

บทความวิจัย (Research Article)**สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำชักนำอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเต้านม**จิรายุส วรรัตน์โกคา¹ และ จินนawat มานะเสถียร^{2*}**Pomegranate peel water extract induces apoptosis in breast cancer cells**Jirayus Woraratphoka¹ and Jinnawat Manasathien^{2*}¹ Program of Applied Biology, Faculty of Science and Liberal Arts, Rajamangala University of Technology Isan, Nakhon Ratchasima, 30000² 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(2): 42-58.*Received: 6 April 2021; Revised: 6 May 2022; Accepted: 12 May 2022***บทคัดย่อ**

มะเร็งเต้านมเป็นโรคที่พบบ่อยมากในเพศหญิง ซึ่งการรักษาทำได้ยากและมีค่าใช้จ่ายสูง พืชสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม โดยเฉพาะอย่างยิ่งทับทิมที่มีการบันทึกถึงการนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพรรักษาโรค งานวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำในหลายมุมมองที่เกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 ที่ขาดการแสดงออกของ caspase-3 โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การแตกหักของดีเอ็นเอ และการตายที่ถูกชักนำโดยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิส ได้แก่ bcl-2, procaspase-9, procaspase-7 และ poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำสามารถยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ในรูปแบบที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลา ซึ่งสังเกตได้จากการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ผ่านอะพอพโทซิส โดยอะพอพโทซิสที่เกิดขึ้นนี้เกี่ยวข้องกับการลดลงของโปรตีน bcl-2, procaspase-9 และ procaspase-7 และกระตุ้นกิจกรรมการตัดโมเลกุลของ PARP นอกจากนี้ การแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ด้วย สรุปได้ว่าสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 โดยการชักนำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ และชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ผ่านการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิส

คำสำคัญ: ทับทิม, ยับยั้งการเติบโต, การแตกหักของดีเอ็นเอ, อะพอพโทซิส, มะเร็งเต้านม¹ สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน จังหวัดนครราชสีมา 30000² สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 30000

Abstract

Breast cancer is more common in females, which this illness needs special care and treatment that makes them expensive. Medicinal plants, especially pomegranates, offer another choice to deal with the impacts of critical illnesses with lower costs of the treatment, which the utilization have been documented in traditional medicine. In this research, pomegranate peel water extract (PWE) was explored for many perspectives associating with the caspase-3-deficient MCF-7 breast cancer cells, particularly on the antiproliferative effects, DNA fragmentation, and apoptotic protein-induced cell death such as bcl-2, procaspase-9, procaspase-7, and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). The result found that PWE could inhibit the MCF-7 cell proliferation in a dose- and time-dependent manner, which was seen from an induction of antiproliferation on MCF-7 cells via apoptosis. This apoptosis correlated with the reductions of bcl-2, procaspase-9, and procaspase-7, and the activation of cleaved-PARP molecule activity. Moreover, these protein expressions associated with morphological change and DNA fragmentation in the MCF-7 cells. In conclusion, the PWE showed an inhibitory effect on proliferation of MCF-7 breast cancer cells by inducing DNA fragmentation and apoptosis through the expression of influencing apoptotic proteins.

Keywords: Pomegranate, Antiproliferation, DNA fragmentation, Apoptosis, Breast cancer

บทนำ

มะเร็งเต้านมพบเป็นสาเหตุการเสียชีวิตมากเป็นอันดับสองของเพศหญิงที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง [1] และพบว่าเพศหญิงในทวีปเอเชียมีแนวโน้มการเป็นมะเร็งเต้านมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับเพศหญิงในแถบตะวันตก โดยมีสาเหตุสำคัญมาจากการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการดำรงชีวิต และอาหารที่ได้รับอยู่เป็นประจำของประชากร [2] และอาจมีสาเหตุมาจากปัจจัยต่าง ๆ ของแต่ละบุคคลที่มีอิทธิพลต่อการพัฒนาการของโรค เช่น พันธุกรรม อายุ ระดับของฮอร์โมน และระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น การรักษาโรคมะเร็งทางการแพทย์ในปัจจุบันมีหลายวิธี ได้แก่ การผ่าตัด การใช้รังสี การใช้สารเคมีบำบัด และการใช้หลายวิธีร่วมกันในการรักษา ขึ้นอยู่กับพยาธิสภาพของโรคและสภาพร่างกายของผู้ป่วย [3], [4] โดยวิธีการรักษาจากการใช้สารเคมีบำบัดเป็นวิธีที่เข้าถึงพื้นที่เติบโตของเซลล์มะเร็งได้รวดเร็วหลังจากได้รับสารเคมีสังเคราะห์ตามขนาดและจำนวนครั้งที่ให้ ดังนั้น สารจากธรรมชาติหลายชนิดจึงมีโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและยับยั้งการพัฒนาของโรคมะเร็งได้ [5] มีรายงานว่าสารสกัดจากพืชหลายชนิดที่เป็นที่รู้จักกันดีของประเทศไทย เช่น

จิกน้ำ ตั้วขน และผักแขยง [6] หรือสารสกัดจากเปลือกผลไม้ เช่น มังคุด [7] ต่างมีฤทธิ์ช่วยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ ทำให้ปัจจุบันประชากรส่วนใหญ่ทั่วโลกต่างหันมานิยมรับประทานพืชผักและผลไม้ชนิดต่าง ๆ เพื่อช่วยส่งเสริมสุขภาพร่างกายให้แข็งแรงและช่วยป้องกันการเกิดโรคมะเร็งกันมากขึ้น

ทับทิม (pomegranate) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Punica granatum* Linn. อยู่ในวงศ์ Punicaceae เป็นพืชพื้นเมืองที่มีต้นกำเนิดจากเอเชียกลางบริเวณประเทศอิหร่านและอัฟกานิสถาน ก่อนแพร่กระจายไปสู่แถบเมดิเตอร์เรเนียน และสู่ภูมิภาคตะวันออกของทวีปเอเชีย ปัจจุบันมีการนำทับทิมมาปลูกเพื่อใช้ผลทับทิมเป็นผลไม้ทางการค้าในหลายประเทศ เช่น อินเดีย จีน ญี่ปุ่น และไทย [8], [9] และหลายประเทศยังนิยมนำส่วนประกอบของทับทิม ได้แก่ น้ำทับทิม ราก เปลือกลำต้น เปลือกผล และเมล็ด มาใช้เป็นพืชสมุนไพรเพื่อรักษาอาการต่าง ๆ เช่น แก้อาการจุกเสียด อาการทางลำไส้ แก้อท้องร่วง แก้อบิด ขับระดู ขับพยาธิ คลายกล้ามเนื้อ ขับลม ขับปัสสาวะ และขับน้ำนม เป็นต้น [10], [11] ซึ่งทับทิมมีองค์ประกอบของฟีนอล (phenols) และโพลีฟีนอล (polyphenols) หลายกลุ่ม เช่น

กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acids) กรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids) กรดเอลลาจิก (ellagic acid) ฟลาแวน-3-อล (flavan-3-ols) ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาโวน (flavones) แอนโทไซยานิน (anthocyanins) แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) และเอลลาจิทนิน (ellagitannins) [9], [12], [13] โดยพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม มีปริมาณของสารพฤกษเคมี (phytochemicals) มากกว่า และสามารถพบสารพฤกษเคมีสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และเอลลาจิทนินหลายชนิดที่ไม่พบจากส่วนอื่นของทับทิม ได้แก่ แคมพ์เฟอรอล (kaempferol) ไซยานิดิน (cyanidin) รูทีน (rutin) ลูทีโอลิน (luteolin) เดลฟินิดิน (delphinidin) เปลาร์โกนิน (pelargonidin) พุนิคาลิน (punicalin) พุนิคาลาจิน (punicalagin) พีตุนคูลาจิน (pedunculagin) คาสูารินิน (casuarinin) เทลลิมาแกรนดิน (tellimagrandin) แกลลาจิลไดแลคตอน (gallagylidilacton) และกรานาติน (granatin) [13-17]

มีรายงานพบว่าเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity) โดยสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใกล้เคียงกับคาเทชิน (catechin) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานเมื่อทดสอบโดยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical method) และวิธี FRAP (ferric reducing antioxidant power assay) และสารสกัดยังมีผลช่วยลดความเสียหายของผิวหนังหนุแรทหลังจากได้รับแสงยูวีบี (UVB; ultraviolet B) [18-19] และสารจากทับทิมยังสามารถมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งต่อมลูกหมากสายพันธุ์ PC-3, LnCap และ DU-145 [20-22] มะเร็งปอดสายพันธุ์ A549 [23] มะเร็งลำไส้สายพันธุ์ HT-29 และ HCT116 [24], [25] และมะเร็งเต้านมสายพันธุ์ MDA-MB-231, MDA-MB-435 และ MCF-7 [26], [27] โดยกรดเอลลาจิกและเอลลาจิทนินที่พบในสารสกัดเปลือกทับทิมมีผลชักนำเซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2 ให้เกิดอะพอพโทซิส (apoptosis) ได้ [28]

อะพอพโทซิสเป็นกระบวนการทำลายตัวเองของเซลล์อย่างเป็นระบบ เป็นกลไกสำคัญที่เกิดขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการรักษาภาวะสมดุลในการดำรงชีวิต

ของเซลล์ ในกระบวนการเกิดอะพอพโทซิสมีการประสานงานร่วมกันกับเอนไซม์หลายชนิด โดยเฉพาะ caspases ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นกลุ่มของเอนไซม์พวก cysteine proteases ได้แก่ caspase-2, caspase-8, caspase-9, caspase-10, caspase-11 และ caspase-12 ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่ย่อยสารตั้งต้นและชักนำให้เกิดอะพอพโทซิส โดยมี procaspases ซึ่งยังไม่พร้อมทำงาน จัดเป็นโมเลกุลเบื้องต้นของ caspases เมื่อ procaspases ถูกกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็น caspases ที่พร้อมทำหน้าที่ ทำให้ปริมาณของ procaspases ภายในเซลล์มีระดับลดลง เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสจะแสดงคุณลักษณะที่สำคัญบางประการ เช่น การรวมตัวอัดแน่นของโครมาติน (chromatin condensation) การแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) และการตัดโมเลกุลโปรตีนของ poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) ที่เป็นเอนไซม์สำหรับใช้ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตาม ภายในเซลล์ยังมีโปรตีนบางชนิดที่มีบทบาทในการยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิส และสนับสนุนการรอดชีวิตของเซลล์ ได้แก่ bcl-2 ดังนั้น เมื่อเซลล์ที่จะเข้าสู่กระบวนการของอะพอพโทซิส ปริมาณของ bcl-2 ภายในเซลล์จะมีระดับที่ลดน้อยลง [29-31] สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้อ้างอิงว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยเอทานอลมีผลชักนำให้เซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 (MCF-7) ให้เกิดอะพอพโทซิสผ่านการลดปริมาณของโมเลกุล procaspase-9, procaspase-7 และ bcl-2 ภายในเซลล์ และยกระดับการตัดโมเลกุล PARP ให้เพิ่มมากขึ้น [32] และยังมีรายงานว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยน้ำมีปริมาณสารฟีนอลิก (phenolics) และฟลาโวนอยด์ คิดเป็น 0.84 และ 0.67 เท่า ของสารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยเอทานอล และมีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH และวิธี FTC (ferric thiocyanate assay) ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่า สารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 อีกด้วย [33]

จากรายงานข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยน้ำมีสารพฤกษเคมีเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูง มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ใกล้เคียงกับสารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยเอทานอล และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 ด้วย อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานผลของสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำต่อการชักนำให้เซลล์มะเร็งเต้านมตายผ่านกระบวนการอะพอพโทซิส นอกจากนี้ หากการสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำสามารถมีฤทธิ์ต่อการชักนำการตายผ่านกระบวนการอะพอพโทซิส จะช่วยให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการสกัดตลอดจนประชาชนทั่วไปสามารถประยุกต์เตรียมสารสกัดด้วยตนเองได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารสกัดเปลือกทับทิมที่สกัดด้วยน้ำที่มีผลต่อการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 ผ่านการตายแบบอะพอพโทซิส โดยศึกษาจากการแตกหักของดีเอ็นเอ และระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะพอพโทซิส ได้แก่ procaspase-9, procaspase-7, PARP และ bcl-2 ซึ่งความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำในทางเภสัชต่อการป้องกันโรคมะเร็งเต้านมต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

Dulbecco's modified Eagle's medium: nutrient mixture F-12 (DMEM/F12), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin และ resazurin จำหน่ายโดย GIBCO, Thermo Fisher Scientific Corporation (Waltham, MA, USA), 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-denzyl tetrazolium bromide (MTT) และ Hoechst 33342 จำหน่ายโดย Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific Corporation (Waltham, WI, USA), agarose ได้มาจาก Promega Corporation (Madison, USA), ethidium bromide ได้จาก Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA), RNaseA ได้จาก Amresco (Solon, OH, USA), DNA ladder และ Genomic DNA extraction kit ได้จาก RBC Bioscience Corp. (Taipei, Taiwan), monoclonal antibodies (cleaved PARP-1: sc-56196, procaspase-9: sc-70505, procaspase-7: sc-28295,

bcl-2: sc-7382 และ actin: sc-8432), secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005), chemiluminescent substrate และ CL-XPosure film ได้จาก Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) และสารเคมีอื่น ๆ นอกจากนี้ที่ใช้ในการศึกษา เป็นเกรดคุณภาพสำหรับใช้ในการวิเคราะห์

การเตรียมสารสกัดทับทิม

ทับทิมที่ใช้ในการศึกษาเป็นผลสุกทับทิมไทยที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดสระบุรี และได้ถูกจำแนกตามตัวอย่างพืชหมายเลข 080252 ของหอพรรณไม้กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช เริ่มจากนำผลทับทิมมาล้างทำความสะอาด คัดแยกเฉพาะส่วนเปลือกของผลทับทิมก่อนนำเข้าตู้อบ นำเปลือกแห้งมาบดให้ละเอียด จากนั้นนำผงเปลือกทับทิมไปสกัดด้วยซอกเลต (soxhlet extraction) โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย การสกัดใช้ระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman no.1) จากนั้นนำมาทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilization) สารสกัดแห้งนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาใช้ทำการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม

เซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 (human breast cancer MCF-7 cells) จากสถาบัน American Type Culture Collection (ATCC) นำมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารชนิด Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) ที่มี fetal bovine serum (FBS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และยาปฏิชีวนะ เพนิซิลลิน/สเตรปโตมัยซิน (penicillin/streptomycin) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในตู้บ่มภายใต้คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 - 3 วัน ก่อนนำมาใช้งาน

ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยวิธี MTT

สาร 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ที่ใช้วัดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 โดยอาศัยหลักการของการเปลี่ยนแปลงสีจากสีเหลือง

ของสารละลาย MTT สู่สีม่วงของฟอร์มazan (formazan) ซึ่งเกิดจากกระบวนการของเอนไซม์ภายในเซลล์ที่มีชีวิต โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงบ่งชี้ถึงเซลล์ที่มีชีวิตที่มีจำนวนลดลง [34] เซลล์ได้รับการเพาะเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงชนิด 96 ช่อง (96-well plate) ให้แต่ละช่องมีเซลล์จำนวน 10,000 เซลล์/ช่อง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่เติมส่วนประกอบต่าง ๆ สมบูรณ์ และนำไปบ่มในตู้บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารสกัดเพื่อทดสอบด้วยน้ำที่ใส่ทดสอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ โดยกลุ่มควบคุมใช้ dimethyl sulfoxide เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการทดสอบให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในภาชนะออก และแทนที่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 400, 500 และ 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ก่อนนำไปบ่มในตู้บ่ม และนำมาตรวจสอบหลังจากทดสอบเป็นระยะเวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ในการตรวจสอบให้ดูดสารสกัดในอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ก่อนแทนที่ด้วยสารละลาย MTT (เข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/ช่อง และนำไปบ่มต่อเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย MTT ทั้ง และเติม dimethyl sulfoxide เข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร/ช่อง จากนั้นนำภาชนะเพาะเลี้ยงไปเขย่าบนเครื่องสั่นเพื่อละลายผลึกสีม่วงที่ตกตะกอนอยู่ และนำไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ก่อนนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต (percent of cell viability) และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% inhibitory concentration; IC₅₀)

ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยวิธีซาซุริน

สารริซาซุริน (resazurin) ที่ใช้วัดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยอาศัยหลักการของการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงของสารละลายริซาซุรินสู่สีแดงของสารละลายริโซรูฟีน (resorufin) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยารีดักชันที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมของเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงบ่งชี้ถึงเซลล์ที่มีชีวิตที่มีจำนวนลดลง [35] เซลล์เพาะเลี้ยงใน

ภาชนะเพาะเลี้ยงชนิด 96 ช่อง มีความหนาแน่นเท่ากับ 10,000 เซลล์/ช่อง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่เติมส่วนประกอบต่าง ๆ สมบูรณ์ นำไปบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารสกัดทดสอบความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อทำการทดสอบให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในภาชนะออก และแทนที่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 400, 500 และ 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่ม และนำมาตรวจสอบหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ในการตรวจสอบให้ดูดสารสกัดในอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ก่อนแทนที่ด้วยสารละลายริซาซุริน (เข้มข้น 100 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ของ DMEM/F-12 ที่ไม่ใส่ FBS) นำไปบ่มต่อเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ก่อนนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀)

การแตกหักของดีเอ็นเอเซลล์มะเร็งเต้านม

เซลล์มะเร็งเต้านมที่ใช้ทดสอบเพาะเลี้ยงในภาชนะชนิด T75 (T75 flask) โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.4×10^6 เซลล์/ภาชนะ เมื่อเริ่มทดสอบให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมสารสกัดเพื่อทดสอบระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ลงในภาชนะเพาะเลี้ยง นำไปบ่มต่อในตู้เพาะเลี้ยง และนำมาตรวจสอบหลังจากทดสอบเป็นระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาทำการเก็บเซลล์นำไปปั่นเหวี่ยง ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และนำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นทำการสกัดแยกดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งเต้านมโดยใช้ชุดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA extraction kit) เติม RNaseA (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ลงในตัวอย่างทดสอบ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที นำดีเอ็นเอที่ตกตะกอนไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 3 นาที ก่อนนำไปชะล้างด้วยบัฟเฟอร์ (elution buffer) ตัวอย่างดีเอ็นเอบริสุทธิ์เจือจางในบัฟเฟอร์ (Tris-HCl EDTA buffer) และนำไปหาปริมาณความเข้มข้นของแต่ละตัวอย่าง จากนั้นทำการตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)

กำหนดปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 2 ไมโครกรัม/ช่อง ให้เกิดการแยกดีเอ็นเอในเจลอะกาโรส (1% agarose gel) เป็นระยะเวลา 90 นาที นำแผ่นเจลอะกาโรสไปตรวจสอบภายใต้แสงยูวีฟลูออเรสเซนต์ (UV fluorescent light) และบันทึกภาพ

การแสดงออกของโปรตีนของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยวิธี Western blotting

เซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงในภาชนะชนิด T75 ให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.4×10^6 เซลล์/ภาชนะ เมื่อเริ่มทดสอบให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมน้ำสกัดเปลือกหุ้มที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของอาหารเลี้ยงเซลล์ ลงในภาชนะเพาะเลี้ยง นำไปปั่นต่อในตู้เพาะเลี้ยง และนำมาตรวจสอบหลังจากทดสอบเป็นระยะเวลา 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการเก็บเซลล์และล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ ก่อนทำให้เซลล์แตกใน RIPA บัฟเฟอร์ (radioimmunoprecipitation assay buffer) เป็นระยะเวลา 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 10 นาที นำโปรตีนที่ได้จากเซลล์ไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธี Bradford [36] โปรตีนของแต่ละตัวอย่าง 30 ไมโครกรัม ถูกนำไปแยกโปรตีนบน sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (12% SDS-PAGE) ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นระยะเวลา 90 นาที ก่อนนำมาทำการย้ายโปรตีนจากแผ่นเจล SDS-PAGE ไปยังแผ่นเมมเบรน poly vinylidene difluoride (PVDF) ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 นาที นำแผ่นเมมเบรน PVDF ไปแช่ใน 2% (w/v) bovine serum albumin ใน Tween20-Tris buffered saline (TTBS) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 60 นาที นำแผ่นเมมเบรน PVDF ไปบ่มด้วย first antibodies ของ anti-mouse monoclonal antibodies ได้แก่ PARP (เจือจาง 1 : 500), procaspase-9 (เจือจาง 1 : 500), procaspase-7 (เจือจาง 1 : 1,000), bcl-2 (เจือจาง 1 : 1,000) และ actin (เจือจาง 1 : 500) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำแผ่นเมมเบรน PVDF ไปล้างด้วย TTBS และนำไปบ่มด้วย secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody)

