

บทความวิจัย (Research Article)

ประสิทธิภาพของสารสกัดเปลือกทับทิมต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

ปิยนุช คณะณมา¹ และ จินณวัตร มานะเสถียร^{2*}

Efficacy of pomegranate peel extracts in prostate cancer cells

Piyanut Khanema¹ and Jinnawat Manasathien^{2*}

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham, 44150

² Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University, Nakhon Ratchasima, 30000

* Corresponding author: manasathien@gmail.com; jinnawat.m@nrru.ac.th

Naresuan Phayao J. 2022;15(1):34-49.

Received; 21 April 2021; Revised: 30 June 2021; Accepted: 30 September 2021

บทคัดย่อ

มะเร็งต่อมลูกหมากเป็นมะเร็งที่พบบ่อยในเพศชายและเป็นโรคที่การรักษาทำได้ยาก มีค่าใช้จ่ายสูงและอาจมีผลข้างเคียงจากการรักษา พืชสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่เหมาะสมในการรักษามะเร็งต่อมลูกหมาก การศึกษามีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินปริมาณฟีนอลิกโดยรวมของสารสกัดจากเปลือกทับทิม และฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลของสารสกัด และสารสกัดเปลือกถูกนำมาศึกษาหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่าง และการรวมตัวอัดแน่นของนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกโดยรวมสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ($428.03 > 362.47$ ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิก/มิลลิกรัมสารสกัด) สอดคล้องกับความสามารถยับยั้งอนุมูล ABTS เมื่อพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งอนุมูล 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอล (129.20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) มีความสามารถมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (151.27 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยสารสกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถใกล้เคียงกับคาเทชิน (128.91 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แต่น้อยกว่าอีพิแกลโลคาเทชินแกลเลท (71.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งสารทั้งสองเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก สำหรับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์พีซี-3 เมื่อพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโต 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอล (455.63 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) มีความสามารถมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (685.98 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยสารสกัดทั้งสองสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีกว่าคาเทชิน (897.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แต่น้อยกว่าอีพิแกลโลคาเทชินแกลเลท (180.42 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และสารสกัดทั้งสองสามารถชักนำเซลล์พีซี-3 ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่าง และเกิดการรวมตัวอัดแน่นของนิวเคลียส โดยสรุปพบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมมีปริมาณฟีนอลิกสูงและมีศักยภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้ สารสกัดยังมีบทบาทสำคัญต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์พีซี-3

คำสำคัญ: ทับทิม, ปริมาณฟีนอลิก, การกำจัดอนุมูล, มะเร็งต่อมลูกหมาก

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

² โปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

Abstract

Prostate cancer is one of the most common cancers in males and trouble to treat. Also, the treatment takes high cost and has side effects on patients sometimes. Therefore, medicinal plants are a suitable choice for the treatment of prostate cancer. The objective of this study was to evaluate the total phenolic content of pomegranate peel extracts and their antioxidant activity. In addition, the growth inhibitory effect, the morphological changes, and the nuclear condensation of PC-3 prostate cancer cells were required to study for determining the potential of peel extracts. The result found that the total phenolic content of peel ethanolic extract (PE/e) was higher than peel water extract (PE/w) ($428.03 > 362.47 \mu\text{g GAE/mg}$, respectively). Corresponding to an ability of median ABTS radical scavenging concentration (EC_{50}), PE/e ($129.20 \mu\text{g/mL}$) was grateful over than PE/w ($151.27 \mu\text{g/mL}$) by the ability was similarly to catechin ($128.91 \mu\text{g/mL}$) but less than epigallocatechin-3-gallate ($71.05 \mu\text{g/mL}$). Catechin and epigallocatechin-3-gallate both are positive control. For inhibiting the growth of PC-3 cancer cells though median inhibitory concentration (IC_{50}), it found that PE/e ($455.63 \mu\text{g/mL}$) was more potent than PE/w ($685.98 \mu\text{g/mL}$) by both extracts could inhibit cancer cells better than catechin ($897.12 \mu\text{g/mL}$) but lower than epigallocatechin-3-gallate ($180.42 \mu\text{g/mL}$). Moreover, both extracts could induce morphological changes and nuclear condensation of PC-3 cells. In conclusion, the pomegranate peel extracts had high phenolic contents and the great potential of antioxidation. Also, the peel extracts had a dominant effect on PC-3 cells antiproliferation.

Keywords: Pomegranate, Phenolic content, Radical scavenging activity, Prostate cancer

บทนำ

โรคมะเร็งจัดเป็นสาเหตุหลักในการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก ซึ่งมะเร็งต่อมลูกหมากเป็นสาเหตุสำคัญในการเสียชีวิตของเพศชายที่มีอายุมากกว่า 50 ปี สาเหตุการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากอาจเกิดจากความผิดปกติของปัจจัยภายในร่างกาย เช่น พันธุกรรม ระบบฮอร์โมน หรือระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น หรืออาจเกิดจากปัจจัยภายนอกในร่างกาย เช่น การได้รับเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย หรือการได้รับสารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เป็นต้น ตลอดจนอาจเกิดจากทั้งสองปัจจัยร่วมกัน โดยทั่วไปวิธีการรักษามะเร็งมีหลายวิธี ได้แก่ การผ่าตัด การใช้รังสี การใช้เคมีบำบัด และการใช้เคมีบำบัดร่วมกับวิธีอื่น ขึ้นอยู่กับพยาธิสภาพของโรคมะเร็งชนิดนั้น ๆ และสภาพร่างกายของผู้ป่วย [1, 2] ซึ่งการใช้เคมีบำบัดอาจมีผลข้างเคียงต่อร่างกายผู้ป่วย มีรายงานว่าอาหารที่มีส่วนประกอบของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) มีผลช่วยลดโอกาสเกิดและตายจากมะเร็งต่อมลูกหมาก พบว่าประชากรเพศชายในประเทศจีนและญี่ปุ่นนิยมบริโภค

อาหาร เช่น ถั่วเหลือง และชาเขียว ซึ่งมีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์อยู่ในระดับสูง ทำให้ประชากรในประเทศจีนและญี่ปุ่นพบผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมากต่ำกว่าประชากรในทวีปอเมริกาเหนือประมาณ 60 – 80 เท่า [3-6] และมีผลการศึกษาได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของการบริโภคสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ต่อการลดโอกาสการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก [7-9]

