

Original article

P01

ฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ของสมุนไพรไทยในเซลล์เพาะเลี้ยง

ชมพูนุท อันศรี^{1*}, วราภรณ์ แก้วคอน¹, รัตติยา ทองรุ่ง¹, กรรณก อิงคินันท์², นันทิทิพ ลิ้มเพียรชอบ¹¹ ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร² ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

* ผู้แสดงผลงาน

บทคัดย่อ

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก จัดเป็นมะเร็งที่พบบ่อยในลำดับต้นๆ โดยเฉพาะในประเทศที่พัฒนาแล้ว และเป็นมะเร็งที่คาดว่าจะสามารถป้องกันได้เนื่องจากสาเหตุหลักเกิดจากลักษณะของอาหารที่รับประทาน จึงมีการศึกษาจำนวนมากที่พยายามค้นหาสารจากธรรมชาติที่สามารถป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย 7 ชนิด ได้แก่ เถาวัลย์เปรียง เขยตาย ปญจันธุ์ พูลกวา อังกาบ ทองพันชั่ง และหญ้าปักกิ่ง โดยทำการทดสอบเบื้องต้นถึงฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยง SW480 ด้วย MTT assay ผลการทดลองพบว่า สารสกัดเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์ SW480 ได้ดีที่สุด ($IC_{50} = 4.86 \mu\text{g/ml}$) สารสกัดเถาวัลย์เปรียงจึงถูกเลือกเพื่อนำมาศึกษาในระดับลึกต่อไป โดยทำการค้นหากลไกในการต้านเซลล์มะเร็ง โดยทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการเกิด cell apoptosis ด้วย Flow cytometer และพบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงไม่มีผลในการทำให้เซลล์มะเร็งเกิด apoptosis แต่พบว่าเซลล์บางส่วนมีการตายแบบ necrosis และคาดว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงอาจมีผลต่อกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์บางส่วน ซึ่งจะได้นำมาดำเนินการทดสอบผลของสารสกัดนี้ต่อ cell cycle ของเซลล์ SW480 ต่อไป

คำสำคัญ : มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง, สมุนไพรไทย, เซลล์เพาะเลี้ยง

บทนำ

ในปัจจุบัน อัตราการเกิดโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (colorectal cancer) จัดเป็นมะเร็งที่พบได้มากขึ้นในปัจจุบัน โดยพบว่าสาเหตุหลักเกี่ยวข้องกับอาหารที่รับประทาน ในประเทศที่กำลังพัฒนาอัตราการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่จะสูงขึ้นในกลุ่มคนเมืองเมื่อเปรียบเทียบกับคนในชนบท โดยที่คนในเมืองจะรับประทานอาหารประเภทเนื้อสัตว์มาก อาหารที่มีปริมาณไขมันหรือน้ำตาลสูง และอาหารที่มีเส้นใยต่ำ (1).

ในปัจจุบัน มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาสารจากธรรมชาติหรือสารสกัดสมุนไพร เพื่อใช้ในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยใช้ colon adenoma cell lines งานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรไทย โดยเฉพาะสมุนไพรที่มีข้อมูลจากภูมิปัญญาชาวบ้านที่มีการนำไปใช้ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง ซึ่งได้แก่ เถาวัลย์เปรียง เขยตาย ปญจันธุ์ พูลกวา อังกาบ ทองพันชั่ง และหญ้าปักกิ่ง มีการศึกษาพบว่า หญ้าปักกิ่งมีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์และลดการเกิด aberrant crypts focus ในลำไส้ของสัตว์ทดลอง (2) ส่วนปญจันธุ์พบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง (3) และยังกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งหลายชนิดได้ รวมทั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (4) นอกจากนี้ มีรายงานถึงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของพูลกวา (5) ส่วนการศึกษาของอังกาบ เถาวัลย์เปรียง เขยตาย และทองพันชั่ง ยังไม่พบรายงานฤทธิ์ในการต้านมะเร็งใดๆ การศึกษาในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรไทยดังกล่าวในการต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เพาะเลี้ยง SW480

