



ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Beauvericin และสารสกัดหยาบที่ได้จาก เชื้อราสกุล *Beauveria* sp.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม^{1*} อินทิรา เพชรทับทิม² และ เกษม สร้อยทอง³

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร beauvericin (BEA) และสารสกัดหยาบจาก เชื้อรา *Beauveria bassiana* (ไอโซเลต A และไอโซเลต B) และ *Beauveria brongniartii* (ไอโซเลต C และไอโซเลต D) โดยการนำเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิด Yeast Extract Sucrose (YES) เป็นระยะเวลา 1 เดือน มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบที่ได้มาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 4 ชนิด คือ P388, HT-29, MCF-7 และ Vero cell ในหลอดทดลองด้วยวิธี MTT assay พบว่า สารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. brongniartii* แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนจากเชื้อรา *B. bassiana* แสดงความเป็นพิษต่อทุกเซลล์ และเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด P388 ซึ่งเป็นเซลล์ประเภท Lymphocyte มากที่สุด โดยไอโซเลต B มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุด ($CC_{50} = 220.55$ g/ml) เช่นเดียวกับสาร beauvericin ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุดเช่นกัน ($CC_{50} = 2.25$ g/ml) จากการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุล *Beauveria* ขึ้นอยู่กับปัจจัยทั้งจากตัวทำละลาย ชนิดของเซลล์ไลน์ที่นำมาทดสอบ ระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ และสายพันธุ์ของเชื้อรา

คำสำคัญ : *Beauveria* sp. ความเป็นพิษกับเซลล์ Beauvericin (BEA) การตรวจสอบ MTT

^{1*}ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

E-mail: poeaim@hotmail.com

^{2,3} ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



Cytotoxicity Activity of Beauvericin and Crude Extracts from *Beauveria* sp.

Supattar Poeaim^{1*} Intira Pechtuptim² and Kasem Soyong³

Abstract

The aim of this study was to determine the cytotoxicity of beauvericin (BEA) and crude extracts from *Beauveria bassiana* (isolate A and isolate B) and *Beauveria brongniartii* (isolate C and isolate D). The mycelium was cultured in Yeast Extract Sucrose (YES) broth for one month and was extracted using maceration technique with different organic solvents (hexane, ethyl acetate and ethanol). Crude extracts and beauvericin were investigated for their cytotoxic activity against P388, HT-29, MCF-7 and Vero cell lines using the MTT assay. The crude extracts from *B. brongniartii* were exhibited the low cytotoxic effect on cell lines. The hexane extracts from *B. bassiana* were exhibited the most effective cytotoxic activity for every cell lines. The hexane extract from isolate B exhibited the most potent cytotoxic activity against P388 cell line ($CC_{50} = 220.55 \mu\text{g/ml}$) like a beauvericin ($CC_{50} = 2.25 \mu\text{g/ml}$). In this study, the crude extracts from *Beauveria* sp. induced cytotoxic effect to mammalian cells that showed differences between the extraction solvents, cell types and concentration in the crude extracts as well as the isolation of fungus.

Keywords: *Beauveria* sp., Cytotoxicity, Beauvericin (BEA), MTT assay

^{1*}Assistant Professor of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

E-mail: poeaim@hotmail.com

^{2,3} Pest Management Technology Program, Faculty of Agriculture Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.



