

ความเป็นพิษและการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง

โดยสารสกัดหยาบจากสาบเสือ**

Cytotoxicity and Apoptosis of Cancer Cells by the Crude Extract From
Chromolaena odorata (L.) King & Robinson**

สุชาดา โทผล^{1*} ปิยาภรณ์ วรานุสันติกุล¹ ศรีสุดา หาญภาคภูมิ¹ และนิวัฒน์ กังวานรังสรรค์²
¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต, ²คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Suchada Thophon^{1*}, Piyaporn Waranusantikul¹, Srisuda Hanphakphoom¹
& Niwat Kangwanrangsan²

¹Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University

²Faculty of Science, Mahidol University

บทคัดย่อ

ใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ (*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson) สกัดด้วย น้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน สารสกัดหยาบจากใบให้ปริมาณร้อยละผลผลิตมากกว่าลำต้นและราก ในทุกตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา C32 ของสารสกัด หยาบจากสาบเสือ ด้วยวิธี MTT assay สารสกัดหยาบที่ให้ค่า $IC_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$ (สารสกัดหยาบจากใบ ที่สกัดด้วยเอทานอล และเฮกเซน) ถูกนำมาใช้ด้วยความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อ ตรวจสอบการชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เมลาโนมา ด้วยวิธีการย้อม DAPI และการแตกหัก ของดีเอ็นเอ ด้วยวิธีแยกสารชีวโมเลกุลด้วยไฟฟ้า ผลการศึกษาพบ การเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างและลักษณะ ของการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะแรก ได้แก่ โครมาตินจับตัวแน่น โครมาตินแตกเป็นชิ้นส่วน นิวเคลียส แตกเป็นชิ้นส่วน และ อะพอพโทติกบอดี การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะ สุดท้ายแสดงการแตกหักของดีเอ็นเอ

คำสำคัญ: สาบเสือ ความเป็นพิษต่อเซลล์ การตายแบบอะพอพโทซิส

* ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)

e-mail: suchada_tho@dusit.ac.th

**งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก “ทุนงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสวนดุสิต”

Cytotoxicity and Apoptosis of Cancer Cells by the Crude Extract From
Chromolaena odorata (L.) King & Robinson

Abstract

Leaf, stem and root of *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson were extracted with aqueous, ethanol, methanol and hexane solvents. The crude leaf extracts with all solvents showed significantly higher percentage yield than those of stem and root. Cytotoxicity study of *C. odorata* extracts was performed on melanoma cell C32 using the MTT assay. The crude extracts which showed IC_{50} values less than 500 $\mu\text{g/ml}$ (leaf with ethanol and hexane), were used with 500 $\mu\text{g/ml}$ concentration at 24 and 48 hours for determination of melanoma cell C32 apoptosis induction using DAPI staining technique and DNA fragmentation using gel electrophoresis technique. The results showed morphological hallmarks in the early stage of apoptosis including chromatin condensation, chromatin fragmentation, nuclear fragmentation and apoptotic bodies. The specific biochemical changes in the late stage of apoptosis showed DNA fragmentation.

Keywords: *Chromolaena odorata*, Cytotoxicity, Apoptosis

บทนำ

สาบเสือ (*Chromolaena odorata*) เป็นวัชพืชที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกากลาง เข้ามาในเอเซียตะวันออกเฉียงใต้ และพบได้ทั่วไปในเขตร้อนของทุกทวีป (McFadyen & Skarratt, 1996; Vaisakh & Pandey, 2012; Zachariades et al., 2011) สาบเสือแพร่กระจายได้รวดเร็ว ทนต่อภาวะแห้งแล้งได้ดีจึงรุกรานพืชในท้องถิ่นและส่งผลกระทบต่อเกษตรอย่างมาก (Witkowski & Wilson, 2001; Zachariades et al., 2011) อย่างไรก็ตามในหลายประเทศแถบเอเซียและแอฟริกา ที่ผ่านมามีการศึกษาวิจัยสารสกัดจากสาบเสือเพื่อนำมาพัฒนาเป็นยาอย่างกว้างขวาง (Akinmoladun et al., 2007; Anyasor et al., 2011; Chakraborty et al., 2011; Panda et al., 2010; Vaisakh & Pandey, 2012; Vijayaraghavan et al., 2013) ใบสาบเสือได้ถูกนำมาวิจัยและผลิตเป็นยารักษาแผลไฟไหม้และรักษาบาดแผล (Phan et al., 1998; Raina et al., 2008) สารสกัดจากสาบเสือมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย อาทิ เช่น ด้านแบคทีเรียที่ก่อโรคหลายชนิด (Mondal et al., 2012; Stanley et al., 2014) ด้านการอักเสบ (Bamidele et al., 2008; Owoyele et al., 2005; Owoyele et al., 2006) ด้านอนุมูลอิสระ (Chakraborty et al., 2011; Parameswari & Suriyavathana, 2012; Vijayaraghavan et al., 2013) และด้านเซลล์มะเร็ง (Kouamé et al., 2013; Prabhu et al., 2011; Podolak et al. 2010; Wu et al. 2011)

สารสกัดจากสาบเสือมีสารสำคัญหลายชนิด เช่น Alkaloids, Coumarins, Flavonoids, Phenols, Quinones, Saponins, Steroids, Tannins, Terpenoids (Anyasor et al., 2011; Danlami et al., 2013; Vijayaraghavan et al., 2013) โดยสารกลุ่ม Flavonoids และ Alkaloids มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ชักนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิส (Gong et al., 2012; Siedlakowski et al., 2008) สาร Saponins มีความเป็นพิษต่อเซลล์และต้านมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม (MDA-MB-435) มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) (Podolak et al., 2010; Wu et al., 2011) ซึ่งการตายแบบอะพอพโทซิสเป็นการตายที่เป็นระบบเกิดขึ้นในภาวะปกติและภาวะที่มีพยาธิสภาพ เช่น มะเร็ง โดยมีลักษณะจำเพาะของการเปลี่ยนแปลง คือ โครมาตินจับตัวกันแน่น นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน และการแตกหักของดีเอ็นเอ (Bras et al., 2005; Coleman et al., 2001; Kim et al., 2006; Vermeulen et al., 2005; Zhang & Xu, 2000) การชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสจึงถูกนำมาใช้ศึกษาการต้านมะเร็งของสารสกัดจากพืช ความสามารถในการต้านมะเร็งของสารสกัดขึ้นกับตัวทำละลายที่ใช้สกัด (Kitagishi et al., 2012; Zong et al., 2012) ซึ่งยาต้านมะเร็งก็ใช้หลักการชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (Bai & Wang 2014; Wong, 2011) การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง โดยใช้สารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ ที่สกัดจากตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน จะทำให้ได้ข้อมูลในการเลือกส่วนของพืชและชนิดของสารสกัดเพื่อนำไปศึกษาการต้านมะเร็งชนิดต่างๆ รวมทั้งสามารถนำผลวิจัยที่ได้ไปใช้ในการศึกษาเพื่อแยกองค์ประกอบของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการต้านมะเร็งต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นการใช้ประโยชน์จากสาบเสือซึ่งเป็นพืชที่ขึ้นอยู่ทั่วไปในพื้นที่ต่างๆของประเทศไทย

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาความเป็นพิษ และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง โดยสารสกัดหยาบจาก ใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างสาบเสือ เก็บตัวอย่างสาบเสือ ที่สูงประมาณ 100-150 เซนติเมตร บริเวณป่าสวนยาง ต.นาวัง อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ (ภาพที่ 1) แยกส่วนใบ ลำต้น และราก หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ตากแดด 3 วัน แล้วนำไปเข้าตู้อบ (Memmert) ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 2 วัน น้ำหนักสดใบ ลำต้น และราก รวม 1 กิโลกรัม หลังอบได้น้ำหนักแห้ง 415 กรัม นำส่วน ใบ ลำต้น และรากที่อบแล้วไปทำให้ละเอียด โปบดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ ลำต้นและรากบดด้วย เครื่องบด Wiley Mill



ภาพที่ 1 ตัวอย่างสาบเสือที่เก็บจาก บริเวณป่าสวนยาง ต.นาวัง อ.เมือง จ. อำนาจเจริญ

การสกัดสารสกัดหยาบ นำผงบดละเอียดของใบ ลำต้น และรากสาบเสือ ปริมาณ 10 กรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทานอล (90%) เมทานอล (90%) และเฮกเซน ปริมาตรตัวทำละลายแต่ละชนิด 100 มิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้น 10% หลังจากที่มีผงบดละเอียดสาบเสือกับตัวทำละลายนำมาเขย่าด้วยเครื่อง Orbit Shaker (Gemmy VRN-480, Taiwan) ที่ความเร็ว 150-200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง กรองสารละลายนำไประเหยด้วย Rotary evaporator (Buchi R-200, USA) แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 80°C Ultra-low freezer (CoolSafe, USA) และทำการระเหยแห้งด้วย Dryer freezer (CoolSafe DK-3450, Denmark) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ผ่านการระเหยแห้ง นำไปใช้ในการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์เมลาโนมา C32 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. รัชนิย์ อุดมแสงพีเชร ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ Complete Media, 10% cDMEM 100 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, dulbecco's modified eagle medium) เติม 10% FBS (10% of fetal bovine serum heat-inactivated) 10 มิลลิลิตร และ Pem Strep 1 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเซลล์มา Warm ใน 37°C Water bath ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ ใส่ใน 75 cm³ flask นำไปเข้าใน Incubator ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายที่มีเซลล์ใน Cryogenic tube ใส่ใน 15 ml plastic tube ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์พร้อมใช้ Centrifuge ที่ 800 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเท Supernateทิ้ง ละลายเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดทั้งหมดใส่ใน 75 cm³ flask เขย่าเบาๆ ให้กระจายทั่ว Flask นำไปเพาะเลี้ยงใน Incubator ที่ 37°C และมีปริมาณของ CO₂ 5%

