



การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด *Taraxacum officinale* ในเซลล์มะเร็ง ภูริชญ์ อินตะ¹, เกวลี ศรีทองกุล¹, อรนุช ธนเขตไพศาล², ณรงค์ชัย จักขุพา²

บทคัดย่อ

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด *Taraxacum officinale* ในเซลล์มะเร็ง
ภูริชญ์ อินตะ¹, เกวลี ศรีทองกุล¹, อรนุช ธนเขตไพศาล², ณรงค์ชัย จักขุพา²

บทนำ: แม้ว่ายาเคมีบำบัดส่วนใหญ่ที่ใช้รักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันจะมีผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งในขั้นตอนต่างๆ แต่ มะเร็งยังคงเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์และอัตราการเสียชีวิตสูงอยู่ในอันดับต้นๆ ของโลก และยาเคมีบำบัดที่มีใช้อยู่ยังไม่สามารถที่จะยับยั้ง เซลล์มะเร็งให้หมดไปได้ รวมทั้งยังก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ที่สำคัญ คือ กดไขกระดูก ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นในการแสวงหาสาร ใหม่จากแหล่งต่างๆ เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็ง *Taraxacum officinale* (dandelion) เป็นพืชตัวหนึ่งที่มีการศึกษา เกี่ยวกับฤทธิ์ที่มีผลยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าสารสำคัญหลายชนิดโดยเฉพาะ taraxasterol มีรายงานว่ามีการยับยั้งการเกิด มะเร็งได้ **วัตถุประสงค์ของการวิจัย:** เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเอทานอลของ *T. officinale* ใน HeLa cell (human cervical carcinoma) **วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย:** เติรียมความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลของ *T. officinale* จำนวน 7 ความเข้มข้น (0.01, 0.1, 1, 10, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) ที่ปราศจากซีรัม โดย ในแต่ละความเข้มข้นจะนำมาทดสอบกับ HeLa cell ที่เลี้ยงในภาชนะหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหาจำนวน เซลล์รอดชีวิตด้วยวิธี 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ซึ่งมี Triton X ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก (positive control) **ผลการวิจัย:** พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตของ HeLa cells จากการทดสอบ ด้วยสารสกัด *T. officinale* ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เท่ากับ 42.21±21.26, 14.06±13.33, 9.29±13.43, 3.34±1.09, 2.70±0.49, 4.65±1.38 และ 1.00±1.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **สรุปผล:** จากผลการศึกษาพบว่าทั้ง 7 ความ เข้มข้นของสารสกัด *T. officinale* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ HeLa cell โดยความเข้มข้นน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถ ยับยั้งการเจริญเติบโตของ HeLa cell ได้ร้อยละ 50

คำพท์สำคัญ: *Taraxacum officinale*, Dandelion, Cytotoxic effect, MTT

¹ นักศึกษาคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

² อาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

* ติดต่อผู้พิมพ์: ณรงค์ชัย จักขุพา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โทร 045 353 600 โทรสาร 045 353 600, E-mail: recipe2@hotmail.com

Abstract

Cytotoxic Effect of *Taraxacum officinale* Extract in Cancer Cell

Phurich Inta¹, Kewalee Sritongkul¹, Oranuch Thanaketspaisan², Narongchai Chaksupa²

Introduction: Although current cancer chemotherapy is mainly a treatment for inhibition of cancer cell proliferation in different stages, cancer is still the most common diseases with high incidence and mortality rates. Moreover, chemotherapy has several serious side effects, especially myelosuppression, and cannot provide beneficial effects in all cancer patients. Therefore, searching new active ingredients from plants for cancer treatment is attractive. *Taraxacum officinale* (dandelion) contains several active substances, such as taraxasterol that has demonstrated anti-tumor properties. **Objective:** The purpose of this study was to investigate the cytotoxic effect of ethanolic extract of *T. officinale* in HeLa cells (human cervical carcinoma). **Materials and Methods:** Seven concentrations (0.01, 0.1, 1, 10, 20, 50 and 100 mg/ml) of *T. officinale* extract



were prepared in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) without serum. Each concentration of extract was added in 96-well plate that occupied by HeLa cells. After 24-hour incubation, cell viability was analyzed by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Triton X (1 and 2%) was used as positive control. **Result:** Percentages of viability of HeLa cells treated with *T. officinale* extract at concentrations of 0.01, 0.1, 1, 10, 20, 50 and 100 mg/ml were 42.21±21.26, 14.06±13.33, 9.29±13.43, 3.34±1.09, 2.70±0.49, 4.65±1.38 and 1.00±1.69%, respectively. **Conclusion:** All concentrations of *T. officinale* extract showed growth inhibitory effect in HeLa cells with the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) value less than 0.01 mg/ml.

Keywords: Taraxacum officinale, Dandelion, Cytotoxic effect, MTT assay

¹ Pharmacy student, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand.

² Ph.D, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand.

* **Corresponding author:** Narongchai Chaksupa, Tel: 045 353 600 Fax 045 353 600, E-mail: recipe2@hotmail.com

บทนำ

ในปัจจุบันมะเร็งเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์และการเสียชีวิตสูงเป็นอันดับต้นๆ ของโลก จากการรายงานขององค์การอนามัยโลกพบว่า ในปี 2548 มีคนตายเพราะมะเร็งปีละ 8 ล้านคน และได้มีการคาดการณ์ว่าในปี 2563 จะมีคนตายด้วยโรคมะเร็งมากกว่า 11 ล้านคน (Boerma T and Shibuya K., 2007) ในประเทศไทยพบว่าตั้งแต่ปี 2549-2553 สถิติการเสียชีวิตของคนไทยนั้นเกิดจากโรคมะเร็งสูงเป็นอันดับหนึ่ง โดยเฉพาะในปี 2553 ที่ผ่านมามีคนไทยเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 58,076 ราย ซึ่งเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสถิติปี พ.ศ. 2549 ประมาณ 8.1 (Bureau of policy and strategy, 2010) โรคมะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากการที่เซลล์ปกติเกิดการกลายพันธุ์ระดับยีนและแปรสภาพกลายเป็นเซลล์มะเร็ง โดยมีลักษณะที่สำคัญ คือ เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างควบคุมไม่ได้ รุกรานไปยังเนื้อเยื่ออื่นที่อยู่รอบข้างและแพร่กระจายไปทั่วร่างกายได้ ซึ่งจากลักษณะต่าง ๆ นั้นก็วิจัยได้นำมาเป็นเป้าหมายในการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการรักษาโรคมะเร็ง ซึ่งในปัจจุบันยาเคมีบำบัดที่ใช้ส่วนใหญ่มีกลไกยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ในขั้นตอนต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตามยาเคมีบำบัดเหล่านี้ก็ยังไม่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งให้หมดไปได้รวมทั้งยังก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ที่สำคัญ คือ กดไขกระดูก ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นในการแสวงหาสารใหม่จากแหล่งต่างๆ เช่น จากพืช เป็นต้น

Taraxacum officinale (dandelion) เป็นพืชที่ได้มีการศึกษาอย่างแพร่หลายเกี่ยวกับฤทธิ์ที่มีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งจากการศึกษา (Williams *et al.*, 1996; Koo *et al.*, 2004) พบว่า dandelion มีสารสำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะ taraxasterol (triterpenes: C₃₀) ที่รายงานว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดมะเร็ง

โดยการเพิ่มระดับ tumor necrosis factor- α (TNF- α) และ interleukin-1 α (IL-1 α) ซึ่งสารทั้งสองมีความสำคัญต่อกระบวนการ apoptosis นอกจากนี้ยังสามารถเหนี่ยวนำการสร้าง nitric oxide ใน macrophage อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเอทานอลของ *T. officinale* ใน HeLa cell (human cervical carcinoma)

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเพาะเลี้ยง HeLa cell

ทำการเพาะเลี้ยง HeLa cell จะเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์และยาปฏิชีวนะ 1 เปอร์เซ็นต์ (เพนนิซิลลิน จี (penicillin G) 100 ยูนิต/มิลลิกรัม + สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) 100 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม (มก./มล.) + แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) 0.25 มก./มล.) ในคนโทเลี้ยงเชื้อ (culture flask) ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งระหว่างการเพาะเลี้ยงจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แบบวันเว้นวัน

2.2 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของ HeLa cell

นำ HeLa cell มาเพาะเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well plate) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยมีจำนวนเซลล์ตั้งต้น 2,000 เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 7 วัน และมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวัน เมื่อครบทุก 24 ชั่วโมง จะนับ



จำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) โดยใช้ hemocytometer เพื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต (% cell viability) ซึ่งจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ (triplicate)

2.3 การเตรียมสารสกัด *T. officinale*

เตรียมสารสกัด *T. officinale* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (DMEM + ยาปฏิชีวนะ 1 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.1, 1, 10, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มก./มล.)

