



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลไกของเอนไซม์เปรี๊ยะต่อการเกิด
apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยง

โดย ผศ.ดร.นันท์ทิพ ลี้มเพียรชอบ และคณะ

ธันวาคม พ.ศ. 2554

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลไกของเอนไซม์เปรี๊ยะต่อการเกิด apoptosis
ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยง

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร.นันทิทิพ ลิ้มเพียรชอบ คณะเภสัชศาสตร์
2. รศ.ดร.กรกนก อิงคินันท์ คณะเภสัชศาสตร์

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นมะเร็งที่พบมากในประเทศที่พัฒนาแล้วซึ่งพบได้ทั้งในเพศชายและเพศหญิง สำหรับในประเทศไทยมีอุบัติการณ์เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ต่ำกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว แต่ในปัจจุบันจากข้อมูลทางสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบว่าอัตราการเกิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่เพิ่มขึ้นทั้งในเพศชายและเพศหญิง และพบมากขึ้นหลังอายุ 50 ปีขึ้นไป ทั้งนี้เนื่องจากพฤติกรรมในการรับประทานอาหารที่เปลี่ยนไป มีพฤติกรรมการรับประทานอาหารแบบตะวันตกเพิ่มขึ้น เช่น เน้นการบริโภคอาหารประเภทเนื้อสัตว์เพิ่มขึ้นหรือรับประทานอาหารในกลุ่มของผักและผลไม้ไม่เพียงพอ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้อัตราเสี่ยงของการเกิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่เพิ่มขึ้น ดังนั้น มะเร็งลำไส้ใหญ่จัดเป็นมะเร็งที่สามารถป้องกันได้โดยการปรับเปลี่ยนหรือหลีกเลี่ยงพฤติกรรมในการรับประทานอาหารที่เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง มีงานศึกษาวิจัยจำนวนมากที่ค้นหาสารจากธรรมชาติหรือสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อต้านมะเร็ง โดยศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองและเซลล์เพาะเลี้ยง ในงานวิจัยนี้จึงสนใจทำการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรที่มีในชุมชนหลายชนิด และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยงได้ จึงมีการศึกษาต่อมาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่กระตุ้นให้เกิด apoptosis โดยศึกษาถึงการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 และการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิด apoptosis ด้วยวิธี western blot ผลจากการทดลอง พบว่าการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเพิ่มมากขึ้น ส่วนของการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเพิ่มขึ้น การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 มีแนวโน้มลดลงในทางกลับกันโปรตีน Bax มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองทั้งสองวิธีนี้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจากผลการทดลองกล่าวได้ว่า กลไกที่สารสกัดเถาวัลย์เปรียงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยงได้ อาจเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ตายแบบ necrosis มากกว่าการตายแบบ apoptosis

Abstract

Colon cancer is one of the most common cancers affecting people in both men and women, especially in developed countries. The incidence rate of colon cancer in Thailand is low when compared with other countries. National cancer institute reported that colon cancer incidence rate is expected to be rapidly increased in both men and women, especially over 50 years of age, due to the acquisition of Western lifestyle. Western style diet such as high consumption of meat, and low vegetables, dietary fiber and fruits is the major risk factor of colorectal cancer. Since diet is definitely important for colon cancer development, dietary interventions are received much attention as one of the approaches to prevent this type of cancer. The extract from *Derris scandens* Benth was previously shown to have anti-proliferative effect against SW480 colon cancer cells. Therefore, the present study was aim to investigate the mechanism of action of the anti-proliferative effect of *D. scandens* extract. Several apoptotic signaling pathways were determined following *D. scandens* treatment. Caspase-3 activity and the expression of Bax pro-apoptotic and Bcl-2 anti-apoptotic proteins were determined. The result showed that *D. scandens* (5-10 $\mu\text{g/ml}$) slightly increased caspase-3 activity, as well as down-regulated Bcl-2 and up-regulated Bax proteins of SW480 cells. However, these changes were not statistically significant. *D. scandens* extract significantly induced cell necrosis determined by the release of LDH. These results suggest that *D. scandens* extract primarily mediate SW480 cell death through necrotic rather than apoptotic process.

บทสรุปย่อ Executive Summary

ในปัจจุบันมีผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เพิ่มมากขึ้น สาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ พฤติกรรมการรับประทานอาหารที่เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง เช่น การทานอาหารที่มีโปรตีนและไขมันสูง อาหารจำพวก ปิ้งย่างหรืออาหารที่มีเส้นใยต่ำเป็นเวลานานๆ แม้ว่าวิธีการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ดีที่สุดคือ การปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการรับประทานอาหารที่เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งดังกล่าวข้างต้น แต่ก็ยังเป็นวิธีที่ยากสำหรับหลายๆคน ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ ในการยับยั้งหรือชะลอการดำเนินของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยทำการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองและในเซลล์เพาะเลี้ยง อีกทั้งยังสนใจที่จะศึกษาในระดับลึกต่อไปคือ กลไกในระดับโมเลกุลในการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในส่วนของโครงการวิจัยนี้ เป็นการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง ซึ่งจากผลการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่า สารสกัดนี้มีฤทธิ์ฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และคาดว่าจะยังทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ด้วย เพื่อให้ทราบกลไกในการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นทดสอบผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการเกิด apoptosis และการทำงานของ caspase-3 activity ซึ่งผลสำเร็จของโครงการวิจัยนี้จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรเถาวัลย์เปรียง โดยอาจจะมีการส่งเสริมและพัฒนาให้ใช้ประโยชน์ได้แพร่หลายมากขึ้น และจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาลึกซึ้งต่อไป เพื่อหาประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ต่อไปในอนาคต

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้เซลล์ SW480 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งการศึกษาค้นคว้าของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ SW480 ทำได้โดยวิธี MTT assay และ Crystal violet staining assay สำหรับการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการเกิด apoptosis ซึ่งได้แก่ Bcl-2 และ Bax สามารถทดสอบได้ด้วยวิธี immunoblotting (western blotting) ส่วนการทำงานของ caspase-3 ทดสอบได้โดยใช้ ชุดทดสอบ caspase-3 assay kit

จากการศึกษา พบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงมีผลลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) ของเซลล์ SW480 ขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ (dose-dependent effect) ซึ่งสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่มีความเข้มข้นต่ำๆ (0.625-2.5 $\mu\text{g/ml}$) ยังสามารถทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้มีการแบ่งตัว และยังสามารถเจริญเติบโตที่ลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control cell) ซึ่งอาจจะเป็นการตายแบบภาวะ apoptosis ส่วนสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่มีความเข้มข้นสูงๆ ตั้งแต่ 5.0 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไปทำให้จำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ลดลงไปจำนวนมาก และเมื่อยืนยันผลโดยการศึกษาการหลั่ง LDH ก็พบว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่มีความเข้มข้นสูงสามารถเหนี่ยวนำให้มีการหลั่ง LDH มากขึ้น ซึ่ง LDH เป็นเอนไซม์ที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ที่ตายแบบ necrosis ดังนั้นที่ความเข้มข้นสูงๆ ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง เซลล์จึงคาดว่าจะมีการตายแบบ necrosis แม้ว่าเซลล์จะตายแบบ necrosis แต่ก็พบว่ายังมีเซลล์จำนวนหนึ่งที่มีการตายแบบ apoptosis เนื่องจากพบว่ามีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นของการทำงานของ caspase-3 และการเพิ่มการแสดงออกของ Bax protein ส่วน Bcl-2 protein มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย

สารสกัดเถาวัลย์เปรียงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ โดยสามารถเหนี่ยวนำเซลล์ให้มีการตายทั้งแบบ apoptosis และ necrosis ได้ ดังนั้น เถาวัลย์เปรียงจึงเป็นสมุนไพรที่อาจสามารถพัฒนาให้มีศักยภาพเพิ่มมากขึ้นในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ต่อไปในอนาคต

ผลการศึกษาของโครงการวิจัยนี้ ได้มีการเผยแพร่ใน 2 รูปแบบ คือ การนำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ และการตีพิมพ์ผลงานในวารสารระดับชาติ (ดังแสดงไว้ในภาคผนวก)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	i
Abstract.....	ii
บทสรุปย่อ (Executive Summary)	iii
สารบัญ.....	v
สารบัญรูปภาพ.....	vi
สารบัญตาราง.....	vii
บทที่ 1 บทนำ (Introduction).....	1
วัตถุประสงค์.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย (Material and Methods)	
อุปกรณ์และสารเคมี.....	3
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	4
บทที่ 3 ผลการทดลอง (Results).....	8
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง (Discussion and conclusion)	
อภิปรายผลการทดลอง.....	15
สรุปผลการทดลอง.....	15
เอกสารอ้างอิง (References).....	17
ผลลัพธ์ (Output).....	19
ภาคผนวก (Index).....	21

