

ศักยภาพของตำลึง ดอกแค ตะไคร้ และคะน้า ในการต้าน Clastogenicity ในหนูเม้าส์

เพียงใจ คุประดินันท์

งานสัตว์ทดลอง กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

บทคัดย่อ

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันว่าผักและผลไม้มีสารเคมีที่สามารถป้องกันโรคมะเร็งได้ จากการวิจัยของสถาบันมะเร็งแห่งชาติที่ผ่านมาพบว่า ผักหลายชนิดในประเทศไทย เช่น ตำลึง (*Coccinia grandis* (L.) Voigt), แค (*Sesbania grandiflora* Linn.), ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf) และคะน้า (*Brassica alboglabra*) มีสารต้านฤทธิ์ที่ออกฤทธิ์ของ aflatoxin B₁ (AFB₁) และสารก่อมะเร็ง Benz(a)pyrene [B(a)P] จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อจะศึกษาศักยภาพของผักชนิดดังกล่าว ในการต้าน การแตกหักของโครโมโซมที่ก่อให้เกิด micronucleus ที่ชักนำด้วยสารก่อมะเร็ง mitomycin C (MMC) และ 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) ซึ่งเป็น direct และ indirect-acting carcinogens ด้วยวิธี *in vivo* erythrocyte micronucleus assay โดยการให้หนูเม้าส์กินอาหารผงที่ผสมผักชนิดต่างๆ ในขนาดความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วทำการเจาะเลือดก่อนและหลังให้สารก่อมะเร็ง จากนั้นตรวจนับเม็ดเลือดแดงที่มี micronucleus (micronucleated peripheral reticulocytes, MNRETs) และไม่มี ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ผลการศึกษาพบว่าใบตำลึงที่ผสมในอาหารร้อยละ 5 และ 10 สามารถลดจำนวน micronucleus ที่ชักนำด้วย MMC และ DMBA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และดอกแคในขนาดร้อยละ 5 และ 10 สามารถลดจำนวน MNRETs ได้เช่นกัน แต่เฉพาะในขนาดความเข้มข้นสูงเท่านั้นที่สามารถลดจำนวน MNRETs ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนตะไคร้ขนาดร้อยละ 5 และ 10 ที่ผสมในอาหารสามารถลดจำนวน MNRETs ที่ชักนำด้วย MMC ได้แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ นอกจากนั้นยังสามารถลดจำนวน MNRETs ที่ชักนำด้วย DMBA ได้ทั้ง 2 ขนาด แต่เฉพาะขนาดความเข้มข้นสูงเท่านั้นที่ลดจำนวน MNRETs ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับคะน้าที่ผสมในอาหารร้อยละ 10 และ 20 ไม่สามารถลดจำนวน MNRETs ได้ ผลการศึกษาแสดงว่าใบตำลึง และดอกแค มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด micronucleus ที่ชักนำด้วยสารก่อมะเร็งทั้งชนิด direct และ indirect-acting ในหนูเม้าส์ ส่วนตะไคร้สามารถยับยั้งการเกิด micronucleus ที่ชักนำด้วย indirect-acting carcinogen เท่านั้น ขณะที่คะน้า ไม่สามารถยับยั้งการเกิด micronucleus ที่ชักนำด้วยสารก่อมะเร็งได้

คำสำคัญ: ตำลึง, ดอกแค, ตะไคร้, คะน้า, หนูเม้าส์, clastogenicity, MNRETs

* Corresponding author: สพ.ญ. เพียงใจ คุประดินันท์
งานสัตว์ทดลอง กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ
268/1 ถนนพระราม 6 กรุงเทพมหานคร 10400
E-mail: pkupradi@health.moph.go.th

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในทุกประเทศรวมทั้งประเทศไทย ซึ่งในปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับ 1 และอัตราการตายจากโรคมะเร็งมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี ในปี 2549 มีอัตราตาย 83.1 ต่อแสนประชากร¹ เพศชายมีอัตราตายสูงกว่าเพศหญิง มะเร็งที่มีอัตราการตายสูงสุดในเพศชายได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ตามลำดับ และมะเร็งที่มีอัตราการตายสูงสุดในเพศหญิงได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด และมะเร็งมดลูกตามลำดับ ส่วนอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งในประเทศไทยในปี 2539 พบในเพศชายเป็น 149.2 ต่อแสนประชากร และในเพศหญิงเป็น 125.0 ต่อแสนประชากร² และมีแนวโน้มว่าอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งสูงขึ้นทุกปีและพบในอายุน้อยลง โรคมะเร็งที่พบบ่อยในประเทศไทย ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ใหญ่ตามลำดับซึ่งมะเร็งเหล่านี้หลายชนิด เป็นมะเร็งที่มีความรุนแรงรักษาให้หายขาดได้ยาก ดังนั้นการป้องกันจึงมีบทบาทสำคัญ ในการควบคุมโรคมะเร็งเพื่อลดอุบัติการณ์ และลดอัตราการตายด้วยโรคมะเร็งในประชากรไทย

ปัจจุบันมีผู้สนใจศึกษาสารยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (antimutagen) และสารยับยั้งฤทธิ์ก่อมะเร็ง (anticarcinogen) ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น พืชผัก ผลไม้ มากขึ้นเนื่องจากมีรายงานว่าในกลุ่มคนที่รับประทานผักตระกูลกะหล่ำ เช่น กะหล่ำปลี Brussels sprouts บรอกโคลี และหัวผักกาด (turnip) อุบัติการณ์ของโรคมะเร็ง เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ ลำไส้ใหญ่ส่วนปลายและมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจะต่ำกว่าในกลุ่มคนที่รับประทานผักเหล่านี้บ่อย^{3,4} การศึกษา

ในสัตว์ทดลอง ก็ยืนยันว่าผักตระกูลกะหล่ำนี้มีสารที่สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งตับ และมะเร็งกระเพาะอาหาร ที่เกิดจากการได้รับสารก่อมะเร็ง⁵⁻⁸ สำหรับในประเทศไทยมีพืชผัก ผลไม้หลายชนิดที่นิยมรับประทาน บางชนิดเป็นพืชผักประจำท้องถิ่น คณะผู้วิจัยได้ศึกษาศักยภาพของผักหลายชนิดในการป้องกันมะเร็งพบว่าผักหลายชนิดเช่น ดอกสะเดา มะระขี้นก ใบขี้เหล็ก กะหล่ำปลี คะน้า มะระจีน ผักกาดขาว และหัวผักกาด สามารถยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อมะเร็งบางชนิดได้⁹⁻¹¹ และสามารถลดระดับของเอนไซม์ ที่กระตุ้นสารก่อมะเร็งให้ออกฤทธิ์ (phase I carcinogen activating enzyme) และเพิ่มระดับเอนไซม์ในกลุ่มที่ทำลายพิษ หรือกำจัดสารเคมี (phase II detoxification enzyme) ได้ เช่น ดอกสะเดา มะระจีน มะระขี้นก ใบโหระพา ลูกยอ ใบยอ ตำลึง และดอกแค¹²⁻¹⁴ ส่วนตะไคร้และคะน้า ทำให้เอนไซม์ทั้งในกลุ่ม phase I และ phase II สูงขึ้น^{11,13,15} นอกจากนี้ สารสกัดของตะไคร้ยังมีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ ยับยั้ง chromosome aberration, micronucleus (nucleus ที่เกิดจากการแตกหักของโครโมโซม) ในตับของหนูแร้ท และยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอกในหนูเม้าส์ ตลอดจนยับยั้งการเกิด DNA adduct และ aberrant crypt foci ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสารก่อมะเร็งในลำไส้ใหญ่หนูแร้ทได้¹⁶⁻¹⁹ ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษาต่อไปว่าผักเหล่านี้จะมี clastogenic/ anticlastogenic activity ในหนูเม้าส์หรือไม่ โดยใช้วิธี *in vivo* erythrocyte micronucleus assay

ในการทดสอบคุณสมบัติต้าน หรือยับยั้งฤทธิ์ก่อมะเร็งของสารเคมีนั้น วิธีที่ให้ผลดีและแม่นยำที่สุดคือการทดสอบระยะยาวโดยใช้สัตว์ทดลอง แต่วิธีการทดสอบต้องใช้เวลาานานมาก และใช้งบประมาณค่าเงิน

การสูง ดังนั้นจึงนิยมใช้วิธีการทดสอบระยะสั้น เพื่อ บ่งชี้ว่าสารเคมีใดจะมีศักยภาพในการต้านหรือยับยั้ง ฤทธิ์ก่อมะเร็งของสารเคมี ซึ่งสามารถทดสอบสารเคมี ได้หลายชนิดในเวลาอันสั้น และเมื่อทราบผลแล้ว จึง คัดเลือกสารเคมีชนิดที่ให้ผลบวก นำไปศึกษาโดยวิธี การทดสอบระยะยาวดังกล่าวข้างต้นต่อไป ซึ่งเป็นการ ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายเป็นอย่างมาก *in vivo* micronucleus test ในหนูเม้าส์เป็นวิธีการทดสอบสาร ก่อมะเร็งระยะสั้นในสัตว์ทดลองที่นิยมใช้มาก²⁰ เป็น วิธีการทดสอบการเกิด micronucleus ในเม็ดเลือด แดงของสัตว์แทะ เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารเคมีในการ ทำให้โครโมโซมเกิดการเปลี่ยนแปลง (clastogenicity) และนิยมประยุกต์ใช้ทดสอบคุณสมบัติต้านหรือยับยั้ง ฤทธิ์ก่อมะเร็งของสารก่อมะเร็งด้วย (anticlastogeni- city)²¹⁻²⁴ ดังนั้นคณะนักวิจัยของสถาบันมะเร็ง แห่งชาติจึงได้นำวิธีการนี้มาใช้ทดสอบคุณสมบัติต้าน หรือยับยั้งฤทธิ์ก่อมะเร็งของผัก และในรายงานนี้เป็น ผลการทดสอบผัก 4 ชนิดคือ ใบตำลึง ดอกแค ตะไคร้ และคะน้า ซึ่งเป็นผักที่พบแล้วว่ามีคุณสมบัติต้านฤทธิ์ ก่อกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย และสามารถลดระดับของ เอนไซม์ในกลุ่ม phase I และเพิ่มระดับเอนไซม์ใน กลุ่ม phase II โดยได้รับการอนุมัติให้ดำเนินโครงการ วิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการควบคุมการใช้ สัตว์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

ผักที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อตำลึง (*Coccinia grandis* (L.) Voigt, ดอกแค (*Sesbania grandiflora* Linn.), ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf) และ คะน้า (*Brassica alboglabra*) จากตลาดสดในกรุงเทพฯ

นำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา และน้ำกลั่น หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปแช่แข็ง และทำให้แห้งโดย วิธีระเหยภายใต้ความดันและอุณหภูมิต่ำ (lyophilization) นำผักที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียด แล้วเก็บ ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C. จนกว่าจะทำการทดลอง

สัตว์ทดลองและวิธีการทดลอง

หนูเม้าส์ สายพันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ น้ำหนัก 25-30 กรัม ซึ่งมาจากสำนักสัตว์ทดลอง แห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงให้ปรับตัว เป็นเวลา 5-7 วัน ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิระหว่าง $23^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C ความชื้นสัมพัทธ์ $45 \pm 10\%$ และให้ดื่มน้ำกรองและกินอาหารผงชนิด semipurified diet ที่ผสมตามสูตร AIN-76 ของ Bieri และคณะ²⁵ และปรับปรุงตาม Reeves และคณะ²⁶ ดังแสดงใน ตารางที่ 1

