การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 ของสารสกัดใบผักแว่นที่มีปริมาณของฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิกรวมเป็นองค์ประกอบ

Antioxidant and anti-A549 lung cancer activities of *Marsilea crenata* C. Presl leaf extract in relation to its total flavonoid and phenolic contents

ณัฏฐ์นรี ชัยเดช[1], อารียา ช้างทอง[1], วีรญา พลวาปี[1], ไพลิน การะวิง[1], ปณิตา คงสิลา[1], ประพัฒน์ มานูเอโล่ เรืองธนู[1], ปราณี ศรีราช[1] และรัชฎาวรรณ อรรคนิมาตย์[1*]

Natnaree Chaidech[1], Areeya Changthong[1], Weeraya Pholwapee[1], Pailin Karawing[1], Panita Kongsila[1], Praphat Manuelo Ruengthanoo[1], Pranee Sriraj[1] and Ratchadawan Aukkanimart[1*]

Received: 7 May 2025 ; **Revised**: 21 July 2025 ; **Accepted**: 11 September 2025

บทคัดย่อ

ผักแว่น *(Marsilea crenata* C. Presl) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ขึ้นชื่อในด้านศักยภาพในการเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ งานวิจัยฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบผักแว่น ศึกษาปริมาณฟีนอลิก และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด ชนิดA549 และการขยายตัวของมะเร็งปอดชนิด A549 โดยใบผักแว่นจากจังหวัดอุดรธานี ทำการแช่สกัดด้วย 70%เอทานอล เป็นตัวทำละลาย แยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดได้รับการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีเรโซแนนซ์แม่เหล็กนิวเคลียร์ ผลการศึกษาการสกัดพบว่ามีปริมาณสารสกัดหยาบร้อยละ 16.74 โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 3.32±5.00 mg GAE/g of Extract และ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 5.11±8.60 mg QE/g of Extract การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS แสดงค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง (IC50) DPPH เท่ากับ 106.06±8.00 µg/mL, ABTS เท่ากับ 74.59±5.75 µg/mLและ FRAP value เท่ากับ 388.65±0.01 mmole Fe^{2+}/g ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ NMR ยังแสดงให้เห็นถึงการมีของโครงสร้างของสารที่มีรายงานเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านมะเร็ง ผลการประเมินฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 โดยใช้การทดสอบ Sulforhodamine B (SRB) พบค่า IC50 เท่ากับ >750 µg/mL (24 ชั่วโมง), 45.56±1.54 µg/mL (48 ชั่วโมง) และ 6.14±3.42 µg/mL (72 ชั่วโมง) ตามลำดับ นอกจากนี้ สารสกัดยังสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 ได้อย่างมีนัยสำคัญในการทดสอบ wound healing ซึ่งบ่งชี้ถึงศักยภาพในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 สรุปสารสกัดจากใบผักแว่นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 และฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด A549 ได้

คำสำคัญ: ผักแว่น, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549, ฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด A549

Abstract

Marsilea crenata C. Presl, a traditional medicinal plant, is recognized for its potential as a rich source of bioactive compounds, particularly phenolics and flavonoids. This study aimed to investigate the biological properties of *M. crenata* C. Presl leaf extract, including its total phenolic and flavonoid contents, antioxidant activity, cytotoxicity against A549 lung cancer cells, and its effect on cancer cell migration. The leaves were collected from Udon Thani Province, Thailand, and extracted by maceration using 70% ethanol. The solvent was removed using a rotary evaporator. The chemical

[1] สาขาการแพทย์แผนไทย ภาควิชาการแพทย์แผนไทย, คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตสกลนคร

[1] Thai Traditional Medicine Program, Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology, Sakon Nakhon Campus

* Corresponding author: Ratchadawan Aukkanimart, Email: ratchadawan.ac@rmuti.ac.th

composition of the extract was analyzed using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The crude extraction yield was 16.74%, with total phenolic content of 3.32 ± 5.00 mg GAE/g extract and total flavonoid content of 5.11 ± 8.60 mg QE/g extract. Antioxidant activities assessed by DPPH and ABTS assays showed IC50 values of 106.06±8.00 µg/mL and 74.59±5.75 µg/mL, respectively, while the FRAP value was 388.65±0.01 mmole Fe^{2+}/g Extracts. NMR analysis also indicated the presence of structural features associated with anticancer compounds. Cytotoxic activity against A549 lung cancer cells was evaluated using the Sulforhodamine B (SRB) assay, revealing IC50 values of >750 µg/mL (24 h), 45.56±1.54 µg/mL (48 h), and 6.14±3.42 µg/mL (72 h). Furthermore, the extract significantly inhibited A549 cell migration in the wound healing assay, suggesting its potential to suppress cancer metastasis. In conclusion, *M. crenata* leaf extract exhibits antioxidant, cytotoxic, and anti-migratory activities against A549 lung cancer cells.

Keywords: *Marsilea crenata* C. Presl, antioxidant, anti-proliferative activity A549, anti-migratory activity A549

บทนำ

โรคมะเร็งยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญระดับโลก โดยข้อมูลจากประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า มะเร็งเต้านม มะเร็งปอดและหลอดลม มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก คิดเป็นสัดส่วนเกือบร้อยละ 50 ของผู้ป่วยโรคมะเร็งทั้งหมด (American Cancer Society, 2024) ในปี พ.ศ. 2567 มีรายงานผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ดังนี้ มะเร็งเต้านม 313,510 ราย (ร้อยละ 16) มะเร็งต่อมลูกหมาก 299,010 ราย (ร้อยละ 15) มะเร็งปอดและหลอดลม 234,580 ราย (ร้อยละ 12) และมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก 152,810 ราย (ร้อยละ 8) (Siegel *et al*., 2024; Sung *et al*., 2024)

สำหรับประเทศไทย โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่ง โดยข้อมูลสถิติระบุว่า มะเร็งท่อน้ำดี และมะเร็งปอดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น (World Health Organization, 2024) ปัจจุบันมีผู้ป่วยมะเร็งสะสมประมาณ 139,000 ราย และพบผู้ป่วยมะเร็งปอดรายใหม่ประมาณ 23,000 รายต่อปี โดยมีผู้เสียชีวิตประมาณ 19,000 ราย (National Cancer Institute of Thailand, 2023) จากข้อมูลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พ.ศ. 2565 พบว่าประเทศไทยมีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ประมาณ 400 รายต่อวัน โดยเป็นผู้ป่วยมะเร็งปอดประมาณร้อยละ 12 ทำให้มะเร็งปอดจัดอยู่ในอันดับ 3 ของมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทย

แนวทางการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน ได้แก่ การผ่าตัด การให้ยาเคมีบำบัด การฉายแสง การรักษาแบบมุ่งเป้า การให้ภูมิคุ้มกันบำบัด และการรักษาแบบประคับประคอง โดยยาที่ใช้ในการรักษามะเร็งอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ยา Cisplatin สำหรับมะเร็งท่อน้ำดี (Rizvi & Gores, 2023) และยา Osimertinib กับ Dabrafenib สำหรับมะเร็งปอด (Soria *et al*., 2023) โดย Cisplatin, Osimertinib และ Dabrafenib เป็นยารักษามะเร็งที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกัน โดยใช้รักษาโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่น มะเร็งท่อน้ำดี และมะเร็งปอดชนิด Non-Small Cell Lung Cance (NSCLC) โดยยา Cisplatin เป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในมะเร็งหลายชนิด กลไกหลักของยาคือการทำลาย DNA ซึ่งขัดขวางกระบวนการจำลองและถอดรหัสสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์ตายผ่านกลไก apoptosis (Rizvi & Gores, 2023) ยา Osimertinib เป็นยากลุ่ม EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor (EGFR-TKI) ใช้ในการรักษามะเร็งปอด ชนิด NSCLC ยานี้สามารถจับกับโปรตีน EGFR และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผ่านวิถี PI3K/AKT และ MAPK/ERK (Soria *et al*., 2023) ยา Dabrafenib เป็นยาในกลุ่ม BRAF inhibitors ใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่มีการกลายพันธุ์ โดยตัวยาจะยับยั้งการทำงานของโปรตีน BRAF ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ MAPK pathway ที่มีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (Soria *et al*., 2023) เซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 เป็นเซลล์มะเร็งปอด ชนิด NSCLC ที่มีลักษณะเป็นชนิดปกติ (wild-type) และมีการกลายพันธุ์ของ KRAS ซึ่งไม่ตอบสนองต่อ ยา Osimertinib หรือยา Dabrafenib และเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 เป็นเซลล์ที่ได้รับความนิยมในการศึกษาทางเภสัชวิทยาและฤทธิ์ต้านมะเร็ง เนื่องจากปัญหาการดื้อยาในผู้ป่วยบางรายจึงเกิดแนวทางการศึกษาวิจัยและพัฒนายาจากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งพบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืช สมุนไพร เช่น สารกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ และ อัลคาลอยด์ รายงานการศึกษาพบว่าสมุนไพรสามารถแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งได้หลายชนิด (Newman *et al*., 2024) และมีรายงานการศึกษาสารสำคัญที่พบใน ฟ้าทะลายโจร กระชาย ขมิ้นชัน และเพกา ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 เป็นต้น (Kumar *et al*., 2004; Chen *et al*., 2006; Lin *et al*., 2007; Saokaew *et al*., 2012)

ผักแว่น (*Marsilea crenata* C. Presl) พืชในวงศ์ MARSILEACEAE เป็นพืชจำพวกเฟิร์น มีลักษณะเป็นไม้น้ำล้มลุก พบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติ เป็นพืชที่มีใบประกอบเป็น

4 ใบย่อยติดกันที่ฐานใบ ผักแว่นประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น สเตอรอล และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น มีบทบาทสำคัญในการต้านแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง และต้านภูมิแพ้ (Kumar *et al*., 2023) ส่วนของใบอ่อน ยอดอ่อน และก้านใบสามารถรับประทานเป็นผักสดร่วมกับอาหารพื้นบ้าน ปัจจุบันมีการพัฒนาใบผักแว่นเป็นผลิตภัณฑ์ครีมสำหรับรักษาแผลอักเสบหลังการผ่าตัด (Widjaja *et al*., 2023)

สารสำคัญที่พบในใบผักแว่น ได้แก่ สารกลุ่ม สเตอรอล สารไฟโตเอสโตรเจน ในกลุ่มเจนีสติน (Genistein) ซึ่งมีเป็นการทดแทนฮอร์โมนเอสโตรเจนในสตรีวัยหมดประจำเดือน (Chen *et al*., 2023; Rahman *et al*., 2023) มีรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายของ Genistein ในผักแว่น ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ (Spagnuolo *et al*., 2023) มีรายงานการศึกษาสารสำคัญในผักแว่น เช่น β-Sitosterol และ stigmasterol มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์ และต้านการบุกรุกเซลล์ (anti-invasion) ของเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A-549 ได้ (Zhang *et al*., 2022a; Man & Zhang, 2023) จากข้อมูลดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารสกัดใบผักแว่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ และศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549

การทดลอง

1. สมุนไพรและการเตรียมสารสกัดใบผักแว่น จากอำเภอกุดจับ จังหวัดอุดรธานี ทำการตรวจสอบลักษณะพฤกษศาสตร์เทียบกับหนังสือผักพื้นบ้านต้านโรค (กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 2553) และผู้เชี่ยวชาญ โดย ผศ.ดร. พิเชษฐ เวชวิฐาน ผู้เชี่ยวชาญเภสัชกรรมแผนไทยและสมุนไพรพื้นบ้าน ดำเนินการเตรียมสารสกัดดังนี้ 1) นำใบผักแว่นล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า ผึ่งให้แห้ง แล้วอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง นำใบผักแว่นบดให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดขนาดเล็ก 2) ชั่งใบผักแว่น 50 กรัม ผสมกับเอทานอล 70% ในอัตราส่วน 1:30 (%w/v) หมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกรองด้วยกระดาษกรองแบบหยาบ (Do *et al*., 2014; Azwanida, 2015; Elboughdiri, 2018) 3) นำสารสกัดใบผักแว่นระเหยแยกเอทานอลออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 60 °C จะได้สารสกัดหยาบ และทำให้สารสกัดแห้งอีกครั้งโดยใช้ Freeze dry จากนั้นเก็บสารสกัดไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C 4) นำสารสกัดใบผักแว่น ส่งตรวจวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดใบผักแว่นด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ณ ห้องปฏิบัติการนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2. การศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ดังนี้ เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 1,000 mg/mL และสารมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 1 mg/mL ทำการเจือจางสารสกัดเป็นความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80, 160 และ320 µg/mL หยดสารสกัดลงใน 96-well plate ตามด้วย Distilled water 60 µL, Folin reagent 20 uL, และ 7.5% Na_2CO_3 100 µL บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร (Singleton *et al*., 1999) และคำนวณปริมาณสารฟีนอลิกรวม และรายงานผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมเทียบเท่า Gallic acid ต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g extract)

3. การศึกษาหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content) ดังนี้ เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 1,000 mg/mL และสารมาตรฐาน Quercetin ความเข้มข้น 1 mg/mL ทำการเจือจางเป็นความเข้มข้น 0.8125, 1.625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 µg/mL หยดสารสกัด 50 µL ลงใน 96-well plate เติมสาร Aluminium chloride 50 µL บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 435 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม รายงานเป็นหน่วยมิลลิกรัมเทียบเท่า Quercetin ต่อกรัมสารสกัด (mg QE/g extract) (Chang *et al*., 2002)

4. การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธี ได้แก่ DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay ดังนี้

4.1 DPPH Assay เตรียมสาร DPPH 0.4 mM และสารมาตรฐาน Trolox จากนั้นผสมสารสกัดกับ DPPH ใน96-well plate บ่ม30 นาทีในที่มืด วัดการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร คำนวณโดยใช้สมการดังนี้

$$\% \text{ Radical Scavenging} = [\ 1-(A_1-A_2)/A_0] \times 100$$

เมื่อ A_1 = ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

A_2 = ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้ของสารเอทานอล

A_3 = ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้ของสารเอทานอลกับ DPPH (Rand-Williams *et al*., 1995) จากนั้นนำมาคำนวนค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง (IC50) โดย CalcuSyn v.2.0

4.2 ABTS Assay โดยเตรียมอนุมูลอิสระ ABTS และสารมาตรฐาน Trolox จากนั้นผสมสารสกัดกับ ABTS ใน 96-well plate บ่ม 15 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร (Re *et al*., 1999) คำนวณโดยใช้สมการดังนี้

Scavenging = [1-(A_1-A_2)/A_3] x 100

เมื่อ A_1 = ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ ABTS

A_2 = ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้ของสารเอทานอล

A_3 = ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้ของสารเอทานอลกับ ABTS จากนั้นนำมาคำนวนค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง (IC50) โดย CalcuSyn v.2.0

4.3 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay โดยเตรียมสารละลาย FRAP โดยผสม Acetate buffer, TPTZ และ $FeCl_3$ หยดสารสกัดและสารละลาย FRAP ใน 96-well plate บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร (Benzie & Strain, 1996) รายงานผลเป็น FRAP value มิลลิโมลต่อกรัมสารสกัด (mmole Fe^{2+}/g)

5. การวิเคราะห์โครงสร้างเคมีสารสกัดด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) เตรียมสารสกัดใบผักแว่นจำนวน 100 mg โดยละลายในตัวทำละลาย Dimethyl Sulfoxide-d6 (DMSO-d6) และบรรจุในหลอด NMR นำตัวอย่างเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ผลการวิเคราะห์จะถูกส่งออกเป็นข้อมูลสเปกตรัมเพื่อประเมินโครงสร้างพันธะทางเคมีของสารสกัดใบผักแว่น

6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 ของสารสกัดใบผักแว่นด้วยวิธี Sulforhodamine B (Skehan *et al*.,1990) เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. โสรัจสิริ เจริญสุดใจ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เซลล์เพาะเลี้ยงที่ถูกเพาะเลี้ยงในมีเดียชนิด Roswell Park Memorial institute (RPMI) 1640 (Gibco®) เสริมด้วย potassium bicarbonate 2 g/L, 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco®) และยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Pen-step (Gibco®), Amphotericin B (Gibco®) ทำการเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 °C ที่5% CO_2 (Lowell *et al*., 2000) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กำหนดกลุ่มทดสอบด้วยสารสกัดใบผักแว่น (23.45-750 µg/mL) และกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบเป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (0 µg/mL) และกลุ่มควบคุมเชิงบวกคือยา Cisplatin (0.1-1,000 µM) บ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในตู้บ่ม 5%CO_2 และทดสอบที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาทำการตรึงเซลล์ด้วย10%TCA บ่มในตู้ 4 °C เป็นเวลา 40 นาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องทำการย้อมสีโดยทำการเติม สารละลาย 0.4% SRB ใน 1% acetic acid บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องจากนั้นล้างออกด้วย 1% acetic acid และตั้งทิ้งไว้จนแห้งละลายสีด้วย Tris base (pH8) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยสมการดังนี้ % Inhibition = [(OD control-OD test)/OD control] x100 เมื่อ OD control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์มะเร็งที่ไม่ได้ใส่สารทดสอบ OD test คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์มะเร็งที่ใส่สารทดสอบ และนำมาคำนวณค่าIC50 (50% Inhibition concentration) โดยใช้โปรแกรม CalcuSyn v.2.0

7. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 โดยเทคนิค wound healing (Liang *et al*., 2007) เป็นวิธีการที่ศึกษาดูการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านช่องวาง โดยทำการขีดตรงบริเวณที่เซลล์มีการเจริญเติบโตให้เป็นช่องว่าง แบบ monolayer หากเซลล์มีการเคลื่อนที่เกิดขึ้นช่องว่างจะแคบลง ทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 ใน 24-well plate บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้ CO_2 อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นขีดเซลล์ด้วยปิเปตทิป และล้างเศษเซลล์ด้วยสารละลาย phosphate saline buffer นำไปถ่ายรูปด้วยNikon Eclipse Ts2R Inverted Research Microscope และทำการวัดความกว้างของรอยแผลที่ขีดที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง และนำเซลล์เติมสารสกัดใบผักแว่นที่ความเข้มข้น 0.25-IC50, 0.5-IC50, IC50 ณ เวลา 48 ชั่วโมง นำเซลล์ไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อครบเวลานำมาถ่ายภาพ วัดความกว้างของรอยแผลที่ชั่วโมง 0, 24 และ48 ชั่วโมง และคำนวณความกว้างที่เปลี่ยนแปลง วัดภาพด้วยโปรแกรม Image J จากนั้นคำนวณเป็นร้อยละของการเคลื่อนที่ของเซลล์การปิดของรอยแผล โดยใช้สมการดังนี้ Percentage of migrated cells [initial scratch (0 ชั่วโมง)–final scratch (48 ชั่วโมงหรือ 72 ชั่วโมง / initial (0 h)] x 100

8. การศึกษาครั้งนี้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±SD) ความเป็นพิษของสารสกัดใบผักแว่นต่อเซลล์มะเร็งปอด ชนิดA549 แสดงผลเป็น ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (%cell viability) และการเปรียบเทียบร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (0 µg/mL) กับสารสกัดใบผักแว่นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (23.45-750 µg/mL) วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย One-way ANOVA ตามด้วย Dunnett's test (Prism 9) การคำนวณค่า IC50 ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด A549 ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง คำนวณด้วยโปรแกรม CalcuSyn v.2.0 โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ $p<0.05$

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. ผลปริมาณสารสกัดสมุนไพรใบผักแว่นด้วยตัวทำละลาย 70 % เอทานอล (แสดงใน Table 1)

Table 1 Percentage yield of *Marsilea crenata* leaf extract.

Color	Dry weight (g)	Extract weight (g)	%Yield
Light brown	50	8.37	16.74

2. ผลปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดใบผักแว่น มีปริมาณฟีนอลิกรวม 3.32±5.00 mgGAE/g Extract โดยกราฟมาตรฐาน Gallic acid แสดงค่า R^2=0.999

3. ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดใบผักแว่น พบว่าสารสกัดใบผักแว่นมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม 5.11±8.60 mgQE/g Extract โดยกราฟมาตรฐาน Quercetin แสดงค่า R^2=0.999

4. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบผักแว่น จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบผักแว่นด้วยวิธี DPPH สารมาตรฐานที่ใช้ คือ Trolox พบว่า กราฟมาตรฐาน Trolox แสดงค่า R^2=0.9997 (ค่า IC50 ของ Trolox เท่ากับ 13.5±0.45 µg/mL) และสารสกัดผักแว่นที่ความเข้มข้น 10-160 µg/mL มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ 12-64% ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และสารสกัดผักแว่นมีค่า IC50 เท่ากับ 106.06±8.00 µg/mL ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารมาตรฐาน Trolox การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบผักแว่นโดยใช้วิธี ABTS มาตรฐานที่ใช้ คือ Trolox พบว่า กราฟมาตรฐานของ Trolox แสดงค่า R^2 เท่ากับ 0.9994 (ค่า IC50 ของ Trolox เท่ากับ 6.56±0.12 µg/mL) โดยสารสกัดผักแว่นแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 39-100% ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และสารสกัดผักแว่นมีค่า IC50 เท่ากับ 74.59±5.75 µg/mL ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารมาตรฐาน Trolox และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบผักแว่นด้วยวิธี FRAP โดยมีสารมาตรฐานที่ใช้คือ Gallic acid พบว่า กราฟมาตรฐาน Gallic acid แสดงค่า R^2=0.9995 และสารสกัดผักแว่น FRAP value เท่ากับ 388.65±0.01 mmole Fe^{2+}/g

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบผักแว่น ด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance spectroscopy

ผลการวิเคราะห์ ^{1}H NMR และพบสัญญาณของสารในช่วงค่าเคมีชิฟต์ (Chemical shift) δ ^{1}H NMR chemical shifts 5.338–5.385 ppm, 2.013–2.24 ppm และ 0.831–1.332 ppm เป็นสารผสมในกลุ่ม alkene, allylic, และ aliphatic protons โดย 5.338–5.385 ppm ซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงการมีอยู่ของพันธะคู่ Vinylic protons (–CH=CH–) ในโครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) เช่น อนุพันธ์ของ Oleic acid, linoleic acid และ palmitic acid เป็นต้น ช่วง 2.013–2.24 ppm พบโครงสร้างของ acyl CH_2 ของกรดไขมัน (fatty acids)/ไฟโตสเตอรอล (phytosterol) และช่วง 0.831–1.332 ppm พบโครงสร้างของ Aliphatic protons (–CH_3, –CH_2–), long hydrocarbon chains ของกรดไขมัน (fatty acids) นอกจากนี้ ช่วง chemical shift ของสารสกัดผักแว่นที่วิเคราะห์พบในช่วงของกลุ่มสาร Sterols/Phytosterols เช่นβ-sitosterol (aliphatic protons: 0.8–1.5 ppm, alkene protons (Δ5): ~5.3 ppm, allylic CH_2: ~2.0–2.2 ppm) และการศึกษานี้พบ Olefinic proton (C=C) ที่ 5.346 ppm ระบุว่าเป็นสาร stigmasterol (PubChem CID 5280794, Spectra Base) ดัง Figure 1

