

นิพนธ์ฉบับ

การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพลูควาวในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพาะเลี้ยง ชนิด HL-60 และ Molt4

สิงห์คำ ธิมา* ภักดี พันธุ์พืช** ทรงยศ อนุชปรีดา*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพลูควาว ในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด HL-60 และ Molt4 เปรียบเทียบกับผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs) ของคนปกติ

วิธีการ: แยกพลูควาวส่วนต้น และใบ สกัดด้วย 80% เอทานอล แล้วทดสอบสารสกัดหยาบกับเซลล์ HL-60, Molt4 และ PBMCs ด้วยวิธี MTT assay

ผลการทดสอบ: พบว่าสารสกัดหยาบจากต้น และใบพลูควาวแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60 และ Molt4 โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ 50% (IC_{50}) อยู่ระหว่าง 500-800 $\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่สารสกัดหยาบทั้งสองชนิดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMCs โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 800 $\mu\text{g/mL}$

สรุป: สารสกัดหยาบพลูควาวมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด HL-60 และ Molt4 โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMCs จึงเป็นไปได้ที่จะใช้สารสกัดจากพลูควาว โดยเฉพาะส่วนใบมาวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญ และพัฒนาเป็นยารักษา มะเร็งเม็ดเลือดขาวในอนาคต วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2553; 43: 30-38.

คำรหัส: พลูควาว, มะเร็งเม็ดเลือดขาว, HL-60, Molt4, MTT assay

* แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** โรงพยาบาลอุมผาง อ.อุมผาง จ.ตาก

Cytotoxicity study of *Houttuynia cordata* Thunb crude extracts on HL-60 and Molt4 leukemic cell line

Singkome Tima* Bhakdee Phanphuech** Songyot Anuchapreeda*

Abstract

Objective: To investigate the effect of crude extract obtained from stem and leaf of *Houttuynia cordata* Thunb (Plu-Kao) on HL-60 and Molt4 leukemic cell line compared to normal peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Method: The stem and leaf of Plu-Kao were extracted with 80% ethanol and various concentrations of the crude extracts were used to treat the HL-60, Molt4, and PBMCs. The cytotoxic effect of crude extracts was investigated by MTT assay.

Results: It was found that crude Plu-Kao extract from stem and leaf showed the cytotoxic effect on HL-60 and Molt4 with inhibitory concentration at 50% (IC_{50}) between 500-800 μ g/mL. Interestingly, the crude extracts did not show the cytotoxic affect on PBMCs with the $IC_{50} > 800$ μ g/mL.

Conclusion: The crude Plu-Kao extracts showed the cytotoxic effect on both leukemic cells (HL-60 and Molt4) but not on PBMCs. Thus, the further investigation of the extracts should be performed to identify an active ingredient and develop chemotherapeutic agent for leukemia treatment. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2010; 43: 30-38.

Keywords: *Houttuynia cordata* Thunb (Plu-Kao), Leukemia, HL-60, Molt4, MTT assay

* Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

** Umphang hospital, Umphang, Tak, Thailand.

บทนำ

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว หรือลิวคีเมีย (leukemia) เป็นโรคมะเร็งทางโลหิตวิทยา (hematological malignancy) ที่มีอุบัติการณ์และอัตราการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลกที่ค่อนข้างสูง รายงานสรุปของสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุขเกี่ยวกับสถิติการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งชนิดต่างๆ พบว่ามีผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวมากเป็นอันดับ 3 ของโรคมะเร็งและเนื้องอกร้ายทั้งหมด โดยมีผู้เสียชีวิตในทุกช่วงอายุคือ ตั้งแต่ต่ำกว่า 5 ปีไปจนถึงมากกว่า 85 ปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งได้มีการสรุปว่าจังหวัดเชียงใหม่มีอุบัติการณ์ในการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวสูงที่สุดในประเทศไทย¹

