

### 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

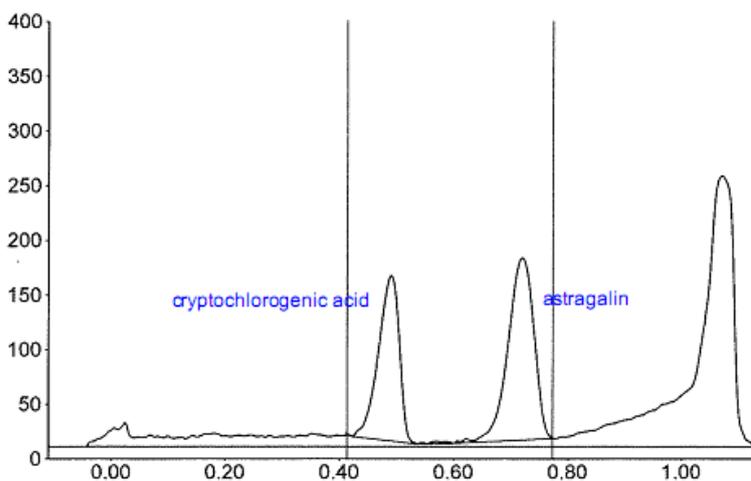
น้ำหนักสารสกัดหยาบ 32.1026 g

คิดเป็น % yield ของสารสกัด = 32.10%

##### 2. การสร้างกราฟมาตรฐานของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid

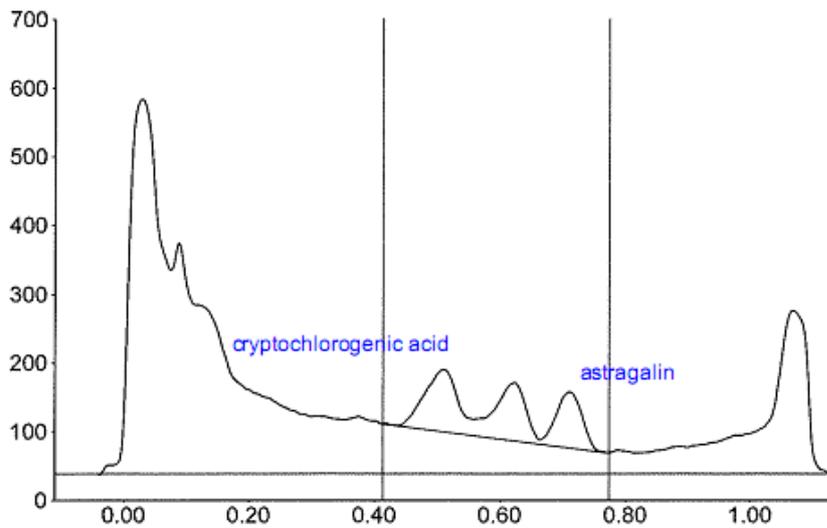
จาก TLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน astragalin และ crypto-chlorogenic acid พบว่า astragalin มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.71-0.73 และ crypto-chlorogenic acid มีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.49-0.51 โดย TLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน astragalin และ crypto-chlorogenic acid แสดงได้ดังรูปที่ 3 และ TLC chromatogram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

ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ Vongsak และคณะ, 2013<sup>(24)</sup> 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)



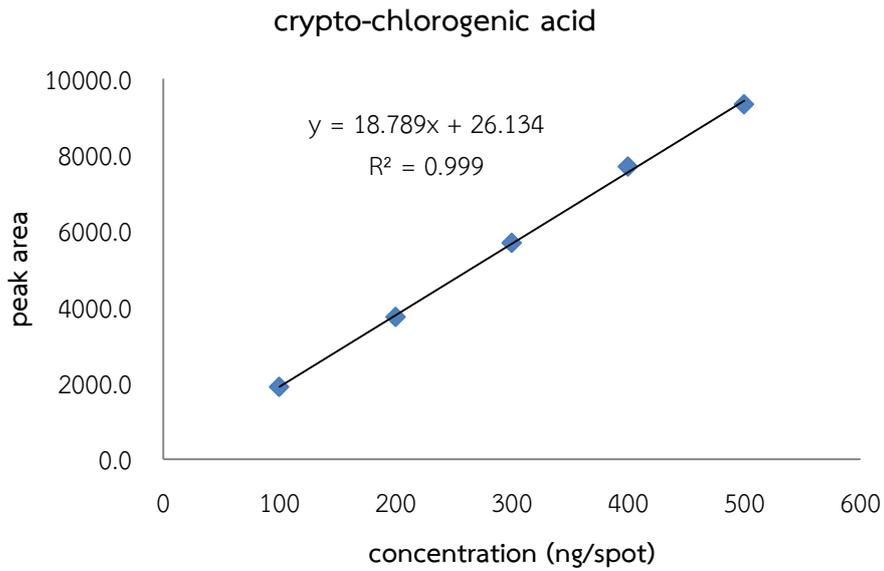
รูปที่ 4 TLC chromatogram ของสารสกัดใบมะรุม

