

บทความวิจัย (Research Article)

ศักยภาพในการต้านมะเร็งของสารสกัดใบมะรุมด้วยน้ำต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของมนุษย์
จิราพร จินดาพล¹, บงกชพร บุญเหลือ¹, ปรมศ พลดงนอก¹, พาณิภัค สิริเพาประดิษฐ์¹, สิริวรรณ จิระอานน¹,
กฤติยา ภัคมี¹ และ ลัดดาวัลย์ เส็งกันไพร^{1*}

Anticancer potential of *Moringa oleifera* aqueous leaf extract on human cholangiocarcinoma cells

Jiraporn Jindapol¹, Bongkorchporn Bunlear¹, Paramet Poldongnok¹, Panipak Siripaopradit¹,
Siriwat Shiraarnon¹, Krittaya Phukmee¹ and Laddawan Senggunprai^{1*}

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Correspondence author: laddas@kku.ac.th

Health Science, Science and Technology Reviews. 2024;17(3):32-42.

Received: 11 September 2024; Revised: 23 October 2024; Accepted: 18 November 2024

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคมะเร็งชนิดรุนแรงซึ่งมีการตอบสนองที่ไม่ดีต่อยาเคมีบำบัดแบบเดิม ในปัจจุบันจึงยังมีความต้องการการศึกษาพัฒนาทฤษฎีใหม่ๆ สำหรับการรักษามะเร็งชนิดนี้ พืชสมุนไพรและผักพื้นบ้านเป็นแหล่งที่สำคัญสำหรับการนำมาพัฒนาเป็นยารักษามะเร็ง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบศักยภาพในการต้านมะเร็งของสารสกัดใบมะรุมด้วยน้ำต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของมนุษย์ชนิด KKU-100 การศึกษาด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดใบมะรุมลดความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์มะเร็ง โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.8 ± 0.1 และ 2.6 ± 0.3 mg/mL ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ การตรวจสอบด้วยวิธี Clonogenic assay พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งความสามารถในการฟอร์มโคโลนีของเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังพบว่า เซลล์ที่ได้รับสารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 5 mg/mL มีสัดส่วนของเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น เท่ากับ $10.5 \pm 0.7\%$ และเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะท้ายรวมกับการตายแบบ necrosis เท่ากับ $23.7 \pm 2.3\%$ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาต่อถึงฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อการเคลื่อนที่และบุกรุกของเซลล์มะเร็งโดยใช้วิธี Wound healing และ invasion assay ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 2 mg/mL สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และการบุกรุกของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสรุป สารสกัดใบมะรุมออกฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดีได้ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต เพื่อย่นำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิส และยับยั้งความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

คำสำคัญ: มะเร็งท่อน้ำดี, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง, สารสกัดใบมะรุม, อะพอพโทซิส, การแพร่กระจาย

¹ สาขาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is an aggressive malignancy with poor responses to conventional chemotherapeutic agents. At present, the development of new strategies for treatment of this deadly disease is highly desired. Medicinal herbs and dietary plants provide very attractive approaches in chemotherapy. The aim of this study was to determine the potential anticancer effect of *Moringa oleifera* aqueous leaf extract (MOE) against human CCA cells, KKU-100. According to the MTT assay, MOE decreased CCA cell viability with the IC_{50} values of 3.8 ± 0.1 and 2.6 ± 0.3 mg/mL at 24 and 48 h, respectively. MOE also inhibited the colony forming capability of the cells as determined by clonogenic assay. Moreover, MOE at 5 mg/mL could induce the apoptotic cell death of CCA cells by which the percentage of early apoptotic cells and late apoptotic/necrosis cells were $10.5 \pm 0.7\%$ and $23.7 \pm 2.3\%$, respectively. The anti-migration and anti-invasive effects of the extract were subsequently investigated by wound healing and invasion assay, respectively. The results showed that MOE could significantly suppress migratory and invasive abilities of CCA cells. Taken together, MOE exhibits potential anticancer activities against CCA by limiting ability of cell to thrive, inducing apoptotic cell death and suppressing metastatic ability of CCA cells.

Keywords: Cholangiocarcinoma, Anticancer, *Moringa oleifera* leaf extract, Apoptosis, Metastasis

บทนำ

มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma) เป็นมะเร็งที่สามารถพบได้ทุกบริเวณของระบบทางเดินน้ำดี ที่มีอุบัติการณ์สูงในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยพบในผู้ชาย 135 คน ต่อประชากร 100,000 คน และ ในผู้หญิง 48 คนต่อประชากร 100,000 คน ซึ่งเป็นอุบัติการณ์ที่สูงที่สุดในโลก [1] สาเหตุที่สำคัญคาดว่าเกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* และ *Clonorchis sinensis* ทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังในท่อน้ำดี ส่งผลให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นอุดมไปด้วยสาร cytokines และ growth factors ต่างๆ ซึ่งสามารถกระตุ้นกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ เกิดการกระตุ้นให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างมากจนไม่สามารถควบคุมได้ [2] จนพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดีในเวลาต่อมา

วิธีการรักษามะเร็งท่อน้ำดีที่ได้ผลดีที่สุดคือการผ่าตัด อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยส่วนมากมักไม่มีการตรวจระยะที่มากพบแพทย์ด้วยอาการตัวเหลืองตาเหลือง ทำให้ได้รับการวินิจฉัยเมื่อโรคอยู่ในระยะที่มีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นและไม่สามารถทำการผ่าตัดได้ การรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้ทำได้ด้วยการให้ยาเคมีบำบัด โดยยาที่นิยมนำมาใช้มี 3 ชนิด ได้แก่ 5-fluorouracil (5-FU), gemcitabine และ platinum compounds เช่น cisplatin และ oxaliplatin [3,4] อย่างไรก็ตาม ผลการรักษาด้วยยาดังกล่าวยังให้ผลการรักษาไม่ดีนัก อีกทั้งยังมีผลข้างเคียงที่รุนแรง ในปัจจุบันจึงมีการวิจัยศึกษาค้นคว้าหาสารใหม่ๆ ที่มีศักยภาพเพื่อนำมาพัฒนาเป็นยาใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี หรือนำมาใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาให้ดียิ่งขึ้น

พืชสมุนไพรที่พบในธรรมชาติเป็นหนึ่งในแหล่งสำคัญของสารที่สามารถนำมาพัฒนาต่อยอดเพื่อเป็นยารักษาโรคมะเร็งได้ ตัวอย่างยาที่ถูกพัฒนาขึ้นจากสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน เช่น vincristine, vinblastine, topotecan, และ docetaxel เป็นต้น มะรุมเป็นพืชในวงศ์ Moringaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Moringa oleifera* Lam. พบในท้องถิ่นของประเทศไทย มีรายงานวสารสกัดจากมะรุม มีคุณค่าทางโภชนาการและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง ป้องกันระบบประสาท ลดน้ำตาลและลดไขมันในเลือด [5] สำหรับฤทธิ์ต้านมะเร็ง พบว่า สารสกัดใบและเมล็ดมะรุมใน 70% เอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีและเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ได้ [6] นอกจากนี้ ยังมี

รายงานถึงฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และส่งเสริมการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น มะเร็งปอด [7] มะเร็งผิวหนัง [8] และมะเร็งลำไส้ใหญ่ [9] เป็นต้น นอกเหนือจากฤทธิ์ชักนำการตายแบบอะพอพโทซิส ยังมีรายงานว่า สารสกัดใบมะรุม สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากได้ด้วย [10] สำหรับสารออกฤทธิ์ที่พบในใบมะรุม นั้น พบว่ามีหลายชนิด ได้แก่ สารกลุ่ม phenolics, flavonoids, glucosinolates, tannins, alkaloids, triterpenes และกลุ่ม isothiocyanates [11]

เนื่องจาก ใบมะรุมพบสารสำคัญออกฤทธิ์หลายชนิด ซึ่งสารต่างๆ เหล่านี้มีความสามารถละลายแตกต่างกันในตัวทำละลายแต่ละชนิด ดังนั้น การสกัดใบมะรุมด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน จะได้ชนิดและปริมาณสารสำคัญออกฤทธิ์แตกต่างกันไป ในงานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดใบมะรุมด้วยน้ำโดยใช้โมเดลในหลอดทดลองทดสอบกับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีรายงานว่าต้องยารักษามะเร็งท่อน้ำดี gemcitabine [12] โดยทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโต ฤทธิ์ยับยั้งการฟอร์มโคโลนี ฤทธิ์เหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส ฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่และการบุกรุกของเซลล์ ผลการศึกษาที่ได้จะทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดจากใบมะรุมด้วยน้ำ และสามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับมะรุมต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดใบมะรุม

สารสกัดใบมะรุมเป็นสารสกัดด้วยน้ำ ได้รับอนุเคราะห์จาก ผศ.ปณต ตั้งสุจริต สาขาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิธีการสกัดโดยย้อมคือ นำใบมะรุมแห้งมาต้มเดือดในน้ำ (ใบมะรุม 100 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร) เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำมากรอง และนำไป freeze-dried โดยใช้เครื่อง lyophilizer เก็บสารสกัดที่ได้ในภาชนะที่สะอาด และเก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส [13] สารสกัดจะถูกนำมาละลายด้วยน้ำตามความเข้มข้นที่ต้องการ และกรองด้วยแผ่นเมมเบรน 0.22 ไมครอน ก่อนนำไปทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีของมนุษย์ในการวิจัยนี้คือเซลล์ชนิด KKU-100 ซึ่งได้รับอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยมะเร็ง ท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น เซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ที่พัฒนามาจาก ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยซึ่งเป็นเขตพื้นที่ระบาดของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* (OV) [14] โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Ham's F12 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.), pH 7.4 ที่ประกอบด้วย 10% (v/v), fetal bovine serum (FBS) (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.), penicillin G 100 U/mL และ gentamicin sulfate 50 µg/mL เพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37°C และทำการถ่ายเซลล์ (subculture) ทุก 3 วัน

3. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ด้วยวิธี MTT assay

ทำการทดสอบด้วยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay โดยใช้วิธีตามรายงานก่อนหน้านี้ [15] กรรวิธีโดยย้อมมีดังนี้ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate ที่ความหนาแน่น 7,500 เซลล์ต่อหลุม โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจาก FBS จากนั้นทำการเติมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 1-10 mg/mL ทำการบ่มเซลล์ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติมนสาร MTT ลงไปแล้วทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นเติมนสาร DMSO ลงไปเพื่อละลายผลึก formazan และ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วยเครื่อง ELIZA microplate reader (Sunrise™, TECAN Austria GmbH, Austria) โดยค่าที่วัดได้จะนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุม

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการฟอร์มโคโลนีด้วยวิธี Clonogenic assay

ทำการทดสอบ Clonogenic assay หรือ colony forming assay โดยใช้วิธีตามรายงานก่อนหน้านี้ [15] กรรมวิธีโดยย่อมีดังนี้ เริ่มจากเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 6-well plate ที่ความหนาแน่น 250,000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นใส่สารที่ต้องการทดสอบลงใน plate ตามความเข้มข้นที่ต้องการ ทำการบ่มเซลล์ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการนับเซลล์เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงใน plate ใหม่ จำนวน 600 เซลล์/หลุม และเลี้ยงเซลล์ไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 8 วัน เมื่อครบกำหนด ทำการ fixed เซลล์ด้วย methanol และย้อมสีเซลล์ด้วย crystal violet และถ่ายรูปดูจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น จากนั้น ทำการละลายสี crystal violet ด้วย 25% acetic acid in 10% methanol แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วยเครื่อง ELIZA microplate reader (Sunrise™, TECAN Austria GmbH, Austria)

5. การทดสอบฤทธิ์เหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส

หลักการของการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์อะพอพโทซิส คือในเซลล์ปกติ phosphatidylserine เป็นฟอสโฟลิพิดที่พบได้ตามพื้นผิวภายในของพลาสมาเมมเบรน ในระหว่างการตายแบบอะพอพโทซิสนั้น phosphatidylserine จะย้ายตำแหน่งไปยังพื้นผิวนอกของพลาสมาเมมเบรน ดังนั้น จึงสามารถใช้ย้อม Annexin V ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถจับกับ phosphatidylserine ในการตรวจหาอะพอพโทซิส [16] ในการศึกษาเนื้องอกการตายแบบอะพอพโทซิส โดยใช้ PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San Jose, CA) ตามกรรมวิธีที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ซึ่งวิธีนี้เป็นการย้อมสีเซลล์ด้วยสี 2 ชนิด ได้แก่ annexin V-phycoerythrin (PE) และ propidium iodide (PI) กรรมวิธีโดยย่อมีดังนี้ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 6-well plate ที่ความหนาแน่น 250,000 เซลล์ต่อหลุม โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจาก FBS จากนั้นเติมสารสกัดใบมะรุ่ยที่ความเข้มข้น 5 mg/mL ลงใน plate ทำการบ่มเซลล์ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการย้อมสีเซลล์ด้วยสาร Annexin V-PE และ PI บ่มเซลล์เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด จากนั้นทำการตรวจสอบการตายของเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA)

6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี Wound healing assay

ทำการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วย Wound healing assay โดยใช้วิธีตามรายงานก่อนหน้านี้ [15] กรรมวิธีโดยย่อมีดังนี้ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 24-well plate ที่ความหนาแน่น 200,000 เซลล์ต่อหลุม โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจาก FBS จากนั้น ใช้ micropipette tip ขีดเส้น สร้างรอยแผลบน monolayer cell ทำการล้างเซลล์ที่ถูกขูดให้หลุดออกไป และทำการถ่ายรูปรอยแผล (0 ชั่วโมง) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใส่สารสกัดใบมะรุ่ยที่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/mL ลงใน plate และเลี้ยงเซลล์ไว้ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำมาถ่ายรูปดูการเคลื่อนที่ของเซลล์เทียบกับที่เวลา 0 ชั่วโมง โดยใช้กล้อง Nikon ECLIPSE TS100 inverted microscope (Nikon Instruments Inc., Japan) ทำการคำนวณพื้นที่ของรอยแผลและความยาวของรอยแผลจากรูปถ่ายโดยใช้โปรแกรม Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, LP, USA) จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นระยะของรอยแผล (Wound distance) โดยการใส่สูตร

$$\text{Wound distance} = \frac{\text{พื้นที่ของรอยแผล}}{\text{ความยาวของรอยแผล}}$$

จากนั้นคำนวณอัตราการปิดของรอยแผล ซึ่งหมายถึงอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ จากสมการ

$$\% \text{ Wound closure} = 100 - \left[\left(\frac{\text{Wound distance at 24 or 48 h}}{\text{Wound distance at 0 h}} \right) \times 100 \right]$$

7. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการบุกรุกของเซลล์ด้วยวิธี Invasion assay