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในงานหลุม 96 หลุม โดยนับเซลล์ ด้วย Heamatocytometer เพื่อคำนวณหาปริมาณเซลล์ 2.5×10³, 5×10³, 1×10⁴, 2×10⁴, 4×10⁴ และ 8×10⁴ เซลล์ต่อหลุม ปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงเซลล์ใน Incubator ที่ 37°C และมีปริมาณ CO₂ 5% เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามเวลาที่กำหนด

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษโดยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium romide test)

หลักการทำงานของ MTT คือเซลล์ซึ่งยังมีชีวิตอยู่ มี Enzyme succinate dehydrogenase ซึ่งจะเปลี่ยน tetrazolium salt ให้เป็น formazan โดยปฏิกิริยา reduction และผลึก formazan มีสีม่วง น้ำเงินที่ไม่ละลายในน้ำต้องละลายด้วย DMSO และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ formazan ซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา C32 ของสารดีเอ็มเอสโอ (DMSO, dimethyl sulfoxide) เซลล์เมลาโนมา C32 ในจานหลุม 96 หลุม จำนวนเซลล์ 4×10^4 เซลล์ต่อหลุม ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ DMSO ใน 10% FBS ที่อุณหภูมิ 37°C ปริมาณ CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเซลล์ใน 75 cm^3 flask เจริญเต็มที่ประมาณ 80% ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ใน flask ออกจนหมด ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FBS ปริมาณ 5 ml แล้วดูดทิ้งเพื่อล้างเซลล์ เติม 0.25% trypsin EDTA 5 ml แล้วนำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ นำไป centrifuge ที่ 800 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเท supernate ที่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ทำการนับเซลล์ โดย Hematocytometer ปริมาณเซลล์ 40,000 เซลล์ต่อหลุม ปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียมสาร DMSO ที่ความเข้มข้น 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.01% และ 0.001% ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มเอสโอ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ใส่สาร DMSO ที่เตรียมไว้ในหลุม นำไปเพาะเลี้ยงใน incubator ที่ 37°C และปริมาณ CO_2 5% เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง วัดปริมาณเซลล์ด้วยการทดสอบ MTT และนำไปวัดค่า การดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 560 nm ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีเดอร์ (microplate reader รุ่น GLOMAX multi detection system) และนำค่าการดูดกลืนแสง มาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา C32 ของสารสกัดจากสาบเสือ ซึ่งสารสกัดปริมาณ 50 มิลลิกรัม ละลายด้วย DMSO 500 ไมโครลิตร สารสกัดจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 100,000 $\mu\text{g/ml}$ ใน 100% DMSO นำ ไปเจือจาง 10 เท่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM สารสกัดจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ใน 1% DMSO นำมากรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน แล้วนำไปเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี DMSO อยู่ 0.1% ให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 1, 100, 250, 500, 750 และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ นำเซลล์ เมลาโนมา C32 ในจานหลุม 96 หลุม จำนวนเซลล์ 4×10^4 เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMSO ใน 10 % FBS ใส่สารสกัดความเข้มข้นต่างๆ นำไปเพาะเลี้ยงใน incubator ที่ 37°C ปริมาณของ CO_2 5% เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตามกำหนดวัดปริมาณเซลล์ด้วยการทดสอบ MTT นำไปหา ค่าการดูดกลืนแสง วิเคราะห์หาค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% of cell viability) และหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์ตายหรือค่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลงร้อยละ 50 (50% Inhibitory concentration, IC_{50}) สูตรการหา

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์} &= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของเซลล์ในหลุมที่ทดสอบกับสารสกัด} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของเซลล์ในหลุมที่ไม่มีสารสกัด}} \\ (\% \text{ of cell viability}) & \end{aligned}$$

การศึกษาการตายแบบอะพอพโทซิส เซลล์เมลานوما C32 นำสารสกัดที่ให้ค่า $IC_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$ มาทดสอบ ได้แก่ สารสกัดจากใบที่สกัดด้วยเอทานอล และเฮกเซน โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ $500 \mu\text{g/ml}$ นำเซลล์ในจานหลุม 96 หลุม จำนวนเซลล์ 4×10^4 เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMSO ใน 10% FBS บ่มใน Incubator ที่ 37°C และปริมาณ CO_2 5% เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เติมน้ำสารสกัด ปริมาตร $500 \mu\text{l}$ บ่มใน 37°C และปริมาณ CO_2 5% เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์ที่ถูกทดสอบถ่ายลงใน Microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยง $500 \times g$ ล้างเซลล์ และตรึงเซลล์ โดยเติม 1X PBS และ เมทานอลที่แช่เย็น เก็บที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำละลาย DAPI (4,6-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid) ปริมาตร $100 \mu\text{l}$ มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น $0.5 \mu\text{g/ml}$ เก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที นำมาปั่นล้างด้วย 1X PBS เติมน้ำ 1X PBS : Glycerin (1:1) ปริมาตร $20 \mu\text{l}$ นำเซลล์ไปศึกษาการตายแบบอะพอพโทซิสด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Fluorescence Microscope, BX53, Olympus Tokyo, Japan) ความยาวคลื่น 430 nm

การตรวจสอบการแตกหักดีเอ็นเอของเซลล์เมลานوما C32 นำสารสกัดที่ให้ค่า $IC_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$ มาทดสอบ ได้แก่ สารสกัดหยาบจาก ใบที่สกัดด้วย เอทานอล และเฮกเซน โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ $500 \mu\text{g/ml}$ นำเซลล์ใส่ลงใน 24-well plate หลุมละ 1×10^6 เซลล์ นำสารสกัดผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ปริมาณ CO_2 5% เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ใส่ใน 1.5 ml centrifuge tube บั่นเหวี่ยงที่ $500 \times g$ นาน 3 นาที ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมน้ำละลายที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (DNAzol reagent, Invitrogen) นำเซลล์ที่แตกมาปั่นเหวี่ยงที่ $500 \times g$ นาน 3 นาที แยกเก็บสารละลายมาใส่ในหลอดเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เติมน้ำเอทานอลในปริมาตรครึ่งหนึ่ง (0.5 volume) ของสารละลายเริ่มต้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $4000 \times g$ นาน 2 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% เอทานอล 1 มิลลิลิตร ละลายตะกอนโดยวิธี Inverting tube ล้างดีเอ็นเอ แล้วปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนอีกครั้ง เทสารละลายเอทานอลทิ้ง ตั้งหลอดทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วย 8 mM NaOH ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

การแยกขนาดดีเอ็นเอ เตรียมสารละลาย agarose ที่ความเข้มข้น 1.8% agarose gel ใน TBE (Tris, Borax, EDTA) buffer โดยนำไปอุ่นให้ร้อนในเตาไมโครเวฟทิ้งไว้ให้เย็นลงอุณหภูมิประมาณ $40-50^\circ\text{C}$ เทลงชุดแท่นพิมพ์ นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาผสมกับ Loading dye นำไปประกอบในชุด Electrophoresis (Electrophoresis system, i.MyRun.N, Cosmo Bio Co.Ltd., Tokyo, Japan) ใส่ DNA marker เพื่อใช้บอกขนาดของดีเอ็นเอแต่ละแถบและใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอ เปิดเครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้าให้ไหลผ่านจากขั้วลบไปขั้วบวกเพื่อให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ และควบคุมให้แรงที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที นำเจลออกมาย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วนำไปตรวจสอบผ่านเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต

ผลการวิจัย

ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ พบว่า สารสกัดหยาบจากใบให้ปริมาณร้อยละผลผลิต (% yield) มากกว่าลำต้นและรากที่ตัวทำละลายชนิดเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณสารสกัดหยาบสูงสุดได้จากใบที่สกัดด้วยน้ำ ($12.16 \pm 0.13\%$) และ เมทานอล ($10.45 \pm 0.012\%$) ส่วนของลำต้น ($0.28 \pm 0.09\%$) และราก ($0.46 \pm 0.23\%$) ที่สกัดด้วยเฮกเซนให้ปริมาณสารสกัดหยาบต่ำสุด รายละเอียดตามตารางที่ 1 [หมายเหตุ: ผลการทดลองส่วนนี้อยู่ภายใต้แผนงานวิจัยเรื่องการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากลำต้นและรากของต้นสาบเสือ โดยโครงการย่อยของแผนงานวิจัยได้เผยแพร่ไปแล้วโดย Hanphakphoom et al. (2016)]

การเลี้ยงเซลล์เมลาโนมา C32 ในจานหลุม 96 หลุม จำนวนเซลล์เริ่มต้น 2.5×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 และ 8×10^4 เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้น 4×10^4 เซลล์ต่อหลุม มีเซลล์เพิ่มจำนวนโดยวัดค่า OD ที่ 24 ชั่วโมง 1.542 ± 0.056 ที่ 48 ชั่วโมง 1.874 ± 0.022 และ ที่ 72 ชั่วโมง 1.620 ± 0.037 ซึ่งจำนวนเซลล์ที่ 4×10^4 เซลล์ต่อหลุม เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมเนื่องจากเซลล์เจริญได้พอเหมาะกับพื้นที่ในหลุมและไม่พบเซลล์ตาย รายละเอียดตามตารางที่ 1 และภาพที่ 2 - 4

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา C32 ของสารดีเอ็มเอสโอ การทดสอบความเข้มข้นของ DMSO 0.001, 0.01, 0.01, 0.1, และ 1% โดยให้กลุ่มควบคุมมีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ เท่ากับ 100 พบว่า ที่ 24 ชั่วโมง ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มากกว่า 100 ที่ 48 ชั่วโมง ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์อยู่ในช่วง 93.94 ± 2.58 - 101.33 ± 1.14 และที่ 72 ชั่วโมง ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ อยู่ในช่วง 98.37 ± 1.10 - 103.67 ± 2.41 รายละเอียดตามตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ปริมาณร้อยละผลผลิต (% yield) ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) สกัดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล และ เฮกเซน