สารเคมี

สารก่อมะเร็ง 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) และกรดอะมิโนที่ใช้เตรียมอาหาร สัตว์ทดลองซื้อจากบริษัท Sigma Chemicals ประเทศสหรัฐอเมริกา ยาเคมีบำบัด mitomycin C (MMC) ซื้อจากบริษัท Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd., Tokyo, ประเทศญี่ปุ่น acridine orange จากบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมัน ส่วนเกลือแร่ ต่าง ๆ ที่ใช้เตรียมอาหารสัตว์ทดลองซื้อจากบริษัท Fluka Chemicals ประเทศสวิทเซอร์แลนด์ และ casein (นมโปรตีน EM HV) จากบริษัท EMV ประเทศเนเธอร์แลนด์

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของอาหารปกติ และอาหารผสมผักที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลองที่ผสมตามสูตร AIN-76²⁵

ส่วนผสม	ปริมาณส่วนผสมในอาหาร (กรัม/กิโลกรัม)								
	สูตรปกติ	5% ตำลึง	10% ตำลึง	5% ดอกแค	10% ดอกแค	5% ตะไคร้	10% ตะไคร้	10% คะน้า	20% คะน้า
นม	200	184	168	190	180	198	197	180	160
แป้งข้าวโพด	150	150	150	150	150	150	150	96	43
น้ำตาล	500	471	442	471	442	458	415	484	467
ไฟเบอร์	50	45	40	39	28	44	38	40	30
น้ำมัน	50	50	50	50	50	50	50	50	50
DL-Methionine	3	3	3	3	3	3	3	3	3
แร่ธาตุ	35	35	35	35	35	35	35	35	35
วิตามิน	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Choline bitartrate	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Vitamin K1	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
ผักแห้ง	0	50	100	50	100	50	100	100	200

วิธีการทดลอง

การทดสอบคุณสมบัติป้องกันหรือยับยั้งการแตกหักของโครโมโซม (Anticlastogenicity test) ของใบตำลึง ดอกแค ตะไคร้ และคะน้า ที่ชักนำด้วยสารก่อมะเร็ง

ก. MMC

หลังจากให้หนูปรับตัวเป็นเวลา 5-7 วันแล้ว แบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม โดยการสุ่มตามน้ำหนักเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง กลุ่มละ 5 ตัว กลุ่มควบคุมให้กินอาหารสูตรปกติ (basal diet) ส่วนกลุ่มทดลองให้กินอาหารผสมใบตำลึง ดอกแค หรือ ตะไคร้ ในอัตราร้อยละ 5 และ 10 และคะน้าในอัตราร้อยละ 10 และ 20 ตามตารางที่ 1 ในการทดลองนี้ ให้หนูกินอาหารเป็นเวลา 14 วัน โดยควบคุมปริมาณอาหารที่กลุ่มควบคุมกิน ให้ใกล้เคียงกับกลุ่มทดลอง (ทำ pair feeding โดยให้กลุ่มควบคุมกินอาหารเท่ากับปริมาณอาหารที่กลุ่มทดลองกินในวันที่ผ่านมา)

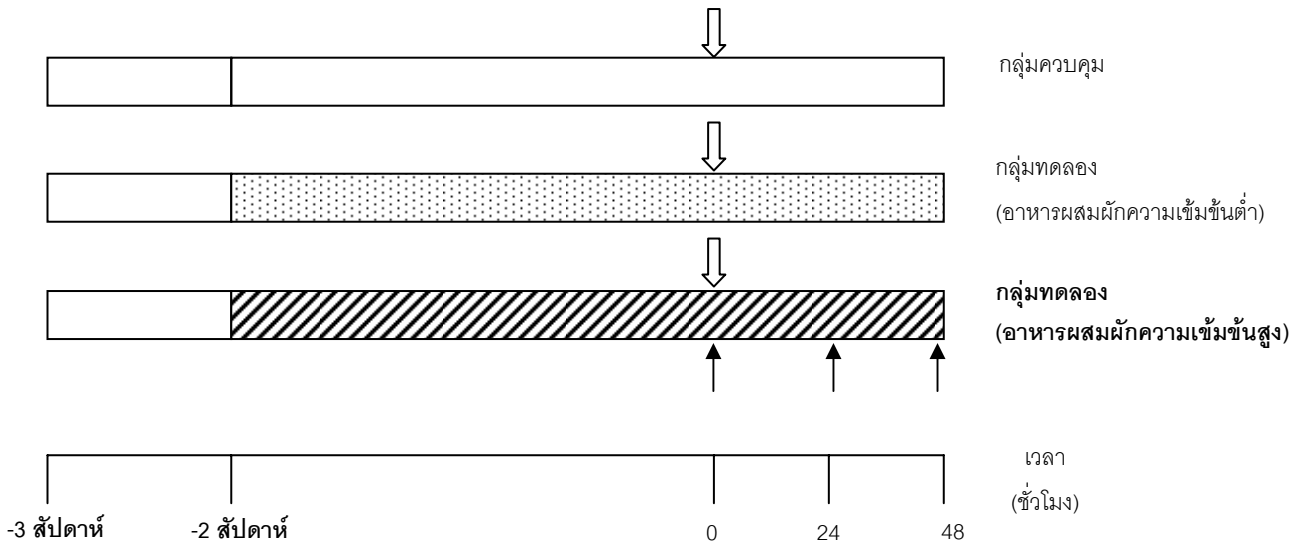
จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ชั่งน้ำหนักหนูทุกวัน เจาะเลือด ซึ่งนับเป็น 0 ชั่วโมงเพื่อตรวจนับ reticulocytes ที่มีและไม่มี micronucleus ก่อนฉีดด้วยยาเคมีบำบัด MMC ในขนาด 1 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าช่องท้อง แล้วเจาะเก็บเลือดที่ 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากการฉีด MMC ตามลำดับ ในระหว่างการทดลอง ยังให้อาหารสูตรปกติหรืออาหารผสมผักต่ออีกจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 1)

