รหัสโครงการ SUT1-104-48-24-03

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของลูกใต้ใบ 3 ชนิด

(Pharmacological Activities of Three *Phyllanthus* species)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-48-24-03

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของลูกใต้ใบ 3 ชนิด

(Pharmacological Activities of Three *Phyllanthus* species)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ภกญ. ดร. นวลน้อย จูฑะพงษ์

สาขาวิชาเภสัชวิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2555

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวกาญจนา พุ่มภาชี นักศึกษาปริญญาโท ที่ช่วยเหลือทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ และขอขอบคุณ ดร. พอล เจ โกรดิ ที่ช่วยตรวจสอบความถูกต้องในการระบุชนิดของพืช สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีสำหรับการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

ลูกใต้ใบเป็นพืชล้มลุกที่จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae จีนัส *Phyllanthus* ลูกใต้ใบถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรโดยแพทย์แผนโบราณเพื่อรักษาโรคต่าง ๆ หลายโรคมาเป็นเวลานานแล้ว เช่น ใช้แก้ไข้ รักษาโรคเบาหวานและโรคตับ เป็นต้น ในประเทศไทยพบว่าพืชที่มีชื่อเรียกทั่วไปว่าลูกใต้ใบมีหลายสปีชีส์เนื่องจากมีลักษณะเด่นที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ มีใบประกอบและออกผลห้อยลงตามซอกก้านใบย่อย ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดหยาบจากลูกใต้ใบ 3 ชนิด ได้แก่ *Phyllanthus virgatus, P. amarus* และ *P. urinaria* โดยทำการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารสกัด แล้วทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดทั้งสามชนิด จากการตรวจหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัด 50% เมธานอล พบว่าสารสกัดจาก *P. virgatus* มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดจาก *P. urinaria* และ *P. amarus* เมื่อทำการทดสอบโดยใช้วิธี DPPH free radical scavenging พบว่าสารสกัดหยาบจาก *P. virgatus* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด นอกจากนั้นยังสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ของ linoleic acid system ได้ดีที่สุดอีกด้วย และเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลูกใต้ใบต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยวิธี MTT และ trypan blue พบว่าสารสกัดจาก *P. virgatus* มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 มากกว่าสารสกัดจาก *P. amarus* และ *P. urinaria* ซึ่งสามารถยืนยันได้จากภาพถ่ายที่แสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ เมื่อนำสารสกัดที่มีความเข้มข้นเท่ากัน คือ 500 µg/mL มาทดสอบหาอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์ด้วยการใช้ Clark oxygen electrode พบว่าสารสกัดจาก *P. virgatus* กระตุ้นให้เซลล์มะเร็ง HepG2 มีการใช้ออกซิเจนมากที่สุด เนื่องจากไมโทคอนเดรียเป็นออร์กาเนลล์ที่สำคัญที่สุดในการใช้ออกซิเจนของเซลล์ ผลการศึกษานี้จึงชี้แนะว่าความเป็นพิษของสารสกัดจากลูกใต้ใบต่อเซลล์มะเร็งอาจมีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของไมโทคอนเดรีย ซึ่งน่าจะมีการศึกษาในรายละเอียดให้ลึกซึ้งต่อไป

คำสำคัญ: ลูกใต้ใบ, *Phyllanthus*, พิษต่อเซลล์, HepG2, การใช้ออกซิเจน

Abstract

Look-tai-bai is an annual herb in the genus *Phyllanthus* (family: Euphorbiaceae). It has long been prescribed in traditional medicine for treating various diseases such as fever, diabetes and liver disorders. In Thailand, the plants which are called Look-tai-bai consist of several species because they are closely related in appearance, i.e. compound leaf and fruits underneath every pair of the feathered leaves. The purpose of this study was to compare the pharmacological activities among crude extracts from three *Phyllanthus* species, namely *P. virgatus*, *P. amarus* and *P. urinaria*. The total phenolic content as well as antioxidant and anticancer activities of the extracts was analyzed. It was found that total phenolic content of the 50% methanol extract of *P. virgatus* was higher than those of *P. urinaria* and *P. amarus*. Moreover, the crude extract of *P. virgatus* showed the highest antioxidant property by using DPPH assay and highest inhibition of peroxidation in linoleic acid system. Additionally, the *in vitro* cytotoxicity of the *Phyllanthus* extracts on human hepatoma HepG2 cells were also investigated by MTT and trypan blue assay. The extract of *P. virgatus* was also more toxic than the extracts of *P. amarus* and *P. urinaria* extract; which was confirmed by cellular morphological changes. Measured by Clark oxygen electrode, the extract of *P. virgatus* (500 µg/mL) produced the highest stimulation on oxygen consumption of HepG2 cells. Since mitochondria is the most important organelle in the oxygen consumption of cells, the results obtained suggest that the mitochondrial effects may play an important role in the cytotoxicity of *Phyllanthus* extracts on HepG2 cells. Further investigations are recommended.

Keywords: Look-tai-bai, *Phyllanthus*, cytotoxicity, HepG2, Oxygen consumption

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	5
บทที่ 3 ผลการวิจัย	9
บทที่ 4 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	16
เอกสารอ้างอิง	19
ภาคผนวก	
งานวิจัยจากโครงการนี้ที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ	22

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 ลักษณะที่คล้ายคลึงกันของลูกใต้ใบ 3 ชนิดที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้ 1
รูปที่ 2 ลักษณะของดอกและผลของลูกใต้ใบ 3 ชนิดที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้ 5
รูปที่ 3.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของลูกใต้ใบวัดด้วยวิธี DPPH radical scavenging 10
รูปที่ 3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ linoleic acid ของสารสกัดลูกใต้ใบ 11
รูปที่ 3.3 Concentration–response ของลูกใต้ใบทั้ง 3 ชนิดต่อการตายของเซลล์ HepG2..... 12
รูปที่ 3.4 ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อรูปร่างของเซลล์ HepG2..... 13
รูปที่ 3.5 ผลของสารสกัดลูกใต้ใบในการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของเซลล์มะเร็ง HepG2 17

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบ phenolic ที่อยู่ในสารสกัดลูกใต้ใบทั้ง 3 สปีชีส์ 9
ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} ของสารสกัดในการทำให้เซลล์ HepG2 ตาย 12

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ลูกใต้ใบ เป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กจัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae จีนัส *Phyllanthus* เหตุที่มีชื่อเรียกว่า ลูกใต้ใบ, หญ้าลูกใต้ใบ หรือ หญ้าใต้ใบ เนื่องจากมีผลขนาดเล็กออกตามซอกก้านใบย่อย และห้อยลงให้เห็นว่าลูกอยู่ใต้ใบ (รูปที่ 1) ในประเทศไทยมีพืชล้มลุกที่มีลักษณะดังกล่าวคล้ายคลึงกันและถูกเรียกว่าลูกใต้ใบอยู่อย่างน้อย 5 ชนิดหรือสปีชีส์ (species) ได้แก่ *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn., *P. debilis, P. niruri, P. urinary* Linn *และ P. virgatus* G. Forst. นอกจากในประเทศไทยแล้ว พืชเหล่านี้ยังมีการกระจายทั่วไปในทุกภูมิภาคทั่วโลก และถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคในชาวพื้นเมืองต่าง ๆ เช่น จีน อินเดีย บราซิล รวมทั้งในประเทศไทย แต่ด้วยความคล้ายคลึงในด้านของลักษณะทั่วไปที่ปรากฏและชื่อพื้นเมืองที่มักจะเหมือนกัน จึงทำให้เกิดยากลำบากและสับสนทั้งในแง่ของการนำไปใช้รักษาโรคและการรายงานผลการศึกษา

A B C

รูปที่ 1 ลักษณะที่คล้ายคลึงกันของลูกใต้ใบ 3 ชนิดที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้ (A) *P. urinaria* (B) *P. amarus* และ (C) *P. virgatus* ที่มา: http://www.alabamaplants.com; http://cookislands.bishopmuseum.org และ http://www.plantsystematics.org

ในระยะเวลาสองทศวรรษที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชในกลุ่มนี้อย่างกว้างขวาง นักวิจัยพบฤทธิ์ต้านการเป็นพิษต่อตับ (anti-hepatotoxic properties) ของทั้ง *P. amarus* (Ram, 2001) *P. fraternus* (Ahmed et al., 2002) และ *P. urinaria* (Wang et al., 1995) นอกจากนั้นยังพบฤทธิ์ต้านการเกิดเนื้องอก, ฤทธิ์ต้านการเกิดมะเร็งและฤทธิ์ต้านการกลาย

พันธุ์ในพืชกลุ่มนี้อีกด้วย (Rajeshkumar et al., 1995; Raphael et al., 2002; Sripanidkulchai et al., 2002) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาที่พบว่าสารสกัดน้ำจาก *P. amarus* สามารถเพิ่มเวลาของการมีชีวิตของหนูขาวที่ถูกชักนำให้เกิดมะเร็งในตับให้ยาวขึ้น (Rajeshkumar and Kuttan 2000) ผลการทดลองจากการนำน้ำสกัดจาก *P. amarus* ไปใช้ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีพบว่าได้ผลดี กล่าวคือทำให้ภูมิต้านทานต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบีของผู้ป่วยเพิ่มขึ้น ขณะที่ระดับ antigen ลดลง (Wang et al., 1995) นอกจากฤทธิ์ในการป้องกันการอักเสบหรืออันตรายต่อตับแล้วยังพบว่าน้ำสกัดจากลูกใต้ใบ *P. urinaria* มีฤทธิ์ทำให้เกิดการตาย (apoptosis) ของเซลมะเร็งชนิด Lewis lung carcinoma โดยมีกลไกไปทำให้เซลมะเร็งชนิดนี้สร้างโปรตีน Bcl-2 น้อยลง (Huang et al., 2003) จากศึกษาของนักวิจัยกลุ่มต่าง ๆ ทั่วโลกพบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ ของพืชลูกใต้ใบอีกหลายประการ เช่น ฤทธิ์ในการต้านอักเสบ (Kiemer et al., 2003) ฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาว (Raphael et al., 2002) และฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการ replication ของ เชื้อ HIV-1 ในเซลล์มะเร็งชนิด CD4(+) HeLa cell (Notka et al., 2003) สำหรับฤทธิ์ในการต้านอักเสบนั้น มีนักวิจัยพบว่าสารสกัดจาก *P. amarus* สามารถยับยั้ง activity ของ iNOS, COX-2, and cytokines หลายชนิดโดยผ่านทาง NF-kappa B pathway (Kiemer et al., 2003) นอกจากนี้ Kassuya และคณะ (2003) ได้นำสารสกัด hexane จาก *P. amarus* มาทดสอบฤทธิ์ในการระงับความเจ็บปวด จากการทดสอบดังกล่าวพบว่าสารสกัดให้ผลตอบสนองดี สามารถระงับความเจ็บปวดได้ทั้งที่เกิดจากการอักเสบ (inflammatory pain) และที่เกิดจากเส้นประสาทอักเสบ (neuropathic pain) ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอักเสบนี้ คณะผู้วิจัยอีกกลุ่มหนึ่งได้ทำการทดสอบทั้งสารสกัดเมทธานอลและสารสกัดน้ำจาก *P. amarus* พบว่าสามารถลดการบวมของอุ้งเท้าหนูได้มากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 42% (Raphael and Kuttan, 2003) นอกเหนือจากฤทธิ์ที่กล่าวมาแล้วสารสกัดเมทธานอลจาก *P. amarus* ยังออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งนักวิจัยคิดว่าน่าจะเป็นผลมาจากฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation และความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ hydroxyl และ superoxide radicals (Raphael et al., 2002)

การค้นพบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของลูกใต้ใบซึ่งสนับสนุนความเชื่อที่ว่า ลูกใต้ใบมีมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค ทำให้มีผลิตภัณฑ์จากลูกใต้ใบออกจำหน่ายทางการค้าจากทั้งในประเทศและต่างประเทศ ด้วยเหตุที่ลูกใต้ใบสายพันธุ์ต่าง ๆ นี้มีความคล้ายคลึงทั้งในด้านลักษณะที่ปรากฏและส่วนประกอบทางเคมี ตลอดจนการใช้รักษาโรคที่คล้ายคลึงกันตั้งแต่ในอดีต ทำให้ผลิตภัณฑ์ซึ่งใช้ชื่อเรียกโดยรวมว่า ผลิตภัณฑ์จากลูกใต้ใบ อาจผลิตมาจากลูกใต้ใบคนละสายพันธุ์และอาจเป็นเหตุให้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากแหล่งผลิตที่ต่างกันมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างกัน นักวิจัยจาก

ประเทศจีนได้ทำการศึกษาวิจัยเปรียบเทียบผลในการรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบีของน้ำสกัดจากลูกใต้ใบชนิดต่าง ๆ จากต่างพื้นที่ คือ *P. amarus* Linn. จากเมือง Madras ประเทศอินเดีย, *P. niruri* จากจังหวัด Hainan ประเทศจีน และ *P. urinaria* จากจังหวัด Henan ประเทศจีน พบว่ามีเพียงผู้ป่วยที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำสกัดจาก *P. urinaria* ที่เก็บได้จากจังหวัด Hainan เท่านั้น ที่สามารถทำให้ผู้ป่วยมีภูมิต้านทานต่อไวรัสตับอักเสบบีเพิ่มขึ้น และ antigen ลดลง (Wang et al., 1995)

เพื่อประโยชน์สูงสุดต่อสุขภาพของประชาชนในการใช้ผลิตภัณฑ์จากลูกใต้ใบ จึงน่าจะมีข้อมูลชี้เฉพาะถึงความแตกต่างของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของลูกใต้ใบแต่ละชนิดซึ่งมีอยู่ในประเทศให้มากขึ้น บริษัทผู้ผลิตหรือประชาชนจะได้มีข้อมูลเกี่ยวกับสรรพคุณที่ถูกต้องเพื่อการเลือกชนิดที่เหมาะสมในการรักษาโรค จากการสำรวจของผู้วิจัย พบว่าลูกใต้ใบที่มีการกระจายตัวอยู่มากที่สุดในพื้นที่เขตจังหวัดนครราชสีมา ประกอบด้วยลูกใต้ใบ 3 สปีชีส์ คือ *P. amarus* Schumach. & Thonn., *P. urinary* Linn และ *P. virgatus* G. Forst. ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในหลาย ๆ ประการของลูกใต้ใบ 3 ชนิดดังกล่าว ได้แก่ ปริมาณ phenolic compound, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อเป็นข้อมูลไปสนับสนุนการเลือกใช้ชนิดของลูกใต้ใบให้ถูกต้อง งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ที่อาจจะเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษต่อเซลล์ ในแง่ของการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำสกัดจากลูกใต้ใบ 3 สปีชีส์ ในหัวข้อต่อไปนี้ คือ

1. ปริมาณสารประกอบ phenolic ในสารสกัด
2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
3. ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2
4. ฤทธิ์กระตุ้นการใช้ออกซิเจนของเซลล์มะเร็งตับ HepG2

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาโดยใช้สารสกัดหยาบ ทำให้มีข้อจำกัดในการระบุสารออกฤทธิ์ อีกทั้งเป็นการศึกษาทดลองในระดับ *in vitro* เท่านั้น

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะช่วยส่งเสริมให้เกิดความระมัดระวังในการเลือกชนิดของลูกใต้ใบมารักษาโรค เนื่องจากพบว่าสารสกัดจะลูกใต้ใบต่างสปีชีส์กันมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างกัน ซึ่งจะ

ก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดกับประชาชนผู้เลือกใช้สมุนไพรอันเป็นอีกทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากการใช้ยาแผนปัจจุบัน

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองและสารเคมี

1. การเก็บตัวอย่างพืชและการสกัดสาร

1.1 การเก็บพืชตัวอย่าง

ลูกใต้ใบทั้ง 3 ชนิด คือ *P. amarus*, *P. virgatus* และ *P. urinaria* เก็บได้จากอำเภอปักธงชัย และอำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา การ identify ทำโดย ดร. พอล เจ โกรดิ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยอ้างอิงจากลักษณะดอกและผล (รูปที่ 2) หลังจากล้างเศษดินและสิ่งที่ปนเปื้อนออกจนสะอาดด้วยน้ำและน้ำกลั่นในครั้งสุดท้ายแล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 40° C หลังจากนั้นนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ผงสมุนไพรที่ได้ถูกเก็บที่ –20° C ในถุงที่ปิดสนิท เพื่อนำไปสกัดต่อในขั้นต่อไป

รูปที่ 2 ลักษณะของดอกและผลของลูกใต้ใบ 3 ชนิดที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้ (A) *P. amarus* (B) *P. urinaria* และ (C) *P. virgatus* โดยในคอลัมน์ (1) = ดอกตัวเมีย (2) = ดอกตัวผู้ (3) = ผล และ (4) = ผลที่ถูกตัดตามขวาง

1.2 การเตรียมสารสกัดจากพืช

นำผงสมุนไพรของลูกใต้ใบแต่ละชนิดไปสกัดด้วย 50% methanol ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงรวม 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งมารวมกันแล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (arotary evaporator under low pressure) เมื่อของเหลวลดลงประมาณ 4/5 จึงนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ที่ –20° C

2. การตรวจหาปริมาณ total phenolic content

ปริมาณ total phenolic compounds ของสารสกัดลูกใต้ใบในการศึกษานี้ใช้วิธีที่กล่าวไว้ในการศึกษาของ Kulkarni และคณะ (2007) ดังต่อไปนี้คือ เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดความเข้มข้น 1 mg/mL จำนวน 250 µl หรือสารมาตรฐาน gallic acid หลายความเข้มข้นระหว่าง 0.025 – 0.5 mg/mL จากนั้นเติม 2% Na_2CO_3 จำนวน 2.5 mL และสารละลาย 50% Folin–ciocalteu จำนวน 100 µL หลังจากตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดการถูกกลืนแสงที่ 750 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ค่า total phenolic content ของสารสกัดได้จากการเปรียบเทียบกับ gallic accid มีหน่วยเป็น mg/g gallic acid equivalents (GAE)

3. การวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

3.1 DPPH free radical scavenging activity

ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดทำได้โดยวัดความสามารถในการกำจัด 2,2–dipenyl–1–picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่คงตัว โดยทำตามที่เคยมีรายงานไว้แล้ว (Ahmad et al., 2005) วิธีที่ใช้มีหลักการดังต่อไปนี้คือ DPPH (สีม่วง) สามารถไปทำปฏิกิริยา reduction กับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยจะรับ electron หรือ hydrogen radical จากสารต้านอนุมูลอิสระ เกิดเป็นโมเลกุลใหม่ที่คงตัวขึ้น (reduced form มีสีเหลืองอ่อน) ทำให้การดูดกลืนแสงที่ 517 nm เปลี่ยนไป วิธีทำมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ คือ เติมสารสกัดหรือสารมาตรฐาน (ascorbic acid) ความเข้มข้นต่าง ๆ ระหว่าง 0–300 µg/mL จำนวน 500 µl ลงใน สารละลาย 50 µM DPPH ใน methanol จำนวน 4.0 mL แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 5.0 mL ด้วยน้ำ เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืด เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer หลอดที่เป็นตัวควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดในประมาตรที่เท่ากัน ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระคำนวณได้เป็น % โดยสมการข้างล่าง

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = [(A_{control} - A_{sample})/ A_{control}] \times 100$$

โดยที่ $A_{control}$ และ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมและสารสกัดหรือสารมาตรฐานตามลำดับ

3.2 Inhibition of linoleic acid oxidation

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยา oxidation ของ linoleic acid ทำได้โดยใช้วิธี ferric thiocyanate method (Zhan et al., 2006) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ คือ เติมสารสกัดหรือสารมาตรฐาน (ascorbic acid และ α-tocopherol) ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 31.25 ถึง 2,000 µg/mL จำนวน 0.5 mL ลงในส่วนผสมของ 0.2 M linoleic acid emulsion (เตรียมโดย ละลาย linoleic acid จำนวน 0.2804 g ลงใน phosphate buffer จำนวน 50 mL ซึ่งมี Tween 20 อยู่ 0.2804 g) โดยใช้ 2.5 mL ผสมกับ phosphate buffer (0.2 M, pH 7.0) จำนวน 2.0 mL บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 60° C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแบ่งส่วนผสมดังกล่าวจำนวน 0.1 mL เติมลงใน 75% ethanol จำนวน 4.5 mL ตามด้วย 30% ammonium thiocyanate จำนวน 0.2 mL และ 20 mM ferrous chloride ใน 3.5% hydrochloric acid จำนวน 0.2 mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm

ในระหว่างปฏิกิริยา oxidation ของ linoleic acid นั้นจะเกิดการสร้าง peroxide ซึ่งสามารถไป oxidize Fe^{2+} ให้เป็น Fe^{3+} Fe^{3+} ที่เกิดขึ้นจะไปจับกับโมเลกุลของ thiocyanate เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 500 nm ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับ ascorbic acid และ α-tocopherol หน่วยใช้เปรียบเทียบคำนวณได้เป็นค่าการยับยั้งการสร้าง lipid peroxidation โดยสมการข้างล่าง

$$\text{Inhibition of lipid peroxidation (\%)} = 100 - [(A_{sample}/A_{control}) \times 100]$$

โดยที่ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม (ปราศจากสารสกัด) และ

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงในปฏิกิริยาที่มีสารสกัดหรือสารมาตรฐานอยู่

4. การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสารสกัดทำได้โดยศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 cell โดย 2 วิธี คือ trypan blue exclusion assay และ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann, 1983) และเพื่อเป็นการควบคุมพิษที่อาจเกิดขึ้นจากตัวทำละลาย ความเข้มข้นของ DMSO ที่ใช้ในการทดลองนี้จึงไม่เกิน 1% (v/v) ซึ่งพบว่าไม่มีพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.1 Cell culture

ทำการเลี้ยง HepG2 cells ในอาหารเลี้ยง RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) ที่อุณหภูมิ 37° C ในบรรยากาศอิ่มตัวและมี 5% carbon dioxide โดยเติม 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL antibiotic–antimycotic (Gibco) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2 Trypan blue exclusion assay

นำเซลล์ (ประมาณ $5x10^5$ cells/well) ใส่ใน 96–well plates ทิ้งไว้ในตู้บ่มข้ามคืน เพื่อให้เซลล์ติดที่ผิวจานเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นเติมสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ นำไปบ่มในตู้บ่มนาน 24 ชม. หลังครบเวลาเก็บเซลล์โดยใช้ 0.25% trypsin–EDTA solution นำเซลล์ไปย้อมด้วย 0.4% (w/v) trypan blue ในปริมาตรที่เท่ากัน นับจำนวนเซลล์ที่ติดสีด้านในเป็นเซลล์ตาย ส่วนเซลล์ที่ไม่ติดสีเป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยเครื่อง hemocytometer จำนวน % ที่เซลล์มีชีวิตคำนวณได้จากสมการด้านล่าง โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