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว หรือลิวคีเมีย (leukemia) เป็นโรคมะเร็งทางโลหิตวิทยา (hematological malignancy) ที่มีอุบัติการณ์และอัตราการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลกที่ค่อนข้างสูง รายงานสรุปของสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุขเกี่ยวกับสถิติการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งชนิดต่างๆ พบว่ามีผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวมากเป็นอันดับ 3 ของโรคมะเร็งและเนื้องอกร้ายทั้งหมด โดยมีผู้เสียชีวิตในทุกช่วงอายุคือ ตั้งแต่ต่ำกว่า 5 ปีไปจนถึงมากกว่า 85 ปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งได้มีการสรุปว่าจังหวัดเชียงใหม่มีอุบัติการณ์ในการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวสูงที่สุดในประเทศไทย¹

โดยทั่วไปการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวนิยมรักษาด้วยยาเคมีบำบัด โดยให้ผลดีในช่วงต้นของการรักษาเท่านั้น แต่หากให้ยาเคมีบำบัดเป็นเวลานานๆ จะทำให้เซลล์มะเร็งมีการพัฒนาและดื้อต่อยาเคมีบำบัดเหล่านั้น ส่งผลให้อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้การรักษาด้วยเคมีบำบัดยังส่งผลข้างเคียง (side effect) กับผู้ป่วย ซึ่งส่งผลกระทบต่อด้านจิตใจแก่ผู้ป่วย ทำให้สุขภาพร่างกายอ่อนแอลง จนอาจเป็นสาเหตุให้เกิดโรคแทรกซ้อนอื่นๆ ตามมา บุคลากรทางการแพทย์และสาธารณสุขทั้งในและต่างประเทศ เล็งเห็นถึงปัญหาที่สำคัญนี้ จึงได้มุ่งหายาหรือสารเคมีที่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้โดยที่ไม่ทำลายเซลล์ปกติ ไม่ทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการดื้อยาหรือเกิดการดื้อยาในอัตราต่ำ และไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ป่วย พืชสมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรเป็นสารธรรมชาติ ไม่ผ่านการสังเคราะห์เหมือนยาเคมีบำบัด จึงส่งผลให้เซลล์มะเร็งไม่เกิดการดื้อยาหรือพัฒนาในอัตราที่ช้ากว่าการดื้อยาเคมีบำบัด และสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรยังส่งผลข้างเคียงกับผู้ป่วยที่น้อยกว่ายาเคมีบำบัดอีกด้วย นอกจากนี้การใช้พืชสมุนไพรซึ่งสามารถปลูกได้ในประเทศยังเป็นการเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกร และลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้ายาเคมีบำบัดจากต่างประเทศให้น้อยลงได้

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ได้เปรียบประเทศอื่นๆ เนื่องจากมีสภาพภูมิประเทศที่ค่อนข้างสมบูรณ์เหมาะกับการเกษตร จึงทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชสมุนไพร ในชนบทมีการใช้สมุนไพรในตำรับยาแผนโบราณเพื่อการรักษาโรคกันมานานแล้ว และปัจจุบันเริ่มมีการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในตำรับยาแผนปัจจุบันเพื่อใช้ในการรักษาโรคกันมากยิ่งขึ้น จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของกลุ่มผู้วิจัยพบว่ามีสารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิด ที่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เช่น สารสกัดเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชัน เป็นต้น²⁻⁴ การศึกษานี้จึงมุ่งหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดใหม่ๆ เพื่อนำมาศึกษาผลในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

สมุนไพรพลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.)

หรือทางภาคเหนือเรียกว่าผักคาวตอง เป็นพืชวงศ์เดียวกับพลู ขนาดเล็กสูง 15-50 เซนติเมตร ลำต้นเลื้อยทอดไปตามพื้นดินและส่วนที่แตะดิน มีรากแตกจากข้อเพื่อยึดเกาะ ใบเดี่ยวออกสลับกัน ตัวใบคล้ายรูปหัวใจฐานใบขอบใบเรียบปลายใบแหลมมีจุดโปร่งแสงทั่วทั้งใบ⁵ สำหรับคุณสมบัติทางด้านการแพทย์ตามตำรายาไทยนั้นพบว่า ส่วนใบมีฤทธิ์รักษาอาการโรค โรคผิวหนัง นอกจากนี้ทั้งต้นยังมีฤทธิ์ในการขับปัสสาวะ แก้บวม น้ำ ผิบบวม อักเสบ ปวดอักเสบ หลอดลมอักเสบ ไอ บิด ผื่นคัน ยับยั้งโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ และริดสีดวงทวาร เป็นต้น⁶ สำหรับฤทธิ์ของพลูคาวกับโรคมะเร็งพบว่ามีความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งหลายชนิดได้แก่ เซลล์มะเร็งปอด (human lung adenocarcinoma) เซลล์มะเร็งรังไข่ (human ovarian adenocarcinoma) เซลล์มะเร็งสมอง มะเร็งลำไส้ และ human malignant melanoma อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม^{7, 8} นอกจากนี้ยังยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง (leukemic cell lines) หลายชนิด เช่น K562, U937, L1210, P3MR1 และ Raji เป็นต้น⁹ งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรพลูคาว ในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด Human promyelocytic leukemic cell line (HL-60) และ Human lymphoblastic leukemic cell line (Molt4) โดยเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในเซลล์ PBMCs ของคนปกติ

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดหยาบพลูคาว

พลูคาวที่นำมาทำการทดลองในครั้งนี้เพาะปลูกในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ โดยซื้อจากตลาดในเขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งประมาณ 1 คืน แยกส่วนของลำต้นและใบของพลูคาว อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 3 วัน บดพลูคาวทั้งสองส่วนให้เป็นผงละเอียด สกัดด้วยเอทานอล ตามวิธีการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยมีรายละเอียดดังนี้ หมักผงสมุนไพร น้ำหนัก 5 กรัม ด้วย 80% เอทานอล จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิทนาน 24 ชั่วโมง โดยเขย่าบ่อยๆ

ใน 6 ชั่วโมงแรก และตั้งทิ้งไว้อีก 18 ชั่วโมง จากนั้นกรองอย่างรวดเร็ว เก็บส่วนที่กรองได้ในภาชนะแก้วที่ทราบน้ำหนักแน่นอน เติม activated charcoal กรองสารสกัดอีกครั้ง หลังจากนั้นจึงนำสารสกัดมาทำเป็นผงแห้งโดยใช้เครื่อง evaporizer และ lyophilizer คำนวณหา % yield ของสารสกัดหยาบที่สกัดได้ ได้เก็บรักษาในอุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะทำการทดสอบ

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 และ Molt4

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ชนิดในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบเพิ่มเติมดังนี้ fetal bovine serum (10%), pyruvate (110 mg/mL), HEPES (10 mM), penicillin (100 units/mL) และ streptomycin (100 µg/mL) เพาะเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ความชื้นสัมพัทธ์ 95% และอุณหภูมิ 37 °C จนพร้อมสำหรับการทดสอบต่อไป

3. การเตรียม และเพาะเลี้ยงเซลล์ PBMCs

เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิด heparin ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติม sterile phosphate buffer saline (PBS) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงค่อยๆ เติม Ficoll-hypaque ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บั่นที่ 1500 rpm นาน 30 นาที ดูดเก็บ PBMCs บั่นล่างเซลล์ PBMCs ด้วย sterile PBS จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที ที่ความเร็ว รอบ 4000 rpm เพาะเลี้ยงเซลล์ PBMCs ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่สภาวะเดียวกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิดข้างต้น

4. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง HL-60 และ Molt4

เพาะเลี้ยงเซลล์ HL-60 และ Molt4 ใน 24 wells plate โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1×10^4 cells/well ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นับจำนวนเซลล์ทุกวันด้วยวิธี Trypan blue exclusion คำนวณปริมาณเซลล์ สร้างกราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิด เพื่อนำผลการศึกษา