ข. DMBA

แบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ ก แต่ในการทดลองนี้ป้อน DMBA ในขนาด 40 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (เตรียมสารละลายในน้ำมันข้าวโพด) และเก็บเลือดที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากการป้อน DMBA ตามลำดับ (รูปที่ 1)

หลังจากเก็บเลือดแล้วย้อม reticulocytes ที่มี micronucleus (MNRETs) ตามวิธีของ Hayashi และ

รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทดสอบผลของผักชนิดต่าง ๆ ต่อการเกิด micronucleus ที่ชักนำด้วย MMC และ DMBA



เลี้ยงหนูให้ปรับตัวเป็นเวลา 1 สัปดาห์ด้วยอาหารผงธรรมดา จากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม โดยในกลุ่มควบคุมให้กินอาหารผงธรรมดา ในกลุ่มทดลองให้กินอาหารผสมผักชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้นต่ำ และความเข้มข้นสูง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เจาะเลือด นับเป็น 0 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้ MMC ในการทดลอง ก. และสารก่อมะเร็ง DMBA ในการทดลอง ข. และเจาะเลือดซ้ำที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากให้สารก่อมะเร็ง

คณะ^{27,28} โดยหยดเลือด 5-8 ไมโครลิตร บนสไลด์ที่เคลือบด้วย acridine orange ขนาดความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร แล้วปิดด้วย coverslip ขนาด 24x40 มม. ทิ้งสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนับ reticulocytes ที่มีและไม่มี micronucleus ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยนับ reticulocytes เฉพาะ Type I, II และ III ตาม Vander และคณะ²⁹

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวน micronucleated peripheral reticulocytes (MNRETs) โดยใช้ One-way ANOVA และ Kruskal -Wallis H Test

ผลการวิจัย

ผลของใบตำลึง ดอกแค ตะไคร้ และคะน้า

ต่ออัตราการเจริญเติบโต

เนื่องจากการทดลองนี้เลี้ยงหนูแบบ pair feeding ดังนั้นอาหารที่หนูแต่ละกลุ่มกินในแต่ละวันจึงใกล้เคียงกัน จากการชั่งน้ำหนักหนูทุกวันพบว่า หนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน แสดงว่าประสิทธิภาพของการใช้อาหาร (น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น/ปริมาณอาหารที่กิน) ใกล้เคียงกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอาหารผสมผักไม่มีผลกระทบ ต่อการเจริญเติบโตของหนูเมาส์ (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

ผลของใบตำลึง ดอกแค ตะไคร้ และคะน้า

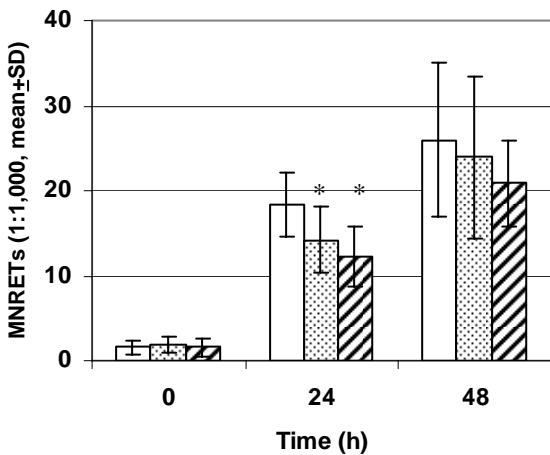
ต่อจำนวน micronucleus

ก. MMC

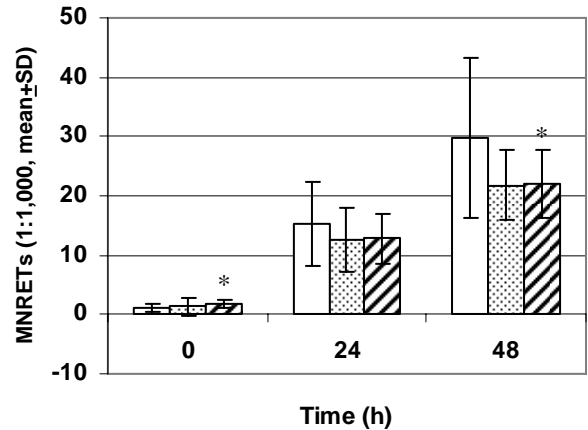
รูปที่ 2 แสดงจำนวน MNREs ในหนูกลุ่มที่ได้รับ MMC ซึ่งเป็น direct-acting carcinogen ที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากได้รับยา MMC จะเห็นว่าจำนวน MNREs ในหนูทั้ง 3 กลุ่มที่ 24 และ 48 ชั่วโมงและในทั้ง 4 การทดลอง (รูปที่ 2.1, 2.2, 2.3 และ 2.4) สูงขึ้นด้วยอัตราใกล้เคียงกันและสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง สำหรับจำนวน MNREs ในหนูกลุ่มที่กินอาหารผสมใบตำลึงพบว่าน้อยกว่าในกลุ่มควบคุมทั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมงและลดลงตามขนาดความเข้มข้นของผัก (ร้อยละ 5 และ 10 ตามลำดับ) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เฉพาะที่ 24 ชั่วโมงเท่านั้น ($p=0.011$ และ $p=0.001$) ตามลำดับ

