกิดเนื้องอกในเซลล์ Raji จากผลการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดที่ได้นั้นผู้วิจัยได้นำมาศึกษาหาค่า IC_{50} ของสารสกัดโดยทำการทดลองบ่มเลี้ยงเซลล์ในระยะ log phase ร่วมกับสารสกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับความมีชีวิต

ของเซลล์เทียบกับเซลล์ควบคุมแล้วนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและความเข้มข้นของสารสกัดที่มีต่อเซลล์มะเร็งต่างๆ ดังรูปที่ 4.3 – 4.7

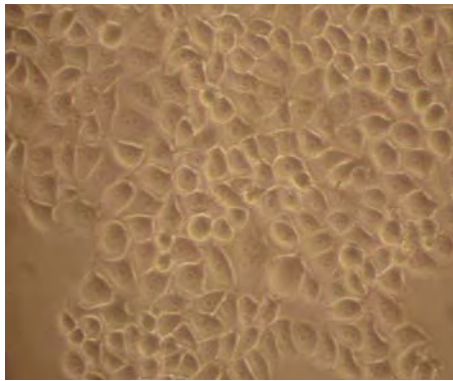
4.3 การทดสอบหาการยับยั้งของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งต่างๆ

4.3.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดขมิ้นขาวและใบยี่หระด้วย acetone ต่อเซลล์มะเร็ง HeLa

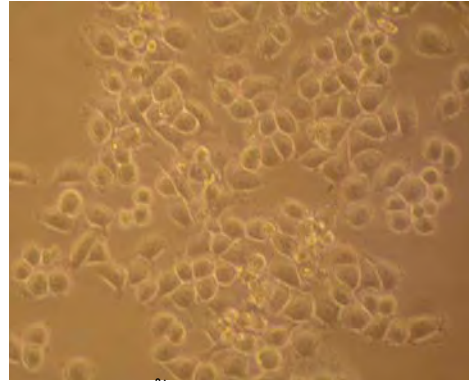


รูปที่ 4.3 เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ HeLa หลังป่นร่วมกับสารสกัดขมิ้นขาว และยี่หระที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/ml

รูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าเปอร์เซนต์ต่อความมีชีวิตของเซลล์ HeLa จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดจากยี่หระจะให้เปอร์เซนต์ความมีชีวิตเป็นศูนย์ที่ความเข้มข้น 0.6 mg/ml ขณะที่ขมิ้นขาวให้ความมีชีวิตเป็นศูนย์ที่สารสกัดขมิ้นขาวเข้มข้น 0.8 mg/ml และเมื่อพิจารณาค่า IC_{50} ที่ก่อให้เกิดความมีชีวิตของ HeLa ลดลงจากสภาวะปกติถึงหนึ่งจะได้ค่า IC_{50} ของสารสกัดขมิ้นขาวที่ 0.41 mg/ml และสารสกัดยี่หระที่ 0.33 mg/ml



Control



ขมิ้นขาว 0.3 mg/ml



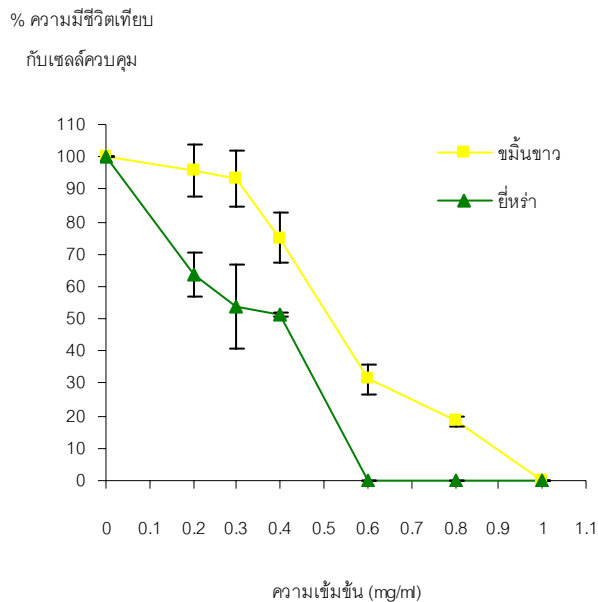
ขมิ้น 0.3 mg/ml

มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนนิเทศศาสตร์

รูปที่ 4.4 ลักษณะและรูปร่างของเซลล์ HeLa เมื่อบ่มเลี้ยงกับสารสกัดที่ทดสอบนาน 48 ชั่วโมง

จากการสังเกตเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีสารสกัดเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติ (control) พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะปกติมีความหนาแน่นของเซลล์มาก เซลล์มีลักษณะยาวใสและเกาะแผ่เจริญดี ส่วนเซลล์ที่บ่มเลี้ยงในสารสกัดขมิ้นขาวเข้มข้น 0.3 mg/ml มีลักษณะคล้ายเซลล์ในสภาวะปกติมากกว่า ขณะที่เซลล์ที่บ่มเลี้ยงในสารสกัดขมิ้นขาวเข้มข้น 0.3 mg/ml ที่ความเข้มข้นเดียวกันมีลักษณะของเซลล์ผิดปกติ บางเซลล์เล็กบางเซลล์ใหญ่และพบลักษณะเป็นถุงเซลล์เล็กๆ จำนวนมากและเมื่อนับความมีชีวิตของเซลล์ในทั้งสองสภาวะพบว่าเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาวที่ความเข้มข้น 0.3 mg/ml มีชีวิต 82.98% ขณะที่เซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาวที่ความเข้มข้น 0.3 mg/ml มีชีวิต 67.27% แสดงว่าสารสกัดจากขมิ้นขาวน่าจะเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa มากกว่าสารสกัดจากขมิ้นขาว ซึ่งสอดคล้องกับค่า IC_{50} ที่ได้จาก 4.3.1

4.3.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของไขมันขาวและใบยี่หระต่อเซลล์มะเร็ง KB



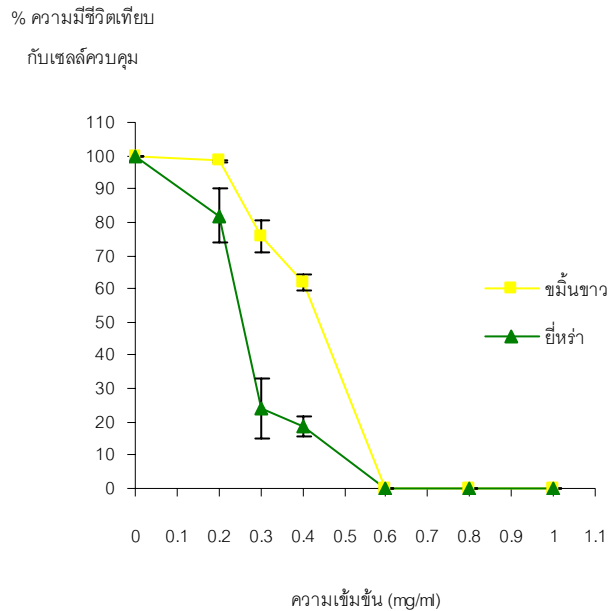
มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

รูปที่ 4.5 เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ KB หลังบ่มร่วมกับสารสกัดไขมันขาว และยี่หระที่ ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/ml

จากรูปที่ 4.5 สารสกัดจากไขมันขาวและใบยี่หระมีผลต่อ KB ในลักษณะเดียวกับ HeLa คือจะก่อให้เกิดการยับยั้งเซลล์มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้น โดยความเข้มข้นของสารสกัดไขมันขาวที่ก่อให้เกิดความมีชีวิตของเซลล์เป็นศูนย์คือความเข้มข้นที่ 1 mg/ml ขณะที่สารสกัดจากยี่หระให้ความมีชีวิตของเซลล์เป็นศูนย์ ที่ความเข้มข้น 0.6 mg/ml และที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของ

สารสกัด (0.2 mg/ml) ที่เซลล์มีชีวิตสูงพบว่าสารสกัดใบยี่หระให้ความมีชีวิตของเซลล์สูง 63.64 % ขณะที่ไขมันขาวให้ความมีชีวิต 95.74 % และเมื่อพิจารณาค่า IC_{50} จะได้ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากใบยี่หระที่ 0.40 mg/ml ส่วนสารสกัดไขมันขาวให้ค่า IC_{50} ที่ 0.51 mg/ml ซึ่งแสดงว่ายี่หระให้สารสกัดที่เป็นพิษต่อ KB มากกว่าไขมันขาว

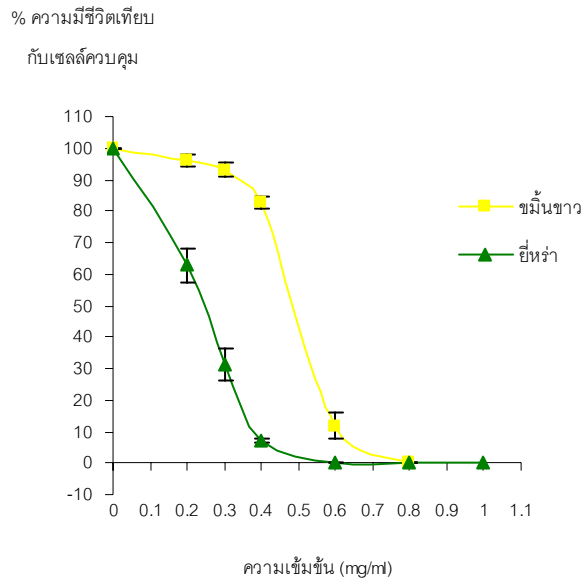
4.3.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของไขมันขาวและใบยี่หระต่อเซลล์มะเร็ง P388



รูปที่ 4.6 เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ P388 หลังบ่มร่วมกับสารสกัดไขมันขาว และยี่หระ ที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/ml

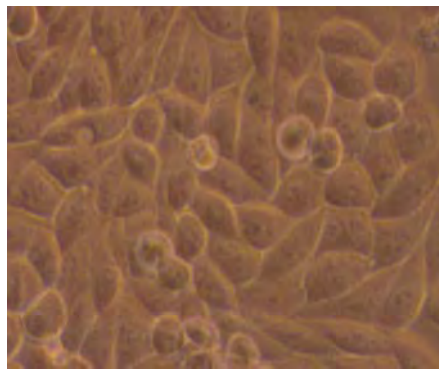
สารสกัดทั้ง 2 ชนิดทำให้เซลล์ P388 มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตลดลงเรื่อยๆเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นโดยความเข้มข้นของสารสกัดที่ 0.6 mg/ml จะทำให้เซลล์มีความมีชีวิตเป็นศูนย์และเมื่อพิจารณาแนวเส้นความมีชีวิตพบว่าแนวเส้นของการทดลองด้วยยี่หระเกิดที่ความเข้มข้นต่ำกว่าและเกิดก่อนไขมันขาวแสดงว่าสารสกัดจากใบยี่หระเป็นพิษต่อเซลล์ P388 มากกว่าสารสกัดจากไขมันขาวเช่นเดียวกับผลทดสอบในเซลล์ HeLa และ KB โดยระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ให้ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากใบยี่หระอยู่ที่ 0.26 mg/ml ขณะที่สารสกัดจากไขมันขาวให้ค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 0.44 mg/ml

4.3.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของไขมันขาวและใบยี่ห่วยต่อเซลล์มะเร็ง SW620

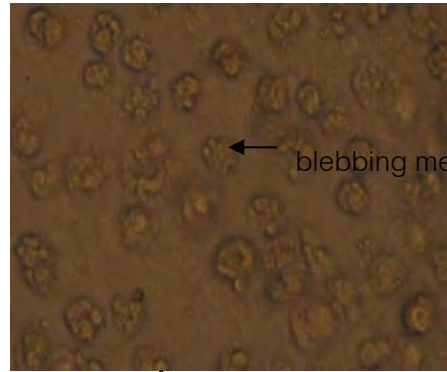


รูปที่ 4.7 เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ SW620 หลังบ่มร่วมกับสารสกัดไขมันขาว และยี่ห่วยที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/ml

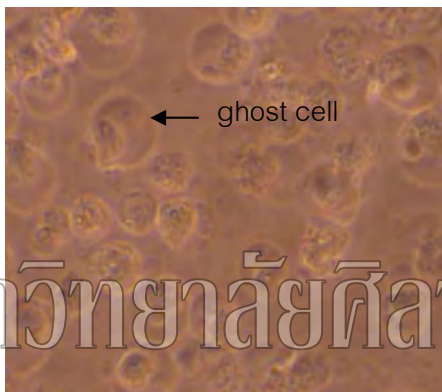
สารสกัดจากใบยี่ห่วยและไขมันขาวมีผลยับยั้งความมีชีวิตของเซลล์ SW 620 โดยจะมีผลยับยั้งมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้นและความเข้มข้นสารสกัดจากใบยี่ห่วยที่ให้เซลล์ SW620 มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตเป็นศูนย์คือ 0.6 mg/ml ซึ่งความเข้มข้นในระดับนี้ก็ส่งผลให้เซลล์ HeLa, KB และ P388 มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตเป็นศูนย์เช่นกันส่วนความเข้มข้นของสารสกัดจากไขมันขาวที่ทำให้เซลล์ SW620 มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตเป็นศูนย์คือ 0.8 mg/ml ซึ่งเป็นค่าเดียวกันกับที่ทดสอบกับเซลล์ HeLa โดยค่า IC_{50} ของสารสกัดจากใบยี่ห่วยอยู่ที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml ส่วนสารสกัดจากไขมันขาวให้ค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 0.49 mg/ml