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมและเซลล์ทดลองในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจาก FBS โดยเซลล์ทดลองได้รับสารสกัดใบมะรุุมที่ความเข้มข้น 2 mg/mL เลี้ยงเซลล์ลงในจานบนของ QCM EMatrix Cell Invasion Assay (#ECM550, Merck Millipore, Watford, UK) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 30,000 เซลล์ / insert well ในส่วนด้านล่างของ chamber ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS ลงไปเพื่อติดตามการบุกรุกของเซลล์ จากนั้นทำการบ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการตรวจดูเซลล์ที่บุกรุกได้ โดยการ fix ด้วย methanol และย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet จากนั้นนำไปส่องดูและถ่ายรูปเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ECLIPSE Ni-U upright Microscope, Nikon Instruments Inc., Japan) และทำวิเคราะห์ผลโดยการนับจำนวนเซลล์ที่บุกรุก แล้วนำมาคำนวณเป็นค่า % invasion ของกลุ่มทดลองเทียบกับกลุ่มควบคุม

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองด้วยวิธี One-way ANOVA with post hoc Tukey's test หรือ Student's t test ตามความเหมาะสม ซึ่งกำหนดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างข้อมูลที่ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS version 24

ผลการศึกษา

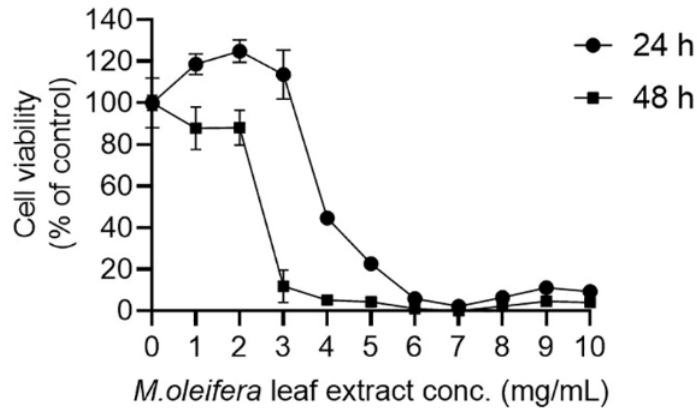
1. ผลของสารสกัดใบมะรุุมต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

จากการทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุุมต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วยวิธี MTT assay ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า ภายหลังการทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ที่ได้รับสารสกัดใบมะรุุมที่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/mL มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์ควบคุมเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม เซลล์ที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 mg/mL ขึ้นไป มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำกว่าเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการทดสอบที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ที่ได้รับสารสกัดใบมะรุุมที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 3 mg/mL ขึ้นไป มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำกว่าเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1) สามารถคำนวณค่า IC_{50} ของสารสกัดได้เท่ากับ 3.8 ± 0.1 และ 2.6 ± 0.3 mg/mL ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้นี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบมะรุุมสามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้

ตารางที่ 1 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับสารสกัดใบมะรุุม (แสดงค่าเป็น %)

เวลา	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดสอบที่ได้สารสกัดใบมะรุุม (mg/mL)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
24 ชั่วโมง	100.0	118.6 $\pm$ 4.9*	124.9 $\pm$ 5.5*	113.7 $\pm$ 11.9	44.7 $\pm$ 1.5*	22.7 $\pm$ 2.9*	5.9 $\pm$ 1.7*	2.1 $\pm$ 0.6*	6.4 $\pm$ 0.6*	11.1 $\pm$ 0.8*	9.3 $\pm$ 1.5*
48 ชั่วโมง	100.0	87.8 $\pm$ 8.4	88.1 $\pm$ 7.9	11.9 $\pm$ 7.9*	5.23 $\pm$ 1.7*	4.4 $\pm$ 0.4*	1.1 $\pm$ 0.1*	0.1 $\pm$ 0.5*	2.2 $\pm$ 0.2*	4.6 $\pm$ 0.5*	4.1 $\pm$ 0.4*

ค่าในตารางแสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD (n = 3), * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



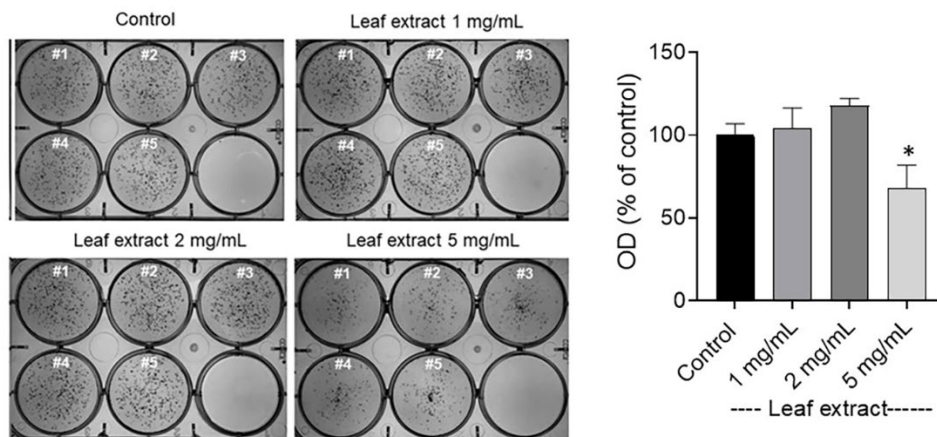
รูปที่ 1 กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิต (Cell viability) ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับสารสกัดใบมะรุม

2. ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการฟอร์มโคโลนีของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