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)

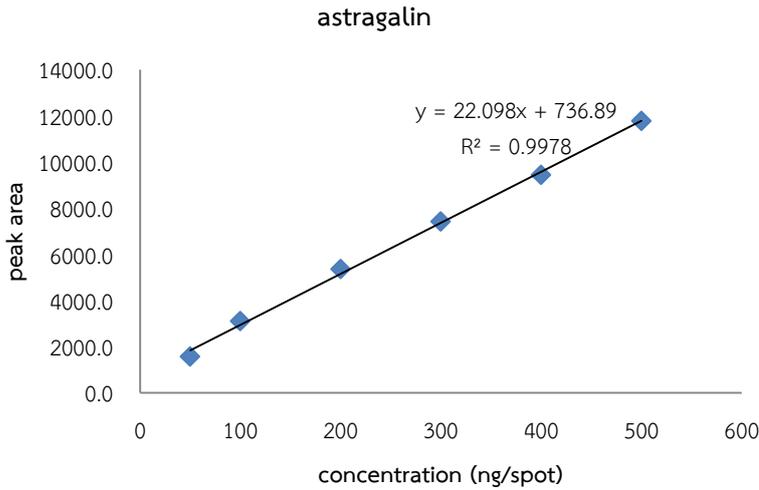


รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของ crypto-chlorogenic acid

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<sup>(24)</sup> แต่ยังคงอยู่ในระดับปริมาณที่ถือว่าสูง

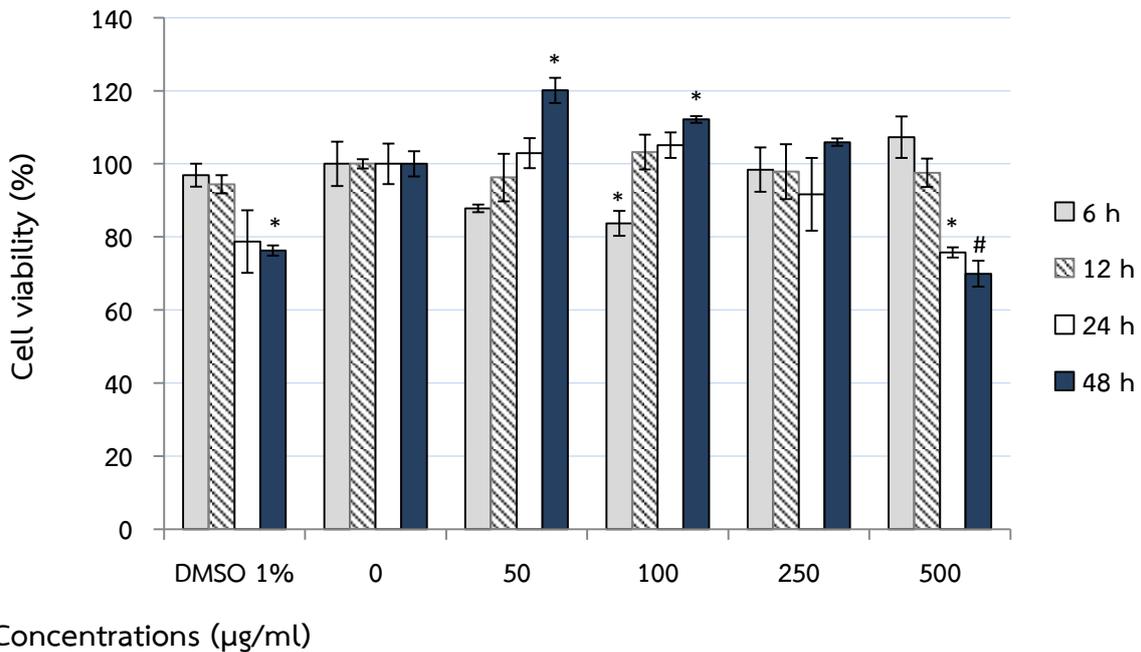
## ตอนที่ 2: การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโสมมารูม, astragalins และ crypto-chlorogenic acid ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells) ด้วย MTT assay

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<sup>(41)</sup>

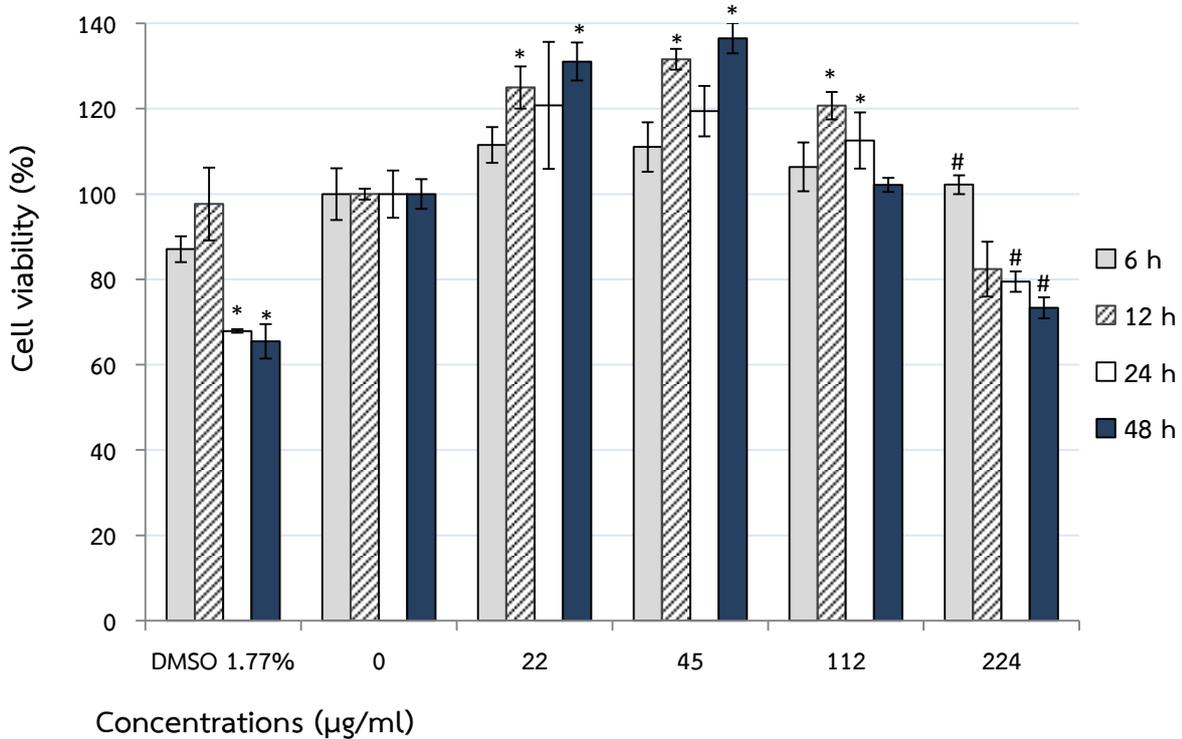
เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ หรือ % relative cell viability ของ HT29 cells เมื่อเติมสารสกัดจากโสมมารูม สารมาตรฐาน astragalins และ crypto-chlorogenic acid ในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 6 h, 12 h, 24 h และ 48 h เปรียบเทียบกับตัวทำละลาย 1, 1.77, 2.2% DMSO แสดงในรูปที่ 7-9



**รูปที่ 7** เปอร์เซนต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells เมื่อเติมสารสกัดจากใบมะรุมในความเข้มข้น 0-500 µg/ml เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 h โดยเปรียบเทียบกับ DMSO 1% (กราฟแสดง means ± S.D. ของ triplicate experiments (\*,  $p < 0.05$  โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติมสารสกัดจากใบมะรุมหรือ DMSO 1% กับเซลล์ที่ไม่เติมสารใด ๆ และ #,  $p < 0.05$  โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติมสารสกัดจากใบมะรุม 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<sup>(42)</sup> นอกจากนี้มีรายงานที่ใช้สารสกัดจากใบมะรุมด้วยน้ำ ด้วยทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน บ่มเป็นเวลา 48 h ใน KB cells แต่ความเข้มข้นสูงสุดที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ KB cells ได้ประมาณ 60% อยู่ที่ 200 µg/ml<sup>(20)</sup> 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** เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells เมื่อเติมสารมาตรฐาน astragalin ในความเข้มข้น 0-224 µg/ml เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 h (กราฟแสดง means ± S.D. ของ triplicate experiments (\*,  $p < 0.05$  โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติม astragalin หรือ DMSO 1.77% กับเซลล์ที่ไม่เติมสารใด ๆ และ #,  $p < 0.05$  โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ของเซลล์ที่เติม astragalin 224 µg/ml กับเซลล์ที่เติม DMSO 1.77%)

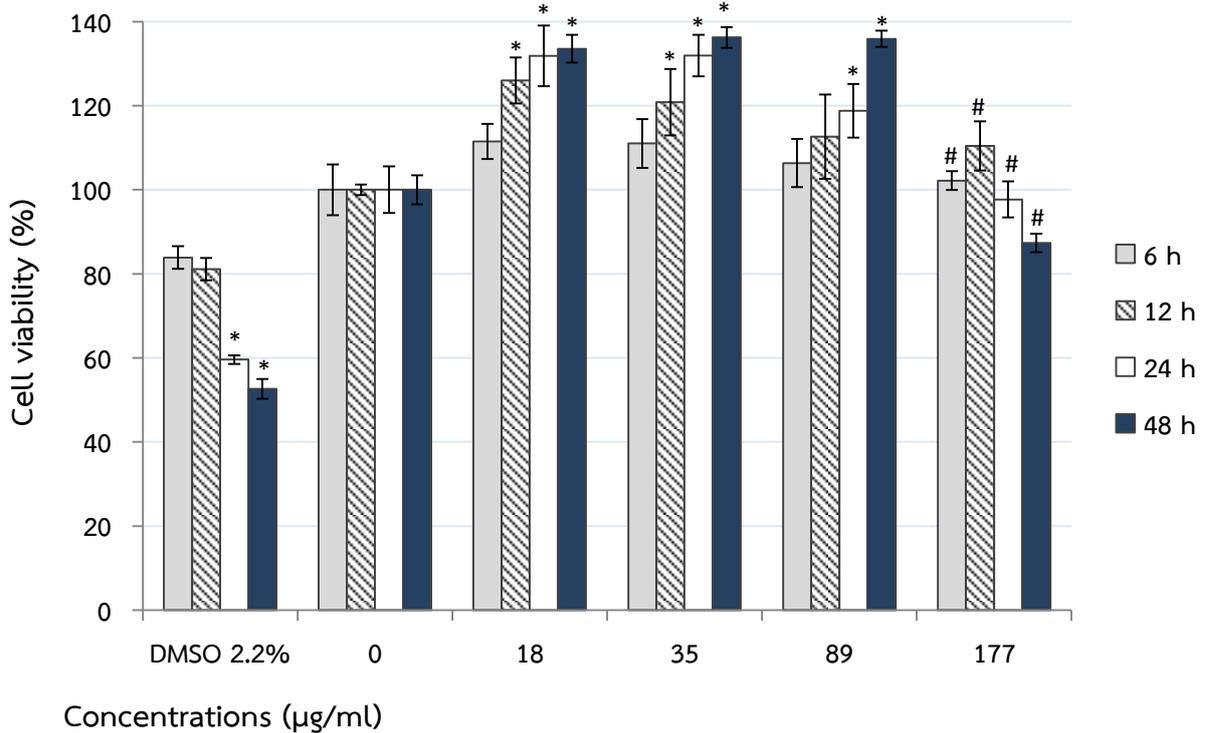
จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารละลายมาตรฐาน astragalin (รูปที่ 8) ในการบ่มสารเป็นระยะเวลาต่าง ๆ (6-48 h) และในความเข้มข้นตั้งแต่ 0-224 µg/ml พบว่าสารละลายมาตรฐาน astragalin ที่ความเข้มข้น 22-112 µg/ml มีผลส่งเสริมในเซลล์เจริญได้ดีที่เวลา 12-48 h อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 112 µg/ml การกระตุ้นการเจริญของเซลล์เกิดขึ้นน้อยกว่าที่ความเข้มข้น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

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

อีกทั้งมีรายงานของ astragalın ที่สกัดจากพืชต่าง ๆ ว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ RKO cells โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 265.34 µM<sup>(47)</sup> หรือในเซลล์ CaCo2 cells โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 315 µM<sup>(48)</sup> ในขณะที่การกระตุ้นการเจริญของเซลล์ส่วนหนึ่งอาจมาจากฤทธิ์การก่อมะเร็งของสาร แต่การศึกษาที่มีมายาวนานของกลุ่มวิจัยในญี่ปุ่นโดยศาสตราจารย์ Takashi Sugimura จาก National Cancer Center<sup>(49)</sup> ซึ่งพบว่า rutin และ astragalın ซึ่งเป็น glycoside ของ quercetin และ kaempferol ตามลำดับนั้น หากทดสอบในจุลชีพจะมีฤทธิ์ genotoxic หรือก่อมะเร็ง แต่เมื่อทดสอบทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงหรือในสัตว์ทดลองยังไม่พบผลดังกล่าว การทดสอบ mutagenicity หรือ carcinogenicity ในจุลชีพในปัจจุบัน ไม่สามารถแปรผลในเซลล์หรือสัตว์ทดลองในทางเดียวกันได้เสมอไป ดังนั้นในฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์ของสารที่พบเป็นส่วนหนึ่งในโสมรุ่มก็มีความน่าสนใจที่จะศึกษาค้นคว้าต่อไป

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

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



**รูปที่ 9** เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์กับเวลาในเซลล์เพาะเลี้ยง 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<sup>(50-52)</sup> ไม่ปรากฏรายงานความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง แต่สำหรับ astragaloside มีฤทธิ์ที่หลากหลายกว่าดังกล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากโสมรุ่มที่ความเข้มข้นต่างๆ มีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์อาจเป็นผลส่วนหนึ่งมาจากฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์นี้อาจเป็นผลมาจากสารสำคัญตัวหนึ่งในโสมรุ่มคือ cryptochlorogenic acid ในขณะที่สารสกัดโสมรุ่มที่ความเข้มข้นสูงซึ่งยับยั้งการเจริญของเซลล์นั้น ส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากสารสำคัญภายในโสมรุ่มคือ astragaloside

อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวเป็นเพียงการคาดการณ์ หากต้องการทราบผลอย่างแท้จริง ต้องมีการแยกสารสกัดโสมรุ่มให้ได้สารสำคัญทั้งสองชนิดแล้วนำไปทดสอบอีกครั้งเพื่อยืนยันผลดังกล่าว

จากผลการทดสอบตอนที่ 2 หากต้องการศึกษาผลของสารสกัดโสมรุ่มต่อการยับยั้งการเจริญของ HT29 cells ความเข้มข้นของสารสกัดโสมรุ่มที่ควรเลือกใช้น่าจะเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่สามารถจะทดลองได้ ซึ่งในที่นี้คือความเข้มข้น 500 µg/ml อีกทั้งจากผลการสกัดและวิเคราะห์สารสกัดโสมรุ่มในตารางที่ 6 ทำให้ทราบว่าสารสกัดโสมรุ่มเข้มข้น 1 mg/ml จะมี cryptochlorogenic acid 4.08 µg/ml และ astragaloside 1.75 µg/ml เมื่อพิจารณาผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโสมรุ่ม

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<sup>(50-53)</sup> ในขณะที่ astragaloside มีแนวโน้มของการมีฤทธิ์ในการทำให้เซลล์ตายแบบ autophagy<sup>(46)</sup> 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

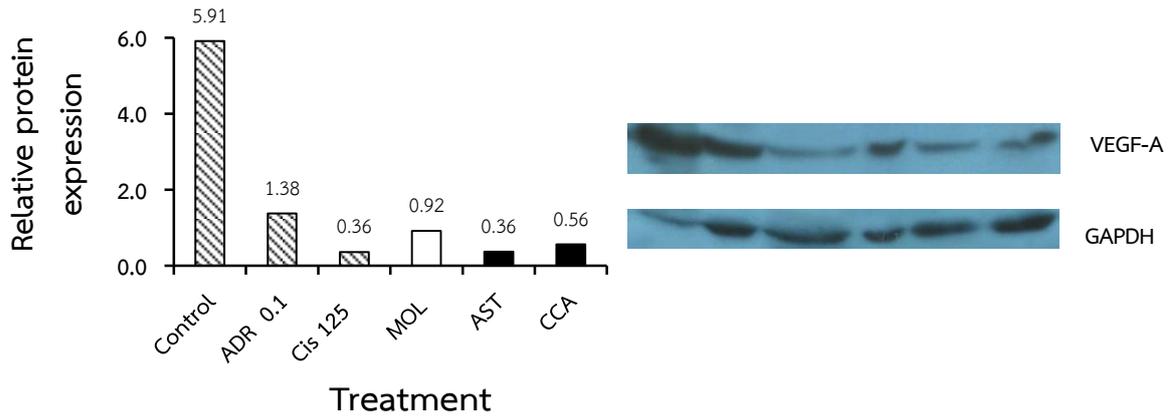
### ตอนที่ 3: การทดสอบผลของสารสกัดโสมมารุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Immunoblotting เปรียบเทียบกับ astragalins และ crypto-chlorogenic acid

ในการทดสอบผลของสารสกัดโสมมารุมต่อการแสดงออกของโปรตีน 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

การทดสอบครั้งนี้เลือกความเข้มข้นของสารสกัดโสมมารุมที่ 500 µg/ml, astragalins 2.0 µg/ml และ crypto-chlorogenic acid 0.84 µg/ml ในการทดสอบใน HT29 cells ด้วยการบ่มที่ 24-48 h สำหรับการเลือกใช้สาร astragalins และ crypto-chlorogenic acid มาทดสอบร่วมกับสารสกัดจากโสมมารุม เนื่องจากสารทั้งสองเป็นสารสำคัญที่พบมากในโสมมารุม หากสารสกัดโสมมารุมมีต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 โดยมีผลไปในทางเดียวกับ astragalins หรือ crypto-chlorogenic 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<sup>(54)</sup> อย่างไรก็ตามในด้านผลต่อการสร้างโปรตีน VEGF มีความแตกต่างกันบ้าง กล่าวคือ cisplatin ลดการแสดงออกของ VEGF ด้วยการลดการกระตุ้นการสร้างตัวรับ VEGF ผ่านการลด Hypoxia inducible factor 1 (HIF 1) โดยเฉพาะชนิด HIF 1 $\alpha$ <sup>(55)</sup> ส่วน adriamycin ลดการกระตุ้น HIF 1 แต่ไม่ได้มีผลที่ HIF 1 $\alpha$ <sup>(54)</sup> ซึ่งผลนี้พบในเซลล์มะเร็งรังไข่ สำหรับในส่วนฤทธิ์ของยาทั้งสองชนิดต่อการแสดงออกของ neuropilin-1 มีรายงานไม่มาก หากแต่เป็นงานวิจัยที่ทราบกันคืออยู่แล้วว่า neuropilin-1 เกี่ยวข้องกับการ metastasis ของมะเร็งและมีการนำความรู้นี้มาศึกษาวิจัยต่อ เช่น Jia และคณะ<sup>(56)</sup> 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<sup>(57)</sup> เช่นกัน

ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ adriamycin และ cisplatin เป็น positive control สำหรับเวลาครึ่งชีวิต (half-life) ของ adriamycin และ cisplatin มีค่าประมาณ 20 - 48 h<sup>(58)</sup> และ 2 h<sup>(59)</sup> 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



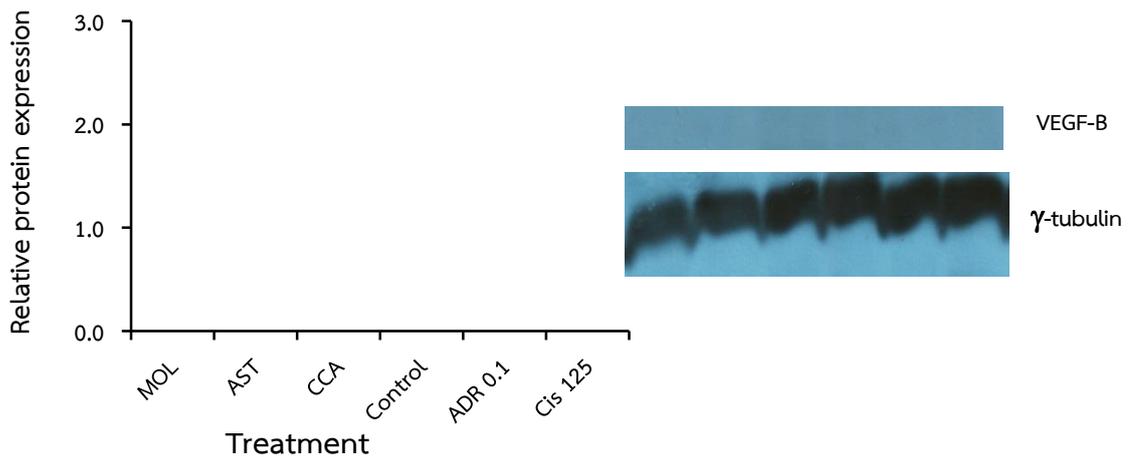
**รูปที่ 10** ผลของสารสกัดโสมมะรุ่ (MOL) ที่ความเข้มข้น 500  $\mu\text{g/ml}$  ต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF-A ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells เปรียบเทียบกับ AST 2.0 และ CCA 0.84  $\mu\text{g/ml}$  ที่บ่มเป็นเวลา 24 h โดยวิธี Western blot โดยใช้ adriamycin 0.1  $\mu\text{g/ml}$  และ cisplatin 125  $\mu\text{g/ml}$  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)

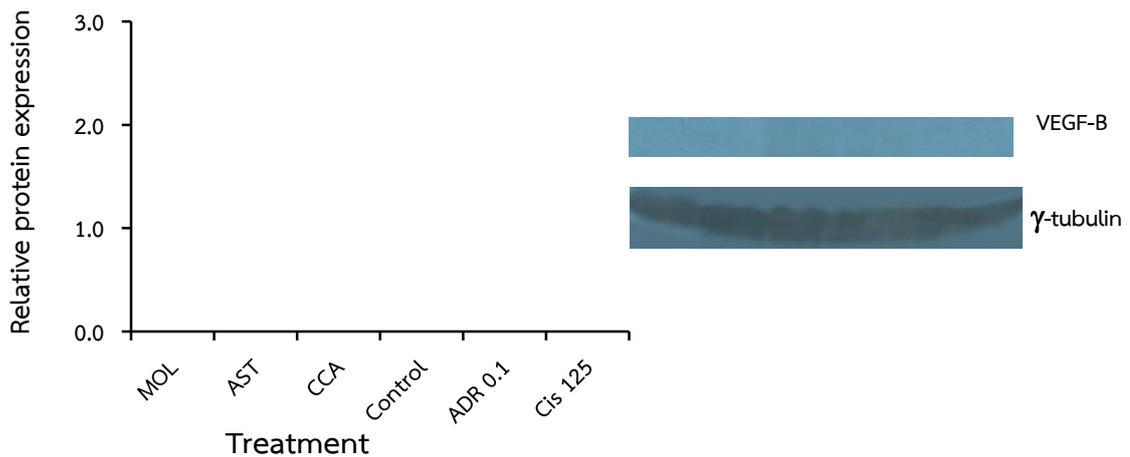
เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control ได้แก่ adriamycin และ cisplatin พบว่ายาด้านมะเร็งทั้งสองชนิด ทำให้เซลล์มีการแสดงออกของ VEGF-A ลดลงประมาณ 4 และ 16 เท่า ตามลำดับ สำหรับ cisplatin ในความเข้มข้น 1  $\mu\text{g/ml}$  ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งรังไข่ SKOV-3 cells ที่บ่มเป็นเวลา 24 h ลดการแสดงออกของ VEGF ได้ประมาณ 5 เท่า<sup>(60)</sup> 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<sup>(59)</sup> 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<sup>(61)</sup> ทดลองใช้สารสกัดใบมะรุมให้หนูทางปาก หลังจากนั้น 2 h จึงให้สารเหนี่ยวนำการอักเสบคือ lipopolysaccharide (LPS) แล้วตรวจสอบ VEGF mRNA พบว่าสารสกัดใบมะรุมลดการแสดงออกของ VEGF ส่วนงานวิจัยอีกเรื่องรายงานโดย Gothai S และคณะ<sup>(62)</sup> 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 เนื่องจากในความเข้มข้นต่ำ ๆ สารสกัดใบมะรุมกระตุ้นการเจริญของเซลล์แบบเดียวกับการวิจัยของ Gothai S และคณะ<sup>(62)</sup> ซึ่งควรทำการศึกษาทดลองโดยละเอียด รวมทั้งตรวจสอบปริมาณโปรตีนตัวรับ VEGF ด้วย เนื่องจากตัวรับ VEGF มีความสัมพันธ์กับการสร้าง VEGF ของเซลล์

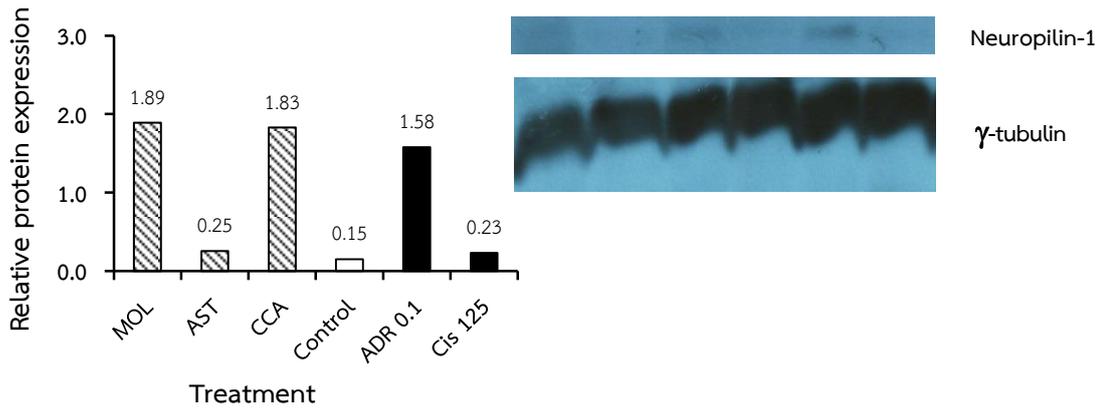


**รูปที่ 11** ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF-B ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells ที่เติมใช้ MOL 500 µg/ml เปรียบเทียบกับ AST 2.0 และ CCA 0.84 µg/ml ที่บ่มเป็นเวลา 24 h โดยวิธี Western blot โดยใช้ adriamycin 0.1 µg/ml และ cisplatin 125 µg/ml เป็น positive control ส่วน control คือเซลล์ที่เติม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

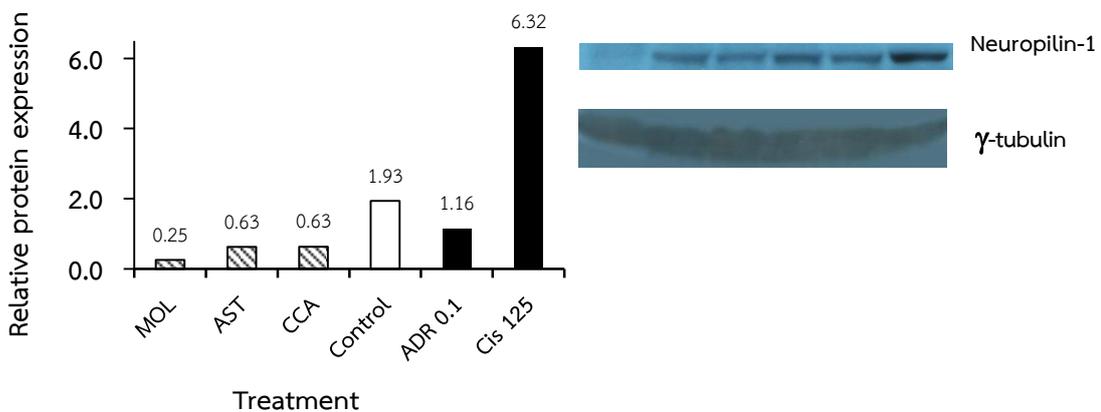


**รูปที่ 12** ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF-B ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells ที่เติมใช้ MOL 500  $\mu\text{g/ml}$  เปรียบเทียบกับ AST 2.0 และ CCA 0.84  $\mu\text{g/ml}$  ที่บ่มเป็นเวลา 48 h โดยวิธี Western blot โดยใช้ adriamycin 0.1  $\mu\text{g/ml}$  และ cisplatin 125  $\mu\text{g/ml}$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

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<sup>(63)</sup> 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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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<sup>(64)</sup> 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 ลดลง 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<sup>(58,59)</sup> 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<sup>(65)</sup>, lipid peroxidation<sup>(66)</sup> 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<sup>(67)</sup> เนื่องจาก neuropilin-1 จะเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็งด้วย<sup>(68)</sup> และมีรายงานการกำจัด neuropilin-1 แล้วทำให้ cisplatin ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น<sup>(56)</sup>

#### 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 ที่สามารถดูผลได้จากกล้องจุลทรรศน์ที่ต่อแหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์นั้น 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 ที่ใช้ยังไม่สูงมากพอ ประกอบกับปัญหาในเรื่องคุณภาพของแสงฟลูออเรสเซนซ์/กล้องที่ด้อยลงจากอายุการใช้งาน ทำให้การสังเกตภาพไม่ชัดเจน นอกจากนี้พบปัญหาที่ไม่คาดคิดคือสารสกัดใบมะรุมเมื่อผ่านกระบวนการย้อมเซลล์ทั้งที่มีและไม่มี antibody พบการเรืองแสงสีแดงในบริเวณรอบ ๆ เซลล์โดยเฉพาะในส่วนที่ยังมีสารสกัดตกค้างอยู่ เนื่องจากต้องใช้การล้างแบบเบาๆ เพื่อไม่ให้เซลล์หลุดจากภาชนะ จึงทำให้มีสารสกัดตกค้างอยู่ และเรืองแสงรบกวนการสังเกต อีกทั้งมี background เป็นสีแดงมากผิดปกติ ปัญหานี้ น่าจะเกิดจากคุณภาพกล้องส่วนหนึ่ง อีกส่วนหนึ่งอาจมาจากการเลือกใช้สีเรืองแสงที่เห็นไม่ชัดเจน หากเปลี่ยนเป็นการย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์จากสีแดงเป็นสีเขียว 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)