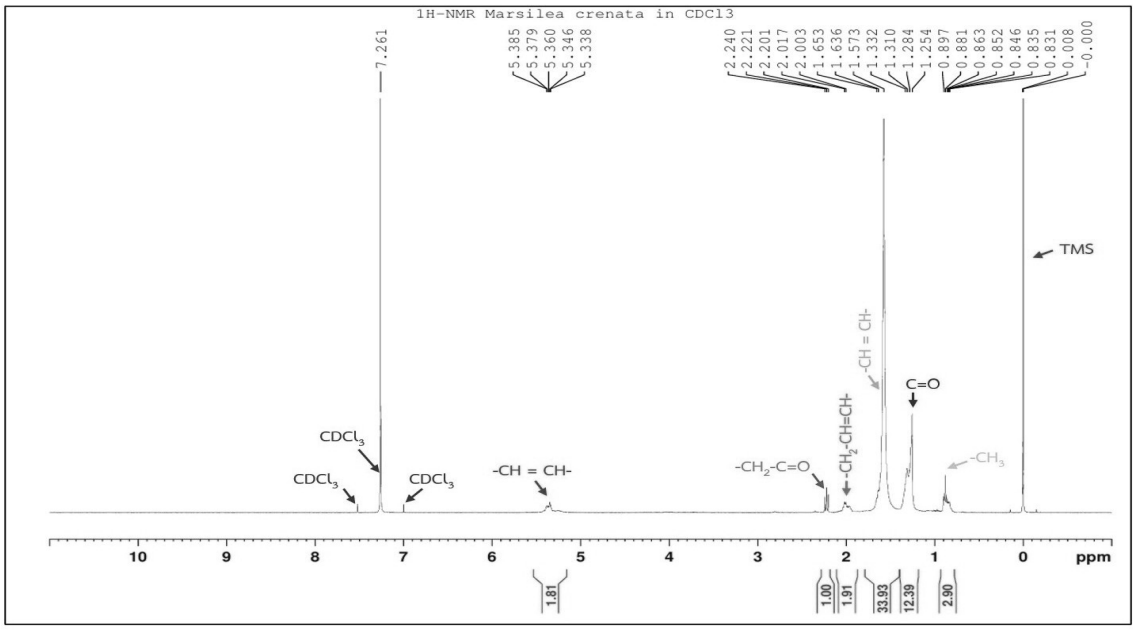


Figure 1 ^{1}H-NMR spectrum of Marsilea crenata in $CDCl_3$, with all peak labels ($CDCl_3$, TMS, –CH=CH–, –CH_2–C=O, –CH_2–CH=CH–, C=O, –CH_3) in English/chemical notation.

Table 2 Total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Marsilea crenata* leaf extract.

Total phenolic content (mg GAE/g extract)	Total flavonoid content (mgQE/g Extract)	Antioxidant activity		
		DPPH (IC50; µg/mL)	ABTS (IC50; µg/mL)	FRAP (mmole Fe^{2+}/g)
3.32±5.00	5.11±8.60	106.06±8.00	74.59±5.75	388.65±0.01

6. ผลความเป็นพิษของสารสกัดใบผักแว่นต่อเซลล์มะเร็งปอด ชนิดA549

ผลการทดลองแสดงออกเป็นร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ (Figure 2) พบว่าสารสกัดใบผักแว่นสามารถลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็ง ขนาดความเข้มข้นของสารสกัดใบผักแว่นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดความเข้มข้น 23.45, 46.88, 93.75, 187.5, 375 และ750 µg/mL โดยเปอร์เซ็นของเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ 99.26±1.76%, 92.78±1.42%, 82.89±2.31%, 77.65± 1.60%,69.54±1.51% และ 56.39±2.40% ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 62.00±1.06%, 51.99±1.00%, 34.63±2.36, 23.38± 0.21%, 17.83±0.67% และ 15.26±0.60% ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 36.44±0.72%,35.36±0.36%, 28.82±0.73%, 18.34±0.81%,17.85±0.90% และ 17.40±1.31% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบผักแว่นแต่ละระดับความเข้มข้นกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (0 µg/mL) ณ ระยะเวลาเดียวกัน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าสารสกัดใบผักแว่นสามารถลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปอด ชนิดA549 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0 µg/mL) ในขณะที่ยาต้านมะเร็ง Cisplatin แสดงค่าความเข้มข้นที่ต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 (IC50) พบว่าในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า>1,000, 248.38±7.8 และ108.59±6.4 µM ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นที่สารสกัดใบผักแว่นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 ได้ร้อยละ 50 (IC50) พบว่าในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ >750, 45.56±1.54 และ 6.14±3.42 µg/mL ตามลำดับ ซึ่งแสดงพบว่าสารสกัดใบผักแว่น มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 ได้ดี ตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น

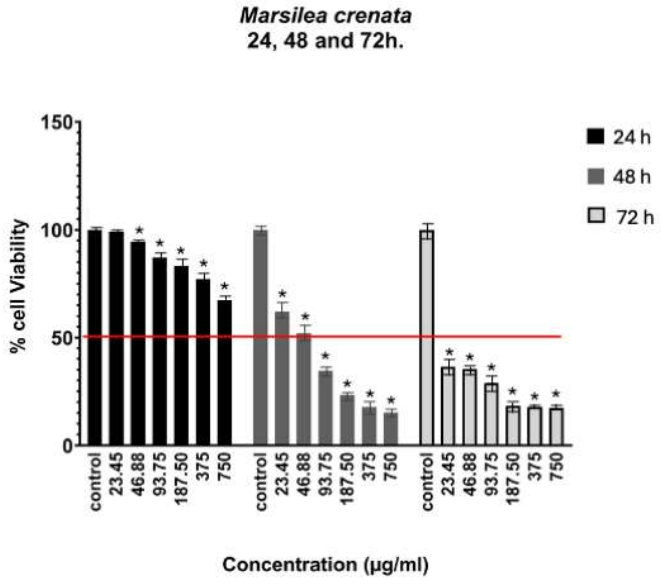


Figure 2 Effect of *Marsilea crenata* extract on the viability of A549 cells after 24, 48 and 72 h of treatment (SRB assay). Data are mean ± SD (n = 3). *p < 0.05 compared with the untreated control (0 µg/mL) at the same time point.

7. ผลการทดสอบสารสกัดใบผักแว่นในฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549

จากการศึกษาผลของสารสกัดใบผักแว่นที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.25-IC50=11.25, 0.5-IC50=22.5 และ IC50=45 µg/mL ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 ด้วยวิธีการทดสอบการเคลื่อนที่เข้ามาบริเวณช่องว่างที่ขีดไว้ พบว่ากลุ่มควบคุม (0 µg/ml) มีความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้ามามากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบผักแว่น โดยเฉพาะในระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบผักแว่น การเคลื่อนที่เซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดใบผักแว่นที่มากขึ้น (ที่ 48 ชั่วโมง) แสดงให้เห็นว่าในกลุ่มควบคุม (non treatment control) เซลล์มะเร็งปอดสามารถเคลื่อนที่ได้ อย่างต่อเนื่องจนเข้ามาชิดสมานรอยที่ขีดไว้

เมื่อคำนวนเปอร์เซ็นการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 พบว่า กลุ่มควบคุม (non treatment control)เซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 เคลื่อนได้ 94±10% กลุ่มสารสกัดใบผักแว่น ความเข้มข้น 11.25 µg/mL เคลื่อนที่ได้ 28% กลุ่มสารสกัดใบผักแว่น ความเข้มข้น 22.25 µg/mL เคลื่อนที่ได้ 25% กลุ่มสารสกัดใบผักแว่น ความเข้มข้น 45 µg/mL และเคลื่อนที่ได้ 22% ซึ่งพบว่าเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 ที่ทดสอบกับสารสกัดใบผักแว่นที่ความเข้มข้นสูงที่สุด 45 µg/mL สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 ได้มากที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Figure 3-4)

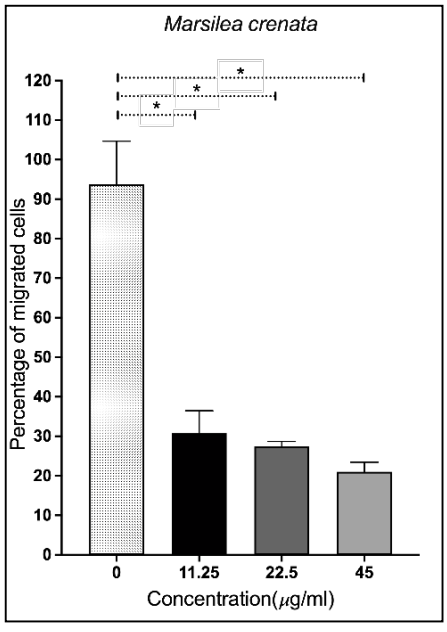


Figure 3 Effect of *Marsilea crenata* extract on the migration of A549 cells after 48 h (wound healing assay). Data are mean ± SD (n = 3). *p < 0.05 compared with the untreated control (0 μg/mL) at the same time point.

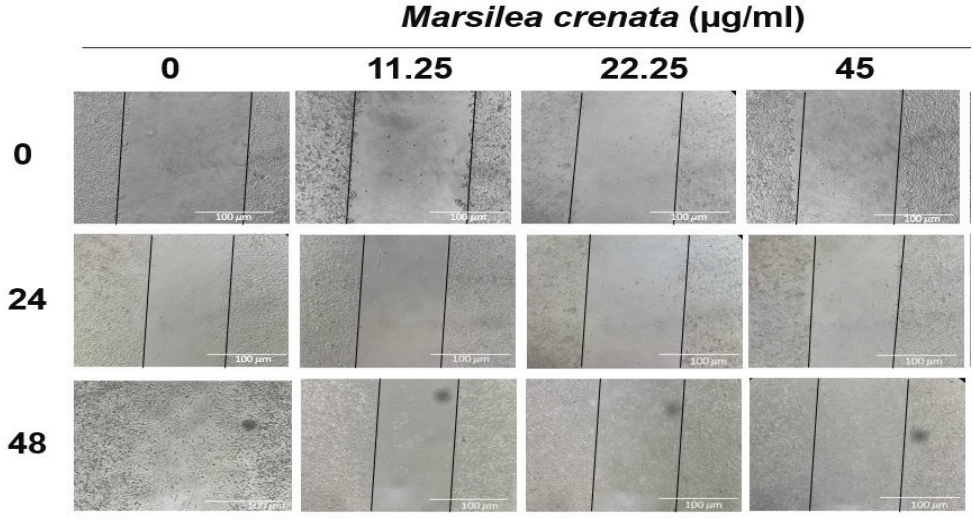


Figure 4 Representative wound healing images of A549 cells treated with *Marsilea crenata* extract (0–IC50 μg/mL) at 0, 24 and 48 h. Scale bar = 100 μm.

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดจากการสกัดใบผักแว่นด้วยเอทานอล 70% มีร้อยละผลผลิต เท่ากับ 16.74 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย(Jain *et al*., 2021) ที่รายงานว่าการสกัดพืชวงศ์ Marsileaceae ด้วยเอทานอล ให้ผลผลิตสารสกัดหยาบในช่วง 10-20% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะการสกัดและชนิดของตัวทำละลาย นอกจากนี้ การศึกษา (Boonsong *et al*., 2022) การใช้เอทานอลเข้มข้นระดับ 60–80% เป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชสมุนไพรไทย และการศึกษาของ Limsuwan *et al*., (2020) รายงานพบว่าการใช้เอทานอล 70% สามารถสกัดสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่น สารสกัดใบผักแว่นมีสารฟีนอลิกรวม ซึ่งผลที่ได้แสดงว่าสารสกัดใบผักแว่นมีศักยภาพในการเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ มีงานวิจัยรายงานว่าสารในกลุ่มฟีนอลิกมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันในเซลล์มนุษย์ (Shahidi & Ambigaipalan *et al*., 2015) ผลการศึกษานี้พบว่าสารสกัดใบผักแว่นมีสารฟลาโวนอยด์ ทั้งนี้ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบได้โดยทั่วไปในพืชสมุนไพรและมีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ

และต้านการเกิดมะเร็ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานกับการศึกษาที่ผ่านมา (Sornsenee *et al*., 2018; Tungmunnithum *et al*., 2018) และอาจมีบทบาทในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีรายงานพบว่าโครงสร้างของ ฟลาโวนอยด์ช่วยยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพ (Panche *et al*., 2016) และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถส่งผลยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Manach *et al*., 2005) นอกจากนี้มีการศึกษาฟลาโวนอยด์จากพืชสมุนไพรไทยหลายชนิด พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์มีผลโดยตรงต่อศักยภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Worasuttayangkurn *et al*., 2021)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบผักแว่นมีค่า IC50 ช่วง 74.59-106.06 µg/mL ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Brand-Williams *et al*. (1995) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืช และงานวิจัยของ Thaipong *et al*. (2006) ที่ได้เปรียบเทียบศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของพืชไทย รายงานว่าพืชที่มี IC50 ต่ำกว่า 200 µg/mL ถือว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับปานกลางถึงสูง ผลการศึกษานี้เป็นแนวทางเดียวกับ งานวิจัยของ Tungmunnithum *et al*. (2018) ที่ประเมินฤทธิ์ของสมุนไพรในกลุ่ม *Marsilea* spp. และมีรายงานการศึกษาพบว่าค่า IC50 ที่ศึกษาจากวิธี ABTS ถ้าต่ำกว่า 100 µg/mL มีสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Re *et al*., 1999) ABTS เป็นวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารที่สามารถละลายน้ำและไขมันได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของสารที่พบในผักแว่น (Chu *et al*., 2000; Zhou *et al*., 2016)

ค่า FRAP สะท้อนถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการเปลี่ยน Fe^{3+}-TPTZ เป็น Fe^{2+}-TPTZ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีสีน้ำเงินเข้ม สารมีค่า FRAP สูงแสดงว่ามีความสามารถในการให้ electron สูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น (Benzie & Strain, 1996) ผลจากการศึกษานี้พบว่าสารสกัดใบผักแว่นมีค่ารีดิวซ์ไอออนเฟอริก เท่ากับ 388.65±0.01 mmole Fe^{2+}/g extract แสดงถึงศักยภาพในการรีดิวซ์อนุมูลเฟอร์ริก ให้อยู่ในรูปเฟอร์รัส เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้า พบว่า ค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบผักแว่นในงานวิจัยนี้สูงกว่าค่าที่รายงานโดย Sulaiman *et al*. (2015) ซึ่งศึกษาสารสกัดผักแว่นด้วยวิธีเดียวกัน และรายงานค่า FRAP 175.43±2.81 µmol Fe^{2+}/g เท่านั้น ความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดจากปัจจัยหลายประการ เช่น แหล่งที่มาของพืช ความแตกต่างของสารตัวทำละลาย หรือกระบวนการสกัดที่ใช้ ซึ่งส่งผลต่อปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์ที่เป็นสาร ต้านอนุมูลอิสระหลัก และสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ศึกษาสมุนไพรจีน และรายงานผลคล้ายคลึงกัน ในกลุ่มพืชที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับผักแว่น (Benzie & Strain, 1996; Zhu *et al*., 2020)

การศึกษาองค์ประกอบโครงสร้างทางเคมีการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR พบว่า สารสกัดใบผักแว่นประกอบด้วย Sterols/Phytosterols เช่น β-sitosterol, stigmasterol มีโครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น อนุพันธ์ของ Oleic acid, linoleic acid และ palmitic acid

ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านมะเร็ง มีรายงานการศึกษาพบว่า β-Sitosterol พบว่ามีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งปอดสายพันธุ์ A549 และ H1975 ในหลอดทดลอง โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (anti-proliferation) กระตุ้นการตายของเซลล์ ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์ (anti-migration) ผ่านกลไกการลดการแสดงออกของ FGFR1 และ EGFR และส่งผลให้สัญญาณเส้นทาง PI3K/AKT/mTOR/Cyclin D1 ถูกกดลง (Man & Zhang, 2023) สำหรับ stigmasterol มีรายงานว่ามีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์ และต้านการบุกรุกเซลล์ (anti-invasion) ของเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A-549 โดยกลไกที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมเส้นทาง PI3K/Akt, ROS และ regulation ของ cyclins/CDKs รวมถึง RORC ส่งผลให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งได้ (Zhang *et al*., 2022a) การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอด ชนิดA549 ของสารสกัดใบผักแว่นสามารถลดความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปอดได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า IC50 ที่ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา (Thavamani *et al*., 2017; Sompong *et al*., 2020) พบว่าใบผักพื้นถิ่นไทย ในกลุ่ม *Marsilea* spp. มีสารออกฤทธิ์ที่สามารถเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis เซลล์มะเร็งได้จริง

การสารสกัดใบผักแว่นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดในความเข้มข้นสูง (45 µg/mL) ซึ่งแสดงให้เห็นการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลไกในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในใบผักแว่น เช่น กลุ่มฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีรายงานว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (Matrix metalloproteinase; MMP) ที่มีบทบาทในการสลายโครงสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ ซึ่งจำเป็นต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (Zhang *et al*., 2022a) มีการรายงานว่าสารฟลาโวนอยด์ สามารถยับยั้งการแสดงออกของ MMP-2 และ MMP-9 ส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 ลดลง (Luo *et al*., 2020) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ สรุปว่าสารสกัดใบผักแว่นมีโครงสร้าง

ทางเคมีของสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 ได้ ซึ่งควรทำการศึกษาหาปริมาณสารสำคัญที่พบในสารสกัดใบผักแว่น กลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด เพื่อประเมินศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้นแบบต้านมะเร็งจากสมุนไพรพื้นบ้าน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศ.ดร. โสรัจสิริ เจริญสุดใจ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อนุเคราะห์เซลล์มะเร็งปอดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณคณาจารย์สาขาการแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตสกลนคร ที่ได้ให้คำแนะนำและความรู้ตลอดการดำเนินงานวิจัยนี้รวมถึงขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่ ให้ข้อเสนอแนะทำให้งานวิจัยฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก [Department of Thai Traditional and Alternative Medicine]. (2553/2010). *ผักพื้นบ้านต้านโรค เล่ม 1* [Local vegetables against disease, Vol. 1]. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

American Cancer Society. (2024). *Cancer facts & figures 2024.* American Cancer Society.

Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants, 4*(3), 196.

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry, 239*(1), 70–76.

Boonsong, J., Suktawee, N., & Jitlang, S. (2022). Ethanol extraction efficiency of Thai herbal plants for bioactive compounds. *Journal of Natural Products Research, 11*(2), 55–62.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology, 28*(1), 25–30.

Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis, 10*(3), 178–182.

Chen, H. W., Huang, H. C., & Lin, T. J. (2006). Curcumin induces apoptosis of lung cancer cells through the upregulation of p53 expression. *Journal of the Chinese Medical Association, 69*(11), 547–553.

Chen, J., Liu, X., & Zhao, Y. (2023). Phytoestrogens and health: Insights into biological mechanisms and therapeutic perspectives. *Nutrients, 15*(2), 450.

Chu, Y. H., Chang, C. L., & Hsu, H. F. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 80*(5), 561–566.

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica. Journal of Food and Drug Analysis, 22*(3), 296–302.

Elboughdiri, N. (2018). Effect of time, solvent-solid ratio, ethanol concentration and temperature on extraction yield of phenolic compounds from olive leaves. *Engineering, Technology & Applied Science Research, 8*(2), 2805–2808. https://doi.org/10.48084/etasr.1983

Jain, N., Jadon, R. S., & Sharma, A. (2021). Extraction techniques and phytochemical investigation of Marsilea species: A review. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 13*(4), 35–42.

Kumar, R. A., Sridevi, K., Kumar, N. V., Nanduri, S., & Rajagopal, S. (2004). Anticancer and immunostimulatory compounds from Andrographis paniculata. *Journal of Ethnopharmacology, 92*(2–3), 291–295.

Kumar, S., Pandey, A. K., & Tripathi, R. (2023). Bioactive compounds and medicinal potential of *Marsilea* species: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 156*, 113982.

Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols, 2*(2), 329–333.

Limsuwan, S., Chaowasku, T., & Voravuthikunchai, S. P. (2020). Bioactive compounds from Thai medicinal

plants: Extraction and biological activities. *Phytochemistry Reviews, 19*, 583–602.

Lin, C. C., Shieh, D. E., & Yang, L. L. (2007). Baicalein inhibits lung cancer cell growth by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Archives of Pharmacal Research, 30*(12), 1562–1569.

Lowell, C. A., Smith, J. D., Wong, E. F., González, M. R., & Patel, N. K. (2000). Cellular culture protocols: Standard procedures for cancer cell lines. *Methods in Cell Biology, 62*, 145–160.

Luo, W., Wang, Y., Zhang, L., & Huang, Q. (2020). Natural compounds targeting cancer cell migration and invasion: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Frontiers in Pharmacology, 11*, 592631.

Man, Y., Li, X., & Zhang, W. (2023). Molecular mechanism of β-sitosterol in inhibiting proliferation and migration of human lung cancer cells through downregulation of FGFR1/EGFR–PI3K/AKT/mTOR pathway. *American Journal of Cancer Research, 15*(3), 1109–1121.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition, 79*(5), 727–747.

National Cancer Institute of Thailand. (2023). *Cancer statistics in Thailand 2023.* Ministry of Public Health.

Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2024). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products, 87*(1), 1–13.

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science, 5*, e47.

Rahman, M. M., Islam, M. S., Ahmed, M., & Hossain, M. A. (2023). Biological activities and anticancer potential of genistein: A comprehensive review. *Journal of Ethnopharmacology, 302*, 115934.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine, 26*(9–10), 1231–1237.

Rizvi, S., & Gores, G. J. (2023). Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology, 165*(1), 165–180.

Saokaew, S., Wilairat, P., Raktanyakan, P., & Teekachunhatean, S. (2012). Cytotoxic effects of *Kaempferia parviflora* extracts against lung cancer cell line A549. Asian Pacific *Journal of Cancer Prevention, 13*(5), 2391–2395.

Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods, 18*, 820–897.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians, 74*(1), 7–33.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology, 299*, 152–178.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., Mc Mahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute, 82*(13), 1107–1112.

Sompong, S., Jarintanan, F., & Boonprakob, U. (2020). Bioactive constituents and cytotoxicity of *Marsilea* species from Thailand. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 10*(5), 225–230.

Soria, J. C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K. H., ... & Ramalingam, S. S. (2023). Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non–small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine, 378*(2), 113–125.

Sornsenee, P., Boonruangprapa, T., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines, 5*(3), 93.

Spagnuolo, C., Moccia, S., Russo, G. L., & Russo, M. (2023). Genistein and cancer: Current status, challenges, and future directions. *Nutrients, 15*(4), 876.

Sulaiman, S. F., Yusoff, N. A. M., Eldeen, I. M., Seow, E. M., Sajak, A. A. B., Supriatno, & Ooi, K. L. (2015). Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis, 38*, 1–10.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2024). Global cancer statistics 2024: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide. *CA: A Cancer Journal for Clinicians, 74*(2), 134–148.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis, 19*(6–7), 669–675.

Thavamani, B. S., Mathew, L. E., & Mahesh, S. (2017). Cytotoxic effect of herbal extracts on human cancer cell lines. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 8*(8), 3211–3218.

Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines, 5*(3), 93. https://doi.org/10.3390/medicines5030093

Widjaja, S. S., *et al*. (2023). Development of Marsilea crenata-based topical products for postoperative wound care. *Journal of Ethnopharmacology, 309,* 116357.

Worasuttayangkurn, L., et al. (2021). The effects of Thai medicinal plants extracts on cancer cell proliferation. *Biomedical Reports, 14*(4), 1–8.

World Health Organization. (2024). *World cancer report 2024.* World Health Organization.

Zhang, X., Wang, J., Zhu, L., Wang, X., Meng, F., Xia, L., & Zhang, H. (2022a). Advances in stigmasterol on its anti-tumor effect and mechanism of action. *Frontiers in Oncology, 12*, Article 1101289. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1101289

Zhang, Y., Wang, L., Li, J., Chen, H., & Liu, X. (2022b). Terpenoid diversity in medicinal plants and their anticancer properties. *Phytochemistry Reviews, 21*(2), 245–262.

Zhou, K., Su, L., & Yu, L. (2016). Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(20), 6108–6114.

Zhu, Y., Wang, X., Li, J., Chen, L., Zhang, Q., Liu, H., ... & Li, Y. (2020). Review on antioxidative natural products from Chinese herbal medicines. *Frontiers in Pharmacology, 11*, 583221.