ใช้ประโยชน์ในการหาปริมาณเซลล์เริ่มต้นสำหรับการทดลองอื่นๆ ต่อไป

5. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง และเซลล์ PBMCs

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบพลูควาต่อเซลล์ทั้งสามชนิดด้วยวิธี MTT assay โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 5×10^4 cells/mL, 1×10^5 cells/mL และ 5×10^5 cells/mL สำหรับเซลล์ HL-60, Molt4 และ PBMCs ตามลำดับ ใน 96 wells plate แล้วบ่มใน CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดหยาบพลูควา ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25-800 µg/mL โดยในกลุ่มควบคุม (vehicle control) เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมกับ dimethylsulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 1% หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดหยาบต่ออีก 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม MTT dye solution เพาะเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม DMSO แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 และ 630 nm และคำนวณค่า % cell viability โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่ม vehicle control และวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 50% หรือ IC₅₀ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเปรียบเทียบกับผลการทดลองในเซลล์ PBMCs ของคนปกติ และแต่ละการทดลองทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง (triplicate) เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการทดลอง

6. การเปรียบเทียบผลการทดลองทางสถิติ

แสดงผลการทดลองที่ได้อยู่ในรูป Mean $\pm$ standard deviation (SD) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

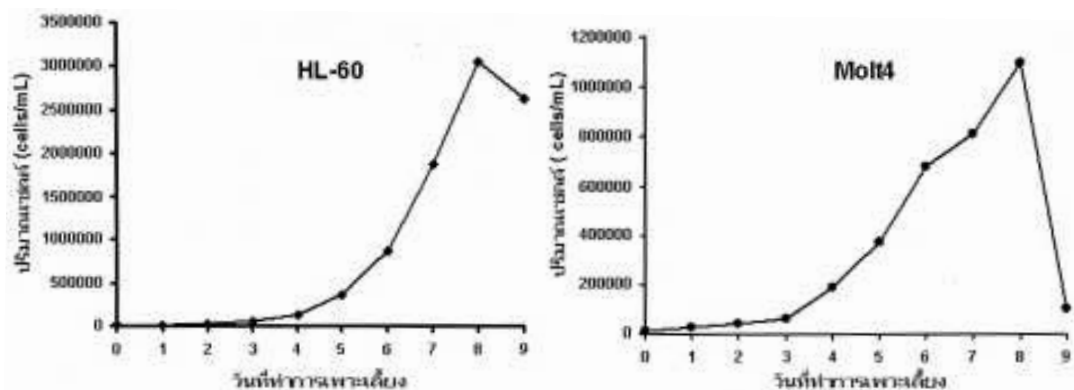
ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง HL-60 และ Molt4

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 และ Molt4 พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตแบบ exponential growth ดังแสดงในรูปที่ 1

ซึ่งจากกราฟที่ได้ นำมาใช้ประโยชน์ในการเลือกใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นสำหรับการทดลองต่อไป โดยใช้

ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 5×10^4 cells/mL และ 1×10^5 cells/mL สำหรับเซลล์ HL-60 และ Molt4 ตามลำดับ

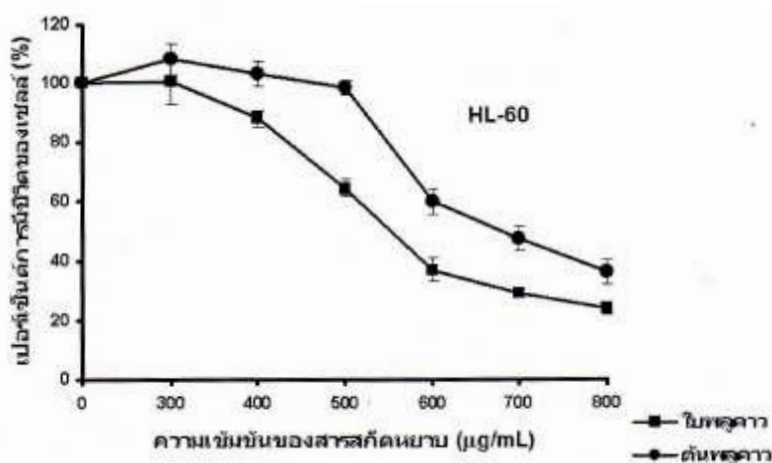


รูปที่ 1 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด HL-60 และ Molt4

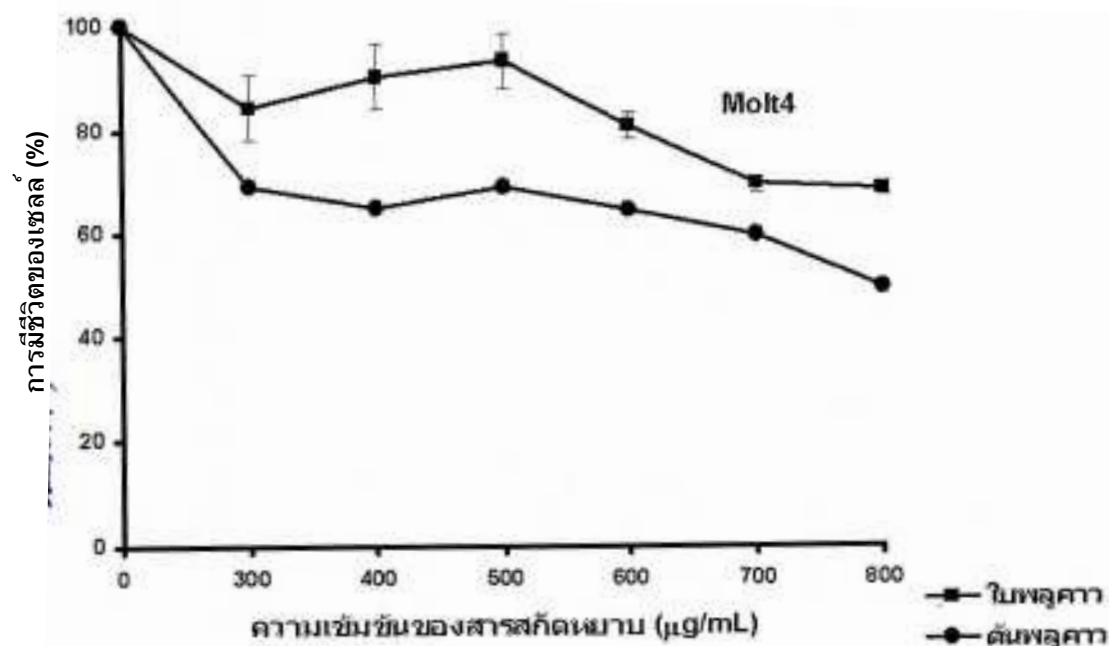
2. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและผลต่อเซลล์ PBMCs

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากทั้งส่วนใบและต้นพลูควาย แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิดตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น โดยในเซลล์ HL-60 พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนใบ และส่วนต้นพลูควายมีค่า IC_{50} เท่ากับ $551 \pm 9 \mu\text{g/mL}$ และ $667 \pm 13 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (รูปที่ 2) และในเซลล์ Molt4 เท่ากับ $>800 \mu\text{g/mL}$ และ $789 \pm 5 \mu\text{g/mL}$

