ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากลำต้นม้ากระทืบโรง
Cytotoxicity Activity of Isolated Compounds from the Stem Extract of *Ficus foveolata* Wall

วิโรจน์ มีรุ่งเรือง[1] และภาคภูมิ พาณิชยูปการนันท์[2]
Wirod Meerungrueang[1] and Pharkphoom Panichayupakaranant[2]
[1]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย
[1]School of Pharmacy, Eastern Asia University
[2]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
[2]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University
Received: July 18, 2019
Revised: November 4, 2019
Accepted: November 6, 2019

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกสารบริสุทธิ์จากลำต้นม้ากระทืบโรงและประเมินฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยวิธี Sulforhodamine B--SRB Assay ผลการวิจัย พบว่าสามารถแยกสารที่มีรายงานโครงสร้างแล้ว 4 สาร คือ flavifloramide B (1) foveolatamide (2) *N-trans*-feruloyltyramine (3) และ *N-trans*-grossamide (4) การพิสูจน์โครงสร้างของสารได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (NMR และ MS) และการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานไว้แล้ว เมื่อนำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสาร 3 และ 4 มีฤทธิ์ความเป็นพิษจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ขณะที่สาร 1 และ 2 ไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งหมด โดยสาร 4 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้แรงที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 1.70 µg/mL ขณะที่สาร 3 มีฤทธิ์ปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.98 µg/mL โดยใช้ Camptothecin (IC50 เท่ากับ 0.00116 µg/mL) เป็นชุดควบคุมบวก นอกจากนี้ยังพบว่าสาร 3 และ 4 ที่ความเข้มข้นของสาร 10 µg/mL ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

คำสำคัญ: ม้ากระทืบโรง, ฤทธิ์ความเป็นพิษ, มะเร็งเต้านม

Abstract

The objectives of the present study were to isolate active compounds from the stems of *Ficus foveolata*, and to investigate their cytotoxic activity against several cancer cell lines (MCF-7, HT-29, KB and HeLa cells) using Sulforhodamine B (SRB) assay. Phytochemical study of the stem extract of *F. foveolata* led to the isolation of four known compounds including flavifloramide B (1) foveolatamide (2) *N-trans*-feruloyltyramine (3) *and N-trans*-grossamide (4). Their structure determination was elucidated by spectroscopic analysis (NMR and MS) and compared with previously reported data. The compounds were then investigated for their cytotoxic activity. Among the tested compounds, the compounds 3 and 4 exhibited cytotoxic effect against MCF-7, whereas the compounds 1 and 2 was inactive in all tested cell lines. Compound 4 showed the strongest cytotoxic activity against MCF-7 with IC_{50} value 1.70 µg/mL, whereas compound 3 showed moderate activity with IC_{50} value 4.98 µg/mL. Camptothecin (IC_{50}=0.00116 µg/mL) was used as a positive control. Moreover, the compounds 3 and 4 did not show any cytotoxicity with normal cell at the concentration of 10 µg/mL.

Keywords: *Ficus foveolata*, cytotoxic activity, breast cancer

บทนำ

มะเร็ง หรือทางการแพทย์เรียกว่า เนื้องอกที่เป็นเนื้อร้าย หรือเนื้องอกชนิดร้ายแรง (malignant tumor) เป็นกลุ่มของโรคที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิดปกติ คือ เซลล์จะมีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตอย่างควบคุมไม่ได้ก่อให้เกิดเป็นเนื้องอก และมักจะรุกรานเนื้อเยื่อที่อยู่ข้างเคียงโดยการเบียดแทรกเข้าไปในเซลล์ที่อยู่รอบด้าน มะเร็งอาจแพร่กระจายไปยังร่างกายส่วนที่อยู่ห่างไกลได้ ผ่านระบบน้ำเหลือง หรือกระแสเลือด ซึ่งจะเข้าไปทำลายเซลล์ปกติทำให้ผู้ป่วยมีอาการเจ็บป่วย หรืออาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้หากไม่ได้รับการรักษา แต่ไม่ใช่เนื้องอกทุกชนิดจะเป็นมะเร็ง เช่น เนื้องอกชนิดธรรมดา (benign tumor) หรือ เนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง เป็นเซลล์เนื้องอกที่เกิดขึ้นแล้วไม่แพร่กระจายลุกลามไปสร้างความเสียหายกับเซลล์เนื้อเยื่อในบริเวณใกล้เคียง หรือเซลล์เนื้อเยื่อในอวัยวะส่วนอื่น โดยเนื้องอกหรือเซลล์ที่จะนับว่าเป็นเซลล์มะเร็งจะต้องมีลักษณะต่างๆ ดังนี้ มีการเจริญของเซลล์และการแบ่งเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ มีกลไกหลีกเลี่ยงการทำให้เซลล์ตายตามปกติ มีความสามารถที่จะแบ่งเซลล์ได้โดยไม่มีจำนวนจำกัด มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ มีการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง และมีความสามารถที่จะแพร่กระจายไปยังตำแหน่งห่างไกลได้ และถ้าเซลล์พวกนี้เกิดขึ้นที่อวัยวะใดก็จะเรียกชื่อมะเร็งตามอวัยวะนั้น เช่น มะเร็งผิวหนัง มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งปากมดลูก มะเร็งสมอง มะเร็งลำไส้ มะเร็งช่องปาก เป็นต้น (Preetha, Ajaikumar, Chitra, Kuzhuvelil, Sheeja, Oiki, Bokyung & Bharat, 2008) โดยสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งนั้นมีความหลากหลายและค่อนข้างซับซ้อน แต่มีหลายปัจจัยที่ทราบแล้วว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง หรือเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง ได้แก่ การสูบบุหรี่ การบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การขาดการออกกำลังกาย การระคายเคืองเรื้อรัง แสงอัลตราไวโอเลต พฤติกรรมการบริโภคอาหารที่มีสารก่อมะเร็ง การสัมผัสรังสี ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายบกพร่อง ความผิดปกติของฮอร์โมน และการติดเชื้อบางชนิด เช่น การติดเชื้อไวรัสชนิด B และ C ก่อให้เกิดโรคมะเร็งตับ และ การติดเชื้อ *Human*

papillomavirus ก่อให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูก โดยทั่วไปก่อนที่มะเร็งจะพัฒนาขึ้น จะต้องมีการเปลี่ยนแปลงของยีนเกิดขึ้นก่อน ประมาณ 5-10% ของมะเร็งเกิดจากการติดเชื้อทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดมาจากพ่อแม่ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้สามารถทำให้ยีนเกิดความเสียหายโดยตรง หรืออาจเกิดจากความบกพร่องทางพันธุกรรมที่มีอยู่เดิมในเซลล์ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นมะเร็งได้ (Goodarz, Stephen, Alan, Christopher & Majid, 2005; Preetha, Ajaikumar, Chitra, Kuzhuvelil, Sheeja, Oiki, Bokyung, & Bharat, 2008; Clarke, 2016) อาการและอาการแสดงของมะเร็งในระยะเริ่มต้นของมะเร็ง ผู้ป่วยอาจจะไม่แสดงอาการใด ๆ หรืออาจจะแสดงอาการอย่างใดอย่างหนึ่ง เช่น มีอาการไอและเสียงแหบแห้งเป็นเวลานาน เจ็บคอเรื้อรัง กลืนอาหารลำบาก หรือมีอาการจุกเสียดแน่นท้องเป็นเวลานาน มีเลือดออกผิดปกติ มีการเปลี่ยนแปลงของหูดและไฝตามร่างกาย มีก้อนที่เต้านม หรือส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย หูอื้อ หรือมีเลือดกำเดาไหล น้ำหนักลดโดยไร้สาเหตุ มีอาการปวดแบบไร้สาเหตุ และมีการเปลี่ยนแปลงในการขับถ่ายของลำไส้และอื่น ๆ แต่อาการเหล่านี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากปัญหาอื่น ๆ ได้เช่นกัน ดังนั้น ผู้ป่วยมะเร็งส่วนใหญ่จึงมักได้รับการรักษาภาวะอื่นมาระยะหนึ่งก่อน ก่อนที่จะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็ง (Minjoung, William, Fiona, Greg & Georgios, 2018) โดยทั่วไปโรคมะเร็งสามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะ ซึ่งแต่ละระยะจะบ่งบอกถึงระดับความรุนแรงของโรคมะเร็งได้แก่ ระยะที่ 1 ก้อนเนื้อ หรือ แผลมะเร็งมีขนาดเล็ก และยังไม่ลุกลามระยะที่ 2 ก้อนเนื้อ เริ่มเป็นแผลมะเร็งมีขนาดใหญ่ขึ้น เริ่มลุกลามภายในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ ระยะที่ 3 ก้อนเนื้อมะเร็งมีขนาดใหญ่ขึ้น เริ่มลุกลามเข้าอวัยวะข้างเคียง เข้าต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้เนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เป็นมะเร็ง และระยะที่ 4 ก้อนเนื้อมะเร็งมีขนาดโตมากและลุกลามเข้าเนื้อเยื่อหรืออวัยวะข้างเคียงจนทะลุ หรือ แพร่กระจายเข้ากระแสโลหิตไปยังเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่น ๆ เช่น ปอด ตับ สมอง กระดูก ไขกระดูก เป็นต้น (Donna, Stephen, Frederick, Mary, Elliot, James, David, Carolyn, Milburn, David, Mahul & Jeffrey, 2017)

ปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆ ของคนทั่วโลก และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี องค์การอนามัยโลกพบว่าในปี พ.ศ. 2561 มีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่จำนวน 18.1 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 9.6 ล้านคน โดยโรคมะเร็งที่พบ 5 อันดับแรกของโลก ได้แก่ มะเร็งปอด (2.1 ล้าน) มะเร็งเต้านม (2.1 ล้าน) มะเร็งต่อมลูกหมาก (1.3 ล้าน) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (1.8 ล้าน) และมะเร็งกระเพาะอาหาร (1.0 ล้าน) ส่วนโรคมะเร็งที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตสูงสุดในโลก คือ มะเร็งปอด (1.8 ล้านคน) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (881,000 คน) มะเร็งกระเพาะอาหาร (783,000 คน) มะเร็งตับ (782,000 คน) และมะเร็งเต้านม (627,000 คน) นอกจากนี้ได้มีการคาดการณ์ว่าภายในปี 2040 จะมีผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่เพิ่มมากถึง 29.3 ล้านคน และอัตราการเสียชีวิตจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 16.3 ล้านคนอีกด้วย (Bray, Ferlay, Soerjomataram, Siegel, Torre & Jemal, 2018) สำหรับสถานการณ์การเกิดโรคมะเร็งในประเทศไทยตามที่ได้มีรายงานในแผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ โดยกระทรวงสาธารณสุข (พ.ศ. 2561-2565) รายงานว่าในปี พ.ศ. 2557 ประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็ง 70,075 คน เป็นเพศชาย 40,161 คน เพศหญิง 29,914 คน ซึ่งถือว่ามะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โรคมะเร็งที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตในเพศชายสูงสุด 5 อันดับแรก ได้แก่มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก มะเร็งช่องปากและคอยหอย มะเร็งเม็ดเลือดขาว และมะเร็งหลอดอาหาร ส่วนมะเร็งที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิต 5 อันดับแรกในเพศหญิง ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักตามลำดับ (National cancer institute of Thailand, 2018) แนวทางการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันสามารถรักษาได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้เคมีบำบัด การผ่าตัด รังสีรักษา ภูมิคุ้มกันบำบัด การรักษาแบบมุ่งเป้า ฮอร์โมนบำบัด การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด และเวชกรรมตรงเหตุ ส่วนใหญ่จะใช้การรักษาที่ผสมผสานกัน ซึ่งวิธีการรักษาโรคมะเร็งส่วนใหญ่มักมีผลข้างเคียงที่เกิดจากการรักษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการรักษาด้วยยาหรือเคมีบำบัด แม้จะเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ยังพบผู้ป่วยจำนวนมากได้รับผลข้างเคียงจากการใช้ยา และมีรายงานถึงการดื้อยา ซึ่งนับเป็นปัญหาที่สำคัญในการรักษาด้วยเคมีบำบัด ความพยายามในการนำสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น จากพืชสมุนไพรเพื่อยับยั้งเซลล์มะเร็งและลดการดื้อยาจึงเป็นอีกทางเลือก

หนึ่งในการรักษาโรคมะเร็งที่น่าสนใจ เนื่องจากพืชสมุนไพรเป็นแหล่งของสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและมีความเป็นพิษต่ำ เช่น สาร paclitaxel ที่สกัดได้จากเปลือกและใบของต้น Pacific Yew (*Taxus brevifolia*) และสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (vincristine และ vinblastine) ที่สกัดได้จากต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus* อยู่ในวงศ์ Apocyanaceae) มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งรังไข่ มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ เป็นต้น (Bhanot, Sharma & Noolvi, 2011; Prakash, Kumar, Kumar & Ajeet, 2013) ดังนั้น การค้นหาสารหรือยาจากพืชสมุนไพรมาใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคมะเร็งจึงมีความจำเป็น ม้ากระทืบโรง (*Ficus foveolata* Wall) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่อยู่ในวงศ์ Moraceae มีสรรพคุณทางยาต่าง ๆ ตามภูมิปัญญาพื้นบ้านในประเทศไทย โดยใช้ลำต้นม้ากระทืบโรงมาดองเหล้าดื่ม หรือต้มน้ำดื่ม บำรุงกำลัง บำรุงสมรรถภาพทางเพศ และใช้เป็นยาอายุวัฒนะ (Suksri, Premcharoen, Thawatphan & Sangthongprow, 2005; Sermboonpaisarn & Sawasdee, 2012) หรือ ใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยาสมานฉันท์เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งปอด มะเร็งตับ และมะเร็งท่อน้ำดี (Thongdeeying, Kitsiripipat, Ruangnoo, Pibanpaknitee & Itharat, 2017) นอกจากนี้ในต่างประเทศ เช่น ประเทศเนปาล มีการนำเอาเปลือกจากลำต้นม้ากระทืบโรงมาบดเป็นผงต้มกับน้ำดื่มเพื่อกระตุ้นการสร้างน้ำนมของหญิงหลังคลอดบุตรได้ (Kunwar & Bussmann, 2006) มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดของลำต้นม้ากระทืบโรงพบสารกลุ่มต่าง ๆ ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ได้แก่ สารกลุ่ม Stilbenes เช่น gnetol ซึ่งแยกได้จากสารสกัดชั้นเมทานอล (methanol extract) ของลำต้นม้ากระทืบโรงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ butyrylcholinesterase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคสมองเสื่อม (alzheimer's disease) ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ1.3 μM (Sermboonpaisarn & Sawasdee, 2012); สารกลุ่ม sesquiterpenes เช่น foveolide A และ foveolide B ซึ่งแยกได้จากสารสกัดชั้นเอทานอลของลำต้นม้ากระทืบโรง มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (human colon cancer--SW620), เซลล์มะเร็งตับ (liver Cancer--HepG2), เซลล์มะเร็งเต้านม (breast Cancer--BT474) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric--KATO-III) ในหลอดทดลองได้ โดยพบว่าสาร Foveolide A มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง SW620, HepG2, BT474 และ KATO-III ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 21.75, 39.97, 31.34 และ 30.38 μM ตามลำดับ ในขณะที่สาร foveolide B แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษ เฉพาะต่อเซลล์มะเร็งลำไส้เท่านั้น ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 20.58 μM (Somwong, Suttisri & Buakeaw, 2013); สารกลุ่ม triterpenes เช่น ficusonolide ซึ่งแยกได้จากสารสกัดชั้นเมทานอลของลำต้นม้ากระทืบโรงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด H116 (Human colon adenocarcinoma) และเซลล์มะเร็งปอดชนิด H125 (Human lung adenocarcinoma) ในหลอดทดลอง ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 17.2 μM และ 24.2 μM ตามลำดับ (Din, Uddin, Hussain, Khan, Khan, Shad & Choudhary, 2013); สารกลุ่ม Benzoquinone เช่น 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone ซึ่งแยกได้จากสกัดชั้นเอทิลอะซีเตตของลำต้นม้ากระทืบโรงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีต่อเชื้อ *Streptococcus pyogenes*, *S. mitis, S. mutans* และ *Bacillus subtilis* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ได้เท่ากับ 46, 46, 93 และ 93 μM ตามลำดับ และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) ได้เท่ากับ 46, 46, 186 แล 93 μM ตามลำดับ (Meerungrueang & Panichayupakaranant, 2014) นอกจากยังพบสารกลุ่ม lignanamides เช่น foveolatamide ซึ่งแยกได้จากสกัดชั้นเอทิลอะซีเตตของลำต้นม้ากระทืบโรง มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีต่อเชื้อ *Streptococcus pyogenes* โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 45 และ 45 μM ตามลำดับ (Meerungrueang & Panichayupakaranant, 2016) จากรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของลำต้นม้ากระทืบโรงที่มีรายงานมาแล้ว พบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจโดยเฉพาะสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ดังนั้น วัตถุประสงค์ในการทำวิจัยในครั้งนี้ คือเพื่อสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากลำต้นม้ากระทืบโรงและประเมินฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (มะเร็งเต้านม (MCF-7) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa)) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ซึ่งงานวิจัยนี้อาจจะนำไปสู่การค้นพบสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและอาจมีบทบาทพัฒนาไปเป็นยาต้าน

มะเร็งชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพทางการรักษา นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยไปใช้เป็นข้อมูลหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพรม้ากระทืบโรงได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดลำต้นม้ากระทืบโรงและประเมินฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

กรอบแนวคิดการวิจัย

สกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากลำต้นม้ากระทืบโรงโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 มะเร็งช่องปากชนิด KB และมะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa โดยวิธี Sulforhodamine B--SRB

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวแปร

ตัวแปรต้น คือ สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดลำต้นม้ากระทืบโรง

ตัวแปรตาม คือ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ได้แก่ มะเร็งเต้านม (MCF-7) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa)

การวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลองตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การเตรียมตัวอย่างลำต้นม้ากระทืบโรง

ลำต้นม้ากระทืบโรง (*Ficus foveolata*) เก็บมาจากจังหวัดนครศรีธรรมราชและทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืช (SKP 117 06 06 01) โดย รศ.ดร. ภาคภูมิ พานิชยูปการนันท์ โดยเก็บรักษาตัวอย่างพืชแห้งในรูปของพิพิธภัณฑ์พืช (herbarium) ไว้ที่ศูนย์สมุนไพรทักษิณ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยนำลำต้นม้ากระทืบโรงมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 50 °C นาน 3 วัน บดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้าและเก็บไว้ในภาชนะที่ป้องกันแสงและความชื้น

2. การสกัดและการแยกสารจากสารสกัดลำต้นม้ากระทืบโรง

นำผงม้ากระทืบโรง 16 กิโลกรัม สกัดด้วยเอทิลอะซีเตต โดยใช้วิธีการสกัดแบบไหลย้อนกลับ (reflux extraction) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนที่เป็นสารละลายมากรองและระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) และนำกากที่เหลือไปสกัดซ้ำ 4 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้แต่ละครั้งรวมกันจะได้สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตตของม้ากระทืบโรง 82 กรัม

นำสารสกัด 80 กรัมไปแยกด้วย quick column chromatography ใช้ตัวทำละลายในการชะเริ่มจากขั้วน้อยไปหาขั้วมาก คือ เฮกเซน: เอทิลอะซีเตต (100: 0-20: 80 v/v) และเอทิลอะซีเตต:เมทานอล (100: 0-20: 80 v/v) ตามลำดับ นำสารละลายที่ได้จากการชะมาวิเคราะห์โดยวิธี Thin Layer Chromatography--TLC ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเพื่อรวมส่วนสกัดย่อยที่เหมือนกันได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 7 fraction (F1-F7) จากนั้นนำสารสกัด F5 (5.7 กรัม) ไปแยกต่อโดยใช้วิธี silica gel column, (สารสกัด 1 กรัม/silica gel 35 กรัม) ชะด้วย เฮกเซน:เอทิลอะซีเตต (80: 20-0: 100 v/v) และเอทิลอะซีเตต:เมทานอล (90: 10-70:30 v/v) ตามลำดับ นำสารละลายที่ได้จากการชะมาวิเคราะห์โดยวิธี TLC จะได้สารสกัดมา 7 fraction (5.1-5.7) นำสารสกัด fraction 5.5 (2.7 กรัม) มาแยกต่อด้วยวิธีที่เหมือนกันกับสารสกัดชั้น F5 แต่ชะด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน คือ คลอโรฟอร์ม: เมทานอลในอัตราส่วนตั้งแต่ 100: 0-70: 30 v/v จะได้สารสกัดมา 5 fraction (I-V) จากนั้นนำ fraction III (843 มิลลิกรัม) มาแยกต่อด้วยวิธี Sephadex LH-20 column โดยใช้เมทานอล 100% เป็นตัวชะจะได้สารสกัดมา 4 fraction (A-D) นำ fraction B (605 มิลลิกรัม) มาแยกต่อโดยใช้วิธี silica gel column ชะด้วยคลอโรฟอร์ม: เมทานอล (96: 4 v/v) จะได้สารสกัด 4 fraction (B1-B4)

จากนั้นนำสารสกัด fraction B3 (323 มิลลิกรัม) มาแยกต่อโดยใช้วิธี Sephadex LH-20 column ชะด้วยเมทานอล 100% นำสารละลายที่ได้จากการชะมาวิเคราะห์โดยวิธี TLC จะได้สารสกัดมา 6 fraction (B3.1-B3.6) และนำสารสกัด fraction B3.2 (103 มิลลิกรัม) ไปแยกต่อด้วยวิธี silica gel column ชะด้วย คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (98: 2 และ 96:4 %v/v) จะได้สาร 1 (9.5 มิลลิกรัม) และ 2 (22 มิลลิกรัม)

นำสารสกัด fraction II (1 กรัม) มาแยกต่อโดยใช้วิธี Sephadex LH-20 column ชะด้วย คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (50:50 v/v) นำสารละลายที่ได้จากการชะมาวิเคราะห์โดยวิธี TLC จะได้สารสกัด 5 fractions (IIA-IIE) จากนั้นนำสารสกัด fraction IID (762 มิลลิกรัม) มาแยกต่อด้วยวิธี Sephadex LH-20 column จะได้สารสกัด 5 fraction (IID1-IID5) และนำ fraction IID4 (182 mg) มาแยกต่อด้วยวิธี silica gel column ชะด้วย เฮกเซน: เอทิลอะซีเตต (40: 60 v/v) จะได้ 3 (24 มิลลิกรัม) และ 4 (34 มิลลิกรัม) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (1-4) พิสูจน์เอกลักษณ์หาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ 1H-13C-NMR และ ESI-MS เป็นต้น

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการประเมินศักยภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตตของม้ากระทืบโรง ได้แก่ เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7, มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29, มะเร็งช่องปากชนิด KB และมะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์ จากห้องปฏิบัติการด้านการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium--DMEM) ที่มีส่วนผสมของซีรั่มลูกวัว 10% (10% fetal bovine serum) และ penicillin-streptomycin ร้อยละ 1 โดยเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมความชื้น อุณหภูมิ 37 °C และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตตของลำต้นม้ากระทืบโรง 4 ชนิด flavifloramide B (1), foveolatamide (2), *N-trans*-feruloyltyramine (3) และ *N-trans*-grossamide (4) ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 มะเร็งช่องปากชนิด KB และมะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ด้วยวิธี Sulforhodamine B--SRB (Skehan et al., 1990) วิธีการทดสอบเริ่มจากถ่ายเซลล์ลงใน 96-well microplate ปริมาตรหลุมละ 100 µl (จำนวน 4000 เซลล์/หลุม) เติมสารละลายตัวอย่างที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายระดับต่าง ๆ (0.00032-5 µg/ml) โดยเติมหลุมละ 100 µl และเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมความชื้น อุณหภูมิ 37 °C และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาค่อยๆ ดูดอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ออก แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ 1 ครั้ง จากนั้นทำการเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ลงไปปริมาตรหลุมละ 200 µl และนำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอีกครั้งเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อดูการรอดของเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตตของม้ากระทืบโรง ในการทดสอบอัตราการรอดของเซลล์ด้วยวิธี SRB assay เริ่มจากทำการตรึงเซลล์ด้วย TCA ร้อยละ 40 และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำ และทำการย้อมเซลล์โดยทำการเติมสารละลาย SRB ร้อยละ 0.4 ในกรดอะซิติก (acetic acid) ร้อยละ 1 ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างสีออกด้วยกรดอะซิติกร้อยละ 1 และตั้งทิ้งไว้จนแห้ง ละลายสีย้อม SRB ที่จับอยู่กับโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ด้วยสารละลาย 10 mM ของ Tris base (pH 10) จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าการออกฤทธิ์ร้อยละการยับยั้งของเซลล์มะเร็งโดยใช้สมการ ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition}=[(\text{OD control}-\text{OD test})/\text{OD control}] \times 100$$

โดย OD control และ OD test คือ ค่าการดูดกลืนแสง

ของเซลล์มะเร็งที่ไม่ได้ใส่สารทดสอบและค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์มะเร็งที่ใส่สารทดสอบ ตามลำดับ ซึ่งเป็นการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยทำการแปลผล ดังนี้ ถ้าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้น้อยกว่าร้อยละ 50 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ แต่ถ้าสามารถยับยั้งได้มากกว่าร้อยละ 50 แสดงว่ามีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะนำไปหาค่า IC_{50} จากค่า dose response curve ซึ่งเป็นดัชนีบ่งถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activity) โดยใช้ยา Camptothecin เป็น positive control

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการศึกษาซ้ำจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยและรายงานผลในรูปค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิจัย

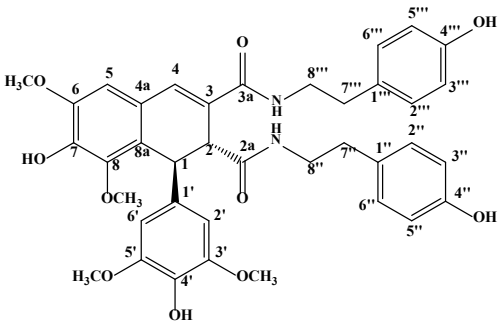
จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดลำต้นม้ากระทืบโรง สามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีรายงานโครงสร้างมาแล้ว 4 สาร คือ flavifloramide B (1) foveolatamide (2) *N-trans*-feruloyltyramine (3) และ *N-trans*-grossamide (4) (รูปที่ 1) พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (^{1}H-^{13}C NMR และ MS) และการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานไว้แล้ว ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

Flavifloramide B (1) มีลักษณะเป็นผงสีขาว มีสูตรโมเลกุล $C_{38}H_{40}N_2O_{10}$ ESI-MS มี pseudomolecularion [M+H]+ *m/z* 685, ^{1}H-NMR (500 MHz, methanol-d_4) δ: 4.84 (1H, d, J=2.0 Hz, H-1), 3.68 (1H, overlapped, H-2), 7.26 (1H, s, H-4), 6.76 (1H, s, H-5), 3.91 (3H, s, MeO-6), 3.57 (3H, s, MeO-8), 6.32 (2H, s, H-2’, 6’), 3.68 (6H, s, MeO-3’, 5’), 6.92 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2”, 6”), 6.64 (2H, d, J=8.5 Hz, H-3”, 5”), 2.52 (2H, td, J=7.0, 3.0 Hz, H-7”), 3.39 (1H, m, H-8”); 3.19 (1H, m, H-8”), 6.81 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2”’, 6”’), 6.63 (2H, d, J=8.5 Hz, H-3”’, 5”’), 2.67 (2H, t, J=7.0 Hz, H-7”’), 3.33 (2H, t, J=7.0 Hz, H-8”’); ^{13}C-NMR (125 MHz, methanol-d_4) δ: 41.6 (C-1), 50.2 (C-2), 127.2 (C-3), 135.2 (C-4), 109.1 (C-5), 149.3 (C-6), 143.1 (C-7), 147.0 (C-8), 173.9 (C-2a), 170.0 (C-3a), 124.3 (C-4a), 125.2 (C-8a), 135.3 (C-1’), 106.0 (C-2’), 149.0 (C-3’), 135.0 (C-4’), 149.0 (C-5’), 106.0 (C-6’), 131.1 (C-1”), 130.8 (C-2”, 6”), 116.3 (C-3”, 5”), 156.8 (C-4”), 35.4 (C-7”), 42.7 (C-8”), 131.4 (C-1”’), 130.7 (C-2”’, 6”’), 116.2 (C-3”’, 5”’), 156.8 (C-4”’), 35.6 (C-7”’), 42.4 (C-8”’), 56.7 (MeO-3’), 56.7 (MeO-5’), 56.8 (MeO-6), 60.8 (MeO-8) (Chaves & Roque, 1997; Greca et al., 2006; Wu et al., 2013)

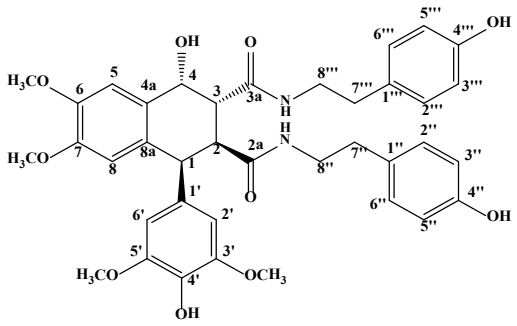
Foveolatamide (2) มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง มีสูตรโมเลกุล $C_{38}H_{42}N_2O_{10}$ ESI-MS มี pseudomolecular ion [M+K]+ *m/z* 725, ^{1}H-NMR (500 MHz, methanol-d_4) δ: 4.32 (1H, d, J=7.5 Hz, H-1), 3.68 (1H, t, J=7.5 Hz, H-2), 2.65 (1H, dd, J=7.5, 4.5 Hz, H-3), 4.89 (1H, d, J=4.5 Hz, H-4), 6.53 (1H, s, H-5), 6.53 (1H, s, H-8), 6.50 (2H, s, H-2’, 6’), 7.01 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2”, 6”), 6.69 (2H, d, J=8.5 Hz,H-3”, 5”), 2.70 (2H, m, H-7”), 3.51 (1H, m, H-8”); 3.27 (1H, m, H-8”), 6.97 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2”’, 6”’), 6.68 (2H, d, J=8.5 Hz, H-3”’, 5”’), 2.52 (2H, td, J=7.5, 3.0 Hz, H-7”’), 3.18 (2H, m, H-8”’), 3.76 (6H, s, MeO-3’, 5’), 3.78 (6H, s, MeO-6, 7); ^{13}C-NMR (125 MHz, methanol-d_4) δ: 52.4 (C-1), 49.9 (C-2), 54.6 (C-3), 85.3 (C-4), 107.5 (C-5), 149.0 (C-6), 149.0 (C-7), 107.5 (C-8), 175.0 (C-2a), 173.7 (C-3a), 135.0 (C-4a), 134.0 (C-8a), 135.3 (C-1’), 107.1 (C-2’), 149.0 (C-3’), 135.2 (C-4’), 149.0 (C-5’), 107.1 (C-6’), 131.1 (C-1”’), 130.8 (C-2”, 6”), 116.3 (C-3”, 5”), 157.0 (C-4”), 33.7 (C-7”), 42.9 (C-8”), 130.9 (C-1”’), 130.7 (C-2”’, 6”’), 116.2 (C-3”’, 5”’), 156.9 (C-4”’), 35.5 (C-7”’), 42.6 (C-8”’), 56.8 (MeO-3’, 3’, 6, 7) (Wirod & Panichayupakaranant, 2016)

N-trans-feruloyltyramine (3) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{19}NO_4$ ESI-MS มี pseudomolecular ion [M+2H]+ *m/z* 315, ^{1}H-NMR (500 MHz, methanol-d_4) δ: 7.10 (1H, d, J=2.0 Hz, H-2), 6.78 (1H, d, J=8.0 Hz, H-5), 7.01 (1H, dd, J=8.0, 2.0 Hz, H-6), 7.43 (1H, d, 15.5 Hz, H-7), 6.39 (1H, d, J=15.5 Hz, H-8), 7.04 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2', 6'), 6.71 (2H, d, J=8.5 Hz, H-3',5'), 2.73 (2H, t, J=7.5 Hz, H-7'), 3.45 (2H, t, J=7.5 Hz, H-8'), 3.86 (3H, s, MeO-3); ^{13}C-NMR (125 MHz, methanol-d4) δ: 128.3 (C-1), 111.6 (C-2), 149.3 (C-3), 149.8 (C-4), 116.5 (C-5), 123.2 (C-6), 142.0 (C-7), 118.8 (C-8), 169.2 (C-2a), 131.3 (C-1'), 130.7 (C-2',6'), 116.3 (C-3',5'), 156.9 (C-4'), 35.8 (C-7'), 42.5 (C-8'), 56.4 (MeO-3) (Tanaka et al., 2009; Xie et al., 2014)

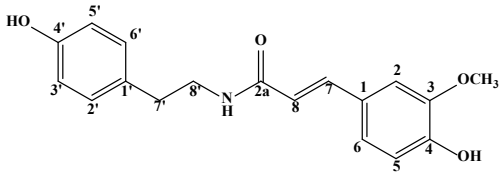
N-trans-grossamide (4) มีลักษณะผงสีขาว มีสูตรโมเลกุล $C_{36}H_{36}N_2O_8$ ESI-MS มี pseudomolecular ion [M+H]+ *m/z* 625, ^{1}H-NMR (500 MHz, methanol-d_4) δ: 7.07 (1H, d, J=1.0 Hz, H-2), 6.74 (1H, overlapped, H-6), 7.41 (1H, d, J=15.5 Hz, H-7), 6.37 (1H, d, J=15.5 Hz, H-8), 6.89 (1H, d, J=2.0 Hz, H-2'), 6.78 (1H, d, J=8.0 Hz, H-5'), 6.75 (1H, dd, J=8.0, 2.0 Hz, H-6'), 5.88 (1H, d, J=8.0 Hz, H-7'), 4.14 (1H, d, J=8.0 Hz, H-8'), 6.99 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2", 6"), 6.71 (2H, d, J=8.5 Hz, H-3", 5"), 2.72 (2H, m, H-7"), 3.46 (2H, m, H-8"), 7.04 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2"', 6"'), 6.72 (2H, d, J=8.5 Hz, H-3"', 5"'), 2.72 (2H, m, H-7"'), 3.46 (2H, m, H-8"'), 3.78 (3H, s, MeO-3), 3.84 (3H, s, MeO-3') ; ^{13}C-NMR (125 MHz, methanol-d_4) δ: 130.4 (C-1), 113.2 (C-2), 146.0 (C-3), 151.2 (C-4), 129.4 (C-5), 118.1 (C-6), 141.7 (C-7), 119.5 (C-8), 172.9 (C-2a), 169.0 (C-3a), 132.6 (C-1'), 110.6 (C-2'), 149.2 (C-3'), 148.0 (C-4'), 116.4 (C-5'), 120.0 (C-6'), 90.0 (C-7'), 58.7 (C-8'), 131.0 (C-1"), 130.7 (C-2", 6"), 116.3 (C-3", 5"), 156.8 (C-4"), 35.3 (C-7"), 42.2 (C-8"), 131.3 (C-1"'), 130.9 (C-2"', 6"'), 116.5 (C-3"', 5"'), 156.9 (C-4"'), 35.7 (C-7"'), 42.5 (C-8"'), 56.5 (MeO-3), 56.8 (MeO-3') (Seca et al., 2001; King & Calhoun, 2005)



