สุมาลี มุสิกา : อิทธิพลของสารสกัดแมงลักคา (*HYPTIS SAUVEOLENS* (L.) POIT) ต่อการเพิ่มจำนวนและการตายแบบอะพ็อบโทซิสของเซลล์มะเร็งของมนุษย์สายพันธุ์เม็ดเลือดขาวเจอร์แคท (THE EFFECTS OF MINTWEED (*HYPTIS SAUVEOLENS* (L.) POIT) EXTRACTS ON PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF A HUMAN JURKAT LEUKEMIA CELL LINE) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.กรกช อินทราพิเชฐ, 177 หน้า.

สารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคาด้วยเอทานอลและน้ำ เมื่อนำมาตรวจสอบชนิดของสารพฤกษเคมี คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ความเป็นพิษต่อเซลล์ คุณสมบัติการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์เจอร์แคทและเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของคน และวิถีการตายแบบอะพ็อบโทซิสของเซลล์ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทานอล มีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงที่สุด ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทานอล สารสกัดใบแมงลักคาด้วยน้ำ สารสกัดเมล็ดแมงลักคาด้วยเอทานอล และสารสกัดเมล็ดแมงลักคาด้วยน้ำ คือ 370.02 ± 7.10 319.45 ± 8.67 135.92 ± 2.17 และ 77.02 ± 2.05 mg GAE/g ของสารสกัดแห้ง ตามลำดับ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ คือ 278.81 ± 3.40 240.81 ± 5.01 86.28 ± 0.67 และ 15.38 ± 0.21 mg CAE/g ของสารสกัดแห้ง ตามลำดับ การตรวจสารพฤกษเคมีของสารสกัดแมงลักคา พบว่ามีสารกลุ่ม เทอร์พีนอยด์ น้ำมันหอมระเหย แทนนิน ซาโปนิน แอลคาลอยด์ แต่ไม่พบสารกลุ่ม คูมาริน คาร์ดิแอ็กกลัยโคไซด์ แอนทราควิโนน คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทานอลมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก คือ 8.52 ± 0.44 μM $FeSO_4$/mg ของสารสกัดแห้ง ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.26 ± 0.08 μg/mL สารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทานอลมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระต่างจากสารมาตรฐานคาเทชินและกรดแอสคอร์บิคอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ การวิเคราะห์กิจกรรมสลายไขมันด้วยวิธี TBARS แสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทานอลและน้ำเหมือนกับคาเทชิน และสูงกว่าสารสกัดเมล็ดแมงลักคาด้วยเอทานอลและน้ำอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

สารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทานอล มีความเป็นพิษต่อไรทะเล (*Artemia salina*) มีค่า LC_{50} เท่ากับ 360.48 (344.02-381.05) μg/mL และยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของคนสายพันธุ์เจอร์แคท โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 553.52 ± 14.07 μg/mL ในขณะที่สารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทานอล ชักนำการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของคน การชักนำการตายแบบอะพ็อบโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์เจอร์แคทวิเคราะห์โดยการย้อมการแตกหัก

ของนิวเคลียสด้วยสี Hoechst 33258 และวิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟไรซิส พบว่า สารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทานอล ชักนำให้เกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิส โดยบ่งชี้ได้จากเส้นใยโครมาตินที่หดแน่น การแตกหักของนิวเคลียส และชิ้นดีเอ็นเอแตกหักแบบขั้นบันได สารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทานอลทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์เจอร์แคทตายที่ 24 ชั่วโมง โดยการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียสซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด และการแตกหักของดีเอ็นเอแบบขั้นบันไดเริ่มพบที่ 6 ชั่วโมง หลังบ่มเซลล์กับสารสกัดที่ความเข้มข้น 600 μg/mL

นอกจากนั้น การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Western blot แสดงว่า สารสกัดแมงลักคาสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์เจอร์แคทโดยการเพิ่มระดับของโปรตีนชักนำให้เกิดการตาย caspase-9 และ Bax และมีการลดระดับของโปรตีนต้านการตาย Bcl-2 จึงสรุปได้ว่า สารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทานอล มีฤทธิ์มากที่สุดจากสารสกัดทั้งหมดในการต้านอนุมูลอิสระ และชักนำให้เกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์เจอร์แคท ดังนั้น มีความเป็นไปได้ที่สารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทานอล จะเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ และสารป้องกันการเกิดมะเร็ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีววิทยา ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

SUMALEE MUSIKA : THE EFFECTS OF MINTWEED (*HYPTIS SAUVEOLENS* (L.) POIT) EXTRACTS ON PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF A HUMAN JURKAT LEUKEMIA CELL LINE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KORAKOD INDRAPICHATE, Ph.D. 177 PP.

HYPTIS SAUVEOLENS/ PHYTOCHEMICALS/ ANTIOXIDANT/ CYTOTOXICITY/ CELL PROLIFERATION/ APOPTOSIS

Mintweed leaf ethanolic and water extracts (MLE/e, MLE/w), mintweed seed ethanolic and water extracts (MSE/e, MSE/w) were evaluated for the phytochemical properties, antioxidant activities, cytotoxicity, proliferative effects on Jurkat leukemia cells and normal human lymphocyte cells and the pathway of apoptotic cell death. The results showed that MLE/e had the highest total phenolic compounds (TPC) and flavonoid contents (TFC). TPC of MLE/e, MLE/w, MSE/e and MSE/w were 370.02 ± 7.10, 319.45 ± 8.67, 135.92 ± 2.17 and 77.02 ± 2.05 mg gallic acid equivalent (GAE)/g dried extract and TFC of MLE/e, MLE/w, MSE/e and MSE/w were 278.81 ± 3.40, 240.81 ± 5.01, 86.28 ± 0.67 and 15.38 ± 0.21 mg catechin equivalent (CAE)/g dried extract, respectively. Phytochemical screening of the extracts revealed the existence of terpeniods, essential oils, tannins, saponins and alkaloids whereas coumarins, cardiac glycosides and antraquinones were not detected. Antioxidant activity of the extracts, which was determined by a FRAP assay showed that MLE/e possessed the highest ferric reducing activity of 8.52 ± 0.44 μM $FeSO_4$/mg dried extract. DPPH method, MLE/e also showed the highest antioxidant activity with an IC_{50} of 9.26 ± 0.08 μg/mL. The antioxidant activity of MLE/e was significantly different

from those of the standards, catechin and ascorbic acid at $p < 0.05$. TBARS assay for lipid peroxidation activity demonstrated that the antioxidant activity of MLE/e and MLE/w exhibited similar property of catechin and their activities were significantly higher than MSE/e and MSE/w ($p < 0.05$).

MLE/e showed the highest cytotoxicity on *Artemia salina* with LC_{50} value of 360.48 (344.02-381.05) µg/mL and also inhibited the growth of Jurkat human cancer cells with IC_{50} values of 553.52 ± 14.07 µg/mL whereas it induced the proliferative property on normal human lymphocytes. Induction of apoptotic cell death in Jurkat cells was analyzed by using Hoechst 33258 staining assay and DNA fragmentation assay. MLE/e induced apoptotic cell death as indicated by chromatin condensation and nuclear fragmentation and nucleosomal DNA ladder pattern analyzed by agarose gel electrophoresis. MLE/e caused death to Jurkat cells at a significant level by changing nuclear morphology at 24 h with dose dependent manner and DNA ladders began to appear at 6 h after the cells were treated at 600 µg/mL.

In addition, Western blot analysis showed that induction of apoptosis of Jurkat cells by mintweed extracts were accompanied by increasing caspase-9, pro-apoptotic Bax and decreasing Bcl-2 levels. It is concluded that MLE/e is the most active extract of all the mintweed extracts in antioxidant and apoptotic activities on Jurkat cells. It may possibly be a potential source of antioxidants and chemopreventive agents against carcinogenesis.

School of Biology
Academic Year 2012

Student's Signature_____
Advisor's Signature_____
Co-advisor's Signature_____