บทคัดย่อ

ฮว่านง็อก (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk.) เป็นพืชสมุนไพรที่ได้รับการกล่าวอ้างว่ามีสรรพคุณทางยามากมาย แต่การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของฮว่านง็อกยังมีปริมาณจำกัด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านมะเร็งของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก รวมถึงประเมินฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ซึ่งอาจเป็นพิษระยะยาวที่ผู้บริโภคมีความกังวลใจมากที่สุด ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดจากใบสดด้วย 95% เอทานอล (95EE-FLP) และสารสกัดส่วนที่ละลายน้ำ (WE-FLP) (ได้จากการแยกเอาส่วนเฉพาะที่ละลายน้ำออกจาก 95EE-FLP) มีปริมาณรวมของสารกลุ่มฟินอลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่าสารสกัดจากใบแห้ง ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า 95EE-FLP และ WE-FLP เมื่อประเมินโดยวิธี DPPH และ FRAP มีค่าสูงกว่าสารสกัดจากใบแห้ง โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดสอดคล้องกับปริมาณของสารฟินอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบ ทั้ง 95EE-FLP และ WE-FLP สามารถลดการสร้างอนุมูลอิสระที่เกิดภายในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 เมื่อถูกชักนำโดย tBOOH เมื่อใช้ probe เรืองแสง DCFH-DA ทั้ง 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เกิดพิษต่อเซลล์ (50-250 µg/ml) แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยการยับยั้งการการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) และการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการอักเสบ iNOS และ COX-2 ในเซลล์ RAW264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 1 µg/ml LPS และ 25 U/ml IFN-γ รวมทั้งการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและ m RNA ของ pro-inflammatory cytokines TNF-α และ IL-6 ใน RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย 100 ng/ml LPS ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดพบว่าเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ของคนชนิดต่าง ๆ มีความไวต่อความเป็นพิษของ 95EE-FLP และ WE-FLP ต่างกัน โดยเซลล์มะเร็งที่มีความไวเรียงลำดับจากมากไปน้อยคือ Jurkat > HepG2 > MCF-7 > PC3 สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 250-1,500 µg/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่เป็นเซลล์คนปกติ สารสกัดทั้ง 2 ชักนำเซลล์ Jurkat ให้เกิดการตายด้วยกลไก apoptosis ดังหลักฐานบ่งชี้ทางสัณฐานวิทยาของ apoptotic เซลล์ เอกลักษณ์การแตกหักของดีเอ็นเอแบบขั้นบันไดใน gel electrophoresis การย้อมติด annexin V-PI และการหลั่งของ cytochrome c จาก mitochondria สู่ cytosol การตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดใน *in vivo* ด้วยโมเดล CAM พบว่าสารสกัด 95EE-FLP (100-300 µg/ml) และ WE-FLP (30-300 µg/ml) มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการชักนำโดยเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ B16F10 ที่ปลูกถ่ายใน CAM โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดตามธรรมชาติใน CAM การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ *in vitro* พบว่า ในช่วงความเข้มข้น 150-600 ไมโครกรัมต่อจานเพาะเชื้อ สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ต่อแบคทีเรีย *S typhimurium* TA98 และ TA100 เมื่อทดสอบในสภาวะทั้งที่มีและไม่มี S9 mix ในวิธีทดสอบของ Ames

โดยรวม สารสกัดจากใบฮว่านง็อกมีศักยภาพสูงในการพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ยา หรือ ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อประยุกต์ใช้ในการบรรเทาอาการของโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของโรคมะเร็ง การอักเสบ และอนุมูลอิสระ

Abstract

Hoan-Ngoc (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk; PP) has been claimed to possess many pharmaceutical properties, nevertheless, the studies of its pharmacological properties are still very limited. The present study aimed to further investigate the phytochemicals and explore the antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of Hoan Ngoc. In addition, a long term mutagenic effect of Hoan Nogoc, the issue most concern among consumers, was also evaluated. The results suggested that 95% ethanol extract prepared from fresh leaves of PP (95EE-FLP) and the water extract of PP (WE-FLP) (water fraction extracted from 95EE-FLP) significantly exhibited higher total phenolic and flavonoid contents than those of dried leaf extracts. Concordantly, the antioxidant activity, assessed by DPPH and FRAP assays, was also more prominent in fresh leaf extracts than that of dried leaf extracts. Both 95EE-FLP and WE-FLP could also effectively attenuate intracellular reactive oxygen species generation in tBuOOH-induced oxidative stress in macrophage RAW264.7 cells as monitored by using DCFH-DA fluorescent probe. At non-toxic concentrations (50-250 µg/ml), both 95 EE-FLP and WE-FLP effectively exhibited anti-inflammatory activities as evidenced by inhibition of nitric oxide production and the expressions of pro-inflammatory enzymes iNOS and COX2 in 1 µg/ml LPS plus 25 U/ml IFN-γ-stimulated RAW264.7 cells. In addition, 95EE-FLP also suppressed LPS-induced TNF-α and IL-6 protein synthesis and mRNA expression in RAW264.7 cells. *In vitro* cytotoxicity of 95EE-FLP and WE-FLP towards various types of human cancer cell lines revealed different susceptibility of cancer cells, and the sensitivity was ranged in the descending order of Jurkat > HepG2 > MCF-7 > PC-3. At the concentration range of 250-1,500 µg/ml, 95EE-FLP and WE-FLP preferentially targeted Jurkat cells with less toxicity to normal human peripheral blood mononuclear cells. Furthermore, the induction of Jurkat cell death by the extracts was mediated via apoptosis mechanism as evidenced by characteristic morphological feature of apoptotic cells, DNA ladder in gel electrophoresis, annexin V-PI staining and the release of cytochrome c from mitochondria to cytosol. The results of *In vivo* anticancer study conducted in the CAM model revealed that 95EE-FLP (100-300 µg/ml) and WE-FLP (100-

300 µg/ml) selectively suppressed the melanoma B16F10-induced angiogenesis at 24 and 48 hr. while sparing the normal neovascularization on the CAM. The mutagenic study indicated that both extracts in the range of 150 to 600 µg/plate had no mutagenicity, either in the presence or absence of S9 mix, in the Ames assay.

Overall, the crude extracts from fresh leaf of Hoan Ngoc has high potential to be developed as natural chemopreventive products or nutraceuticals in combating development of cancer, chronic inflammation and oxidative stress-related diseases.