

บทความวิจัย (Research Article)

ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT29 จากสารสกัดไผ่จืด

เบญญาลักษณ์ มุลล้า¹, สริดาภา บุญศรีกุล¹, สนิตตรา ทาแก้ว¹, อัญชลี ระวังการ¹, กฤษณา พุกอินทร์¹, รุ่งทิพย์ ทองบุญโท², ทศนีย์ ศรีโพธิ์³ และ รัชฎา ประภาสวัต^{4*}

The inhibitory effect of *Pogonatherum paniceum* extracts on HT29 colorectal cancer cells growth

Benyalak Moomla¹, Saridapha Boonsrikun¹, Sinitttra Thakaew¹, Anchalee Rawangkan¹, Grissana Pook-In¹, Rungthip Thongboontho², Thatsani Sriphe³ and Ratsada Peaphasawat^{4*}

¹ Division of Microbiology, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao 56000

² Division of Biochemistry, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao 56000

³ Department of Emergency Medical Operation, School of Medicine, University of Phayao, Phayao 56000

⁴ Department of Pathology, School of Medicine, University of Phayao, Phayao 56000

* Correspondence author: ratsada.pr@up.ac.th

Health Science, Science and Technology Reviews. 2024;17(1):15-23.

Received: 12 October 2023; Revised: 28 March 2024; Accepted: 1 April 2024

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดเป็นอันดับ 3 ของมะเร็งทั่วโลก พบมากในผู้ที่มีอายุ 50 ปีขึ้นไป แม้ว่าปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรมมีบทบาทสำคัญในการก่อโรค แต่งานวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นบทบาทของโภชนาการเกี่ยวกับสาเหตุและการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ ไผ่จืด *Pogonatherum paniceum* (Lam.) Hack เป็นพืชตระกูลหญ้าที่มีฤทธิ์โดดเด่นในการขับสารพิษออกจากร่างกาย งานวิจัยนี้สนใจศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดไผ่จืด รวมไปถึงกลไกที่เกี่ยวข้อง ทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด Human Colorectal HT29 Cells ด้วยวิธี MTT assay, MTS assay และ colony formation assay จากนั้นศึกษากลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ได้แก่ การกระตุ้นการตายของเซลล์ ด้วยวิธี ELISA ซึ่งตรวจวัดปริมาณ histone-associated DNA fragments จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่า สารสกัดไผ่จืดทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง HT29 ลดลง 50% ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยแสดงให้เห็นจากค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.2 ± 0.06 mg/ml และที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.75 mg/ml สารสกัดไผ่จืดสามารถทำให้เกิดการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิสได้ จึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดไผ่จืดมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส

คำสำคัญ: โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง, สารสกัดไผ่จืด

¹ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

² สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

³ สาขาวิชาปฏิบัติการฉุกเฉินการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

⁴ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

Abstract

Colorectal cancer is the third most frequent cancer worldwide. It is more common in adults over the age of 50, while environmental and genetic variables have a part to play in etiology. However, studies have indicated that nutrition plays a role in both the cause and prevention of colon cancer. *Pogonatherum paniceum* (Lam.) Hack (PP) is a grass family with exceptional detoxification properties. This study is focused on the anti-proliferative effect of PP extract and apoptosis related mechanism. MTT, MTS, and colony formation assays were used to evaluate the anti-proliferative activities of human HT29 colon cancer cells. The results suggest that greater concentrations of PP extract reduced the viability of HT29 cancer cells after 48 hours, as shown by an IC_{50} of 1.2 ± 0.06 mg/mL. Moreover, PP extract induces apoptosis in HT29 cancer cells in a dose-dependent manner (0.5-0.75 mg/mL). In conclusion, PP extract is an alternative treatment for colorectal cancer cells.