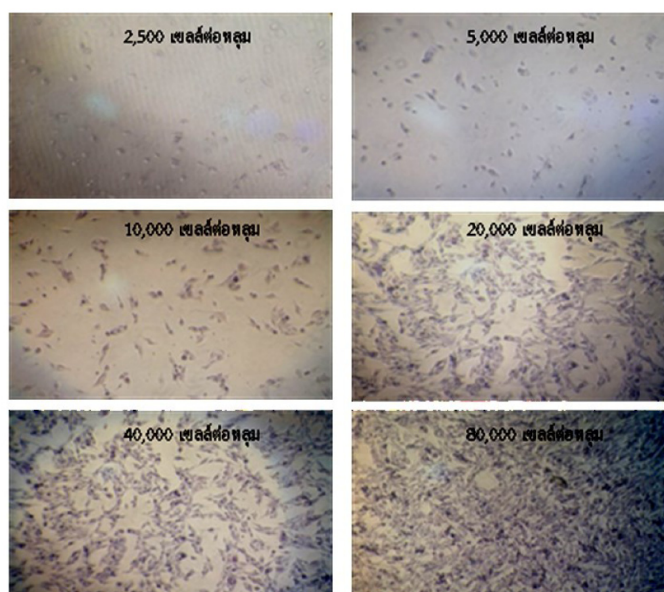
ส่วนของสาบเสือ	ตัวทำละลาย	ปริมาณร้อยละผลผลิต (% yield)
ใบ	น้ำ	12.16±1.341,c
	เอทานอล	8.42±1.152,c
	เมทานอล	10.45±0.121,b
	เฮกเซน	2.37±0.213,b
ลำต้น	น้ำ	2.49±0.571,b
	เอทานอล	1.88±0.042,b
	เมทานอล	2.99±0.091,a
	เฮกเซน	0.28±0.093,a
ราก	น้ำ	5.87±0.631,a
	เอทานอล	3.99±0.152,a
	เมทานอล	4.34±0.682,a
	เฮกเซน	0.46±0.233,a

หมายเหตุ 1) ตัวเลขแตกต่างกันภายในสดมภ์ของแต่ละส่วนสกัด (ใบ ลำต้น และราก) แสดงค่าเฉลี่ย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างตัวทำละลายชนิดต่างๆ ในส่วนสกัดประเภทเดียวกันด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี LSD

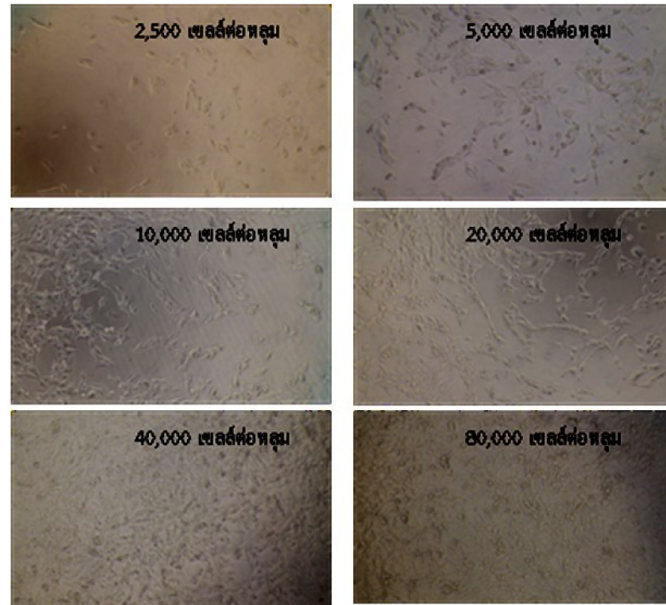
2) อักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกันระหว่างสดมภ์ระหว่างส่วนสกัดต่างๆ (ใบ ลำต้น และราก) ของตัวทำละลายชนิดเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างส่วนสกัดต่างๆ (ใบ ลำต้น และราก) เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกันด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี LSD

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสง (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) และร้อยละการเจริญของเซลล์เมลานوما ที่เลี้ยงใน 96 well plate ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

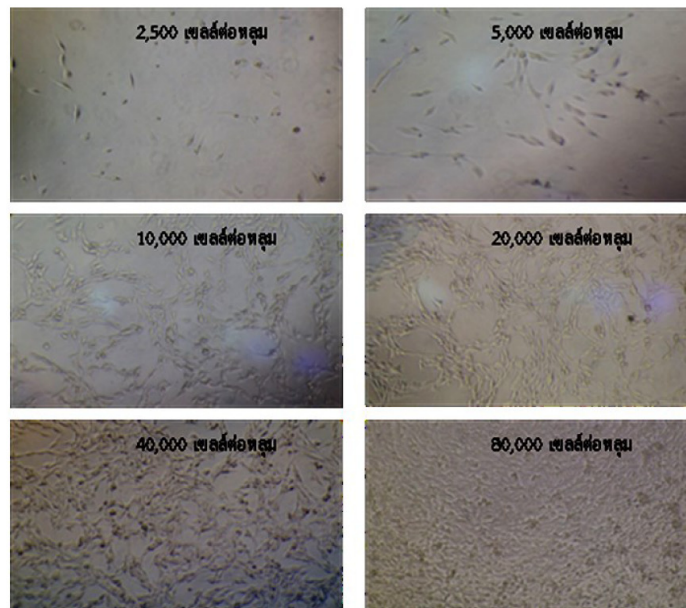
จำนวนเซลล์ ต่อหลุม	ค่าการดูดกลืนแสง (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
2.5×10^3	0.290 ± 0.036	0.674 ± 0.017	0.376 ± 0.020
5×10^3	0.373 ± 0.018	0.803 ± 0.017	0.595 ± 0.052
1×10^4	0.553 ± 0.037	1.014 ± 0.023	0.972 ± 0.019
2×10^4	1.098 ± 0.075	1.558 ± 0.032	1.349 ± 0.005
4×10^4	1.542 ± 0.056	1.874 ± 0.022	1.620 ± 0.037
8×10^4	1.878 ± 0.075	2.222 ± 0.019	2.154 ± 0.028



ภาพที่ 2 การเลี้ยงเซลล์เมลานوما ในจานหลุม 96 well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 3 การเลี้ยงเซลล์เมลาโนมา ในจานหลุม 96 well plate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



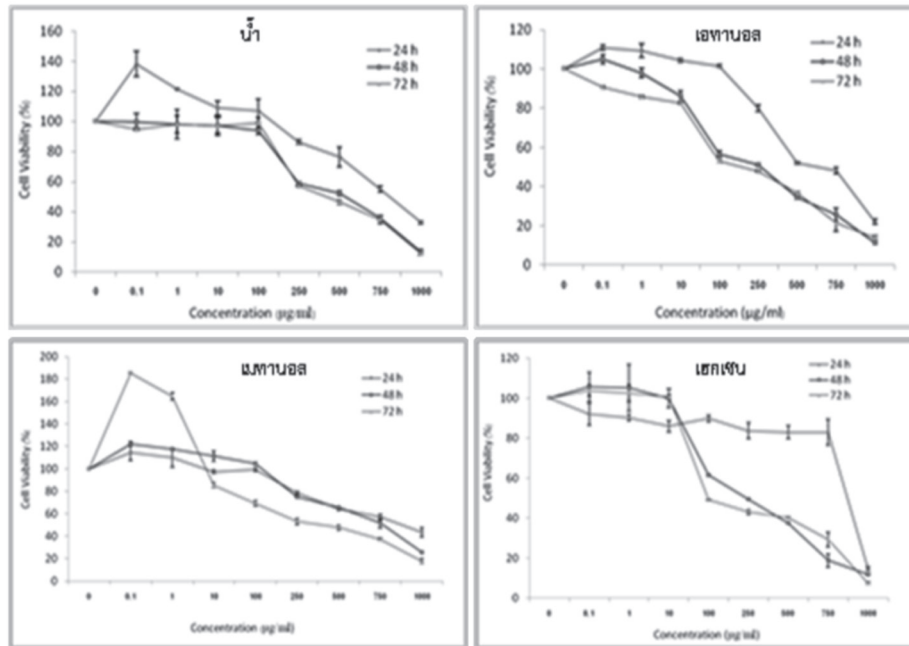
ภาพที่ 4 การเลี้ยงเซลล์เมลาโนมา ในจานหลุม 96 well plate เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เมลานوماต่อสารดีเอ็มเอสโอ ความเข้มข้น 0.001 ถึง 1% ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ดีเอ็มเอสโอ (%)	ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เมลานوما (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
0.001	102.02 ± 2.69	99.99 ± 1.90	98.37 ± 1.10
0.01	103.87 ± 1.85	101.09 ± 2.18	99.13 ± 2.40
0.05	103.71 ± 3.88	101.33 ± 1.14	103.67 ± 2.41
0.1	105.72 ± 2.01	100.93 ± 3.17	103.49 ± 1.68
0.2	103.01 ± 2.53	98.45 ± 2.32	102.88 ± 1.04
0.5	105.63 ± 1.90	98.24 ± 1.00	102.31 ± 0.76
1	104.07 ± 7.83	93.94 ± 2.58	101.46 ± 1.42

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานوما C32 ของสารสกัดจากใบสาบเสือ