ที่เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 20,000 เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง และนำมาล้างด้วย TTBS จากนั้นตรวจหาแถบโปรตีนโดยเติมสาร Super Signal West Pico chemiluminescent substrate ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5 นาที แถบโปรตีนได้รับการบันทึกภาพลงบนฟิล์ม CL-XPosure ในห้องมืด [37]

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลจากการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of mean) ความแตกต่างค่าเฉลี่ยหลายกลุ่มทดสอบใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ละคู่ใช้วิธีเปรียบเทียบพหุคูณแอลเอสดี (least-significant different; LSD) ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันใช้การวิเคราะห์ทีเทสต์ (t-test) ระดับนัยสำคัญที่ใช้ในการทดลองระบุที่ 0.05 ($p < 0.05$)

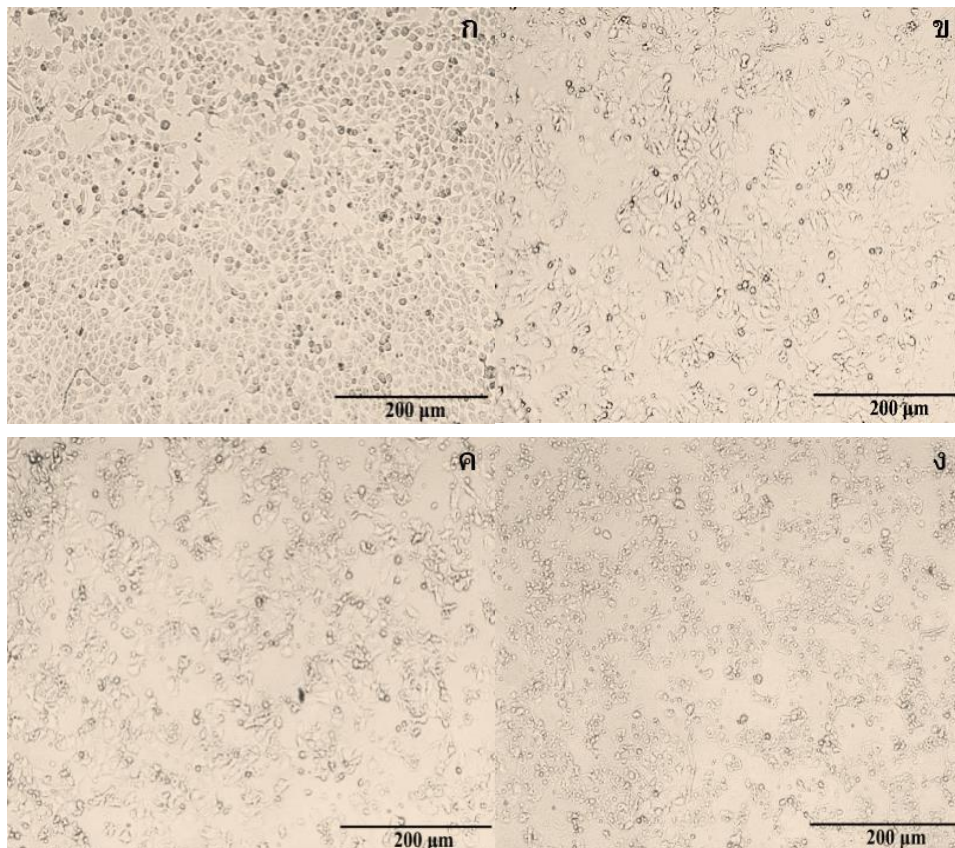
ผลการศึกษา

ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเปลือกหุ้มด้วยน้ำที่มีต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 เมื่อให้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 300 - 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในภาชนะเพาะเลี้ยงลดน้อยลง และมีลักษณะรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ 1) และเมื่อตรวจสอบผลของสารสกัดความเข้มข้น 400, 500 และ 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT และรีซาชูริน หลังจากการให้สารสกัดเป็นระยะเวลา 6 - 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 โดยฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตาราง 1) เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) พบว่า การทดสอบด้วยวิธี MTT มีค่า IC_{50} ที่

เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เท่ากับ $1,004.35 \pm 66.70$, 513.73 ± 23.19 , 481.33 ± 21.79 และ 459.90 ± 15.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบวิธีรีซาซูลิน มีค่า IC_{50} ที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เท่ากับ $1,175.80 \pm 55.39$, $1,044.10 \pm 42.69$, 660.60 ± 20.51 และ 589.45 ± 16.21 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตามลำดับ (ตาราง 1) เมื่อนำค่า IC_{50} จากการทดสอบทั้งสองวิธี ที่ระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง มาเปรียบเทียบกัน พบว่า ค่า IC_{50} ที่ได้จากวิธี MTT แสดงฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากวิธีรีซาซูลิน



ภาพ 1 การเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-1 หลังจากได้รับสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกภาพภายใต้กำลังขยาย 40 เท่า ภาพ 1 ก เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ที่ไม่ได้รับสารสกัด (กลุ่มควบคุม) และ ภาพ 1 ข - ง เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 300, 400 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ตาราง 1 เปอร์เซนต์ของเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 ที่มีชีวิต เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT และรีซาชูริน หลังได้รับสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำความเข้มข้นต่าง ๆ และความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเซลล์เพิ่มจำนวนที่มีชีวิตได้ 50 เปอร์เซนต์ (IC_{50}) เป็นระยะเวลา 6 - 24 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม)	เปอร์เซนต์ของเซลล์ที่มีชีวิต			
		6 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
MTT	400	93.17 ± 2.26 ^ข	67.03 ± 1.50 ^ก	62.93 ± 7.24 ^ก	69.71 ± 1.08 ^ก
	500	88.57 ± 2.62 ^{กข}	50.25 ± 2.42 ^ข	39.67 ± 2.19 ^ข	30.18 ± 4.36 ^ข
	600	83.30 ± 3.00 ^ก	32.02 ± 5.97 ^ก	23.66 ± 0.64 ^ก	20.68 ± 1.28 ^ก
IC_{50}		1,004.35 ± 66.70	513.73 ± 23.19*	481.33 ± 21.79*	459.90 ± 15.90*
รีซาชูริน	400	90.08 ± 4.14	92.96 ± 1.03 ^ข	94.58 ± 4.24 ^ก	93.07 ± 0.77 ^ก
	500	82.17 ± 4.96	90.24 ± 1.26 ^{กข}	81.03 ± 1.66 ^ข	87.58 ± 1.22 ^ข
	600	78.30 ± 4.99	81.37 ± 1.50 ^ก	61.12 ± 2.09 ^ก	54.73 ± 2.17 ^ก
IC_{50}		1,175.80 ± 55.39	1,044.10 ± 42.69	660.60 ± 20.51	589.45 ± 16.21

พยัญชนะ (^{ก, ข และ ก}) ที่ต่างกันในสัณฐานของแต่ละวิธีทดสอบ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตในแต่ละความเข้มข้น จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบพหุคูณ และดอกจัน (*) แสดงความแตกต่างของความเข้มข้นที่มีผลยับยั้งเซลล์เพิ่มจำนวนที่มีชีวิตได้ 50 เปอร์เซนต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างวิธีทดสอบ MTT และรีซาชูริน ที่ระยะเวลา 6 - 24 ชั่วโมง จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างสองกลุ่ม