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร นำส่วนของพืชที่ต้องการสกัดมาบด แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 °C การสกัดจะใช้การหมักสมุนไพรแห้งด้วย methanol เป็นเวลา 3 วัน และผ่านกระบวนการกรอง จากนั้นระเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture) SW480 human colon carcinoma cells จะถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 ที่มี 10% FBS และ 1% penicillin-streptomycin ในที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ ใน 75 cm³ culture flask

3. การวัดการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability assay) ทดสอบโดย MTT [3-(3,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetra-zolium bromide)] assay โดยเลี้ยงเซลล์ ใน 96 well microplate ด้วยสารสกัดแต่ละชนิดเป็นเวลา 24 ชม. การเกิดสี formazan จะถูกประเมินโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วย ELISA reader

4. การวัด Cell apoptosis ด้วย Flow cytometer cell apoptosis สามารถวัดได้โดยใช้ Annexin V-FITC apoptosis detection kit จากนั้นวิเคราะห์เซลล์ด้วย Flow cytometer โดยเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) จะได้เป็น annexin V-negative&PI-negative ส่วนเซลล์ early apoptosis จะได้เป็น annexin V-positive&PI-negative และเซลล์ late apoptosis จะได้เป็น annexin V-positive&PI-positive

5. การวัด lactate dehydrogenase (LDH) activity โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ LDH ที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ที่ตายแบบ necrosis สู่อาหารเลี้ยงเซลล์ ด้วยการใช้ pyruvate และ NADH เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาและติดตามการลดลงของ NADH ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm

ผลการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 7 ชนิด ในการยับยั้งเซลล์ SW480 โดยเลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0-1,000 µg/ml เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำไปวัด cell viability ด้วย MTT assay แล้วคำนวณหาค่า IC₅₀ ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือฆ่าเซลล์ SW480 ได้ดีที่สุด ส่วนหญ้าปักกิ่ง ไม่พบว่าสามารถยับยั้งเซลล์ได้ที่มีความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ จึงไม่สามารถคำนวณหาค่า IC₅₀ ได้

ตารางที่ 1 ค่า IC₅₀ ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ SW480

Plant extract	Scientific name	IC ₅₀ (µg/ml)
เถาวัลย์เปรียง	<i>Derris scandens</i> (Roxb.) Benth.	4.86
ปัญญาจันทร์	<i>Gynostemma pentaphyllum</i> Makino	118.50
เขยตาย	<i>Glycosmis pentaphylla</i> (Retz.) DC.	> 1,000
ทองพันชั่ง	<i>Rhinacanthus nasutus</i> (L.) Kurz	> 1,000
พลูคาว	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	> 1,000
หญ้าปักกิ่ง	<i>Murdannia loriformis</i> (Hassk.) Rolla Rao & Kammathy	> 1,000
อังกาบ	<i>Barleria cristata</i> L.	> 1,000

หมายเหตุ ND = non detectable

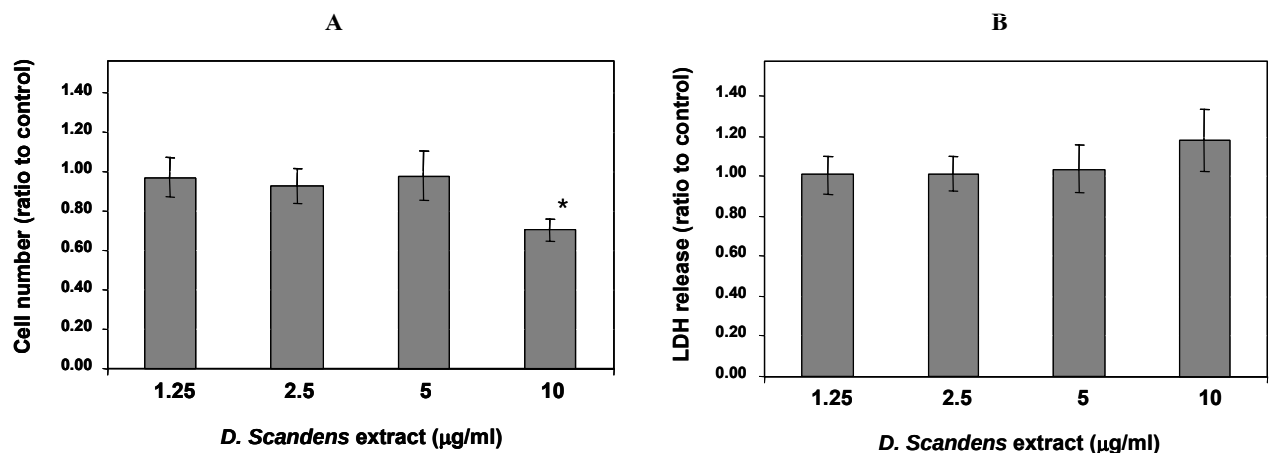
เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสมุนไพรทั้ง 7 ชนิด เถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด จึงถูกเลือกเพื่อนำไปศึกษาหากลไกในระดับลึกต่อไป โดยคาดว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงอาจเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายหรือทำให้เกิดการหยุดการแบ่งตัวของเซลล์โดยรบกวนกระบวนการ cell cycle ของเซลล์ จึงได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ด้วย Flow cytometer เนื่องจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าเซลล์มะเร็งด้วย MTT assay ได้ทำการทดลองโดยการเลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดเป็นเวลา 24 ชม. ซึ่งพบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 10 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้จำนวนเซลล์ลดลงไปจำนวนมาก ทำให้ไม่มีเซลล์มากพอที่จะใช้ในการประเมินการเกิด apoptosis ด้วย Flow cytometer จึงได้ปรับการทดลองเป็นเลี้ยงเซลล์ SW480 ด้วยสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้น 1.25-10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 4 ชม. แล้วประเมินการเกิด apoptosis หลังจากนั้น 48 ชม. ผลการทดลองพบว่า ร้อยละของเซลล์ที่นำไปทดสอบด้วย Flow cytometer พบว่าเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis และ necrosis ไม่มีความแตกต่างกันทั้งเซลล์กลุ่มควบคุมและเซลล์ที่เลี้ยงด้วยสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ทุกความเข้มข้น (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการวัด cell apoptosis ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ SW480

<i>D. Scandens</i> Extract ($\mu\text{g/ml}$)	Live cells (%)	Early apoptosis (%)	Late apoptosis (%)	Necrosis (%)
Untreated cells	85.12 $\pm$ 3.21	6.88 $\pm$ 2.45	5.95 $\pm$ 1.45	2.05 $\pm$ 0.58
0.25% DMSO	85.61 $\pm$ 1.77	6.72 $\pm$ 2.09	6.19 $\pm$ 1.20	2.30 $\pm$ 0.90
1.25	84.50 $\pm$ 2.75	5.99 $\pm$ 1.82	6.50 $\pm$ 1.10	3.02 $\pm$ 0.78
2.5	87.40 $\pm$ 4.54	5.11 $\pm$ 2.23	6.10 $\pm$ 2.35	1.40 $\pm$ 0.49
5	83.69 $\pm$ 2.78	7.25 $\pm$ 1.89	6.63 $\pm$ 1.14	2.42 $\pm$ 0.37
10	86.61 $\pm$ 2.31	6.71 $\pm$ 1.39	5.20 $\pm$ 1.14	1.48 $\pm$ 0.29

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็น Mean $\pm$ SEM จาก 3-5 การทดลอง

อย่างไรก็ตาม หลังจากเลี้ยงเซลล์ SW480 ด้วยสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเป็นเวลา 4 ชม. ได้ทำการนับจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่และนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบการหลั่ง lactate dehydrogenase (LDH) ซึ่งเป็นสัญญาณของการเกิด cell necrosis จากการที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย และมีการหลั่ง LDH ออกมาภายนอกเซลล์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้น 1.25-5 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้เซลล์ตายไม่มากนัก โดยยังมีจำนวนเซลล์และการหลั่ง LDH ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (สัดส่วนใกล้เคียง 1) ยกเว้นสารสกัดที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้จำนวนเซลล์ลดลงเล็กน้อย (รูปที่ 1A) และมีการหลั่ง LDH เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเช่นกัน (รูปที่ 1B)



รูปที่ 1 ผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อเซลล์ SW480 หลังจากเลี้ยงเซลล์ SW480 ด้วยสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้น 1.25-10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 4 ชม. แล้วนับจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่ (A) ส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์นำไปวัดระดับของ LDH (B) โดยจำนวนเซลล์และการหลั่งของ LDH คำนวณเป็นค่าสัดส่วนกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นเซลล์ที่เลี้ยงด้วย 0.25% DMSO ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่า Mean $\pm$ SEM จาก 3-5 การทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองเปรียบเทียบสมุนไพรทั้ง 7 ชนิด ในการยับยั้งหรือฆ่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 พบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ที่ดีที่สุด โดยมีค่า $\text{IC}_{50} = 4.86 \mu\text{g/ml}$ จึงได้ถูกเลือกเพื่อทำการศึกษาในระดับลึกต่อไปถึงกลไกของฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง เถาวัลย์เปรียงเป็นสมุนไพรที่มีการนำมาใช้เพื่อลดการอักเสบ สารสำคัญที่พบเป็นสารกลุ่ม isoflavones (6) และมีรายงานว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (7) นอกจากข้อมูลจากภูมิปัญญาชาวบ้านที่ใช้รักษามะเร็งแล้ว ยังไม่เคยมีรายงานว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงนี้ ทำโดยประเมินผลของสารสกัดต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 ซึ่งการต้านเซลล์มะเร็งอาจเป็นผลมาจากการทำให้เซลล์ตายหรือเซลล์หยุดเจริญเติบโต การประเมินผลของสารสกัดในการทำให้เซลล์มะเร็งตาย ได้ทำการทดสอบการตายทั้งแบบ apoptosis และ necrosis ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงไม่ทำให้เซลล์เกิด apoptosis และมีแนวโน้มที่จะทำให้เซลล์ตายแบบ necrosis แต่อย่างไรก็ตาม สัดส่วนของเซลล์ที่ตายแบบ necrosis ดูเหมือนว่าจะต่ำกว่าสัดส่วนของจำนวนเซลล์ที่ลดลงไปเล็กน้อย แสดงว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงอาจมีผลอย่างอื่นอีก ซึ่งอาจเป็นฤทธิ์ในการรบกวนกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ จึงทำให้เซลล์หยุดการเพิ่มจำนวน ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวนี้ จะทำการทดสอบผลของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงต่อ cell cycle ของเซลล์ SW480 ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW480 ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ ปญจขันธ์ เขยตาย พลุควา อังกาบ ทองพันชั่งและหญ้าปักกิ่ง โดยกลไกในการต้านเซลล์มะเร็งนี้ไม่ได้เป็นผลมาจากการทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis แต่ทำให้เซลล์บางส่วนเกิดการตายแบบ necrosis ส่วนผลต่อ cell cycle ของเซลล์ SW480 จะได้ทำการทดสอบต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนครสวรรค์ (RX-AR-027-2552)

เอกสารอ้างอิง

1. Harris DM, Go VL. Vitamin D and colon carcinogenesis. J Nutr 2004; 134(12 Suppl): 3463S-71S.
2. Intiyot Y, Kinouchi T, Kataoka K, Arimochi H, Kuwahara T, Vinitketkumnien U, et al. Antimutagenicity of *Murdannia loriformis* in the Salmonella mutation assay and its inhibitory effects on azoxymethane-induced DNA methylation and aberrant crypt focus formation in male F344 rats. J Med Invest 2002; 49: 25-34.
3. Zhou Z, Wang Y, Zhou Y, Zhang S. Effect of *Gynostemma pentaphyllum* mak on carcinomatous conversions of golden hamster cheek pouches induced by dimethylbenzanthracene: a histological study. Chin Med J (Engl) 1998; 111: 847-50.

4. Chen JC, Lu KW, Lee JH, Yeh CC, Chung JG. Gypenosides induced apoptosis in human colon cancer cells through the mitochondria-dependent pathways and activation of caspase-3. *Anticancer Res* 2006; 26: 4313-26.
5. Chang JS, Chiang LC, Chen CC, Liu LT, Wang KC, Lin CC. Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb. *Am J Chin Med* 2001; 29: 303-12.
6. Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, Jansakul C, Taylor WC. Isoflavone glycosides from *Derris scandens*. *Phytochemistry* 2002; 60: 827-34.
7. Sriwanthana B, Chavalittumrong P. *In vitro* effect of *Derris scandens* on normal lymphocyte proliferation and its activities on natural killer cells in normals and HIV-1 infected patients. *J Ethnopharmacol* 2001; 76: 125-9.