Keywords: Colorectal cancer, Anticancer, Apoptosis, *Pogonatherum paniceum* extracts

บทนำ

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (Colorectal cancer) เป็นโรคที่พบบ่อยเป็นอันดับ 3 และเสียชีวิตเป็นอันดับ 2 ของโรคมะเร็งทั้งหมดทั่วโลก ในประเทศไทยมีรายงานว่า พบผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่สูงเป็นอันดับ 4 และมักพบมากในผู้ที่มีอายุ 50 ปีขึ้นไป ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งมีหลากหลาย ประกอบด้วย ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม ได้แก่ เชื้อก่อโรคและสารก่อมะเร็ง เป็นต้น [1] และปัจจัยทางด้านพันธุกรรม หรือ epigenetic ที่อาจนำไปสู่การเริ่มต้นของโรคมะเร็ง [2]

มะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากการที่เซลล์ปกติเกิดการกลายพันธุ์ระดับยีนและแปรสภาพกลายเป็นเซลล์มะเร็ง โดยมีลักษณะที่สำคัญคือ เซลล์มีการแบ่งตัวแบบควบคุมไม่ได้ ลักษณะจำเพาะที่สำคัญของเซลล์มะเร็ง คือ มีกลไกหลีกเลี่ยงการตายแบบ Apoptosis [3] จากลักษณะดังกล่าวนี้ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นเป้าหมายเพื่อพัฒนาชนิดพุงเป้าเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งมะเร็ง

สารสกัดจากธรรมชาติได้ถูกนำมาใช้เป็นยาสำหรับรักษาโรคมะเร็งมาอย่างยาวนาน เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับการสนใจอย่างมาก เนื่องจากสารเหล่านั้นประกอบด้วยสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ที่ถูกสกัดเพื่อนำมาใช้เป็นยาในการบำบัดรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง มีรายงานวิจัยพบว่า สารพฤกษเคมีสามารถกระตุ้นให้เซลล์ตายได้ด้วยกลไกที่สำคัญได้แก่ necrosis และ apoptosis [4] นอกจากนี้ข้อมูลระบุว่าสารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มีฤทธิ์สำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ สามารถต้านมะเร็งได้อีกด้วย [5]

ไผ่จืด *Pogonatherum paniceum* (Lam.) Hack เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Poaceae มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นพืชตระกูลหญ้า มีรสจืด ฤทธิ์เย็น ช่วยลดความร้อน ร้อนในกระหายน้ำ มีการนำมาใช้ประโยชน์ในชุมชน โดยมีการนำมาใช้ต้มดื่มเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดความดันโลหิต แก้ปวดหัว เบาหวาน โรคหอบ หืด และแก้โรคสะเก็ดเงิน มีฤทธิ์สามารถรักษาบาดแผลได้ [6] จากการศึกษาพบว่า ใบของไผ่จืดสามารถขับสารพิษได้ โดยการสังเคราะห์เอนไซม์ GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMPase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ L-ascorbic acid (AsA) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการขับสารพิษ งานวิจัยดังกล่าวพบว่า ไผ่จืดที่อยู่ในสภาวะเครียด (stress) จากการเพิ่มเกลือ (NaCl 200 mM) และ แรงดัน osmotic (30% PEG6000) เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามี GMPase เพิ่มขึ้นตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม [7]

จากการสืบค้นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์ชีวภาพของสารสกัดไผ่จืด พบว่ามีสารกลุ่มฟีนอลิกเป็นส่วนประกอบ ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร

สกัดไฟจิตยังมีอยู่ไม่มาก ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบและยืนยันฤทธิ์ด้านการเจริญเซลล์มะเร็ง ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และกลไกการยับยั้งมะเร็ง ซึ่งเป็นมะเร็งที่พบได้มากในประเทศไทย

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัด

สารสกัดไฟจิตได้รับมาจาก อาจารย์รุ่งทิพย์ ทองบุญโท อาจารย์สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา โดยนำส่วนลำต้นมาสกัดด้วยน้ำ (aqueous extract) จากนั้นเตรียมสารสกัดไฟจิต โดยการนำมาระบายด้วยน้ำกลั่น นำไปกรองด้วย membrane filter 0.22 ไมครอน และเก็บสารละลายในภาชนะที่สะอาดปราศจากเชื้อ เก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ HT29

