

## บทความวิจัย (Research Article)

## ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักด้วยสารสกัดเปลือกทับทิม

พวงศันเรศ แจ่งพรมมา<sup>1</sup>, ภัชรี พิมาลรัมย์<sup>1</sup>, รัชฎา ประภาสวัต<sup>2</sup> และ กานต์ชนก สุขบท<sup>1\*</sup>

## Antiproliferative activity of pomegranate peel extracts against colorectal cancer cells

Pongnared Jaengpromma<sup>1</sup>, Phatcharee Pimalram<sup>1</sup>, Ratsada Praphasawat<sup>2</sup> and Karnchanok Sukhabot<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Department of Traditional Chinese Medicine, School of Public Health, University of Phayao, Phayao Province 56000, Thailand<sup>2</sup> Department of Pathology, School of Medicine, University of Phayao, Phayao Province 56000, Thailand

\* Correspondence author, E-mail: karnchanok.su@up.ac.th

Health Science, Science and Technology Reviews. 2025;18(2):24-33.

Received: 7 April 2025; Revised: 8 July 2025; Accepted: 19 August 2025

## บทคัดย่อ

เปลือกทับทิม (Pomegranate peel) มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย ได้แก่ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบและต้านมะเร็ง และมีรายงานทางแพทย์แผนจีนนำมาใช้รักษาโรคมะเร็งได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นพิษและฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ชนิด HCT116 ของสารสกัดเปลือกทับทิม 2 ชนิด คือ ตัวอย่างสารสกัดเปลือกทับทิมจากการสกัดด้วยเอทานอลหรือ PPE1 และสารสกัดเปลือกทับทิมสำเร็จรูปหรือ PPE2 การทดสอบเริ่มต้นจากการประเมินอัตราการรอดชีวิตต่อเซลล์ทดสอบด้วยวิธี Trypan blue exclusion พบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมทั้ง PPE1 และ PPE2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HCT116 โดยเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (25-200 µg/ml) ทำให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงและเมื่อบ่มสารสกัดที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้น (24-48 ชั่วโมง) ทำให้มีอัตราการมีชีวิตรอดต่อเซลล์ HCT116 ลดลง จากการทดสอบพบว่า ที่ 24 ชั่วโมง มีเซลล์ตายร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้นมากกว่า 200 µg/ml และพบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง สารสกัด PPE1 และสารสกัด PPE2 ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml มีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 50% ทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็ง ด้วยวิธี MTS และ Clonogenic assay พบว่า HCT116 ที่รับสารสกัดเปลือกทับทิมทั้งสองชนิดความเข้มข้น 25-75 µg/ml มีจำนวนเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด นอกจากนี้สารสกัดเปลือกทับทิมทำให้จำนวนกลุ่มเซลล์โคโลนีและขนาดเล็กลงอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเปลือกทับทิมทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักได้ สารสกัดเปลือกทับทิมมีศักยภาพที่เหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งจากธรรมชาติในอนาคต

**คำสำคัญ:** สารสกัดเปลือกทับทิม, ความเป็นพิษต่อเซลล์, เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่<sup>1</sup> สาขาวิชาการแพทย์แผนจีน คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000 ประเทศไทย<sup>2</sup> ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000 ประเทศไทย

## Abstract

Pomegranate peel (*Punica granatum*) exhibits diverse biological activities including antioxidant anti-inflammatory and anti-cancer properties. In Traditional Chinese Medicine, pomegranate peel has been reported as a potential treatment for cancer. This study aimed to evaluate the cytotoxicity and anti-cancer effects of two pomegranate peel extracts (ethanolic extract; PPE1 and commercial extract; PPE2) on HCT116 colorectal cancer cell line. The cell viability was assessed using the trypan blue exclusion assay. The results demonstrated that both PPE1 and PPE2 exhibited cytotoxic effects against HCT116 cells at increasing concentrations (25-200 µg/ml) and times dependent manners (24-48 h). At 24 hours, there was 50% cell death at concentrations more than 200 µg/ml. Additionally, at 48 hours, both PPE1 and PPE2 extracts at 200 µg/ml exhibited approximately 50% cell viability. We evaluated cell-proliferation and self-renewal abilities using the MTS and clonogenic assays. The result revealed that treatment of HCT116 with PPE1 (25-100 µg/ml) caused a statistically significant reduction in cell number ( $p < 0.05$ ) compared to the untreated control group. Treatment with PPE2 also resulted in a decrease of the cell number ( $p < 0.05$ ). Interestingly, both PPE1 and PPE2 significantly decreased the number and size of cellular colonies. These findings demonstrate that pomegranate peel extracts exhibit cytotoxicity and effectively inhibit the proliferation of colorectal cancer cells (HCT116). Pomegranate peel extract has promising potential for future development as a natural anticancer agent.

**Keywords:** Pomegranate peel extract, Cytotoxicity, Colorectal cancer cells

## บทนำ

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรจำนวนมาก องค์การอนามัยโลกรายงานว่า มีผู้เสียชีวิตเกือบ 10 ล้านคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักพบเป็นสาเหตุการเสียชีวิตเป็นอันดับที่ 2 จากมะเร็งทั้งหมด[1] นอกจากนั้นมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ยังมีอุบัติการณ์เกิดเป็น 1 ใน 3 ของมะเร็งที่พบในเพศชายและหญิง โรคมะเร็งเกิดจากเซลล์ปกติที่กลายพันธุ์ (Transformation) เซลล์มะเร็งสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้เอง และสามารถแบ่งตัวไร้ขีดจำกัด[2,3] การรักษาโรคมะเร็งมีวิธีต่าง ๆ เช่น การผ่าตัด การฉายรังสีและการให้ยาเคมีบำบัด ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง ใช้ระยะเวลาในการรักษาอย่างต่อเนื่องและทำให้เกิดอาการข้างเคียงเกิดขึ้นได้[4,5]

เปลือกทับทิม (*Punica granatum* Linn. (Pomegranate) peel) หรือเปลือกแห้งของทับทิม ซึ่งเป็นสมุนไพรจีนชนิดหนึ่งที่แพทย์แผนจีนนิยมใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง มีรสเปรี้ยว ฝาด และมีฤทธิ์อุ่น มีสรรพคุณฝาดสมานลำไส้ ต้านอาการท้องเสีย ห้ามเลือด และฤทธิ์ต้านพยาธิ[6] ตามตำราไทย เปลือกทับทิมมีสรรพคุณแก้ท้องเสีย แก้บิด แก้แผลพุพองเน่าเปื่อย ฝาดสมาน สมานแผล ขับพยาธิ[7] ในเปลือกทับทิมประกอบไปด้วยสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) หลากหลายชนิด มีรายงานวิจัยพบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมมีสารกลุ่มแทนนิน ได้แก่ พุนิคาลาจิน (Punicalagin) กรดเอลลาจิก (Ellagic Acid) กรดแกลลิก (Gallic acid)[8,9] มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและชักนำให้เกิดการตาย (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เซลล์มะเร็งตับ[10,11] นอกจากนี้ พุนิคาลาจิน (Punicalagin) ยังส่งเสริมให้เกิดกระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว[12] และยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (anti-angiogenesis) และการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระดูกชนิดปฐมภูมิ[13] เอลลาจิกแทนนิน (Ellagitannins) จากเปลือกทับทิมเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ ช่วยในการชักนำการตายและหยุดเจริญในวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle arrest) ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) รวมถึงยับยั้ง nuclear factor kappa B (NF-κB) บรรเทาอาการเยื่อทางเดินอาหารอักเสบที่เกิดจากการได้รับ 5-Fluorouracil (5-FU) ในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้[14,15] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ สามารถลดระดับของ IL-1β และ IL-6 อีกทั้งยังเพิ่มระดับของ

Glutathione peroxidase, SOD, Catalase, และ IL-10[16] แม้ว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิมประกอบด้วยสารพฤกษเคมีที่แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดต่าง ๆ แต่ข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยเฉพาะเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักยังค่อนข้างจำกัด ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเปลือกทับทิม พุ่งเป้าหมายที่การทำลายเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ชนิด HCT116 ด้วยการทดสอบอัตราการรอดชีวิต โดยใช้กระบวนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Trypan Blue Exclusion การทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTS assay และ Clonogenic assay ผลการวิจัยมีประโยชน์เพื่อเป็นทางเลือกในการนำสารสกัดเปลือกทับทิมจากยาสมุนไพรจีนมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

## วัสดุและวิธีการ

การวิจัยนี้เป็นวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) ในห้องปฏิบัติการ (Laboratory Research) ศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษและการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ชนิด HCT116 ด้วยสารสกัดเปลือกทับทิม