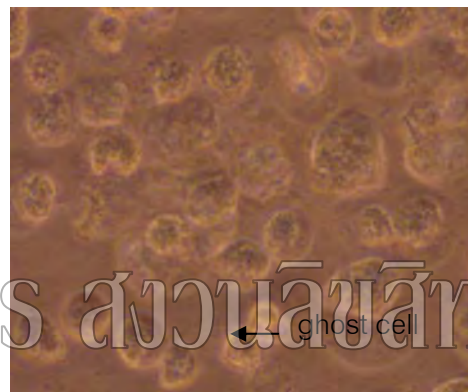
Control



ขมิ้นขาว 0.6 mg/ml



ขมิ้นขาว 1mg/ml



ยี่หระ 0.6 mg/ml

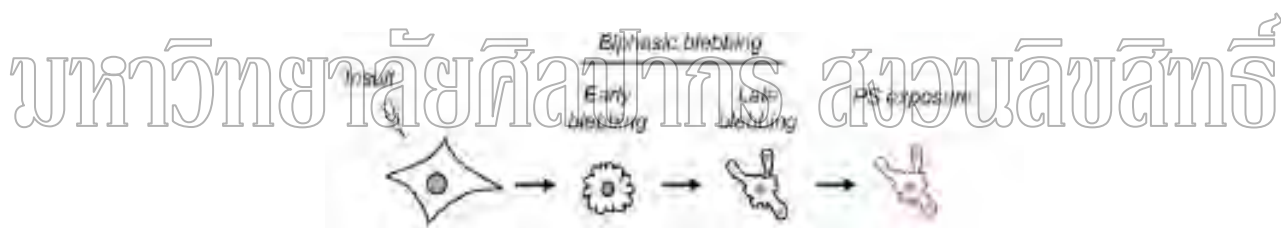
รูปที่ 4.8 ลักษณะและรูปร่างของเซลล์ SW620 เมื่อบ่มเลี้ยงกับสารสกัดที่ทดสอบนาน 48 ชั่วโมง

จากการสังเกตภายใต้กล้อง phase contrast เซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาวที่ความเข้มข้น 0.6 mg/ml มีลักษณะกลม ขอบเซลล์มีลักษณะไม่เรียบมีรอยหยักซึ่งเป็นลักษณะของ blebbing membrane (ดังลูกศร) โดยเป็นลักษณะของเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis และเซลล์ส่วนใหญ่ไม่เกาะแผ่และเป็นเซลล์แขวนลอย เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 1 mg/ml พบมีการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น เซลล์มีลักษณะเหมือนถุงใสซึ่งอาจเป็น ghost cell (ดังลูกศร) ที่พบในระยะปลายของการตายแบบ apoptosis เช่นเดียวกับเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดจากใบยี่หระที่ความเข้มข้น 0.6 mg/ml มีลักษณะไม่เกาะแผ่และเกิด ghost cell (ดังลูกศร) เหมือนเซลล์มะเร็งที่ถูกกระตุ้นด้วยยา taxol ความเข้มข้น 100 nM นาน 48 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ดังรูปที่ 4.9 ทั้งนี้การเกิด blebbing membrane ของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะ

เกิดขึ้น 2 ขั้นตอน ดังรูปที่ 4.10 โดยลักษณะของ blebbing membrane นี้ไม่ปรากฏในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติ (control)



รูปที่ 4.9 ลักษณะ ghost cell ของเซลล์ KB
เมื่อบ่มเลี้ยงกับยา Taxol 100 nM นาน 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.10 ขั้นตอนการเกิด membrane blebbing

จากการศึกษาถึงระดับความเป็นพิษของสารสกัดขมิ้นขาวและใบยี่หระต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย acetone ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า IC_{50} ของสารสกัดโดยความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบคือ 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/ml ดังรูปที่ 4.3, 4.5, 4.6 และ 4.7 ได้ค่า IC_{50} ของสารสกัดดังกล่าวต่อเซลล์ทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.7 ค่า IC_{50} (mg/ml) ของสารสกัดจากขมิ้นขาวและไยี่หว่าต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ

สารสกัด	Cytotoxicity IC_{50} (mg/ml)			
	HeLa	KB	P388	SW620
ขมิ้นขาว	0.41	0.51	0.44	0.49
ไยี่หว่า	0.33	0.40	0.26	0.25

จากตารางที่ 4.7 ที่ให้ค่า IC_{50} ของสารสกัดขมิ้นขาวและไยี่หว่าต่อเซลล์มะเร็งต่างๆ ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากไยี่หว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 4 มากกว่าสารสกัดจากขมิ้นขาว เนื่องจากให้ค่า IC_{50} ของสารสกัดขมิ้นขาวต่อเซลล์มะเร็งอยู่ในช่วง 0.41 – 0.51 mg/ml ซึ่งสูงกว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดจากไยี่หว่า (ช่วง 0.25 – 0.40 mg/ml) โดย HeLa มีความไวต่อสารสกัดไยี่หว่ามากกว่าสารสกัดขมิ้นขาว (ให้ค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 0.33 mg/ml) ขณะที่ SW620 และ P388 จะมีความไวต่อสารสกัดของไยี่หว่ามากกว่า HeLa และ KB โดยให้ค่า IC_{50} อยู่ที่ 0.25 และ 0.26 mg/ml ตามลำดับ

จากผลการทดลองสารสกัดจากขมิ้นขาวให้ค่า IC_{50} ต่อเซลล์ KB สูงกว่าเซลล์ชนิดอื่น แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ที่ได้นี้กับค่า IC_{50} ของพืชชนิดอื่นในวงศ์เดียวกัน เช่น ขมิ้นชัน ดังผลการวิจัยของ Manosroi และคณะ (2005) ที่ทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยของขมิ้นชันต่อเซลล์ KB พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากขมิ้นชันมีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB ที่ IC_{50} 1.08 mg/ml โดยตัวควบคุมเชิงบวกที่ใช้คือ 5-Fluorouracil มีค่า IC_{50} 1.77 mg/ml ในขณะที่การทดลองครั้งนี้สารสกัดขมิ้นขาวมีค่า IC_{50} 0.51 mg/ml ต่อเซลล์ KB ดังตารางที่ 4.6 ดังนั้นสารสกัดขมิ้นขาวในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีแนวโน้มที่มีพิษต่อเซลล์ KB สูงกว่าน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน

จากตารางที่ 4.7 สารสกัดจากไยี่หว่าให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดขมิ้นขาวในทุกเซลล์ที่ทดสอบ ทั้งนี้ Vieira และคณะ (2001) พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากไยี่หว่ามีส่วนประกอบที่สำคัญคือ eugenol, thymol และ geraniol ซึ่งมีงานวิจัยที่ทดสอบความเป็นพิษของ eugenol ต่อเซลล์ HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells) พบว่า eugenol มีฤทธิ์ชักนำให้เซลล์ HL-60 เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านทาง ROS signal โดยพบการสูญเสียสภาพของ membrane mitochondria และระดับของ bcl - 2 ซึ่งเป็น antiapoptotic protein ลดลง ทำให้ cytochrom c ออกสู่ cytosol และตรวจพบการเกิด DNA fragment เป็นลักษณะของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis นอกจากนี้ Okada และคณะ (2005) พบว่า eugenol สามารถ

ยับยั้งการแสดงออกของ cyclooxygenase - 2 gene ในเซลล์ RAW 264.7 ทั้งนี้สารสำคัญของใบยี่หว่าที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ KB จะเป็นสารตัวใดนั้นต้องผ่านการทำบริสุทธิ์เพื่อระบุสารสำคัญต่อไป

4.4 ผลการทดสอบการเกิด colony formation assay

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ทำโดย colony formation assay ต่อเซลล์ HeLa, KB และ SW620 เนื่องจากเป็นเซลล์เกาะผิวจึงสามารถเห็นการเจริญของเซลล์เป็นโคโลนีได้ที่มีความหนาแน่นของเซลล์น้อยๆ ได้ง่ายโดยในการทดลองนี้ได้ดูความสามารถในการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งหลังจากการบ่มเลี้ยงร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นที่ IC_{50} (ดังตารางที่ 4.7) ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบบ reversible หรือ irreversible โดยแบ่งการทดสอบเป็น 2 ภาวะคือ บ่มเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดนาน 14 วันแล้วจึงย้ายเซลล์โคโลนีที่เกิดขึ้น และอีกภาวะคือบ่มเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดนาน 48 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารปกติ บ่มเลี้ยงต่ออีก 12 วันจึงย้ายเซลล์โคโลนี ซึ่งให้ผลการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์แสดงดังตารางที่ 4.8

สารสกัด	เซลล์	สภาวะที่ทดสอบ	
		A	B
ขมิ้นขาว	HeLa	0	16.24%
	KB	0	0
	SW620	1.75%	3.51%
ยี่หว่า	HeLa	0	12.99 %
	KB	0	0
	SW620	16.34%	14.38%

ตารางที่ 4.8 เปอร์เซนต์การเกิดโคโลนีของเซลล์เมื่อบ่มเลี้ยงร่วมกับสารสกัดขมิ้นขาว และ ใบยี่หว่าที่ความเข้มข้น IC_{50} เทียบกับการบ่มเลี้ยงในอาหารปกติ 14 วัน

A = สภาวะที่บ่มเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารทดสอบนาน 14 วัน

B = สภาวะที่บ่มเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารทดสอบนาน 48 ชั่วโมง

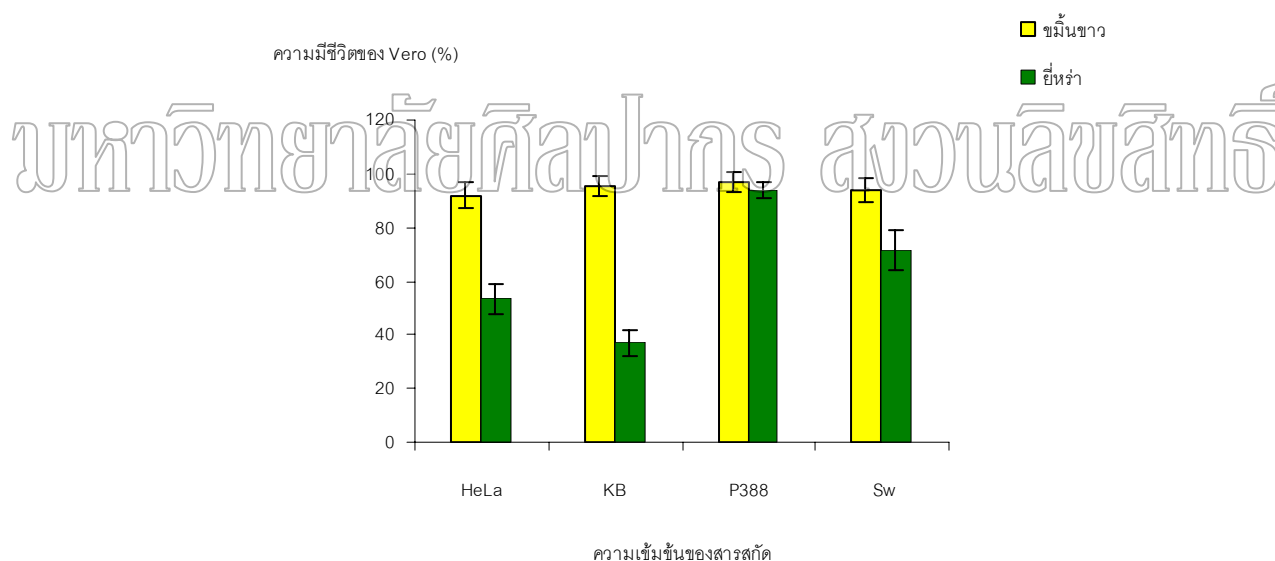
แล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารปกติบ่มต่อ 12 วัน

หมายเหตุ IC_{50} ของขมิ้นขาวต่อ HeLa, KB และ SW620 คือ 0.41, 0.51 และ 0.49 mg/ml

IC_{50} ของยี่หว่าต่อ HeLa, KB และ SW620 คือ 0.33, 0.40 และ 0.25 mg/ml

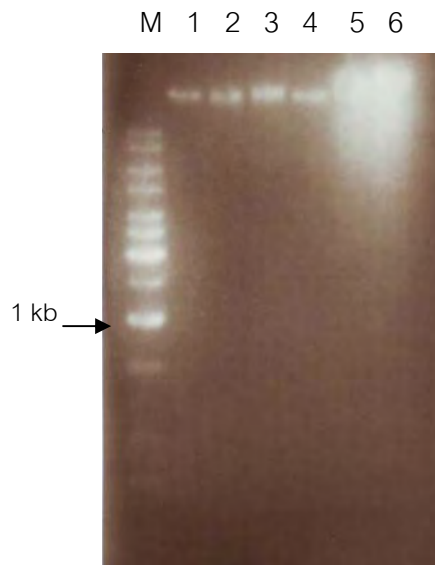
จากตารางที่ 4.8 พบว่าไขมันขาวที่ค่า IC_{50} ให้ผลยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์ KB เป็น ศูนย์แม่ในสภาวะที่ไม่มีการเปลี่ยนอาหารและสภาวะการเปลี่ยนอาหาร ซึ่งแสดงว่าสารสกัดไขมัน ขาวนอกจากเป็นพิษต่อเซลล์แล้วยังยับยั้งเซลล์ไม่ให้เจริญเป็นโคโลนี โดยออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ irreversible เนื่องจากไม่ว่าล้างหรือไม่ล้างสารสกัดจะให้ผลการยับยั้งเหมือนเดิม ส่วนผลของสาร สกัดไขมันขาวต่อ HeLa และ SW620 พบว่าสารสกัดที่ค่า IC_{50} ยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของ HeLa และ SW620 เป็น แบบ reversible เนื่องจากเมื่อล้างสารสกัดออกกลับทำให้ความสามารถเจริญ เป็นโคโลนีเพิ่มขึ้น ทำนองเดียวกันสารสกัดจากยี่ห่วยที่ค่า IC_{50} ยับยั้งสภาวะการเกิดโคโลนีโดย ออกฤทธิ์แบบ reversible ในขณะที่สารสกัดยี่ห่วยที่ IC_{50} ยับยั้งการสร้างโคโลนีต่อ KB มากกว่า SW620 และยับยั้งแบบ irreversible

4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดที่ความเข้มข้น IC_{50} ต่อเซลล์ปกติ



หมายเหตุ IC_{50} ไขมันขาวต่อ HeLa, KB, P388 และ SW620 คือ 0.41, 0.51, 0.44 และ 0.49 mg/ml
 IC_{50} ยี่ห่วยต่อ HeLa, KB, P388 และ SW620 คือ 0.33, 0.40, 0.26 และ 0.25 mg/ml

รูปที่ 4.11 ความมีชีวิตของเซลล์ Vero เมื่อทดสอบกับสารสกัดไขมันขาวและใบยี่ห่วยที่ความเข้มข้น IC_{50} ของ เซลล์มะเร็งแต่ละชนิด



รูปที่ 4.12 ผลการตรวจหา DNA fragmentation ของเซลล์ HeLa

M : DNA marker 1 kb

Lane 1 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงในอาหารปกติ 24 ชั่วโมง

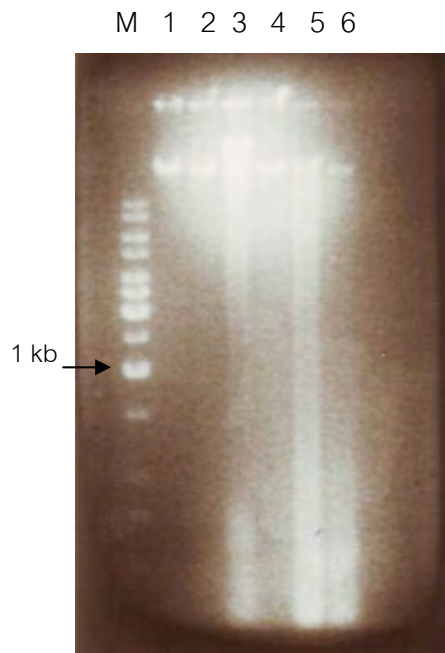
Lane 2 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาว IC_{50} 0.41 mg/ml นาน 24 ชั่วโมง

Lane 3 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดใบยี่หระ IC_{50} 0.33 mg/ml นาน 24 ชั่วโมง

Lane 4 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงในอาหารปกติ 48 ชั่วโมง

Lane 5 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาว IC_{50} 0.41 mg/ml นาน 48 ชั่วโมง

Lane 6 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดใบยี่หระ IC_{50} 0.33 mg/ml นาน 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.13 ผลการตรวจหา DNA fragmentation ของเซลล์ KB

M : DNA marker 1 kb

Lane 1 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงในอาหารปกติ 24 ชั่วโมง

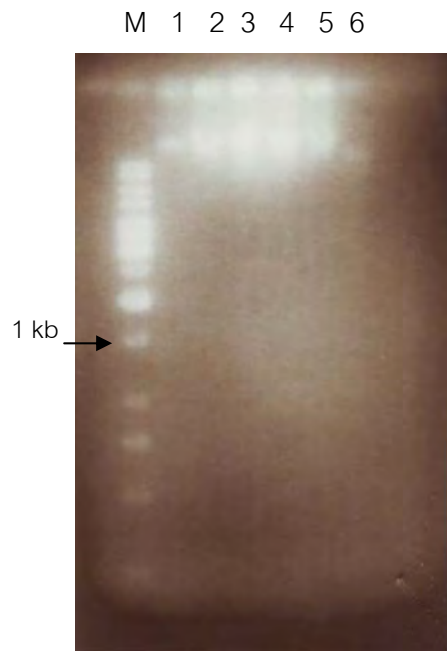
Lane 2 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาว IC_{50} 0.51 mg/ml นาน 24 ชั่วโมง

Lane 3 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดใบยี่หระ IC_{50} 0.40 mg/ml นาน 24 ชั่วโมง

Lane 4 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงในอาหารปกติ 48 ชั่วโมง

Lane 5 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาว IC_{50} 0.51 mg/ml นาน 48 ชั่วโมง

Lane 6 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดใบยี่หระ IC_{50} 0.40 mg/ml นาน 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.14 ผลการตรวจหา DNA fragmentation ของเซลล์ P388

M : DNA marker 1 kb

Lane 1 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงในอาหารปกติ 24 ชั่วโมง

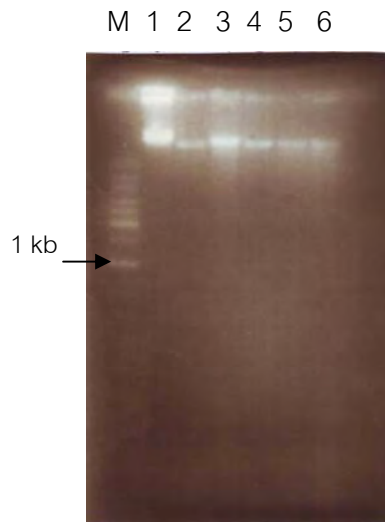
Lane 2 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาว IC_{50} 0.44 mg/ml นาน 24 ชั่วโมง

Lane 3 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดใบยี่หระ IC_{50} 0.26 mg/ml นาน 24 ชั่วโมง

Lane 4 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงในอาหารปกติ 48 ชั่วโมง

Lane 5 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาว IC_{50} 0.44 mg/ml นาน 48 ชั่วโมง

Lane 6 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดใบยี่หระ IC_{50} 0.26 mg/ml นาน 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.15 ผลการตรวจหา DNA fragmentation ของเซลล์ SW620

M : DNA marker 1 kb

Lane 1 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงในอาหารปกติ 24 ชั่วโมง

Lane 2 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาว IC_{50} 0.49 mg/ml นาน 24 ชั่วโมง

Lane 3 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดใบยี่หระ IC_{50} 0.25 mg/ml นาน 24 ชั่วโมง

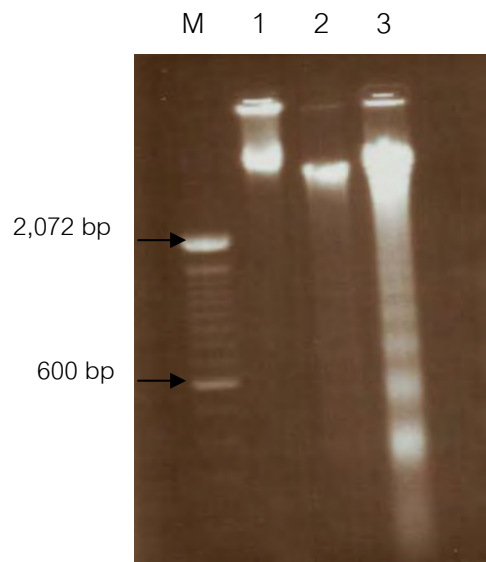
Lane 4 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงในอาหารปกติ 48 ชั่วโมง

Lane 5 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาว IC_{50} 0.49 mg/ml นาน 48 ชั่วโมง

Lane 6 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดใบยี่หระ IC_{50} 0.25 mg/ml นาน 48 ชั่วโมง

สารสกัดขมิ้นขาวและใบยี่หระที่ความเข้มข้น IC_{50} ของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดจะไม่ทำให้เซลล์ HeLa, P388 และ SW620 เกิด DNA fragmentation ที่เป็นลักษณะการตายแบบ apoptosis ได้เนื่องจากไม่มี DNA ขนาดท่อนเล็กๆให้เห็น แม้การบ่มเซลล์กับสารสกัดนาน 24 – 48 ชั่วโมง ยกเว้นการทดสอบกับ KB ที่เห็นแถบของ DNA ขนาดเล็กๆที่ปลายเจลซึ่งคาดว่าน่าจะเป็น DNA ladder จากการตายแบบ apoptosis โดยจะเห็นผลได้กับสารสกัดยี่หระที่ 0.40 mg/ml ที่บ่มนานเพียง 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเนื่องจาก marker ที่ใช้เป็น DNA marker 1kb ซึ่งอาจทำให้ไม่เห็นเป็น fragment (DNA ladder) ชัดเจนจึงได้ทำการทดลองเพิ่มระยะเวลาการบ่มเซลล์ KB กับสารสกัดจาก 48 ชั่วโมง เป็น 72 ชั่วโมง ด้วยความเข้มข้นของสารสกัดเท่าเดิม และเพิ่มความเข้มข้นของ

agarose gel จากเดิม 1.5% เป็น 2% agarose พร้อมทั้งใช้ DNA marker 100 bp ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 ผลการตรวจหา DNA fragmentation ของเซลล์ KB เมื่อเพิ่มระยะเวลาการบ่มกับสารสกัดขมิ้น 72 ชั่วโมง

M : DNA marker 100 bp

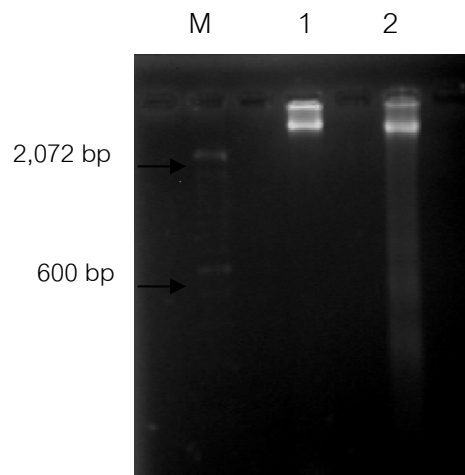
Lane 1 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงในอาหารปกติ 72 ชั่วโมง

Lane 2 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาว IC_{50} 0.51 mg/ml นาน 72 ชั่วโมง

Lane 3 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดใบยี่หระ IC_{50} 0.40 mg/ml นาน 72 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.16 เมื่อเพิ่มระยะเวลาการบ่มสารสกัดเป็น 72 ชั่วโมงยังคงไม่พบ DNA fragment จากเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาว แต่พบ DNA fragment ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงร่วมกับสารสกัดยี่หระโดยเห็น DNA fragment ที่มีขนาดต่ำกว่า 600 bp จำนวน 2 fragment ซึ่งมีขนาด 400 และ 200 bp เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA marker 100 bp จากการศึกษาของ Bortner และคณะพบว่าลักษณะ DNA fragment ของเซลล์ที่ตายแบบ Apoptosis จะพบ DNA fragment ที่มีขนาดเล็กประมาณ 180 – 200 bp ซึ่งเกิดจาก endogenous nuclease ตัดบริเวณ linker region ระหว่างโปรตีน histones บนโครโมโซมแต่ทั้งนี้การตายแบบ apoptosis ก็สามารถตรวจพบก่อน DNA ขนาด

ใหญ่ประมาณ 50 – 300 kb ได้เช่นกัน (Lagarkova, Iarovaio and Razin, 1995) ในการศึกษาครั้งนี้เพิ่มระยะเวลาการบ่มสารสกัดขมิ้นขาวกับเซลล์ KB จาก 72 ชั่วโมงเป็น 96 ชั่วโมง จึงพบ DNA fragment เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA marker 100 bp ดังรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 ผลการตรวจหา DNA fragmentation ของเซลล์ KBเมื่อบ่มกับสารขมิ้นขาวที่ความเข้มข้น IC_{50} 0.51 mg/ml นาน 96 ชั่วโมง

M : DNA marker 100 bp

Lane 1 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงในอาหารปกติ 96 ชั่วโมง

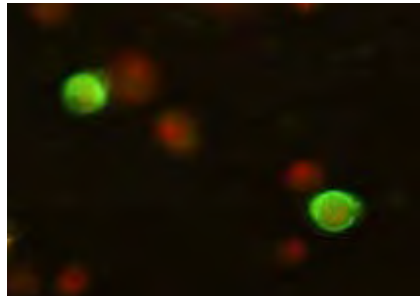
Lane 2 : DNA ของเซลล์ที่บ่มเลี้ยงกับสารสกัดขมิ้นขาว IC_{50} 0.51 mg/ml นาน 96 ชั่วโมง

จากผลการทดลองจึงกล่าวได้ว่า KB มีความไวต่อสารสกัดขมิ้นขาวน้อยกว่าสารสกัดยี่หระซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้ในตารางที่ 4.7 แต่ทั้งนี้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นขาวที่ทดสอบนั้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติดังรูปที่ 4.11

4.6.2 ผลการตรวจลักษณะการเกิด membrane alterations

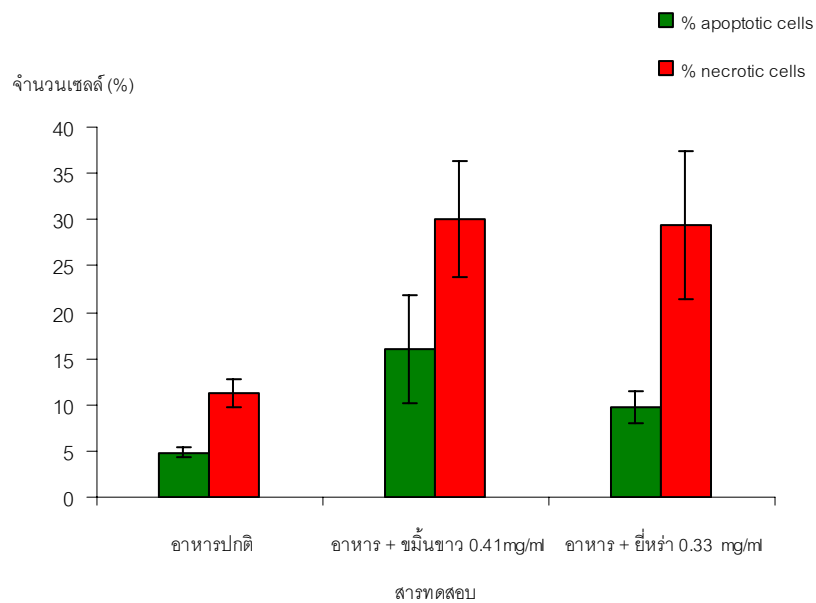
ลักษณะการตายของเซลล์แบบ apoptosis นั้นนอกจากจะตรวจพบการเกิด DNA ladder แล้วการตรวจลักษณะของ membrane alterations ด้วยการย้อมเซลล์ด้วย annexin V และ propidium iodide เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจระบุการตายของเซลล์ว่าเป็นแบบ apoptosis หรือแบบ necrosis เนื่องจากเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis นั้นจะมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่ให้

phosphatidylserine ย้ายจาก inner membrane ออกมาอยู่ด้าน outer membrane ซึ่งจะจับกับ annexin V ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เมื่อดูภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์เห็นเซลล์ถูกย้อมด้วยสีเขียวในขณะที่เซลล์ที่ตายแบบ necrosis จะติดสีแดงของ propidium iodide ดังแสดงในรูปที่ 4.18

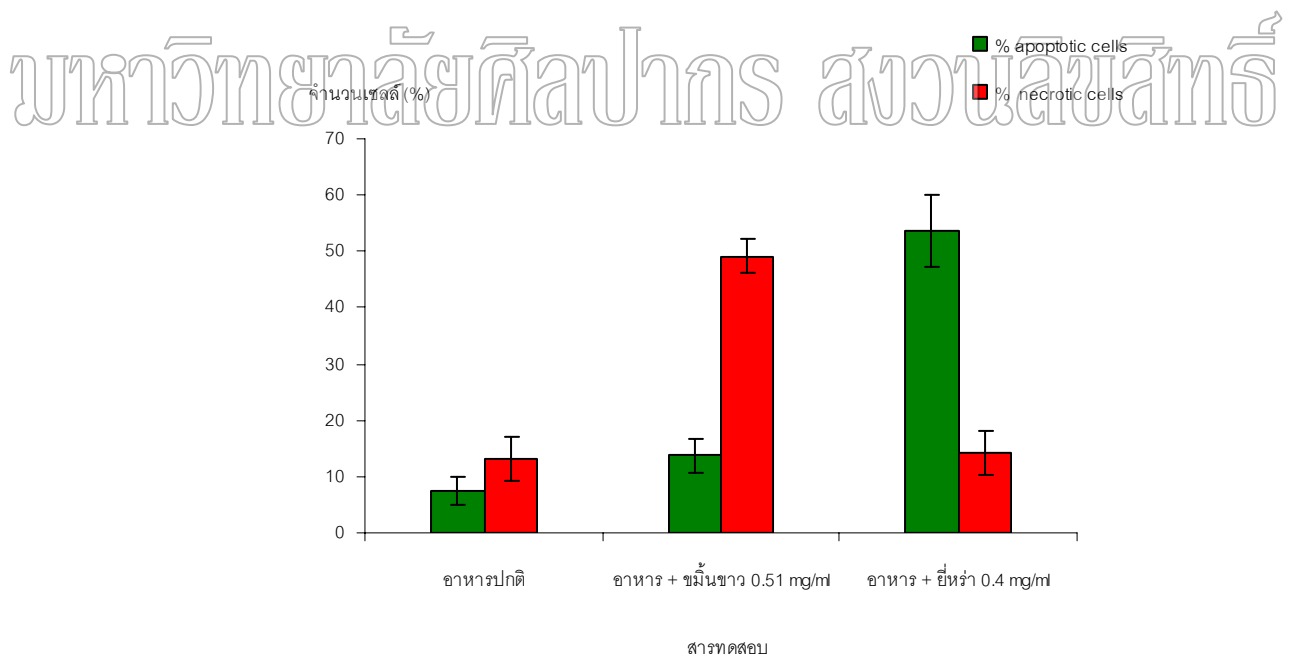


รูปที่ 4.18 ลักษณะของเซลล์ที่ย้อมด้วย annexin V และ propidium iodide เมื่อดูใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ (40x) เซลล์ที่ติดสีเขียวแสดงการตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ติดสีแดงแสดงการตายแบบ necrosis

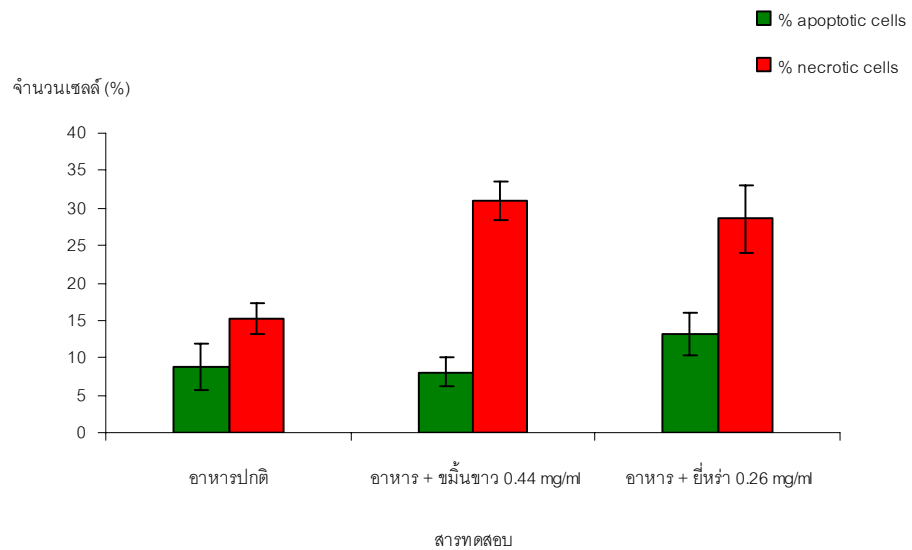
มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนนิเทศน์
จากการทดลองย้อมเซลล์กับสารสกัดที่ความเข้มข้น IC_{50} นาน 48 ชั่วโมงแล้วนำเซลล์มาย้อม annexin V และ propidium iodide ด้วย Vybrant Apoptosis Assay kit 2 พบเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์แบบ apoptosis และ necrosis ดังแสดงในรูป 4.19 – 4.24



รูปที่ 4.19 เปรียบเทียบลักษณะการตายของเซลล์ HeLa หลังบ่มกับสารทดสอบ ที่ความเข้มข้น IC_{50} นาน 48 ชั่วโมง

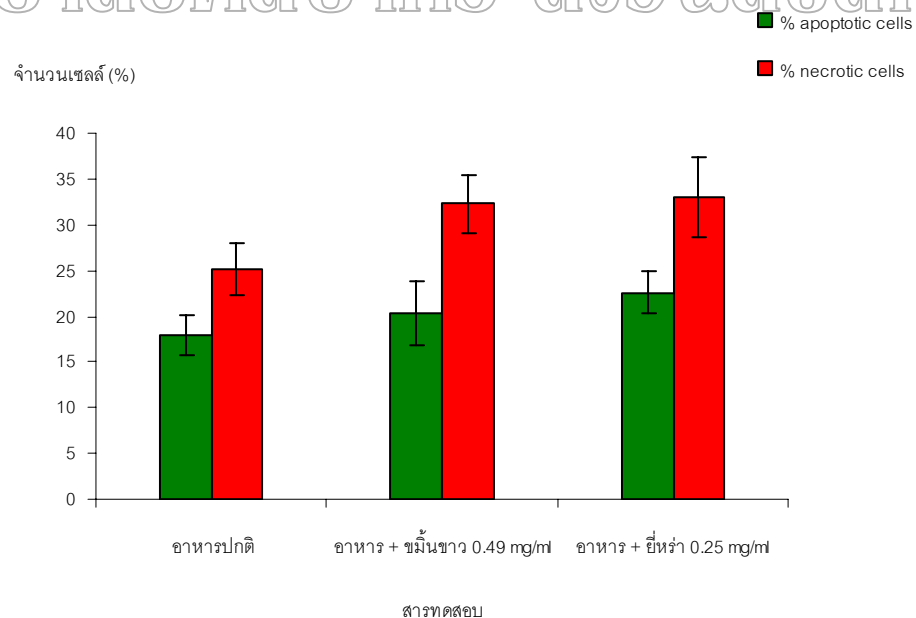


รูปที่ 4.20 เปรียบเทียบลักษณะการตายของเซลล์ KB หลังบ่มกับสารทดสอบ ที่ความเข้มข้น IC_{50} นาน 48 ชั่วโมง

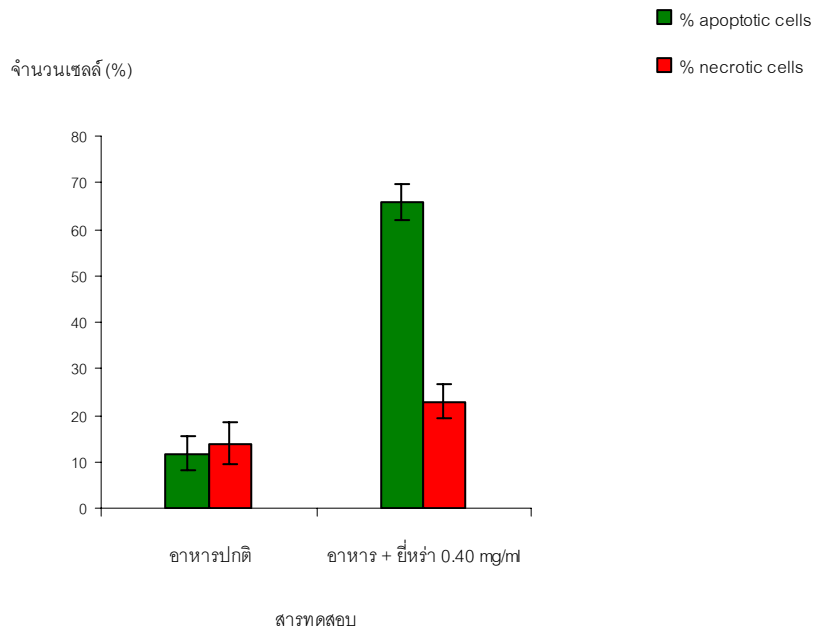


รูปที่ 4.21 เปรียบเทียบลักษณะการตายของเซลล์ P388 หลังป้อนกับสารทดสอบ ที่ความเข้มข้น IC_{50} นาน 48 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

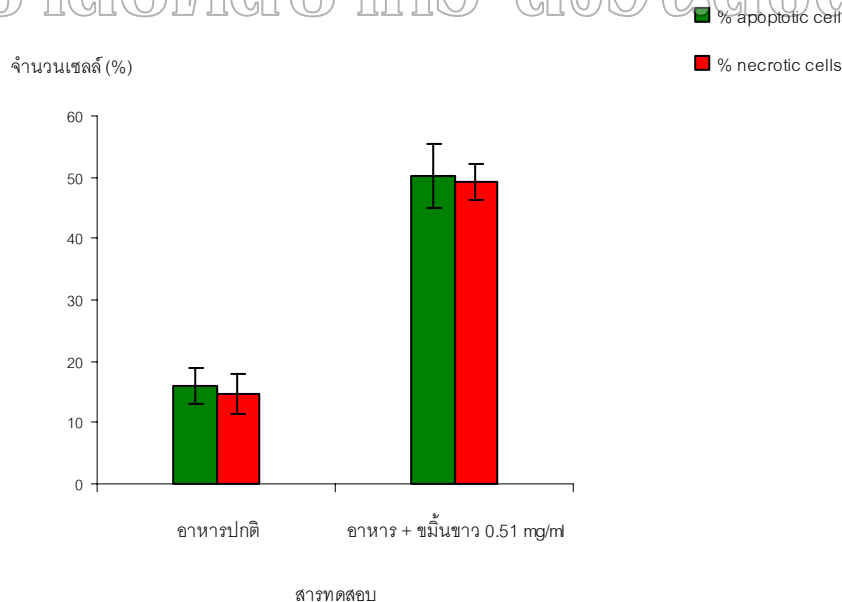


รูปที่ 4.22 เปรียบเทียบลักษณะการตายของเซลล์ SW620 หลังป้อนกับสารทดสอบ ที่ความเข้มข้น IC_{50} นาน 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.23 เปรียบเทียบลักษณะการตายของเซลล์ KB หลังป้อนกับสารสกัดยี่ห้อ
ที่ความเข้มข้น IC_{50} นาน 72 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

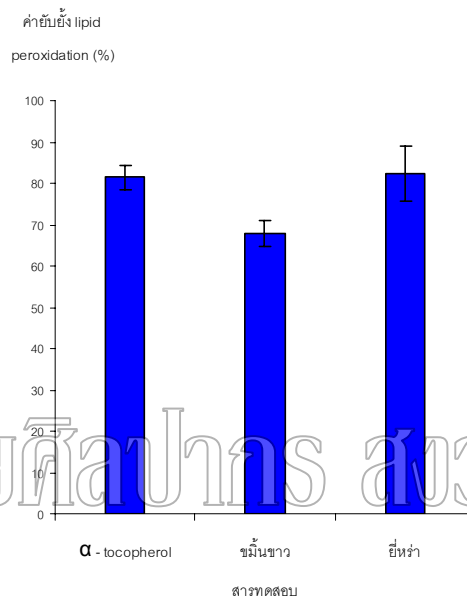


รูปที่ 4.24 เปรียบเทียบลักษณะการตายของเซลล์ KB หลังป้อนกับสารสกัดขมิ้นขาว
ที่ความเข้มข้น IC_{50} นาน 96 ชั่วโมง

สารสกัดขมิ้นขาวและยี่ห้อที่ความเข้มข้น IC_{50} ของเซลล์ HeLa, P388 และ SW620 จะพบ
ลักษณะการตายของเซลล์แบบ necrosis สูงกว่า apoptosis ยกเว้นสารสกัดจากยี่ห้อที่ความ

เข้มข้น IC_{50} ต่อเซลล์ KB (ดังรูป 4.20) ซึ่งจะพบเปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis สูงกว่า necrosis อย่างเห็นได้ชัดและเมื่อพิจารณาผลการตรวจ DNA ladder (รูปที่ 4.16) พบการเกิด DNA ladder ในเซลล์ KB ที่ป้อนกับสารสกัดยี่หว่าที่ความเข้มข้นเดียวกัน จากรูปที่ 4.20 เซลล์ KB ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้นขาวนั้นเกิดการตายแบบ apoptosis ที่อยู่ในระดับต่ำแต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการป้อนเป็น 96 ชั่วโมงพบการตายแบบ apoptosis สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ดังรูปที่ 4.24

4.7 ผลการวัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Thiocyanate (FTC)



รูปที่ 4.25 เปรียบเทียบค่าการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ของสารสกัดขมิ้นขาวและยี่หว่ากับตัวควบคุม(α - tocopherol)

จากการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งสองพบว่าสารสกัดจากยี่หว่าให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 82.42 % ซึ่งสูงในระดับเดียวกับตัวควบคุมที่ใช้คือ α - tocopherol (วิตามิน E) 81.41% ในขณะที่สารสกัดขมิ้นขาวมีความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าคือ 67.84 % จากผลที่ได้จึงแสดงถึงสารสกัดยี่หว่าจึงมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดขมิ้นขาว