เพาะเลี้ยงเซลล์เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ชนิด HT29 ในภาชนะ (Cell culture dish เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 60 mm) มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Completed medium ประกอบด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มีประกอบด้วย Glucose, L-glutamine และ pyruvate และเติม 10% Fetal Bovine Serum (FBS) และ 1% penicillin/streptomycin จากนั้นปล่อยให้เซลล์เจริญในตู้บ่มที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเซลล์ทุกๆ 3 วัน การถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยงนั้น ทำด้วยวิธีการแยกเซลล์ออกจากพื้นผิวด้วย 0.1% Trypsin/EDTA แล้วบ่มที่ตู้บ่มต่อ 1 นาที จากนั้นเติมอาหาร Completed medium แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ใส่ภาชนะใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Completed medium แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ HT29 ด้วยวิธี MTT assay

ศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay [8] เตรียมเซลล์ HT29 ที่ความเข้มข้น 4x10³ เซลล์/หลุม ในภาชนะ 96 well-plate แล้วปล่อยให้เซลล์ยึดเกาะที่พื้นผิวภาชนะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดไฟจิตที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.25, 1.5 mg/mL นำไปบ่มที่ตู้บ่มที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเติมสาร MTT solution ความเข้มข้น 2 mg/mL หลุมละ 50 µl จากนั้นบ่มต่อ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วดูดสารละลาย MTT ออกก่อนเติม DMSO ปริมาณ 100 µl/well นำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader จากนั้นคำนวณร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (%viability) โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{optical density Sample} \times 100}{\text{optical density Control}}$$

จากนั้นนำมาคำนวณค่า IC₅₀ (inhibitory concentration) เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ 50% จากกราฟสมการเชิงเส้น และการทำการทดสอบอย่างน้อย 3 ครั้ง

4. การทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ HT29 ด้วยวิธี MTS assay

ศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] (MTS) assay ตามรายงานใน [9] เตรียมเซลล์ HT29 ที่ความเข้มข้น 4x10³ เซลล์/หลุม ในภาชนะ 96 well-plate แล้วปล่อยให้เซลล์ยึดเกาะที่พื้นผิวภาชนะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเติมสารสกัดไฟจิตที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 mg/mL จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบการมีชีวิตรอดที่เวลา 0 (T=0) และ 48 (T=2d) ชั่วโมง โดยการเติมสาร MTS solution หลุมละ 20 µl จากนั้นบ่มต่อ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 490 โดยใช้เครื่อง Microplate reader และคำนวณการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Proliferation) โดยคำนวณจากสูตรดังนี้ [10]

$$\text{Relative Proliferation} = \frac{\text{OD of T=2d}}{\text{OD of T=0}} \div \text{Proliferation of Control}$$

5. การทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ HT29 ด้วยวิธี Colony formation assay

เตรียมเซลล์ HT29 ที่ความเข้มข้น 5×10^2 เซลล์/หลุม ในภาชนะ 6 well-plate นำไปบ่มในตู้บ่มที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์เกาะที่ผิวหน้าภาชนะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดไผ่จืดที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 mg/mL จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 7-9 วันโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน จากนั้นล้างเซลล์ด้วย cold บัฟเฟอร์เย็น (PBS) แล้วตรึงเซลล์ด้วย เมทานอลเย็น (cold methanol) หลังจากครบเวลาทำการย้อมเซลล์ด้วยสี 0.5% crystal violet จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นแต่ละกลุ่ม หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีของแต่ละความเข้มข้น ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง

6. การทดสอบผลของสารสกัดต่อการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ HT29 ด้วยวิธี Cell Death Detection ELISA Plus

เตรียมเซลล์ HT29 ที่ความเข้มข้น 8×10^4 เซลล์/หลุม ในภาชนะ 12 well-plate แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์เกาะที่ผิวหน้าภาชนะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดไผ่จืดที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.75 mg/mL เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกแล้วใส่ lysis solution บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ใส่ใน ELISA plate และเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮิสโตน (Antibody-histone) และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอ-เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (Anti-DNA-POD) บ่มที่อุณหภูมิห้องที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 2 ครั้งก่อนเติม ABTS substrate และ stop solution ตามลำดับ จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง

7. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

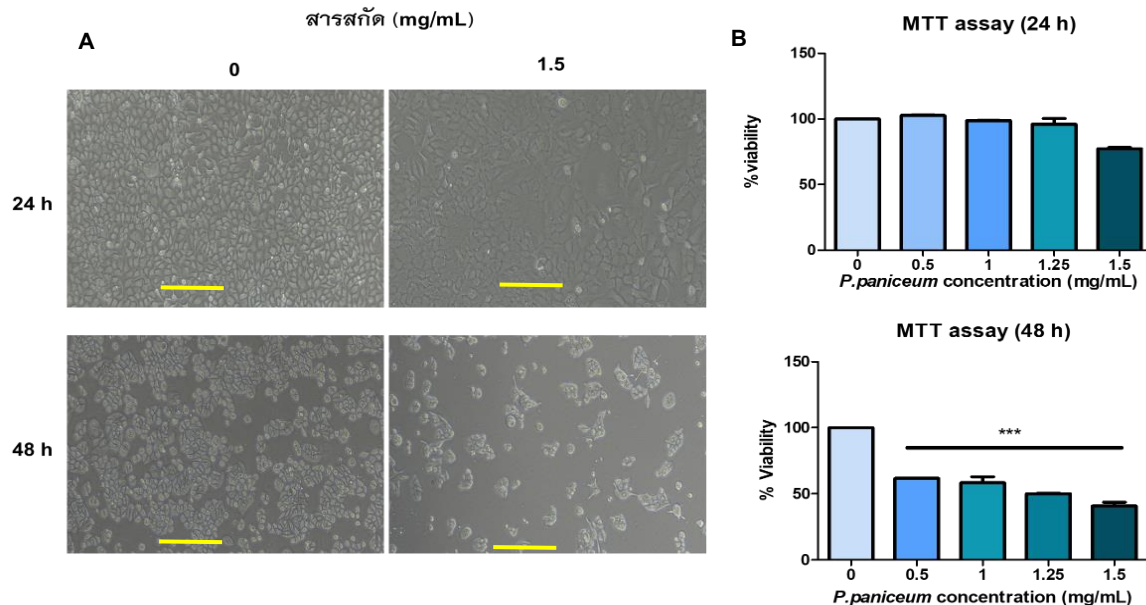
นำผลการทดสอบอย่างน้อย 3 ครั้ง คำนวณหาค่า Mean $\pm$ SD จากนั้นทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ควบคุมกับกลุ่มทดลองโดยวิธี Two-Way ANOVA วิเคราะห์แบบ Dunnett's Multiple Comparison Test โดยความแตกต่างอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติระหว่างข้อมูลจะถูกพิจารณาที่ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 5.0

ผลการศึกษา

1. ผลของสารสกัดไผ่จืดต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง HT29 ด้วยวิธี MTT assay

จากการทดสอบการมีชีวิตรอดของสารสกัดไผ่จืดต่อเซลล์ HT29 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0.5 – 1.5 mg/mL และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัด ด้วยวิธี MTT assay พบว่า ภายหลังการทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ที่ได้รับอาหารเพียงอย่างเดียว (กลุ่มควบคุม) มีการเจริญเติบโตที่หนาแน่น เช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด (รูปที่ 1) และมีค่าร้อยละการมีชีวิตรอด (%viability) เท่ากับ 100%, 102.06%, 98.42%, 91.81% และ 76.16% ตามลำดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.25 และ 1.5 mg/mL