การทดลอง Clonogenic assay เป็นการทดสอบความสามารถของเซลล์ในการเพิ่มจำนวนและสร้างโคโลนี มักใช้เพื่อประเมินผลกระทบของการรักษาต่างๆ ต่อการอยู่รอดและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ จากการทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการฟอร์มโคโลนีของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบว่า เซลล์ที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 5 mg/mL มีการเจริญเป็นโคโลนีจำนวนน้อยลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของเซลล์ที่ย้อมด้วยสี crystal violet พบว่าเซลล์กลุ่มทดลองมีค่าการดูดกลืนแสงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบมะรุมสามารถยับยั้งการฟอร์มโคโลนีของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้

(A)

(B)

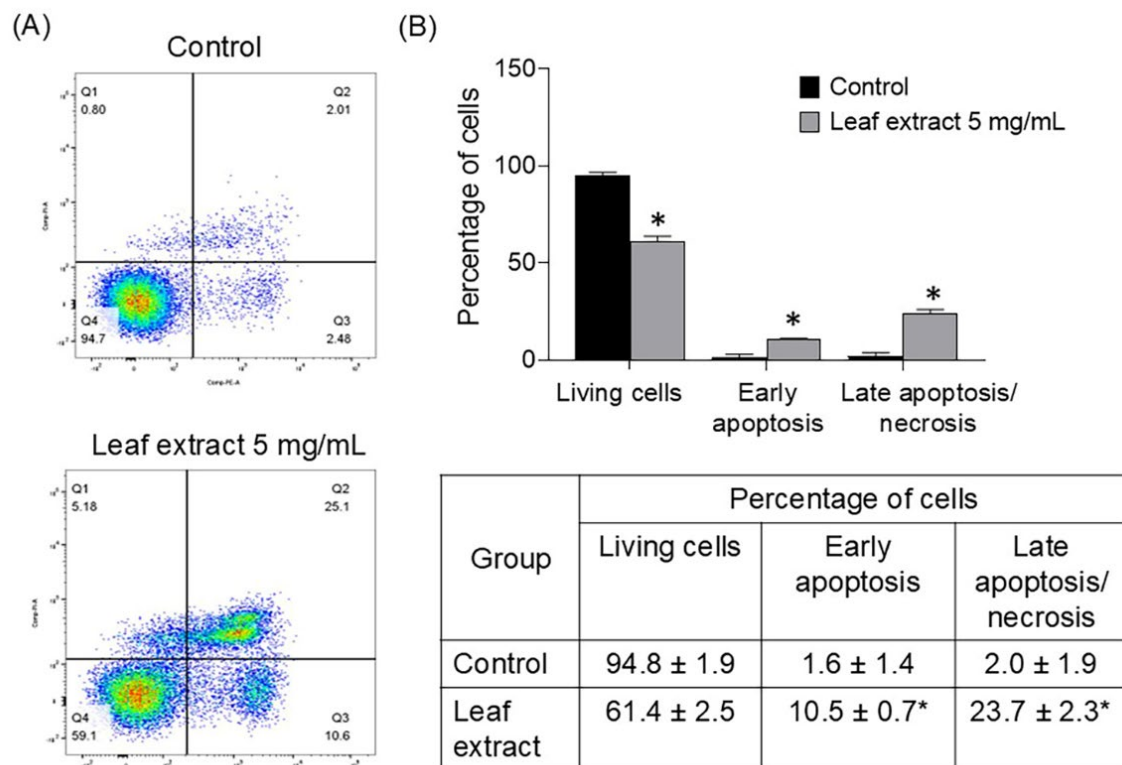


รูปที่ 2 ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการฟอร์มโคโลนีของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (A) เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 5 mg/mL โดยในแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบซ้ำ 5 หลุม (B) ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ย้อมด้วยสี crystal violet, * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

3. ผลของสารสกัดใบมะรุมในการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอโทซิส

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมในการชักนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเกิดการตายแบบอะพอโทซิส ด้วยวิธีการย้อมสี annexin V-PE และ PI แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Flow cytometry พบว่า สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 5 mg/mL สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเกิดการตายแบบอะพอโทซิสเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม โดยมีสัดส่วนของเซลล์ที่เกิด early apoptosis (Quadrant 3 (Q3)) ใน

