บทที่ 1
บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันแนวโน้มการใช้สมุนไพรและยาจากสมุนไพร ได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น มีข้อมูลการศึกษาและทดลองใช้ที่เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การใช้สมุนไพร ยังมีการใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก การใช้สมุนไพรในประเทศไทยจัดเป็นหนึ่งในการแพทย์ทางเลือก (alternative medicine) ที่ประชาชนสามารถเลือกใช้ควบคู่ไปกับการรักษาแผนปัจจุบัน เนื่องจากการใช้สมุนไพรในประเทศไทยและแถบโลกตะวันออก มีประวัติและบันทึกถึงการใช้สมุนไพรมาอย่างยาวนานและมีข้อมูลที่น่าเชื่อถือว่ามีความปลอดภัยระดับหนึ่ง สมุนไพรในต่างประเทศหลายชนิดได้มีการนำมาศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องและได้รับยอมรับในการรักษาและป้องกันโรคต่างๆ จนได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นยา เช่น ยา paclitaxel (Taxol®) ซึ่งเป็นสกัดจากเปลือกต้น Pacific yew tree (*Taxus brevifolia*) ออกฤทธิ์เป็น mitotic inhibitor ยับยั้งการแบ่งเซลล์ในระยะไมโตซิส (mitosis) ของวงจรการแบ่งเซลล์ โดยยับยั้งเอนไซม์ในการสังเคราะห์โปรตีนในการแบ่งเซลล์ ขณะที่เกิดการแบ่งตัว ส่งผลให้สามารถทำลายเซลล์ได้ในทุกระยะของวงจรแบ่งเซลล์ สามารถใช้เป็นยารักษามะเร็ง

ประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ รวมทั้งมีสมุนไพรนานาชนิด แม้มีการศึกษาการใช้สมุนไพรมาตั้งแต่สมัยโบราณจนกระทั่งปัจจุบัน แต่ยังขาดการศึกษาค้นคว้ากลไกการออกฤทธิ์ของสมุนไพรในเชิงลึกหรือระดับโมเลกุล ซึ่งจะช่วยอธิบายฤทธิ์และประสิทธิภาพของสมุนไพรในการรักษาหรือบำบัดอาการของโรคได้ดียิ่งขึ้น

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

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

หากขาดการสร้างหลอดเลือดใหม่ก้อนเนื้องอกจะไม่สามารถโตได้เกินกว่าขนาด 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 มีทั้งเป็นโปรตีนที่อยู่ที่เมมเบรนและอยู่ภายในเซลล์ 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 มีการวางเป้าหมายของการรักษามะเร็งไว้ที่การลดการสร้าง VEGF[6] ทั้ง VEGF-Aและ VEGF-B แม้ว่ามีรายงานเกี่ยวกับ VEGF-B น้อยกว่าแต่พบว่ามะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีน VEGF-B[9] จำนวนมากมีความเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็ง มีนอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของ neuropilin-1 จะส่งผลเพิ่มการยับยั้งการเจริญของมะเร็งได้[8,11]

มะรุม (*Moringa oleifera* Lam) เป็นพืชในตระกูล Moringaceae มีชื่อสามัญในภาษาอังกฤษว่า drumstick tree หรือ horse radish tree เป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ในใบมีส่วนประกอบเป็นโปรตีน 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]

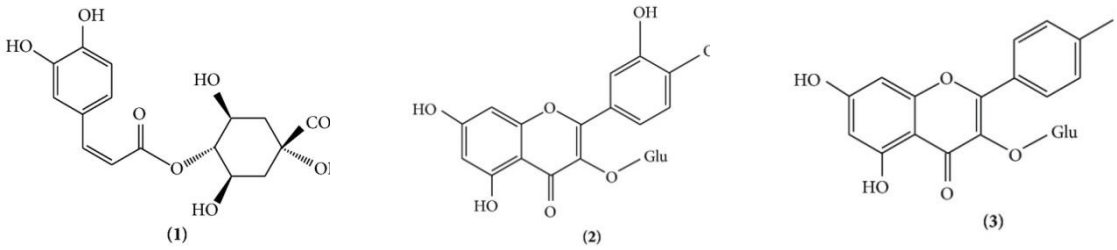
การใช้มะรุมเป็นอาหาร และใช้ในตำรับยาสมุนไพรมีมานาน มีการใช้ในหลายประเทศ สำหรับการศึกษาความเป็นพิษของมะรุมพบว่ามีไม่มาก อาจเนื่องด้วยมะรุมจัดเป็นพืชที่ใช้เป็นอาหาร เมื่อเร็ว ๆ นี้ Awodele O. และคณะ[18] ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดด้วยน้ำจากใบมะรุมในหนู Wistar albino mice และ albino rats เพื่อศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน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

ในด้านการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของมะรุม พบว่ามีผู้สนใจศึกษาจำนวนมาก ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาการใช้สารสกัดด้วยน้ำจากใบมะรุมมาทดสอบในเซลล์ 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]

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

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



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

Astragalin หรืออีกชื่อหนึ่งคือ kaempferol 3-β-D-glucopyranoside เป็นสารที่พบมากในสมุนไพรจีนคือ *Astragalus membranaceus* Bge. มีรายงานว่าเป็นสารที่ช่วยต้านการอักเสบ 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 ที่มีต่อเซลล์มะเร็งโดยเฉพาะการออกฤทธิ์ผ่านกระบวน การสร้างหลอดเลือดใหม่ อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ทดลองในหนู Sprague-Dawley rats ที่เหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานแล้วฉีด chlorogenic acid เข้าช่องท้องหนู พบว่า chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid) ลดการสร้างโปรตีน VEGF ได้[30] นอกจากนี้ยังพบว่าหนูถูกเหนี่ยวนำให้เกิด liver fibrosis ด้วย CCl_4 เมื่อได้รับ chlorogenic acid อาการของตับที่อักเสบลดลงพร้อมกับมีโปรตีน VEGF และ mediater 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

จะเห็นได้ว่าสารสำคัญที่แยกได้จากใบมะรุม 3 ตัว ได้แก่ astragalin, crypto-chlorogenic acid และ isoquercetin (เรียงตามปริมาณสารสำคัญที่แยกได้จากมากไปน้อย) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบ และมีความเป็นไปได้ที่จะเกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะรุม เปรียบเทียบกับสารสำคัญในใบมะรุมอย่างน้อย 2 ชนิด ต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF น่าจะเป็นประโยชน์และช่วยอธิบายกลไกส่วนหนึ่งของมะรุมออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งได้ซึ่งคณะผู้วิจัยสนใจศึกษาสารสกัดจากมะรุม และสารสำคัญที่พบคือ astragalin และ crypto-chlorogenic acid เนื่องจากเป็นสารที่พบมากในใบมะรุม และมีรายงานเกี่ยวกับสารทั้งสองยังไม่มาก เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถทำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

วัตถุประสงค์การวิจัย

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

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	=	*Moringa oleifera* leaves
PBS	=	phosphate buffered saline

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