



## รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและต้านการเจริญเซลล์มะเร็งของแมงลักคา

**Antioxidant Activities and Anti-cancer Cell Proliferation of Mintweed**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัย

# ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและต้านการเจริญเซลล์มะเร็งของแมงลักคา Antioxidant Activities and Anti-cancer Cell Proliferation of Mintweed

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์. ดร. กรรข อินทราพิเชฐ

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2552

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2548

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2548

ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีเพื่อนร่วมงาน และ ขอขอบคุณเป็นพิเศษสำหรับ  
นางสาวสุมาลี มุสิกกา ผู้ช่วยวิจัยที่ได้ช่วยงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงอย่างดียิ่ง



## บทคัดย่อ

แมงลักคาหรือกระเพราผี (*Hyptis suaveolens*) เป็นวัชพืชที่เจริญแพร่หลายตามข้างถนนและไร่อะไรทั่วไป ในภูมิภาคนี้พบในบ้านมีการใช้แมงลักคา รักษาโรคหลายอาการ จึงเป็นพืชที่น่าสนใจนำมาศึกษาวิจัยในระดับเซลล์เพื่อนำไปพัฒนาใช้ประโยชน์ต่อไป วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาหาสารทุติยภูมิและคุณสมบัติทางชีววิทยาของสารสกัดแมงลักคาต่อระดับเซลล์และระดับโมเลกุลในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ของคน การทดลองประกอบด้วย

- 1) วิเคราะห์หาสารทุติยภูมิในสารสกัดใบและเมล็ด
- 2) วัดปริมาณ total phenolic compounds และ total flavonoid content ในสารสกัด
- 3) วิเคราะห์คุณสมบัติ antioxidant activity ของสารสกัด
- 4) วิเคราะห์หาคุณสมบัติ cytotoxicity ของสารสกัด
- 5) วิเคราะห์ฤทธิ์ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งสายพันธุ์
- 6) วิเคราะห์ฤทธิ์ต่อวัฏจักรเซลล์และปัจจัยควบคุมวัฏจักรเซลล์
- 7) วิเคราะห์ฤทธิ์การชักนำให้เกิดการตายแบบฆ่าตัวตาย (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์

### สารทุติยภูมิ คุณสมบัติ antioxidant และ cytotoxicity ของสารสกัดแมงลักคา

สารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคาซึ่งสกัดด้วย ethanol และด้วยน้ำ แยกวิเคราะห์ด้วย Thin layer chromatography (TLC) และ specific reagent testing สารสกัดใบ MLEs และสารสกัดเมล็ด MSEs มี phenolics, terpenoids, และ essential oils ยกเว้น MSE/w มี saponins โดยเฉพาะในสารสกัดเมล็ด สารสกัดทุกชนิดมีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidant

สารสกัดใบแมงลักคา มี total phenolic compounds (TPC) และ total flavonoids (TF) มากกว่าสารสกัดจากเมล็ด MLEs มี TPC  $319.45 \pm 8.67 - 370.07 \pm 7.10$  mg GAE/g dried extract มี TF  $240.81 \pm 5.01 - 278.81 \pm 3.40$  mg CAE/g dried extract; MSEs มี TPC  $77.02 \pm 2.05 - 135.92 \pm 2.17$  mg GAE/g dried extract มี TF  $15.38 \pm 0.21 - 86.28 \pm 0.67$  mg CAE/g dried extract

Antioxidant activity ของสารสกัดแมงลักคา วิเคราะห์โดย free radical scavenging DPPH และ ferric reducing ability power (FRAP) สารสกัด MLEs มี activity สูงกว่าสารสกัด MSEs โดย MLEs มี DPPH activity,  $IC_{50} 9.26 \pm 0.08 - 10.89 \pm 0.70$  ug/ml และมี FRAP  $6.27 \pm 0.03 - 8.52 \pm 0.44$  uM FeSO<sub>4</sub>/mg และ MSEs มี DPPH activity,  $IC_{50} 32.85 \pm 0.05 - 147.17 \pm 1.67$  ug/ml และมี FRAP  $2.01 \pm 0.35 - 1.36 \pm 0.00$  uM FeSO<sub>4</sub>/mg คุณสมบัติ antioxidant activity ของสารสกัดแมงลักคาสอดคล้องกับปริมาณ TPC และ TF ที่มีในสารสกัด

สารสกัดแมงลักคาทั้งหมดไม่มีพิษระดับเซลล์ต่อถุงฟอยและเซลล์ปกติโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ซึ่งมี  $LC_{50}$  13.77 ug/ml ในขณะที่ Cytotoxicity,  $LC_{50}$  ของ MLE/e 360.48 ug/ml; ของ MLE/w 1,282.47 ug/ml; ของ MSE/e 708.26 ug/ml และ ของ MSE/w 470.60 ug/ml

### อิทธิพลของสารสกัดแมงลักคาต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ วัฏจักรเซลล์ และการตายของเซลล์

วิเคราะห์ cell proliferation ด้วย AlamarBlue (AB) assay พบว่าสารสกัดแมงลักคา MLE/e เพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs),  $IC_{50}$  24 ชม  $1,356.17 \pm 136.78$  ug/ml ในทางตรงข้ามสารสกัดยับยั้ง proliferation ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์ Jurkat human T leukemia cells ทั้งนี้ MLEs แสดง antiproliferative effect สูงกว่า MSEs ฤทธิ์ของสารสกัดทั้งหมดต่อ Jurkat cells และเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้น (dose-dependent manner) เรียงประสิทธิภาพจาก  $IC_{50}$  ที่ 24 ชม ดังนี้ MLE/e ( $553.52 \pm 14.07$  ug/ml) > MLE/w ( $912.06 \pm 16.86$  ug/ml) > MSE/e ( $2,385.95 \pm 81.28$  ug/ml) > MSE/w ( $5,813.45 \pm 111.25$  ug/ml) นั่นคือสารสกัดเมล็ดทั้ง MSE/e และ MSE/w ไม่แสดง antiproliferation ต่อ Jurkat cells เมื่อเลือกเฉพาะ MLE/e ทดลองกับเซลล์มะเร็งซึ่งแนบติดงานเลี้ยง 3 สายพันธุ์ MLE/e ยับยั้ง proliferation แบบ dose-dependent manner MLE/e ยับยั้ง proliferation ของ MCF7 human breast cancer cells ด้วย  $IC_{50}$   $763.12 \pm 9.51$  ug/ml และของ HepG2 human hepatocellular carcinoma cells ด้วย  $IC_{50}$ ,  $866.06 \pm 16.44$  ug/ml แต่ MLE/e ไม่ลดจำนวนเซลล์ PC3 human prostate cancer cells,  $IC_{50}$ ,  $1,636.16 \pm 152.90$  ug/ml

วิเคราะห์การหยุดของวัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest) ด้วยการแยกเซลล์ระยะต่างๆ ในวัฏจักร โดย Flow cytometer สารสกัดใบแมงลักคา, MLEs หยุด cell cycle ของ Jurkat cells ที่ระยะ G1 ทำให้เซลล์สะสมอยู่ที่ Sub G1 และสะสมเพิ่มขึ้นแบบ dose- and time-dependent manner สารสกัด MLE/e ที่ความเข้มข้น 400, 600, และ 800 ug/ml, 24 h ทำให้เซลล์สะสมใน Sub G1 1.07%, 8.01%, 27.29% และ 63.10% ตามลำดับ MLE/w ต้องการความเข้มข้นสูงกว่าจึงแสดงฤทธิ์ MLE/w ที่ 800, 1,000 และ 1,200 ug/ml มีเซลล์สะสมที่ Sub G1 1.23%, 4.33%, 10.23% และ 22.38% ตามลำดับ จึงเลือกที่ความเข้มข้น 600 ug/ml MLE/e บ่มกับ Jurkat cells ระหว่าง 0, 6, 12, และ 24 ชม เซลล์สะสมที่ Sub G1 1.24%, 4.87%, 22.13% และ 28.06% ตามลำดับ และ 1,000 ug/ml MLE/w ทำให้เซลล์สะสมเพียง 1.70%, 1.92%, 4.12%, และ 10.11% ตามลำดับ ส่วน MSEs ไม่มีผลต่อ cell cycle arrest ของ Jurkat cells ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับผลของ cell proliferation ข้างต้น

เลือกเฉพาะ MLE/e ที่ 400 ug/ml และ 600 ug/ml บ่มกับ Jurkat cells นาน 0, 1.5, 3, และ 6 ชม วิเคราะห์ protein lysate ด้วย SDS-PAGE และ Western blotting พบว่า MLE/e ที่ 600 ug/ml ชักนำ deregulation ของ Jurkat cell cycle factor แบบ dose- and time-dependent manner โดยทำให้ Cyclin D1 เริ่มลดลงที่ 1.5 ชม Cyclin E เริ่มลดลงที่ 3 ชม CDK4 ลดลงที่ 6 ชม CDK2 ไม่ปรากฏ expression ตั้งแต่ 1.5 ชม deregulation ของ proteins เหล่านี้สอดคล้องกับผลของ MLE/e ต่อ cell cycle arrest

MLE/e ชักนำ Jurkat cells ให้เกิด apoptosis ตรวจวิเคราะห์โดยการย้อมเซลล์ด้วย Annexin V/propidium iodide และแยกด้วย flow cytometer เมื่อบ่มสารสกัดที่ความเข้มข้น 400, 600 และ 800 ug/ml กับเซลล์นาน 24 ชม ชักนำ apoptosis ทั้งหมด 32.00%, 73.97% และ 93.27% ตามลำดับ เมื่อเลือก MLE/e ที่ 600 ug/ml บ่มกับ cells นาน 0, 6, 12 และ 24 ชม ชักนำ apoptosis ทั้งหมด 17.55%, 25.28% และ 74.00% ตามลำดับ ฤทธิ์ของ MLE/e ชักนำ apoptosis แบบ dose-and time-dependent manner

ดังนั้น แมงลักคามีสาร phenolics, flavonoids และ essential oils ที่มีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidants ไม่มี cytotoxicity เซลล์ปกติ สารสกัดเพิ่มจำนวนเซลล์ปกติ แต่สารสกัดใบมีศักยภาพยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ Jurkat, MCF7 และ HepG2 โดยเฉพาะ MLE/e หยุดวัฏจักรเซลล์ของ Jurkat cells ที่ระยะ G1 ลดปริมาณ CDK2, CDK4, Cycle D1 และ Cycle E และชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis แมงลักคาจึงเป็นพืชหนึ่งที่มีศักยภาพสูงที่จะวิจัยและพัฒนาเพิ่มเติมอีกหลายประเด็นรวมทั้งการทดลองทางคลินิกเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเภสัชในการป้องกันและเป็นยารักษาต่อเนื่องต่อไปได้

## Abstract

Mintweed (Maenglak-kha / Kraproawphee) (*Hyptis suaveolens*) is a weed that grows widely along road sides and farms. It is traditionally used to cure many symptoms. It is an interesting plant to be studied at cellular level for further applications. The purposes of this research were to determine secondary metabolites and biological properties at cellular and molecular levels in its extracts in normal and cancer cell lines. The studies were performed as followings.

- 1) Analyzing secondary metabolites in leaf and seed extracts
- 2) Measuring total phenolic compounds and total flavonoid content in the extracts
- 3) Analyzing antioxidant activities of the extracts
- 4) Analyzing cytotoxicity of the extracts
- 5) Analyzing the proliferative effect on normal cells and cancer cell lines
- 6) Analyzing the cell cycle effect and its control factors
- 7) Analyzing the apoptotic induction on cancer cell lines

### Secondary metabolites, antioxidant property and cytotoxicity of the mintweed extracts

Ethanol and water extracts of leaves and seeds of mintweed were separated and analyzed by thin layer chromatography (TLC) and specific reagent testing. The leaf extracts, MLEs and the seed extracts, MSEs possessed phenolics, terpenoids and essential oils, except in MSE/w. There is saponins only in the seed extracts. All extracts have antioxidant property.

The mintweed leaf extracts contained more total phenolic compounds (TPC) and total flavonoid (TF) content than those of the seed extracts. MLEs had TPC  $319.45 \pm 8.67 - 370.07 \pm 7.10$  mg GAE/g dried extract and TF  $240.81 \pm 5.01 - 278.81 \pm 3.40$  mg CAE/g dried extract. MSEs had TPC  $77.02 \pm 2.05 - 135.92 \pm 2.17$  mg GAE/g dried extract and TF  $15.38 \pm 0.21 - 86.28 \pm 0.67$  mg CAE/g dried extract.

Antioxidant activity of the mintweed extracts were analyzed by free radical scavenging DPPD and ferric reduction ability power (FRAP). MLEs possessed DPPH activity,  $IC_{50} 9.26 \pm 0.08 - 10.89 \pm 0.70$  ug/ml and FRAP  $6.27 \pm 0.03 - 8.52 \pm 0.44$  uM FeSO<sub>4</sub>/mg. MSEs contained DPPH activity,  $IC_{50} 32.85 \pm 0.05 - 147.17 \pm 1.67$  ug/ml and FRAP  $2.01 \pm 0.35 - 1.36 \pm 0.00$  uM FeSO<sub>4</sub>/mg. The antioxidant activities of the extracts were agreed with the amounts of TPC and TF.

All extracts did not express cytotoxicity on brine shrimp and normal cells as compared to ascorbic acid standard with  $LC_{50}$  of was 13.77 ug/ml. The cytotoxicity, the  $LC_{50}$  of MLEs was 360.48 ug/ml; of MLE/w was 1,282.47 ug/ml; of MSE/e was 708.26 ug/ml; and of MSE/w was 470.60 ug/ml.

### **Effect of mintweed extracts on cell proliferation, cell cycle and apoptosis**

Cell proliferation was analyzed by AlamarBlue (AB) assay. It appeared that MLE/e enhanced the proliferation of normal white blood cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), with  $IC_{50}$  at 24 h of  $1,356.17 \pm 136.78$  ug/ml. On the contrary, mintweed extracts against the proliferation of Jurkat human T leukemia cells by which the MLEs was higher than MLE/w. Their effects were dose-dependent manner. Their  $IC_{50}$ , 24 h, was orderly arranged as MLE/e ( $553.52 \pm 14.07$   $\mu$ g/ml) > MLE/w ( $912.06 \pm 16.86$   $\mu$ g/ml) > MSE/e ( $2,385.95 \pm 81.28$   $\mu$ g/ml) > MSE/w ( $5,813.45 \pm 111.25$   $\mu$ g/ml). MLE/e was selected to be tested with 3-surface attach cell lines, MLE/e reduced these cell lines as dose-dependent manner. It reduced proliferation of MCF7 human breast cancer cells with  $IC_{50}$ , of  $763.12 \pm 9.51$   $\mu$ g/ml and of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells with  $IC_{50}$ , of  $866.06 \pm 16.44$   $\mu$ g/ml. However, MLE/e did not reduce the proliferation of PC3, its  $IC_{50}$ , was  $1,636.16 \pm 152.90$   $\mu$ g/ml.

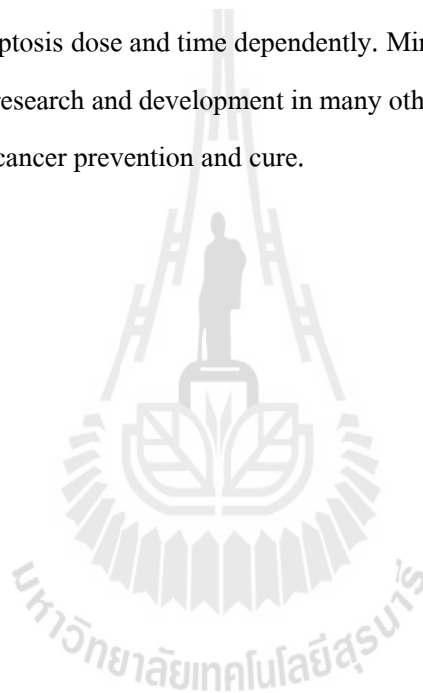
Cell cycle arrest was analyzed by separation of cells at different phases of cell cycle through flow cytometer. MLEs arrested Jurkat cell cycle at G1 phase causing the cells accumulated in sub G1 in dose- and time-dependent manner. MLE/e at 400, 600, 800 ug/ml, 24 h induced cell accumulation in Sub G1 1.07%, 8.01%, 27.29% and 63.10% respectively. MLE/w needed higher amount of the extracts to express their effects. MLE/w at 800, 1,000, 1,200 ug/ml caused cell accumulation at Sub G1 1.23%, 4.33%, 10.23% and 22.38% respectively. MLE/e at 600 ug/ml was selected to treat Jurkat cells for 0, 6, 12 and 24 h, these caused the cells accumulated in Sub G1 1.24%, 4.87%, 22.13% and 28.06% respectively. MLE/w at 1,000 ug/ml made low cell accumulation, only 1.70%, 1.92%, 4.12%, and 10.11% respectively. While MSEs did not exert their effects on Jurkat cell cycle arrest. This result was correlated to the results of cell proliferation above.

MLE/e was chosen at 400 ug/ml and 600 ug/ml to treat Jurkat cells for 0, 1.5, 3, and 6 h. The protein lysates were separated by SDS-PAGE and Western blotting. MLE/e at 600 ug/ml induced deregulation of Jurkat cell cycle factor dose and time dependently. Cyclin D1 began to decline at 1.5 h, Cyclin E at 3 h, and CDK4 at 6 h. CDK2 did not express from 1.5 h of treatment on ward. The deregulation effect on cell cycle factors of MLE/e agreed with its effect on cell cycle arrest.



Cell apoptosis was analyzed by Annexin V/propidium iodide staining and flow cytometry. MLE/e at 400, 600 and 800 ug/ml incubated with Jurkat cells for 24 h were able to induce apoptosis 32.00%, 73.97% and 93.27% respectively. Selected MLE/e at 600 ug/ml treated the cells for 0, 6, 12 and 24 h was able to induce total apoptotic cells 17.55%, 25.28% and 74.00% respectively. Thus MLE/e induced Jurkat cell apoptosis in dose- and time dependent manners.

In summary, mintweed extracts contained phenolics, flavonoids and essential oils with antioxidant property, without cytotoxicity but enhanced proliferation of normal cells. The leaf extracts possessed potential against cell proliferation of Jurkat, MCF7, and HepG2 cancer cell lines. Selectively, MLE/e arrested Jurkat cell cycle at G1 phase; deregulated CDK2, CDK4, Cyclin D1, and Cyclin E; and induced cell apoptosis dose and time dependently. Mintweed is therefore a weed plant with high potential for further research and development in many other aspects including clinical and pharmaceutical researches for cancer prevention and cure.



# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย) .....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) .....	ง
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง .....	ญ
สารบัญภาพ .....	ฉ
<b>บทที่</b>	
1 บทนำ .....	1
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย .....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย .....	3
1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ .....	3
1.5 ประโยชน์ของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ .....	3
เอกสารอ้างอิง .....	4
2 ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	5
2.1 คำนำ .....	5
2.2 อนุกรมวิธานของแมงลักคา .....	7
2.3 สารต้านออกซิเดชัน (Antioxidants) จากพืช .....	8
2.4 สารต้านการเจริญของเซลล์ (Antiproliferation) จากพืช .....	9
เอกสารอ้างอิง .....	10
3 พฤกษาศาสตร์ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และ ความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิต .....	15
3.1 คำนำ .....	15
3.2 วัตถุประสงค์ .....	16
3.3 อุปกรณ์และวิธีการ .....	17
3.3.1 การเก็บตัวอย่างพืชและการเตรียมสารสกัด .....	17
3.3.2 การตรวจหาสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites screening) .....	17
3.3.2.1 การตรวจหาสารด้วย Thin layer chromatography .....	17
3.3.2.2 การตรวจหาสารด้วย Specific reagent testing .....	17
3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic compounds (TPC) .....	18

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณ Total flavonoid (TF) contents .....	18
3.3.5 การวิเคราะห์ Antioxidant activity .....	19
3.3.5.1 Free radical scavenging activity โดย DPPH .....	19
3.3.5.2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) .....	19
3.3.6 การวิเคราะห์ Cytotoxicity โดย Brine shrimp lethal assay .....	19
3.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ .....	20
3.4.1 Secondary metabolites ในสารสกัดแมงลักคา .....	20
3.4.2 ปริมาณ Total phenolic compounds (TPC) และ Total flavonoid (TF) contents ในสารสกัดแมงลักคา .....	30
3.4.3 Antioxidant activity ของสารสกัดแมงลักคา .....	31
3.4.3.1 Free radical scavenging (DPPH) .....	31
3.4.3.2 Ferric reducing power (FRAP) .....	33
3.4.4 Cytotoxicity ของสารสกัดแมงลักคา .....	35
3.5 สรุปผลการทดลอง .....	37
เอกสารอ้างอิง .....	39
4 อิทธิพลของสารสกัดแมงลักคาต่อการเพิ่มจำนวนและการตายของเซลล์ .....	45
4.1 คำนำ .....	45
4.2 วัตถุประสงค์ .....	47
4.3 อุปกรณ์และวิธีการ .....	47
4.3.1 การเตรียมสารสกัด .....	47
4.3.2 การเตรียม normal lymphocytes (peripheral blood mononuclear cells – PBMCs) .....	47
4.3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ .....	48
4.3.4 Cell proliferation assay .....	48
4.3.5 Flow cytometric analysis .....	49
4.3.6 Apoptotic analysis .....	50
4.3.7 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Western blot analysis .....	50
4.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล .....	51
4.4.1 Proliferative effect ของสารสกัดแมงลักคา .....	51

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	4.4.1.1 Proliferative effect ต่อ normal PBMCs และ Jurkat cell line .....	51
	4.4.1.2 Proliferative effect ของ MLE/e ต่อ HepG2, MCF7 และ PC3 cell lines .....	54
	4.4.2 Cell cycle effect ของสารสกัดใบแมงลักคา .....	56
	4.4.3 Effect ต่อ cell cycle factors ของสารสกัดแมงลักคา MLE/e .....	63
	4.4.4 Apoptotic induction ของ MLE/e .....	65
	4.5 สรุปผลการทดลอง .....	66
	เอกสารอ้างอิง .....	69
5	สรุปผลการทดลอง .....	75
	5.1 สารพฤกษเคมี (phytochemicals) ในสารสกัดแมงลักคา .....	75
	5.2 ปริมาณ total phenolic compounds (TPC) และ Total flavonoid contents (TF) ในสารสกัดแมงลักคา .....	75
	5.3 Antioxidant activity ของสารสกัดแมงลักคา .....	75
	5.4 Cytotoxicity ของสารสกัดแมงลักคา .....	76
	5.5 Proliferative effect ของสารสกัดแมงลักคา .....	76
	5.5.1 Proliferative effect ต่อ normal PBMCs และ Jurkat cell line .....	76
	5.5.2 Proliferative effect ของ MLE/e ต่อ HepG2, MCF7 และ PC3 cell lines ...	77
	5.6 Cell cycle effect ของสารสกัดใบแมงลักคา .....	77
	5.7 Effect ต่อ cell cycle factors ของสารสกัดแมงลักคา MLE/e .....	77
	5.8 Apoptotic induction ของ MLE/e .....	78
	ประวัติผู้วิจัย .....	79

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	R <sub>f</sub> values of TLC fingerprints of mintweed extracts visualized under UV light at A-254 nm and A-366 nm. ...	22
3.2	R <sub>f</sub> values of TLC fingerprints of mintweed extracts detected by KOH, Dragendorff reagent, anisaldehyde/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> and vanillin/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> reagent. ...	24
3.3	R <sub>f</sub> values of TLC fingerprints of mintweed extracts detected by FeCl <sub>3</sub> , DPPH and Kedde reagents. ...	26
3.4	Summary of phytochemical screening of mintweed extracts isolated by Thin Layer chromatography (TLC) and specific test detection. ...	29
3.5	Total phenolic compounds and total flavonoid contents of mintweed ( <i>H. sauveolens</i> ) extracts. Data were mean ± SD., (n = 6). ...	30
3.6	DPPH free radical scavenging activities of mintweed ( <i>H. sauveolens</i> ) extracts and of the standards, catechin and ascorbic acid. Data were mean ± SD., (n = 3). ...	32
3.7	Ferric reducing ability power (FRAP) values of mintweed ( <i>H. sauveolens</i> ) extracts, catechin and ascorbic acid. Data were mean ± SD., (n = 3). ...	33
3.8	Summary of antioxidant activities of mintweed extracts analyzed by DPPH radical scavenging and ferric reducing ability power (FRAP). ...	34
3.9	Cytotoxic effect of mintweed extracts assayed by brine shrimp lethality assay (BSLA) at 24 h. Data were mean ± S.D., (n = 60). ...	36
3.10	Comparison of cytotoxic efficacy (LC <sub>50</sub> ) among the extracts and the antioxidant standards, catechin and ascorbic acid. ...	37
3.11	Summary of some components and properties of mintweed ( <i>H. sauveolens</i> ) leaf and seed extracts. ...	38

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.1 Antiproliferative effects of mintweed leaf extracts on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by AlamarBlue assay at 24 h. Data were mean $\pm$ S.D., (n= 3).	... 52
4.2 Antiproliferative effects of mintweed leaf and seed extracts on Jurkat cells (human T lymphocyte leukemia cells) by AlamarBlue assay at 24 h. Data were mean $\pm$ S.D., (n = 3).	... 53
4.3 Comparison of the efficacy of antiproliferative effects (IC <sub>50</sub> ) of mintweed leaf and seed extracts on PBMCs and Jurkat cells by AlarmaBlue assay at 24 h.	... 54
4.4 Comparison of the antiproliferative efficacy at 24 and 48 h of MLE/e on PBMC, Jurkat HepG2, MCF7, and PC3 cells.	... 55
4.5 Summary of apoptotic effect of concentrations of MLE/e treatment at 24 h on percentage of Jurkat cells, stained with annexin V/propidium iodide.	... 68
4.6 Summary of apoptotic effect of incubation time of 600 ug/ml MLE/e treatment at 24 h on percentage of Jurkat cells, stained with annexin V /propidium iodide.	... 68

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit. A, plant tree. B, seeds	..... 6
3.1	Two-chamber container with a perforate divider. The smaller compartment was for brine shrimp egg hatching. The larger compartment was for the nauplii, migrated toward the light.	..... 20
3.2	TLC fingerprints of mintweed extracts were separated in ethyl acetate: methanol: water (81:11:8) and visualized under UV light at 254 nm (A) and 366 nm (B). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/w, mintweed seed water extract; E <sub>2</sub> , estradiol	..... 21
3.3	TLC fingerprints of mintweed extracts were developed in ethylacetate: methanol: water (81:11:8) and sprayed with specific reagents: A, KOH reagent (UV-366 nm); B, Dragendorff's reagent (vis); C, Anisaldehyde/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> reagent (vis); D, Vanillin/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> reagent (vis). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/w, mintweed seed water extract; Cou; coumarin.	..... 23
3.4	TLC fingerprints of mintweed extracts were developed in ethyl acetate: methanol: water (81:11:8) and sprayed with specific reagents: A, FeCl <sub>3</sub> reagent; B, DPPH reagent; C, Kedde reagent. MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/w, mintweed seed water extract; CA, catechin; Tro, trolox.	..... 26
3.5	A: Terpenoids detection in mintweed extracts by Salkowski test. B: Tannins detection in mintweed extracts by Ferric chloride test. C: Alkaloids detection in mintweed extracts by Dragendorff reagent test. MLE/e, mintweed leaf	..... 27

ภาพที่	สารบัญญภาพ (ต่อ)	หน้า
	ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract	
3.6	Frothing test of mintweed extracts. A, after shaking, B, after adding NaOH and shaking, C, after adding HCl, boiling for 10 min and shaking. MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract.	..... 28
4.1	Figure 4.1 Cell cycle (A) and the protein factors in cell cycle regulation (B).	..... 46
4.2	Peripheral Blood Mononuclear cells separation by density-gradient centrifugation in Histopaque-1077 (Hofmann et al., 1982)	48
4.3	AlamarBlue <sup>®</sup> assay principle (Markaki, 2009).	..... 49
4.4	Proliferation of HepG2, MCF7, and PC3 cells after MLE/e treatment at various concentrations and incubation at 24 h (A) and 48 h (B). Data were mean $\pm$ S.D., n = 6.	..... 55
4.5	Dose-dependent effect of mintweed leaf ethanol and water extracts, MLE/e and MLE/w, on cell cycle of Jurkat cells (human T leukemia cells). The cells were treated with various concentrations, designated, of MLE/e (upper panel) and MLE/w (lower panel) for 24 h. The cell cycle phases were analyzed by flow cytometer. The percentage of cells in G1, S and G2/M phases are indicated. The sub G1 represents the apoptotic population. Data shown are representatives of three independent experiments.	..... 58
4.6	Dose-dependent effect of mintweed seed ethanol and water extracts, MSE/e and MSE/w, on cell cycle of Jurkat cells (human T leukemia cells). The cells were treated with various concentrations, designated, of MSE/e (upper panel) and MSE/w (lower panel) for 24 h. The cell cycle phases were analyzed by flow cytometer. The percentage of cells in G1, S and G2/M phases are indicated. The sub G1 represents the apoptotic population. Data	.... 59



ภาพที่	สารบัญญภาพ (ต่อ)	หน้า
	shown are representatives of three independent experiments.	
4.7	Time-dependent effect of mintweed leaf ethanol and water extracts, MLE/e and MLE/w, on cell cycle of Jurkat cells (human T leukemia cells). The cells were incubated with 600ug/ml MLE/e and 1,000 ug/ml MLE/w. The cells were harvested at 0, 6, 12 and 24 h and then were subjected to flow cytometer. The percentage of cells in G1, S and G2/M phases are indicated. The sub G1 represents the apoptotic population. Data shown are representatives of three independent experiments.	..... 60
4.8	Time-dependent effect of mintweed seed ethanol and water extracts, MSE/e and MSE/w, on cell cycle of Jurkat cells (human T leukemia cells). The cells were incubated with 2,500 ug/ml MSE/e and 6,000 ug/ml MSE/w. The cells were harvested at 0, 6, 12 and 24 h and then subjected to flow cytometer. The percentage of cells in G1, S and G2/M phases are indicated. The sub G1 represents the apoptotic population. Data shown are representatives of three independent experiments.	..... 61
4.9	Effect of MLE/e on the expression of Cyclin and CDK proteins in Jurkat cells. The cells were treated at 400 ug/ml and 600 ug/ml for 0, 1.5, 3, and 6 h and 40 ug cell protein lysate was then subjected to 12% SDS-PAGE and Western blotting. Actin was used as a protein loading reference. The autoradiogram represents three experiments.	.... 64
4.10	Cytogram of annexin V binding and propidium iodide uptake in Jurkat (human T leukemia) cells after treated with 400, 600 and 800 ug/ml MLE/e for 24 h (A) and with 600 ug/ml for 0, 6, 12 and 24 h (B). Q represents quadrants in cytogram; Q1, necrotic cells; Q2, late apoptosis; Q3, live cells; Q4, early apoptosis. Data shown are representatives of three independent experiments.	..... 67

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งเป็นสาเหตุการตายลำดับต้นๆ ในประเทศพัฒนา และเป็นลำดับรองในประเทศกำลังพัฒนา และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเพราะวัยและการเจริญของประชากร โลกพร้อมกับพฤติกรรมที่จะทำให้เกิดมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิถีการดำรงชีพ การกินอยู่และการสูบบุหรี่ในประเทศกำลังพัฒนาทางเศรษฐกิจ ปี ค.ศ. 2008 ประมาณการมีคนเป็นมะเร็งเกิดใหม่ 12.7 ล้านคน และผู้ป่วยมะเร็งตาย 7.6 ล้านคน (Jermal, et al., 2011) และคาดว่าในปี ค.ศ. 2030 ผู้ป่วยมะเร็งจะเพิ่มขึ้นจนเป็นภาระหลักของทั่วโลกประมาณ 22 ล้านคน (World Cancer Factsheet, WHO, 2012)