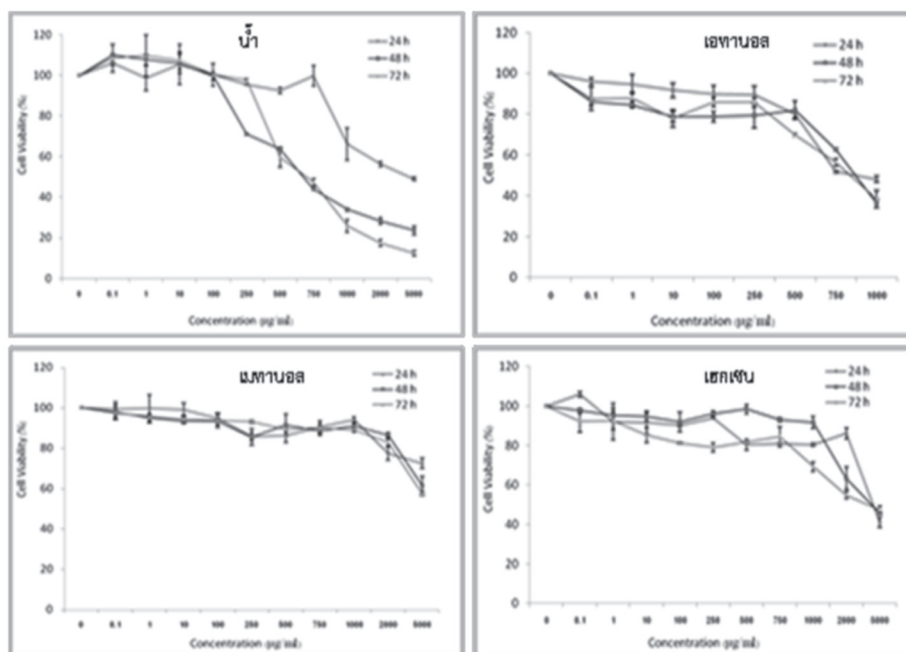
ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เมลานوماต่อสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน ความเข้มข้น ในช่วง 0.1 ถึง 1,000 µg/ml ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 100 พบว่า สกัดด้วยน้ำ ที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 750 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลง เป็น 55.19±2.11 ที่ 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 500 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเป็น 52.38±1.56 ที่ 72 ชั่วโมง ความเข้มข้น 500 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ ลดลง เป็น 46.42±1.40 สกัดด้วยเอทานอล ที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 500 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ ลดลง เป็น 51.96±0.70 ที่ 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 250 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ ลดลงเป็น 50.99±0.66 และที่ 72 ชั่วโมง ความเข้มข้น 250 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลง 47.85±0.42 สกัดด้วยเมทานอล ที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ ลดลงเป็น 43.26±4.05 ที่ 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ ลดลงเป็น 25.48±0.90 และ ที่ 72 ชั่วโมง ความเข้มข้น 500 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ ลดลงเป็น 47.54±2.13 สกัดด้วย เฮกเซน ที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลง เป็น 14.77±1.05 ที่ 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 500 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ ลดลงเป็น 37.61±0.52 ที่ 72 ชั่วโมง ความเข้มข้น 500 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ ลดลงเป็น 40.17±0.55 (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เมลานอมาต่อสารสกัดจากใบสาบเสือ ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานอมา C32 ของสารสกัดจากลำต้นสาบเสือ

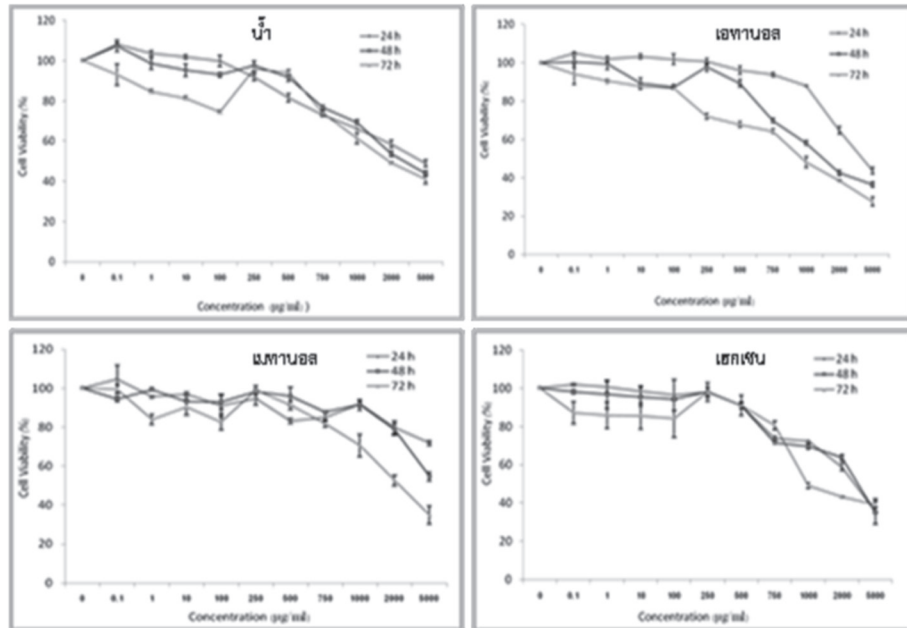
ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เมลานอมาต่อสารสกัดจากลำต้นสาบเสือ ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน ความเข้มข้น ในช่วง 0.1 ถึง 5,000 µg/ml ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 100 พบว่า สกัดด้วยน้ำ ที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเป็น 66.12 ± 7.78 ที่ 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเป็น 33.98 ± 0.94 และที่ 72 ชั่วโมง ความเข้มข้น 500 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเป็น 59.68 ± 4.87 สกัดด้วยเอทานอล ที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเป็น 48.15 ± 1.54 ที่ 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเป็น 36.31 ± 2.05 และ ที่ 72 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเป็น 38.36 ± 4.28 สกัดด้วยเมทานอล ที่ 72 ชั่วโมง ความเข้มข้น 5,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเป็น 57.44 ± 1.06 สกัดด้วยเฮกเซน ที่ 72 ชั่วโมง ความเข้มข้น 2,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลง เป็น 54.79 ± 1.76 (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เมลานوماต่อสารสกัดจากลำต้นสาบเสือ ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล และ เฮกเซน ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานوما C32 ของสารสกัดจากรากสาบเสือ

ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เมลานوماต่อสารสกัดจากลำต้นสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน ความเข้มข้น ในช่วง 0.1 ถึง 5,000 µg/ml ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 100 พบว่า สกัดด้วยน้ำ ที่ 72 ชั่วโมง ความเข้มข้น 2,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลง เป็น 49.20 ± 0.62 สกัดด้วยเอทานอล ที่ 72 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเป็น 48.13 ± 2.75 สกัดด้วยเมทานอล ที่ 72 ชั่วโมง ความเข้มข้น 2,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลง เป็น 52.71 ± 2.67 สกัดด้วยเฮกเซน ที่ 72 ชั่วโมง ความเข้มข้น 2,000 µg/ml ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเป็น 43.16 ± 0.53 (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เมลานوماต่อสารสกัดจากรากสาบเสือ ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล และ เฮกเซน ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานوما IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากสาบเสือ

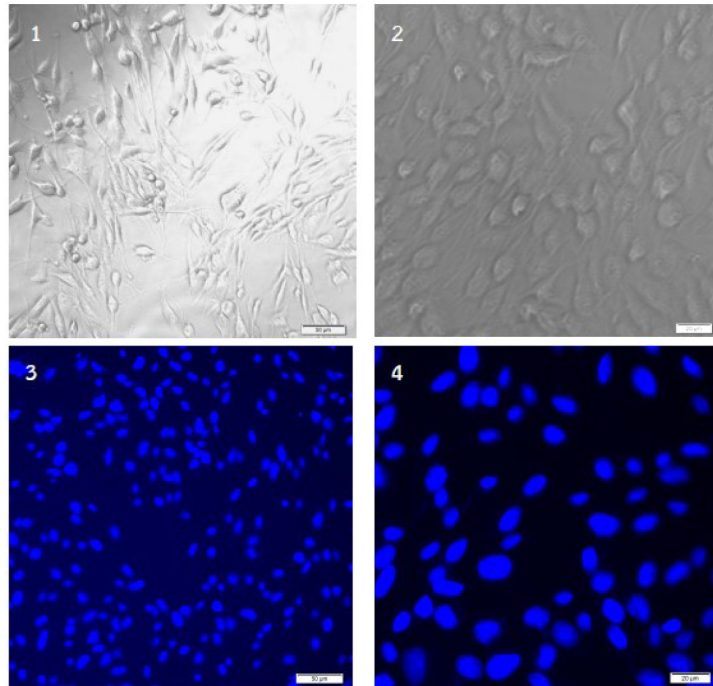
ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานوما IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือ พบว่า ค่า IC_{50} < 500 µg/ml ได้แก่ สกัดด้วยเอทานอล ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 428.77 ± 6.19 µg/ml และ 381.40 ± 8.70 µg/ml ตามลำดับ สกัดด้วยเฮกเซน ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 447.45 ± 22.82 µg/ml และ 436.65 ± 3.46 µg/ml ตามลำดับ ค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 500 - 1,000 µg/ml ได้แก่ สกัดด้วยน้ำ ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สกัดด้วยเอทานอล ที่ 24 ชั่วโมง สกัดด้วยเมทานอล ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และ สกัดด้วยเฮกเซน ที่ 24 ชั่วโมง ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานوما IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากลำต้นสาบเสือ พบว่า ค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 500 - 1,000 µg/ml ได้แก่ สกัดด้วยเอทานอล $1,000 >$ ค่า IC_{50} < 2,000 µg/ml ได้แก่ สกัดด้วยน้ำ ที่ 72 ชั่วโมง และ ค่า $IC_{50} > 2,000$ µg/ml ได้แก่ สกัดด้วยน้ำ ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง สกัดด้วยเมทานอล และเฮกเซน ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานوما IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากรากสาบเสือ พบว่า ค่า $IC_{50} > 2,000$ µg/ml ทุกตัว ทำละลาย รายละเอียดตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานوما IC₅₀ ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากสาบเสือ สกัดด้วย น้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