ทับทิม (Pomegranate) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Punica granatum* Linn. เป็นพืชที่รู้จักกันดีในด้านของผลไม้เพื่อการบริโภค และหลายประเทศทั่วโลกได้นำส่วนประกอบของต้นทับทิมมาใช้เป็นพืชสมุนไพรเพื่อรักษาอาการของโรคต่าง ๆ เช่น ใช้น้ำทับทิมช่วยเพิ่มการย่อยอาหารและบำบัดโรคเรื้อรัง เปลือกและรากทับทิมใช้ขับไล่พยาธิตัวตืดในร่างกาย เปลือกลำต้น ใบ และเปลือกผล ใช้รักษาอาการท้องร่วง บิด และเลือดไหลไม่หยุด และดอกช่วยบำบัดอาการของโรคหลอดเลือดเป็นต้น [10] เป็นที่ทราบกันดีว่าน้ำทับทิมมีส่วนประกอบของฟีนอล (Phenols) และโพลีฟีนอล (Polyphenols)

หลายกลุ่มที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ ได้แก่ hydroxybenzoic acids, Phenylpropanoids, Anthocyanins, Flavan-3-ols และ Flavonols [11] โดยสารสกัดที่ได้จากเปลือกผลทับทิม พบว่า เต็มไปด้วยสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ต่าง ๆ ที่สำคัญในปริมาณมากกว่าที่ได้จากส่วนอื่น ๆ ของทับทิม และยังพบสารสำคัญหลายชนิดที่ไม่พบในน้ำทับทิม ได้แก่ Flavonol glycosides, Flavones, Flavone glycosides, Anthocyanidins และ Ellagitannins [12-15] สอดคล้องกับบางรายงานที่พบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำและเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ให้สารฟีนอลิก (Phenolics) และฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ได้จากส่วนอื่นของทับทิม และปริมาณของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดที่ได้มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ [16] มีรายงานว่าฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกทับทิมสามารถลดผลกระทบต่อผิวหนังจากการได้รับแสงยูวีบี (Ultraviolet B; UVB) [17] และสารที่ได้จากเปลือกทับทิมยังมีบทบาทลดการอักเสบ ลดการเจริญของเซลล์เนื้องอก ลดการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ มะเร็งเต้านม และมะเร็งปอด เป็นต้น [18-22] สอดคล้องกับรายงานที่พบว่าสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำ และเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ได้ [16] และสารสกัดจากทับทิมสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด LnCaP และ DU-145 ได้ [23-25] นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าสารกลุ่มสเตอรอล เช่น แคมเพสเตอร์อล (Campesterol), สติกมาสเตอร์อล (Stigmasterol) และเบต้า-ซิโตสเตอรอล (Beta-sitosterol) ที่พบในเมล็ดทับทิม มีบทบาทชักนำเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิดพีซี-3 (PC-3) ให้เกิดอะพอพโทซิส (Apoptosis) และชะลอวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle arrest) จากการเปลี่ยนแปลงของ Reactive oxygen species (ROS) และการหลั่งพรอสตาแกลนดิน (Prostaglandin) ที่มีผลต่อเซลล์ [26, 27] และพบว่าสารพฤกษเคมีในผลทับทิมยังมีผลต่อเซลล์พีซี-3 โดยลดการทำงานของเครือข่ายโปรตีน (cki-cyclin-cdk network) และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน p21 และ

p27 ที่มีบทบาทต่อการยึดเหนี่ยววัฏจักรเซลล์ ตลอดจนเพิ่มระดับของอัตราส่วน Bax/Bcl-2 (Bax/Bcl-2 ratio) ซึ่งชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์พีซี-3 [28]

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยน้ำและเอทานอลต่อปริมาณฟีนอลิกโดยรวม ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ และผลต่อฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่าง และการรวมตัวอัดแน่นของนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยจะช่วยพัฒนาการนำเปลือกทับทิมไปใช้ประโยชน์ในทางเภสัช และช่วยเพิ่มทางเลือกการใช้พืชสมุนไพรทดแทนยาแผนปัจจุบันในอนาคต

วัสดุและวิธีการศึกษา

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

Folin-Ciocalteu's phenol reagent, กรดแกลลิก (Gallic acid), 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), คาเทชิน (Catechin) และอีพิแกลโลคาเทชินแกลเลต (Epigallocatechin-3-gallate) จำหน่ายโดย Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA), Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640), fetal bovine serum (FBS) และ penicillin/streptomycin จำหน่ายโดย GIBCO, Thermo Fisher Scientific Corporation (Waltham, USA), Hoechst 33342 และ 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) จำหน่ายโดย Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific Corporation (Waltham, USA) ส่วนสารเคมีอื่นที่ใช้ในการศึกษาเป็นเกรดคุณภาพสำหรับใช้ในการวิเคราะห์

วัตถุดิบ และการสกัดสาร

ผลทับทิมที่ใช้ในการวิจัย คัดเลือกผลทับทิมสุกที่ได้มาจากสวนทับทิมตำบลกลางดง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ในเดือนมกราคม พ.ศ.2562 และจำแนกตามตัวอย่างพืชหมายเลข 080252 ของหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช นำผลทับทิมมาล้างทำความสะอาด แยกเอาส่วนเปลือกออกจากผลทับทิม จากนั้นนำเปลือกทับทิมที่คัดแยกไว้ไปทำให้แห้งในตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเปลือกแห้งมาบดละเอียด ผงป่น

เปลือกหุ้มที่ได้นำมาแบ่งเป็น 2 ส่วน สำหรับการสกัดด้วยน้ำกลั่น และสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีสกัดด้วยซอกเลต (Soxhlet extraction) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำสารสกัดเปลือกหุ้มด้วยน้ำและเอทานอล มารองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 สารสกัดที่ผ่านการกรองนำมาระเหยถึงตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศ จากนั้นนำสารสกัดมาทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง (Freeze dehydration) สารสกัดเปลือกหุ้มแห้งถูกเก็บไว้ในภาชนะป้องกันการรั่วซึมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ในงาน

การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกโดยรวม

การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกโดยรวมจากสารสกัดเปลือกหุ้ม ใช้วิธีวิเคราะห์ประยุกต์จากวิธี Folin-Ciocalteu [29] เริ่มจากเตรียมสารสกัดเปลือกหุ้มด้วยน้ำและเอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ (200