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cells ด้วยวิธี MTT assay.....	9
รูปที่ 2 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cells ด้วยวิธี Crystal violet staining assay.....	9
รูปที่ 3 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการตายของเซลล์แบบ necrosis ด้วยวิธี LDH assay.....	10
รูปที่ 4 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยใช้ชุดทดสอบ annexin V-FITC detection kit.....	12
รูปที่ 5 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 โดยใช้ชุดทดสอบ EnzChek [®] caspase-3 assay	13
รูปที่ 6 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax ด้วยวิธี western blot.....	14

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ผลของเซลล์ที่ย้อมด้วย annexin V-FITC และ PI เครื่อง flow cyotmeter.....	6
ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cells	11

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) เป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับต้นๆของมะเร็งชนิดต่างๆ [1] โดยสาเหตุที่อาจเกิดมาจากปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม โดยพบว่าสาเหตุหลักที่สำคัญของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่เกี่ยวข้องกับอาหารที่รับประทาน เช่น การรับประทานอาหารประเภทเนื้อสัตว์และไขมันในปริมาณสูง หรืออาหารที่มีเส้นใยน้อย พฤติกรรมในการดำรงชีวิตอื่นๆ ที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ ได้แก่ การไม่ออกกำลังกาย การสูบบุหรี่ ดื่มสุรา และการขาดสารอาหารบางชนิด เช่น folate และ methionine [2] ในประเทศที่กำลังพัฒนาอัตราการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่จะสูงขึ้นในกลุ่มคนเมือง เมื่อเปรียบเทียบกับคนในชนบท ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของลักษณะของอาหาร ซึ่งเป็นกลุ่มคนที่ทานอาหารประเภทเนื้อสัตว์มาก อาหารที่มีเส้นใยต่ำ รวมทั้งอาหารที่มีปริมาณไขมันหรือน้ำตาลสูง เนื่องจากมะเร็งลำไส้ใหญ่เกิดมาจากปัจจัยของการรับประทานอาหารเป็นสำคัญ จึงเชื่อกันว่าการเกิดมะเร็งชนิดนี้สามารถป้องกันได้ (preventive cancer) โดยการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมทานอาหาร หรือทานอาหารเสริมที่สามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ [3]

เชื่อกันว่าการรับประทานอาหารที่มีเส้นใยสูง สามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ แต่จากผลการวิจัยจากที่ต่างๆ พบว่า ยังมีความขัดแย้งกันและยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดถึงบทบาทการป้องกันมะเร็งลำไส้ของอาหารที่มีเส้นใยสูง [4] นอกจากอาหารเส้นใยแล้ว มีการศึกษาจำนวนมากที่พยายามค้นหาวิธีการป้องกันมะเร็งลำไส้จากการทานอาหารเสริมชนิดต่างๆ เช่น การศึกษากรดไขมันไม่อิ่มตัว (n-3 polyunsaturated fatty acids) ในน้ำมันปลา พบว่าสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ได้ในสัตว์ทดลอง [5] การเสริมวิตามินดีและแคลเซียมก็พบว่าช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ได้ [2] นอกจากนี้ มีการศึกษาพบว่าวิตามินอีช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ได้เช่นกัน ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระภายในลำไส้ [6] ในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยสารจากธรรมชาติหรือสารสกัดสมุนไพรหลายชนิด ในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยวิธีการศึกษา สามารถทำได้โดยทดสอบในสัตว์ทดลองและในเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งการใช้ colon adenoma cell lines พบว่าเป็นวิธีที่เชื่อถือได้และนิยมใช้ในการวิจัยเพื่อคัดกรองค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (chemopreventive effect) [7] มีการศึกษาสารจากพืชหลายชนิดที่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตหรือกระตุ้นให้เกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง เช่น สารกลุ่ม flavonoids, lignans, indoles และ isothiocyanates [8-10] ในเบื้องต้น คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรหลายชนิดที่มีการใช้ในชุมชน พบว่า เถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens* Benth) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็ง (anti-proliferative effect) ซึ่งผลของสารสกัดอาจทำให้เซลล์ตายหรือหยุดการเจริญเติบโตได้ และนอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดนี้ อาจมีส่วนทำให้เซลล์เกิดตายแบบ apoptosis แต่อย่างไรก็ตาม รายงานการวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรชนิดนี้มีจำนวนน้อยมาก ในประเทศไทย เถาวัลย์เปรียงเป็นสมุนไพรที่มีการศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ ลดอาการปวด จึงมีการใช้บรรเทาทั้งการปวดกล้ามเนื้อ ปวดหลังและปวดข้อ และมีการนำมาผลิตเป็นชาดื่มเพื่อสุขภาพ และมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้แทนยา กลุ่มสเตียรอยด์ (steroids) ส่วนข้อมูลในการต้านมะเร็งของเถาวัลย์เปรียงนั้น ยังไม่พบรายงาน เนื่องจากเป็นสมุนไพรที่มีการใช้รับประทานเพื่อลดอาการปวดและมีผลิตภัณฑ์วางขาย

แล้ว คาดว่าเถาวัลย์เปรียงน่าจะเป็นสมุนไพรที่มีความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติ จึงเป็นที่น่าแปลกใจสำหรับคณะผู้วิจัยที่สมุนไพรนี้มีฤทธิ์ลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ของสมุนไพรชนิดนี้ โดยทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ จึงเป็นการศึกษาเพื่อค้นหากลไกระดับโมเลกุลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ซึ่งได้แก่ การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้ จะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญที่แสดงถึงกลไกการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสมุนไพรดังกล่าว และยังเป็นข้อมูลเพื่อใช้ในการสนับสนุนการทดสอบประสิทธิภาพของเถาวัลย์เปรียงในสัตว์ทดลองต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยงตายแบบ apoptosis

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงในการกระตุ้น apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยง
2. ผลการวิจัยจะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ และเป็นข้อมูลที่จะมีส่วนช่วยสนับสนุนการต่อยอดการรักษาเพื่อพิสูจน์ประสิทธิภาพการต้านมะเร็งลำไส้ในสัตว์ทดลองหรือในผู้ป่วยต่อไป
3. ข้อมูลที่ได้จะมีส่วนช่วยแสดงศักยภาพของสมุนไพรดังกล่าว ในการนำไปพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เพื่อป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่
4. ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปเผยแพร่โดยการนำเสนอผลงาน และ/หรือ ตีพิมพ์ลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติหรือระดับชาติ
5. เปิดโอกาสให้นักวิจัยรุ่นใหม่ ซึ่งเป็นนิสิตปริญญาโทหรือเอกได้เข้ามามีส่วนร่วมในการวิจัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & Methods)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Autoclave (HA-300P, Hirayama Manufacturing Corporation)
2. CO₂-incubator (Forma series II, Thermo Fisher Scientific)
3. Flow cytometer (BD Biosciences)
4. Laminar air flow (Heal Force[®])
5. Liquid nitrogen tank (Taylor Wharton)
6. Microplate Spectrophotometer (Multimode detector DTX 880, Beckman Coulter)
7. pH meter (Mettler-Teledo)
8. PVDF membrane (Pierce)
9. Vertical gel electrophoresis (Model Mini-Protean Tetra Cell, Biorad laboratory)

สารเคมี

1. Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences)
2. Anti-human Bcl-2 (Cell signaling technology)
3. Anti-human Bax (Cell signaling technology)
4. BCA protein assay kit (Pierce)
5. Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient F-12 Ham (DMEM/F-12, Sigma)
6. EnzChek[®] caspase-3 assay kit (Invitrogen)
7. Fetal bovine serum (FBS, Gibco)
8. Goat anti-rabbit IgG conjugated alkaline phosphatase (Cell signaling)
9. Penicillin/Streptomycin (Gibco)
10. Triazolyl tetrazolium bromide (MTT, Amresco)
11. 0.25% Trypsin/EDTA (Gibco)
12. สารเคมีอื่นๆซื้อจาก Sigma chemical Co. (St. Louis, Mo)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

เก็บตัวอย่างสมุนไพร โดยบันทึกแหล่งที่เก็บและทำตัวอย่างพืชแห้ง (voucher specimen) ไว้ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ PBM Herbarium มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อใช้ในการอ้างอิงและตรวจสอบชื่อพืชต่อไป การเตรียมสารสกัดสมุนไพร โดยนำส่วนของพืชที่ต้องการสกัดมาบดแล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 °C การสกัดจะทำการหมักสมุนไพรแห้งด้วย methanol เป็นเวลา 3 วัน และผ่านกระบวนการกรอง จากนั้นระเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษา คือ SW480 human colon carcinoma cells ซึ่งได้มาจาก American Type Culture Collection (ATCC) จากนั้นเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 ที่มี 10% FBS และ 1% penicillin-streptomycin ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm³ ในตู้ CO₂-incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ หลังจากเซลล์เพิ่มจำนวนจนเกือบเต็มพื้นของขวดเลี้ยงเซลล์ (90-95% confluent) จึงทำการ subculture โดยการลอกเซลล์ออกจากพื้นขวดเลี้ยงเซลล์ (detach) ด้วย 0.25% trypsin ใน Ca²⁺, Mg²⁺ free phosphate buffer (PBS) ที่มี 0.2 g/L EDTA โดยใช้ split ratio 1:4 ในทุกๆ 3-4 วัน และจะเริ่มนับเป็น passage ที่ 1 และเริ่มแบ่งเก็บเซลล์แช่แข็ง (freeze cell) เมื่อเซลล์อยู่ใน passage ที่ 5 ซึ่งเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้จะเริ่มใช้ในช่วงของ passage ที่ 10 – 20

3. การวัดการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability determination)

3.1 MTT assay

ทำการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ SW480 โดยการวัดด้วยวิธี MTT assay [3-(3,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide), MTT] โดยเลี้ยงเซลล์จำนวน 1×10⁴ เซลล์ ต่อ well ใน 96-wells cell culture plate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงลงไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเท่ากับ 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 µg/ml ซึ่งละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และใช้ 0.25% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม และนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อใน ตู้ CO₂ - incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10 µl ของ MTT (5 mg/ml ใน PBS) ใน 2 ชั่วโมงก่อนสิ้นสุดการทดสอบ จึงนำเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติม 200 µl DMSO : EtOH (1:1) และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วย spectrophotometer

3.2 Crystal violet staining assay (Sharma et al., 2009)

การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ SW480 สามารถวัดโดยตรงด้วยวิธีย้อมเซลล์ด้วย crystal violet [11] จากนั้นจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยเลี้ยงเซลล์จำนวน 1×10⁴ เซลล์ ต่อ well ใน 96-wells cell culture plate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงลงไป

ไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเท่ากับ 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และใช้ 0.25% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติม 4% formaldehyde จำนวน 100 μl เป็นเวลา 1 ชม. และล้างเซลล์ด้วย PBS ก่อน 1 ครั้ง แล้วจึงเติม crystal violet dye (0.02% ใน 2% ethanol) จำนวน 100 μl เป็นเวลา 30 นาที และทำการล้างเซลล์อีกครั้งด้วยน้ำกลั่นก่อนเติม 10% acetic acid จำนวน 100 μl และนำ plate ไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ด้วย spectrophotometer

3.3 Lactate dehydrogenase (LDH) activity

ทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ LDH ที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ที่ตายแบบ necrosis ด้วยวิธี LDH assay โดยเลี้ยงเซลล์จำนวน 1×10^4 เซลล์ ต่อ well ใน 96-wells cell culture plate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงลงไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเท่ากับ 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และใช้ 0.25% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นเก็บ 100 μl ของอาหารเลี้ยงเซลล์มาวัดปริมาณของเอนไซม์ LDH ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ และเติม 150 μl mixing reagent [20 mM Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), Sodium pyruvate และ PBS pH7.4 ในอัตราส่วน 1:1:3] ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาและติดตามการลดลงของ NADH ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm โดยวัดเป็น kinetics ทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง spectrophotometer

4 การวัด cell apoptosis ด้วย flow cytometer

ทำการตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ด้วยชุดทดสอบ annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Bioscience) โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานนี้ เลี้ยงเซลล์ SW480 จำนวน 1×10^6 เซลล์ ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60-mm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงลงไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเท่ากับ 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งละลายใน DMSO เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับ 0.25% ในอาหารเลี้ยงเซลล์) และใช้ 0.25% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นเซลล์ที่พ่นจานเลี้ยงเซลล์ด้วย PBS buffer 1 ครั้ง และลอกเซลล์โดยใช้ด้วย 0.25% trypsin/EDTA จากนั้นทำการกระจายเซลล์ด้วย 100 μl 1Xbinding buffer และนำเซลล์มาย้อมด้วยสี annexin V-FITC และ propidium iodide (PI) จากนั้นวิเคราะห์เซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer และทำการแปลผลโดยใช้โปรแกรม CellQuestPro software (ตารางที่ 1)

ตาราง 1 การวิเคราะห์ผลของเซลล์ที่ย้อมด้วย annexin V-FITC และ PI ภายหลังการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

ชนิดของเซลล์	Annexin V-FITC	PI
เซลล์มีชีวิต (Viable cells)	- ve	- ve
เซลล์ที่ตายแบบ apoptotic ระยะแรก (Early apoptotic cells)	+ ve	- ve
เซลล์ที่ตายแบบ apoptotic ระยะสุดท้าย (Late apoptotic cells)	+ ve	+ ve
เซลล์ที่ตายแบบ necrosis	- ve	+ ve

5. การวัด caspase-3 activity

ทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ที่พบการทำงานเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์มีการตายแบบ apoptosis ด้วยชุดทดสอบ EnzChek® Caspase-3 Assay Kit โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานนี้ เลี้ยงเซลล์ SW480 จำนวน 1×10^6 เซลล์ ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60-mm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงลงไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเท่ากับ 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งละลายใน DMSO เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับ 0.25% ในอาหารเลี้ยงเซลล์) และใช้ 0.25% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ล้างเซลล์ด้วย PBS และทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer (200 mM Tris pH7.5, 2 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.2% Triton™ X-100) จากนั้นปั่นเก็บส่วน supernatant และวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA protein assay kit (Pierce) เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหา caspase-3 activity ต่อปริมาณโปรตีน จากนั้นเติม cell lysate จำนวน 25 μl และ caspase-3 substrate working solution (rhodamine 110 bis-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide, Z-DEVD-R110) จำนวน 25 μl จากนั้นวัดค่า fluorescence ของ rhodamine 110 (R110) ด้วย spectrophotometer ที่ excitation 485 nm และ emission 535 nm

6. การวัดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax

ทำการเลี้ยงเซลล์ SW480 จำนวน 1×10^6 เซลล์ ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60-mm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงลงไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเท่ากับ 2.5, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งละลายใน DMSO เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับ 0.25% ในอาหารเลี้ยงเซลล์) และใช้ 0.25% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นล้างด้วย PBS buffer แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย M-PER® lysis buffer (Pierce) จากนั้นปั่นเก็บส่วน supernatant และวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA protein assay kit จากนั้นนำโปรตีนปริมาณ 20 μg มาทำการแยกโดยใช้ sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และย้ายโปรตีนจาก gel ลงบนแผ่น polyvinylidene difluoride (PVDF membrane) จากนั้นทำการ block non-specific binding ด้วย 5% skim milk เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง membrane ด้วย

0.05% Tween ใน Tris buffer pH 7.6 ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และนำ membrane มาเติม primary antibody: anti-Bcl-2 หรือ anti-Bax ที่ dilution 1:2000 ก่อนจะบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นล้าง membrane ด้วย 0.05% Tween-TBS pH 7.6 ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จึงเติม secondary antibody: goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase (AP) ที่ dilution 1:10,000 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. และล้าง membrane ด้วย 0.05% Tween-TBS pH 7.6 ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นตรวจแถบการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 หรือ Bax โดยเติม 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) ซึ่งเป็น substrate ของเอนไซม์ alkaline phosphatase

7. วิเคราะห์ข้อมูล

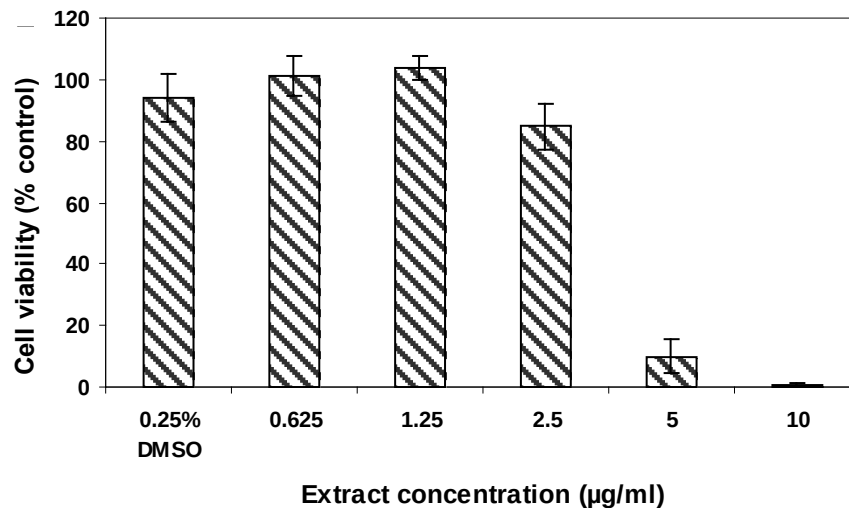
การทดลองทั้งหมดจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ข้อมูลที่ได้จะนำมาวิเคราะห์ โดยใช้ค่าทางสถิติ ANOVA ในการประเมินความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างกลุ่ม treatment และกลุ่มควบคุม