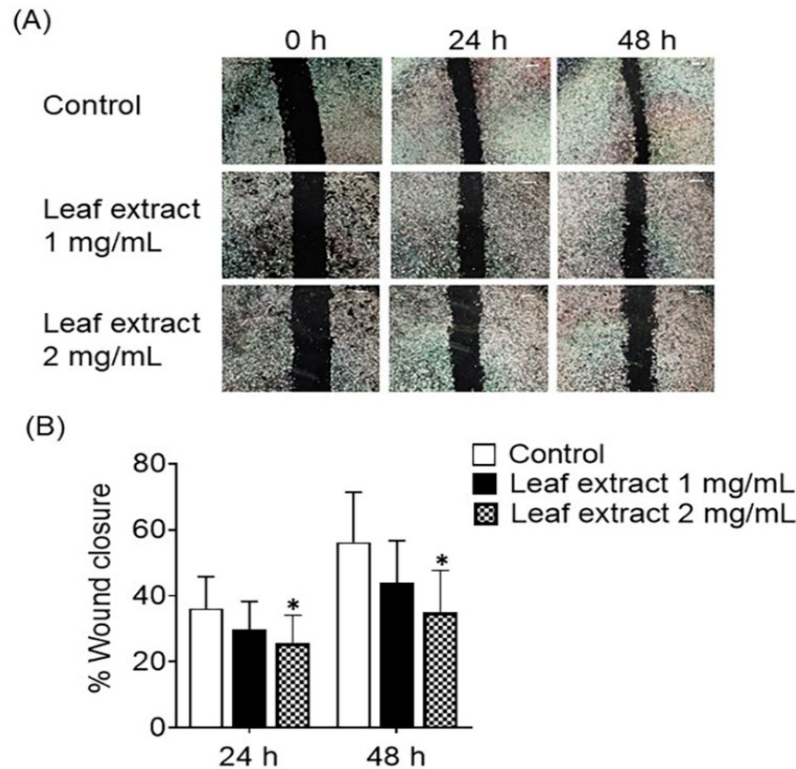
กลุ่มที่ได้รับสารสกัด เท่ากับ 10.5 ± 0.7 % และในกลุ่มควบคุม เท่ากับ 1.6 ± 1.4 % และมีสัดส่วนของเซลล์ที่เกิด late apoptosis/necrosis (Q2) ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด เท่ากับ 23.7 ± 2.3 % และในกลุ่มควบคุม เท่ากับ 2.0 ± 1.9 % ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดใบมะรุมในการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส (A) ผลการวิเคราะห์สัดส่วนของเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำการตายโดยเทคนิค Flow cytometry (Early apoptotic cells (Q3), late apoptotic/necrotic cells (Q2), living cells (Q4)) (B) กราฟแสดงค่าสัดส่วนของเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ตายแบบต่างๆ ของเซลล์กลุ่มทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่าแสดงในกราฟคือค่า mean $\pm$ SD (n = 3), * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4. ผลของสารสกัดใบมะรุมในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

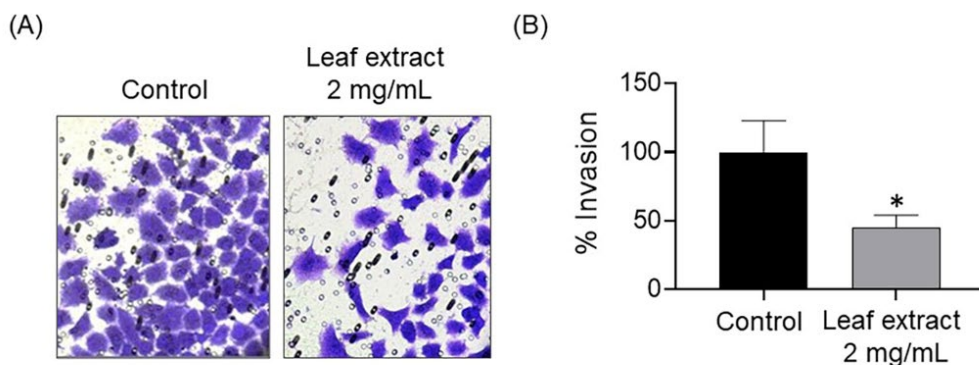
ในการทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี Wound healing assay นั้น ผู้วิจัยเลือกใช้สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/mL ในการทดสอบ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เพื่อให้มั่นใจว่า ผลการยับยั้งการเคลื่อนที่ที่พบไม่ได้เกิดจากผลของสารที่ทำให้เซลล์ตาย จากผลการทดลองพบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ที่ได้รับสารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ความเข้มข้น 2 mg/mL โดยมีค่า % Wound closure ของเซลล์ควบคุม และเซลล์ที่ได้รับสารสกัด 1 และ 2 mg/mL เท่ากับ $36.2 \pm 9.7\%$, $29.8 \pm 8.5\%$ และ $25.7 \pm 8.4\%$ ตามลำดับ สอดคล้องกับที่เวลา 48 ชั่วโมง เซลล์ที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/mL มีการเคลื่อนที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่า % Wound closure ของเซลล์ควบคุมและเซลล์ที่ได้รับสารสกัด 1 และ 2 mg/mL เท่ากับ $56.3 \pm 15.2\%$, $43.9 \pm 12.8\%$ และ $34.9 \pm 12.7\%$ ตามลำดับ โดยพบผลการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเซลล์ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 2 mg/mL (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ผลของสารสกัดใบมะรุมในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (A) รูปแสดงการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับสารสกัดใบมะรุมเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (B) กราฟแสดงค่า % Wound closure ของเซลล์กลุ่มควบคุมและเซลล์ที่ได้รับสารสกัด ค่าแสดงในกราฟคือค่า mean $\pm$ SD (n = 6), * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