– 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ดูดสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงหลอดทดลอง ละลายในตัวทำละลาย (น้ำกลั่นหรือเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นผสมกับสารทดสอบ (Folin-Ciocalteu's phenol reagent: เมทานอล, 1:1, ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติมนโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นระยะเวลา 45 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความสามารถในการดูดกลืนแสง (Optical density) ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ค่าที่อ่านได้นำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid standard curve) จากสมการที่ 1 หน่วยแสดงเป็นไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิก (Gallic acid equivalent)

$$Y = 0.0049x + 0.0564; R = 0.9998 \quad (1)$$

การทดสอบกิจกรรมยับยั้งอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ใช้วิธีวิเคราะห์ประยุกต์จากวิธี ABTS [30, 31] เริ่มจากเตรียมสารละลาย ABTS เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) เข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ผสมสารละลาย ABTS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดเป็นระยะเวลา 12 - 16 ชั่วโมง นำสารที่บ่มไว้มาเจือจางด้วยเมทานอลจนกระทั่งมีความสามารถในการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.100 ± 0.04 เตรียมสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ (25 – 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เตรียมสาร

กลุ่มควบคุมเชิงบวก ได้แก่ คาเทชิน และอีพิกัลโลคาเทชิน แกลเลทความเข้มข้นต่าง ๆ (25 – 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ดูดสารสกัดตัวอย่างและสารกลุ่มควบคุมเชิงบวกปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมกับสารทดสอบ ABTS (มีค่าการดูดกลืนแสง 1.100) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมส่วนประกอบให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ค่าที่อ่านได้นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งอนุมูลอิสระจากสมการที่ 2 และนำมาวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งอนุมูลได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Median efficient concentration; EC₅₀)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ} = [1 - (g_{s_1} - g_{s_2})/g_{s_0}] \times 100 \quad (2)$$

พจน์ g_{s_0} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงสารทดสอบ ABTS ที่ไม่มีสารสกัด พจน์ g_{s_1} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงสารทดสอบ ABTS ที่มีสารสกัด และพจน์ g_{s_2} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดแต่เพียงอย่างเดียวไม่มีสารทดสอบ ABTS

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 (Human prostate cancer cells) ได้มาจากสถาบัน American Type Culture Collection (ATCC) ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) ที่เติมด้วย Fetal bovine

serum (FBS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และยาปฏิชีวนะ Penicillin/streptomycin เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน ภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร บ่ม ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมี ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide) เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบกิจกรรมยับยั้งการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้ง การเจริญเติบโตของเซลล์โดยใช้วิธี MTT [32] เริ่มจาก ทำการย้ายเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 ลงใน ภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well culture plate) ให้มีความหนาแน่นเท่ากับ 10,000 เซลล์/หลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 ที่เติม FBS และ ยาปฏิชีวนะสมบูรณ์แล้ว นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณ คาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็น ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แทนที่ด้วยสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลความเข้มข้น ต่าง ๆ (200 – 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในอาหาร

เลี้ยงเซลล์ ปฏิบัติลักษณะเดียวกันกับสารกลุ่มควบคุม เชิงบวก ได้แก่ คาเทชิน และอีพิกัลโลคาเทชินแกล เลท และมีกลุ่มควบคุม คือ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปบ่ม ต่อในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารทดสอบทิ้ง และเติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ที่ละลายใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) พีเอช 7.4) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ก่อนนำไปบ่มทดสอบ ในตู้เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่ กำหนดดูดสารละลาย MTT ในแต่ละหลุมทิ้ง แล้วจึง เติม DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร/หลุม นำภาชนะเพาะเลี้ยงไปเขย่า อย่างต่อเนื่องเพื่อละลายผลึกสีม่วงน้ำเงิน (Formazan crystals) ที่ตกตะกอนอยู่ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หา ความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าที่อ่านได้นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการเจริญเติบโตจากสมการที่ 3 จากนั้นนำมา วิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ยับยั้ง การเจริญเติบโตได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Median inhibitory concentration; IC₅₀)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต} = [1 - (กส_1 - กส_2)/กส_0] \times 100 \quad (3)$$

พยัญชนะ กส₀ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสง ของกลุ่มควบคุม (เซลล์ที่ไม่มีสารสกัด) พยัญชนะ กส₁ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดสอบ (เซลล์ที่ ได้รับสารสกัด) และพยัญชนะ กส₂ หมายถึง ค่าการ ดูดกลืนแสงของสารสกัดแต่เพียงอย่างเดียวปราศจาก เซลล์ทดสอบ

การรวมตัวอัตโนมัติของนิวเคลียสของเซลล์มะเร็ง ต่อมลูกหมาก

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และการ รวมตัวอัตโนมัติของนิวเคลียส เป็นลักษณะสำคัญที่บ่งชี้ ถึงขั้นตอนของกระบวนการเกิดอะพอพโทซิส (Apoptosis) โดยการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ สามารถสังเกตได้โดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วน การรวมตัวอัตโนมัติของนิวเคลียสสามารถสังเกตได้จาก

การนำเซลล์มาย้อมด้วยสี Hoechst 33342 โดยวิธี ศึกษาเริ่มจากการย้ายเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี- 3 ลงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม (6-well culture plate) ให้มีความหนาแน่นเท่ากับ 300,000 เซลล์/หลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มในตู้ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารออกและ เติมสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ (200 – 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในอาหารเลี้ยง เซลล์ นำไปบ่มต่อในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารทดสอบทิ้งและล้างด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ตรึงเซลล์ด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์

จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ย้อมด้วยสี Hoechst 33342 (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์) ในที่มีดเป็นระยะเวลา 15 นาที การเปลี่ยนแปลงรูปร่างนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 สังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับแบบฟลูออเรสเซนซ์และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล [33]

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการศึกษานำจำนวน 4 ซ้ำ ในทุกการทดลอง ข้อมูลทั้งหมดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ standard error of mean) การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) ใช้วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของประชากรหลายกลุ่ม และใช้วิธีการเปรียบเทียบพหุคูณแบบ Least-significant different (LSD) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยประชากรครั้งละหลายคู่ และในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวอย่างสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันใช้การทดสอบที (T-test) ระดับการมีนัยสำคัญกำหนดที่ 0.05 ($p < 0.05$) ในทุกการทดลอง และการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูล (Correlation) แสดงเป็นแผนภาพการกระจาย (Scatter diagram) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R)

