

ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดใผ่จัดต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HCT116

Anticancer activity of *Pogonatherum paniceum* Extract against HCT116 Human Colorectal Cancer Cells

รัชฎา ประภาสวัต¹ สริดาพา บุญศรีกุล² เบนญาลักษณ์ มูลหล้า² ทศนีย์ ศรีโพธิ์³ ชลวัชร ชัยชาญ⁴

ภัสรี พิมลรัมย์⁵ กานต์ชนก สุขบท⁵ และ อัญชลี ระวังการ^{2*}

Ratsada Praphasawat¹ Saridapha Boonsrikun² Benyalak Moomla² Thatsani Sripho³ Chonlawat Chaichan⁴

Phatcharee Pimalram⁵ Karnchanok Sukhabot⁵ and Anchalee Rawangkan^{2*}

¹ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

²สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

³สาขาปฏิบัติการฉุกเฉินการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

⁴ภาควิชาวิทยาการวิจัยและนวัตกรรมทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

⁵สาขาวิชาการแพทย์แผนจีน คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

¹Department of Pathology, School of Medicine, University of Phayao

²Division of Microbiology and Parasitology, School of Medical Sciences, University of Phayao

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

⁴Department of Research and Medical Innovation, Faculty of Medicine Vajira Hospital, Navamindradhiraj University

⁵Department of Traditional Chinese Medicine, School of Public Health, University of Phayao

*E-mail: ewmedsci@gmail.com, anchalee.ra@up.ac.th

Received: Sep 18, 2023

Revised: Oct 28, 2023

Accepted: Oct 30, 2023

บทคัดย่อ

ใผ่จัดเป็นพืชตระกูลหญ้าที่ทราบกันดีว่ามีสรรพคุณด้านการขับสารพิษ แต่มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดใผ่จัดต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด HCT116 โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของสารสกัดใผ่จัดต่อความมีชีวิตของเซลล์ HCT116 โดยวิธี MTT assay การเพิ่มจำนวนเซลล์ HCT116 โดยวิธี clonogenic assay การเคลื่อนที่ของเซลล์ HCT116 โดยวิธี wound healing assay และวัฏจักรเซลล์ของเซลล์ HCT116 โดยวิธี flow cytometry ผลการทดลองพบว่าสารสกัดใผ่จัดทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HCT116 ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดใผ่จัด โดยค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ HCT116 เท่ากับ 81.92, 67.03 และ 63.27 เมื่อเพิ่มเซลล์ HCT116 กับสารสกัดใผ่จัดที่มีความเข้มข้น 1, 1.25 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดใผ่จัดสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนโคโลนี และลดการเคลื่อนที่ของเซลล์ HCT116 รวมทั้งชักนำให้เกิดการหยุดของวัฏจักรเซลล์ของเซลล์ HCT116 ที่ระยะ G0/G1 ได้ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใผ่จัดมีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HCT116 และน่าจะเป็นทางเลือกสำหรับการรักษาโรคมะเร็งได้

คำสำคัญ: ใผ่จัด ฤทธิ์ต้านมะเร็ง เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด HCT116

Abstract

Pogonatherum paniceum is a type of grass known to have detoxification activity. However, very few studies of its anticancer activity have been evident. Therefore, this research aimed to examine the anticancer activity of *P. paniceum* extract against HCT116 human colorectal cancer cells. This research investigated the effect

of *P. paniceum* extract on viability of HCT116 cells by the MTT assay, proliferation of HCT116 cells by the clonogenic assay, migration of HCT116 cells by the wound healing assay and cell cycle of HCT116 cells by flow cytometry. The results demonstrated that the *P. paniceum* extract caused the reduction in viability of HCT116 cells in a dose dependent manner. The percentages of viability of HCT116 cells were 81.92, 67.03 and 63.27 when HCT116 cells were incubated with 1, 1.25 and 1.5 mg/mL of the *P. paniceum* extract for 48 h, respectively. It was also found that the *P. paniceum* extract was able to suppress proliferation and diminish migration of HCT116 cells. It was also able to induce cell cycle arrest of HCT116 cells at G0/G1 phase. This research suggested that the *P. paniceum* extract exhibited anticancer activity against HCT116 human colorectal cancer cells and might be an alternative for cancer treatment.

Keywords: *Pogonatherum paniceum*, Anticancer activity, HCT116 human colorectal cancer cell

1. บทนำ

โรคมะเร็ง (cancer) คือ โรคที่มีความผิดปกติของเซลล์ในอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย โดยเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์ ก่อให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็งที่มีการเจริญเติบโตอย่างไม่จำกัดและควบคุมไม่ได้ ทำให้เกิดเป็นก้อนเนื้อมะเร็งที่เติบโตรบกวนการทำงานของเซลล์ปกติ และสามารถลุกลามแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นได้ทั่วร่างกาย [1] จากรายงานขององค์การอนามัยโลกในปี ค.ศ. 2020 พบว่ามีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่สูงถึง 19.3 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง ประมาณ 9.9 ล้านคน ทั้งนี้โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักพบมากเป็นอันดับ 3 และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรโลกสูงเป็นอันดับ 2 ของมะเร็งทั้งหมด [2] การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น การรักษาด้วยการผ่าตัด การฉายรังสี เคมีบำบัด ภูมิคุ้มกันบำบัด และการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังพบผลข้างเคียงจากการรักษาหรือการกลับมาเป็นซ้ำใหม่ได้ [3] ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาหาแนวทางการรักษาอื่น เพื่อที่จะทำให้การรักษาประสบความสำเร็จมากยิ่งขึ้น พืชสมุนไพรถูกนำมาใช้รักษาโรคมะเร็งมาอย่างยาวนาน [4], [5] เนื่องจากเป็นแหล่งของสารสำคัญทางธรรมชาติหลายชนิด เช่น กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่มีฤทธิ์ป้องกันและรักษามะเร็งได้หลายชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งตับอ่อน มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น [6]

ไผ่จืด หรือ *Pogonatherum paniceum* (Lam.) Hack หรือไผ่จืด อยู่ในวงศ์ Poaceae เป็นพืชตระกูลหญ้า สูง 1 เมตร มีเหง้าหรือหน่อใต้ดิน ลำต้น เป็นข้อปล้องเหมือนไม้ แตกเป็นกอหนาแน่น แต่ละกอไม่น้อยกว่า 100 ต้น ไม่มีขน ใบเดี่ยว

ออกสลับรูปรีหรือรูปใบหอก ปลายแหลม โคนมน สีเขียวสด มีงานวิจัยพบว่าไผ่จืดมีสรรพคุณด้านการขับสารพิษ และต้านอนุมูลอิสระได้โดยการสังเคราะห์เอนไซม์ GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMPase) เพิ่มมากขึ้น เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม [7] ส่วนฤทธิ์ด้านการอักเสบของไผ่จืด คาดว่าเป็นผลมาจากความสามารถในการลดการแสดงออกของยีน p22^{phox} และ iNOS [8] อย่างไรก็ตามที่ผ่านมามีการศึกษาน้อยมากเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งของไผ่จืด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดไผ่จืดต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด HCT116

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การเตรียมสารสกัด

สารสกัดไผ่จืดที่ใช้ในการศึกษานี้ใช้น้ำเป็นตัวสกัดและทำให้เป็นผงแห้งด้วยวิธี lyophilization โดยได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์รุ่งทิพย์ ทองบุญโท คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จากนั้น เตรียมสารสกัดไผ่จืดโดยละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ กรองด้วย membrane filter ขนาดรูพรุน (pore size) 0.22 ไมโครเมตร และเก็บสารละลายในให้พ้นแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

2.2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ HCT116

เพาะเลี้ยงเซลล์ HCT116 (ATCC เลขที่ CCL-287TM) ในอาหาร Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และยาปฏิชีวนะ (penicillin/streptomycin) ได้เป็นอาหารสำเร็จรูปเรียกว่า "Completed media" จากนั้นปล่อยให้เซลล์เจริญในตู้บ่มที่

มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเซลล์ทุก ๆ 3 วัน การถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยงทำโดยวิธีการแยกเซลล์ออกจากพื้นผิว ด้วยการเติม 0.25% Trypsin/EDTA โดยหลังจากดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffered saline (PBS) จากนั้นเติม trypsin 1 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มนาน 2 นาที แล้วนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) เพื่อสังเกตการหลุดออกจากพื้นผิวภาชนะของเซลล์ แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม Completed media จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดตะกอนของเซลล์ ใส่ในภาชนะใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์เจริญต่อไป

2.3. การศึกษาผลของสารสกัดไผ่จืดต่อความมีชีวิตของเซลล์ HCT116 โดยวิธี MTT assay

เตรียมเซลล์ HCT116 ที่ความเข้มข้น 4×10^4 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร แล้วดูดเซลล์ HCT116 ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96 well-plate และให้เซลล์เกาะที่พื้นผิวภาชนะ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีสารสกัดไผ่จืด ความเข้มข้น 1, 1.25 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มควบคุมไม่เติมสารสกัด แล้วนำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงดูด MTT ออก แล้วเติม DMSO ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader จากนั้นคำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ [9] ดังนี้

$$\% \text{ Viability} = (\text{OD}_E / \text{OD}_C) \times 100$$

เมื่อ

OD_E = ค่า OD ของกลุ่มสารสกัด

OD_C = ค่า OD ของกลุ่มควบคุม

2.4. การศึกษาผลของสารสกัดไผ่จืดต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ HCT116 โดยวิธี clonogenic assay

เตรียมเซลล์ HCT116 ที่ความเข้มข้น 3×10^2 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร จากนั้นดูดเซลล์ HCT116 ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ใน 6-well plate ให้เซลล์เกาะที่พื้นผิวภาชนะ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดไผ่จืดความเข้มข้น 0.75, 1 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มควบคุมไม่เติมสารสกัด จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ และบ่มต่อเป็นเวลา 7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเก่าออกทุก ๆ 2-3 วัน จากนั้นล้างเซลล์ด้วย cold-PBS นำมาตรึงเซลล์ (fixation) ด้วย cold-methanol เป็นเวลา 20 นาที แล้วย้อมเซลล์ด้วยสี 1% crystal violet เป็นเวลา 15 นาที จึงล้างออกด้วย PBS ตรวจสอบผลการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ และนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏในแต่ละความเข้มข้น [10]

2.5. การศึกษาผลของสารสกัดไผ่จืดต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ HCT116 โดยวิธี wound healing assay

เตรียมเซลล์ HCT116 ที่ความเข้มข้น 6×10^5 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร แล้วดูดเซลล์ HCT116 ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well-plate แล้วปล่อยให้เซลล์เกาะที่พื้นผิวภาชนะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย DMEM ที่ไม่เติม serum นำไปเลี้ยงต่อในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสร้างระยะห่างระหว่างเซลล์ (wound) โดยการกรีดผิวหน้าเซลล์ด้วย sterile tip ขนาด 200 ไมโครลิตร ล้างเศษเซลล์ที่หลุดออกด้วย PBS และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดไผ่จืดความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และวัดระยะห่างของ wound เริ่มต้นและที่เวลา 24 ชั่วโมง นำมาคำนวณร้อยละการปิดรอยแผล [11] ดังนี้

$$\% \text{ Wound closure} = 1 - (\text{WD}_{24} / \text{WD}_0) \times 100$$

เมื่อ

WD_{24} = ระยะห่างของ wound ที่เวลา 24 ชั่วโมง

WD_0 = ระยะห่างของ wound เริ่มต้น

2.6. การศึกษาผลของสารสกัดไผ่จืดต่อวัฏจักรเซลล์ของเซลล์ HCT116 โดยวิธี flow cytometry

หลังจากบ่มเซลล์ HCT116 กับสารสกัดไผ่จืดที่มีความเข้มข้น 1, 1.25 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นล้างเซลล์ด้วย cold-PBS ที่เติม 1% FBS แล้วตรึงเซลล์ด้วย 70% cold-methanol เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย cold-PBS เติมสารละลาย RNAase A เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แล้วบ่มในที่มีดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วย้อมเซลล์ด้วยโพพรพิเดียมไอโอไดด์ (propidium iodide) ที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ DNA content ด้วยเครื่อง Fluorescence-activated cell sorter (FACS) [12]

2.7. การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองแสดงเป็นค่า Mean \pm SD จากการทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองใช้วิธี One-Way ANOVA วิเคราะห์แบบ Dunnett's multiple comparison test โดยความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างข้อมูลถูกพิจารณาที่ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 5.0

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1. ผลของสารสกัดไผ่จืดต่อความมีชีวิตของเซลล์ HCT116

จากการทดสอบผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ HCT116 ด้วยวิธี MTT assay ของสารสกัดไผ่จืดที่มีความเข้มข้น 1, 1.25 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อบ่มเซลล์ HCT116 กับสารสกัดไผ่จืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ชัดเจน (Figure 1) และเมื่อบ่มต่อ

ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีการเจริญดีและเพิ่มจำนวนหนาแน่น ในขณะที่กลุ่มทดสอบมีความหนาแน่นของเซลล์น้อยลง (Figure 2) เมื่อวิเคราะห์ค่าร้อยละความมีชีวิต (% Viability) ของเซลล์ HCT116 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเติมสารสกัดไผ่จืดที่มีความเข้มข้นมากขึ้นจะทำให้ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งเท่ากับ 81.92, 67.03 และ 63.27 เมื่อเติมสารสกัดไผ่จืดที่มีความเข้มข้น 1, 1.25 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ (Figure 3) เมื่อเปรียบเทียบผลงานวิจัยนี้กับผลงานวิจัยก่อนหน้านั้นพบว่าสารสกัดไผ่จืดที่ใช้ในการศึกษานี้ทำให้เซลล์ HCT116 มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นระดับเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของวิธีการที่ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ [13]

3.2. ผลของสารสกัดไผ่จืดต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ HCT116

จากการทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ HCT116 ของสารสกัดไผ่จืดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.75, 1 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี clonogenic assay พบว่า กลุ่มควบคุม (Figure 4A) มีโคโลนีขนาดใหญ่และจำนวนมากกว่ากลุ่มที่เติมสารสกัด (Figure 4B, C, D) จากกราฟแสดงจำนวนของโคโลนีของเซลล์ HCT116 (Figure 5) พบว่าเมื่อใช้สารสกัดไผ่จืดที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.75, 1 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จำนวนโคโลนีที่พบเท่ากับ 4.75 ± 1.5 , 3.25 ± 2.06 และ 1.25 ± 0.5 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ 10 ± 1.15 โคโลนี การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดไผ่จืดเพิ่มขึ้นทำให้จำนวนโคโลนีลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นสารสกัดไผ่จืดสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ HCT116 ได้

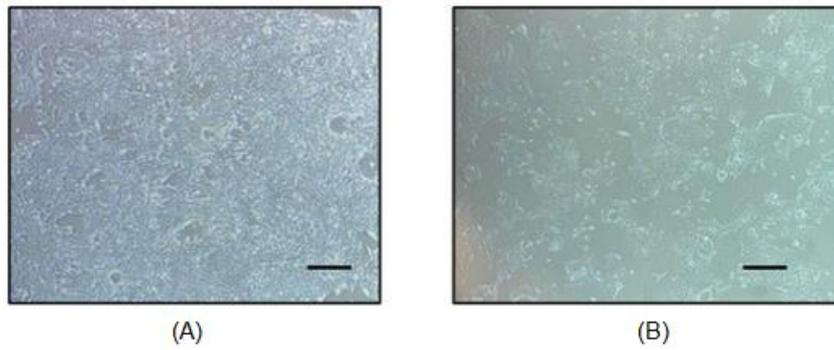


Figure 1 Change in cellular morphology of HCT116 cells after treatment with *P. paniceum* extract for 24 h analyzed by phase contrast microscopy; Scale bar = 50 μ m
(A) Untreated cells and (B) Cells treated with 1.5 mg/mL *P. paniceum* extract

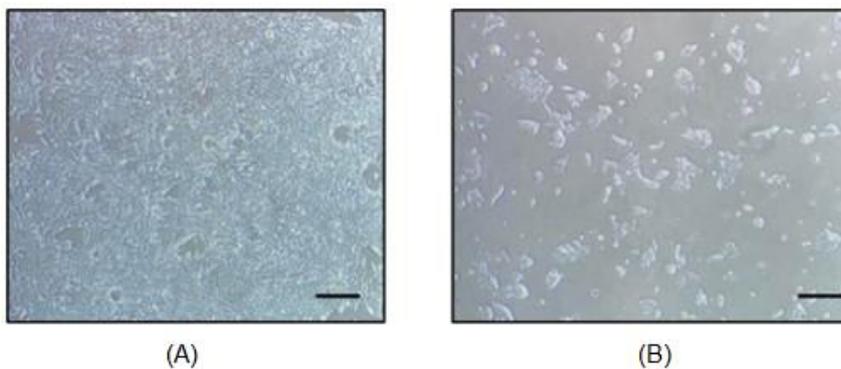


Figure 2 Change in cellular morphology of HCT116 cells after treatment with *P. paniceum* extract for 48 h analyzed by phase contrast microscopy; Scale bar = 50 μ m
(A) Untreated cells and (B) Cells treated with 1.5 mg/mL *P. paniceum* extract

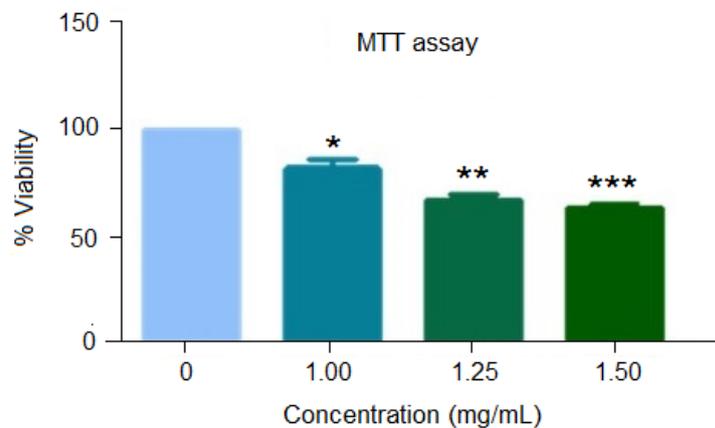


Figure 3 Effect of *P. paniceum* extract on cell viability of HCT116 cells after treatment with *P. paniceum* extract for 48 h (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)

*, ** and *** indicate significant difference compared with the control (0 mg/mL of the extract).

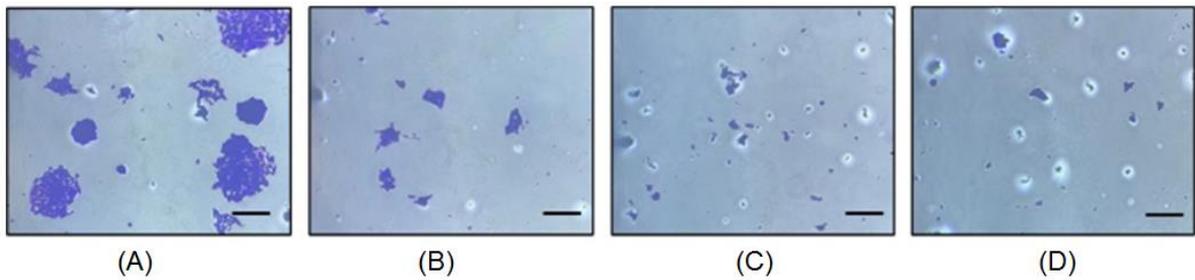


Figure 4 Antiproliferative activity of *P. paniceum* extract against HCT116 cells; Scale bar = 50 μ m
(A) Untreated cells; (B)-(D) Cells treated with 0.75, 1, 1.25 mg/mL *P. paniceum* extract, respectively

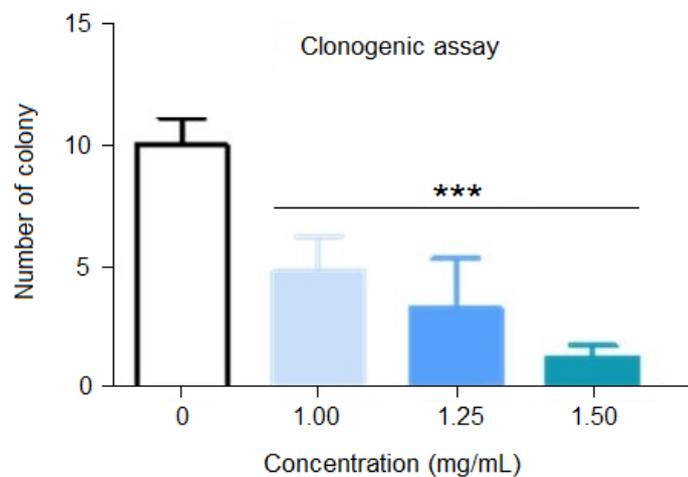


Figure 5 Effect of *P. paniceum* extract on proliferation of HCT116 cells (***) = $p < 0.001$
*** indicates significant difference compared with the control (0 mg/mL of the extract).

3.3. ผลของสารสกัดไผ่จืดต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ HCT116

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ HCT116 ด้วยวิธี wound healing assay โดยใช้สารสกัดไผ่จืดที่ความเข้มข้น 0.75, 1 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร บ่มเป็นเวลา 0, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่า รอยกรีด (รอยแผล) ที่พบในกลุ่มควบคุมมีขนาดที่แคบลง ในขณะที่รอยกรีดที่พบในกลุ่มที่เติมสารสกัดไผ่จืดมีขนาดเท่าเดิม โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เวลา 24 ชั่วโมง (Figure 6) เมื่อคำนวณร้อยละการปิดรอยแผล (% Wound closure) พบมีค่าเท่ากับ 38.11, 35.69 และ 30.05 เมื่อเติมสารสกัดไผ่จืดความเข้มข้นที่ 0.75, 1 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าร้อยละการปิด

รอยแผล เท่ากับ 42.46 (Figure 7) การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดไผ่จืดสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ HCT116 ทำให้เซลล์ดังกล่าวไม่สามารถเคลื่อนที่มาปิดรอยแผลได้ ค่าร้อยละการปิดแผลของชุดทดลองที่มีการเติมสารสกัดไผ่จืดจึงต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัดไผ่จืด ถึงแม้ว่าความแตกต่างของค่าดังกล่าวจะไม่มาก แต่ก็ถือว่าสารสกัดไผ่จืดมีแนวโน้มในการลดการเคลื่อนที่ของเซลล์ HCT116 การที่ค่าร้อยละการปิดแผลของชุดทดลองกับชุดควบคุมไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดไผ่จืดที่ใช้ในการทดลองนี้อาจน้อยเกินไป หากมีการเพิ่มความเข้มข้นขึ้นอาจทำให้ค่าดังกล่าวของชุดทดลองกับชุดควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

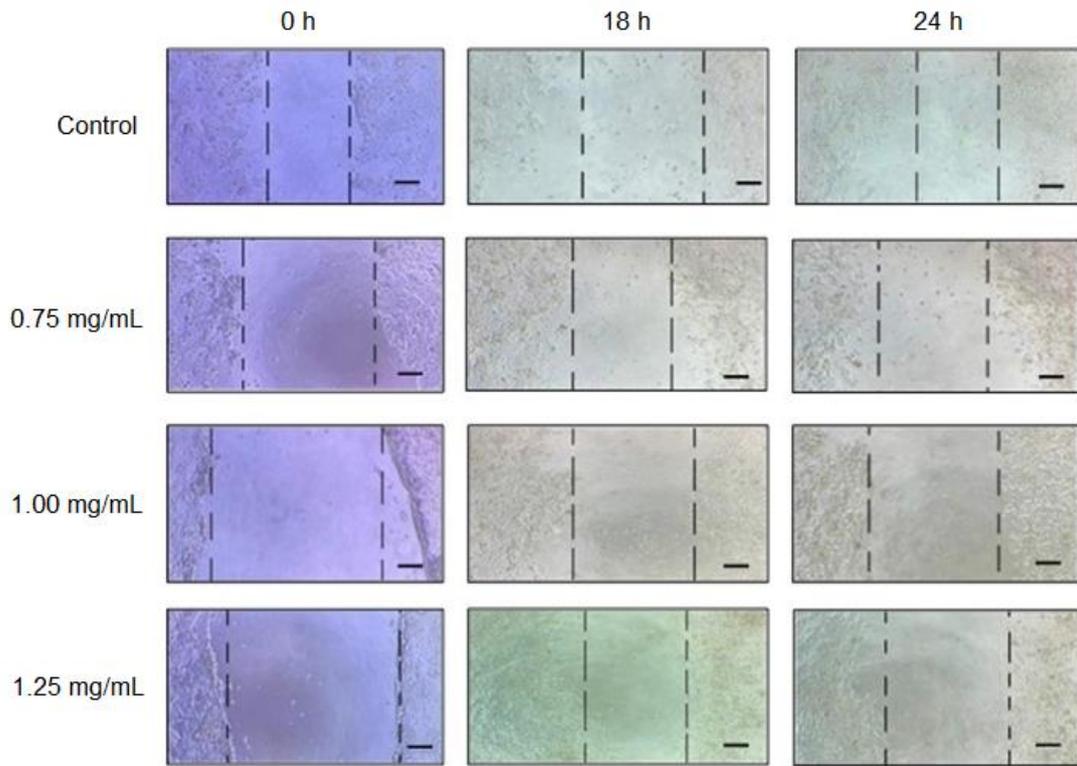


Figure 6 Antimigration activity of *P. paniceum* extract against HCT116 cells; Scale bar = 50 μ m

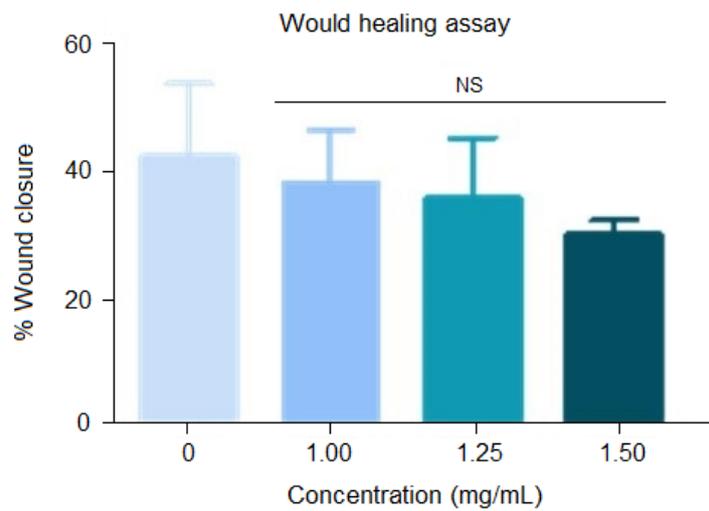


Figure 7 Effect of *P. paniceum* extract on wound closure of HCT116 cells

NS indicates non-significant difference compared with the control (0 mg/mL of the extract).

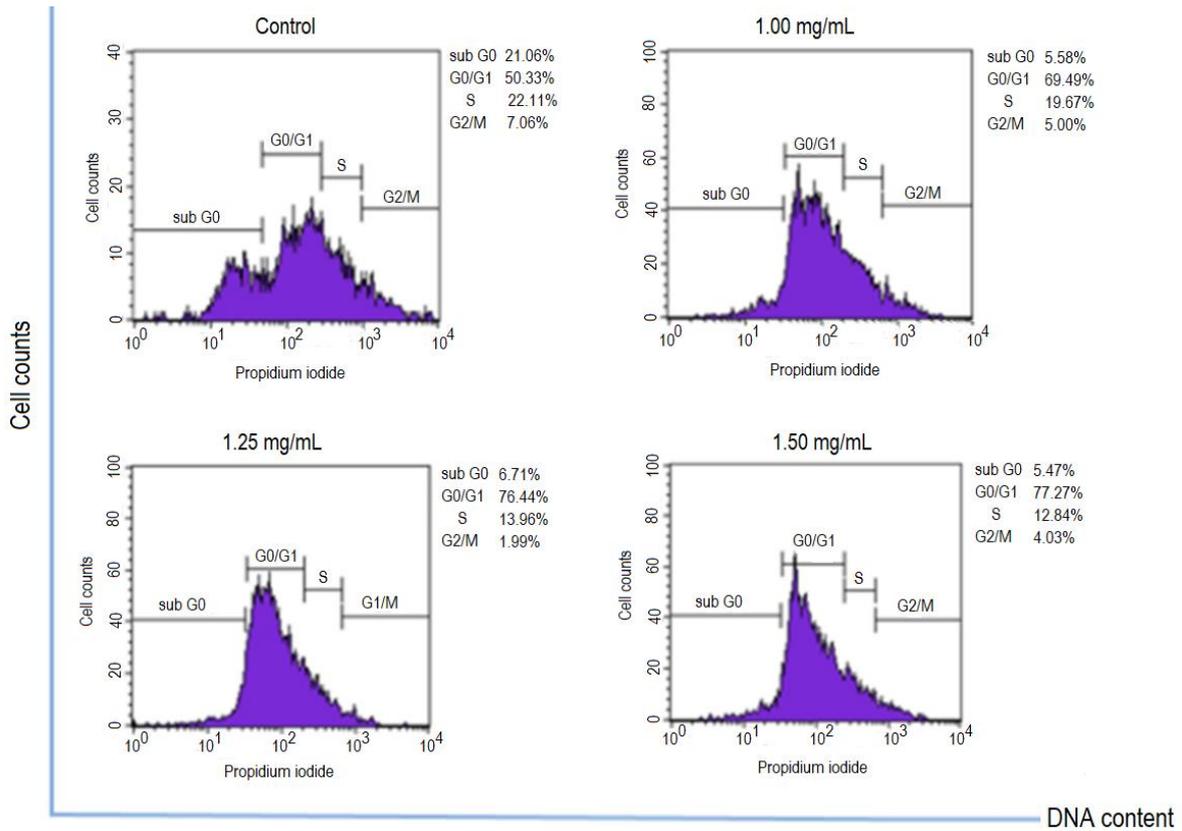


Figure 8 Flow cytometric analysis of distribution in cell cycle phases of untreated HCT116 cells (control) and HCT116 cells treated with different concentrations (1, 1.25 and 1.50 mg/mL) of *P. paniceum* extract for 48 h

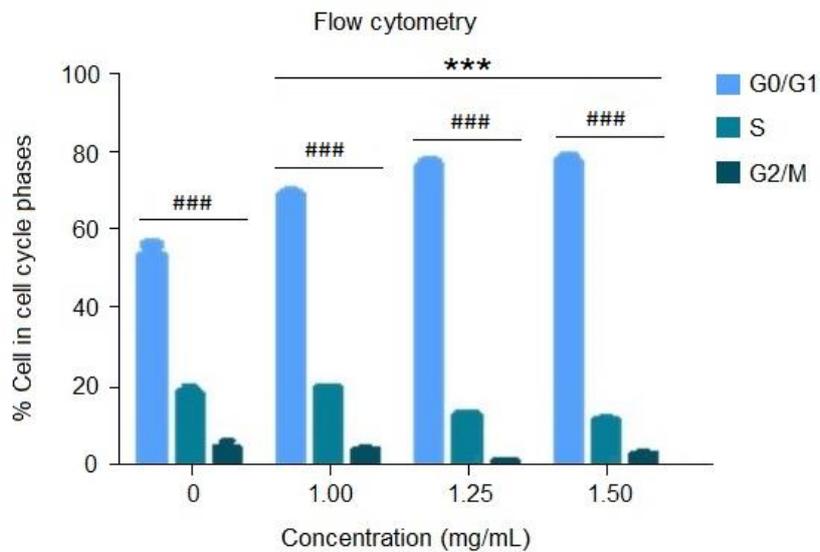


Figure 9 Effect of *P. paniceum* extract on cell cycle of HCT116 cells (### and *** = $p < 0.001$)

indicates significant difference compared within the same concentration group;

*** indicates significant difference compared with the control (0 mg/mL of the extract).

3.4. ผลของสารสกัดใฝ่จืดต่อวัฏจักรเซลล์ของเซลล์

HCT116

จากการทดสอบการชักนำการหยุดวัฏจักรของเซลล์ HCT116 ด้วยวิธี flow cytometry โดยใช้สารสกัดใฝ่จืดที่มีความเข้มข้น 1, 1.25 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าโดยปกติแล้วเซลล์ HCT116 ส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะ G0/G1 ไม่ว่าจะได้รับ หรือไม่ได้รับสารสกัดใฝ่จืด เมื่อเทียบกับระยะอื่นในวัฏจักรเซลล์ เช่น ระยะ sub G0, S และ G2/M (Figure 8, Figure 9) แต่การได้รับสารสกัดใฝ่จืดจะยิ่งทำให้เซลล์ HCT116 อยู่ในระยะ G0/G1 มากขึ้น ดังนั้นการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใฝ่จืดสามารถชักนำการหยุดวัฏจักรของเซลล์ HCT116 ที่ระยะ G0/G1 ส่งผลทำให้เซลล์มะเร็งเพิ่มจำนวนได้ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาก่อนหน้านี้ที่พบว่าสารสกัดใฝ่จืดสามารถชักนำการหยุดวัฏจักรเซลล์ที่ระยะ G0/G1 [13]

ถึงแม้ว่าการศึกษานี้จะแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดใฝ่จืด แต่สารสำคัญ และกลไกที่สารสกัดใฝ่จืดใช้ในการต้านมะเร็งยังคงต้องมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาที่มีข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับประเด็นนี้ ดังนี้ จากการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดใฝ่จืดของทีมนักวิจัยพบว่า มีสารกลุ่ม polyphenolic compound เป็นจำนวนมาก ได้แก่ tannic acid, gallic acid และ catechin [13] ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งหลายชนิดผ่านกลไกต่าง ๆ เช่น tannic acid สามารถยับยั้งความมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง และชักนำให้เกิดการหยุดวัฏจักรของเซลล์ การเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งปอดได้ [14], [15] นอกจากนี้ tannic acid ยังช่วยยับยั้งกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ของโปรตีน AKT ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะและสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ได้ [16] ส่วน gallic acid สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอด [17] และยังสามารถยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ [18] ส่วนสาร catechin มีคุณสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม [19] และช่วยยับยั้งการแสดงออกของยีน vascular endothelial growth factor (VEGF) ของเซลล์มะเร็งตับอ่อน และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ [20] ดังนั้นสารสำคัญที่พบมากในใฝ่จืดเหล่านี้อาจมีบทบาทต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง HCT116

4. บทสรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใฝ่จืดมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ชนิด HCT116 โดยมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HCT116 และยับยั้งการเพิ่มจำนวนโคลนของเซลล์ HCT116 อีกทั้งสารสกัดใฝ่จืดยังมีแนวโน้มในการลดการเคลื่อนที่ของเซลล์ HCT116 ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดใฝ่จืดสามารถชักนำให้วัฏจักรของเซลล์ HCT116 หยุดที่ระยะ G0/G1 ได้ งานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น เพื่อให้ทราบข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดใฝ่จืด งานวิจัยเชิงลึกที่ต้องมีการศึกษาต่อไป ได้แก่ การศึกษาหาความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมในการต้านมะเร็ง การศึกษาชนิดของสารสำคัญ และกลไกที่สารสกัดใฝ่จืดใช้ในการต้านมะเร็ง เป็นต้น

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยพะเยา Fundamental Fund (Grant No. FF66-RIM039 และ FF66-RIM072) และทุนสนับสนุนบางส่วนจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา (Grant No.MD66-04)

6. References

- [1] Hanahan, D. 2022. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discovery*. 12(1): 31-46.
- [2] Siegel, R.L. and et al. 2022. Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 72(1): 7-33.
- [3] Wang, S. and et al. 2019. Postoperative complications and prognosis after radical gastrectomy for gastric cancer: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *World Journal of Surgical Oncology*. 17(1): 52.
- [4] Bhanot, A., Sharma, R. and Noolvi, M.N. 2011. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. *International Journal of Phytomedicine*. 3: 9-26.
- [5] Gordaliza, M. 2007. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*. 9(12): 767-776.

- [6] He, Q., Ma, P. and Torshizi, R. 2022. The impact of some natural phenolic compounds on α -glucosidase and sorbitol dehydrogenase enzymes, and anti-leukemia cancer potential, spin density distributions, and in silico studies. **Journal of Oleo Science**. 71(6): 863-873.
- [7] Ai, T. and et al. 2016. GDP-D-mannose pyrophosphorylase from *Pogonatherum paniceum* enhances salinity and drought tolerance of transgenic tobacco. **Zeitschrift fur Naturforschung C: A Journal of Biosciences**. 71(7-8): 243-252.
- [8] Thongboontho, R. and et al. 2023. Effects of *Pogonatherum paniceum* (Lamk) Hack extract on anti-mitochondrial DNA mediated inflammation by attenuating Tlr9 expression in LPS-induced macrophages. **Nutrition Research and Practice**. 17(5): 827-843.
- [9] Petchsak, P. and Sripanidkulchai, B. 2015. *Momordica cochinchinensis* aril extract induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. 16(13): 5507-5513.
- [10] Zhang, X. and et al. 2019. Cannabidiol induces cell cycle arrest and cell apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. **Biomolecules**. 9(8): 302.
- [11] Alnuqaydan, A.M. and et al. 2022. Evaluation of the cytotoxic activity of *Tamarix articulata* and its anticancer potential in prostate cancer cells. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. 12(02): 89-108.
- [12] Rawangkan, A. and et al. 2022. Dinactin: A new antitumor antibiotic with cell cycle progression and cancer stemness inhibiting activities in lung cancer. **Antibiotics**. 11(12): 1845.
- [13] Praphasawat, R. and et al. 2023. Anticancer and antimutagenic properties of *Pogonatherum paniceum* on colorectal cancer cells. **World Journal of Oncology**. 14(4): 266-276.
- [14] Sp, N. and et al. 2020. Tannic acid inhibits non-small cell lung cancer (NSCLC) stemness by inducing G0/G1 cell cycle arrest and intrinsic apoptosis. **Anticancer Research**. 40(6): 3209-3220.
- [15] Kim, D.A. and et al. 2019. Tannic acid attenuates the formation of cancer stem cells by inhibiting NF-KB-mediated phenotype transition of breast cancer cells. **American Journal of Cancer Research**. 9(8): 1664-1681.
- [16] Chen, M.C. and et al. 2022. Tannic acid attenuate AKT phosphorylation to inhibit UMUC3 bladder cancer cell proliferation. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 477(12): 2863-2869.
- [17] Wang, D. and Bao, B. 2020. Gallic acid impedes non-small cell lung cancer progression via suppression of EGFR-dependent CARM1-PELP1 complex. **Drug Design, Development and Therapy**. 14: 1583-1592.
- [18] Aye, K.T. and et al. 2021. Gallic acid enhances pirarubicin-induced anticancer in living K562 and K562/Dox leukemia cancer cells through cellular energetic state impairment and P-glycoprotein inhibition. **Oncology Reports**. 46(4): 227.
- [19] Turkoglu, B. and Mansuroglu, B. 2020. Catechin loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: characterization, antioxidant and cytotoxic activity against MCF-7 breast cancer cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. 20(9): 5313-5321.
- [20] McMillan, B. and et al. 2007. Dietary influence on pancreatic cancer growth by catechin and inositol hexaphosphate. **Journal of Surgical Research**. 141(1): 115-119.