% Viable cells = (Viable cells per mL/ Total cells per mL) X 100

4.3 MTT Assay:

นำเซลล์ (ประมาณ $5x10^5$ cells/well) ใส่ใน 96–well plate บ่มกับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ทำนองเดียวกับการทดลองที่ 4.2 หลังบ่มร่วมกับสารสกัดนาน 24 ชม. เติม MTT (5 mg/mL) จำนวน 20 µl ตั้งทิ้งไว้ 4 ชม. ดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออกแล้วเติม DMSO จำนวน 100 µl เพื่อละลาย formazan นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm แต่ละความเข้มข้นทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน % ที่เซลล์มีชีวิต (% Viable cells) คำนวณได้โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้ใส่สารสกัด

4.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์

หลังจากที่เซลล์ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 500 µg/mL นาน 24 ชั่วโมง นำไปถ่ายภาพผ่านกล้อง stereomicroscope เพื่อศึกษาผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์

4.5 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการใช้ออกซิเจนของเซลล์มะเร็ง

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์ HepG2 โดยการใช้ Clark oxygen electrode (Hansatech Oxygraph system) ทำได้โดยวัดปริมาณออกซิเจนที่ลดลงใน oxygraph chamber โดยเซลล์ HepG2 ($2x10^7$ cells/mL) สารอาหาร (substrate) ที่ให้พลังงานแก่เซลล์คือ glucose (2g/mL) รอจนอัตราการใช้ออกซิเจนคงที่จึงเติมสารสกัดแต่ละชนิดความเข้มข้น 500 µg/mL ในการศึกษานี้ใช้ carbonyl cyanide 3–chlorophenylhydrazone (CCCP) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็น mitochondrial uncoupler เป็น positive control อัตราการหายใจของเซลล์มีหน่วยเป็น nmol O/mL/min

บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1. ปริมาณ total phenolic content (TPC) ในสารสกัด

ปริมาณสารประกอบพวก phenolic พบได้อยู่ทั่วไปในพืชทุกชนิด มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับสารประกอบกลุ่มนี้ (Xin-hua et al., 2001) ดังนั้นปริมาณ TPC จึงค่อนข้างมีความสำคัญในการบ่งชี้เบื้องต้นถึงความสามารถในการออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระของพืชแบบหนึ่ง ในการศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจหาและเปรียบเทียบปริมาณ TPC ของสารสกัด ซึ่งพบว่าในสารสกัดจาก *P. virgatus* มีปริมาณ TPC สูงกว่า *P. urinaria* และ *P. amarus* แต่ 2 ชนิดหลังไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบ phenolic ที่อยู่ในสารสกัดลูกใต้ใบทั้ง 3 สปีชีส์

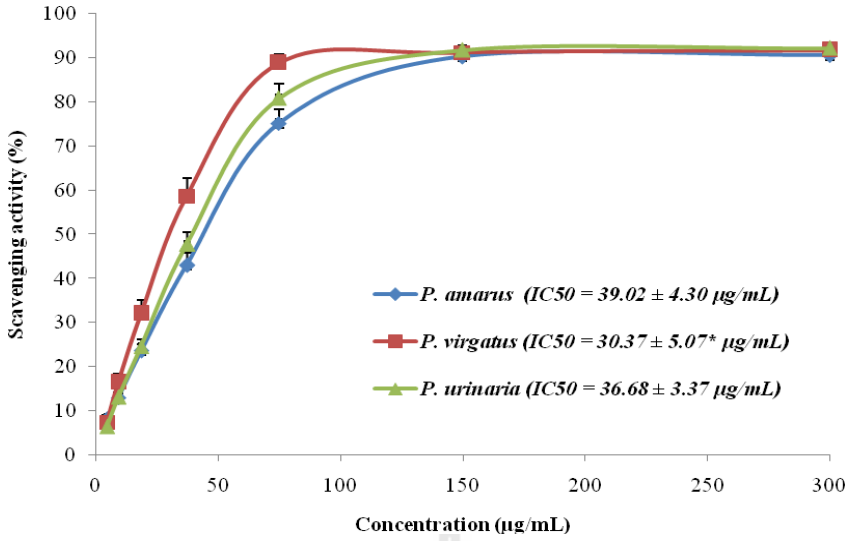
สารสกัด	Yield (%)	Total phenolic content (mg/g GAE)
P. amarus	6.48	34.2 ± 1.8
P. virgatus	8.50	43.6 ± 1.0*
P. urinaria	4.78	35.4 ± 2.7

* $P < 0.05$, ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่า mean ± S.E. (n=5)

3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดลูกใต้ใบ

3.2.1 DPPH free radical scavenging activity

ความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการกำจัด DPPH คือ 5 µg/mL และสูงสุดคือ 300.0 µg/mL ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 150 µg/mL ของสารสกัดทั้งสามทำให้เกิดการกำจัด DPPH สูงสุด คือประมาณ 90% (รูป 3.1) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ค่า IC_{50} หรือความเข้มข้นของสารสกัดที่กำจัด DPPH ได้ครึ่งหนึ่งของสารสกัด *P. virgatus* ต่ำที่สุดคือ 30.37 ± 5.07 µg/mL โดยต่ำว่าสารสกัด *P. urinaria* (36.68 ± 3.37 µg/mL) และ *P. amarus* (39.02 ± 4.30 µg/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ ascorbic acid มีฤทธิ์แรงที่สุด คำนวณได้ค่า IC_{50} = 25.02 ± 4.30 µg/mL



รูปที่ 3.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของลูกใต้ใบวัดด้วยวิธี DPPH radical scavenging พบว่า *P. virgatus* มีค่า IC_{50} น้อยที่สุด ซึ่งแตกต่างจากลูกใต้ใบชนิดอื่น * $P < 0.05$; n=5

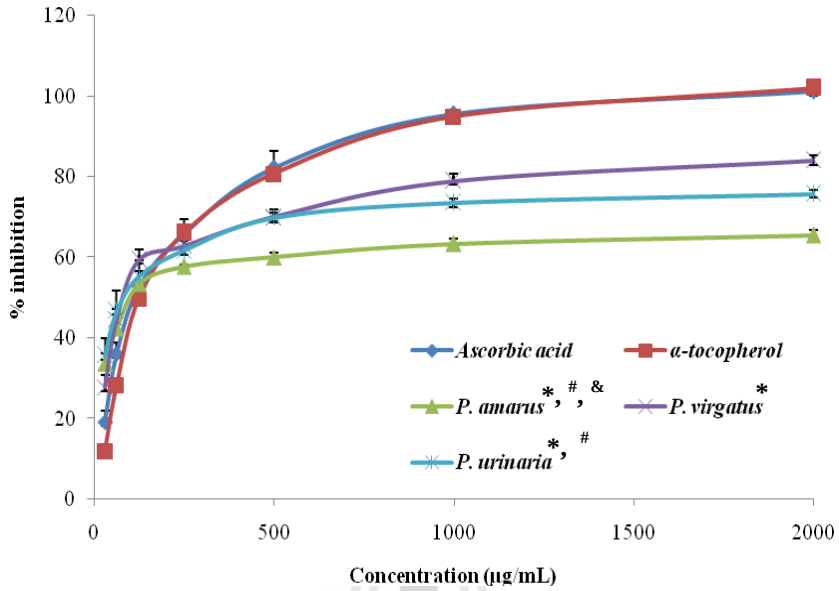
3.2.2 การยับยั้ง peroxide ที่เกิดจากปฏิกิริยา oxidation ของ linoleic acid โดยสารสกัดลูกใต้ใบ

จากการใช้ Ferric thiocyanate method ในการตรวจหาปริมาณ peroxide จากปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยผลการทดลองแสดงอยู่ในรูป 3.2 พบว่าสารสกัดจาก *P. virgatus* มีความสามารถในการยับยั้งการเกิด peroxide สูงสุดมีค่ามากกว่าสารสกัดจาก *P. urinaria* และ *P. amarus* ตามลำดับ และความสามารถในการยับยั้งการเกิด linoleic acid peroxidation สูงสุดของสารสกัดทั้งสามชนิดนั้นต่ำกว่า ascorbic acid และ α–tocopherol โดยเรียงลำดับได้ดังต่อไปนี้ คือ ascorbic acid (100.00 ± 0.40%) = α–tocopherol (100.00 ± 0.89%) > *P. virgatus* (83.98 ± 3.20%) > *P. urinaria* (75.77 ± 0.97%) > *P. amarus* (65.54 ± 3.10%) ดังสรุปไว้ในตารางที่ 2

3.3 ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดลูกใต้ใบ (Cytotoxic effects).

ความสามารถของสารสกัดลูกใต้ใบทั้งสามในการฆ่าเซลล์มะเร็งตับ HepG2 cell แสดงไว้ในรูป 3.3 โดยในรูป 3.3A ใช้วิธีย้อมด้วย trypan blue หรือเรียกว่า trypan blue exclusion ส่วนในรูปที่ 3.3B ใช้วิธี MTT assay ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งของสารสกัดขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด (dose dependent) และผลการทดลองที่ได้จากวิธีทั้งสองนั้นสอดคล้องกัน โดยพบว่าสารสกัดจาก *P. virgatus* มีความเป็นพิษต่อ HepG2 cell มากที่สุด พิจารณาได้จาก ค่า IC_{50} เรียงตามลำดับดังนี้ สารสกัด *P. virgatus* < *P. amarus* < *P. urinaria*

(ตารางที่ 3) สารละลาย 1% DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำลายละลายสารสกัดไม่มีผลต่อการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ linoleic acid ของสารสกัดลูกใต้ใบ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสารสกดัจากลูกใต้ใบต่างชนิดกัน โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด *P. virgatus* > *P. urinaria* > *P. amarus* ตามลำดับ

* $P < 0.05$ เทียบกับ positive control (ascorbic acid และ α–tocopheol); # $P < 0.05$ เทียบกับ *P. virgatus* และ & $P < 0.05$ เทียบกับ *P. urinaria.*

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน

Extract	DPPH radical scavenging (IC_{50}: µg/ml)	Maximum Inhibition of linoleic acid oxidation (%)
P. amarus	39.02 ± 4.30*	65.5 ± 1.4*
P. virgatus	30.37 ± 5.07*#&	84.0 ± 1.4*#&
P. urinaria	36.68 ± 3.37*	75.77 ± 1.0*#
Ascorbic acid	25.02 ± 4.30	100.00 ± 0.40
α–tocopherol	–	100.00 ± 0.89

* $P < 0.05$, เทียบกับ *Ascorbic acid*; # $P < 0.05$, เทียบกับ *P. amarus*;
& $P < 0.05$, เทียบกับ *P. urinaria*; ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่า mean ± S.E. (n=5)

3.4 ผลของสารสกัดจากลูกใต้ใบต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ HepG2

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 500 µg/mL แสดงไว้ในรูปที่ 3.4 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติซึ่งไม่ได้สารใดๆ (รูปที่ 3.4A) เซลล์ที่ปกติจะมีรูปร่างที่เรียกว่า epithelial–like feature แผ่เรียงต่อกันเป็นเซลล์ชั้นเดียวบนผิวของจานเลี้ยงเชื้อ (monolayer) ขณะที่เซลล์ที่ได้รับสารสกัดจะเปลี่ยนรูปร่างมีลักษณะกลมและไม่เกาะตัวต่อกับเซลล์ใกล้เคียง รวมทั้งหลุดออกจากผิวของจานเลี้ยงเชื้อ ในรูปที่ 3.4B พบว่า 0.5% DMSO ไม่มีผลต่อการเจริญและการตายของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