บทนำ

การค้นพบเพนิซิลิน (Penicillin) จากเชื้อรา *penicilium* เป็นจุดเริ่มต้นทำให้มีการศึกษาหาสารจากเชื้อราหลากหลายสายพันธุ์ และเนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ รวมทั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแมลง (Entomopathogenic Fungi) เช่น *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium Lecanii*, *Metarhizium Anisopliae* และ *Beauveria Bassiana* เป็นต้น ซึ่งปัจจุบันนิยมนำเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแมลงมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี (Biological Control) เพิ่มมากขึ้น เพื่อลดการใช้สารเคมี โดยกลไกการเข้าทำลายแมลงมีทั้งการเข้าไปเจริญเติบโตและแย่งอาหาร และสร้างสารเพื่อทำลายเนื้อเยื่อหรืออวัยวะของแมลง มีรายงานการวิจัยสารจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลงสร้างขึ้น เช่น *M. anisopliae* ผลิตสารในกลุ่ม Destruxin, *V. lecanii* ผลิตสาร Dipcolonic acid เชื้อราในสกุล *Tolypocaldium* ผลิตสาร Cyclosporin และ *B. Bassiana* ซึ่งเป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลงที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช เช่น หนอนผีเสื้อ แมลงปีกแข็ง และหนอนกระทู้ โดยเชื้อราชนิดนี้มีรายงานการสร้างสาร เช่น Bassianin, Beauvericin, Bassianolide, Beauverolide, Tenellin และ oosporein (Butt et al., 2001) โดยสาร Beauvericin มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Bacillus* sp. และ *Paenibacillus* sp. (Castlebury et al., 1999) และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U-937 และ HL-60 (Calo et al., 2004) รวมทั้งสาร Bassianin, Tenellin และ Oosporein จะมีผลกระทบต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงและยับยั้งการทำงานของ ATPase (Jeffs et al., 1997) นอกจากนั้นยังมี

รายงานการมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่มีเอธิลอะซิเตตเป็นตัวทำละลาย (Parine et al., 2010) ซึ่งข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแมลงยังมีอยู่น้อย โดยเฉพาะฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จึงมีการตรวจสอบหาเชื้อราที่มีคุณสมบัติสร้างสารที่เป็นประโยชน์ ซึ่งนอกจากเป็นการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ แล้ว ยังเป็นการประเมินฤทธิ์ของสารจากเชื้อราที่นำมาใช้เป็นสารชีวภาพที่อาจปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม (Jestoi et al., 2004) หรือเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์เลี้ยงและมนุษย์ได้ แม้ว่ามีรายงานเพียงบางกรณีเท่านั้นจากการติดเชื้อจากเชื้อรา *B. bassiana* นี้ (Henke et al., 2002)

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity Screening) ในหลอดทดลอง (In Vitro) เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถให้ข้อมูลเบื้องต้นได้ ซึ่งการตรวจสอบมีหลายวิธี เช่น Lactate dehydrogenase (LDH), Neutral Red (NR), Trypan Blue (TB) และ Methyl tetrazolium 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay เป็นต้น โดยในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษของสาร Beauvericin และสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *B. Bassiana* และ *B. Brongniartii* ต่อเซลล์ไลน์ 4 ชนิด แบ่งเป็นเซลล์มะเร็ง คือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine Leukemia Cell: P388) เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (Human Breast Cancer Cell: MCF-7) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ (Human Colon Adenocarcinoma Cell: HT-29) และเซลล์ปกติ คือเซลล์ไตของลิง (African Green Monkey Kidney Cell: Vero

Cell) ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองด้วยวิธี MTT assay

วิธีการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเชื้อราและการสกัดสาร

เพาะเลี้ยง *B. Bassiana* (ไอโซเลต A และ ไอโซเลต B) และ *B. Brongniartii* (ไอโซเลต C และ ไอโซเลต D) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract Sucrose Broth (YES) (จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชนิด YES มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 1 เดือน จากนั้นนำส่วนของเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง หรือจนมีน้ำหนักคงที่ นำส่วนของเส้นใยมาบดให้ละเอียด สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ เป็นระยะเวลาประมาณ 72 ชั่วโมง ในสภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที และนำมากรองด้วย Whatman lter paper No.1 และนำส่วนของตัวทำละลายไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Rotary Evaporator) จนได้สารสกัดหยาบ (Crude Extract) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (P388) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดแขวนลอย (Suspension Culture) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ (HT-29) เซลล์ไตของลิง (Vero cell) และเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (MCF-7) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเกาะพื้นผิว (Monolayer Culture) ในอาหาร RPMI 1640 ที่มี Fetal Bovine Serum (FBS) 10 % และ Gentamicin 50 I/ml บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่

37 °C ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %

เตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบจากเชื้อรา โดยการละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ให้มีระดับความเข้มข้น 200 mg/ml และเจือจางด้วยสารละลาย Phosphate Buffered Saline (PBS) ให้มีระดับความเข้มข้นเป็น 20 mg/ml นำสารละลายมาทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน Millipore Membrane lter ขนาด 0.45 m ก่อนนำไปตรวจสอบจะเจือจางด้วยอาหาร RPMI 1640 ให้มีความเข้มข้นที่ต้องการ สำหรับสาร Beauvericin ($C_{45}H_{57}N_3O_9$) จากบริษัท Sigma ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล = 784.0 ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT Assay ที่ดัดแปลงวิธีการมาจาก Mosmarin (1983) โดยเซลล์ชนิด P388, MCF-7, Vero และ HT-29 cell line ปลุกเซลล์เริ่มต้นจำนวน 0.8×10^5 , 1×10^5 , 1.5×10^5 และ 1.5×10^5 cell/ml ตามลำดับ ใน 96 well plate ปริมาตร 100 I/well บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 I/well โดยให้ความเข้มข้นของ beauvericin ในแต่ละหลุมเป็น 20, 10, 5, 2.5 และ 1.25 g/ml และของสารสกัดแต่ละตัวทำละลายในแต่ละหลุมเป็น 2000, 1000, 500 และ 250 g/ml นำไปบ่มต่อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 2 mg/ml ปริมาตร 50 I/well แล้วนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในที่มืด เมื่อครบเวลานำอาหารที่มีสารละลาย MTT ออกและละลายผลึก MTT-formazan ด้วย DMSO: Ethanol ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 I/well วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำมาหา



ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (50% Cytotoxic Concentration: CC_{50}) ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 5.0

ผลการวิจัย

MTT assay เป็นวิธีตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองจากความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ Dehydrogenase และ Cofactor ในไมโทคอนเดรียที่จะรีดิวซ์สาร 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) ที่มีสีเหลืองให้กลายเป็นผลึกฟอร์มาซาน (Formazan) ที่มีสีม่วงได้ ดังนั้นจึงใช้ผลึกฟอร์มาซานแสดงถึงมีชีวิตของเซลล์ (Mosmann, 1983) โดยเซลล์ที่ตายนั้นจะมีลักษณะใสไม่มีสี ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะมีผลึกสีม่วงเกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งเมื่อนำมาละลายในตัวทำละลาย เช่น DMSO จะได้สารละลายสีม่วงน้ำเงินที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งนิยมรายงานความเป็นพิษของสารจากระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (50% Cytotoxic concentration: CC_{50})

ก่อนการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบ ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารละลาย Beauvericin ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด เพื่อนำไปใช้เป็น Positive Control ในความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ชนิด P388, MCF-7, Vero และ HT-29 cell ที่ทำการทดสอบด้วยสารละลาย Beauvericin ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 20, 10, 5, 2.5 และ 1.25 g/ml เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่มี 1% Methanol ร่วมในการตรวจสอบด้วย และนำมาตรวจสอบหาค่า

ระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% พบว่าสารละลาย Beauvericin ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด ทำให้มีอัตราการมีชีวิตรอดลดลงแตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์ไลน์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเป็นพิษต่อเซลล์ P388 ซึ่งเป็นเซลล์ประเภท Lymphocyte มากที่สุด โดยเซลล์ไลน์ชนิด P388, Vero, MCF-7 และ HT-29 cell มีค่า CC_{50} เท่ากับ 2.25, 10.48, 13.40 และ 15.05 g/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมีผลทำให้อัตราการมีชีวิตรอดลดลง ดังแสดงในกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Beauvericin กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด ในรูปที่ 1 A สอดคล้องกับรายงานที่พบว่าสาร Beauvericin มีผลต่อความอยู่รอดของทั้ง Insect และ Mammalian Cell Lines หลายชนิด โดยอัตราการตายของเซลล์ขึ้นกับทั้งความเข้มข้นของสารและระยะเวลา โดยมีผลทำให้เพิ่มการหลั่งของ Cytochrome C จากไมโทคอนเดรียและเพิ่มการทำงานของ Caspase-3 ซึ่งมีผลต่อการทำงานของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ (Dombrink-Kurtzman, 2003; Calo et al., 2003; Calo et al., 2004; Jow et al., 2004 ; Lin et al., 2005; Segvit Klarit et al., 2008) โดยสาร Beauvericin นี้สามารถผลิตได้จากเชื้อราสกุล *Fusarium* ซึ่งขึ้นได้ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น ข้าว ข้าวโพด และถั่ว เป็นต้น ซึ่งในการศึกษารั้งนี้ใช้สารละลาย Beauvericin ที่ความเข้มข้น 10 g/ml เป็น Positive Control ในขั้นตอนต่อไป