### 1. การเตรียมสารสกัดเปลือกทับทิม

สารสกัดเอทานอลจากเปลือกทับทิม 2 ตัวอย่าง ได้แก่

1) สารสกัดเปลือกทับทิม 1 หรือ (Pomegranate peel extract 1 หรือ PPE1) เตรียมโดยนำเปลือกทับทิมแห้งผสมกับเอทานอล 60% ในอัตราส่วน 1:5 แล้วปั่นสารละลายด้วยเครื่องปั่นผสมสาร (Overhead Stirrers) ความเร็วรอบตั้งแต่ 300-500 รอบต่อนาที ทำการปั่นสาร 3 ชั่วโมง พัก 2 ชั่วโมง จนครบ 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 10-20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมารองหยาบด้วยผ้าขาวบาง 1 รอบ แล้วพักไว้ที่อุณหภูมิ 10-20 องศาเซลเซียส ทำซ้ำทั้งหมด 3 รอบ จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดมารองละเอียดด้วยเครื่องกรองสารละลายแบบสุญญากาศ (Filter glass vacuum) โดยใช้กระดาษกรอง WHATMAN Filter paper เบอร์ 1 ความละเอียดที่ 11  $\mu\text{m}$  จากนั้นนำมาระเหยแอลกอฮอล์ออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) แล้วทำให้เป็นผงแห้ง โดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dryer Benchtop)[17] จากนั้นชั่งน้ำหนักส่วนสารสกัด PPE1 ที่ได้ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส โดยไม่ให้โดนแสง ร่อนนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อไป

2) สารสกัดเปลือกทับทิมสำเร็จรูป (Pomegranate peel extract 2 หรือ PPE2) ซื้อจากบริษัท Sciyu Biotech Co.,Ltd., ประเทศจีน เป็นสารสกัดจากเอทานอล มีปริมาณสารสำคัญจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้แก่ Ellgalate acid (40%), polyphenols (10-70%) และ Punicalagins (30-40%)

การเตรียม PPE1 และ PPE2 ก่อนการทดสอบด้วยการละลายในเอทานอล เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นและกรองด้วย membrane filter 0.22  $\mu\text{m}$  แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และป้องกันแสง

### 2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HCT116 (ATCC, CCL247) ได้รับสนับสนุนจาก รศ.ดร.ประสิทธิ์ สุวรรณเลิศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี Fetal bovine serum 10 % และ 1% Streptomycin/Penicillin เพาะเลี้ยงเซลล์ในจานอาหาร บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ซึ่งระหว่างการเพาะเลี้ยงจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 48 ชั่วโมง

### 3. การประเมินอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HCT116 (Viability test) โดยวิธี Trypan Blue Exclusion Method

เตรียมเซลล์ HCT116 ที่ความหนาแน่น  $6 \times 10^4$  cells/ml ใน 12-well plate และปล่อยให้เซลล์เกาะผิวหน้าภาชนะโดยบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลาข้ามคืน 12-18 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดเปลือกทับทิม PPE1 และ PPE2 ที่ความเข้มข้น 25-200  $\mu\text{g/ml}$  เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ให้เก็บเซลล์ด้วยการปั่นตกตะกอน ที่ความเร็ว 1500 rpm 5 นาที และล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วเจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ต้องเติมซีรัม จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย 0.4% trypan blue dye แล้วเปิดสารละลายเซลล์ ลงบนอุปกรณ์นับเซลล์ (Hemocytometer) นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า และคำนวณหาอัตราการรอดชีวิต (%Viability) [18,19] โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Viability} = (\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มที่ได้รับสารสกัด} \times 100) / \text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มควบคุม}$$

### 4. การทดสอบฤทธิ์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 โดย MTS assay

การทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] (MTS) assay โดยใช้ Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, สหรัฐอเมริกา) เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด HCT116 ให้มีความหนาแน่น  $5 \times 10^3$  cells/well ในภาชนะ 96-well plate ในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดเปลือกทับทิม PPE1 และ PPE2 โดยให้ความเข้มข้น 25-75  $\mu\text{g/ml}$  ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ให้เติมสารละลาย MTS ปริมาณ 20  $\mu\text{l}$  ลงในแต่ละหลุม บ่มเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader [20,21]

### 5. การทดสอบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (self-renewal) ด้วยวิธี Clonogenic assay

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด HCT116 ใน 6-well plate บ่มเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดเปลือกทับทิม PPE1 และ PPE2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้ดูดสารละลายออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ (ที่ไม่มีสารสกัด) บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 9-10 วัน และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุกๆ 2-3 วัน เพื่อดูการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์เป็นกลุ่มโคลนี จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและล้างด้วย PBS แล้วตรึงเซลล์ด้วย 70% methyl alcohol และย้อมเซลล์ด้วย 1% crystal violet นับจำนวนเซลล์โคลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า [22]

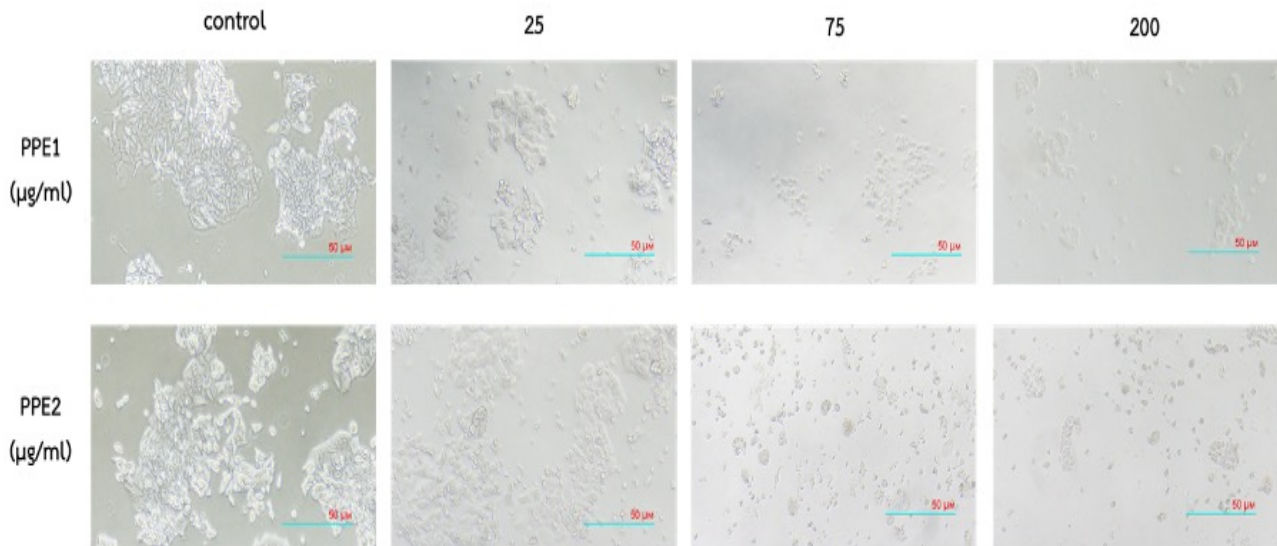
### 6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าที่ได้จากการทดสอบและทำการทดลองจำนวน 3 ครั้งในแต่ละการทดลอง แสดงในรูปแบบ ค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ) การวิเคราะห์หาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS ver.23 ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ใช้การทดสอบ Scheffé โดยระดับนัยสำคัญที่ใช้ในการระบุความแตกต่างที่ 0.05 ( $p < 0.05$ )

## ผลการศึกษา

### 1. ผลของสารสกัดเปลือกทับทิม ต่อการมีชีวิตรอดต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด HCT116

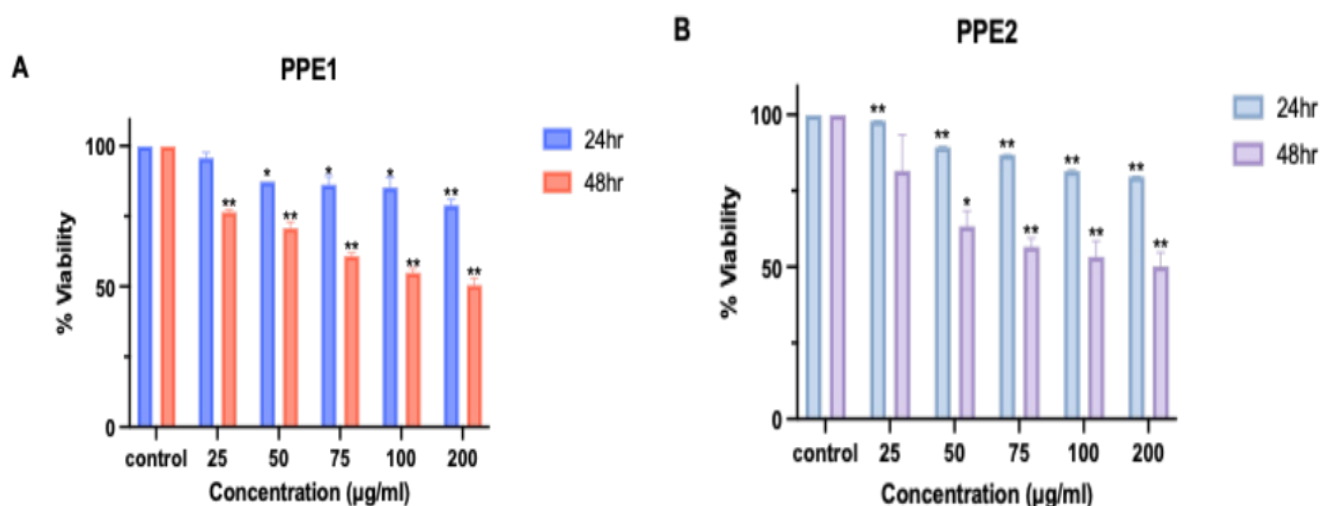
การทดสอบสารสกัดเปลือกทับทิมชนิด PPE1 และ PPE2 ต่อเซลล์ HCT116 ภายหลังจากบ่มเซลล์และนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่าเซลล์ HCT116 ที่ได้รับสารสกัด PPE1 ที่ความเข้มข้น 25-200  $\mu\text{g/ml}$  มีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด โดยพบว่ามีปริมาณเซลล์ลดลงและมีลักษณะหดตัวเป็นวงกลมมากขึ้นภายหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสอดคล้องกับเซลล์ HCT116 ที่ได้รับสารสกัดเปลือกทับทิมชนิด PPE2