(รูปที่ 2.1) ส่วนหนูที่กินอาหารผสมดอกแคพบว่าที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังให้ MMC จำนวน MNREs ในหนูกลุ่มที่กินอาหารผสมดอกแคทั้งร้อยละ 5 และ 10 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม โดยเฉพาะกลุ่มที่กินอาหารผสมดอกแค ร้อยละ 10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.049$, รูปที่ 2.2) สำหรับหนูที่กินอาหารผสมตะไคร้ในขนาดร้อยละ 5 และ 10 พบว่าจำนวน MNREs ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมเล็กน้อยทั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมง แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (รูปที่ 2.3) ส่วนหนูที่กินอาหารผสมคะน้าในขนาดร้อยละ 10 และ 20 พบว่าจำนวน MNREs น้อยกว่าในกลุ่มควบคุมเฉพาะที่ 24 ชั่วโมงเท่านั้นแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (รูปที่ 2.4)

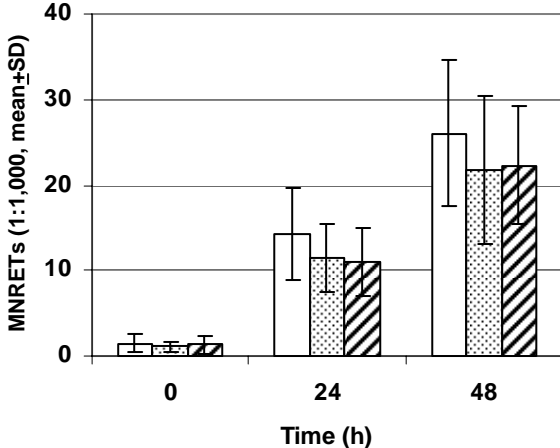
รูปที่ 2.1 : ตำลึง



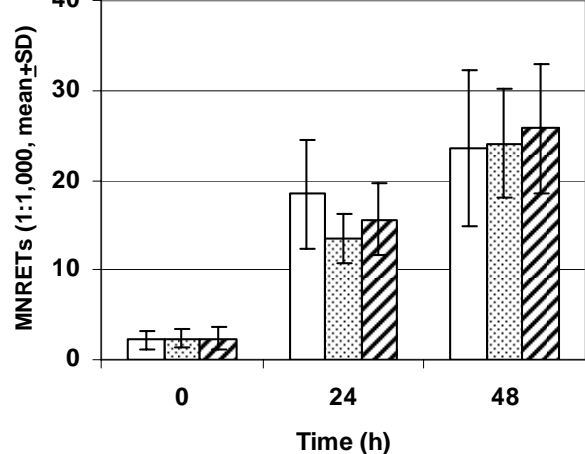
รูปที่ 2.2 : ดอกแค



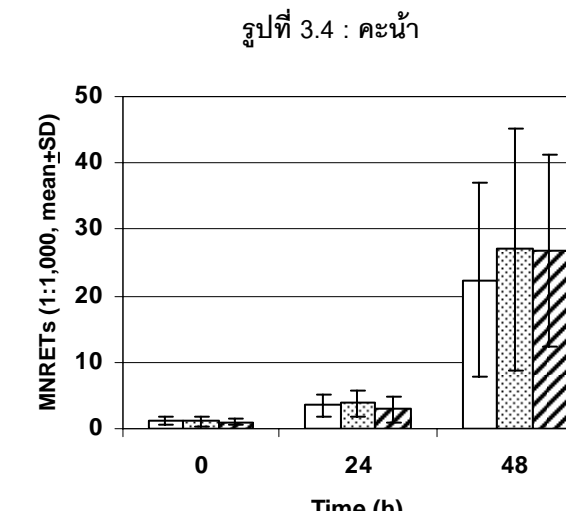
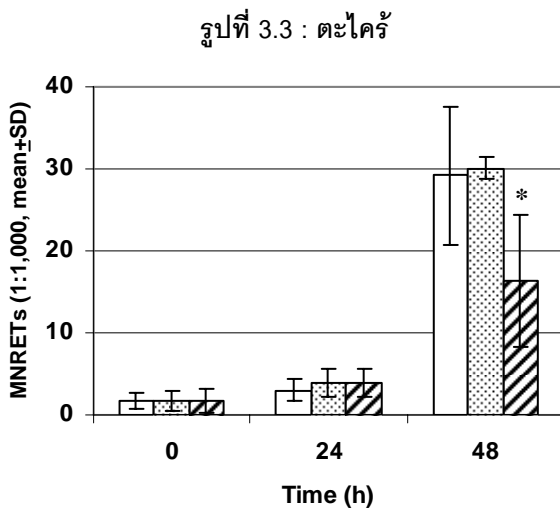
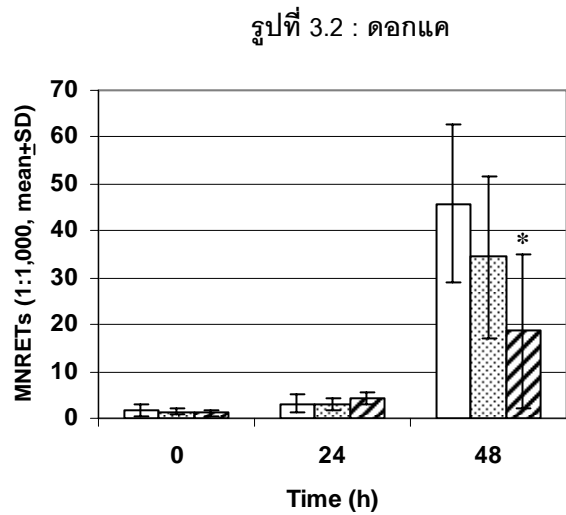
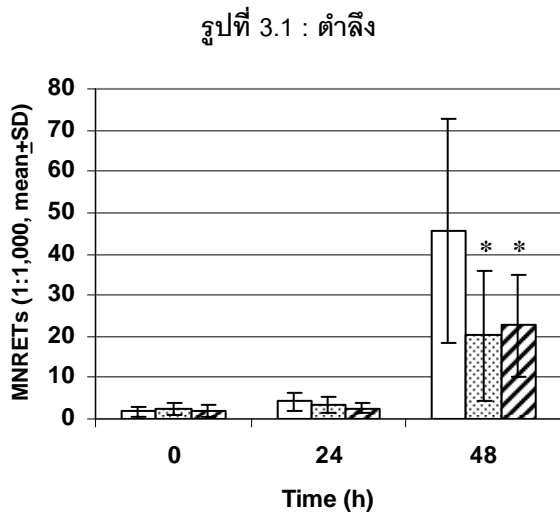
รูปที่ 2-3 : ตะไคร้