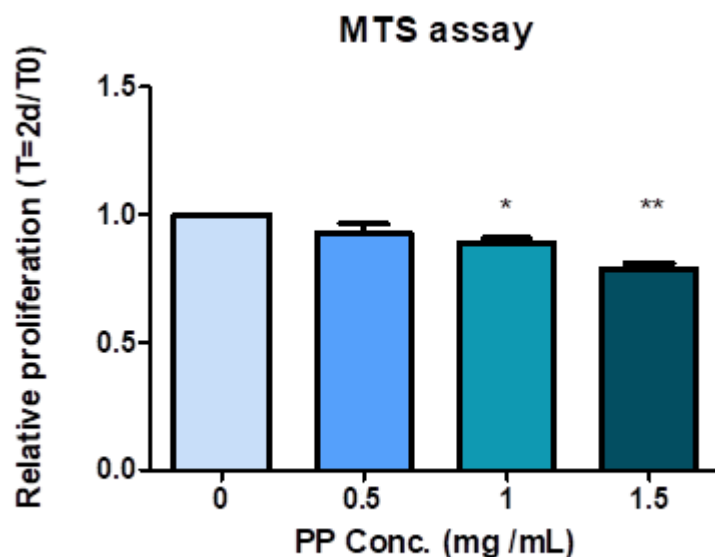
ต่อมาทำการทดสอบสารสกัดไผ่จืดที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ที่ได้รับสารสกัดมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดไผ่จืดโดยเซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดไผ่จืดมีอัตราการเจริญน้อยลง เซลล์เรียงตัวกันหลวมๆ หลุดออกจากผิวหน้าภาชนะ และหลุดลอยในอาหารเลี้ยงเมมากขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ที่ไม่มีชีวิตรอด (รูปที่ 1) จากนั้นคำนวณหาอัตราการรอดชีวิต (%viability) เท่ากับ 100%, 61.52%, 55.06%, 49.87%, และ 38.78% ตามลำดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.25 และ 1.5 mg/mL จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดไผ่จืดเพิ่มขึ้น และระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นจะทำให้เซลล์มีชีวิตรอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.001$) ผู้วิจัยจึงเลือกระยะเวลาที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่เห็นผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดได้ดีที่สุด เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งต่อไป และคำนวณค่า IC_{50} ที่เวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 1.2 mg/mL



รูปที่ 1 การทดสอบการมีชีวิตรอดต่อเซลล์มะเร็ง HT29 ด้วยสารสกัดไผ่จืด (A) แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ และความหนาแน่นของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและไม่ได้รับสารสกัดที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง, (B) แสดงค่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆ 24 และ 48 ชั่วโมง (***) $p < 0.001$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) (สเกลบาร์ = 50 μ m)

2. การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง HT29 ด้วยวิธี MTS assay

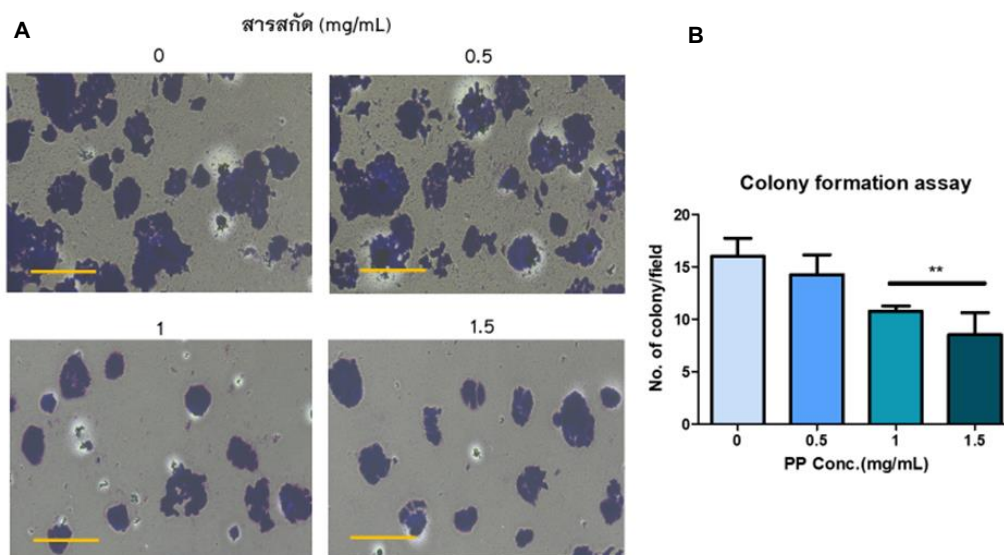
จากการทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวน (Anti-proliferation) ของสารสกัดไผ่จืดต่อเซลล์ HT29 ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 mg/mL ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดไผ่จืดสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ HT29 โดยมีค่า Relative Proliferation เท่ากับ 1, 0.925, 0.819 และ 0.787 ตามลำดับ โดยเซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดที่มีความเข้มข้น 1 และ 1.5 mg/mL มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$, $p < 0.01$) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผลการทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวน (Anti-proliferation) ต่อเซลล์มะเร็ง HT29 ด้วยสารสกัดไผ่จืดที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

3. การเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง HT29 ด้วยวิธี colony formation assay

จากการทดสอบการยับยั้งเจริญของเซลล์ HT29 ด้วยสารสกัดไผ่จืด ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 mg/mL พบว่า กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดไผ่จืด มีขนาดโคโลนีใหญ่ และจำนวนมาก (รูปที่ 3) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดไผ่จืด มีเซลล์ที่เจริญเป็นโคโลนีจำนวนน้อยลง และมีขนาดของโคโลนีเล็กลง ซึ่งแสดงด้วยจำนวนโคโลนี เท่ากับ 15.25, 14.25, 12, 10.25 ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเซลล์กับสารสกัดไผ่จืดที่ความเข้มข้น 1.25 และ 1.5 mg/mL มีจำนวนโคโลนีลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.01$)

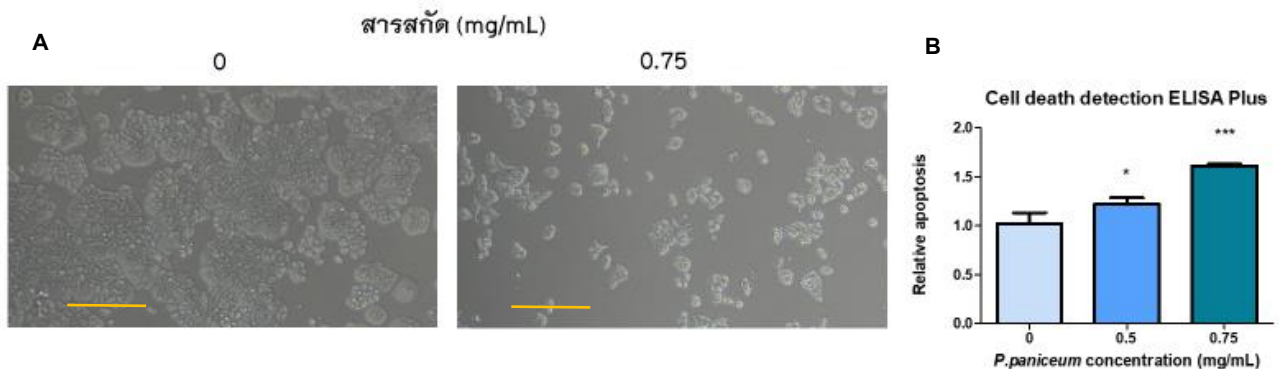


รูปที่ 3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์ HT29 ด้วยสารสกัดไผ่จืด (A) แสดงขนาดและจำนวนโคโลนี, (B) แสดงจำนวนโคโลนี ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง (** $p<0.01$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) (สเกลบาร์ = 50 μ m)

4. ผลการทดสอบผลสารสกัดใผ่จืดต่อการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง HT29 ด้วยวิธี ELISA

