

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด
A549 ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่แยกจากฟ้าทะลายโจร
Inhibition of Cell Proliferation and Cell Metastasis of
A549 Human Lung Cancer Cells of Andrographolide
Isolated from *Andrographis paniculata*

ชุตินา แก้วพิบูลย์*

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง
ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93210

ณวงศ์ บุณนาค

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ
ตำบลเขารูปช้าง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

Chutima Kaewpiboon

Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung Campus,
Ban Phrao, Pa Payom, Phatthalung 93210

Nawong Boonnak

Department of Basic Science and Mathematics, Faculty of Science, Thaksin University,
Khoa Roob Chang, Muang, Songkhla 90000

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งปอดเป็นโรคที่มีอัตราการแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายสูง ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ การที่เซลล์มะเร็งปอดแพร่กระจายได้นั้นจะต้องมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ เพื่อให้เซลล์สามารถอยู่รอดในสภาวะหลุดออกจากการยึดเกาะ และสามารถเคลื่อนที่ออกจากก้อนมะเร็งไปยังอวัยวะอื่น ๆ ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในการยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด (A549 cell line) ผลการศึกษาพบว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT วัดค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ มีค่า IC_{50} 5.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ไลน์ปกติชนิด Vero นอกจากนี้สารแอนโดรกราโฟไลด์ยังสามารถลด

*ผู้รับผิดชอบบทความ : chutima.k@tsu.ac.th

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์มีศักยภาพในการศึกษาการออกฤทธิ์ต่าง ๆ ซึ่งจำเป็นต่อการพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งได้ในอนาคต

คำสำคัญ : โรคมะเร็งปอด; แอนโดรกราโฟไลด์; ฟาทะลายใจ; การยับยั้งการเจริญ; การยับยั้งการแพร่กระจาย

Abstract

Lung cancer has been a disease with high fatality rate due to the high metastatic rate. One of the most essential processes of metastasis is the ability of cancer cells to undergo the epithelial to mesenchymal transition (EMT) which allows cancer cells to resist the programmed cell death in a detached condition and to migrate into the surrounding organ tissue. Andrographolide has been a promising naturally derived compound for cancer therapy due to several cytotoxic effects in various cancer cells. Therefore, this study has demonstrated that andrographolide inhibits cell proliferation and metastasis process in A549 human lung cancer cells. Cytotoxicity of andrographolide on A549 and Vero cells using MTT assay showed that andrographolide decreased the viability of A549 human lung cancer cells with IC_{50} value at 5.51 $\mu\text{g/mL}$, whereas it performed non-cytotoxic against Vero normal cell lines. Furthermore, andrographolide decreased the migration process. As the results, andrographolide is found to be a potential compound for studying its mechanisms to further develop as cancer therapeutic drug.

Keywords: lung cancer; andrographolide; *Andrographis paniculata*; proliferation inhibition; metastasis inhibition

1. บทนำ

โรคมะเร็งปอดเป็นโรคที่พบอัตราการเกิดโรคสูงในประชากรทั่วโลก และเป็นโรคมะเร็งชนิดที่มีโอกาสแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายสูง จึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ [1] โดยปัจจุบันการผ่าตัดยังคงเป็นทางเลือกแรกสำหรับผู้ป่วยในระยะต้น อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยมะเร็งปอดในระยะแพร่กระจายจำเป็นต้องใช้วิธีเคมีบำบัดและรังสีบำบัดในการรักษา แม้ว่าปัจจุบันมีการพัฒนาตัวยาชนิดใหม่ ๆ จำนวนมาก แต่อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งในช่วงระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมา มีเพียงร้อยละ 23-36 [2] ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์มะเร็งปอดมีกลไกการดื้อยา เพื่อให้เซลล์อยู่รอดและแพร่กระจาย

ไปยังเนื้อเยื่อใกล้เคียงได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนายาชนิดใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อใช้ยับยั้งกลไกดังกล่าว การพัฒนาและค้นหายาชนิดใหม่ ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวยาที่มาจากสารสกัดจากธรรมชาติที่มีสมบัติต้านเซลล์มะเร็ง เช่น สารแอนโดรกราโฟไลด์ [3] เป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

สารแอนโดรกราโฟไลด์เป็นสารออกฤทธิ์หลักที่พบในฟาทะลายใจ ซึ่งมีการใช้เป็นยาสมุนไพร โดยจัดอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติของประเทศไทย มีข้อบ่งใช้ในการบรรเทาอาการของโรคหวัด (common cold) เช่น เจ็บคอ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ น้ำมูกไหล และบรรเทาอาการท้องเสียชนิดไม่ติดเชื้อ [4] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ทางยาอีกหลายประการ เช่น ฤทธิ์ลดน้ำตาล

ในเลือด [5] ฤทธิ์ต้านการอักเสบ [6] และฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด [7] มีรายงานว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็งกระเพาะอาหาร [8] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจนำสารออกฤทธิ์ในธรรมชาติจากพืชสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมาใช้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาโลกที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ และนำไปสู่ขั้นตอนการพัฒนาารักษามะเร็งที่มีประสิทธิภาพต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสกัดและแยกสารแอนโดรกราโฟไลด์

นำใบฟ้าทะลายโจรอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นแช่สกัด (maceration) ใบฟ้าทะลายโจรที่แห้งแล้วในเมทานอลเป็นเวลา 7 วัน และแยกสารละลายออกด้วยการกรอง นำสารละลายที่แยกได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจร และแยกสารแอนโดรกราโฟไลด์โดยวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction) โดยนำส่วนสกัดหยาบละลายในเมทานอล และสกัดด้วยเฮกเซนในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วสกัดแยกซ้ำอีก 5 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายชั้นเมทานอลไประเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน จะมีส่วนของแข็งที่ไม่ละลายเกิดขึ้น และแยกของแข็งด้วยวิธีการกรอง จากนั้นชั่งน้ำหนักของแข็งและคำนวณเพื่อหาค่าร้อยละผลผลิตของสาร (% extraction yield) จากสมการที่ (1)

ร้อยละผลผลิต = $\frac{\text{น้ำหนักของสารแอนโดรกราโฟไลด์}}{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบ}} \times 100$ (1)

หลังจากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง โดยใช้เมทานอล : คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1 : 7 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ นำ

ผลที่ได้เปรียบเทียบกับสารแอนโดรกราโฟไลด์มาตรฐาน และพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ (Bruker FT-NMR Ultra Shield™ spectrometer) ความถี่ 300 MHz โดยนำสารที่ได้ละลายในตัวทำละลาย CDCl_3 แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิง [9]

2.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 และเซลล์ปกติ Vero cell ด้วยวิธี MTT ดัดแปลงจากวิธีของ Kaewpiboon และคณะ (2012) โดยเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ปกติในอาหาร RPMI และ DMEM ตามลำดับ เติม FBS ร้อยละ 10 สารปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin ร้อยละ 1 เลี้ยงในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนมีความหนาแน่นร้อยละ 80 ของพื้นที่ทั้งหมดในขวดเลี้ยงเซลล์ แยกเซลล์ออกจากภาชนะและนับจำนวนเซลล์ แล้วจึงนำไปเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ 96-well plate โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น คือ 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงในสภาวะเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติมสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเติมสารละลาย MTT 100 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม นำไปเลี้ยงต่อที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย DMSO 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกสีม่วงที่เกิดขึ้น และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงมาใช้คำนวณหาร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (% of cell viability) ดังสมการ นำค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มาสร้างกราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) [10] จาก

สมการที่ (2)

ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ = (ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ ÷ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ) × 100 (2)

2.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์

เซลล์เพาะเลี้ยงใน 24-well plate เมื่อเจริญได้ร้อยละ 90-100 ถูกขีดด้วย sterile micro-plate tip ขนาด 200 ไมโครลิตร จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงให้เซลล์ชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์ และเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้ควบคุมปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยถ่ายภาพเซลล์เพาะเลี้ยงก่อนและหลังได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (trinocular inverted Olympus) แล้วคำนวณหาร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ (% wound closed) จากสมการที่ (3)

ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ = [(ระยะห่างระหว่างเซลล์ ณ จุดเริ่มต้น - ระยะห่างระหว่างเซลล์ ณ 24 ชั่วโมง) ÷ ระยะห่างระหว่างเซลล์ ณ 24 ชั่วโมง] × 100 (3)

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลแสดงเป็น mean ± SD ใช้สถิติ Student's t-test เพื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบแบบรายคู่ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง โดยกำหนดค่านัยสำคัญ p-value < 0.01

3. ผลและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การสกัดและแยกสารแอนโดรกราโฟไลด์จากฟ้าทะลายโจร

เมื่อนำใบฟ้าทะลายโจรมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลโดยใช้วิธีแช่สกัด ที่อุณหภูมิห้อง



Figure 1 Yellow crystal of andrographolide isolated from *Andrographis paniculata* by liquid-liquid extraction with methanol: hexane (1 : 1) solvent



Lane	Compounds	R _F
A	andrographolide (standard)	0.51
B	Isolated compound	0.51

Figure 2 TLC of (A) standard andrographolide (B) isolated compound performed along with a silica gel plate using MeOH: CHCl₃ (1 : 7) solvent. The spots were visualized under UV light at 254 nm.

เป็นเวลา 7 วัน ระเหยตัวทำละลายออก จะได้สารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม จากนั้นสกัดแยกสารแอนโดรกราโฟไลด์ด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction) จะได้เป็นของแข็งสีเหลือง (รูปที่ 1) และได้ผลผลิตร้อยละ 8.44

เมื่อนำสารที่ได้ระหว่างกระบวนการแยกมาทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางเปรียบเทียบกับแอนโดรกราโฟไลด์มาตรฐาน โดยใช้เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (1 : 7) เป็นตัวจักรภาค

เคลื่อนที่ ซึ่งจะปรากฏแถบการแยกภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (รูปที่ 2) พบว่ามีค่า R_f เท่ากับสารแอนโดรกราโฟไลด์มาตรฐาน

ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิง [9] พบว่ามีลักษณะของข้อมูลที่ปรากฏมีลักษณะเหมือนกัน ดังนั้นจึงสรุปว่าสารที่สกัดแยกได้จากฟ้าทะลายโจรเป็นแอนโดรกราโฟไลด์บริสุทธิ์ มีลักษณะทางกายภาพเป็นของแข็งสีเหลือง มีสูตรโมเลกุล คือ $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5$ มีมวลโมเลกุล 350.45 กรัมต่อโมล [9]

Table 1 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) spectral data of andrographolide (standard) and isolated compound

Positions	δ (ppm) (J in Hz)	
	F85/86/87	Andrographolide (standard) [9]
3	3.34 (H, <i>btr</i> , $J = 8.1$ Hz)	3.44 (1H,m,o)
12	6.85 (H, <i>dt</i> , $J = 6.9, 1.5$ Hz)	6.84 (1H, <i>dt</i> , $J = 6.8, 1.5$ Hz)
14	4.87 (H, <i>d</i> , $J = 5.7$ Hz)	5.01 (H, <i>d</i> , $J = 6.1$ Hz)
15	4.38 (H, <i>dd</i> , $J = 10.5, 6.0$ Hz)	4.45 (H, <i>dd</i> , $J = 10.2, 6.1$ Hz)
	4.17 (H, <i>dd</i> , $J = 10.5, 2.0$ Hz)	4.14 (H, <i>dd</i> , $J = 10.2, 2.0$ Hz)
17	4.81 (H, <i>brs</i>)	4.87 (H, <i>s</i>)
	4.54 (H, <i>brs</i>)	4.67 (H, <i>s</i>)
18	1.16 (3H, <i>s</i>)	1.20 (3H, <i>s</i>)
19	4.10 (H, <i>d</i> , $J = 10.8$ Hz)	4.11 (H, <i>d</i> , $J = 11.0$ Hz)
	3.31 (H, <i>m</i>)	3.36 (H, <i>m</i>)
20	0.62 (3H, <i>s</i>)	0.74 (3H, <i>s</i>)

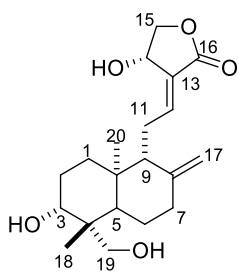


Figure 3 Structure of andrographolide

3.2 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์

การนำสารแอนโดรกราโฟไลด์ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (A549 cell line) และเซลล์ไลน์ปกติ (Vero cell line) โดยมียาต้านมะเร็งอีโทโพไซด์ (etoposide) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (รูปที่ 4)

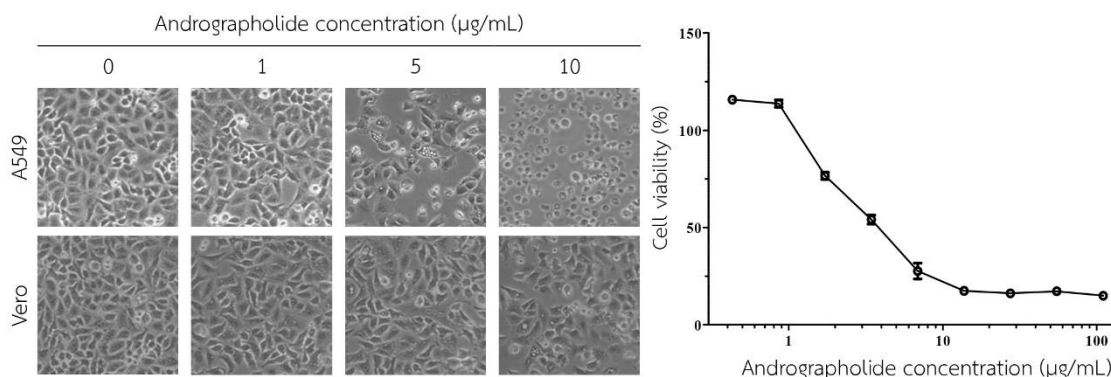


Figure 4 (A) A549RT-eto cells were treated with andrographolide (0, 1, 5, 10 µg/mL) for 72 h. After treatment, the morphological changes of cells and cell viability were observed under a light microscope. (B) The IC₅₀ of XanX against A549RT-eto cells was measured by MTT assay. The results shown are the average of triplicates; the bar indicates standard deviation.

ผลการทดลองพบว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์แสดงผลการต้านเซลล์มะเร็งปอดด้วยค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ร้อยละ 50 (inhibitory concentration, IC₅₀) เท่ากับ 5.51±0.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (รูปที่ 4A) และมีความจำเพาะของความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ไลน์ปกติ เมื่อเซลล์ได้รับสารสกัดนาน 3 วันพบว่าที่ความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดได้ร้อยละ 50 จะไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ปกติ (IC₅₀ > 110 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) นอกจากนี้จะเห็นลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปภายหลังจากได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์แปรผันตามความเข้มข้นของสารที่ได้รับ พบว่าที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จะทำให้ลักษณะของเซลล์มะเร็งปอดเปลี่ยนแปลงไปมากที่สุด แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ไลน์ปกติ (รูปที่ 4B) และเมื่อเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อเซลล์มะเร็งปอด พบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่ายาอีโทโพไซด์ (IC₅₀ = 37.51±1.05 ไมโคร

กรัมต่อมิลลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhao และคณะ (2008) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งหลาย ๆ ชนิดของสารแอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด (A549 cell lines) [13] นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับกลไกของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในการต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิด พบว่าสามารถเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) รวมถึงสารแอนโดรกราโฟไลด์สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบออโตฟาจี (autophagy) อีกด้วย [14,15] ที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์มีประสิทธิภาพในการต้านเซลล์มะเร็ง โดยชักนำให้เกิดการตายของเซลล์หลายรูปแบบ จึงน่าสนใจในการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดแบบจำเพาะ

3.3 การศึกษาความสามารถของสารแอนโดร

กราโฟไลด์ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง

การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดเป็นปัญหาหนึ่งต่อการประสบความสำเร็จของการรักษาโรคมะเร็ง ซึ่งการศึกษานี้ทดสอบฤทธิ์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด ด้วยวิธี scrape/wound โดยสารแอนโดรกราโฟไลด์ความ

เข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดมากกว่าร้อยละ 80) เพื่อใช้ทดสอบการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งโดยถ่ายภาพเซลล์ก่อนและหลังได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ (รูปที่ 5)

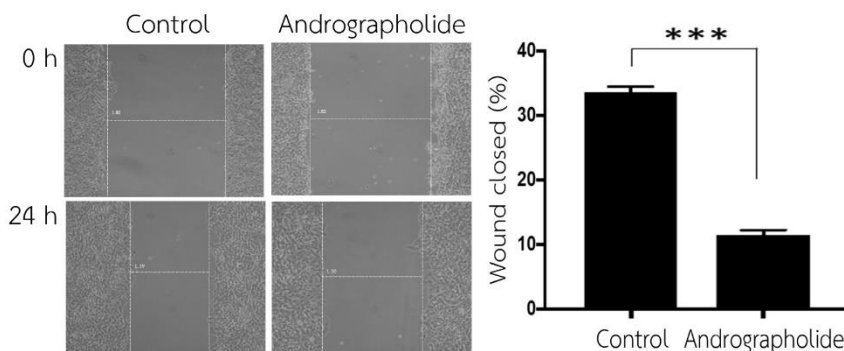


Figure 5 The effect of andrographolide (3 $\mu\text{g/mL}$) on A549 cell migration by wound healing assay at 24 hours

สารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง ชุดควบคุมมีการเคลื่อนที่ได้ร้อยละ 33.89 ± 1.65 ส่วนเซลล์มะเร็งที่ได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์ความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเคลื่อนที่ของเซลล์คิดเป็นร้อยละ 17.58 ± 1.43 ดังนั้นสารแอนโดรกราโฟไลด์สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด A549 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) (รูปที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (2010) ที่ศึกษาสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด A549 พบว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านกลไกการลดการแสดงออกของโปรตีนในวิถี PI3K/Akt

[16] นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยแสดงกลไกของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการลดการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง พบว่ามีกลไกอื่น ๆ อีกมากมายที่เกี่ยวข้อง [17] ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจต่อการศึกษาในเชิงลึกต่อไป เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอดได้ดียิ่งขึ้น

4. สรุปผลการทดลอง

แอนโดรกราโฟไลด์ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์หลักในฟ้าทะลายโจร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด ($\text{IC}_{50} = 5.51 \pm 0.56$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และมีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง นอกจากนี้พบว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์มีความจำเพาะของความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (A549 cell line) มากกว่าเซลล์ไลน์ปกติ (Vero cell line) และมีประสิทธิภาพดีกว่ายาอีโทโพไซด์ที่

เป็นยารักษา มะเร็ง ในปัจจุบัน ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการทดลองจึงสามารถนำไปเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษากลไกต่าง ๆ เพื่อพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการวิจัยเงินรายได้มหาวิทยาลัยทักษิณ ประเภททุนวิจัยบูรณาการ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 และทุนสนับสนุนบางส่วนจากเงินรายได้โครงการวิจัยของสาขาวิชาชีววิทยา และสาขาวิชาคณิตศาสตร์และวิทยาศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ และขอขอบคุณข้อมูลสนับสนุนบางส่วนจากนางสาวนุรฮายาตี โอจินางสาววราลี ฟุ้งเฟื่อง และนายจิรยุทธ ขุนอักษร

6. References

- [1] Luo, X., Luo, W., Lin, C., Zhang, L. and Li, Y., 2014, Andrographolide inhibits proliferation of human lung cancer cells and the related mechanisms, *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7: 4220-4225.
- [2] Zhu, X. and Li, J.I.N., 2010, Gastric carcinoma in China: Current status and future perspectives (review), *Oncol. Lett.* 1: 407-412.
- [3] Marcaccini, A.M., Meschiari, C.A., Zuardi, L.R., de Sousa, T.S., Taba, M., Teofilo, J.M., Jacob-Ferreira, A.L, Tanus-Santos, J.E., Novaes, A.B. and Gerlach, R.F., 2010, Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy, *J. Clin. Periodontol.*

37: 180-190.

- [4] Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand, 2007, *Thai Herbal Pharmacopoeia*, Volume II, Office of Notional Buddhishm Press, Bangkok.
- [5] Akhtar, M.T., Bin Mohd Sarib, M.S., Ismail, I.S., Abas, F., Ismail, A., Lajis, N.H. and Shaari, K., 2016, Anti-Diabetic activity and metabolic changes Induced by *Andrographis paniculata* plant extract in obese diabetic rats, *Molecules* 21(8): E1026.
- [6] Low, M., Khoo, C.S., Münch, G., Govindaraghavan, S. and Suche, N.J., 2015, An *in vitro* study of anti-inflammatory activity of standardised *Andrographis paniculata* extracts and pure andrographolide, *BMC Comp. Altern. Med.* 15(1): 18.
- [7] Menon, V. and Bhat, S., 2010, Anticancer activity of andrographolide semisynthetic derivatives, *Nat. Prod. Commun.* 5: 717-720.
- [8] Dai, L., Wang, G. and Pan, W., 2017, Andrographolide inhibits proliferation and metastasis of SGC7901 gastric cancer cells, *BioMed Res. Inter.* 2017: 1-10.
- [9] Liu, Z., Law, W.K., Wang, D., Nie, X., Sheng, D., Song, G., Guo, K., Wei, P., Ouyang, P., Wong, C.W. and Zhou, G.C., 2014, Synthesis and discovery of andrographolide derivatives as non-steroidal farnesoid X receptor (FXR) antagonists, *RSC Adv.* 4: 13533-13545.

- [10] Kaewpiboon, C., Lirdprapamongkol, K., Srisomsap, C., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T., Puwaprisirisan, P, Svasti, J. and Assavalapsakul, W., 2012, Studies of the in vitro cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants, BMC Comp. Altern. Med. 12: 217-222.
- [11] Rajani, M., Shrivastava, N. and Ravishan kara, M.N., 2000, A rapid method for isolation of andrographolide from *Andrographis paniculata* Nees (kalmegh), Pharm. Biol. 38: 204-209.
- [12] National Center for Biotechnology Information, 2018, Andrographolide, Available Source: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5318517PubChemCompoundDatabase;CID=5318517>, May 1, 2018.
- [13] Zhao, F., He, E.Q., Wang, L. and Liu, K., 2008, Anti-tumor activities of andrographolide, a diterpene from *Andrographis paniculata*, by inducing apoptosis and inhibiting VEGF level, J. Asian Nat. Prod. Res. 10: 467-473.
- [14] Hsieh, M.J., Lin, C.W., Chiou, H.L., Yang, S.F. and Chen, M.K., 2015, Dehydroandrographolide, an iNOS inhibitor, extracted from *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees, induces autophagy in human oral cancer cells, Oncotarget 6: 30831-30849.
- [15] Shao, F., Tan, T., Tan, Y., Sun, Y., Wu, X. and Xu, Q., 2016, Andrographolide alleviates imiquimod-induced psoriasis in mice via inducing autophagic proteolysis of MyD88, Biochem. Pharm. 115: 94-103.
- [16] Lee, Y.C., Lin, H.H., Hsu, C.H., Wang, C.J., Chiang, T.A. and Chen, J.H., 2010, Inhibitory effects of andrographolide on migration and invasion in human non-small cell lung cancer A549 cells via down-regulation of PI3K/Akt signaling pathway, Eur. J. Pharm. 632: 23-32.
- [17] Islam, M.T., Ali, E.S., Uddin, S.J., Islam, M.A., Shaw, S., Khan, I.N., Saravi, S.S.S., Ahmad, S., Rehman, S., Gupta, V.K., Gaman, M.A., Gaman, A.M., Yele, S., Das, A.K., Castro, E.S.J.M., Moura Dantas, S.M.M., Rolim, H.M.L., Carvalho Melo-Cavalcante, A.A., Mubarak, M.S., Yarla, N.S., Shilpi, J.A., Mishra, S.K., Atanasov, A.G. and Kamal, M.A., 2018, Andrographolide, a diterpene lactone from *Andrographis paniculata* and its therapeutic promises in cancer, Cancer Lett. 420: 129-145.