ผลการศึกษา

ปริมาณฟินอลิกโดยรวมของสารสกัดจากเปลือกทับทิม

ผลจากการศึกษาหาปริมาณฟินอลิกโดยรวมในสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำและเอทานอล พบว่าปริมาณฟินอลิกเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อทดสอบสารสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีปริมาณฟินอลิกโดยรวมเท่ากับ 80.43 ± 0.95 , 150.53 ± 0.90 , 221.35 ± 0.91 , 289.51 ± 0.93 และ 362.47 ± 0.96 ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิกตามลำดับ (ตาราง 1) โดยสารสกัดด้วยน้ำในแต่ละความเข้มข้นแสดงปริมาณฟินอลิกโดยรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบสารสกัดด้วยเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน พบว่ามีปริมาณฟินอลิกโดยรวมเท่ากับ 102.78 ± 1.53 , 186.19 ± 1.03 , 266.09 ± 1.14 , 349.05 ± 0.98 และ 428.03 ± 1.23 ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิกตามลำดับ (ตาราง 1) โดยสารสกัดด้วยเอทานอลในแต่ละความเข้มข้นมีปริมาณฟินอลิกโดยรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณฟินอลิกโดยรวมระหว่างสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลในทุกความเข้มข้น พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟินอลิกสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตาราง 1 ปริมาณฟีนอลิกโดยรวมของสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำและเอทานอล

กลุ่ม	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม)	ปริมาณฟีนอลิกโดยรวม (ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิก)
สารสกัดด้วยน้ำ	200	80.43 ± 0.95 ^g
	400	150.53 ± 0.90 ^g
	600	221.35 ± 0.91 ^h
	800	289.51 ± 0.93 ^h
	1,000	362.47 ± 0.96 ^h
สารสกัดด้วยเอทานอล	200	102.78 ± 1.53 ^{g, *}
	400	186.19 ± 1.03 ^{g, *}
	600	266.09 ± 1.14 ^{h, *}
	800	349.05 ± 0.98 ^{h, *}
	1,000	428.03 ± 1.23 ^{h, *}

พยัญชนะ (^{g, h, ...}) ที่ต่างกันภายในสดมภ์ของแต่ละกลุ่ม แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของปริมาณฟีนอลิกโดยรวมในแต่ละความเข้มข้น จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบพหุคูณ และดอกจัน (*) แสดงความแตกต่างของปริมาณฟีนอลิกโดยรวม ระหว่างสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างสองกลุ่ม

ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกทับทิม

ผลจากการศึกษากิจกรรมยับยั้งอนุมูลอิสระพบว่า ความสามารถในการเก็บกวาดอนุมูล ABTS สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่ให้เพิ่มขึ้น โดยเมื่อทดสอบสารสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า สารสกัดด้วยน้ำสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 8.76 ± 0.22 , 18.56 ± 1.01 , 34.78 ± 1.26 และ 64.95 ± 1.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 2) สารสกัดด้วยน้ำในแต่ละความเข้มข้นแสดงความสามารถยับยั้งอนุมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนสารสกัดด้วยเอทานอลยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 9.40 ± 1.27 , 21.11 ± 1.26 , 39.23 ± 1.06 และ 76.50 ± 0.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 2) สารสกัดด้วยเอทานอลในแต่ละความเข้มข้นแสดงความสามารถยับยั้งอนุมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สำหรับกลุ่มควบคุมเชิงบวกเมื่อทดสอบที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า คาเทชินมีค่าเท่ากับ 8.83 ± 0.59 , 22.25 ± 0.36 , 39.35 ± 0.79 และ 76.47 ± 0.95 เปอร์เซ็นต์ และอีพิกัลโลคาเทชิน

แกลเลทมีค่าเท่ากับ 15.75 ± 0.45 , 35.34 ± 0.88 , 70.99 ± 0.97 และ 87.07 ± 0.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 2) เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ยับยั้งอนุมูลอิสระในแต่ละความเข้มข้นของทุกกลุ่มมาเปรียบเทียบกัน พบว่าทุกระดับความเข้มข้นอีพิกัลโลคาเทชินแกลเลทมีความสามารถสูงที่สุด ตามมาด้วยคาเทชินและสารสกัดเอทานอลที่มีความสามารถใกล้เคียงกัน โดยสารสกัดด้วยน้ำมีความสามารถต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งคาเทชินและสารสกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถยับยั้งอนุมูลใกล้เคียงกันในทุกระดับความเข้มข้นและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ยับยั้งอนุมูลได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50}) พบว่าแต่ละกลุ่มมีค่า ดังนี้ สารสกัดด้วยน้ำ (151.27 ± 1.55 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สารสกัดด้วยเอทานอล (129.20 ± 0.73 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) คาเทชิน (128.91 ± 0.93 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และอีพิกัลโลคาเทชินแกลเลท (71.05 ± 0.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยอีพิกัลโลคาเทชินแกลเลทมีความสามารถสูงที่สุด ส่วนสารสกัดน้ำมีความสามารถต่ำที่สุดอย่างมี

นัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนคาเทชินและสารสกัดเอทานอลมีความสามารถใกล้เคียงกัน ($p > 0.05$) แต่สูงกว่าสารสกัดน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลในทุกความเข้มข้น พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิตร มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แต่ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิตร สารสกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลได้ 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตาราง 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำและเอทานอล และความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิมที่มีผลยับยั้งอนุมูลได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50})

กลุ่ม	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม)	ยับยั้งอนุมูลอิสระ (เปอร์เซ็นต์)	ความเข้มข้นที่ยับยั้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (ไมโครกรัม)
สารสกัดด้วยน้ำ	25	8.76 ± 0.22^b	151.27 ± 1.55^a
	50	18.56 ± 1.01^b	
	100	34.78 ± 1.26^b	
	200	64.95 ± 1.32^b	
สารสกัดด้วยเอทานอล	25	9.40 ± 1.27^b	$129.20 \pm 0.73^{b,*}$
	50	21.11 ± 1.26^b	
	100	$39.23 \pm 1.06^{b,*}$	
	200	$76.50 \pm 0.62^{b,*}$	
คาเทชิน	25	8.83 ± 0.59^b	128.91 ± 0.93^b
	50	22.25 ± 0.36^b	
	100	39.35 ± 0.79^b	
	200	76.47 ± 0.95^b	
อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลท	25	15.57 ± 0.45^a	71.05 ± 0.75^a
	50	35.34 ± 0.88^a	
	100	70.99 ± 0.97^a	
	200	87.07 ± 0.72^a	