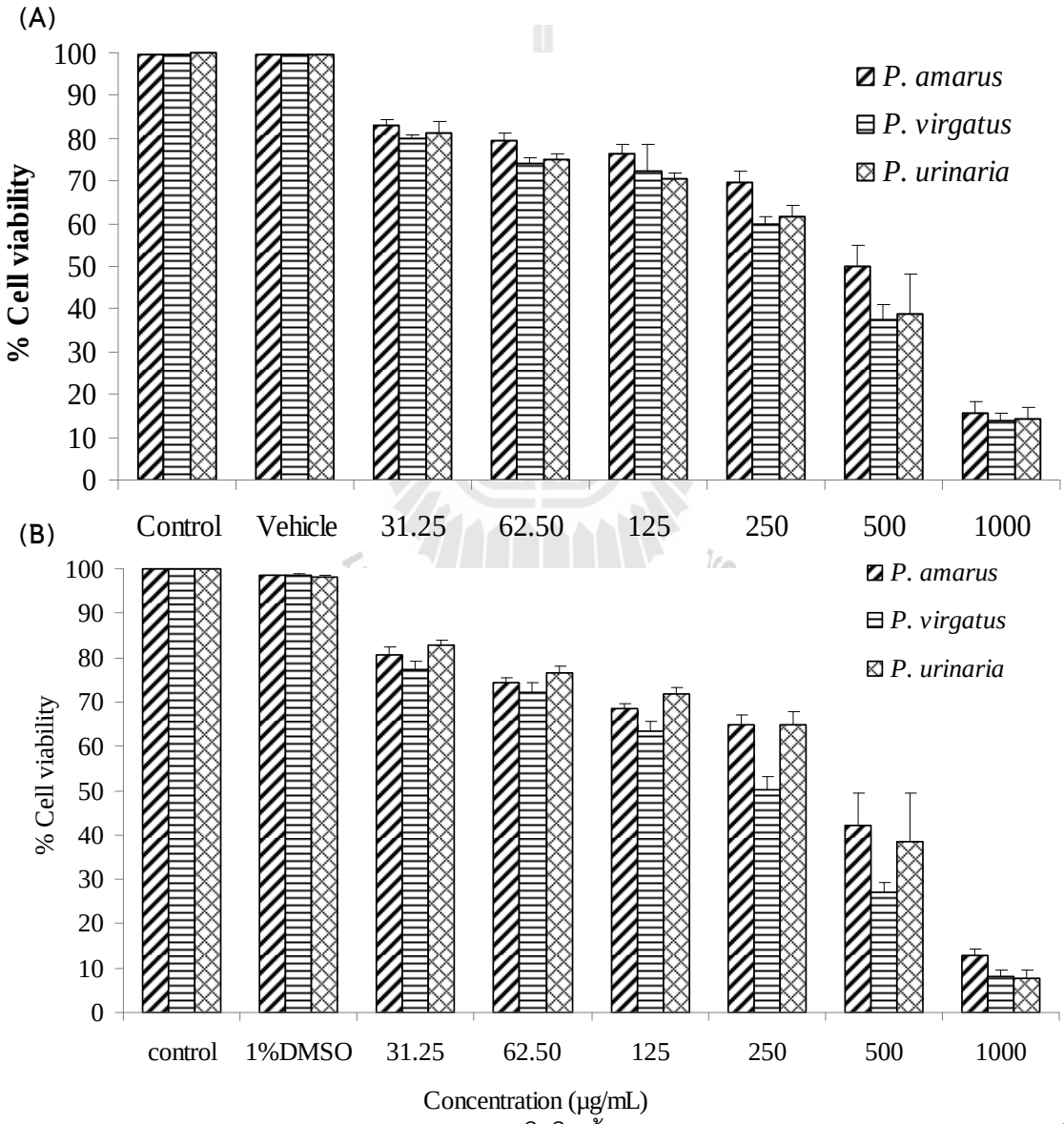


Figure 3.3 Concentration–response ของลูกใต้ใบทั้ง 3 ชนิดต่อการตายของ HepG2 cells วัดโดยวิธี (A) trypan blue exclusion และ (B) MTT assay

ตารางที่ 3 ค่า IC_{50} ของสารสกัดในการทำให้เซลล์ HepG2 ตาย

Extract	Inhibiting concentration (IC_{50}) (µg/mL)	
	Trypan Blue	MTT
P. amarus	514.15 ± 44.54	463.72 ± 68.24
P. virgatus	370.90 ± 21.11*	253.30 ± 18.89*
P. urinaria	431.14 ± 65.54	445.07 ± 62.19

* $P < 0.05$, เทียบกับสารสกัดชนิดอื่น ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่า mean ± S.E. (n=5)

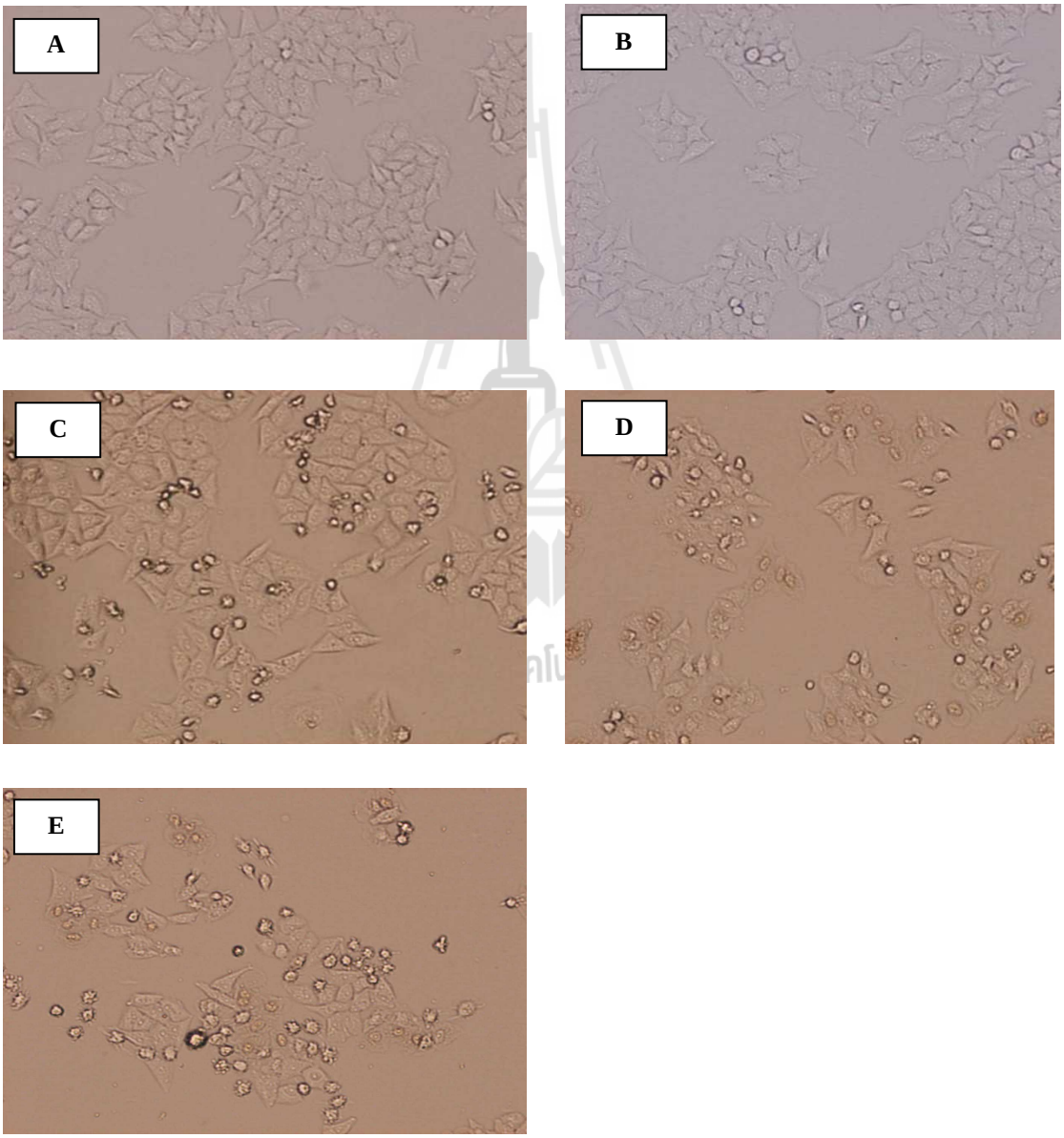


Figure 3.4 ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อรูปร่างของเซลล์ HepG2 (A) Control (B) Vehicle (0.5% DMSO) (C) *P. amarus* (500 µg/mL) (D) *P. virgatus* (500 µg/mL) (E) *P. urinaria* (500 µg/mL)