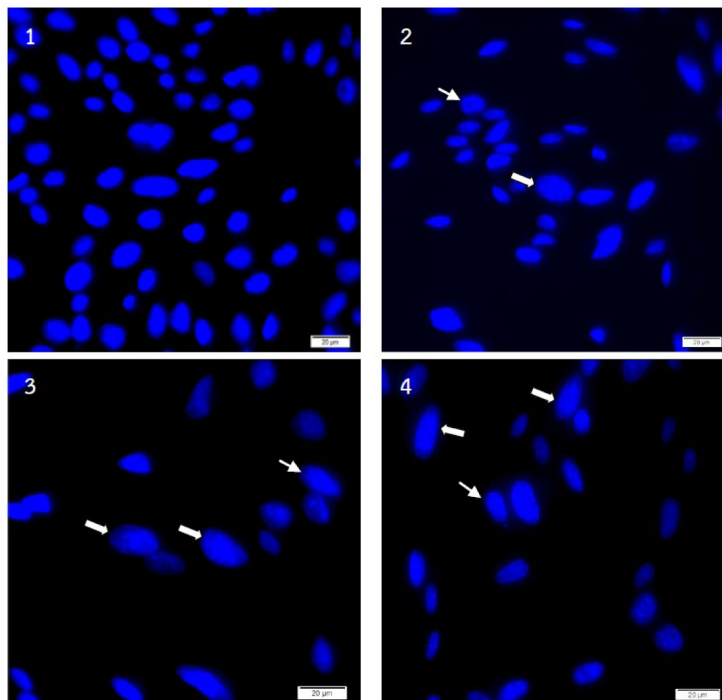
ส่วนของ สาบเสือ	ตัวทำ ละลาย	IC ₅₀ (µg/ml, ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)		
		24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
ใบ	น้ำ	789.04±18.86	545.64±9.24	527.43±7.30
	เอทานอล	655.59±9.38	428.77±6.19	381.40±8.70
	เมทานอล	827.03±14.16	708.80±17.62	594.60±6.84
	เฮกเซน	862.48±47.82	447.45±22.82	436.65±3.46
ลำต้น	น้ำ	4,095.07±184.95	2,094.64±35.57	1884.91±20.01
	เอทานอล	950.97±8.01	948.50±36.20	858.99±49.21
	เมทานอล	8,887.12±913.38	7,229.05±861.85	6,122.76±158.66
	เฮกเซน	4,374.44±179.82	4,370.79±122.90	4,022.56±102.31
ราก	น้ำ	3,925.62±56.08	3,686.37±122.29	3,418.24±89.53
	เอทานอล	4,127.23±129.32	3,028.19±58.68	2,343.14±62.50
	เมทานอล	8,724.78±54.33	5,604.27±348.63	3,315.54±284.36
	เฮกเซน	3,415.06±264.12	3,432.17±45.93	3,124.62±66.32

การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์เมลานوما C32 ตายแบบอะพอพอโทซิส (Apoptosis)

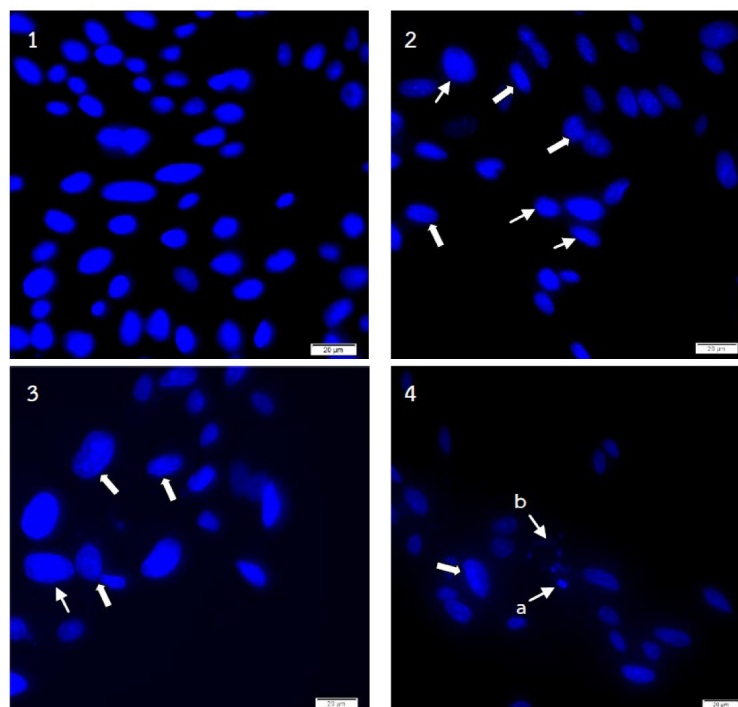
เซลล์เมลานوماกลุ่มควบคุมมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจำนวนมาก ไม่พบลักษณะจำเพาะของการตายแบบอะพอพอโทซิส (ภาพที่ 8) เซลล์เมลานوماที่ได้รับสารสกัดจากใบสาบเสือ ที่สกัดด้วยเอทานอล และเฮกเซน ความเข้มข้น 500 µg/ml ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์เมลานوماที่มีชีวิตลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่าเซลล์เมลานوما C32 มีการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างและลักษณะของการตายแบบอะพอพอโทซิสในระยะแรก ได้แก่ โครมาตินจับตัวแน่น โครมาตินแตกเป็นชิ้นส่วน นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน และ อะพอพอโทติกบอดี ที่บ่มนาน 48 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงรุนแรงมากกว่า รายละเอียดตามภาพที่ 9 - 12



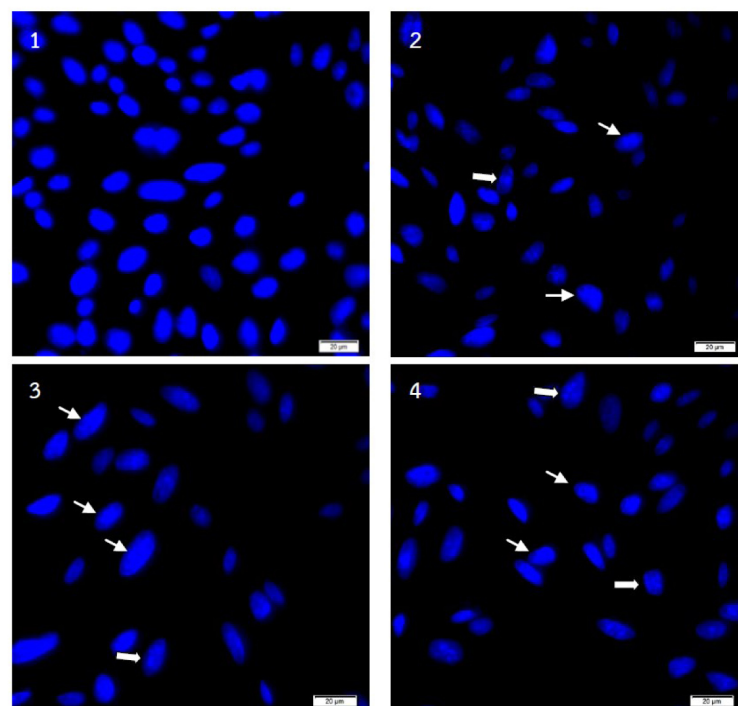
ภาพที่ 8 เซลล์เมลาโนมากลุ่มควบคุมที่ 24 และ 48 ชั่วโมง สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์หัวกลับ ไม่พบการตายแบบอะพอพโทซิส



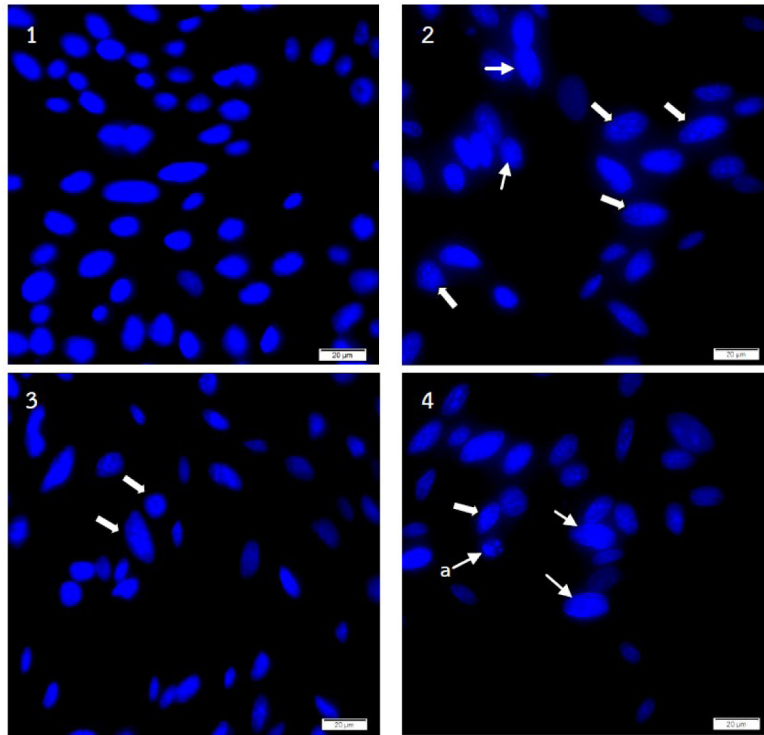
ภาพที่ 9 เซลล์เมลาโนมากลุ่มควบคุม (1) กลุ่มที่ได้สารสกัดใบสาบเสือสกัดด้วยเอทานอล 500 µg/ml (2-4) ที่ 24 ชั่วโมง พบโครมาตินจับตัวแน่น (→) โครมาตินแตกเป็นชิ้นส่วน (⇨)



ภาพที่ 10 เซลล์เมลานوماกลุ่มควบคุม (1) กลุ่มที่ได้สารสกัดใบสาบเสือสกัดด้วยเอทานอล 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2-4) ที่ 48 ชั่วโมง โครมาตินจับตัวแน่น ($\rightarrow$) โครมาตินแตกเป็นชิ้นส่วน ($\rightarrow$) อะพอพอทิกบอดี (a) นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน (b)



