

ฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นสมสารในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์
ผ่านการหยุดวัฏจักรเซลล์

Antiproliferative Effects of *Senna garrettiana* Heartwood Extract on
Human Hepatocellular Carcinoma Cells via Cell Cycle Arrest

ฐิตาภรณ์ คอมแพงจันทร์¹ อัญชลี ต้นศรี² วรวัฒน์ สุราฤทธิ์³ และ พินทุสร หาญสกุล^{2*}

Thitaporn Kompangjan¹ Unchalee Thonsri² Worawat Surarit³ and Pintusorn Hansakul^{2*}

¹หลักสูตรชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120 ประเทศไทย

²สาขาชีวเคมี สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120 ประเทศไทย

³สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120 ประเทศไทย

¹Biochemistry and Molecular Biology Graduate Program, Faculty of Medicine,
Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand

²Biochemistry Division, Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine,
Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand

³Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology,
Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand

*E-mail: hansakul@gmail.com

Received: Jan 09, 2026

Revised: Jan 31, 2026

Accepted: Feb 02, 2026

บทคัดย่อ

แก่นสมสารเป็นสมุนไพรที่ใช้กันมาอย่างยาวนานในประเทศไทย สำหรับการรักษาอาการเจ็บป่วยหลายชนิด รวมถึงโรคมะเร็ง อย่างไรก็ตาม การศึกษาฤทธิ์ของแก่นสมสารต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma ยังมีจำกัด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากแก่นสมสาร (SGE) ต่อเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 และเพื่อหาปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดดังกล่าว โดยประเมินฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและความเป็นพิษต่อเซลล์โดย Sulforhodamine B (SRB) assay วัดความสามารถในการเกิดโคโลนีโดย Colony formation assay วิเคราะห์การหยุดวัฏจักรเซลล์โดย Flow cytometry และตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดย Folin-Ciocalteu assay และ Aluminium chloride colorimetric assay ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า SGE สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ HepG2 ได้ในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้นและระยะเวลา โดยมีฤทธิ์ที่สูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง ($IC_{50} = 28.22 \pm 1.64$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และแสดงความเป็นพิษจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง (ค่า Selective index = 2.09) นอกจากนี้ SGE ยังสามารถยับยั้งการเกิดโคโลนีของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญและเหนี่ยวนำให้วัฏจักรเซลล์หยุดที่ระยะ G0/G1 จากผลการศึกษาพบว่า SGE มีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 388.89 ± 0.56 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และ 238.20 ± 6.73 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า SGE มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์ HepG2 ซึ่งควรมีการศึกษาทบทวนโมเลกุลเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: แก่นสมสาร ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เซลล์มะเร็งตับ

Abstract

Senna garrettiana heartwood has long been used in Thailand as a medicinal herb for treating a wide range of ailments, including cancer. However, studies on the effects of *Senna garrettiana* heartwood on hepatocellular carcinoma cells remain limited. This study aimed to evaluate the anticancer activity of *Senna garrettiana* heartwood extract (SGE) and to determine its total phenolic and flavonoid contents. The antiproliferative and cytotoxic effects of SGE were assessed using the sulforhodamine B (SRB) assay. Colony-forming ability was examined by the colony formation assay, and cell cycle arrest was analyzed using flow cytometry. Total phenolic and flavonoid contents were quantified by the Folin-Ciocalteu assay and aluminium chloride colorimetric assay. The results demonstrated that SGE inhibited HepG2 cell proliferation in a dose- and time-dependent manner with the highest activity at 72 h ($IC_{50} = 28.22 \pm 1.64 \mu\text{g/mL}$) and displayed selective cytotoxicity towards cancer cells (selective index = 2.09). In addition, SGE significantly suppressed colony formation and induced G0/G1 cell cycle arrest. The results also revealed that the total phenolic and flavonoid contents were 388.89 ± 0.56 mg gallic acid equivalents per gram of extract and 238.20 ± 6.73 mg catechin equivalents per gram of extract, respectively. This study demonstrates that SGE has the potential to exert anticancer activity against HepG2 cells, warranting further investigation of its molecular mechanisms.

Keywords: *Senna garrettiana* heartwood, Anticancer activity, Phenolics, Flavonoids, Hepatocellular carcinoma cells

1. บทนำ

มะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma (HCC) เป็นมะเร็งที่พบได้บ่อย โดยมีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับที่ 6 และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งเป็นอันดับ 3 ของโลก [1] ในประเทศไทย HCC ถูกจัดเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงและเป็นสาเหตุสำคัญจากการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็ง [2] การเกิดมะเร็งชนิดนี้มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรังและความเสียหายของเนื้อเยื่อตับเป็นเวลานาน ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญได้แก่ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซี การดื่มแอลกอฮอล์เป็นเวลานาน การได้รับสารก่อมะเร็ง เช่น อะฟลาทอกซินจากอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อรา รวมถึงสารเคมีบางชนิด [3] มะเร็งตับในระยะเริ่มต้นสามารถรักษาให้หายได้โดยการผ่าตัดตับบางส่วนหรือการทำลายก้อนมะเร็งเฉพาะที่ อย่างไรก็ตาม ในผู้ป่วยที่ไม่สามารถเข้ารับการผ่าตัดได้หรืออยู่ในระยะลุกลาม การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (Chemotherapy) เช่น 5-Fluorouracil (5-FU), Doxorubicin, Cisplatin และ Oxaliplatin ยังคงเป็นทางเลือกสำคัญ โดยยาเหล่านี้มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งที่มีอัตราการแบ่งตัวสูง

อย่างไรก็ตาม ยาเคมีบำบัดส่วนใหญ่ขาดความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่มีการแบ่งตัวสูงเช่นกัน ก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่รุนแรง และอาจนำไปสู่การเกิดภาวะดื้อต่อยา ซึ่งจำกัดประสิทธิภาพของการรักษาในระยะยาว ด้วยเหตุนี้ การค้นคว้าและพัฒนาสารสกัด

จากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติในระดับต่ำ จึงได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่พบมากในพืชและสมุนไพร เนื่องจากมีรายงานว่สารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิดผ่านกลไกระดับเซลล์และโมเลกุลที่หลากหลาย [4], [5]

สมสาร (*Senna garrettiana* (Craib) Irwin & Bameby หรือ *Cassia garrettiana* Craib) เป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปในทุกภูมิภาคของประเทศไทย และได้รับการบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ โดยมีการนำแก่นสมสารมาใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยาสมุนไพรเพื่อรักษาโรคเรื้อรัง บรรเทาอาการปวด ลดไข้ และช่วยปรับสมดุลของร่างกาย [6] นอกจากนี้ แก่นสมสารยังถูกนำไปใช้เป็นส่วนหนึ่งของตำรับยารักษา มะเร็งในการแพทย์แบบผสมผสาน ณ. อโรคยาศาล วัดคำประมง จังหวัดสกลนคร ซึ่งสะท้อนถึงศักยภาพในการนำไปใช้ด้านการดูแลผู้ป่วยมะเร็งในทางเลือกการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์บูรณาการ อีกทั้งมีรายงานว่สารสกัดจากแก่นสมสาร มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนู [6] และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงหลายชนิด [7] นอกจากนี้ ยังมีรายงานการตรวจพบสารกลุ่มฟีนอลิกหลายชนิดในแก่นสมสาร เช่น Piceatannol, Emodin, Aloe emodin, Chrysophanol, Resveratrol, Cassigarol E และ Quercetin

ซึ่งล้วนเป็นสารที่มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการต้านมะเร็งผ่านกลไกระดับโมเลกุลที่หลากหลาย [7], [8]

เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งระดับของสารสกัดจากแก่นสมสารโดยตรง และงานวิจัยก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่เน้นการแยกและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นรายชนิด โดยยังขาดการวิเคราะห์ปริมาณรวมทั้งหมดของสารกลุ่มดังกล่าว ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นสมสารต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและก่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับ รวมถึงการยับยั้งการสร้างโคโลนีของเซลล์ และการเหนี่ยวนำทำให้หยุดวัฏจักรเซลล์ นอกจากนี้ ยังได้ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ และประเมินความสัมพันธ์ในเบื้องต้นระหว่างปริมาณรวมของสารกลุ่มดังกล่าวกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่ตรวจพบ โดยเป็นการศึกษาในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษากลไกระดับโมเลกุลของสารสกัดจากแก่นสมสารในอนาคต ขณะเดียวกัน ข้อมูลปริมาณรวมของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ยังสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนามาตรฐานและการควบคุมคุณภาพของสารสกัดจากพืช สำหรับการศึกษาทางเภสัชวิทยาต่อไป

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การเตรียมสารสกัดแก่นสมสาร

นำผงแก่นสมสารจากจังหวัดสุรินทร์ ประเทศไทย มาสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บส่วนของเหลวและกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1 ก่อนระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนสุญญากาศ (Vacuum rotary evaporator) เอทานอลที่แยกออกมาถูกนำไปใช้สกัดซ้ำกับกากสารสกัดเดิมอีก 2 ครั้ง โดยดำเนินการในลักษณะเดียวกัน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากทั้ง 3 รอบมาผสมรวมกัน และทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งเยือกแข็งแบบสุญญากาศ (Vacuum freeze dryer) ผงสารสกัดที่ได้ถูกนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณร้อยละผลผลิต (% Yield) และเก็บรักษาผงสารสกัดแก่นสมสาร (*Senna garrettiana* extract; SGE) ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 (ATCC HB-8065) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM; Merck, Germany) ที่เสริมด้วย Fetal bovine serum (FBS) 10% ขณะที่เพาะเลี้ยงเซลล์ดับปกติ BNL CL.2 (ATCC TIB-73) ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Merck, Germany) ที่มี FBS 10% โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดนี้ในภาชนะปลอดเชื้อภายในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 80% จึงทำการแยกเซลล์ออกจากภาชนะด้วยเอนไซม์ Trypsin-EDTA เป็นเวลา 3 นาที และนำเซลล์ที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.3. การทดสอบฤทธิ์ของ SGE ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับ HepG2

การทดสอบฤทธิ์ของ SGE ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ใช้วิธี Sulforhodamine B (SRB) assay โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับเซลล์ดับปกติ BNL CL.2 ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

การทดลองนี้ทำในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well plate) โดยเตรียมเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 จำนวน 1.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม และเซลล์ดับปกติ BNL CL.2 จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อหลุม บ่มเซลล์ในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารทดสอบ SGE หรือยา 5-fluorouracil (5-FU) ซึ่งละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ในปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลุม และบ่มเซลล์ต่อในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ภายหลังการบ่ม เติมน้ำสาร Trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 40% ที่ทำให้เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง TCA ออกด้วยน้ำประปา และเติมน้ำละลาย Sulforhodamine B (SRB) ความเข้มข้น 0.4% ซึ่งละลายในกรดอะซิติก 1% (1% Acetic acid) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างสี SRB ส่วนเกินออกด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1% และผึ่งเซลล์ให้แห้ง จากนั้นละลายสีด้วยสารละลาย Tris base (pH 10) ความเข้มข้น 10

มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลุม และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดยนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) ตามสมการที่กำหนด

$$\% \text{ Viability} = 100 \times (T - T_0) / (C - T_0),$$

เมื่อ $T \geq T_0$

หรือ

$$\% \text{ Viability} = 100 \times (T - T_0) / T_0,$$

เมื่อ $T < T_0$

T = ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์ที่เติมสารทดสอบ ที่เวลาทดสอบ 24, 48 หรือ 72 ชั่วโมง

