

โครงการวิจัยที่ 1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญจากมังคุดเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง

Study activities of major constituents isolated from mangosteen as chemotherapy for cancers

1. บทนำ

เนื่องจากมังคุดเป็นตัวอย่างของผลไม้ไทย ที่มีการใช้ในภูมิปัญญาไทย ในการรักษาโรคหลายชนิด จากรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของกลุ่มต่างๆ และของคณะผู้วิจัยทำให้ทราบศักยภาพเบื้องต้นที่น่าสนใจอย่างยิ่งของมังคุดในการนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคต่างๆ โดยขณะนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาและทำการแยกสารบริสุทธิ์และสารกึ่งบริสุทธิ์จากมังคุดจากสารสกัดอัลกอฮอล์ได้ คือ α -mangostin, garcinone D และ partially purified flavonoids จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า สารสกัดเบื้องต้นก่อนการแยกให้บริสุทธิ์มีคุณสมบัติที่มีศักยภาพสูง ในการนำมาประยุกต์ใช้ด้านด้านการแบ่งตัวของมะเร็ง และฤทธิ์ antioxidant ที่มีประสิทธิภาพสูงมาก

สำหรับงานวิจัยที่นำเสนอในระยะเวลา 1 ปีนี้ จะนำความรู้และการวิจัยที่ได้จากการศึกษาต่อเนื่องมาในระยะหลายปีที่ผ่านมา นำเปลือกของผลมังคุดที่เป็นขยะที่ไร้มูลค่าและเปลือกเป็นส่วนที่หาได้ง่ายเหลือทิ้งจากการรับประทาน นำมาแยกสารสำคัญที่มีปริมาณมากในเปลือกคือ α -mangostin เนื่องจากกลุ่มผู้วิจัยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งเต้านมและมะเร็งรังไข่ จึงได้เริ่มการศึกษาโดยคัดเลือกมะเร็งกลุ่มนี้มาศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยาเริ่มต้นของสาร α -mangostin ที่แยกได้จากมังคุด ทั้งทางด้านฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและกลไกการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์และมีผลการศึกษาที่ได้ทำมาในระดับหนึ่ง แต่ยังไม่สมบูรณ์ทั้งหมดในรูปแบบที่เสนอในโครงการนี้ ดังนั้นเพื่อที่จะอธิบายฤทธิ์และกลไกของสาร α -mangostin ในด้านต่างๆ ให้ได้ชัดเจนโดยการศึกษาใน cell lines ชนิดต่างๆ ให้ได้ผลครอบคลุมและเปรียบเทียบผลกันได้ โดยเปรียบเทียบกับยาควบคุมที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดนั้นๆ ที่ใช้ในปัจจุบันก่อนนำมาศึกษาต่อในสัตว์ทดลองและการประยุกต์ใช้ในมนุษย์ต่อไป เซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ที่จะใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นเซลล์ที่ได้มีการศึกษาอยู่ในห้องปฏิบัติการแล้วส่วนหนึ่ง และได้จัดหาเซลล์ที่จะใช้ศึกษาโดยคัดเลือกมะเร็งชนิดที่เป็นปัญหาของสุขภาพของประเทศไทยที่ควรนำมา ร่วมในการศึกษาค้นคว้า ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมที่เป็นชนิด types ต่างๆ (4 ชนิด) เซลล์มะเร็งรังไข่ (2 ชนิด) เซลล์มะเร็งลำไส้ (3 ชนิด) เซลล์มะเร็งตับ (1 ชนิด) และ เซลล์ควบคุม รวมเป็นเซลล์ทั้งหมดประมาณ 10 cell lines โดยจะทำการศึกษาระบบการ ต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ การเกิดกระบวนการ apoptosis ที่ศึกษากลไกการเกิดในหลายด้านในระดับเซลล์ signal proteins และ gene expression, tumor marker gene expression เช่น cytokeratin เป็นต้นของเซลล์ดังกล่าว ฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยศึกษาปฏิกิริยาทางเคมี และผลต่อเซลล์ และท้ายสุดศึกษากลไกของสารต่อภูมิคุ้มกัน (immunomodulation)

สรุปวัตถุประสงค์

- (1) เพื่อตรวจฤทธิ์เบื้องต้นที่เกี่ยวข้องกับการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของสารบริสุทธิ์ (แอลฟาแมงโกสติน) จากเปลือกมังคุด ที่แยกได้จากโครงการในแผนงานวิจัย
- (2) เพื่อตรวจฤทธิ์ด้าน antioxidation ของสารแอลฟาแมงโกสติน โดยเป็นการทดสอบทางปฏิกิริยาทางเคมี และที่ตรวจผลด้วยเซลล์
- (3) เพื่อตรวจฤทธิ์ต้านมะเร็งในระดับลึกลึกศึกษากลไกที่เกิดปฏิกิริยาต่อกระบวนการเกิด apoptosis และการฆ่าเซลล์มะเร็งที่ชัดเจน (10 cell lines) และตรวจระดับ tumor markers และ gene expression ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกต่าง ๆ นั้น ก่อนและภายหลังการทดสอบกับสารแอลฟาแมงโกสติน (gene หลายชนิดยังไม่มีผู้รายงาน)
- (4) เพื่อตรวจผลของสารแอลฟาแมงโกสตินที่มีต่อระบบของภูมิคุ้มกัน (immunomodulation) เป็นแนวทางการศึกษาในสมุนไพรอื่น ต่อไป

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

มังคุด	(Mangosteen)
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Garcinia mangostana</i> L.
ชื่อวงศ์	Guttiferae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้ยืนต้นสูงประมาณ 10-12 เมตร ทุกส่วนมียางสีเหลือง ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปไข่หรือรูปวงรีแกมขอบขนาน กว้าง 6-11 ซม. ยาว 15-25 ซม. เนื้อใบหนาและค่อนข้างเหนียวคล้ายหนัง หลังใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ท้องใบสีอ่อนกว่า ดอกเดี่ยวหรือเป็นคู่ออกที่ซอกใบใกล้ปลายกิ่ง สมบูรณ์เพศหรือแยกเพศ กลีบเลี้ยงสีเขียวอมเหลือง กลีบดอกสีแดง ฉ่ำน้ำ ผลเป็นผลสด ค่อนข้างกลม (สมุนไพรพื้นบ้าน, 2542)

ส่วนที่ใช้

ราก ทำให้ประจำเดือนมาตามปกติ รักษาโรคบิดมูกเลือด, ต้น รักษาโรคบิดมูกเลือด, เปลือกต้น ขะล้าบดแผล รักษาแผล, ใบ รักษาโรคบิดมูกเลือด, ดอก รักษาโรคบิดมูกเลือด, ผลดิบ สมานแผล แก้บาดแผล แก้ท้องร่วง, เปลือกผล แก้แผลเป็นหนอง แก้แผลเปื่อย แก้บิดมูกเลือด (สมุนไพรพื้นบ้าน, 2542)

องค์ประกอบทางเคมี

ประกอบด้วย xanthone, mangostin, tannin, chrysanthemin, garcinone, gartanin, mangostanol, mangostinone, vitamin B1, B2, C (สมุนไพรพื้นบ้าน, 2542; Moongkarndi et al., 2004) เป็นต้น

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

สารจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ต้านเชื้อรา, ยับยั้งเอนไซม์ viral reverse transcriptase และ HIV protease, ต้านเชื้อมาลาเรีย, แก้ท้องเดิน, ต้าน histamine, ต้าน serotonin, ลดการอักเสบ ลดการเกิดแผลในทางเดินอาหาร, ยับยั้งเอนไซม์ DNA topoisomerases I และ II, จับกับอนุมูลอิสระ ต้านออกซิเดชัน, ต้านมะเร็ง, เพิ่มความดันโลหิต (สมุนไพรรพพื้นบ้าน, 2542; Moongkarndi et al., 2004) เป็นต้น

การวิจัยในประเทศไทย พบว่าสารสกัดหยาบ (crude extract) จากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วย methanol สามารถการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม (SKBR3) โดยมีค่า ED50 ที่ความเข้มข้น $9.25 \pm 0.64 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis โดยตรวจสอบจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidation) รวมถึงการยับยั้งการเกิด Reactive Oxygen Species (ROS reduction) อีกด้วย (Moongkarndi et al., 2004)



Mangostin

เป็นสารกลุ่ม phenolic compounds ตัวหนึ่ง ซึ่งอนุพันธ์ของ xanthone มีชื่อทางเคมี คือ 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2,8-bis-(3-methyl-2-butenyl)-9H-xanthen-9-one หรือ 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2,8-di(3-methyl-2-butenyl) xanthone (The Merck Index, 1996) และยังแบ่งเป็น α , beta และ gamma-mangostin ขึ้นกับหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง hydroxyl (-OH) ดังแสดงในรูปที่ 3 (Matsumoto et al., 2004) ในด้านของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่า α -mangostin สามารถเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ของ human leukemia HL60 cell line โดยกระตุ้นระบบ caspase-3, 9 ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งตรวจการเกิด apoptosis โดยดูจากรูปร่างของเซลล์ที่เปลี่ยนไป และดูจาก cytochrome C/AIF ที่ถูกปลดปล่อยออกมา จากการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีที่สัมพันธ์กับกระบวนการ apoptosis พบว่าการแทนที่หมู่ methoxy ($\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{C}$) โดยหมู่ hydroxyl พบว่าลดความแรงอย่างมีนัยสำคัญ (Matsumoto et al., 2003) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ sphingomyelinase ทำให้กระตุ้นการเกิด apoptosis ของเซลล์ การยับยั้งกระบวนการเกิด oxidative damage ของ LDL ในมนุษย์, การเป็น competitive antagonist ของ histamine ที่ H1 receptor และมีฤทธิ์ต้านเชื้อ Helicobacter pylori (Ikubo et al., 2002) เป็นต้น สำหรับ α -mangostin มีการศึกษาพบว่าสามารถยับยั้งการสร้าง prostaglandin E2 โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-1 และ COX-2 ที่ความเข้มข้น 0.8 และ $2 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ, มีฤทธิ์ต้านเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus (MRSA), มีฤทธิ์ antimalarial และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ monoamine oxidase (Nakatani et al., 2002)

แม้ว่ามังคุดจะมีสรรพคุณทางยาที่น่าสนใจ แต่ว่าข้อมูลการศึกษาวิจัยเชิงวิทยาศาสตร์ยังคงมีน้อยมาก เมื่อเทียบกับพืชสมุนไพรอื่น ๆ ไม่ว่าจะเป็นขมิ้นชัน, ลูกยอ และลูกใต้ใบ เป็นต้น จากฐานข้อมูล online ของ PubMed (www.pubmed.com; accessed September 7, 2010) พบว่ารายงานเกี่ยวกับมังคุดในเชิงวิทยาศาสตร์ มีตัวเลขเพียง 10% ของงานวิจัยที่เกี่ยวกับขมิ้นชัน และพบว่าตั้งแต่ปี ค.ศ.1980 ถึงปัจจุบัน มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับมังคุด *Garcinia mangostana* ถูกตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติรวม 129 เรื่อง จนถึงปี ค.ศ. 2010 ถือว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับพืชสายพันธุ์อื่นใน Genus เดียวกัน (*Garcinia* sp. มี 156 เรื่อง ถึงปี ค.ศ. 2007 และ 523 เรื่อง ในปี ค.ศ. 2010) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยส่วนใหญ่ของมังคุดเกี่ยวข้องกับการศึกษาทางพิษวิทยาของมังคุด ส่วนน้อยแต่ก็มีเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบันที่รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีววิทยา สำหรับสาร mangostin ขณะนี้ถูกตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 92 เรื่อง เมื่อถึงปี ค.ศ. 2010 สำหรับสาร garcinone ขณะนี้ถูกตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ เพียง 11 เรื่อง ถึงปี ค.ศ. 2010 สำหรับส่วน water extract *Garcinia* เพียง 10 เรื่อง ถึงปี ค.ศ. 2010 ดังนั้นจึงเป็นโอกาสดีที่กลุ่มงานวิจัยของเราจะเป็นกลุ่มแรกๆ ที่ศึกษาเกี่ยวกับสารสำคัญที่มีปริมาณมากที่แยกได้จากเปลือกของมังคุดอย่างละเอียด โดยเน้นสำหรับโรคมะเร็ง เพื่อการประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์สำหรับผู้ป่วยในอนาคต

จากรายงานการวิจัยที่กลุ่มงานผู้วิจัยค้นพบและได้ตีพิมพ์แล้ว ทำให้ทราบว่า สารสกัดเมทานอล/เอทานอลจากมังคุด มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม และกระตุ้นขบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis และยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระอย่างน่าสนใจ (Moongkarndi et al., 2004a) รายงานวิจัยที่ถูกตีพิมพ์ในปีเดียวกัน พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดให้ฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม เมื่อเทียบกับสมุนไพรชนิดอื่น ๆ อีก 8 ชนิด (Moongkarndi et al., 2004b) พบว่าสารกลุ่ม xanthenes ที่สกัดได้จากพืชทั่วไปให้ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ และกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งของเซลล์เม็ดเลือดขาวแบบ apoptosis (Pedro et al., 2002) สารกลุ่ม xanthenes เป็นสารกลุ่มหลักที่พบในเปลือกมังคุด เริ่มมีการนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยามากขึ้น นอกจากนั้นได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดอัลกอฮอล์ที่มีฤทธิ์เป็น antioxidant โดยใช้การตรวจสอบทางเคมีต่างๆ การใช้เซลล์และการใช้เครื่องมือพิเศษคือ Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy โดยศึกษาทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* techniques ในโครงการความร่วมมือ JSPS-NRCT Core University Program ซึ่งเป็นโครงการที่ไม่ได้รับงบประมาณในการวิจัยที่ประเทศไทยเป็นเพียงความร่วมมือกับประเทศญี่ปุ่น และ Professor Hideo Utsumi ที่ Kyushu University สนับสนุนให้นักศึกษาที่รับทุนปริญญาเอกกาญจนาภิเษกมีโอกาสทำวิจัยใช้อุปกรณ์วิจัยพิเศษที่ญี่ปุ่นได้นานขึ้น และการศึกษาในขณะนั้นจะศึกษาเพียงสารสกัดอัลกอฮอล์

จากผลการศึกษาเบื้องต้นด้านการต้านมะเร็งของคณะผู้วิจัยพบว่า สารสกัดหยาบ (methanolic crude extract) จากมังคุดเมื่อทำการศึกษา *in vivo* antitumor activity ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของ murine colon cancer NL-17 cells ใน BALB/c mice ในแบบ dose-dependent manner และขนาดที่ให้ผลดีที่สุดคือ

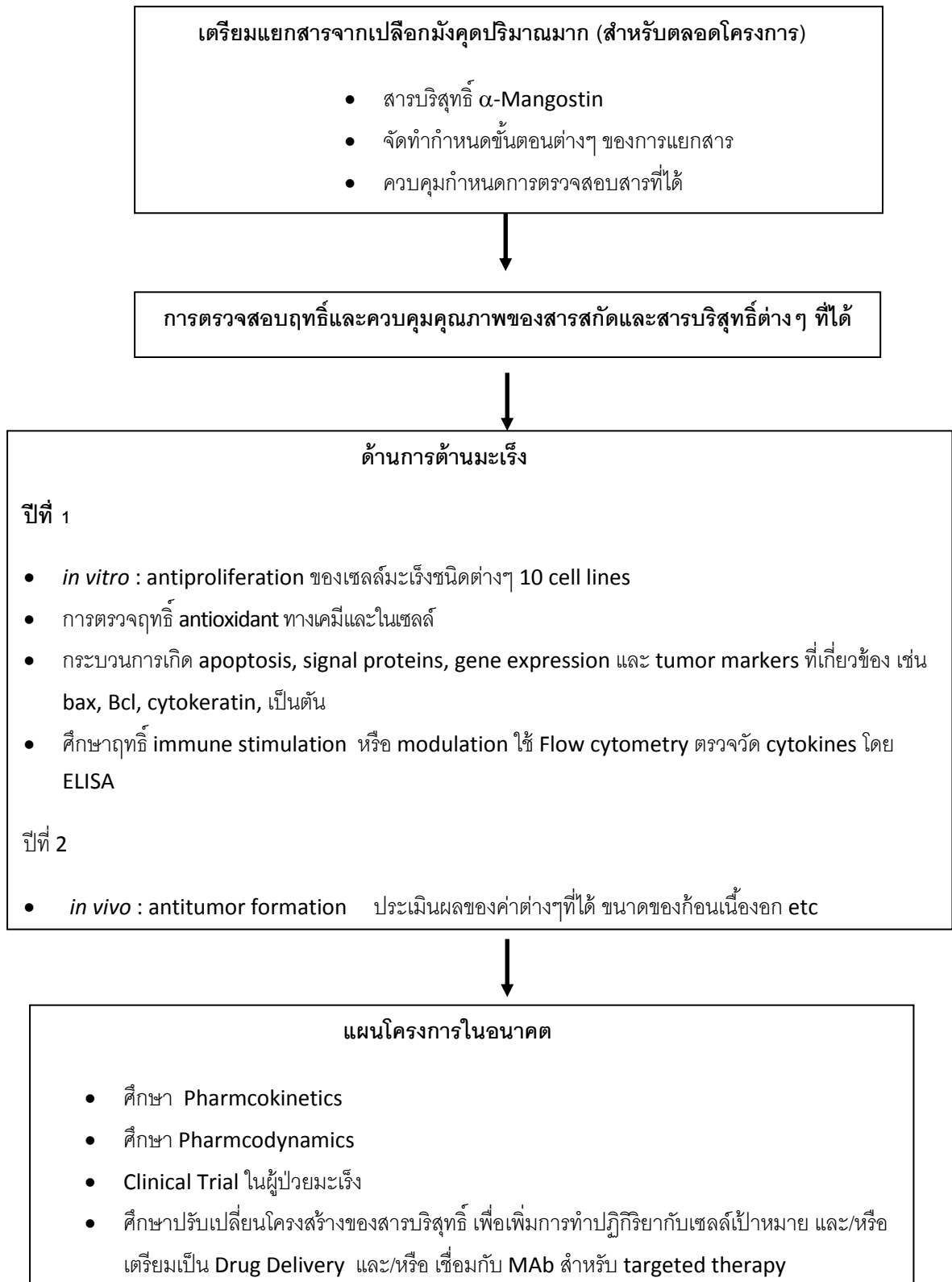
ขนาด 200 mg/kg treated-mice จากผลการทดลองสรุปว่าขนาดของสารสกัดที่ใช้ระหว่าง 100-200 mg/kg/mouse จะมีผล antitumor activity ประมาณ 50-70% ในขณะที่ 5-FU (15 mg/kg/mouse) ที่ใช้เป็น positive control จะให้ผลประมาณ 60.25% ผลของการตรวจทางพยาธิวิทยาที่พบบริเวณของเนื้อมะเร็งมีขนาดลดลงอย่างเด่นชัด นอกจากนี้ life span ของหนูที่ใช้สารสกัดที่ 150 and 200 mg/kg-treated tumor bearing mice ก็ยาวขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ จาก 24 ± 3.16 เป็น 44.6 ± 6.73 และ 47.4 ± 5.59 วัน ตามลำดับ ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาทาง *in vivo* ดังที่นำเสนอ

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาทาง *in vivo* ของ สารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ที่แยกจากมังคุด งานวิจัยที่นำเสนอแสดงถึงฤทธิ์ *in vivo* antitumor activity ของสารสกัดจากมังคุดต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของ murine colon cancer NL-17 cells ใน BALB/c mice ในแบบ dose-dependent manner และขนาดที่ให้ผลดีที่สุดคือขนาด 200 mg/kg treated-mice จากผลการทดลองสรุปว่าขนาดของสารสกัดที่ใช้ระหว่าง 100-200 mg/kg/mouse จะมีผล antitumor activity ประมาณ 50-70% ผลของการตรวจทางพยาธิวิทยาที่พบบริเวณของเนื้อมะเร็งมีขนาดลดลงอย่างเด่นชัด นอกจากนี้ life span ของหนูที่ใช้สารสกัดที่ 150 and 200 mg/kg-treated tumor bearing mice ก็ยาวขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ จาก 24 ± 3.16 เป็น 44.6 ± 6.73 และ 47.4 ± 5.59 วัน ตามลำดับ

มีผลการศึกษาทาง *in vitro* สำหรับสารที่เป็น crude extract และสารที่แยกบริสุทธิ์จากมังคุดในรายงานตั้งแต่ปี 2003-2008 พบว่าสารสำคัญแต่ละชนิดที่แยกได้ โดยเฉพาะสาร mangostin และ garcinone E มีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นยาต้านมะเร็งได้ และอาจมีผลเสริมในการใช้รักษาร่วมกับยาที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน (Pedraza-Chaverri 2008) แต่ละรายงานทำการศึกษากับ cell line บางชนิด จะไม่ได้ศึกษากับเซลล์หลายชนิดแบบที่นำเสนอ ซึ่งผลที่รายงานจากหลายกลุ่มผู้วิจัยจะได้ค่าที่แตกต่างกันและประเมินผลที่เทียบเคียงกันได้ยาก ปัจจุบันยังไม่มีรายงานเพิ่มขึ้นมาก โดยเฉพาะผลที่ทดสอบทาง *in vivo* กับสารบริสุทธิ์ยังไม่มีรายงาน แต่ถ้าที่ใช้กับสาร crude extract ได้มีรายงานที่ได้ผลดีจากกลุ่มที่ผู้วิจัยได้ศึกษา (Kosem et al., 2013)