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด HCT116 ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและไม่ได้รับสารสกัดเปลือกทับทิม PPE1 และ PPE2 ที่เวลา 24 ชั่วโมง (สเกลบาร์ = 50  $\mu\text{m}$ )

จากนั้นทดสอบอัตราการรอดชีวิต พบว่าเซลล์ HCT116 มีอัตราการรอดชีวิตลดลง เมื่อได้รับสารสกัด PPE1 และ PPE2 โดยอัตราการรอดชีวิตลดลงตามลำดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น แสดงดังรูปที่ 2A และ 2B พบว่าเมื่อบ่มสกัด PPE1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 95.85%, 87.40%, 86.32%, 85.29% และ 78.97% ตามลำดับความเข้มข้นตั้งแต่ 25  $\mu\text{g/ml}$  ถึง 200  $\mu\text{g/ml}$  และสารสกัด PPE2 มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 98.04%, 89.41%, 86.87%, 81.58% และ 79.73% ที่ความเข้มข้นเท่ากัน จากนั้นเมื่อบ่มเซลล์เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง สารสกัดทั้งสองชนิดทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตลดลง โดยมีค่าอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 76.62%, 70.84%, 60.86%, 54.94% และ 50.55% เมื่อบ่มด้วย PPE1 และเซลล์ HCT116 ที่บ่มด้วย PPE2 มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 81.63%, 63.41%, 56.60%, 53.30% และ 50.15% ตามลำดับความเข้มข้น

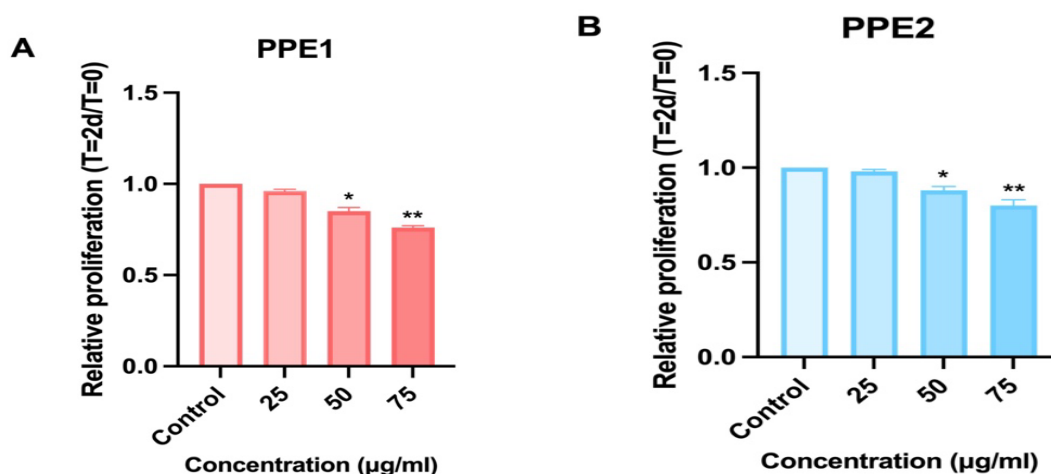
จากผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิต พบว่า ที่ 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้นมากกว่า 200  $\mu\text{g/ml}$  และพบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง สารสกัด PPE1 และสารสกัด PPE2 ที่ความเข้มข้น 200  $\mu\text{g/ml}$  มีอัตราการมีชีวิตรอด ประมาณ 50% จากนั้นผู้วิจัยเลือกความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิมทั้งสองชนิดที่ความเป็นพิษต่ำ เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อไป



**รูปที่ 2** การทดสอบการมีชีวิตรอดต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด HCT116 ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง  
(A) ทดสอบด้วยสารสกัด PPE1, (B) ทดสอบด้วยสารสกัด PPE2 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

## 2. ผลการทดสอบความสามารถในการลดจำนวนเซลล์ HCT116 ด้วยสารสกัดเปลือกทับทิม

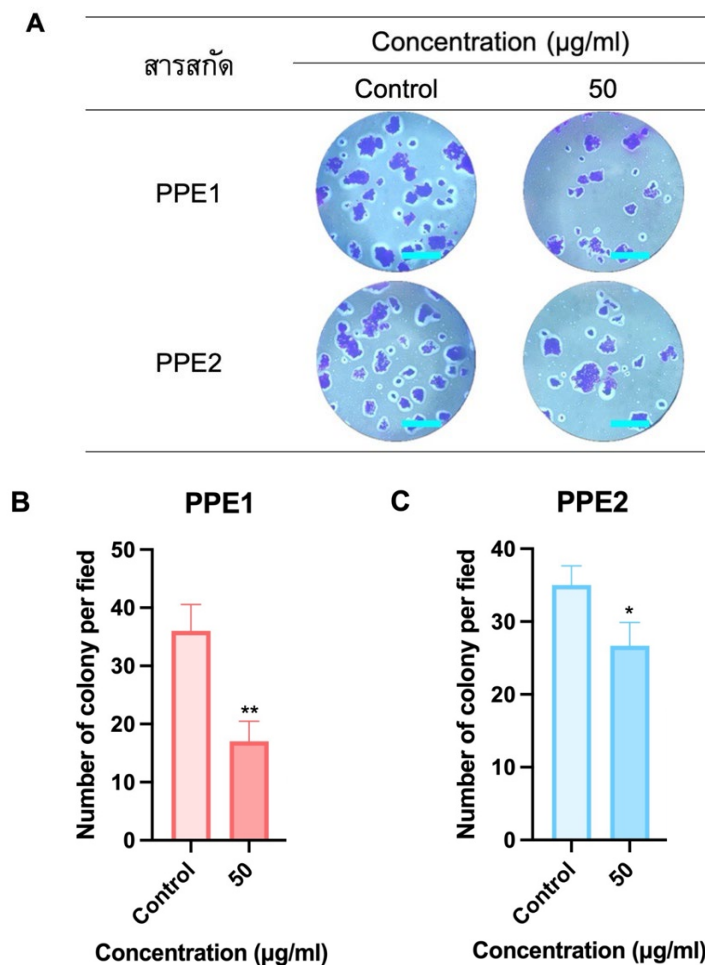
จากนั้นเลือกความเข้มข้นที่เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 50 เพื่อทดสอบความสามารถในการลดจำนวนเซลล์ HCT116 ด้วยสารสกัดเปลือกทับทิม ด้วยวิธี MTS assay พบว่าเซลล์ HCT116 กลุ่มที่ได้รับสารสกัด PPE1 ที่ความเข้มข้น 25-75 µg/ml สามารถลดจำนวนเซลล์ HCT116 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$ ) ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้รับ และที่ความเข้มข้นเดียวกัน กลุ่มที่ได้รับสารสกัด PPE2 สามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$ ) และขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้รับ แสดงดังรูปที่ 3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอทานอลจากเปลือกทับทิม ทั้งชนิด PPE1 และ PPE2 มีประสิทธิภาพการลดจำนวนต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด HCT116



**รูปที่ 3** ผลการทดสอบการลดจำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด HCT116 ด้วยสารสกัดเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง (A) ทดสอบด้วยสารสกัด PPE1, (B) ทดสอบด้วยสารสกัด PPE2 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

### 3. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด HCT116 ของสารสกัดเปลือกทับทิม

การทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนต่อเซลล์ HCT116 ของสารสกัดเปลือกทับทิม ด้วยวิธี clonogenic assay เป็นการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจากเซลล์เดี่ยวที่เจริญไปเป็นกลุ่มเซลล์โคโลนี ผลการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ พบว่า สารสกัดเปลือกทับทิม PPE1 และ PPE2 ทำให้กลุ่มเซลล์โคโลนีมีจำนวนลดลงและขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด ดังรูปที่ 4A และจากการนับจำนวนโคโลนี พบว่า ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเปลือกทับทิม PPE1 มีจำนวนโคโลนีเท่ากับ  $17 \pm 3.46$  ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ  $36 \pm 4.17$  โคโลนี ผลการทดสอบด้วยสารสกัด PPE2 สอดคล้องกับสารสกัด PPE1 ซึ่งพบว่าจำนวนโคโลนีลดลง เท่ากับ  $26.67 \pm 3.21$  โคโลนี ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ  $35 \pm 2.64$  โคโลนี แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเปลือกทับทิมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด HCT116