พหุคูณ ($^{a,b,c,\dots}$) ที่ต่างกันภายในสมรภูมิเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากค่าความเข้มข้นเดียวกันของสารสกัดเปลือกทับทิมและสารกลุ่มควบคุมเชิงบวก ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ และแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต่อผลยับยั้งอนุมูลได้ 50 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบพหุคูณ และดอกจัน (*) แสดงความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ และผลยับยั้งอนุมูลได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างสองกลุ่ม

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3

ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากของสารสกัดจากเปลือกทับทิม และสารกลุ่มควบคุมเชิงบวก พบว่า ความสามารถในการยับยั้ง

การเจริญเติบโตของเซลล์พีซี-3 หลังจากให้สารเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่ให้เพิ่มขึ้น (ตาราง 3) เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ยับยั้งการเจริญได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) สารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วย

เอทานอล มีค่าเท่ากับ 685.98 ± 14.89 และ 455.63 ± 49.98 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตาราง 3) ส่วนกลุ่มควบคุมเชิงบวก ได้แก่ คาเทชิน และอีพิกัลโลคาเทชินแกลเลท มีค่าเท่ากับ 897.12 ± 24.18 และ 180.24 ± 4.50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตาราง 3) และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความเข้มข้นระหว่างสารสกัดทุกกลุ่มในการยับยั้งเซลล์พีซี-3 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่า อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลทมีความสามารถสูงที่สุด ตามมาด้วยสารสกัดเอทานอล

สารสกัดน้ำ และคาเทชินมีความสามารถต่ำที่สุด ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอล พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลแสดงความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งพีซี-3 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกโดยรวมและเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์พีซี-3 ของสารสกัดจากเปลือกทับทิม พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.9598 (ภาพ 1)

ตาราง 3 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต และความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิมที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

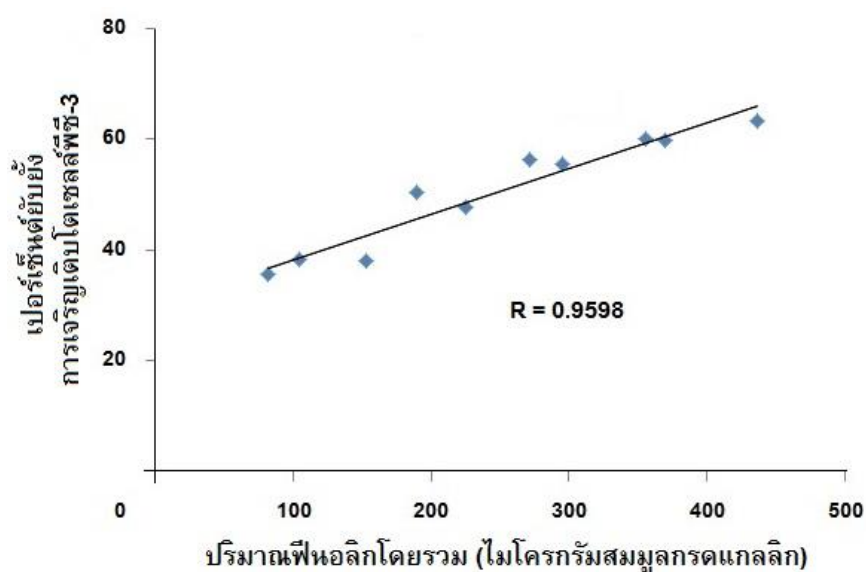
กลุ่ม	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม)	ยับยั้งการเจริญเติบโต (เปอร์เซ็นต์)	ความเข้มข้นที่ยับยั้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (ไมโครกรัม)
สารสกัดด้วยน้ำ	200	35.47 ± 1.17	685.98 ± 14.89^a
	400	37.92 ± 1.14	
	600	47.63 ± 0.53	
	800	55.50 ± 2.32	
	1,000	59.76 ± 0.97	
สารสกัดด้วยเอทานอล	200	38.23 ± 2.72	$455.63 \pm 49.98^{a,*}$
	400	50.51 ± 2.77	
	600	56.36 ± 0.79	
	800	60.13 ± 1.19	
	1,000	63.29 ± 0.34	
คาเทชิน	400	21.31 ± 5.10	897.12 ± 24.18^b
	600	37.11 ± 4.65	
	800	45.05 ± 2.13	
	1,000	52.33 ± 0.54	
อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลท	100	30.69 ± 2.21	180.42 ± 4.50^c
	150	41.26 ± 1.98	
	200	57.86 ± 1.99	
	250	67.64 ± 1.17	

พยัญชนะ (^{a, b, ...}) ที่ต่างกันภายในสดมภ์ แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต่อผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบพหุคูณ และดอกจัน (*) แสดงความแตกต่างระหว่างสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยเอทานอลต่อผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างสองกลุ่ม

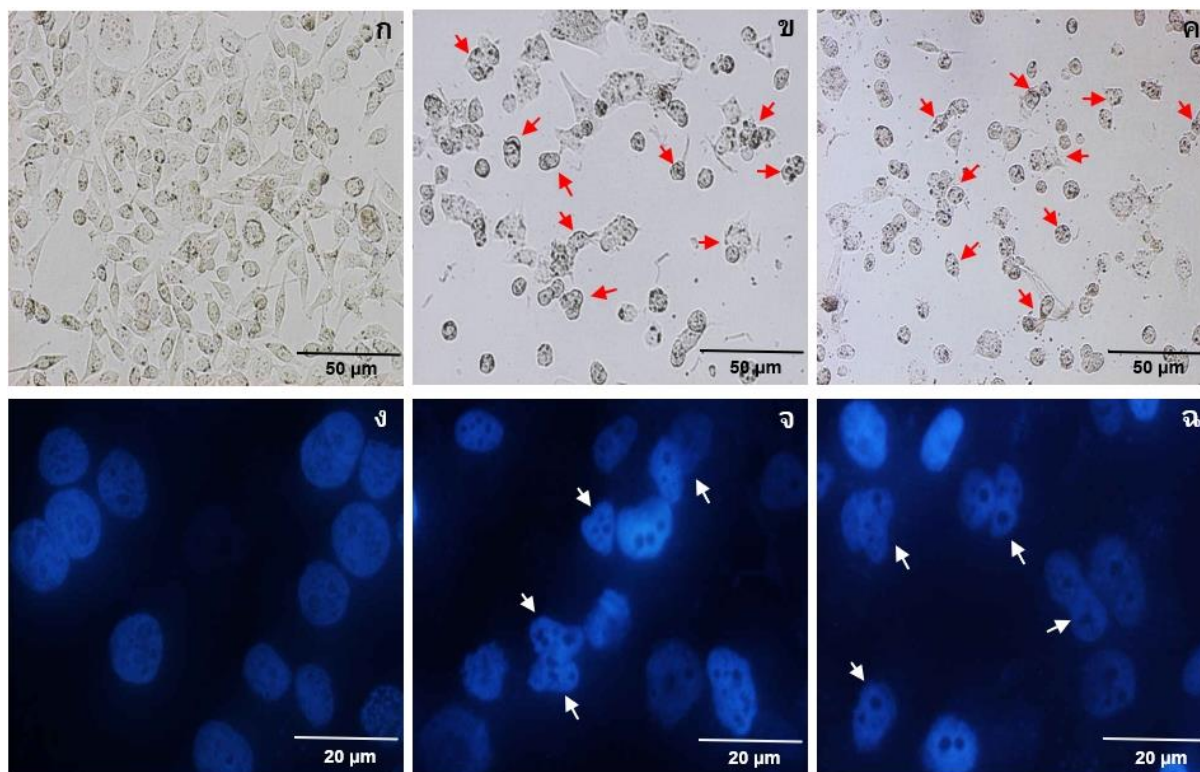
การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3

หลังการบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดเปลือกทับทิม ด้วยน้ำและเอทานอลเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ พบว่า เซลล์พีซี-3 ที่ได้รับสารสกัดน้ำและเอทานอลเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพ 2 ข และ ค) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ 2 ก) เมมเบรนของเซลล์มีการหดตัว สูญเสียสภาพในการยึดเกาะ และเสียสภาพการติดต่อกับเซลล์ข้างเคียง

และเมื่อนำเซลล์มาย้อมด้วย Hoechst 33342 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส พบว่า เซลล์พีซี-3 ที่ได้รับสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอล 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพ 2 จ และ ฉ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ 2 ง) นิวเคลียสของเซลล์มีลักษณะการรวมตัวอัดแน่น และมีลักษณะของการเกิดอะพอโทติกบอดี ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญในการบ่งชี้ถึงการเกิดอะพอโทซิส โดยสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 200, 800 และ 1,400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงลักษณะการเกิดอะพอโทติกบอดีไม่ชัดเจนภายหลังจากการย้อมสี (ไม่แสดงในภาพ)



ภาพ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกและเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 จากสารสกัดเปลือกทับทิม



ภาพ 2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 หลังจากให้สารสกัดเปลือกทับทิมเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ ภาพ 2 ก - ค เซลล์ไม่ได้รับการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ ภายใต้กำลังขยาย 100 เท่า ภาพ 2 ง - ฉ เซลล์ได้รับการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ ภายใต้กำลังขยาย 400 เท่า โดย ภาพ 2 ก และ ง เซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด ภาพ 2 ข และ จ เซลล์ได้รับสารสกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และภาพ 2 ค และ ฉ เซลล์ได้รับสารสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลูกศรสีแดงแสดงลักษณะของเซลล์ที่หดตัวและเมมเบรนสูญเสียสภาพการยึดเกาะ ลูกศรสีขาวแสดงการหดตัวของนิวเคลียสและอะพอโทติกบอดี

วิจารณ์

สารพฤกษเคมีที่พบในพืชสมุนไพรส่วนใหญ่จะมีความสัมพันธ์กับบทบาทในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การต้านการอักเสบ การเพิ่มภูมิคุ้มกัน และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น มีรายงานถึงสารฟีนอลิกสำคัญที่พบในเปลือกทับทิมหลายชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก (Gallic acid), กรดเอลลาจิก (Ellagic acid), กรดคาเฟอิก (Caffeic acid), กรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid), กรดคูมาริก (Coumaric acid), กรดควินิก (Quinic acid), ฟลาเวน (Flavan), คาเทชิน (Catechin), อีพิกะเทชิน (Epicatechin), อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลท (Epigallocatechin-3-gallate), เควอร์เซติน (Quercetin), แคมพ์เฟอรอล (Kaempferol), รูติน (Rutin), ลูทีโอลิน

(Luteolin), นารินจิน (Naringin), เดลฟิไดน (Delphinidin), ไฮยานิไดน (Cyanidin), เปลาร์โกนิน (Pelargonidin), พุนิคาลิน (Punicalin), พุนิคาลาจิน (Punicalagin), โคริลาจิน (Corilagin) คาซอรีนิน (Casuarinin), เพดุนคูลาจิน (Pedunculagin), เทลลิมาแกรนดิน (Tellimagrandin) และกรานาติน (Granatin) [11] ผลจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 428.03 ± 1.23 ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิก/มิลลิกรัมสารสกัด โดยมีปริมาณมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำที่มีค่าเท่ากับ 362.47 ± 0.96 ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิก/มิลลิกรัมสารสกัด ซึ่งสอดคล้องกับในรายงานที่พบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอทานอลจะพบปริมาณของสารฟีนอลิกโดยรวม (449.60 ± 4.40) ไมโครกรัมสมมูลกรดแกล

ลิก/มิลลิกรัมสารสกัด) และฟลาโวนอยด์ (38.44 ± 1.44 ไมโครกรัมสมมูลคาเทชิน/มิลลิกรัมสารสกัด) มากกว่าที่พบจากสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำที่มีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ (380.54 ± 5.87 ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิก/มิลลิกรัมสารสกัด) และฟลาโวนอยด์เท่ากับ (26.04 ± 0.93 ไมโครกรัมสมมูลคาเทชิน/มิลลิกรัมสารสกัด) [16] ดังนั้น แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างในควมมีขั้วของตัวทำละลายมีผลต่อความสามารถในการดึงสารฟีนอลิกที่อยู่ในเปลือกทับทิม คล้ายกับรายงานที่พบว่า เมทานอลสามารถดึงสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน ออกมาจากพืชได้มากกว่าการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย [34] และสอดคล้องกับงานวิจัยในเปลือกมังคุดที่รายงานว่าเมื่อใช้เอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย สามารถสกัดสารฟีนอลิกออกจากเปลือกมังคุดได้มากกว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย [35]

ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกทับทิมมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของสารพฤษเคมีที่อยู่ในสารสกัด โดยผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงว่าสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS ได้ดีกว่าสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับในรายงานเปรียบเทียบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกทับทิมที่ได้รายงานว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีค่า EC_{50} เท่ากับ 121.65 ± 2.66 และ 18.04 ± 1.95 ไมโครกรัม เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และวิธี FTC ตามลำดับ ส่วนสารสกัดด้วยน้ำมีค่า EC_{50} เท่ากับ 151.78 ± 2.70 และ 22.34 ± 2.11 ไมโครกรัม เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และวิธี FTC ตามลำดับ นอกจากนี้ในรายงานยังได้แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกกับความสามารถในการต้านอนุมูลได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50}) โดยแสดงค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination) เท่ากับ 0.833 และ 0.976 จากวิธี DPPH และวิธี FTC ตามลำดับ [16] และผลการวิจัยในครั้งนี้ยังพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ใกล้เคียงกับคาเทชิน ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่นิยมใช้ในการเปรียบเทียบ (ภาพ 2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในหนู

แรพที่พบว่า สารสกัดจากเปลือกทับทิมช่วยรักษาและยกระดับกิจกรรมกำจัดอนุมูลอิสระของเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase) เปอร็อกซิเดส (Peroxidase) และยังช่วยลดการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้ถึง 54 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม [36]

สารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยน้ำและเอทานอล พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 ได้ดีกว่าคาเทชิน (ตาราง 3) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกมีความสามารถที่จะยับยั้งเซลล์พีซี-3 ได้สอดคล้องกับรายงานเมื่อใช้สารสกัดบริสุทธิ์จากเปลือก เช่น นารินจิน (Naringin) พบว่า สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์พีซี-3 [23] สอดคล้องกับการศึกษาที่ได้รายงานว่า สารกลุ่มฟลาโวนอยด์หลายชนิดในเปลือกทับทิม ได้แก่ ลูทีโอลิน เคอร์เซติน อีพีแกลโลคาเทชิน แคมพ์เฟอรอล และฟีลาร์โกนินดิน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 [37] เมื่อทดสอบสารสกัดทับทิมจากส่วนต่าง ๆ พบว่า สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์พีซี-3 ได้ โดยสารไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในวัฏจักรเซลล์ของพีซี-3 แต่เมื่อย้อมสีฟลูออเรสเซนส์เพื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลง พบว่าสารสกัดทับทิมมีผลต่อการเกิดอะพอโทซิส โดยไมโทคอนเดรียแสดงลักษณะการเสื่อมสภาพ ยอมให้สารซึมผ่านได้มากขึ้น และมีจำนวนของอะพอโทติกเซลล์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มการทำงานของ Caspase-3 ในเซลล์พีซี-3 [25] และเมื่อย้อมด้วย Hoechst 33342 เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส พบว่า นิวเคลียสของพีซี-3 มีขนาดเล็กลงจากการหดตัวและจับกันแน่น นอกจากนี้ ยังพบการหดตัวของเมมเบรนเพื่อไปห่อหุ้มโครมาตินและไซโทพลาสซึมให้รวมตัวอัดแน่นกันเป็นก้อน ซึ่งเป็นลักษณะของอะพอโทติกบอดี และเป็นขั้นตอนในกระบวนการเกิดอะพอโทซิส [38, 39] สอดคล้องกับรายงานที่พบว่า สารสกัดจากทับทิมสามารถยับยั้งยับยั้งการเจริญของเซลล์พีซี-3 โดยชักนำให้เกิดอะพอโทซิสผ่านการทำงานของโปรตีนควบคุมการเกิดอะพอโทซิส โดยมีอัตราส่วนของ Bax/Bcl-2 เพิ่มขึ้น [28] มีรายงานว่าสารกลุ่มฟลาโวน (Flavones)

ที่พบในเปลือกผลทับทิมมีผลยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์พีซี-3 [23] โดยสารสกัดจากเปลือกทับทิมช่วยยับยั้งการแสดงออกของเซลล์พีซี-3 ในการสร้าง phospholipase A2 (PLA₂) ที่เป็นสารตั้งต้นสำคัญในกระบวนการสร้างไอโคซานอยด์ (Eicosanoids) [24] และมีการศึกษาสารสกัดจากน้ำทับทิม โดยสารส่วนใหญ่ที่พบ ได้แก่ พวแกนนโทไซยานิน (Anthocyanins) เช่น เดลฟินิดิน ไซยานิดิน และฟิลาโรโกนิน เป็นต้น และพวกไฮโดรไลซ์แทนนิน (Hydrolysable tannins) เช่น พุนิคาลิน ฟิดันคูลาจิน พุนิคาลาจิน และกรดเอลลาจิก เป็นต้น ซึ่งสามารถพบสารเหล่านี้ได้ในสารสกัดจากเปลือกทับทิม [11, 15] โดย Malik [28] ได้รายงานว่สารสกัดจากน้ำทับทิมช่วยยับยั้งการเติบโตและชักนำอะพอพโทซิสต่อเซลล์พีซี-3 โดยการชะลอกระบวนการในวัฏจักรเซลล์ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Cyclin D1, Cyclin D2, Cyclin E, Cdk2, Cdk4 และ Cdk6 พร้อมกับชักนำการแสดงออกของโปรตีน p21 และ p27 และสารสกัดจากน้ำทับทิมยังกระตุ้นการตัดโมเลกุลโปรตีนของ PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase) inhibitors ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์พีซี-3 ซึ่งเป็นหนึ่งในกระบวนการเกิดอะพอพโทซิส และยังช่วยเพิ่มระดับการแสดงออกของ Bax และ Bak ซึ่งทั้งสองเป็นโปรตีนสำคัญเริ่มต้นในกลไกการเกิดอะพอพโทซิส (Proapoptotic proteins) ตลอดจนช่วยลดระดับการแสดงออกของ Bcl-X_L ที่เป็นโปรตีนช่วยลดการเกิดอะพอพโทซิส (Antiapoptotic protein) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของสารสกัดทับทิมที่มีต่อเซลล์บุผิวปกติ (Normal human epithelial cells) และเซลล์ต่อมลูกหมากปกติ (Normal human prostate stromal cells) เปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 พบว่า ค่า IC₅₀ ที่ทดสอบจากเซลล์บุผิวและเซลล์ต่อมลูกหมากปกติมากกว่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 ถึง 3.57 เท่า [25] และเมื่อทดสอบสารสกัดจากเปลือกทับทิมกับเซลล์เดอร์มัลไฟโบรบลาสต์ปกติ (Normal human

dermal fibroblasts) พบว่า มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตามระดับความเข้มข้นของสารสกัด [40] สอดคล้องกับเมื่อนำสารฟลาโวนอยด์ที่พบในเปลือกทับทิม เช่น อีพิกัลโลคาเทชิน แคมพ์เฟอร์อล และฟิลาโรโกนิน ไปทดสอบกับเซลล์ต่อมลูกหมากปกติ พบว่า ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ [37] ดังนั้น ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยน้ำและเอทานอลสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 ตายผ่านกระบวนการอะพอพโทซิสได้ และมีความปลอดภัยเมื่อใช้ในระดับที่เหมาะสม

