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
- คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	6
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	8
- สมุนไพรและสารเคมี	8
- วัสดุอุปกรณ์	9
- วิธีทำการวิจัย	11
- ตอนที่ 1 การเตรียมสารสกัดจากใบมะรุมและการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ	11
- ตอนที่ 2: การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบมะรุม, astragalin และ crypto-chlorogenic acid ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells) ด้วย MTT assay	13
- ตอนที่ 3: การทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Immunoblotting เปรียบเทียบกับ astragalin และ crypto-chlorogenic acid	15
- ตอนที่ 4: การทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี immunocytochemistry เปรียบเทียบกับ astragalin และ crypto-chlorogenic acid	15
- สถิติที่ใช้	16
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	17
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	40
ผลรับที่ได้จากโครงการ	46
ประวัติผู้ทำวิจัย	47

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	VEGF family isoform และคุณสมบัติบางประการ (ดัดแปลงจาก Roskoski R Jr., 2007)	11
ตารางที่ 2	ปริมาณ astragalin, crypto-chlorogenic acid (ng/spot) และสารสกัด (µg/spot) เมื่อ spot บนแผ่น TLC	12
ตารางที่ 3	พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน crypto-chlorogenic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ	18
ตารางที่ 4	พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน astragalin ที่ความเข้มข้นต่างๆ	19
ตารางที่ 5	พื้นที่ใต้กราฟของสารสกัดใบมะรุม	20
ตารางที่ 6	ปริมาณ astragalin และ crypto-chlorogenic acid ในสารสกัด 1 กรัม และในใบมะรุมแห้ง 100 กรัม	20

สารบัญรูป

หน้า

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

รูปที่ 2 แสดง HT29 cells ที่เพาะเลี้ยงใน 6-well plate ภายหลัง subculture และเลี้ยง 24 h (image 10 × objective using an inverted microscope) 4 13

รูปที่ 3 TLC chromatogram ของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid 17

รูปที่ 4 TLC chromatogram ของ สารสกัดใบมะรุม 18

รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของ crypto-chlorogenic acid 19

รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานของ astragalin 20

รูปที่ 7 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells เมื่อเติมสารสกัดจากใบมะรุมในความเข้มข้น 0-500 µg/ml เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 h โดยเปรียบเทียบกับ DMSO 1% (กราฟแสดง means ± S.D. ของ triplicate experiments (*, $p \leq 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ของเซลล์ที่เติมสารสกัดจากใบมะรุมหรือ DMSO 1% กับเซลล์ที่ไม่เติมสารใด ๆ และ #, $p \leq 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ของเซลล์ที่เติมสารสกัดจากใบมะรุม 500 µg/ml กับเซลล์ที่เติม DMSO 1%) ** แสดงการเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ) 22

รูปที่ 8 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells เมื่อเติมสารมาตรฐาน astragalin ในความเข้มข้น 0-224 µg/ml เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 h (กราฟแสดง means ± S.D. ของ triplicate experiments (*, $p \leq 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ของเซลล์ที่เติม astragalin หรือ DMSO 1.77% กับเซลล์ที่ไม่เติมสารใด ๆ และ #, $p \leq 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ของเซลล์ที่เติม astragalin 224 µg/ml กับเซลล์ที่เติม DMSO 1.77%) 23

รูปที่ 9 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง 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 (*, $p \leq 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ของเซลล์ที่เติม crypto-chlorogenic acid หรือ DMSO 2.2% กับเซลล์ที่ไม่เติมสารใด ๆ และ #, $p \leq 0.05$ โดยเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ของเซลล์ที่เติม crypto-chlorogenic acid 177 µg/ml กับเซลล์ที่เติม DMSO 2.2%) 25

สารบัญรูป (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

สารบัญรูป (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 เป็นโปรตีนสำหรับควบคุมปริมาณการเติมโปรตีนในแต่ละหลุม ใช้ neuropilin-1 antibody 1:1000) คำนวณค่าแถบสีที่ปรากฏด้วยโปรแกรม ImageJ® 31

รูปที่ 15 การเรืองแสงสีแดงของเซลล์ที่ไม่ได้ย้อม (2 คอลัมน์ซ้าย) และย้อมโปรตีน VEGF-A (2 คอลัมน์ขวา) ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ (คอลัมน์ซ้ายสุดและคอลัมน์ที่ 3 จากซ้าย) เปรียบเทียบกับ bright field (คอลัมน์ที่ 2 จากซ้ายและคอลัมน์ขวาสุด) 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 (คอลัมน์ซ้ายสุดและคอลัมน์ที่ 3 จากซ้าย) เปรียบเทียบกับ bright field (คอลัมน์ที่ 2 จากซ้ายและคอลัมน์ขวาสุด) 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 (คอลัมน์ซ้ายสุดและคอลัมน์ที่ 3 จากซ้าย) เปรียบเทียบกับ bright field (คอลัมน์ที่ 2 จากซ้ายและคอลัมน์ขวาสุด) 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

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

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) 37

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 × objective using an inverted microscope) 38