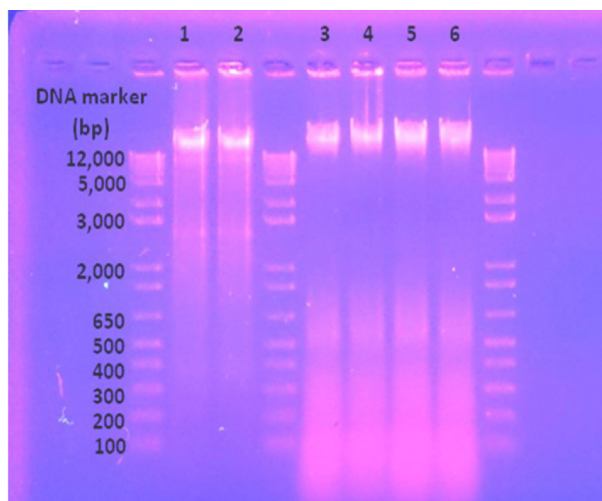
ภาพที่ 11 เซลล์เมลานوماกลุ่มควบคุม (1) กลุ่มที่ได้สารสกัดใบสาบเสือสกัดด้วยเฮกเซน 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2-4) ที่ 24 ชั่วโมง พบโครมาตินจับตัวแน่น ($\rightarrow$) โครมาตินแตกเป็นชิ้นส่วน ($\rightarrow$)



ภาพที่ 12 เซลล์เมลานอมากลุ่มควบคุม (1) กลุ่มที่ได้สารสกัดใบสาบเสือสกัดด้วยเฮกเซน 500 µg/ml (2-4) ที่ 48 ชั่วโมง โครมาตินจับตัวแน่น (→) โครมาตินแตกเป็นชิ้นส่วน (↗) อะพอพอโทติกบอดี (a)

การตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) ของเซลล์เมลานوما C32 โดยวิธีแยกสารชีวโมเลกุลด้วยไฟฟ้า (Gel electrophoresis technique)

ดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์เมลานอมากลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือ (เลนที่ 1 และ 2) มีแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่มากกว่า 12,000 คู่เบส (Base pairs; bp) ปรากฏอยู่เป็นแถบเรืองแสงที่ด้านบนของเจล และพบว่า แถบดีเอ็นเอจากเซลล์เมลานوماที่มีสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือสกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 500 µg/ml ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง (เลนที่ 3 และ 4) พบมีการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอขนาดเล็ก ตั้งแต่ประมาณ 500 bp ไปจนถึงเล็กมากคือ 100 bp ที่อยู่ด้านล่างของเจล เซลล์เมลานوماที่มีสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือสกัดด้วยเฮกเซน ความเข้มข้น 500 µg/ml ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง (เลนที่ 5 และ 6) พบแถบดีเอ็นเอขนาดเล็กที่อยู่ด้านล่างของเจล ซึ่งแสดงการแตกหักของดีเอ็นเอบ่งชี้การตายของเซลล์แบบอะพอพอโทซิส (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 เซลล์เมลานโนมาที่ได้รับสารสกัดจากใบสาบเสือสกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซน 500 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง กลุ่มควบคุม (เลนที่ 1 และ 2) เอทานอล (เลนที่ 3 และ 4) และเฮกเซน (เลนที่ 5 และ 6)

อภิปรายผลการวิจัย

ปริมาณร้อยละผลผลิต (% yield) ของสารสกัดหยาบจากใบ ลำต้น และรากสาบเสือ

ใบสาบเสือให้ปริมาณร้อยละผลผลิต (% yield) ของสารสกัดหยาบมากกว่าลำต้นและราก ในทุกตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สารสกัดด้วยน้ำและเมทานอล ให้ปริมาณร้อยละผลผลิตมากที่สุด และเฮกเซนได้น้อยสุด จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอล จะมีปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yield) ไม่แตกต่างกัน ปริมาณสารสกัดที่ได้ขึ้นกับความแรงของขั้วของตัวทำละลาย โดยน้ำมีความแรงของขั้วสูงสุด รองลงมาเป็นเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน ตามลำดับ (Vidović et al., 2014 ; Stanley et al., 2014)

ความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานโนมา C32 ของสารดีเอ็มเอสโอ (DMSO, dimethyl sulfoxide)

ความเข้มข้นสูงสุดของ DMSO ที่นำมาใช้ในการทดลองคือ 1% เพื่อให้สารสกัดหยาบละลายได้ดี ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานโนมา C32 พบว่า ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์น้อยที่สุดคือ 93 หรือทำให้เซลล์ตายไม่เกินร้อยละ 5 จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าปริมาณ DMSO ความเข้มข้นสูงสุดที่นำมาใช้และไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ คือ ความเข้มข้น DMSO ไม่เกิน 5% (Gerhauser et al., 2003)

ความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานوما C32 ของสารสกัดจากใบ ลำต้น และรากของสาบเสือ

ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานوما IC_{50} ของสารสกัดหยาบจาก ใบ ลำต้น และรากสาบเสือ ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่สกัดด้วย เอทานอล (ที่ 72 ชั่วโมง $IC_{50} = 381.40 \pm 8.70 \mu\text{g/ml}$, ที่ 48 ชั่วโมง $IC_{50} = 428.77 \pm 6.19 \mu\text{g/ml}$, ที่ 24 ชั่วโมง $IC_{50} = 436.65 \pm 3.46 \mu\text{g/ml}$) และเฮกเซน (ที่ 48 ชั่วโมง $IC_{50} = 447.45 \pm 22.82 \mu\text{g/ml}$) มีความเป็นพิษปานกลาง ($IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$) ตามเกณฑ์ระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากพืชต่อเซลล์มะเร็ง (Shirazi et al., 2004) ที่แบ่งระดับความเป็นพิษ ดังนี้ ค่า $IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ เป็นสารสกัดที่มีความเป็นพิษรุนแรงมาก ค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 10 - 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็นสารสกัดที่มีความเป็นพิษรุนแรง ค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 100 - 500 $\mu\text{g/ml}$ เป็นสารสกัดที่มีความเป็นพิษปานกลาง และค่า $IC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$ เป็นสารสกัดที่ไม่มีพิษ

ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานوما IC_{50} ของสารสกัดหยาบจาก ใบ ลำต้น และรากสาบเสือ พบว่า ใบที่สกัดด้วยเอทานอล และเฮกเซน มีความเป็นพิษปานกลาง ($IC_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$) การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากใบสาบเสือมีสารสำคัญมากมายหลายชนิด ขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด โดยสารที่มีขั้วจะถูกสกัดออกมาจากตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ เมทานอล และเอทานอล ส่วนเฮกเซน เหมาะสำหรับสารที่ไม่มีขั้ว พบว่าใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล มีสารสำคัญ ได้แก่ Alkaloids, Coumarins, Flavonoids, Phenols, Quinones, Saponins, Steroids, Tannins, Terpenoids (Anyasor et al., 2011; Danlami et al., 2013; Vijayaraghavan et al., 2013) ใบสาบเสือที่สกัดด้วยเฮกเซน มีสารสำคัญ ได้แก่ Alkaloids, Phenols, Tannins, และ Terpenoids (Akinmoladun et al., 2007; Vijayaraghavan et al., 2013) นอกจากนี้ Phan et al. (2001) ได้ศึกษาแยกสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือ พบสารสำคัญในกลุ่ม flavonoids ได้แก่ 3,5,4 β -trihydroxy-7-methoxyflavanone; 5,7,3 β -trihydroxy-5 β -methoxyflavanone และ 3,5,7-trihydroxy-4 β -methoxyflavanone สารในกลุ่ม Phenolic พบ Protocatechuic, p-coumaric, Ferulic, p-hydroxybenzoic และ Vanillic acids

สารสกัดจากใบสาบเสือมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและต้านมะเร็งหลายชนิด Hung et al. (2011) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 70% โดยพบสารกลุ่มใหม่ของ Flavonoid โดย Flavonoid glycosides ชนิดที่ 1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง LLC และ HL-60 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 28.2 และ 11.6 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ Flavonoid glycosides ชนิดที่ 2 แสดงการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ชนิดเดียว คือ HL-60 ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 10.8 $\mu\text{g/ml}$ การศึกษาของ Prabhu & Ravi (2012) แยกองค์ประกอบของสารสกัดใบสาบเสือได้สาร Triterpene ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ค่า IC_{50} เท่ากับ 206.7 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งค่า IC_{50} มีความใกล้เคียงกับผลการวิจัยในครั้งนี้ นอกจากนี้มีการศึกษาแยกองค์ประกอบจากใบสาบเสือ พบสารใหม่ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ในกลุ่ม Phenolics และ Flavonoids ได้แก่ สาร 2'-Hydroxy-4,4',5',6'-tetramethoxy chalcone ต้านเซลล์มะเร็ง Cal51,

MCF7 และ MDAMB-468 และเสริมฤทธิ์กับ Bcl2 Inhibitor ABT737 เพิ่มการตายแบบอะพอพโทซิส ของเซลล์มะเร็งเต้านม Cal51 (Kouamé et al., 2013)

สารกลุ่ม Alkaloids พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและชักนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิส (Gong et al., 2012; Siedlakowski et al., 2008) โดยกลุ่ม Alkaloids พบสาร Pyrrolizidine alkaloids (PAs) ที่มีความเป็นพิษ (Roeder & Wiedenfeld, 2011) และสาร Tannins, Terpenoids, Cardiacglycosides, Saponins, Anthraquinones (Akinmoladun et al., 2007; Anyasor et al., 2011; Vijayaraghavan et al., 2013)

สารกลุ่ม Flavonoids มีองค์ประกอบของสารหลายชนิดที่ต้านมะเร็ง ได้แก่ Flavonoid quercetin ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง U138MG และชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (Braganhol et al., 2006) Flavonoid baicalein ต้านมะเร็ง ลำไส้ใหญ่ HT-29 และมะเร็งต่อมลูกหมาก DU-145 (Ye et al., 2007) Flavonoid casticin ต้านมะเร็งผิวหนังโดยยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (Haidara et al., 2006) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า สาร Saponins มีความเป็นพิษต่อเซลล์และต้านมะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม (MDA-MB-435) มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) (Podolak et al., 2010; Wu et al., 2011)

การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์เมลาโนมา C32 ตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) และการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation)

เซลล์เมลาโนมา C32 ที่ได้รับสารสกัดหยาบจากใบที่สกัดด้วยเอทานอล และเฮกเซน ความเข้มข้น 500 µg/ml พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เป็นลักษณะจำเพาะของการตายแบบอะพอพโทซิส 2 ลักษณะ ดังนี้ 1) การเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างและลักษณะของการตายแบบอะพอพโทซิส ได้แก่ การหดตัวของเซลล์ การโป่งยื่นของเยื่อหุ้มเซลล์ โครมาตินจับตัวกันแน่น นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน อะพอพโทติกบอดี และโครมาตินแตกเป็นชิ้นส่วน 2) การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของการตายแบบอะพอพโทซิส ได้แก่ ดีเอ็นเอแตกเป็นชิ้นส่วน (DNA Fragmentation) ขนาดประมาณ 500 base pairs ไปจนถึงเล็กมาก คือ 100 Base pairs

การชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสถูกนำมาใช้เป็นการศึกษาการต้านมะเร็งของสารสกัดจากพืช โดยที่ความสามารถในการต้านมะเร็งของสารสกัดขึ้นกับตัวทำละลายที่ใช้สกัด (Kitagishi et al., 2012; Zong et al., 2012) ซึ่งผลวิจัยในครั้งนี้นักแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบสาบเสือ ที่สกัดด้วยเอทานอล และเฮกเซน มีความสามารถในการชักนำให้เซลล์เมลาโนมา C32 ตายแบบอะพอพโทซิสได้ ซึ่งยาต้านมะเร็งก็ใช้หลักการชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสเช่นกัน (Bai & Wang 2014; Wong, 2011)

การตายแบบอะพอพโทซิสเป็นการตายของเซลล์แบบที่มีการโปรแกรมไว้แล้ว (Programmed cell death) กระบวนการนี้เกิดทั้งในภาวะปกติและภาวะที่ร่างกายมีพยาธิสภาพ เช่น มะเร็งที่เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและแบ่งเซลล์ผิดปกติ โดยไม่โตคอนตรอล มีบทบาทสำคัญในการหลั่งสารที่เหนี่ยวนำให้

เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส เช่น Cytochrome C และ Apoptosis inducing factor อะพอพโทซิสจะเกิดขึ้นเมื่อมีสัญญาณภายในเซลล์ โดยอาศัยเอนไซม์ Caspase เป็นตัวกลาง และ Proapoptotic proteins เป็นตัวชักนำการตาย และมี Antiapoptotic proteins เป็นตัวยับยั้งการตาย การเหนี่ยวนำอะพอพโทซิสเกิดได้ 2 วิธี ได้แก่ 1) วิธีภายนอกเกิดเมื่อ Death receptors เช่น Tumor necrosis factor receptor, Fas receptor, TNF-related apoptosis-inducing ligand เป็นต้น เมื่อถูกกระตุ้นจะเกิดเป็นโครงสร้างภายในเซลล์ที่เรียกว่า “Death-inducing signaling complex” (DISC) มีผลไปกระตุ้นให้ Procaspase เป็น Initiator caspase ที่จะเหนี่ยวนำให้ Effector caspases ทำงานและนำไปสู่อะพอพโทซิส 2) วิธีจากภายในที่มีไมโทคอนเดรีย เมื่อมีการกระตุ้นจากสิ่งเร้าต่างๆ เช่น ออกซิเดชัน แสงอัลตราไวโอเลต รังสีแกมมา หรือ การใช้ยาเคมีบำบัด มีผลทำให้ไมโทคอนเดรียหลั่งสารจากช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ได้แก่ Cytochrome C และ AIF จะชักนำสู่อะพอพโทซิส (Bras et al., 2005; Kim et al., 2006)

การเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างและลักษณะของการตายแบบอะพอพโทซิส ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในระยะแรก ได้แก่ การหดตัวของเซลล์ (Cell shrinkage) การโป่งยื่นของเยื่อหุ้มเซลล์ (Plasma membrane blebbing) โครมาตินจับตัวกันแน่น (Chromatin condensation) นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน (Nuclear fragmentation) (Coleman et al., 2001; Kim et al., 2006; Vermeulen et al., 2005; Zhang & Xu, 2000) โดยลักษณะจำเพาะ (Morphological hallmarks) ของการตายแบบอะพอพโทซิสในนิวเคลียส ได้แก่ โครมาตินจับตัวกันแน่น และนิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน ลักษณะที่โครมาตินจับตัวกันแน่นจะเริ่มต้นบริเวณขอบของนิวเคลียสทำให้มีรูปร่างเหมือนพระจันทร์เสี้ยว (Crescent) ต่อมาโครมาตินจะจับตัวกันแน่นมากขึ้นจนแตกออกเป็นชิ้นส่วนภายในเซลล์และยังมีเยื่อหุ้มเซลล์อยู่ (Kroemer et al., 2005; Manjo & Joris, 1995) การตรวจวัดการตายแบบอะพอพโทซิส ใช้การย้อมสีนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI เซลล์จะย้อมติดสีฟ้าตรงตำแหน่งนิวเคลียสทั้งหมด โครมาตินที่อัดแน่นภายในเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสจะติดสีที่ค่อนข้างเข้มกว่าและมีขอบเขตที่คมชัด เนื่องจาก DAPI เป็นสารเรืองแสงสีฟ้าที่ขอบจับกับสายของดีเอ็นเอสายคู่ โดยจับในตำแหน่งเบส AT Clusters บริเวณ Minor groove ของดีเอ็นเอ 1 โมเลกุลของ DAPI จะจับกับคู่เบสได้ 3 คู่ การจับกันระหว่าง DAPI และดีเอ็นเอสายคู่ ทำให้เกิดการเรืองแสงเพิ่มขึ้นประมาณ 20 เท่า การเรืองแสงที่เกิดขึ้นจะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณของดีเอ็นเอ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจะดูดกลืนแสงทำให้สามารถสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Sgono & Gruber, 1998)

การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของการตายแบบอะพอพโทซิส ประกอบด้วย การเปลี่ยนแปลงหลัก 3 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Caspases 2) การแตกหักของ DNA และโปรตีน 3) เยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงเพื่อส่งสัญญาณให้มาโครฟาจ (Macrophage) ในร่างกายมาจับกิน (Kumar et al., 2010) การแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA Fragmentation) ซึ่งการแตกหักของดีเอ็นเอเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ Caspases ที่ตัดดีเอ็นเอออกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ขนาดประมาณ 180 - 200 Base pairs (McFadyen & Skarratt, 1996; Vaux & Silke, 2003) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การตายของเซลล์แบบ

อะพอพโทซิสในระยะสุดท้าย จากนั้นเซลล์จะแตกออกเป็นชิ้นส่วนถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยังคงอยู่ตลอดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส เรียกว่า อะพอพโทติกบอดี (Apoptotic bodies)

สรุปผลการวิจัย

สาบเสือ (*Chromolaena odorata*) จากจังหวัดอำนาจเจริญ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย ถูกนำมาศึกษาความเป็นพิษและการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง (เมลานوما C32) โดยใช้ส่วนใบ ลำต้น และราก ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน พบว่าใบให้ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดมากกว่าลำต้นและราก โดยใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำให้ปริมาณร้อยละผลผลิตสูงสุด รองลงมาเป็นเมทานอล

ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานوما C32 ของสารสกัดหยาบจากใบที่สกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซน มีความเป็นพิษปานกลาง ค่า $IC_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$ และเมื่อนำสารสกัดจากใบที่สกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซน ความเข้มข้น $500 \mu\text{g/ml}$ มาทดสอบการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เมลานوما โดยใช้การย้อมสีนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI สังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง และศึกษาการแตกหักของดีเอ็นเอด้วยวิธีการแยกสารชีวโมเลกุลด้วยไฟฟ้า พบเซลล์เมลานوما มีการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างและลักษณะของการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะแรกอย่างชัดเจน ได้แก่ โครมาตินจับตัวกันแน่น โครมาตินแตกเป็นชิ้นส่วน นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน และอะพอพโทติกบอดี การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในระยะสุดท้ายของการตายแบบอะพอพโทซิส ได้แก่ การแตกหักเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ของดีเอ็นเอขนาด 100 - 500 Base pairs โดยการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างลักษณะและทางชีวเคมีของการตายแบบอะพอพโทซิสรุนแรงขึ้นตามเวลา

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการนำสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทยมาศึกษาเพิ่มเติม เนื่องจากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากใบที่สกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซน มีความเป็นพิษระดับปานกลางต่อเซลล์มะเร็ง (เมลานوما C32) ทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส ดังนั้นการศึกษาเพื่อแยกองค์ประกอบสำคัญจากสารสกัดหยาบจากใบที่สกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซน จะทำให้ทราบชนิดและปริมาณของสารสำคัญ (Active constituents) และหากนำสารที่ได้มาทดสอบการต้านมะเร็งชนิดต่างๆ แล้วพบว่ามียุทธวิธีต้านมะเร็งได้ดีก็อาจจะศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งต่อไปได้

References

- Akinmoladun, A. C., Ibukun, E. O. & Dan-Ologe, I. A. (2007). Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of *Chromolaena odorata*. *Scientific Research and Essay*. 2(6), 191-194.
- Anyasor, G. N., Aina, D. A., Olushola, M. & Aniyikaye, A. (2011). Phytochemical constituent, proximate analysis, antioxidant, antibacterial and wound healing properties of leaf extracts of *Chromolaena odorata*. *Annals of Biological Research*. 2(2), 441-451.
- Bai, L. & Wang, S. (2014). Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics. *Annual Review of Medicine*. 65, 139–155.
- Bamidele, V. O., Stephen, O., Kemi, D. B., Alice, O., Elizabeth, A. A. & Ayodele, O. S. (2008). Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities from flavonoid fractions of *Chromolaena odorata*. *Journal of Medicinal Plant Research*, 2(9), 219–225.
- Braganhol, E., Zamin, L. L., Canedo, A. D., Horn, F., Tanajusuku, A. S., Wink, M. R. & Salbego, C. B. (2006). Antiproliferative effect of quercetin in the human UI38MG glioma cell line. *Anticancer Drugs*. 17, 663–671.
- Bras, M., Queenan, B. & Susin, A. (2005). Programmed cell death via mitochondria: different models of dying. *Biochemistry*. 70(2), 284-293.
- Chakraborty, A. K., Rambhade, S. & Patil, U. K. (2011). *Chromolaena odorata* (L): an overview. *Journal of Pharmacy Research*. 4, 573–576.
- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. & Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology*. 3, 339-45.
- Danlami, U., Adebisi, F. A., David, B. M., Lawal, D. R. & Galadanchi, K. M. (2013). Proximate and phytochemical analyses of the hexane, ethyl acetate and ethanol extracts of *Chromolaena odoratum* (Linn.) leaves. *Asian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*. 3(1), 34-35.