งานวิจัยนี้สรุปได้ว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำและเอทานอล มีองค์ประกอบของสารพฤษเคมีที่มีศักยภาพต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพีซี-3 ผ่านการตายแบบอะพอพโทซิส โดยเฉพาะอย่างยิ่งเปลือกทับทิมซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำทับทิมสามารถนำมาเพิ่มมูลค่าทางการตลาดได้ ตลอดจนสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำยังมีศักยภาพต่อการยับยั้งอนุมูล และยับยั้งการเจริญของเซลล์พีซี-3 ทำให้ง่ายสำหรับประชาชนโดยทั่วไปในการนำเปลือกทับทิมมาใช้ประโยชน์ อย่างไรก็ตาม การศึกษาสารสกัดจากเปลือกทับทิมในอนาคต ควรจะทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลต่อเซลล์ต่อมลูกหมากปกติด้วย เพื่อจะได้อธิบายถึงประโยชน์จากการใช้สารสกัดได้ดียิ่งขึ้น ผลจากการศึกษานี้คาดหวังว่าจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพืชสมุนไพรเพื่อใช้ในการรักษาทางคลินิกในโอกาสต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณโปรแกรมชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม หน่วยงานต้นสังกัดที่ได้ให้เวลาในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Pinter O, Mucsi I, Molna J. In vitro antiproliferation in prostate cancer cell lines with cytostatics and combinations with resistance modifiers. in vivo. 2005;19:253-260.
2. Haskell CM. Principles of cancer chemotherapy. In: Cancer Treatment. 2nd ed. Haskell CM., (ed). Philadelphia: WB. Saunders. p. 21-42.
3. Ganry O. Phytoestrogens and prostate cancer risk. Prev Med. 2005;41:1-6.
4. Morton MS, Chan PS, Cheng C, Blacklock N, Matos-Ferreira A, Abranches-Monteiro L, et al. Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. Prostate. 1997;32:122-128.
5. Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S. Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. Lancet. 1993;342:1209-1210.
6. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 2005;55:74-108.
7. Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. Am J Clin Nutr. 2002;76:560-568.
8. Neuhouwer ML. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. Nutr Cancer. 2004;50:1-7.
9. Lee MM, Gomez SL, Chang JS, Wey M, Wang RT, Hsing AW. Soy and isoflavone consumption in relation to prostate cancer risk in China. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003;12:665-668.
10. Morton JF. Fruits of warm climates. 1987. Miami: FL. p. 352-355.
11. Lansky EP, Newman RA. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharmacol. 2007;109:177-206.
12. de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. J Agric Food Chem. 2000;48:5331-5337.
13. van Elswijk DA, Schobel UP, Lansky EP, Irth H, van der Greef J. Rapid dereplication of estrogen compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. Phytochemistry. 2004;65:233-241.
14. Noda Y, Kaneyuka T, Mori A, Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyaniding, and pelargonidin. J Agric Food Chem. 2002;50:166-171.
15. Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J Agric Food Chem. 2000;48:4581-4589.
16. Manasathien J, Indrapichate K, Intarapichet K. Antioxidant activity and bioefficacy of pomegranate *Punica granatum* Linn. peel and seed extracts. Global J Pharm. 2012;6(2):131-141.
17. Manasathien J, Kupittayanant S, Indrapichate K. Protective efficacy of pomegranate (*Punica granatum* Linn., Punicaceae) peel ethanolic extract on UVB-irradiated rat skin. Am-Eurasian J Toxicol Sci. 2011;3(4):250-258.
18. Hou DX, Ose T, Lin S, Harazoro K, Imamura I, Kubo M, et al. Anthocyanidins induce

- apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Int J Oncol*. 2003;23:705-712.
19. Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D, Heber D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J Agric Food Chem*. 2006;54:980-985.
 20. Kowalski I, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. Effect of kaemferol on the production and gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in J774.2 macrophages. *Pharmacological reports*. 2005;PR 57:107-112.
 21. Ackland ML, van de Waarsenburg S, Jone R. Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. *In Vivo*. 2005;19:69-76.
 22. Khan N, Hadi N, Afaq F, Syed DN, Kweon MH, Mukhtar H. Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice. *Carcinogenesis*. 2007;28:163-173.
 23. Lansky EP, Harrison G, Froom P, Jiang WG. Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. *Invest New Drugs*. 2005;23:121-122.
 24. Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs*, 2005;23:11-20.
 25. Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, Lansky EP, Gommersall LM, Patel A, et al. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J Med Food*. 2004;7:274-283.
 26. Awad AB, Fink CS. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *Journal of Nutrition*. 2000;130:2127-2133.
 27. Awad AB, Burr AT, Fink CS. Effect of resveratrol and beta-sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty acids*. 2005;72:219-226.
 28. Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:14813-14818.
 29. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidations by mean of Folin-Ciocateu reagent. *Methods. Enzymol*. 1999;299:152-178.
 30. Arnao MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem*. 2001;7:239-244.
 31. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:1231-1237.
 32. Mosmann T. Rapid colorimetric for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
 33. Manasathien J, Indrapichate K. Apoptosis of MCF-7 cancer cell induced by pomegranate

- (*Punica granatum* L.) peel extract. Suranaree J Sci Technol. 2016;21(1):63-74.
34. Widyawati PS, Budianta TDB, Kusuma FN, Wijaya EL. Differences of solvent polarity to phytochemical content and antioxidant activity of *Pluchea indica* Less leaves extracts. Int J Pharmacogn Phytochem Res. 2014;6:850-855.
35. Manasathien J. Effects of mangosteen hull extracts on bioefficacy and antiproliferation of human breast and prostate carcinoma cell lines. Suranaree J Sci Technol. 2017;24(4):475-488.
36. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. J Agric Food Chem. 2002;50:4791-4795.
37. Haddad AQ, Venkateswaran V, Viswanathan L, Teahan SJ, Fleshner NE, Klotz LH. Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2006;9:68-76.
38. Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. Oncogene. 2004;23:2850-2560.
39. Ashkenazi A, Dixit Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace AJ. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. Cancer Res. 2000;60:6101-6110.
40. Aslam MN, Lansky EP, Varani J. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. J Ethnopharmacol. 2006;103:311-318.