**รูปที่ 4** การทดสอบการยับยั้งการแบ่งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด HCT116 ของสารสกัดเปลือกทับทิม ที่เวลา 48 ชั่วโมง (A) แสดงขนาดและจำนวนโคโลนี, (B) แสดงจำนวนโคโลนีที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัด PPE1, (C) แสดงจำนวนโคโลนีที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัด PPE2 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) (สเกลบาร์= 50  $\mu\text{m}$ )

## วิจารณ์

ในการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเปลือกทับทิมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ชนิด HCT116 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า จากการทดสอบ Trypan Blue Exclusion Method และ MTS assay ของสารสกัดเปลือกทับทิมทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์และลดจำนวนเซลล์ลง จากการทดสอบ Clonogenic assay แสดงให้เห็นการยับยั้งการแบ่งเซลล์ HCT116 โดยแสดงให้เห็นผลการยับยั้งเซลล์ HCT116 สอดคล้องกันเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากเปลือกทับทิมทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ตัวอย่างสารสกัดเปลือกทับทิมและสารสกัดเปลือกทับทิมสำเร็จรูป พบว่าตัวอย่างสารสกัดเปลือกทับทิม มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารสกัดเปลือกทับทิมสำเร็จรูป เมื่อเปรียบเทียบในความเข้มข้นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบของ Amit B. Shirode และคณะ [23] พบว่า ผิวนอกของเปลือกทับทิม (Fruit skin) สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น 0-100 µg/ml และระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น 0-96 ชั่วโมงได้ รวมถึงแสดงให้เห็นกลไกที่เกี่ยวข้องของการยับยั้งเซลล์ด้วยการยับยั้งวัฏจักรเซลล์ ระยะ G2/M และการเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis นอกจากนี้ การศึกษาของจิรายุส วรรณโกคา และ จิณณวัตร มานะเสถียร [24] พบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ MCF-7 โดยการชักนำให้เกิดการแตกหักของ DNA และการเกิด apoptosis ได้ และการศึกษาของ Mostafa I Waly และคณะ [25] พบว่า สารสกัดจากเปลือกทับทิมสามารถยับยั้งการเกิดรอยโรคก่อนมะเร็งลำไส้ใหญ่ ผ่านกลไกการต้านอนุมูลอิสระ และลดความเครียดออกซิเดชันในหนูทดลอง

สารสกัดเปลือกทับทิมมีส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่ Ellagic acid ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า Ellagic acid มีบทบาทในการยับยั้งมะเร็ง ได้แก่ มะเร็งปากมดลูก โดยผ่านกระบวนการยับยั้งสัญญาณ AKT/mTOR ด้วยการกระตุ้นการแสดงออกยีน IGFBP7[26] นอกจากนี้การทดสอบกลไกระดับเซลล์ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่า Ellagic acid กระตุ้นการตายของเซลล์ (Apoptosis) และหยุดวัฏจักรของเซลล์ (Cell cycle arrest) ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้[27] แสดงให้เห็นว่า Ellagic acid ที่มีมากในสารสกัดเปลือกทับทิมมีบทบาทในการยับยั้งมะเร็งได้ อย่างไรก็ตาม ควรมีการวิเคราะห์หาสาระสำคัญในสารสกัดเปลือกทับทิม เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณสาร ฤทธิ์ทางชีวภาพและศึกษากลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในอนาคต

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนสนับสนุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund) ประจำปีงบประมาณ 2566 เลขที่สัญญา FF66-RIM098

## เอกสารอ้างอิง

- [1] World Health Organization. Cancer [Internet]. Geneva: World Health Organization; [cited 2025 Apr 4]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [2] Sawicki T, Ruskowska M, Danielewicz A, Niedzwiedz E, Arlukowicz T, Przybylowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(9):2025.
- [3] Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31–46.
- [4] Esmeeta A, Adhikary S, Dharshna V, Swarnamughi P, Ummul Maqsummiya Z, Banerjee A, et al. Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. *Biomed Pharmacother*. 2022;153:113384.

- [5] Engstrand J, Nilsson H, Strömberg C, Jonas E, Freedman J. Colorectal cancer liver metastases – a population-based study on incidence, management and survival. *BMC Cancer*. 2018;18(1):78.
- [6] Yang B, Zhong G. Traditional Chinese pharmacology. 3rd ed. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press; 2021. (In Chinese)
- [7] Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University. Thai herbal database [Internet]. Ubon Ratchathani: UBU Herb Garden; [cited 2025 Apr 5]. Available from: <https://phar.ubu.ac.th/herb-DetailPhargarden/230>. (In Thai)
- [8] Mendes PM, Gomes Fontoura GM, Rodrigues LDS, Souza AS, Viana JPM, Fernandes Pereira AL, et al. Therapeutic Potential of *Punica granatum* and Isolated Compounds: Evidence-Based Advances to Treat Bacterial Infections. *Int J Microbiol*. 2023;2023:4026440.
- [9] Pengkumsri N, Kaewdoo K, Leeprechanon W, Sundaram Sivamaruthi B. Influence of Extraction Methods on Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Some of the Commonly Used Plants in Thailand. *Pak J Biol Sci*. 2019;22(3):117–26.
- [10] Teniente SL, Flores-Gallegos AC, Esparza-González SC, Campos-Múzquiz LG, Nery-Flores SD, Rodríguez-Herrera R. Anticancer Effect of Pomegranate Peel Polyphenols against Cervical Cancer. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(1):127.
- [11] Elbakry MMM, ElBakary NM, Hagag SA, Hemida EHA. Pomegranate Peel Extract Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Ionizing Radiation, Induces Apoptosis and Inhibits MAPK, JAK/STAT3,  $\beta$ -Catenin/NOTCH, and SOCS3 Signaling. *Integr Cancer Ther*. 2023;22:15347354221151021.
- [12] Tamborlin L, Sumere BR, de Souza MC, Pestana NF, Aguiar AC, Eberlin MN, et al. Characterization of pomegranate peel extracts obtained using different solvents and their effects on cell cycle and apoptosis in leukemia cells. *Food Sci Nutr*. 2020;8(10):5483–96.
- [13] Huang T, Zhang X, Wang H. Punicalagin inhibited proliferation, invasion and angiogenesis of osteosarcoma through suppression of NF-KB signaling. *Mol Med Rep*. 2020;22(3):2386–94.
- [14] Subkorn P, Norkaew C, Deesrisak K, Tanyong D. Punicalagin, a pomegranate compound, induces apoptosis and autophagy in acute leukemia. *PeerJ*. 2021;9:e12303.
- [15] Sharma K, Kesharwani P, Prajapati SK, Jain A, Jain D, Mody N, et al. An Insight into Anticancer Bioactives from *Punica granatum* (Pomegranate). *Anticancer Agents Med Chem*. 2022;22(4):694–702.
- [16] Sayed S, Alotaibi SS, El-Shehawi AM, Hassan MM, Shukry M, Alkafafy M, et al. The Anti-Inflammatory, Anti-Apoptotic, and Antioxidant Effects of a Pomegranate-Peel Extract against Acrylamide-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Life (Basel)*. 2022;12(2):224.
- [17] Huang D, Qiu H, Luo W, Xu G, Liang Q, Deng H. Research on separation, purification and antioxidation of polyphenols from pomegranate peel. *Bot Res*. 2018;7(5):514–22. (In Chinese)
- [18] Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111:A3.B.1-A3.B.3.
- [19] Ratanabunyong S, Siriwaseree J, Wanaragthai P, Krobthong S, Yingchutrakul Y, Kuaprasert B, et al. Exploring the apoptotic effects of sericin on HCT116 cells through comprehensive nanostring transcriptomics and proteomics analysis. *Sci Rep*. 2024;14(1):2366.

- [20] Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell viability assays. In: Markossian S, Grossman A, Arkin M, Auld D, Austin C, Baell J, et al., editors. *Assay Guidance Manual*, 1st ed. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. [Internet]. [cited 2025 Apr 5]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065>.
- [21] 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;528(3):586–93.
- [22] 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;14(4):266–76.
- [23] Shirole AB, Kovvuru P, Chittur SV, Henning SM, Heber D, Reliene R. Antiproliferative effects of pomegranate extract in MCF-7 breast cancer cells are associated with reduced DNA repair gene expression and induction of double strand breaks. *Mol Carcinog*. 2014;53(6):458–70.
- [24] Manasatian J, Woraratphoka J. Pomegranate peel water extract induces apoptosis in breast cancer cells. *Health Sci Tech Rev*. 2022;15(2):42–58. (In Thai)
- [25] Waly MI, Ali A, Guizani N, Al-Rawahi AS, Farooq SA, Rahman MS. Pomegranate (*Punica granatum*) peel extract efficacy as a dietary antioxidant against azoxymethane-induced colon cancer in rat. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(8):4051–5.
- [26] Guo H, Zhang D, Fu Q. Inhibition of Cervical Cancer by Promoting IGFBP7 Expression Using Ellagic Acid from Pomegranate Peel. *Med Sci Monit*. 2016;22:4881–6.
- [27] Ni X, Shang FS, Wang TF, Wu DJ, Chen DG, Zhuang B. Ellagic acid induces apoptosis and autophagy in colon cancer through the AMPK/mTOR pathway. *Tissue Cell*. 2023;81:102032.