ประเทศในกลุ่มอาเซียน (ASEAN) ปี ค.ศ. 2008 มีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ 700,000 คน ส่วนมากเป็นมะเร็งปอด มะเร็งเต้านม และมะเร็งตับ มีผู้ป่วยมะเร็งตาย 500,000 คนจากมะเร็งปอด มะเร็งตับและมะเร็งลำไส้ใหญ่ ประชากรในอาเซียนมีรูปแบบของมะเร็งต่างกัน อัตราการเกิดมะเร็งขึ้นกับอายุและการเปลี่ยนวิถีการดำรงชีวิต ประเทศกลุ่มอาเซียนจึงต้องมีนโยบายควบคุมมะเร็ง โดยเน้นระบบสุขภาพที่เข้มแข็งเพื่อเพิ่มการป้องกัน การรักษาและการจัดการ (Kimman, Norman, Jan, Kingston and Woodward, 2012)

มะเร็งในประเทศไทยจัดอยู่ในลำดับที่สามของโลก ผู้ป่วยมะเร็งตายปีละ 6,000 – 7,000 คน ผู้หญิงส่วนมากตายจากมะเร็งมดลูก (cervical cancer) และมะเร็งเต้านม (breast cancer) ผู้ชายส่วนมากตายจากมะเร็งตับ (liver cancer) และมะเร็งปอด (lung cancer) ([http://archive.mail-list.com/hbv\\_research/msg01749.html](http://archive.mail-list.com/hbv_research/msg01749.html)) เนื้องอก (tumor) และมะเร็ง (malignant tumor/cancer) เกิดจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมหลายประการ เช่น สารไนโตรซามีน (nitrosamine) พัยโรลีสเซต (pyrolysates) และ โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon) จากอาหารปิ้งย่างและทอด (วิสิฐศักดิ์ 2543) สารเคมีอื่นๆ รังสี (American Cancer Society, 2014) ปัจจัยกายภาพอื่น ๆ และ ความเครียด ปัจจัยเหล่านี้เป็นสาเหตุเบื้องต้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์และการแสดงออกของพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารโปรตีนปัจจัยการแบ่งเซลล์ ทำให้เซลล์แบ่งตัวได้เซลล์กลุ่มใหม่ที่ผิดปกติ และแบ่งตัวได้อย่างไม่มีขีดจำกัดจนกลายเป็นมะเร็ง ไปรบกวนการทำหน้าที่ของเซลล์ปกติ ความผิดปกติเช่นนี้สามารถป้องกันได้ในเบื้องต้น ด้วยปัจจัยจากภายนอกเซลล์บางประการดังกล่าวมาที่ทำให้วัฏจักรเซลล์ผิดปกติ ไม่สามารถผ่านจากระยะ G1 เข้าสู่ระยะ S ซึ่งเป็นระยะสังเคราะห์ DNA เซลล์ไม่สามารถ

แบ่งตัวได้ และเซลล์จะหยุดในระยะ G1 ของวัฏจักรเซลล์ซึ่งมีทั้งหมด 4 ระยะ คือ G1 (Gap 1), S (DNA Synthetic phase), G2 (Gap 2) และ M (Mitotic phase) หรือเซลล์อาจถูกกำหนดให้ฆ่าตัวตายเอง (apoptosis – programmed death) (van den Heuvel, 2005)

การรักษาเนื้องอกและมะเร็งหลังวินิจฉัยพบแล้วมีความเสี่ยงและค่าใช้จ่ายสูง กอปรกับปัจจุบันประเทศกำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทยมีการใช้สมุนไพรตามภูมิปัญญาพื้นบ้านที่สืบทอดกันมาเป็นเวลานานในการรักษามะเร็งและโรคหลายโรค แต่ไม่ปรากฏมีหลักฐานวิจัยละเอียดทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนฤทธิ์ของพืชสมุนไพรเหล่านั้นมากนัก การแสวงหาสารสกัดธรรมชาติจากพืชสมุนไพรต่างๆ และวิเคราะห์ศึกษาอย่างละเอียดถึงฤทธิ์ของพืชสมุนไพรตามหลักการทางวิทยาศาสตร์ เพื่อการใช้ป้องกันก่อนเกิดเนื้องอกและมะเร็ง (plant natural product for tumor/cancer prevention) การศึกษาวิจัยพืชสมุนไพรจึงเป็นความสำคัญอย่างหนึ่งในระดับประเทศ ทั้งนี้เพื่อให้การใช้สารสกัดจากพืชเป็นการแพทย์ทางเลือก (alternative medicine) ลดการรักษาด้วยสารรังสีที่ราคาสูง และยังสามารถพัฒนาเป็นอาหารเสริม (supplement) เพื่อการป้องกัน และใช้เป็นยารักษาโรคอื่นๆ ต่อไปในอนาคตได้ด้วย นอกจากนี้ยังจะช่วยลดการนำเข้าสารเคมีจากต่างประเทศ ทำให้ประชาชนไทยพึ่งตัวเองได้ ส่งผลดีโดยรวมต่อเศรษฐกิจของประเทศ

การวิจัยนี้ต้องการวิเคราะห์สารสกัดแมงลักคา (กระเพราผี) (*Hyptis suaveolens*, (L.) Poit) ซึ่งเป็นทั้งพืชผักและวัชพืช เพื่อใช้ในการป้องกันหรือยับยั้งการเกิดและการรักษาเนื้องอกและมะเร็ง โดยเน้นวิเคราะห์หาฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity) ความเป็นพิษต่อเซลล์ (toxicity) และหาฤทธิ์ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็ง ต่อการตายของเซลล์มะเร็ง และปัจจัยโปรตีนควบคุมกลไกที่เกี่ยวข้องในวัฏจักรเซลล์

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 วิเคราะห์หาสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) คุณสมบัติต้านออกซิเดชันหรือด้านการก่อกวนอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) และความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัดแมงลักคา (*Hyptis suaveolens*)
- 1.2.2 วิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดแมงลักคาต่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) วัฏจักรและปัจจัยในวัฏจักรเซลล์ (cell cycle and factors) และการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ (cancer cell line)

### 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยกำหนดขอบเขตไว้ดังนี้

- 1.3.1 วิเคราะห์หาสารฟีนอลิก/ฟลาโวนอยด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic compounds) และ สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content) ในสารสกัดหยาบ (crude extract) ใบและเมล็ดแมงลักคา
- 1.3.2 วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ ของแมงลักคาในหลอดทดลอง (*in vitro*)
- 1.3.3 วิเคราะห์พิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ฤทธิ์ของสารสกัดแมงลักคาต่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ และวัฏจักรเซลล์ (proliferation and cell cycle) ของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต้นแบบ
- 1.3.4 วิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดแมงลักคาต่อการตาย (apoptosis) ของเซลล์สายพันธุ์

### 1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

- 1.4.1 การเตรียมสารสกัด (crude extract) จากแมงลักคา

เก็บตัวอย่างแมงลักคาในพื้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและพื้นที่ข้างเคียง แยกใบและเมล็ด ล้างใบด้วยน้ำและตากใต้แสงแดดให้แห้ง ส่วนเมล็ดแช่น้ำให้เชื้อหุ้มพองแล้วกำจัดเชื้อหุ้มออก ทำเมล็ดให้แห้งโดยเป่าลม บดใบแห้งและเมล็ดแห้งให้เป็นผง สกัดผงตัวอย่างแห้งด้วยน้ำ และ 70% แอลกอฮอล์ ทำสารสกัดให้แห้งเป็นผง เก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ก่อนใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

- 1.4.2 วิเคราะห์หาสารฟีนอลิกในสารสกัดใบและเมล็ด
- 1.4.3 วิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compounds และ total flavonoid content ในสารสกัด
- 1.4.4 วิเคราะห์คุณสมบัติ antioxidant activity ของสารสกัด
- 1.4.5 วิเคราะห์หาคุณสมบัติ cytotoxicity ของสารสกัด
- 1.4.6 วิเคราะห์ฤทธิ์ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) ของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งสายพันธุ์
- 1.4.7 วิเคราะห์ฤทธิ์ต่อวัฏจักรเซลล์และปัจจัยควบคุมวัฏจักรเซลล์ (cell cycle and factors)
- 1.4.8 วิเคราะห์ฤทธิ์ต่อการตายแบบฆ่าตัวตาย (apoptosis)

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ผลการวิจัยนี้จะได้องค์ความรู้ด้านส่วนประกอบเบื้องต้นของสารฟีนอลิกในแมงลักคา และด้านฤทธิ์ของสารสกัดโดยรวมจากแมงลักคาในระดับเซลล์ ซึ่งจะเป็พื้นฐานข้อมูลที่สำคัญยิ่งใน

การศึกษาวิจัยขั้นละเอียดอีกต่อไปอีก เช่น การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ (active compounds) ที่สามารถแยกได้จากสารสกัดแมงลักคา และปฏิบัติการทำงานระดับโมเลกุลของสารภายในเซลล์เพื่อประโยชน์ทางวิจัยระดับสูงเกี่ยวกับฤทธิ์ต่อมะเร็งต่างๆ ในมนุษย์และพัฒนาใช้ทางคลินิกต่อไป

- 1.5.2 ผลการวิจัยนี้จะเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับแมงลักคาซึ่งในประเทศไทยจัดเป็นวัชพืชและพบเจริญแพร่หลายในพื้นที่ทำการเกษตร จึงสามารถให้เป็นบริการความรู้แก่เกษตรกร ส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกแมงลักคาขายเป็นรายได้เสริม และสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรรูปแบบต่างๆ เชิงพาณิชย์ได้
- 1.5.3 ผลการยับยั้งการเจริญแบ่งเซลล์และทำให้เซลล์มะเร็งตายจะเป็นการนำร่องสู่การวิจัยทางคลินิกของการแพทย์ การพัฒนาเป็นอาหารเสริมและการพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งจากแมงลักคานี้ได้ต่อไป

#### เอกสารอ้างอิง

- American Cancer Society. (2014). X-rays, gamma rays, and cancer risk. American Cancer Society. pp. 15. Available at [www.cancer.org](http://www.cancer.org).
- Jernal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 61: 69-90.
- Kimman<sup>1</sup>, M., Norman, R., Jan, S., Kingston, D., and Woodward, M. (2012). The burden of cancer in member countries of the association of Southeast Asian Nations (ASEAN). Asain Pacific J Cancer Prev. 13:411-420.
- van den Heuvel, S. (2005) Cell-cycle regulation. Kramer, J.M. and Moerman, D.G., edited. WormBook, pp. 16. doi/10.1895/wormbook.1.28.1, available at <http://www.wormbook.org>.
- World cancer factsheet, International Agency for Research on Cancer, WHO. (2012). Cancer Research UK.
- วิสิฐศักดิ์ วุฒิอดิเรก (2543). ความรู้สิ่งเป็นพิษ ตอนที่ 14, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หน้าที่ 1-3. สืบค้นได้ที่ [http://webdb.dmso.moph.go.th/ifc\\_toxic/a\\_tx\\_1\\_001c.asp?info\\_id=77](http://webdb.dmso.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_1_001c.asp?info_id=77)

## บทที่ 2

### ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 คำนำ

พืชสังเคราะห์สาร secondary metabolites หลายชนิด เช่น phenolics, flavonoids, terpenoids และ alkaloids (Birt, Hendrich, and Wang, 2001; Reddy, Odhav, and Bhoola, 2003) เพื่อป้องกันตัวเองจากสารปฏิกิริยาออกซิเจน (reactive oxygen species – ROS) ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อโรค รังสี และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความเย็น ความแห้งแล้ง ความเค็มและมลพิษอื่นๆ (Grassmann, Hippeli, and Elstner, 2002) พบว่าพืชผัก ผลไม้ที่มนุษย์บริโภคเป็นอาหารในชีวิตประจำวันและสมุนไพรหลายชนิดมีสารออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือเป็นสาร antioxidant กำจัด ROS ไม่ให้เกิดระหว่างกระบวนการเมตาโบลิสมในเซลล์ปกติ (normal cell metabolism) นั่นคือป้องกันการทำลาย lipids, proteins, nucleic acids และเซลล์ (Heinonen, Meyer, and Frankel, 1998; Ames, Shigenaga, and Hagen, 1993) และยังต่อต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ (antiproliferation) และหยุดวัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest) ในเซลล์ที่ผิดปกติ ต่อต้านการเกิดเนื้องอก (antitumorogenesis) ทำให้เซลล์ที่ร่างกายไม่ต้องการมาตายแบบ apoptosis เป็นการยับยั้งก่อนการเกิดเนื้องอกและมะเร็ง ต้านการบวมอักเสบ (anti-inflammation) และ เสริมภูมิคุ้มกัน

ผลไม้ประเภท berry เช่น strawberry ผลิตสาร antioxidants ในปริมาณสูง (273 mg gallic acid equivalents/100 g fruit) และมีฤทธิ์ ยับยั้งการเพิ่มปริมาณเซลล์มะเร็งตับของคน (HepG<sub>2</sub>) (Meyers, Watkins, Pritts, and Liu, 2003) ส่วนองุ่นมีสารสำคัญคือ resveratrol ทำให้เซลล์ HepG<sub>2</sub> เกิด apoptosis และหยุดการแบ่งเซลล์ โดยชักนำการแสดงออกของโปรตีน p21, p53 และ Bax (Kuo, Chiang, and Lin, 2002) ซึ่งเป็นปัจจัยโปรตีนยับยั้งการแบ่งเซลล์ ทำให้เกิด apoptosis ในเวลาต่อมา นอกจากนี้ยังพบว่า resveratrol จากองุ่นและพืชอื่นๆ เช่น ถั่ว มีคุณสมบัติ antioxidation และช่วยป้องกันมะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) (Pezzuto, 2008; Seeni, et al., 2008) ชา (*Camellia sinensis*) ซึ่งเป็นเครื่องดื่มที่นิยมกันทั่วโลก สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งผิวหนัง ยับยั้งการแบ่งเซลล์มะเร็งผิวหนัง และ เซลล์มะเร็งเต้านม (Lin, Liang, and Lin-Shiau, 1999) นอกจากนี้ยังมีพืชในเขตร้อนอีกหลายชนิดรวมทั้งในประเทศไทยที่มีฤทธิ์ antioxidation, anti-cell proliferation, antitumor และชักนำ apoptosis ในเซลล์มะเร็งหลายชนิดของหนูและของคน เช่น ขมิ้น (curcumin) (Choudhuri, T., et al., 2002; Sa and Das, 2008) เฝือก (Latha and Panikkar, 2000; Kharat, Nambiar,

Tarkasband and Pujari, 2013) Jivanti (*Leptadenia reticulata*) (Sathiyarayanan, Arulmozhi and Chidambaranathan, 2007) และ Acanthus (christmas holly) (Babu, Shylesh, and Padikkala, 2002)

แมงลักคา (mintweed, desert lavender, chan) (*Hyptis suaveolens*) เป็นวัชพืชในประเทศเขตร้อนทั่วไป ในประเทศไทยพบมากทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและพื้นที่รอบๆ มหาวิทยาลัยพบมีมากในตามข้างถนน ไร่พืชทั่วไป ในประเทศเอเชียใต้ และในทวีปแอฟริกาบริเวณแ่งลักคาเป็นพืชอาหารประเภทเครื่องเทศ แมงลักคาเป็นพืชล้มลุกและเป็นไม้พุ่มเตี้ย ในวงศ์มินท์ (Lamiaceae) มีกลิ่น (aromatic) แรง ต้นสูงได้ถึง 3 เมตร ลำต้นสี่เหลี่ยม และมีขนใบรูปไข่ออกตรงข้ามกัน ใบยาว 2.5-10 เซนติเมตร ฐานใบรูปหัวใจ ดอกเป็นกลุ่ม กลีบฐานดอกมีฟันคล้ายขน 5 ซี่ กลีบดอกสีม่วงเข้ม มีกลีบในดอกสีม่วง 2 กลีบ (Figure 2.1) (<http://eol.org/pages/579589/overview>)



Figure 2.1 *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. A, plant tree. B, seeds (Provided by ARS Systematic Botany and Mycology Laboratory, Mexico)

## 2.2 อนุกรมวิธานของแมงลักคา

แมงลักคาหรือกระเพราหมีเป็นพืชดอกในสกุล *Hyptis* มีชื่อสามัญเรียกตามท้องถิ่นหลายชื่อ เช่น chan, Chinese mint, horehound, hyptis, mint weed, mintweed, pignut, wild spikenard แหล่งกำเนิดในอเมริกากลางและเขตร้อนของอเมริกา และมีลำดับชั้นอนุกรมวิธานดังนี้

### Taxonomic Hierarchy ของ *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.

Kingdom	<u>Plantae</u> - Planta, plantes, plants, Vegetal
Subkingdom	<u>Tracheobionta</u> - vascular plants
Division	<u>Magnoliophyta</u> - angiospermes, angiosperms, flowering plants, phanérogames, plantes a fleurs, plantes a fruits
Class	<u>Magnoliopsida</u> - dicots, dicotyledones, dicotyledons
Subclass	<u>Asteridae</u>
Order	<u>Lamiales</u>
Family	<u>Lamiaceae</u> - menthes, mints
Genus	<u>Hyptis</u> Jacq. - bushmint, hyptis
Species	<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit. - pignut, wild spikenard, mintweed

Source:

[http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=32534](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32534)

มีการใช้แมงลักการรักษาหลายอาการเช่น ใช้เป็นสารกระตุ้นประสาท (stimulant) ขับลม (carminative) ขับเหงื่อ (sudorific) และ ขับน้ำนม (lactagogue) ใช้ฉีดลดอาการบวม (catarrhal condition) ใช้ใบรักษา มะเร็งและเนื้องอก น้ำคั้นจากใบแก้อาการกล้ามเนื้อกระตุก (antispasmodic) และแก้อาการไขข้ออักเสบ (antirheumatic) อาการปวดกระเพาะ (stomachach) แก้ไข้ เมล็ดใช้แก้กระหาย (allay thirst) แก้ท้องผูก (constipation) ใบของแมงลักคามีฤทธิ์ด้านการเจริญพันธุ์ (Pokharkar, Saraswat, and Kotkar, 2010) น้ำจากใบใช้ห้ามเลือดออก (blood bleeding) (Sukumaran, Brintha, Subitha, Sheebha, and Jeeve, 2014) สารสกัดใบแมงลักคาสามารถรักษาบาดแผล ทำให้ปากแผลปิดได้ดี (Shenoy, Ushenoy, Patil, and Kumar, 2009)



### 2.3 สารต้านออกซิเดชัน (Antioxidants) จากพืช

สารออกซิแดนท์ (oxidants) เป็นธาตุ/สารรับอิเล็กตรอน เช่น oxygen, ozone, hydrogen peroxide, inorganic peroxide, nitric acid, nitrate compounds, chlorite, hyperchlorite และสารทำความสะอาดในบ้าน household bleach เป็นต้น หรือเป็นอนุพันธ์ของโปรตีนหรือไขมัน สารออกซิแดนท์ หรือสารอนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่ไม่เสถียร มีปฏิกิริยาสูง รบกวนการทำงานของเซลล์ อนุมูลอิสระมีมากมายจากมลพิษ สารเสริมอาหาร (additives) สารกำจัดศัตรูพืช (pesticides) สารกำจัดแมลง (insecticides) ควันบุหรี่ ฯลฯ อนุมูลอิสระทำลายส่วนประกอบของเซลล์ รวมทั้ง DNA และ RNA ซึ่งนำสู่การเกิดมะเร็งได้ สาร oxidants ยังสามารถทำลายโมเลกุลอื่นๆ ในเซลล์ มีผลต่อสิ่งมีชีวิต เช่นทำให้เกิดการบวมอักเสบ ทำลายเนื้อเยื่อและอวัยวะทำให้เนื้อเยื่อสมองขาดเลือด เป็นโรคไต โรคหัวใจ และโรคอื่นๆ (Gospodatyov and Lushchak, 2012) ส่วนสารต้านออกซิเดนต์ (antioxidants) เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก จากภายนอกและภายในเซลล์เอง อาจได้รับจากอาหารและวิตามิน เช่น วิตามิน C (Ascorbic acid), glutathione (GSH) และ วิตามิน E (tocopherols) เป็นต้น (Frei, 1999)

พฤษเคมี คือสารเคมีจากพืช ซึ่งพืชสังเคราะห์ขึ้นเพื่อป้องกันพืชเองและผู้บริโภค นักวิจัยคาดว่าพฤษเคมีประมาณ 40,000 ชนิด สารเหล่านี้เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) และเป็นสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลิก (polyphenolic compounds) หลายชนิดมีคุณสมบัติทางชีวภาพหลายอย่างที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต รวมทั้งยับยั้งการอักเสบ ต้านไวรัส ต้านออกซิเดชัน ยับยั้งการเจริญของเซลล์ หรือ ยับยั้งวัฏจักรเซลล์ การก่อมะเร็ง และทำให้เซลล์ผิดปกติฆ่าตัวตาย (apoptosis) (Guo, Matsidak, Ablise, Sheng, and Abudula, 2013; Katyal, Bhardwaj, and Khajuria, 2014; Saritha, Karpagam, and Sumathi, 2014)

แมงลักคาเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่สารสกัดแมงลักคามีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidants (Nantitanon, Chowwanapoonpohn, and Okonogi, 2007; Gavani and Paarakh, 2008; Ghaffari, Ghassam, and Prakash, 2012; Ghaffari, Ghassam, Nayaka, Kini, and Prakash, 2014; Priyadharshini, and Sujatha, 2013) เนื่องจากในสารสกัดแมงลักคามีสารประกอบ alkaloids, flavonoids, phenols, terpenes และ sterols (Agarwal and Varma, 2013; Sharma, Roy, Anurag, Gupta, and Vipin, 2013; Okoye and Chukwu, 2014) นอกจากนี้ สารสกัดแมงลักคาเพิ่มระดับของ antioxidant enzymes catalase และ superoxide dismutase และ เสริมการรักษาบาดแผล (Shirwaikar, Shenoy, Udupa, Udupa and Shetty, 2003)

## 2.4 สารต้านการเจริญของเซลล์ (Antiproliferation) จากพืช

สารจากพืชหลายชนิดแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์สายพันธุ์หรือเซลล์มะเร็ง เช่น สารสกัดใบพุดชาจีน (*Zizyphus*) (Hassan and Abdel-Gawad, 2010) สารสกัดใบราชวดี (*Plumeria acuminata*) (Periyasami, Gupta, Mazumder, Gebrelibanos, and Sintayehu, 2013) สารสกัดจากทั้งต้นของ *Lactuca serriola* (prickly lettuce) (Alshathly and Elsharkawy, 2014) ยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกชนิดนี้ Ehrlich ascites carcinoma ในช่องท้องของหนูเมาส์ Swiss albino พบว่าชา (*Camellia sinensis*) ผลิตภัณฑ์ polyphenol - Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ที่สามารถกดสัญญาณนอกเซลล์ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งผิวหนัง กำจัด ROS (reactive oxygen species) และยับยั้งสัญญาณการแบ่งเซลล์ mitosis ในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular disease) โรคประสาทเสื่อม (neurodegenerative disorder) และมะเร็ง (Yang and Wang, 2010) โดย EGCG จับกับ epidermal growth factor receptor ของเซลล์มะเร็งผิวหนัง (human epidermoid carcinoma cells) EGCG ยับยั้งการชักนำให้ผลิต inhibitory nitric oxide synthase (iNOS) ในเซลล์ macrophage และ EGCG ยับยั้งวัฏจักรเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7) ไว้ที่ระยะ G1 โดยชักนำการสังเคราะห์ p21 และ p27 ไปยับยั้ง cyclin-dependent kinase (CDK2/4) ซึ่งเป็นสารบิการแบ่งเซลล์ (Lin, Liang, and Lin-Shiau, 1999) นอกจากนี้ EGCG ยับยั้งการเกิดเนื้องอกในปอด ทางเดินอาหาร และ ต่อมน้ำนมโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในวิถี signal transduction ซึ่งจะไปกดการแบ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ (Yang, Wang, Lu and Picinich, 2009)

สารสกัดจากใบแมงลักก็มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และเชื้อรา *Candida albicans*, *Aspergillus niger* และ *Trichophyton rubrum* (Iwalokun, Olwadun, Otunba, and Oyenuga, 2012) ในทางตรงกันข้ามพบว่าสารสกัดแมงลักคาเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของคน (human lymphocytes) เสริมการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติชนิด natural killer T lymphocytes (NK) (Sriwanthana, Treesangsri, Boriboontrakul, Somchit Niumsukul, and Chavalittumrong, 2007) และ ลดเวลาในการสร้างเนื้อเยื่อผิวหนัง (epithelization period) ในการรักษาบาดแผล (Rajiput, et al., 2011) การศึกษาฤทธิ์ของแมงลักคาต่อ antioxidation, cell proliferation, cell cycle และ apoptosis ของเซลล์มะเร็งจึงมีความสำคัญ เพื่อวิเคราะห์หาศักยภาพของสารสกัดแมงลักคา นำไปประยุกต์และพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อป้องกันการเกิดเนื้องอก/มะเร็ง และพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งในทางคลินิกต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- Agarwal, K. and Varma, R. (2013). Antioxidant activity and phytochemical analysis of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. J Adv Phar Edu & Res. 3(4): 541-549.
- Alshathly, M. and Alsharkawy, E. (2014). Inhibition of Ehrlich ascites carcinoma by *Lactuca serriola* in swiss albino mice. J Chem Eng. 8: 66-71.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci USA. 90: 7915-7922.
- Birt, D.F., Hendrich, S., and Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharma Therapeutics. 90: 157-177.
- Babu, B.H., Shylesh, B.S., and Padikkala, J. (2002). Tumour reducing and anticarcinogenic activity of *Acanthus ilicifolius* in mice. J Ethopharma. 79: 27-33.
- Choudhuri, T., Pal, S., Agwarwal, M.L., Das, T. and Sa, G. (2002). Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. FEBS Letters. 512: 334-340.
- Frei, B. (1999). Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. FASEB J. 13(9): 963-964.
- Gavani, U. and Paarakh, P.M. (2008). Antioxidant activity of *Hyptis suaveolens* Poit. Int J Pharma 4(3): 227-229.
- Ghaffari, H., Ghassam, B.J., and Prakash, H.S. (2012). Hepatoprotective and cytoprotective properties of *Hyptis suaveolens* against oxidative stress-induced damage by CCl<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Asian Pacific J Trop Med. 5(11): 868-874. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60162-X
- Ghaffari, H., Ghassam, B.J., Nayaka, S.C., Kini, K.R., and Prakash, H.S. (2014). Antioxidant and neuroprotective activities of *Hyptis suaveolans* (L.) Poit. Against oxidative stress-induced neurotoxicity. Cell Mol Neurobiol. 34(3): 323-331. DOI 10.1007/s10571-013-0016-7
- Gospodaryov, D. and Lushchak, V. (2012). Oxidative Stress: Cause and Consequence of Diseases, Oxidative Stress and Diseases, Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.), ISBN: 978-953-51-0552-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-diseases/oxidative-stress-as-a-causeand-consequence-of-diseases>
- Grassmann, J., Hippeli, S., and Elstner, E. 2002. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. Plant Physiol. 40: 471-478

- Guo X., Matsidak, R., Ablise, M., Sheng, L., and Abudula, A. (2013). Anti-cancer activity of flavonoids from Xinjiang *Glycyrrhiza inflata* Licorice on proliferation, cytotoxicity and apoptosis in cervical carcinoma cells. *J Med Plants Res.* 7(5): 173-178.
- Hassan, A.I. and Abdel-Gawad, E.I. (2010). Effect of Zizyphus leaves extract on mice suffering from Ehrlich ascites carcinoma. *Nature Sci.* 8(11): 234-244.
- Heinonen, M., Meyer, A.S., and Frankel, E.N. (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J Agric Food Chem.* 46: 4107-4112
- Iwalokun, B.A., Oluwadun, A., Otunba, A., and Oyenuga, O.A. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of a new chemotype of *Hyptis suaveolens* (Poit) from Nigeria. *Curr Res J Biol Sci.* 4(3): 265-272.
- John M. Pezzuto, J.M. (2008). Resveratrol as an inhibitor of carcinogenesis. *Pharmaceutical Biol.* 46: 443-573.
- Katyaj, P., Bhardwaj, N., and Khajuria, R. (2014). Flavonoids and their therapeutic potential as anticancer agents: Biosynthesis, metabolism and regulation. *World J Pharm Pharm Sci.* 3(6): 2188-2216.
- Kharat, A.R., Nambiar, V.V., Tarkasband, Y.S. and Pujari, R.R. (2013). A review on phytochemical and pharmacological activity of genus *Ixora*. *International J Res Pahrma Chem.* 3: 628-635.
- Kuo, P-L, Chiang, L-C, and Lin, C-C. 2002. Resveratrol-induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells. *Life Sci.* 72: 23-34.
- Latha, P.G. and Panikkar, K.R. (2000). Inhibition of chemical carcinogenesis in mice by *Ixora coccinea* flowers. *Pharm Biol.* 3: 152-156.
- Lin, J-K, Liang, Y-C., and Lin-Shiau, S.-Y. (1999). Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem Pharma.* 58: 911-915.
- Meyers, K.J., Watkins, C.B., Pritts, M.P., and Liu, R.H. (2003). Antioxidant and antiproliferation activities of strawberries. *J Agric Food Chem.* 57: 6887-6892.
- Nantitanon, W., Chowwanapoonpohn, S., and Okonogi, S. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Hyptis suaveolans* essential oil. *Sci Pharm.* 75: 35-46.
- Okoye, E.I. and Chukwu, P.I. (2014). Extraction and preliminary structural elucidation of alkaloid and flavonoid in *Hyptis suaveolens*. *J Med Plants Res.* 2(4): 45-49.
- Pezzuto, J.M. (2008). Resveratrol as an inhibitor of carcinogenesis. *Pharma Biol.* 46(7-8): 443-576.

- Periyasamy, G., Gupta, M., Mazumder, U.K., Gebrelibanos, M., and Sintayehu, B. (2013). Antioxidant and antitumor activity of *Plumeria acuminata* in Ehrlich ascites carcinoma bearing Swiss albino mice. *British J Pharma Res.* 3(4): 671-685.
- Pokharkar, R.D., Saraswat, R.K., and Kotkar, S. (2010) survey of plants having antifertility activity from Western Ghat area of Maharashtra State. *J Herb Med Toxicol.* 4(2): 71-75.
- Priyadharshini, S.D. and Sujatha, V. (2013). Antioxidant and cytotoxic studies on two compounds isolated from *Hyptis suaveolens* leaves. *Int J Pharm Pharm Sci.* 5(4): 283-290.
- Rajput, R., Bose, U., Manjusha, B., Reddy, S., Udupa, A.L., Bhat, V., and Rao, N. (2011). Reversal of dexamethasone suppressed wound healing with ethanolic extract of leaves of *Hyptis suaveolens* (L) Poit. *Inter J App Biol Pharma Technol.* 2(1): 307-312.
- Reddy, L., Odhav, B., and Bhoola, K.D. (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharma Therapeutics,* 99: 1-13.
- Sa, G. and Das, T. (2008). Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Division,* 3:14
- Saritha, B., Karpagam, and Sumathi. (2014). Studies on antioxidant activity, phenol and flavonoid content of *Pisonia alba* Span. *Asian Pharm Clin Res.* 7(2): 106-109.
- Sathiyarayanan, L., Arulmozhi, S. and Chidambaranathan, N. (2007). Anticarcinogenic activity of *Leptadenia reticulata* against Dalton's Ascitic Lymphoma. *Iranian J Pharmacol Therapeutics.* 6: 133-135.
- Seeni, A., Takahashi, S., Takeshita, K., Tang, M., Sugiura, S., Sato, S-Y. and Shirai, T. (2008). Suppression of prostate cancer growth by resveratrol in the transgenic rat for adenocarcinoma of prostate (TRAP) model. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 9: 7-14.
- Sgenoy, C., Patil, M.B., and Kumar, R. (2009). Wound healing activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). *Int J Pharm Tech Res.* 1(3): 737-744.
- Sharma, P.P., Roy, R.K., Anurag, Gupta, D., and Vipin, K.S. (2013). *Hyptis suaveolens* (L.) poit: A phyto-pharmacological review. *Pint J Chem Pharm Sci.* 4(1): 1-11.
- Shirwaikar, A., Shenoy, R., Udupa, A.I., Udupa S.L., and Shetty, S. (2003). Wound healing property of ethanolic extract of leaves of *Hyptis suaveolens* with supportive role of antioxidant enzymes. *Indian J Experiment Biol.* 41:238-241.
- Sriwanthana, B., Treesangri, W., Boriboontrakul, B., Somchit Niumsukul, S., and Chavalittumrong, P. (2007). In vitro effects of Thai medicinal plants on human lymphocyte activity. *Songklanakarin J Sci Technol.* 29 (Suppl. 1): 17-28.