2.4 การทดสอบฤทธิ์ที่เป็นพิษต่อเซลล์ของ *T. officinale*

นำ HeLa cell จำนวน 5,000 เซลล์ต่อหลุม มาเพาะเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) ซึ่งภายในมีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยในกลุ่มทดลอง HeLa cell จะได้รับสารสกัด *T. officinale* แต่ละความเข้มข้น (0.01, 0.1, 1, 10, 20, 50 และ 100 มก./มล.) แล้วนำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหาความเป็นพิษของสารสกัดต่อ HeLa cell โดยใช้สารละลาย MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (ความเข้มข้น 5 มก./มล.) นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเติมไลซิส บัฟเฟอร์ (lysis buffer) ซึ่งประกอบด้วย โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate) 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethyl formamide) ต่อน้ำกลั่น (distilled water) ในอัตราส่วน 1:1 ที่จุ่มเข็มคั้น จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของ HeLa cell ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% inhibitory concentration, IC₅₀) และเปรียบเทียบกับ Triton x 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมผลบวก (positive control) โดยทำการทดสอบทั้งหมด 4 ซ้ำ (quadruplicate)

2.5 สถิติที่ใช้

วิเคราะห์ข้อมูลเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตโดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance, ANOVA) และทดสอบภายหลังจากการวิเคราะห์ (post hoc test) โดยใช้ Tukey Honestly Significant Difference, HSD เปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกลุ่ม

3. ผลการศึกษาวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบทดลอง (experimental study) เพื่อศึกษาถึงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ (growth curve) และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด *T. officinale* โดยใช้วิธี MTT assay ใน HeLa cell ซึ่งได้ผลการศึกษาดังนี้

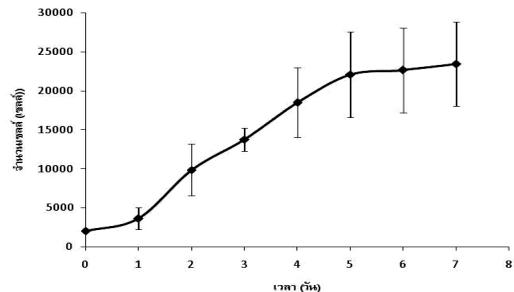
3.1 อัตราการเจริญเติบโตของ HeLa cell (growth curve)

ผลการศึกษาพบว่า ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ในช่วงเวลาที่ 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 เท่ากับ 3.63×10^3 , 9.33×10^3 , 1.24×10^4 , 1.62×10^4 , 1.98×10^4 , 2.29×10^4 และ 2.43×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 1)

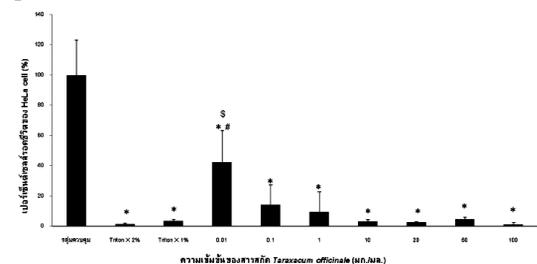
3.2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต

HeLa cell ที่ได้รับสารสกัด *T. officinale* มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 20, 50 และ 100 มก./มล. เท่ากับ 42.21 ± 21.26 , 14.06 ± 13.33 , 9.29 ± 13.43 , 3.34 ± 1.09 , 2.70 ± 0.49 , 4.65 ± 1.38 และ 1.00 ± 1.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 2)

จากการศึกษาพบว่า HeLa cell ที่ได้รับสารสกัด *T. officinale* ทุกความเข้มข้นมีเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต น้อยกว่ากลุ่มควบคุมผลลบ (negative control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัด *T. officinale* ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.01 มก./มล. มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ HeLa cell ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมผลบวกทั้ง 2 ความเข้มข้น



รูปที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตของ HeLa cell ในหนึ่งสัปดาห์



รูปที่ 2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต (% cell viability)

ของสารสกัด *T. officinale*

*เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมผลลบ (negative control),

p -value < 0.01

เปรียบเทียบกับ Triton X 1%, p -value < 0.05

§ เปรียบเทียบกับ Triton X 2 %, p -value < 0.05



3.3 ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์

ค่าความเข้มข้นของสารสกัด *T. officinale* ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของ HeLa cell ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าน้อยกว่า 0.01 มก./มล.

4. อภิปรายผลและสรุป

จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัด *T. officinale* มีความเป็นพิษต่อ HeLa cell ทุกความเข้มข้น (0.01 – 100 มก./มล.) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเป็นแบบขึ้นกับปริมาณสาร (dose-dependent)

Triton X เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) ซึ่งนำมาใช้เป็นตัวควบคุมผลบวกในการศึกษาที่ค้นหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลายการศึกษา (Bopp and Lettieri, 2008; Dvorák Z *et al.*, 2003) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้ Triton X ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ผลจากการทดลองพบว่าสารสกัด *T. officinale* ทุกความเข้มข้น (ยกเว้น 0.01 มก./มล.) มีฤทธิ์เป็นพิษต่อ HeLa cell ไม่แตกต่างจาก Triton X ทั้งสองความเข้มข้น

ในการศึกษาครั้งนี้สารสกัด *T. officinale* ที่ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ใน HeLa cell มีเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตเพียง 15.03 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การศึกษาของ Koo และคณะพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัด *T. officinale* ที่มีความเป็นพิษต่อ Hep G2 cell (human hepatoma cell line) ที่ความเข้มข้น 0.2 มก./มล. Hep G2 cell มีเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตเท่ากับ 74 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากผลดังกล่าวนี้อาจบ่งบอกได้ว่า HeLa cell มีความไวต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด *T. officinale* มากกว่า Hep G2 cell

การตอบสนองของเซลล์แต่ละชนิดต่อสารสกัด *T. officinale* อาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ โดยใน HeLa cell อาจพบการตอบสนองต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ของ *T. officinale* ที่สูงกว่า Hep G2 cell แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Koo และคณะกับการศึกษาในครั้งนี้มีความแตกต่างในวิธีการเตรียมสารสกัด เนื่องจากอาหารเลี้ยงเซลล์ใน Hep G2 cell ที่ใช้ซีรัมเป็นองค์ประกอบซึ่งสารต่าง ๆ ในซีรัมอาจทำให้ฤทธิ์ของสารสกัด *T. officinale* ลดลงได้ นอกจากนี้ควรมีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด *T. officinale* เช่น เพิ่มกระบวนการเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ด้านงบประมาณ อุปกรณ์ เครื่องมือ

และสารเคมีในการทดลองต่างๆ และทั้งนี้ต้องขอขอบพระคุณ ดร. บัญญา ยิ่งงาม ที่ให้การสนับสนุน HeLa cell เพื่อทำการศึกษาในครั้งนี้

References

- Boerma T, Shibuya K. Part 1: Ten statistical highlights in global public health. In: Pinchuk M, editor. *World Health Statistic*. France: World Health Organization; 2007. 12.
- Bopp SK, Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol* 2008; doi:10.1186/1471-2210-8-8.
- Bureau of policy and strategy. Rate per 100,000 population of first 10 leading cause groups of death 2010 [Online]. 2010 [cited 2011 Dec 2]; [1 screen]. Available from: <http://bps.ops.moph.go.th/index.php?mod=bps&doc=5>
- Dvorák Z, Kosina P, Walterová D, Šimánek V, Bachleda P, Ulrichová J. Primary cultures of human hepatocytes as a tool in cytotoxicity studies: cell protection against model toxins by flavonolignans obtained from *Silybum marianum*. *Toxicol Lett* 2003; 137: 201-12.
- Koo HN, Hong SH, Song BK, Kim CH, Yoo YH, Kima HM. *Taraxacum officinale* induces cytotoxicity through TNF- α and IL-1 α secretion in Hep G2 cells. *Life Sciences* 2004; 74: 1149–57.
- Williams AC, Goldstone F, Greenham J. Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry* 1996; 42: 121-7.