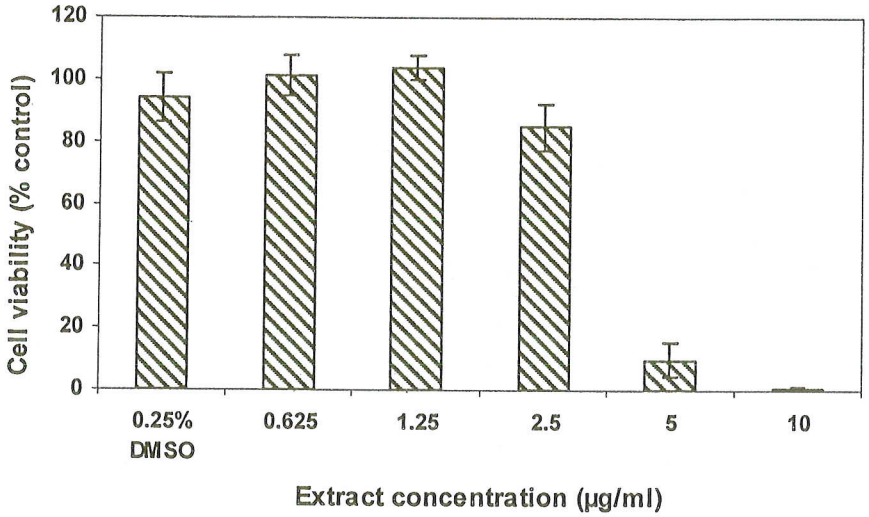
บทที่ 3

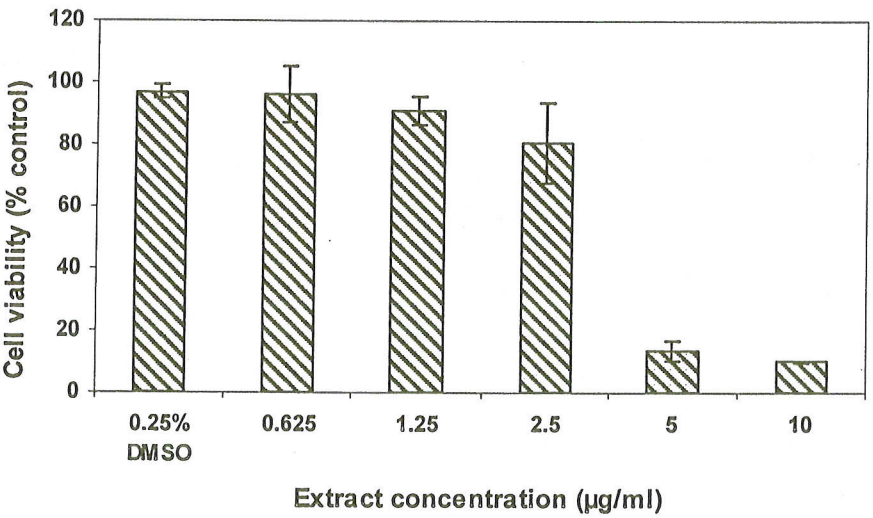
ผลการทดลอง (Results)

ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยง

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ SW480 cell line โดยเลี้ยงเซลล์ ใน 96 well microplate ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.625, 1.25, 2.5, 5.0 และ 10.0 µg/ml) เป็นเวลา 24 ชม จากนั้นทำการวิเคราะห์จำนวนของเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ (cell viability) ด้วย MTT assay และ Crystal violet staining assay (รูปที่ 1 และ 2) การวัดการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 ด้วยวิธี MTT assay (รูปที่ 1) พบว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นต่ำๆ (0.625-2.5 µg/ml) ยังสามารถทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้มีการแบ่งตัว และยังมีการเจริญเติบโตที่ลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control cell) ส่วนสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นสูงๆ ตั้งแต่ 5.0 µg/ml ขึ้นไปทำให้จำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ลดลงไปจำนวนมาก คาดว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงอาจจะเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เกิดภาวะ necrosis หรือ apoptosis โดยเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายหรือทำให้เกิดการหยุดการแบ่งตัวของเซลล์โดยรบกวนกระบวนการ cell cycle ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเมื่อทำการทดสอบ cell viability ด้วยวิธี crystal violet staining assay (รูปที่ 2) พบว่าลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นไปตามลักษณะเช่นเดียวกับวิธี MTT assay กล่าวคือ ที่ความเข้มข้นต่ำของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเซลล์ยังมีการเจริญเติบโตลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control cell) ส่วนสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นสูงๆ ตั้งแต่ 5.0 µg/ml ขึ้นไปทำให้จำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ลดลงไปอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

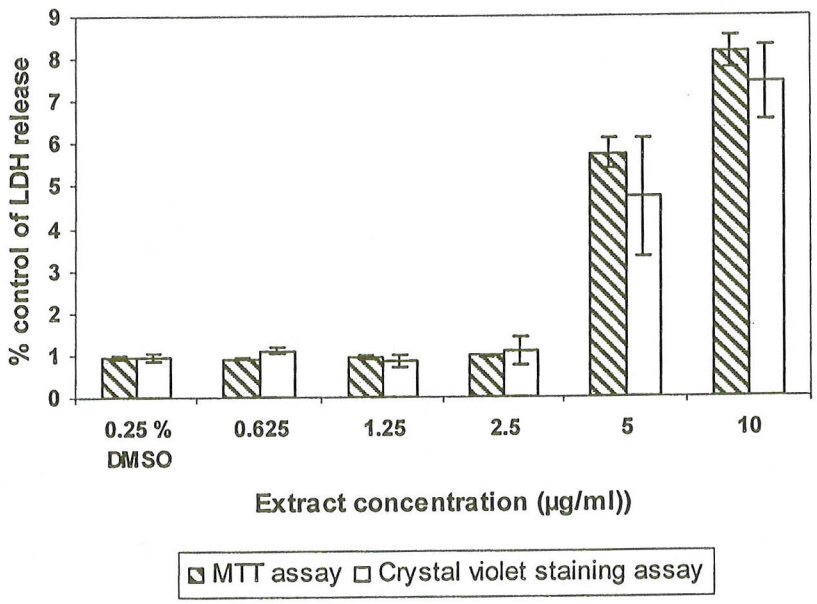


รูปที่ 1 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cell line เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเป็น 0.25% หลังจากนั้น 24 ชม วัดจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่ด้วย MTT assay กลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด แสดงผลเป็น % control (Mean ± SEM) จาก 3 การทดลอง



รูปที่ 2 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW 480 cell line เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเป็น 0.25% หลังจากนั้น 24 ชม วัดจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่ด้วย Crystal violet staining assay กลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด แสดงผลเป็น % control (Mean ± SEM) จาก 3 การทดลอง

นอกจากการทดสอบฤทธิ์สารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วย MTT assay และ Crystal violet staining assay แล้วหลังจากเลี้ยงเซลล์ SW480 ด้วยสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเป็นเวลา 24 ชม. ได้นำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบการหลั่ง lactate dehydrogenase (LDH) โดยวิธี LDH assay ซึ่งเป็นสัญญาณของการเกิด cell necrosis จากการที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย และมีการหลั่ง LDH ออกมาภายนอกเซลล์ จากผลการทดลอง **(รูปที่ 3)** พบว่า เซลล์มะเร็งลำไส้ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นต่ำๆ ไม่มีการหลั่งของ LDH เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5.0 µg/ml ขึ้นไป มีการหลั่งของ LDH เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง จากผลการทดลองดังกล่าว คาดว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงตั้งแต่ 5.0 µg/ml ขึ้นไป น่าจะเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดภาวะ necrosis เพราะผลของการหลั่ง LDH ที่เพิ่มมากขึ้น ส่วนที่ความเข้มข้นต่ำๆ ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงน่าจะเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดภาวะ apoptosis เพราะจากการวัดการอยู่รอดของเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay และ Crystal violet staining assay พบว่าเซลล์บางส่วนมีการเจริญเติบโตที่ลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิด apoptosis



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการตายแบบ necrosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cell line เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเป็น 0.25% หลังจากนั้น 24 ชม จากนั้นนำไปวัดปริมาณ lactate dehydrogenase ด้วย LDH assay กลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด แสดงผลเป็น % control of LDH release (Mean±SEM) จาก 3 การทดลอง

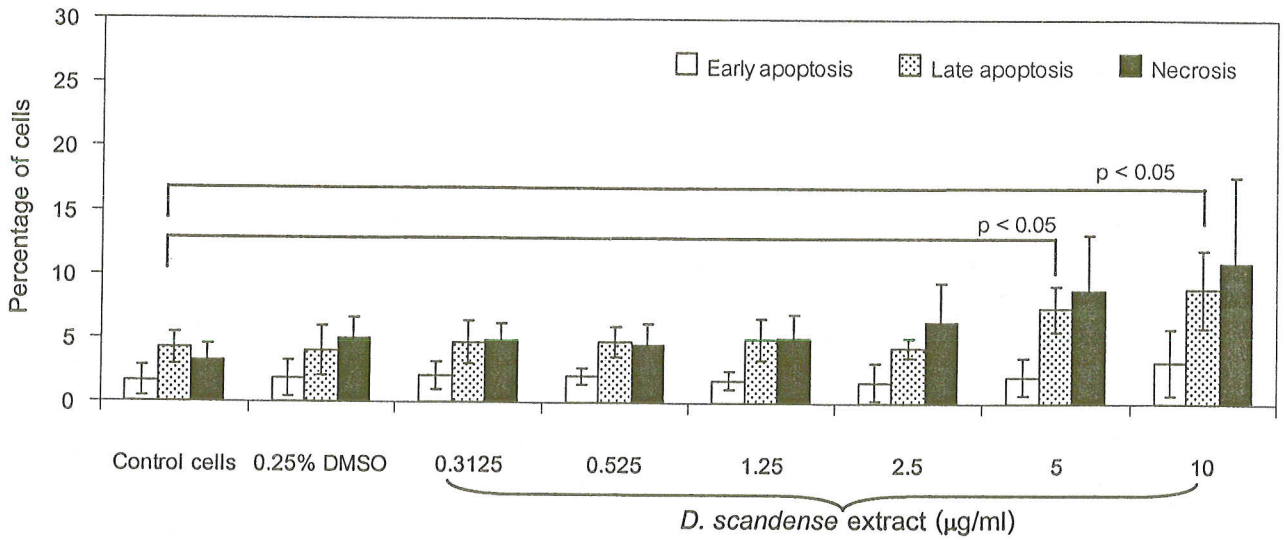
ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยง

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการตายแบบ apoptosis ของ SW480 cell line ด้วยชุดทดสอบ annexin-V FITC apoptosis detection kit และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง flow cytometer ซึ่งทำได้โดยการ เลี้ยงเซลล์ SW480 จำนวน 7×10^5 เซลล์ ใน 60-mm cell culture dish และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.625, 1.25, 2.5, 5.0 และ 10.0 µg/ml) เป็นเวลา 24 ชม พบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5 µg/ml ขึ้นไปมีผลทำให้ปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้น 5 และ 10 µg/ml ส่งผลให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 มีการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น โดยจำนวนเซลล์ที่พบส่วนใหญ่อยู่ทั้งในระยะ early และ late apoptosis แม้ว่ามีเพียงระยะ late apoptosis เท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12
ดังแสดงใน ตารางที่ 1 และรูปที่ 4 นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นสูงนี้ยังทำให้เกิดเซลล์มีการตายแบบ necrosis เพิ่มขึ้นได้เช่นกัน

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเกิด cell apoptosis ในเซลล์ SW480

ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง (µg/ml)	เซลล์มีชีวิต (Live cells)	ระยะแรกของ cell apoptosis	ระยะสุดท้าย apoptosis	เซลล์ตายแบบ necrosis
Control cells	90.87 ± 2.02	1.63 ± 1.23	4.20 ± 1.24	3.30 ± 1.29
0.25 % DMSO	89.22 ± 1.59	1.85 ± 1.36	4.00 ± 1.93	4.94 ± 1.69
0.3125	88.34 ± 1.75	2.09 ± 1.07	4.67 ± 1.67	4.91 ± 1.28
0.625	91.03 ± 4.83	2.11 ± 0.65	4.77 ± 1.22	4.60 ± 1.52
1.25	88.14 ± 2.49	1.78 ± 0.70	4.97 ± 1.65	5.11 ± 1.87
2.5	87.58 ± 1.08*	1.67 ± 1.43	4.34 ± 0.80	6.42 ± 3.00
5.0	81.58 ± 4.36*	2.09 ± 1.46	7.43 ± 1.79*	8.91 ± 4.27
10.0	76.77± 5.66*	3.29 ± 2.60	8.94 ± 3.03*	11.01 ± 6.71

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นร้อยละของเซลล์ทั้งหมด โดยเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง
* $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control cell)

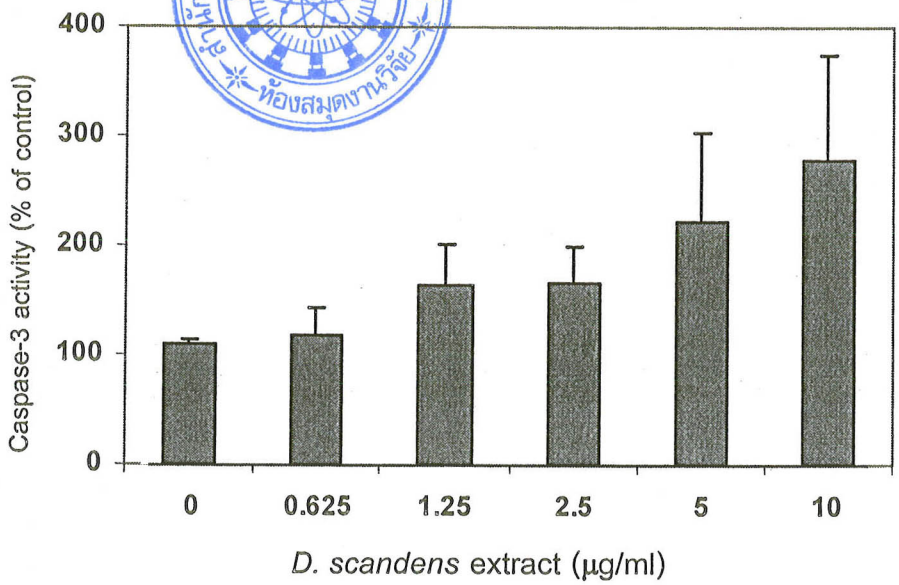


รูปที่ 4 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเกิด cell apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cell line เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเป็น 0.25% หลังจากนั้น 24 ชม แล้วทำการประเมิน cell apoptosis ด้วย flow cytometer แสดงผลเป็น ร้อยละของเซลล์ทั้งหมด (Mean±SD) จาก 4 การทดลอง

ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase-3

จากการที่สารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้น 5 และ 10 µg/ml สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cells เกิดการตายแบบ apoptosis ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการตายแบบ apoptosis โดยเมื่อเซลล์มีการตายแบบ apoptosis จะกระตุ้นให้มีการหลั่งเอนไซม์ caspase-3 เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่ได้เติมสารสกัดลงไป หลังจากเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นและเวลาเช่นเดียวกับการทดสอบ cell apoptosis จากนั้นจึงเก็บเซลล์และนำไปวัดการทำงานของ caspase-3 activity (รูปที่ 5) ผลการทดลองพบว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงสามารถกระตุ้นให้มีการหลั่งเอนไซม์ caspase-3 ในเซลล์ SW480 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น (dose-dependent manner) โดยความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ 5 และ 10 µg/ml มีแนวโน้มของ caspase-3 activity เพิ่มขึ้นสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เติม 0.25% DMSO ลงไป แต่ถึงอย่างไรก็ตามก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