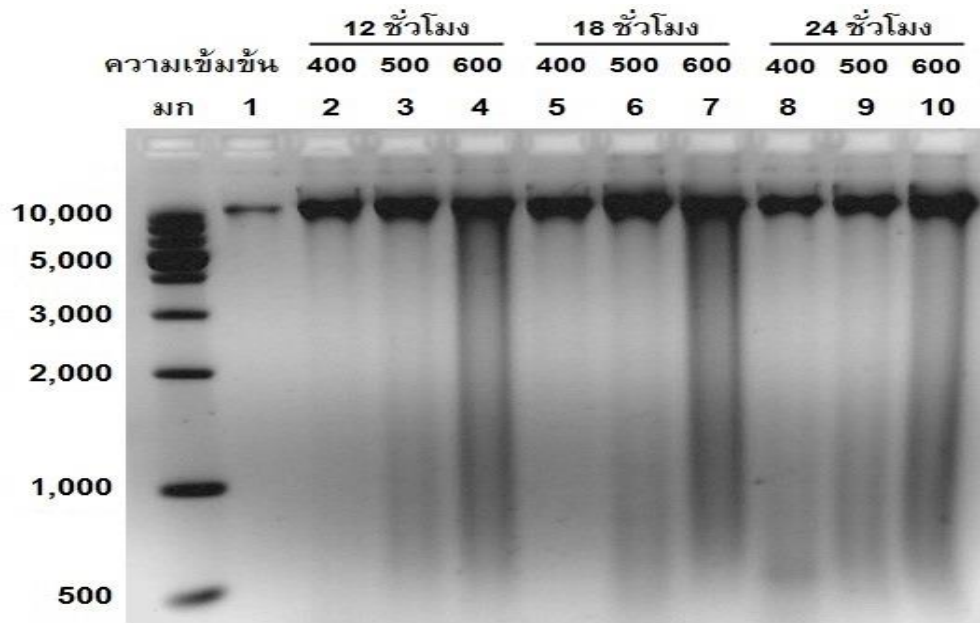
ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการแตกหักของดีเอ็นเอ

เอ

เซลล์มะเร็งเต้านม

ในการศึกษาการแตกหักของดีเอ็นเอสามารถพิจารณาได้จากลักษณะที่ปรากฏบนแผ่นเจลอะกาโรส จากการศึกษพบว่า สารสกัดจากเปลือกทับทิมเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้น มีผลชักนำให้เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนลดลง (ภาพ 1 ข – ง) หลังจากได้รับสารเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และมีเปอร์เซนต์

ของเซลล์ที่มีชีวิตลดลง ซึ่งแปรผันโดยตรงกับระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (ตาราง 1) สอดคล้องกับการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 ที่เพิ่มขึ้น เมื่อได้รับสารสกัดในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ 2) โดยมีการแตกหักของดีเอ็นเอมากที่สุดเมื่อให้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในทุกช่วงเวลา (12 - 24 ชั่วโมง)

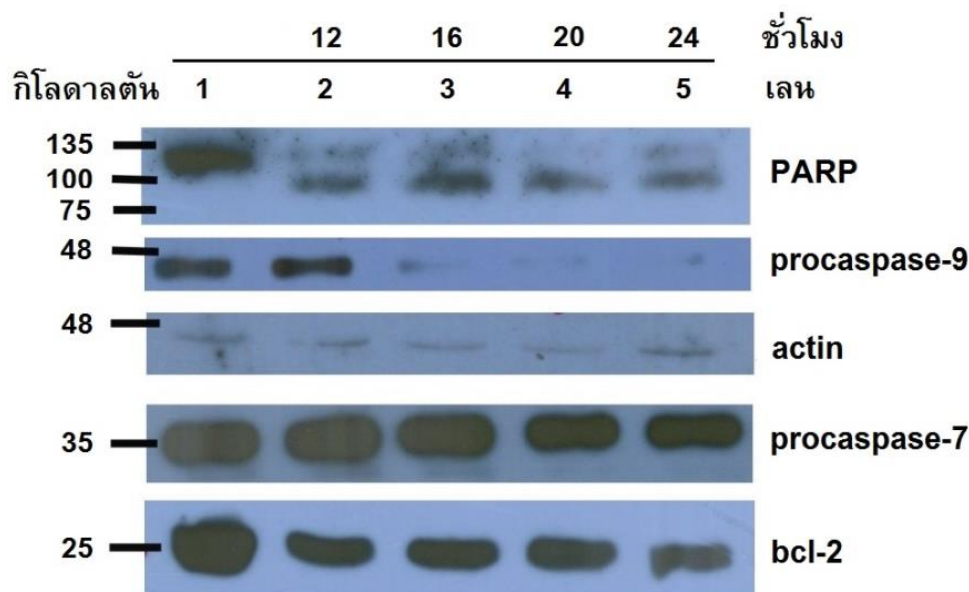


ภาพ 2 การแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 ที่ได้รับสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 12 - 24 ชั่วโมง ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ 10,000 bp (เลน มก) เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ที่ไม่ได้รับสารสกัด (เลนที่ 1) และเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 400 - 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (เลนที่ 2 - 4) 18 ชั่วโมง (เลนที่ 5 - 7) และ 24 ชั่วโมง (เลนที่ 8 - 10)

ฤทธิ์ของสารสกัดต่อกิจกรรมของโปรตีนในการตายแบบอะพอพโทซิส

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 ที่ได้รับสารสกัดเปลือกทับทิมเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพ 1 ง) และความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิมที่ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ด้วยวิธี MTT ที่ระยะเวลา 12 - 24 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 513.73 - 459.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตาราง 1) เป็นเหตุให้ผู้วิจัยเลือกใช้สารสกัดเปลือกทับทิมความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา

12 - 24 ชั่วโมง ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อกิจกรรมของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 โดยมี actin เป็นโปรตีนควบคุมการไหลให้แต่ละเลนมีมาตรฐานเดียวกันในการทดสอบด้วยวิธี Western blotting จากการศึกษาพบว่า สารสกัดสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอะพอพโทติกโปรตีนของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ 3) โดยโปรตีน bcl-2, procaspase-9 และ procaspase-7 ของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 มีกิจกรรมลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่โปรตีน PARP ของเอ็มซีเอฟ-7 มีการสูญเสียสภาพตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (ภาพ 3)



ภาพ 3 การแสดงออกของโปรตีน PARP, procaspase-9, procaspase-7 และ bcl-2 ของเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 ที่ได้รับสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาต่าง ๆ เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ที่ไม่ได้รับสารสกัด (เลนที่ 1) และเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ที่ได้รับสารสกัดที่ระยะเวลา 12 - 24 ชั่วโมง (เลนที่ 2 - 5)