Sukumaran, S., Brintha, T.S.S., Subitha, P., Sheebha, Y.A, and Jeeve, S. (2014). Usage of medicinal plants by two cultural communities of Kanyakumari district, Tamilnadu, South India. *J Chem Pharma Res.* 6(8): 67-79.

Yang, C.S. and Wang, X., Lu G., and Picinich, S.C. (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer.* 9(6): 429-439.

<http://eol.org/pages/579589/overview>

[http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=32534](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32534)



## บทที่ 3

### พฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และ ความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิต

#### 3.1 คำนำ

องค์การอนามัยโลก (WHO) ประมาณว่า 80% ของประชากรในท้องถิ่นพึ่งพาการแพทย์แบบดั้งเดิม (traditional medicine) สำหรับการรักษาปฐมภูมิ (primary health care) การแพทย์ในประเทศจีนมีการใช้พืชเป็นฐานหลักสำหรับการรักษาประชากรซึ่งมีจำนวนมาก ในประเทศไทยมีโครงการการแพทย์ปฐมภูมิเพื่อส่งเสริมการใช้พืชสมุนไพรและการรักษาแบบดั้งเดิม (Srivastava, Lambert, and Vietmeyer, 1996) นักวิจัยประมาณการว่า สองในสามของพืชทั่วโลกมีคุณค่าทางการแพทย์ เนื่องจากพืชผลิตสารต้านออกซิเดนต์ (antioxidants) (Balassundrum, Sundram and Samman, 2006; Khalil, Moustaf, and Naguib, 2007) ซึ่งเป็นสารที่มีศักยภาพต้านกระบวนการออกซิเดชัน (antioxidation activity)

Antioxidants จากธรรมชาติ แม้ที่ความเข้มข้นต่ำก็สามารถป้องกัน oxidation ของสารในเซลล์ได้ เช่น ป้องกันโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และ DNA (Deoxyribonucleic acid) จากการกลายพันธุ์และการก่อมะเร็ง (Tapiero, Tew, Nguyen Ba, and Mathe, 2002) antioxidants มีส่วนประกอบทางกายภาพและเคมีแตกต่างกัน antioxidants แบ่งเป็นกลุ่มหลักๆ ได้ ดังนี้ (Gupta and Sharma, 2006; Sharma, Singh, and Singh, 2013)

- 1) Enzymes ใน น้ำ เลือด (plasma) มี superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), และ Glutathion peroxidase (GPx) ทำหน้าที่เปลี่ยน Reactive Oxygen Species (ROS) และ Nitrogen Reactive Species (RNS) ให้เป็นโมเลกุลเสถียร และมี lipid proteases, transferase และ DNA repair enzymes เป็นต้น
- 2) High molecular weight compounds ได้แก่โปรตีน เช่น albumin, transferrin, และ ceruplasmin ซึ่งควบคุมผลผลิตของ metal catalyzed free radicals
- 3) Low molecular weight compounds ซึ่งจำแนกย่อยได้อีกเป็น
  - 3.1 Lipid soluble antioxidants: tocopherol, quinins, bilirubin และ polyphenols บางชนิด
  - 3.2 Water soluble antioxidants: ascorbic acid, uric acid และ polyphenols บางชนิด
- 4) Minerals: selenium, copper, manganese, zinc เป็นต้น
- 5) Vitamins: vitamin A, C และ E
- 6) Antioxidants พืชและสิ่งมีชีวิตอื่น : carotenoids, phenolic compounds และ flavonoids

Antioxidants จากพืชผัก ผลไม้และสมุนไพรกำลังได้รับความสนใจอย่างมากด้วยสามารถป้องกันความเสียหายจากฤทธิ์ของ oxidation และ ส่งเสริมสุขภาพของคน antioxidants เป็นโมเลกุลที่สามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยา oxidation ได้ นอกจากนี้ antioxidants ซึ่งเป็นสารทฤษฎีภูมิสกัดจากพืชสมุนไพรหรือพฤกษเคมีช่วยการทำงานของอวัยวะ ยังสามารถลดความเครียดจาก oxidative stress ในระดับเซลล์ antioxidants จึงมีประโยชน์ในการรักษาหลายๆ โรคในคน รวมทั้งโรคหัวใจและโรคเส้นเลือด โรคภูมิแพ้ (Tripoli et al., 2005; Kris-Etherton, 2002) โรคสมอง (Kennedy and Wightman, 2011) โรคจากการเสื่อมของอวัยวะ โรคผิดปกติของเมตาโบลิสม และโรคมะเร็ง เนื่องจากพืชมีสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็น antioxidants (Winston, 1999; Gupta and Sharma, 2006; Krishnaiah, Sarbatly and Nithyanandam, 2011; Sharma, Singh, and Singh, 2013 )

แมงลักคามีพฤกษเคมีที่สามารถฤทธิ์ต้านอาการน้ำตาลในเลือดสูง (anti-hyperglycemic) (Danmalam, Abdullahi, Agunu, and Musa, 2009; Mishra Verma, Mukerjee, and Vijayakumar, 2011) ต้านเบาหวาน (antidiabetic) (Nayak, Kar, and Nayak, 2013) ป้องกันตับ (hepatoprotective and cytoprotective) (Ghaffari, Ghassam, Prakash, 2012) ป้องกันประสาท (neuroprotective activities) (Ghaffari, Ghassam, Nayaka, Kini, and Prakash, 2014) ต้านอาการรูมาติก (antirheumatic) ต้านการเจริญพันธุ์ (antifertility) และต้านการติดเชื้อ (antiseptic) (Chitra, Patil, and Ravi, 2009) แมงลักคามีศักยภาพต้านการเกิด oxidation ในเซลล์สิ่งมีชีวิต ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ และ ความผิดปกติหรือโรคหลายๆ อย่างในคนได้ การศึกษาวิจัยสารสกัดแมงลักคานี้จึงมีคุณค่าที่สามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้ให้เป็นประโยชน์เชิงการป้องกันและการรักษาได้

### 3.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสารสกัดแมงลักคา (*Hyptis suaveolens*) โดยตรวจหาสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) หรือ พฤกษเคมี (phytochemicals) เบื้องต้น วิเคราะห์หา ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds - TPC) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids content - FC) ศึกษาคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity) และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ปกติและเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ ในประเด็นการต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) วัฏจักรเซลล์ และการฆ่าตัวตายของเซลล์ (cell apoptosis)



### 3.3 อุปกรณ์และวิธีการ

#### 3.3.1 การเก็บตัวอย่างพืชและการเตรียมสารสกัด

เก็บแมงลักจากพื้นที่ภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและพื้นที่ข้างเคียงบริเวณรอบมหาวิทยาลัย การจำแนกชนิดของแมงลักตามอนุกรมวิธาน ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร. ประนอม จันทรโณทัย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เก็บใบแมงลักระหว่างเดือนตุลาคม ล้างใบแมงลักด้วยน้ำสะอาดและตากแห้งด้วยแสงแดด ส่วนเมล็ดแมงลักเก็บช่วงเดือนมกราคม เตรียมสกัดเมล็ดโดยแช่เมล็ดในน้ำสะอาดตั้งทิ้งไว้จนเมือกของเมล็ดบวมขึ้น จึงกำจัดเมือกทิ้ง ตากเมล็ดที่ปราศจากเมือกให้แห้งในอากาศ แยกบดใบและเมล็ดแมงลักที่ตากแห้งแล้วใน โถบดไฟฟ้า (electric blender)

สกัดผงบดของใบและเมล็ดด้วยเครื่องสกัด Soxhlet extraction apparatus (Buchi Instruments, Switzerland) ใช้ผงบด 50 กรัมในน้ำ หรือ 70% ethanol (v/v) 500 ml นาน 24 ชั่วโมง กรองสารสกัดและทำให้เข้มข้นในเครื่องระเหย rotary evaporator (Buchi Instruments, Switzerland) จากนั้นทำให้สารสกัดแห้งเป็นผงโดย lyophilization ที่  $-50^{\circ}\text{C}$  (Freeze-zone 12 Plus, Labconco Corporation, Missouri, USA) เก็บผงสกัด lyophilized extract ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะใช้ทดลอง

#### 3.3.2 การตรวจหาสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites screening)

##### 3.3.2.1 การตรวจหาสารด้วย Thin layer chromatography (TLC)

ใช้แผ่นเคลือบ silica gel 60 F<sub>254</sub> 0.25 mm (Merck, Darmstadt, Germany) ละลายสารสกัดในน้ำ หรือ 70% ethanol จุด (spot) สารตัวอย่างบนแผ่น TLC จุ่มปลายแผ่นด้านจุดสารตัวอย่างลงในสารละลาย mobile phase ซึ่งประกอบด้วย ethyl acetate: methanol: water (81:11:8) สังเกตแถบสารภายใต้แสง UV ที่ A-254 และ A-366 nm จากนั้นพ่นด้วยสารพิเศษจำเพาะเพื่อตรวจหาสารบางชนิด ดังนี้ (1) Potassium hydroxide (KOH) reagent สำหรับตรวจหา anthraquinones, anthones และ coumarins group, (2) Dragendorff's reagent สำหรับตรวจหา alkaloids group, (3) Anisaldehyde/sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) reagent, และ (4) Vanillin/sulfuric (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) reagent สำหรับ essential oils, steroid, terpenoids and phenols, (5) Iron (III) chloride reagent สำหรับตรวจหา phenolic compounds และ tannins, (6) DPPH reagent สำหรับตรวจหา antioxidants และ (7) Kedde reagent สำหรับตรวจหา cardiac glycosides (Wagner and Bladt, 1996; Gibbons and Gray, 1998) คำนวณ R<sub>f</sub> ดังสูตรข้างล่าง

$$R_f = \frac{\text{Compound distance from origin (cm)}}{\text{Solvent front distance from origin (cm)}}$$

### 3.3.2.2 การตรวจหาสารด้วย Specific reagent testing

ใช้สารพิเศษทำปฏิกิริยากับสารสกัดในหลอดทดลอง ทำให้เกิดสี (coloration) เพื่อตรวจหาสารเฉพาะ (Sofowora, 1993; Trease and Evans, 1989; Harborne, 1973) ดังนี้ (1) Salkowski test สำหรับตรวจหา terpenoids นำสารสกัดใบแมงลักคก 0.05 กรัม และ สารสกัดเมล็ดแมงลักคก 0.2 กรัม ผสมกับ chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) 2 ml ค่อยๆ ใส conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 ml บนผิวของสารผสมนั้น แลบสีน้ำตาลแดงที่เกิดขึ้นระหว่าง interface แสดงว่ามี terpenoids (2) Ferric chloride test สำหรับตรวจหา tannins ต้มสารสกัดแมงลักคก 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 4 ml 10 นาที กรอง แล้วหยด 5%  $\text{FeCl}_3$  2-3 หยดใส่ใน filtrate ถ้ามี tannins จะได้สี brownish green หรือ blue-black (3) Dragendorff's reagent สำหรับตรวจหา alkaloids นำสารสกัดแมงลักคก 0.2 กรัม ผสมกับ 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 ml จากนั้นกรอง แล้วหยด Dragendorff reagent 2-3 หยดใส่ใน filtrate ถ้ามี alkaloids จะได้สี orange red (4) Frothing test สำหรับตรวจหา saponins (Harborne, 1998) สารสกัดแมงลักคก 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 4 ml อุณหภูมิ 10 นาที กรองและเขย่าอย่างแรงจนเกิดฟองที่คงที่ จากนั้นยืนยันการมี saponins โดย 1) เติม NaOH เขย่า ถ้ายังมีฟองอยู่ แสดงว่ามี saponins หรือ 2) เติม HCl แล้วต้มเพื่อ hydrolyze saponin glycoside ให้เป็น aglycone แล้วไม่มีฟอง

### 3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic compounds (TPC)

ปริมาณ total phenolic compounds ในสารสกัดวัดโดยวิธี Folin-Ciocalteu method (Matthaus, 2002) ละลายสารสกัดในน้ำหรือแอลกอฮอล์ สารละลายตัวอย่าง 0.1 ml ผสมกับ 2% Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 2 ml ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu (Folin:methanol, 1:1) 0.1 ml บ่ม 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ A-750 nm ด้วย spectrophotometer (CE1011, Cecil Instruments, Cambridge, UK) ใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ปริมาณ TPC รายงานเป็นหน่วย mg Gallic acid equivalent ต่อ mg สารสกัดแห้ง (mg GAE/mg dried extract)

### 3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณ Total flavonoid (TF) contents

ปริมาณ total flavonoid contents วิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยากับ Aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3$ ) ซึ่งอธิบายโดย Liu et al. (2002) ทำละลายสารตัวอย่าง 5 mg/ml ในสารตั้งต้นทำสกัด สารละลายตัวอย่าง 0.250 ml ผสมกับน้ำ 1.25 ml และ 5%  $\text{NaNO}_2$  75  $\mu\text{l}$  บ่ม 6 นาที แล้วเติมสารละลาย 10%  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  บ่ม 5 นาที เติม 1 M NaOH 0.25 ml เติมน้ำให้ได้ปริมาณทั้งหมด 2.5 ml วัดค่าดูดแสงที่ A-510 nm ด้วย spectrophotometer ใช้ Catechin เป็นสารมาตรฐาน ปริมาณ TF รายงานเป็นหน่วย mg Catechin equivalent ต่อ mg สารสกัดแห้ง (mg CA/mg dried extract)

### 3.3.5 การวิเคราะห์ Antioxidant activity

#### 3.3.4.1 Free radical scavenging activity โดย DPPH

ศึกษาการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH method) (Sanchez-Moreno et al., 1999) สารละลายที่หลายความเข้มข้นของแต่ละตัวอย่าง 50  $\mu$ l ผสมกับกับสารละลาย 40 mg/ml methanol DPPH $\cdot$  1.95 ml ผสมเขย่าอย่างแรงให้เข้ากัน ตั้งไว้ 45 นาทีในที่มีด วัดค่าดูดกลืนแสงที่ A-515 nm โดยใช้ methanol เป็น blank control และใช้ methanol DPPH $\cdot$  เป็นสารควบคุม ใช้ L-ascorbic acid และ Catechin เป็นสารมาตรฐาน antioxidant activity รายงานเป็นเข้มข้นประสิทธิภาพกำจัด DPPH $\cdot$  ตั้งต้น ได้ 50% (Inhibition concentration 50, IC<sub>50</sub>  $\mu$ gCAE/ml หรือ  $\mu$ gAAE/ml)

$$\% \text{ inhibition} = \left( \frac{A \text{ control} - A \text{ sample}}{A \text{ control}} \right) \times 100$$

A control คือค่า absorbance ของสารควบคุม

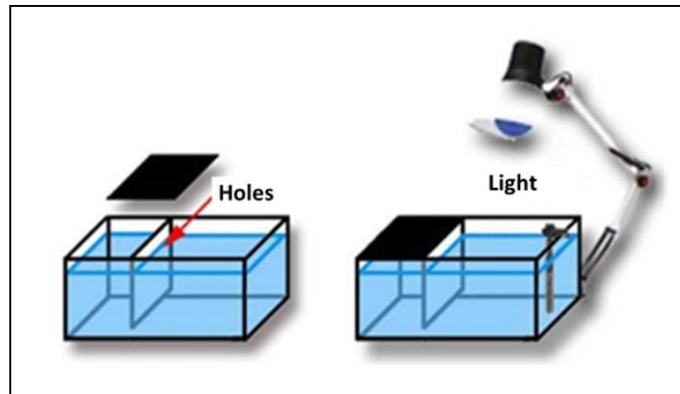
A sample คือค่า absorbance ของสารตัวอย่าง

#### 3.3.4.2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ความสามารถลด ferric ions ของสาร antioxidants ในสารสกัด วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP (Benzie and Strain, 1996) ซึ่งเป็นการวัดความเข้มข้นทั้งหมดของ antioxidants เตรียม FRAP reagent ใหม่ๆ โดยผสม 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) ในสารละลาย 40 mM HCl, 20 mM FeCl<sub>3</sub> ใน 0.1 M Acetate buffer, pH 3.6 ในอัตราส่วน 1:1:4 (v/v/v) ผสมสารละลายตัวอย่าง 50  $\mu$ l และ FRAP reagent 1.5 ml บ่ม 10 นาที วัดค่าดูดแสงที่ A-593 nm ใช้ FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (100 - 1000  $\mu$ M) เป็นสารมาตรฐาน และรายงานผลเทียบเท่าเป็น  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ต่อ mg สารสกัดแห้ง ( $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O equivalent/mg dried extract)

### 3.3.5 การวิเคราะห์ Cytotoxicity โดย Brine shrimp lethal assay

วิเคราะห์ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Brine Shrimp Lethal Assay (BSLA) (Wanyoike, et al., 2004) โดยเตรียมน้ำทะเลเทียม (3.8% NaCl) ใส่ในกล่องซึ่งแบ่งเป็น 2 ช่องไม่เท่ากัน เพาะกุ้งฝอย (brine shrimp) โดยใส่ไข่แห้ง (cysts) ในช่องเล็ก ปิดช่องนี้เพื่อกันแสงด้วยกระดาษดำ เลี้ยง brine shrimp ที่ 25  $\pm$  2 $^{\circ}$ C ประมาณ 24 ชั่วโมง ได้ตัวอ่อน nauplii ส่องไฟ 20 วัตต์ที่ช่องใหญ่เพื่อดึงตัวอ่อน nauplii ออกมาจากที่เพาะไข่ (ช่องเล็ก) (Figure 3.1)



**Figure 3.1** Two-chamber container with a perforate divider. The smaller compartment was for brine shrimp egg hatching. The larger compartment was for the nauplii, migrated toward the light.

ย้าย 10 nauplii ใส่ในหลุมของ 24-well plate (SPL Life Sciences, Gyeonggi-do, Korea) ซึ่งบรรจุน้ำทะเลเทียม 4 ml ใส่สารละลายสารสกัดในน้ำ หรือ ใน 1% DMSO (ความเข้มข้นสุดท้าย) และปรับความเข้มข้นสารระหว่าง 10 - 1000  $\mu\text{g/ml}$  ความเข้มข้นละ 6 หลุม เลี้ยง nauplii ต่ออีก 24 ชั่วโมง และนับจำนวน nauplii ตาย ใน 24 ชั่วโมง คำนวณหา % corrected mortality ด้วย Abbot's formula (1925)

$$\% \text{ Corrected mortality} = \frac{\text{Observed treatment mortality} - \text{Control mortality}}{100 - \text{Control mortality}} \times 100$$

วิเคราะห์ข้อมูลด้วย Probit analysis (Finney, 1971) หา ความเข้มข้นที่ทำให้ brine shrimp ตาย 50% (Lethal concentration 50,  $\text{LC}_{50}$ )

### 3.4 ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 3.4.1 Secondary metabolites ในสารสกัดแมงลักคา

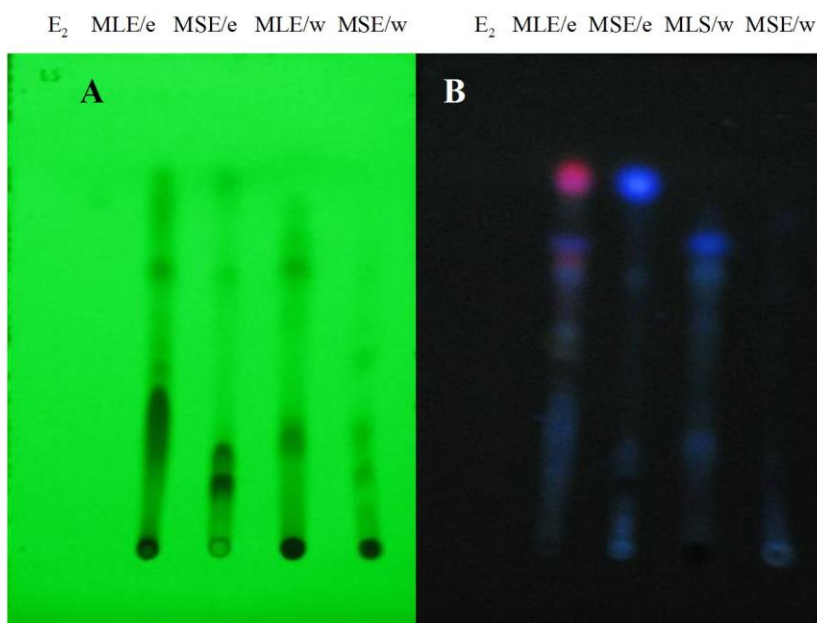
การตรวจหาสารทุติยภูมิ/พฤษเคมีในสารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคาซึ่งสกัดด้วย 70% ethanol และ น้ำ (MLE/e, MSE/e, MLE/w, และ MSE/w ตามลำดับ) ได้ดำเนินการ 2 วิธีหลัก คือ

(1) แยกสารประกอบด้วย thin layer chromatography (TLC) ด้วยระบบ ethyl acetate: methanol: water 81:11:8 แล้วตรวจหาสารด้วยแสง UV และ (2) ทดสอบด้วยการให้ทำปฏิกิริยากับสารพิเศษ (specific reagent testing)

### 3.4.1.1 Thin layer chromatography (TLC)

แยกสารสกัด ด้วย TLC และ ตรวจหาตำแหน่งสารด้วย UV 2 modes คือ UV short wavelength ที่ A-254 nm และ UV long wavelength ที่ A-366 nm แล้วประเมินผลเชิง qualitative ของ chromatogram จาก  $R_f$  value ซึ่งเป็นการประเมิน เบื้องต้น สารบางชนิดดูดกลืนแสงที่ UV-254 nm ซึ่งเป็นสารไม่เรืองแสง (quench fluorescence) สารปรากฏเป็นแถบ (zone) สีดำ บนพื้น (background) สีเขียวสด ส่วน UV-366 nm ทำให้เห็นแถบสารแสงเรืองโดยธรรมชาติ (native fluorescence) บน background สีดำ และ ประเมินหาสารที่แยกได้โดย TLC แล้วด้วยการพ่นด้วย visualization reagents

เมื่อแยกสารสกัดด้วย TLC และตรวจหาด้วย UV พบว่าแมงลักสกัดด้วย 70% ethanol สามารถแยกสารประกอบจากใบและเมล็ดแมงลักได้มากกว่าสกัดด้วยน้ำ ในทำนองเดียวกันแยกสารสกัดจากใบได้มากกว่าสารสกัดจากเมล็ด (Figure 3.2, A & B) จาก  $R_f$  value (Table 3.1) ภายใต้ UV-254 nm ได้สารเป็นจุดม่วงดำบนพื้นสีเขียวสด ในสารสกัดใบด้วย ethanol (MLE/e) มี 5 แถบ ( $R_f$  0.39-0.79) สารสกัดเมล็ดด้วย ethanol (MSE/e) มี 4 แถบ ( $R_f$  0.14-0.79) สารสกัดใบด้วยน้ำ (MLE/w) มี 2 แถบ ( $R_f$  0.23-0.60) และ สารสกัดเมล็ดด้วยน้ำ (MSE/w) มี 3 แถบ ( $R_f$  0.16-0.42) ภายใต้ UV 366 nm ได้แถบสาร fluorescence บนพื้นดำ ทั้งนี้แม้  $R_f$  เท่ากันแต่แถบสีแตกต่างกันจึงไม่ใช่สารชนิดเดียวกัน MLE/e มี 7 แถบ ( $R_f$  0.032-0.79) MSE/e มี 4 แถบ ( $R_f$  0.06-0.79) MLE/w มี 4 แถบ ( $R_f$  0.23-0.65) และ MSE/w มี 1 แถบ ( $R_f$  0.06)



**Figure 3.2** TLC fingerprints of mintweed extracts were separated in ethyl acetate: methanol: water (81:11:8) and visualized under UV light at 254 nm (A) and 366 nm (B). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/w, mintweed seed water extract; E<sub>2</sub>, estradiol

**Table 3.1**  $R_f$  values of TLC fingerprints of mintweed extracts visualized under UV light at A-254 nm and A-366 nm.

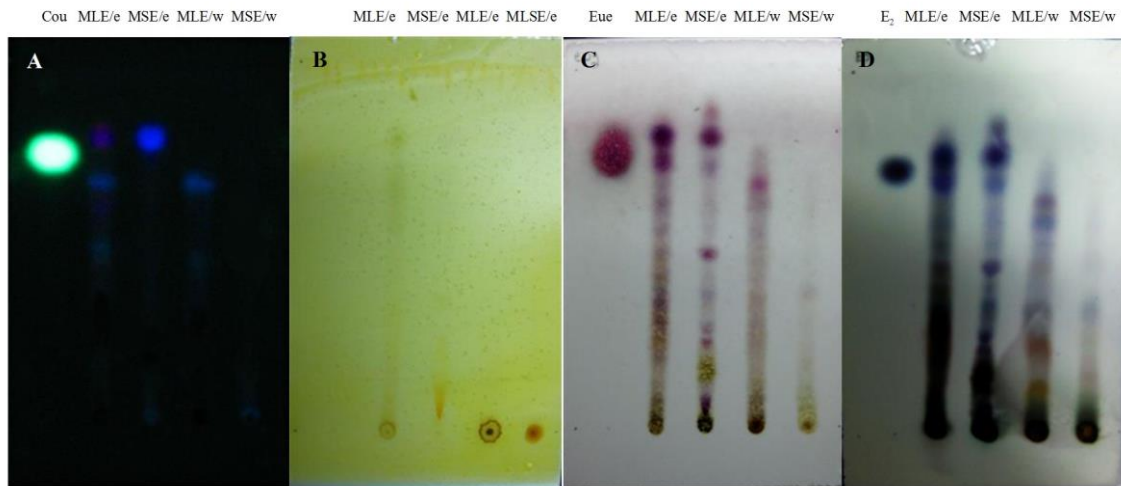
TLC Detection	$R_f$ of extracts			
	MLE/e	MSE/e	MLE/w	MSE/w
UV, A-254 nm	0.79 (LD)	0.79 (LD)	0.60 (B)	0.42 (LD)
	0.74 (LD)	0.60 (LD)	0.23 (B)	0.25 (LD)
	0.72 (B)	0.21 (B)		0.16 (LD)
	0.44 (LD)	0.14 (B)		
	0.39 (LD)			
UV, A-366 nm	0.79 (LR)	0.79 (LBI)	0.65 (LBI)	0.06 (BI)
	0.65 (BI)	0.58 (BI)	0.58 (BI)	
	0.62 (P)	0.21 (BI)	0.47 (BI)	
	0.58 (BI)	0.06 (BI)	0.23 (BI)	
	0.45 (BI)			
	0.42 (G)			
	0.32 (BI)			

MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/w, mintweed seed water extract (LD), light dark; (B), black; (LR), light red; (BI), blue; (R), red; (G), grey; (LBI), light blue.

สารประกอบในสารสกัดเมงลักคาคูกกลืนแสงที่ UV-254 ปรากฏเป็นแถบม่วงดำบนพื้นเขียวสด (dark violet spots on a bright green background) (Figure 3.2, A) ซึ่ง Jachen (1991) อธิบายว่า สารประกอบที่ดูดกลืนแสงที่ A-254 nm ส่วนมากเป็นสารที่มี aromatic rings และ conjugated double bonds ปรากฏเป็น dark violet spots บน bright green background เช่น anthraquinones, coumarins, flavonoids และ polyphenols แสดงว่า สารสกัดเมงลักคาคูกจากใบและเมล็ดทุกสารสกัดมี aromatic rings และ conjugated double bonds ของ flavonoids และ polyphenols การตรวจหาสารเฉพาะจึงได้ใช้ สาร visualization reagents พิเศษ KOH, Dragendorff's reagent, anisaldehyde/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagent, vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagent, FeCl<sub>3</sub> reagent, DPPH reagent และ Kedde reagent เพื่อจำแนกสารเฉพาะอย่างใน chromatogram

1) การตรวจหา anthraquinones (red), anthrone (yellow) และ coumarins โดยใช้ KOH reagent ฉีดบน TLC plate ซึ่งมี coumarins เป็นสารมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบ และตรวจแถบที่ A-366 nm coumarins เคลื่อนที่ที่  $R_f$  0.75 (blue-green) (Wagner and Bladt, 1996) ในสารสกัดเมงลักคา แต่ละชนิดแสดงใน Figure 3.3, A และ Table 3.2 MLE/e อาจมี anthraquinones ( $R_f$  0.79 LR) แต่ไม่มี

anthrones และ coumarins ในขณะที่ MSE/e ไม่มี anthraquinones, anthrones แต่มี coumarins ( $R_f$  0.79 BI) ส่วน MLE/w และ MSE/w ไม่มีสารทั้ง 3 ชนิดนี้



**Figure 3.3** TLC fingerprints of mintweed extracts were developed in ethylacetate: methanol: water (81:11:8) and sprayed with specific reagents: A, KOH reagent (UV-366 nm); B, Dragendorff's reagent (vis); C, Anisaldehyde/ $H_2SO_4$  reagent (vis); D, Vanillin/ $H_2SO_4$  reagent (vis).

MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/w, mintweed seed water extract; Cou; coumarin.

2) การตรวจหา alkaloids และสาร nitrogen compounds โดยพ่น TLC plate ด้วย Dragendorff's reagent (potassium iodide-bismuth nitrate) ซึ่ง alkaloids จะปรากฏแถบสีน้ำตาลหรือส้ม ภายใต้ visible light (Wagner and Bladt, 1996) พบว่าสารสกัดแมงลักจากใบและเมล็ดทั้ง 4 สารสกัดไม่มี alkaloids (Figure 3.3, B และ Table 3.2) แต่ในพืชโดยทั่วไป alkaloids มีมากในเมล็ด แสดงว่าแมงลักน่าจะไม่ใช่พืชที่มีพิษ (Doughari, 2012)

3) การตรวจหา essential oils ใช้ Anisaldehyde/ $H_2SO_4$  reagent พ่น TLC plate ซึ่งจะตรวจหาได้ทั้ง essential oils, steroids, terpenoids และ phenols ได้แถบสีม่วงแดง หรือน้ำเงิน หรือเขียว ที่ visible light (Jork et al., 1990; Wagner and Bladt, 1996) ในการวิจัยนี้ใช้ eugenol ( $R_f$  0.83) เป็นสารมาตรฐานสำหรับ phenyl essential oils พบว่า MLE/e, MSE/e และ MLE/w มี essential oils ในระดับความเข้มข้นต่างกัน และไม่พบมี essential oils ใน MSE/w (Figure 3.3, C และ Table 3.2)

4) การตรวจหา terpenes/steroids ใช้ Vanillin/ $H_2SO_4$  reagent พ่น TLC plate ซึ่ง terpenes หลายชนิดให้สีแดงและน้ำเงิน เมื่อทำปฏิกิริยากับ Vanillin/ $H_2SO_4$  reagent (Macherey Nagel GmbH & Co.) ใช้ estradiol ( $R_f$  0.77 NBI) เป็นสารมาตรฐานสำหรับ sterol triterpenoids พบว่าสารสกัดแมงลักจากใบและเมล็ดทุกชนิดมี terpenoids ในระดับความเข้มข้นต่างกัน (Figure 3.3, D และ

Table 3.2) และที่เด่นชัด MLE/e ( $R_f$  0.79), MSE/e ( $R_f$  0.79) เคลื่อนที่ใกล้เคียงกับ estradiol ส่วน terpenoids ใน MLE/w ( $R_f$  0.58) อาจจะ polar กว่า estradiol จึงเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า และ MSE/w มี terpenoids ความเข้มข้นน้อย

**Table 3.2**  $R_f$  values of TLC fingerprints of mintweed extracts detected by KOH, Dragendorff reagent, anisaldehyde/  $H_2SO_4$  and vanillin/ $H_2SO_4$  reagent.