รูปที่ 2.4 : คะน้า



รูปที่ 2 จำนวน MNREs ในหนูกลุ่มควบคุมที่กินอาหารผสมสูตรปกติ □ กลุ่มที่กินอาหารผสมใบตำลึง ดอกแค ตะไคร้ ความเข้มข้นร้อยละ 5 ▨ และ 10 ▩ และ คะน้าความเข้มข้นร้อยละ 10 ▨ และ 20 ▩ หลังจากได้รับ mitomycin C (MMC)



รูปที่ 3 จำนวน MNRETS ในหนูกลุ่มควบคุมที่กินอาหารผงสูตรปกติ □ กลุ่มที่กินอาหารผสมใบตำลึง ดอกแค ตะไคร้ ความเข้มข้นร้อยละ 5 ◻ และ 10 ◻ และ คະน้ำความเข้มข้นร้อยละ 10 ◻ และ 20 ◻ หลังจากได้รับสารก่อมะเร็ง DMBA

ข. DMBA

รูปที่ 3 แสดงจำนวน MNRETS ในหนูกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็ง DMBA ซึ่งเป็น indirect-acting carcinogen ที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากได้รับ DMBA จำนวน MNRETS สูงขึ้นเล็กน้อยที่ 24 ชั่วโมง แล้วขึ้นสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง ทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่กินอาหารผสมผักทั้ง 4 ชนิด จำนวน MNRETS ที่ 48 ชั่วโมง ในหนูกลุ่มที่กินอาหารผสมใบตำลึงทั้งร้อยละ 5 และ 10 พบว่า ต่ำกว่าในกลุ่มที่กินอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.016$ และ $p = 0.045$) ตามลำดับ (รูปที่ 3.1) ส่วนอาหารที่ผสมดอกแคในขนาดร้อยละ 5 และ 10

ทำให้จำนวน MNRETS ที่ 48 ชั่วโมงต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมได้ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะอาหารที่ผสมดอกแคร้อยละ 10 ($p = 0.007$, รูปที่ 3.2) สำหรับหนูกลุ่มที่กินอาหารผสมตะไคร้ร้อยละ 10 เท่านั้นที่ทำให้จำนวน MNRETS เฉพาะที่ 48 ชั่วโมงต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.000$, รูปที่ 3.3) ส่วนหนูกลุ่มที่กินอาหารผสมคະน้ำ พบว่าจำนวน MNRETS ไม่แตกต่างจากจำนวน MNRETS ในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3.4)

วิจารณ์

ศักยภาพของใบตำลึง ดอกแค ตะไคร้ และคะน้า ในการต้านการเกิด micronucleus ในหนูเม้าส์ในขนาดที่ทดลองแสดงว่า ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนูทดลอง เพราะผักเหล่านี้ทุกชนิดยกเว้นคะน้าเป็นผักที่ขึ้นเองโดยธรรมชาติ ไม่มีการใช้สารเคมี เช่น ปุ๋ยและยาฆ่าแมลง และในการทดลองนี้ได้ล้างผักเป็นอย่างดีก่อนการสับและทำให้แห้ง จึงปลอดภัยต่อหนูทดลอง สำหรับผลต่อการเกิด micronucleus นั้นพบว่าทั้งใบตำลึงและดอกแคซึ่งเป็นผักที่นิยมใช้ในการประกอบอาหารเพราะมีวิตามินเอ และซีสูง ซึ่งจัดว่าเป็นสารเคมีป้องกันมะเร็ง เพราะสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ เมื่อผสมอาหารในขนาดที่ทดลอง (ร้อยละ 5 และ 10) สามารถลดจำนวน MNRETs ในเม็ดเลือดแดงของหนูเม้าส์ เมื่อผสมให้หนูกินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนให้สารก่อมะเร็งทั้งชนิด direct-acting (MMC) และ indirect-acting carcinogens (DMBA) แต่พบว่ามี dose response ต่อแต่ละ carcinogen ไม่เหมือนกัน โดยตำลึงมี dose response ต่อ MMC ส่วนดอกแคมี dose response ต่อ DMBA ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย¹¹ ที่ผ่านมารวว่า ตำลึงมีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ต่อ indirect-acting mutagens ดีกว่าดอกแค อย่างไรก็ตามสิ่งที่ควรคำนึงก็คือ ดอกแคมีทั้งฤทธิ์ clastogenicity และ anticlastogenicity ในขนาดความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 10) ซึ่งอาจเนื่องจากมีสารเคมีบางชนิดที่มี clastogenic activity ซึ่งควรทำการศึกษาต่อไป ซึ่งคล้ายกับผลของดอกสะเดา ที่พบว่า ส่วนสกัดเมทานอลมีคุณสมบัติยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อมะเร็ง AFB₁ และ B(a)P

ขณะเดียวกันมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์อย่างอ่อนต่อ *Salmonella typhimurium* ด้วย¹¹

การทดลองนี้ผสมตำลึงในขนาดความเข้มข้นสูงสุดเพียงร้อยละ 10 เท่านั้นเพราะในครั้งแรกผสมให้กินในขนาดความเข้มข้น ร้อยละ 12.5 และ 25 หนูทั้ง 2 กลุ่มกินอาหารได้น้อยมากเพราะมีกลิ่นและรสชาติไม่ดี (ไม่ได้แสดงผล) จึงลดความเข้มข้นลงเหลือเพียงร้อยละ 5 และ 10 ถ้าสามารถเพิ่มความเข้มข้นได้มากขึ้นอาจเห็นผลของการยับยั้งการเกิด micronucleus ได้ดีกว่านี้ สำหรับตะไคร้ในขนาดร้อยละ 10 ในอาหาร พบว่าสามารถลดจำนวน MNRETs ที่ชักนำด้วย DMBA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา¹⁵⁻¹⁹ แต่การทดลองนี้ใช้ตะไคร้แห้งเพื่อให้เหมือนกับลักษณะที่คนบริโภค

สำหรับคะน้าในขนาดที่ทดลอง (ร้อยละ 10 และ 20 ในอาหาร) สามารถลดจำนวน MNRETs ที่ชักนำด้วย MMC ได้เล็กน้อย ในขณะที่เดียวกันไม่สามารถลดจำนวน MNRETs ที่ชักนำด้วย DMBA ได้ ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า คะน้าสามารถยับยั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของ AFB₁¹⁰ แต่ทำให้เอนไซม์ทั้งในกลุ่ม phase I และ phase II สูงขึ้น¹³ ซึ่งคล้ายกับผลของใบโหระพา ที่พบว่ามีความสามารถในการกระตุ้นเอนไซม์ทั้ง 2 กลุ่มเช่นกันแต่ไม่สามารถป้องกันการเกิดมะเร็งเต้านมในสัตว์ทดลองที่ชักนำด้วยสารก่อมะเร็ง DMBA ได้³⁰

สรุป

การทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า ตำลึง ดอกแค และตะไคร้ ซึ่งเป็นผักพื้นบ้านและเป็นสมุนไพรไทยมีฤทธิ์ยับยั้ง หรือป้องกันการแตกหักของโครโมโซมในหนูเม้าส์ได้เมื่อได้รับสารก่อมะเร็งที่เป็น direct-acting/

indirect-acting carcinogens ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ผักเหล่านี้ น่าจะมีศักยภาพในการป้องกันมะเร็ง ที่เกิด จากสารก่อมะเร็งบางชนิด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณสโรชิน ชุนราช ผู้ช่วยวิจัย, คุณปริญญา คงกระพันธ์ ในการดูแลสัตว์ทดลอง, คุณอนงค์ ปุ่กานนท์ ในการดูแลเครื่อง freeze dryer, คุณภมร บักรวด ผู้พิมพ์รายงานการวิจัย และ ทำยี่สุดนี้ขอขอบคุณ ดร.วรวณี คุณสำราญ ที่ ปรึกษาในกลุ่มงานวิจัย ในการให้คำปรึกษา แนะนำ ในการทำวิจัยและแก้ไขบทความ งานวิจัยนี้ได้รับเงิน อุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2548 จาก กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวง สาธารณสุข. สถิติการตาย พ.ศ. 2545-2549. Available at: <http://bps.ops.moph.go.th/Death.html>, assessed March 4, 2008.
2. Sriplung H, Sontipong S, Martin N, *et al.* Cancer in Thailand Vol. III, 1995-1997. Bangkok: Bangkok Medical Publisher, 2003: 11,13.
3. Graham S, Dayal H, Swanson M, *et al.* Diet in the epidemiology of cancer of the colon and rectum. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61(3): 709-14.
4. Graham S. Results of case control studies of diet and cancer in Buffalo, New York. *Cancer Res* 1983; 43: 2409s-13s.
5. Boyd JN, Babish JG, Stoewsand GS. Modification by beet and cabbage diets of aflatoxin B₁- induced rat plasma-faetoprotein elevation, hepatic tumorigenesis, and mutagenicity of urine. *Food Chem Toxicol* 1982; 20: 47-52.
6. Wattenberg LW. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res* 1983; 43: 2448-53.
7. Chang Y, Bjeldanes LF. R-Goitrin and BHA-induced modulation of aflatoxin B₁ binding DNA and biliary excretion of conjugates in rats. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1043-50.
8. Van der Hoeven JCM. Occurrence and detection of natural mutagens and modifying factors in food products. In: Hayashi, Y. *et al.* eds. Diet, Nutrition and Cancer. Tokyo: Japan Sci Soc Press, 1986: 119-37.
9. วรวณี โรจนโพธิ์, อนงค์ เทพสุวรรณ์.ฤทธิ์ก่อ กลายพันธุ์และฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของผัก บางชนิด. *วารสารกรมการแพทย์* 2535; 17: 461-69.
10. Rojanapo W, Tepsuwan A. Antimutagenic and mutagenic potentials of Chinese radish. *Environ Health Perspec* 1993; 101 (Suppl.3): 247-52.
11. Kusamran WR, Tepsuwan A, Kupradinun P. Antimutagenic and anticarcinogenic potentials of some Thai vegetables. *Mutat Res* 1998; 402: 247-58.
12. Kusamran WR, Ratanavila A, Tepsuwan A. Effects of neem flowers, Thai and Chinese bitter gourd fruits and sweet basil leaves on hepatic mono-oxygenases and glutathione-

- S-transferase activities and in vitro metabolic activation of chemical carcinogens in rats. *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 475-84.
13. อนงค์ เทพสุวรรณณ์, วรณี คุณสำราญ. บทบาทของกะหล่ำปลี คื่นช่าย และหัวผักกาดต่อระดับ cytochrome P450 เอนไซม์กลุ่ม mono-oxygenase และ เอนไซม์ในระบบขับพิษสารเคมี และความสามารถในการกระตุ้นฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อมะเร็งในตับหนู. *วารสารโรคมะเร็ง* 2539; 22: 29-44.
 14. อนงค์ เทพสุวรรณณ์, วรณี คุณสำราญ. ผลของใบขี้เหล็ก ใบยอ และใบบัวบกต่อเอนไซม์ในระบบเมตาบอลิซึมของสารก่อมะเร็งในตับหนู. *วารสารกรมการแพทย์* 2540; 22(10): 425-37.
 15. Vinitketkumnun U, Puatanachokchai R, Kongtawelert P, *et al.* Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in *Salmonella* mutation assay. *Mutat Res* 1994; 341: 71-5.
 16. Vinitketkumnun U, Suaeyun R, Puatanachokchai R, *et al.* Effect of lemon grass extract on cytochrome P450 content and phase II enzymes in liver of Wistar rat. Present at the 5th International Conference on Mechanism of and Anti mutagenesis, December 2-6, 1996, Okayama, Japan.
 17. Meevatee U, Boontin S, Keereeta O, *et al.* Antimutagenic activity of lemon grass. In: Boot-in S ed. Man and Environment. Chiang Mai: Chiang Mai University Press, 1993: 346.
 18. Puatanachokchai R. Antimutagenicity, cytotoxicity and antitumor activity from lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) extract. [M.S. thesis in Biochemistry]. Chiang Mai: Faculty of Medicine, Chiang Mai University, 1994.
 19. Suaeyun R, Kinouchi T, Arimochi H, *et al.* Inhibitory effect of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon. *Carcinogenesis* 1997; 18: 949-55.
 20. Ashby J, de Serres FJ, Shelby MD, *et al.* Evaluation of short-term tests for carcinogens. Report of the International Programme on Chemical Safety's Collaborative Study on in vivo Assays. Volume 1. IPCS. Cambridge University Press, 1988.
 21. Au WW, Anwar WA, Hanania E, *et al.* Antimutagenic effects of dimethylsulfoxide on metabolism and genotoxicity of benzene *in vivo*. In: Kuroda Y, Shankel DM, Water MD, eds. Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanism II. New York: Plenum Publishing, 1990: 449-54.
 22. เพียงใจ คุณประดิษฐ์, อนงค์ เทพสุวรรณณ์, วรณี คุณสำราญ. การศึกษา clastogenicity และ anticlastogenicity ของดอกสะเดาโดยวิธี erythrocyte micronucleus assay ในหนูเมาส์. *วารสารโรคมะเร็ง* 2540; 23(1-2): 37-45.
 23. Kumvan W. Clastogenic and anticlastogenic potentials of dietary seaweeds *Porphyra* spp. and *Gracilaria* spp. using erythrocyte micronucleus assay in the mouse and their nutritive value. [M.S. thesis in food and nutrition toxicology]. Nakhon Pathom: Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, 2002 .
 24. Masomboon P. Clastogenic and anticlastogenic potential of raw and cooked *Amaranthus* species. [M.S. thesis in food and nutrition toxicology]. Nakhon Pathom: Faculty of

- Graduate Studies, Mahidol University, 2003.
25. Bieri LG, Stoewsand GS, Briggs GM, *et al.* Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J Nutr* 1997; 107: 1340-8.
26. Reeves PG, Nielsen FH, Fahay Jr GC. AIN-93 purified diet for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-51.
27. Hayashi M, Sofuni T, Ishidate M Jr. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat Res* 1983; 120: 241-7.
28. Hayashi M, Morita T, Kodama Y, *et al.* The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res* 1990; 245: 245-9.
29. Vander BJ, Harris AC, Ellis RS. Reticulocyte counts by means of fluorescence microscopy. *J Lab & Clin Med* 1963; 62: 132-40.
30. Singletary KW. Effect of dietary butylated hydroxytoluene on the in vivo distribution, metabolism and DNA-binding of 7, 12-dimethylbenz(a) anthracene. *Cancer Lett* 1990; 49(3): 187-93.

Anticlastogenic Potentials of Ivy Gourd, Sesbania, Lemon Grass and Chinese Kale in the Mouse

Piengchai Kupradinun

Laboratory Animal Section, Research Division, National Cancer Institute

ABSTRACT

A number of vegetables and fruits are known to contain various kinds of chemical possessing chemopreventive potential. Recently, we reported that some Thai vegetables, i.e. ivy gourd leaves (*Coccinia grandis* (L.) Voigt, Sesbania flowers (*Sesbania grandiflora* Linn.), lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) and Chinese kale (*Brassica alboglabra*) contained anti-mutagens against indirect carcinogens/mutagens such as aflatoxin B₁ (AFB₁) and benz (a) pyrene. The present study aimed at the determination of anticlastogenic activity of the above vegetables against clastogens/carcinogens i.e. mitomycin C (MMC) and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) using the *in vivo* mouse erythrocyte micronucleus assay. Mice were fed either with semipurified diet containing various concentrations of ground lyophilized vegetables for 2 weeks prior to administration of MMC and DMBA. Blood samples were collected before and after carcinogens administration and counted for reticulocytes both with micronucleus (micronucleated peripheral reticulocytes, MNRETs) and without micronucleus by using fluorescent microscope. It was found that feeding diets containing 5% and 10 % of ivy gourd leaves significantly decreased the number of MNRETs induced by both MMC and DMBA. Sesbania flowers at 5% and 10% also caused a reduction in the number of MNRETs induced by both MMC and DMBA, however, the difference was significant only at high concentration. On the other hand, lemon grass at 5% and 10% decreased MNRETs induced by both MMC and DMBA. Interestingly however, the effect was statistically significant only at high concentration in DMBA-treated group. Chinese kale at 10% and 20 % could not reduce MNRETs. The present study demonstrated that leaves of ivy gourd and flowers of sesbania possessed anticlastogenic activity against both direct and indirect-acting clastogens in the mouse. In addition, lemon grass could inhibit the clastogenicity of only indirect-acting clastogen. While Chinese kale did not inhibit the clastogenicity.

Keywords: Anticlastogenic, ivy gourd, sesbania, lemon grass, Chinese kale, MNRETs, mouse

* Corresponding author: สพ.ญ. เพียงใจ คุประดีนันท์
งานสัตว์ทดลอง กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ
268/1 ถ.พระราม 6 กรุงเทพมหานคร 10400
E-mail: pkupradi@health.moph.go.th