เพื่อศึกษากลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็ง HT29 ของสารสกัดใผ่จืด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (subtoxic dose) นำมาทดสอบการเหนี่ยวนำ apoptosis ต่อเซลล์ HT29 จากการทดสอบสารสกัดใผ่จืดต่อเซลล์ HT29 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0.5 - 0.75 mg/mL พบว่า กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดใผ่จืดมีการเจริญเติบโตที่หนาแน่น (รูปที่ 4) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใผ่จืด มีขนาดเซลล์เล็กลง จำนวนเซลล์ที่มีการเจริญลดน้อยลง และมีการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์หดกลมมากขึ้น (round shape) จากนั้นทดสอบ apoptosis ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ผลการทดสอบ พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดใผ่จืดมีการกระตุ้นให้เกิด apoptosis สูงขึ้น เท่ากับ 1.192 และ 1.577 ที่ความเข้มข้น 0.5 - 0.75 mg/mL ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และที่ความเข้มข้น 0.75 mg/mL เป็นการเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารสกัดใผ่จืดสามารถทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 4 ผลการทดสอบการเหนี่ยวนำ apoptosis ของเซลล์ HT29 ด้วยสารสกัดใผ่จืด ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง (A) แสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดและไม่ได้รับสารสกัด, (B) แสดงค่าการตายแบบ apoptosis ด้วยวิธี ELISA (***) $p < 0.001$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) (สเกลบาร์ = 50 μ m)

วิจารณ์

ใผ่จืด (*Pogonatherum paniceum*) เป็นสมุนไพรพื้นบ้านมีสรรพคุณ แก้อ่อนใน ขับปัสสาวะ แก้อาการบวม น้ำ แก้อาการหอบหืด ขับน้ำคาวปลา ขับสารพิษจากร่างกาย แก้อาการเมาค้าง งานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดใผ่จืดพบว่ามีกลุ่มของ Polyphenolic Compound เป็นจำนวนมาก โดย 3 อันดับแรก ได้แก่ Tannic acid, Gallic acid และ Catechin ตามลำดับ (ไม่แสดงผล) ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านมะเร็งหลายชนิดผ่านกลไกต่างๆ ได้แก่ การเหนี่ยวนำ apoptosis และการหยุดวัฏจักรเซลล์ได้ [11]

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Natália P. Bona *et al.* [12] ได้นำ Tannic acid มาทำการทดสอบการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งและในแบบจำลองพรีคลินิกชนิด glioblastoma multiforme ในหนูทดลอง พบว่า Tannic acid สามารถกระตุ้นการตายของเซลล์โดยกระบวนการ apoptosis การหยุดวัฏจักรเซลล์ ลดการสร้างจำนวนและขนาดของโคโลนี และลดการย้ายหรือยึดเกาะของเซลล์ได้ นอกจากนี้มีการศึกษาจำนวนหนึ่งได้ตรวจสอบกลไกที่อยู่ภายใต้คุณสมบัติทางยาของ Tannic acid ซึ่งมีรายงานว่าฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง และกระตุ้นการตายของเซลล์ [13,14]

การศึกษาความสามารถการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ของ Gallic acid พบว่าสามารถการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้หลายสายพันธุ์ เช่น COLO 205, HCT-15 และ HCT116 [15] ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Forester *et al.* [16] พบว่า Gallic acid กระตุ้นการยับยั้งการเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ COLO 205 และสามารถปรับวัฏจักรของเซลล์และการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ HCT-15 [17]

การศึกษา catechin ก่อนหน้านี้เป็นการศึกษา catechin ในใบชา ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant capacity) ทำให้ catechin มีประโยชน์ต่อสุขภาพหลายอย่าง ได้แก่ ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง [18] ดังนั้นสารสำคัญที่พบมากในไฟจิตดังกล่าวน่าจะมีบทบาทสำคัญในการต้านมะเร็ง

ในการศึกษานี้ พบว่าสารสกัดไฟจิตสามารถยับยั้งการรอดชีวิต การเพิ่มจำนวนของเซลล์ และกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ต่อเซลล์ HT29 สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ [11] อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องมีการทดสอบกลไกระดับโมเลกุลต่อไป เพื่อให้เกิดองค์ความรู้นำไปสู่การพัฒนารักษาโรคมะเร็งจากสารสกัดธรรมชาติชนิดฟองเป่าได้มีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนวิจัยคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา (Grant No.MD66-04) และทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยพะเยา Fundamental Fund (Grant No.FF66-RIM039)

เอกสารอ้างอิง

- [1] Chueh AC, Tse JWT, Tögel L, Mariadason JM. Mechanisms of Histone Deacetylase Inhibitor-Regulated Gene Expression in Cancer Cells. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Jul 1;23(1):66–84.
- [2] Rs W. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res CR* [Internet]. 2011 Sep 26 [cited 2023 Mar 29];30(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21943236/>
- [3] Pavlova NN, Zhu J, Thompson CB. The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell Metab*. 2022 Mar 1;34(3):355–77.
- [4] Angwa LM, Jiang Y, Pei J, Sun D. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention of Fluoride-Induced Oxidative Stress and Apoptosis: a Review. *Biol Trace Elem Res*. 2022 Mar;200(3):1418–41.
- [5] Muniyandi K, George E, Sathyanarayanan S, George BP, Abrahamse H, Thamburaj S, et al. Phenolics, tannins, flavonoids and anthocyanins contents influenced antioxidant and anticancer activities of Rubus fruits from Western Ghats, India. *Food Sci Hum Wellness*. 2019 Mar;8(1):73–81.
- [6] Junsongduang A, Nabundit O, Chinnawong P, Tanming W, Balslev H. Medicinal Plants Used by Tai Lao Healers in Roi Et Thailand. 2021.
- [7] Ai T, Liao X, Li R, Fan L, Luo F, Xu Y, et al. GDP-D-mannose pyrophosphorylase from *Pogonatherum paniceum* enhances salinity and drought tolerance of transgenic tobacco. *Z Naturforschung C J Biosci*. 2016;71(7–8):243–52.
- [8] Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018 Jun 1;2018(6).
- [9] Wang Y, Nguyen DT, Yang G, Anesi J, Kelly J, Chai Z, et al. A Modified MTS Proliferation Assay for Suspended Cells to Avoid the Interference by Hydralazine and β -Mercaptoethanol. *Assay Drug Dev Technol*. 2021 Apr;19(3):184–90.

- [10] Ratsada P, Hijiya N, Hidano S, Tsukamoto Y, Nakada C, Uchida T, et al. DUSP4 is involved in the enhanced proliferation and survival of DUSP4-overexpressing cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Jul 30;528(3):586–93.
- [11] Praphasawat R, Thakaew S, Rawangkan A, Thongboontho R, Sooksaen P, Laovittayangkoon S, et al. Anticancer and Antimutagenic Properties of *Pogonatherum paniceum* on Colorectal Cancer Cells. *World J Oncol.* 2023 Aug;14(4):266–76.
- [12] Bona NP, Pedra NS, Azambuja JH, Soares MSP, Spohr L, Gelsleichter NE, et al. Tannic acid elicits selective antitumoral activity in vitro and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. *Metab Brain Dis.* 2020 Feb;35(2):283–93.
- [13] Chen KS, Hsiao YC, Kuo DY, Chou MC, Chu SC, Hsieh YS, et al. Tannic acid-induced apoptosis and - enhanced sensitivity to arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells. *Leuk Res.* 2009 Feb;33(2):297–307.
- [14] Darvin P, Baeg SJ, Joung YH, Sp N, Kang DY, Byun HJ, et al. Tannic acid inhibits the Jak2/STAT3 pathway and induces G1/S arrest and mitochondrial apoptosis in YD-38 gingival cancer cells. *Int J Oncol.* 2015 Sep;47(3):1111–20.
- [15] Yoshioka K, Kataoka T, Hayashi T, Hasegawa M, Ishi Y, Hibasami H. Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. *Oncol Rep.* 2000;7(6):1221–3.
- [16] The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals - PubMed [Internet]. [cited 2023 Mar 31]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23124926/>
- [17] Subramanian AP, Jaganathan SK, Mandal M, Supriyanto E, Muhamad II. Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2016 Apr 21;22(15):3952–61.
- [18] Yuan JM, Sun C, Butler LM. Tea and cancer prevention: epidemiological studies. *Pharmacol Res.* 2011 Aug;64(2):123–35.