- Gerhauser, C., Klimo, K., Heisis, E., Neumann, I., Gamal-Eldeen, A. & Knauf, J. (2003). Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutation Research*. 523, 163-172.
- Gong, K., Chen, C., Zhan, Y., Chen, Y., Huang, Z. & Li, W. (2012). Autophagy-related gene 7 (ATG7) and reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase regulate tetrastine-induced autophagy in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*. 287, 35576–35588.
- Haidara, K., Zahir, L., Shi, Q. W. & Batist, G. (2006). The flavonoid casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action. *Cancer Letters*. 242, 180–190.
- Hanphakphoom, S., Thophon, S., Waranusantigul, P., Kangwanrangsan, N. & Krajangsang, S. (2016). Antimicrobial activity of *Chromolaena odorata* extracts against bacterial human skin infections. *Modern Applied Science*, 10, 159-172.
- Hung, T. M., Cuong, T. D., Dang, N. H., Zhu, S., Long, P. Q., Komatsu, K. & Min, B. S. (2011). Flavonoid glycosides from *Chromolaena odorata* leaves and their in vitro cytotoxic activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 59(1), 129-131.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Uchida, Y. & Arihiro, K. (2006). The role of apoptotic or non apoptotic cell death in determining cellular response to anticancer treatment. *European Journal of Surgical Oncology*. 32(3), 69-277.
- Kitagishi, Y., Kobayashi, M. & Matsuda, S. (2012). Protection against cancer with medicinal herbs via activation of tumor suppressor. *Journal of Oncology*. 20, 1–7.
- Kouamé, P. B., Jacques, C., Bedi, G., Silvestre, V., Loquet, D., Barillé-Nion, S., Robins, R. J. & IlaTea, I. (2013). Phytochemicals isolated from leaves of *Chromolaena odorata*: impact on viability and clonogenicity of cancer cell lines. *Phytotherapy Research*. 27, 835–840.
- Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P. & Zhivotovskiy, B., Blagosklonny, M. V., Malorni, W., Knight, R. A., Piacentini, M., Nagata, S. & Melino, G. (2005). *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. *Cell death and differentiation*. 12, 1463–1467.

- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. & Aster, J. C. (2010). *Robins and Cotran: pathologic basis of disease*. Philadelphia: Saunders Elsevier. 8, 25–32.
- Manjo, G. & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology*. 146, 3–15.
- McFadyen, R. C. & Skarratt, B. (1996). Potential distribution of *Chromolaena odorata* (siam weed) in Australia, *Africa and Oceania. Agriculture Ecosystems and Environment*. 59, 89-96.
- Mondal, K. C., Bhargava, D., Shivapuri, J. N. & Kar, S. (2012). In vitro antigonorrhoeal activity and extraction of chemical constituents from the leaves of *Chromolaena odorata* (Lin.) Locally known as ‘BANMARA’. *International Journal of Chemical and Analytical Science*. 3(7): 1487-1495.
- Owoyele, V. B., Adediji, J. O. & Soladoye, A. O. (2005). Anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract of *Chromolaena odorata*. *Inflammopharmacology*, 13(5-6), 479-484.
- Owoyele, V. B., Soladoye, A. O., Panda, D., Dash, K. S. & Dash, K. G. (2006). Anti inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract of *Chromolaena odorata* leaves. *Chronic Common Disease*. 18, 397–406.
- Panda, D., Dash, K. S. & Dash, K. G. (2010). Qualitative phytochemical analysis and investigation of anthelmintic and wound healing potentials of various extracts of *Chromolaena odorata* LINN. Collected from the locality of Mohuda Village, Berhampur (SouthOrissa). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 1, 122–126.
- Parameswari, G. & Suriyavathana, M. (2012). In vitro anti-oxidant activity of *Chromolaena odorata* (L.) King and Robinson. *International Research Journal of Pharmacy*. 3, 187–192.
- Phan, T. T., Hughes, M. A. & Cherry, G. W. (1998). Enhanced proliferation of fibroblasts and endothelial cells treated with an extract of the leaves of *Chromolaena odorata* (Eupolin), a herbal remedy for treating wounds. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 101, 756–765.

- Podolak, I., Galanty, A. & Sobolewska, D. (2010). Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*. 9, 425–474.
- Prabhu, V., Sujina, I., Hemlal, H. & Ravi, S. (2011). Essential oil composition, antimicrobial, MRSA and in-vitro cytotoxic activity of fresh leaves of *Chromolaena odorata*. *Journal of Pharmacy Research*. 4(12), 4609-4611.
- Prabhu, V. & Ravi, S. (2012). Isolation of a novel triterpene from the Essential oil of fresh leaves of *Chromolaena odorata* and its in-vitro cytotoxic activity against HepG2 cancer cell line. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2(9), 132-136.
- Raina, R., Prawez, S., Verma, P. K. & Pankaj, N. K. (2008). Medicinal plants and their role in wound healing. *Veterinary Journal*. 3, 1–7.
- Roeder, E. & Wiedenfeld, H. (2011). Pyrrolizidine alkaloids in plants used in the traditional medicine of Madagascar and the Mascarene islands. *Pharmazie*. 66, 637–647.
- Sgonc, R. & Gruber, J. (1998). Apoptosis detection: an overview. *Experimental Gerontology*. 33(6), 525-533.
- Siedlakowski, P., McLachlan-Burgess, A., Griffin, C., Tirumalai, S. S., McNulty, J. & Pandey, S. (2008). Synergy of Pancratistatin and Tamoxifen on breast cancer cells in inducing apoptosis by targeting mitochondria. *Cancer biology & therapy*. 7, 376–384.
- Stanley, M. C., Ifeanyi, O. E., Nwakaego, C. C. & Esther, I. O. (2014). Antimicrobial effects of *Chromolaena odorata* on some human pathogens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(3), 1006-1012.
- Vaisakh, M. N. & Pandey, A. (2012). The invasive weed with healing properties: a review on *Chromolaena odorata*. *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research*. 3(1), 80-83.
- Vaux, D. & Silke, J. (2003). Mammalian mitochondrial IAP-binding proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 203, 449–504.
- Vidović, S., Zeković, Z., Marošanić, B., Todorović, M. P. & Vladić, J. (2014). Influence of pre-treatments on yield, chemical composition and antioxidant activity of Satureja Montana extracts obtained by supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 95, 468-473.

- Vermeulen, K., Bockstaele, V. & Berneman, Z. N. (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology*. 84, 627–639.
- Vijayaraghavan, K., Mohamed, S. & Maruthi, R. (2013). Studies on phytochemical screening and antioxidant activity of *Chromolaena odorata* and *Annona squamosa*. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. 2(12), 7315-7321.
- Witkowski, E. T. F. & Wilson, M. (2001). Changes in density, biomass, seed production and soil seed banks of the nonnative invasive plant, *Chromolaena odorata*, along a 15 year chronosequence. *Plant Ecology*. 152, 13–27.
- Wong, R.S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 30, 87.
- Wu, Q., Wang, Y. & Guo, M. (2011). Triterpenoid saponins from the seeds of *Celosia argentea* and their anti-inflammatory and antitumor activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 59, 666–671.
- Ye, C. L., Liu, Y. & Wei, D. Z. (2007). Antioxidant and anticancer activity of 3'-formyl-4', 6'-dihydroxy-2'-methoxy-5'-methylchalcone and (2S)-8-formyl-5-hydroxy-6-methylflavanone. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 59, 553–559.
- Zachariades, C., Strathie, L. W., Retief, E. & Dube, N. (2011). Progress towards the biological control of *Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H. Rob (Asteraceae) in South Africa. *African Entomology*. 19, 282-302.
- Zhang, J. H. & Xu, M. (2000). DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Research*. 10, 205-11.
- Zong, A., Cao, H. & Wang, F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research. *Carbohydrate polymer*. 90, 1395–1410.

คณะผู้เขียน

ดร.สุชาดา โทผล

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
295 ถนนราชสีมา เขตดุสิต กรุงเทพฯ ฯ 10300
e-mail : suchada_tho@dusit.ac.th

ดร.ปิยาภรณ์ วรรณสันติกุล

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
295 ถนนราชสีมา เขตดุสิต กรุงเทพฯ ฯ 10300
e-mail: wpiyaporn@yahoo.com

ดร. ศรีสุดา หาญภาคภูมิ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
295 ถนนราชสีมา เขตดุสิต กรุงเทพฯ ฯ 10300
e-mail: srisuda_han@hotmail.com

ดร. นิวัฒน์ กังวานรังสรรค์

ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพระราม 6 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400
e-mail: scnkwa@mahidol.ac.th