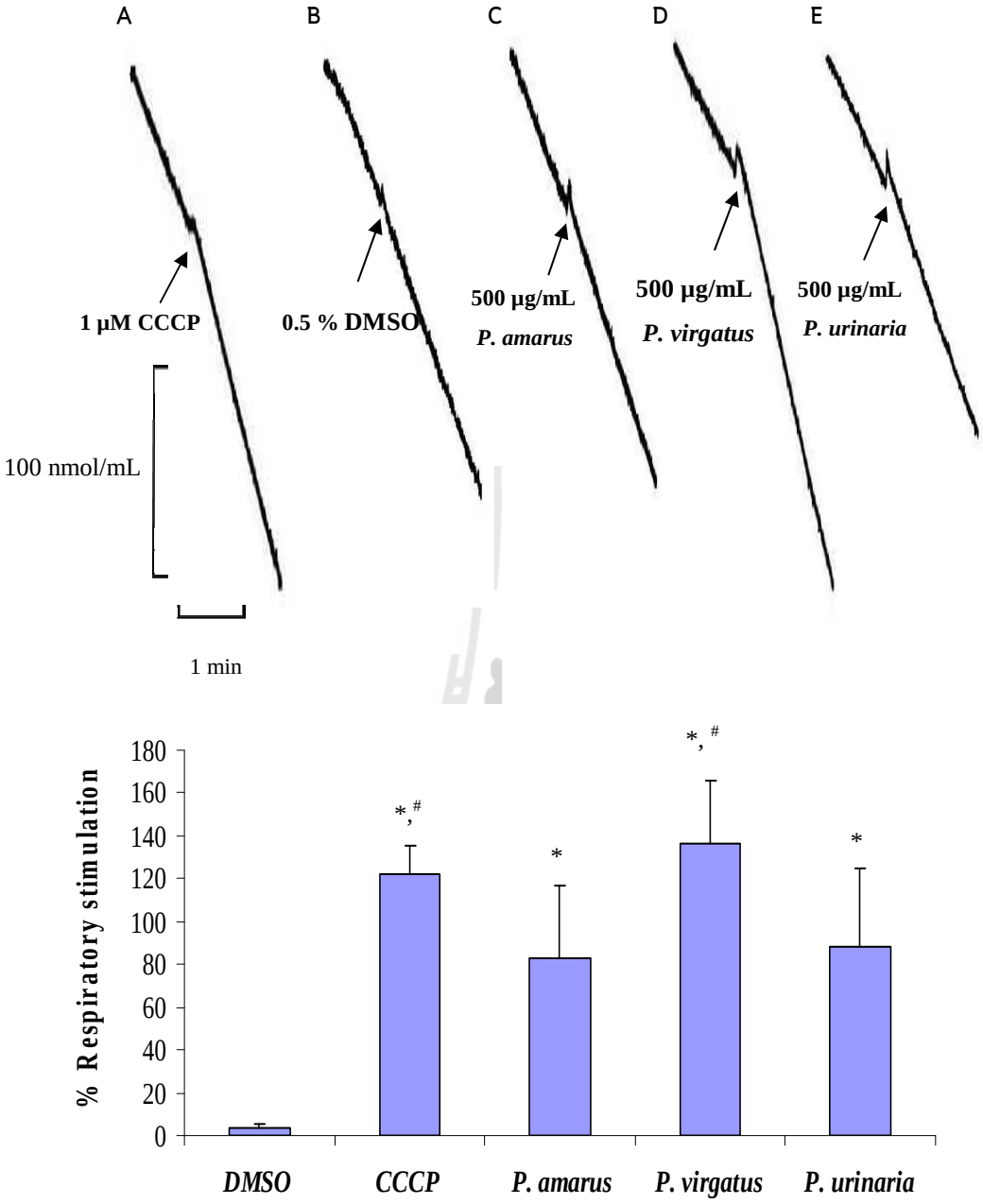


Figure 3.5 ผลของสารสกัดลูกใต้ใบในการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของเซลล์มะเร็ง HepG2 รูปบนเป็น tracing แสดงการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนหลังจากใส่สาร (ลูกศรชี้) ส่วนกราฟแท่งด้านล่างเป็นการสรุปผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการใช้ออกซิเจนของเซลล์ HepG2 จากการทดลองซ้ำ (n=3) โดยขนาดของสารสกัดที่ใช้คือ 500 µg/mL พบว่าสารสกัดจาก *P. virgatus* มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการหายใจของเซลล์มากที่สุดเทียบเท่ากับ CCCP ส่วนสารสกัดจาก *P. amarus และ P. urinaria* มีการกระตุ้นการใช้ออกออกซิเจนของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ DMSO แต่สองกลุ่มหลังนี้มีฤทธิ์แรงไม่แตกต่างกัน

*$P < 0.05$ เทียบกับ 0.5% DMSO, # $P < 0.05$ เทียบกับ *P. amarus* และ *P. urinaria*

3.5 ผลของสารสกัดลูกใต้ใบในการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของเซลล์มะเร็ง HepG2

อัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์ HepG2 ที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบแสดงอยู่ในรูปที่ 3.5 ผลการทดลองแสดงให้ว่าสารสกัดจาก *P. amarus* และ *P. urianaria* กระตุ้นการหายใจของเซลล์ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ว่าน้อยกว่าสารสกัดจาก *P. Virgatus* พบว่าสารสกัดจาก *P. virgatus* นั้นกระตุ้นการหายใจของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทำนองเดียวกับ CCCP 1 μM ซึ่งใช้เป็น positive control ขณะที่ 0.5 % DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายไม่ผลในการกระตุ้นการหายใจของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

พืชใน genus Phyllanthus (Family: Euphorbiaceae) (Jain et al., 2008) ประกอบด้วยพืชหลายสปีชีส์ พืชหลายชนิดใน genus นี้ได้แก่ *P. virgatus*, *P. amarus* และ *P. urinaria* มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก เนื่องจากมีผลห้อยอยู่ใต้ใบ ซึ่งนำไปสู่การเรียกชื่อสามัญที่เหมือนกันคือ ลูกใต้ใบ หรือหญ้าใต้ใบ ลูกใต้ใบถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรโดยประชาชนในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากลักษณะที่ใกล้เคียงกันดังที่กล่าวมาแล้วทำให้การเก็บพืชดังกล่าวมาทำยารักษาโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์ยาอาจมีการผสมระหว่างชนิดของพืช ถึงแม้ว่าสารประกอบทางเคมีของพืชเหล่านี้อาจจะคล้ายคลึงกันแต่ก็ยังมีข้อแตกต่าง ดังนั้นการไม่ระมัดระวังในการเก็บพืชที่ต้องการอาจทำให้ฤทธิ์ในการรักษาแต่ละครั้งแต่ต่างกันออกไปได้ ก่อนให้เกิดความไม่แน่นอนในการรักษา

มีนักวิจัยให้ความสำคัญในการศึกษาหาฤทธิ์ของลูกใต้ใบสปีชีส์ต่าง ๆ แต่พบว่าข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับ *P. virgatus* ค่อนข้างมีจำกัดเมื่อเทียบกับ *P. amarus* และ *P. urinaria* ในการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของลูกใต้ใบ *P. virgatus* ในแง่ของการเปรียบเทียบกับอีก 2 สปีชีส์ ว่ามีความเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร โดยขั้นแรกได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณสาร phenolic ที่เป็นส่วนประกอบทั่ว ๆ ไปของพืช ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของพืช รวมทั้งสามารถออกฤทธิ์เป็นต้านการอักเสบและโรคมะเร็งได้ (Han et al., 2007) จากผลการทดลองวัดปริมาณ total phenolics ในสารสกัดจากลูกใต้ใบทั้ง 3 ชนิด พบว่า *P. virgatus* มีปริมาณของ polyphenol มากที่สุด และผลการทดลองสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ซึ่งพบว่าสารสกัด *P. virgatus* มีฤทธิ์แรงที่สุด ด้วยค่า IC_{50} ในการทำลาย DPPH radical = 30.37 ± 5.07 µg/mL ซึ่งมากกว่า *P. urinaria* (36.68 ± 3.37µg/mL) และ *P. amarus* (39.02 ± 4.30 µg/mL) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ในการทำลาย DPPH radical ของสารสกัด *P. amarus* ซึ่งมีนักวิจัยคณะอื่นเคยทำมาแล้วพบว่าใครเคียงกันคือ ประมาณ 45 µg/mL (Wongnawa et al., 2006)

ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธีที่มีหลักการแตกต่างไปอีกวิธีหนึ่งคือการใช้ linoleic acid system เพื่อให้เกิดการสร้าง peroxyl radicals ขึ้นในระบบการเกิดอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้มีความใกล้เคียงกับปฏิกิริยาจริงในร่างกายมากกว่า (Siddhuraju and Becker, 2007) พบว่าสารสกัด *P. virgatus* สามารถป้องกันการเกิด hydroperoxide ได้มากกว่าสารสกัดจาก *P. amarus* และ *P. urinaria* ตามลำดับ อย่างไรก็ตามฤทธิ์ดังกล่าวของสารสกัดทุก

ชนิดมีฤทธิ์ต่ำกว่า ascorbic acid และ α–tocopherol คณะวิจัยที่มี Wongnawa เป็นหัวหน้าคณะ (2006) มีแนวคิดที่ว่าสารสกัดน้ำของ *P. amarus* ซึ่งมีความสามารถในการกำจัด DPPH radical ได้ค่อนข้างดี จึงได้นำไปทดลองฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายตับจากพิษของ paracetamol พบว่าได้ผลดี นอกจากนั้นยังมีผู้นำเอาสารสกัดน้ำจาก *P. amarus, P. virgatus* และ *P. uinaria* ไปใช้กับผู้ป่วยโรคตับและเบาหวาน (Ali et al., 2008) Kuo และคณะ (2005) ชี้แนะว่าสารประกอบในธรรมชาติสามารถที่จะป้องกันหรือเบาเทาโรคได้หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นสารประกอบในชาเขียว *Cirisium rhinoceros* Nakai, *Terminalia arjuna* Linn., *Euphorbia jolkini* Bioss, *Polygonum cuspidatums*, *Myrica rubra* Sieb et Zucc, *Centella asiatica*, *Bupleurum kaoi*, *Ochrosia elliptica* Labill, *Stephania tetrandra* และ *Rhei Rhizoma* สารประกอบในพืชหลายอย่างที่ถูกนำมาศึกษาและพบว่าสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ เช่น สารกลุ่ม flavonoid ที่มีชื่อว่า acacetin ใน *Cirisium rhinoceros* Nakai ไปยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากของคน 2 ชนิดคือ human prostate carcinoma LNCaP และ DU145 cells (Singh et al., 2005) หรือสารกลุ่ม tannin เช่น (–)–epigallo–catechin (EGC) ซึ่งเป็นสารประกอบชนิดหนึ่งในชาเขียวสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีชื่อว่า MCF–7 และ MDA–MB–231 (Vergote et al., 2002) ดังนั้นสารสกัดลูกใต้ใบอาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับได้เช่นกัน

ปัจจุบันยังมีประชากรจำนวนมากที่เข้าถึงยาแผนปัจจุบันได้ลำบาก พบว่ายาที่มาจากธรรมชาติมีส่วนสำคัญในการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ หลายโรครวมทั้งโรคมะเร็ง โรคมะเร็งกำลังเป็นโรคสำคัญที่ทำเกิดอัตราการตายอยู่ในระดับต้น ๆ ของทั้งประเทศที่พัฒนาแล้ว และประเทศกำลังพัฒนา มีรายงานว่าโรคมะเร็งตับจัดเป็นโรคที่เกิดบ่อยเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก (Roberts et al., 2005) สำหรับลูกใต้ใบนั้นมีรายงานฤทธิ์ในต้านมะเร็งอยู่หลายชนิด เช่น การให้สารสกัด *P. amarus* แก่หนูที่ถูกชักนำให้เกิดเนื้องอกที่ตับด้วยสาร *N*–nitrosodiethylamine ทำให้หนูมีชีวิตยาวขึ้น (Rajeshkumar and Kuttan, 2000) นอกจากนั้นสารสกัด *P. amarus* ยังไปทำให้เกิดการตายของเซลล์ human adenocarcinoma cell line Caco–2 (Lawson–Evi et al., 2008) หรือในการศึกษาสารสกัด *P. urinaria* ยังไปช่วยทำให้เซลล์ Lewis lung carcinoma เกิด apoptosis มากขึ้น แต่ไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ปกติ เช่น HUVECs และ WRL 68 cells ทำให้ค่อนข้างมั่นใจว่าสารสกัด *P. urinaria* น่าจะไปก่อให้เกิดการทำลายเซลล์มะเร็งได้มากกว่า (Huang et al., 2003)

ในการศึกษาวิจัยนี้จึงได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ด้วยวิธี MTT และ trypan blue assay ซึ่งพบว่าสารสกัดระหว่างความเข้มข้น (31.25–1,000 µg/mL) สามารถทำให้เซลล์ HepG2 hepatocellular carcinoma ตายได้ โดย *P. virgatus* มีฤทธิ์แรงที่สุดด้วยค่า IC50 ที่ต่ำกว่าสารสกัดจาก *P. urinaria* และ *P. amarus*