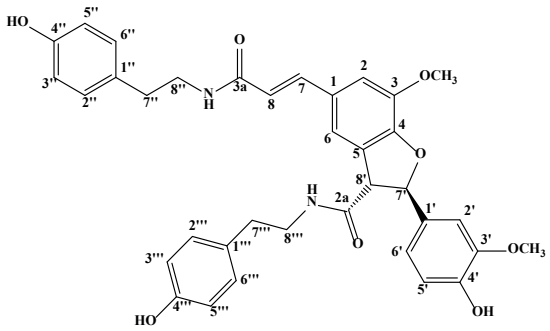
(1)



(2)



(3)



(4)

ภาพ 1 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ (1-4) ที่แยกได้จากสารสกัดลำต้นม้ากระทืบโรง

เมื่อนำสารที่แยกได้ทั้งหมดมาศึกษาหาค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 มะเร็งช่องปากชนิด KB และมะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa โดยใช้สารที่ความเข้มข้น 5 μg/mL พบว่าสาร 3 และ 4 เท่านั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมได้มากกว่าร้อยละ 50 โดยสาร 4 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ดีที่สุดด้วยค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 84.50 รองลงมาคือ สาร 3 มีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 54.84 (ตารางที่ 1) ในขณะที่สาร 1 และ 2 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ (ฤทธิ์ยับยั้งน้อยกว่า 50% /ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็ง)

ตาราง 1

ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากสารสกัดลำต้นม้ากระทืบโรงที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (n=3)

สาร	ร้อยละการยับยั้งของเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 5 µg/mL(Mean ± SEM)			
	MCF-7	HT-29	Kb	Hela
1	30.98±7.43	25.26±6.50	N.A.	N.A.
2	22.91±0.25	7.19±7.56	N.A.	N.A.
3	54.84±1.24	7.99±5.55	N.A.	N.A.
4	84.50±3.13	49.47±6.88	N.A.	N.A.

flavifloramide B (1) foveolatamide (2) *N-trans*-feruloyltyramine (3) *N-trans*-grossamide (4)
N.A.=ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

นำสาร 3 และ 4 (มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้มากกว่าร้อยละ 50) ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0.00032-5 µg/mL) เพื่อหาความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมได้มากกว่าร้อยละ 50 (IC_{50}) พบว่า สาร 4 มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านมแรงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.70 µg/mL รองลงมาคือ สาร 3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.98 µg/mL โดยใช้ Camptothecin เป็นชุดควบคุมบวก (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ เมื่อนำสาร 3 และ 4 ที่ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 10 µg/mL ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ พบว่าสารดังกล่าวไม่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

ตาราง 2

ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของสารที่แยกได้จากสารสกัดลำต้นม้ากระทืบโรง (n=3)

สาร	ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (IC_{50}, µg/mL) (Mean±SEM)
N-trans-feruloyltyramine (3)	4.98±0.054
N-trans-grossamide (4)	1.70±0.065
Camptothecin (Positive control)	0.00116±2.18 x10-4

การอภิปรายผล

การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตตของลำต้นม้ากระทืบโรงด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 4 สาร ได้แก่ flavifloramide B (1) foveolatamide (2) *N-trans*-feruloyltyramine (3) และ *N-trans*-grossamide (4) ซึ่งเป็นสารที่ทราบโครงสร้างแล้ว เมื่อนำไปประเมินฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa) พบว่า เฉพาะสาร 3 และ 4 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ในขณะที่สาร 1 และ 2 ไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ โดยสาร 4 มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมได้ดีที่สุด (IC_{50} เท่ากับ 1.70 μg/mL) เมื่อเทียบกับสาร 3 (IC_{50} เท่ากับ 4.98 μg/mL) แต่น้อยกว่าสารมาตรฐาน Camptothecin (IC_{50} เท่ากับ 0.00116 μg/mL) นอกจากนี้ยังพบว่าสาร *N-trans*-grossamide (4) และ *N-trans*-feruloyltyramine (3) เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ พบว่าสารดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ

จากผลการวิจัยดังกล่าวมีรายงานการวิจัยที่สนับสนุนผลการวิจัยนี้พบว่า สาร *N-trans*-grossamide ที่แยกได้จากเมล็ดของต้นเฮนเบน (*Hyoscyamus niger*) ซึ่งเป็นพืชในที่อยู่วงศ์ Solanaceae มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (human prostate cancer LNCaP cells) ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 33 μM (Ma, Liu, & Che , 2002) ในขณะที่สาร *N-trans*-feruloyltyramine ที่แยกได้จากลำต้นของ *Casearia membranacea* (วงศ์ Flacourtiaceae) มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine Leukemia Cell: P388) ด้วยค่า IC50 เท่ากับ 2.20 μg/mL (Chang, Duh, Chen, & Tsai, 2003) ดังนั้นจากผลการวิจัยนี้พบว่าสาร *N-trans*-grossamide และ *N-trans*-feruloyltyramine ที่แยกได้จากสารสกัดลำต้นม้ากระทืบโรงมีศักยภาพจำเพาะในการเป็นสารต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ในระดับหลอดทดลอง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อมูลที่น่าสนใจนำไปศึกษาต่อยอดในการศึกษากลไกการทำงานหรือนำมาเป็นโครงสร้างทางเคมีหลักที่จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งให้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยไปใช้เป็นข้อมูลหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพรม้ากระทืบโรงได้

References

Bhanot, A., Sharma, R., & Noolvi, M. N. (2011). Natural sources as potential anti-cancer agents: a review. *International Journal of Phytomedicine, 3*(1), 9-26.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L.A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer Journal for Clinicians, 68*(6), 394-424.

Chang, K. C., Duh, C. Y., Chen, I. S., & Tsai, I. L. (2003). A cytotoxic butenolide, two new dolabellane diterpenoids, a chroman and a benzoquinol derivative formosan Casearia membranacea. *Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research, 69*(7), 667-72.

Chaves, M. H., & Roque, N. F. (1997). Amides and lignanamides from Porcelia macrocarpa. *Phytochemistry, 46*(5), 879-881.

Clarke, B. B. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World Journal of Clinical Oncology, 7*(1): 54-86.

Din, A. U. D., Uddin, G., Hussain, N., Khan, A., Khan, I., Shad, A. A., & Choudhary, M. I. (2013). Bioassay-guided isolation of new antitumor agent from Ficus faveolata (Wall. ex Miq.). *Journal of Cancer Science & Therapy, 5*(11), 404-408.

Donna, M. G., & et al. (2017). Principles of cancer staging. *American Joint Committee on Cancer, 8*(1), 1-60. DOI 10.1007/978-3-319-40618-3_1.

Goodarz, D., Stephen, V. H., Alan, D. L., Christopher, J. L. M., & Majid, E. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet Journal, 366*(1), 1784-1793.

Greca, M. D., Previtera, L., Purcaro, R., & Zarrelli, A. (2006). Cinnamic acid amides and lignanamides from Aptenia cordifolia. *Tetrahedron, 62*(5), 2877-2882.

King, R. R., & Calhoun, L. A. (2005). Characterization of cross-linked hydroxycinnamic acid amides isolated from potato common scab lesions. *Phytochemistry, 66*(20), 2468-2473.

Kunwar, R. M., & Bussmann, R. W. (2006). Ficus (Fig) species in Nepal: a review of diversity and indigenous uses. *Lyonia, 11*(1), 85-97.

Ma, C. Y., Liu, W. K., & Che, C. T. (2002). Lignanamides and non-alkaloidal components of Hyoscyamus niger seeds. *Journal of Natural Products, 65*(2), 206-209.

Meerungrueang, W., & Panichayupakaranant, P. (2014). Antimicrobial activities of some Thai traditional medical longevity formulations from plants and antibacterial compounds from Ficus foveolata. *Pharmaceutical Biology 52*(9), 1104-1109.

Meerungrueang, W., & Panichayupakaranant, P. (2016). A new antibacterial tetrahydronaphthalene lignanamide, Foveolatamide from the stems of Ficus foveolata. *Natural Product Communications, 11*(1), 91-94.

Minjoung, M. K., William, H., Fiona, M. W., Greg, P. R., & Georgios, L. (2018). Symptom Signatures and Diagnostic Timeliness in Cancer Patients: A Review of Current Evidence. *Neoplasia Journal, 20*(2), 165-174.

Ministry of Public Health (2018). *National Cancer Control Programmes (2018-2022).* Retrived May 10, 2018 from http:// http://www.nci.go.th/th/index1.html. (in Thai)

Prakash, O., Kumar, A., Kumar, P., & Ajeet (2013). Anticancer potential of plants and natural products: a review. American *Journal of Pharmacological Sciences, 1*(6) 104-115.

Preetha, A., & et al. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research, 25*(9), 2097-2116. DOI: 10.1007/s11095-008-9661-9. (in Thai)

Seca, A. M. L., Silva, A. M. S., Silvestre, A. J. D., Cavaleiro, J. A. S., Domingues, F. M. J., & Neto, C. P. (2001). Lignanamides and other phenolic constituents from the bark of kenaf (Hibiscus cannabinus). *Phytochemistry, 58*(8), 1219-1223.

Sermboonpaisarn, T. & Sawasdee, P. (2012). Potent and selective butyrylcholinesterase inhibitors from Ficus foveolata. *Fitoterapia 83*(4), 780-784.

Skehan, P., & et al. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute, 82*(13), 1107-1112. (in Thai)

Somwong, P., Suttisri, R., & Buakeaw, A. (2013). New sesquiterpenes and phenolic compound from Ficus foveolata. *Fitoterapia, 85*(1), 1-7.

Suksri, S., Premcharoen, S., Thawatphan, C., & Sangthongprow, S. (2005). Ethnobotany in Bung Khong Long non-hunting area, Northeast Thailand. *Kasetsart Journal (Natural Sciences), 39*(3), 519-533. (in Thai)

Tanaka, H., et al. (2009). A new amide from the leaves and twigs of Litsea auriculata. *Journal of Natural Medicines, 63*(3), 331-334.

Thongdeeying, P., Kitsiripipat, J., Ruangnoo, S., Pibanpaknitee, P., & Itharat, A. (2017). Cytotoxic activity of Samhannachan recipe and its ingredients against lung cancer cell. *Thammasat Medical Journal, 17*(4), 565-573. (in Thai)

Wu, Y., Zheng, C. J., Deng, X. H., & Qin, L. P. (2013). Two new bis-alkaloids from the aerial part of Piper flaviflorum. *Helvetica Chimica Acta, 96*(5), 951-955.

Xie, L. W., et al. (2014). Activity-guided isolation of NF-kB inhibitors and PPARγ agonists from the root bark of Lycium chinense Miller. *Journal of Ethnopharmacol. 152*(3), 470-477.