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเอทานอล ของทั้งเชื้อรา *B. Bassiana* และ *B. Brongniartii* มาทดสอบ

ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 4 ชนิด แบ่งเป็นเซลล์มะเร็ง คือ P388, MCF-7 และ HT-29 และเซลล์ปกติ คือ Vero cell ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ และค่า CC_{50} โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 2000 g/ml ดังนั้นหาก $CC_{50} > 2000$ g/ml นับว่ามีค่าความเป็นพิษต่ำ พบว่าสารสกัดหยาบจากทุกตัวทำละลายจากเชื้อรา *B. Brongniartii* มีค่า $CC_{50} > 2000$ g/ml ยกเว้นสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนจากไอโซเลต C มีค่า $CC_{50} = 1788$ g/ml (ไม่ได้แสดงข้อมูล) สำหรับค่า CC_{50} ของสารสกัดหยาบในทุกตัวทำละลายจากเชื้อรา *B. Bassiana* แสดงในตารางที่ 2 โดยสารสกัดหยาบจากทุกตัวทำละลายของทั้งสองไอโซเลตมีผลต่อเซลล์ P388 มากกว่าเซลล์ไลน์ชนิดอื่น โดยเฉพาะสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนของไอโซเลต B มีค่า CC_{50} ต่ำสุดเพียง 220.55 g/ml (รูปที่ 1B) และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนของเชื้อรา *B. Bassiana* ทั้งสองไอโซเลตแสดงความเป็นพิษมากที่สุด (รูปที่ 1C และ D) โดยไอโซเลต A มีค่า CC_{50} ส่วนใหญ่มากกว่าไอโซเลต B ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า B จัดเป็นไอโซเลตที่น่าจะเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า เนื่องจากใช้ปริมาณสารเพียงเล็กน้อยสามารถที่จะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าทั้งสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนและเอธิลอะซิเตทของเชื้อรา *B. Bassiana* ไอโซเลต A แสดงความเป็นพิษต่อ Vero cell ซึ่งเป็นเซลล์ปกติจากไตของลิงได้ ดังนั้นในการนำเชื้อราในสกุล *Beauveria* มาประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอาจกล่าวได้ว่าเชื้อรา *B. Bassiana* น่าจะมีประสิทธิภาพดีกว่า *B. Brongniartii* แต่อย่างไรก็ตามอาจมีโอกาสนปนเปื้อน

ของสารเข้าสู่สิ่งแวดล้อม หรือห่วงโซ่อาหารที่จะมีผลกระทบต่อสุขภาพได้ ซึ่งควรมีการศึกษาการปนเปื้อนของสารที่ได้จากเชื้อรา ดังเช่นการรายงานการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราและประเมินฤทธิ์ของสารพิษจากเชื้อราในตลาดพินแลนด์และอิตาลี แม้ว่าปริมาณที่พบมีระดับต่ำ (Jestoi et al., 2004) ฉะนั้นสารจากเชื้อราจึงไม่ควรที่จะมีฤทธิ์ต่อเซลล์ปกติชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะเซลล์ของสัตว์และมนุษย์ การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเชื้อราในสกุล *Beauveria* ขึ้นอยู่กับปัจจัยทั้งจากตัวทำละลาย ชนิดของเซลล์ไลน์ที่นำมาทดสอบ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด และสายพันธุ์ของเชื้อ

ตารางที่ 1 แสดงระดับความเข้มข้นของสารละลาย beauvericin ที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (CC_{50})

Treatment	Cell Line Types	CC_{50} (g/ml)
Beauvericin (BEA)	P388	2.25
	MCF-7	13.40
	HT-29	15.05
	Vero Cell	10.48

อภิปรายผลและสรุป

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร Beauvericin และสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. Bassiana* และ *B. Brongniartii* ซึ่งเป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแมลง ต่อเซลล์ไลน์ 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine Leukemia Cell: P388) เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (Human Breast Cancer Cell: MCF-7)



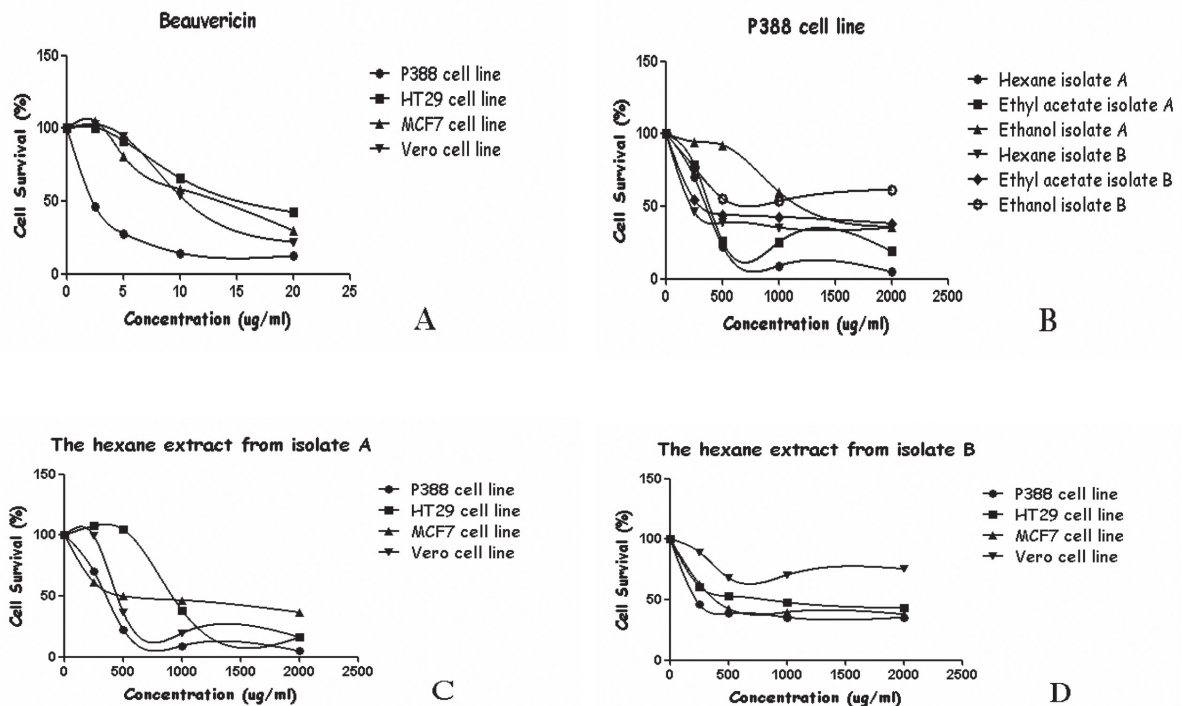
และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ (Human Colon Adenocarcinoma cell: HT-29) และเซลล์ไตของลิง (African Green Monkey Kidney cell: Vero cell) ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. Brongniartii* แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในในระดับต่ำ และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนจากเชื้อรา *B. Bassiana* แสดงความเป็นพิษในทุกเซลล์แต่มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากกว่าเซลล์ชนิดอื่น สำหรับสาร Beauvericin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุดเช่นกัน จึงอาจกล่าว

ได้ว่าในการนำ *B. Bassiana* มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในสภาวะแวดล้อมมีแนวโน้มที่จะมีผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์เลี้ยง และมนุษย์ อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการตรวจสอบเบื้องต้น (Screening method) เท่านั้น เนื่องจากมีปัจจัยอีกหลายชนิดที่มีผลต่อการทดลอง โดยเฉพาะเรื่องของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ดังนั้นควรมีการศึกษาวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์ของเซลล์ด้วยวิธีอื่นๆ ฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ รวมทั้งการประเมินความปลอดภัยในสิ่งมีชีวิต (*In Vivo*) ด้วย

ตารางที่ 2 แสดงระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจาก *B. Bassiana* ไอโซเลต A และ ไอโซเลต B ที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (CC_{50})

Isolates	Cell Types	50% Cytotoxic Concentration: CC_{50} (µg/ml)		
		Hexane	Ethyl acetate	Ethanol
A	P388	354.18	384.27	1176.12
	MCF-7	488.07	1019.90	>MCT
	HT-29	914.92	988.98	>MCT
	Vero	447.16	719.21	>MCT
B	P388	220.55	300.45	669.53
	MCF-7	379.52	>MCT	>MCT
	HT-29	808.08	>MCT	>MCT
	Vero	>MCT	>MCT	>MCT

MCT= maximal concentration tested (≥ 2000 µg/ml)



ภาพที่ 1 แสดงความเป็นพิษของสาร beauvericin และสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. bassiana* โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร beauvericin ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ (A) สารสกัดหยาบ จากตัวทำละลายทั้งสามชนิดต่อเซลล์ชนิด P388 (B) สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนของไอโซเลต A (C) และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนของไอโซเลต B (D) ต่อเซลล์ชนิด P388, HT-29, MCF-7 และ Vero cell lines

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2554 ของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารอ้างอิง

- Butt, T.M., Jackson, C. and Magan, N. (2001). **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. CABI Publishing. United Kingdom. 389 p.
- Calo, L., Fornelli, F., Nenna, S., Tursi, A., Caiaffa, M.F., Macchia, L. (2003). Beauvericin cytotoxicity to the invertebrate cell line SF-9. **J. Appl. Genet.** 44: 515-520.
- Calo, L., Fornelli, F., Ramires, R., Nenna, S., Tursi, A., Caiaffa, M.F. and Macchia L. (2004). Cytotoxic effects of the mycotoxin to beauvericin to human cell lines of myeloid origin. **Pharmacol Res** 49: 73-77.



- Castlebury, A.L., Sutherland, B.J., Tanner, A.L., Henderson, L.A. and Cerniglia, E.C. (1999). Use of a bioassay to evaluate of beauvericin to bacteria. **World J. Microbiol. Biotechnol** 15: 119 -121.
- Dombrink-Kurtzman, M.A. (2003). Fumonisin and beauvericin induce apoptosis in turkey peripheral blood lymphocytes. **Mycopatholo** 156: 357-364.
- Henke, M.O., De Hoog, G.S., Gross, U., Zimmermann, G., Kraemer, D. and Weig, M. (2002). Human deep tissue infection with an entomopathogenic *Beauveria* species. **J. Clin. Microbiol.**, 40: 2698-2702.
- Jeffa, L.B. and Khachatourians, G.G. (1997). Toxic properties of *Beauveria* pigments on erythrocyte membranes. **Toxicon.**, 1351-1356.
- Jestoi, M., Somma, M.C., Kouva, M., Veijalainen, P., Rizzo, A., Ritieni, A. and Peltonen, K. (2004) Levels of mycotoxins and sample cytotoxicity of selected organic and conventional grain-based products purchased from Finnish and Italian markets. **Mol. Nutr. Food. Res.**, 48: 299-307.
- Jow, G.M., Chou, C.J., Chen, B.F. and Tsai, J.H. (2004). Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c release, caspase 3 activation: the causative role of calcium. **Cancer Lett.**, 216: 165-173.
- Lin, H.I., Lee, Y.J., Chen, B.F., Tsai, M.C., Lu, J.L., Ghou, C.J. and Joe, G.M. (2005). Involvement of Bcl-2 family, Cytochrome C and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in humannon-small cell lung cancer cells. **Cancer Lett.**, 230: 248-259.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol .Method.** 65: 1017-1023.
- Parine, N.R., Pathan, A.K., Sarayu, B., Nishanth, V.S. and Bobbarala, V. (2010). Antibacterial efficacy of secondary metabolites from entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. **Int. J. Chem. Anal. Sci.** 1: 94-96.
- Segvit Klarit M., Rumora, L., Ljubanovic, D. and Pepeljnjak, S. (2008). Cytotoxicity and apoptosis induced by fumonisin B1, beauvericin and ochratoxin A in porcine kidney PK15 cells: effects of individual and combined treatment. **Arch. Toxicol.**, 82: 247-255.