ผู้วิจัยได้พยายามหากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเพื่อใช้อธิบายความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 cell พบว่าเมื่อนำเซลล์มาวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์ พบว่าสารสกัดทั้งสามชนิดออกฤทธ์กระตุ้นการหายใจของเซลล์ โดยที่ความเข้มข้นที่ 500 µg/mL ที่เท่ากันนั้น *P. virgatus* ยังคงกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของเซลล์ได้มากที่สุด เทียบเท่ากับ CCCP ซึ่งเป็นสารที่ไปทำให้เกิด uncoupling ของ respiratory chain และ oxidative phosphorylation ใน mitochondria ส่งผลให้เกิดการเพิ่มการใช้ออกซิเจนโดยปราศจากการสร้าง ATP เนื่องจากการหายใจหรือ cellular respiration ของเซลล์เป็นตัวชี้วัดของกระบวนการ metabolism ดังนั้นอัตราการใช้ออกซิเจนจึงเป็นตัวบอกถึงกระบวนการ oxidative phosphorylation ของ mitochondria ดังนั้นผู้วิจัยเชื่อว่า ความเป็นพิษของสารสกัดลูกใต้นั้นน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของ mitochondria ประการใดประการหนึ่งซึ่งน่าจะได้ทำการศึกษาต่อไป เช่น การทดสอบฤทธิ์ต่อการใช้ออกซิเจนของ mitochondria การแยกออกจากเซลล์ เป็นต้น อย่างไรก็ตามเป็นการยากที่สรุปอย่างชัดเจนต่อกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ เนื่องจากสารสกัดหยาบมักจะมีส่วนประกอบที่เป็นสารเคมีมากมายหลายชนิด ฤทธิ์ที่เกิดขึ้นจากการทดสอบสารสกัดหยาบมักจะเป็นผลรวมของฤทธิ์จากสารเคมีเหล่านั้น สกัดออกมาทดสอบกับสารสกัด

โดยสรุป งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการตรวจสอบและเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดลูกใต้ใบ 3 สปีชีส์ คือ *P. virgatus, P. amarus* และ *P. urinaria* และพบว่า สารสกัดจาก *P. virgatus* มีส่วนประกอบที่เป็นสารประกอบ phenolic สูงที่สุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยสารสกัดทั้งสามชนิดสามารถทำให้เซลล์มะเร็งตับ HepG2 ตายได้ โดยกลไกการออกฤทธิ์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องคือการไปกระตุ้นการหายใจหรือการใช้ออกซิเจนของเซลล์ การเลือกใช้ลูกใต้ใบในการรักษาโรคควรต้องคำนึงถึงการเลือกเก็บให้ถูกชนิด จากการวิจัยนี้พบว่าลูกใต้ใบสปีชีส์ *P. virgatus* นั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งค่อนข้างสูง และยังไม่มีรายงานในเรื่องความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ต่างจาก *P. urinaria* ซึ่งมีข้อมูลเรื่องความเฉพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง ขณะที่ *P. amarus* นั้นก็มีรายงานการทดลองในมนุษย์แล้ว การเลือกเก็บลูกใต้ใบมาทำเป็นยารักษาโรคจึงควรต้องระมัดระวังไม่ให้เกิดการปนเปื้อนลูกใต้ใบชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน สุดท้ายผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการทำงานของ mitochondria เป็นงานที่น่าสนใจที่ควรจะศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Ahmad R, Ali AM, Israf DA, Ismail NH, Shaari K and Lajis NH (2005) Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some Hedyotis species. Life Sci. 76: 1953-1964.

Ahmed B, Al-Howiriny TA and Mathew R (2002) Antihepatotoxic activity of *Phyllanthus fraternus*. Pharmazie. 57: 855-856.

Ali SS, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava, H, Sahu A and Bora U (2008) Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. Food Res Int. 41: 1-15.

Han X, Shen T and Lou H (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. Int J Mol Sci. 8: 950-988.

Huang ST, Yang RC, Yang LJ, Lee PN and Pang JH (2003) Phyllanthus urinaria triggers the apoptosis and Bcl-2 down-regulation in Lewis lung carcinoma cells. Life Sci. 72: 1705-1716.

Jain N, Shasany AK, Singh S, Khanuja SP and Kumar S (2008) SCAR markers for correct identification of *Phyllanthus amarus*, *P. fraternus*, *P. debilis* and *P. urinaria* used in scientific investigations and dry leaf bulk herb trade. Planta Med. 74: 296-301.

Kassuya CA, Silvestre AA, Rehder VL, Calixto JB (2003) Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from Phyllanthus amarus in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. Eur J Pharmacol. 478:145-153.

Kiemer AK, Hartung T, Huber C and Vollmar AM (2003) *Phyllanthus amarus* has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-kappaB pathway. J Hepatol. 38: 289-297

Kulkarni AP, Policegoudra RS and Aradhya SM (2007) Chemical composition and antioxidant activity of sapota (*Achras sapota* Linn.) fruit. J. Food Biochem. 31: 399-414.

Kuo PL, Hsu, YL and Lin CC (2005) The chemopreventive effects of natural products against human cancer cells. Int J Appl Sci and Eng. 3: 203-214.

Lawson-Evi P, Eklu-Gadegbeku K, Agbonon A, Aklikokou K, Moukha S, Creppy EE and Gbeassor M (2008) Toxicological assessment on extracts of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn. Sci Res Essays. 3: 410-415.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 65: 55–63.

Notka F, Meier GR, Wagner R (2003) Inhibition of wild–type human immunodeficiency virus and reverse transcriptase inhibitor–resistant variants by Phyllanthus amarus. Antiviral Res. 58:175–186.

Rajeshkumar NV and Kuttan R (2000) *Phyllanthus amarus* extract administration increases the life span of rats with hepatocellular carcinoma. J Ethnopharmacol. 73: 215–219.

Rajeshkumar NV, Joy KL, Kuttan G, Ramsewak RS, Nair MG, Kuttan R (2002) Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. J Ethnopharmacol. 81:17–22.

Ram VJ (2001) Herbal preparations as a source of hepatoprotective agents. Drug News Perspect. 14: 353–363.

Raphael KR, Ajith TA, Joseph S and Kuttan R (2002) Anti–mutagenic activity of *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn *in vitro* as well as in vivo. Teratog Carcinog Mutagen. 22: 285–291.

Raphael KR, Kuttan R (2003) Inhibition of experimental gastric lesion and inflammation by Phyllanthus amarus extract. J Ethnopharmacol. 87:193–175.

Raphael KR, Sabu MC and Kuttan R (2002) Hypoglycemic effect of methanol extract of *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn on alloxan induced diabetes mellitus in rats and its relation with antioxidant potential. Indian J Exp Biol 40: 905–909.

Roberts LR and Gores GJ (2005) Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic Targets. Semin Liver Dis. 25: 212–351.

Siddhuraju P and Becker K (2007) The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. Food Chem 101: 10–19.

Singh RP, Agrawal P, Yim D, Agarwal C and Agarwal R (2005) Acacetin inhibits cell growth and cell cycle progression, and induces apoptosis in human prostate cancer cells: structure–activity relationship with linarin and linarin acetate. Carcinogenesis 26: 845–854.

Sripanidkulchai B, Tattawasart U, Laupatarakasem P, Vinitketkumneun U, Sripanidkulchai K, Furihata C and Matsushima T (2002) Antimutagenic and anticarcinogenic effects of *Phyllanthus amarus*. Phytomedicine 9: 26–32.

Vergote D, Cren-Olive C, Chopin V, Toillon RA, Rolando C, Hondermarck H and Bourhis XL (2002) (–)-Epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts. Breast Cancer Res Tr. 76: 195–201.

Wang M, Cheng H, Li Y, Meng L, Zhao G and Mai K (1995) Herbs of the genus *Phyllanthus* in the treatment of chronic hepatitis B: observations with three preparations from different geographic sites. J Lab Clin Med. 126: 350–352.

Wongnawa M, Thaina P, Bumrungwong N, Rattanapirum P, Nitiruangjaras A, Muso A and Prasartthong V (2006) The protective potential and possible mechanism of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. aqueous extract on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. Songklanakarin J Sci Tech. 28:551-561.

Xin-hua W, Chang-quing L, Xing-bo G and Lin-chun F (2001) A comparative study of *Phyllanthus amarus* compound and interferon in the treatment of chronic viral hepatitis B. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 32: 140–142.

Zhan Y, Dong CH, and Yao YJ (2006) Antioxidant activities of aqueous extract from cultivated fruit-bodies of *Cordyceps militaris* (L.) link in vitro. J Integr Plant Biol. 48: 1365–1370.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Original Paper

Medical Principles and Practice

Med Princ Pract
DOI: 10.1159/000331596

Received: November 10, 2010
Accepted: May 9, 2011
Published online: October 20, 2011

Comparison of the Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Phyllanthus virgatus* and *Phyllanthus amarus* Extracts

Kanchana Poompachee Nuannoi Chudapongse

School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

Key Words
Phyllanthus virgatus · *Phyllanthus amarus* · Antioxidant · HepG2 · Cytotoxicity · Oxygen consumption

Abstract
Objective: To determine the antioxidant activity and cytotoxicity of *Phyllanthus virgatus* crude extract compared to *Phyllanthus amarus*. ***Methods:*** Phenolic contents of the hydromethanolic extracts were measured using Folin-Ciocalteu reagent. Antioxidant activity was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate free radical scavenging and antilipid peroxidation assays. Cytotoxicity on human hepatoma HepG2 cells was assessed by trypan blue and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide viability assays. A stereomicroscope was used to observe and photograph the morphology of the cells. Oxygen consumption of the HepG2 cells was measured using a Clark oxygen electrode. ***Results:*** The extract of *P. virgatus,* which contained more phenolic compounds than *P. amarus* extract, had higher cytotoxicity and showed higher free radical scavenging activity and more inhibition of peroxidation in a linoleic acid system. *P. virgatus* extract conspicuously increased the oxygen consumption of HepG2 cells, while *P. amarus* extract had little stimulatory effect. ***Conclusion:*** The hydromethanolic extract of *P. virgatus* had stronger antioxidant and cytotoxic action than *P. amarus* extract. The stimulation of HepG2 cell respiration by *P. virgatus* extract suggests the extract alters mitochondrial function; this action could play a role in the cytotoxicity of this plant.

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

Introduction

Oxidative stress induced by oxygen radicals, causing damage to lipids, proteins and nucleic acid, has been shown to be involved in the initiation and progression of various diseases such as inflammation, liver injury, renal failure, cardiovascular diseases and cancer [1]. Several studies have revealed the potential of medicinal plants for serving as antioxidants against various diseases induced by oxidative radicals [2–4]. It is widely known that almost all chemotherapeutic agents currently used produce serious toxicities to several organs. Naturally occurring phenolic compounds of plants have been shown to have antioxidant properties [5–7] and to exhibit cytotoxic activity on a variety of cancer cell types, such as Jurkat and human hepatoma HepG2 cells, without toxicity to non-cancer cells [8]. Moreover, there is increasing evidence

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2011 S. Karger AG, Basel
1011–7571/11/0000–0000$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/mpp

Dr. Nuannoi Chudapongse
School of Biology, Institute of Science
Suranaree University of Technology
Nakhon Ratchasima 30000 (Thailand)
Tel. +66 4422 4620, E-Mail nuannoi@sut.ac.th

showing the chemopreventive potential of many plant compounds such as green and black tea polyphenols, lycopene, soy isoflavones, curcumin, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol and perillyl alcohol [9–11].

The genus *Phyllanthus* consists of several species in the family Euphorbiaceae. *Phyllanthus virgatus* and another two species, *P. amarus* and *P. urinaria,* are closely related in appearance and phytochemical structure [12]. In Thailand, they have the same local name (Look Tai Bai). All of them traditionally have been used for the treatment of many ailments such as gonorrhea, jaundice, diabetes and liver diseases [13]. The anticancer activity of *Phyllanthus* species has also been documented [14–19]. For example, *P. amarus* inhibits the growth of human adenocarcinoma cell line Caco-2 [14], hepatoma induced by *N*-nitrosodiethylamine in rats [15] and sarcoma induced by 20-methylcholanthrene in mice [16]. Similarly, *P. urinaria* has also been shown to possess cytotoxic activity against several cancer cell lines including human promyelocytic leukemia [17], Lewis lung carcinoma cells [18] and HepG2 cells [19]. However, the pharmacological studies on *P. virgatus* mostly involved its antimicrobial [20, 21] and antihyperglycemic effects [22]. Cytotoxicity of *P. virgatus* to cancer cells, particularly HepG2 cells, has never been reported. In this survey, we studied and compared the antioxidant and cytotoxic activities of the hydromethanolic extracts of *P. virgatus* and *P. amarus.* In addition, the effects of both extracts on HepG2 cell oxygen consumption were also investigated.

Materials and Methods

Plant Materials and Extraction

Plants were collected from June to September 2005 in the Pak Tong Chai and Mueang districts of Nakhon Ratchasima province, Thailand, and were identified by a botanist, Dr. Paul J. Grote, School of Biology, Suranaree University of Technology. Specimens of the plants are archived at the same School of Biology. Whole plants were thoroughly washed with distilled water to remove dirt and contaminants, and then oven-dried at 40°C. Each dried plant (10 g) was extracted twice with 100 ml of 50% methanol in distilled water. The pooled extracts were filtered and concentrated at 40°C using a rotary evaporator under low pressure. The residue was freeze-dried in a lyophilizer and stored at –20°C until used.

Measurement of Total Phenolic Compounds

The concentration of phenolic compounds in an extract was measured according to the method described previously [23], using gallic acid as a standard. The reaction mixture consisted of 250 μl of the extract (1 mg/ml) or standard (0.025–0.5 mg/ml gallic acid), and 2.5 ml of 2% Na_2CO_3 was added with 100 μl of 50% Folin-Ciocalteu reagent. After 30 min of incubation, the absorbance was measured at 750 nm using a spectrophotometer. Results were expressed as milligrams per gram of gallic acid equivalents.

Determination of Antioxidant Activity: DPPH Free Radical Scavenging Activity

To measure antioxidant activity, the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) radical scavenging assay was carried out according to the procedure previously described [8]. Briefly, each sample (500 μl; final concentration range: 0–300 μg/ml) was added to 4.0 ml of 50 μM DPPH in methanolic solution, and the final volume was adjusted to 5.0 ml with distilled water. After vortexing, the mixture was incubated for 30 min in the dark at room temperature. The decrease in absorbance at 517 nm was then measured using a spectrophotometer. Antioxidant activity was expressed as half maximal inhibitory concentration (IC_{50}), which was defined as the concentrations of the extracts required to inhibit the formation of DPPH radicals by 50%.

Determination of Antioxidant Activity: Inhibition of Linoleic Acid Oxidation

The antilipid peroxidation activity of the extracts was determined using the ferric thiocyanate method, as previously described [24]. Each sample (500 μl; final concentration range: 0–2,000 μg/ml) was mixed with 2.5 ml of linoleic acid emulsion (0.2 M, pH 7.0) and 2.0 ml of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.0). The linoleic acid emulsion was prepared by mixing 0.2804 g of linoleic acid with 0.2804 g of Tween 20 and 50 ml of phosphate buffer. The reaction mixture was incubated in the dark at 60°C for 8 h. An aliquot (0.1 ml) of the mixture was diluted with 4.5 ml of 75% ethanol, followed by the addition of 0.2 ml of 30% ammonium thiocyanate and 0.2 ml of 20 mM ferrous chloride in 3.5% HCl. Absorbance of the solution was measured at 500 nm using a spectrophotometer. The percentage of inhibition of lipid peroxidation in linoleic acid emulsion was calculated as follows:

$$\text{inhibition of lipid peroxidation (\%)} = (1 - A_1/A_0) \times 100\%,$$

where A_0 is the absorbance of the control, while A_1 is the absorbance in the presence of the extracts.

Cytotoxicity Studies

HepG2 cells (ATCC HB-8065; Manassas, Va., USA) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 U/ml antibiotic-antimycotic (Gibco, Langley, Okla., USA). The cells were grown at 37°C in a fully humidified atmosphere of air with 5% CO_2. The cells were used to determine the cytotoxicity of the extracts by trypan blue exclusion and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays [8].

Trypan Blue Exclusion Assay

Cells (5×10^5 cells/well) were plated in triplicate in a 96-well culture plate overnight. They were treated with various concentrations (ranging from 0 to 1,000 μg/ml) of the extracts for 24 h. Cells were harvested after digestion with 0.25% trypsin-EDTA solution at 37°C for 5 min. The cell suspension was mixed with an equal volume of 0.4% (w/v) trypan blue. The numbers of viable (unstained) and dead (stained) cells were counted by hemacytometer under a light microscope and the results calculated and expressed as the percentage of live cells compared to control.

Table 1. Comparison of total phenolic contents and antioxidant activity of *Phyllanthus* extracts

	Total phenolic contents, mg/g GAE	Scavenging of DPPH, IC_{50}, μg/ml	Inhibition of linoleic acid oxidation, %	
			250 μg/ml	2,000 μg/ml
P. virgatus	43.6 ± 1.0***	30.4 ± 5.1*	62.9 ± 3.1**	84.0 ± 3.2***
P. amarus	34.2 ± 1.8	39.0 ± 4.3	57.5 ± 1.1	65.5 ± 3.1

Values are means ± SD. GAE = Gallic acid equivalents. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n = 5.

MTT Assay

HepG2 cells (5×10^5 cells/well) were prepared as described above for the trypan blue exclusion assay and treated with each extract for 24 h. MTT solution (0.5 mg/ml) was added to each well and incubated for a further 4 h. The medium was removed and 100 μl of DMSO (99.9%) added to each well to dissolve purple crystals of formazan. Absorbance was measured with a spectrophotometer at a wavelength of 540 nm using a microplate reader (Biorad, USA). Data are expressed as percent cell viability compared to control.

Measurement of HepG2 Cell Oxygen Consumption

Rates of oxygen consumption by HepG2 cells were determined with a Clark oxygen electrode (Hansatech Oxygraph, King's Lynn, UK). HepG2 cells (2×10^7 cells/ml) were incubated in an oxygraph chamber. Glucose (2 mg/ml) was used as a substrate. After a stable rate of oxygen consumption, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), which is a well-known and potent mitochondrial uncoupler (as a positive control), or the extracts were added to the chamber. Respiratory rates were expressed as nanomoles of oxygen per milliliter per minute.

Statistical Analysis

Data are expressed as means ± SD, and the unpaired t test was used to compare phenolic content and antioxidant activity between *P. virgatus* and *P. amarus* groups. However, the data from cytotoxicity and oxygen consumption studies were not normally distributed. The data were expressed as medians with interquartile ranges. The Mann-Whitney U test was used to compare cytotoxicity (IC_{50}) between *P. virgatus* and *P. amarus* groups. Statistical differences between treated and control groups in the oxygen consumption study were determined using the Friedman repeated measures analysis of variance by ranks followed by the Student-Newman-Keuls method for multiple comparisons. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$ (n = 5 in each group for all experiments).

Results

Total Phenolic Content and Antioxidant Activity

The amounts of phenolic compounds in extracts as well as antioxidant activity are shown in table 1. *P. virgatus* extract contained more phenolic compounds than *P. amarus* extract. The former also showed significantly greater antioxidant capacity both in DPPH scavenging ($p < 0.05$) and inhibition of linoleic acid oxidation ($p < 0.01$). Significant differences in the inhibition of linoleic acid oxidation were found at concentrations of ≥250 μg/ml of the extracts, and the maximal inhibition rates of the *P. virgatus* and *P. amarus* extracts were about 84.0 and 65.5% ($p < 0.001$), respectively.

Cytotoxic Effect

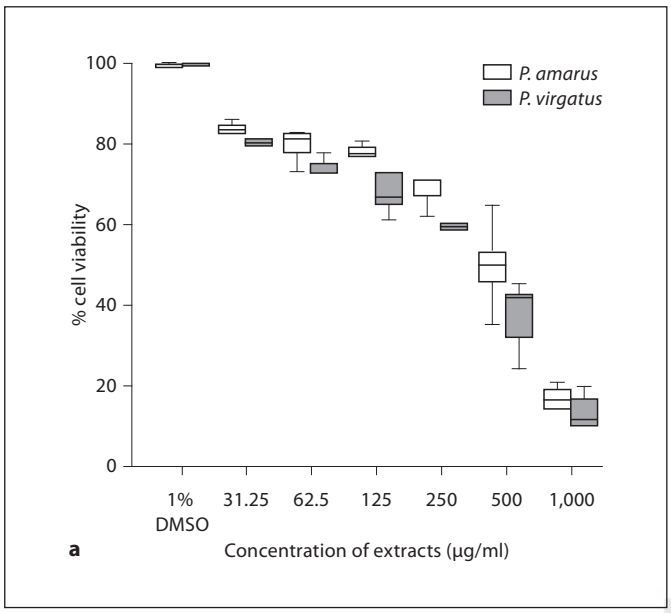
The cytotoxic activity of the extracts of *P. virgatus* and *P. amarus,* expressed as IC_{50} values, from the two assays was similar (fig. 1). The results showed that *P. virgatus* extract was more toxic to HepG2 cells than *P. amarus* extract. The IC_{50} of *P. amarus* and *P. virgatus* extracts calculated from trypan blue exclusion were 500 (424–604) and 380 (305–401) μg/ml, respectively (fig. 1a), whereas those calculated from MTT assays were 372 (336–593) and 258 (208–296) μg/ml, respectively (fig. 1b).

Effects of Phyllanthus *Extracts on Morphological Changes of HepG2 Cells*

Morphological features of cells treated with the extracts at 500 μg/ml were studied after 24 h of incubation (fig. 2). Normal cell morphology characterized by epithelial-like features forming a monolayer on the surface of the culture flask was seen in controls and cells treated with 1% DMSO. In the presence of the plant extracts, morphological changes were observed, such as rounding up, loss of contact with cells and detachment from the plate. *P. virgatus* extract caused more extensive morphological changes in HepG2 cells than *P. amarus.*

Effects of Phyllanthus *Extracts on Oxygen Consumption of HepG2 Cells*

The rate of oxygen consumption by HepG2 cells was measured in the presence of the extracts (fig. 3). It was found that *P. amarus* extract caused a small and statisti-



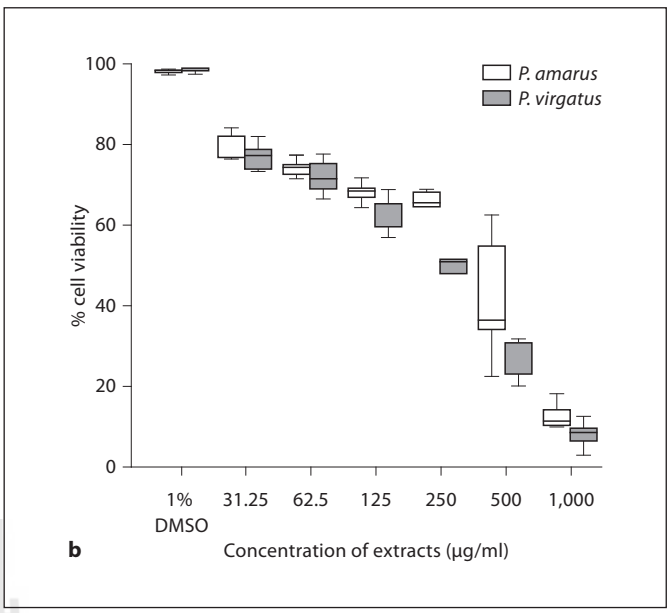


Fig. 1. Cytotoxic effects of *Phyllanthus* extracts. Cell viability was measured by two different methods. Values are expressed as medians with interquartile ranges in parentheses. The IC_{50} of *P. amarus* and *P. virgatus* measured by the trypan blue method (**a**) were 500 (424–604) and 380 (305–401) μg/ml, respectively ($p < 0.05$; n = 5). The IC_{50} of *P. amarus* and *P. virgatus* measured by MTT viability assays (**b**) were 372 (336–593) and 258 (208–296) μg/ml, respectively ($p < 0.05$; n = 5).

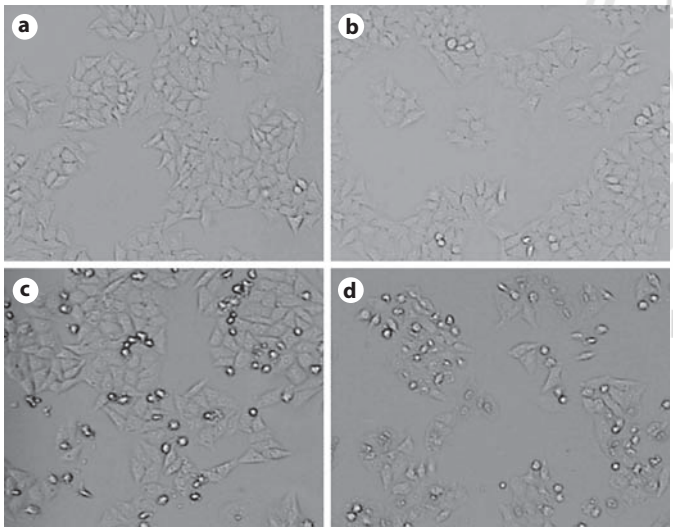


Fig. 2. Effects of *Phyllanthus* extracts on HepG2 morphology. Morphological features of cells treated with the extracts (500 μg/ml each) were observed under a microscope after 24 h of incubation. **a** Control. **b** 0.5% DMSO. **c** *P. amarus*. **d** *P. virgatus*.

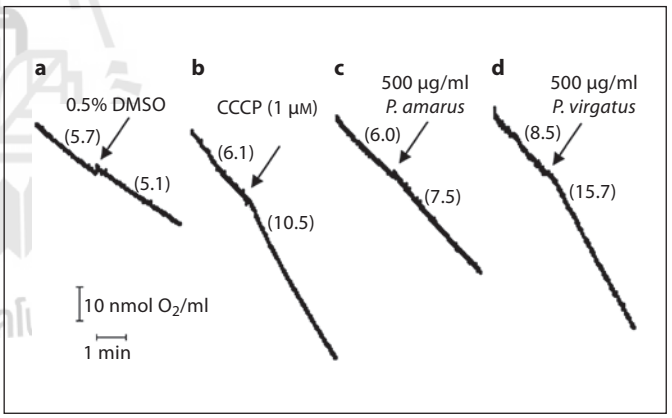


Fig. 3. Effects of *Phyllanthus* extracts on oxygen consumption of HepG2 cells. Tracings **a** and **b** show the effects of vehicle (0.5% DMSO) and CCCP (1 μM) as negative and positive controls, respectively. Tracings **c** and **d** show the effects of *P. amarus* and *P. virgatus* (500 μg/ml each), respectively. Arrows: time at which the vehicle, CCCP and the extracts were added. Numbers in parentheses: rates of oxygen consumption in nanomoles of oxygen per milliliter per minute. The tracings are representative of 5 experiments (n = 5). The respiration rates of HepG2 cells in the presence of *P. virgatus* extract [16.9 (13.3–20.7) nmol O_2/ml/min] and CCCP [9.8 (8.1–14.2) nmol O_2/ml/min], but not of *P. amarus* extract [7.5 (5.7–11.0) nmol O_2/ml/min], were significantly higher ($p < 0.05$) than that of the negative control [5.5 (4.2–8.2) nmol O_2/ml/min]. Data are presented as medians with interquartile ranges.

cally insignificant respiratory stimulation ($p > 0.05$), while *P. virgatus* extract clearly enhanced the respiration of HepG2 cells. This effect of *P. virgatus* extract was comparable to that produced by CCCP.

Discussion

The findings of a higher total phenolic content of *P. virgatus* extract from five separate plant collections and the stronger antioxidant activity of *P. virgatus* extract are comparable to those presented by Kumaran and Karunakaran [13], who have previously reported that the total phenolic content and antioxidant activity of five *Phyllanthus* species from India can be placed in the following order: *P. debilis* > *P. urinaria* > *P. virgatus* > *P. maderaspatensis* > *P. amarus*. *P. virgatus* extract also showed a stronger cytotoxic effect than *P. amarus*.

Experiments on the effect of *Phyllanthus* extracts on HepG2 cell respiration showed that at a concentration of 500 μg/ml, *P. virgatus* extract clearly stimulated oxygen consumption, whereas *P. amarus* extract produced but a small and insignificant increase in respiration. Since oxygen consumption by cells is mostly due to mitochondrial oxidative phosphorylation, changes in cellular respiration rate as a result of experimental treatment may indicate alterations in mitochondrial activity. This finding therefore suggests that *P. virgatus* extract affects mitochondrial function. The greater cytotoxic activity of *P. virgatus* extract compared to that of *P. amarus* may be related to a higher phenolic content since it has been reported that phenolic compounds could be cytotoxic [25].

The ability of the extracts to stimulate HepG2 cell oxygen consumption may be involved in cell death. Apoptosis signaling transduction can be induced through the death receptor pathway, such as the Fas ligand and Bcl-2 family, as well as through a mitochondrial pathway [26]. Mitochondrial dysfunction can cause a necrosis-type cell death via ATP depletion and Ca^{2+} dysregulation [27]. Further experiments are needed to determine whether dysregulation of mitochondrial respiration and function is caused by phenolic compounds and is thereby involved in the cytotoxicity of *Phyllanthus* extracts; these might include, for example, measurement of oxygen consumption and oxidative phosphorylation by isolated mitochondria treated with known phenolic compounds of these extracts.

Conclusion

The results of the present study demonstrate that the hydromethanolic extract of *P. virgatus* exerted greater antioxidant and cytotoxic effects on human hepatoma HepG2 cells than *P. amarus* extract. It also produced stronger stimulation of HepG2 cell respiration, which indicates the possibility of mitochondrial involvement in the cytotoxic action.

Acknowledgments

This study was supported by the National Research Council of Thailand. We thank Dr. Paul J. Grote for plant verification, and Ms. Matcha Kamkhunthod for her technical assistance.

References

1 Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B: Oxygen free radicals and human diseases. J R Soc Health 1991;111:172–177.

2 Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med 1996;21:933–956.

3 Sabu MC, Kuttan R: Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. J Ethnopharmacol 2002;81:155–160.

4 Vuillaume M: Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. Mutat Res 1987;186:43–72.

5 Sithisarn P, Supabphol R, Gritsanapan W: Comparison of free radical scavenging activity of Siamese neem tree (*Azadirachta indica* A Juss var *siamensis* Valeton) leaf extracts prepared by different methods of extraction. Med Princ Pract 2006;15:219–222.

6 Rao VS, Paiva LA, Souza MF, Campos AR, Ribeiro RA, Brito GA, Teixeira MJ, Silveira ER: A correlation between the antioxidant activity and total phenolic content has been observed. Planta Med 2003;69:851–853.

7 Sithisarn P, Jarikasem S: Antioxidant activity of *Acanthopanax trifoliatus*. Med Princ Pract 2009;18:393–398.

8 Rao YK, Geethangili M, Fang SH, Tzeng YM: Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: a comparative study. Food Chem Toxicol 2007;45:1770–1776.

9 Gann PH, Ma J, Giovannucci E, Willett W, Sacks FM, Hennekens CH, Stampfer MJ: Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. Cancer Res 1999;59:1225–1230.

10 Miller EC, Giovannucci E, Erdman JW Jr, Bahnson R, Schwartz SJ, Clinton SK: Tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. Urol Clin North Am 2002;29:83–93.

11 Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Malone WA, Boone CW, Kopelovich L, Hawk ET, Lieberman R, Lawrence JA, Ali I, Viner JL, Sigman CC: Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. J Nutr 2000; 130:467S–471S.

12 Chantaranothai P: *Phyllanthus;* in van Welzen PC, Chayamarit K (eds): Euphorbiaceae. Flora of Thailand. Bangkok, Royal Forest Department, 2005, vol 6, pp 473–507.
13 Kumaran A, Karunakaran RJ: In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. LWT 2007;40:344–352.
14 Lawson-Evi P, Eklu-Gadegbeku K, Agbonon A, Aklikokou K, Moukha S, Creppy EE, Gbeassor M: Toxicological assessment on extracts of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn. Sci Res Essay 2008;3:410–415.
15 Rajeshkumar NV, Kuttan R: *Phyllanthus amarus* extract administration increases the life span of rats with hepatocellular carcinoma. J Ethnopharmacol 2000;73:215–219.
16 Rajeshkumar NV, Joy KL, Kuttan G, Ramsewak RS, Nair MG, Kuttan R: Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. J Ethnopharmacol 2002;81:17–22.
17 Huang ST, Yang RC, Chena MY, Pang JHS: *Phyllanthus urinaria* induces the Fas receptor/ligand expression and ceramide-mediated apoptosis in HL-60 cells. Life Sci 2004;75:339–351.
18 Huang ST, Yang RC, Yang LJ, Lee PN, Pang JHS: *Phyllanthus urinaria* triggers the apoptosis and Bcl-2 down-regulation in Lewis lung carcinoma cells. Life Sci 2003;72:1705–1716.
19 Sureban SM, Subramaniam D, Paramasivam R, Ramanujam RP, Dieckgraefe BK, Houchen CW, Anant S: Therapeutic effects of *Phyllanthus* species: induction of TNF-α-mediated apoptosis in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. Am J Pharmacol Toxicol 2006;1:65–71.
20 Maruyama M, Yamauchi S, Akiyama K, Sugahara T, Kishida T, Koba Y: Antibacterial activity of a virgatusin-related compound. Biosci Biotechnol Biochem 2007;71:677–680.
21 Akiyama K, Yamauchi S, Nakato T, Maruyama M, Sugahara T, Kishida T: Antifungal activity of tetra-substituted tetrahydrofuran lignan, (–)-virgatusin, and its structure-activity relationship. Biosci Biotechnol Biochem 2007;71:1028–1035.
22 Shabeer J, Srivastava RS, Singh SK: Antidiabetic and antioxidant effect of various fractions of *Phyllanthus simplex* in alloxan diabetic rats. J Ethnopharmacol 2009;124:34–38.
23 Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J Agric Food Chem 1999;47:3954–3962.
24 Zhan Y, Dong CH, Yao YJ: Antioxidant activities of aqueous extract from cultivated fruit-bodies of *Cordyceps militaris* (L) link in vitro. J Integr Plant Biol 2006;48:1365–1370.
25 Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaité E, Segura-Aguilar J: Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. Free Radic Biol Med 1999;26:107–116.
26 Nagata S: Apoptosis by death factor. Cell 1997;88:355–365.
27 Bernardi P, Petronilli V, di Lisa F, Forte M: A mitochondrial perspective on cell death. Trends Biochem Sci 2001;26:112–117.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี