บทคัดย่อ

แมงลักคาหรือกระเพราผี (*Hyptis suaveolens*) เป็นวัชพืชที่เจริญแพร่หลายตามข้างถนนและไร่เกษตรทั่วไป ในภูมิปัญญาพื้นบ้านมีการใช้แมงลักคารักษาโรคหลายอาการ 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 antioxidation และ cytotoxicity ของสารสกัดแมงลักคา

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

สารสกัดใบแมงลักคามี total phenolic compounds (TPC) และ total flavonoids (TF) มากกว่าสารสกัดจากเมล็ด MLEs มี TPC 319.45 ± 8.67 - 370.07 ± 7.10 mg GAE/g dried extract มี TF 240.81 ± 5.01 - 278.81 ± 3.40 mg CAE/g dried extract; MSEs มี TPC 77.02 ± 2.05 - 135.92 ± 2.17 mg GAE/g dried extract มี TF 15.38 ± 0.21 - 86.28 ± 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 ± 0.08 - 10.89 ± 0.70 ug/ml และมี FRAP 6.27 ± 0.03 - 8.52 ± 0.44 uM $FeSO_4$/mg และ MSEs มี DPPH activity, IC_{50} 32.85± 0.05 - 147.17 ± 1.67 ug/ml และมี FRAP 2.01 ± 0.35 - 1.36 ± 0.00 uM $FeSO_4$/mg คุณสมบัติ antioxidant activity ของสารสกัดแมงลักคาสอดคล้องกับปริมาณ TPC และ TF ที่มีในสารสกัด

สารสกัดแมงลักคาทั้งหมดไม่มีพิษระดับเซลล์ต่อกุ้งฝอยและเซลล์ปกติโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 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 และ การตายของเซลล์

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 ± 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 ± 14.07 µg/ml) > MLE/w (912.06 ± 16.86 µg/ml) > MSE/e (2,385.95 ± 81.28 µg/ml) > MSE/w (5,813.45 ± 111.25 µg/ml) นั่นคือสารสกัดเมล็ดทั้ง MSE/e และ MSE/wไม่แสดง natiproliferation ต่อ Jurkat cells เมื่อเลือกเฉพาะ MLE/e ทดลองกับเซลล์มะเร็งซึ่งแนบติดจานเลี้ยง 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 ± 9.51 µg/ml และของ HepG2 human hepatocellular carcinoma cells ด้วย IC_{50}, 866.06 ± 16.44 µg/ml แต่ MLE/e ไม่ลดจำนวนเซลล์ PC3 human prostate cancer cells, IC_{50}, 1,636.16 ± 152.90 µg/ml

วิเคราะห์การหยุดของวัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest) ด้วยการแยกเซลล์ระยะต่างๆ ในวัฏจักรโดย 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 แมงลักคาจึงเป็นพืชหนึ่งที่มีศักยภาพสูงที่จะวิจัยและพัฒนาเพิ่มเติมอีกหลายประเด็นรวมทั้งการทดลองทางคลินิกเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเภสัชในการป้องกันและเป็นยารักษามะเร็งต่อไปได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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 ± 8.67 - 370.07 ± 7.10 mg GAE/g dried extract and TF 240.81 ± 5.01 - 278.81 ± 3.40 mg CAE/g dried extract. MSEs had TPC 77.02 ± 2.05 - 135.92 ± 2.17 mg GAE/g dried extract and TF 15.38 ± 0.21 - 86.28 ± 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 ± 0.08 - 10.89 ± 0.70 ug/ml and FRAP 6.27 ± 0.03 - 8.52 ± 0.44 uM $FeSO_4$/mg. MSEs contained DPPH activity, IC_{50} 32.85± 0.05 - 147.17 ± 1.67 ug/ml and FRAP 2.01 ± 0.35 - 1.36 ± 0.00 uM $FeSO_4$/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 ± 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 ± 14.07 µg/ml) > MLE/w (912.06 ± 16.86 µg/ml) > MSE/e (2,385.95 ± 81.28 µg/ml) > MSE/w (5,813.45 ± 111.25 µg/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 ± 9.51 µg/ml and of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells with IC_{50}, of 866.06 ± 16.44 µg/ml. However, MLE/e did not reduce the proliferation of PC3, its IC_{50}, was 1,636.16 ± 152.90 µg/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, และ 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 และ 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 essemtial 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.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี