



รายงานการวิจัย เรื่อง

ผลของสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลต่อการแสดงออกของ VEGF
ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells)
Effect of *Moringa oleifera* ethanolic leaf extract on VEGF expression
in colon cancer (HT 29) cells.

คณะผู้วิจัย

รศ.ดร. อวยพร อภิรักษ์อร่ามวง (Auayporn Apirakaramwong, Ph.D.)
ผศ.ดร. พีรยศ ภมรศิลป์ธรรม (Perayot Pamonsinlapatham, Ph.D.)
อ.ดร. นพรัตน์ นันทรัตนพงศ์ (Nopparat Nuntharatanapong, Ph.D.)
รศ.ดร. เพ็ญพรรณ เวชวิทยาคลัง (Penpun Wetwitayaklung, Ph.D.)

หน่วยงานที่สังกัด

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
(Faculty of Pharmacy, Silpakorn University)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สถาบัน วิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2558

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ.2559



Research Report

Effect of *Moringa oleifera* ethanolic leaf extract on VEGF expression
in colon cancer (HT 29) cells

ผลของสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลต่อการแสดงออกของ VEGF
ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells)

Researchers

Auayporn Apirakaramwong, Ph.D. (รศ.ดร. อวยพร อภิรักษ์อร่ามวง)
Perayot Pamonsinlapatham, Ph.D. (ผศ.ดร. พีรยศ ภมรศิลป์ธรรม)
Nopparat Nuntharatanapong, Ph.D. (อ.ดร. นพรัตน์ นันทรัตนพงศ์)
Penpun Wetwitayaklung, Ph.D. (รศ.ดร. เพ็ญพรรณ เวชวิทยาขลัง)

Affiliation

Faculty of Pharmacy, Silpakorn University
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

This research is financially supported by
Silpakorn University Research and Development Institute
(Fiscal Year 2015)

Year of completion : 2016

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำวิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ซึ่งให้การสนับสนุน
ทุนอุดหนุนการวิจัยซึ่งเป็นทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 ขอขอบคุณภาควิชา ชีว
เภสัชศาสตร์ ภาควิชาเภสัชเวท ภาควิชาสารสนเทศศาสตร์ทางสุขภาพ ภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา และ
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สำหรับการวิจัย

คณะผู้ทำวิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการ ผลของสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลต่อการแสดงออกของ VEGF ในเซลล์เพาะเลี้ยง
มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells)

ชื่อผู้วิจัย 1. รศ.ดร.อวยพร อภิรักษ์อร่ามวง (หัวหน้าโครงการ)
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
2. ผศ.ดร.พีรยศ ภมรศิลปธรรม (ผู้ร่วมวิจัย)
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
3. อ.ดร.นพรัตน์ นันทรัตน์พงศ์ (ผู้ร่วมวิจัย)
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
4. รศ.ดร.เพ็ญพรรณ เวชวิทยาคลัง (ผู้ร่วมวิจัย)
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2558
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ 2559

ประเภทการวิจัย การวิจัยพื้นฐาน

สาขาวิชา (อ้างอิงตามวช.) วิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช

บทคัดย่อ

มะรุม (*Moringa oleifera* Lam) เป็นพืชในตระกูล Moringaceae มีชื่อสามัญในภาษาอังกฤษว่า drumstick tree หรือ horse radish tree เป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูง และใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารไทย รวมทั้งเป็นส่วนประกอบในยาแผนไทย ซึ่งใช้ในการรักษาโรคหลายชนิด มะรุมมีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านออกซิเดชัน ลดความดันโลหิต การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อการศึกษาผลของสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอล ต่อการแสดงออกของโปรตีน vascular endothelial growth factor (VEGF) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer cell line, HT29 cell) เปรียบเทียบกับสารสำคัญในใบมะรุมคือ astragaloside และ cryptochlorogenic acid การสกัดใบมะรุมด้วย 70 % เอทานอล ได้ % yield เท่ากับร้อยละ 32.10 พบปริมาณ astragaloside และ cryptochlorogenic acid เท่ากับร้อยละ 0.13 และ 0.056 ตามลำดับ เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) พบว่าสารสกัดจากใบมะรุมที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้เซลล์ตายมากที่สุด เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่สารมาตรฐาน astragaloside (0-224 $\mu\text{g/ml}$) และ cryptochlorogenic acid (0-177 $\mu\text{g/ml}$) ในเกือบทุกความเข้มข้นกลับเพิ่มการเจริญของเซลล์ เมื่อนำสารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ มาบ่มในเซลล์เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อทดสอบการแสดงออกของโปรตีน vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) และ neuropilin-1 ด้วยวิธี western blot และ immunohistochemistry เปรียบเทียบกับ 1) astragaloside ที่

ผลของสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลต่อการแสดงออกของ VEGF
ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells)

ความเข้มข้น 2.0 µg/ml และ 2) crypto-chlorogenic acid ที่ความเข้มข้น 0.84 µg/ml มี positive control 2 ชนิดคือ 0.1 µg/ml adriamycin และ 125 µg/ml cisplatin พบว่าสารสกัดจากใบมะรุม, astragalin และ crypto-chlorogenic acid มีผลลดการการแสดงออกของโปรตีน VEGF-A และเพิ่ม neuropilin-1 ในเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะเกิดการลด neuropilin-1 ในเวลา 48 ชั่วโมง โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ positive control พบว่ามีความใกล้เคียงกับ adriamycin มากกว่า cisplatin การวิจัยครั้งนี้ทำให้เห็นว่าสารสกัดจากใบมะรุมยับยั้งการเจริญของเซลล์ ผ่านกลไกในการยับยั้งของการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 และอาจมีความเกี่ยวข้องกับ signaling molecule อื่นๆ ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ :

มะรุม (*Moringa oleifera*) , VEGF, neuropilin-1, astragalin, crypto-chlorogenic acid

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Research Title	Effect of <i>Moringa oleifera</i> ethanolic leaf extract on VEGF expression in colon cancer (HT 29) cells
Researcher	Assoc. Prof. Dr. Auayporn Apirakaramwong (Project Leader) Faculty of Pharmacy Silpakorn University
Researchers	Assist. Prof. Dr. Perayot Pamonsinlapatham (Co-Researcher) Faculty of Pharmacy Silpakorn University Dr. Nopparat Nuntharatanapong (Co-Researcher) Faculty of Pharmacy Silpakorn University Assoc. Prof. Dr. Penpun Wetwitayaklung (Co-Researcher) Faculty of Pharmacy Silpakorn University
Research Grants	Fiscal Year 2015, Research and Development Institute, Silpakorn University
Year of completion	2016
Type of research	Basic research
Subjects (based NRCT)	Chemistry and Pharmacy

Abstract

Moringa oleifera Lam or a common name of “Drumstick tree” is a highly valued plant for Thai traditional food and known in traditional medicine for the treatment of various diseases. It possesses many biological activities, including anti-inflammatory, antioxidant, and antihypertensive activity. This study aims to investigate the effect of *Moringa oleifera* ethanolic leaf extract on vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in colon cancer (HT 29) cells compared to its major compositions, astragaloside, and cryptochlorogenic acid. The extraction of *Moringa* leaves with 70% ethanol gave a yield of 32.10%, with a content of 0.13% astragaloside and 0.056% cryptochlorogenic acids, respectively. The *Moringa oleifera* leaf (MOL) extract and its 2 major active components were evaluated for cell viability in HT29 cells by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT assay. MOL at a concentration of 500 µg/ml decreased cell viability significantly when cells treated for 48 h, whereas astragaloside at almost all concentrations of 0-224 µg/ml and cryptochlorogenic acid at almost all concentrations of 0-177 µg/ml increased cell viability. The treatment of HT29 cells with MOL at a concentration of 500 µg/ml for 24-48 h was done to examine the effect on VEGF-A and neuropilin-1 expression compared to 1) 2.0 µg/ml astragaloside, and 2) 0.84 µg/ml cryptochlorogenic acid.

ผลของสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลต่อการแสดงออกของ VEGF
ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells)

chlorogenic acid by western blot analysis and immunohistochemistry. Two positive controls were used as follows: 0.1 µg/ml adriamycin and 125 µg/ml cisplatin. The results showed that MOL, astragalin and crypto-chlorogenic acid decreased the expression of VEGF-A and increased the expression of neuropilin-1 at 24 h, then neuropilin-1 was reduced at 48 h. The similar results were observed with adriamycin. Taken together, MOL could inhibit cell proliferation by the decrease in VEGF and neuropilin-1 expression. This might involve to other signaling molecules which need to further study.

Keywords: *Moringa oleifera*, VEGF, neuropilin-1, astragalin, crypto-chlorogenic acid

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญเรื่อง	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	4
- วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	5
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
- ขอบเขตของการวิจัย	5
- คำสำคัญ (Keywords)	5
- คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	6
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	8
- สมุนไพรและสารเคมี	8
- วัสดุอุปกรณ์	9
- วิธีการวิจัย	11
- ตอนที่ 1 การเตรียมสารสกัดจากโสมเมรุ่และการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ	11
- ตอนที่ 2: การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโสมเมรุ่, astragalin และ crypto-chlorogenic acid ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells) ด้วย MTT assay	13
- ตอนที่ 3: การทดสอบผลของสารสกัดโสมเมรุ่ต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Immunoblotting เปรียบเทียบกับ astragalin และ crypto-chlorogenic acid	15
- ตอนที่ 4: การทดสอบผลของสารสกัดโสมเมรุ่ต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี immunocytochemistry เปรียบเทียบกับ astragalin และ crypto-chlorogenic acid	15
- สถิติที่ใช้	16
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	17
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	40
ผลรับที่ได้จากโครงการ	46
ประวัติผู้ทำวิจัย	47

สารบัญชิตาราง

	หน้า	
ตารางที่ 1	VEGF family isoform และคุณสมบัติบางประการ (ดัดแปลงจาก Roskoski R Jr., 2007)	11
ตารางที่ 2	ปริมาณ astragalın, crypto-chlorogenic acid (ng/spot) และสารสกัด ($\mu\text{g}/\text{spot}$) เมื่อ spot บนแผ่น TLC	12
ตารางที่ 3	พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน crypto-chlorogenic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ	18
ตารางที่ 4	พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน astragalın ที่ความเข้มข้นต่างๆ	19
ตารางที่ 5	พื้นที่ใต้กราฟของสารสกัดใบมะรุม	20
ตารางที่ 6	ปริมาณ astragalın และ crypto-chlorogenic acid ในสารสกัด 1 กรัม และใบมะรุมแห้ง 100 กรัม	20

สารบัญญรูป

	หน้า	
รูปที่ 1	โครงสร้างของ crypto-chlorogenic acid (1), isoquercetin (2) และ astragaloside (3) (คัดลอกจากรูปจาก Vongsak B และคณะ, 2013)	3
รูปที่ 2	แสดง HT29 cells ที่เพาะเลี้ยงใน 6-well plate ภายหลังจาก subculture และเลี้ยง 24 h (image 10 × objective using an inverted microscope)	4
รูปที่ 3	TLC chromatogram ของ astragaloside และ crypto-chlorogenic acid	13
รูปที่ 4	TLC chromatogram ของ สารสกัดโสมรุม	17
รูปที่ 5	กราฟมาตรฐานของ crypto-chlorogenic acid	18
รูปที่ 6	กราฟมาตรฐานของ astragaloside	19
รูปที่ 7	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells เมื่อเติมสารสกัดจากโสมรุมในความเข้มข้น 0-500 µg/ml เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 h โดยเปรียบเทียบกับ DMSO 1% (กราฟแสดง means ± S.D. ของ triplicate experiments (*, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติมสารสกัดจากโสมรุมหรือ DMSO 1% กับเซลล์ที่ไม่เติมสารใด ๆ และ #, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติมสารสกัดจากโสมรุม 500 µg/ml กับเซลล์ที่เติม DMSO 1%) ** แสดงการเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ)	20
รูปที่ 8	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells เมื่อเติมสารมาตรฐาน astragaloside ในความเข้มข้น 0-224 µg/ml เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 h (กราฟแสดง means ± S.D. ของ triplicate experiments (*, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติม astragaloside หรือ DMSO 1.77% กับเซลล์ที่ไม่เติมสารใด ๆ และ #, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติม astragaloside 224 µg/ml กับเซลล์ที่เติม DMSO 1.77%)	22
รูปที่ 9	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells เมื่อเติมสารมาตรฐาน crypto-chlorogenic acid ในความเข้มข้น 0-177 µg/ml เป็นเป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 h (กราฟแสดง means ± S.D. ของ triplicate experiments (*, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติม crypto-chlorogenic acid หรือ DMSO 2.2% กับเซลล์ที่ไม่เติมสารใด ๆ และ #, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติม crypto-chlorogenic acid 177 µg/ml กับเซลล์ที่เติม DMSO 2.2%)	23
		25

สารบัญญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 10 ผลของสารสกัดใบมะรุม (MOL) ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml ต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF-A ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells เปรียบเทียบกับ AST 2.0 และ CCA 0.84 µg/ml ที่บ่มเป็นเวลา 24 h โดยวิธี Western blot โดยใช้ adriamycin 0.1 µg/ml และ cisplatin 125 µg/ml เป็น positive control ส่วน control คือเซลล์ที่เติม 1%DMSO ตัวอย่างโปรตีนที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 40 µg/well (โปรตีน Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase หรือ GAPDH เป็นโปรตีนสำหรับควบคุมปริมาณการเติมโปรตีนในแต่ละหลุม และใช้ VEGF-A antibody 1:200) คำนวณค่าแถบสีที่ปรากฏด้วยโปรแกรม ImageJ®	28
รูปที่ 11 ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF-B ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells ที่เติมใช้ MOL 500 µg/ml เปรียบเทียบกับ AST 2.0 และ CCA 0.84 µg/ml ที่บ่มเป็นเวลา 24 h โดยวิธี Western blot โดยใช้ adriamycin 0.1 µg/ml และ cisplatin 125 µg/ml เป็น positive control ส่วน control คือเซลล์ที่เติม 1%DMSO ตัวอย่างโปรตีนที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 25 µg/well (ในการตรวจสอบใช้โปรตีน γ -tubulin เป็นโปรตีนสำหรับควบคุมปริมาณการเติมโปรตีนในแต่ละหลุม ใช้ VEGF-B antibody 1:1000) คำนวณค่าแถบสีที่ปรากฏด้วยโปรแกรม ImageJ®	29
รูปที่ 12 ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF-B ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells ที่เติมใช้ MOL 500 µg/ml เปรียบเทียบกับ AST 2.0 และ CCA 0.84 µg/ml ที่บ่มเป็นเวลา 48 h โดยวิธี Western blot โดยใช้ adriamycin 0.1 µg/ml และ cisplatin 125 µg/ml เป็น positive control ส่วน control คือเซลล์ที่เติม 1%DMSO ตัวอย่างโปรตีนที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 25 µg/well (ในการตรวจสอบใช้โปรตีน γ -tubulin เป็นโปรตีนสำหรับควบคุมปริมาณการเติมโปรตีนในแต่ละหลุม ใช้ VEGF-B antibody 1:1000) คำนวณค่าแถบสีที่ปรากฏด้วยโปรแกรม ImageJ®	30
รูปที่ 13 ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน neuropilin-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells ที่เติมใช้ MOL 500 µg/ml เปรียบเทียบกับ AST 2.0 และ CCA 0.84 µg/ml ที่บ่มเป็นเวลา 24 h โดยวิธี Western blot ใช้ adriamycin 0.1 µg/ml และ cisplatin 125 µg/ml เป็น positive control และ control คือเซลล์ที่เติม 1%DMSO ตัวอย่างโปรตีนที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 15 µg/well (ในการตรวจสอบใช้โปรตีน γ -tubulin เป็นโปรตีนสำหรับควบคุมปริมาณการเติมโปรตีนในแต่ละหลุม ใช้ neuropilin-1 antibody 1:1000) คำนวณค่าแถบสีที่ปรากฏด้วยโปรแกรม ImageJ®	31

สารบัญญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 14 ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน neuropilin-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells ที่เติมใช้ MOL 500 µg/ml เปรียบเทียบกับ AST 2.0 และ CCA 0.84 µg/ml ที่บ่มเป็นเวลา 48 h โดยวิธี Western blot ใช้ adriamycin 0.1 µg/ml และ cisplatin 125 µg/ml เป็น positive control และ control คือเซลล์ที่เติม 1%DMSO ตัวอย่างโปรตีนที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 15 µg/well (ในการตรวจสอบใช้โปรตีน γ -tubulin เป็นโปรตีนสำหรับควบคุม ปริมาณการเติมโปรตีนในแต่ละหลุม ใช้ neuropilin-1 antibody 1:1000) คำนวณค่าแถบสีที่ปรากฏด้วยโปรแกรม ImageJ®	31
รูปที่ 15 การเรืองแสงสีแดงของเซลล์ที่ไม่ได้ย้อม (2 คอลัมน์ซ้าย) และย้อมโปรตีน VEGF-A (2 คอลัมน์ขวา) ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ (คอลัมน์ซ้ายสุด และคอลัมน์ที่ 3 จากซ้าย) เปรียบเทียบกับ bright field (คอลัมน์ที่ 2 จากซ้าย และคอลัมน์ขวาสุด) หลังจากเติมสารเป็นเวลา 24 h โดย (1) เซลล์ที่เติม 1%DMSO (negative control), (2) MOL 500 µg/ml, (3) AST 2.0 µg/ml, (4) CCA 0.84 µg/ml, (5) Adriamycin 0.1 µg/ml (positive control), (6) Cisplatin 125 µg/ml (positive control) (image 10 × objective using an inverted microscope)	34
รูปที่ 16 การเรืองแสงสีแดงของเซลล์ที่ไม่ได้ย้อม (2 คอลัมน์ซ้าย) และย้อมโปรตีน VEGF-B (2 คอลัมน์ขวา) ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ (คอลัมน์ซ้ายสุด และคอลัมน์ที่ 3 จากซ้าย) เปรียบเทียบกับ bright field (คอลัมน์ที่ 2 จากซ้าย และคอลัมน์ขวาสุด) หลังจากเติมสารเป็นเวลา 24 h โดย (1) เซลล์ที่เติม 1%DMSO (negative control), (2) MOL 500 µg/ml, (3) AST 2.0 µg/ml, (4) CCA 0.84 µg/ml, (5) Adriamycin 0.1 µg/ml (positive control), (6) Cisplatin 125 µg/ml (positive control) (image 10 × objective using an inverted microscope)	35
รูปที่ 17 การเรืองแสงสีแดงของเซลล์ที่ไม่ได้ย้อม (2 คอลัมน์ซ้าย) และย้อมโปรตีน Neuropilin-1 (2 คอลัมน์ขวา) ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ (คอลัมน์ซ้ายสุด และคอลัมน์ที่ 3 จากซ้าย) เปรียบเทียบกับ bright field (คอลัมน์ที่ 2 จากซ้าย และคอลัมน์ขวาสุด) หลังจากเติมสารเป็นเวลา 24 h โดย (1) เซลล์ที่เติม 1%DMSO (negative control), (2) MOL 500 µg/ml, (3) AST 2.0 µg/ml, (4) CCA 0.84 µg/ml, (5) Adriamycin 0.1 µg/ml (positive control), (6) Cisplatin 125 µg/ml (positive control) (image 10 × objective using an inverted microscope)	36

สารบัญญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 18 การเรืองแสงสีเขียวของเซลล์ที่ไม่ได้ย้อม (2 คอลัมน์ซ้าย) และย้อมโปรตีน VEGF-B (2 คอลัมน์ขวา) ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ (คอลัมน์ซ้ายสุด และคอลัมน์ที่ 3 จากซ้าย) เปรียบเทียบกับ bright field (คอลัมน์ที่ 2 จากซ้าย และคอลัมน์ขวาสุด) หลังจากเติมสารเป็นเวลา 48 h โดย (1) เซลล์ที่เติม 1%DMSO (negative control), (2) MOL 500 µg/ml, (3) AST 2.0 µg/ml, (4) CCA 0.84 µg/ml, (5) Adriamycin 0.1 µg/ml (positive control), (6) Cisplatin 125 µg/ml (positive control) (image 10 × objective using an inverted microscope)	37
รูปที่ 19 การเรืองแสงสีเขียวของเซลล์ที่ไม่ได้ย้อม (2 คอลัมน์ซ้าย) และย้อมโปรตีน Neuropilin-1 (2 คอลัมน์ขวา) ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ (คอลัมน์ซ้ายสุด และคอลัมน์ที่ 3 จากซ้าย) เปรียบเทียบกับ bright field (คอลัมน์ที่ 2 จากซ้าย และคอลัมน์ขวาสุด) หลังจากเติมสารเป็นเวลา 48 h โดย (1) เซลล์ที่เติม 1%DMSO (negative control), (2) MOL 500 µg/ml, (3) AST 2.0 µg/ml, (4) CCA 0.84 µg/ml, (5) Adriamycin 0.1 µg/ml (positive control), (6) Cisplatin 125 µg/ml (positive control) (image 10 × objective using an inverted microscope)	38

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันแนวโน้มการใช้สมุนไพรและยาจากสมุนไพร ได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น มีข้อมูลการศึกษาและทดลองใช้ที่เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การใช้สมุนไพร ยังมีการใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก การใช้สมุนไพรในประเทศไทยจัดเป็นหนึ่งในทางเลือก (alternative medicine) ที่ประชาชนสามารถเลือกใช้ควบคู่ไปกับการรักษาแผนปัจจุบัน เนื่องจากการใช้สมุนไพรในประเทศไทยและแถบโลกตะวันออก มีประวัติและบันทึกถึงการใช้สมุนไพรมาอย่างยาวนานและมีข้อมูลที่น่าเชื่อถือว่ามีความปลอดภัยระดับหนึ่งสมุนไพรในต่างประเทศหลายชนิดได้มีการนำมาศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องและได้รับยอมรับในการรักษาและป้องกันโรคต่างๆ จนได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นยา เช่น ยา paclitaxel (Taxol[®]) ซึ่งเป็นสกัดจากเปลือกต้น Pacific yew tree (*Taxus brevifolia*) ออกฤทธิ์เป็น mitotic inhibitor ยับยั้งการแบ่งเซลล์ในระยะไมโทซิส (mitosis) ของวงจรการแบ่งเซลล์ โดยยับยั้งเอนไซม์ในการสังเคราะห์โปรตีนในการแบ่งเซลล์ ขณะที่เกิดการแบ่งตัว ส่งผลให้สามารถทำลายเซลล์ได้ในทุกระยะของวงจรแบ่งเซลล์ สามารถใช้เป็นยารักษา มะเร็ง

ประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ รวมทั้งมีสมุนไพรนานาชนิด แม้มีการศึกษาการใช้สมุนไพรมาตั้งแต่สมัยโบราณจนกระทั่งปัจจุบัน แต่ยังคงขาดการศึกษาค้นคว้ากลไกการออกฤทธิ์ของสมุนไพรในเชิงลึกหรือระดับโมเลกุล ซึ่งจะช่วยอธิบายฤทธิ์และประสิทธิภาพของสมุนไพรในการรักษาหรือบำบัดอาการของโรคได้ดียิ่งขึ้น

Vascular endothelial growth factor (VEGF) เป็นโปรตีนที่เซลล์สร้างขึ้น เพื่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อด้วยการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neo-angiogenesis) ในกรณีเซลล์ที่เพิ่มจำนวนมากผิดปกติ หรือเป็นเซลล์มะเร็งที่จะเจริญต่อไปได้ จำเป็นต้องมีการสร้างหลอดเลือดใหม่เช่นกัน โปรตีน VEGF จะถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้น แล้วหลั่งออกจากเซลล์ที่บาดเจ็บหรือเซลล์ผิดปกติ จากนั้น VEGF จะไปจับกับตัวรับเฉพาะของ VEGF (VEGF receptor) บนผิวเซลล์เป้าหมายอันได้แก่ เซลล์หลอดเลือดหรือหลอดเลือดน้ำเหลือง รวมทั้งเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดต่าง ๆ ส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์เป้าหมายหลายรูปแบบ ทั้งกระตุ้นหรือยับยั้ง เพื่อการสร้างหลอดเลือดใหม่ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการภายในเซลล์อื่น ๆ เช่น กระบวนการอักเสบ เป็นต้น

การสร้างหลอดเลือด หรือ angiogenesis เป็นกระบวนการทางสรีรวิทยาที่สำคัญในการพัฒนาร่างกายหรือเจริญเติบโต รวมถึงใช้ในการซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ ในขณะเดียวกันเนื้อเยื่อที่เจริญอย่างผิดปกติ จนก่อให้เกิดโรคร้ายอย่างมะเร็งก็ใช้กระบวนการสร้างหลอดเลือดนี้ด้วย สมมติฐานนี้กล่าวว่า “เมื่อเกิดมีเนื้องอก ทุกเซลล์เนื้องอกต้องถูกเลี้ยงด้วยหลอดเลือดใหม่”⁽¹⁾ โดยสมมติฐานนี้เริ่มมาตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2514 และจากสมมติฐานนี้ก่อให้เกิดการศึกษาด้านโมเลกุลสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดมากมาย มีการค้นพบ angiostatic steroids, angiogenesis inhibitors, angiogenic diseases รวมทั้งค้นคว้าบทบาทหน้าที่ของกระบวนการนี้โดยเป็นศาสตร์ใหม่ที่เกี่ยวข้องกับศาสตร์ด้าน developmental biology, cardiology, wound healing, ophthalmology, and dermatology สำหรับเซลล์มะเร็งเมื่อจะกระจายหรือเพิ่มจำนวนจำเป็นต้องมีการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดมาเลี้ยง

หากขาดการสร้างหลอดเลือดใหม่ก่อนเนื้องอกจะไม่สามารถโตได้เกินกว่าขนาด 1 มิลลิเมตร⁽¹⁻³⁾ การสร้างหลอดเลือดใหม่ที่ไปหล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง เกิดจากวิถีที่เชื่อมโยงภายในเซลล์ที่ซับซ้อน⁽⁴⁾ สำหรับโมเลกุลของสารที่มีความเกี่ยวข้องเชื่อมโยงกับกระบวนการสร้างหลอดเลือด ได้แก่โปรตีน vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF) และ platelet-derived growth factor (PDGF) โมเลกุลที่จัดเป็นโมเลกุลสำคัญและเป็นศูนย์กลางของการเจริญของหลอดเลือดใหม่ คือโปรตีน VEGF ซึ่งหลั่งออกมาจากเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ การยับยั้งการสร้างโปรตีน VEGF จะช่วยลดการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งได้ และถือว่าเป็นหนึ่งในกลยุทธ์พื้นฐานของการรักษามะเร็งที่ผ่านทาง VEGF pathway⁽⁵⁾ ซึ่งอีกกลยุทธ์คือการยับยั้งการจับกันระหว่างโปรตีน VEGF กับ VEGF receptor โดยการที่โปรตีน VEGF จะมีผลต่อการส่งสัญญาณภายในเซลล์หลอดเลือดย่อมต้องผ่านขั้นตอนการจับกับตัวรับของมันก่อน

สำหรับกลุ่มโปรตีน VEGF (VEGF family) ในเซลล์มนุษย์พบด้วยกัน 5 กลุ่มคือ VEGF (or VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, and placental growth factor (PlGF)⁽⁶⁾ ซึ่งโปรตีนกลุ่มนี้มีขนาดโมเลกุลและการจับกับตัวรับดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 VEGF family isoform และคุณสมบัติบางประการ (ดัดแปลงจาก Roskoski R Jr., 2007)

VEGF family isoforms	MW	การจับกับตัวรับ
VEGF-A	27.0	VEGFR1, VEGFR2
VEGF-B	21.6	VEGFR1
VEGF-C	46.9	VEGFR2, VEGFR3
VEGF-D	40.4	VEGFR2, VEGFR3
Placental growth factor (PlGF)	24.8	VEGFR1

Neuropilin จัดเป็นโปรตีนตัวรับอีกชนิดหนึ่งที่มีขนาดโมเลกุลในช่วง 120 - 130 kDa และไม่ได้อยู่ในกลุ่ม tyrosine kinase receptors ซึ่ง Neuropilin มีทั้งเป็นโปรตีนที่อยู่บนเมมเบรนและอยู่ในเซลล์ แบ่งเป็น neuropilin-1 และ neuropilin-2 หน้าที่หลักของ neuropilin คือเป็นโปรตีนตัวรับ หรือเป็นโปรตีนตัวรับร่วม (co-receptor)⁽⁷⁾ สำหรับการจับกับสารในกลุ่ม VEGF นั้น โปรตีนตัวที่ทำหน้าที่ตัวรับร่วมนี้คือ neuropilin-1⁽⁶⁻⁷⁾ เพื่อให้สามารถจับกับ VEGF receptor ได้ต่อไป

สำหรับเซลล์มะเร็งหลายชนิด รวมทั้งมะเร็งลำไส้ พบว่าเซลล์มะเร็งเหล่านี้มีการแสดงออกของยีน VEGF⁽⁶⁾ ทั้ง VEGF-A และ VEGF-B และ neuropilin-1^(7,8,10) เพิ่มขึ้น มีการวางแผนการรักษามะเร็งไว้ที่การลดการสร้าง VEGF⁽⁶⁾ ทั้ง VEGF-A และ VEGF-B แม้ว่ามียารายงานเกี่ยวกับ VEGF-B น้อยกว่า แต่พบว่ามะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีน VEGF-B⁽⁹⁾ จำนวนมากมีความเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็ง มีนอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของ neuropilin-1 จะส่งผลเพิ่มการยับยั้งการเจริญของมะเร็งได้^(8,11)

มะรุม (*Moringa oleifera* Lam) เป็นพืชในตระกูล Moringaceae มีชื่อสามัญในภาษาอังกฤษว่า drumstick tree หรือ horse radish tree เป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ใบใบมีส่วนประกอบเป็นโปรตีน วิตามินซี และ β -carotene มีแร่ธาตุเหล็กและโพแทสเซียมสูง⁽¹²⁾ นอกจากนี้พบว่ามีการใช้มะรุมเกือบทุก

ส่วนไม่ว่าจะเป็นดอก ฝัก ราก ในตำรับยาสมุนไพรในประเทศเขตร้อน รวมถึงประเทศไทย และมีรายงานฤทธิ์ของมะรุมที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านการชัก ต้านเนื้องอก ต้านเบาหวาน ต้านเชื้อรา และแบคทีเรีย⁽¹³⁻¹⁴⁾ และยังมีรายงานฤทธิ์อื่น ๆ เพิ่มขึ้น⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

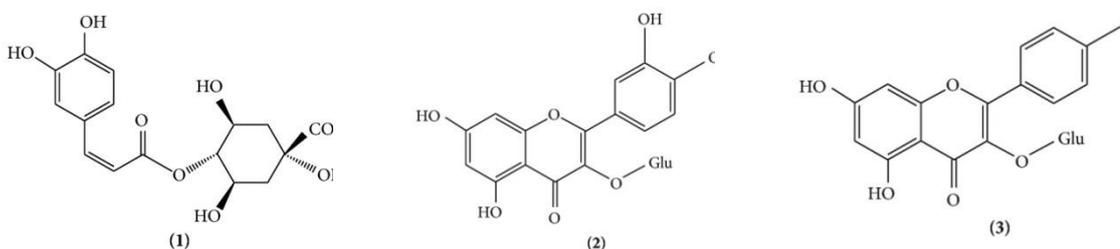
การใช้มะรุมเป็นอาหาร และใช้ในตำรับยาสมุนไพรมีมานาน มีการใช้ในหลายประเทศ สำหรับการศึกษาค้นคว้าความเป็นพิษของมะรุมพบว่ามีไม่มาก อาจเนื่องด้วยมะรุมจัดเป็นพืชที่ใช้เป็นอาหาร เมื่อเร็ว ๆ นี้ Awodele O. และคณะ⁽¹⁸⁾ ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดด้วยน้ำจากโสมชะในหนู Wistar albino mice และ albino rats เพื่อศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน และความเป็นพิษเรื้อรัง พบว่าสารสกัดจากโสมชะมีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันและเรื้อรัง แม้หนูจะได้รับสารสกัดในขนาดสูง 6,400 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานจากการทดสอบความเป็นพิษในหนู Sprague-Dawley (S-D) พบว่าสารสกัดจากโสมชะทำให้เกิด genotoxic ที่ขนาด 3,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมได้ และขนาดที่แนะนำว่าปลอดภัยอยู่ที่ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม⁽¹⁹⁾

ในด้านการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของมะรุม พบว่ามีผู้สนใจศึกษาจำนวนมาก ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาการใช้สารสกัดด้วยน้ำจากโสมชะมาทดสอบในเซลล์ human epidermal carcinoma KB (KB) cell line พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ (antiproliferation) และทำให้เซลล์ตายมากขึ้น (apoptotic induction) และเมื่อนำสารสกัดมาแยกสารสำคัญ พบว่ามีส่วนประกอบเป็น quercetin และ kaempferol ในปริมาณ 795 and 216 µg/g ตามลำดับ⁽²⁰⁾ หรือศึกษาสารสกัดส่วนฝักของมะรุม ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ พบว่ามะรุมช่วยลดการเกิดมะเร็งได้⁽²¹⁾

สำหรับสารสำคัญที่พบในมะรุมมีด้วยกันหลายกลุ่ม กลุ่มที่สำคัญได้แก่ polyphenols และ flavonoids ซึ่งพบทั้งในใบ⁽²⁰⁾ และในฝัก⁽²²⁾

การสกัดโสมชะให้ได้สารสำคัญในกลุ่ม polyphenols และ flavonoids ในปริมาณสูง และยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ควรใช้วิธีแช่เย็น (maceration) ใน 70% ethanol เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะทำให้ได้สารสำคัญในปริมาณสูง⁽²³⁾ สารสำคัญที่สกัดได้คือ astragalin, crypto-chlorogenic acid และ isoquercetin⁽²⁴⁾

ปริมาณสารสำคัญที่สกัดได้จากโสมชะที่มาจากแหล่งต่าง ๆ ทั่วประเทศไทย จะพบว่ามีสารสำคัญจากมากไปน้อยเรียงตามลำดับคือ astragalin, crypto-chlorogenic acid และ isoquercetin ซึ่งมีโครงสร้างดังรูป



รูปที่ 1 โครงสร้างของ crypto-chlorogenic acid (1), isoquercetin (2) และ astragalin (3)
(คัดลอกจาก Vongsak B และคณะ, 2013)

Astragalin หรืออีกชื่อหนึ่งคือ kaempferol 3-β-D-glucopyranoside เป็นสารที่พบมากในสมุนไพรจีนคือ *Astragalus membranaceus* Bge. มีรายงานว่า เป็นสารที่ช่วยต้านการอักเสบ ยับยั้งการอักเสบของผิวหนัง Min Ke และคณะ⁽²⁵⁾ ทำการทดลองใน Müller cells ในภาวะที่มีน้ำตาลสูง พบว่ามีฤทธิ์ลดการสร้าง VEGF น่าจะลดอาการ diabetic retinopathy ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า astragalin ลดการอักเสบจากการเหนี่ยวนำด้วย lipopolysaccharide ใน mouse mammary epithelial cells โดยลด inducible nitric oxide synthase และ cyclooxygenase-2⁽²⁶⁾

Crypto-chlorogenic acid จัดเป็น isomer หนึ่งของ chlorogenic acid หรืออีกชื่อหนึ่งว่า 4-caffeoylquinic acid มีฤทธิ์เป็นสารต้านการอักเสบ⁽²⁷⁾ และต้านอนุมูลอิสระ⁽²⁸⁻²⁹⁾ ยังไม่พบการรายงานฤทธิ์ของ crypto-chlorogenic acid ที่มีต่อเซลล์มะเร็งโดยเฉพาะการออกฤทธิ์ผ่านกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ทดลองในหนู Sprague-Dawley rats ที่เหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานแล้วฉีด chlorogenic acid เข้าช่องท้องหนู พบว่า chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid) ลดการสร้างโปรตีน VEGF ได้⁽³⁰⁾ นอกจากนี้ยังพบว่าหนูถูกเหนี่ยวนำให้เกิด liver fibrosis ด้วย CCl₄ เมื่อได้รับ chlorogenic acid อาการของตับที่อักเสบลดลงพร้อมกับมีโปรตีน VEGF และ mediator อื่น ๆ ลดลง⁽³¹⁾ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะพบว่า crypto-chlorogenic acid มีฤทธิ์สูงกว่า chlorogenic acid⁽³²⁾

Isoquercetin (quercetin 3-glycoside, quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-β-D-glucoside, and hirsutrin) เป็น glycoside โดย aglycone คือ quercetin ทั้งสองสารมีฤทธิ์ในการป้องกันหัวใจและหลอดเลือด ต้านการอักเสบ ลดอาการแทรกซ้อนจากเบาหวาน⁽³³⁾ และต้านอนุมูลอิสระ⁽³¹⁾ นอกจากนี้มีเริ่มมีรายงานเกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญของเซลล์⁽³⁴⁾

อย่างไรก็ตามสำหรับ isoquercetin ไม่มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ผ่านกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ แต่มีงานวิจัยที่แสดงผลของ quercetin⁽³⁵⁻³⁸⁾ ต่อการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ อีกทั้งมีการศึกษาที่ระบุว่า quercetin กลับเหนี่ยวนำให้เกิด angiogenesis และกระตุ้นการสร้าง VEGF เพิ่มขึ้น⁽³⁹⁻⁴⁰⁾ ได้เช่นกัน

จะเห็นได้ว่าสารสำคัญที่แยกได้จากโสม 3 ตัว ได้แก่ astragalin, crypto-chlorogenic acid และ isoquercetin (เรียงตามปริมาณสารสำคัญที่แยกได้จากมากไปน้อย) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบ และมีความเป็นไปได้ที่จะเกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากโสม 3 ตัว เปรียบเทียบกับสารสำคัญในโสม 2 ชนิด ต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF น่าจะเป็นประโยชน์และช่วยอธิบายกลไกส่วนหนึ่งของฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งได้ซึ่งคณะผู้วิจัยสนใจศึกษาสารสกัดจากโสม และสารสำคัญที่พบคือ astragalin และ crypto-chlorogenic acid เนื่องจากเป็นสารที่พบมากในโสม และมีรายงานเกี่ยวกับสารทั้งสองยังไม่มาก เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

วัตถุประสงค์การวิจัย

ศึกษาผลของสารสกัดโสมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF เปรียบเทียบกับสารสำคัญคือ astragalin และ crypto-chlorogenic acid ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (human colon cancer cell line, HT29 cell)

ผลของสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลต่อการแสดงออกของ VEGF
ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells)

ประโยชน์ที่ได้รับ

ผลวิจัยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านวิชาการ เนื่องจากเมื่อทราบกลไก และฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อการสร้างโปรตีน VEGF สามารถนำไปต่อยอดการวิจัยต่อไป

ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง โดยศึกษาผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF เปรียบเทียบกับสารสำคัญคือ astragalin และ cryptochlorogenic acid ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colon cancer cell line, HT29 cell)

คำสำคัญ (Keyword)

มะรุม (*Moringa oleifera*) , VEGF, neuropilin-1, astragalin, crypto-chlorogenic acid

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (list of symbols and abbreviations)

°C	=	degree Celsius
µg	=	microgram
µl	=	microliter
µm	=	micrometer
µM	=	micromolar
mM	=	millimolar
nM	=	nanomolar
%	=	percent
%v/v	=	percent volume by volume
%w/w	=	percent weight by weight
ATCC	=	American Type Culture Collection
AST	=	astragalin
BSA	=	bovine serum albumin
cm ²	=	square centimeter
cm ²	=	square centimeter
CCA	=	crypto-chlorogenic acid
Da	=	dalton
DMEM	=	Dulbecco's Minimum Essential Medium Eagle
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
FBS	=	fetal bovine serum
G	=	gram
h	=	hour
HT29 cells	=	human colon cancer cell line
ISQ	=	Isoquercetin
L	=	litre
M	=	molar
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MOL	=	<i>Moringa oleifera</i> leaves
PBS	=	phosphate buffered saline

ผลของสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลต่อการแสดงออกของ VEGF
ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells)

pH	=	potentia hydrogenii (lat.)
PVDF	=	Polyvinylidene-fluoride
s	=	second
SD	=	standard deviation
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS-T	=	Tris buffer saline with 0.1% tween 20
TC	=	tissue culture
TLC	=	thin layer chromatography
VEGF	=	Vascular endothelial growth factor
VEGF-A	=	Vascular endothelial growth factor A
VEGF-B	=	Vascular endothelial growth factor B
VEGFR	=	Vascular endothelial growth factor receptor
WB	=	Western Blot

บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย (Materials and Methods)

สมุนไพรรและสารเคมี

1. ใบมะรุม เก็บจากพื้นที่ในเขตตลิ่งชัน กรุงเทพมหานคร และนครปฐม ระหว่าง เดือนเมษายน-พฤษภาคม พ.ศ. 2558
2. สารเคมีในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังนี้
 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) medium จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - Fetal bovine serum EU Approved origin จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - Non-essential amino acid 100X w/o จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - L-glutamine, Penicillin, Streptomycin จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - PBS buffer (NaCl, KCl, Na₂HPO₄) จากบริษัท Merck ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน
 - HEPES จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - Glucose จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - MgSO₄, CaCl₂ จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - 0.25% Trypsin-EDTA จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - Trypan blue จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - Sodium bicarbonate (Analar[®] BDH; VWR International Ltd.) ประเทศอังกฤษ
 - Sterile Water for Injection (A.N.B. Laboratories CO., Ltd.) ประเทศไทย
 - Dimethyl sulphoxide (DMSO) จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. สารเคมีในงาน Western Blot ดังนี้
 - Micro BCA protein assay kit จากบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - Protein marker จากบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - Precast gel for SDS-PAGE จากบริษัท GE Healthcare ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - Enhanced chemiluminescence (ECL) reagent จากบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - PVDF membranes จากบริษัท GE Healthcare ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - Hyperfilm จากบริษัท GE Healthcare ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - NP-40 จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - lysis buffer (Na₃VO₄, NaF) จากบริษัท Sigma-Aldrich[®] ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - Tween 20, Glycine, Tris, Bovine serum albumin จากบริษัท Sigma-Aldrich[®]

ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. สารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบ
 - Astragalin จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - Crypto-chlorogenic acid จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. แอนติบอดีที่ใช้ จากบริษัท Cell Signaling Technology (CST) ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - VEGF-B antibody (#2463)
 - Neuropilin-1 (D62C6) Rabbit mAb (#3725)
 - γ -Tubulin Antibody (#5886)
 - Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (# 7074S)
 - Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (# 7076S)
6. แอนติบอดี VEGF Antibody (#PA5-16754) และ GAPDH Loading Control Antibody, HRP (GA1R) (#MA5-15738-HRP) จากบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. แอนติบอดี anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 546 conjugate จากบริษัท Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) จากบริษัท Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO) ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. TLC Silica gel 60 F245 Aluminium sheets 20x20 cm, layer thickness 0.2 mm (Merck, Darmstadt) ประเทศเยอรมัน
10. Whatman No.1 filter paper จาก Merck Millipore ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. Sodium chloride (UNIVAR® Ajax Finechem; analytical reagent grade)
12. Ethanol absolute (Scharlau® ET0016 analytical reagent grade) ประเทศสเปน
13. Hydrochloric acid (Scharlau® Chemie) ประเทศสเปน
14. Methanol (QRëCTM) ประเทศนิวซีแลนด์
15. Formic acid 98 – 100% (Fisher Scientific, Leicestershire) ประเทศอังกฤษ
16. Glacial acetic acid, ethyl acetate จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
17. เซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells (human colorectal adenocarcinoma cell line) จาก American Type Culture Collection ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. paraformaldehyde จากบริษัท ANH Scientific Marketing Ltd. ประเทศไทย
19. Immuno-Mount จากบริษัท ESM ประเทศสหรัฐอเมริกา

วัสดุอุปกรณ์

1. CAMAG TLC scanner 4, visionCAT (CAMAG, Muttenz, Switzerland)
2. Analytical balance รุ่น CP224S และรุ่น CP3020S บริษัท Sartorius ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. Autoclave รุ่น LS-2D บริษัท Hirakawa ประเทศไต้หวัน
4. Biohazard รุ่น Bio-II-A บริษัท Telstar ประเทศสเปน
5. Centrifuge tubes จากบริษัท ANH Scientific Marketing Ltd. ประเทศไทย

6. CO₂ incubator รุ่น HERA Cell 240 บริษัท Heraeus ประเทศเยอรมัน
7. 1.5 ml Eppendorf[®] tubes (CORNING[®]; Corning Incorporated) ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. 2 ml Cryogenic tube (Sorenson[™], BioScience, Inc.) ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. 25 cm², 75 cm² tissue culture flask (CORNING[®]; Corning Incorporated) ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. Flat-bottomed 96-well cell culture plates (costar[®]; Corning Incorporated) ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. Fluorescence 96 well plates (Bottom) (costar[®]; Corning Incorporated) ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. Tissue culture 6-well, 24-well, 48-well, 96-well plates บริษัท Nunc ประเทศ เดนมาร์ค
13. Tissue culture 96-well plates for fluorescence reading บริษัท Nunc ประเทศ เดนมาร์ค
14. Hemocytometer 0.1 mm deep chamber (BOECO, Germany)
15. Cover Glass Round Diameter 12 mm. จากบริษัท ANH Scientific Marketing Ltd. ประเทศไทย
16. Gel documentation รุ่น MultiGenius บริษัท Syngene สหราชอาณาจักร
17. Protein and nucleic acid gel electrophoresis (MyRUN intelligent electrophoresis unit) บริษัท Cosmobio ประเทศญี่ปุ่น
18. Filtered membrane 0.22, 0.45 μm จากบริษัท Whatman ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. Filtered pipet tip ขนาดต่าง ๆ จากบริษัท CLP ประเทศสหรัฐอเมริกา
20. Fusion[™] Universal Microplate Analyzer รุ่น A153601 จากบริษัท Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา
21. Filter Set for Sterilization บริษัท Sartorius ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. Fluorescent Inverted Microscope รุ่น ECLIPSE TE 2000-U บริษัท Nikon ประเทศญี่ปุ่น
23. Hot Air Oven รุ่น EED บริษัท WTB Binder ประเทศเยอรมัน
24. High Speed Centrifuge รุ่น Biofuge Stratos บริษัท Sorvell ประเทศเยอรมัน
25. Incubator รุ่น 1050-1400 บริษัท Contherm Scientific Ltd ประเทศนิวซีแลนด์
26. Magnetic stirrer จากบริษัท Framo ประเทศเยอรมัน
27. Microcentrifuge รุ่น Spectrafuge 16M บริษัท Labnet ประเทศสหรัฐอเมริกา
28. Micropipette จากบริษัท Gilson ประเทศสหรัฐอเมริกา
29. pH Meter รุ่น PP15 บริษัท Sartorius ประเทศสหรัฐอเมริกา
30. Shaking incubator รุ่น 3031 บริษัท GFL ประเทศเยอรมัน
31. Spectrophotometer รุ่น Gene Ray บริษัท Biometra สหราชอาณาจักร
32. Liquid nitrogen tank -179°C
33. Speed vacuum รุ่น Dyna Vap V1000 บริษัท Labnet ประเทศสหรัฐอเมริกา
34. Vortex mixer บริษัท Labnet ประเทศสหรัฐอเมริกา
35. Rotary evaporator (Buchi R205) ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

วิธีทำการวิจัย

ตอนที่ 1: การเตรียมสารสกัดจากใบมะรุมและการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

1. การเตรียมสารสกัดจากใบมะรุม

- 1) เก็บตัวอย่างใบมะรุมสด ล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา ตากแห้งกลางแดดจัดภายในวันที่เก็บตัวอย่าง เก็บในที่แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง
- 2) บดตัวอย่างใบมะรุมแห้งให้ละเอียดจนเป็นผง
- 3) ชั่งผงใบมะรุมแห้งที่ผ่านร่อน 20 mesh แล้วจำนวน 100 กรัม
- 4) ทำการสกัดด้วย 70% ethanol 2,000 ml เป็นเวลา 3 วัน โดยในระหว่างวันทำการเขย่าภาชนะที่ใช้สกัดเป็นระยะ เมื่อครบเวลารอง นำสารสกัดที่ได้มารวมกัน แล้วระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดันให้เข้มข้น
- 5) กากผงพืชที่เหลือนำไปสกัดซ้ำเช่นเดิมอีก 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ระเหยเข้มข้นทั้ง 3 ครั้งมารวมกัน โดยผสมให้เนื้อสารสกัดเข้ากัน แล้วระเหยให้แห้งบนหม้ออังไอน้ำ
- 6) สังเกตสารสกัดจากการระเหยแห้งว่าเยิ้มเหลวหรือไม่ และเมื่อสังเกตไม่พบร่องรอยตัวทำละลายแล้วทำการระเหยแห้งบนหม้ออังไอน้ำ ต่อไปอีกเป็นเวลา 2 วันจนแน่ใจว่าสารสกัดแห้งสนิท
- 7) จากนั้นชั่งหา % yield ของสารสกัดหยาบ

2. การหาปริมาณสาร astragalin และ crypto-chlorogenic acid ด้วยเทคนิค thin layer chromatography (Vongsak และคณะ, 2013)

2.1 การเตรียม stock solution ของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid

เตรียม stock solution ของ astragalin และ stock solution ของ crypto-chlorogenic ความเข้มข้น 10 mg/ml ใน dimethylsulfoxide (DMSO)

2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid

เตรียมสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นเท่ากันของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid เท่ากับ 100 µg/ml โดยปิเปต stock solution ของ astragalin และ stock solution ของ crypto-chlorogenic acid อย่างละ 10.0 µl และเติม 50% methanol จำนวน 980.0 µl

เตรียมสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นเท่ากันของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid เท่ากับ 50 µg/ml โดยปิเปตสารละลายผสมของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid ความเข้มข้น 100 µg/ml จำนวน 100.0 µl และเติม 50% methanol จำนวน 100.0 µl

นำสารละลายผสมของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid ความเข้มข้น 50 µg/ml ไป spot บนแผ่น TLC โดยแต่ละจุด spot จำนวน 1 µl (n=6)

นำสารละลายผสมของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid ความเข้มข้น 100 µg/ml ไป spot บนแผ่น TLC โดยแต่ละจุด spot จำนวน 1, 2, 3, 4, 5 µl (n=6) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณ astragalin, crypto-chlorogenic acid (ng/spot) และ สารสกัด ($\mu\text{g}/\text{spot}$) เมื่อ spot บนแผ่น TLC

ความเข้มข้นของสารละลายผสม astragalin, crypto-chlorogenic acid	จำนวน μl ที่ spot	ปริมาณ astragalin, crypto-chlorogenic acid ต่อจุด (ng/spot)
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1	50, 50
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1	100, 100
	2	200, 200
	3	300, 300
	4	400, 400
	5	500, 500
สารสกัด 50 mg/ml	1	50 $\mu\text{g}/\text{spot}$

2.3 การเตรียมสารละลายของสารสกัด (ความเข้มข้น 50 mg/ml) หากมากไปลดลง
ซึ่งสารสกัด 500 mg ใน volumetric flask ขนาด 10.0 ml ละลาย และปรับปริมาตรด้วย
50% methanol ทำการกรองสารละลายด้วย 0.45 mm nylon membrane ก่อนนำไป spot

2.4 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid

1) นำแผ่น TLC ไป develop โดยใช้ methanol เป็น mobile phase
2) นำแผ่น TLC ที่ develop แล้วในข้อ 1 ไปอบที่ 105°C นาน 15 นาที เก็บแผ่น TLC นี้ไว้ใช้
เตรียมกราฟมาตรฐานและทำการวิเคราะห์ปริมาณสารในสารสกัด

3) ทำการ spot สารละลายมาตรฐานผสมของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid
ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ จำนวน 1 μl ($n=7$) ด้วย microcapillary pipette ขนาด 5 μl ลงบนแผ่น
TLC ขนาด 10x20 cm ($n=7$)

4) ทำการ spot สารละลายมาตรฐานผสมของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid
ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ จำนวน 1, 2, 3, 4, 5 μl ($n=7$) ด้วย microcapillary pipette ขนาด 5 μl
ลงบนแผ่น TLC ขนาด 10x20 cm ($n=7$)

5) นำแผ่น TLC ไป develop โดยใช้สารละลายผสมของ ethylacetate : formic acid :
acetic acid : water สัดส่วนโดยปริมาตร (v/v/v/v) เท่ากับ 34 : 3.5 : 1.5 : 7 เป็น mobile phase

หมายเหตุ

ข้อ 3) และ ข้อ 4) ทำต่อเนื่องกันดังนี้ spot สารละลายมาตรฐานผสมของ astragalin และ
crypto-chlorogenic acid ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ จำนวน 1 μl แล้วตามด้วยการ spot สารละลาย
มาตรฐานผสมของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ จำนวน 1, 2,
3, 4, 5 μl

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารในสารสกัด

1) บนแผ่น TLC เดียวกับที่วิเคราะห์เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของ **astragalins** และ **cryptochlorogenic acid** โดยทำการ spot สารละลายของสารสกัดความเข้มข้น 50 mg/ml จำนวน 1 μ l (n=8), ทำพร้อมกับสารมาตรฐาน)

2) นำแผ่น TLC ที่ผ่านการ develop ไปตรวจวัดพื้นที่ใต้กราฟของสารภายใต้สภาวะ ดังนี้
ความยาวคลื่น 340 nm

Silt dimension 5.00x0.45 mm

Scan speed 20 mm/s

3) นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละความเข้มข้นของสารมาตรฐานและของสารละลายสารสกัดมาสร้างกราฟมาตรฐานของ **astragalins** และ **cryptochlorogenic acid**

4) หาปริมาณของ **astragalins** และ **cryptochlorogenic acid** ในสารละลายสารสกัดจากพื้นที่ใต้กราฟของสารทั้งสองในสารละลายสารสกัด โดยคำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐาน

ตอนที่ 2: การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโสมรุม, astragalins และ cryptochlorogenic acid ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells) ด้วย MTT assay

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการวิจัยนี้ คือ HT29 cells (human colorectal adenocarcinoma cell line) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C, ความชื้นสัมพัทธ์ 95%, 5% CO₂ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM Medium) เซลล์ถูก passage ทุก ๆ 3-5 วันด้วย spit ratio 1:5 ถึง 1:10

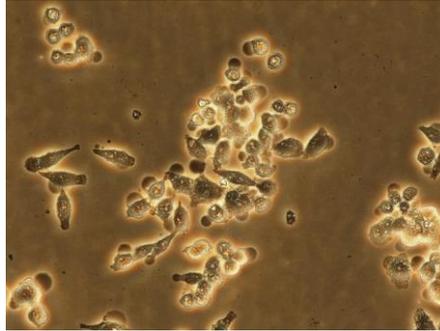
1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

นำ fetal bovine serum (FBS) มา incubate ที่ 56°C ในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 30 นาที นำผงอาหารเลี้ยงเซลล์ละลายใน sterile water for injection ปริมาตรประมาณ 950 ml คนให้ละลาย เติมน้ำ NaHCO₃ ประมาณ 2.2 g DMEM เพื่อปรับ pH ให้น้อยกว่า pH ที่จะใช้เลี้ยงเซลล์ (7.4) ลงไป 0.2-0.3 หน่วย pH จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน แล้วเติม L-Glutamine, Non-essential Amino Acids, FBS และ penicillin G/streptomycin เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1%, 1%, 10% v/v และ 0.1% ตามลำดับ เพื่อเตรียมเป็น complete medium

1.2 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

- 1) ใน TC-flasks นำเซลล์ที่ thaw แล้วมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และเปลี่ยน medium สัปดาห์ละ 1-2 ครั้ง พร้อมทั้งตรวจสอบการเจริญเติบโต การปนเปื้อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope (รูปที่ 2)
- 2) นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่โต 70-90% confluence (เลี้ยงประมาณ 24-30 h) ทำการ subculture ด้วย 0.25% trypsin-EDTA solution ถ้าย้ายใน plate 96- หรือ 6-well plate ตามต้องการ

HT29 cells



รูปที่ 2 แสดง HT29 cells ที่เพาะเลี้ยงใน 6-well plate ภายหลังจาก subculture และเลี้ยง 24 h (image 10 × objective using an inverted microscope)

2. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโสม, astragalins และ crypto-chlorogenic acid ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells) ด้วย MTT assay

นำเซลล์ HT29 cells ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเจริญประมาณ 70-90% โดยใช้เซลล์จำนวน 2×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ถ่ายใส่ 96 well-plates และ pre-incubated เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ก่อนทดสอบ จากนั้นเติมสารสกัดโสม (ช่วงความเข้มข้น 0-500 $\mu\text{g/ml}$), astragalins (ช่วงความเข้มข้น 0-0.5 mM หรือ 0-224 $\mu\text{g/ml}$) และ crypto-chlorogenic acid (ช่วงความเข้มข้น 0-0.5 mM หรือ 0-177 $\mu\text{g/ml}$) สารสกัดโสม, astragalins และ crypto-chlorogenic acid ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้นสูงสุด 1, 1.7 และ 2.2% ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีกลุ่มควบคุมเป็น DMSO ที่ความเข้มข้น 1, 1.7 และ 2.2% ด้วยซึ่ง 3 กลุ่มของ DMSO เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารใด ๆ

จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้อัตราความชื้นสัมพัทธ์ 95%, 5% CO_2 เป็นเวลา 6 h, 12 h, 24 h และ 48 h จากนั้นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง นำเซลล์มาผสมกับ MTT 20 μl (0.5 mg/ml MTT in DMEM) เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง ขั้นตอนสุดท้ายให้ดูดสารละลายตัวกลางออกแล้วละลาย formazan crystal ด้วย DMSO 100 μl ต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative cell viability) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารใด ๆ ดังสมการ

$$\% \text{ cell viability} = \frac{[\text{OD}]_{\text{test}} - [\text{OD}]_{\text{DMSO}}}{[\text{OD}]_{\text{control}} - [\text{OD}]_{\text{DMSO}}} \times 100$$

การทดลองทุกสารและทุกความเข้มข้นทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate culture)

เมื่อได้ผล % cell viability นำไป plot กราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ จากนั้นทดสอบความแตกต่างของ % cell viability ระหว่างกลุ่มควบคุมที่เป็น DMSO และกลุ่มที่ไม่ได้เติมสารใด ๆ กับกลุ่มทดลอง (สารที่เติม) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดโสมที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์มากที่สุด

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดโสมที่ต้องการใช้ นำไปคำนวณหาปริมาณของสาร สำคัญที่เป็นองค์ประกอบทั้งสอง จากการวิเคราะห์ในตอนที่ 1 (ข้อ 2.5) เพื่อนำไปใช้ในตอนที่ 3 และ 4ต่อไป

ตอนที่ 3: การทดสอบผลของสารสกัดโสมชะมดต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Immunoblotting เปรียบเทียบกับ astragaloside และ cryptochlorogenic acid

นำเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 หลังจาก subculture แล้วมาเลี้ยงใน tissue culture flask ขนาด 25 cm² (T-25 flask) โดยใช้เซลล์ 2 X 10⁵ cells/flask เพาะเลี้ยงที่ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ 95%, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 h ให้ได้เซลล์ที่ 65-70% confluence ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วเปลี่ยนเป็น DMEM แล้วเติมสารสกัดจากโสมชะมดให้ได้เข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 µg/ml สำหรับสารมาตรฐาน astragaloside และ cryptochlorogenic acid จะใช้ในความเข้มข้นที่คำนวณได้เทียบเท่ากับที่ควรจะมีในสารสกัดจากโสมชะมด 100-570 µg/ml (ในที่นี้คำนวณได้เป็น astragaloside 2.00 µg/ml คิดจากสารสกัด 570 µg/ml และ cryptochlorogenic acid 0.84 µg/ml คิดจากสารสกัด 100 µg/ml) จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ 95%, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 h และ 48 h โดยใช้ 1% DMSO เป็น negative control และใช้ adriamycin 0.1 µg/ml และ cisplatin 125 µg/ml ซึ่งทั้งสองสารเป็นยาต้านมะเร็งที่ใช้กันในปัจจุบัน เป็น positive control

เมื่อครบเวลา ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วดูด PBS ทิ้งให้มากที่สุด จากนั้นทำให้เซลล์แตกที่อุณหภูมิ 4°C (on ice) ด้วย 1 mM Na₃VO₄ ที่ ผสม 1 mM NaF ปริมาตรไม่เกิน 40 µL เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ micropipette ดูดขึ้นลงเพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์แตกหมด แล้วปลดปล่อย cytosol ออกมาภายนอก ดูดสารทั้งหมดใน flask รวบรวมถ่ายลง microcentrifuge tube

นำ cell lysate ไปแยกส่วนใสด้วยการปั่นที่ 13,000 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 min หลังจากนั้นเก็บส่วนใสไว้

แบ่งส่วนใสปริมาตร 2 µl เติมน้ำอีก 18 µL (1:10) เพื่อนำไปทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA Protein Assay (ใช้ microplate reader) ตามวิธีที่ระบุจากบริษัท

จากนั้นนำโปรตีนปริมาณ 25-30 µg มาเติม SDS sample buffer แล้วนำไปต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 5 min จากนั้นนำมา cool down บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 min

นำตัวอย่างโปรตีนที่ได้มาแยกด้วย 10% gel SDS-PAGE ที่ 110 volts เป็นเวลา 90 min

ภายหลังการ run แยก gel ออกมาแล้ว นำไปทำ transfer ลง PVDF membrane ในขั้นตอนการ blotting ใช้เวลาประมาณ 3 h เมื่อสิ้นสุด นำแผ่น membrane มาล้างด้วย TBS-T 2 ครั้ง แล้วเติม blocking buffer (5% w/v BSA ใน TBS-T) ทำการ block 2 ครั้ง เติม primary antibody (VEGF-A 1:200, VEGF-B 1:1000, neuropilin-1 1:1000, γ -tubulin 1:1000, GAPDH 1:7500) แห่ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°C

จากนั้นนำแผ่น membrane มาล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง เติม secondary antibody (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody 1:10000 หรือ Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody 1:10000) แห่ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 h จากนั้นล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง

นำแผ่น membrane มา detect หาโปรตีนโดยเติม ECL reagent แห่ประมาณ 1 min นำ membrane ออก ชับน้ำออกทำให้พอแห้ง ห่อด้วยพลาสติก ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นนำไปทาบบนแผ่น x-ray film ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำ x-ray film ไปล้าง และนำไปอ่านค่าด้วยโปรแกรม ImageJ[®]

ตอนที่ 4: การทดสอบผลของสารสกัดโสมรวมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี immunocytochemistry เปรียบเทียบกับ astragalin และ cryptochlorogenic acid

นำเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 หลังจาก subculture แล้วมาเลี้ยงใน 6-well plate โดยใช้เซลล์ 2×10^4 cells/flask เพาะเลี้ยงที่ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ 95%, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 h ให้ได้เซลล์ที่ 65-70% confluence ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วเปลี่ยนเป็น DMEM แล้วเติมสารสกัดจากโสมรวมให้ได้เข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 $\mu\text{g/ml}$, astragalin 4.55 μM หรือ 2.04 $\mu\text{g/ml}$ และ cryptochlorogenic acid 2.47 μM หรือ 0.85 $\mu\text{g/ml}$ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ 95%, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 h และ 48 h โดยใช้ 1%DMSO เป็น negative control และใช้ adriamycin 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และ cisplatin 125 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งทั้งสองสารเป็นยาต้านมะเร็งที่ใช้กันในปัจจุบัน ใช้เป็น positive control

เมื่อครบเวลา ล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง แล้ว fix ด้วย 10% paraformaldehyde เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

ล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วเติม blocking buffer (1X PBS ที่เติม 5% FBS) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 h เมื่อครบเวลาดูด blocking buffer ออกเติม primary antibody (VEGF-A 1:100, VEGF-B 1:100, neuropilin 1:250) แล้วล้างออกด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นเติม second antibody (anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 546 conjugate 1:2000) บ่มเป็นเวลา 1 h ในที่มืด จากนั้นสังเกตการเรืองแสงของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์

สถิติที่ใช้

สำหรับการทดลองในตอนต้นที่ 2 ในแต่ละการทดลองทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm standard deviation (SD) ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญใช้สถิติ one-way analysis of variance (ANOVA)

สำหรับการทดลองในตอนต้นที่ 3-4 ในแต่ละการทดลองทำการทดลอง 2 ครั้ง ผลการทดลองไม่สามารถรายงานเป็นค่าเฉลี่ยได้

บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Results and Discussion)

ตอนที่ 1: การเตรียมสารสกัดจากใบมะรุมและการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

1. การเตรียมสารสกัดจากใบมะรุมและผลการสกัดใบมะรุม

ในการเตรียมสารสกัดจากใบมะรุมให้แห้งใช้วิธีระเหยตัวทำละลายออกโดยการตั้งบน water bath และใช้วิธีการสังเกตด้วยตาเปล่าว่าลักษณะสารสกัดที่ได้ไม่เยิ้มเหลว หรือมีตัวทำละลายตกค้าง จากนั้นทำการระเหยบน water bath ต่อไปอีก 2 วัน เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีตัวทำละลายตกค้าง

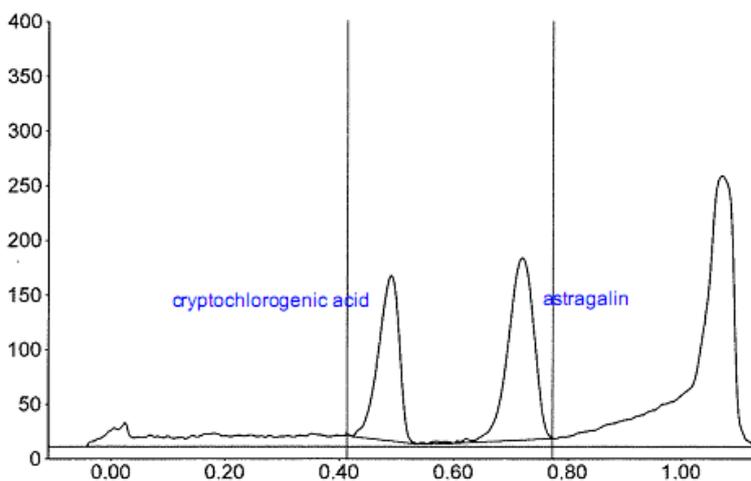
จากการสังเกต พบว่าสารสกัดจากใบมะรุมสามารถทำให้แห้งด้วยวิธีดังกล่าว ลักษณะสารสกัดที่ได้ไม่เยิ้มเหลว ไม่มีการไหลเมื่อเอียงภาชนะ จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก ได้ผลดังนี้

น้ำหนักถ้วยระเหย + สารสกัดหยาบ	90.0130 g
น้ำหนักถ้วยระเหย	57.9104 g
น้ำหนักสารสกัดหยาบ	32.1026 g
คิดเป็น % yield ของสารสกัด	= 32.10%

2. การสร้างกราฟมาตรฐานของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid

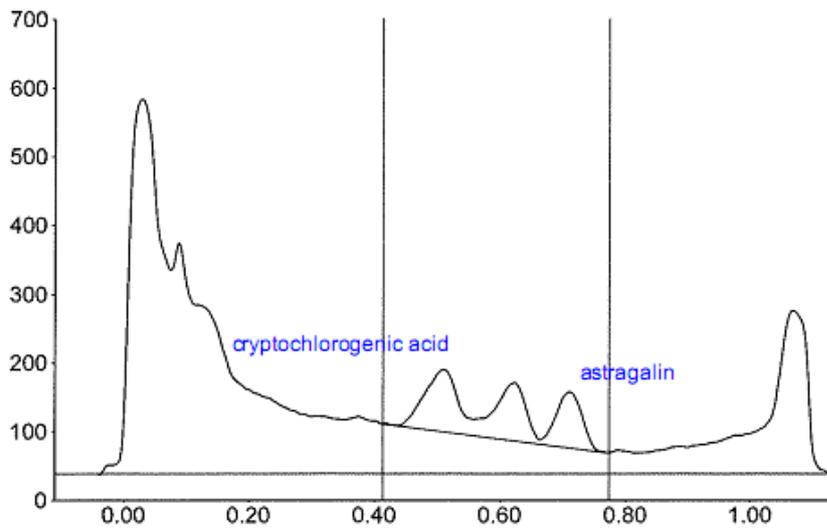
จาก TLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน astragalin และ crypto-chlorogenic acid พบว่า astragalin มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.71-0.73 และ crypto-chlorogenic acid มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.49-0.51 โดย TLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน astragalin และ crypto-chlorogenic acid แสดงได้ดังรูปที่ 3 และ TLC chromatogram ของสารสกัดใบมะรุม แสดงได้ดังรูปที่ 4

ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ Vongsak และคณะ, 2013⁽²⁴⁾ รายงานไว้พบว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกันคือ 0.51 และ 0.72 สำหรับ crypto-chlorogenic acid และ astragalin ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม พบว่า TLC chromatogram ของสารสกัดใบมะรุม (รูปที่ 4) มี peak ที่แยกจากกัน แต่ peak ค่อนข้างกว้าง



รูปที่ 3 TLC chromatogram ของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid

ผลของสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลต่อการแสดงออกของ VEGF
 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells)



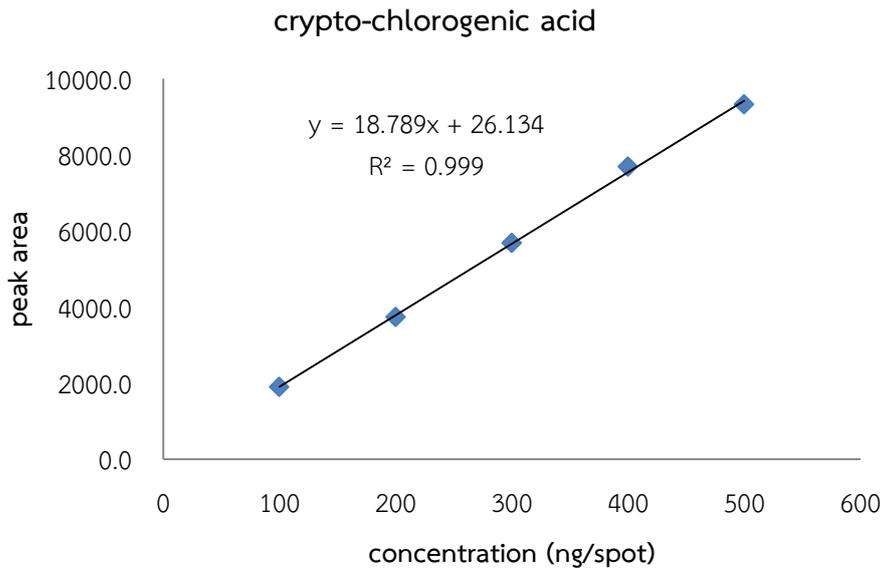
รูปที่ 4 TLC chromatogram ของสารสกัดใบมะรุม

ผลการวัดพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานทั้ง 2 ชนิด และสารสกัดใบมะรุม แสดงดังตารางที่ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ และกราฟมาตรฐานของ crypto-chlorogenic acid และ astragalin แสดงดังกราฟในรูปที่ 5 และ 6 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน crypto-chlorogenic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น crypto-chlorogenic acid (ng/spot)	พื้นที่ใต้กราฟ							avg	SD
	1	2	3	4	5	6	7		
100	1727.7	1835.9	2207.4	1973	2012.2	1679.5	1856.9	1898.9	181.1
200	3479.3	3629.3	4051.3	3619.9	4099.9	3596.3	3664.2	3734.3	240.6
300	5358.6	5591.7	6261.2	4603.8	6344.1	5923.3	5659.3	5677.4	592.7
400	7319.6	7524.3	8298.9	6242.2	8294.2	7913.9	8208.5	7685.9	743.4
500	9091.7	9448.3	9647.9	9453.2	7978.9	9730.4	9873.3	9317.7	641.2

ผลของสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลต่อการแสดงออกของ VEGF
 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells)

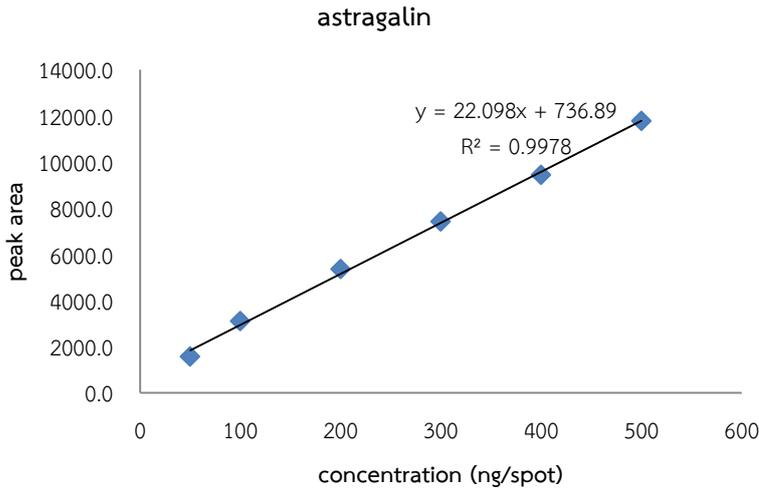


รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของ crypto-chlorogenic acid

ตารางที่ 4 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน astragalın ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น astragalın (ng/spot)	พื้นที่ใต้กราฟ							avg	SD
	1	2	3	4	5	6	7		
50	1613.6	1631.2	1638.2	1508.3	1640.1	1356.2	1606	1570.5	104.9
100	3115.4	3095.2	3235.7	3155.9	2933.3	2825.3	3412.1	3110.4	192.2
200	5042.8	5491.5	5816.1	5210.7	5208.9	5420.7	5301.4	5356.0	251.0
300	7309.2	7547.3	8099	6353.1	7586.5	7850.2	7188.6	7419.1	561.9
400	9141.2	10142.1	8027.2	8814.1	10248.9	9781	9901.9	9436.6	811.8
500	10960.4	11779	11373.4	12201.4	11682.6	11581.1	12880.7	11779.8	615.8

ผลของสารสกัดโสมด้วยเอทานอลต่อการแสดงออกของ VEGF
 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells)



รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานของ astragalin

ตารางที่ 5 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายสารสกัดโสม

ความเข้มข้นสารสกัดโสม (50 µg/spot)	พื้นที่ใต้กราฟ								avg	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Crypto-chlorogenic acid	3954.4	3838.7	3783.3	4051.5	3649.2	3807.8	3884.3	3907.8	3859.6	120.7
Astragalin	2828.1	2861.2	2421.8	2747.7	2858.9	2654.4	2479.7	2495.9	2668.5	181.9

สามารถคำนวณปริมาณ astragalin และ crypto-chlorogenic acid ได้ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณ crypto-chlorogenic acid และ astragalin ในสารสกัด 1 กรัม และในโสมแห้ง 100 กรัม

ความเข้มข้นสารสกัดโสม (50 µg/spot)	ความเข้มข้น (ng/spot)	ความเข้มข้นในสารสกัด (mg/g)	ความเข้มข้นในโสมแห้ง % (g/100 g)
Crypto-chlorogenic acid	204.03	4.08	0.130986
Astragalin	87.41	1.75	0.056117

จากปริมาณสารสำคัญที่วิเคราะห์ได้ในสารสกัดจากโสมจะเห็นได้ว่าปริมาณสารสำคัญในโสมแห้งที่สกัดได้มีสัดส่วนของ crypto-chlorogenic acid และ astragalin ที่แตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมา⁽²⁴⁾ แต่ยังคงอยู่ในระดับปริมาณที่ถือว่าสูง

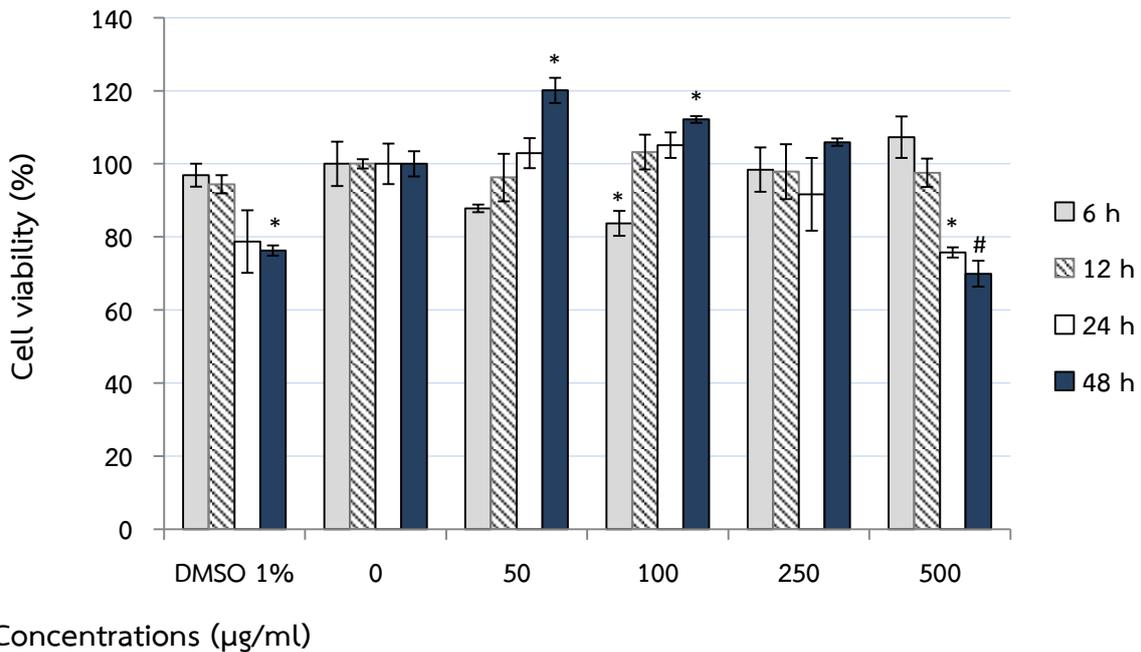
ตอนที่ 2: การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโสมมารูม, astragalins และ crypto-chlorogenic acid ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells) ด้วย MTT assay

เนื่องจากการทดสอบผลของสารสกัดโสมมารูมต่อการทำงานของโปรตีนภายในเซลล์มะเร็ง การเลือกใช้ความเข้มข้นใดของสารสกัดจากโสมมารูม จำเป็นต้องมีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ก่อนการทดลองอื่น ๆ และหากสารสกัดจากโสมมารูมมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจริง ก็อาจสามารถหาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ของสารสกัดโสมมารูมกับการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 ซึ่งปกติเป็นโปรตีนที่พบเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งทั่วไป รวมทั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วย

ในการทดสอบเบื้องต้น เมื่อเติมสารสกัดโสมมารูม, สารละลายมาตรฐาน astragalins และ crypto-chlorogenic acid ในความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วบ่มเป็นเวลา 3 h แล้วนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในทางกายภาพ อีกทั้งเซลล์ HT29 เป็นเซลล์ที่เจริญค่อนข้างช้า มี doubling time ตามที่ระบุจากเอกสารของ ATCC ประมาณ 23 h ดังนั้นจึงเริ่มต้นการทดสอบความเป็นพิษในเวลาของการบ่มเท่ากับ 6 h, 12 h, 24 h และ 48 h

นอกจากนี้ในการละลายสารสกัดจากโสมมารูม สารมาตรฐาน astragalins และ crypto-chlorogenic acid ใช้ความเข้มข้นสูงสุดของ DMSO เป็น 1, 1.77, 2.2% ตามลำดับ เนื่องจากสารสกัดจากโสมมารูมในความเข้มข้น 500 µg/ml ละลายใน 1% DMSO; astragalins ในความเข้มข้น 224 µg/ml ละลายใน 1% DMSO และ crypto-chlorogenic acid ในความเข้มข้น 177 µg/ml ละลายใน 2.2% DMSO ในขณะที่สารสกัดโสมมารูม สารมาตรฐาน astragalins และ crypto-chlorogenic acid ในความเข้มข้นอื่น ๆ ละลายในน้ำ ทำให้ต้องมีการทดสอบความเป็นพิษของ DMSO ในความเข้มข้นดังกล่าวเนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่า DMSO ในความเข้มข้นสูง ๆ จะทำให้เซลล์ตาย และมีรายงานแนะนำให้ใช้ DMSO ในความเข้มข้นที่ไม่เกิน 1% และบ่มเซลล์ได้นาน 48 h⁽⁴¹⁾

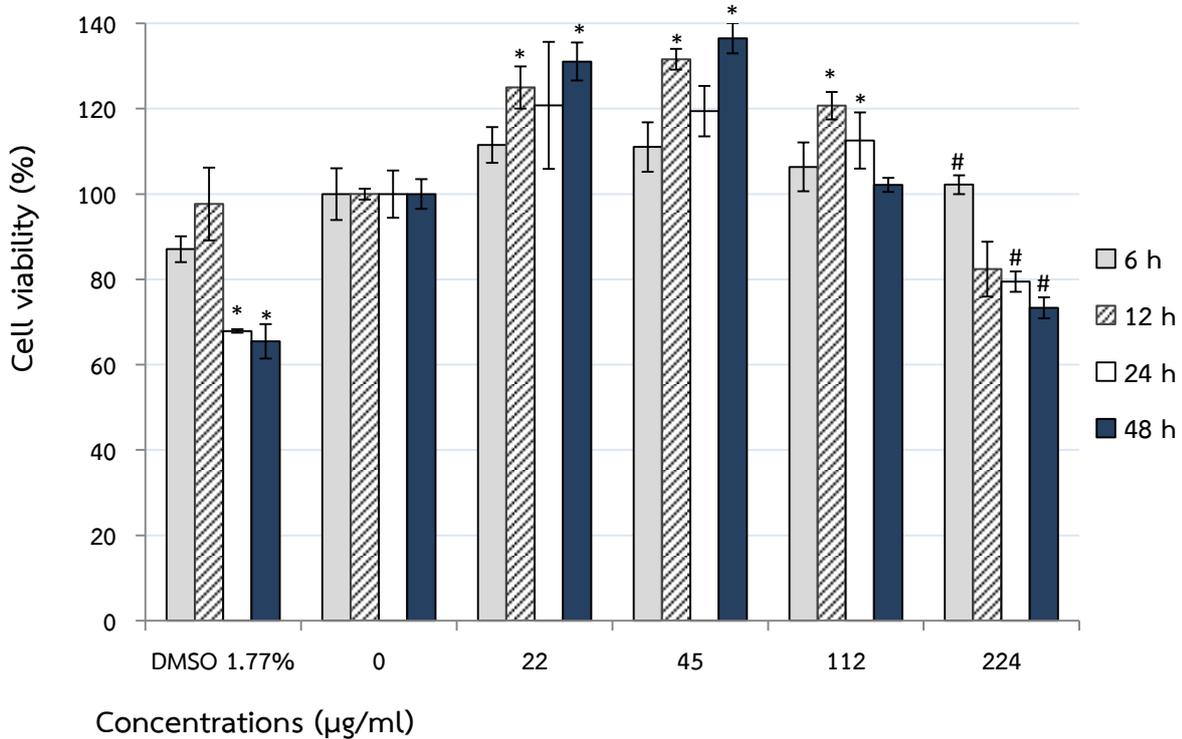
เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ หรือ % relative cell viability ของ HT29 cells เมื่อเติมสารสกัดจากโสมมารูม สารมาตรฐาน astragalins และ crypto-chlorogenic acid ในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 6 h, 12 h, 24 h และ 48 h เปรียบเทียบกับตัวทำละลาย 1, 1.77, 2.2% DMSO แสดงในรูปที่ 7-9



รูปที่ 7 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells เมื่อเติมสารสกัดจากใบมะรุมในความเข้มข้น 0-500 µg/ml เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 h โดยเปรียบเทียบกับ DMSO 1% (กราฟแสดง means ± S.D. ของ triplicate experiments (*, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติมสารสกัดจากใบมะรุมหรือ DMSO 1% กับเซลล์ที่ไม่เติมสารใด ๆ และ #, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติมสารสกัดจากใบมะรุม 500 µg/ml กับเซลล์ที่เติม DMSO 1%)

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบมะรุม (รูปที่ 7) ในการบ่มเป็นระยะเวลาต่าง ๆ และในความเข้มข้นตั้งแต่ 0-500 µg/ml พบว่าสารสกัดจากใบมะรุมมีผลต่อการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงใน 2 ลักษณะ กล่าวคือสารสกัดจากใบมะรุมในความเข้มข้น 50-100 µg/ml สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มมากขึ้น เมื่อบ่มในเวลาเพิ่มขึ้น ยกเว้นที่เวลา 6 h ของความเข้มข้น 100 µg/ml ที่พบว่าสารสกัดลดการเจริญของเซลล์ อีกลักษณะที่พบคือสารสกัดจากใบมะรุมในความเข้มข้น 250-500 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ในลักษณะ time-dependent และ concentration-dependent ยกเว้นที่เวลา 48 h ของความเข้มข้น 250 µg/ml พบว่าสารสกัดเพิ่มการเจริญของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ ซึ่งใช้สารสกัดใบมะรุมด้วยเมทานอลผสมน้ำ ทดสอบความเป็นพิษ และ antioxidative stress ภายใน HepG2 cells เป็นเวลา 29 h พบว่าสารสกัดใบมะรุมในความเข้มข้นมากกว่า 1,000 µg/ml จะยับยั้งการเจริญของเซลล์อีกทั้งจะเห็นฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้น⁽⁴²⁾ นอกจากนี้มีรายงานที่ใช้สารสกัดจากใบมะรุมด้วยน้ำ ด้วยทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน บ่มเป็นเวลา 48 h ใน KB cells แต่ความเข้มข้นสูงสุดที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ KB cells ได้ประมาณ 60% อยู่ที่ 200 µg/ml⁽²⁰⁾ ในขณะที่ใช้การสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลของการวิจัยนี้ ยับยั้งการเจริญของ HT29 cells ได้ประมาณ 30% อยู่ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml (ที่เวลา 48 h ซึ่งมีผลจากตัวทำละลายคือ 1%DMSO ร่วมด้วย) จะเห็นได้ว่าผลการทดลองของการวิจัยนี้มีบางส่วนที่เป็นไปในทางเดียวกับงานวิจัยที่มีมาก่อน และในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้น

ของสารสกัดจากโสมรวมที่ 500 µg/ml และเลือกเวลาในการทดสอบอยู่ที่ 24 และ 48 h



รูปที่ 8 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells เมื่อเติมสารมาตรฐาน astragalins ในความเข้มข้น 0-224 µg/ml เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 h (กราฟแสดง means ± S.D. ของ triplicate experiments (*, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ของเซลล์ที่เติม astragalins หรือ DMSO 1.77% กับเซลล์ที่ไม่เติมสารใด ๆ และ #, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ของเซลล์ที่เติม astragalins 224 µg/ml กับเซลล์ที่เติม DMSO 1.77%)

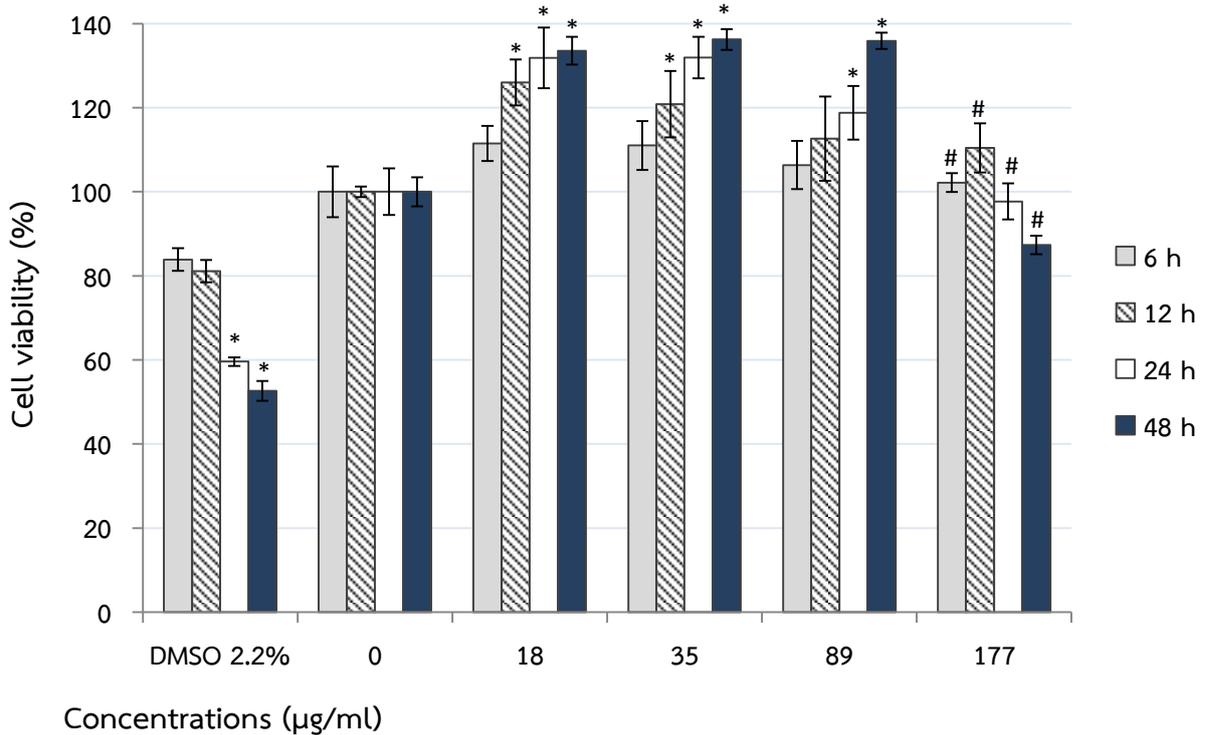
จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารละลายมาตรฐาน astragalins (รูปที่ 8) ในการบ่มสารเป็นระยะเวลาต่าง ๆ (6-48 h) และในความเข้มข้นตั้งแต่ 0-224 µg/ml พบว่าสารละลายมาตรฐาน astragalins ที่ความเข้มข้น 22-112 µg/ml มีผลส่งเสริมในเซลล์เจริญได้ดีที่เวลา 12-48 h อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 112 µg/ml การกระตุ้นการเจริญของเซลล์เกิดขึ้นน้อยกว่าที่ความเข้มข้น 22-45 µg/ml ส่วนที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือ 224 µg/ml ดูเสมือน astragalins จะยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่เติมสารใด ๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เติม DMSO 1.77% โดยเฉพาะที่ 24 และ 48 h จะพบว่า astragalins สามารถทำให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์สูงกว่า หรืออาจกล่าวได้ว่าจากผลการทดสอบ astragalins ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ แม้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น astragalins ในเกือบทุกความเข้มข้นช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์ ในความเข้มข้นที่สูงที่สุดคือ 224 µg/ml บ่ม 48 h อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ยังสูงกว่า 1.77% DMSO ฤทธิ์นี้ของ astragalins น่าจะเกิดจากความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ⁽⁴³⁾ ลดกระบวนการอักเสบ⁽⁴⁴⁾ และพบว่าช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์กระดูก (UMR-106 cells)⁽⁴³⁾ และ granulosa cell ในรังไข่หนู⁽⁴⁵⁾

อย่างไรก็ตามมีรายงานฤทธิ์อื่นของ astragalın ซึ่งเป็นสารที่มักพบในตำรับยาสมุนไพรจีน เมื่อนำสมุนไพรมาสกัดจนได้ astragalın และทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่มีระดับของเอนไซม์ Dihydrodiol dehydrogenase (DDH) สูงจะพบว่า astragalın สามารถลดระดับเอนไซม์ตัวนี้ได้ และเมื่อศึกษาในระดับกลไกจะพบว่า astragalın สามารถทำให้เซลล์ตายได้ด้วยกลไกที่ไม่ใช่ apoptosis อาจผ่านวิถี autophagy⁽⁴⁶⁾

อีกทั้งมีรายงานของ astragalın ที่สกัดจากพืชต่าง ๆ ว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ RKO cells โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 265.34 μM ⁽⁴⁷⁾ หรือในเซลล์ CaCo2 cells โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 315 μM ⁽⁴⁸⁾ ในขณะที่การกระตุ้นการเจริญของเซลล์ส่วนหนึ่งอาจมาจากฤทธิ์การก่อมะเร็งของสาร แต่การศึกษาที่มีมายาวนานของกลุ่มวิจัยในญี่ปุ่นโดยศาสตราจารย์ Takashi Sugimura จาก National Cancer Center⁽⁴⁹⁾ ซึ่งพบว่า rutin และ astragalın ซึ่งเป็น glycoside ของ quercetin และ kaempferol ตามลำดับนั้น หากทดสอบในจุลชีพจะมีฤทธิ์ genotoxic หรือก่อมะเร็ง แต่เมื่อทดสอบทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงหรือในสัตว์ทดลองยังไม่พบผลดังกล่าว การทดสอบ mutagenicity หรือ carcinogenicity ในจุลชีพในปัจจุบัน ไม่สามารถแปลผลในเซลล์หรือสัตว์ทดลองในทางเดียวกันได้เสมอไป ดังนั้นในฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์ของสารที่พบเป็นส่วนหนึ่งในโสมรุ่มก็มีความน่าสนใจที่จะศึกษาค้นคว้าต่อไป

ส่วนผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารละลายมาตรฐาน crypto-chlorogenic acid (รูปที่ 9) ในการบ่มสารเป็นระยะเวลาต่าง ๆ (6-48 h) และในความเข้มข้นตั้งแต่ 0-177 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารละลายมาตรฐาน crypto-chlorogenic acid ให้ผลในทางเดียวกับ astragalın คือไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น แม้จะดูเหมือนว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลง แต่ crypto-chlorogenic acid ยังคงช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์ สังเกตที่ความเข้มข้นที่สูงที่สุดคือ 177 $\mu\text{g/ml}$ บ่ม 48 h อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ยังสูงกว่า 2.2% DMSO

สำหรับ crypto-chlorogenic acid ฤทธิ์ที่ช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์น่าจะเกิดจากความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแต่เพียงอย่างเดียว เนื่องจากรายงานส่วนใหญ่ในปัจจุบันมีเพียงฤทธิ์นี้เท่านั้น (50-52)



รูปที่ 9 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์กับเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells เมื่อเติมสารมาตรฐาน cryptochlorogenic acid ในความเข้มข้น 0-177 µg/ml เป็นเป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 h (กราฟแสดง means ± S.D. ของ triplicate experiments (*, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติม cryptochlorogenic acid หรือ DMSO 2.2% กับเซลล์ที่ไม่เติมสารใด ๆ และ #, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติม cryptochlorogenic acid 177 µg/ml กับเซลล์ที่เติม DMSO 2.2%))

เมื่อทบทวนผลการวิจัยที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ สำหรับ cryptochlorogenic acid จะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเป็นหลัก⁽⁵⁰⁻⁵²⁾ ไม่ปรากฏรายงานความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง แต่สำหรับ astragaloside มีฤทธิ์ที่หลากหลายกว่าดังกล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากโสมมารุมที่ความเข้มข้นต่างๆ มีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์อาจเป็นผลส่วนหนึ่งมาจากฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์นี้อาจเป็นผลมาจากสารสำคัญตัวหนึ่งในโสมมารุมคือ cryptochlorogenic acid ในขณะที่สารสกัดโสมมารุมที่ความเข้มข้นสูงซึ่งยับยั้งการเจริญของเซลล์นั้น ส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากสารสำคัญภายในโสมมารุมคือ astragaloside

อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวเป็นเพียงการคาดการณ์ หากต้องการทราบผลอย่างแท้จริง ต้องมีการแยกสารสกัดโสมมารุมให้ได้สารสำคัญทั้งสองชนิดแล้วนำไปทดสอบอีกครั้งเพื่อยืนยันผลดังกล่าว

จากผลการทดสอบตอนที่ 2 หากต้องการศึกษาผลของสารสกัดโสมมารุมต่อการยับยั้งการเจริญของ HT29 cells ความเข้มข้นของสารสกัดโสมมารุมที่ควรเลือกใช้น่าจะเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่สามารถจะทดลองได้ ซึ่งในที่นี้คือความเข้มข้น 500 µg/ml อีกทั้งจากผลการสกัดและวิเคราะห์สารสกัดโสมมารุมในตารางที่ 6 ทำให้ทราบว่าสารสกัดโสมมารุมเข้มข้น 1 mg/ml จะมี cryptochlorogenic acid 4.08 µg/ml และ astragaloside 1.75 µg/ml เมื่อพิจารณาผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโสมมารุม

พบว่า สารสกัดโสมชะมดในความเข้มข้น 50 และ 100 µg/ml มีผลเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารใด ๆ ส่วนสารสกัดโสมชะมด 500 µg/ml มีผลลดอัตราการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารใด ๆ (ที่เวลา 24 h) หรือเทียบกับเซลล์ที่เติม 1% DMSO (ที่เวลา 48 h) ประกอบกับมีรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า crypto-chlorogenic acid มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน⁽⁵⁰⁻⁵³⁾ ในขณะที่ astragaloside มีแนวโน้มของการมีฤทธิ์ในการทำให้เซลล์ตายแบบ autophagy⁽⁴⁶⁾ จึงทำให้กำหนดค่าความเข้มข้นของ crypto-chlorogenic acid เป็นปริมาณที่อยู่ในสารสกัดประมาณ 100 µg/ml ส่วน astragaloside กำหนดเป็นปริมาณที่อยู่ในสารสกัดประมาณ 570 µg/ml ดังนั้นจึงเลือกใช้ crypto-chlorogenic acid ในความเข้มข้น 0.84 µg/ml หรือ 2.47 µM ส่วน astragaloside ใช้ความเข้มข้น 2.0 µg/ml หรือ 4.55 µM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่อาจมีผลต่อการทำงานของเซลล์และใช้เปรียบเทียบกับสารสกัดโสมชะมดต่อไป

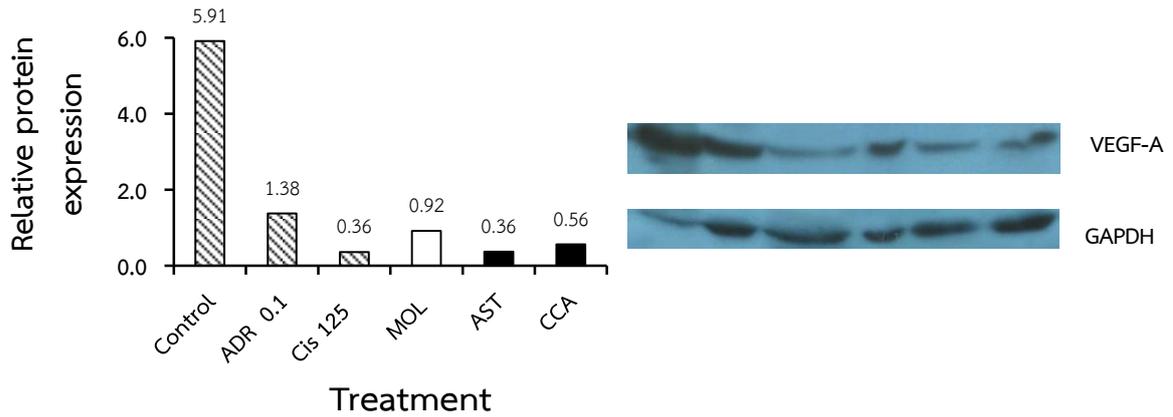
ตอนที่ 3: การทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Immunoblotting เปรียบเทียบกับ astragaloside และ cryptochlorogenic acid

ในการทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 นั้น ในการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้วิธี immunoblot หรือ western blot analysis โดยทดสอบกับโปรตีน VEGF-A และ VEGF-B ซึ่งมีผู้วิจัยน้อยกว่า VEGF-A และ neuropilin-1 ซึ่งมีผลร่วมกับการทำงานของ VEGF ในการกระตุ้นให้เซลล์หลอดเลือดเกิดกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่

การทดสอบครั้งนี้เลือกความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมที่ 500 µg/ml, astragaloside 2.0 µg/ml และ cryptochlorogenic acid 0.84 µg/ml ในการทดสอบใน HT29 cells ด้วยการบ่มที่ 24-48 h สำหรับการเลือกใช้สาร astragaloside และ cryptochlorogenic acid มาทดสอบร่วมกับสารสกัดจากใบมะรุม เนื่องจากสารทั้งสองเป็นสารสำคัญที่พบมากในใบมะรุม หากสารสกัดใบมะรุมมีต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 โดยมีผลไปในทางเดียวกับ astragaloside หรือ cryptochlorogenic acid อาจทำให้ทราบว่าฤทธิ์ที่เกิดขึ้นมาจากสารสำคัญตัวใด ซึ่งจะเป็นแนวทางในการวิจัยต่อไป

นอกจากนี้ยังเลือกยาต้านมะเร็ง 2 ชนิดได้แก่ adriamycin และ cisplatin เป็น positive control โดยยาทั้งสองชนิดมีกลไกในการเป็นยาต้านมะเร็งที่แตกต่างกัน กล่าวคือ adriamycin หรือ doxorubicin จะทำลาย DNA ด้วยการจับแบบ intercalation, ทำให้เกิดอนุมูลอิสระมาทำลาย DNA, ยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II ในขณะที่ cisplatin จะออกฤทธิ์โดยการจับกับ DNA ด้วยพันธะโควาเลนต์ ทำให้เกิด inter/intra cross link ใน DNA จึงทำให้เซลล์ตาย⁽⁵⁴⁾ อย่างไรก็ตามในด้านผลต่อการสร้างโปรตีน VEGF มีความแตกต่างกันบ้าง กล่าวคือ cisplatin ลดการแสดงออกของ VEGF ด้วยการลดการกระตุ้นการสร้างตัวรับ VEGF ผ่านการลด Hypoxia inducible factor 1 (HIF 1) โดยเฉพาะชนิด HIF 1 α ⁽⁵⁵⁾ ส่วน adriamycin ลดการกระตุ้น HIF 1 แต่ไม่ได้มีผลที่ HIF 1 α ⁽⁵⁴⁾ ซึ่งผลนี้พบในเซลล์มะเร็งรังไข่ สำหรับในส่วนฤทธิ์ของยาทั้งสองชนิดต่อการแสดงออกของ neuropilin-1 มีรายงานไม่มากนัก หากแต่เป็นงานวิจัยที่ทราบกันคืออยู่แล้วว่า neuropilin-1 เกี่ยวข้องกับการ metastasis ของมะเร็งและมีการนำความรู้นี้มาศึกษาวิจัยต่อ เช่น Jia และคณะ⁽⁵⁶⁾ ศึกษาสาร EG3287 ที่เป็น specific antagonist ของ VEGF ต่อการจับกับ neuropilin-1 พบว่า การทำให้ neuropilin-1 ไม่สามารถจับกับ VEGF จะช่วยเพิ่มฤทธิ์ของยา เช่น cisplatin ได้ อีกรายงานวิจัยกล่าวถึงการกำจัด neuropilin-1 จากเซลล์ osteosarcoma cells ทำให้เพิ่มฤทธิ์ของยา adriamycin ได้⁽⁵⁷⁾ เช่นกัน

ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ adriamycin และ cisplatin เป็น positive control สำหรับเวลาครึ่งชีวิต (half-life) ของ adriamycin และ cisplatin มีค่าประมาณ 20 - 48 h⁽⁵⁸⁾ และ 2 h⁽⁵⁹⁾ แม้ว่ายาทั้งสองจะเป็นยาต้านมะเร็ง แต่การออกฤทธิ์ของยาทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน กล่าวคือ adriamycin จะออกฤทธิ์ค่อนข้างช้ากว่า แต่คงอยู่ได้นานกว่า ในขณะที่ cisplatin จะออกฤทธิ์ได้เร็วและหมดฤทธิ์ภายใน 24 h ช่วงเวลาในการทดสอบที่เลือกเป็น 24-48 h นั้นพึงตระหนักผลของ positive control ทั้งสองชนิดใน HT29 cells ด้วย กล่าวคือการออกฤทธิ์ของ adriamycin ในการบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 h น่าจะเห็นผลชัดเจนกว่า ในขณะที่ cisplatin จะเห็นผลชัดเจนเมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 h



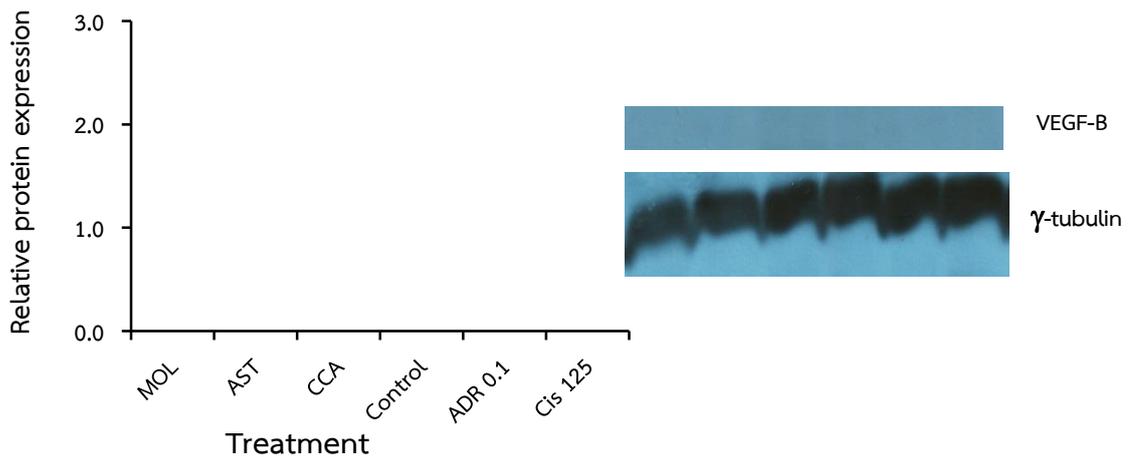
รูปที่ 10 ผลของสารสกัดโสมมะรุ่ (MOL) ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ ต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF-A ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells เปรียบเทียบกับ AST 2.0 และ CCA 0.84 $\mu\text{g/ml}$ ที่บ่มเป็นเวลา 24 h โดยวิธี Western blot โดยใช้ adriamycin 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และ cisplatin 125 $\mu\text{g/ml}$ เป็น positive control ส่วน control คือเซลล์ที่เติม 1%DMSO ตัวอย่างโปรตีนที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 40 $\mu\text{g/well}$ (โปรตีน Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase หรือ GAPDH เป็นโปรตีนสำหรับควบคุมปริมาณการเติมโปรตีนในแต่ละหลุม และใช้ VEGF-A antibody 1:200) คำนวณค่าแถบสีที่ปรากฏด้วยโปรแกรม ImageJ®

จากรูปที่ 10 พบว่าในเวลา 24 h เซลล์เพาะเลี้ยง HT29 มีการแสดงออกของ VEGF-A ในระดับที่สูงมาก (ค่า relative protein expression มีค่า 5.91) เมื่อเติมสารสกัดโสมมะรุ่ในเซลล์ทำให้เซลล์มีการแสดงออกของ VEGF-A ลดลง (0.92) ประมาณ 6 เท่า ซึ่งในความเข้มข้นของสารสกัดโสมมะรุ่ 500 $\mu\text{g/ml}$ เป็นความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ (รูปที่ 7) ในขณะที่สารมาตรฐานทั้ง astragalol และ cryptochlorogenic acid ก็ส่งผลลดการแสดงออกของ VEGF-A ประมาณ 16 และ 10 เท่าตามลำดับ แต่ความเข้มข้นของสารมาตรฐานทั้งสองที่ใช้ เป็นความเข้มข้นที่กระตุ้นการเจริญของเซลล์มากกว่ายับยั้งการเจริญของเซลล์ (รูปที่ 8 และ 9)

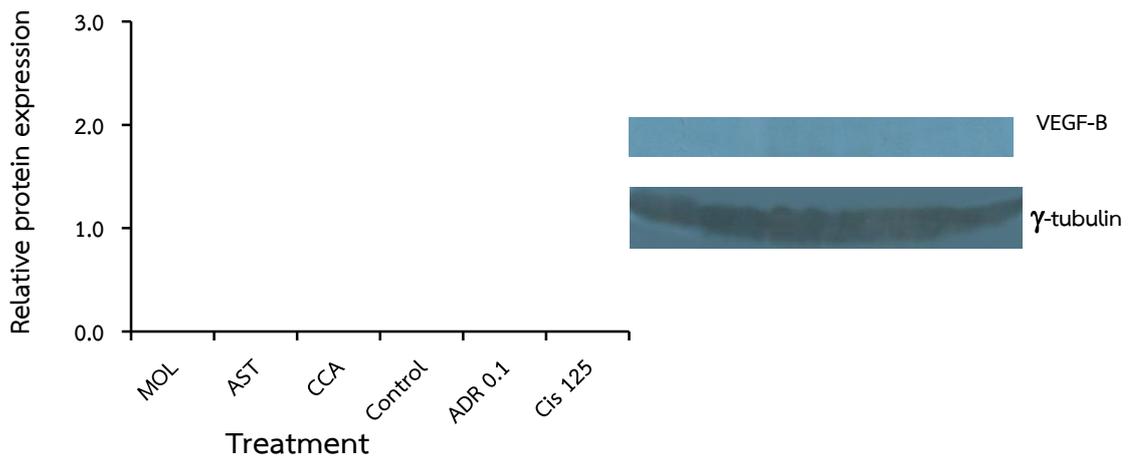
เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control ได้แก่ adriamycin และ cisplatin พบว่ายาต้านมะเร็งทั้งสองชนิด ทำให้เซลล์มีการแสดงออกของ VEGF-A ลดลงประมาณ 4 และ 16 เท่า ตามลำดับ สำหรับ cisplatin ในความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งรังไข่ SKOV-3 cells ที่บ่มเป็นเวลา 24 h ลดการแสดงออกของ VEGF ได้ประมาณ 5 เท่า⁽⁶⁰⁾ นอกจากนี้มีรายงานผลของยาต้านมะเร็งซึ่งรวม adriamycin และ cisplatin ในเซลล์มะเร็งปอด H460 cells ด้วยการบ่มเซลล์เป็นเวลา 3 วัน แล้ววิเคราะห์ปริมาณ tumor cells produced factors (TPFs) ซึ่งรวม VEGF พบว่า adriamycin 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และ cisplatin 1.5 $\mu\text{g/ml}$ ลดการสร้าง VEGF ได้ประมาณ 18 และ 9 เท่าตามลำดับ⁽⁵⁹⁾ จากการสังเกตในขณะเลี้ยงเซลล์ยาต้านมะเร็งทั้งสองชนิด มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ (ที่ 24 h มีอัตราการเจริญของเซลล์ประมาณ 60-70% เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่เติมสารใด ๆ) จากผลดังกล่าวจะเห็นว่าสารสกัดโสมมะรุ่ลดการแสดงออกของ VEGF-A ในระดับใกล้เคียงกับ adriamycin แต่ลดได้ไม่ดีเท่า cisplatin ขณะที่สาร astragalol และ cryptochlorogenic acid ลด VEGF-A ในระดับเท่ากับหรือใกล้เคียงกับ cisplatin

เมื่อเร็ว ๆ นี้มีรายงานเกี่ยวกับสารสกัดมะรุมที่น่าสนใจ 2 เรื่องเรื่องแรก Fitch M และคณะ⁽⁶¹⁾ ทดลองใช้สารสกัดใบมะรุมให้หนูทางปาก หลังจากนั้น 2 h จึงให้สารเหนี่ยวนำการอักเสบคือ lipopolysaccharide (LPS) แล้วตรวจสอบ VEGF mRNA พบว่าสารสกัดใบมะรุมลดการแสดงออกของ VEGF ส่วนงานวิจัยอีกเรื่องรายงานโดย Gothai S และคณะ⁽⁶²⁾ ซึ่งใช้สารสกัดใบมะรุมในความเข้มข้นต่ำ ๆ ในเซลล์ fibroblast ปกติ พบว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์เจริญและเหนี่ยวนำให้เกิดการ migration หรืออาจกล่าวได้ว่าสารสกัดใบมะรุมมีคุณสมบัติในการช่วยทำให้แผลหายเร็วผ่านการส่งเสริม angiogenesis

จะเห็นได้ว่าจากการวิจัยเรื่องผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของ VEGF ในครั้งนี้ สารสกัดใบมะรุมในความเข้มข้นสูง (500 µg/ml) บ่มในเซลล์ HT29 เป็นเวลา 24 h ส่งผลลดการแสดงออกของโปรตีน VEGF เทียบเท่า 0.1 µg/ml adriamycin ในขณะที่งานวิจัยนี้ยังไม่ได้ทดลองคือการทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุมในความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ VEGF ในเซลล์ HT29 ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่สารสกัดใบมะรุมในความเข้มข้นต่ำ ๆ จะเพิ่มการแสดงออกของ VEGF เนื่องจากในความเข้มข้นต่ำๆ สารสกัดใบมะรุมกระตุ้นการเจริญของเซลล์แบบเดียวกับการวิจัยของ Gothai S และคณะ⁽⁶²⁾ ซึ่งควรทำการศึกษาทดลองโดยละเอียด รวมทั้งตรวจสอบปริมาณโปรตีนตัวรับ VEGF ด้วย เนื่องจากตัวรับ VEGF มีความสัมพันธ์กับการสร้าง VEGF ของเซลล์

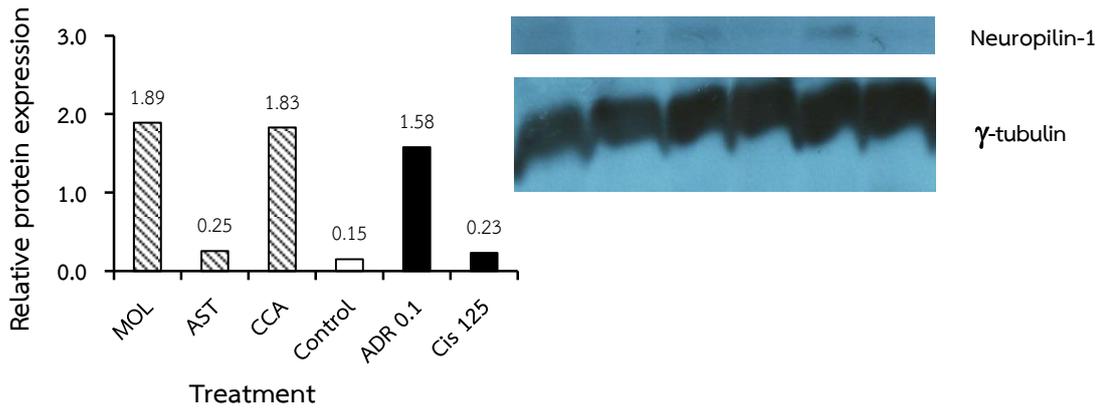


รูปที่ 11 ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF-B ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells ที่เติมใช้ MOL 500 µg/ml เปรียบเทียบกับ AST 2.0 และ CCA 0.84 µg/ml ที่บ่มเป็นเวลา 24 h โดยวิธี Western blot โดยใช้ adriamycin 0.1 µg/ml และ cisplatin 125 µg/ml เป็น positive control ส่วน control คือเซลล์ที่เติม 1%DMSO ตัวอย่างโปรตีนที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 25 µg/well (ในการตรวจสอบใช้โปรตีน γ -tubulin เป็นโปรตีนสำหรับควบคุมปริมาณการเติมโปรตีนในแต่ละหลุม ใช้ VEGF-B antibody 1:1000) คำนวณค่าแถบสีที่ปรากฏด้วยโปรแกรม ImageJ[®]

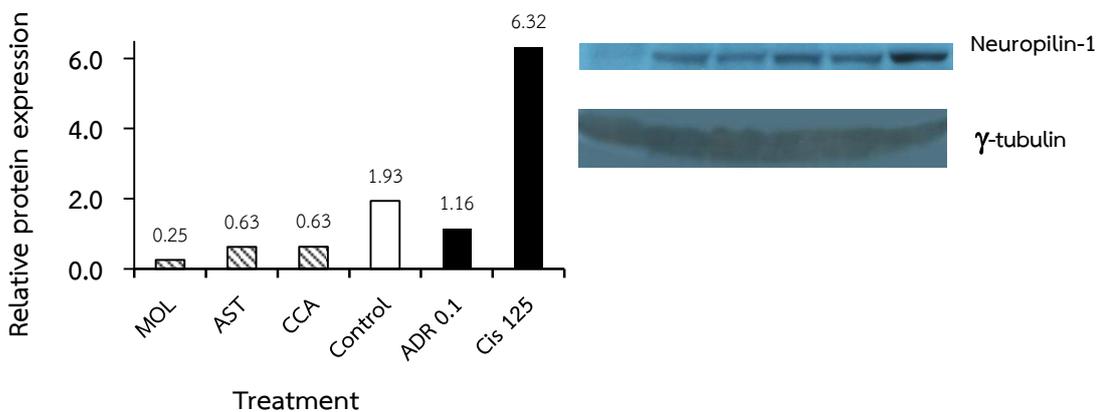


รูปที่ 12 ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF-B ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells ที่เติมใช้ MOL 500 $\mu\text{g/ml}$ เปรียบเทียบกับ AST 2.0 และ CCA 0.84 $\mu\text{g/ml}$ ที่บ่มเป็นเวลา 48 h โดยวิธี Western blot โดยใช้ adriamycin 0.1 $\mu\text{g/ml}$ และ cisplatin 125 $\mu\text{g/ml}$ เป็น positive control ส่วน control คือเซลล์ที่เติม 1%DMSO ตัวอย่างโปรตีนที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ 25 $\mu\text{g/well}$ (ในการตรวจสอบใช้โปรตีน γ -tubulin เป็นโปรตีนสำหรับควบคุมปริมาณการเติมโปรตีนในแต่ละหลุม ใช้ VEGF-B antibody 1:1000) คำนวณค่าแถบสีที่ปรากฏด้วยโปรแกรม ImageJ[®]

จากรูปที่ 11 และ 12 พบว่าในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถตรวจสอบหาปริมาณโปรตีน VEGF-B ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 ได้ คาดว่าปัญหาในการทำ western blot analysis ในครั้งนี้ น่าจะเกิดจากปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์ (cell lysate) ปริมาณที่ใช้คือ 15 และ 25 $\mu\text{g/well}$ ในการทดลอง 2 ครั้ง ซึ่งแม้ว่าเป็นปริมาณโปรตีนที่สูงแล้วก็ตามยังไม่สามารถติดตามร่องรอยของ VEGF-B ได้ ในขณะที่บางรายงานใช้ปริมาณโปรตีนประมาณ 20-40 $\mu\text{g/well}$ สามารถอ่านผลได้ แต่แถบโปรตีนที่ตรวจสอบได้ค่อนข้างจางกว่าโปรตีนอื่น⁽⁶³⁾ นอกจากนี้ VEGF-B จัดเป็นโปรตีนที่มีการ express ในปริมาณที่น้อยกว่า VEGF-A จากผลในรูปที่ 10 ซึ่งสามารถตรวจสอบ VEGF-A ได้ (ด้วยปริมาณโปรตีน 40 $\mu\text{g/well}$) ในเซลล์ HT29 น่าจะมีการสร้าง VEGF-B น้อยกว่า หรือมีอีกปัจจัยคือ antibody ในบาง lot ที่ผลิตอาจมีปัญหา ซึ่งผู้วิจัยมาทราบภายหลังว่าการส่งคืน antibody เพื่อแลกเปลี่ยน lot ใหม่สามารถทำได้ภายในเวลา 1 เดือน (เงื่อนไขเฉพาะ antibody บางบริษัทเท่านั้น) แต่เนื่องจากพยายามทำตาม protocol มาตรฐาน จึงนานเกินกำหนดการส่งเปลี่ยนได้ อย่างไรก็ตามในการวิจัยหรือการทดลองครั้งต่อไปควรแก้ไขในเรื่องเพิ่มปริมาณโปรตีนในการ load ลง gel ซึ่งอาจใช้ในปริมาณที่สูงกว่า 40 $\mu\text{g/well}$ และนั่นหมายถึงอาจต้องเพิ่มการเลี้ยงเซลล์ใน Flask ขนาดใหญ่ขึ้น อีกทางเลือกหนึ่งคือการลดการเจือจาง primary antibody เป็น 1:100 หรือ 1:50 นอกจากนี้ อาจต้องทดสอบการแสดงออกของ VEGF-B mRNA ด้วย northern blot analysis เพื่อทดสอบการแสดงออกควบคู่กัน หรืออาจเลือกใช้วิธี immunoprecipitation ก่อนวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ซึ่งจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มความจำเพาะต่อโปรตีนและทำให้มีโอกาสเห็นแถบโปรตีนได้เพิ่มขึ้น



รูปที่ 13 ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน neuropilin-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells ที่เติมใช้ MOL 500 µg/ml เปรียบเทียบกับ AST 2.0 และ CCA 0.84 µg/ml ที่บ่มเป็นเวลา 24 h โดยวิธี Western blot ใช้ adriamycin 0.1 µg/ml และ cisplatin 125 µg/ml เป็น positive control และ control คือเซลล์ที่เติม 1%DMSO ตัวอย่างโปรตีนที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 15 µg/well (ในการตรวจสอบใช้โปรตีน γ -tubulin เป็นโปรตีนสำหรับควบคุมปริมาณการเติมโปรตีนในแต่ละหลุม ใช้ neuropilin-1 antibody 1:1000) คำนวณค่าแถบสีที่ปรากฏด้วยโปรแกรม ImageJ®



รูปที่ 14 ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน neuropilin-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells ที่เติมใช้ MOL 500 µg/ml เปรียบเทียบกับ AST 2.0 และ CCA 0.84 µg/ml ที่บ่มเป็นเวลา 48 h โดยวิธี Western blot ใช้ adriamycin 0.1 µg/ml และ cisplatin 125 µg/ml เป็น positive control และ control คือเซลล์ที่เติม 1%DMSO ตัวอย่างโปรตีนที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 15 µg/well (ในการตรวจสอบใช้โปรตีน γ -tubulin เป็นโปรตีนสำหรับควบคุมปริมาณการเติมโปรตีนในแต่ละหลุม ใช้ neuropilin-1 antibody 1:1000) คำนวณค่าแถบสีที่ปรากฏด้วยโปรแกรม ImageJ®

จากรูปที่ 13 พบว่าในการทดลองครั้งนี้ใช้ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์ (cell lysate) ปริมาณที่ใช้คือ 15 µg/well สำหรับครั้งที่ 2 แม้จะเพิ่มโปรตีนเป็น 25 µg/well แต่เนื่องจากมีแถบรบกวนและไม่สามารถแยกแถบโปรตีนได้ชัดเจน จึงรายงานผลเฉพาะครั้งที่ใช้โปรตีน 15 µg/well จากผลการทดลองพบว่า

เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 h เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับเฉพาะ 1%DMSO (control) แล้วเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากโสมมารูม, crypto-chlorogenic acid, astragaloside หรือ cisplatin มีการแสดงออกของโปรตีน neuropilin-1 เพิ่มขึ้น โดยสารสกัดจากโสมมารูม, crypto-chlorogenic acid มีผลทำให้ neuropilin-1 เพิ่มขึ้นประมาณ 12 เท่า ในขณะที่ adriamycin ทำให้ neuropilin-1 เพิ่มขึ้นประมาณ 10 เท่า และ astragaloside หรือ cisplatin ให้ neuropilin-1 เพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 เท่า กรณีที่มีการแสดงออกของ neuropilin-1 เพิ่มขึ้น แต่เซลล์มีการรอดชีวิตลดลงนั้น อาจอธิบายได้จากการที่เซลล์แม้มีการแสดงออกของ neuropilin-1 เพิ่มขึ้น แต่หากมี VEGF ที่ลดลงด้วยร่วมกับมีการลดลงของ cell signaling อื่น เช่น pERK, Akt⁽⁶⁴⁾ เซลล์จะมีชีวิตรอดน้อยลงได้ ซึ่งผลของ VEGF-A ที่ลดลง ขณะที่ neuropilin-1 เพิ่มขึ้นอย่างมาก และเซลล์มีการรอดชีวิตน้อยลง พบในกรณีที่เซลล์เลี้ยงในภาวะที่มีสารสกัดจากโสมมารูม และ adriamycin

จากรูปที่ 14 จะเห็นว่าสารสกัดโสมมารูม, astragaloside, crypto-chlorogenic acid และ adriamycin มีผลลดการแสดงออกของ neuropilin-1 ประมาณ 7, 3, 3, และ 5 เท่า ตามลำดับ แต่ cisplatin มีผลเพิ่ม neuropilin-1 ประมาณ 3 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับเฉพาะ 1%DMSO (control)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับเฉพาะ 1%DMSO (control) บ่มเป็นเวลา 24 h (รูปที่ 13) กับ 48 h (รูปที่ 14) พบว่า มีการสร้าง neuropilin-1 เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น สำหรับ adriamycin มีผลทำให้เพิ่ม neuropilin-1 มาก (10 เท่า) เมื่อเวลา 24 h จากนั้นเมื่อเวลา 48h กลับทำให้ปริมาณ neuropilin-1 ลดลงไป 5 เท่า ในขณะที่ cisplatin มีผลเพิ่ม neuropilin-1 เล็กน้อย (1.5 เท่า) เมื่อเวลา 24 h เมื่อเวลาผ่านไปเป็น 48 h กลับมีผลเพิ่ม neuropilin-1 มากขึ้น (3 เท่า)ฤทธิ์ของยา adriamycin หรือ cisplatin ที่แตกต่างกันนี้อาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากระยะเวลาครึ่งชีวิตที่แตกต่างกันของยาทั้งสองตัว^(58,59) adriamycin จะอยู่ในร่างกายนานกว่า cisplatin และยังมีฤทธิ์ออกฤทธิ์ที่ช้ากว่า cisplatin จึงเห็นผลเพิ่ม neuropilin-1 ก่อนแล้วจึงลดลง ในขณะที่ cisplatin มีฤทธิ์สั้นและเร็วกว่าจึงเห็นการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจนในช่วง 24 h และเมื่อเวลาผ่านไป 48 h cisplatin อาจมีผลต่อ neuropilin-1 โดยผ่าน signal อื่นร่วมด้วยเช่น MEK/ERK signaling⁽⁶⁵⁾, lipid peroxidation⁽⁶⁶⁾ เป็นต้น เมื่อพิจารณาที่สารสกัดโสมมารูมพบว่า มีผลต่อ neuropilin-1 ในเวลา 24 และ 48 h ในลักษณะที่คล้ายคลึงกับ adriamycin และ crypto-chlorogenic acid มากกว่า cisplatin และ astragaloside

จากผลดังกล่าวข้างต้น อาจสรุปได้ว่าสารสกัดโสมมารูมยับยั้งการเจริญของเซลล์ด้วยการลดโปรตีน VEGF-A ในช่วง 24 h แต่ยังคงมี neuropilin-1 สูง ซึ่ง neuropilin-1 จะลดลงใน 48 h และผลในลักษณะเดียวกันพบใน crypto-chlorogenic acid แต่ไม่ใช่ astragaloside การที่โสมมารูมมีฤทธิ์ดังกล่าว โดยเฉพาะผลลด neuropilin-1 นั้น อาจเป็นกลไกหนึ่งที่ใช้อธิบายการนำโสมมารูมเป็นสมุนไพรช่วยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ส่วนนี้อาจมาจาก crypto-chlorogenic acid ซึ่งปัจจุบันมีการค้นคว้ายาในการต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ ซึ่งมุ่งที่การลด neuropilin-1⁽⁶⁷⁾ เนื่องจาก neuropilin-1 จะเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็งด้วย⁽⁶⁸⁾ และมีรายงานการกำจัด neuropilin-1 แล้วทำให้ cisplatin ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น⁽⁵⁶⁾

ตอนที่ 4: การทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี immunocytochemistry เปรียบเทียบกับ astragaline และ cryptochlorogenic acid

ในการทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF-A, VEGF-B และ neuropilin-1 นั้นนอกจากวิธี immunoblot หรือ western blot analysis แล้ว เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองอีกวิธีหนึ่งที่ผู้วิจัยเลือกใช้ คือการทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF-A, VEGF-B และ neuropilin-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี immunocytochemistry และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมที่ 500 µg/ml, astragaline 2.0 µg/ml และ cryptochlorogenic acid 0.84 µg/ml ในการทดสอบใน HT29 cells ด้วยการบ่มที่ 24-48 h เช่นเดียวกัน

จากรูปที่ 15-19 เป็นการย้อมโปรตีน VEGF-A, VEGF-B และ neuropilin-1 ด้วยการย้อม primary antibody VEGF-A (1:100), VEGF-B (1:100) และ neuropilin (1:250) แล้วเติม anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 546 conjugate (1:2000) ซึ่งเรืองแสงสีแดง ที่สามารถดูผลได้จากกล้องจุลทรรศน์ที่ต่อแหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนต์นั้น พบว่าในเซลล์ที่เติม 1%DMSO ซึ่งเป็น control ที่โดยปกติในเซลล์มะเร็งควรพบการเรืองแสงของ VEGF-A, VEGF-B และ neuropilin-1 ทั้งที่เวลา 24 h (รูปที่ 15-17) หรือ 48 h (รูปที่ 18-19) แต่รูปที่ได้พบการเรืองแสงน้อย เป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของ antibody ที่ใช้อย่างไม่สูงมากพอ ประกอบกับปัญหาในเรื่องคุณภาพของแสงฟลูออเรสเซนต์/กล้องที่ด้อยลงจากอายุการใช้งาน ทำให้การสังเกตภาพไม่ชัดเจน นอกจากนี้พบปัญหาที่ไม่คาดคิดคือสารสกัดใบมะรุมเมื่อผ่านกระบวนการย้อมเซลล์ทั้งที่มีและไม่มี antibody พบการเรืองแสงสีแดงในบริเวณรอบ ๆ เซลล์โดยเฉพาะในส่วนที่ยังมีสารสกัดตกค้างอยู่ เนื่องจากต้องใช้การล้างแบบเบาๆ เพื่อไม่ให้เซลล์หลุดจากภาชนะ จึงทำให้มีสารสกัดตกค้างอยู่ และเรืองแสงรบกวนการสังเกต อีกทั้งมี background เป็นสีแดงมากผิดปกติ ปัญหานี้ น่าจะเกิดจากคุณภาพกล้องส่วนหนึ่ง อีกส่วนหนึ่งอาจมาจากการเลือกใช้สีเรืองแสงที่เห็นไม่ชัดเจน หากเปลี่ยนเป็นการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์จากสีแดงเป็นสีเขียว อาจทำให้เห็นภาพชัดเจน หรืออาจต้องย้อมสีนิวเคลียสของเซลล์เพิ่มเพื่อให้เกิดสีที่ตรงข้าม (contrast) นอกจากนี้ยังมีข้อเสนอแนะในการทดลองครั้งต่อไป อาจพิจารณาเรื่องการ treat เซลล์อาจต้องทำการ fix และ penetrate ให้แน่ใจการจับของแอนติบอดีกับสารโปรตีนภายในเซลล์ อีกทั้งอาจต้องพยายามล้างสารสกัดให้หมด รวมทั้งการตรวจสอบอาจต้องใช้ Laser-scanning confocal microscopy เพื่อให้เห็นผลที่ชัดเจน

สำหรับการเติมสารอื่น ๆ นอกเหนือจากสารสกัดใบมะรุม และ control พบว่าการเรืองแสงสีแดงที่เกิดขึ้นจะสังเกตได้เฉพาะ adriamycin ที่ชัดเจน (VEGF-B และ neuropilin-1) แต่เนื่องจากต้องเปรียบเทียบกับ control จึงไม่สามารถสรุปผลจากการทดลองตอนที่ 4 นี้ได้

ในภาพรวมผลที่พบทั้งการเติมสารต่าง ๆ เป็นเวลา 24-48 h จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากใบมะรุมให้ผลลดการแสดงออกของโปรตีน VEGF-A (รูปที่ 10) และเพิ่ม neuropilin-1 (รูปที่ 13) ในเวลา 24 h ก่อนที่จะเกิดการลด neuropilin-1 (รูปที่ 14) ในเวลา 48 h ซึ่งเป็นไปตาม สมมุติฐานที่ตั้งไว้กล่าวคือ การที่เซลล์ตายมากขึ้น อาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากการลดโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 ของสารสกัดใบมะรุมและอาจในอธิบายกลไกเป็นหนึ่งในกลไกการออกฤทธิ์ของการใช้มะรุมเป็นยารักษามะเร็ง โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน astragaline และ cryptochlorogenic acid ที่ใช้ในการทดลองในความเข้มข้นที่เพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์ แต่ยังสามารถมีผลลดการแสดงออกของโปรตีน VEGF-A (รูปที่ 10) และเพิ่ม neuropilin-1 (รูปที่ 13) ในเวลา 24 h ก่อนที่จะเกิดการลด neuropilin-1 (รูปที่ 14) ในเวลา 48 h เช่นกัน ผลที่เกิดเมื่อเปรียบเทียบกับ positive control พบว่ามีความใกล้เคียงกับ adriamycin มากกว่า cisplatin

Treat ment	ไม่เติม VEGF-A antibody		เติม VEGF-A antibody	
	Fluorescent light	Bright field	Fluorescent light	Bright field
1. Control				
2. MOL 500 µg/mL				
3. AST 2.0 µg/mL				
4. CCA 0.84 µg/mL				
5. Adria mycin 0.1 µg/mL				
6. Cisplatin 125 µg/mL				

รูปที่ 15 การเรืองแสงสีแดงของเซลล์ที่ไม่ได้ย้อม (2 คอลัมน์ซ้าย) และย้อมโปรตีน VEGF-A (2 คอลัมน์ขวา) ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ (คอลัมน์ซ้ายสุด และคอลัมน์ที่ 3 จากซ้าย) เปรียบเทียบกับ bright field (คอลัมน์ที่ 2 จากซ้าย และคอลัมน์ขวาสุด) หลังจากเติมสารเป็นเวลา 24 h โดย (1) เซลล์ที่เติม 1%DMSO (negative control), (2) MOL 500 µg/mL, (3) AST 2.0 µg/mL, (4) CCA 0.84 µg/mL, (5) Adriamycin 0.1 µg/mL (positive control), (6) Cisplatin 125 µg/mL (positive control) (image 10 x objective using an inverted microscope)

Treat ment	ไม่เติม VEGF-B antibody		เติม VEGF-B antibody	
	Fluorescent light	Bright field	Fluorescent light	Bright field
1. Control				
2. MOL 500 µg/mL				
3. AST 2.0 µg/ml				
4. CCA 0.84 µg/ml				
5. Adria mycin 0.1 µg/mL				
6. Cisplatin 125 µg/mL				

รูปที่ 16 การเรืองแสงสีแดงของเซลล์ที่ไม่ได้ย้อม (2 คอลัมน์ซ้าย) และย้อมโปรตีน VEGF-B (2 คอลัมน์ขวา) ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ (คอลัมน์ซ้ายสุด และคอลัมน์ที่ 3 จากซ้าย) เปรียบเทียบกับ bright field (คอลัมน์ที่ 2 จากซ้าย และคอลัมน์ขวาสุด) หลังจากเติมสารเป็นเวลา 24 h โดย (1) เซลล์ที่เติม 1%DMSO (negative control), (2) MOL 500 µg/mL, (3) AST 2.0 µg/ml, (4) CCA 0.84 µg/ml, (5) Adriamycin 0.1 µg/mL (positive control), (6) Cisplatin 125 µg/mL (positive control) (image 10 × objective using an inverted microscope)

Treat ment	ไม่เติม Neuropilin-1 antibody		เติม Neuropilin-1 antibody	
	Fluorescent light	Bright field	Fluorescent light	Bright field
1. Control				
2. MOL 500 µg/mL				
3. AST 2.0 µg/ml				
4. CCA 0.84 µg/ml				
5. Adria mycin 0.1 µg/mL				
6. Cisplatin 125 µg/mL				

รูปที่ 17 การเรืองแสงสีแดงของเซลล์ที่ไม่ได้ย้อม (2 คอลัมน์ซ้าย) และย้อมโปรตีน Neuropilin-1 (2 คอลัมน์ขวา) ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ (คอลัมน์ซ้ายสุด และคอลัมน์ที่ 3 จากซ้าย) เปรียบเทียบกับ bright field (คอลัมน์ที่ 2 จากซ้าย และคอลัมน์ขวาสุด) หลังจากเติมสารเป็นเวลา 24 h โดย (1) เซลล์ที่เติม 1%DMSO (negative control), (2) MOL 500 µg/mL, ((3) AST 2.0 µg/ml, (4) CCA 0.84 µg/ml, (5) Adriamycin 0.1 µg/mL (positive control), (6) Cisplatin 125 µg/mL (positive control) (image 10 × objective using an inverted microscope)

Treat ment	ไม่เติม VEGF-B antibody		เติม VEGF-B antibody	
	Fluorescent light	Bright field	Fluorescent light	Bright field
1. Control				
2. MOL 500 µg/mL				
3. AST 2.0 µg/ml				
4. CCA 0.84 µg/ml				
5. Adria mycin 0.1 µg/mL				
6. Cisplatin 125 µg/mL				

รูปที่ 18 การเรืองแสงสีแดงของเซลล์ที่ไม่ได้ย้อม (2 คอลัมน์ซ้าย) และย้อมโปรตีน VEGF-B (2 คอลัมน์ขวา) ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ (คอลัมน์ซ้ายสุด และคอลัมน์ที่ 3 จากซ้าย) เปรียบเทียบกับ bright field (คอลัมน์ที่ 2 จากซ้าย และคอลัมน์ขวาสุด) หลังจากเติมสารเป็นเวลา 48 h โดย (1) เซลล์ที่เติม 1%DMSO (negative control), (2) MOL 500 µg/mL, (3) AST 2.0 µg/ml, (4) CCA 0.84 µg/ml, (5) Adriamycin 0.1 µg/mL (positive control), (6) Cisplatin 125 µg/mL (positive control) (image 10 × objective using an inverted microscope)

Treat ment	ไม่เติม Neuropilin-1 antibody		เติม Neuropilin-1 antibody	
	Fluorescent light	Bright field	Fluorescent light	Bright field
1. Control				
2. MOL 500 µg/mL				
3. AST 2.0 µg/ml				
4. CCA 0.84 µg/ml				
5. Adria mycin 0.1 µg/mL				
6. Cisplatin 125 µg/mL				

รูปที่ 19 การเรืองแสงสีแดงของเซลล์ที่ไม่ได้ย้อม (2 คอลัมน์ซ้าย) และย้อมโปรตีน Neuropilin-1 (2 คอลัมน์ขวา) ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ (คอลัมน์ซ้ายสุด และคอลัมน์ที่ 3 จากซ้าย) เปรียบเทียบกับ bright field (คอลัมน์ที่ 2 จากซ้าย และคอลัมน์ขวาสุด) หลังจากเติมสารเป็นเวลา 48 h โดย (1) เซลล์ที่เติม 1%DMSO (negative control), (2) MOL 500 µg/mL, (3) AST 2.0 µg/ml, (4) CCA 0.84 µg/ml, (5) Adriamycin 0.1 µg/mL (positive control), (6) Cisplatin 125 µg/mL (positive control) (image 10 x objective using an inverted microscope)

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทำวิจัยในครั้งนี้ สามารถเตรียมสารสกัดจากโสมด้วยเอทานอลที่มีสารสำคัญอย่างน้อย 2 ชนิดคือ astragaloside และ cryptochlorogenic acid ในปริมาณที่อยู่ในช่วงของการสกัดตามวิธีของ Vongsak และคณะ, 2013 แนะนำไว้ เมื่อนำไปทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HT29 ในเวลา 6-48 h พบว่าความเข้มข้น 500 µg/ml เป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายมากที่สุด ในขณะที่สารมาตรฐาน astragaloside (0-224 µg/ml) และ cryptochlorogenic acid (0-177 µg/ml) ในเกือบทุกความเข้มข้นกลับมีผลเพิ่มการเจริญของเซลล์

เมื่อตรวจสอบผลของสารสกัดโสมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF-A, VEGF-B และ neuropilin-1 พบว่าสารสกัดจากโสมมีผลลดการแสดงออกของโปรตีน VEGF-A (รูปที่ 10) และเพิ่ม neuropilin-1 (รูปที่ 13) ในเวลา 24 h ก่อนที่จะเกิดการลด neuropilin-1 (รูปที่ 14) ในเวลา 48 h ซึ่งเป็นไปตาม เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน astragaloside และ cryptochlorogenic acid ที่ใช้ในการทดลองในความเข้มข้นที่เพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์ แต่ยังสามารถมีผลลดการแสดงออกของโปรตีน VEGF-A (รูปที่ 10) และเพิ่ม neuropilin-1 (รูปที่ 13) ในเวลา 24 h ก่อนที่จะเกิดการลด neuropilin-1 (รูปที่ 14) ในเวลา 48 h เช่นกัน ผลที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ positive control พบว่ามีความใกล้เคียงกับ adriamycin มากกว่า cisplatin

ทั้งนี้ในการวิจัยนี้ไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน VEGF-B ได้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากประสิทธิภาพของ antibody เอง หรืออาจมาจากปริมาณโปรตีนในการ load ลง gel ยังไม่มากพอ ซึ่งหากต้องการทดสอบอีกครั้งจำเป็นต้องใช้ปริมาณโปรตีนจากเซลล์ที่มากกว่า 40 µg/well และนั่นหมายถึงอาจต้องเพิ่มการเลี้ยงเซลล์ใน Flask ขนาดใหญ่ขึ้น อีกทางเลือกหนึ่งคือการลดการเจือจาง primary antibody เป็น 1:100 หรือ 1:50 นอกจากนี้อาจต้องทดสอบการแสดงออกของ VEGF-B mRNA ด้วย northern blot analysis เพื่อทดสอบการแสดงออกควบคู่กัน หรืออาจเลือกใช้วิธี immunoprecipitation ก่อนวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ซึ่งจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มความจำเพาะต่อโปรตีนและทำให้มีโอกาสเห็นแถบโปรตีนได้เพิ่มขึ้น

จุดอ่อนของการวิจัยอีกประการอยู่ที่การทำ immunohistochemistry ที่ไม่สามารถทำให้เห็นผลได้ชัดเจน ปัญหาหลักมาจากเครื่องมือและอุปกรณ์มีคุณภาพของแสงฟลูออเรสเซนต์/กล้องด้อยลงจากการใช้งาน ทำให้การสังเกตภาพไม่ชัดเจน การเลือกสีเรืองแสงเพียงตัวเดียว ไม่มีการย้อมสีนิวเคลียสของเซลล์เพิ่มเพื่อให้เกิดสีที่ตรงข้าม (contrast) การเพิ่มขึ้นตอนการ treat เซลล์ด้วยการ fix และให้สาร penetrate จนแน่ใจว่ามีการจับของแอนติบอดีกับสารโปรตีนภายในเซลล์ อีกทั้งอาจต้องพยายามล้างสารสกัดให้หมด รวมทั้งการตรวจสอบอาจต้องใช้ Laser-scanning confocal microscopy เพื่อให้เห็นผลที่ชัดเจนมากขึ้น

สำหรับข้อเสนอแนะจากผลการวิจัยนี้ในการศึกษาวิจัยต่อไป คือการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งจากสารสกัดโสมในความเข้มข้นที่สูงขึ้นในเซลล์อื่น ๆ การสกัดสารสำคัญจากโสมให้ได้สารเดี่ยว และนำไปทดสอบต่อเพื่อให้ทราบว่าผลการลด VEGF-A และ neuropilin-1 มาจากสารใด นอกจากนี้ยังควรศึกษา signaling molecule และฤทธิ์อื่น ๆ ที่น่าสนใจของโสม เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง (Reference)

1. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?. J Natl Cancer Inst. 1990; 82(1): 4–6.
2. Pedro M, Lacala PM, Moreac V, Ruffinia F, Orecchiad A, Dorioe AS, et al. Inhibition of endothelial cell migration and angiogenesis by a vascular endothelial growth factor receptor-1 derived peptide. Eu J Cancer. 2008; 44: 1914-21.
3. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. Oncogene. 1999; 18(38): 5356–62.
4. Makrilia N, Lappaa T, Xylaa V, Nikolaidisa I, Syrigosa K. The role of angiogenesis in solid tumours: An overview. Eur J Intern Med. 2009, doi:10.1016/j.ejim.2009.07.009.
5. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol. 2005; 23: 1011-27.
6. Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. Crit Rev Oncol Hematol. 2007; 62(3): 179–213.
7. Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. Mol Cancer Ther. 2006; 5(5): 1099-107.
8. Parikh AA, Fan F, Liu WB, et al. Neuropilin-1 in human colon cancer: expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. Am J Pathol. 2004; 164: 2139–51.
9. Yang X, Zhang Y, Hosaka K, Andersson P, Wang J, Tholander F, Cao Z, Morikawa H, Tegnér J, Yang Y, Iwamoto H, Lim S, Cao Y. VEGF-B promotes cancer metastasis through a VEGF-A-independent mechanism and serves as a marker of poor prognosis for cancer patients. Proc Natl Acad Sci USA. 2015 Jun 2; 112(22): E2900-9.
10. Soker S1, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. Cell. 1998; 92(6): 735-45.
11. Pan Q1, Chantry Y, Liang WC, et al. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. Cancer Cell. 2007; 11(1): 53-67.
12. Verma AR, Vijayakumar M, Mathela CS, Rao CV. In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. Food Chem Toxicol. 2009 Sep; 47(9): 2196-201.

13. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother Res*. 2007 Jan;21(1): 17-25.
14. Paliwal R, Sharma V, Pracheta. A review on horse radish tree (*Moringa oleifera*): A multipurpose tree with high economic and commercial importance. *Asian J Biotechnol*. 2011; 3: 317-28.
15. Chumark P, Khunawat P, Sanvarinda Y, et al. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *J Ethnopharmacol*. 2008; 116(3): 439-46.
16. Mahajan SG and Mehta AA. Effect of *Moringa oleifera* Lam. seed extract on ovalbumin-induced airway inflammation in guinea pigs. *Inhal Toxicol*. 2008; 20(10): 897-909.
17. Debnath S and Guha S. Role of *Moringa oleifera* on enterochromaffin cell count and serotonin content of experimental ulcer model. *Indian J Exp Biol*. 2007; 45(8): 726-31.
18. Awodele O, Oreagba IA, Odoma S, da Silva JA, Osunkalu VO. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). *J Ethnopharmacol*. 2012; 139(2): 330-6.
19. Asare GA, Gyan B, Bugyei K, Adjei S, Mahama R, Addo P, et al. Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. *J Ethnopharmacol*. 2012; 6; 139(1): 265-72.
20. Sreelatha S, Jeyachitra A, and Padma PR. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49(6): 1270-5.
21. Budda S, Butryee C, Tuntipopipat S, Rungsipipat A, Wangnaitum S, Lee JS, Kupradinun P. Suppressive effects of *Moringa oleifera* Lam pod against mouse colon carcinogenesis induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011; 12(12): 3221-8.
22. Cheenpracha S, Park EJ, Yoshida WY, Barit C, Wall M, Pezzuto JM, Chang LC. Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. *Bioorg Med Chem*. 2010 Sep 1; 18(17): 6598-602.
23. Vongsak B, Sithisarna P, Mangmoolb S, Thongpraditchotec S, Wongkrajanc Y, Gritsanapana W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industr Crops Products*. 2013; 44: 566-71.
24. Vongsak B, Sithisarn P, Gritsanapan W. Simultaneous determination of cryptochlorogenic Acid, isoquercetin, and astragalins contents in *Moringa oleifera* Leaf

- extracts by TLC-densitometric method. Evid Based Complement Alternat Med. 2013; 2013: 917609.
25. Ke M, Hu XQ, Ouyang J, Dai B, Xu Y. The effect of astragaloside on the VEGF production of cultured Müller cells under high glucose conditions. Biomed Mater Eng. 2012; 22(1-3): 113-9.
 26. Li F, Wang W, Cao Y, Liang D, Zhang W, Zhang Z, Jiang H, Guo M, Zhang N. Inhibitory effects of astragaloside on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mouse mammary epithelial cells. J Surg Res. 2014 Dec;192(2): 573-81.
 27. Evers D, Deußler H. Potato antioxidant compounds: Impact of cultivation methods and relevance for diet and health. www.intechopen.com/download/pdf/29977.
 28. Nuengchamnong N, Krittasilpb K, Ingkaninanc K. Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay. Food Chem. 2009; 117(4): 750-6.
 29. Shui G, Leong LP, Wong SP. Rapid screening and characterisation of antioxidants of *Cosmos caudatus* using liquid chromatography coupled with mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005; 827(1):127-38.
 30. Shin JY, Sohn J, Park KH. Chlorogenic acid decreases retinal vascular hyperpermeability in diabetic rat model. J Korean Med Sci. 2013 Apr; 28(4): 608-13.
 31. Shi H, Dong L, Bai Y, Zhao J, Zhang Y, Zhang L. Chlorogenic acid against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. Eur J Pharmacol. 2009 Nov 25; 623(1-3): 119-24.
 32. Nakatani N, Kayano S, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.) J Agric Food Chem. 2000; 48: 5512-6.
 33. Appleton J. Evaluating the bioavailability of isoquercetin. Nat Med J. 2010; 2(1): 1-6.
 34. Engen A, Maeda J, Wozniak DE, Brents CA, Bell JJ, Uesaka M, Aizawa Y, Kato TA. Induction of cytotoxic and genotoxic responses by natural and novel quercetin glycosides. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2015; 784-785: 15-22.
 35. Pratheeshkumar P, Budhraj A, Son YO, et al. Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR- 2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways. PLoS One. 2012; 7(10): e47516.

36. Chen SS, Michael A, Butler-Manuel SA. Advances in the treatment of ovarian cancer: a potential role of antiinflammatory phytochemicals. *Discov Med*. 2012 Jan; 13(68): 7-17.
37. Gacche RN, Shegokar HD, Gond DS, Yang Z, Jadhav AD. Evaluation of selected flavonoids as antiangiogenic, anticancer, and radical scavenging agents: an experimental and in silico analysis. *Cell Biochem Biophys*. 2011 Dec; 61(3): 651-63.
38. Anand K, Asthana P, Kumar A, Ambasta RK, Kumar P. Quercetin mediated reduction of angiogenic markers and chaperones in DLA-induced solid tumours. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011; 12(11): 2829-35.
39. Jeon H, Kim H, Choi D, et al. Quercetin activates an angiogenic pathway, hypoxia inducible factor (HIF)-1-vascular endothelial growth factor, by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase: a structural analysis of quercetin for inhibiting HIF-prolyl hydroxylase. *Mol Pharmacol*. 2007 Jun; 71(6): 1676-84.
40. Park SS, Bae I, Lee YJ. Flavonoids-induced accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α /2 α is mediated through chelation of iron. *J Cell Biochem*. 2008 Apr 15; 103(6): 1989-98.
41. Trivedi AB, Kitabatake N, Doi E. Toxicity of dimethyl sulfoxide as a solvent in bioassay system with HeLa cells evaluated colorimetrically with 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide. *Agri Biol Chem*. 1990; 54(11): 2961-6.
42. Sangkitikomol W, Rocejanasaroj A, Tencomnao T. Effect of *Moringa oleifera* on advanced glycation end-product formation and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. *Genet Mol Res*. 2014 Jan 29;13(1):723-35
43. Yang L, Chen Q, Wang F, Zhang G. Antiosteoporotic compounds from seeds of *Cuscuta chinensis*. *J Ethnopharmacol*. 2011 May 17; 135(2): 553-60.
44. Cho IH, Gong JH, Kang MK, Lee EJ, Park JH, Park SJ, Kang YH. Astragalin inhibits airway eotaxin-1 induction and epithelial apoptosis through modulating oxidative stress-responsive MAPK signaling. *BMC Pulm Med*. 2014 Jul 29; 14: 122.
45. Wei M, Mahady GB, Liu D, Zheng ZS, Lu Y. Astragalin, a Flavonoid from *Morus alba* (Mulberry) increases endogenous estrogen and progesterone by inhibiting ovarian granulosa cell apoptosis in an aged rat model of menopause. *Molecules*. 2016 May 21;21(5). pii: E675. doi: 10.3390/molecules21050675.
46. Chiang YY, Wang SL, Yang CL, Yang HY, Yang HC, Sudhakar JN, et al. Extracts of *Koelreuteria henryi* Dummer induce apoptosis and autophagy by inhibiting dihydrodiol dehydrogenase, thus enhancing anticancer effects. *Int J Mol Med*. 2013 Sep;32(3):577-84.

47. Jun Yi, Jian-Guo Wu, Yan-Bin Wu, Wei Peng. Antioxidant and anti-proliferative activities of flavonoids from *Bidens pilosa* L var *radiata* Sch Bip. Trop J Pharm Res. 2016; 15(2):34-48.
48. Shoeb M, Celik S, Jaspars M, Kumarasamy Y, MacManus SM, Nahar L, et.al. Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii*. Tetrahedron 2005; 61(38):9000-6.
49. Sugimura T. Nutrition and dietary carcinogens. 2000;21(3): 387-95.
50. Liu H, Zheng YF, Li CY, Zheng YY, Wang DQ, Wu Z, et al. Discovery of anti-inflammatory ingredients in chinese herbal formula Kouyanqing granule based on relevance analysis between chemical characters and biological effects. Sci Rep. 2015 Dec 10; 5: 18080. doi: 10.1038/srep18080.
51. Zhen J, Villani TS, Guo Y, Qi Y, Chin K, Pan MH, et al. Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves. Food Chem. 2016 Jan 1; 190: 673-80.
52. Wang J, Cao X, Jiang H, Qi Y, Chin KL, Yue Y. Antioxidant activity of leaf extracts from different *Hibiscus sabdariffa* accessions and simultaneous determination five major antioxidant compounds by LC-Q-TOF-MS. Molecules. 2014 Dec 17; 19(12): 21226-38.
53. Xu JG, Hu QP, Liu Y. Antioxidant and DNA-protective activities of chromogenic acid isomers. J Agric Food Chem. 2012 Nov 21;60(46):11625-30.
54. Duyndam MC, van Berkel MP, Dorsman JC, Rockx DA, Pinedo HM, Boven E. Cisplatin and doxorubicin repress vascular endothelial growth factor expression and differentially down-regulate hypoxia-inducible factor 1 activity in human ovarian cancer cells. Biochem Pharmacol. 2007 Jul 15;74(2):191-201.
55. Zhong XS, Liu LZ, Skinner HD, Cao Z, Ding M, Jiang BH. Mechanism of vascular endothelial growth factor expression mediated by cisplatin in human ovarian cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jun 22;358(1):92-8.
56. Jia H, Cheng L, Tickner M, Bagherzadeh A, Selwood D, Zachary I. Neuropilin-1 antagonism in human carcinoma cells inhibits migration and enhances chemosensitivity. Br J Cancer. 2010 Feb 2;102(3):541-52.
57. Yue B, Ma JF, Yao G, Yang MD, Cheng H, Liu GY. Knockdown of neuropilin-1 suppresses invasion, angiogenesis, and increases the chemosensitivity to doxorubicin in osteosarcoma cells - an in vitro study. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014;18(12):1735-41.
58. Pfizer New Zealand. Data Sheet "Adriamycin" Available from: <http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/a/adriamycininj.pdf> [Accessed 9th October 2016].

59. Hermann G, Heffeter P, Falta T, Berger W, Hann S, Koellensperger G. In vitro studies on cisplatin focusing on kinetic aspects of intracellular chemistry by LC-ICP-MS. *Metallomics*. 2013 Jun;5(6):636-47.
60. Sheng WJ, Jiang H, Wu DL, Zheng JH. Early responses of the STAT3 pathway to platinum drugs are associated with cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer. *Braz J Med Biol Res*. 2013;46 (8): 2013.
61. Fitch M, Ray S, Zwetsloot KA, Mowa C. *Moringa oleifera* whole methanolic leaf extract attenuates levels of angiogenic factors in the cervix of preterm labor mice models. *FASEB J*. 2016;30(1):Supplement 921.7.
62. Dasari SR, Velma V, Yedjou CG, Tchounwou PB. Preclinical assessment of low doses of cisplatin in the management of acute promyelocytic leukemia. *Int J Cancer Res Mol Mech*. 2015 Oct;1(3). doi: 10.16966/2381-3318.113.
63. Auyeung KK, Woo PK, Law PC, Ko JK. *Astragalus saponins* modulate cell invasiveness and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma cells. *J Ethnopharmacol*. 2012 Jun 1;141(2):635-41.
64. Tragulpakseerojn J. Effect of *Moringa oleifera* leaves extract on molecular signaling in colon cancer cells. PhD [dissertation]. Nakorn Pathom, Thailand: Silpakorn University; 2016.
65. Pendleton CS. Mechanisms of cisplatin resistance in triple negative breast cancer [dissertation on the Internet]. [Tennessee (United State of America)]: University Vanderbilt; 2014 [cited 2016 Oct 11]. Available from: http://etd.library.vanderbilt.edu/available/etd-11242014-103854/unrestricted/Pendleton_Thesis.pdf
66. Yen HC, Nien CY, Majima HJ, Lee CP, Chen SY, Wei JS, See LC. Increase of lipid peroxidation by cisplatin in WI38 cells but not in SV40-transformed WI38 cells. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):39-46.
67. Yu DC, Waby JS, Chirakkal H, Staton CA, Corfe BM. Butyrate suppresses expression of neuropilin I in colorectal cell lines through inhibition of Sp1 transactivation. *Mol Cancer*. 2010 Oct 15;9:276. doi: 10.1186/1476-4598-9-276.
68. Hong TM, Chen YL, Wu YY, Yuan A, Chao YC, Chung YC, et al. Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 15;13(16):4759-68.

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติสืบเนื่องจากการประชุม

1. Tragulpakseerojn J, Pamonsilapatham P, Wetwitayaklung P, Nuntharatanapong N, Apirakaramwong A. The effect of *Moringa oleifera* ethanolic leaf extract and its 2 major active components on colon cancer cell viability. In: Peerapattana J, editor. NATPRO 6. Proceedings of the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty; 2016 Jan 21-23; Khon Kaen, Thailand. The Organizing and Scientific Committee of NATPRO6: Khon Kaen University; 2016. p. 266-9. (ค่าน้ำหนักตามเกณฑ์ สกอ. 2557 = 0.4)

ภาคผนวก

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. อวยพร อภิรักษ์อร่ามวง

Associate Professor Dr. Auayporn Apirakaramwong

1. สังกัดและสถานที่ทำงาน พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

โทรศัพท์ 0 3425 5800 โทรสาร 0 3425 5801

E-mail: apirakaramwong_a@su.ac.th

2. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา
2533	ตรี	ภ.บ. (เกียรตินิยม)	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2535	โท	วท.ม.	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยมหิดล
2542	เอก	Ph.D.	Pharmaceutical Sciences	Chiba university (Japan)

3. ผลงานวิชาการ / วิจัย

3.1 บทความวิจัยที่เผยแพร่ในวารสารวิชาการนานาชาติ (refereed journals)

1. Auayporn Apirakaramwong, Jun-ichi Fukuchi, Keiko Kashiwagi, Yoshimi Kakinuma, Emiko Ito, Akira Ishihama, Kazuei Igarashi. Enhancement of cell death due to decrease in Mg^{2+} uptake by OmpC (cation-selective porin) deficiency in ribosome modulation factor-deficient mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:482-487.
2. Auayporn Apirakaramwong, Keiko Kashiwagi, V. Samuel Raj, Kaori Sakata, Yoshimi Kakinuma, Akira Ishihama, Kazuei Igarashi. Involvement of ppGpp, ribosome modulation factor, and stationary phase-specific sigma factor, σ^S , in the decrease in cell viability caused by spermidine. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:643-647.
3. V. Samuel Raj, Hideyuki Tomitori, Madoka Yoshida, Auayporn Apirakaramwong, Keiko Kashiwagi, Koji Takio, Akira Ishihama, Kazuei Igarashi. Properties of a revertant of *Escherichia coli* viable in the presence of spermidine accumulation:

- increase in L-glycerol 3-phosphate. *J Bacteriol* 2001;183:4493-4498.
4. Wanlop Weecharangsan, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Theerasak Rojanarata, Auayporn Apirakaramwong. Chitosan lactate as a nonviral gene delivery vector in COS-1 Cells. *AAPS PharmSciTech* 2006;7: Article 66.
 5. Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Amornrut Chaidedgumjorn, Theerasak Rojanarata, Auayporn Apirakaramwong, Sasiprapha Phongying, Chantiga Choochottiros, Suwabun Chirachanchai. Incorporation of camptothecin into N-phthaloyl chitosan-g-mPEG self-assembly micellar system. *Eur J Pharm Biopharm* 2006;64:269-76.
 6. Praneet Opanasopit, Polawan Aumklad, Tanasait Ngawhiranpat, Auayporn Apirakaramwong, Theerasak Rojanarata, Satit Puttipipatkachorn. Effect of salt forms and molecular weight of chitosans on in vitro permeability enhancement in intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Dev Technol.* 2007;12(5):447-55. มี impact factor 0.816
 7. Praneet Opanasopit, Auayporn Apirakaramwong, Tanasait Ngawhirunpat, Theerasak Rojanarata, Uracha Ruktanonchai. Development and characterization of pectinate micro/nanoparticles for gene delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2008;9(1):67-74. มี impact factor 0.857
 8. Jariya Kowapradit, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhiranpat, Auayporn Apirakaramwong, Theerasak Rojanarata, Uracha Ruktanonchai and Warayuth Sajomsang. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan, a novel chitosan derivative, enhances paracellular permeability across intestinal epithelial cells (Caco-2) *AASP PharmSciTech.* 2008;9(4):1143-1152. มี impact factor 1.445.
 9. Wanlop Weecharangsan, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, Theerasak Rojanarata, Uracha Ruktanonchai, Robert J. Lee. Evaluation of chitosan salts as nonviral gene vectors in CHO-K1 Cells. *Int J Pharm.* 2008;348:161-168. มี impact factor 2.408
 10. Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, Auayporn Apirakaramwong, Tanasait Ngawhirunpat, Uracha Ruktanonchai. Nuclear localization signal peptides enhance transfection efficiency of chitosan/DNA complexes. *Int J Pharm.* 2009;382:291-295. มี impact factor 3.061
 11. Jariya Kowapradit, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, Theerasak Rojanarata, Uracha Ruktanonchai and Warayuth Sajomsang. In vitro permeability enhancement in intestinal epithelial cells (Caco-2) monolayer of water soluble quaternary ammonium chitosan derivatives. *AAPS PharmSciTech*, 2010;Jun;11(2):497-508. มี impact factor 1.19.
 12. Sunee Techaarpornkul, Sirirat Wongkupasert, Praneet Opanasopit,

- Auayporn Apirakaramwong, Jurairat Nunthanid, Uracha Ruktanonchai Chitosan-mediated siRNA delivery in vitro: Effect of polymer molecular weight, Concentration and salt forms. *AAPS PharmSciTech*, 2010; Mar;11(1):64-72. มี impact factor IF 1.19.
13. Praneet Opanasopit, Jintana Tragulpakseerode, Auayporn Apirakaramwong, Theerasak Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat. Chitosan enhances transfection efficiency of cationic polypeptides/DNA complexes. *Int J Pharm*. 2011;410:161-168.
 14. Jariya Kowapradit, Auayporn Apirakaramwong, Tanasait Ngawhirunpat, Theerasak Rojanarata, Warayuth Sajomsang, Praneet Opanasopit. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan coated liposomes for oral protein drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2012;47: 359-366.
 15. Paecharoenchai O, Niyomtham N, Apirakaramwong A, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Yingyongnarongkul BE, Opanasopit P. Structure relationship of cationic lipids on gene transfection mediated by cationic liposomes. *AAPS PharmSciTech*. 2012 Dec;13(4):1302-8.

3.2 บทความวิจัยที่เผยแพร่ในวารสารวิชาการในประเทศ

1. Auayporn Apirakaramwong, Nusara Piyapolrungrong. Effect of antimicrobial supplement on drug transport across Caco-2 cell monolayer. *Srinakarinwirot J Pharm Sci*. 2002;7:30-40.
2. Taweewan Inda, Auayporn Apirakaramwong , Chatchai Chinpaisal , Gaysorn Chansiri , Sindhchai Keokitichai. The employers' satisfaction of graduates from the Faculty of Pharmacy, Silpakorn University in the academic year of 2001-2002. *Srinakarinwirot J Pharm Sci*. 2005;10:191-200.
3. Auayporn Apirakaramwong, Jintana Tragulpakseeroj, Piyanuch Jongsamak, Nopparat Nuntharatanapong, Praneet Opanasopit. Effect of endocytosis inhibitors on gene transfection efficiency with chitosan/Poly-L-arginine/DNA complex in HeLa cells. *Thai J Pharma Sci (TJPS)*. 2016 Jun 2;40:155-8.

3.3 บทความ (proceedings) ที่เผยแพร่ในงานประชุมวิชาการนานาชาติและในประเทศ

1. Verayuth Lertnattee, Auayporn Apirakaramwong, Sinthop Chomya. THSearch: Thai-enable Herbal Search Engine. In: Zheng Zhou, editor. ISCIT 2005. *Proceedings of 5th International Symposium on Communication and Information Technology; 2005* Oct 12-14; Beijing, China; 2005. p.1052-1055.
2. Praneet Opanasopit, Maleenart Petchsangsa, Tanasait Ngawhirunpat, Theerasak Rojanarata, Auayporn Apirakaramwong, Uracha Ruktanonchai, Warayuth Sajomsang, Supawan Tantayanon. Development of a novel gene carrier using

- water soluble chitosan derivatives. *NSTDA Annual Conference* 28-30 March 2007; Thailand Science Park, Pathumthani, Thailand.
3. Praneet Opanasopit, Maleenart Petchsangsa, Tanasait Ngawhirunpat, Theerasak Rojanarata, Auayporn Apirakaramwong, Uracha Ruktanonchai, Warayuth Sajomsang, Supawan Tantayanon. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) Chitosan for a Novel Effective Gene Carrier. *34th Annual meeting of the controlled release society* July 7-11, 2007; Long Beach Convention Center, Long Beach, California, USA.
 4. Praneet Opanasopit, Sirirat Wongkupasert, Sunee Techaarpornkul, Auayporn Apirakaramwong, Jurairat Nunthanid. Chitosan-Mediated siRNA Delivery in Vitro: Effect of Polymer Molecular Weight and Salt Forms. *34th Annual meeting of the controlled release society* July 7-11, 2007; Long Beach Convention Center, Long Beach, California, USA.
 5. Sunee Techaarpornkul, Sirirat Wongkupasert Praneet Opanasopit,, Auayporn Apirakaramwong and Jurairat Nunthanid. Chitosan lactate as siRNA delivery in stable constitutive eGFP expression cells. *Proceeding of the Fifth Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences* November 21–24 , 2007 Siam City Hotel, Bangkok, Thailand
 6. Suchada Piriyaprasarth, Sunee Techaarpornkul, Praneet Opanasopit, Jurairat Nunthanid, Auayporn Apirakaramwong. In silico modeling of the evaluation of the chitosan derivatives for siRNA delivery into the cells by using artificial neural network method. *Proceeding of the Fifth Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences* November 21–24, 2007 Siam City Hotel, Bangkok, Thailand.
 7. Jariya Kowapradit, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, Theerasak Rojanarata, Uracha Ruktanonchai and Warayuth Sajomsang. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) Chitosan on Epithelial Permeability using Caco-2 Cells. *The 2nd Thailand Nanotechnology Conference (TNC) Nanomaterials for Health, Energy and Environment*.13-15 August 2008, Phuket Graceland Resort&Spa, Patong, Phuket, Thailand.
 8. Jintana Tragulpakseerode, Praneet Opanasopit, Auayporn Apirakaramwong, Uracha Ruktanonchai. Evaluation of cationic polypeptides and chitosan for gene delivery. *The 3rd Annual Research Conference in Silpakorn Research*. January 28-29, 2009, Nakornpathom, Thailand.
 9. Auayporn Apirakaramwong, Thawatchai Phaechamud, Toshi Toida, Kazuhiro Nishimura, and Kazuei Igarashi. Effect of areca nut extract and its main alkaloid, arecoline on acrolein treatment in FM3A cells: a preliminary study *Proceedings of NRCT-JSPS Core University Program on Natural Medicine in*

- Pharmaceutical Sciences the 9th Joint Seminar*; 2010 Dec 8-9; Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulaongkorn University, Bangkok, Thailand; 2010. p.157-158.
10. Auayporn Apirakaramwong, Perayot Pamonsinlapatham, Sunee Techaarpornkul, Praneet Opanasopit, Suwanee Panomsuk, Waraporn Soksawatmaekhin. Mechanisms of cellular uptake with chitosan/DNA complex in hepatoma cell line. *Advanced Materials Research* 2012;506:485-488.
 11. Orapan Paecharoenchai, N. Niyomtham, Auayporn Apirakaramwong, B. Yingyongnarongkul, and Praneet Opanasopit. Effect of Acyl Chain Length of Spermine Derivatives on Transfection Efficiency. *Advanced Materials Research* 2012;506:445-448.
 12. Jariya Kowapradit, Praneet Opanasopit, Teerasak Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, Warayuth Sajomsang. Application of methylated N-(4-N,N-dimethylaminocinnamyl) chitosan for oral protein drug deliver. *Advanced Materials Research* 2012;506:465-468.
 13. Perayot Pamonsinlapatham, Jintana Takulpaksaroj, Chavalit Sithisombut, Auayporn Apirakaramwong. In vitro anti-proliferative activities of *Moringa oleifera* L. extracts in HT29 human colon cancer cell line. *The 4th International Conference on Natural Products for Health and Beauty: (NATPRO4)*; 2012 November 28 -30; Chiang Mai Thailand.
 14. Siangjong L, Apirakaramwong A, Wetwitayaklung P. Effect of *Cissus quadrangularis*, *Pluchea indica* and *Clerodendrum serratum* extracts on expression of cyclooxygenase proteins. NATPRO 6. *Proceedings of the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6)*; 2016 Jan 21-23; Khon Kaen, Thailand; 2016. p.249-252.

3.4 บทคัดย่อ (abstracts) ที่เผยแพร่ในงานประชุมวิชาการนานาชาติและในประเทศ

1. Auayporn Apirakaramwong, Jun-ichi Fukuchi, Keiko Kashiwagi, Yoshimi Kakinuma, Emiko Ito, Akira Ishihama, Kazuei Igarashi. Decrease in cell viability in the *Escherichia coli* mutant lacking *rmf* and *ompC* genes. *Tokyo International Symposium on Polyamines*; 1996 Oct 22-25; Tokyo, Japan.
2. Auayporn Apirakaramwong, Nusara Piyapolrunroj. Effect of antimicrobial supplement on Caco-2 cells. *The 19th Annual Research Meeting in Pharmaceutical Sciences*, Chulalongkorn University; 2002 Dec 4; Bangkok, Thailand.
3. Nusara Piyapolrunroj, Auayporn Apirakaramwong. Effect of antimicrobial supplement on drug transport across Caco-2 monolayers. *The 2nd Pharmaceutical Sciences World Congress*; 2004 May 29 -June 3; Kyoto, Japan.

4. Walop Weecharangsan, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong. Chitosan lactate as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. *The 2nd AASP Symposium & 2nd APEM Conference*; 2005 Nov 14-17; Bangkok, Thailand.
5. Praneet Opanasopit, Porawan Aumklad, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, Sathit Puttipipatkachorn. Effect of molecular weight and salt forms of chitosan on epithelial permeability using Caco-2 cells. *The 5th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*; 2006 Mar 27-30; Geneva, Switzerland.
6. Verayuth Lertnattee, Jeerapan Iamkhan, Pattama Fongjirakittikul, Wichitra Tansatien, Aram Chochon, Maimun Halee, Auayporn Apirakaramwong. Evaluation of Herbal Websites Using Website Structure. *The US-Thai Consortium Conferences and Meeting*; 2007 Jan 6-9; Bangkok, Thailand.
7. Praneet Opanasopit, Maleenart Petchsangai, Tanasait Ngawhirunpat, Theerasak Rojanarata, Auayporn Apirakaramwong, Uracha Ruktanonchai, Warayuth Sajomsang, Supawan Tantayanon. Development of a novel gene carrier using water soluble chitosan derivatives. *NSTDA Annual Conference* 28-30 March 2007; Thailand Science Park, Pathumthani, Thailand.
8. Maleenart Petchsangai, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Theerasak Rojanarata, Auayporn Apirakaramwong, Uracha Ruktanonchai, Warayuth Sajomsang, Supawan Tantayanon. Development of a novel gene delivery carrier using methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosans. *การประชุมเสนอผลงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2549 (ครั้งที่ 23) และ JSPS 1st Medicinal chemistry seminar of Asia/Africa scientific program* ในระหว่างวันที่ 14-15 ธันวาคม 2549 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
9. Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, Theerasak Rojanarata, Manee Luangtana-anan, Suwannee Panomsuk. Development of gene delivery systems using pectin nanoparticles. *การประชุมเสนอผลงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2549 (ครั้งที่ 23) และ JSPS 1st Medicinal chemistry seminar of Asia/Africa scientific program* ในระหว่างวันที่ 14-15 ธันวาคม 2549 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
10. Sirirat Wongkupasert, Sunee Techaarpornkul, Auayporn Apirakaramwong, Praneet Opanasopit, Jurairat Nunthanid. Characterization of lipofectamine and polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro. *การประชุมเสนอผลงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2549 (ครั้งที่ 23) และ JSPS 1st Medicinal chemistry seminar of Asia/Africa scientific program* ในระหว่างวันที่ 14-15 ธันวาคม 2549 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. Wanlop Weecharangsan, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, Uracha Ruktanonchai, and Robert J. Lee. An Investigation of Chitosan Salts as Nonviral Gene Vectors in CHO-K1 Cells. *The 2007 US-Thai consortium conference and meeting*, 6-9 January, Bangkok, Thailand.
12. Praneet Opanasopit, Maleenart Petchsangsa, Tanasait Ngawhirunpat, Theerasak Rojanarata, Auayporn Apirakaramwong, Uracha Ruktanonchai, Warayuth Sajomsang, Supawan Tantayanon. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) Chitosan for a Novel Effective Gene Carrier. *34th Annual meeting of the controlled release society*; 2007 July 7-11; Long Beach Convention Center, Long Beach, California, USA.
13. Praneet Opanasopit, Sirirat Wongkupasert, Sunee Techaarpornkul, Auayporn Apirakaramwong, Jurairat Nunthanid. Chitosan-Mediated siRNA Delivery in Vitro: Effect of Polymer Molecular Weight and Salt Forms. *34th Annual meeting of the controlled release society*; 2007 July 7-11; Long Beach Convention Center, Long Beach, California, USA.
14. Praneet Opanasopit, Sunee Techaarpornkul, Sirirat Wongkupasert, Auayporn Apirakaramwong, Jurairat Nunthanid and Mitsuru Hashida. Galactosylated chitosan for siRNA delivery in stable constitutive eGFP-HepG2 cells. *3rd Asian association of Schools of pharmacy (AASP) conference* October 25-28 2007 at the Renaissance Makati City Hotel, Makati City, Philippines.
15. Maleenart Petchsangsa, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Theerasak Rojanarata, Auayporn Apirakaramwong, Uracha Ruktanonchai, Warayuth Sajomsang. Development of a novel gene carrier using methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) Chitosan. *APAI, Innovation in drug delivery from biomaterial devices*. 30 September-3 October 2007; Naples, Italy.
16. Praneet Opanasopit, Jariya Kowapradit, Auayporn Apirakaramwong, Tanasait Ngawhirunpat, Theerasak Rojanarata, Uracha Ruktanonchai and Warayuth Sajomsang. 3-chloro-2-hydroxypropyl trimethylammonium chitosan on epithelial permeability using Caco-2 cells. *การประชุมเสนอผลงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2550 (ครั้งที่ 24) ในระหว่างวันที่ 11-12 ธันวาคม 2550 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*.
17. Praneet Opanasopit, Jariya Kowapradit, Auayporn Apirakaramwong, Tanasait Ngawhirunpat, Theerasak Rojanarata, Uracha Ruktanonchai and Warayuth Sajomsang. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan enhanced epithelial permeability. *Experimental Biology 2008 Today's Research: Tomorrow's Health*, 5-9 April 2008 at San Diego Convention Center, San Diego, California, USA.

18. Theerasak Rojanarata, Praneet Opanasopit, Auayporn Apirakaramwong, Tanasait Ngawhiranpat, Uracha Ruktanonchai. Nuclear localization signal peptides enhance transfection efficiency of chitosan/DNA complexes delivery. *Experimental Biology 2008 Today's Research: Tomorrow's Health*, 5-9 April 2008 at San Diego Convention Center, San Diego, California, USA.
19. Suchada Piriyaprasarth, Sunee Techaarpornkul, Praneet Opanasopit, Jurairat Nunthanid, Auayporn Apirakaramwong. QSPR analysis on siRNA-delivery properties of chitosan derivatives by using artificial neural network. *Proceeding of The 22nd Congress of Federation of Asian Pharmaceutical Associations (FAPA) 2008* Singapore.
20. Jariya Kowapradit, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, Theerasak Rojanarata, Uracha Ruktanonchai and Warayuth Sajomsang. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) Chitosan on Epithelial Permeability using Caco-2 Cells. *ในงานการประชุมเสนอผลงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ประจำปี 2551 (ครั้งที่ 25) ในวันที่ 2 ธันวาคม 2551 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*
21. Jariya Kowapradit, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, Uracha Ruktanonchai and Warayuth Sajomsang. Permeation Enhancing Effect Of Methylated N-(4-N,N-Dimethyl Aminobenzyl) Chitosan-Coated Liposomes. *The 17th International Symposium on Microencapsulation* Sep 29 - Oct 1 2009 at the Nagoya International Congress Center, Japan.
22. Jintana Tragulpakseerode, Auayporn Apirakaramwong, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Theerasak Rojanarata, Uracha Ruktanonchai. Self-assembling poly-L-arginine/chitosan/DNA complexes as a novel gene carrier. *26th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences*, 4 December 2009 at Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
23. Jariya Kowapradit, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, Uracha Ruktanonchai and Warayuth Sajomsang. Permeation Enhancing Effect of Methylated N-(4-N,N-Dimethyl Aminobenzyl) Chitosan-Coated Liposomes. *26th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences*, 4 December 2009 at Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
24. Jintana Tragulpakseerode, Praneet Opanasopit, Auayporn Apirakaramwong, Tanasait Ngawhirunpat, Theerasak Rojanarata, Uracha Ruktanonchai. Liposome coated with cationic polymers and its potential use in gene delivery. *1st Current Drug Development International Conference*. May 6-8, 2010 Woraburi Phuket

Resort & Spa, Phuket, Thailand.

25. Auayporn Apirakaramwong, Praneet Opanasopit, Panomsuk Suwannee, Waraporn Soksawatmaekhin, and Perayot Pamonsinlapatham. Cytotoxicity Evaluation of Six Endocytic Inhibitors by MTT Assay on Human Cervical Carcinoma Cell Lines (HeLa cells). Abstract No. 664-P1A033 p. 156. **23rd Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress (FAPA 2010)**, 5-18 November 2010; Taipei International Convention Center (TICC). Taiwan.
26. Boonsuchin Chatpitun, Auayporn Apirakaramwong. Utilization of cefoperazone/sulbactam injection at Banpong general hospital. Abstract No. 663-P1C119 p. 156. **23rd Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress (FAPA 2010)**, 5-18 November 2010; Taipei International Convention Center (TICC). Taiwan.

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรยศ ภูมิศิลป์ธรรม

Assist. Prof. Dr. Perayot Pamonsinlapatham

1. สังกัดและสถานที่ทำงาน พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาสารสนเทศศาสตร์ทางสุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

โทรศัพท์ 0 3425 5800 โทรสาร 0 3425 5801

E-mail: pamonsinlapatham_p@su.ac.th

2. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ การศึกษา	ระดับ ปริญญา	อักษรย่อ ปริญญา	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา
2541	ตรี	ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยนเรศวร
2548	โท	ภ.ม.	เภสัชศาสตร์ชีวภาพ	มหาวิทยาลัยศิลปากร
2551	เอก	Ph.D.	Biomedical and Pharmaceutical Sciences	University Rene Descartes (U. Paris V), (France)

3. ผลงานวิชาการ / วิจัย

3.1 บทความวิจัยที่เผยแพร่ในวารสารวิชาการนานาชาติ (refereed journals)

1. **Pamonsinlapatham P**, Hadj-Slimane R, Raynaud F, Bickle M, Corneloup C, Barthelaix A, Lepelletier Y, Mercier P, Schapira M, Samson J, Mathieu AL, Hugo N, Moncorgé O, Mikaelian I, Dufour S, Garbay C, Colas P. A RasGAP SH3 peptide aptamer inhibits RasGAP-Aurora interaction and induces caspase-independent tumor cell death. PLoS ONE. 2008 Aug 6; 3(8):e2902.
2. **Pamonsinlapatham P**, Gril B, Dufour S, Hadj-Slimane R, Gigoux V, Pethe S, L'hoste S, Camonis J, Garbay C, Raynaud F, Vidal M. Capns1, a new binding partner of RasGAP-SH3 domain in K-Ras(V12) oncogenic cells: Modulation of cell survival and migration. Cell Signal. 2008 Aug 13.
3. **Pamonsinlapatham P**, Hadj-Slimane R, Lepelletier Y, Allain B, Toccafondi M, Garbay C, Raynaud F. P120-Ras GTPase activating protein (RasGAP): a multi-interacting protein in downstream signaling. Biochimie. 2009 Mar 91(3): 320-8.
4. Dourlat J, Liu WQ, Sancier F, Edmonds T, **Pamonsinlapatham P**, Cruzalegui F, Garbay C. A novel non-phosphorylated potential antitumoral peptide inhibits STAT3 biological activity. Biochimie. 2009 Aug; 91(8): 996-1002. Epub 2009 May 24.

5. Hadj-Slimane R, **Pamonsinlapatham P**, Herbeuval JP, Garbay C, Lepelletier Y, Raynaud F. RasV12 induces Survivin/AuroraB pathway conferring tumor cell apoptosis resistance. *Cell Signal*. 2010 Aug;22(8):1214-21.
6. Allain B, Jarray R, Borriello L, Leforban B, Dufour S, Liu WQ, **Pamonsinlapatham P**, Bianco S, Larghero J, Hadj-Slimane R, Garbay C, Raynaud F, Lepelletier Y. Neuropilin-1 regulates a new VEGF-induced gene, Phactr-1, which controls tubulogenesis and modulates lamellipodial dynamics in human endothelial cells. *Cell Signal*. 2012.
7. Satiraphan M, **Pamonsinlapatham P**, Sotanaphun U, Sittisombut C, Raynaud F, Garbay C, Michel S, Cachet X. Lupane triterpenes from the leaves of the tropical rain forest tree *Hopea odorata* Roxb. and their cytotoxic activities. *Biochemical Systematics and Ecology* 2012 Volume 44: 407–412.

3.2 บทความวิชาการและบทความวิจัยที่เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับชาติ (refereed journals)

1. Pamonsinlapatham P. Mucosal Immunity and Vaccine Development. *Journal of Health Science* 2003; 12: 635-44.
2. Pamonsinlapatham P and Pengrungrangwong K. Mother to Child HIV transmission. *Thai Journal of Hospital Pharmacy (TJHP)* 2003; 2: 142-49
3. Sithisombat C and Pamonsinlapatham P. Calanolide A and its derivative for anti-HIV. *Silpakorn University Journal* 2004; 23 (2): 36-55.
4. Pamonsinlapatham P and Pengrungrangwong K. Vaccine Development for Group A *Streptococcus pyogenes* (GAS) Infection. *Journal of Health Science* 2006; 15: 163-175.
5. Pamonsinlapatham P and Intralapairoj T. Targeting the Epidermal growth factor receptors (EGFR) pathway for cancer therapy. *PharmaTime* 2007; (8) 110: 5-15.
6. Pamonsinlapatham P and Intralapairoj T. Cancer Vaccine. *PharmaTime* 2008; (8) 115: 5-16.
7. Pamonsinlapatham P, Pamonsinlapatham K, Thangwirai W. Limitation of anti-HIV drug and new drug development. *Thai Journal of Hospital Pharmacy (TJHP)* 2009; 19(3): 247-259.
8. Pamonsinlapatham P. Focal adhesion kinase (FAK): a new target in cancer therapy *Thai Journal of Pharmacy* 2010; (5) Jan-Dec: 139-150.

3.3 บทความ (proceedings) ที่เผยแพร่ในงานประชุมวิชาการนานาชาติและในประเทศ

1. Auayporn Apirakaramwong, Perayot Pamonsinlapatham, Sunee Techaarpornkul, Praneet Opanasopit, Suwanee Panomsuk, Waraporn Soksawatmaekhin. Mechanisms of cellular uptake with chitosan/DNA complex in hepatoma cell line. *Advanced Materials Research* (2012); 506: 485-488.

3.4 บทความย่อ (abstracts) ที่เผยแพร่ในงานประชุมวิชาการนานาชาติและในประเทศ

1. Auayporn Apirakaramwong, Praneet Opanasopit, Panomsuk Suwannee, Waraporn Soksawatmaekhin, and Perayot Pamonsinlapatham. Cytotoxicity Evaluation of Six Endocytic Inhibitors by MTT Assay on Human Cervical Carcinoma Cell Lines (HeLa cells). Abstract No. 664-P1A033 p. 156. *23rd Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress (FAPA 2010)*, 5-18 November 2010; Taipei International Convention Center (TICC). Taiwan.

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญพรรณ เวชวิทยาคลัง

Associate Professor Dr. Penpun Wetwitayaklung

1. สังกัดและสถานที่ทำงาน พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

โทรศัพท์ 0 3425 5800 โทรสาร 0 3425 5801

E-mail: wetwitayaklung_p@su.ac.th

2. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ การศึกษา	ระดับ ปริญญา	อักษรย่อ ปริญญา	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา
2534	ตรี	ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยมหิดล
2537	โท	ภ.ม.	เภสัชศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2544	เอก	Ph.D.	Pharmaceutical Chemistry	University of Vienna (Austria)

3. ผลงานวิชาการ / วิจัย

3.1 บทความวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารและนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ

1. Wetwitayaklung P, Limmatvapirat C, Phaechamud T. Antioxidant and anticholinesterase activities in various parts of *Sonneratia caseolaris* (L.). Indian J Pharm Sci. 2013 Nov;75(6):649-56.
2. Jabeen I, Wetwitayaklung P, Chiba P, Pastor M, Ecker GF. 2D- and 3D-QSAR studies of a series of benzopyranes and benzopyrano[3,4-b][1,4]-oxazines as inhibitors of the multidrug transporter P-glycoprotein. J Comput Aided Mol Des. 2013 Feb;27(2):161-71.
3. Phaechamud T, Yodkhum K, Limmatvapirat C, Wetwitayaklung P. Morphology, thermal and antioxidative properties of water extracts from *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. prepared with freeze drying and spray drying. Res J Pharm Biol Chem Sci. 2012;3(1):725-39.
4. Jabeen I, Wetwitayaklung P, Klepsch F, Parveen Z, Chiba P, Ecker GF. Probing the stereoselectivity of P-glycoprotein-synthesis, biological activity and ligand docking studies of a set of enantiopure benzopyrano[3,4-b][1,4]oxazines. Chem Commun (Camb). 2011 Mar 7;47(9):2586-8.
5. Wetwitayaklung P, Phaechamud T. Antioxidant activities and phenolic content of *Solanum* and *Capsicum* sp. Res J Pharm Biol Chem Sci. 2011 Apr;2(2):146-54.
6. Wetwitayaklung P, Yamrote T, Phunttumamat N, Kaewnuan N, Makchumnum P. A Determination of the antioxidant activity of proanthocyanidin of Thai cultivated grape

- seed, L-ascorbic Acid, and trolox by means of FRAP Assay. Bulletin of the Department of Medical Sciences 2011 Feb 2;50(1):24-34.
7. Thavanapong N, Wetwitayaklung P, Charoenteeraboon J. Comparison of essential oils compositions of *Citrus maxima* Merr. peel obtained by cold press and vacuum steam distillation methods and of its peel and flower extract obtained by supercritical carbon dioxide extraction method and their antimicrobial activity. Journal of Essential Oil Research. 2010 Jan 1;22(1):71-7.
 8. Samten, Wetwitayaklung P, Kitcharoen N, Sotanaphun U. TLC image analysis for determination of the piperine content of the traditional medicinal preparations of Bhutan. Acta Chromatographica. 2010 Jun 1;22(2):227-36.
 9. Wetwitayaklung P, Thavanapong N, Charoenteeraboon J. Chemical constituents and antimicrobial activity of essential oil and extracts of heartwood of *Aquilaria crassna* obtained from water distillation and supercritical fluid carbon dioxide extraction. Silpakorn University Science and Technology Journal. 2009;3(1):25-33.
 10. Wetwitayaklung P, Sarunyakasitharin K, Phaechamud T. Total phenolic content and antioxidant activity of fresh and preserved fruits of *Ellaeocarpus hygrophilus* Kurz. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal 2009 Jan 3;4(1):21-8.
 11. Wetwitayaklung P, Phaechamud T, Limmatvapirat C, Keokitichai S. The study of antioxidant activities of edible flower extracts. In International Workshop on Medicinal and Aromatic Plants 786 2007 Jan 15 (pp. 185-192).
 12. Wetwitayaklung P, Limmatvapirat C, Phaechamud T, Keokitichai S. Kinetics of Acetylcholinesterase inhibition of *Quisqualis indica* Linn flower extract. Silpakorn University Science and Technology Journal. 2007;1(2):20-8.
 13. Wessapan C, Charoenteeraboon J, Wetwitayaklung P, Limmatvapirat C, Phaechamud T. Antimicrobial activity of some edible flowers in Thailand. Planta Medica. 2007;73(09):P_201.
 14. Charoenteeraboon J, Wetwitayaklung P, Limmatvapirat C, Phaechamud T. Hepatoprotective activity from various parts of *Sonneratia caseolaris*. Planta Medica. 2007;73(09):P_561.
 15. Wetwitayaklung P, Phaechamud T, Keokitichai S. Antioxidant activities of several Chinese medicine herbs. Food Chemistry. 2005;88:347-50.
 16. Wetwitayaklung P, Phaechamud T, Keokitichai S. The antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* L. heartwood in various ages, Naresuan University Journal 2005; 13 (2): 43-52.
 17. SripHong L, Sotanaphun U, Limsirichaikul S, Wetwitayaklung P, Chaichantipyuth C, Pummangura S. Cytotoxic alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. Planta Med. 2003 Nov;69(11):1054-6.

ผู้ร่วมวิจัย

อาจารย์ ดร. นพรัตน์ นันท์รัตนพงศ์

Dr. Nopparat Nuntharatanapong

1. สังกัดและสถานที่ทำงาน พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

โทรศัพท์ 0 3425 5800 โทรสาร 0 3425 5801

E-mail:nantharatanapong_n@su.ac.th

2. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ การศึกษา	ระดับ ปริญญา	อักษรย่อ ปริญญา	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา
2536	ตรี	ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยศิลปากร
2539	โท	วท.ม	เภสัชวิทยา	มหาวิทยาลัยมหิดล
2548	เอก	Ph.D.	Biopharmaceutical Sciences	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลงานวิชาการ / วิจัย

3.1 บทความวิจัยที่เผยแพร่ในวารสารวิชาการนานาชาติ (refereed journals) และงานประชุมวิชาการนานาชาติและในประเทศ

1. Phornchirasilp S., Thitiwatanakarn N. Effects of pravastatin on rat hepatic microsomal and peroxisomal enzymes activity. The 12th Annual Conferences in Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, 6 December, 1995, Bangkok, Thailand.
2. Nuntharatanapong N., Suramana T, Chaemthavorn S, Zapuang K, Ritta E, Semathong S, Chuamorn S, Niyomwan V, Dusitsin N, Lohinavy O, Sinhaseni P. Increase in tumour necrosis factor-alpha and a change in the lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in plasma of workers exposed to aflatoxin-contaminated feeds Arh Hig Rada Toksikol 2001;52:291-8.
3. Sinhaseni P, Niyomwan V, Tansaringkarn K, Chaemthavorn S, Zapung K, Semathong S, Chaya W, Suramana T, Nuntharatanapong N., Posayanonda T, Ritta E, Panthong A, Bureekul T, Dusitsin N, Public participation for Health Promotion: A case study of Map Ta Phut Industrial Estate Annual Conference in King Prajadhipok's Institute (KPI) congress II. 2-4 March 2001, Chonburi, Thailand.
4. Suramana T, Murray JM, Hu K, Posayanonda T, Nuntharatanapong N., Sindhuphak R, Dusitsin N and Sinhaseni P. Tyrosine and serine/threonine kinase inhibitors can block sodium arsenite induced disruption of the actin cytoskeleton and focal adhesion. The 41th Annual Meeting of Society of Toxicology (SOT), March 17-21, 2002 Nashville,

Tennessee, USA.

5. Posayanonda T, Suramana T, Nuntharatanapong N, Lohitnavy O, Snowden R, Schwable W, Dusitsin N, Sindhupak R, Sinhaseni P. Effects of methomyl on spleens and apoptosis. XIth dysfunction & 2nd Misrahi Symposium on Neurobiology Symposium on Cholinergic mechanisms function and International, 5-9 May, 2002, St. Moritz, Switzerland.
6. Sindhupak R, Sinhaseni P, Posayanonda T, Nuntharatanapong N, Chichareon, Wilawan K, Onthum Y, Dusitsin N. FTIR pattern shifts detected in B-lymphocytes and cervical cancer cells. 10th World Congress on the Menopause, 10-14 June, 2002, Berlin, Germany.
7. Suramana T, Murray JM, Hu K, Posayanonda T, Nuntharatanapong N, Sindhupak R, Dusitsin N and Sinhaseni P. Actin cytoskeleton and focal adhesion disruption induced by sodium arsenite. 18th UICC International Cancer Congress, 30 June-5 July 2002, Oslo, Norway.
8. Nuntharatanapong N, Chen K, Sinhaseni P, Keaney JF Jr. EGF receptor-dependent JNK activation is involved in arsenite-induced p21Cip1/Waf1 upregulation and endothelial apoptosis. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Jul;289(1):H99-H107.