5. ผลของสารสกัดใบมะรุมในการยับยั้งการบุกรุกของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ในการทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการยับยั้งการบุกรุกของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีนั้น ผู้วิจัยทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีความเข้มข้น 2 mg/mL ซึ่งความเข้มข้นนี้ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ได้รับสารสกัดใบมะรุมมีความสามารถในการบุกรุกน้อยลงเมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ผลของสารสกัดใบมะรุมในการยับยั้งการบุกรุกของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (A) รูปแสดงการบุกรุกของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับสารสกัดใบมะรุม 2 mg/mL เทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (B) กราฟแสดงค่า % Invasion ของเซลล์กลุ่มควบคุมและเซลล์ที่ได้รับสารสกัด ค่าแสดงในกราฟคือค่า mean $\pm$ SD (n = 4), * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

วิจารณ์

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่มีความรุนแรง และมักพบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองและอวัยวะอื่นของร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต การพัฒนาค้นคว้าหายาที่สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็งจึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการรักษาผู้ป่วย การศึกษาวิจัยนี้ทำการตรวจสอบเบื้องต้นถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดจากใบมะรุมด้วยน้ำ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเหี่ยวนาให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิส และสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และบุกรุกของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้

หนึ่งในกลไกสำคัญของสารต้านมะเร็งคือ การจำกัดความสามารถของเซลล์มะเร็งในการเจริญเติบโต และการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างควบคุมไม่ได้ การศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานถึงผลของสารสกัดใบมะรุมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก [17] และมะเร็งปอด [7] เป็นต้น สำหรับในมะเร็งท่อน้ำดี มีการศึกษาก่อนหน้าที่รายงานว่า สารสกัดจากเมล็ดและใบมะรุมด้วย 70% เอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 และ RMCCA1 โดยเห็นผลอย่างชัดเจนตั้งแต่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ เป็นต้นไป [6] ส่วนสารสกัดเมล็ดของมะรุมด้วย 95% เอทานอล พบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA1 ได้ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ เป็นต้นไป [18] ซึ่งผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษา ก่อนหน้า โดยพบว่า สารสกัดใบมะรุมด้วยน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้พบว่าสารสกัดมีผลยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.8 mg/mL ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้าที่รายงานว่า สารสกัดใบมะรุมด้วยน้ำยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งตับ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.5 mg/mL [19] มีรายงานว่าพบสารออกฤทธิ์ในใบมะรุมหลายชนิด ได้แก่ สารกลุ่ม phenolics, flavonoids, glucosinolates, tannins, triterpenes, alkaloids และกลุ่ม isothiocyanates [11] ซึ่งสารสำคัญที่พบเหล่านี้มีความสามารถละลายแตกต่างกันในตัวทำละลายแต่ละชนิด ดังนั้นการสกัดใบมะรุมด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน จะได้ชนิดและปริมาณสารสำคัญออกฤทธิ์แตกต่างกันไป จากผลการทดลองที่ได้นี้ แสดงให้เห็นว่า สารสำคัญของมะรุมในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีอาจเป็นสารกลุ่มที่สามารถละลายได้ดีในเอทานอล ซึ่งเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะทำการศึกษาต่อถึงชนิดของสารออกฤทธิ์เหล่านี้ นอกจากนี้ ในการวิจัยครั้งนี้ยังพบว่า เซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดใบมะรุมในความเข้มข้นต่ำ (1-2 mg/mL) ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นไปได้ว่า เซลล์อาจเกิดการปรับตัวเพื่อการมีชีวิตรอดเมื่อได้รับสารแปลกปลอมจากภายนอก ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า สารสกัดใบมะรุมด้วยน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งความสามารถในการสร้างโคโลนีได้ ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของเซลล์มะเร็งที่สามารถเพิ่มจำนวนอย่างไม่สิ้นสุด ในปัจจุบันการฆ่ามะเร็งโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสได้รับการยอมรับว่าเป็นกลยุทธ์สำคัญในการค้นหาต่อต้านมะเร็ง ในการศึกษา พบว่า ฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมด้วยน้ำในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีนั้น ส่วนหนึ่งเกิดขึ้นจากการกระตุ้นวิธีการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่พบว่า สารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลสามารถเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ [6,18] แต่อย่างไรก็ตาม ต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมด้วยน้ำในขนาดสูงเพื่อชักนำให้เซลล์เกิดอะพอพโทซิส นอกเหนือจากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแล้ว มีรายงานว่าสารสกัดใบมะรุมส่งเสริมการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งอื่นอีกหลายชนิดเช่น ปอด [7] มะเร็งตับ [19] และมะเร็งลำไส้ใหญ่ [9] เป็นต้น

กระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญคือ การเคลื่อนที่และการบุกรุกของเซลล์ [20] ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อการเคลื่อนที่และการบุกรุกของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยในการศึกษาฤทธิ์ต่อการเคลื่อนที่และบุกรุก ผู้วิจัยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพื่อเป็นการยืนยันว่าฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่และบุกรุกของสาร ไม่ได้มาจากฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดใบมะรุมสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และการบุกรุกของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่รายงานว่า สารสกัดจากใบมะรุมมีฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งกระดูก

[21] และมะเร็งต่อมลูกหมาก [10] ได้ โดยการศึกษาในมะเร็งต่อมลูกหมากนั้น พบว่าสารสำคัญออกฤทธิ์ในสารสกัดใบมะรุมเป็นสารกลุ่ม alkaloids [10]

โดยสรุป สารสกัดใบมะรุมด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดีได้ อย่างไรก็ตาม ต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดค่อนข้างสูงในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดี ผลการศึกษาที่ได้ สามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับสารสำคัญออกฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ กัน นอกจากนี้ ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อศึกษาต่อเกี่ยวกับผลของมะรุมต่อโมเลกุลเป้าหมายและการทำงานของวิถีสัญญาณต่าง ๆ ภายในเซลล์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- [1] Sriamporn S, Pisani P, Pipitgool V, Suwanrungruang K, Kamsa-ard S, Parkin DM. Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. *Trop Med Int Health*. 2004;9(5):588-94.
- [2] Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, Mairiang E, Laha T, Smout M, et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med*. 2007;4(7):e201.
- [3] Najran P, Lamarca A, Mullan D, McNamara MG, Westwood T, Hubner RA, et al. Update on treatment options for advanced bile duct tumours: Radioembolisation for advanced cholangiocarcinoma. *Curr Oncol Rep*. 2017;19(7):50.
- [4] O'Hagan K. Updates in cholangiocarcinoma. *J Adv Pract Oncol*. 2022;13(3):320-3.
- [5] Kou X, Li B, Olayanju JB, Drake JM, Chen N. Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*. 2018;10(3).
- [6] Leelawat S, Leelawat K. *Moringa oleifera* extracts induce cholangiocarcinoma cell apoptosis by Induction of reactive oxygen species production. *J Pharmacogn Phytochem*. 2014;6(2):183-9.
- [7] Xie J, Peng LJ, Yang MR, Jiang WW, Mao JY, Shi CY, et al. Alkaloid extract of *Moringa oleifera* Lam. exerts antitumor activity in human non-small-cell lung cancer via modulation of the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021;2021:5591687.
- [8] Do BH, Nguyen TPT, Ho NQC, Le TL, Hoang NS, Doan CC. Mitochondria-mediated caspase-dependent and caspase-independent apoptosis induced by aqueous extract from *Moringa oleifera* leaves in human melanoma cells. *Mol Biol Rep*. 2020;47(5):3675-89.
- [9] Caicedo-Lopez LH, Cuellar-Nunez ML, Luzardo-Ocampo I, Campos-Vega R, Loarca-Pina G. Colonic metabolites from digested *Moringa oleifera* leaves induced HT-29 cell death via apoptosis, necrosis, and autophagy. *Int J Food Sci Nutr*. 2021;72(4):485-98.
- [10] Xie J, Luo FX, Shi CY, Jiang WW, Qian YY, Yang MR, et al. *Moringa oleifera* alkaloids inhibited PC3 cells growth and migration through the COX-2 mediated Wnt/beta-Catenin signaling pathway. *Front Pharmacol*. 2020;11:523962.
- [11] Wu YY, Xu YM, Lau ATY. Anti-cancer and medicinal potentials of Moringa isothiocyanate. *Molecules*. 2021;26(24).
- [12] Dokduang H, Namwat N, Jusakul A, Bhudisawadi V, Loilome W, Yongvanit P, et al. Determination of growth inhibitory effect of gemcitabine on human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines and comparison of its inhibition between the generic and reference formulation. *Srinagarind Med J*. 2010;25:1-5.

- [13] Aekthammarat D, Pannangpetch P, Tangsucharit P. *Moringa oleifera* leaf extract lowers high blood pressure by alleviating vascular dysfunction and decreasing oxidative stress in L-NAME hypertensive rats. *Phytomedicine*. 2019;54:9-16.
- [14] Sripa B, Leungwattananit S, Nitta T, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Puapairoj A, et al. Establishment and characterization of an opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma cell line (KKU-100). *World J Gastroenterol*. 2005;11(22):3392-7.
- [15] Pocasap P, Prawan A, Kongpetch S, Senggunprai L. Network pharmacology- and cell-based assessments identify the FAK/Src pathway as a molecular target for the antimetastatic effect of momordin Ic against cholangiocarcinoma. *Heliyon*. 2024;10(11):e32352.
- [16] Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques*. 1997;23(3):525-31.
- [17] Khan F, Pandey P, Ahmad V, Upadhyay TK. *Moringa oleifera* methanolic leaves extract induces apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest via downregulation of Hedgehog Signaling Pathway in human prostate PC-3 cancer cells. *J Food Biochem*. 2020;44(8):e13338.
- [18] Leelawat S, Leelawat K. Molecular mechanisms of cholangiocarcinoma cell inhibition by medicinal plants. *Oncol Lett*. 2017;13(2):961-6.
- [19] Tiloke C, Phulukdaree A, Gengan RM, Chuturgoon AA. *Moringa oleifera* aqueous leaf extract induces cell-cycle arrest and apoptosis in human liver hepatocellular carcinoma cells. *Nutr Cancer*. 2019;71(7):1165-74.
- [20] Tahtamouni L, Ahram M, Koblinski J, Rolfo C. Molecular regulation of cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2019;2019:1356508.
- [21] Bhadresha KP, Jain NK, Rawal RM. Assessing the protective effect of *Moringa oleifera* extract against bone metastasis: An in vitro simulated digestion approach. *Nutr Cancer*. 2022;74(3):1023-36.