หากผลที่ได้ทาง *in vitro* ในโครงการปีที่ 1 นี้ เป็นที่น่าพอใจและสาร α -mangostin ให้ผลที่มีศักยภาพที่ควรศึกษาต่อทาง *in vivo* จะนำเสนอโครงการศึกษาต่อทางด้าน antitumor formation ในสัตว์ทดลอง (ในปีที่ 2) ซึ่งมีผลการศึกษาเริ่มต้นและได้ผลดีมีประสิทธิภาพเมื่อใช้ crude methanolic extract (Kosem et al in press) เพื่อนำผลที่ได้ไปประเมินถึงประสิทธิภาพและศักยภาพโดยรวมที่จะนำไปใช้ศึกษาวิจัยต่อไปทางคลินิก เพื่อการประยุกต์ใช้ในมนุษย์ในอนาคต

โครงการการพัฒนายาใหม่จากสารสกัดและสารบริสุทธิ์ จากมังคุดเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษามะเร็ง



3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

เตรียมสารให้มีปริมาณมากสำหรับโครงการวิจัยที่นำเสนอในแผนงานวิจัย และตรวจพิสูจน์ประกันคุณภาพของสารที่ได้ให้มีคุณสมบัติตามที่แยกได้ตามวิธีการที่เตรียมได้แล้ว

3.1. การสกัดสาร และแยกสารให้บริสุทธิ์

การเตรียมอยู่ในแผนงานวิจัย โดยย่อทำการเก็บตัวอย่างเปลือกของผลมังคุด สดหรือตากให้แห้งก่อนบดเป็นผงยา ตรวจการปนเปื้อนทั่วไปในเบื้องต้น หลังจากนั้นทำการหมักด้วย solvents ที่เหมาะสม โดย Soxhlet extractor แล้วเก็บส่วนของ supernatant มาทำให้เข้มข้นก็จะได้ crude extract ต่อมานำ crude extract นี้มาลงใน silica gel column chromatography และทำการสกัดด้วย solvents ต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน เพื่อแยกให้ได้สารกลุ่มต่าง ๆ ตามลำดับความมีขั้ว ทดสอบความบริสุทธิ์ของสาร α -mangostin ด้วยวิธี Thin layer chromatography, HPLC, Mass spectrophotometry, Infrared spectrometry และ NMR เป็นต้น จัดทำกำหนดขั้นตอนต่าง ๆ ของการแยกสาร และการควบคุมกำหนดการตรวจสอบสารที่ได้

3.2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีววิทยา ในหลอดทดลอง *in vitro*

เซลล์ที่ศึกษา 10 ชนิด คัดเลือกมาจากเซลล์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการ และเป็นเซลล์มะเร็งชนิดที่รักษาได้ยาก และมีคนไทยเป็นกันมาก คือ

- เซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3, BT474, BT549, MDA-MB-231, MCF-7 human breast cancer cell lines ต่างๆ
- เซลล์มะเร็งรังไข่ OV-CAR-3, SKOV3 human ovarian cell lines
- เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ CACO-II, SW620 human colon cell lines
- เซลล์มะเร็งตับ HepG2 human hepatocellular liver carcinoma cell line

Cytotoxic drugs ที่ใช้ในการทดลอง และเป็นยาที่เป็นยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งแต่ละชนิด

1. Breast cancer: Doxorubicin/ Paclitaxel (Taxol)/ Melphalan/ Docetaxel/ Cisplatin/ Gemcitabine/ Methotrexate
2. Ovarian cancer: Doxorubicin/Paclitaxel (Taxol)/Melphalan/Irinotecan/Cisplatin/Carboplatin/ Gemcitabine
3. Liver cancer: Doxorubicin/ Mitomycin C
4. Colon, rectum, esophagus or intestine cancer: Doxorubicin/Irinotecan/Mitomycin C

กลไกการออกฤทธิ์ (Mechanisms of action):

1. Doxorubicin: interact with DNA by intercalation and inhibition of macromolecular biosynthesis

2. Paclitaxel (taxol) and Docetaxel: enhance stability of microtubules, preventing the separation of chromosomes during anaphase
3. Cisplatin and Carboplatin: binding to and causing crosslinking of DNA which ultimately triggers apoptosis
4. Irinotecan: A Topoisomerase inhibitor
5. Mitomycin C: A potent DNA crosslinker
6. Melphalan: Alkylating agents

3.3 ศึกษาฤทธิ์ด้านการเจริญและกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis ต่อเซลล์มะเร็งและกลไกของเซลล์มะเร็ง ผลต่อ gene expression

วัดความแรงของสาร α -mangostin ต่อการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT method

วิธีนี้จะวัดความสามารถของเซลล์ที่มีชีวิตในการเปลี่ยนสาร MTT ให้เป็นผลิตภัณฑ์สีม่วง ซึ่งวัดได้ด้วยเครื่อง microplate reader หลังจากทดสอบด้วยสารจากมังคุด เราจะทราบได้ว่าสารสกัดและสารบริสุทธิ์สามารถยับยั้งและฆ่าเซลล์มะเร็งได้กี่เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกและลบ วิธีนี้ทำให้ทราบค่า IC_{50} ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ เพื่อนำค่าที่ได้ไปใช้ในการทดสอบอื่น ๆต่อไป

3.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนสำคัญที่บ่งบอกถึงการเกิด apoptosis และการยับยั้งการเกิดมะเร็ง

โปรตีน/ยีน สัญญาณหลายตัวใช้บ่งบอก pathway apoptosis ในโครงการนี้ได้ศึกษา caspase, cytokeratin ที่พบว่ามีสำคัญในการเปลี่ยนแปลงที่เป็นตัวบ่งบอกการเกิดมะเร็งได้ (tumor marker) การตรวจพบการแสดงออกของยีนเหล่านี้ หลังจากทดสอบเซลล์ชนิดต่างๆด้วยสาร α -mangostin จากเปลือกมังคุด จะทำให้ทำนายกลไกการทำงานของสารได้ ใช้ตรวจด้วย RT-PCR ด้วย real time RT-PCR

3.5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

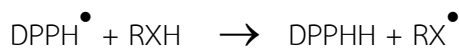
การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาทางเคมี DPPH method

วิธีการทดสอบดังต่อไปนี้ใช้เพื่อตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัด และสารบริสุทธิ์ ได้แก่ การตรวจสอบปริมาณ phenolics ด้วย Folin-Ciocalteu reagent, การตรวจสอบความสามารถในการ reducing โลหะ ferric (III) iron, ตรวจการกำจัด DPPH radical ด้วยการให้โปรตอน, ตรวจสอบความสามารถในการกำจัด nitric oxide radical ด้วย sodium nitroprusside และตรวจสอบความสามารถในการกำจัด Lipid peroxidation ด้วย Linoleic acid emulsion system การศึกษาในโครงการจะใช้วิธีตรวจง่าย ๆ โดย DPPH method

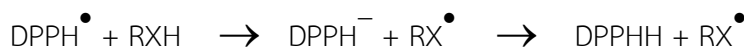
DPPH method

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่มีความคงตัวและดูดกลืนแสงที่ 528 nm หลังจากที่ถูก reduced ด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดจากสมุนไพรหลายชนิดมีความสามารถดังกล่าว ดังนั้น DPPH method จึงเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสมุนไพรในเบื้องต้น เนื่องจากการทดสอบที่ง่ายและสะดวกรวดเร็ว ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง DPPH และสารสกัด มีโอกาสเกิดขึ้นได้ 2 กลไก สามารถแสดงเป็นสมการง่าย ๆ ได้ดังนี้

กลไกที่ 1 คือ a direct H-atom abstraction process



กลไกที่ 2 คือ a proton concerted electron transfer process



ในการทดสอบใช้สารควบคุมบวก คือ วิตามินซี (บริษัท Fisher, Cat No. 50-81-7) ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำ และ วิตามินอี (alpha – tocopherol)(บริษัท Sigma, Cat No PT-1157) ซึ่งเป็นสารที่ละลายในน้ำมัน เป็นตัวควบคุมบวกร่วมด้วย และจะใช้ตัวทำละลายสารที่ทดสอบเป็นตัวควบคุมลบ

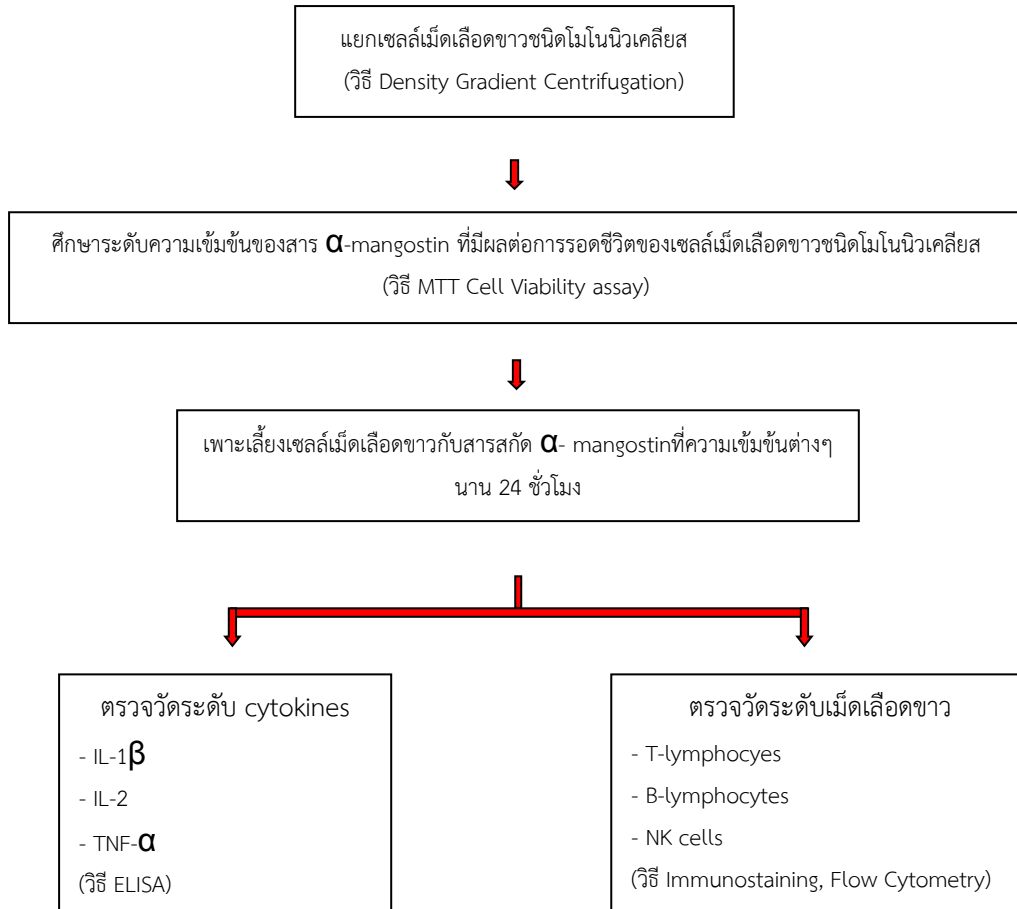
- การตรวจสอบการกำจัดอนุมูลอิสระด้วย cell culture system

การกำจัด intracellular reactive oxygen species (ROS) ของสารสกัดถูกตรวจสอบด้วย DCFH-DA fluorescence probe โดยใช้ cell lines ชนิดต่างๆ ในการทดสอบที่ทดลองในห้องปฏิบัติการจะใช้วิตามินอี (alpha – tocopherol)(บริษัท Sigma, Cat No PT-1157) และวิตามินซี เป็นตัวควบคุมบวก และจะใช้ตัวทำละลายสารที่ทดสอบเป็นตัวควบคุมว่าไม่มีผลต่อเซลล์ที่ทดสอบ และมีเซลล์ที่ไม่ได้ใส่สารทดสอบเป็นกลุ่มควบคุมร่วมด้วย

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกัน (immunomodulation)

สารบริสุทธิ์ α -mangostin ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม และเวลาที่เหมาะสม ทดสอบการเปลี่ยนแปลงทางปริมาณของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน เช่น mononuclear cell, CD4, CD8, CD20 ที่เป็น marker ที่สำคัญบนเซลล์ในระบบ จะถูกตรวจสอบด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์บนแอนติบอดี และตรวจวัดด้วย flow cytometry และตรวจวัดระดับ cytokines คือ IL-1 β , IL-2, TNF- α โดยวิธี ELISA ด้วยการใส่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (peripheral blood mononuclear cell; PBMC)

วิธีการวิจัย



- การแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส

ขั้นตอนการทดลอง:

1. นำ buffy coat ที่ได้จากอาสาสมัครสุขภาพดีมาเจือจางด้วย 0.01M PBS ในอัตราส่วน 1:1
2. ใช้ปิเปตค่อยๆ ปล่อยเลือด 6 ml ที่เจือจางแล้วลงบนผิวหน้า Lymphoprep™ ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง ปิดฝาให้สนิท
3. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 800 x g นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่มีเบรก
4. ใช้ Pasteur pipette ดูดส่วนชั้นขาวของ mononuclear cell ที่อยู่ระหว่าง diluted serum/Lymphoprep™ ออกมาเก็บไว้
5. นำส่วนที่เก็บได้มาเติม 0.01M PBS และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 250 x g นาน 10 นาที
6. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5 อีกประมาณ 3 รอบเพื่อล้างเซลล์
7. นับเซลล์โดยใช้ hemocytometer counting chamber และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 4×10^6 cells/ml ใน complete RPMI.

- **MTT Cell Viability Assay**

การทดลองทำตามวิธีการตรวจดังที่อธิบายในตอนต้น

Concanavalin A (ConA) ความเข้มข้น 40 µg/ml; เป็น carbohydrate-binding protein ทำหน้าที่กระตุ้น T-cells ทำหน้าที่เป็น กลุ่มควบคุมบวกในการทดลอง

$$\text{การคำนวณ Survival rate (\%)} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{negative control}} - A_{\text{blank}}) \times 100$$

A sample = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมทดสอบที่มี PBMCs และ α -mangostin

A negative control = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่มี PBMCs ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO

A blank = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม blank ที่มีสาร α -mangostin

- ขั้นตอนการทดลอง การทดสอบฤทธิ์ของสาร โดยใช้ PBMCs

PBMCs จะถูกเลี้ยงใน 6-well plate ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2×10^6 PBMCs/ml เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีสาร α -mangostin ความเข้มข้นต่างๆ หรือในอาหารที่มี α -mangostin ร่วมกับ ConA และกลุ่มควบคุมบวกคือ PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย ConA ส่วนกลุ่มควบคุมลบคือ PBMCs ที่ไม่ได้เติมสารใดๆ

1. เติม complete RPMI medium 1.5 ml/หลุม ลงในหลุมกลุ่มควบคุมลบ
2. เติม complete RPMI medium 750 µl/หลุมลงในหลุมของสารทดสอบ
3. เติมสาร α -mangostin ที่ความเข้มข้นต่างๆ 750 µl/หลุม ลงในหลุมของสารทดสอบ
4. เติม ConA 750 µl/หลุม ลงในหลุมกลุ่มควบคุมบวก
5. เติม PBMCs 1.5 ml/หลุมลงในทุกหลุม

ดังนั้นในทุกหลุมจะมีปริมาตรเท่ากับ 3 ml/หลุม

6. นำ plate เข้าตู้ ตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง
7. เก็บเซลล์จากหลุมมาใส่ centrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500x g,

3 นาที

8. เก็บส่วนใส (supernatant) มาใส่ Eppendorf และเก็บในตู้เย็น - 20 °C จนกว่าจะนำมาทำการวิเคราะห์หาระดับ cytokines ส่วน pellet นั้นนำมาทำการย้อมสีหา CD maker ของเซลล์ต่อไป

- การตรวจวัดระดับ Cytokines ด้วยวิธี ELISA

- ชุดตรวจ cytokines IL-1 β

IL-1 β ทำหน้าที่สำคัญในการตอบสนองด้านภูมิคุ้มกันและการตอบสนองด้านการอักเสบ, เกี่ยวข้องกับ bone remodeling, การเกิดไข้, และ carbohydrate metabolism ระดับ IL-1 β ที่ไม่เหมาะสมหรือการหลั่ง IL-1 β เป็นเวลานานแสดงถึงความผิดปกติทางพยาธิสภาพ ได้แก่ การติดเชื้อ, arthritis, inflammatory bowel disease, acute and chronic myelogenous leukemia, insulindependent diabetes mellitus, atherosclerosis, neuronal injury และ aging-related diseases

- ชุดตรวจ cytokines IL-2

IL-2 หรือ T cell growth factor (TCGF) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการกระตุ้น T-cells และ T-cell expansion, development, maintenance และการทำงานของ regulatory T cells ซึ่งทำหน้าที่ป้องกัน autoimmune disease นอกจากนี้ IL-2 ยังสามารถส่งเสริมการเกิดการอักเสบใน autoimmune ใน target organs ผ่านการแสดงออกของ T cell trafficking genes และการสร้าง Th2 cytokines นอกจากนี้ IL-2 ยังช่วย promote development ของ activated CD8+ ให้กลายเป็น memory cells

- ชุดตรวจ cytokines TNF- α

TNF- α ทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการอักเสบ, การพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกัน, การเกิด apoptosis และ lipid metabolism นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหืด, Crohn's disease, rheumatoid arthritis, neuropathic pain, obesity, type 2 diabetes, septic shock, autoimmunity และมะเร็ง

ขั้นตอนการทดลอง การตรวจวัดระดับ Cytokines ด้วยวิธี ELISA

นำ supernatant ที่เก็บไว้อยู่ในอุณหภูมิห้อง เติมน้ำ supernatant ลงไปและทดสอบตามที่ชุดทดสอบกำหนด ทำการวัดผลโดยวัดค่าความยาวคลื่นที่ 450 nm และ reference wavelength 570 nm

- Immunostaining, flow cytometric analysis[19-22]

- Wash buffer (2%FCS, 0.1%NaN₃ in PBS)
- Fix solution (1% paraformaldehyde in PBS)
- BD Multitest™ IMK kit

ขั้นตอนการทดลอง

ประเภทของ human lymphocytes จำแนกตามหน้าที่และ cell-surface antigen ได้เป็น 3 กลุ่มหลัก คือ mature human T lymphocytes (CD3+), B lymphocytes (CD19+) และ NK lymphocytes (CD3-CD16+ และ/หรือ CD56+) ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ four-color direct immunofluorescence reagent kit ย้อมสีเซลล์โดยใช้เครื่อง flow cytometer วัดผล ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการหาจำนวน T, B และ NK lymphocytes การทดสอบเริ่มจากหลังจากเก็บเซลล์ไว้แล้วนำมาล้างด้วย wash buffer 3 ครั้งและแบ่งใส่ round-bottom centrifuge tube (2 x 10⁵ cells/tubes) เซลล์ในแต่ละหลอดจะถูกย้อมด้วยสี FITC-labeled CD3, PE-labeled CD16, CD56, PerCP-labeled CD45, และ APC-labeled CD19 นาน 30 นาทีแล้วล้างออก จากนั้นให้ fix เซลล์ด้วย fix solution 30 นาที ล้างเซลล์และเก็บเซลล์ไว้ใน wash buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C การวิเคราะห์ผลจะทำภายใน 1 สัปดาห์หลังจาก fix เซลล์เสร็จ

- การวิเคราะห์ทางสถิติ

สำหรับข้อมูลต่างๆจะถูกนำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ซึ่งการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีการแจกแจงปกติใช้ one-way ANOVA ร่วมกับ Tukey's post hoc test หรือ Student's t-test ส่วนข้อมูลที่มีความเบ้ใช้ Kruskal-Wallis test ตามด้วย Mann-Whitney U test (SPSS version 17.0) โดยที่ค่านัยสำคัญทางสถิติอยู่ที่ P -value < 0.05

ปีที่ 2 การศึกษาผลของสารสกัดสารสำคัญในด้านการต้านมะเร็งทาง *in vivo*

หากผลที่ได้ที่ศึกษาในปีที่ 1 มีผลที่มีศักยภาพที่ดี จะดำเนินการศึกษาผล การต้านมะเร็งทาง *in vivo* โดยจะศึกษาใน BALB/c mice ที่ปลูกถ่าย breast cancer cells และได้รับสารสมุนไพรที่แยกบริสุทธิ์ โดยจะดำเนินการของในปีงบประมาณ 2556 ตลอดจนการขออนุญาตการวิจัยในสัตว์ทดลอง

4. ผลการวิจัย (ควรมีภาพหรือตาราง)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีววิทยา ในหลอดทดลอง *in vitro*

เซลล์ที่ศึกษา 10 ชนิด คือ

- เซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3, BT549, BT474, MCF-7, MDA-MB-231 human breast cancer cell lines
- เซลล์มะเร็งรังไข่ OV-CAR-3, SKOV3 human ovarian cell lines
- เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ CACO-II, SW620 human colon cell lines
- เซลล์มะเร็งตับ HepG2 human hepatocellular liver carcinoma cell line

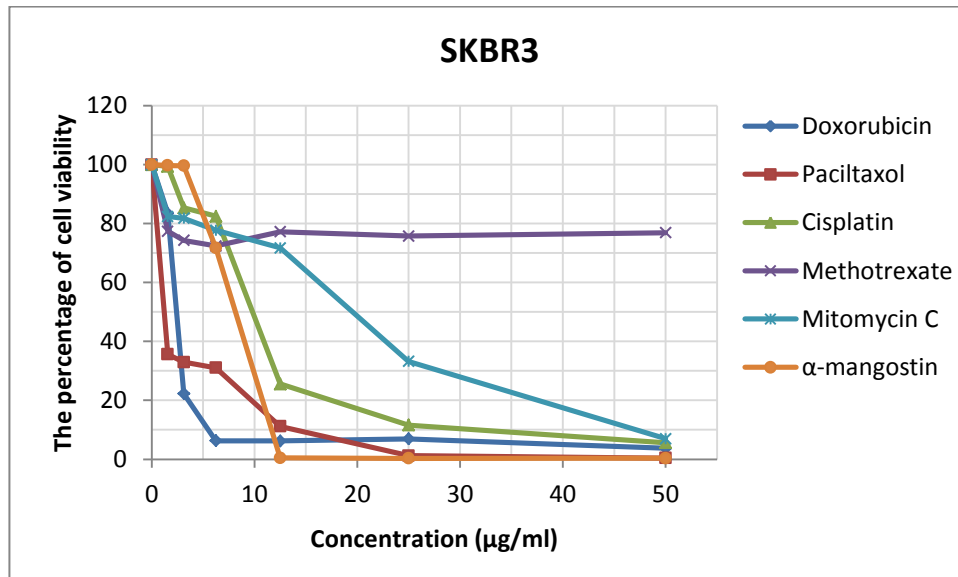
Cytotoxic drugs ที่สามารถจัดหามาใช้ได้ในการทดลองและใช้เป็นสารควบคุมในการทดลอง

- Breast cancer: Doxorubicin/ Paclitaxel (Taxol)/ Methotrexate
- Ovarian cancer: Doxorubicin/ Paclitaxel (Taxol)/ Cisplatin
- Liver cancer: Doxorubicin/ Mitomycin C
- Colon, rectum, esophagus or intestine cancer: Doxorubicin/ Mitomycin C

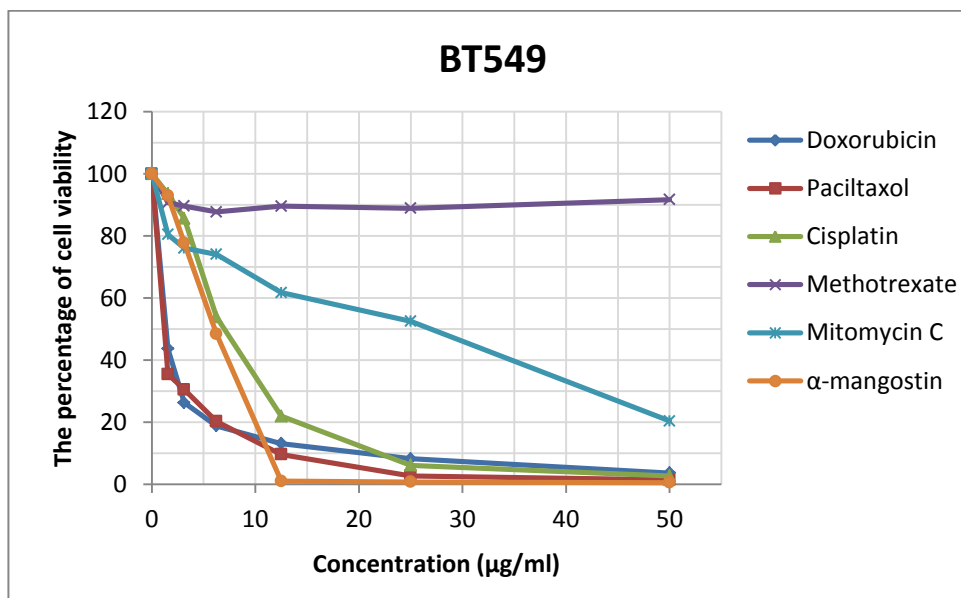
ผลการทดลองที่รายงานคือ

- แสดงผลของการทดสอบฤทธิ์ antiproliferation ของสาร alpha-mangostin ต่อเซลล์ชนิดต่างๆ โดยวิธี MTT assay แสดงเป็นค่า ED50 $\mu\text{g/ml}$ เปรียบเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ แสดงผลตามภาพที่ 1-10 และ ตารางสรุปที่ 1
- แสดงความสัมพันธ์ของ DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของ ascorbic acid แสดงผลตารางที่ 2-3 และภาพที่ 11-12
- แสดงความสัมพันธ์ของ DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของ ascorbic acid และ alpha-mangostin แสดงผลภาพที่ 13
- แสดงผล reactive oxygen species (ROS) production ของเซลล์แต่ละชนิดที่ทดสอบด้วยสาร alpha-mangostin โดยเซลล์ที่ทดสอบได้รับการกระตุ้นและไม่ได้การกระตุ้นด้วยสาร H_2O_2 แสดงผลภาพที่ 14
- แสดงความสัมพันธ์ของ The percentage of reactive oxygen species (ROS) production แสดงผลสรุปตารางที่ 4
- ตารางที่ 5 The expression of molecular markers of each cell line
- แสดงผลการแสดงออกของ molecular markers Bcl-2, Bax, cytokeratin และ beta 2 microglobulin แสดงผลภาพที่ 15
- ผลต่อกระบวนการเกิด apoptosis, signal proteins, gene expression และ tumor markers ที่เกี่ยวข้อง ได้ศึกษาการแสดงออกของ Bcl-2, Bax, cytokeratin และ beta 2-microglobulin โดยปรับ conditions ของ primers ต่างๆที่ใช้ในการทดลองได้ผลดีโดยใช้ PCR และแสดงผลการแสดงออกของยีนเหล่านี้ เมื่อทดสอบกับสาร alpha mangostin ตรวจวัดโดย Real time PCR
- ผลการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกัน (immunomodulation) ของสารบริสุทธิ์ α -mangostin ด้วยการใส่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส ทดสอบการเปลี่ยนแปลงทางปริมาณของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน ตรวจสอบด้วย flow cytometry และตรวจวัดระดับ cytokines คือ IL-1 β , IL-2, TNF- α โดยวิธี ELISA

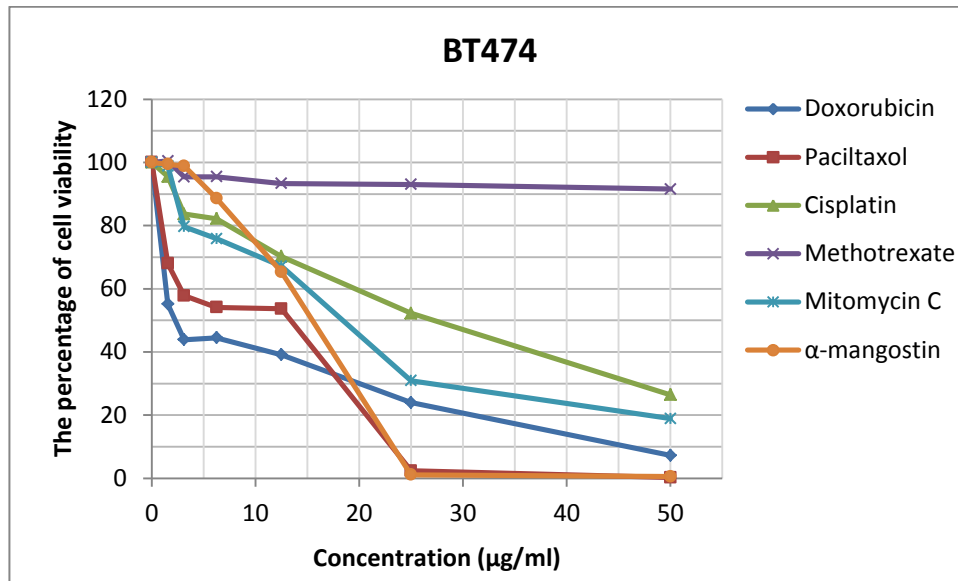
แสดงผลของการทดสอบฤทธิ์ antiproliferation ของสาร alpha-mangostin ต่อเซลล์ชนิดต่างๆ โดยวิธี MTT assay แสดงเป็นค่า ED_{50} $\mu\text{g/ml}$ เปรียบเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ แสดงผลตามภาพที่ 1-10 และ ตารางสรุปที่ 1



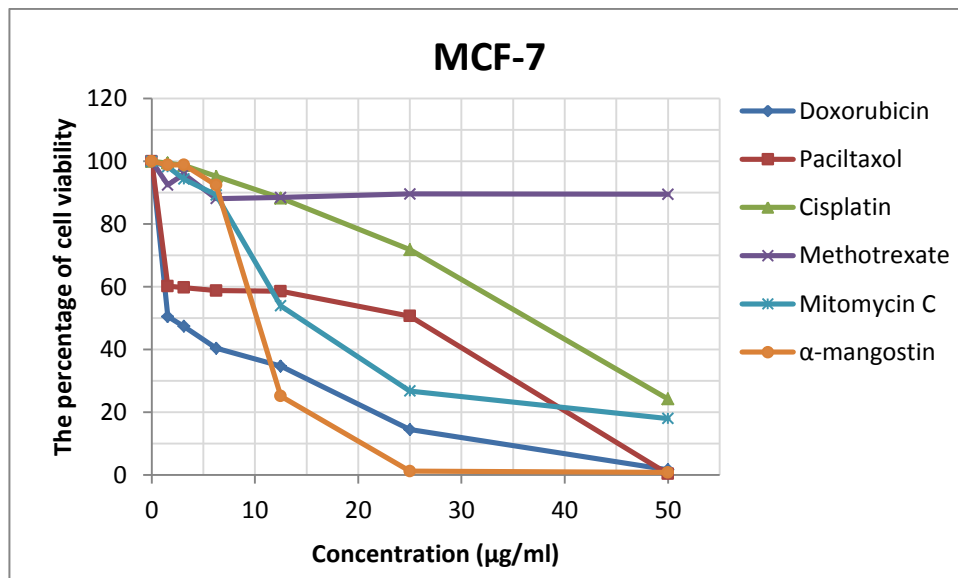
ภาพที่ 1 กราฟแสดงผลของสาร α -mangostin ต่อเซลล์ SKBR3 โดยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ



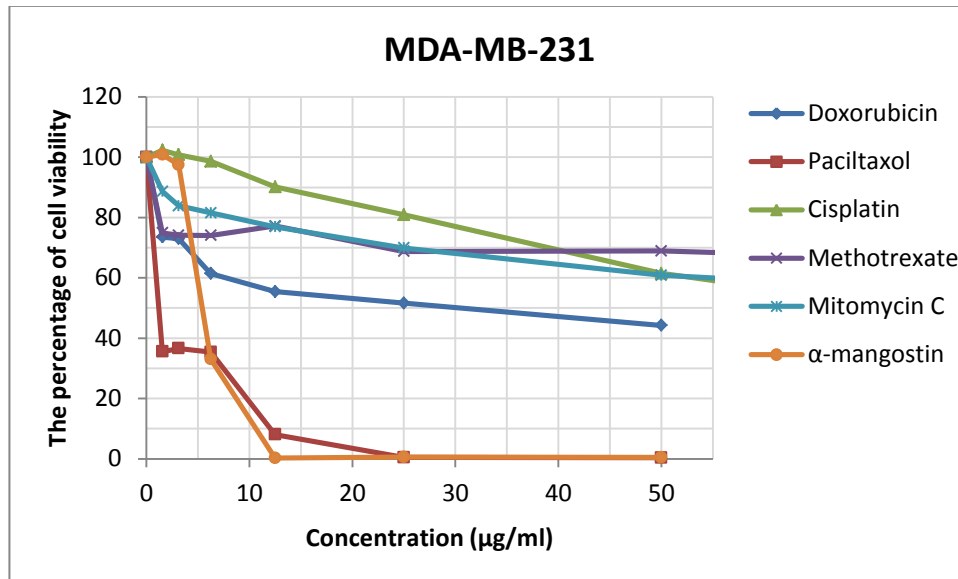
ภาพที่ 2 กราฟแสดงผลของสาร α -mangostin ต่อเซลล์ BT549 โดยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ



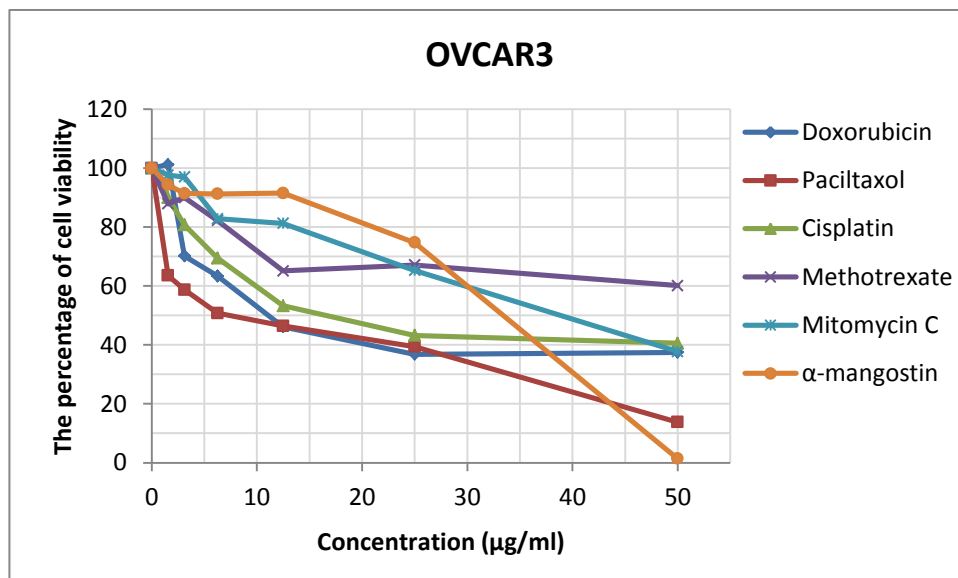
ภาพที่ 3 กราฟแสดงผลของสาร α -mangostin ต่อเซลล์ BT474 โดยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ



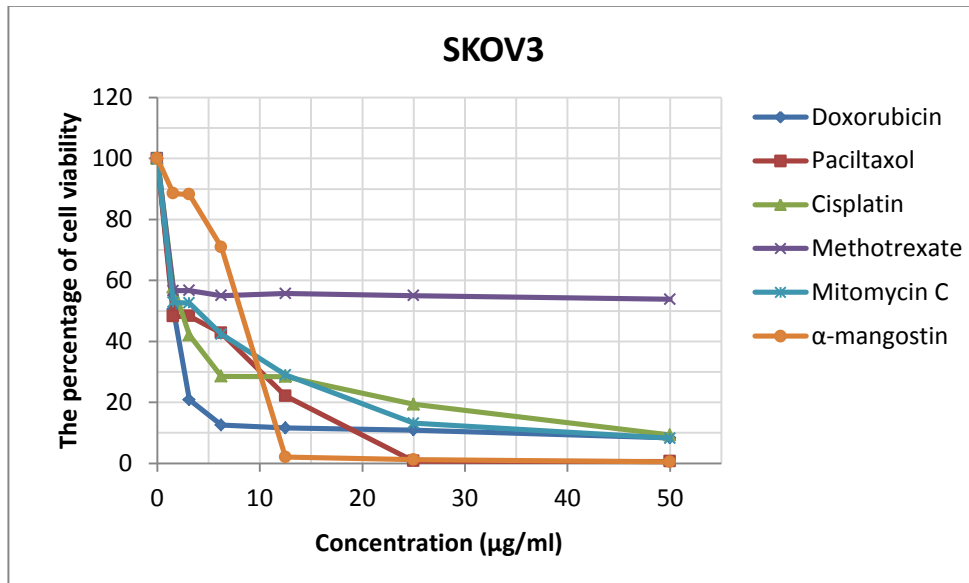
ภาพที่ 4 กราฟแสดงผลของสาร α -mangostin ต่อเซลล์ MCF-7 โดยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ



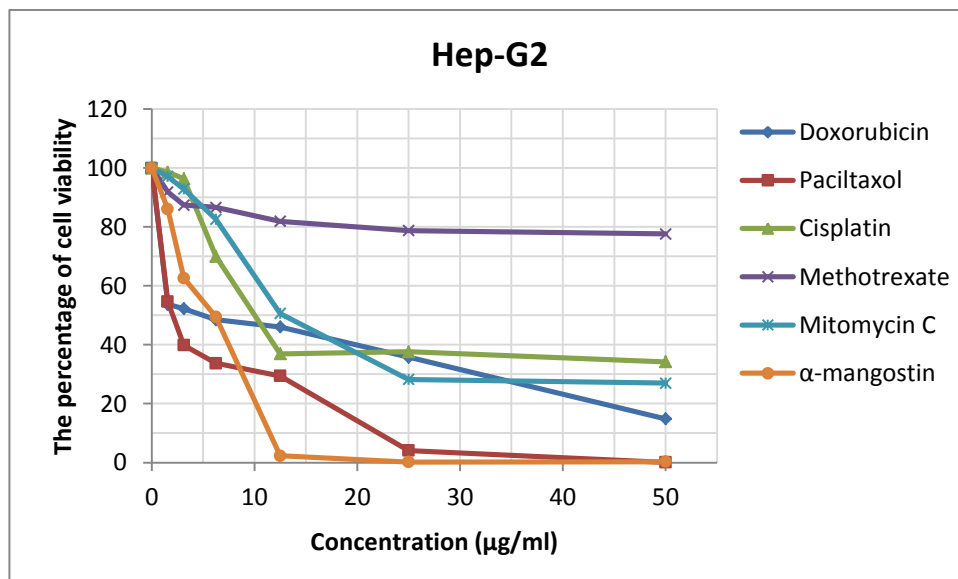
ภาพที่ 5 กราฟแสดงผลของสาร α -mangostin ต่อเซลล์ MDA-MB-231 โดยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ



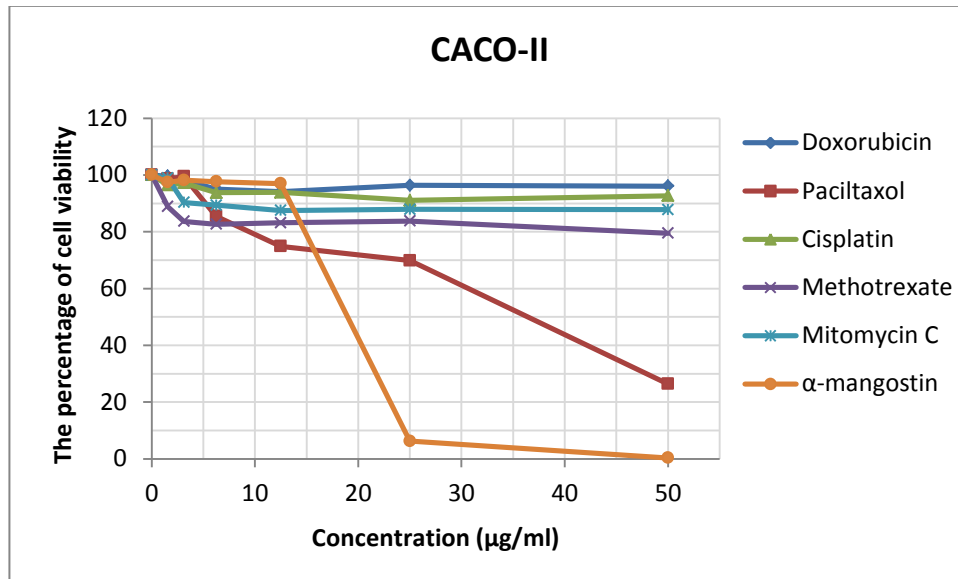
ภาพที่ 6 กราฟแสดงผลของสาร α -mangostin ต่อเซลล์ OVCAR3 โดยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ



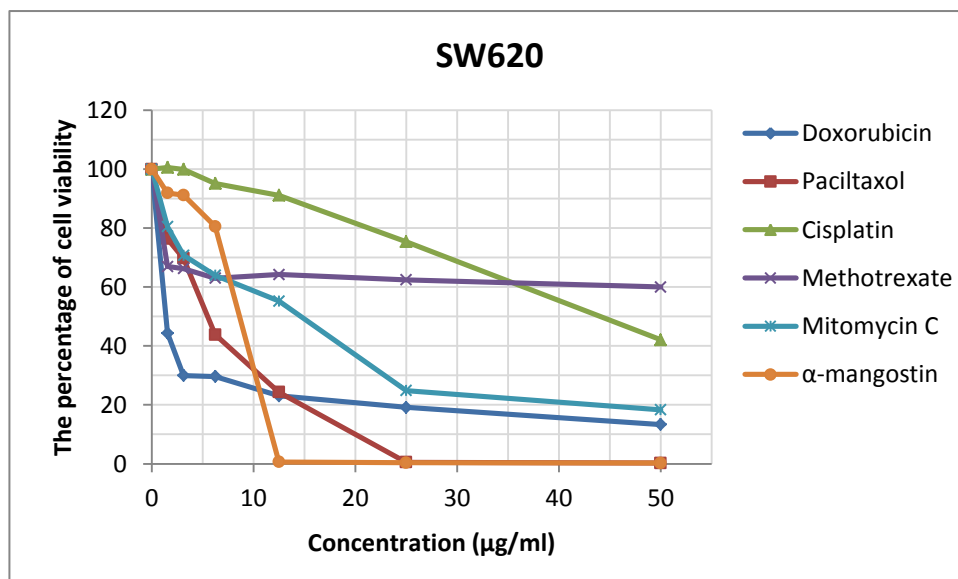
ภาพที่ 7 กราฟแสดงผลของสาร α -mangostin ต่อเซลล์ SKOV3 โดยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ



ภาพที่ 8 กราฟแสดงผลของสาร α -mangostin ต่อเซลล์ Hep-G2 โดยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ



ภาพที่ 9 กราฟแสดงผลของสาร α -mangostin ต่อเซลล์ CACO-II โดยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับ ยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ



ภาพที่ 10 กราฟแสดงผลของสาร α -mangostin ต่อเซลล์ SW620 โดยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับ ยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ

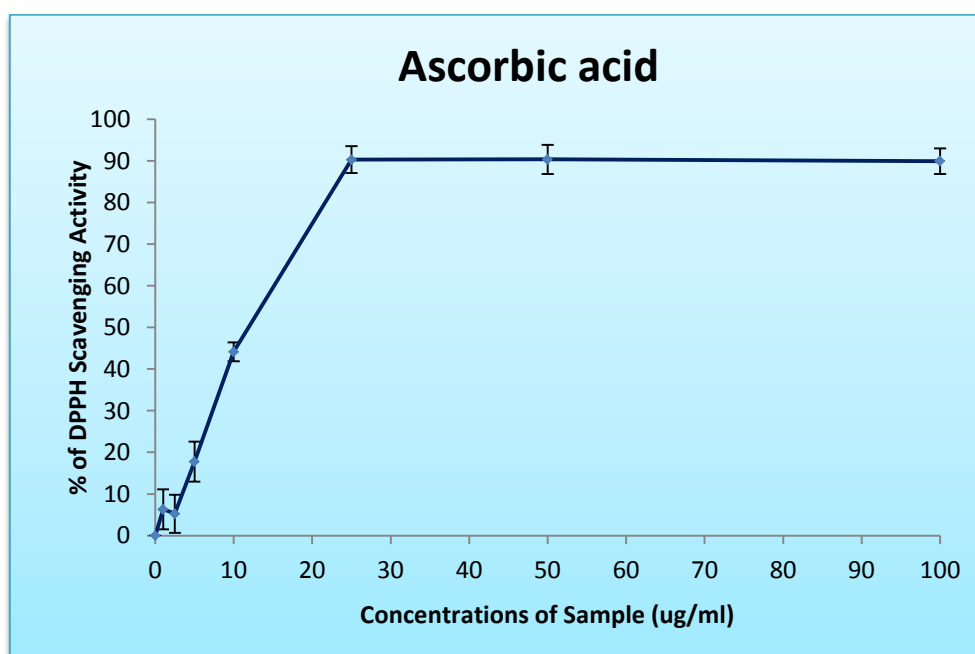
ตารางที่ 1 แสดงผลของการทดสอบฤทธิ์ antiproliferation ของสาร α -mangostin ต่อเซลล์ชนิดต่างๆ โดยวิธี MTT assay แสดงเป็นค่า ED_{50} μ g/ml เปรียบเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆ

Cell line/ยา	Doxorubicin	Pacitaxol	Cisplatin	Methotrexate	Mitomycin C	α -mangostin
SKBR3	2.43 $\pm$ 0.03	1.20 $\pm$ 0.00	9.83 $\pm$ 0.20	>400	19.46 $\pm$ 1.29	8.21 $\pm$ 0.37
BT549	1.50 $\pm$ 0.05	1.20 $\pm$ 0.03	7.01 $\pm$ 0.25	>400	26.97 $\pm$ 1.63	6.09 $\pm$ 0.39
BT474	2.27 $\pm$ 0.22	13.39 $\pm$ 0.22	27.18 $\pm$ 0.55	>400	18.41 $\pm$ 1.39	15.41 $\pm$ 0.67
MCF-7	1.82 $\pm$ 0.90	25.34 $\pm$ 1.48	36.46 $\pm$ 1.31	>400	14.32 $\pm$ 1.25	10.19 $\pm$ 0.43
MDA-MB-231	30.50 $\pm$ 5.67	1.20 $\pm$ 0.14	74.18 $\pm$ 6.22	>400	110.20 $\pm$ 6.64	5.45 $\pm$ 0.12
OVCAR3	11.10 $\pm$ 3.74	7.32 $\pm$ 4.36	16.60 $\pm$ 6.42	>400	38.90 $\pm$ 3.11	33.4 $\pm$ 0.61
SKOV3	1.59 $\pm$ 0.04	1.50 $\pm$ 0.02	2.33 $\pm$ 0.35	>400	3.92 $\pm$ 0.59	8.15 $\pm$ 0.12
Hep-G2	4.98 $\pm$ 0.66	2.05 $\pm$ 0.16	10.05 $\pm$ 0.15	>400	12.84 $\pm$ 2.97	6.12 $\pm$ 0.32
CACO-II	>400	36.41 $\pm$ 1.72	316.79 $\pm$ 13.01	>400	>400	18.98 $\pm$ 0.50
SW620	1.40 $\pm$ 0.155	5.51 $\pm$ 0.31	44.05 $\pm$ 0.84	>400	14.65 $\pm$ 2.27	8.63 $\pm$ 0.16

DPPH radical scavenging activity

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของ DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของ ascorbic acid

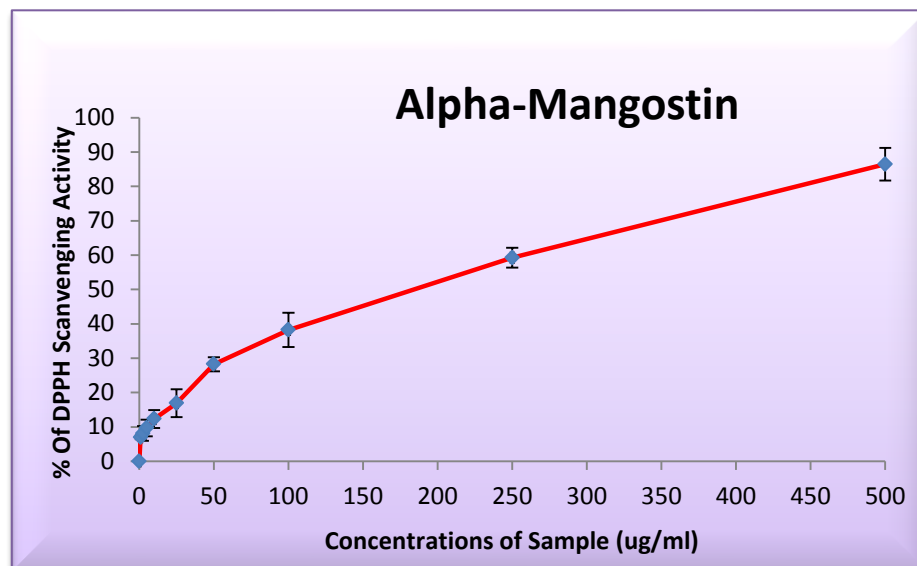
Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	n=1		n=2		n=3		% of DPPH scavenging activity	SD
	OD	%	OD	%	OD	%		
0	0.795	0.00	0.753	0.00	0.724	0.00	0.00	0.00
1	0.757	9.69	0.73	8.50	0.759	0.83	6.34	4.81
2.5	0.782	6.54	0.726	9.03	0.764	0.14	5.24	4.49
5	0.72	14.34	0.619	23.24	0.651	15.75	17.78	4.78
10	0.487	43.65	0.443	46.61	0.46	42.13	44.13	2.28
25	0.139	87.42	0.088	93.76	0.116	89.64	90.27	3.22
50	0.142	87.04	0.086	94.02	0.114	89.92	90.33	3.51
100	0.146	86.54	0.097	92.56	0.109	90.61	89.90	3.07
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)							11.91	



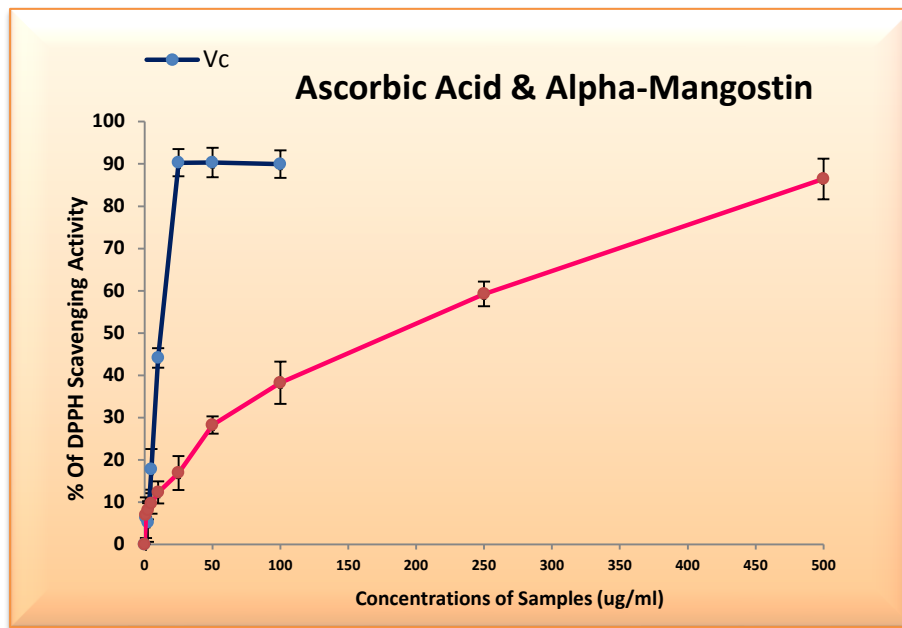
ภาพที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ของ DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของ ascorbic acid

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของ DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของ alpha-mangostin

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	n=1		n=2		n=3		% of DPPH scavenging activity	SD
	OD	%	OD	%	OD	%		
0	0.687	0.00	0.697	0.00	0.679	0.00	0.00	0.00
1	0.691	6.70	0.687	7.60	0.688	6.63	6.98	0.55
2.5	0.698	5.68	0.678	8.90	0.667	9.72	8.10	2.14
5	0.686	7.42	0.674	9.47	0.650	12.22	9.71	2.41
10	0.672	9.46	0.650	12.91	0.634	14.58	12.32	2.61
25	0.652	12.37	0.600	20.09	0.609	18.26	16.91	4.03
50	0.558	26.06	0.530	30.13	0.539	28.57	28.25	2.06
100	0.513	32.61	0.460	40.17	0.448	41.97	38.25	4.97
250	0.350	56.33	0.327	59.25	0.311	62.15	59.25	2.91
500	0.180	81.08	0.111	90.24	0.135	88.07	86.46	4.79
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)							183.95	

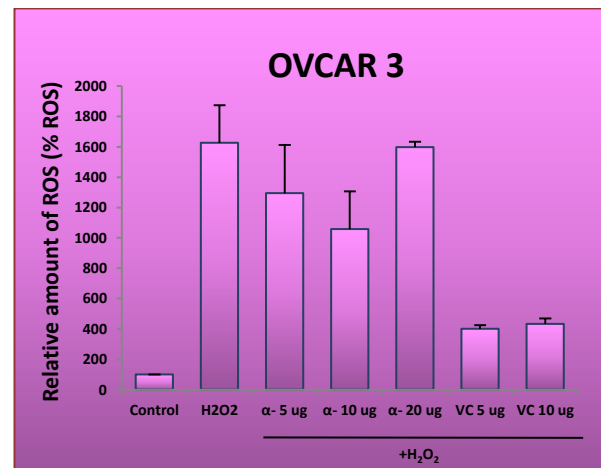
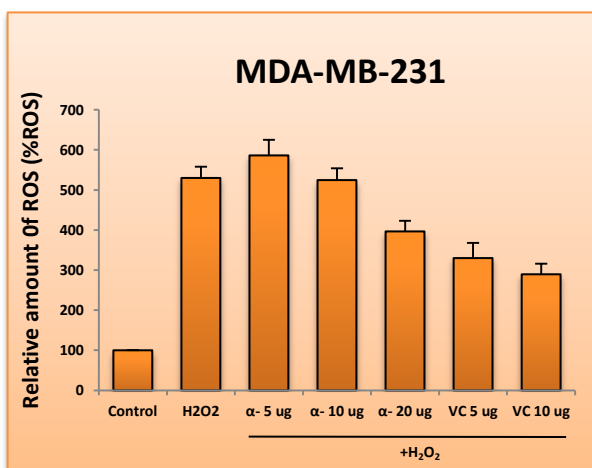
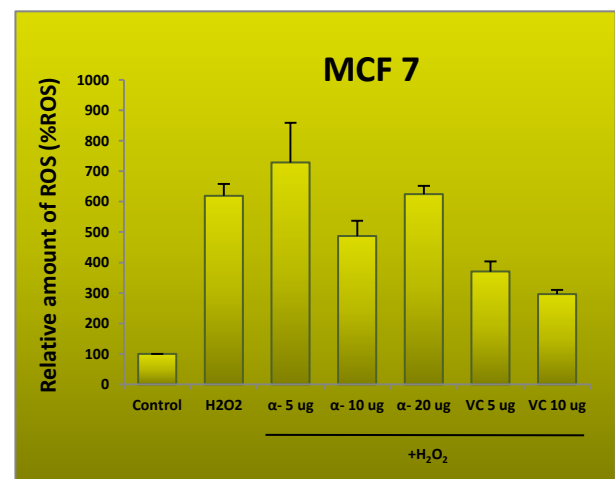
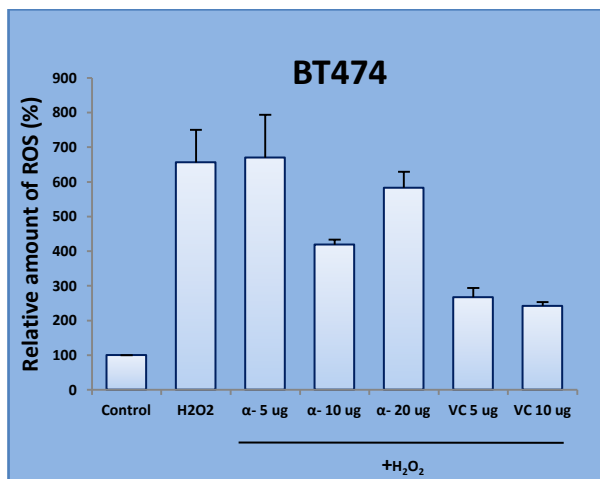
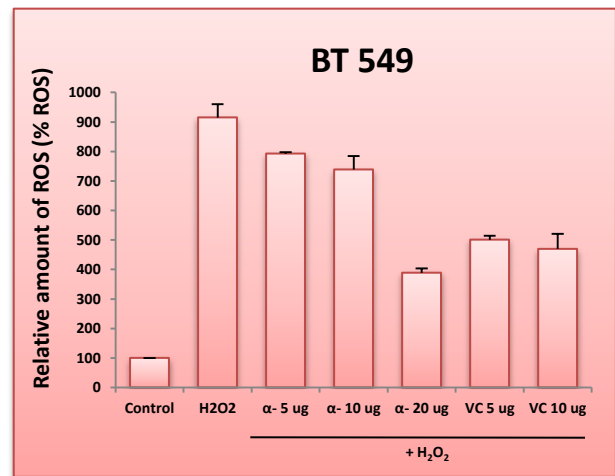
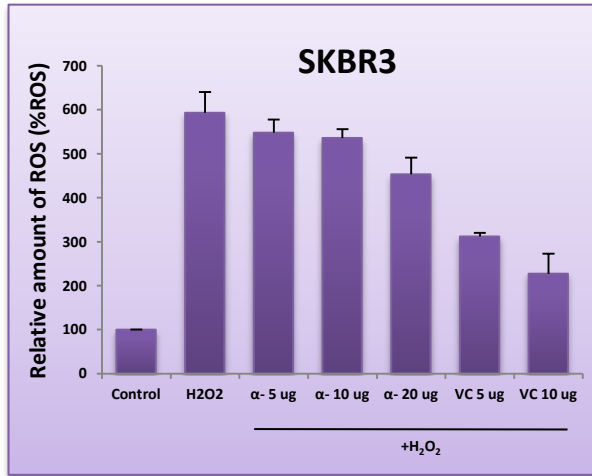


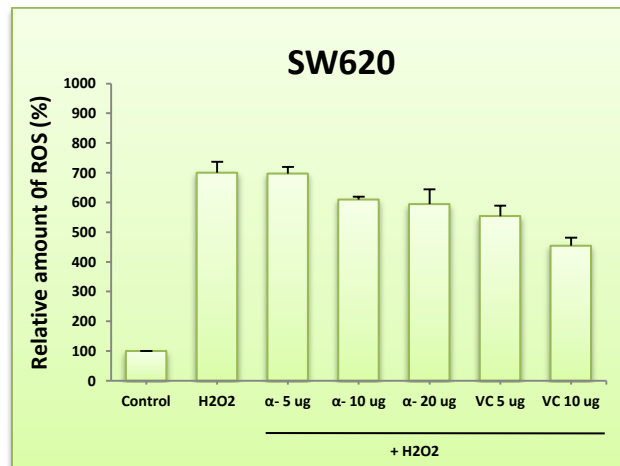
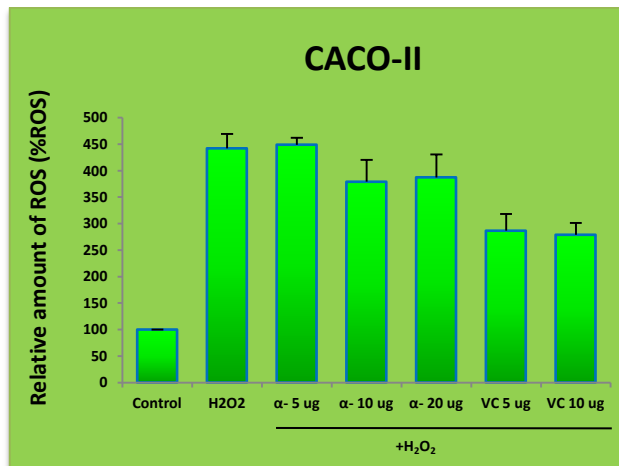
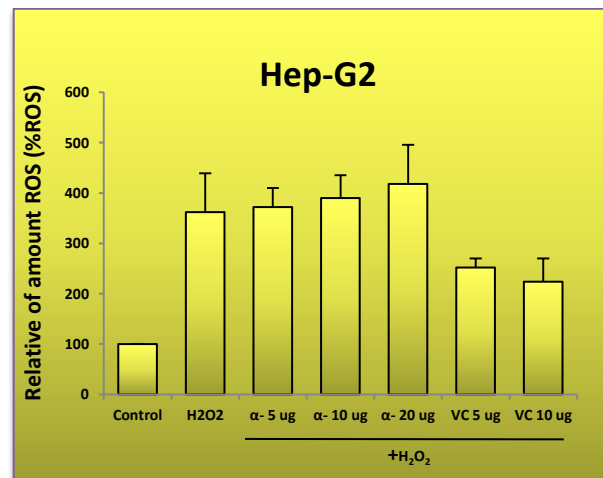
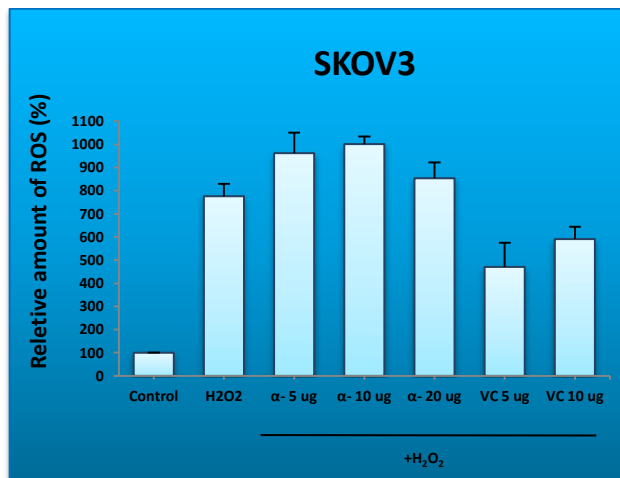
ภาพที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ของ DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของ Alpha-Mangostin



ภาพที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ของ DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของ ascorbic acid และ alpha-mangostin

Reactive oxygen species (ROS) production





ภาพที่ 14 แสดงผล reactive oxygen species (ROS) production ของเซลล์แต่ละชนิดที่ทดสอบด้วยสาร alpha-mangostin โดยเซลล์ที่ทดสอบได้รับการกระตุ้นและไม่ได้การกระตุ้นด้วยสาร H_2O_2

ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ของ The percentage of reactive oxygen species (ROS) production

Cells	Control untreated n = 3	Untreated (%) n = 3					Treated with H ₂ O ₂ (%) n = 3					Control treated with H ₂ O ₂ n = 3
		α -Mangostin			Ascorbic acid		α -Mangostin			Ascorbic acid		
		5 µg	10 µg	20 µg	5 µg	10 µg	5 µg	10 µg	20 µg	5 µg	10 µg	
SKBR 3	100	97.33±15.53	99.92±16.97	99.56±18.70	94.99±9.87	89.52±14.36	547.85±29.94	535.79±19.91	453.16±37.63	311.80±8.06	227.20±45.69	593.07±46.95
BT 549	100	100.35±5.09	78.01±2.74	110.64±10.97	84.14±6.32	80.07±1.83	797.48±5.12	781.09±45.42	399.85±15.60	490.07±14.01	455.29±51.35	915.08±45.07
BT 474	100	87.92±11.11	111.35±14.26	83.99±13.32	69.99±3.97	66.20±8.55	670.09±123.32	418.98±14.17	582.84±46.59	266.96±26.88	241.85±11.51	656.41±93.65
MCF-7	100	94.95±9.42	109.07±8.02	100.57±7.31	65.94±5.37	65.73±2.26	728.52±129.89	487.01±50.65	624.51±27.42	370.66±33.10	296.33±13.72	618.98±38.68
MDA-MB-231	100	87.11±4.94	82.48±4.99	83.46±2.48	69.98±1.98	67.31±3.84	586.21±38.86	524.65±29.31	396.58±26.46	330.03±38.16	289.61±26.47	529.97±28.24
OVCAR3	100	80.79±6.96	80.37±4.99	81.81±4.39	72.78±2.59	59.56±5.59	1293.90±319.22	1057.29±249.75	1596.80±35.63	400±24.94	432.86±37.19	1625.47±248.71
SKOV 3	100	70.26±9.24	68.92±2.86	74.40±4.93	61.46±2.64	49.82±5.09	906.73±104.85	969.68±33.97	799.83±43.92	557.27±90.52	639.07±56.06	766.04±55.03
Hep-G2	100	97.92±16.70	82.29±5.26	75.98±21.35	72.35±6.89	72.30±13.29	373.14±37.79	390.06±45.06	418.12±77.93	252.07±17.96	223.90±46.03	362.11±76.91
CACO-II	100	78.64±6.22	92.36±15.56	86.00±2.84	77.79±5.59	74.22±8.28	449.01±13.32	379.03±41.26	387.40±42.98	286.59±31.80	278.94±22.08	442.13±27.33
SW 620	100	86.73±12.57	87.78±1.76	83.30±2.52	67.12±4.09	65.51±4.07	697.03±22.90	609.60±9.44	594.30±49.47	554.12±34.93	454.06±27.68	699.96±36.46

แสดงผลกระบวนการเกิด apoptosis, signal proteins, gene expression และ tumor markers ที่เกี่ยวข้อง

การประเมินศักยภาพของ α -mangostin ต่อการแสดงออกของ Bax และ Bcl-2 mRNA

ประเมินศักยภาพของ α -mangostin ในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆต่อการเพิ่มหรือลดปริมาณของระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis คือ Bax และ Bcl-2 โดยวิธีการ real time RT-PCR แบบ one-step method

โดยการเตรียมเซลล์มะเร็งที่ต้องการทดสอบปริมาณ 1×10^6 cell/ml ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ และนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้น นำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม α -mangostin ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไป บ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้จากการทดสอบมาทำการสกัด total RNA โดยใช้วิธีสกัดแบบ Tri-reagent (ดูภาคผนวก) และทำการวัดความเข้มข้นของ total RNA โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm แล้วนำ total RNA ปริมาณ 50ng ที่สกัดได้จากเซลล์แต่ละชนิด ที่ทดสอบด้วย α -mangostin ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบด้วยวิธี real time one step RT-PCR ต่อไป

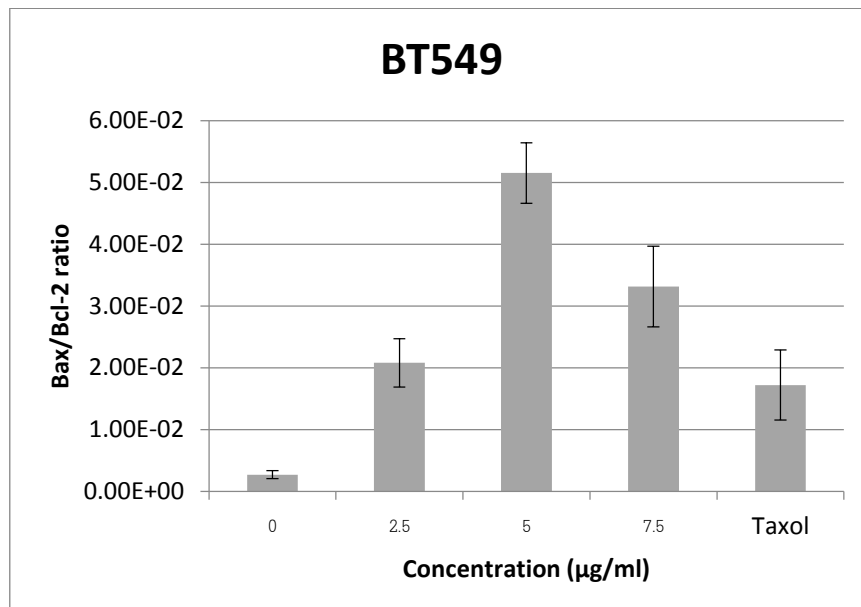
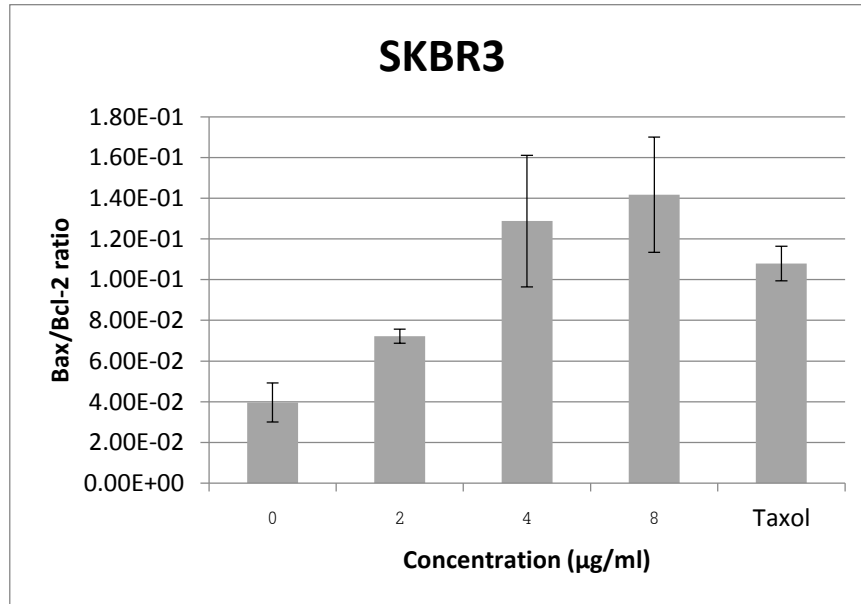
Primers ที่ใช้ในการทดสอบมีความจำเพาะต่อยีน Bax และ Bcl-2 รวมทั้งยีน β_2 microglobulin ซึ่งเป็น house-keeping gene เป็นยีนมาตรฐาน มีลำดับเบสดังนี้

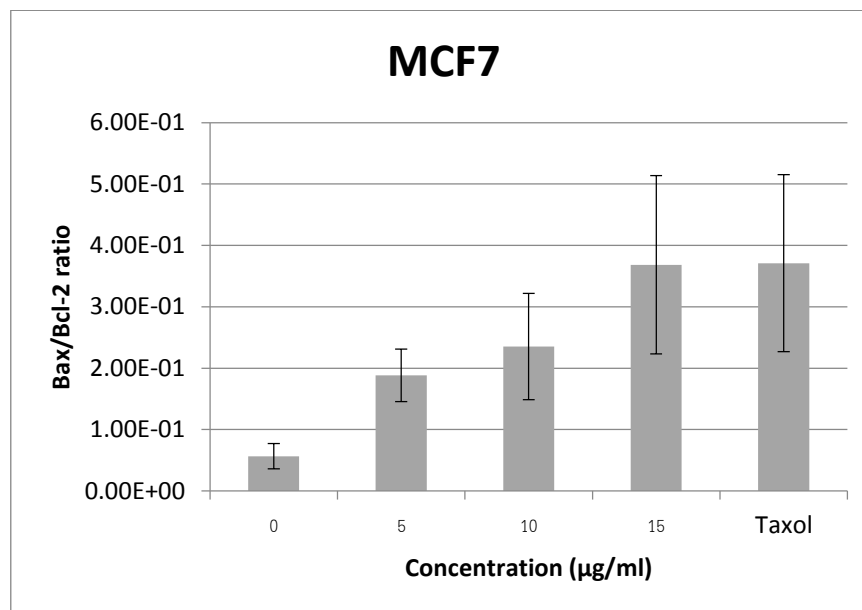
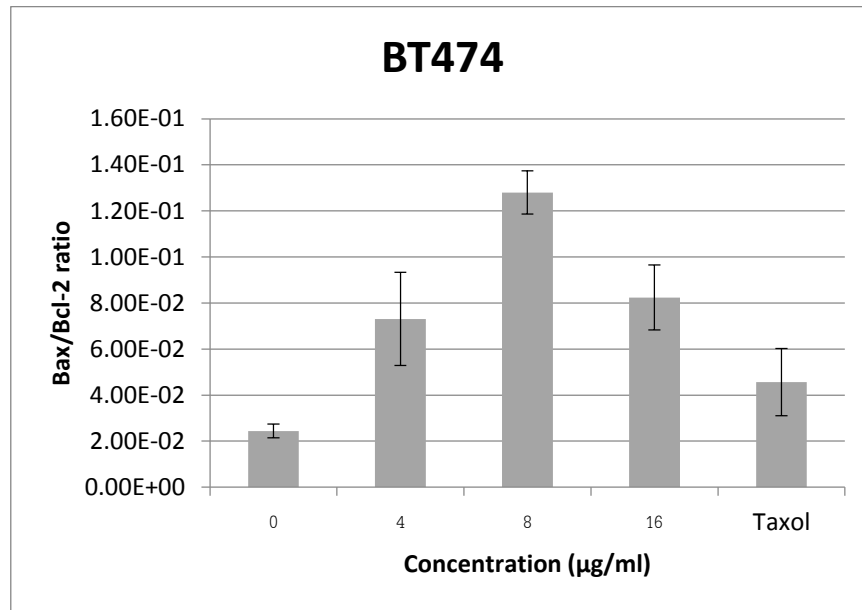
Gene	Primers	Ref.
Bcl-2	5'-CTACGAGTGGGATGCGGGAGATG-3' 5'-GGTTCAGGTACTCAGTCATCCACAG-3'	Liu et al., 2005
bax	5'-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTC-3' 5'-TGTCCAGCCCATGATGGTTC-3'	Liu et al., 2005
$\text{h}\beta_2\text{m}$	5'-CTT GTC TTT CAG CAA GGA CTG G-3' 5'-CCT CCA TGA TGC TGC TTA CAT GTC-3'	Uawisetwathana, 2007

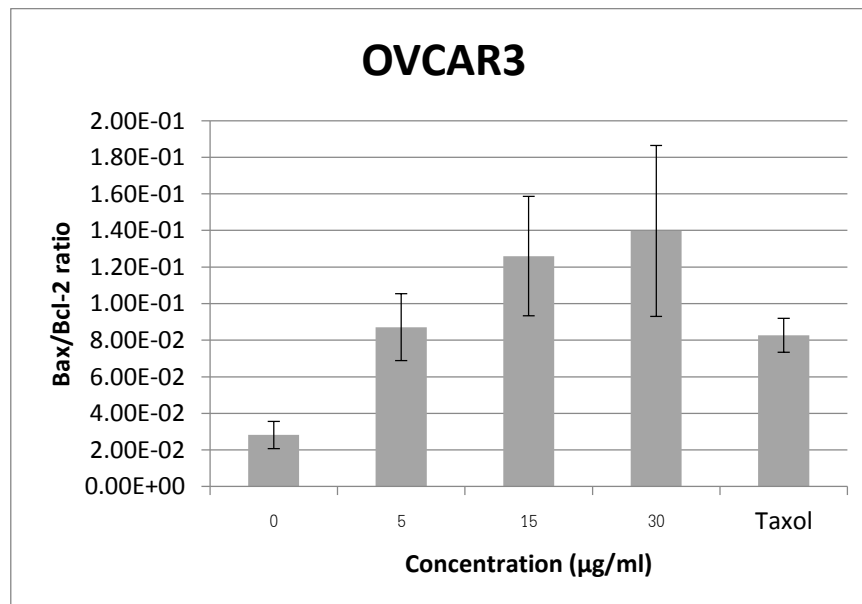
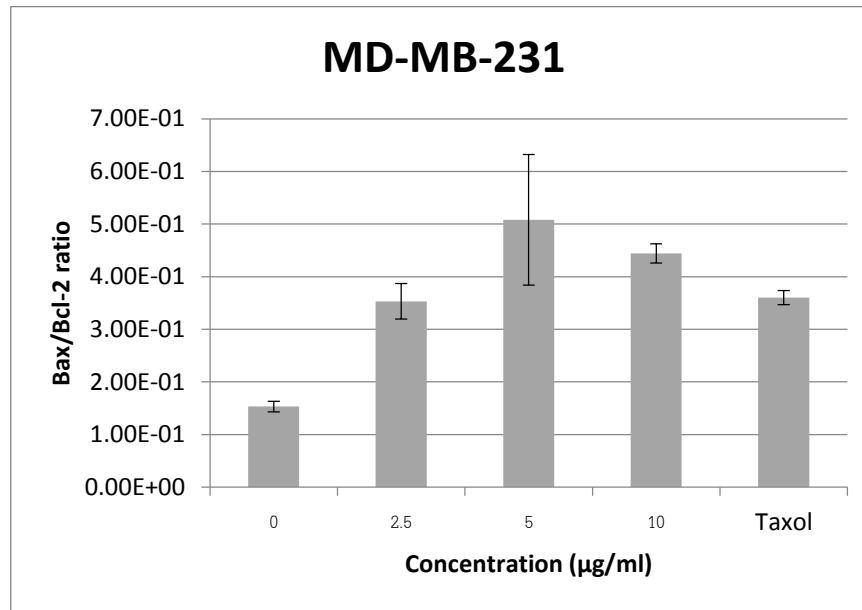
ทำสอบโดยใช้ส่วนผสมปริมาตร 20 μl ที่ประกอบด้วย 0.5 MgCl_2 , PCR buffer, 10pMole ของ primer แต่ละเส้น และ taq polymerase (GoTaq 1-Step qRT-PCR, Promega, USA) และน้ำกลั่น มาทดสอบเพิ่มจำนวนของ DNA ในเครื่อง real time PCR (MX3000, Agilent, USA) โดยเริ่มจากการสังเคราะห์สาย complementary DNA (cDNA) โดย Reverse Transcriptase ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที แล้ว

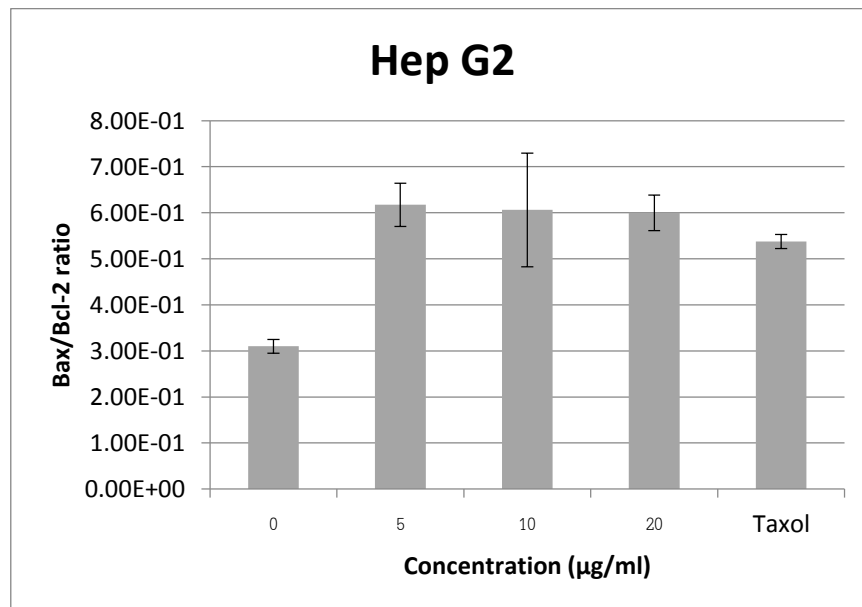
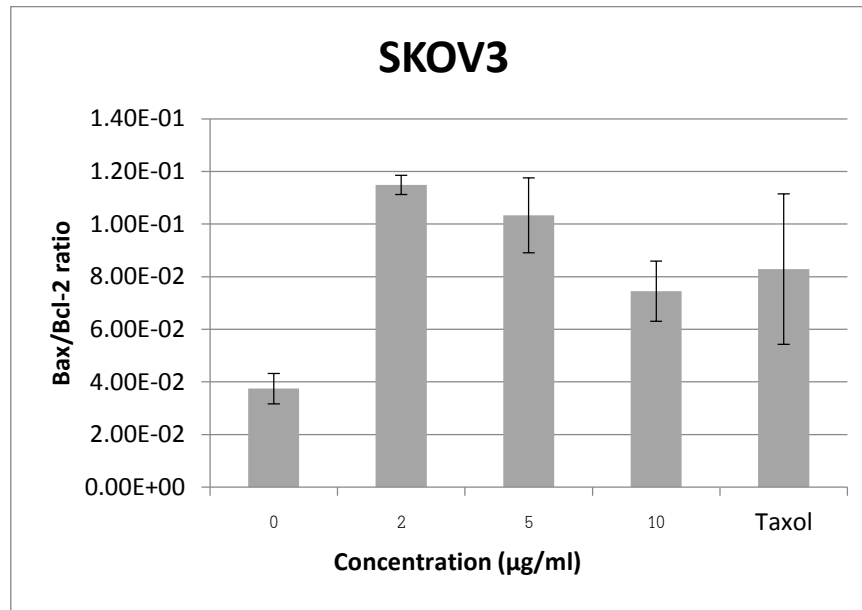
เริ่มขั้นตอน PCR โดยใช้โปรแกรม denaturation ที่ 95°C, 30 วินาที, primer annealing ที่ 55°C, 30 วินาที และ extension ที่ 72°C, 30 วินาที เป็นจำนวน 30 รอบ โดยแต่ละรอบมีการอ่านค่าสี SYBG ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสาย DNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในปฏิกิริยา

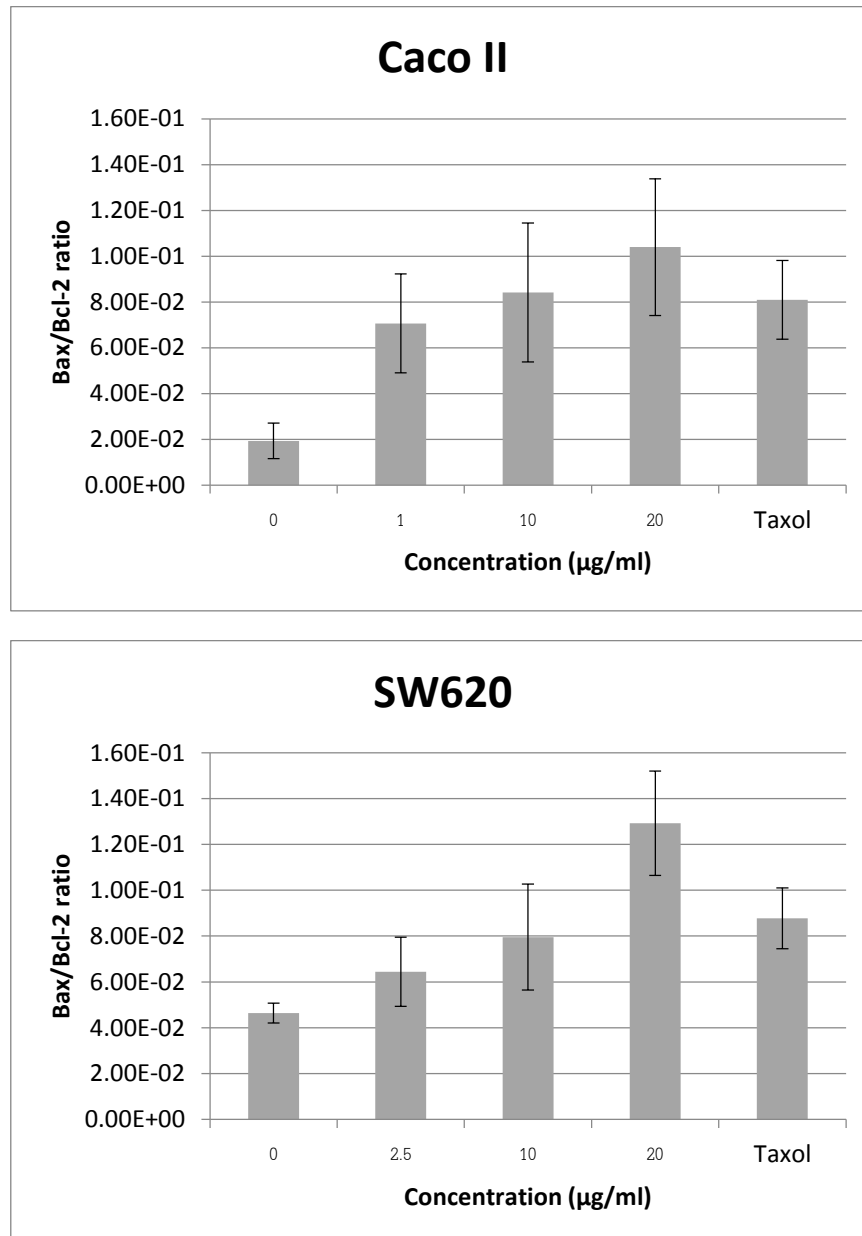
ผลการทดลอง



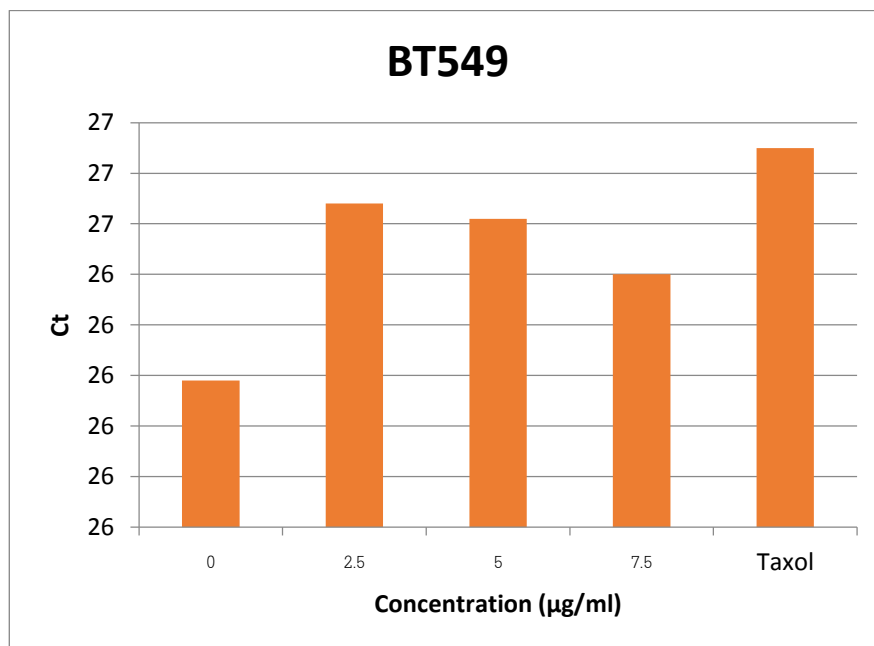
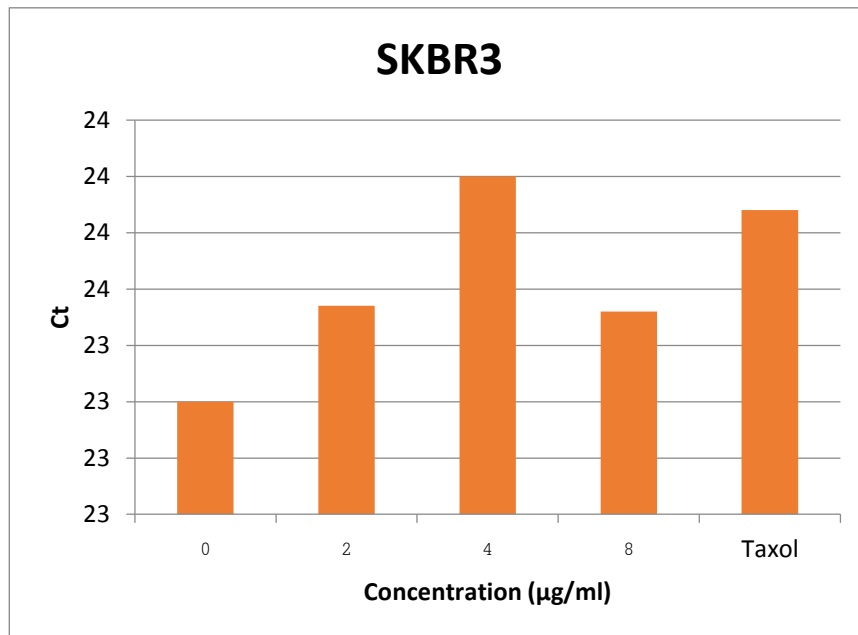


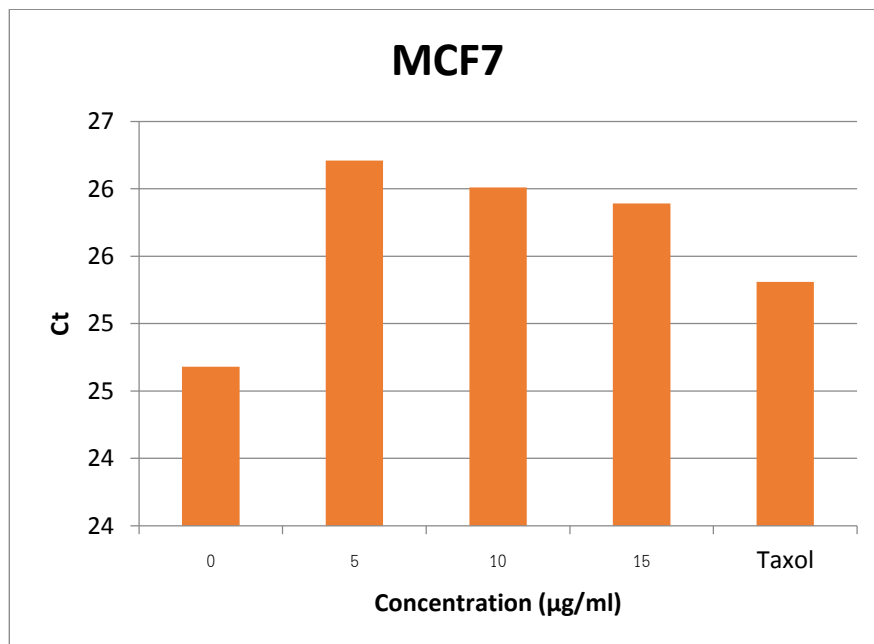
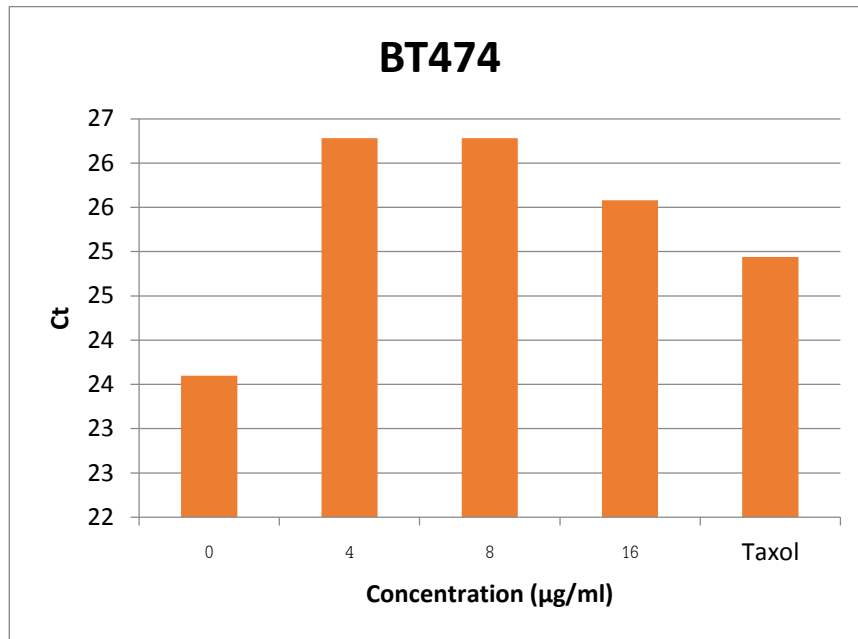


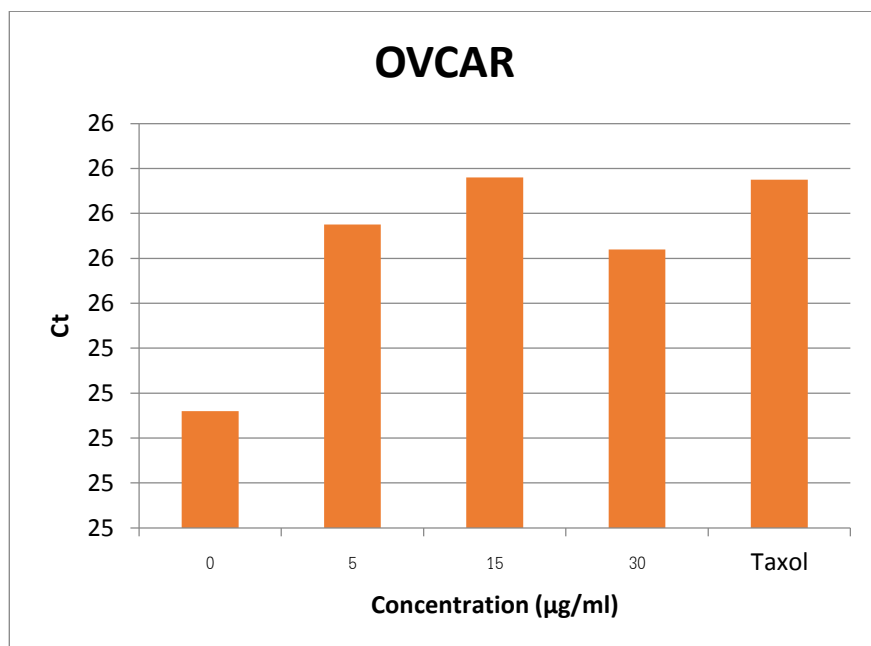
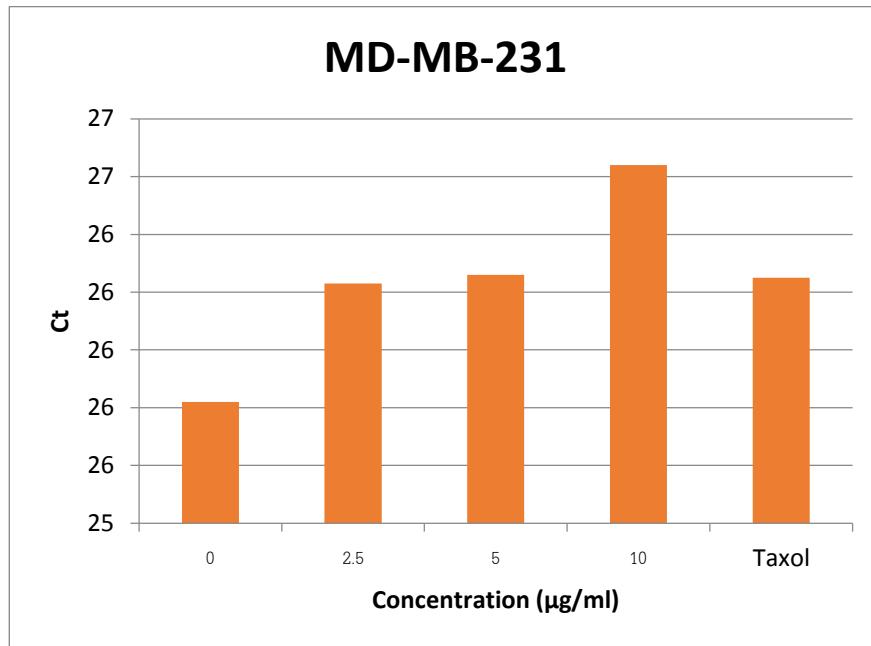


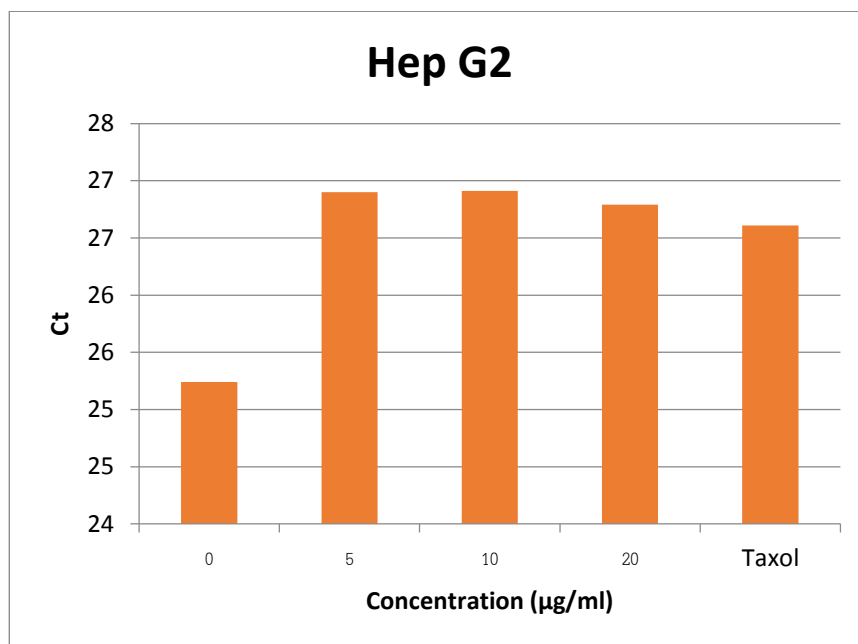
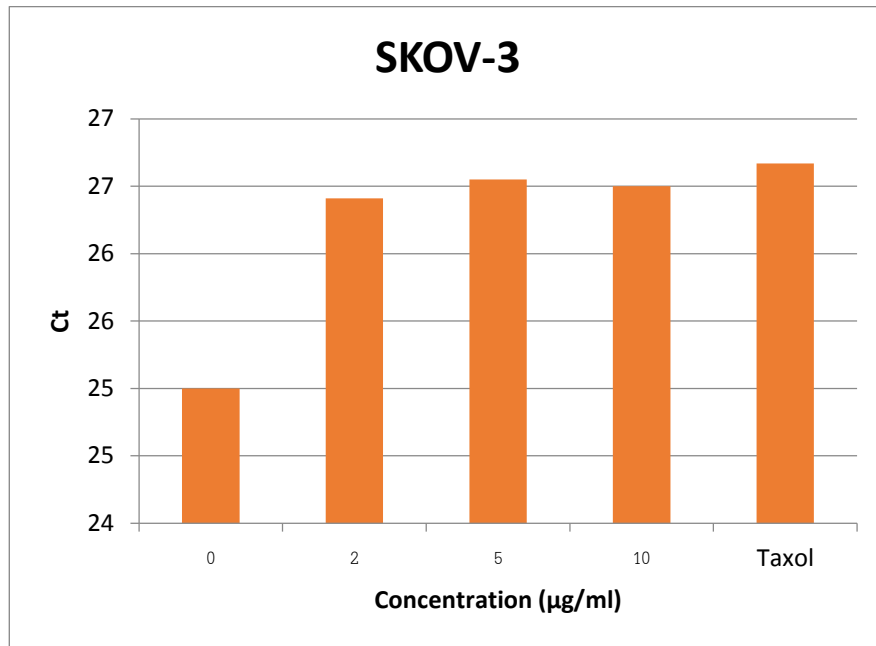


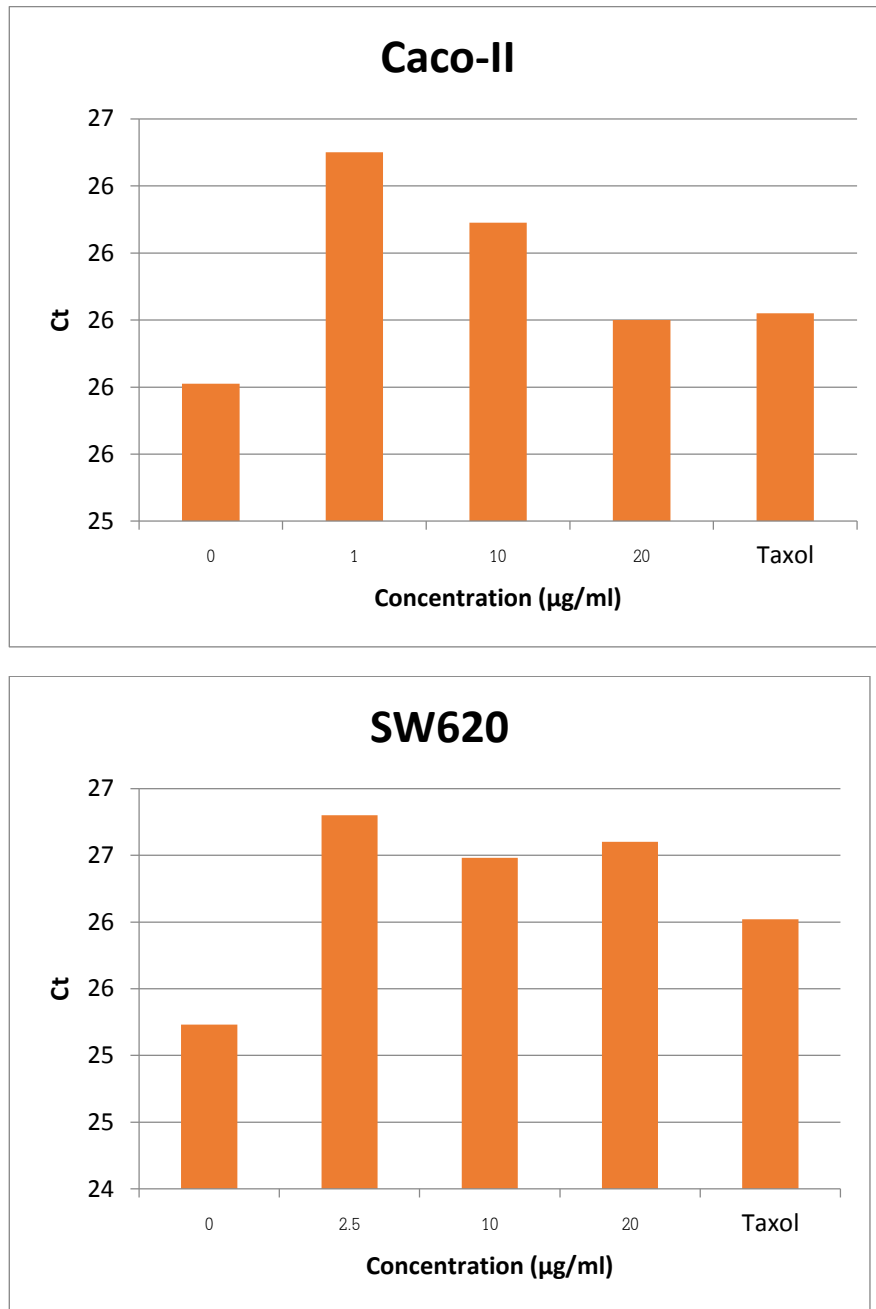
ภาพที่ 15 Real time RT-PCR assay ตรวจสอบปริมาณสัดส่วนของการแสดงออกของยีน Bax/Bcl-2 ที่ทำการศึกษาใน 10 cancer cell lines ภายหลังทดสอบด้วย α -mangostin เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Taxol ในการทดลอง real time RT-PCR assay ปฏิกริยาที่ให้ผลบวกที่ตรวจวัดได้จะแสดงผลของการตรวจวัดการสะสมของ fluorescent signal ซึ่งนำมาเปรียบเทียบผลกันได้ เซลล์มะเร็งที่ได้รับสาร α -mangostin จะมีผลทำให้มี อัตราส่วนของ Bax/Bcl-2 มากขึ้น เนื่องจากเซลล์มะเร็งชนิดนั้น มีการแสดงออกของยีนที่เหนี่ยวนำกระบวนการเกิด apoptosis (Bax) มากขึ้นต่อยีนที่มีการแสดงออกที่ยับยั้งกระบวนการเกิด apoptosis (Bcl-2) น้อยลง ซึ่งสามารถแปลผลได้ว่าเซลล์มะเร็งชนิดนั้น มีอัตราการตายที่เกิดจากกระบวนการ apoptosis มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งที่ไม่มีการให้ α -mangostin











ภาพที่ 16 Realtime RT-PCR assay for cytokeratin in 10 cell lines treated with **α-Mangostin** comparing with Taxol การตรวจวัดการแสดงออกของยีน CK-19 ในเซลล์มะเร็งที่ได้รับสาร α-mangostin ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบด้วยวิธี real time one step RT-PCR โดยใช้ SYBR ในการตรวจหาการแสดงออก แล้วใช้ค่า Ct ในแต่ละตัวอย่างในการเปรียบเทียบ ซึ่งค่า Ct เป็นค่าที่วัดได้จากการทำ real time PCR เป็นค่าที่แสดงรอบของปฏิกิริยา PCR ที่เริ่ม ตรวจหาสัญญาณสี SYBR ในแต่ละตัวอย่าง โดยค่า Ct ที่ได้จะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของ cDNA ในตัวอย่าง ซึ่งสามารถใช้ในการหาปริมาณการแสดงออกของยีน โดยตัวอย่างที่มีค่า Ct น้อย เป็นผลจากยีนที่ต้องการตรวจหาในตัวอย่างนั้น มีการแสดงออกมาก และในทางกลับกัน ในตัวอย่างที่มีค่า Ct น้อย เป็นผลมาจากยีนที่ต้องการตรวจหาในตัวอย่างนั้นๆ มีการแสดงออกน้อยกว่า

แสดงผล immunomodulation

ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด α -mangostin จากเปลือกมังคุดที่มีต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMCs)

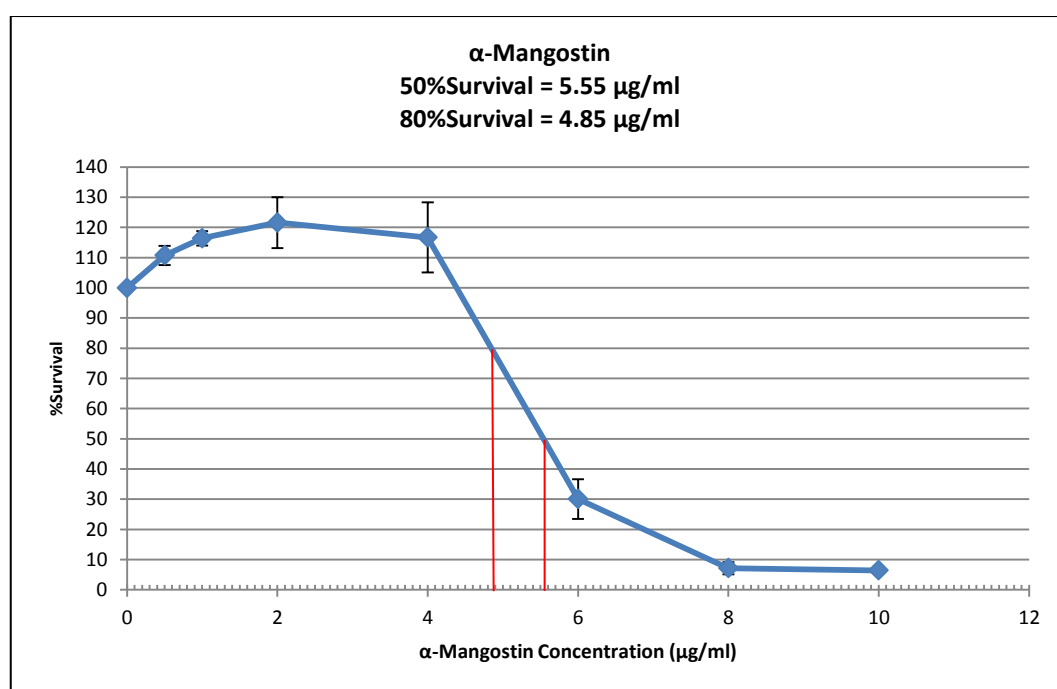
ระบบภูมิคุ้มกันเป็นระบบที่ซับซ้อนและมีความสำคัญในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ทำหน้าที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมจากภายในและภายนอกร่างกาย แบ่งออกเป็น 2 ระบบคือ 1) innate immune system ทำหน้าที่เป็นด่านแรกในการป้องกันสิ่งแปลกปลอม และ 2) adaptive immune system เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นอย่างจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม NK cells เป็นเซลล์ใน innate immune system ทำหน้าที่ทำลายเซลล์แปลกปลอมได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องอาศัยการกระตุ้นหรือนำเสนอโปรตีนของสิ่งแปลกปลอมจากเซลล์อื่น ทำหน้าที่สำคัญในการต้านไวรัสและต้านการเกิดเนื้องอก ในขณะที่ adaptive immune system มี T-lymphocytes และ B-lymphocytes เป็นเซลล์สำคัญของระบบ โดย B-cells นี้จะจับสิ่งแปลกปลอม (antigen) ได้จากการสร้างและแสดง antibodies ออกมาบนผิวเซลล์ (ทำหน้าที่เป็น B-cell receptors) ส่วน antigen receptors ของ T-cells จะปรากฏอยู่บนผิวเซลล์เสมอ เซลล์เหล่านี้จะทำหน้าที่เฉพาะของตน แต่สามารถสื่อสารกันได้โดยอาศัยการหลั่ง cytokines โปรตีนออกมา ซึ่ง cytokine แต่ละชนิดจะทำหน้าที่ควบคุมหรือกระตุ้นการทำงานของเซลล์ต่างๆได้แตกต่างกัน ความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันก่อให้เกิดโรคมามากมาย เช่น การติดเชื้อง่ายอันเกิดจากการไม่สามารถสร้าง T-cells ได้ตามปกติ (เช่นโรค DiGeorge syndrome) หรือเกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มากเกินไป (เช่น โรคหืด, Crohn's disease เป็นต้น) การรักษาภูมิคุ้มกันให้อยู่ในภาวะปกติจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการป้องกันและรักษาโรค

มังคุดเป็นผลไม้ในเขตร้อนชื้นที่มีรสชาติดอ้อยและถูกนำมาใช้ในยาพื้นบ้านหลายตำหรับ มีการศึกษาสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของมังคุดอย่างแพร่หลาย โดยสารที่มีการศึกษามากได้แก่ α -mangostin ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้าน amyloid-aggregation เหนี่ยวนาให้เกิด cell cycle arrest, apoptosis และยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ข่าเชื้อแบคทีเรียและรา และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ของสาร α -mangostin ที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันยังไม่เป็นที่กระจ่าง ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลต่อเซลล์ที่สำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกัน T-cells, B-cells, NK-cells และ cytokines ต่างๆ ใน PBMCs

1. MTT Cell Viability Assay

α -mangostin Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	%Survival			Average	SEM
	n1	n2	n3		
10	6.969989	6.845706	5.505529	6.440408	0.468814
8	10.73433	3.706006	7.016823	7.152385	2.030034
6	30.34152	18.54141	41.33828	30.07374	6.582252
4	121.7897	94.48831	133.7658	116.6813	11.62256
2	131.8088	104.9632	128.0143	121.5954	8.387946
1	119.7792	111.8002	117.7301	116.4365	2.392431
0.5	113.9945	104.3368	113.869	110.7334	3.198507
0	100	100	100	100	0

ตารางที่ 5 แสดงผลระดับความเข้มข้นของสาร α -Mangostin ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ PBMCs ในเลือดอาสาสมัครสุขภาพดี 3 คน



ภาพที่ 17 แสดงผลระดับความเข้มข้นของสาร α -mangostin ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ PBMCs ในเลือดอาสาสมัครสุขภาพดี 3 คน

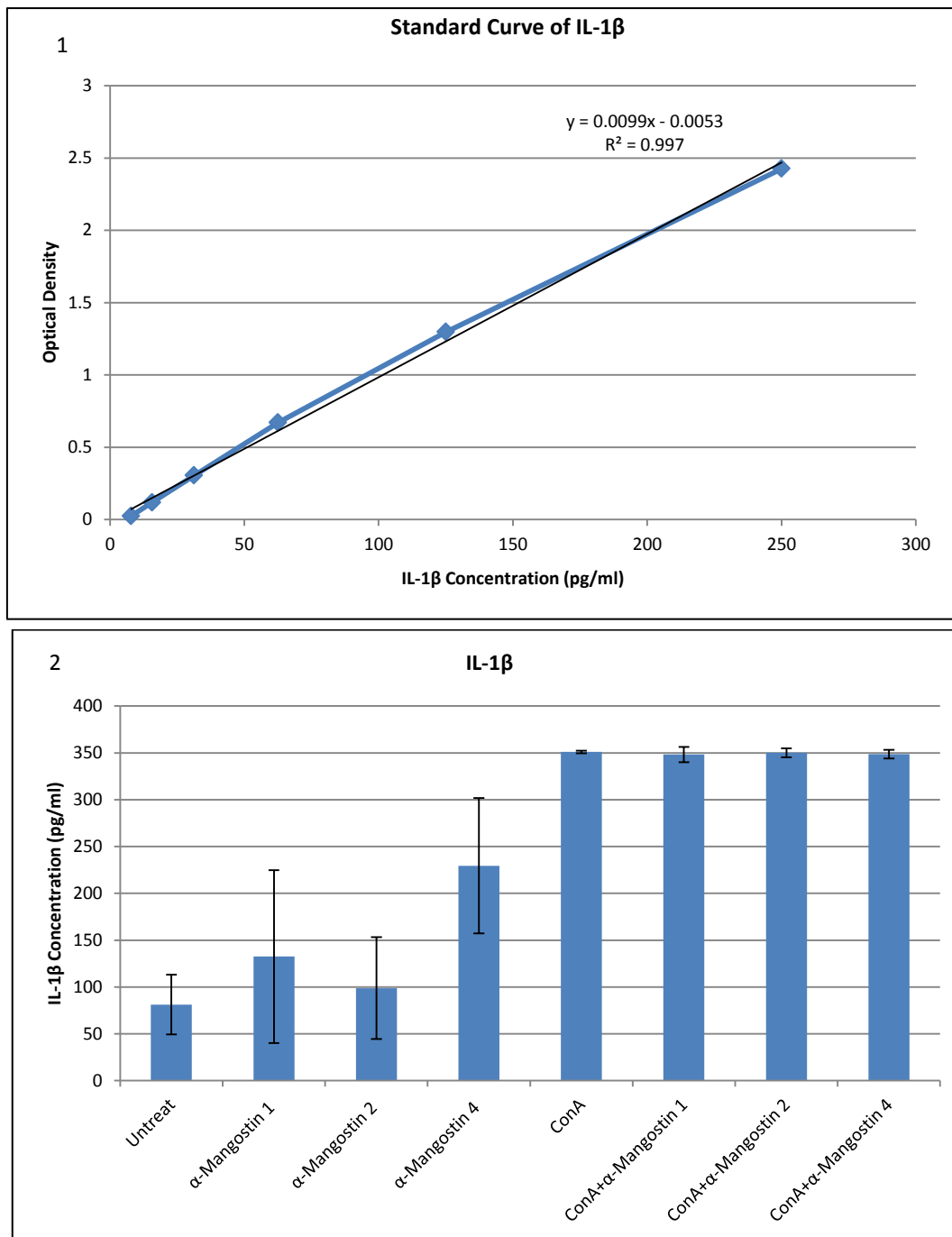
MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) เป็นสารที่นิยมใช้ในการวัด metabolic activity ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยที่ไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถสร้างเอนไซม์ dehydrogenase มาเปลี่ยนสีของสาร MTT จากสีเหลืองเป็นสีม่วง (formazan formed) ได้ซึ่งสีม่วงของ formazan นี้จะเป็นสัดส่วนโดยกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

เมื่อทดลองเติมสาร α -mangostin ลงไปพร้อมกับการเลี้ยง PBMCs พบว่า ยิ่งความเข้มข้นของสาร α -mangostin สูงเท่าไร เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ PBMCs ก็ยิ่งต่ำลงเท่านั้น โดยความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์รอดชีวิตได้ 50% เท่ากับ 5.55 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนความเข้มข้นของสารที่น้อยกว่า 4.85 $\mu\text{g/ml}$ จะทำให้เซลล์มีการรอดชีวิตมากกว่า 80% ขึ้นไป ดังนั้นความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดลองขึ้นไปจึงมีความเข้มข้นต่ำกว่า 4.85 $\mu\text{g/ml}$

2. การตรวจวัดระดับ Cytokines ด้วยวิธี ELISA

หลังจากบ่มเลี้ยง PBMCs ในสภาพต่างๆ (negative control; PBMCs ที่ไม่ได้เติมสารใดๆ, positive control; PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย ConA 10 $\mu\text{g/ml}$ และ สารทดสอบ; PBMCs ที่เติมสาร α -mangostin ความเข้มข้น 1, 2, หรือ 4 $\mu\text{g/ml}$ อย่างเดียว หรือเติมสารกระตุ้น ConA 10 $\mu\text{g/ml}$ ด้วย) นาน 24 ชั่วโมง ส่วน supernatant ที่ไม่มีตัวเซลล์จะถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ cytokines ต่างๆ ดังนี้

2.1 IL-1 β

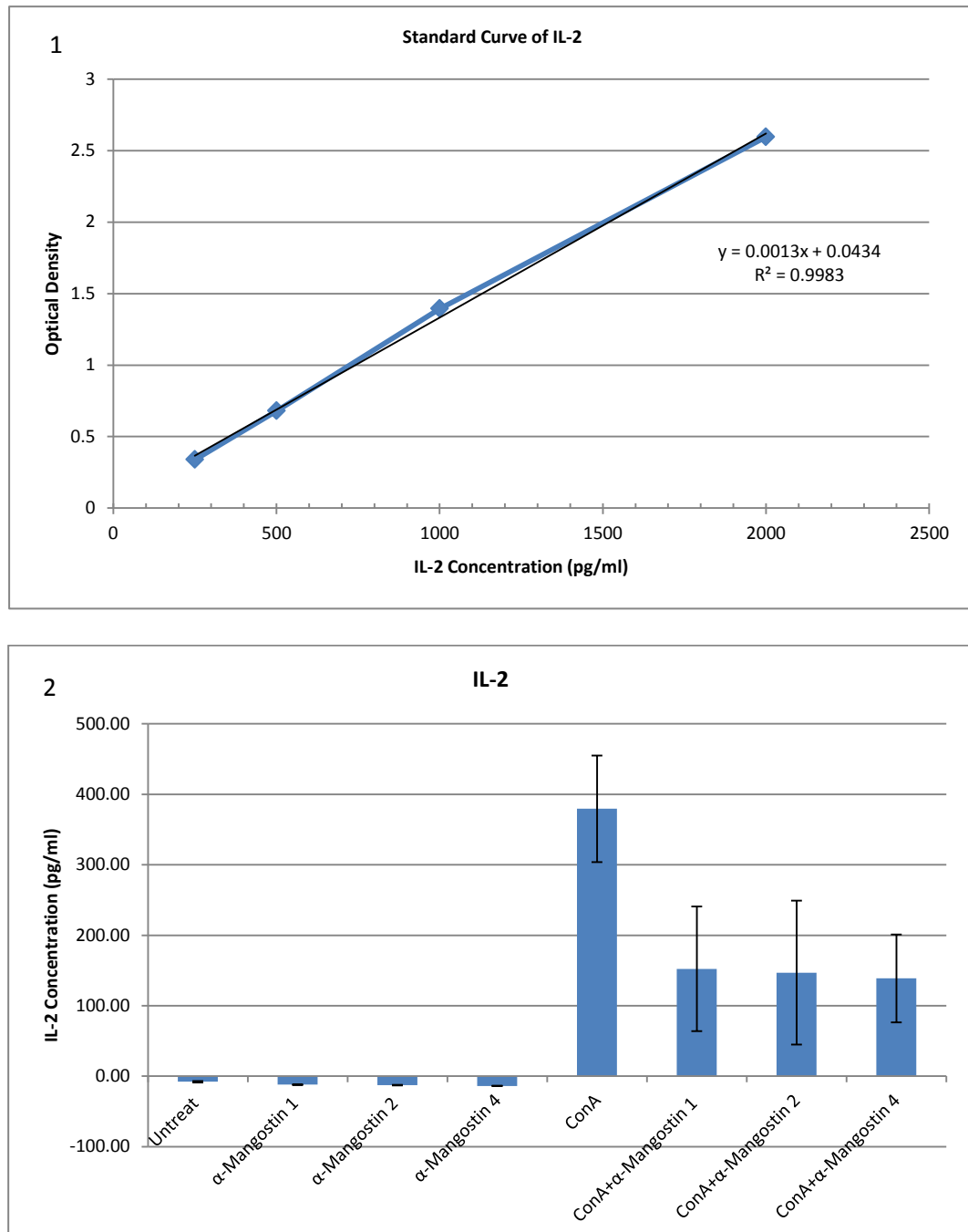


ภาพที่ 18 แสดงกราฟมาตรฐานของสาร IL-1 β (1), ความเข้มข้นของ IL-1 β ที่หลั่งออกมาจาก PBMCs ในสภาวะต่างๆ (แสดงในรูป mean $\pm$ SEM, จำนวนตัวอย่างทดสอบเท่ากับ 3) (2)

จากการทดสอบเติมสาร α -mangostin ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 μ g/ml ลงไปในอาหารเลี้ยง PBMCs พบว่า ระดับการหลั่ง IL-1 β ของ PBMCs เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ)

เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (untreat PBMCs) โดยที่ความเข้มข้น 4 μ g/ml ของ α -mangostin สามารถเพิ่มระดับการหลั่ง IL-1 β ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับในสามความเข้มข้น ในขณะที่การเติมสาร α -mangostin ลงไปพร้อมกับ ConA กลับไม่ทำให้PBMCsเกิดการเปลี่ยนแปลงการหลั่ง IL-1 β เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (ConA-stimulated PBMCs)

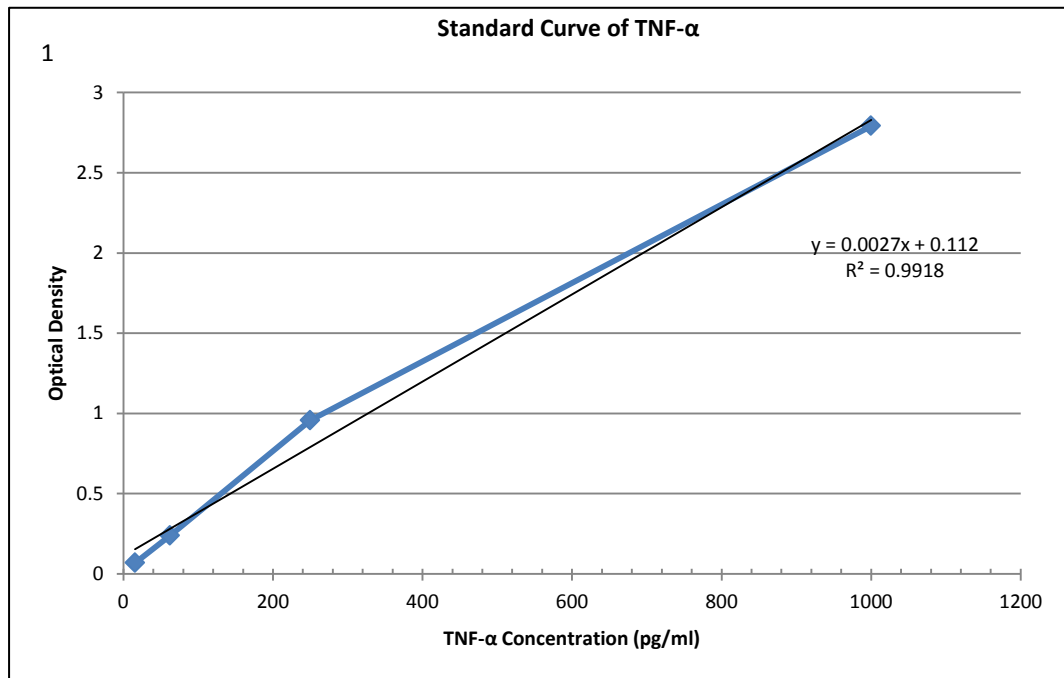
2.2 IL-2

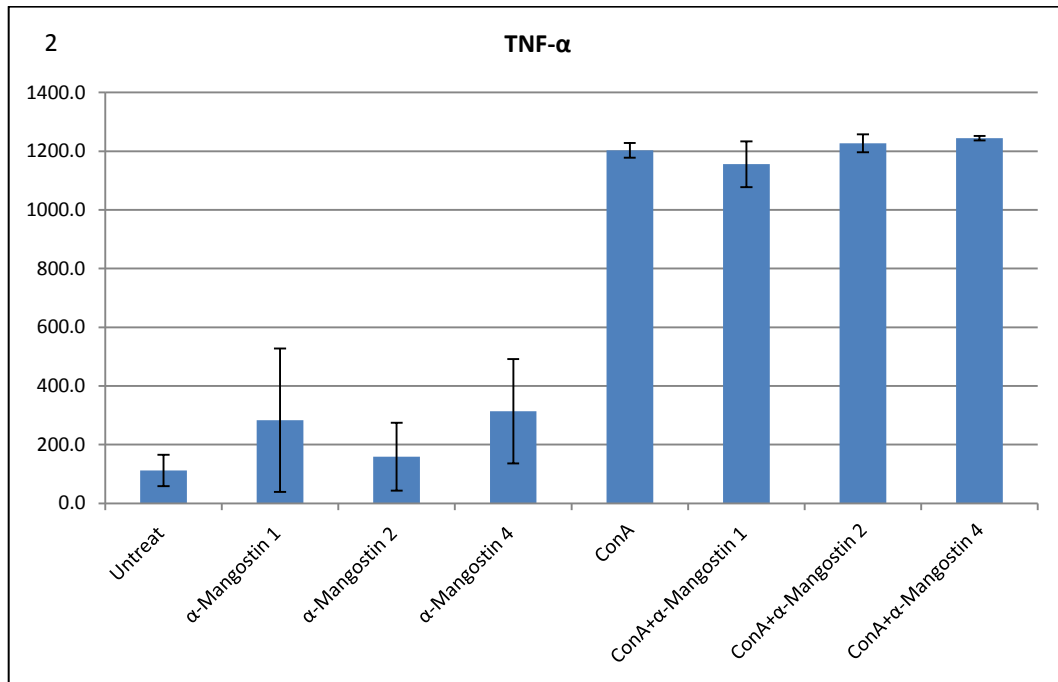


ภาพที่ 19 แสดงกราฟมาตรฐานของสาร IL-2 (1), ความเข้มข้นของ IL-2 ที่หลั่งออกมาจาก PBMCs ในสภาวะต่างๆ (แสดงในรูป mean $\pm$ SEM, จำนวนตัวอย่างทดสอบเท่ากับ 3) (2)

เมื่อเติมสาร α -mangostin ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 $\mu\text{g/ml}$ ลงไปในอาหารเลี้ยง PBMCs พบว่า ไม่ทำให้ PBMCs เกิดการเปลี่ยนแปลงการหลั่ง IL-2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (untreat PBMCs) แต่เมื่อเติมสาร α -mangostin ลงไปพร้อมกับ ConA กลับทำให้ PBMCs ลดการหลั่ง IL-2 ได้มาก (ไม่นัยสำคัญทางสถิติ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (ConA-stimulated PBMCs) โดยที่ความเข้มข้นของสาร α -mangostin ที่สูงจะสามารถลดระดับการหลั่ง IL-2 ได้มากกว่าสารที่มีความเข้มข้นต่ำ (ความเข้มข้นของ α -mangostin 4 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดระดับของ IL-2 ได้มากกว่าความเข้มข้น 2 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ; ลดลงแบบ dose- response manner)

2.3 TNF- α





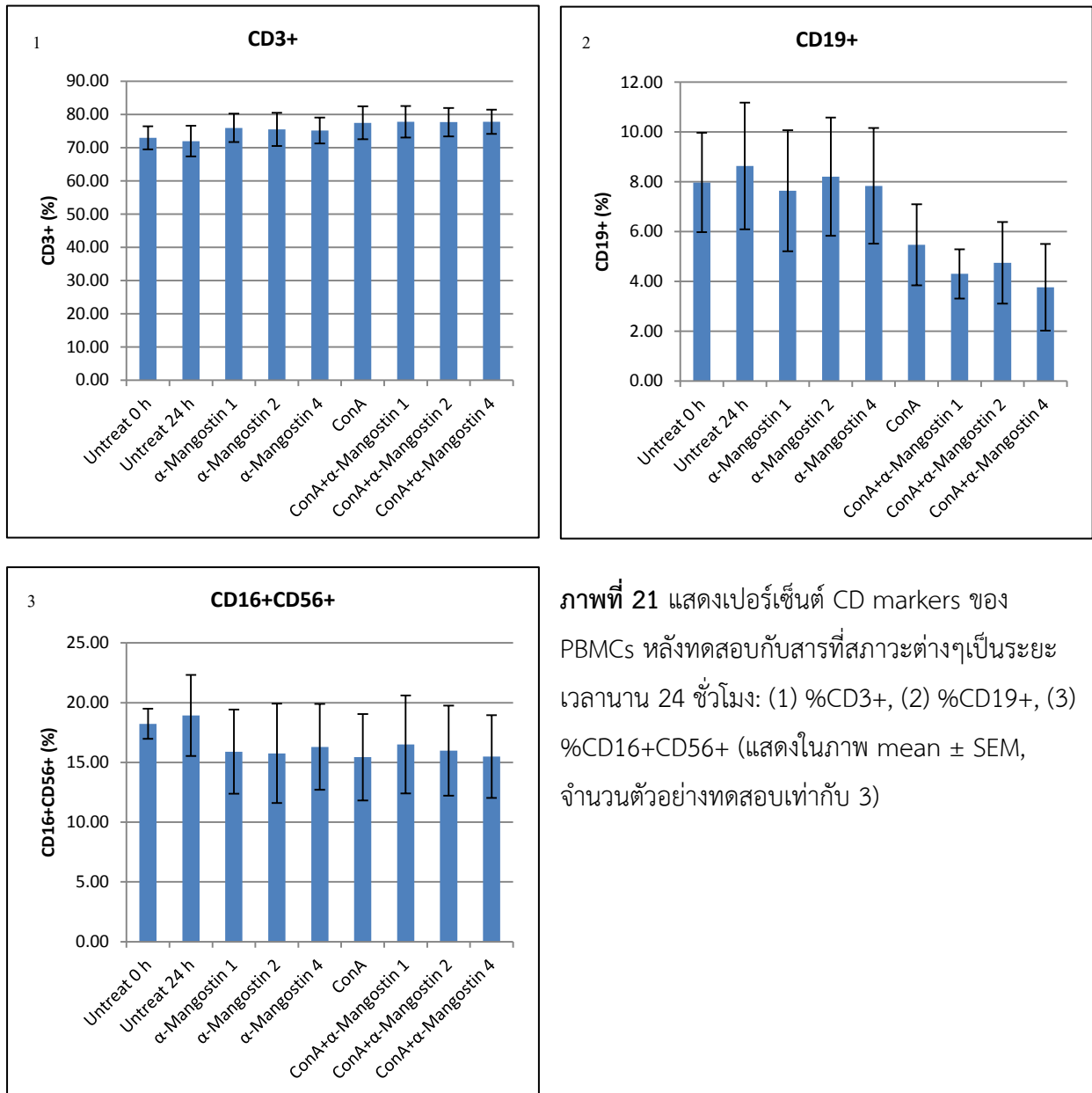
ภาพที่ 20 แสดงกราฟมาตรฐานของสาร TNF- α (1), ความเข้มข้นของ TNF- α ที่หลั่งออกมาจาก PBMCs ในสถานะต่างๆ (แสดงในรูป mean $\pm$ SEM, จำนวนตัวอย่างทดสอบเท่ากับ 3) (2)

จากการทดสอบพบว่าสาร α -mangostin ทั้งสามความเข้มข้นสามารถกระตุ้น PBMCs ให้เพิ่มการหลั่ง TNF- α ได้เล็กน้อย (อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (untreat PBMCs) ในขณะที่สาร α -mangostin ไม่มีผลในการกระตุ้นหรือยับยั้งฤทธิ์ของสาร ConA เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (ConA-stimulated PBMCs)



3. Immunostaining: Flow Cytometry

Conditions	%CD3+					%CD19+					%CD16+CD56+					%CD3+CD16+CD56+				
	n1	n2	n3	Average	SEM	n1	n2	n3	Average	SEM	n1	n2	n3	Average	SEM	n1	n2	n3	Average	SEM
Untreat 0 h	66.74	78.70	73.60	73.01	3.46	11.60	4.70	7.62	7.97	2.00	20.20	15.90	18.60	18.23	1.25	9.44	12.10	20.00	13.85	3.17
Untreat 24 h	63.97	80.00	72.00	71.99	4.63	9.73	3.78	12.40	8.64	2.55	25.70	15.80	15.30	18.93	3.39	8.87	13.30	16.30	12.82	2.16
α -mangostin 1	71.08	84.60	72.30	75.99	4.32	6.16	4.36	12.40	7.64	2.44	22.40	10.30	15.00	15.90	3.52	8.98	14.10	15.00	12.69	1.87
α -mangostin 2	68.32	85.10	73.20	75.54	4.98	7.28	4.64	12.70	8.21	2.37	23.70	9.67	13.90	15.76	4.16	9.82	14.70	14.80	13.11	1.64
α -mangostin 4	69.85	82.80	72.90	75.18	3.91	6.31	4.80	12.40	7.84	2.32	23.30	11.40	14.20	16.30	3.59	9.25	15.40	15.40	13.35	2.05
ConA	69.93	86.80	75.80	77.51	4.94	5.27	2.76	8.38	5.47	1.63	21.90	9.41	15.00	15.44	3.61	9.13	13.70	17.90	13.58	2.53
ConA+ α -mangostin 1	70.79	86.80	75.90	77.83	4.72	3.70	2.97	6.23	4.30	0.99	23.60	9.41	16.50	16.50	4.10	8.59	13.40	17.80	13.26	2.66
ConA+ α -mangostin 2	71.61	86.00	75.50	77.70	4.30	3.37	2.85	8.01	4.74	1.64	22.80	9.78	15.40	15.99	3.77	9.61	13.10	16.70	13.14	2.05
ConA+ α -mangostin 4	74.31	85.10	74.00	77.80	3.65	1.56	2.52	7.20	3.76	1.74	22.00	10.20	14.30	15.50	3.46	7.71	11.80	16.80	12.10	2.63



ภาพที่ 21 แสดงเปอร์เซ็นต์ CD markers ของ PBMCs หลังทดสอบกับสารที่สภาวะต่างๆเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง: (1) %CD3+, (2) %CD19+, (3) %CD16+CD56+ (แสดงในภาพ mean $\pm$ SEM, จำนวนตัวอย่างทดสอบเท่ากับ 3)

จากผลการศึกษาพบว่าสาร α -mangostin ทั้งสามความเข้มข้นทำให้ PBMCs เพิ่มระดับ T-lymphocytes (CD3+) ได้เพียงเล็กน้อย (อย่างไม่มีนัยสำคัญ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบที่ 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการกระตุ้น PBMCs ด้วย ConA ร่วมกับสาร α -mangostin ทำให้ระดับ CD3+ เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการกระตุ้นด้วย ConA เพียงอย่างเดียว; ภาพที่ 21 (1), แต่การเติมสาร α -mangostin กลับทำให้ระดับ B-lymphocytes (CD19+) ลดลง (อย่างไม่มีนัยสำคัญ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบที่ 24 ชั่วโมง และระดับของ B-lymphocytes จะยิ่งลดลงอีกเมื่อให้ร่วมกับ ConA เมื่อเทียบกับการได้รับ ConA เพียงอย่างเดียว; ภาพที่ 21 (2), ในขณะที่การเติมสาร α -mangostin ทำให้ระดับของ NK cells (CD16+CD56+) ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบที่ 24 ชั่วโมง แต่ไม่ทำให้ระดับของ NK cells ลดลงมากขึ้นเมื่อให้ร่วมกับ ConA หากเทียบกับการได้รับ ConA เพียงอย่างเดียว; ภาพที่ 21 (3)

5. อภิปรายและวิจารณ์ผล ได้แก่ การอธิบายผลการทดลอง ผลการวิจัยที่ได้ทั้งหมด ทั้งที่เป็นและไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ รวมถึงการเปรียบเทียบกับผลการวิจัยที่ได้มีการศึกษาไว้แล้ว

5.1 Antiproliferation และ antioxidation ของสาร α -mangostin ต่อเซลล์ชนิดต่างๆ โดยวิธี MTT assay

- ในเบื้องต้นจากผลการทดลอง พบว่าสาร α -mangostin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ชนิดต่าง ๆ มีค่า ED_{50} $\mu\text{g/ml}$ แตกต่างกันระหว่าง 5.45-18.98 $\mu\text{g/ml}$ และบางเซลล์ alpha mangostin จะมีฤทธิ์ที่ดีกว่ายาควบคุม
- พบว่าสาร alpha mangostin มีฤทธิ์ antioxidation เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH method แต่ฤทธิ์ไม่แรงเท่า ascorbic acid

พบว่าสาร alpha mangostin มีฤทธิ์ antioxidation เมื่อทดสอบด้วยวิธี reactive oxygen species (ROS) โดยใช้ cell line แต่ละชนิด ที่กระตุ้นด้วยสาร H_2O_2 ทำการทดสอบด้วยสาร alpha mangostin ที่ 5, 10 และ 20 $\mu\text{g/ml}$ ผลที่ได้ต่อเซลล์ต่างๆมีความแตกต่างกัน และจากการทดลอง alpha mangostin ไม่มีผลจากการทดลองนี้ต่อเซลล์ OVCAR3, SKOV3 และ HepG2 ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ เมื่อเทียบกับ ascorbic acid

5.2 การประเมินศักยภาพของ α -mangostin ต่อกระบวนการเกิด apoptosis, signal proteins, gene expression และ tumor markers

- Apoptosis เป็นกลไกหนึ่งของร่างกายที่ใช้กำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการหรือถึงอายุขัย แต่เซลล์มะเร็งสามารถต่อต้านการควบคุมการตายแบบ apoptosis ได้จากผลการทดลองพบว่าสาร α -mangostin มีผลต่อการเกิด กระบวนการ apoptosis โดยที่ เมื่อเซลล์มะเร็ง ได้รับสาร α -mangostin จะมีผลทำให้มี อัตราส่วนของ Bax/Bcl-2 มากขึ้น เนื่องมาจากเซลล์มะเร็งชนิด นั้น มีการแสดงออกของยีนที่เหนี่ยวนำกระบวนการเกิด apoptosis (Bax) มากขึ้นต่อยีนที่มีการแสดงออกที่ยับยั้งกระบวนการเกิด apoptosis (Bcl2) น้อยลง ซึ่งสามารถแปลผลได้ว่าเซลล์มะเร็งชนิดนั้น มีอัตราการตายที่เกิดจากกระบวนการ apoptosis มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งที่ไม่มีการให้ α -mangostin ซึ่งผลที่ได้ในเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด เมื่อมีการให้สาร α -mangostin ที่มีความเข้มข้นมากขึ้น อัตราการตาย ของเซลล์ SKBR3, MCF7, OVCAR3, Hep-G2, Caco II และ SW620 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ยกเว้นในเซลล์ BT543, BT474, MD-MB-231 และ SKOV3 ที่เมื่อได้รับสาร α -mangostin ในปริมาณสูงแล้ว ค่าสัดส่วนของ Bax/Bcl-2 มีค่าที่ลดลง แต่จากการสังเกตเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์มีอัตราการตายที่มากขึ้นตามความเข้มข้นของ สาร α -mangostin ซึ่งสาเหตุ ของการตายนั้น อาจเนื่องมาจากเซลล์นั้นๆ มีกระบวนการตายของเซลล์ ที่ไม่ได้เกิดจาก กระบวนการ apoptosis และมีการเกิด กระบวนการดังกล่าวขึ้นก่อนที่ ยีนที่ควบคุมกระบวนการ apoptosis จะเริ่มมีการแสดงออกจึงมีผลทำให้ ปริมาณ mRNA ที่สกัดได้จากเซลล์มีค่าน้อยกว่า ใน สภาวะที่มีความเข้มข้นของ สาร α -mangostin มากขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบกับ การให้ยามาตรฐาน Taxol พบว่า สาร α -mangostin มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ได้เช่นเดียวกันกับ Taxol แต่อัตราการเกิด กระบวนการ apoptosis ก็จะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของเซลล์มะเร็ง จากการทดลอง จึงสรุปได้ว่าสาร α -mangostin จากมังคุดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม จะมีศักยภาพในการที่จะนำมาใช้เป็นสารต้านมะเร็งได้

- **Tumor markers** ศึกษา ยีน Cytokeratin-19 (CK-19) ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นตัวตรวจวินิจฉัยมะเร็ง ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจวัดการแสดงออกของยีน CK-19 ในเซลล์มะเร็งที่ได้รับสาร α -mangostin ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบด้วยวิธี real time one step RT-PCR โดยใช้ SYBR ในการตรวจหาการแสดงออกแล้วใช้ค่า Ct ในแต่ละตัวอย่างในการเปรียบเทียบ ซึ่งค่า Ct เป็นค่าที่วัดได้จากการทำ real time RT-PCR เป็นค่าที่แสดงรอบของปฏิกิริยา PCR ที่เริ่ม ตรวจหาสัญญาณสี SYBR ในแต่ละตัวอย่าง โดยค่า Ct ที่ได้จะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของ cDNA ในตัวอย่าง ซึ่งสามารถใช้ในการหาปริมาณการแสดงออกของยีน โดยตัวอย่างที่มีค่า Ct น้อย เป็นผลจากยีนที่ต้องการตรวจหาในตัวอย่างนั้น มีการแสดงออกมาก และในทางกลับกัน ในตัวอย่างที่มีค่า Ct มาก เป็นผลมาจากยีนที่ต้องการตรวจหาในตัวอย่างนั้นๆ มีการแสดงออกน้อยกว่า

ในการศึกษาพบว่า α -mangostin มีบทบาทต่อการแสดงออกของยีน CK-19 โดยการแสดงออกของยีน CK-19 จะลดลงในเซลล์มะเร็งที่ได้รับสาร α -mangostin เช่นเดียวกันกับ เซลล์มะเร็งที่ได้รับยา Taxol และผลที่ได้มีแนวโน้มเดียวกันกับการตรวจวัดโดยการวัดด้วย ค่าสัดส่วนของ Bax/Bcl-2 จึงเป็นการช่วยยืนยัน ศักยภาพของสาร α -mangostin จากมังคุด ที่จะนำมาใช้เป็นสารต้านมะเร็งได้

- ยีน Cytokeratin-19 (CK-19) มีการนำมาใช้เป็นตัวตรวจวินิจฉัยมะเร็ง ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจวัดการแสดงออกของยีน CK-19 ในเซลล์มะเร็งที่ได้รับสาร α -mangostin ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบด้วยวิธี real time one step RT-PCR ต่อไป

- ในการศึกษาพบว่า α -mangostin มีบทบาทต่อการแสดงออกของยีน CK-19 โดยการแสดงออกของยีน CK-19 จะลดลงในเซลล์มะเร็งที่ได้รับสาร α -mangostin เช่นเดียวกันกับ เซลล์มะเร็งที่ได้รับยา Taxol และผลที่ได้มีแนวโน้มเดียวกันกับการตรวจวัดโดยการวัดด้วย ค่าสัดส่วนของ Bax/Bcl-2 จึงเป็นการช่วยยืนยัน ศักยภาพของสาร α -mangostin จากมังคุด ที่จะนำมาใช้เป็นสารต้านมะเร็งได้

5.3 Immunomodulation ของสาร α -mangostin

- ในการทดลองนี้ต้องการศึกษาผลของสาร α -mangostin ที่มีต่อเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส ได้แก่ T-lymphocytes, B-lymphocytes และ NK cells โดย NK-cells ทำหน้าที่เป็นด่านแรกในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม ขณะที่ T-cells และ B-cells มีส่วนสำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันขึ้นมา จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารที่นำมาทดสอบ (1, 2 และ 4 μ g/ml) ส่งผลทำลายเซลล์น้อย (เซลล์รอดชีวิต

มากกว่า 80%) และทั้งสามความเข้มข้นนี้มีผลเพิ่ม T-cells (CD3+) เพียงเล็กน้อย; ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด (1 $\mu\text{g/ml}$) ทำให้เปอร์เซ็นต์ CD3+ เพิ่มสูงกว่าความเข้มข้น 2 และ 4 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และแม้จะทำการกระตุ้น PBMCs ด้วยสาร ConA ที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้น T-cells กลับไม่ทำให้เปอร์เซ็นต์ CD3+ เพิ่มขึ้นมากนัก ส่วนการเติมสาร α -mangostin ลงไปพร้อมกับการกระตุ้นของ ConA ก็ไม่ได้ส่งผลเพิ่มระดับ CD3+ ให้มากขึ้นไปกว่าการกระตุ้นด้วย ConA เพียงอย่างเดียว ในทางตรงกันข้าม α -mangostin กลับส่งผลลดระดับเปอร์เซ็นต์ของ CD19+ และ CD16+56+ ลง แสดงว่าสารนี้มีฤทธิ์ในการทำลาย B- และ NK-cells และเมื่อ PBMCs ได้รับสาร α -mangostin พร้อมกับ ConA ระดับเปอร์เซ็นต์ของ CD19+ ยิ่งลดต่ำลงกว่าเดิม แสดงว่าสาร α -mangostin มีฤทธิ์ร่วมกับ ConA ในการทำลาย B-cells มากขึ้น ในส่วนของการหลั่ง cytokines พบว่า PBMCs ที่ได้รับสาร α -mangostin แม้ว่าจะเพิ่มการหลั่ง IL-1 β และ TNF- α ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการอักเสบเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญอย่างไร แสดงว่าสาร α -mangostin ไม่ทำให้เซลล์เกิดการอักเสบ และไม่มีผลในการยับยั้งหรือเสริมฤทธิ์กับ ConA ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ ส่วน IL-2 นั้นตามปกติจะหลั่งจาก $\gamma\delta$ T cells, activated conventional CD4+ และ CD8+ T cell [3] แต่การให้สาร α -mangostin แก่ PBMCs ไม่ทำให้ระดับ IL-2 เพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับระดับ T-cells (CD3+) ที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงแตกต่างไปจากกลุ่มควบคุมลบ แต่สาร α -mangostin กลับมีฤทธิ์ยับยั้ง ConA ไม่ให้ PBMCs หลั่ง IL-2 มากขึ้นอีก แสดงว่าสาร α -mangostin มีฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์ของ ConA ในการกระตุ้น $\gamma\delta$ T cells, activated conventional CD4+ และ CD8+ T cell อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังมีจำนวนตัวอย่างที่ใช้ทดสอบน้อยอยู่ ควรทำการเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ใช้ทดสอบและทำการศึกษากลไกต่างๆเพิ่มเติม

6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ ให้สรุปเรื่องราวในการวิจัยพร้อมทั้งเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไปตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานที่ได้

แนวโน้มของการศึกษาเพื่อการประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต

พบว่าสาร α -mangostin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ มีค่า ED₅₀ $\mu\text{g/ml}$ แตกต่างกันระหว่าง 5.45-18.98 $\mu\text{g/ml}$ และบางเซลล์ α -mangostin จะมีฤทธิ์ที่ดีกว่ายาควบคุม และพบว่ามีฤทธิ์ antioxidation ตลอดจนผลที่ได้ที่เกี่ยวกับการเกิด apoptosis โดยผลที่ได้จากการตรวจวัด ค่าสัดส่วนของ Bax/Bcl-2 และ cytokeratin expression เป็นการช่วยยืนยันศักยภาพของสาร α -mangostin จากมังคุด ที่จะนำมาใช้เป็นสารต้านมะเร็งได้ จึงเชื่อมั่นว่าควรทำการศึกษา antitumor activities *in vivo* ของสารบริสุทธิ์ α -mangostin ตามที่ได้เคยศึกษาได้ผลดีจากสาร crude methanolic extract ของมังคุดที่เปปสารตั้งต้นในการแยกสารบริสุทธิ์ α -mangostin ซึ่งอยู่ในระหว่างรอผลการพิจารณาโครงการขอทุนจาก วช. สำหรับปี 2556 เพื่อศึกษาผล antitumor ของสาร α -mangostin ในหนู ก่อนนำข้อมูลมาใช้ต่อไปในการศึกษาทางคลินิก

7. บรรณานุกรม (Bibliography)

- Boehm T. Design principles of adaptive immune systems. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:307-317.
- Chaivisuthangkura A, Malaikaew Y, Chaovanalikit A, Jaratrungtawee A, Panseeta P, Ratananukul P, Suksamrarn S. Prenylated xanthone composition of *Garcinia mangostana* (Mangosteen) FruitHull. *Chromatographia* 2009;69:315-318.
- Farnsworth NR, Bunyaphrathasara N. Thai medicinal plant: recommended for primary health care system. Bangkok: Mahidol University; 1992.
- Gad SC, Chengelis CP. Animal models in toxicology. New York: Marcel Dekker; 1992.
- Gupta M, Mazumder UK, Rath N, Mukhopadhyay DK. Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich Ascites Carcinoma. *J Ethnopharmacol* 2000;72:151-6.
- Holland EC. Mouse models of human cancer. New York: Wiley-Liss, 2004.
- Kosem N, Han YH, Moongkarndi P. Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* hulls. *ScienceAsia* 2007;33:283-292.
- Kosem N. et al. *In vivo* toxicity and antitumor activity of mangosteen extract. *J Nat Med* 2013;67:255-263.
- Liu HF, Liu WW, Fang DC, Men RP. Expression and significance of proapoptotic gene Bax in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;5:15-17.
- ^aMoongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *J Ethnopharmacol* 2004;90:161-6.
- ^bMoongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, Jongsomboonkusol S, Pongpan N. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia* 2004;75:375-7.
- National Cancer Institute of Thailand [Online]. Available from: <http://www.nci.go.th> [Accessed 2008 Jan 07].
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism of the National Institutes of Health (NIAAA) [Online]. Available from: <http://www.niaaa.nih.gov> [Accessed 2008 Jan 05].
- National Library of Medicine and the National Institutes of health [Online]. Maryland; 2004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/query> [Accessed 2007 Nov 17].
- Neungton N, Moongkarndi P, Laohathai K, Neungton S, Juntrachotiwiwit P. Immunohistological characteristic of OVS1 and OVS2 monoclonal antibodies recognizing human ovarian mucinous cystadenocarcinoma. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1992;10:129-34.

- Neungton N, Moongkarndi P, Neungton S, Laohathai K, Srisawat C, Wachirutmanggur L. Establishment of OVS1 and OVS2 monoclonal antibodies recognizing human ovarian mucinous cystadenocarcinoma. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 1995;13:47-53.
- Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Orozco-Ibarra M, Pérez-Rojas J. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chem Toxicol* 2008;46:3227-3239.
- Proimmune. Unlabeled pentamer staining protocol. 2010 02/2010 [cited 2012; Available from: http://www.proimmune.com/ecommerce/pdf_files/PR06U.pdf.
- Satyavati GV, Raina MK, Sharma M. Medicinal plants of India. Delhi: Cambridge Printing Works; 1976.
- Studzinski GP. Cell growth and apoptosis: a practical approach. New York: IRL Press; 1995.
- Systems RD. Quantikine Human IL-10, in Quantikine IL-10 Immunoassay. 2010: Minnesota.
- Systems RD. Quantikine Human IL-1beta/IL-1F2, in Quantikine Human IL-1beta/IL-1F2 Immunoassay. 2009: Minnesota.
- Systems RD. Quantikine Human IL-2. 2010: Minnesota.
- Systems RD. Quantikine Human TNF-alpha, in Quantikine Human TNF-alpha Immunoassay. 2010: Minnesota.
- Uawisetwathana U. Master Thesis, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand 2007.
- Weecharangsan W, Opanasopit P, Sukma M, Ngawhirunpat T, Sotanaphun U, Siripong P. Antioxidative and neuroprotective activities of extracts from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) *Med Principles Practice* 2006;15:281– 287.
- WHO 2000. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine., Geneva: World Health Organization; 2000.
- World Health Organization [Online]. Available from: <http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html> [Accessed 2008 Jan 05].
- World Health Organization [Online]. Available from: <http://www.who.int/media/centre/factsheets/fs297/en/> [Accessed 2008 Jan 07].
- World Health Organization. World health statistics 2007. Geneva: WHO Press; 2007.