บทที่ 3

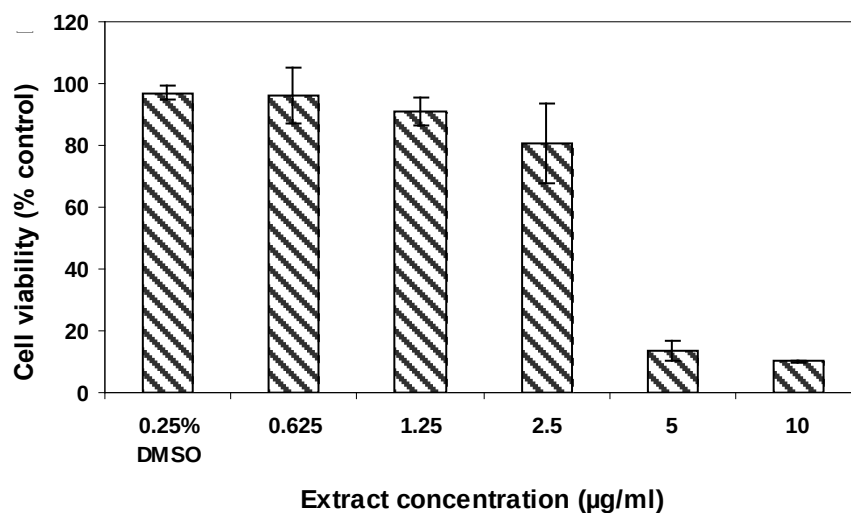
ผลการทดลอง (Results)

ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยง

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ SW480 cell line โดยเลี้ยงเซลล์ ใน 96 well microplate ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.625, 1.25, 2.5, 5.0 และ 10.0 $\mu\text{g/ml}$) 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 $\mu\text{g/ml}$) ยังสามารถทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มีการแบ่งตัว และยังมีการเจริญเติบโตที่ลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control cell) ส่วนสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นสูงๆ ตั้งแต่ 5.0 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไปทำให้จำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ลดลงไปจำนวนมาก คาดว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงอาจจะเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เกิดภาวะ necrosis หรือ apoptosis โดยเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายหรือทำให้เกิดการหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ โดยรบกวนกระบวนการ cell cycle ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเมื่อทำการทดสอบ cell viability ด้วยวิธี crystal violet staining assay (รูปที่ 2) พบว่าลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นไปตามลักษณะเช่นเดียวกับวิธี MTT assay กล่าวคือ ที่ความเข้มข้นต่ำของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง เซลล์ยังมีการเจริญเติบโตลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control cell) ส่วนสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นสูงๆ ตั้งแต่ 5.0 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไปทำให้จำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ลดลงไปอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

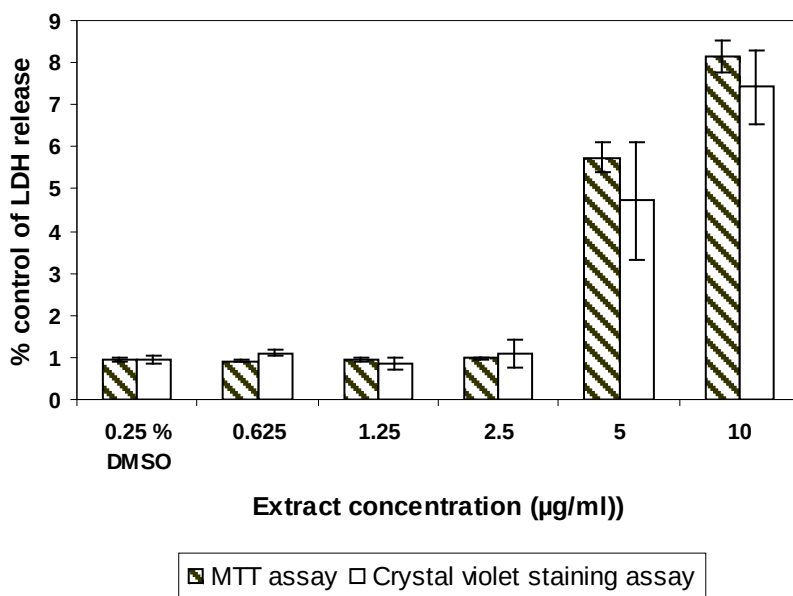


รูปที่ 1 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cell line เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเป็น 0.25% หลังจากนั้น 24 ชม วัดจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่ด้วย MTT assay กลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด แสดงผลเป็น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

นอกจากการทดสอบฤทธิ์สารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ด้วย 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 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไป มีการหลั่งของ LDH เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง จากผลการทดลองดังกล่าว คาดว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงตั้งแต่ 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\pm$ SEM) จาก 3 การทดลอง

ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยง

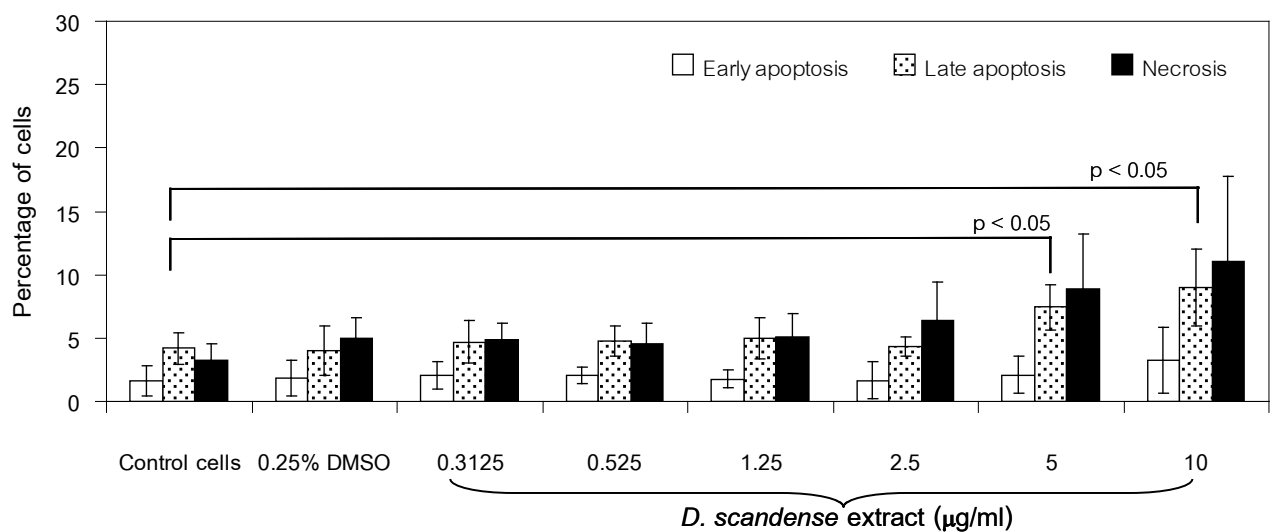
ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการตายแบบ apoptosis ของ SW480 cell line ด้วยชุดทดสอบ annexin-V FITC apoptosis detection kit และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง flow cytometer ซึ่งทำได้โดยการ เลี้ยงเซลล์ SW480 จำนวน 7×10^5 เซลล์ ใน 60-mm cell culture dish และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.625, 1.25, 2.5, 5.0 และ 10.0 $\mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 24 ชม พบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไปมีผลทำให้ปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้น 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ 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 ($\mu\text{g/ml}$)	เซลล์มีชีวิต (Live cells)	ระยะแรกของการตายแบบ cell apoptosis	ระยะสุดท้ายของการตายแบบ 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	$87.58 \pm 1.08^*$	1.67 ± 1.43	4.34 ± 0.80	6.42 ± 3.00
5.0	$81.58 \pm 4.36^*$	2.09 ± 1.46	$7.43 \pm 1.79^*$	8.91 ± 4.27
10.0	$76.77 \pm 5.66^*$	3.29 ± 2.60	$8.94 \pm 3.03^*$	11.01 ± 6.71

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นร้อยละของเซลล์ทั้งหมด โดยเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

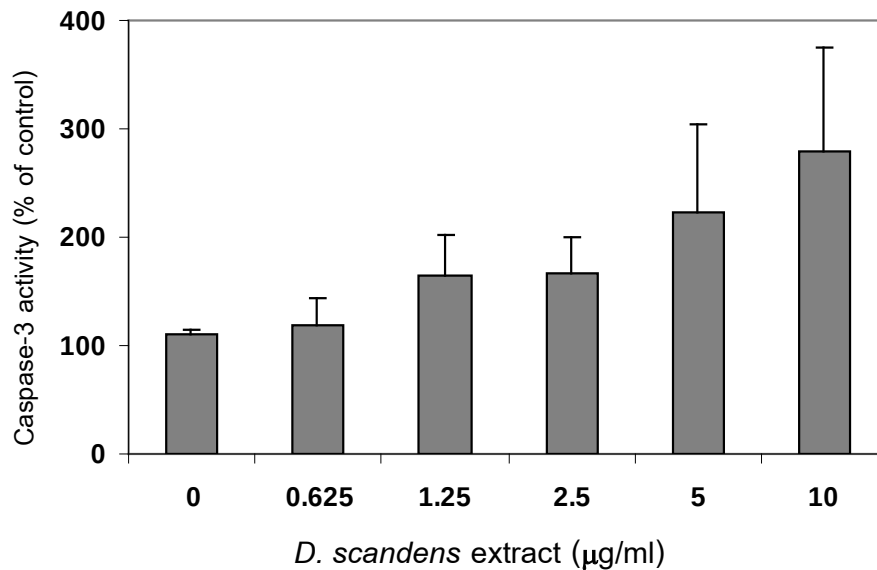
* $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control cell)



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 แต่ถึงอย่างไรก็ตามก็ไม่มีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

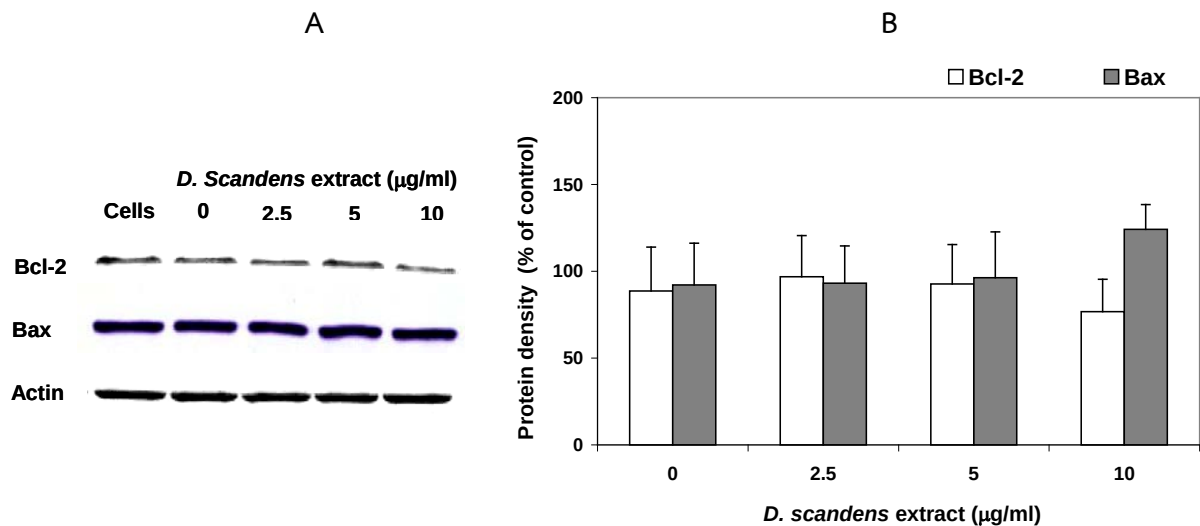


รูปที่ 5 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการทำงานของ caspase-3 activity ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 cell line เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเป็น 0.25% หลังจากนั้น 24 ชม จากนั้นไปวัดการทำงานของ caspase-3 activity ด้วย Caspase-3 assay kit แสดงผลเป็น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

ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax

การเกิดกระบวนการตายแบบ 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 มีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 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

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง (Conclusion & Discussion)

อภิปรายผล

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ SW480 cell line ด้วยวิธี MTT assay และ Crystal violet staining assay โดยมีแนวโน้มของการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่เป็นไปในทางเดียวกัน พบว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นต่ำๆ (0.625-2.5 $\mu\text{g/ml}$) ยังสามารถทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้มีการแบ่งตัว และยังมีการเจริญเติบโตที่ลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control cell) ซึ่งอาจจะเป็นการตายแบบภาวะ apoptosis ส่วนสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นสูงๆ ตั้งแต่ 5.0 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไปทำให้จำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ลดลงไปจำนวนมาก และเมื่อยืนยันผลโดยการศึกษาการหลั่ง LDH ก็ให้ผลที่เป็นไปในทางเดียวกัน พบว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นสูงๆ จะสามารถเหนี่ยวนำให้มีการหลั่ง LDH มากขึ้น ซึ่ง LDH เป็นเอนไซม์ที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ที่ตายแบบ necrosis ดังนั้นที่ความเข้มข้นสูงๆ ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง เซลล์อาจจะมีการตายแบบ necrosis

จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงมีสารสำคัญพวก isoflavone เช่น genistein และอนุพันธ์ ซึ่งมีรายงานทางระบาดวิทยาว่าประชากรที่รับประทานอาหารที่มี isoflavone สูง เช่น ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองที่มี genistein และ daidzein เป็นส่วนประกอบหลัก จะช่วยลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งเต้านม และลดอัตราการตายจากมะเร็งต่อมลูกหมากได้ [12] ในการศึกษาสารสกัดเถาวัลย์เปรียง อาจจะเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายทั้งภาวะที่เป็นแบบ necrosis หรือ apoptosis หรือทำให้เกิดการหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ จึงได้มีการศึกษาการทำงานของ caspase-3 activity ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis [13] โดยศึกษาในระยะยาว เป็นเวลา 24 ชม พบว่าการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเพิ่มมากขึ้น แต่จากการทดลองจะพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ดื่มอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับการวัดเซลล์ apoptosis ด้วยเครื่อง flow cytometer ที่พบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงมีการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น แต่เซลล์ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในระยะสุดท้ายของกระบวนการตายแบบ apoptosis ซึ่งใกล้เคียงกับการตายของเซลล์แบบ necrosis มาก จึงอาจเป็นไปได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะความเข้มข้นที่ 5-10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบ apoptosis ในระยะสุดท้ายก่อนที่ membrane จะเสียหายและแตกออก จนกลายเป็นการตายแบบ necrosis ทำให้ตรวจพบการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 เพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม เนื่องจากเซลล์บางส่วนมีการตายแบบ necrosis ร่วมด้วย

กระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis นอกจากเกี่ยวข้องกับกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ยังเกี่ยวข้องกับโปรตีนในกลุ่มของ Bcl-2 family Bcl-2 เป็นโปรตีนที่ยับยั้งหรือลดการทำงานของกระบวนการ apoptosis และในทางตรงกันข้าม Bax เป็นโปรตีนที่กระตุ้นหรือส่งเสริม

ให้เกิด กระบวนการ apoptosis ภายในเซลล์ [14] ในการทดสอบสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax จากการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงสูงขึ้น (5-10 $\mu\text{L/ml}$) การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax แปรผกผันกัน กล่าวคือ Bcl-2 มีแนวโน้มลดลง ในขณะที่โปรตีน Bax มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 จากการศึกษาครั้งนี้จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงอาจจะเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 เกิด cell apoptosis โดยเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax แต่เนื่องจากข้อมูลที่ได้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ จึงอาจเป็นไปได้ว่า การที่สารสกัดเถาวัลย์เปรียงมีผลต่อการลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อาจจะเป็นผลจากการตายของเซลล์แบบ necrosis มากกว่าการตายแบบ apoptosis ดังจะเห็นได้จากการหลังของเอนไซม์ LDH ที่เพิ่มขึ้น

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดเถาวัลย์เปรียงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ โดยสามารถเหนี่ยวนำเซลล์ให้มีการตายทั้งแบบ apoptosis และ necrosis ได้ เนื่องจากมีองค์ประกอบที่สำคัญพวก isoflavone และอนุพันธ์ต่างๆ ของ isoflavone ดังนั้น จากผลการทดลองเถาวัลย์เปรียงจึงสามารถพัฒนาให้มีศักยภาพเพิ่มมากขึ้นในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Jemal, A., F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman. (2011). Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, **61**(2), 69-90.
- [2] Gross, M.D. (2005). Vitamin D and Calcium in the Prevention of Prostate and Colon Cancer: New Approaches for the Identification of Needs. **J. Nutr.**, **135**(2), 326-331.
- [3] Labianca, R., G.D. Beretta, B. Kildani, L. Milesi, F. Merlin, S. Mosconi, et al. (2010). Colon cancer. **Crit Rev Oncol Hemat**, **74**(2), 106-133.
- [4] Ferguson, L.R. (2005). Does a diet rich in dietary fibre really reduce the risk of colon cancer? **Digest Liver Dis**, **37**(3), 139-141.
- [5] Roynette, C.E., P.C. Calder, Y.M. Dupertuis, and C. Pichard. (2004). n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clin Nutr**, **23**(2), 139-151.
- [6] Campbell, S.E., W.L. Stone, S.G. Whaley, M. Qui, and K. Krishnan. (2003). Gamma (gamma) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (gamma) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. **BMC Cancer**, **3**, 25.
- [7] Marian, B. (2002). In vitro models for the identification and characterization of tumor-promoting and protective factors for colon carcinogenesis. **Food Chem Toxicol**, **40**(8), 1099-1104.
- [8] Ferguson, L.R., M. Philpott, and N. Karunasinghe. (2004). Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**, **198**(1-3), 147-159.
- [9] Bonnesen, C., I.M. Eggleston, and J.D. Hayes. (2001). Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. **Cancer Res**, **61**(16), 6120-6130.
- [10] Qu, H., R.L. Madl, D.J. Takemoto, R.C. Baybutt, and W. Wang. (2005). Lignans are involved in the antitumor activity of wheat bran in colon cancer SW480 cells. **J Nutr**, **135**(3), 598-602.

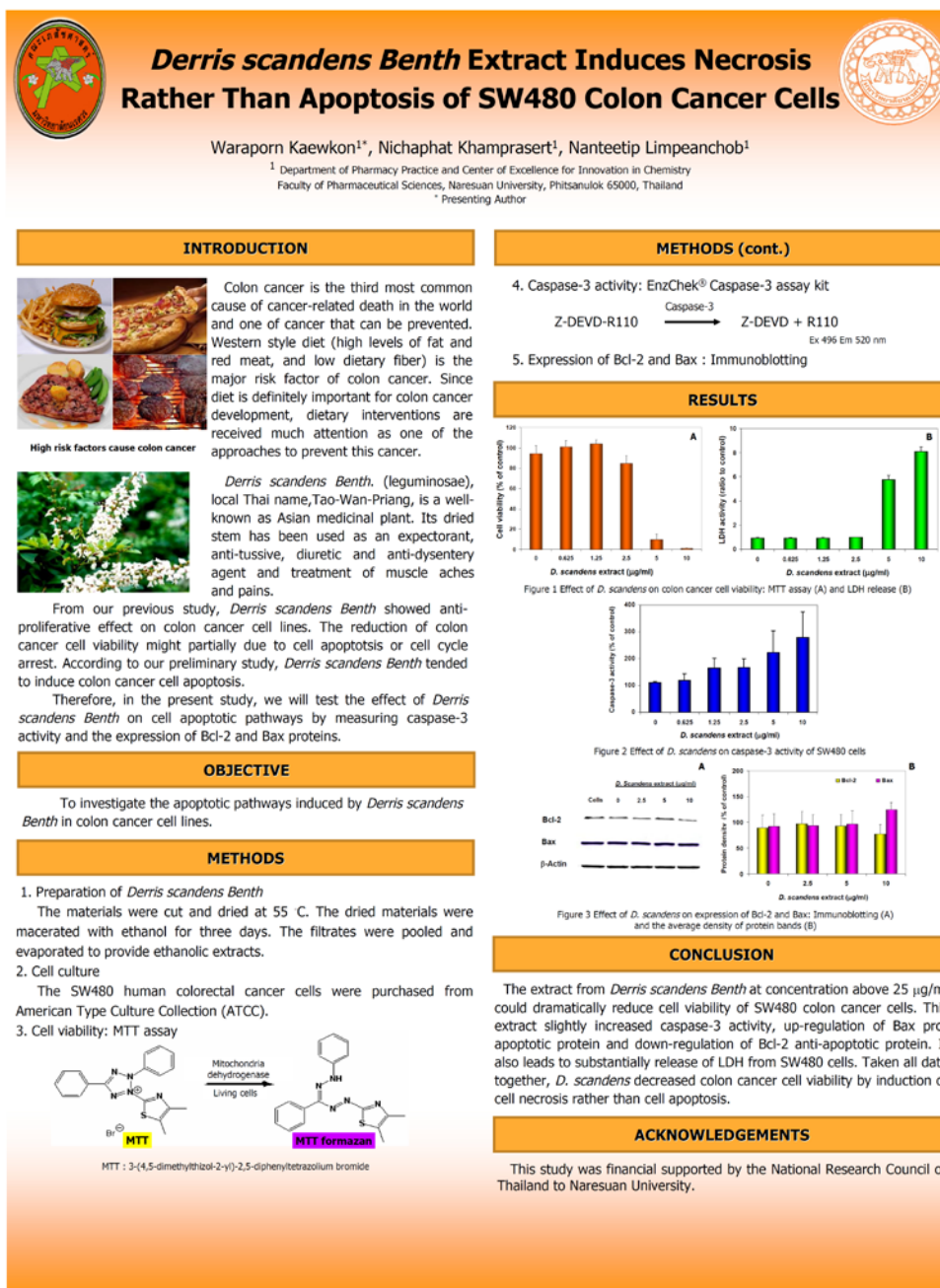
- [11] Sharma, R.K., P.A. Netland, M.A. Kedrov, and D.A. Johnson. (2009). Preconditioning protects the retinal pigment epithelium cells from oxidative stress-induced cell death. **Acta Ophthalmol**, **87**(1), 82-88.
- [12] Laupattarakasem P, S.B., Laupattarakasem W (2007). Antimigration of cancer cells by *Derris scandens* on cholangiocarcinoma cells. **J Srinagarind Med**, **22**(4), 339-345.
- [13] Park, H.J., M.J. Kim, E. Ha, and J.H. Chung. (2008). Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. **Phytomedicine**, **15**(1-2), 147-151.
- [14] Youle, R.J. and A. Strasser. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, **9**(1), 47-59.

ผลลัพธ์ (Output)

1. การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมระดับชาติ

รูปแบบ การนำเสนอโปสเตอร์

งานประชุมวิชาการครั้งที่ 33 สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ณ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วันที่ 17-19 มีนาคม 2554



2. เผยแพร่บทความวิจัยในวารสารระดับชาติ

- เรื่อง** *Derris scandens Benth* Extract Induces Necrosis Rather Than Apoptosis of SW480 Colon Cancer Cells
- วารสาร** Thai Journal of Pharmacology Volume 33, Number 2, 2011, page 118-121
- ผู้วิจัย** Woraporn Kaewkon, Nichapat Khamprasert, Nanteetip Limpeanchob
- (บทความวิจัยแนบท้ายภาคผนวก)

ภาคผนวก (Index)

ตารางที่ 1 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ SW480 โดยวิธี MTT assay

ความเข้มข้นของสารสกัด เถาวัลย์เปรียง ($\mu\text{g/ml}$)	Cell viability (% of control)			Mean	SEM
	การทดลอง ครั้งที่ 1	การทดลอง ครั้งที่ 2	การทดลอง ครั้งที่ 3		
Control	100.0	100.0	100.0	100.0	0.00
0.25 % DMSO	83.0	105.0	95.0	94.3	7.76
0.625	91.5	108.9	103.0	101.1	6.23
1.25	98.5	109.4	103.7	103.9	3.84
2.5	73.0	92.7	88.8	84.8	7.36
5.0	5.9	4.9	18.7	9.8	5.45
10.0	0.7	0.0	1.6	0.8	0.57

หมายเหตุ Control เป็นเซลล์ที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ SW480 โดยวิธี Crystal violet assay

ความเข้มข้นของสารสกัด เถาวัลย์เปรียง ($\mu\text{g/ml}$)	Cell viability (% of control)			Mean	SEM
	การทดลอง ครั้งที่ 1	การทดลอง ครั้งที่ 2	การทดลอง ครั้งที่ 3		
Control	100.0	100.0	100.0	100.0	0.00
0.25 % DMSO	100.7	94.6	95.3	96.9	2.33
0.625	86.9	90.2	110.7	95.9	9.09
1.25	83.9	94.3	95.2	91.1	4.44
2.5	59.4	89.1	92.7	80.4	12.94
5.0	12.5	10.0	18.8	13.8	3.20
10.0	10.3	10.6	9.3	10.1	0.49

หมายเหตุ Control เป็นเซลล์ที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการตายแบบ necrosis ของเซลล์ SW480 โดยวิธี MTT assay

ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง ($\mu\text{g/ml}$)	% control of necrotic cells			Mean	SEM
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3		
Control	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
0.25 % DMSO	0.96	0.97	0.85	0.93	0.05
0.625	0.95	0.92	0.88	0.92	0.02
1.25	0.94	0.86	1.00	0.93	0.05
2.5	1.00	0.94	1.00	0.98	0.03
5.0	6.09	5.98	5.18	5.75	0.35
10.0	8.23	7.60	8.65	8.16	0.37

หมายเหตุ Control เป็นเซลล์ที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการตายแบบ necrosis ของเซลล์ SW480

ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง ($\mu\text{g/ml}$)	% control of LDH release			Mean	SEM
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3		
Control	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
0.25 % DMSO	1.06	0.82	0.93	0.94	0.09
0.625	0.98	1.19	1.15	1.11	0.08
1.25	1.06	0.73	0.79	0.86	0.12
2.5	1.65	0.81	0.86	1.11	0.34
5.0	6.61	4.91	2.64	4.72	1.41
10.0	8.53	6.08	7.65	7.42	0.88

หมายเหตุ Control เป็นเซลล์ที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12

ตารางที่ 5 การทำงาน caspase-3 activity ของเซลล์ SW480 เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัด
เถาวัลย์เปรียงในเวลา 24 ชม (long term)

ความเข้มข้นของสารสกัด เถาวัลย์เปรียง (µg/ml)	Caspase-3 activity			Mean	SEM
	การทดลอง ครั้งที่ 1	การทดลอง ครั้งที่ 2	การทดลอง ครั้งที่ 3		
Control	468.53	479.38	619.56	522.49	59.57
0.25 % DMSO	478.09	448.23	605.68	510.67	59.14
0.625	418.35	417.32	535.66	457.11	48.10
1.25	438.12	518.02	591.44	515.86	54.22
2.5	494.02	606.21	618.86	573.03	48.59
5.0	508.91	584.19	547.71	546.94	26.62
10.0	466.11	609.83	561.48	545.81	51.71

หมายเหตุ Control เป็นเซลล์ที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12

ตารางที่ 6 การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ของเซลล์ SW480 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัด
เถาวัลย์เปรียงความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม

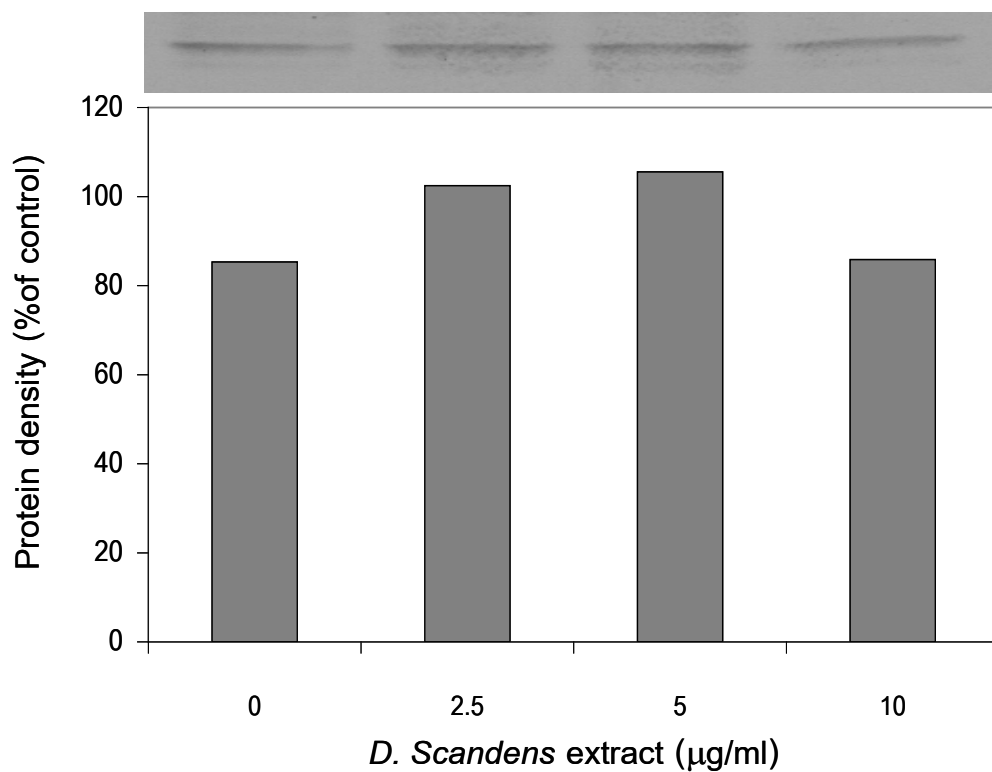
ความเข้มข้นของสารสกัด เถาวัลย์เปรียง (µg/ml)	Density (% control)			Mean	SD
	การทดลอง ครั้งที่ 1	การทดลอง ครั้งที่ 2	การทดลอง ครั้งที่ 3		
control	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
0.25% DMSO	85.29	65.11	115.41	88.60	25.31
2.5	102.46	70.74	117.20	96.80	23.74
5	105.53	66.57	106.10	92.74	22.66
10	85.84	55.42	89.11	76.79	18.58

หมายเหตุ Control เป็นเซลล์ที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12

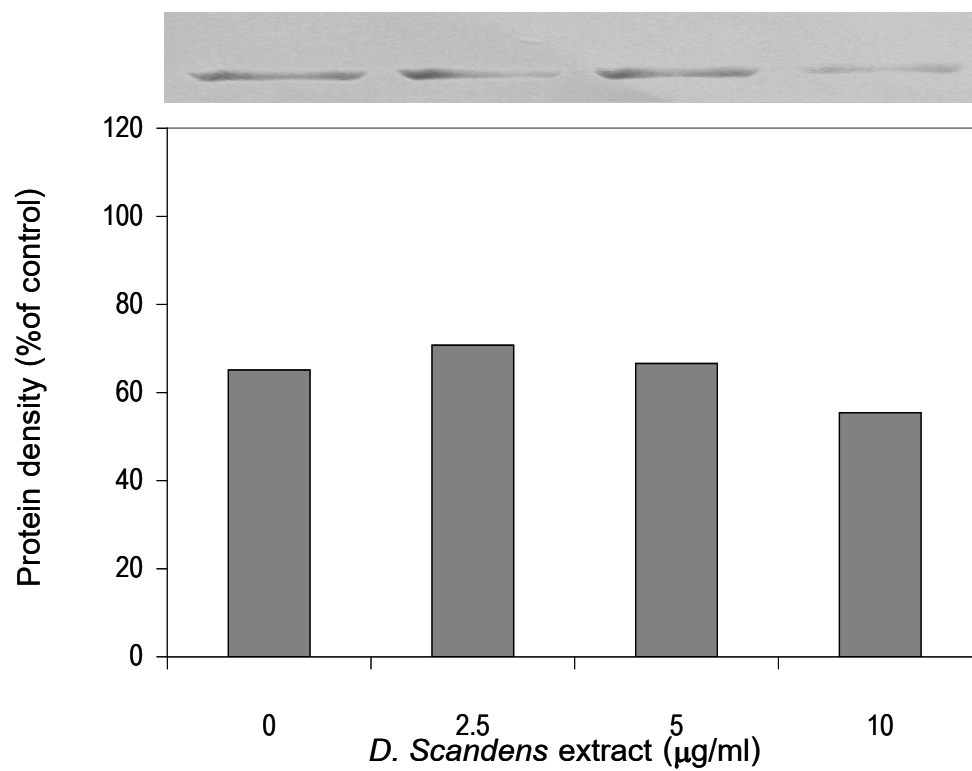
ตารางที่ 7 การแสดงออกของโปรตีน Bax ของเซลล์ SW480 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัด
ถั่วลิสงปริมาณความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม

ความเข้มข้นของสารสกัด ถั่วลิสง (µg/ml)	Density (% control)			Mean	SD
	การทดลอง ครั้งที่ 1	การทดลอง ครั้งที่ 2	การทดลอง ครั้งที่ 3		
control	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
0.25% DMSO	113.05	65.87	97.40	113.05	65.87
2.5	107.60	68.38	103.33	107.60	68.38
5	112.11	65.64	110.97	112.11	65.64
10	135.00	108.04	129.54	135.00	108.04

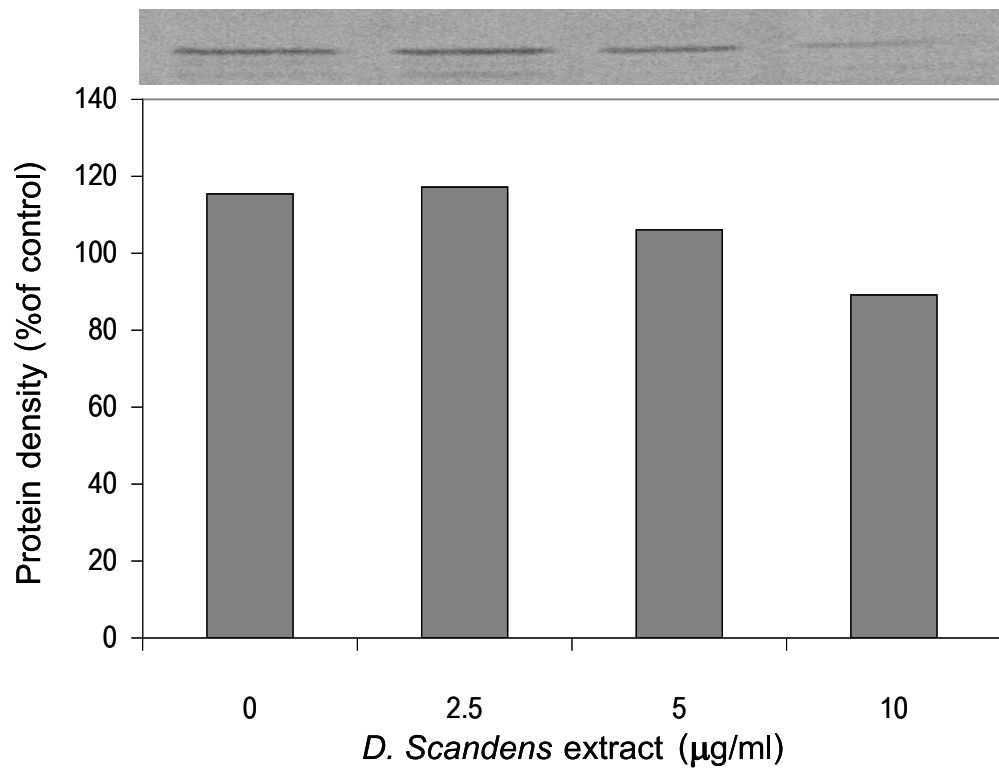
หมายเหตุ Control เป็นเซลล์ที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12



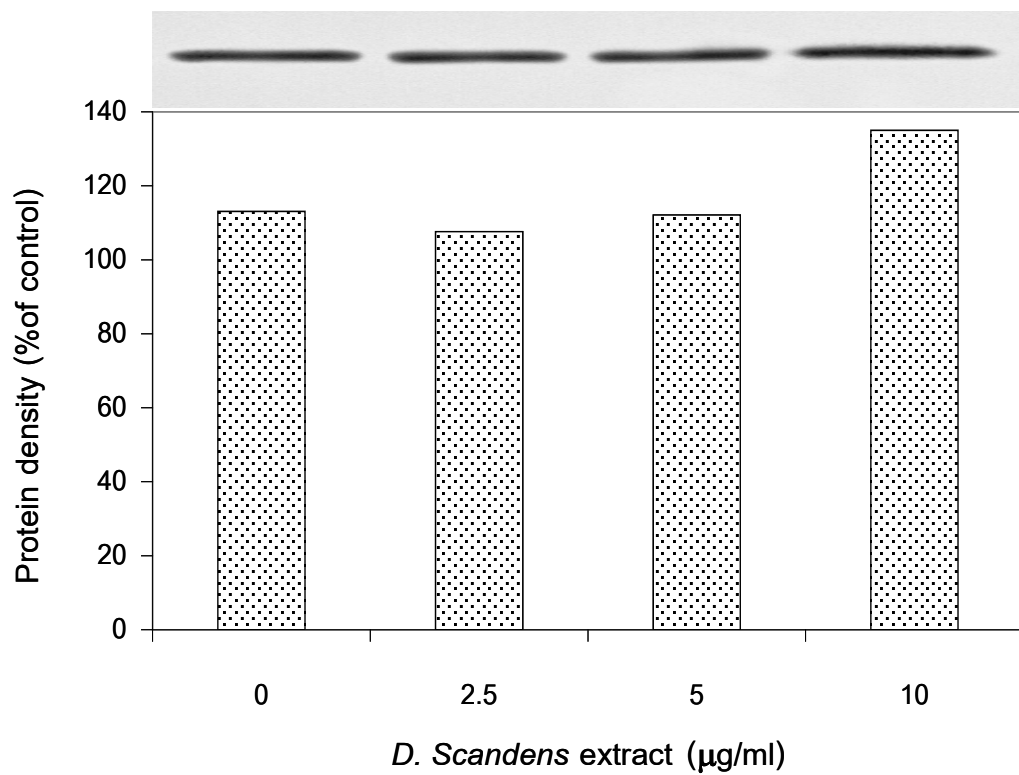
รูปที่ 1 การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ของเซลล์ SW480 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม ด้วยวิธี western blot ครั้งที่ 1



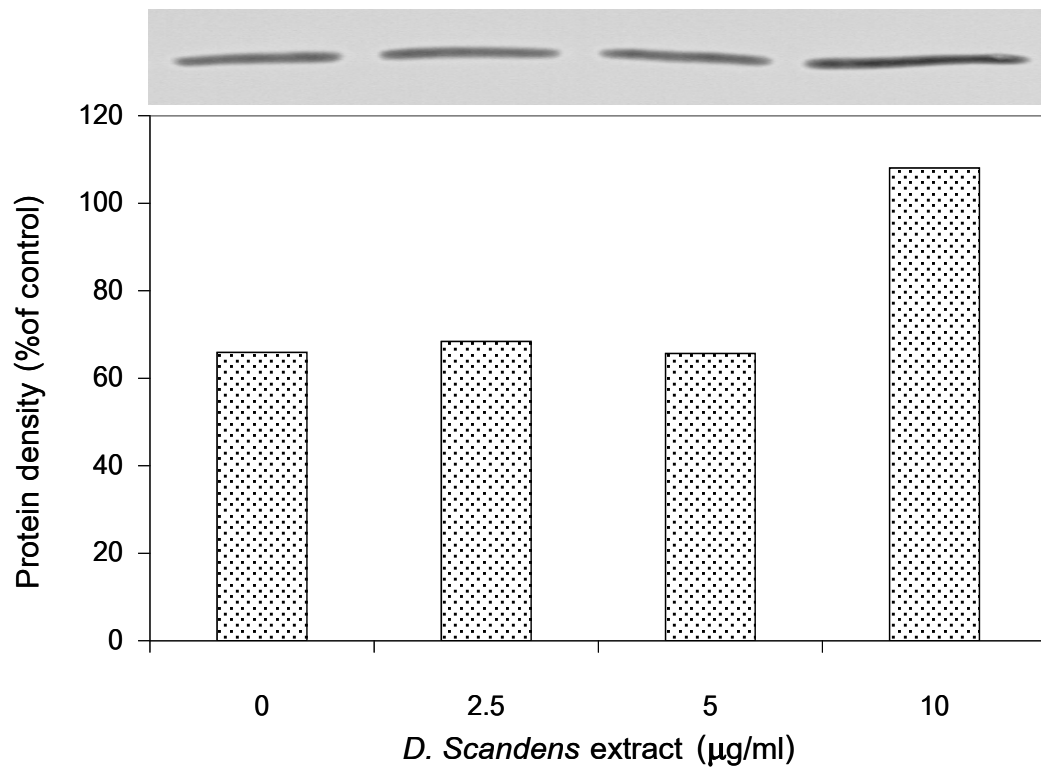
รูปที่ 2 การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ของเซลล์ SW480 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัด
เถาวัลย์เปรียงความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม ด้วยวิธี western blot ครั้งที่ 2



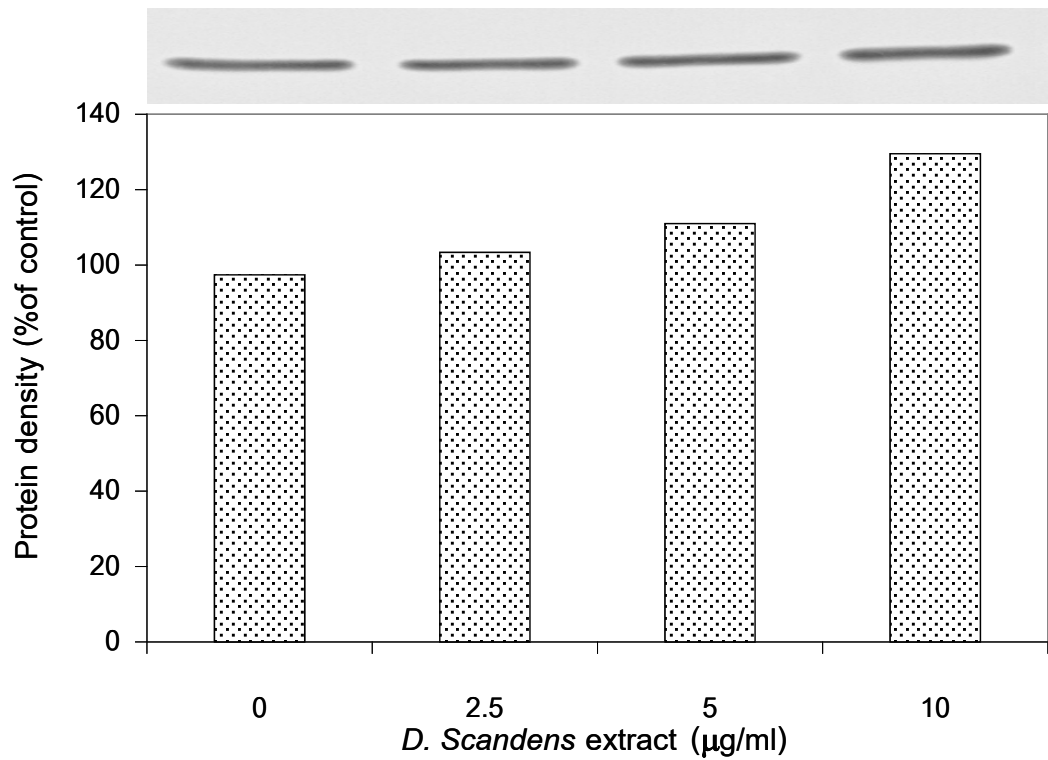
รูปที่ 3 การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ของเซลล์ SW480 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัด
เถาวัลย์เปรียงความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม ด้วยวิธี western blot ครั้งที่ 3



รูปที่ 4 การแสดงออกของโปรตีน Bax ของเซลล์ SW480 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัด
เถาวัลย์เปรียงความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม ด้วยวิธี western blot ครั้งที่ 1



รูปที่ 5 การแสดงออกของโปรตีน Bax ของเซลล์ SW480 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัด
เถาวัลย์เปรียงความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม ด้วยวิธี western blot ครั้งที่ 2



รูปที่ 6 การแสดงออกของโปรตีน Bax ของเซลล์ SW480 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัด
เถาวัลย์เปรียงความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม ด้วยวิธี western blot ครั้งที่ 3