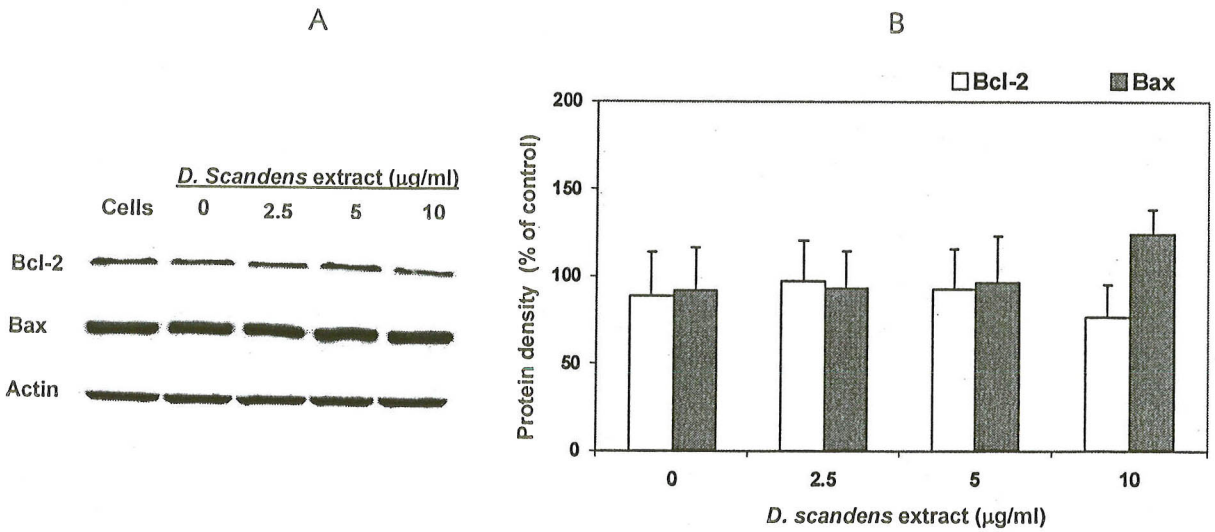
รูปที่ 5 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการทำงานของ caspase-3 activity ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cell line เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเป็น 0.25% หลังจากนั้น 24 ชม จากนำไปวัดการทำงานของ caspase-3 activity ด้วย Caspase-3 assay kit แสดงผลเป็น % of control ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่า Mean±SEM จาก 5 การทดลอง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 16 ก.พ. 2555
เลขทะเบียน 243969
เลขเรียกหนังสือ

ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax

การเกิดกระบวนตายแบบ apoptosis นอกจากมีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 เพิ่มขึ้นแล้วยังเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ในกลุ่มโปรตีน Bcl-2 family ด้วย ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ที่ทำหน้าที่เป็นตัวต้านกระบวนการตายแบบ apoptosis (anti-apoptotic protein) และโปรตีน Bax ซึ่งทำหน้าที่ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบ apoptosis (pro-apoptotic protein) โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม จากนั้นเก็บเซลล์และคำนวณหาปริมาณโปรตีนเพื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax ด้วยวิธี western blot (รูปที่ 6) จากการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเพิ่มมากขึ้น การแสดงออกของปริมาณโปรตีน Bcl-2 มีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกันกลุ่มควบคุมที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 (รูปที่ 6A) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทำงานของโปรตีน Bcl-2 ที่พบว่า เมื่อเซลล์มีการตายแบบ apoptosis เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ที่ลดลง แต่จะตรงกันข้ามกับการแสดงออกของโปรตีน Bax ที่จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเซลล์มีการตายแบบ apoptosis ที่เพิ่มขึ้น จากการทดลองครั้งนี้พบว่า เมื่อเติมสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5 µg/ml ปริมาณโปรตีน Bax ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Bax (รูปที่ 6A) แต่ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10 µg/ml

พบว่า ปริมาณโปรตีน Bax มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อนำแถบของโปรตีนที่ได้จากรูปที่ 6A มาวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มของแถบโปรตีนเพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 โดยใช้โปรแกรม Photoshop CS3 (รูปที่ 6B) และคำนวณความเข้มของแถบโปรตีนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (% of control) พบว่า ผลที่ได้ทั้งสองมีความสอดคล้องกัน จากการทดลองครั้งนี้แสดงว่า เมื่อเซลล์มีการตายแบบ apoptosis จะส่งผลให้มีการทำงานของโปรตีน Bcl-2 ลดลง แต่จะไปส่งผลให้มีการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Bax เพิ่มขึ้น



รูปที่ 6 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cell line เลี้ยงเซลล์ SW480 ด้วยสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม จากนั้นใช้ปริมาณโปรตีน 20 µg ของเซลล์ SW480 มาแยกโปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE เพื่อดูการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax ด้วย western blotting (A) และค่าความเข้มของแบนโปรตีน (B) ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่า Mean±SD จาก 3 การทดลอง