TLC Detection	$R_f$ of extract						
	MLE/e	MSE/e	MLE/w	MSE/w	Coumarin	Eugenol	Estradiol
KOH	0.79 (P)	0.79 (Bl)	0.65 (Bl)	-	0.75 (BGr)	-	-
	0.65 (Bl)		0.43 (Bl)				
	0.58 (DBl)						
	0.47 (LBl)						
Dragendorff	ND	0.05 (CYL)	ND	0.00 (CYD)	-	-	-
Anisaldehyde/ $H_2SO_4$	0.79 (V)	0.88 (P)	0.69 (LPu)	-	-	0.83 (Pu)	-
	0.74 (Pu)	0.79 (Pu)	0.63 (LPu)				
	0.63 (LPu)	0.71 (LPu)	0.54 (LPu)				
	0.56 (LPu)	0.48 (Pu)					
	0.50 (LPu)	0.38 (LPu)					
	0.04 (Br)	0.28 (LPu)					
	0.38 (Br)	0.24 (Pu)					
	0.35 (PGr)	0.16 (Y)					
Vanillin/ $H_2SO_4$	0.31 (Bl)	0.06 (Pu)					
	0.25 (Br)						
	0.79 (NBl)	0.86 (DBl)	0.65 (LV)	0.33 (LBl)	-	-	0.77 (NBl)
	0.70 (DBl)	0.79 (NBl)	0.58 (Bl)	0.25 (PG)			
	0.60 (G)	0.70 (Bl)	0.47 (PG)	0.23 (LP)			
	0.54 (G)	0.48 (Pu)	0.36 (G)	0.05 (Gr)			
	0.47 (DG)	0.40 (G)	0.52 (Br)				
0.43 (DG)	0.35 (Bl)	0.14 (Y)					
	0.31 (G)						
	0.27(NBl)						
	0.23 (LV)						

MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/w, mintweed seed water extract

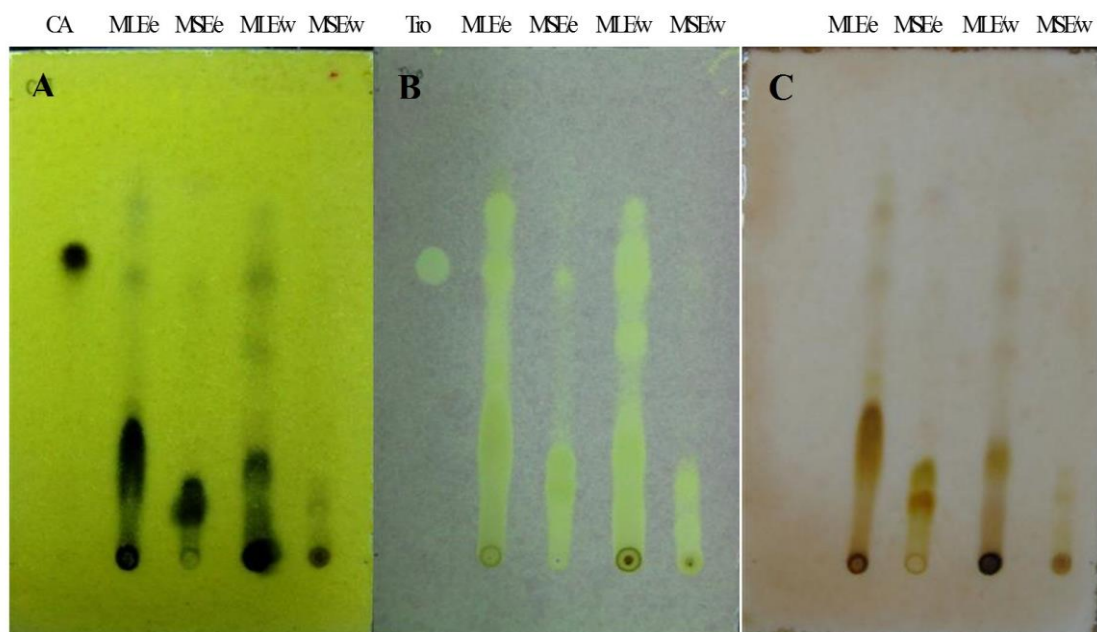
(P), purple; (Bl), blue; (V), violet; (LV), light violet; (Pu), purple; (LPu), light purple; (Bl), blue; ; (BGr), blue green; (NBl), navy blue; (DBl), dark blue; (LBl), light blue; (Br), brown; (Gr), green; (PGr), pale green; (CYL), cadmium yellow light; (CYD), cadmium yellow deep; (P), pink; (LP), light pink; (Y), yellow; (G), grey; (DG), dark grey; (PG), pale grey; ND, not detectable



5) การตรวจหา phenolic compounds และ tannins ด้วย  $\text{FeCl}_3$  reagent ฟ้น TLC plate ใช้ catechin เป็นสารมาตรฐาน เมื่อฉีดพ่นด้วย  $\text{FeCl}_3$  ได้จุดสีน้ำตาลหรือเทาดำที่  $R_f$  0.67 พบในสารสกัดทุกชนิดมี phenolic compounds ในสารสกัดใบมี phenolic compounds มากกว่าในสารสกัดเมล็ด สารบางชนิดเคลื่อนที่ช้ากว่าสารมาตรฐาน catechin (Figure 3.4, A และ Table 3.3) สาร phenolic compounds ในสารสกัดแมงลักคาน่าจะมีโมเลกุลที่ polar มากกว่า catechin

6) การตรวจหา antioxidants ในสารสกัด โดยการพ่น TLC plate ด้วย DPPH reagent และใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน พบว่า phenolic compounds ในสารสกัดทั้งหมดทำปฏิกิริยากับ DPPH ให้สีเหลืองบนพื้นสีค่อนข้างม่วง นั่นคือสารสกัดแมงลักคาน่าจะมีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidants และปรากฏว่าสาร antioxidants ใน Figure 3.4, B มีรูปแบบตรงกับรูปแบบของ phenolics compounds ใน Figure 3.4, A และ MLE/e, MSE/e และ MLE/w มี  $R_f$  0.60 ตรงกับ  $R_f$  ของ Trolox ในสารสกัดทั้งสามนี้จึงน่าจะมี Trolox ประกอบอยู่ด้วย การแยกสารสกัดด้วย TLC แล้วพ่นด้วยสาร DPPH เป็นแนวทางการตรวจหาสารที่มีคุณสมบัติ antioxidants ซึ่งเป็นวิธีตรวจหาคุณสมบัติโดยการแยกจากภาพอัตโนมัติของชีวเป็นแนวทาง (TLC bioautography-guided method) ช่วยให้สามารถระบุได้ว่าในสารสกัดมีสารที่มีศักยภาพเป็น antioxidant มากหรือน้อย เพื่อการแยกสาร (fractionation) ให้ได้สารบริสุทธิ์ในขั้นต่อไป (Vogel, et al., 2005; Gu, Wu and Wang, 2009; Wang, Yue, Tang and Sun, 2012)

7) การตรวจหา cardenolides/cardiac glycosides ฟ้น TLC plate ด้วย Kedde reagent และดูแถบภายใต้แสงสีขาว (visible light) ได้แถบสี ชมพู แดง หรือ ม่วง ซึ่งในสารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคาน่าไม่มีปรากฏมี cardiac glycosides (Figure 3.4, C และ Table 3.3) cardiac glycosides เป็นสาร steroid ชนิดหนึ่ง และเป็นสารที่ค่อนข้าง hydrophilic อาจเคลื่อนที่ไม่ดี ช้า หรือไม่เคลื่อนที่ใน solvent system ระบบ ethyl acetate: methanol: water (81:11:8) ที่ใช้นี้ อาจต้องเลือกใช้ระบบอื่นๆ ซึ่งเคลื่อนที่  $R_f$  ต่างๆ กัน (Heftmann, 1979) หรือในแมงลักคาน่าจะมี cardiac glycosides น้อยมากหรือไม่มีเลย แสดงว่าแมงลักคาน่าเป็นพืชที่ไม่มีพิษต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ



**Figure 3.4** TLC fingerprints of mintweed extracts were developed in ethyl acetate: methanol: water (81:11:8) and sprayed with specific reagents: A, FeCl<sub>3</sub> reagent; B, DPPH reagent; C, Kedde reagent. MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/w, mintweed seed water extract; CA, catechin; Tro, trolox.

**Table 3.3** R<sub>f</sub> values of TLC fingerprints of mintweed extracts detected by FeCl<sub>3</sub>, DPPH and Kedde reagents.

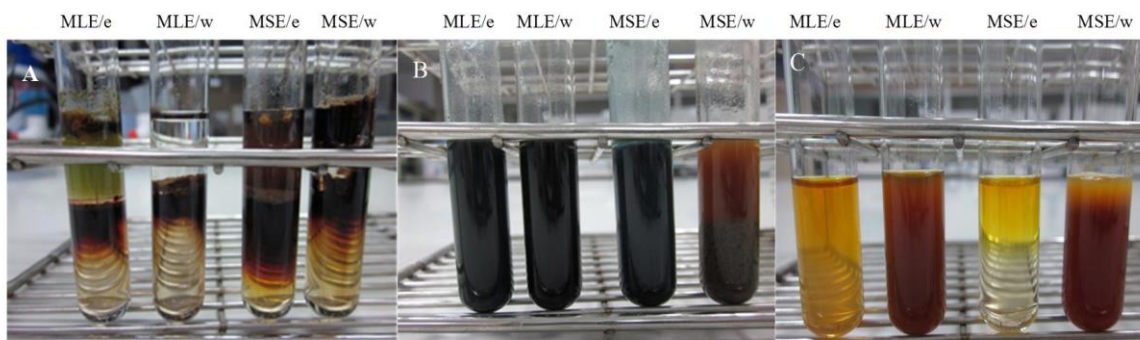
TLC	R <sub>f</sub> of extracts					
	MLE/e	MSE/e	MLE/w	MSE/w	Catechin	Trolox
FeCl <sub>3</sub>	0.77 (DB)	0.23 (B)	0.60 (DB)	0.21 (DB)	0.67 (B)	-
	0.60 (DB)	0.12 (DB)	0.46 (DB)	0.21 (B)		
DPPH	0.73 (Y)	0.60 (Y)	0.75 (Y)	0.07 (Y)	-	0.60 (Y)
	0.60 (Y)	0.20 (Y)	0.66 (Y)	0.13 (Y)		
		0.14 (Y)	0.60 (Y)	0.46 (Y)		
Kedde	0.79 (PBr)	0.25 (Y)	0.65 (PBr)	0.15 (Br)	-	-
	0.73 (PBr)	0.13 (Br)	0.44 (PBr)			
	0.60 (PBr)		0.21 (Br)			
	0.44 (PBr)					
	0.37 (Br)					

MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/w, mintweed seed water extract  
(DB), diluted black; (B), black; (Y), yellow; (Br), brown; (PBr), pale brown

### 3.4.1.2 Specific reagent testing

#### 1) Salkowski test สำหรับ terpenoids

Salkowski test ทดสอบหา terpenoids ในสารสกัด ปฏิกริยาให้ชั้นแถบสีเหลืองแล้ว เปลี่ยนเป็นน้ำตาลแดงระหว่าง interphase ของ ethanol/water กับ chloroform ใน 2 นาที พบสารสกัด ใบและเมล็ดแมงลักคาทั้งหมดมี terpenoids ในสารสกัดเมล็ดมีความเข้มข้นมากกว่าใบ (Figure 3.5, A) terpenoids มีคุณสมบัติทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น เป็นสาร antioxidants, antibiotics, antitumour, insecticides, และบางชนิดเป็นสารหอมระเหย (volatiles) (Raaman, 2006)



**Figure 3.5** A: Terpenoids detection in mintweed extracts by Salkowski test. B: Tannins detection in mintweed extracts by Ferric chloride test. C: Alkaloids detection in mintweed extracts by Dragendorff reagent test. MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract

#### 2) Ferric chloride test สำหรับ tannins

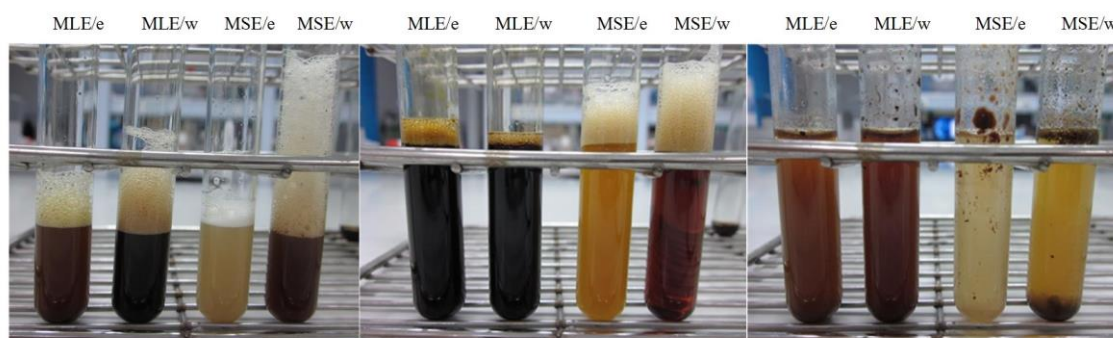
Ferric chloride ทำปฏิกิริยากับ tannins ให้สี brownish green หรือ blue-black พบว่า MLE/e, MLE/w มี tannins และ MSE/e มี tannins เข้มข้นมาก ส่วน MSE/w ไม่มี tannins (Figure 3.5, B) tannins เป็นสาร polyphenolic compound ในพืชหลายชนิด tannins เป็นสารที่ทำให้พืชมีรสขม ป้องกันพืชจากการทำลายโดยแมลง และใช้ tannins เป็น astringent (Ashok and Upadhyaya, 2012)

#### 3) Dragendorff reagent test สำหรับ alkaloids

Dragendorff's reagent (potassium iodide-bismuth nitrate) ใช้อย่างกว้างขวางเพื่อ ตรวจหา alkaloids โดย heavy metal atom ( $\text{BiI}_4$ ) รวมกับ nitrogen ใน alkaloid ได้ ion pairs ที่ไม่ละลาย ได้ตะกอนสาร complex สีส้มแดง ในสาร MLE/e, MLE/w และ MSE/e ไม่มี alkaloids แต่ MSE/w มี alkaloids (Figure 3.5, C)

#### 4) Frothing test สำหรับ saponins

Saponins พบมีในพืชหลายชนิด เป็นกลุ่ม amphipathic glycosides ในโมเลกุลมีหน่วย hydrophilic glycoside moieties กับ lipophilic triterpene derivative มีลักษณะพิเศษคือ เมื่อเขย่าอย่างแรงในสารละลายน้ำ เกิดฟอง (froth) (Hostettmann and Marston, 1995; Silva et al., 1998) ซึ่งแสดงว่ามี saponins พบว่า MLE/e และ MLE/w เกิดฟอง และ MSE/w มีฟองมากที่สุด เป็น honeycomb สูงกว่า 2 นิ้วจากผิวของเหลวและเสถียรอยู่ยาวนานถึง 10 นาที ในขณะที่ MLE/e และ MLE/w ให้ honeycomb สูงประมาณ 1 cm (Figure 3.6, A) แต่เมื่อยืนยันด้วยการเติม NaOH พบ MSE/e มีฟองมากกว่า MSE/w, MLE/e และ MLE/w (Figure 3.6, B) และ เมื่อย่อย saponin glycoside ด้วย HCl ให้เป็น aglycone sapogenin ซึ่งไม่มีฟองหรือมีฟองน้อยมาก สารสกัดทั้ง 4 ชนิดไม่มีฟอง (Figure 3.6, C) แสดงว่าสารสกัดแมงลักทุกชนิดมี saponins ในปริมาณที่ต่างกัน (Trease and Evans, 1983)



**Figure 3.6** Frothing test of mintweed extracts. A, after shaking, B, after adding NaOH and shaking, C, after adding HCl, boiling for 10 min and shaking. MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract.

สารพฤกษเคมีในสารสกัดใบและเมล็ดแมงลักซึ่งตรวจหาด้วยเทคนิค TLC แล้วพัฒนาสี (develop) ด้วยการฉีดพ่น TLC plate ด้วยสารตรวจเฉพาะ และเทคนิคทดสอบปฏิกิริยากับสารพิเศษ สรุปผลการตรวจหาสารพฤกษเคมีในสารสกัดได้ดังปรากฏในสรุป Table 3.4 พบว่ามีสาร phenolics และ terpenoids ในสารสกัดทั้ง 4 ชนิด (MLE/e, MLE/w, MSE/e, MSE/w) มี essential oils และ tannins ใน MLE/w, MLE/e และ MSE/e แต่ไม่พบมีใน MSE/w ส่วน saponins พบมีเฉพาะในสารสกัดเมล็ดเท่านั้นทั้งใน MSE/w และ MSE/e และ alkaloids พบมีเฉพาะใน MSE/w สารสกัดทั้ง 4 ชนิดไม่มี coumarins, anthraquinones และ cardiac glycosides ยิ่งกว่านั้นสารสกัดแมงลักจากทั้ง 4 ชนิดมีสารพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidants

**Table 3.4** Summary of phytochemical screening of mintweed extracts isolated by Thin Layer chromatography (TLC) and specific test detection.

Phytochemical category	MLE/e	MLE/w	MSE/e	MSE/w
Phenolics <sup>a</sup>	+	+	+	+
Terpenoids <sup>b</sup>	+	+	+	+
Essential oils <sup>a</sup>	+	+	+	-
Tannins <sup>b</sup>	+	+	+	-
Saponins <sup>b</sup>	-	-	+	+
Alkaloids <sup>b</sup>	-	-	-	+
Coumarins <sup>a</sup>	-	-	-	-
Antraquinones <sup>a</sup>	-	-	-	-
Cardiac glycosides <sup>a</sup>	-	-	-	-
Antioxidant activity <sup>a</sup>	+	+	+	+

“+” present; “-” absent; <sup>a</sup>Detected by TLC; <sup>b</sup>detected by TLC and tests with specific reagents. MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract.

สารสกัดแมงลักคามี phenolics, terpenoids, saponins tannins และ essential oils มาก แต่ไม่มี alkaloids หรืออาจจะมีแต่น้อยมาก ซึ่งการแยกและตรวจหาสารพฤกษเคมีในสารสกัดแมงลักคานี้สอดคล้องกับหลายรายงานการแยกสารสกัดจากแมงลักคา (Das Prabhat, et al., 2009; Mbatchou, Abdullatif and Glover, 2010; Moreira, de Oliveira Lima, Wanderley, Carmo, and de Souza, 2010; Pachkore and Dhale, 2011; Shaikat, Hossain and Azam, 2012) มีรายงานว่าส่วนประกอบของ essential oils ของแมงลักคาคือ สาร sabinene, limonene, bicyclogermacrene,  $\beta$ -phellandrene (Azevedo et al., 2001), 1,8-cineole, (*E*)-caryophyllene, และ spathulenol (Oliveira et al., 2005) สารสกัดเหล่านี้มีศักยภาพต้านเชื้อรา (Singha and Handiquea, 1997), ต้านการอักเสบ (Grassia, et al., 2006) มาเลเรีย และเชื้อจุลินทรีย์ (Asekun, Ekundayoa and Adeniyib, 1999; Khamsan et al., 2011) ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Manosroi, Dhamtano, and Manosri, 2006) และชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (Cha and Kim, 2012) ส่วน Terpenes และ tanins มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Joshi et al., 2008; Akiyama, Fujii, Yamasaki, Oono, and Iwatsuki, 2001) ต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ (antiproliferation) (de Almeida, Rios-Luci, Padron, and Palermo, 2010; de Melo, et al., 2010) และหยุดวัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest) ทำให้เซลล์ฆ่าตัวตายแบบ apoptosis (Chen et al., 2009; Chen et al., 2010) และ มีรายงานว่า saponins ยับยั้งการเจริญของเซลล์และทำให้เซลล์ apoptosis (Tin, Cho, Chan, James and Ko, 2007) ส่วน alkaloids เป็นสารต้านเนื้องอก (Zupko et al., 2009) และชักนำให้เซลล์เกิด apoptosis

(Li, et al., 2008) ดังนั้นสารสกัดแมงลักคามีสาร bioactive หลายชนิดที่น่าจะนำไปสกัดแยกและวิจัยต่อไป เพื่อพัฒนาใช้เป็นสารรักษาอาการ/โรคได้หลายอย่าง

### 3.4.2 ปริมาณ Total phenolic compounds (TPC) และ Total flavonoid (TF) contents ในสารสกัดแมงลักคา

ปริมาณทั้งหมดของ phenolic compounds (TPC) และของฟลาโวนอยด์ (TF) ในสารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคาค้างใน Table 3.5 ปรากฏว่าสารสกัดจากใบแมงลักคามีสาร TPC และ TF มากกว่าสารสกัดจากเมล็ด และสกัดด้วย 70% ethanol ให้ปริมาณ TPC และ TF มากกว่าสกัดด้วยน้ำ

ปริมาณ TPC ในสารสกัดแมงลักคาเปรียบเทียบจากปริมาณมากไปหาน้อยตามลำดับดังนี้ MLE/e ( $370.02 \pm 7.10$  mg GAE/g) > MLE/w ( $319.45 \pm 8.67$  mg GAE/g) > MSE/e ( $135.92 \pm 2.17$  mg GAE/g) > MSE/w ( $77.02 \pm 2.05$  mg GAE/g) (Table 3.5, column 2) และ

ปริมาณ TF ในสารสกัดแมงลักคาพบมีจากมากไปหาน้อยตามลำดับดังนี้ MLE/e ( $278.81 \pm 3.40$  mg CAE/g) > MLE/w ( $240.81 \pm 5.01$  mg CAE/g) > MSE/e ( $86.28 \pm 0.67$  mg CAE/g) > MSE/w ( $15.38 \pm 0.21$  mg CAE/g) (Table 3.5, column 3)

**Table 3.5** Total phenolic compounds and total flavonoid contents of mintweed (*H. suaveolens*) extracts. Data were mean  $\pm$  SD., (n = 6).

Extract	Total phenolics mg GAE/g dried extract	Total flavonoids mg CAE/g dried extract
MLE/e	$370.07 \pm 7.10^a$	$278.81 \pm 3.40^a$
MLE/w	$319.45 \pm 8.67^b$	$240.81 \pm 5.01^b$
MSE/e	$135.92 \pm 2.17^c$	$86.28 \pm 0.67^c$
MSE/w	$77.02 \pm 2.05^d$	$15.38 \pm 0.21^d$

Different letters within the same column were significant difference ( $p < 0.05$ ). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract

เห็นได้ว่า 70% ethanol สามารถสกัดสาร TPC และ TF จากใบและเมล็ดแมงลักคาได้มากกว่าสกัดด้วยน้ำ ในทำนองเดียวกันสารสกัดจากใบมี TPC และ TF มากกว่าสารสกัดจากเมล็ด การวิเคราะห์ปริมาณของ TPC และ TF นี้ได้ผลสอดคล้องไปในทางเดียวกันกับการแยกสารสกัดด้วยเทคนิค TLC (ข้อ 3.4.1.1) และ การทดสอบสารสกัดด้วยสารพิเศษ (ข้อ 3.4.1.2) สาร polyphenols และ flavonoids เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสารหลักของพืชที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidants (Rice-

vans, Miller, and Paganga, 1997; Heim, Tagliaferro, and Bobilya, 2002; Stevenson and Hurst, 2007; Wojdylo, Oszmianski, and Czemerys, 2007)

### 3.4.3 Antioxidant activity ของสารสกัดแมงลักคา

#### 3.4.3.1 Free radical scavenging activity (DPPH)

สารประกอบธรรมชาติหลายชนิดในกลุ่มสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) เช่น phenolic compounds, terpenoids และ alkaloids มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity) โดยกำจัดอนุมูลอิสระ (free radicals) DPPH<sup>•</sup> สาร antioxidants เป็นผู้ให้ hydrogen แก่ DPPH<sup>•</sup> ได้ DPPH-H โมเลกุลที่เสถียร สีของสารในปฏิกิริยาเปลี่ยนจาก สีม่วงเป็นสีเหลือง และลดการดูดแสงที่ A-515 nm กำหนดหา % scavenging activity ในการกำจัด free radicals และค่าความเข้มข้นที่กำจัด/ยับยั้งได้ 50% (half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>)) ซึ่งเป็นปริมาณของสารที่ต้องการใช้กำจัดครึ่งหนึ่งของ free radicals ที่มีในกระบวนการทางชีววิทยา พบว่า scavenging activity ของสารสกัดใบแมงลักคามีฤทธิ์ กำจัด free radicals ได้มากกว่าสารสกัดจากเมล็ดแมงลักคา และ สารสกัดด้วย 70% ethanol ทั้งจากใบและเมล็ดแมงลักคากำจัด radicals ได้มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ประสิทธิภาพกำจัด free radical DPPH<sup>•</sup> ของสารสกัดแมงลักคาเรียงตามลำดับจากค่า IC<sub>50</sub> ดังนี้ MLE/e (9.26 ± 0.08 ug/ml) > MLE/w (10.89 ± 0.70 ug/ml) > MSE/e (32.8 5± 0.05 ug/ml) > MSE/w (147.17 ± 1.67 ug/ml) (Table 3.6)

เมื่อเปรียบเทียบ IC<sub>50</sub> ของสารสกัดแมงลักคากับสารมาตรฐาน catechin และ ascorbic acid ได้ดังนี้

IC <sub>50</sub> (ug/mL)		IC <sub>50</sub> (ug/mL)	
MLE/e < Catechin	3.47 เท่า	MLE/e < Ascorbic acid	2.20 เท่า
MLE/w < Catechin	4.08 เท่า	MLE/w < Ascorbic acid	2.58 เท่า
MSE/e < Catechin	12.30 เท่า	MSE/e < Ascorbic acid	7.78 เท่า
MSE/w < Catechin	55.12 เท่า	MSE/w < Ascorbic acid	34.87 เท่า

**Table 3.6** DPPH free radical scavenging activities of mintweed (*H. suaveolens*) extracts and of the standards, catechin and ascorbic acid. Data were mean  $\pm$  SD., (n = 3).

Sample	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	% inhibition	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
MLE/e	5	28.56 $\pm$ 0.66	9.26 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>
	7.5	41.04 $\pm$ 0.35	
	10	53.39 $\pm$ 0.50	
	12.5	66.89 $\pm$ 0.50	
	15	78.85 $\pm$ 1.10	
MLE/w	5	24.01 $\pm$ 0.28	10.89 $\pm$ 0.70 <sup>d</sup>
	7.5	33.64 $\pm$ 0.56	
	10	46.06 $\pm$ 0.93	
	12.5	58.10 $\pm$ 0.36	
	15	68.17 $\pm$ 0.58	
MSE/e	2.5	5.93 $\pm$ 0.10	32.85 $\pm$ 0.05 <sup>e</sup>
	12.5	23.85 $\pm$ 0.78	
	25	40.58 $\pm$ 0.51	
	37.5	57.16 $\pm$ 0.65	
	50	71.94 $\pm$ 0.50	
MSE/w	50	18.21 $\pm$ 0.52	147.17 $\pm$ 1.67 <sup>f</sup>
	100	34.84 $\pm$ 1.71	
	150	53.22 $\pm$ 0.77	
	200	66.83 $\pm$ 1.62	
	250	81.33 $\pm$ 0.31	
Catechin	2	40.83 $\pm$ 1.42	2.67 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
	3	55.42 $\pm$ 0.43	
	4	66.06 $\pm$ 1.25	
	5	79.96 $\pm$ 1.18	
	6	91.95 $\pm$ 0.51	
Ascorbic acid	2	25.02 $\pm$ 1.33	4.22 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
	3	35.53 $\pm$ 0.48	
	4	47.14 $\pm$ 0.10	
	5	58.81 $\pm$ 0.37	
	6	70.74 $\pm$ 0.55	

Different letters within the same column were significant difference ( $p < 0.05$ ). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; ; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract; CA, catechin; AA, ascorbic acid



มีรายงานสารสกัดต้นแมงลักคั่วด้วย methanol มีประสิทธิภาพต่อ free radical scavenging activity สูง (ค่า  $IC_{50}$  ต่ำ)  $IC_{50}$  7.49  $\mu\text{g/ml}$  (Ghaffari, Ghassam, Nayaka, Kini, and Prakash, 2014) สารสกัดใบแมงลักคั่วด้วย methanol มีค่า  $IC_{50}$  14.04  $\mu\text{g/ml}$  (Gavani and Paarkh, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยนี้ซึ่งสกัดด้วย ethanol แต่ Nantinon et al. (2007) รายงาน radical scavenging activity ของ essential oil แมงลักคั่ว มีค่า  $IC_{50}$  ค่อนข้างสูง (3.27  $\text{mg/ml}$  หรือ activity ต่ำ) จึงเป็นไปได้ว่าความสามารถในการกำจัด free radicals ของสารสกัดแมงลักคั่วที่แตกต่างกัน อาจเนื่องจาก สายพันธุ์ย่อย (variety) ของพืช สถานที่พืชเจริญ (location) ฤดูเก็บเกี่ยวพืช และวิธีการเตรียมสารสกัดที่ต่างกัน

### 3.4.3.2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

FRAP เป็นวิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นทั้งหมดของ antioxidants ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยสาร antioxidants เปลี่ยน ferric ให้เป็น ferrous ซึ่ง FRAP เป็นตัวบ่งชี้ศักยภาพของ antioxidant activity ของสารสกัด (Benzie and Szeto, 1999) สารสกัดใบแมงลักคั่วมีค่า FRAP สูงกว่าสารสกัดเมล็ด ประมาณ 4-6 เท่า และสารสกัดใบและเมล็ดด้วย 70% ethanol มีค่า FRAP สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ค่า FRAP ของสารสกัดแมงลักเรียงจากมากไปน้อยดังนี้  $\text{MLE/e}$  ( $8.52 \pm 0.44 \mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ ) >  $\text{MLE/w}$  ( $6.27 \pm 0.03 \mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ ) >  $\text{MSE/e}$  ( $2.01 \pm 0.35 \mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ ) >  $\text{MSE/w}$  ( $1.36 \pm 0.00 \mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ ) (Table 3.7)

**Table 3.7** Ferric reducing ability power (FRAP) values of mintweed (*H. sauveolens*) extracts, catechin and ascorbic acid. Data were mean  $\pm$  SD., (n = 3).

Sample/standard	FRAP ( $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ dried extract)
MLE/e	$8.52 \pm 0.44^c$
MLE/w	$6.27 \pm 0.03^d$
MSE/e	$2.01 \pm 0.35^e$
MSE/w	$1.36 \pm 0.00^f$
Catechin	$16.26 \pm 0.65^b$
Ascorbic acid	$19.31 \pm 0.22^a$

Different letters within the same column were significant difference ( $p < 0.05$ ). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract; CA, catechin; AA, ascorbic acid

เมื่อเปรียบเทียบค่า FRAP ระหว่างของสารสกัดแมงลักคั่วและสารมาตรฐาน Catechin และ Ascorbic acid จะเห็นว่า FRAP ของสารสกัดมีค่าน้อยกว่าของสารมาตรฐานดังนี้

FRAP (uM FeSO <sub>4</sub> /mg dried extract)	FRAP (uM FeSO <sub>4</sub> /mg dried extract)
MLE/e < Catechin 1.91 เท่า	MLE/e < Ascorbic acid 2.27 เท่า
MLE/w < Catechin 2.59 เท่า	MLE/w < Ascorbic acid 3.08 เท่า
MSE/e < Catechin 8.09 เท่า	MSE/e < Ascorbic acid 9.61 เท่า
MSE/w < Catechin 12.00 เท่า	MSE/w < Ascorbic acid 14.20 เท่า

Antioxidant activity ของสารสกัดแมงลักคั่ววิเคราะห์โดยกิจกรรม DPPH radical scavenging และ กิจกรรม ferric reducing ability power สอดคล้องไปในทางเดียวกัน นั่นคือ สารสกัดใบแมงลักคั่วมี antioxidant activity มากกว่าสารสกัดเมล็ด และสารสกัดด้วย 70% ethanol มี antioxidant activity มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (Table 3.8) แม้ antioxidant activity ของสารสกัดแมงลักคั่วน้อยกว่าของสารมาตรฐาน อาจเนื่องจากสารสกัดเป็นสารสกัดหยาบ (crude extracts) ไม่ใช่สารบริสุทธิ์เช่นสารมาตรฐาน ซึ่งอาจมีสารบางสารมีผลกระทบต่อปฏิกิริยาของ DPPH reagent และ FRAP reagent

**Table 3.8** Summary of antioxidant activities of mintweed extracts analyzed by DPPH radical scavenging and ferric reducing ability power (FRAP).

Sample	DPPH IC <sub>50</sub> (ug/ml)	FRAP (uM FeSO <sub>4</sub> /mg extract)
MLE/e	9.26 ± 0.08 <sup>c</sup>	8.52 ± 0.44 <sup>c</sup>
MLE/w	10.89 ± 0.70 <sup>d</sup>	6.27 ± 0.03 <sup>d</sup>
MSE/e	32.85 ± 0.05 <sup>e</sup>	2.01 ± 0.35 <sup>e</sup>
MSE/w	147.17 ± 1.67 <sup>f</sup>	1.36 ± 0.00 <sup>f</sup>
Catechin	2.67 ± 0.06 <sup>a</sup>	16.26 ± 0.65 <sup>b</sup>
Ascorbic acid	4.22 ± 0.01 <sup>b</sup>	19.31 ± 0.22 <sup>a</sup>

Data expressed as mean ± SD (n = 3), statistical analysis was performed by ANOVA, different letters within the same column were significantly different (p < 0.05).

MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract; CA, catechin; AA, ascorbic acid

### 3.4.4 Cytotoxicity ของสารสกัดแมงลักคา

ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารพฤษเคมีสามารถทดสอบเบื้องต้นด้วย Brine shrimp lethality assay (BSLA) ใช้กุ้งฝอย *Artemia salina* เป็นสัตว์ต้นแบบทดลอง นอกจากทดสอบ cytotoxicity แล้ว BSLA ยังทดสอบ pharmacological activity ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ จากพืชและสัตว์ได้ด้วย (Pelka, Danzl, Distler, and Petschelt, 2000; Carbello, Hernandez, Perez, and Garcia-Gravalos, 2002)

ในการทดสอบ cytotoxicity ของสารสกัดแมงลักคาด้วย BSLA พบว่า MLE/e มีความเป็นพิษสูงสุด ค่า lethal concentration 50,  $LC_{50}$  ความเข้มข้นทำให้กุ้งฝอยตาย 50% เท่ากับ 360.48 ug/ml ที่ 24 ชม รองลงมาคือ MSE/w และ MSE/e ซึ่งมีค่า  $LC_{50}$  470.60 ug/ml และ  $LC_{50}$  708.26 ug/ml ตามลำดับ ส่วน MLE/w มีค่า  $LC_{50}$  1,282.47 ug/ml (Table 3.9)

อย่างไรก็ตาม cytotoxicity ของสารสกัดแมงลักคาสูงกว่า cytotoxicity ของ Catechin ซึ่งมี  $LC_{50}$  2,332.00 ug/ml ประมาณ 2 – 6 เท่า แต่ น้อยกว่า cytotoxicity ของ Ascorbic acid มาก ซึ่งมีค่า  $LC_{50}$  13.77 ug/ml ประมาณ 26-93 เท่า (Table 3.10) ประสิทธิภาพ cytotoxicity ของ ascorbic acid สูง ทั้งที่ใช้ความเข้มข้นน้อย อาจเป็นเพราะ ascorbic acid เป็นสารบริสุทธิ์ (Hanashima and Namiki, 1999) แต่ในสารสกัดแมงลักคาไม่ทำให้กุ้งฝอยตาย หรือตายน้อยมาก ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยเฉพาะ Ascorbic acid สารสกัดแมงลักคาจึงมีความเป็นพิษต่อกุ้งฝอย หรือเซลล์ปกติน้อยมาก และสามารถเลือกใช้ประสิทธิภาพต่างๆ ของสารสกัดแมงลักคาใบหรือเมล็ด หรือสกัดด้วย ethanol หรือนำประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ตามประเด็นที่ต้องการได้

**Table 3.9** Cytotoxic effect of mintweed extracts assayed by brine shrimp lethality assay (BSLA) at 24 h. Data were mean  $\pm$  S.D., (n = 60).

Extract	Conc. (ug/mL)	% Mortality	LC <sub>50</sub> (ug/mL)
MLE/e	250	1.67 $\pm$ 0.40	360.48 (344.02-381.05)
	300	11.67 $\pm$ 0.75	
	350	35.00 $\pm$ 1.87	
	400	83.33 $\pm$ 1.03	
MLE/w	500	3.33 $\pm$ 0.51	1,282.47 (1118.26-1457.79)
	1000	23.33 $\pm$ 1.50	
	1500	75.00 $\pm$ 0.54	
	2000	83.33 $\pm$ 1.86	
MSE/e	250	8.33 $\pm$ 0.98	708.26 (594.32-874.67)
	500	18.33 $\pm$ 0.75	
	750	55.00 $\pm$ 1.87	
	1000	80.00 $\pm$ 2.45	
MSE/w	100	1.67 $\pm$ 0.40	470.60 (294.94-808.63)
	250	8.33 $\pm$ 0.98	
	500	45.00 $\pm$ 1.38	
	1000	100.00 $\pm$ 0.00	
Catechin	2000	43.33 $\pm$ 1.21	2,332.00 (1848.36-2736.94)
	4000	65.00 $\pm$ 1.04	
	6000	85.00 $\pm$ 0.83	
	8000	100.00 $\pm$ 0.00	
Ascorbic acid	5	11.67 $\pm$ 1.16	13.77 (11.44-16.70)
	10	20.00 $\pm$ 1.41	
	20	73.33 $\pm$ 1.50	
	40	100.00 $\pm$ 0.00	

MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract; CA, catechin; AA, ascorbic acid

**Table 3.10** Comparison of cytotoxic efficacy (LC<sub>50</sub>) among the extracts and the antioxidant standards, catechin and ascorbic acid.

Extract	LC50 (ug/ml)	Cytotoxic efficacy (fold) as compared to standards	
MLE/e	360.48	MLE/e > CA	6.47
		< AA	26.18
MLE/w	1,282.47	MLE/w > CA	1.80
		< AA	93.00
MSE/e	708.26	MSE/e > CA	3.29
		< AA	51.44
MSE/w	470.60	MSE/w > CA	4.96
		< AA	34.00
Catechin	2,332.00		
Ascorbic acid	13.77		

MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/w, mintweed seed water extract; CA, catechin; AA, ascorbic acid

### 3.5 สรุปผลการทดลอง

สารทุติยภูมิ/พฤษเคมีในสารสกัดแมงลักคาแยกโดย TLC และ specific reagent test พบมีสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ดังนี้ phenolics และ terpenoids พบมีทั้งในสารสกัดใบและเมล็ดสกัดด้วย ethanol และน้ำ essential oils และ tannins ไม่มีในสารสกัดเมล็ดสกัดด้วยน้ำ saponins และ alkaloids พบมีเฉพาะในสารสกัดเมล็ด สารสกัดแมงลักคาทุกชนิดไม่พบมี coumarins, anthraquinones และ cardiac glycosides สารสกัดแมงลักคาทุกชนิดมีคุณสมบัติ antioxidant activity

สารสกัดใบแมงลักคามี total phenolic compounds และ total flavonoids ปริมาณมากกว่าสารสกัดเมล็ด และสอดคล้องกับคุณสมบัติ antioxidant activity ซึ่งวิเคราะห์กิจกรรมด้าน free radical scavenging และ ferric reducing ability power สารสกัดใบด้วย ethanol มี cytotoxicity มากที่สุด ซึ่งตรงข้ามกับสารสกัดใบด้วยน้ำมี cytotoxicity น้อยที่สุด เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน โดยเฉพาะกับ ascorbic acid สารสกัดแมงลักไม่มี cytotoxicity ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตปกติ

ปริมาณ total phenolic compounds, total flavonoids, free radical scavenging (DPPH), ferric reducing ability power และ cytotoxicity สรุปปรวมใน Table 3.11

**Table 3.11** Summary of some components and properties of mintweed (*H. sauveolens*) leaf and seed extracts.

<b>Extract</b>	<b>TPC</b> mg GAE/g	<b>TF</b> mg CAE/g	<b>DPPH</b> IC <sub>50</sub> (ug/ml)	<b>FRAP</b> uM FeSO <sub>4</sub> /mg	<b>Cytotoxicity</b> LC <sub>50</sub> (ug/ml)
<b>MLE/e</b>	370.07 ± 7.10 <sup>a</sup>	278.81 ± 3.40 <sup>a</sup>	9.26 ± 0.08 <sup>c</sup>	8.52 ± 0.44 <sup>c</sup>	360.48 (344.02-381.05)
<b>MLE/w</b>	319.45 ± 8.67 <sup>b</sup>	240.81 ± 5.01 <sup>b</sup>	10.89 ± 0.70 <sup>d</sup>	6.27 ± 0.03 <sup>d</sup>	1,282.47 (1118.26-1457.79)
<b>MSE/e</b>	135.92 ± 2.17 <sup>c</sup>	86.28 ± 0.67 <sup>c</sup>	32.85 ± 0.05 <sup>e</sup>	2.01 ± 0.35 <sup>e</sup>	708.26 (594.32-874.67)
<b>MSE/w</b>	77.02 ± 2.05 <sup>d</sup>	15.38 ± 0.21 <sup>d</sup>	147.17 ± 1.67 <sup>f</sup>	1.36 ± 0.00 <sup>f</sup>	470.60 (294.94-808.63)
<b>Catechin</b>	-	-	2.67 ± 0.06 <sup>a</sup>	16.26 ± 0.65 <sup>b</sup>	2,332.00 (1848.36-2736.94)
<b>Ascorbic acid</b>	-	-	4.22 ± 0.01 <sup>b</sup>	19.31 ± 0.22 <sup>a</sup>	13.77 (11.44-16.70)

Different letters within the same column were significant difference ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract



## เอกสารอ้างอิง

- Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol.* 18: 265-267.
- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T. and Iwatsuki, K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemotherapy.* 48(4): 487-491.
- Asekun, O.T., Ekundayo, O. and Adeniyib, B.A. (1999). Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. *Fitoterapia.* 70: 440-442.
- Ashok, P.K. and Upadhyaya, K. (2012). Tannins are astringent. *J Pharma Phytochem.* 1(3): 45-50.
- Azevedo, N.R., Campos, I.F.P., Ferreira, D.H., Portes, T.A., Santos, S.C., Seraphin, J.C., Paula, J.R. and Ferri, P.H. (2001). Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochem.* 57: 733-736.
- Balasundram, N., Sundram, K., and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99: 191-203.
- Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidant power the FRAP assay. *Anal Biochem.* 239: 70-76.
- Benzie, I.F.F. and Szeto, Y.T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agri Food Chem.* 47: 633-636.
- Carbello, J.L., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P., and Garcia-Gravalos, M.D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* 2: 17-21.
- Cha, J. and Kim, J-Y. (2012). Essential oil from *Cryptomeria japonica* induces apoptosis in human oral epidermoid carcinoma cells via mitochondrial stress and activation of caspases. *Molecules.* 17: 3890-3901.
- Chen, K.S., et al. (2009). Tannic acid-induced apoptosis and enhanced sensitivity to arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells. *Leukemia Res.* 33(2): 297-307.
- Chen, H-L., et al. (2010). Terpenoids induce cell cycle arrest and apoptosis from the stems of *Celastrus kusanoi* associated with reactive oxygen species. *J Agric Food Chem.* 58: 3808-3812.
- Chitra, S., Patil, M.B. and Ravi, K. (2009). Wound healing activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). *Inter J Pharm Tech Res.* 1(3): 737-744.

- Danmalam, U. H., Abdullahi, L. M., Agunu, A. and Musa, K. Y. (2009). Acute toxic studies and hypoglycemic activity of the methanol extract of the leaves of *Hyptis suaveolens* Poit. (Lamiaceae). Nigerian J Pharma Sci. 8(2): 87-92.
- Das Prabhat, K. et al. (2009), Phytochemical and pharmacological investigation of the protective effect of plant *Hyptis suaveolens* against duodenal ulceration. J Global Pharm Tech. 1(1): 82-87.
- de Almeida, M.T., Rios-Luci, C., Padron, J.M. and Palermo, J.A. (2010). Antiproliferative terpenoids and alkaloids from the roots of *Maytenus vitis-idaea* and *Maytenus spinosa*. Phytochem. 71(14-15): 1741-1748.
- de Melo, J.G., et al., (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. Molecules. 15: 8534-8542.
- Doughari, J.H. (2012). Phytochemicals: Extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. In phytochemicals -a global perspective of their role in nutrition and health, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0, InTech, available from: [andhealth/phytochemicals-extraction-methods-basic-structures-and-mode-of-action-as-potentialchemotherapeutic](#)
- Finney, D.J. (1971). Probit analysis, 25th edit. Cambridge University Press, pp 350. ISBN 052108041X.
- Gavani, U. and Paarkh, P.M. (2008). Antioxidant activity of *Hyptis suaveolens* Poit. Inter J pharma. 4(3): 227-229.
- Gibbons, S., and Gray, A.I. (1998). Isolation by planar chromatography. In J. P. Cannell (ed). Natural Products Isolation. Humana Press. New Jersey. pp 209-245.
- Ghaffari, H., Ghassam, B.J., and Prakash, H.S. (2012). Hepatoprotective and cytoprotective properties of *Hyptis suaveolens* against oxidative stress-induced damage by  $\text{CCl}_4$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Asian Pacific J Trop Med. 5(11): 868-874. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60162-X.
- Ghaffari, H., Ghassam, B.J., Nayaka, S.C., Kini, K.R., and Prakash, H.S. (2014). Antioxidant and neuroprotective activities of *Hyptis suaveolans* (L.) Poit. Against oxidative stress-induced neurotoxicity. Cell Mol Neurobiol. 34(3): 323-331. DOI 10.1007/s10571-013-0016-7.
- Grassia, P., Reyes, T.S. U., Sosac, S., Tubaro, A., Hoferd, O. and Zitterl-Eglseera. K. (2006). Anti-inflammatory activity of two diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. p.165-170.
- Gu, L., Wu, T., and Wang, Z. (2009). TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit



- of *Perilla frutescens* var. *acuta*. LWT-Food Sci Tech. 42: 131-136.
- Gupta, V.K. and Sharma, S.K. (2006). Plants as natural antioxidants. Nat Prod Radiance. 5(4): 326-334.
- Heftmann, E. (1976). Chromatography of steroids. Chapter 16 Cardnolides and bufadienolides, pp. 112–126. J Chromatography Library, vol. 8. Elsevier/North-Holland Inc., New York, N.Y.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., and Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidant: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J Nat Biochem. 13: 572-584.
- Herborne, J.B. (1973). Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall, London: pp 278.
- Harborne, J.B. (1998). Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. London, UK: Chapman and Hall, pp: 302.
- Hostettmann, K. and Marston, A. (1995). Saponins. Cambridge University Press. pp 564. ISBN 0-521-32970-1. OCLC 29670810
- Janchen, D.E. (1991). Instrumental thin-layer chromatography. In handbook of thin-layer chromatography, Marcel Dekker, Inc. New York, USA, pp. 113-134.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., and Wimmer, H. (1990). Thin-layer chromatography: Reagents and detection methods. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany. pp 497.
- Joshi, S., Chanotiya, C.S., Agarwal, G., Prakash, O., Pant, A.K. and Mathela, C.S. (2008). Terpenoid compositions, and antioxidant and antimicrobial properties of the rhizome essential oils of different *Hedychium* species. Chem Biodiversity. 5(2): 299-309.
- Kennedy, D.O. and Wightman, E.L. (2011). Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. Adv Nutr. 2: 32–50.
- Khalil.M.Y., Moustafa, A.A., and Naguib, N.Y. (2007). Growth, phenolic compounds and antioxidant activity of some medicinal plants grown under organic farming condition. World J Agric Sci. 3(4): 451-457.
- Khamsan, S., et al. (2011). Antimalarial, anticancer, antimicrobial activities and chemical constituents of essential oil from the aerial parts of *Cyperus kyllingia* Endl. Records of Nat Prod. 5(4): 324-327
- Kris-Etherton, P.M, Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., et al., (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am J Med 113(9B): 72S-88S.

- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process.* 89:217-233. 1(3): 404-409.
- Li, et al. (2008). Alkaloid from *Angelicae dahuricae* inhibits HeLa cell growth by inducing apoptosis and increasing caspase-3 activity. *Labmedicine.* 39(9): 540-546.
- Liu, M., Li, Q., Weber, C., Lee, C. Brown, J., and Liu, R. (2002). Antioxidant and antioxidative activities of raspberries. *J Agric Food Chem.* 50: 2926-2930.
- Macherey Nagel GmbH & Co. Basic principles of TLC. p 312. Available at [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)
- Manosroi, J., Dhumtanom, P. and Manosroi, A. (2006). Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Letters.* 235(1): 114-120.
- Mattaus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J Agric Food Chem.* 50: 3444-3451.
- Mbatchou, V.C., Abdullatif, S. and Glover, R. (2010). Phytochemical screening of solvent extracts from *Hyptis suaveolens* LAM for fungal growth inhibition. *Pakistan J Nutr.* 9(4): 358-361.
- Mishra, S.B., Verma, A., Mukerjee, A. and Vijayakumar, M. (2011). Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pacific J Trop Med.* 4(9): 689-693.
- Moreira, A.C.P., de Oliveira Lima, E., Wanderley, P.A., Carmo, E.S., de Souza, E.L. (2010). Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. *J Microb.* 41: 28-33.
- Nantitanon, W., Chowwanapoonpohn, S. and Okonogi, S. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Hyptis suaveolens* essential oil. *Scientia Pharm.* 75: 35-46.
- Nayak, P.S., Kar, D.M. and Nayak, S P. (2013). Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of aerial parts of *Hyptis suaveolens* poit. *African J Pharma Pharm.* 7(1): 1-7. DOI: 10.5897/AJPP12.350.
- Oliveira, M.J., Campos, I.F.P., Oliveira, C.B.A., Santos, M.R., Souza, P.S., Santos, S.C., Seraphin, J.C. and Ferri, P.H. (2005). Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochem System Ecol.* 33: 275-285.
- Pachkore, G.J. and Dhale, D.A. (2011). Pharmacognostic evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.Poit) Lamiaceae. *J Ecobiotechnol.* 3(3): 05-10.
- Pelka, M., Danzl, C., Distler, W, and Petschelt, A. (2000). A new screening test for toxicity testing of dental materials. *J Dentistry.* 28:341-345.

- Raaman, N. (2006). Phytochemical techniques. Chapter 9 categories of phytochemicals, pp 197-274. New India Publishing agency, New Delhi.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2(4): 152-159.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., and Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Res Inter.* 32: 407-412.
- Zeshan Hashib Shaikat, Z.H., Hossain, T. and Azam, G. (2012). Phytochemical screening and antidiarrhoeal activity of *Hyptis suaveolens*. *Inter J App Res Nat Pod.* 5(2): 1-4.
- Sharma, S.K., Singh, L., and Singh, S. (2013). A review on medicinal plants having antioxidant potential. *Indian J Res Pharm Biotachnol.* 1(3): 404-409.
- Silva, G.L., Lee, I-S. and Kinghorn, A.D. (1998). Special problems with the extraction of plants. In *Methods in Biotechnology, Vol 4, Natural products isolation.* R. J. P. Cannell (ed.). pp 343-363. Totowa, NJ: Humana Press Inc. Totowa, NJ., USA.
- Singha, H.B. and Handiquea, A.K. (1997). Antifungal activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* and its efficacy in biocontrol measures. *J Essential Oil Res.* 9(6): 683-687.
- Sofowora, A. (1993). **Medicinal plants and traditional medicine in Africa.** John Wiley and Sons Ltd., New York. pp 274.
- Srivastav, J., Lambert, J., and Vietmeyer, N. (1996) Medicinal plants: An expanding role in development. World Bank technical paper; no. 320; pp 2-6. The World Bank, Washington D.C.; ISBN 0-8213-3613-4, Available at [http://www.google.co.th/books?hl=en&lr=&id=BoUhhYHim08C&oi=fnd&pg=PR5&dq=who+estimates+of+medicinal+plants+users&ots=s\\_cjeAwS8N&sig=Sw5qVjO4ti-Miq\\_hLD2TQDEbEI&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](http://www.google.co.th/books?hl=en&lr=&id=BoUhhYHim08C&oi=fnd&pg=PR5&dq=who+estimates+of+medicinal+plants+users&ots=s_cjeAwS8N&sig=Sw5qVjO4ti-Miq_hLD2TQDEbEI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Stevenson, D.E. and Hurst, R.D. (2007). Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci.* 64:2900-2916.
- Tapiero, H., Tew, K.D., Nguyen Ba, G., and Mathe, G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharm.* 56: 200-207.
- Tin, M.M.Y., Cho, C-H., Chan, K., James, A.E. and Ko, J.K.S. (2007). *Astragalus* saponins induce growth inhibition and apoptosis in human colon cancer cells and tumor xenograft. *Carcinogenesis.* 28(6): 1347-1355.

- Trease, G.E. and Evans, W.C. (1983). **Pharmacognosy**, 12th ed. Bailliere Tindal. London, U. K. pp 812.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Majo, D.D., Giammanco, S., and Guardia M.L. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nurt Res Rev.* 18: 98-112.
- Vogel, H., Gonzalez, M., Faini, F., Razmilic, I., Rodriguez, J., et al. (2005). Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean *Haplopappus*-species known as bailahuen. *J Ethnopharm.* 97: 97-100.
- Wang, J., Yue, Y-D., Tang, F. and Sun, J. (2012). TLC Screening for antioxidant activity of extracts from fifteen bamboo species and identification of antioxidant flavone glycosides from leaves of *Bambusa textilis* McClure. *Molecules.* 17: 12297-12311. doi:10.3390/molecules171012297.
- Wagner, H. and Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*, 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp 368.
- Wanyoike, G.N., Chhabra, S.C., Lang'at-Thoruwa, C.C., and Omar, S.A. (2004). Brine shrimp toxicity and antiplasmodial activity of five Kenya medicinal plants. *J Ethnopharm.* 90: 129-133.
- Winston, J.C. (1999). Health-promoting properties of common herbs. *Am J Nutr.* 70(suppl): 491S-9S.
- Wojdylo, A., Oszmiariski, J., and Czemerzys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105: 940-949.
- Woraratphoka, J., Intarapichet, K-O., and Indrapichate, K. (2012). Antioxidant activity and cytotoxicity of six selected, regional, Thai vegetables. *American-Eurasian J Toxicol Sci.* 4(2): 108-117.
- Zupko, I., et al. (2009). Antitumor activity of alkaloids derived from *Amaryllidaceae* species. In *Vivo.* 23: 41-48.

## บทที่ 4

### อิทธิพลของสารสกัดแมงลักต่อการเพิ่มจำนวนและการตายของเซลล์

#### 4.1 คำนำ

การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) เป็นผลจากการเจริญและการแบ่งเซลล์ (cell growth and cell division) การประเมินจำนวนเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นประโยชน์และกุญแจสำคัญที่จะประยุกต์ใช้กับความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) และการตายของเซลล์แบบอะพอโตซิส (apoptosis) เพราะ cell proliferation ไวต่อปัจจัยที่ทำให้เซลล์เครียด (cell stress) ที่กระทำต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์ ส่วนการเจริญของเซลล์ (cell growth) หมายถึงการพัฒนาการของเซลล์ (cell development) และการสืบพันธุ์ระดับเซลล์ (cell reproduction) ซึ่งเซลล์ต้องเพิ่มปริมาณ cytoplasm และ organelles จำลองสารพันธุกรรม เตรียมอุปกรณ์เพื่อแบ่งสารพันธุกรรม และแบ่งเซลล์แม่ให้เป็น 2 เซลล์ลูกเท่าๆ กัน ปรากฏการณ์ทั้งหมดนี้เป็นวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) (Figure 4.1, A) ทำให้สิ่งมีชีวิตเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) ในเนื้อเยื่อและอวัยวะอย่างเหมาะสม โดยมีกระบวนการที่ถูกควบคุมอย่างถูกต้อง เมื่อเซลล์หมดอายุตามปกติ (normal turnover) และเพื่อการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อ (tissue homeostasis) เซลล์จะตายแบบ apoptosis หรือเซลล์ฆ่าตัวตาย (cell suicide) โดยปัจจัยที่เซลล์กำหนดไว้แล้วด้วยโมเลกุลของสารจากพันธุกรรม (program death) หรือเมื่อปัจจัยการควบคุมขึ้นใดขั้นหนึ่งผิดปกติ ทำให้ได้เซลล์ใหม่ที่ผิดปกติ เซลล์ที่ผิดปกตินี้จะกำจัดตัวเองหรือฆ่าตัวตาย (apoptosis) เพื่อกำจัดเซลล์ผิดปกติให้หมดไปโดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติอื่นๆ แต่หากกำจัดเซลล์ผิดปกติไม่ได้ เซลล์เหล่านั้นจะแบ่งตัวโดยควบคุมให้หยุดไม่ได้ จนอาจกลายเป็นเซลล์เนื้องอกหรือเซลล์มะเร็งต่อไป สารธรรมชาติจากพืชมีคุณสมบัติควบคุมกระบวนการเจริญของเซลล์ พืชหลายชนิดจึงได้รับความสนใจศึกษาเพื่อนำมาควบคุมวัฏจักรเซลล์หรือกำจัดเซลล์ผิดปกติหรือเซลล์มะเร็งในคน

ปัจจัยควบคุมการเพิ่มจำนวนเซลล์คือ โปรตีนซึ่งตอบสนองต่อสัญญาณภายนอกและทำงานเป็นลำดับขั้นตอนที่ไม่ย้อนกลับ โปรตีนหลักสำคัญในกระบวนการมี 2 กลุ่ม คือ Cyclin และ Cyclin-dependent kinase (CDK) ที่ควบคุมตลอดวัฏจักรเซลล์ (Nigg, 1995) Cyclin D เป็น Cyclin แรกที่เซลล์ผลิตขึ้นตอบสนองต่อสัญญาณ growth factor ภายนอกเซลล์ Cyclin D จับกับ CDK4 ได้เป็น CDK4/Cyclin D complex ควบคุมที่ระยะ G1 ให้วัฏจักรเข้าสู่ระยะ S (G1/S) และ ที่ S ถูกควบคุมด้วย CDK2/Cyclin E complex ผลักดันเซลล์เข้าสู่ระยะ G2 และผ่าน G2/M พร้อมกับ CDK2/ Cyclin B complex กระตุ้นให้แบ่งเซลล์ในระยะ M จนเสร็จสมบูรณ์ (Figure 4.1, B) (Vermeulen, Van Bockstaele and Berneman, 2003; van den Heuve, 2005)

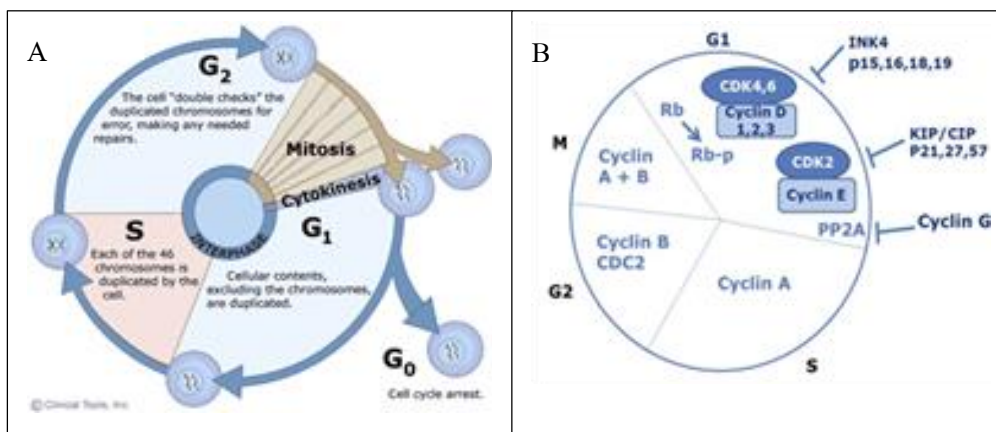


Figure 4.1 Cell cycle (A) and the protein factors in cell cycle regulation (B).

Source:

A, from <http://zebrafish.umdj.edu/Pre-Enrollment/Resources/Biology/Eukaryotic%20Cell/Images/cellcycle.png>

B, from <http://www.fefchemicals.com/biopharm/scientific-information/articles/regulation-of-the-cell-cycle-by-insulin-and-igf1/>

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชสมุนไพรมีฤทธิ์ต่อเซลล์ทั้งในด้านส่งเสริมให้เซลล์เพิ่มจำนวนเพื่อฟื้นฟูเนื้อเยื่อ หรือก่อมะเร็งได้ และ ในทางตรงกันข้ามก็สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์มะเร็งได้ ประเทศพัฒนาแล้วบางประเทศในยุโรป เช่น เยอรมันนี ฝรั่งเศส และ สหราชอาณาจักรกำหนดให้พืชสมุนไพรและสารสกัดสมุนไพรเป็นยาถูกต้องตามกฎหมายต้องให้แพทย์ออกใบสั่งยา (prescription drug) ให้ผู้ป่วย (Hasan and Al Sorkhy, 2014) สมุนไพรบางชนิดใช้เป็นยาพื้นบ้าน (folk medicine) ในการรักษาโรค เป็นต้นกำเนิดของการพัฒนาการรักษาโรค ปัจจุบันยาจากสมุนไพรบางชนิดถูกนำไปใช้ในคลินิกแล้ว (da Rocha, Lopes, and Schwartzmann, 2001; Newman, Cragg, and Snader, 2003; Meiyanto, Hermawan, and Anindyajati, 2012)

พฤษภคมีจากพืชหลายชนิดมีคุณสมบัติเสริม proliferative activity ต่อเซลล์ของอวัยวะปกติ เช่น สารสกัดใบของ *Hyptis fruticososa* เพิ่ม proliferation ของตับหนูแรทซึ่งถูกตัดออกบางส่วน (partial hepatectomy) (Lima, et al., 2012) สารสกัด *Calophyllum brasiliense*, *Ipomoea pes-caprae*, และ *Matayba elaeagnoides* เพิ่ม proliferation ของเซลล์ปกติของม้ามจากหนู (Zandonai, et al., 2010)

สารสกัดพืชสมุนไพรบางชนิดยับยั้งการเจริญของเซลล์สายพันธุ์มะเร็ง สารสกัดใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) แสดง antiproliferation ต่อเซลล์ KB human mouth epidermal carcinoma cell line และใบโหระพา (*Ocimum basilicum*) มีฤทธิ์ antiproliferation ต่อเซลล์ P388 murine leukemia cell line (Manosroi, Dhumtanom, and Manosroi, 2005) สารสกัด *Lycium europeum* และ *Jatropha podagrica* แสดง antiproliferative activity ต่อเซลล์ A547 และ OVCAR-3 จากมะเร็งรังไข่คน เซลล์ A549 จากมะเร็งปอดคน และเซลล์ PC12 จากมะเร็งประสาทหนูแรท (Ghali, Vaudry, Jouenne, and Marzouki,

2014) สารสกัด *Dillenia suffruticosa* หยุด cell cycle ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF7 estrogen positive breast cancer cells ที่ G2/M และชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis และทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 estrogen negative breast cancer cells สะสมในระยะ sub-G1 โดยไม่หยุด cell cycle (Armania, et al., 2013) ในทำนองเดียวกัน สารสกัดเมล็ดองุ่น (*Vitis vinifera*) หยุด cell cycle ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ 2 สายพันธุ์ LoVo และ HT29 ที่ระยะ G1 (Kaur, Mandair, Agarwal and Agarwal, 2008) สารสกัดเมล็ดลิ้นจี่ (*Litchi chinensis*) ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ 2 สายพันธุ์ Colo320DM และ SW480 ที่ G2/M (Hsu, et al., 2012) การตอบสนองต่อสารสกัดต่างๆ ของเซลล์มะเร็งแต่ละสายพันธุ์จึงไม่เหมือนกัน ทั้งนี้จะเป็นเพราะความผิดปกติของพันธุกรรมของแต่ละเซลล์สายพันธุ์ไม่เหมือนกัน หรือผิดปกติที่ genes ต่างกัน ซึ่ง genes เหล่านี้อาจตอบสนองต่อสารหรือแสดงออกต่างกัน

## 4.2 วัตถุประสงค์

วิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดแมงลักต่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) วัฏจักรเซลล์ (cell cycle) และโปรตีนบ่งชี้ควบคุม และการฆ่าตัวตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์

## 4.3 อุปกรณ์และวิธีการ

### 4.3.1 การเตรียมสารสกัด

การเตรียมสารสกัดใบและเมล็ดแมงลัก รายละเอียดในวิธีการ บทที่ 3

### 4.3.2 การเตรียม normal lymphocytes (peripheral blood mononuclear cells – PBMCs)

เลือดจากคนสุขภาพปกติได้รับความอนุเคราะห์จากธนาคารเลือด สภากาชาดไทย สาขาจังหวัดนครราชสีมา ผสมเลือดทั้งหมด (whole blood) กับ Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 ในสัดส่วน 1:1 (v/v) pipet ดูดเลือดแล้วค่อยๆ วาง บนผิวของ Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich company Ltd, St. Louis, MO, USA) ปั่นเหวี่ยงแบบ density-gradient centrifugation ที่ 400 x g 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แยก peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) โดยค่อยๆ ดูดชั้นที่มีลักษณะขุ่นขาวปรากฏอยู่ระหว่างชั้น Histopaque กับชั้น plasma (Figure 4.2) ย้ายลงใน 15-ml conical centrifuge tube ล้างเซลล์ PBMC ด้วย PBS และปั่นแยกเซลล์ที่ 250 x g 10 นาที จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ PBMC ด้วย complete RPMI 1640 ค้างคืน เพื่อให้ monocytes และ platelets เกาะติดกับพื้นขวดเลี้ยง เซลล์ลอยแขวนคือ lymphocytes/PBMC's เก็บไว้ทดลองต่อไป

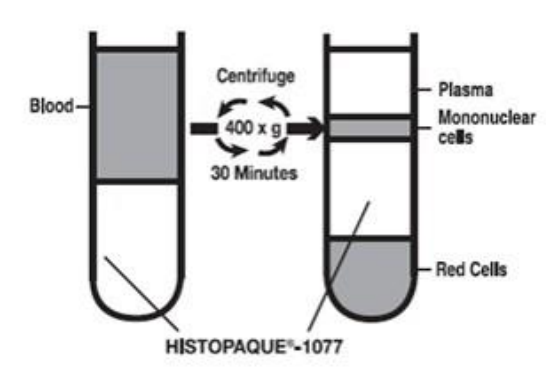


Figure 4.2 Peripheral Blood Mononuclear cells separation by density-gradient centrifugation in Histopaque-1077 (Hofmann et al., 1982)

### 4.3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์

Jurkat (human T leukemia cell line) ซึ่งได้จาก Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea) HepG2 (human hepatocellular carcinoma cell line), MCF7 (Michigan Cancer Foundation-7 / human breast cancer cell line) และ PC3 (human prostate cancer cell line) ซึ่งได้จาก ATCC (American type culture collection, USA)

เลี้ยง PBMC's, Jurkat cells และ PC3 cells ใน RPMI 1640 medium เสริมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml penicillin และ 100 g/ml streptomycin ส่วน HepG2 และ MCF7 cells เลี้ยงใน high glucose DMEM medium และเสริมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml penicillin และ 100 g/ml streptomycin เซลล์ทั้งหมดเลี้ยงใน 75-cm<sup>2</sup> flask และบ่มในตู้บ่มที่ 95% ความชื้นอากาศ 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37°C

### 4.3.4 Cell proliferation assay

Cell proliferation วิเคราะห์โดย AlamarBleu (AB) assay ซึ่งเป็นเทคนิคในการวัด proliferation ของประชากรเซลล์ทั้งหมด เซลล์ปกติมี metabolic activity ที่สามารถเปลี่ยน fluorometric/colorimetric growth indicator ใน medium ให้เรืองแสงหรือมีสี เมื่อใส่ fluorometric/colorimetric growth indicator และสารทดลองใน growth medium เลี้ยงเซลล์ indicator ซึ่งเป็นสี oxidation-reduction (REDOX) จะตอบสนองต่อ chemical reduction/oxidation ระหว่าง respiration เป็นผลจาก cell growth ทำให้ indicator นี้เปลี่ยนทั้งเรืองแสงและมีสี ในเทคนิค AB ใช้ resazurin ซึ่งละลายในน้ำและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อ resazurin เข้าในเซลล์ ถูก metabolized เป็น resorufin (Figure 4.3) resorufin ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนกับ metabolic activity ของเซลล์มีชีวิต (Orton and Pognan, 2000; Al-Nasiry, Geusens, Hanssens, Luyten, and Pijnenborg, 2007; O'Brien, Wilson, Markaki, 2009)



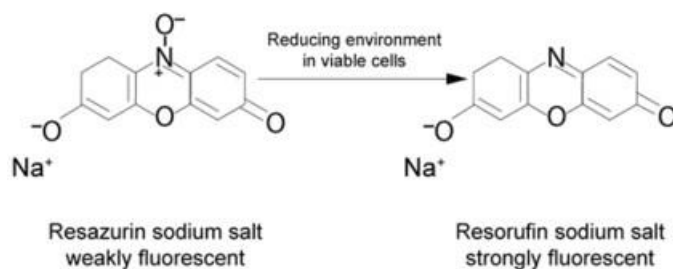


Figure 4.3 AlamarBlue<sup>®</sup> assay principle (Markaki, 2009).

เลี้ยงเซลล์ PBMC ที่  $1 \times 10^5$  cell/well และ Jurkat cells ที่  $2.5 \times 10^5$  cells/well ใน 96-well plate แบบ clear flat bottom (Costar, Corning Incorporated, NY, USA) และ เลี้ยง HepG2, MCF7 และ PC3 ที่  $1.5 \times 10^4$  cells/well ในปริมาตร 100 ul/well บ่ม 18 ชม หรือ 24 ชม ใส่สารสกัดแมงลักคาลาย ความเข้มข้นใน 100 ul/well บ่ม 24 และ 48 ชม แล้วใส่ 10 ul AB (Invitrogen, CA, USA) บ่มต่ออีก 4 ชม วัดแสง excitation wavelength ที่ A-540 nm และ emission wavelength ที่ A-590 nm ด้วย Spectrofluorometer (Spectra MAX Gemini EM, Molecular Devices, CA, USA) ใช้ 0.02% (v/v) DMSO เป็น blank control ทำการทดลอง triplicate คำนวณ % cell viability และ half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ )

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{Fluorecence of sample} - \text{Fluorecence of blank}}{\text{Fluorecence of control} - \text{Fluorecence of blank}} \times 100$$

#### 4.3.5 Flow cytometric analysis

วิเคราะห์ cell cycle โดย flow cytometry ใช้วิธีของ Chen, Hsieh, Chang and Chung (2004) และปรับเปลี่ยนเล็กน้อย เลี้ยง Jurkat cells  $1 \times 10^6$  cells/well ใน 6-well plate (Nunc, Denmark) บ่มกับ สารสกัด เก็บเซลล์ที่ 0, 6, 12 และ 24 ชม โดย centrifugation ที่  $400 \times g$  5 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วกระจายเซลล์ใน 500 ul PBS จากนั้นดอง (fix) ใน 4 ml 70% ethanol พร้อมเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิต่ำที่  $-20^{\circ}\text{C}$  เก็บ fixed cells โดยปั่นเหวี่ยง ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 0.1% BSA ใน PBS แล้วบ่มกับ 3.8 nM Sodium citrate, pH 8.45 ซึ่งมี 100 ug/ml RNase A และ 0.5% Tritox X-100 30 นาที ที่  $37^{\circ}\text{C}$  ย้อมเซลล์ด้วย 50 ug/ml Propidium iodide (PI) (Gibco, NY, USA) ตั้งไว้ในที่มืดและล้างคืนที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแยกเซลล์โดย fluorescence-activated cell sorting (FACS) / Flow cytometer และ ด้วย Cell Quest Pro Software (FACSCalibur, Becton Dickinson Biosciences, USA.)

#### 4.3.6 Apoptotic analysis

เลี้ยงเซลล์ Jurkat cells ที่  $1 \times 10^6$  cells/well ใน 6-well plate ป่มเซลล์กับสารสกัด MLE/e ที่ ความเข้มข้น 400-800 ug/ml 0-24 ชม เก็บเซลล์โดย centrifugation ที่  $400 \times g$  5 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ย้อมเซลล์ด้วย Annexin V-FITC และ Propidium iodide (PI) ตามรายละเอียดในชุดสารของบริษัท EXBIO (Czech Republic) นำเซลล์  $5 \times 10^5$  cells ใส่ใน 100 ul 1 x binding buffer ใส่ 5 ul Annexin V-FITC (EXBIO, Czech Republic) และ 5 ul PI ย้อมเซลล์ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องและในที่มืด แล้วเติม 400 ul 1 x binding buffer และวิเคราะห์ด้วย Flow cytometer

#### 4.3.7 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Western blot analysis

ป่ม Jurkat cells  $4 \times 10^6$  cells ใน 6-well plate กับ 400-600 ug/ml MLE/e 0-6 ชม เก็บเซลล์โดย centrifugation ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris, pH 8.0, 150 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5 mM PMSF และ protease inhibitor cocktail 30 นาทีในถังน้ำแข็ง เก็บ cell lysate โดย centrifugation ที่  $14,000 \times g$  ที่  $4^{\circ}C$  30 นาที วัดปริมาณโปรตีนใน lysate โดยวิธี Bradford assay (Bradford, 1976) แยกโปรตีนโดยนำ 40 ug แยกใน 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ที่ 120 V คงที่ 1 ชม จากนั้นเตรียม Western blot โดย electrotransfer ถ่ายโปรตีนจาก SDS-PAGE ลงบน nitrocellulose membrane ที่ 400 mA คงที่  $4^{\circ}C$  4 ชม ปิดสาร nonspecific binding sites บน blotted membrane ด้วย blocking reagent ซึ่งประกอบด้วย BSA ใน Tris-buffer saline และมี 0.1% Tween-20 (v/v) (TBST) และ 3% BSA สำหรับการตรวจหา cyclin D1 และ 5% BSA สำหรับการตรวจหา cyclin E, cdk2, cdk4 และ actin แช่ blotted membrane นาน 1 ชม ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง membrane ด้วย TBS แล้วป่ม membrane กับ primary antibodies against anti-mouse cyclin D1, cyclin E, cdk2, และ cdk4 (1:1000 ใน 3% BSA ใน TBST) และ actin (1:1000 ใน 5% BSA ใน TBST) 3 ชม ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง membrane ด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วป่มกับ secondary goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:10,000 ใน 3% BSA ใน TBST) 1 ชม ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง membrane ด้วย TBST 3 ครั้ง และ TBS 2 ครั้ง (antibodies ทั้งหมดซื้อจาก Santa-Cruz Biotechnology, CA, USA) ตรวจหาโปรตีนโดยแช่ membrane ใน chemiluminescent detection solution 5 นาที และทำ autoradiography บน X-ray film

#### 4.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

##### 4.4.1 Proliferative effect ของสารสกัดแมงลักคากา

###### 4.4.1.1 Proliferative effects ของสารสกัดแมงลักคากาต่อ PBMCs และ Jurkat cells

ฤทธิ์ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ – proliferation effect ของสารสกัดแมงลักคากาต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติและต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์ ซึ่งเซลล์เม็ดเป็นเซลล์ลอยแขวน (suspension cells) ใน plasma/สารอาหารเลี้ยง วิจารณ์ proliferation ของเซลล์ด้วย AlamarBlue (AB) assay เพื่อเป็นการเปรียบเทียบฤทธิ์ต่อเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง วิจารณ์ฤทธิ์ของสารสกัดแมงลักคากาทั้งหมดต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) โดยใช้ Catachin และ Ascorbic acid เป็นสารควบคุม พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารควบคุม สารสกัดแมงลักคากาทั้งหมดมีฤทธิ์ antiproliferative effect ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติน้อยมาก ในทางตรงกันข้ามมีแนวโน้มกระตุ้น proliferation ของเซลล์ปกติ นั่นคือ proliferation ของเซลล์ PBMCs สูงมากกว่า 100% ยกเว้นฤทธิ์ของ MLE/w ที่แสดง antiproliferative effect บางเล็กน้อย และ ฤทธิ์ proliferative effect เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น (dose-dependent manner) (Table 4.1)

อย่างไรก็ตาม Antiproliferative effect ของ MLE/w ต่อ PBMCs สูงกว่าของ MSE/w ประมาณ 10 เท่า แต่น้อยกว่าของ Catachin 2 เท่า และน้อยกว่าของ Ascorbic acid 1.77 เท่า ลำดับของ antiproliferative effect จากมากไปหาน้อยโดยเทียบจากค่า  $IC_{50}$  ที่ 24 ชม ของสารสกัดได้ดังนี้ MLE/w ( $1,140.52 \pm 6.05 \mu\text{g/ml}$ ) > MLE/e ( $1,356.17 \pm 136.78 \mu\text{g/ml}$ ) > MSE/e ( $2,920.68 \pm 155.38 \mu\text{g/ml}$ ) > MSE/w ( $11,366.26 \pm 266.28 \mu\text{g/ml}$ ) สรุปได้ว่าสารสกัดแมงลักคากาไม่ยับยั้ง แต่กระตุ้น proliferation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (Table 4.1)

Antiproliferative effect ของสารสกัดใบแมงลักคากา MLEs ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์ Jurkat (human T leukemia cell line) ฤทธิ์เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสาร (dose-dependent manner) ในขณะที่ฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดแมงลักคากา MSEs ต้องการปริมาณสูงมากจึงแสดงฤทธิ์ หรือไม่มีฤทธิ์ antiproliferative effect (Table 4.2) antiproliferative effect ของ MLE/e ต่อ Jurkat cells สูงกว่าของ MLE/w ประมาณ 1.65 เท่า ฤทธิ์ antiproliferative effect ของสารสกัดแมงลักคากาทั้งหมดต่อ Jurkat cells เรียงลำดับจากประสิทธิภาพ ค่า  $IC_{50}$  ที่ 24 ชม ได้ดังนี้ MLE/e ( $553.52 \pm 14.07 \mu\text{g/ml}$ ) > MLE/w ( $912.06 \pm 16.86 \mu\text{g/ml}$ ) > MSE/e ( $2,385.95 \pm 81.28 \mu\text{g/ml}$ ) > MSE/w ( $5,813.45 \pm 111.25 \mu\text{g/ml}$ )

**Table 4.1** Antiproliferative effects of mintweed leaf extracts on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by AlamarBlue assay at 24 h. Data were mean  $\pm$  S.D., (n= 3).

Extract	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	PBMCs	
		% viability	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
MLE/e	200	140.50 $\pm$ 9.50	1,356.17 $\pm$ 136.78 <sup>a</sup>
	400	125.36 $\pm$ 0.70	
	600	115.92 $\pm$ 2.50	
	800	89.93 $\pm$ 0.43	
MLE/w	600	93.09 $\pm$ 2.00	1,140.52 $\pm$ 6.05 <sup>a</sup>
	800	81.90 $\pm$ 3.30	
	1000	61.18 $\pm$ 0.30	
	1200	44.24 $\pm$ 1.34	
MSE/e	1500	142.34 $\pm$ 4.80	2,920.68 $\pm$ 155.38 <sup>b</sup>
	2000	133.50 $\pm$ 3.00	
	2500	128.47 $\pm$ 3.40	
	3000	119.69 $\pm$ 5.00	
MSE/w	2000	107.23 $\pm$ 2.00	11,366.26 $\pm$ 266.28 <sup>c</sup>
	4000	86.34 $\pm$ 0.50	
	6000	79.72 $\pm$ 2.00	
	8000	71.31 $\pm$ 0.80	
Catechin	200	106.00 $\pm$ 2.50	647 $\pm$ 12.76 <sup>a</sup>
	300	99.23 $\pm$ 6.50	
	400	82.35 $\pm$ 0.60	
	500	67.91 $\pm$ 0.80	
Ascorbic acid	100	104.69 $\pm$ 2.50	772.47 $\pm$ 79.13 <sup>a</sup>
	200	103.61 $\pm$ 0.90	
	300	90.40 $\pm$ 1.80	
	400	82.40 $\pm$ 2.00	

Statistical analysis was performed by ANOVA, different letters within the same column were significantly different ( $p < 0.05$ ). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract.

**Table 4.2** Antiproliferative effects of mintweed leaf and seed extracts on Jurkat cells (human T lymphocyte leukemia cells) by AlamarBlue assay at 24 h. Data were mean  $\pm$  S.D., (n = 3).

Extract	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Jurkat	
		% viability	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
MLE/e	200	92.45 $\pm$ 2.00	553.52 $\pm$ 14.07 <sup>c</sup>
	400	79.59 $\pm$ 3.25	
	600	49.15 $\pm$ 3.00	
	800	8.95 $\pm$ 1.30	
MLE/w	600	66.08 $\pm$ 2.10	912.06 $\pm$ 16.86 <sup>d</sup>
	800	53.99 $\pm$ 7.40	
	1000	49.35 $\pm$ 7.70	
	1200	32.54 $\pm$ 2.43	
MSE/e	1500	66.17 $\pm$ 0.90	2,385.95 $\pm$ 81.28 <sup>e</sup>
	2000	55.19 $\pm$ 1.80	
	2500	47.55 $\pm$ 0.72	
	3000	39.99 $\pm$ 3.70	
MSE/w	2000	72.01 $\pm$ 0.31	5,813.45 $\pm$ 111.25 <sup>f</sup>
	4000	62.93 $\pm$ 0.60	
	6000	48.42 $\pm$ 0.70	
	8000	35.52 $\pm$ 0.80	
Catechin	200	65.48 $\pm$ 2.30	339.74 $\pm$ 14.55 <sup>b</sup>
	300	54.63 $\pm$ 1.50	
	400	42.18 $\pm$ 3.25	
	500	33.46 $\pm$ 1.23	
Ascorbic acid	100	86.12 $\pm$ 4.00	211.29 $\pm$ 13.40 <sup>a</sup>
	200	40.45 $\pm$ 6.40	
	300	24.62 $\pm$ 5.80	
	400	12.04 $\pm$ 0.70	

Statistical analysis was performed by ANOVA, different letters within the same column were significantly different ( $p < 0.05$ ). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract.

จะเห็นได้ว่าสารสกัดใบเมี่ยงล็กกา MLE/e และ MLE/w มีคุณสมบัติ antiproliferative effect ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat cells และฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารควบคุม เมื่อเปรียบเทียบกับค่า  $IC_{50}$  ในขณะที่สารสกัดเมล็ดเมี่ยงล็กกา MSE/e และ MSE/w ไม่แสดงคุณสมบัติ antiproliferative effect ต่อ Jurkat cells

สรุปได้ว่า สารสกัดเมี่ยงล็กกาทั้งหมดมีฤทธิ์ proliferation ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ PBMCs และสารสกัดใบเมี่ยงล็กกา MLEs มีฤทธิ์ antiproliferation ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat cells มากที่สุด และฤทธิ์เป็นแบบ dose/concentration dependent ประสิทธิภาพ (efficacy) ของ MLE/e น้อยกว่า Catechin ประมาณ 1.63 เท่า และ น้อยกว่า Ascorbic acid ประมาณ 2.62 เท่า (Table 4.3) ส่วนสารสกัดเมล็ดเมี่ยงล็ก ไม่ฤทธิ์ antiproliferation ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat cells

**Table 4.3** Comparison of the efficacy of antiproliferative effects ( $IC_{50}$ ) of mintweed leaf and seed extracts on PBMCs and Jurkat cells by AlarmaBlue assay at 24 h.

Extract	PBMC's $IC_{50}$ (ug/ml)	Jurkat cells' $IC_{50}$ (ug/ml)	Efficacy MLE/e on Jurkat cells
MLE/e	1,356.17 ± 136.78	553.52 ± 14.07	> MLE/w = 1.65 fold
MLE/w	1,140.52 ± 6.05	912.06 ± 16.86	-
MSE/e	2,920.68 ± 155.38	2,385.95 ± 81.28	-
MSE/w	11,366.26 ± 266.28	5,813.45 ± 111.25	-
Catechin	647.00 ± 12.76	339.74 ± 14.55	> MLE/e = 1.63 fold
Ascorbic acid	772.47 ± 79.13	211.29 ± 13.40	> MLE/e = 2.62 fold

Statistical analysis was performed by ANOVA, different letters within the same column were significantly different ( $p < 0.05$ ). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract.

#### 4.4.1.2 Proliferative effect ของ MLE/e ต่อ HepG2, MCF7 และ PC3 cell lines

เพื่อเป็นการยืนยัน antiproliferative effect ของสารสกัดเมี่ยงล็กกาต่อเซลล์มะเร็งในข้อ 4.5.1.1 การทดลองนี้จึงเลือกเฉพาะสารสกัดใบเมี่ยงล็กกาที่สกัดด้วย 70% ethanol - MLE/e – และทดสอบเฉพาะเซลล์มะเร็งอีก 3 สายพันธุ์ คือ (1) HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line (2) MCF7 human breast cancer cell line และ (3) PC3 human prostate cancer cell line ซึ่งเป็นเซลล์ที่แนบติดกับพื้นของจานเลี้ยง (attach cells) และวิเคราะห์ด้วย AlamarBlue assay โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ MLE/e ระหว่าง 200, 400, 600, 800, 1,000, 1,200, และ 1,400 ug/ml และ เวลา 24 ชม และ 48 ชม

พบว่าเมื่อบ่มเซลล์กับ MLE/e เข้มข้น 800  $\mu\text{g/ml}$  นาน 24 ชม MLE/e แสดง antiproliferative effect ต่อเซลล์ MCF7 มากที่สุด 64.04% (35.96% viability) รองลงมาคือฤทธิ์ต่อ HepG2 antiproliferation ได้ 53.58% (46.42% viability) และ ต่อ PC3 antiproliferation น้อยที่สุด 12.07% (87.93% viability) (Figure 4.4, A) และเมื่อบ่มเซลล์นาน 48 ชม antiproliferative effect เพิ่มขึ้นประมาณ 1.25 เท่า antiproliferative effect ต่อ MCF7 เพิ่มขึ้นเป็น 82.49% ต่อ HepG2 เพิ่มขึ้นเป็น 67.00% และ ต่อ PC-3 เพิ่มขึ้นเป็น 14.03% (Figure 4.4, B)

Efficacy ของ MLE/e ต่อ antiproliferation ของเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะต่อเซลล์ MCF7 และ HepG2 ยืนยันได้จากค่า  $\text{IC}_{50}$  ที่ 24 ชม และ ที่ 48 ชม (Table 4.4) efficacy ของ MLE/e ต่อ MCF > HepG2 >> PC3 และเป็นแบบ dose-dependent manner (Figure 4.4) แต่ไม่เป็นแบบ time-dependent manner

Table 4.4 Comparison of the antiproliferative efficacy at 24 and 48 h of MLE/e on PBMC, Jurkat HepG2, MCF7, and PC3 cells.

Cells / MLE/e efficacy	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ), 24 h	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ), 48 h
PBMC	$1,356.17 \pm 136.78$	-
Jurkat	$553.52 \pm 14.07$	-
HepG2	$866.06 \pm 16.44$	$798.28 \pm 20.23$
MCF7	$763.12 \pm 9.51$	$707.45 \pm 7.84$
PC3	$1,636.16 \pm 152.90$	$1,381.99 \pm 43.85$

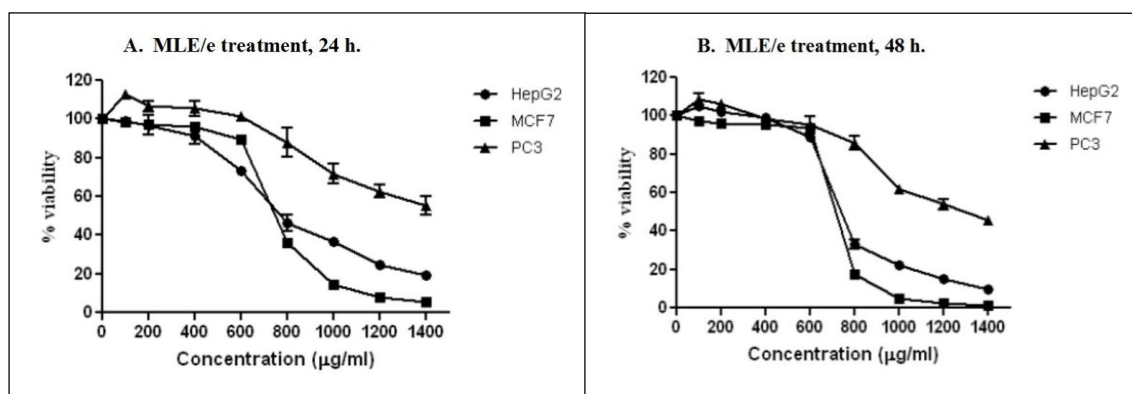


Figure 4.4 Proliferation of HepG2, MCF7, and PC3 cells after MLE/e treatment at various concentrations and incubation at 24 h (A) and 48 h (B). Data were mean  $\pm$  S.D., n = 6.

จะเห็นได้ว่า สารสกัดใบแมงลักคามีคุณสมบัติ antiproliferation ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ทั้งชนิดเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวซึ่งเป็นเซลล์ลอยแขวน และ ชนิดเซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากซึ่งเป็นเซลล์บุผิว (epithelial cells) และแนบกับพื้นจานเลี้ยง ผลการทดลองนี้แม้ว่าเป็นสารสกัดหยาบ แต่ก็สอดคล้องกับการทดลองของ Priyadharshini and Sujatha (2013) ซึ่งใช้ menthol และ linalool จากสารสกัดใบแมงลักคากับ ethyl acetate แล้วแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย hexane และ ethyl acetate ทดสอบกับ MCF7 พบว่า ทั้ง menthol และ linalool แสดงฤทธิ์ยับยั้ง growth/proliferation ของ MCF7 แบบ dose dependent ในทำนองคล้ายกัน พืชในวงศ์ Lamiaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับแมงลักคามีฤทธิ์ antiproliferation ต่อเซลล์มะเร็งแบบลอยแขวนและแบบแนบกับพื้นจานเลี้ยง สารสกัดใบ *Hyptis mutabilis* ยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกจาก solid tumor/ascites จากช่องท้องของหนูเมาส์ 2 สายพันธุ์ คือ sarcoma 108 และ Ehrlich solid tumor ได้มากกว่า 74% (Ximenes, Melo, Magalhaea, de Souza, and De Albuquerque, 2013) สารสกัดด้วย hexane จาก *Hyptis martiusii* ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ CEM (acute lymphoblastic leukemia cell line), HL-60 (HeLa cell), HCT-8 (ileocecal colorectal adenocarcinoma cell line), MCF7 และ B-16 (melanoma cell line) (Costa-Lotufo, et al., 2003) นอกจากนี้สารสกัดใบ เปลือกลำต้น ราก เปลือกเมล็ดหมัก และฝักของโกโก้ *Theobroma cacao* แสดงฤทธิ์ antiproliferation ต่อ เซลล์มะเร็ง HeLa, HepG2, MCF7 (Baharum, Akim, Taufiq-Yap, Hamid, and Kasran, 2014) และ สารสกัดใบของพืช genus *Philadelphus* มีฤทธิ์ antiproliferation ต่อ A431 (human skin carcinoma cell) (Valko, Pravdova, Nagy, Gruncai and Fickova, 2007)

การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดใบแมงลักคา (MLE) มีศักยภาพสูงในการต้านการเจริญเติบโต ลดจำนวนเซลล์มะเร็งได้ดีมาก โดยเฉพาะสารสกัดใบด้วย 70% ethanol MLE/e ในขณะที่สารสกัดเมล็ดแมงลักคา (MSE) ไม่มีพิษต่อเซลล์มะเร็ง แต่สนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติ ดังนั้นการวิจัยต่อจากนี้เพื่อการประยุกต์ใช้ประโยชน์แมงลักคาจึงควรพิจารณาเลือกแต่ละส่วนของพืชให้เหมาะสมกับคุณสมบัติเบื้องต้นนี้ เช่น วิจัยใบแมงลักคาเพื่อนำไปใช้ป้องกันและรักษาเนื้องอก/มะเร็ง และ วิจัยเมล็ดแมงลักคาเพื่อนำไปใช้ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อให้เพิ่มจำนวนเซลล์ในบางระบบ เพื่อให้การทำงานของอวัยวะในร่างกายคงสภาพสมดุล (homeostasis)

#### 4.4.2 Cell cycle effect ของสารสกัดใบแมงลักคา

Cell cycle เป็นปรากฏการณ์การสืบพันธุ์ระดับเซลล์ที่มีเหตุการณ์หลายลำดับขั้นตอน ซึ่งถูกควบคุมด้วยปัจจัยทางพันธุกรรม และที่สำคัญคือลำดับใน cell cycle ไม่สามารถย้อนกลับได้ ดังนั้นเมื่อปัจจัยการควบคุมขั้นใดขั้นหนึ่งผิดปกติในระยะใดระยะหนึ่งของ cell cycle จากเหตุใดๆ ก็ตาม ทำให้เซลล์หยุดและสะสมมากในระยะนั้นๆ และเซลล์ตายในเวลาต่อมา จากฤทธิ์ของสารสกัด



แมงลักคาคือ proliferation ของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ 5 ชนิดในข้อ 4.5.1 การทดลองนี้ จึงเลือกเฉพาะ เซลล์สายพันธุ์ Jurkat เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดแมงลักคาคามีต่อ cell cycle ของเซลล์มะเร็ง โดย วิเคราะห์แยกเซลล์ระยะต่างๆ ออกจากกันด้วย fluorescence-activated cell sorting (FACS) หรือ Flow cytometry พบว่าสารสกัดใบแมงลักคาโดยเฉพาะ MLE/e มีฤทธิ์หยุดวัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest) และฤทธิ์นี้เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นและเวลา (dose- and time-dependent fashion) ในขณะที่สาร สกัดเมล็ดไม่มีฤทธิ์ cell cycle arrest เซลล์ใน G1 phase ที่ถูก arrested สะสมใน Sub G1 peak บ่งชี้ถึง การตายของเซลล์ (apoptosis) เนื่องจาก DNA ของเซลล์ตายจะไม่จับสี propidium iodide และถูก shift มาทางด้านซ้ายของ histogram

สารสกัดใบแมงลักคา MLE/e ที่ความเข้มข้น 400, 600, และ 800 ug/ml, 24 h ทำให้เซลล์ Jurkat สะสมใน Sub G1 1.07%, 8.01%, 27.29% และ 63.10% ตามลำดับ สาเหตุมาจาก G1 arrest (Figure 4.5, upper panel) ส่วน MLE/w ที่ความเข้มข้น 800, 1,000 และ 1,200 ug/ml มีเซลล์สะสมที่ Sub G1 1.23%, 4.33%, 10.23% และ 22.38% ตามลำดับ (Figure 4.5, lower panel)

ส่วนสารสกัดเมล็ดแมงลักคา MSE/e และ MSE/w ไม่แสดงผล cell cycle arrest ต่อ Jurkat cells แม้ที่ความเข้มข้นสูงมากถึง 8,000 ug/ml (Figure 4.6)

เฉพาะที่ความเข้มข้น 600 ug/ml ของ MLEs บ่มกับ Jurkat cells 24 ชม cell cycle arrest ของ Jurkat cells โดยพิจารณาจาก Sub G1 peak ได้ดังนี้ ระหว่าง 0, 6, 12, และ 24 ชม เซลล์ที่ Sub G1 สะสม 1.24%, 4.87%, 22.13% และ 28.06% ตามลำดับ (Figure 4.7, upper panel) ส่วน MLE/w ที่ 1,000 ug/ml ทำให้เซลล์สะสมที่ Sub G1 เพียง 1.70%, 1.92%, 4.12%, และ 10.11% ตามลำดับ (Figure 4.7, lower panel) ส่วน MSE/e และ MSE/w ไม่มีผลต่อ cell cycle arrest ของ Jurkat cells ซึ่งผลนี้ สอดคล้องกับผลของฤทธิ์ต่อ cell proliferation (Table 4.2) ในข้อ 4.5.1.1

มีรายงานวิจัยที่ใช้เทคนิค Flow cytometry ตรวจสอบคุณสมบัติของสารจากพืชสมุนไพรต่อ cell cycle เพื่อวิเคราะห์ว่า cell cycle ของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งว่าถูกยับยั้ง ณ ระยะใด ซึ่งรายงาน เหล่านี้สอดคล้องกับคุณสมบัติ antiproliferation และ cell cycle arrest ของสารสกัดใบแมงลักคา เช่น สารสกัดหญ้าหางม้า (*Equisetum hyemale*) ซึ่งเป็นสมุนไพรพื้นบ้านใช้รักษาโรคความดันโลหิต ภูมิแพ้ หัวใจวายเฉียบพลัน และมะเร็งเป็นต้น มีคุณสมบัติเป็น antiproliferation ต่อเซลล์ L1210 murine leukemia cell line และ ชักนำ G2/M arrest และ cell apoptosis (Li et al., 2012) สารสกัดต้น โทงเทงฝรั่ง (*Physalis angulata* และ *P. peruviana*) ทำให้ cell cycle ของเซลล์ HepG2 arrest ที่ G0/G1 และเซลล์สะสมใน sub G1 peak แบบ dose dependence (Wu, et al., 2004) และสารสกัดเมล็ดของ *Annona glabra* ชักนำเซลล์ multidrug-resistant CEM/VLB cells ให้หยุด cell cycle ที่ G0/G1 phase

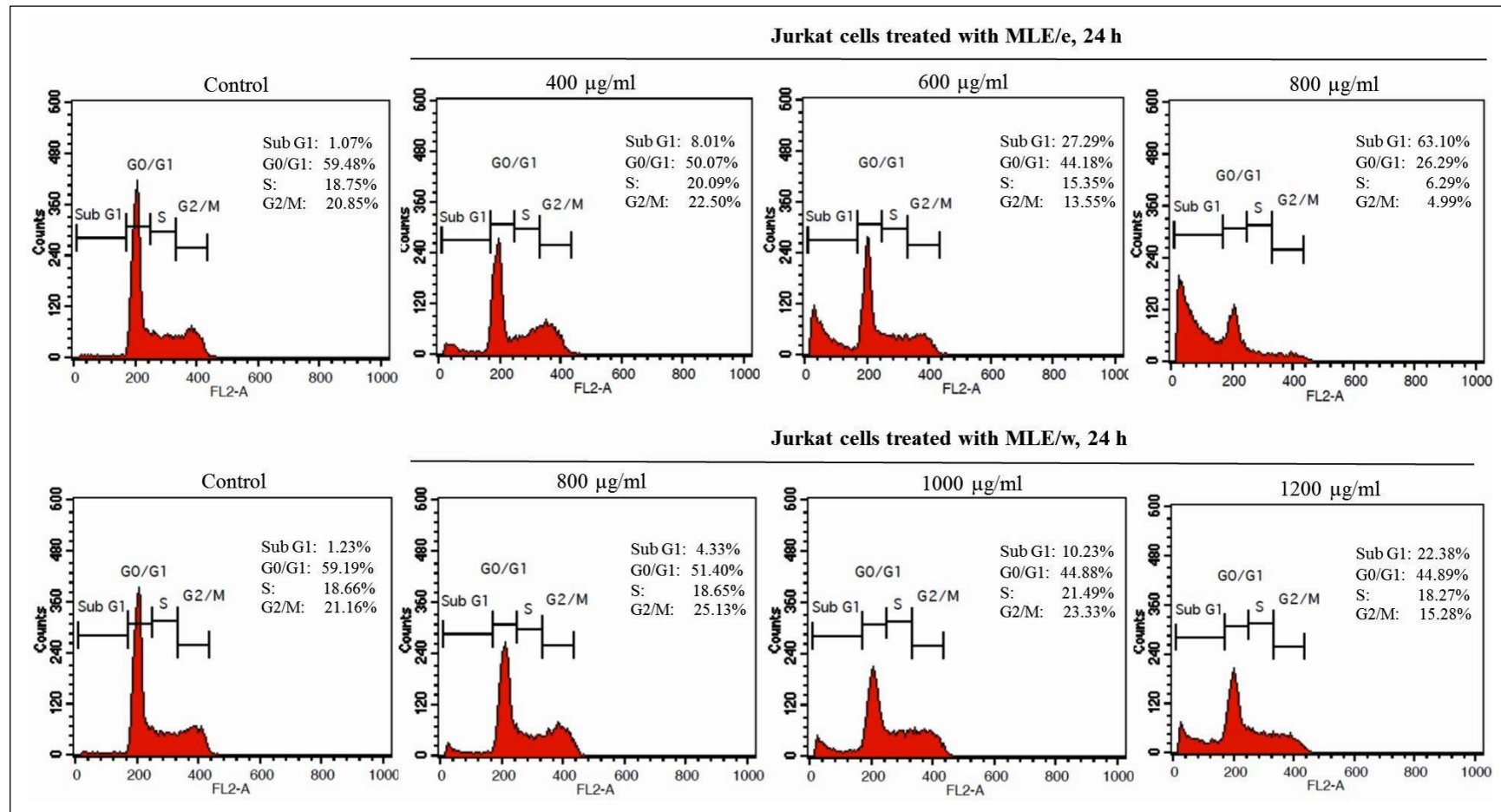


Figure 4.5 Dose-dependent effect of mintweed leaf ethanol and water extracts, MLE/e and MLE/w, on cell cycle of Jurkat cells (human T leukemia cells). The cells were treated with various concentrations, designated, of MLE/e (upper panel) and MLE/w (lower panel) for 24 h. The cell cycle phases were analyzed by flow cytometer. The percentage of cells in G1, S and G2/M phases are indicated. The sub G1 represents the apoptotic population. Data shown are representatives of three independent experiments.

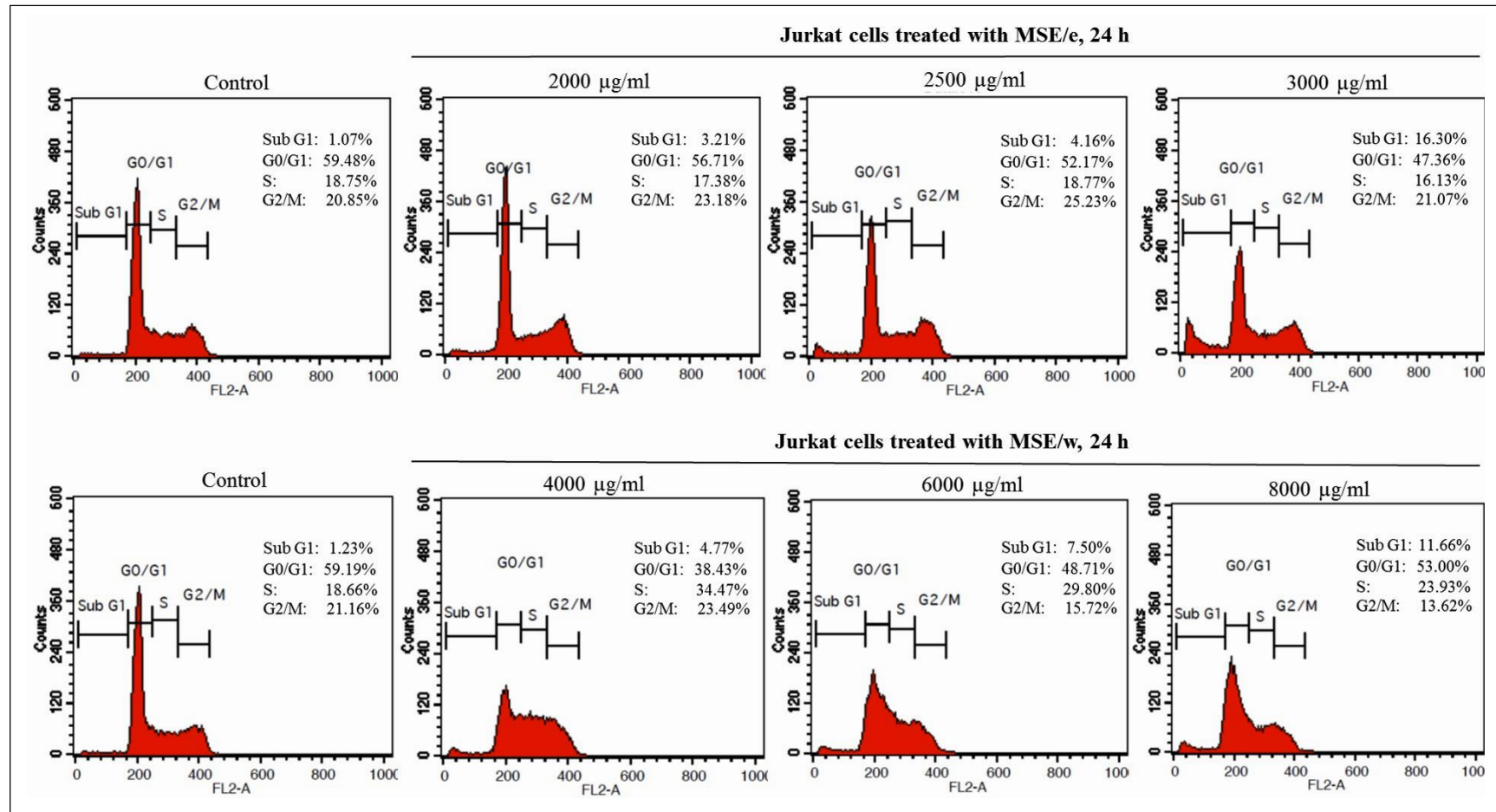


Figure 4.6 Dose-dependent effect of mintweed seed ethanol and water extracts, MSE/e and MSE/w, on cell cycle of Jurkat cells (human T leukemia cells). The cells were treated with various concentrations, designated, of MSE/e (upper panel) and MSE/w (lower panel) for 24 h. The cell cycle phases were analyzed by flow cytometer. The percentage of cells in G1, S and G2/M phases are indicated. The sub G1 represents the apoptotic population. Data shown are representatives of three independent experiments.

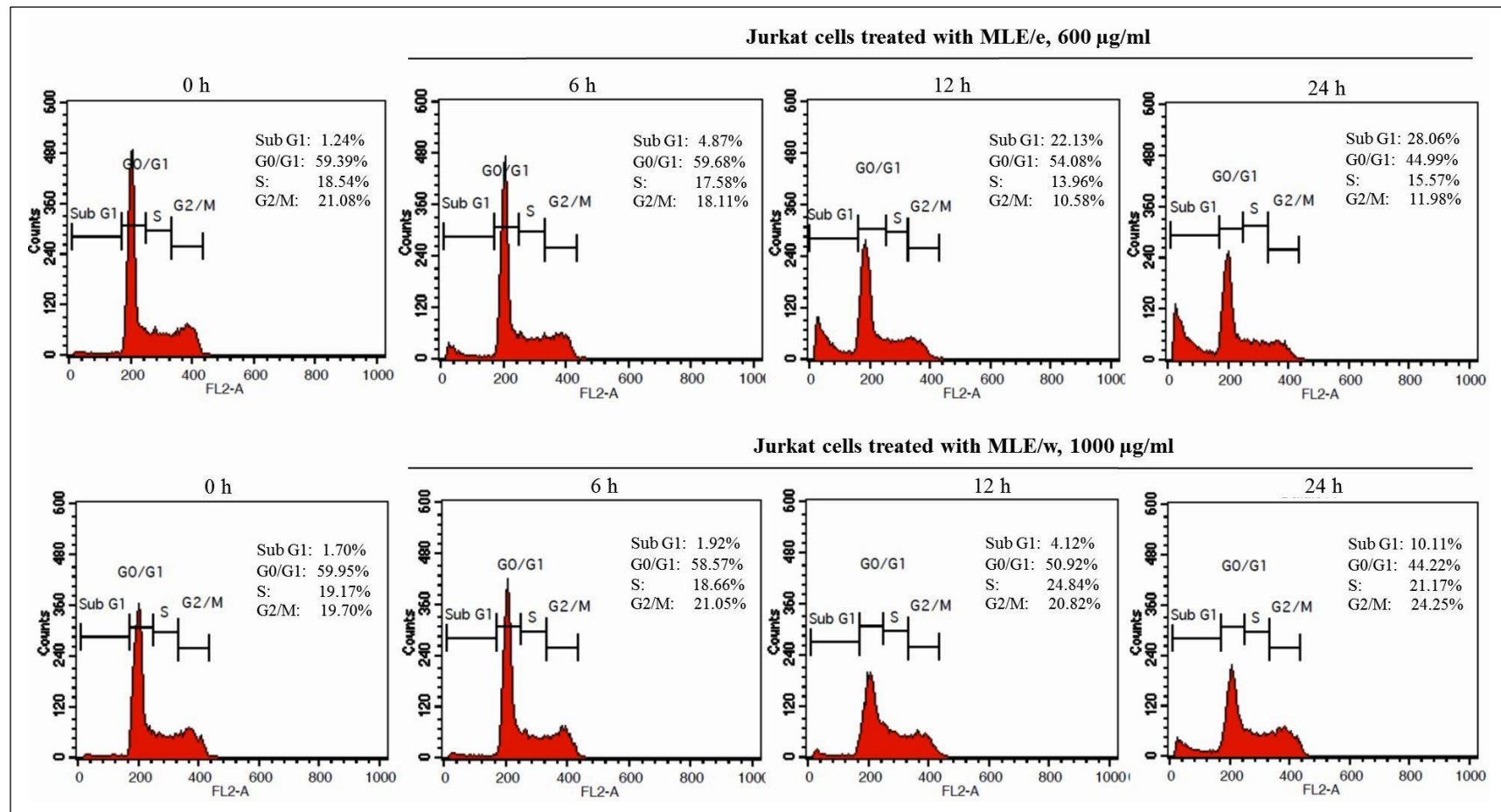


Figure 4.7 Time-dependent effect of mintweed leaf ethanol and water extracts, MLE/e and MLE/w, on cell cycle of Jurkat cells (human T leukemia cells). The cells were incubated with 600µg/ml MLE/e and 1,000 µg/ml MLE/w. The cells were harvested at 0, 6, 12 and 24 h and then were subjected to flow cytometer. The percentage of cells in G1, S and G2/M phases are indicated. The sub G1 represents the apoptotic population. Data shown are representatives of three independent experiments.

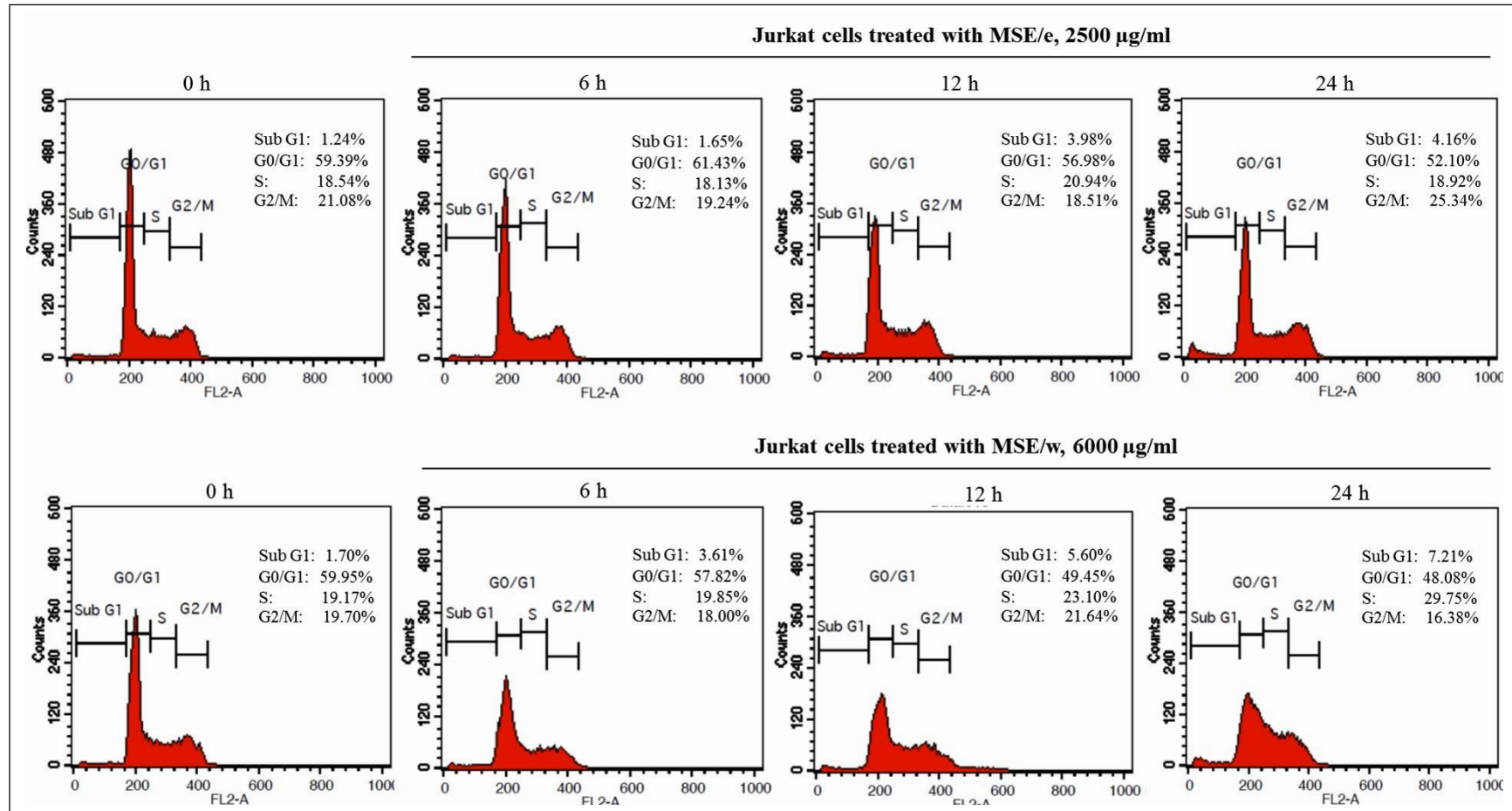


Figure 4.8 Time-dependent effect of mintweed seed ethanol and water extracts, MSE/e and MSE/w, on cell cycle of Jurkat cells (human T leukemia cells). The cells were incubated with 2,500 µg/ml MSE/e and 6,000 µg/ml MSE/w. The cells were harvested at 0, 6, 12 and 24 h and then subjected to flow cytometer. The percentage of cells in G1, S and G2/M phases are indicated. The sub G1 represents the apoptotic population. Data shown are representatives of three independent experiments.

(Cochrane, Raveendran Nair, Melnick, Resek, and Ramachandran, 2008) สารสกัดเปลือกกรากของ *Persea americana* แสดง antiproliferative effect ต่อ MCF7 และหยุด cell cycle ที่ G1 phase (Engel, Oppermann, Falodun, and Kragl, 2011) รวมทั้งสารสกัดบัวบก (*Centella asiatica*) ซึ่งเป็นผักพื้นบ้านของไทยสามารถชักนำเซลล์มะเร็งลำไส้ CACO-2 arrest ที่ S และ G2/M phases และชักนำ apoptosis (Bunpo, et al., 2005) และสารสกัดเห็ดหลินจือ (*Ganoderma tsugae*) ก็หยุดการเจริญของ human colorectal adenocarcinoma Colo205 ที่ G2/M phase (Hsu, et al., 2008) นอกจากนี้มีรายงานของสาร curcumin จากขมิ้นและพริก แสดงฤทธิ์ cell cycle arrest ของเซลล์ bladder cancer cells ของคนที่ G2/M phase (Liu, Ke, Cheng, Huang, and Su, 2011) ส่วนฤทธิ์ต่อ cell cycle ของพืชในวงศ์เดียวกับแมงลักคาคือวงศ์ Lamiaceae มีรายงานน้อยมาก *Hyptis incana* ชักนำ G2/M arrest ของเซลล์ neuroblastoma cells (Tabata, et al., 2012)

นอกจากนี้มีรายงานแสดงสาร Flavonoids เป็นสารประกอบหลักที่ทำให้ cell cycle arrest และ apoptosis ในที่สุด (Sak, 2014) Flavonoids บริสุทธิ์หลายชนิดแสดงคุณสมบัติ cell cycle arrest แบบ dose- and time-dependent เช่น Apogenin หยุด cell cycle ของ human colon carcinoma cell lines SW480, HT-29 และ Caco-2 ที่ G2/M (Wang, W., Heideman, L., Chung, C.S., Pelling, J.C., Koehle, K.J., et al., 2000) Genistein, Apigenin, Luteolin, และ Quercetin หยุด cell cycle ของ LNCaP human prostate carcinoma cell line และ mouse BALB/c 3T3 fibroblasts ที่ G2/M (Kobayashi, Nakata, and Kuzumaki, 2002) และ Daidzein, Luteolin, และ Quercetin หยุด cell cycle ของ OCM-1 human melanoma cell line ที่ G1 แต่ Kaempferol, Apigenin, และ Genistein หยุดที่ G2/M (Casagrande and Darbon, 2001) และ Flavonoids อีกหลายชนิดหยุด cell cycle ของ PC3 human prostate cancer cell ที่ G2/M (Haddad, Venkateswaran, Viswanathan, Teahan, Fleshner, et al., 2006) Flavonoids จากสารสกัด cranberry หยุด cell cycle ของ MDA-MB-435 mice bearing human breast tumor cells ที่ G2/M และทำให้ไม่เกิดการแพร่กระจาย (metastasis) ของ tumor cells ในหนู (Ferguson, Kurowska, Freeman, Chambers, and Koropatnick, 2004)

ในทำนองเดียวกัน ในการทดลองนี้สารสกัดใบแมงลัก MLE/e พบมี flavonoids ปริมาณมาก (Table 3.5 บทที่ 3) แสดงคุณสมบัติ cytotoxicity ต่อ brine shrimp (Table 3.9, บทที่ 3) และแสดง antiproliferative effect ต่อเซลล์มะเร็งหลายสายพันธุ์ (Table 4.4) ดังนั้น Flavonoids จึงน่าจะเป็นสารประกอบหลักใน MLE/e ที่แสดงฤทธิ์ทำให้ human T leukemia Jurkat cell line เกิด cell cycle arrest และ apoptosis ในที่สุด

#### 4.4.3 Effect ต่อ cell cycle factors ของสารสกัดแมงลักคา MLE/e

เนื่องจากการผ่านระยะต่างๆของเซลล์ใน cell cycle ต้องการปัจจัยโปรตีนสนับสนุน คือ Cyclin-dependent protein kinases (CDKs) ซึ่งทำงานร่วมกับ Cyclins ทำให้เกิดปฏิกิริยาและกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง (successive activation) โดยได้เป็นชุดของ CDK/Cyclin complexes (CDK4,6/CyclinD complex และ CDK2/Cyclin E complex) ในระยะ G1 ซึ่ง complexes นี้จะ phosphorylate proteins ที่ต้องการในการกระตุ้น genes ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ DNA และโปรตีนอื่นๆ จนในที่สุดเซลล์เข้าสู่การแบ่งเซลล์ (mitosis) (Figure 4.1, B) (Nigg, 1995) และเพื่อเป็นการยืนยันฤทธิ์ของ MLE/e ต่อ cell cycle arrest ที่ Sub G1 ซึ่งก็คือที่ G1 phase ใน Jurkat cells การวิจัยนี้จึงได้วิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดใบแมงลักคา MLE/e ต่อ expression ของโปรตีน Cyclin D1, Cyclin E, CDK2 และ CDK4

MLE/e ที่ 600 ug/ml ลดการแสดงออก (deregulation) ของโปรตีน cyclin และ CDK ใน Jurkat cells (Figure 4.9) ขึ้นกับความเข้มข้นและเวลา (dose- and time-dependent manner) MLE/e ที่ 400 ug/ml ยังไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 กลุ่มนี้ MLE/e ที่ 600 ug/ml ทำให้ Cyclin D1 เริ่มลดลงที่ 1.5 ชม (Figure 4.9) และ ลดลงมากขึ้นตามเวลา แล้วหลังจากนี้การลดลงของ Cyclin D1 คงที่ Cyclin E เริ่มลดลงที่ 3 ชม และปรากฏน้อยมากที่ 6 ชม ส่วน CDK4 ลดลงที่ 6 ชม CDK2 ซึ่งเป็น kinase enzyme ที่ทำปฏิกิริยากับ Cyclin E ไม่ปรากฏ expression ตั้งแต่ 1.5 ชม

จะเห็นได้ว่า Expression ของ cyclins และ CDKs ของ Jurkat cells ต่อฤทธิ์ของ MLE/e เป็นการลดลง (deregulation) ที่สอดคล้องกับผลของ MLE/e ต่อ cell cycle arrest (Figure 4.5 – 4.8) Cyclin D และ Cyclin E เป็น 2 proteins หลักใน G1 phase ส่วน CDK4 ซึ่งเป็น kinase enzyme ทำปฏิกิริยา phosphorylation Cyclin D1 ได้ CDK4/Cyclin D1 complex กระตุ้น (promote) cell cycle ที่ G1 phase เมื่อ CDK4/Cyclin D1 complex น้อยลง ทำให้เกิด deregulation ของ cell cycle ที่ G1 ส่วน CDK2 ทำปฏิกิริยา phosphorylation กับ Cyclin E ได้ CDK2/Cyclin E complex ควบคุมการข้ามผ่านของ cell cycle จาก G1 phase ให้เข้าสู่ S phase (Nigg, 1995) และ deregulation ของโปรตีน Cyclins และ CDKs ใน Jurkat cells โดย MLE/e นี้เป็นแบบ dose- and time-dependent manner โดยเฉพาะอย่างยิ่ง deregulation ของ CDK2/Cyclin E complex ทำให้ Jurkat cells ไม่สามารถผ่านเข้าสู่ระยะ S เป็นเหตุให้เซลล์สะสมที่ Sub G1 และเซลล์สู่ mode ของ apoptosis ต่อไป ซึ่ง cell cycle arrest โดยสารสกัดพืชเช่นนี้ มีรายงานสนับสนุนหลายรายงาน



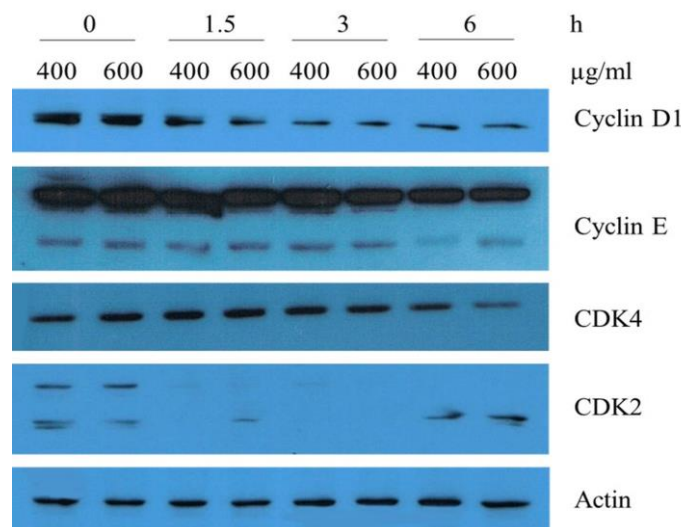


Figure 4.9 Effect of MLE/e on the expression of Cyclin and CDK proteins in Jurkat cells. The cells were treated at 400 ug/ml and 600 ug/ml for 0, 1.5, 3, and 6 h and 40 ug cell protein lysate was then subjected to 12% SDS-PAGE and Western blotting. Actin was used as a protein loading reference. The autoradiogram represents three experiments.

สารสกัดใบของ *Toona sinensis* (Chinese cedar) ลด expression ของ Cyclin D1 และ CDK4 และเพิ่ม cell cycle inhibitory protein p27 ใน H661 human lung large cell carcinoma cell line เป็นผลให้ cell cycle arrest ที่ Sub G1 phase (Wang, et al., 2010; Yang, et al., 2010) แต่สารสกัดจากเมล็ดของ ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis*) (Hsu et al., 2012) และเห็ดหลินจือ (*Ganoderma tsugae*) (Hsu, et al., 2008) arrest cell cycle ของ human colorectal carcinoma cells ที่ G2/M phase ส่วนสารสกัดจากขางหวาน หางจระเข้ (aloe-emodin) arrest cell cycle ของ HL-60 human promyelocytic leukemia cells ที่ G2/M (Chen, Hsieh, Chang, and Chung, 2004)

ในทำนองเดียวกันรายงานสาร phenolic diterpenes สกัดจาก *Hyptis incana* พืชในวงศ์เดียวกับ แมงลักคา (Lamiaceae) arrest cell cycle ของ IMR-32 neuroblastoma cells ที่ G2/M โดย deregulation ของ Cyclin B และ CDC2 (Tabata, et al., 2012) และสาร Isoquercitrin ซึ่งเป็น glycosylated quercetin flavonoid สกัดแยกจากใบและดอก *Hyptis fasciculata* ลด Cyclin D1 และเพิ่ม p27 แบบ dose- and time-dependent manner ใน Gbm 95 human glioblastoma cells เป็นผลให้เซลล์ arrest ที่ G1 phase ซึ่งสอดคล้องกับ cell cycle effect ของ MLE/e ต่อ Jurkat cells ของการวิจัยนี้ แต่ Isoquercitrin ไม่ชักนำให้เกิด apoptosis ใน Gbm 95 cells (Amado, et al., 2009) ดังนั้นชนิดของพืช วิธีการสกัดสาร และวิธีแยกสารทำให้ได้สารประกอบต่างๆ กันในสารสกัด ความหลายหลายของสารประกอบในพืชจึงน่าจะเป็นสาเหตุหลักที่ออกฤทธิ์ควบคุม expression ของ Cyclins, CDKs และ regulatory proteins อื่นๆ



ต่างกัน การควบคุมของสารสกัดต่อ cell cycle ระยะเวลาต่างๆ จึงต่างกัน รวมทั้งวิถี apoptosis ของ cancer cell lines ก็อาจเกิดจากเซลล์หยุดในระยะเวลาต่างๆ กัน ของ cycle ได้

#### 4.4.4 Apoptotic induction ของ Jurkat cells โดย MLE/e

MLE/e แสดงพิษต่อเซลล์ Jurkat ทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ซึ่งวิเคราะห์ได้จากการติดตามการขาด หักเป็นชิ้นของ DNA โดยการย้อม DNA ในเซลล์ด้วยสารเรืองแสง Propidium iodide และการเปลี่ยนแปลงของ cell membrane โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของ phosphatidylserine (PS) ซึ่งเป็น phospholipid ชนิดหนึ่ง โมเลกุลของ PS เรียงอยู่กึ่งลิบด้านใน (inner leaflet) ของ lipid bilayer ของ cell membrane ถ้าเซลล์เกิด apoptosis ขึ้น PS เคลื่อนย้ายออกจากด้านในมาด้านนอก แต่การเคลื่อนที่ของโมเลกุล PS ไม่สมมาตร (asymmetry) จึงสามารถติดตามการเคลื่อนย้ายของ PS ใน cell membrane ได้โดยการย้อม PS ด้วยสารเรืองแสง Annexin V แล้วแยกเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายออกจากกันด้วย flow cytometer

Apoptosis ของ Jurkat cells ที่ได้รับ MLE/e ความเข้มข้นระหว่าง 400, 600 และ 800 ug/ml นาน 24 ชม และเฉพาะความเข้มข้นที่ 600 ug/ml นาน 0, 6, 12 และ 24 ชม. การตรวจวิเคราะห์ด้วย Annexin V/propidium iodide และ flow cytometer แสดง Cytoqram ของ cell apoptosis ใน Figure 4.10 MLE/e ทำให้ Jurkat cells เกิด apoptosis มากขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้นและเวลาที่เพิ่มมากขึ้น ปริมาณ (%) ของ apoptotic Jurkat cells สรุปเปรียบเทียบใน Table 4.5 และ Table 4.6 ฤทธิ์ของ MLE/e ต่อ apoptosis ของ Jurkat cells บ่มนาน 24 ชม. เริ่มปรากฏที่ความเข้มข้น 400 ug/ml เซลล์ตายทั้งหมด (Q2 + Q4) 32% ที่ความเข้มข้น 600 ug/ml เซลล์ตายทั้งหมด 73.97% และ ที่ความเข้มข้นสูง 800 ug/ml เซลล์ตายทั้งหมด 93.27%

การชักนำของ MLE/e ต่อ Jurkat cells ให้เกิดการตาย apoptosis โดยตรวจวิเคราะห์ด้วย Annexin V/propidium iodide staining และ flow cytometry ในการทดลองนี้ มีรายงานหลายฉบับสนับสนุน จากสารสกัดพืชสมุนไพรหลายชนิดชักนำให้เซลล์มะเร็งหลายสายพันธุ์ตายแบบ apoptosis ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ และการแสดงออกของฤทธิ์ต่อ cell cycle arrest ที่ G1 phase และ apoptosis เป็นแบบ dose- and time-dependent manner เช่นกัน อาทิเช่น สารสกัดโองเทงฝรั่ง *Physalis peruviana* ชักนำ cell cycle arrest และ apoptosis ของ HepG2 (Wu, Ng, Chen, Lin, Wang, S-S., et al., 2004) สารสกัดจากรากของโกฐเชียง *Chinese angelica* ชักนำ A549 human lung adenocarcinoma cells (Cheng, Chang, Lee, Liu, Chen, et al., 2004) สารสกัด *Annona glabra* (พืชในวงศ์ Annonaceae) ชักนำ CEM และ CEM/VLB leukemia cell lines (Cochrane, Nair, Melnick, Resek, and Ramachandran, 2008) สารสกัดใบเคอร์รี่ (*Murraya koenigii*) ชักนำ MCF7 and MDA-MB-231 human breast carcinoma cell lines (Bindu Noolu, B., Ajumeera, R., Chauhan, A., Nagalla, B., Manchala, R., et al., 2013) และสาร

สกัดใบวอลนัต (*Juglans regia*) ชักนำ cell cycle arrest ใน PC3 human prostate cancer cells (Li, Li, Wang, Zheng, Hu, et al., 2015)

นอกจากนี้ยังมีรายงาน flavonoids แยกสกัดจากชะเอมเทศ *Glycyrrhiza inflata* ชักนำ apoptosis ใน เซลล์ SiHa cervical carcinoma cells (Xia, Matsidik, Ablise, Lei and Abudula, 2013) สารสกัดน้ำจากใบของ *Urtica dioica* ยับยั้ง proliferation และทำให้ MCF7 cells เกิด apoptosis โดยเพิ่มปริมาณ calpain 1, calpastatin, caspase 3, caspase 9, Bax และ Bcl-2 โปรตีนใน apoptotic pathway (Fattahi, Ardekani, Zabih, Abedian, Mostafazadeh, et al., 2013)

#### 4.5 สรุปผลการทดลอง

ในการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบแมงลักสกัดด้วย 70% ethanol MLE/e และสกัดด้วย น้ำ MLE/w ไม่มีพิษต่อเซลล์ปกติ PBMC แต่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะสารสกัด MLE/e มีศักยภาพในการควบคุมเซลล์มะเร็ง HepG2, MCF7, PC3 และ Jurkat ทำให้เซลล์ไม่เจริญเพิ่มจำนวน -antiproliferation- เกิดการหยุดวัฏจักรเซลล์ -cell cycle arrest- ที่ G1 phase โดยลดการแสดงออกของปัจจัยโปรตีนควบคุม cell cycle คือ Cyclin D1, Cyclin E, CDK2 และ CDK4 ทำให้เซลล์ไม่สามารถเตรียมความพร้อมให้ผ่านจากระยะ G1 เข้าสู่ระยะ S วัฏจักรเซลล์หยุด เซลล์ไม่แบ่งตัวเพิ่มจำนวน เซลล์สะสมที่ Sub G1 หรือ G1 phase และ เซลล์เข้าสู่การฆ่าตัวตาย -cell apoptosis- ในเวลาต่อมา โดย DNA/nucleosomes ใน nucleus แตกหัก และ โมเลกุล phospholipids ใน cell membrane แยกสลาย ดังนั้นแมงลักจึงน่าจะเป็นพืชทางเลือกที่ดีอีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง และเป็นตัวเลือกในการวิจัยพัฒนาขึ้นต่อไปเพื่อผลิตเป็นยารักษามะเร็งในคนได้ในที่สุด

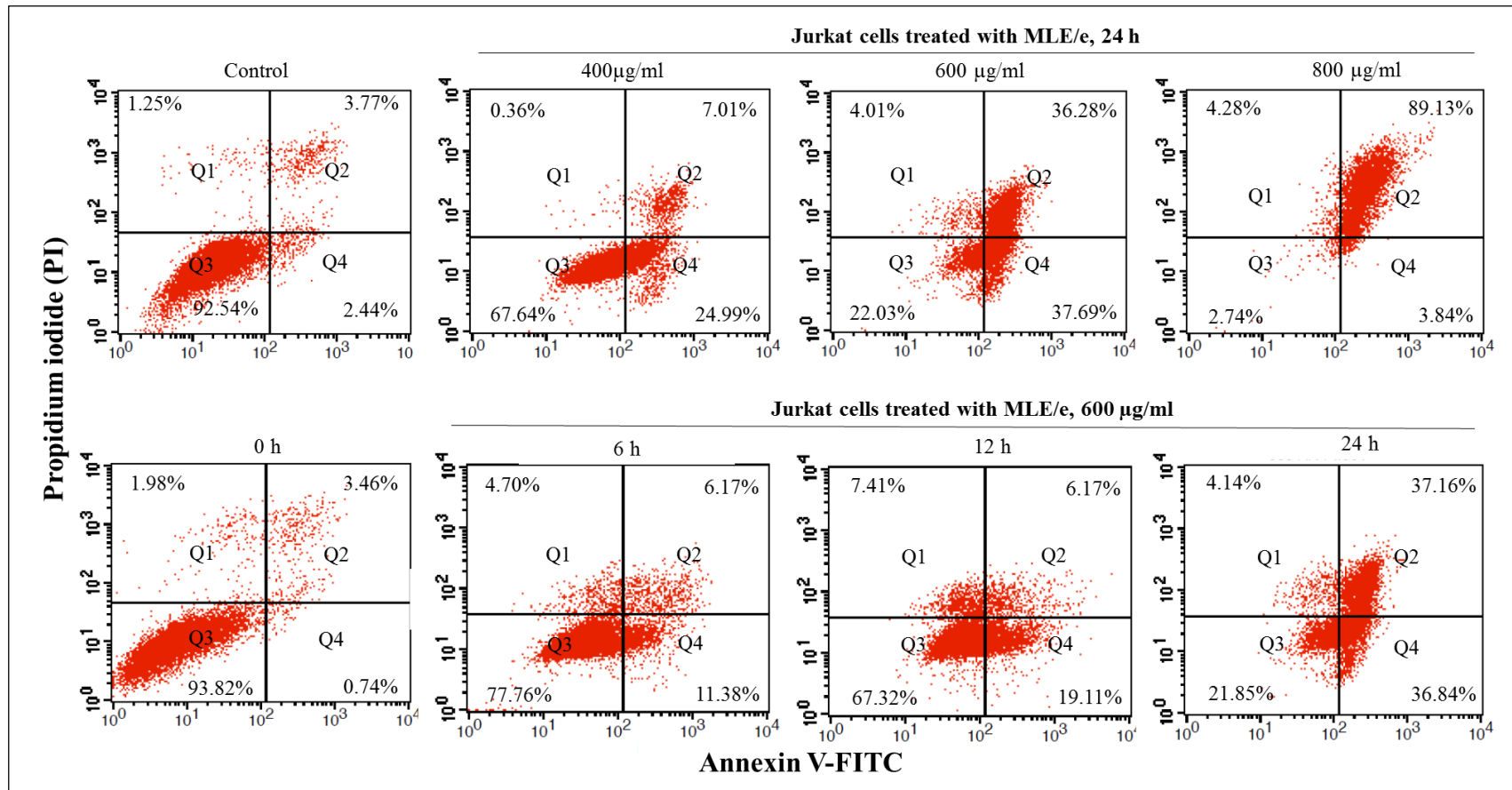


Figure 4.10 Cytogram of annexin V binding and propidium iodide uptake in Jurkat (human T leukemia) cells after treated with 400, 600 and 800 µg/ml MLE/e for 24 h (A) and with 600 µg/ml for 0, 6, 12 and 24 h (B). Q represents quadrants in cytogram; Q1, necrotic cells; Q2, late apoptosis; Q3, live cells; Q4, early apoptosis. Data shown are representatives of three independent experiments.

Table 4.5 Summary of apoptotic effect of concentrations of MLE/e treatment at 24 h on percentage of Jurkat cells, stained with annexin V/propidium iodide.

MLE/e	% Annexin V/propidium iodide stained apoptotic cells			
	Live cells (Q3)	Early apoptotic cells (Q4)	Late apoptotic cells (Q2)	Total apoptosis (Q2 + Q4)
24 hours				
Control	92.54	02.44	03.77	06.21
400 ug/ml	67.64	24.99	07.01	32.00
600 ug/ml	22.03	37.69	36.28	73.97
800 ug/ml	02.74	03.84	89.43	93.27

Table 4.6 Summary of apoptotic effect of incubation time of 600 ug/ml MLE/e treatment at 24 h on percentage of Jurkat cells, stained with annexin V/propidium iodide.

MLE/e	% Annexin V/propidium iodide stained apoptotic cells			
	Live cells (Q3)	Early apoptotic cells (Q4)	Late apoptotic cells (Q2)	Total apoptosis (Q2 + Q4)
600 ug/ml				
0 h	93.82	00.74	03.46	04.20
6 h	77.76	11.38	06.17	17.55
12 h	67.32	19.11	06.17	25.28
24 h	21.85	36.84	37.16	74.00

## เอกสารอ้างอิง

- Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., and Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hu. Reprod.* 22(5): 1304–1309; doi:10.1093/humrep/dem011. Advance Access Publication. February 16, 2007
- Amado, N.G., Cerqueira, D.M., Menezes, F.S., da Silva, J.F., Neto, V.M., et al. (2009). Isoquercitrin isolated from *Hyptis fasciculata* reduces glioblastoma cell proliferation and changes beta-catenin cellular localization. *Anticancer Drugs.* 20(7): 543-552; doi: 10.1097/CAD.0b013e32832d1149.
- Armania, N., Yazan, L.S., Ismail, I.S., Foo, J.B., Tor, Y.S., Ishak, N., Ismail, N., and Ismail, M. (2013). *Dillenia suffruticosa* extract inhibits proliferation of human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) via induction of G2/M arrest and apoptosis. *Molecules.* 18: 13320-13339; doi:10.3390/molecules181113320.
- Baharum, Z., Akim, A.M., Taufiq-Yap, Y.H., Hamid, R.D., and Kasran, R. (2014). In Vitro antioxidant and antiproliferative activities of methanolic plant part extracts of *Theobroma cacao*. *Molecules.* 19: 18317-18331; doi:10.3390/molecules191118317.
- Bindu Noolu, B., Ajumeera, R., Chauhan, A., Nagalla, B., Manchala, R., et al. (2013). *Murraya koenigii* leaf extract inhibits proteasome activity and induces cell death in breast cancer cells. *BMC Complementary Alternative Med.* 13: 7. Available at <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/7>.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Bunpo, P., Kataoka, K., Arimochi, H., Nakayama, H., Kuwahara, T., et al. (2005). *Centella asiatica* extract induces cell cycle arrest in CACO-2 human colon cancer cells. *Chiang Mai Med Bull.* 44 (1): 21-28.
- Casagrande, F. and Darbon, J-M. (2001). Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharm.* 61: 1205-1215.

- Chen, H.C., Hsieh, W.T., Chang, W.C., Chung, J.G. (2004). Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Food Chem Toxicol.* 42: 1251-1257; doi:10.1016/j.fct.2004.03.002.
- Cheng, Y-L., Chang, WL., Lee, S-C., Liu, Y-G., Chen, C-J., et al. (2004). Acetone extract of *Angelica sinensis* inhibits proliferation of human cancer cells via inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Life Sci.* 75:1579-1594; doi:10.1016/j.lfs.2004.03.009.
- Cochrane, C.B., Raveendran Nair, P.K., Melnick, S.J., Resek, A.P., and Ramachandran, C. (2008). Anticancer effects of *Annona glabra* plant extracts in human leukemia cell lines. *Anticancer Res.* 28: 965-972.
- Costa-Lotufo, L.V., Araujo, E.C.C., Lima, M.A.S., Moraes, M.E.A., Pessoa, C., et al. (2003). Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). *Pharmazie.* 58: 78-79.
- da Rocha, A.B., Lopes, R.M., and Schwartzmann, G. (2001). Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion Pharma.* 1:364–369.
- Engel, N., Oppermann, C., Falodun, A., and Kragl, U. (2011). Proliferative effects of five traditional Nigerian medicinal plant extracts on human breast and bone cancer cell lines. *J Ethnopharm.* 137: 1003-1010; doi:10.1016/j.jep.2011.07.023.
- Fattahi, S., Ardekani, A.M., Zabihi, E., Abedian, Z., Mostafazadeh, A. et al. (2013). Antioxidant and apoptotic effects of an aqueous extract of *Urtica dioica* on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 14 (9): 5317-5323; doi:http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.9.5317
- Ghali, W., Vaudry, D., Jouenne, T., and Marzouki, M.N. (2014). Extracts from medicinal plants inhibit cancer cell proliferation, induce apoptosis in ovary, lung and neuronal cancer cell lines. *Cancer Metab.* 2(Suppl 1): 21-22.
- Haddad, A.Q., Venkateswaran, V., Viswanathan, L., Teahan, S.J., Fleshner, N.E., et al. (2006). Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Diseases.* 9: 68-76; doi:10.1038/sj.pcan.4500845
- Hasan, N.M. and Al Sorkhy, M. K. (2004). Herbs that promote cell proliferation. *Inter J Herbal Med.* 1 (6): 18-21.
- Hofman, F.M., Kanesberg, B., Smith, D., Garrison, D. and Sevier, E.D. (1982). Stability of T and B-cell numbers in human peripheral blood. *Am J Clinical Pathol.* 77(6): 710-713.

- Hsu, S-C., Ou, C-C., Li, J-W., Chuang, T-C., Kuo, H-P., et al. (2008). *Ganoderma tsugae* extracts inhibit colorectal cancer cell growth via G2/M cell cycle arrest. *J Ethnopharm.* 120: 394-401; doi:10.1016/j.jep.2008.09.025.
- Hsu, C-P., Lin, C-C., Huang, C-C., Lin, Y-H., Chou, J-C., et al. (2012). Induction of apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal carcinoma by litchi seed extract. *J Biomed Biotechnol.* Vol. 2012, 7 pages; doi:10.1155/2012/341479.
- Kaur, M., Mandair, R., Agarwal, R., and Agarwal, C. (2008). Grape seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma cells. *Nutr Cancer.* 60 (Suppl 1): 2–11; doi:10.1080/01635580802381295.
- Kobayashi, T., Nakata, T., and Kuzumaki, T. (2002). Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer Letters.* 176: 17-23.
- Li, H., Wang, P., Liu, Q., Cheng, X., and Zhou, Y. (2012). Cell cycle arrest and cell apoptosis induced by *Equisetum hyemale* extract in murine leukemia L1210 cells. *J Ethnopharm.* 144: 322–327.
- Li, W., Li, D-Y., Wang, H-D., Zheng, Z-J., Hu, J., et al. (2015). *Juglans regia* hexane extract exerts antitumor effect, apoptosis induction and cell cycle arrest in prostate cancer cells in vitro. *Trop J Pharma Res.* 14 (3): 399-405; Available online at <http://www.tjpr.org>, <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v14i3.7>.
- Lima, S.O., da Costa Viana, L., de Santana, F.R.T., Zucoloto, S., de Albuquerque Junior, R.L., et al. (2012). Proliferative effect of aqueous extract of *Hyptis fruticosa* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 27 (1): 71-75.
- Liu, H-S., Ke, C-S., Cheng, H-C., Huang, C-Y.F., and Su, C-L. (2011). Curcumin-induced mitotic spindle defect and cell cycle arrest in human bladder cancer cells occurs partly through inhibition of a urora A. *Mol Pharm.* 80: 638-646.
- Manosroi, J., Dhumtanom, P., and Manosroi, A. (2005). Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Letters* 235: 114–120.
- Markaki, A.E. (2009). AlamarBlue® assay for assessment of cell proliferation using the FLUOstar OPTIMA. BMG LABTECH GmbH, Application Note 195, pp 2. Available at [www.bmglabtech.com](http://www.bmglabtech.com).
- Meiyanto, E., Hermawan, A., and Anindyajati. (2012). Natural products for cancer-targeted therapy: Citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 13, 427-436; DOI:<http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.2.427>.

- Newman, D.J., Cragg, G.M., and Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod.* 66: 1022-1037.
- Nigg, E.A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: Key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Biol Essays.* 17 (6): 471–80; doi:10.1002/bies.950170603. PMID 7575488.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 267: 5421-5426.
- Peter J. Ferguson, P.J., Kurowska, E., Freeman, D.J., Chambers, A.F., Koropatnick, D.J. (2004). A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. *J Nutr.* 134: 1529-1535.
- Priyadharshini, S.D. and Sujatha, V. (2013). Antioxidant and cytotoxic studies on two known compounds isolate from *Hyptis suaveolens* leaves. *Int J Pharma Pharma Sci.* 5(4): 283-290.
- Sak, K. (2014). Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev.* 8(16): 122-146; doi: 10.4103/0973-7847.134247.
- Shu-Jing Wu, S-J., Ng, L-T., Chen, C-H., Lin, D-L., Wang, S-S., Lin, C-C. (2004). Antihepatoma activity of *Physalis angulate* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human HepG2 cells. *Life Sci.* 74: 2061-2073; doi:10.1016/j.lfs.2003.09.058
- Tabata, K., Kim, M., Makino, M., Satoh, M., Satoh, Y., et al. (2012). Phenolic diterpenes derived from *Hyptis incana* induce apoptosis and G2/M arrest of neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 32: 4781-4790.
- Valko, V., Pravdova, E., Nagy, M., Gruncai, D., and Fickova, M. (2007). Antiproliferation activity of plant extracts from genus *Philadelphus* L. *Acta Fact Pharm Univ Comeniana.* 54: 209-214.
- van den Heuvel, S. (2005). Cell-cycle regulation. In: *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* [Internet]. Pasadena, CA. pp 28.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36: 131–149.
- Wang, W., Heideman, L., Chung, C.S., Pelling, J.C., Koehle, K.J., et al. (2000). Cell-Cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol Carcinogenesis.* 28: 102-



- Wang, C-Y., Lin, K-H., Yang, C-J., Tsai, J-R., Hung, J-Y, et al. (2010). *Toona sinensis* extracts induced cell cycle arrest and apoptosis in the human lung large cell carcinoma. *Kaohsiung J Med Sci.* 26(2): 68–75.
- Wu, S-J., Ng, L-T., Chen, C-H., Lin, D-L., Wang, S-S., et al. (2004). Antihepatoma activity of *Physalis angulate* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human HepG2 cells. *Life Sci.* 74: 2061 – 2073; doi:10.1016/j.lfs.2003.09.058.
- Yang, C-J., Huang, Y-J., Wang, C-Y., Wang, P-H., Hsu, H-K., et al. (2010). Antiproliferative effect of *Toona sinensis* leaf extract on non–small-cell lung cancer. *Translational Res.* 155(6): 305-313; doi:10.1016/j.trsl.2010.03.002
- Xia, G., Matsidik, R., Ablise, M., Lei, S., and Abudula, A. (2013). Anti-cancer activity of flavonoids from Xinjiang *Glycyrrhiza inflata* licorice on proliferation, cytotoxicity and apoptosis in cervical carcinoma cells. *J Med Plants Res.* 7(5): 173-178; doi: 10.5897/JMPR11.1485.
- Ximenes, R.M., Melo, A.M., Magalhaea, L.P.M., de Souza, I.A., and de Albuquerque, J.F.C. (2013). Antitumor activity of leaves from *Hyptis mutabilis* (A. Rich.) Briq. Lamiaceae) in mice bearing tumor. *Dataset Papers Pharma.* Vol. 2013. Article ID 169357,3 pp. Hindawi Publishing Corporation; <http://dx.doi.org/10.7167/2013/169357>.
- Zandonai, R.H., Coelho, F., Ferreira, J., Mendes, A.K.B., and Biavatti, M.W. (2010). Evaluation of the proliferative activity of methanol extracts from six medicinal plants in murine spleen cells. *Brazilian J Pharma Sci.* 46: 323-333.

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

#### 5.1 สารพฤกษเคมี (phytochemicals) ในสารสกัดแมงลักคา

การตรวจหาพฤกษเคมีในสารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคา (mintweed) สกัดด้วย 70% ethanol และน้ำ โดยการแยกสารสกัดด้วย thin layer chromatography (TLC) และ โดยการทดสอบให้สารสกัดทำปฏิกิริยากับสารพิเศษ (specific reagent testing) สารสกัดใบ MLE/e และ MLE/w มี phenolics, terpenoids, essential oils, และ tannins สารสกัดเมล็ด MSE/e มี phenolics, terpenoids, essential oils, tannins และ saponins ส่วน MSE/w มี phenolics, terpenoids, saponins, และ alkaloids สารสกัดทั้งหมดมีคุณสมบัติ antioxidant activity

#### 5.2 ปริมาณ Total phenolic compounds (TPC) และ Total flavonoid (TF) contents

##### ในสารสกัดแมงลักคา

สารสกัดใบแมงลักคา มี total phenolic compounds (TPC) และ total flavonoids (TF) มากกว่าสารสกัดจากเมล็ด ปริมาณ TPC และ ปริมาณ FT ดังนี้

MLE/e มี TPC  $370.07 \pm 7.10$  mg GAE/g dried extract และ FT  $278.81 \pm 3.40$  mg CAE/g dried extract

MLE/w มี TPC  $319.45 \pm 8.67$  mg GAE/g dried extract และ FT  $240.81 \pm 5.01$  mg CAE/g dried extract

MSE/e มี TPC  $135.92 \pm 2.17$  mg GAE/g dried extract และ FT  $86.28 \pm 0.67$  mg CAE/g dried extract

MSE/w มี TPC  $77.02 \pm 2.05$  mg GAE/g dried extract และ FT  $15.38 \pm 0.21$  mg CAE/g dried extract

#### 5.3 Antioxidant activity ของสารสกัดแมงลักคา

คุณสมบัติ antioxidant activity ของสารสกัดแมงลักคา วิเคราะห์โดย DPPH radical scavenging และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) สารสกัดใบแมงลักคา มีประสิทธิภาพ  $IC_{50}$  ของ antioxidant activity สูงกว่าสารสกัดเมล็ด ทั้งประสิทธิภาพต่อ radical scavenging และ reducing antioxidant power และ สารสกัดด้วย 70% ethanol MLE/e และ MSE/e แสดงประสิทธิภาพ antioxidant activity สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ MLE/w และ MSE/w

MLE/e มี radical scavenging  $IC_{50}$   $9.26 \pm 0.08$  ug/ml และมี FRAP  $8.52 \pm 0.44$  uM  $FeSO_4$ /mg extract

MLE/w มี radical scavenging  $IC_{50}$   $10.89 \pm 0.70$  ug/ml และมี FRAP  $6.27 \pm 0.03$  uM  $FeSO_4$ /mg extract

MSE/e มี radical scavenging  $IC_{50}$   $32.85 \pm 0.05$  ug/ml และมี FRAP  $2.01 \pm 0.35$  uM  $FeSO_4$ /mg extract

MSE/w มี radical scavenging  $IC_{50}$   $147.17 \pm 1.67$  ug/ml และมี FRAP  $1.36 \pm 0.00$  uM  $FeSO_4$ /mg extract

ประสิทธิภาพ antioxidant activity ของสารสกัดแมงลักคั่วทั้ง radical scavenging และ reducing antioxidant power มีความสัมพันธ์ตรงกับปริมาณของ TPC และ FC ที่มีในแต่ละสารสกัด ทั้งนี้ปริมาณ total phenolic compounds และ total flavonoids, antioxidant activity โดย DPPH free radical scavenging และ ferric reducing-antioxidant power (FRAP) และ cytotoxicity ของสารสกัดแมงลักคั่วสรุปรวมไว้ในตาราง 3.11

#### 5.4 Cytotoxicity ของสารสกัดแมงลักคั่ว

สารสกัดแมงลักคั่วไม่มีความเป็นพิษระดับเซลล์ (cytotoxicity) ต่อสิ่งมีชีวิตปกติ คือ กุ้งฝอย *Artemia salina* โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Ascorbic acid

MLE/e มีค่า lethal concentration 50,  $LC_{50}$  360.48 ug/ml,

MLE/w มีค่า  $LC_{50}$  1,282.47 ug/ml

MSE/e มีค่า  $LC_{50}$  708.26 ug/ml และ

MSE/w มีค่า  $LC_{50}$  470.60 ug/ml และ

Ascorbic acid มีค่า  $LC_{50}$  13.77 ug/ml

#### 5.5 Proliferative effects ของสารสกัดแมงลักคั่ว

##### 5.5.1 Proliferative effects ต่อ normal PBMCs และ Jurkat cell line

สารสกัดแมงลักคั่วทั้งหมดมีคุณสมบัติเสริมการเพิ่มจำนวนเซลล์ - proliferative effect ของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ - normal peripheral blood mononuclear cells

เฉพาะสารสกัดใบ แสดงคุณสมบัติยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ - antiproliferative effect ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์ Jurkat cell แบบ dose-dependent manner ซึ่งประสิทธิภาพ antiproliferative effect ของ MSE/e ต่อ Jurkat cells ที่ 24 ชม มีค่า  $IC_{50}$   $553.52 \pm 14.07$  ug/ml และของ MLE/w  $912.06 \pm 16.86$  ug/ml (Table 4.3)

### 5.5.2 Proliferative effect ของ MLE/e ต่อ HepG2, MCF7 และ PC3 cell lines

สารสกัดแมงลักคา MLE/e ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ MCF7 และ HepG2 แบบ dose- and time-dependent manner ประสิทธิภาพต่อ MCF7 ที่ 24 ชม มีค่า  $IC_{50}$   $763.12 \pm 9.51$  ug/ml และ ที่ 48 ชม  $IC_{50}$   $707.45 \pm 7.84$  ug/ml และ ประสิทธิภาพต่อ HepG2 ที่ 24 ชม มีค่า  $IC_{50}$   $866.06 \pm 16.44$  ug/ml และ ที่ 48 ชม  $IC_{50}$   $798.28 \pm 20.23$  ug/ml (Table 4.4)

ดังนั้นสารสกัดแมงลักคายับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของทั้งเซลล์มะเร็งแบบแขวนลอย - suspension cell คือ Jurkat cells ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด และ เซลล์แบบยึดติดพื้นจานเลี้ยง – attach cell คือ MCF7 และ HepG2 cells ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งในเนื้อเยื่อของเต้านมและตับ แต่มีต่อ PC3 cells น้อยมาก

### 5.6 Cell cycle effect ของสารสกัดใบแมงลักคา MLE/e

สารสกัดใบแมงลักคามีคุณสมบัติยับยั้ง cell cycle ของ Jurkat cells แต่ สารสกัดเมล็ดไม่แสดงคุณสมบัตินี้ MLE/e ยับยั้ง cell cycle ของ Jurkat cells ที่ระยะ G1 แบบ dose- and time-dependent manner

MLE/e ที่ ความเข้มข้น 400, 600, และ 800 ug/ml, 24 ชม ทำให้เซลล์ Jurkat สะสมใน Sub G1 1.07%, 8.01%, 27.29% และ 63.10% ตามลำดับ ส่วน MLE/w ที่ความเข้มข้น 800, 1,000 และ 1,200 ug/ml, 24 ชม มีเซลล์สะสมที่ Sub G1 1.23%, 4.33%, 10.23% และ 22.38% ตามลำดับ

MLE/e ที่ความเข้มข้น 600 ug/ml ยับยั้ง cell cycle ของ Jurkat cells มากขึ้นตามเวลา 0, 6, 12, และ 24 ชม เซลล์สะสมที่ Sub G1 1.24-4.87, 4.8%, 22.13% และ 22.13-28.06% ตามลำดับ และ MLE/w ที่ 1,000 ug/ml ทำให้เซลล์สะสมที่ Sub G1 1.70%, 1.92%, 4.12%, และ 10.11% ตามลำดับ

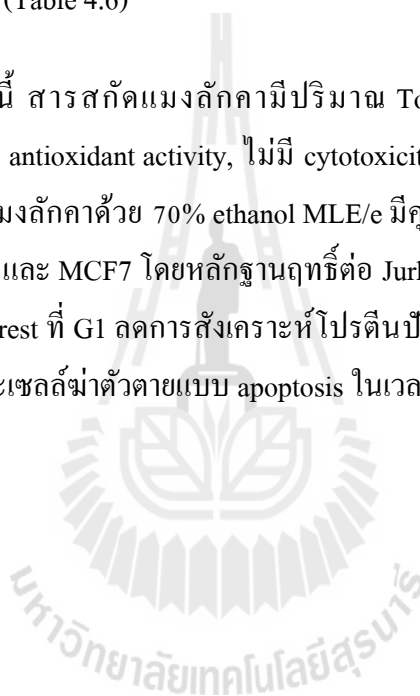
### 5.7 Effect ต่อ cell cycle factors ของสารสกัดแมงลักคา MLE/e

จากผล cell cycle arrest ในการวิเคราะห์นี้จึงเน้นเฉพาะ MLE/e ในการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยโปรตีนในระยะ G1 ของ cell cycle เท่านั้น MLE/e ทำให้เกิด deregulation ของ cyclin และ CDK ใน Jurkat cells แบบ dose- and time-dependent manner MLE/e ที่ความเข้มข้น 400 ug/ml ไม่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ Cyclin และ CDK การแสดงออกของ Cyclin และ CDK ลดลงเมื่อเซลล์ได้รับ 600 ug/ml MLE/e โดย Cyclin D1 และ CDK2 เริ่มลดลงที่ 1.5 ชม. Cyclin E เริ่มลดลงที่ 3 ชม. และ CDK4 เริ่มลดลงที่ 6 ชม. ซึ่งเป็นผลให้เซลล์ไม่มี CDK/Cyclin complex ที่จะทำปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไป เซลล์ไม่สามารถผ่านจากระยะ G1 เข้าสู่ระยะ S เพื่อสังเคราะห์ DNA ได้ เซลล์จึงสะสมใน Sub G1 หรือก็คือ เซลล์หยุดอยู่ในระยะ G1 และเซลล์ไม่แบ่งตัวและจะถูกกำจัดโดยการฆ่าตัวตายแบบ apoptosis ต่อไป

### 5.8 Apoptotic induction ของ MLE/e

การตายของเซลล์ วิเคราะห์จากการแตกสลายของ DNA และ การเคลื่อนย้ายโมเลกุล phosphatidylserine (PS) จากกิลิป phospholipid bilayer ชั้นในสู่กิลิปชั้นนอก MLE/e ชักนำให้ Jurkat cells เกิด apoptosis แบบ dose-and time-dependent manner MLE/e ความเข้มข้น 400, 600 และ 800 ug/ml ชักนำ apoptosis ทั้งหมด 32.00%, 73.97% และ 93.27% ตามลำดับ (Table 4.5) และเลือกเฉพาะ MLE/e ความเข้มข้น 600 ug/ml บ่มกับ Jurkat cells นาน 0, 6, 12 และ 24 ชม ชักนำ apoptosis ทั้งหมด 17.55%, 25.28% และ 74.00% ตามลำดับ (Table 4.6)

การวิจัยนี้สรุปได้ดังนี้ สารสกัดแมงลักคามีปริมาณ Total phenolic compounds และ total flavonoids สูง มีคุณสมบัติของ antioxidant activity, ไม่มี cytotoxicity ต่อเซลล์และสิ่งมีชีวิต (กุ้งฝอย) ปกติ โดยเฉพาะสารสกัดใบแมงลักคาคด้วย 70% ethanol MLE/e มีคุณสมบัติ cytotoxicity ต่อเซลล์สายพันธุ์มะเร็ง Jurkat cells, HepG2 และ MCF7 โดยหลักฐานฤทธิ์ต่อ Jurkat cells สารสกัด MLE/e ยับยั้ง cell proliferation ทำให้ cell cycle arrest ที่ G1 ลดการสังเคราะห์โปรตีนปัจจัย CDKs และ Cyclins ซึ่งเป็นผลให้เซลล์หยุดที่ G1 ใน cycle และเซลล์ฆ่าตัวตายแบบ apoptosis ในเวลาต่อมา



## ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ ดร. กรกช นามสกุล อินทราพิเชฐ
2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้  
สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000  
โทรศัพท์ 044-22-4296 โทรสาร 044-22-4633
4. ประวัติการศึกษา  
พ.ศ. 2515 ปริญญาตรี วท.บ. (สัตววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
พ.ศ. 2520 ปริญญาโท วท.ม. (กายวิภาคศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล  
พ.ศ. 2533 ปริญญาเอก Ph.D. (Molecular Biology) Lehigh University, Bethlehem,  
Pennsylvania, USA.
5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญ  
Molecular Cell Biology (cell proliferation and cell apoptosis), Monoclonal antibody production  
และ Plant-based insect pest biological control