T_0 = ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์ที่ไม่เติมสารทดสอบ ที่เวลา 0 ชั่วโมง

C = ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์ควบคุมที่เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เท่านั้น ที่เวลาทดสอบ 24, 48 หรือ 72 ชั่วโมง

นำค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) ที่ได้จากแต่ละความเข้มข้นของสารทดสอบมาสร้างกราฟ และใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของสารทดสอบที่ก่อให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนหรือความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับ 25, 50, 75 และ 100% (IC_{25} , IC_{50} , IC_{75} และ IC_{100} ตามลำดับ) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 5.0 นอกจากนี้ ยังได้คำนวณค่าความจำเพาะเจาะจงของสารต่อเซลล์มะเร็ง (Selective index; SI) โดยคำนวณจากอัตราส่วนของค่า IC_{50} ในเซลล์ปกติ ต่อค่า IC_{50} ในเซลล์มะเร็ง

2.4. การทดสอบฤทธิ์ของ SGE ต่อการยับยั้งการเจริญเป็นโคลนของเซลล์มะเร็งตับ HepG2

การทดสอบฤทธิ์ของ SGE ต่อการยับยั้งการเจริญเป็นโคลนของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ใช้วิธี Colony formation ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

การทดลองนี้ทำในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well plate) โดยเตรียมเซลล์มะเร็งตับ HepG2 จำนวน 1.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม บ่มเซลล์ในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเติมสาร SGE ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลุม และบ่มเซลล์ในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลา จึงทำการแยกเซลล์แต่ละกลุ่มออกจากหลุมด้วยสารละลายเอนไซม์ Trypsin-EDTA จากนั้นนับจำนวน

เซลล์และนำเซลล์แต่ละกลุ่มทดสอบจำนวน 500 เซลล์ต่อหลุมหยอดลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well plate) ใหม่ เซลล์ถูกนำไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 14 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate-buffered saline; PBS) ที่ทำให้เย็น และทำการตรึงเซลล์ด้วยเมทานอลที่เย็นเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเมทานอลออกและย้อมเซลล์ด้วยสารละลาย Crystal violet ความเข้มข้น 1.0% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนถ่ายภาพและนับจำนวนโคลนที่เกิดขึ้น โดยรายงานผลเป็นจำนวนโคลนของเซลล์ในแต่ละกลุ่มการทดลอง

2.5. การทดสอบฤทธิ์ของ SGE ต่อการหยุดวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle arrest) ของเซลล์มะเร็งตับ HepG2

การทดสอบฤทธิ์ของ SGE ต่อการหยุดวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle arrest) ของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ใช้วิธี Propidium iodide (PI)/RNase staining assay ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

หลังจากทำการทดสอบเซลล์มะเร็งตับ HepG2 จำนวน 1.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม ด้วยสาร SGE ที่ความเข้มข้น IC_{50} ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จึงทำการแยกเซลล์ออกจากหลุมด้วยสารละลายเอนไซม์ Trypsin-EDTA จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เซลล์ถูกล้างด้วย PBS จำนวน 1 ครั้ง และปั่นตกตะกอนอีกครั้ง ก่อนทำการตรึงเซลล์ด้วยเมทานอลความเข้มข้น 70% ที่ทำให้เย็นจัด เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ภายในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ และย้อมด้วยชุดน้ำยา PI/RNase kit (Cell Signaling Technology, USA) ในที่มีตู้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เซลล์ที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโฟลว์ไซโตเมทรี (Flow cytometry) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Kaluza analysis software

2.6. การวิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิก

การวิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกใน SGE ใช้วิธี Folin-Ciocalteu assay โดยเติมสารสกัด SGE ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 0.2 มิลลาร์ ปริมาตร 525 ไมโครลิตร และเติม 7.5% Sodium carbonate (Na_2CO_3)

ปริมาตร 525 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารผสมปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของแผ่นเพลตชนิด 96 หลุม (96-well plate) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร คำนวณปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิก โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid) และรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg gallic acid equivalents (GAE)/g extract)

2.7. การวิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดของฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดของฟลาโวนอยด์ใช้วิธี Aluminum chloride colorimetric method โดยเติมสารสกัด SGE ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ จากนั้นเติมสารละลาย Sodium nitrite (NaNO_2) ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 75 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย Aluminum chloride (AlCl_3) ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 275 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนดูดสารผสม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณทั้งหมดของสารฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของคาเทชิน (Catechin) โดยรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อกรัมสารสกัด (mg catechin equivalents (CE)/g extract)

2.8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ SD) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง การวิเคราะห์ความ

แตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดสอบใช้ Student's t-test และ One-way analysis of variance (ANOVA) ร่วมกับการทดสอบ Tukey's post hoc test โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดดำเนินการโดยใช้โปรแกรม SPSS version 13.0

3. ผลการวิจัย

3.1. ผลของ SGE และ 5-FU ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 และเซลล์ตับปกติ BNL CL.2

เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ของ SGE เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า SGE ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 31.25, 37.5 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control group) แสดงถึงฤทธิ์ในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้น (Dose-dependent manner) ซึ่งสามารถนำไปคำนวณหา IC_{50} ได้ดังแสดงใน Figure 1A โดยเฉพาะ SGE ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ลดลงจนมีค่าติดลบประมาณ -50% บ่งชี้ถึงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างชัดเจน ในทำนองเดียวกัน SGE ที่ความเข้มข้น 25, 37.5, 50, 62.5 และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ตับปกติ BNL CL.2 ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยพบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถคำนวณหา IC_{50} ได้ดังแสดงใน Figure 1B เมื่อพิจารณาค่า Selective index (Table 1) ที่ระยะเวลาทดสอบ 72 ชั่วโมง พบว่า SGE มีความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและก่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 สูงกว่าเซลล์ตับปกติ BNL CL.2 ประมาณ 2.09 เท่า แสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งระดับของ SGE

Table 1 IC_{50} values and selective index of SGE on HepG2 and BNL CL.2 cells after treatment with SGE for 24, 48 and 72 h

Time (h)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		Selective index
	HepG2	BNL CL.2	
24	30.37 ± 0.56^a	72.35 ± 3.94^a	2.38
48	29.66 ± 0.91^{ab}	66.75 ± 3.98^b	2.25
72	28.22 ± 1.64^a	58.99 ± 2.34^c	2.09

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation.

Mean values followed by different superscript letters within a column are significantly different ($p < 0.05$).

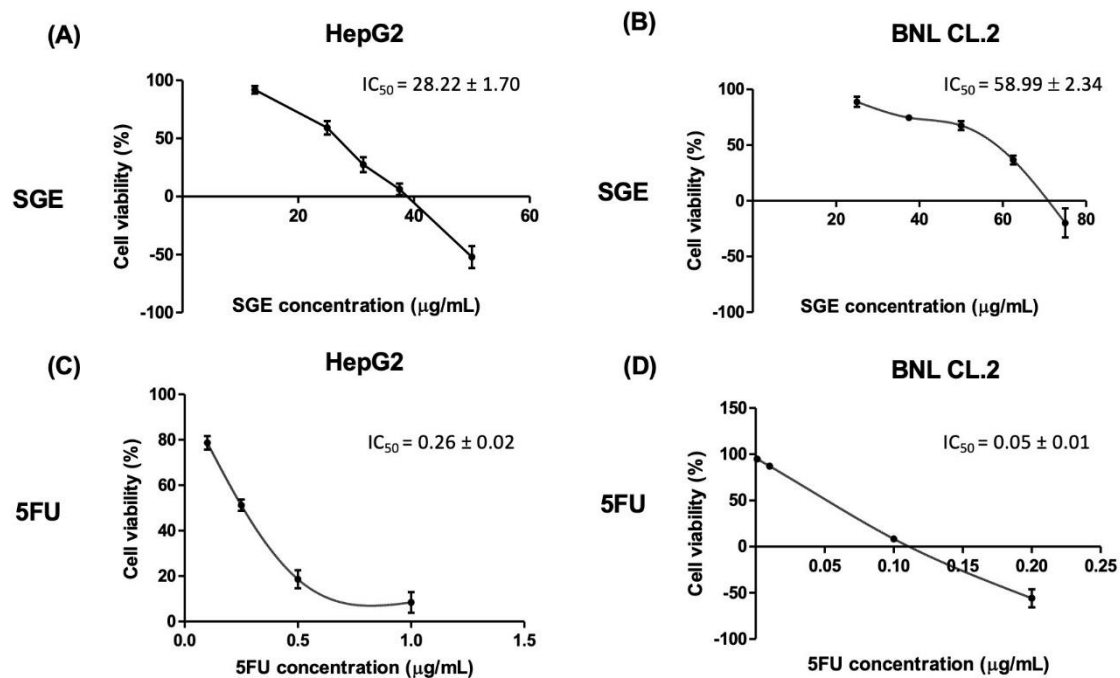


Figure 1 Effects of SGE and 5-fluorouracil (5-FU) on the viability of HepG2 and BNL CL.2 cells at 72 h after treatment;

(A) Effects of SGE on HepG2 cells; (B) Effects of SGE on BNL CL.2 cells;

(C) Effects of 5-FU on HepG2 cells and (D) Effects of 5-FU on BNL CL.2 cells.

สำหรับผลการทดสอบของ 5-fluorouracil (5-FU) ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) พบว่า 5-FU ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาทดสอบเดียวกัน สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้น และสามารถคำนวณค่า IC_{50} ได้ดังแสดงใน Figure 1C ในทำนองเดียวกัน 5-FU ที่ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1 และ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับปกติ BNL CL.2 โดยพบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ลดลงประมาณ -50% และสามารถคำนวณค่า IC_{50} ได้ดังแสดงใน Figure 1D เมื่อคำนวณค่า Selective index ของ 5-FU พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.19 แสดงให้เห็นว่า 5-FU ไม่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 แต่มีผลต่อเซลล์ตับปกติ BNL CL.2 มากกว่า โดยค่า IC_{50} ในเซลล์ตับปกติต่ำกว่าในเซลล์มะเร็งประมาณ 5 เท่า

3.2. ผลของ SGE และ 5-FU ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์ตับปกติ BNL CL.2 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

จากผลที่พบว่า SGE มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและก่อความเป็นพิษแบบจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ BNL CL.2 จึงได้ทำการศึกษาต่อเพื่อประเมินผลของ SGE ที่ขึ้นกับระยะเวลาทดสอบที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า SGE ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและก่อความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสองชนิดในลักษณะขึ้นกับทั้งความเข้มข้นและระยะเวลาทดสอบ (Figure 2A-B) โดย SGE ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ HepG2 ลดลงจนมีค่าติดลบประมาณ -30 ถึง -50% ในทุกช่วงเวลาทดสอบ (Figure 2A) ในขณะที่ SGE ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ BNL CL.2

มีค่าติดลบเฉพาะที่เวลา 72 ชั่วโมง เท่านั้น (Figure 2B) ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า SGE มีความเป็นพิษที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 มากกว่าเซลล์ตับปกติ

ผลการคำนวณค่า IC_{50} ของ SGE ต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์ตับปกติ BNL CL.2 ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (Table 1) พบว่าค่า IC_{50} มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างช่วงเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง ขณะที่ค่า IC_{50} ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทั้งสองช่วงเวลาดังกล่าว ในทางตรงกันข้าม ค่า IC_{50} ของ

SGE ต่อเซลล์ตับปกติ BNL CL.2 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลา นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาค่า Selective index (Table 1) พบว่า SGE มีค่ามากกว่า 2 ในทุกช่วงเวลา บ่งชี้ถึงความจำเพาะของ SGE ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและก่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ค่า IC_{50} ของ SGE ในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าต่ำที่สุด แสดงถึงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่เด่นชัดที่สุด ดังนั้น การศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้ระยะเวลาทดสอบ 72 ชั่วโมง

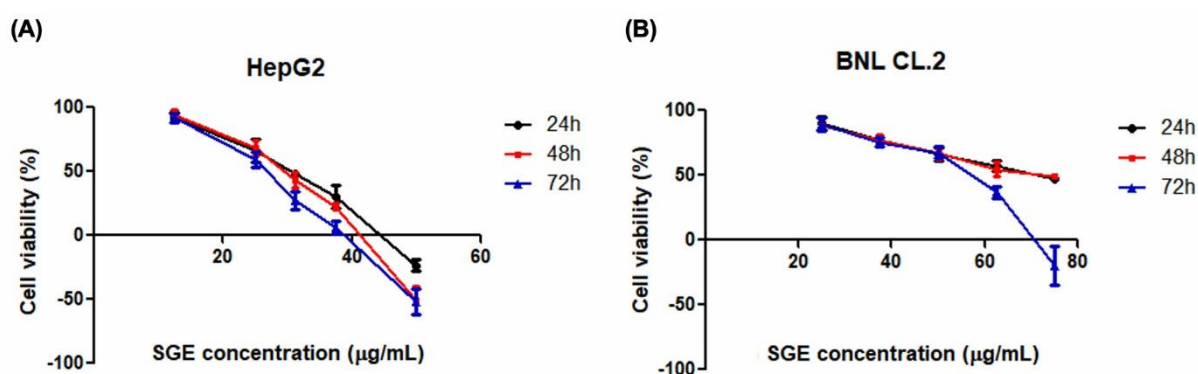


Figure 2 Effects of SGE on cell viability of HepG2 (A) and BNL CL.2 cells (B) after treatment with SGE for 24, 48 and 72 h

3.3. ผลของ IC_{25} , IC_{50} , IC_{75} และ IC_{100} ของ SGE ต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่เวลา 72 ชั่วโมง

เพื่อให้สามารถควบคุมระดับการลดลงของการรอดชีวิตของเซลล์อย่างเป็นลำดับขั้นในช่วงละ 25% และเอื้อต่อการประเมินการเปลี่ยนแปลงทั้งในระดับเซลล์และระดับโมเลกุลอย่างชัดเจน ผู้วิจัยจึงกำหนดค่าความเข้มข้นของ SGE ที่ทำให้การรอดชีวิตของเซลล์ลดลงในระดับ 25, 50, 75 และ 100% (IC_{25} , IC_{50} , IC_{75} และ IC_{100}) โดยคำนวณจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์กับความเข้มข้นของ SGE จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของ SGE ที่ได้ (Table 2) ไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง และทำการประเมินการรอดชีวิตของเซลล์ ผลการทดลองยืนยันว่าการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงในระดับประมาณ 25, 50, 75 และ 100% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงทั้งในด้านจำนวนและลักษณะรูปร่างของเซลล์ HepG2 (Figure 3) อย่างไรก็ตาม แม้ที่ความเข้มข้น IC_{100} ซึ่งกำหนดให้ค่าการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 0% ยังตรวจพบเซลล์บางส่วนหลงเหลืออยู่ ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังการทดสอบมีค่าใกล้เคียงกับ

จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเริ่มต้น ณ เวลา 0 ชั่วโมง

3.4. ผลของ SGE ต่อการเพิ่มจำนวนโคโลนีของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่เวลา 72 ชั่วโมง

ในการทดสอบนี้ เซลล์มะเร็งตับ HepG2 ถูกบ่มร่วมกับ SGE ที่ความเข้มข้น IC_{25} , IC_{50} , IC_{75} และ IC_{100} เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเซลล์ออกจากหลุมเพาะเลี้ยง และคัดเลือกเซลล์ที่มีชีวิตจำนวน 500 เซลล์ เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่ไม่เติม SGE เป็นเวลา 14 วัน ก่อนย้อมโคโลนีที่เกิดขึ้นด้วย Crystal violet ผลการทดลองพบว่า SGE ในทุกระดับความเข้มข้น สามารถยับยั้งการเกิดโคโลนีของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้อย่างชัดเจน และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างระดับความเข้มข้นของ SGE และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control group) ดังแสดงใน Figure 4A-B ผลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า SGE สามารถยับยั้งการแบ่งตัวอย่างต่อเนื่องของเซลล์มะเร็งตับเดี่ยวได้ ส่งผลให้ไม่สามารถเกิดเป็นโคโลนีได้ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในระยะยาว (Long-term antiproliferative effect) ได้อย่างชัดเจน

Table 2 IC₂₅, IC₅₀, IC₇₅ and IC₁₀₀ values of SGE on HepG2 cells after treatment with SGE for 72 h

Time (h)	IC (µg/mL)			
	IC ₂₅	IC ₅₀	IC ₇₅	IC ₁₀₀
	(75% viability)	(50% viability)	(25% viability)	(0% viability)
72	21.48 ± 2.94	28.22 ± 1.70	33.05 ± 1.64	39.05 ± 1.20

Data are presented as mean ± standard deviation.

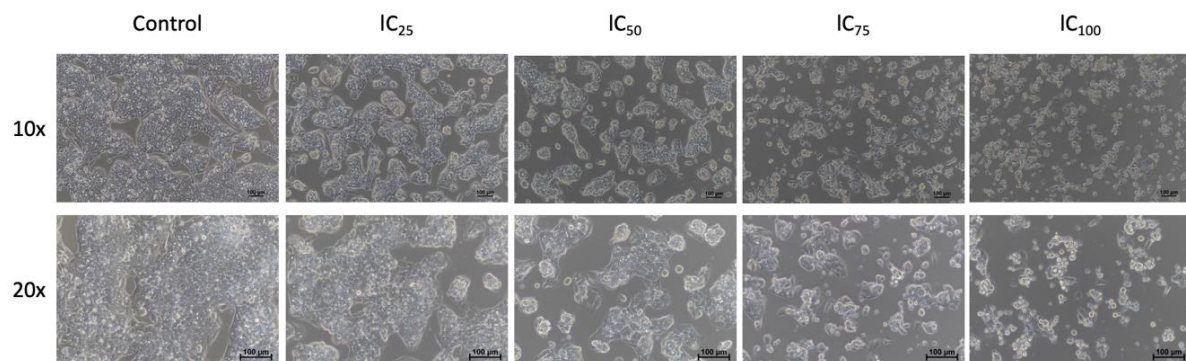


Figure 3 Effects of SGE at IC₂₅, IC₅₀, IC₇₅ and IC₁₀₀ on cell number and morphology of HepG2 cells after treatment with SGE for 72 h;

Images at 10x and 20x magnification; Scale bar = 100 µm

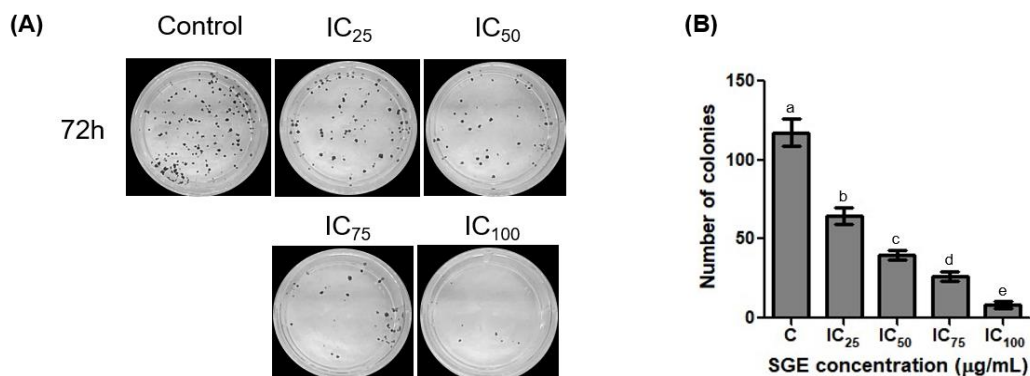


Figure 4 Effects of SGE at IC₂₅, IC₅₀, IC₇₅ and IC₁₀₀ on colony formation of HepG2 cells;

(A) Representative images of HepG2 colonies after treatment with SGE for 72 h and

(B) Quantitative analysis of the number of colony-forming units in each treatment group

3.5. ผลของ SGE ต่อวัฏจักรของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง

จากการศึกษาผลของ SGE ต่อวัฏจักรเซลล์ของเซลล์มะเร็งตับ โดยใช้ SGE ที่ความเข้มข้น IC₅₀ บ่มร่วมกับเซลล์ HepG2 เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Flow cytometry พบว่า SGE สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดของวัฏจักรเซลล์ที่ระยะ G0/G1 ได้อย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control group) ส่งผลให้สัดส่วนของเซลล์ในระยะ G2/M ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากเซลล์ถูกยับยั้งให้อยู่ในระยะ G0/G1 ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของวัฏจักรเซลล์ อย่างไรก็ตามที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าสัดส่วนของเซลล์ในระยะ G0/G1 ลดลงและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน (Figure 5)

3.6. ร้อยละผลผลิต และปริมาณทั้งหมดของสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ใน SGE

จากการสกัด SGE ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% พบว่า มีร้อยละของผลผลิต (% Yield) เท่ากับ 4.5 และจากการวิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

พบว่า SGE มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 388.89 ± 0.56 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 238.20 ± 6.73 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อกรัมสารสกัด ดังแสดงใน Table 3

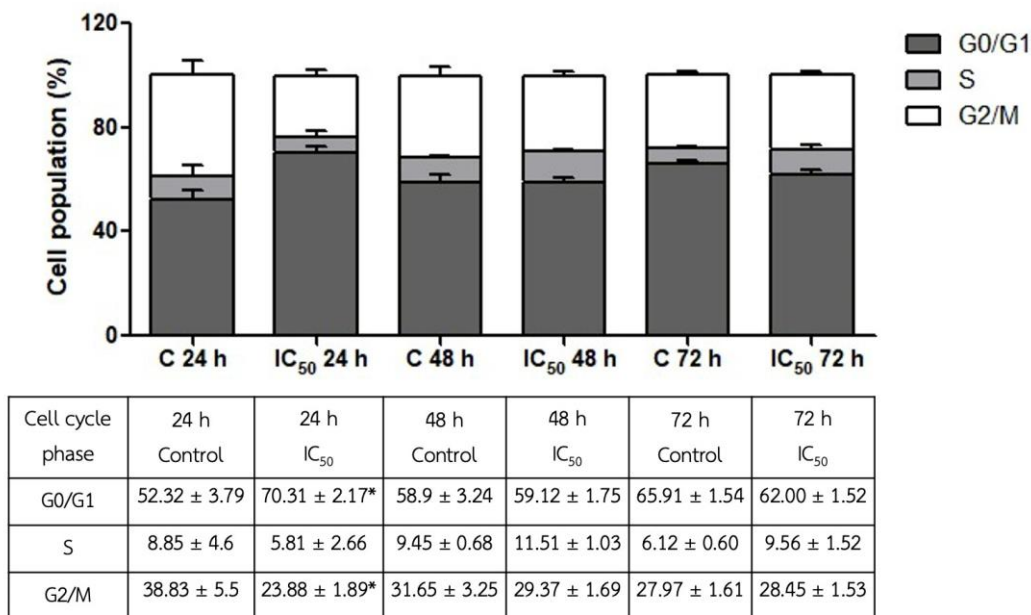


Figure 5 Effects of SGE on the cell cycle of HepG2 cells;
Cell cycle distribution of HepG2 cells (%) in G0/G1, S and G2/M phases after treatment with SGE at the IC₅₀ concentration for 24, 48 and 72 h;
*p < 0.05 (compared with the control at the same time point)

Table 3 Yield and total contents of phenolics and flavonoids of SGE

Sample	Yield (%)	Total phenolic content (mg GAE/g extract)	Total flavonoid content (mg CE/g extract)
SGE	4.5%	388.89 ± 0.56	238.20 ± 6.73

Data are presented as mean ± standard deviation.

4. อภิปรายผลการวิจัย

HepG2 เป็นเซลล์มะเร็งระดับของมนุษย์ชนิด Hepatocellular carcinoma ที่นิยมใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในระบบ *in vitro* เนื่องจากยังคงคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาที่สำคัญของเซลล์ตับ เช่น การแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแปรสภาพสารเคมีและยา รวมถึงการตอบสนองต่อสารพิษและสารต้านมะเร็งได้อย่างเหมาะสม [9] ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เซลล์ HepG2 เป็นแบบจำลองในการประเมินฤทธิ์ของ SGE ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ การเหนี่ยวนำความเป็นพิษต่อเซลล์ การหยุดวัฏจักรชีวิตของ

เซลล์ และฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์เดี่ยวในระยะยาวผ่านการทดสอบการเกิดโคโลนี นอกจากนี้ การเปรียบเทียบเซลล์ตบกดก็ยังช่วยประเมินความจำเพาะของฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดได้อย่างเหมาะสม

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) โดยอ้างอิงกับจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเริ่มต้น ณ เวลา 0 ชั่วโมง ร่วมกับกลุ่มควบคุมที่มีการเจริญเติบโตของเซลล์ตามปกติ ช่วยให้สามารถประเมินผลฤทธิ์ของสารทดสอบทั้งฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และฤทธิ์เหนี่ยวนำการตายของเซลล์ได้อย่างชัดเจน ผลการทดลองที่พบว่าค่า % Cell

viability ลดลงต่ำกว่าระดับตั้งต้น บ่งชี้ว่าสารทดสอบไม่ได้ ออกฤทธิ์เพียงในลักษณะยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cytostatic effect) แต่ยังมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic effect) โดยทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงต่ำกว่าจำนวน เซลล์ที่เพาะเลี้ยงเริ่มต้น ณ เวลา 0 ชั่วโมง การวิเคราะห์ใน ลักษณะนี้จึงมีความสำคัญต่อการแยกแยะกลไกการออกฤทธิ์ ของสาร และสนับสนุนผลการทดลองอื่น ๆ ที่แสดงถึงศักยภาพ ของสารในการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งได้อย่าง มีประสิทธิภาพ ผลการทดสอบ SGE พบว่าสามารถออกฤทธิ์ ได้ทั้งในลักษณะยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ และเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยมีค่า IC_{50} ไม่เกิน 30 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจัดอยู่ในเกณฑ์ของสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ต้าน มะเร็งอยู่ในเกณฑ์ดี และเหมาะสมต่อการศึกษาค้นคว้าในระดับ โมเลกุลหรือการแยกสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อไป [10] นอกจากนี้ SGE ยังแสดงความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยมีค่า Selective index มากกว่าประมาณ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ [11] และมีความจำเพาะสูง กว่ายาเคมีบำบัด 5-FU ผลการศึกษานี้ จึงนับเป็นรายงาน ครั้งแรกที่แสดงถึงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับของสารสกัดจาก แก่นแสมสารอย่างเป็นระบบ

การทดสอบด้วยวิธี SRB assay แสดงให้เห็นถึงผล ของ SGE ต่อการลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ในระยะสั้น แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าเซลล์ยังคงมีชีวิต อยู่ และยังสามารถแบ่งตัวต่อไปได้หรือไม่ ในทางตรงกันข้าม ผลจาก Colony formation assay ช่วยให้เห็นผล Long-term cytostatic/Antiproliferative effects ของ สารได้ชัดเจนขึ้น [12] แสดงให้เห็นว่า SGE ยับยั้งความสามารถ ของเซลล์เดี่ยว HepG2 ในการแบ่งตัวต่อเนื่องจนเกิดเป็น โคลนีได้อย่างมีนัยสำคัญ แม้ในสภาวะที่ไม่มี SGE แล้ว ผลดังกล่าวบ่งชี้ว่า SGE ออกฤทธิ์ไม่เพียงในลักษณะก่อความ เป็นพิษต่อเซลล์ แต่ยังมีฤทธิ์ยับยั้งความสามารถในการเพิ่ม จำนวนของเซลล์มะเร็งในระยะยาว ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการ ควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้องอก

Antiproliferative assay เช่น SRB assay, MTT assay หรือ WST assay เป็นการประเมินผลลัพธ์ปลายทางในระยะสั้น ซึ่งบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ภายใน ช่วงเวลา 24-72 ชั่วโมง โดยผลที่ได้เป็นผลรวมของทั้งการ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการเหนี่ยวนำการตายของ เซลล์ อย่างไรก็ตาม การทดสอบดังกล่าว ไม่สามารถอธิบาย กลไกเชิงลึกของการยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ การวิเคราะห์

วัฏจักรเซลล์ด้วย Flow cytometry แสดงให้เห็นว่า SGE สามารถรบกวนการดำเนินของวัฏจักรชีวิตของเซลล์ โดยทำให้ เซลล์หยุดอยู่ที่ระยะ G0/G1 ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งบ่งชี้ถึงฤทธิ์ ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ในลักษณะ Cytostatic ผ่านการ ยับยั้งการเข้าสู่ระยะสังเคราะห์ DNA ดังนั้น การใช้ผลจากทั้ง สองการทดสอบร่วมกัน จึงสนับสนุนว่าการลดลงของ Cell viability โดย SGE เกิดจากทั้งการหยุดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์ สะท้อนถึงศักยภาพของ SGE ในการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับอย่างมีประสิทธิภาพ

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีวงแหวนฟีนอล อย่างน้อยหนึ่งวงในโครงสร้าง โดยฟลาโวนอยด์จัดเป็นสาร ประกอบฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ที่มีวงฟีนอลสองวง ซึ่งสามารถแสดง ฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย จากการวัดปริมาณสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดใน SGE พบว่ามีปริมาณสารกลุ่มนี้ สูงกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารสกัด จากพืชที่มีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในระดับสูง [13] จากข้อมูลที่จะกล่าวถึงต่อไปนี้ จึงมีแนวโน้มว่าฤทธิ์ต้าน เซลล์มะเร็งตับของ SGE อาจมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณสาร ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในระดับสูงดังกล่าว ประการแรก คือ รายงานการแยกสารในกลุ่มฟีนอลิกจากแก่นแสมสาร เช่น Chrysophanol, Piceatannol, Aloe emodin และ Emodin ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงหลายชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเต้านม และมะเร็งช่องปาก ในระดับที่ แตกต่างกัน [7] นอกจากนี้ มีรายงานว่า Emodin ซึ่งแยกได้ จากรากและเหง้าของโกฐน้ำเต้า (*Rheum palmatum* L.) สมุนไพรสำคัญในแพทย์แผนจีน สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวน ของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เหนี่ยวนำการหยุดวัฏจักรเซลล์ใน ระยะ S และ G2/M กระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) และยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ โดยออก ฤทธิ์ผ่านการยับยั้งสัญญาณ Wnt/ β -catenin [14]

ในการศึกษาต่อไป ผู้วิจัยจะมุ่งศึกษากลไกการออกฤทธิ์ ของสารสกัดจากแก่นแสมสารต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ใน ระดับโมเลกุล โดยให้ความสำคัญกับการควบคุมวัฏจักรเซลล์ การเหนี่ยวนำการตายของเซลล์ และเส้นทางสัญญาณที่ เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนและการอยู่รอดของเซลล์ พร้อมทั้ง พัฒนามาตรฐานของสารสกัดด้วยการทำ Chemical fingerprint การกำหนดสารบ่งชี้ และการประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อให้ สารสกัดมีความสม่ำเสมอและสามารถนำไปพัฒนาทาง เภสัชวิทยาได้ แม้จะเป็นสารผสมหลายองค์ประกอบ

5. บทสรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากแก่นแสมสาร (SGE) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 โดยออกฤทธิ์ขึ้นกับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ทดสอบ สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและเหนี่ยวนำความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้อย่างจำเพาะเมื่อเทียบกับเซลล์ตับปกติ นอกจากนี้ SGE ยังลดความสามารถในการเกิดโคโลนี และเหนี่ยวนำให้วัฏจักรเซลล์หยุดที่ระยะ G0/G1 ผลการศึกษานี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สนับสนุนการศึกษากลไกระดับโมเลกุลของ SGE ในอนาคต ขณะเดียวกัน ข้อมูลปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนามาตรฐานและควบคุมคุณภาพของสารสกัดจากพืช สำหรับการศึกษาทางเภสัชวิทยาในลำดับต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2568 สัญญาเลขที่ ทป.2-11/2568

7. References

- [1] Sung, H. and et al. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. 71(3): 209-249.
- [2] Chonprasertsuk, S. and Vilaichone, R.K. 2017. Epidemiology and treatment of hepatocellular carcinoma in Thailand. **Japanese Journal of Clinical Oncology**. 47(4): 294-297.
- [3] Lampimukhi, M. and et al. 2023. A review of incidence and related risk factors in the development of hepatocellular carcinoma. **Cureus**. 15(11): e49429.
- [4] Ahmed, Z.S.O. and et al. 2025. Updated review on natural polyphenols: Molecular mechanisms, biological effects, and clinical applications for cancer management. **Biomolecules**. 15(5): 629.
- [5] Pandey, P. and et al. 2025. An updated review summarizing the anticancer potential of flavonoids via targeting NF-kB pathway. **Frontiers in Pharmacology**. 15: 1513422.
- [6] Surapanthanakorn, S. and et al. 2018. Assessment of the anti-inflammatory activity of piceatannol-rich extract from *Senna garrettiana* heartwood. **Chiang Mai Journal of Science**. 45(7): 2691-2702.
- [7] Yuenyongsawad, S. and et al. 2014. Anti-cancer activity of compounds from *Cassia garrettiana* heartwood. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. 36(2): 189-194.
- [8] Hafez, S. and et al. 2019. Chemical constituents and biological activities of *Cassia* genus: Review. **Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University**. 3(2): 195-227.
- [9] Arzumanyan, V.A. and et al. 2021. The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. **International Journal of Molecular Sciences**. 22(23): 13135.
- [10] Goel, N. and et al. 2021. A comparative assessment of in vitro cytotoxic activity and phytochemical profiling of *Andrographis nallamalayana* J.L.Ellis and *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees using UPLC-QTOF-MS/MS approach. **RSC Advances**. 11: 35918-35936.
- [11] Artun, F.T. and et al. 2016. In vitro anticancer and cytotoxic activities of some plant extracts on HeLa and Vero cell lines. **Journal of BUON**. 21(3): 720-725.
- [12] Brix, N. and et al. 2021. Analysis of clonogenic growth *in vitro*. **Nature Protocols**. 16(11): 4963-4991.
- [13] Aryal, S. and et al. 2019. Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from western Nepal. **Plants**. 8(4): 96.
- [14] Qin, B. and et al. 2022. Emodin inhibits invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells via regulating autophagy-mediated degradation of snail and β -catenin. **BMC Cancer**. 22(1): 671.