วิจารณ์

ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อให้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น (ภาพ 7 และตาราง 7) สอดคล้องกับรายงานที่แสดงถึงฤทธิ์ของทับทิมต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมสายพันธุ์ MDA-MB-231, MDA-MB-435 และเอ็มซีเอฟ-7 [26, 27] เห็นได้ว่าสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำมีส่วนประกอบของสารพฤกษเคมีจำนวนมาก โดยสารสกัดที่ใช้ทดสอบในการทดลองนี้ ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ที่พบในสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำและเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ มาก่อนแล้ว [33] โดยสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณของฟีนอลิกเท่ากับ 380.54 ± 5.87 ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิก/มิลลิกรัมสารสกัด และมีปริมาณของฟลาโวนอยด์เท่ากับ 26.04 ± 0.93 ไมโครกรัมสมมูลคาเทชิน/มิลลิกรัมสารสกัด ซึ่งปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ได้คิดเป็น 84.64 และ 67.74 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำยังสามารถยับยั้งการ

แบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 ได้อีกด้วย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 471.80 ± 4.37 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT หลังได้รับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง [33] และสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT [32] สอดคล้องกับผลที่ได้รายงานในการศึกษาครั้งนี้ (ตาราง 1) Manasathien และ Indrapichate [32] ยังได้รายงานว่าสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ชักนำการตายของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ผ่านกระบวนการอะพอพโทซิส โดยฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 อาจเกี่ยวข้องกับสารฟีนอลิกต่าง ๆ ที่พบในเปลือกทับทิม ได้แก่ กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดไฮดรอกซีซินนามิก ฟลาแวน-3-อล ฟลาโวนอล ฟลาโวน แอนโทไซยานิน แอนโทไซยานิดิน และเอลลาจิกแทนนิน [9, 12, 13] ที่ออกฤทธิ์ช่วยเสริมกันยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งมีรายงานยืนยันถึงบทบาทของฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ ในเปลือกทับทิมช่วยเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม [38] นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาผลของสารสกัดทับทิมที่มีต่อเซลล์เดอร์มัลไฟโบรบลาสต์ปกติ (Normal human dermal fibroblasts) พบว่า ไม่แสดง

ความเป็นพิษ และมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ ตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ให้ [39] ดังนั้น ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 และมีความปลอดภัยเมื่อใช้ในระดับที่เหมาะสม

หนึ่งในลักษณะสำคัญของกระบวนการเกิดอะพอพโทซิส ได้แก่ การแตกหักของดีเอ็นเอ ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำสามารถชักนำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอภายในเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 ในรูปแบบสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้น (ภาพ 2) มีรายงานว่าสารแอนโทไซยานิน กรดเอลลาจิก ฟีนอลาจีน และเอลลาจิกแทนนิน ซึ่งเป็นสารที่พบในเปลือกทับทิม มีบทบาทชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสกับเซลล์มะเร็ง HT-29, HT-115, HCT-116 และ Caco-2 [25], [28], [40] อย่างไรก็ตาม เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญของกระบวนการเกิดอะพอพโทซิส เนื่องจากกิจกรรมของ caspase-3 ชักนำให้โครมาตินมีการรวมตัวอัดแน่น ตัดโครงสร้างโมเลกุล PARP และเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ [41] ดังนั้น การแตกหักของดีเอ็นเอเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 อาจเกิดจากโมเลกุลโปรตีนอื่นที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ โดยมีรายงานว่า นอกจาก caspase-3 แล้ว ยังมี caspase-7 ที่สามารถชักนำให้ดีเอ็นเอเกิดการแตกหักได้ ซึ่งทั้ง caspase-3 และ caspase-7 มีผลลดกิจกรรมของ ICAD (Inhibitor of caspase-3 activated DNase) ทำให้ช่วยสนับสนุนการแตกหักของดีเอ็นเอได้ [42] นอกจากนี้ PARP ยังมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นเอนไซม์เพื่อใช้ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหาย ซึ่งความสามารถในการทำหน้าที่ซ่อมแซมของ PARP จะสูญเสียไปในการเกิดอะพอพโทซิส เนื่องจาก caspases ที่มีบทบาทเป็นเอนไซม์เช่นเดียวกันจะไปตัดโครงสร้างของ PARP ที่เป็นซับสเตรตของ caspase-3 และ caspase-7 [43] ซึ่งเมื่อเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ได้รับสารสกัดด้วยน้ำ แสดงให้เห็นถึงการตัดโครงสร้างของ PARP ทำให้มีการแสดงออกลดลงเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลา (ภาพ 3) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง PARP ที่เกิดขึ้นนี้เป็นลักษณะสำคัญทาง

ชีวเคมีที่บ่งชี้ถึงกิจกรรมของ caspase-7 ที่นำไปสู่การแตกหักของดีเอ็นเอ และการเกิดอะพอพโทซิส สอดคล้องกับที่มีรายงานว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้มีการตัดโครงสร้างของ PARP ทำให้ PARP มีระดับการแสดงออกลดลง และนำไปสู่การแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 [32] ดังนั้น ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยน้ำมีฤทธิ์ชักนำการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 ซึ่งเป็นหนึ่งในกลไกการเกิดอะพอพโทซิส

ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นถึงบทบาทของสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 12 - 24 ชั่วโมง สารสกัดสามารถชักนำให้กิจกรรมของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิสภายในเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-4 เปลี่ยนแปลงไป เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ 3) เซลล์ปกติโดยทั่วไป การแสดงออกของ *bax* gene เป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญในการชักนำให้เกิดอะพอพโทซิส โดยโปรตีน *bax* ที่อยู่ในไซโทซอลเมื่อถูกกระตุ้นจะเปลี่ยนโครงสร้าง และเคลื่อนที่ไปยังเมมเบรนของไมโทคอนเดรีย ทำให้เมมเบรนสูญเสียศักย์ภาพ และโปรตีน *bax* ยังมีผลในการยับยั้งการทำงานของ *bcl-2* gene ด้วย [44] ดังนั้น หากมีการแสดงออกของโปรตีน *bax* ในระดับสูงจึงมีผลทำให้การแสดงออกของโปรตีน *bcl-2* ลดน้อยลง อย่างไรก็ตาม เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 มีการแสดงออกของโปรตีน *bax* ต่ำ เนื่องจากเซลล์ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญในขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอในกระบวนการเกิดอะพอพโทซิส และเมื่อเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอจึงไปมีผลต่อ *p53* gene ให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และโปรตีน *p53* จึงไปมีผลต่อโครงสร้างของ *bax* ในไซโทซอล [41], [45], [46] ทำให้เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ที่มีระดับของโปรตีน *bax* ต่ำ จึงมีการแสดงออกของโปรตีน *bcl-2* ในระดับสูง และขัดขวางการเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์ [44] คล้ายกับเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ส่วนใหญ่ที่มีโปรตีน *bcl-2* อยู่ในระดับสูง เนื่องจาก *bcl-2* มีบทบาทช่วยสนับสนุนให้เซลล์อยู่รอด และยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิส ในขณะที่โปรตีน *bax* มีบทบาทช่วยเร่งให้เกิดอะพอพโทซิส [31] มีรายงานว่า Tumor

necrosis factor- α และอีพิแกลโลคาเทชินแกลเลท (epigallocatechin-3 - gallate; EGCG) ชัก นำให้ reactive oxygen species (ROS) มีระดับสูงขึ้น และลดศักยภาพของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ซึ่งเกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 [47, 48] ในการตอบสนองต่อความเสียหายหรือความกดดันที่รุนแรง โปรตีน bax จะเคลื่อนที่ออกจากพื้นผิวไมโทคอนเดรีย และทำให้โปรตีน bcl-2 สูญเสียบทบาทหน้าที่ เหตุการณ์ลักษณะเช่นนี้จะนำไปสู่การสูญเสียศักยภาพของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย และมีการไหลทะลักของไซโทโครมซี (cytochrome c) ออกจากไมโทคอนเดรีย [49] ดังนั้น เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ที่ได้รับสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำจึงลดการแสดงออกของโปรตีน bcl-2 ตามระยะเวลาการทดสอบที่เพิ่มขึ้น (ภาพ 3) และทำให้มีการตายของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 เพิ่มมากขึ้น (ตาราง 1) สอดคล้องกับที่มีรายงานว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ลดการแสดงออกของโปรตีน bcl-2 และชักนำให้เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ตายแบบอะพอพโทซิส [32] มีหลายรายงานยืนยันว่าสารพฤษเคมีจากทับทิมชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ผ่านการเพิ่มกิจกรรมของ bax และลดการแสดงออกของ bcl-2 ในเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่น เซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2 มะเร็งปอด A549 lung มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 และมะเร็งเต้านม MDA-MB-435 เป็นต้น [23], [27], [28], [50]

จากการสูญเสียศักยภาพของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ทำให้เกิดการรั่วไหลของไซโทโครมซีจากไมโทคอนเดรีย ซึ่งไซโทโครมซีจะไปมีกิจกรรมกับ apoptosis protease activating factor 1 (apaf-1) จากนั้นมีกิจกรรมร่วมกับ procaspase-9 เกิดเป็นโมเลกุลของอะพอพโทโซม (apoptosome) โดยอะพอพโทโซมเป็นโมเลกุลสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมของโปรตีน caspase-3, caspase-6 และ caspase-7 และเกิดกระบวนการเพื่อดำเนินไปสู่การตายแบบอะพอพโทซิส [51, 52] มีรายงานการทดสอบกรดเอลลาจิก เอลลาจแทนนิน โปรแอนโทไซยานิดิน และอีพิแกลโลคาเทชินแกลเลท กับเซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2 มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 และมะเร็งเต้านม MDA-MB-231 พบว่า สารเหล่านี้มีฤทธิ์ชักนำ

เซลล์มะเร็งให้เกิดอะพอพโทซิสจากช่องทางการกระตุ้นกิจกรรมของ caspase-9 [27], [28], [50] โดยเอลลาจิกแทนนิน และอีพิแกลโลคาเทชินแกลเลทสามารถชักนำเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ให้เกิดอะพอพโทซิสผ่านตัวเริ่มต้นของ caspase-9 [28], [47] สอดคล้องกับที่มีรายงานว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้โปรตีน procaspase-9 มีการแสดงออกลดลงตามระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง ของการทดสอบ [32] ดังนั้น เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ที่ได้รับสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำจึงมีระดับโปรตีน procaspase-9 ลดลงตามระยะเวลาการทดสอบที่เพิ่มขึ้น (ภาพ 3) และส่งผลชักนำเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส

โปรตีน caspases ต่าง ๆ ที่แพร่กระจายภายในเซลล์ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์จากขั้นตอนการเกิดอะพอพโทซิส โดย caspases มีบทบาทเป็นเอนไซม์เฉพาะสำหรับขับเคลื่อนที่สำคัญต่าง ๆ รวมถึงโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบโครงสร้างของเซลล์ เช่น c-fodrin, gelsolin, PARP, p21 -activated kinase, focal adhesion kinase และ DFF45 [43,53-55] โปรตีน caspase-9 ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในช่วงระยะต้นของการเกิดอะพอพโทซิส ซึ่งมีบทบาทไปกระตุ้น caspase-3, caspase-6 และ caspase-7 ที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในช่วงระยะหลังของการเกิดอะพอพโทซิส เป็นที่ทราบว่า caspase-3 เป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญการเกิดอะพอพโทซิส เช่น ส่งผลต่อการจัดเรียงไซโทสเกเลตอน การรวมตัวอันแน่นของโครมาติน การตัด PARP และการแตกหักของดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า หนูถีบจักรที่ขาดการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 มีผลกระทบต่อยานของเซลล์และการอยู่รอดเพียงเล็กน้อย ส่วนในหนูถีบจักรที่ขาดการแสดงออกของโปรตีน caspase-3 และ caspase-7 พบว่า หนูตายหลังเกิดเนื่องจากความผิดปกติของหัวใจ [56-58] เอนไซม์ caspase-3 และ caspase-7 มีประสิทธิภาพในการตัดซับสเตรตที่เป็น DEVD-based peptide, ROCK I, RhoGDI, c-fodrin, PARP และ ICAD ได้ใกล้เคียงกัน [43], [59] Mc Gee et al. [59] ได้เสนอว่า caspase-7 เกี่ยวข้องกับกลไกของ pyrrolo-1,5-benzoxazepine ในการชักนำอะพอพโทซิส

ของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 และยังพบว่ากิจกรรมของ caspase-7 ในเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 สามารถมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น 3 - 5 เท่า จากระดับปกติ เมื่อได้รับสารสกัดจากมะขามป้อม [60] สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำมีผลกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของ procaspase-9 ไปสู่ caspase-9 ที่เป็นเอนไซม์ในระยะต้นของอะพอพโทซิส และเอนไซม์ caspase-9 มีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง procaspase-7 ให้เป็น caspase-7 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในระยะหลังของอะพอพโทซิส ดังนั้น ระดับโปรตีน procaspase-7 จึงลดลงตามระยะเวลาการทดสอบที่เพิ่มขึ้น (ภาพ 3) และมีผลชักนำเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ที่ขาดการแสดงออกของ caspase-3 ให้ตายแบบอะพอพโทซิส สอดคล้องกับรายงานที่พบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้โปรตีน procaspase-7 มีการแสดงออกลดลงตามระยะเวลาการทดสอบที่เพิ่มขึ้น และมีความสัมพันธ์กับการตัดโมเลกุลของ PARP ที่เป็นซับสเตรท [32]

การศึกษาในครั้งนี้แสดงว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำมีคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านมเอ็มซีเอฟ-7 โดยสารสกัดด้วยน้ำสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ ชักนำการแตกหักของดีเอ็นเอ และชักนำการตายแบบอะพอพโทซิส ผ่านการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการเกิดอะพอพโทซิสในเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ที่ขาดการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 โดยสารสกัดด้วยน้ำมีบทบาทต่อการลดปริมาณของ bcl-2 ที่ช่วยสนับสนุนการอยู่รอด กระตุ้นการเปลี่ยน procaspase-9 ไปเป็น caspase-9 ที่มีบทบาทต่อเนื่องไปกระตุ้น procaspase-7 ให้เปลี่ยนโครงสร้างไปเป็น caspase-7 ที่มีบทบาทเป็นเอนไซม์ และสามารถตัดซับสเตรท เช่น PARP ส่งให้ PARP สูญเสียความสามารถในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ดังนั้น สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำสามารถชักนำอะพอพโทซิสในเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 และยิ่งเป็นที่น่าสนใจในการนำเปลือกทับทิมซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปน้ำผลไม้มาเพิ่มมูลค่าทางการตลาด และง่ายต่อการนำเปลือกทับทิมมาใช้ประโยชน์ ในฐานะของสารต้านมะเร็งจากธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม การศึกษาสารสกัด

จากเปลือกทับทิมในอนาคต ควรจะทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลต่อเซลล์เต้านมปกติด้วย เพื่อจะช่วยให้อธิบายถึงการนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์ได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ในการสนับสนุนงบประมาณที่ใช้ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนสถานที่ทำงานวิจัย ตลอดจนขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กรกช อินทรพิเชฐ ที่ช่วยสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

1. Merrill RP, Weed DL. Measuring the public health burden of cancer in the United States through lifetime and age-condition rich estimates. *Ann Epidemiol.* 2001;11:547-533.
2. Yip CH. Breast cancer in Asia. *Methods Mol Biol.* 2009;471:51-64.
3. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:768-780.
4. Haskell CM. Principles of cancer chemotherapy. In: *Cancer Treatment*. 2nd ed. Haskell CM., (ed). Philadelphia: WB. Saunders. p. 21-42.
5. Mukhtar H, Ahmad N. Cancer chemoprevention: future holds in multiple agents. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999;158:207-210.
6. Woraratphoka J, Intarapichet KO, Indrapichate K. Antioxidant activity and cytotoxicity of six selected, regional, Thai vegetables. *American-Eurasian J Toxic Sci.* 2012;4(2):108-117.
7. 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.
8. Morton JF. Fruits of warm climates. 1987. Miami: FL. p. 352-355.
 9. Lansky EP, Newman RA. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharmacol. 2007;109:177-206.
 10. Bianchini F, Corbetta F. Health plants of the world. 1979. New York: Newsweek.
 11. Duke AJ, Ayensu SE. Medicinal plants of China. 1985. Reference Publications: MI.
 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. Satomi H, Umemura K, Ueno A, Hatano T, Okuda T, Noro T. Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *Punica granatum* L. Biol Pharm Bull. 1993;16:787-790.
 17. Tanaka T, Nonaka GI, Nishioka I. Tannins and related compounds. C. Reaction of dehydrohexahydroxydiphenic acid esters with bases, and its application to the structure determination of pomegranate tannins, granatins a and b. Chem Pharm Bull. 1990;38:9424-9428.
 18. Guo CJ, Yang JJ, Wei JY, Li YF, Xu J, Jiang YG. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutr Res. 2003;31:1719-1726.
 19. 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.
 20. 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 Martigel. Invest New Drugs. 2005;23:121-122.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
24. 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.
 25. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem*. 2005;16:360-367.
 26. Toi M, Banado H, Ramachandran C, Melnick SJ, Imai A, Fife RS, et al. Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions in vitro and in vivo. *Angiogenesis*. 2003;6:121-128.
 27. Kim ND, Mehta R, Yu W, Neeman I, Livney T, Amichay A, et al. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2002;71:203-217.
 28. Larrosa M, Tomas-Barberan FA, Espin JC. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem*. 2006;17:611-625.
 29. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004;116:205-219.
 30. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003;22:8543-8567.
 31. Korsmeyer SJ. Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Res*. 1992;53:4251-4256.
 32. 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.
 33. Manasathien J, Indrapichate K, Intarapichate K. Antioxidant activity and bioefficacy of pomegranate *Punica granatum* Linn. peel and seed extracts. *Global J Pharm*. 2012;6(2):131-141.
 34. Hansen M, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*. 1989;119:203-210.
 35. Goegan P, Johnson G, Vincent R. Effects of serum protein and colloid on the alamarBlue assay in cell cultures. *Toxicol In Vitro*. 1995;9:257-266.
 36. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.
 37. Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, Das T, Sa G. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. *FEBS Lett*. 2002;512:334-340.
 38. Ackland ML, van de Waarsenburg S, Jones R. Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. *In Vivo*. 2005;19:69-76.
 39. 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.

40. Coates EM, Popa G, Gill CIR, McCann MJ, McDougall GJ, Stewart D, Rowland I. Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on *in vitro* models of colon cancer. *J Carcinog*. 2007;6:4.
41. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M. Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis caspase-3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem*. 1999;274(33):22932-22940.
42. Wolf BB, Schuler M, Escheverri F, Green DR. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem*. 1999;274:30651-30656.
43. Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Luthi AU, Gerner C, Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *P Natl Acad Sci USA*. 2008;105:12815-12819.
44. Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, Igarashi Y, Hakomori S, Tsujimoto H, et al. Overexpression of *Bax* sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and etoposide. *Jpn J Surg*. 1997;27:676-679.
45. Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*. 1998;273:9357-9360.
46. Kagawa S, Gu J, Honda T, McDonnell TL, Swisher SG, Roth JA, et al. Deficiency of caspase-3 in MCF-7 cells blocks bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin Cancer Res*. 2001;7:1474-1480.
47. Hsuuw YD, Chan WH. Epigallocatechin gallate dose-dependently induces apoptosis or necrosis in human MCF-7 cells. *Ann NY Acad Sci*. 2007;1095:428-440.
48. Siemankowski LM, Morreale J, Briehl MM. Antioxidant defenses in TNF-treated MCF-7 cells: selective increase in MnSOD. *Free Radical Bio Med*. 1999;26:919-924.
49. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281:1309-1312.
50. Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *P Natl Acad Sci USA*. 2005;102:14813-14818.
51. Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*. 2004;23:2950-2966.
52. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 2002;296(5573):1635-1636.
53. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 1995;367:37-43.
54. Rudel T, Bokoch GM. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase mediated activation of PAK2. *Science*. 1997;276:1571-1574.
55. Wen LP, Fahrni JA, Troie S, Guan JL, Orth K, Rosen GD. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272:26056-26061.
56. Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Booth CJ, Mehal WZ, et al. Caspase 3 and 7: Key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*. 2006;311:847-851.

57. Leonard JR, Klocke BJ, D'Sa C, Flavell RA, Roth KA. Strain - dependent neurodevelopmental abnormalities in caspase-3-deficient mice. *J Neuropath Exp Neur.* 2002;61:673-677.
58. Houde C, Banks KG, Coulombe N, Rasper D, Grimm E, Roy S, et al. Caspase-7 expanded function and intrinsic expression level underlies strain-specific brain phenotype of caspase-3-null mice. *J Neurosci.* 2004;24: 9977-9984.
59. Mc Gee MM, Hyland E, Campiani G, Ramunno A, Nacci V, Zisterer DM. Caspase-3 is not essential for DNA fragmentation in MCF-7 cells during apoptosis induced by the pyrrolo-1,5-benzoxazepine, PBOX-6. *FEBS Lett.* 2002;515:66-70.
60. Lee SH, Jaganath IB, Wang SM, Sekaran SD. Antimetastatic effects of *Phyllanthus* on human lung (A549) and breast (MCF-7) cancer cell lines. *Plos ONE.* 2011;6(6): e20994.