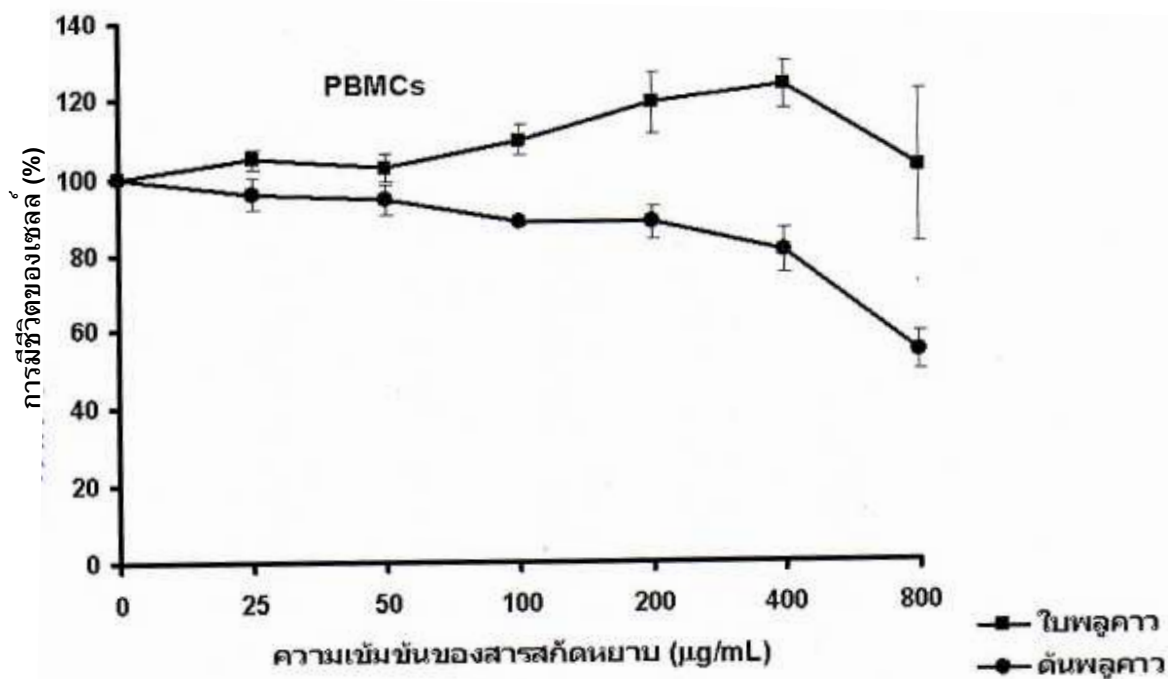
ตามลำดับ (รูปที่ 3) ในขณะที่สารสกัดหยาบทั้งสองส่วนไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMCs โดยมีค่า $IC_{50} > 800 \mu\text{g/mL}$ (รูปที่ 4) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบจากใบพลูควายยังมีแนวโน้มกระตุ้นเซลล์ PBMCs เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอีกด้วย และหากพิจารณาเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างเซลล์ HL-60, Molt4 และ PBMCs ในการตอบสนองต่อสารสกัดหยาบจากใบพลูควาย (รูปที่ 5) และต้นพลูควาย (รูปที่ 6) พบว่าเซลล์ HL-60 ตอบสนองต่อสารสกัดได้ดีกว่าเซลล์ Molt4 โดยเฉพาะส่วนของใบพลูควาย



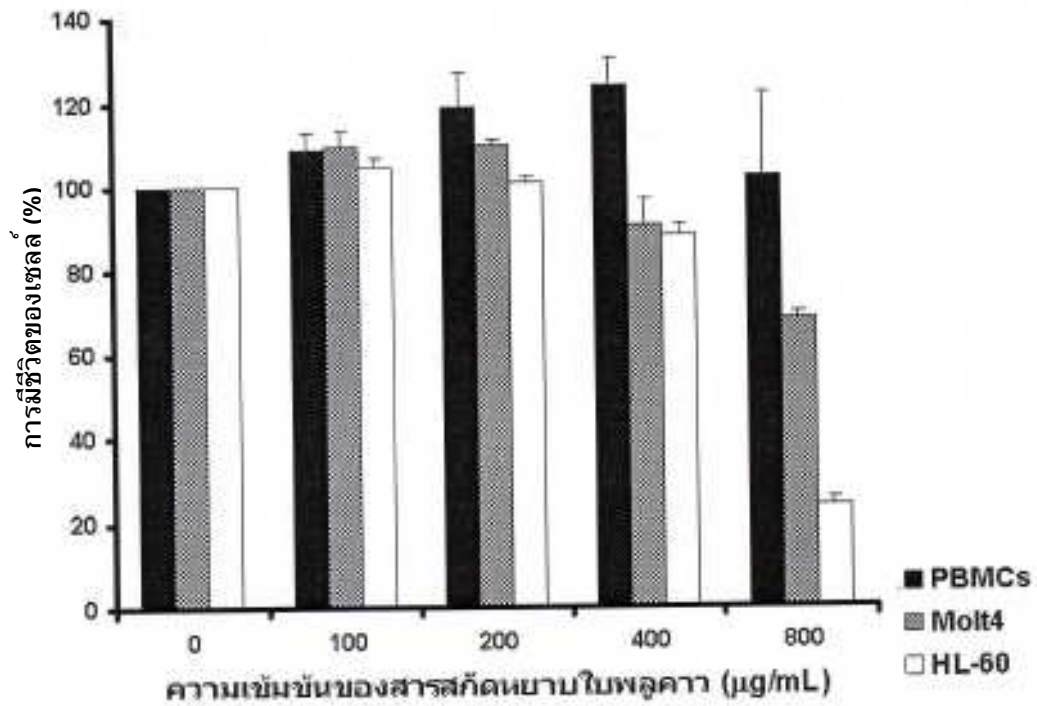
รูปที่ 2 แสดงผลของสารสกัดหยาบจากส่วนใบและต้นพลูควาย ในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด HL-60



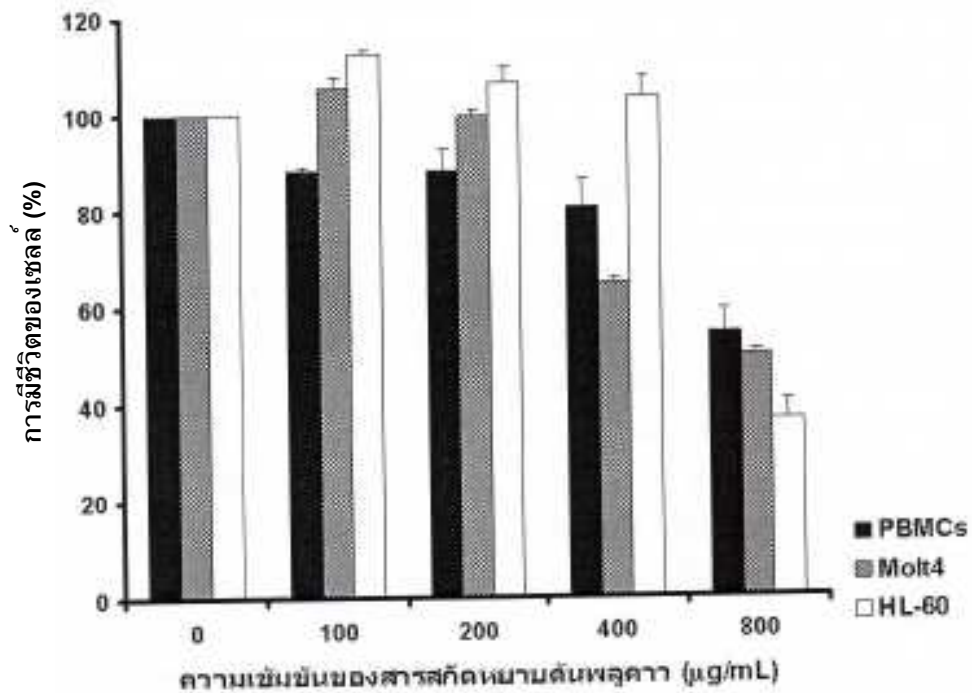
รูปที่ 3 แสดงผลของสารสกัดเห็บจากส่วนใบและต้นพญาคาในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด Molt4



รูปที่ 4 แสดงผลของสารสกัดเห็บจากส่วนใบและต้นพญาคาในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs)



รูปที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบจากส่วนใบพลูควาในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60, Molt4 และ PBMCs



รูปที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบจากส่วนต้นพลูควาในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60, Molt4 และ PBMCs

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

คณะผู้วิจัยเลือกใช้เซลล์ human promyelocytic leukemic cell line (HL-60) และ human lymphoblastic leukemic cell line (Molt4) เป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวใน myelocytic series และ lymphocytic series ตามลำดับ จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพลูควาที่สกัดด้วย 80% ethanol ในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 และ Molt4 ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดจากใบพลูความีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 ได้ดีกว่าสารสกัดที่มาจากส่วนของต้น ในขณะที่สารสกัดจากต้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt4 ได้ดีกว่าใบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างในคุณสมบัติของเซลล์ และลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) หรือจีโนไทป์ (genotype) ของเซลล์ทั้งสองชนิด รวมทั้งความแตกต่างของสารออกฤทธิ์สำคัญ (active ingredients) ในสารสกัดหยาบแต่ละส่วนที่อาจต่างกัน ทำให้การตอบสนองของเซลล์มะเร็งแตกต่างกันด้วย จากผลการศึกษาพบว่าสอดคล้องกับการศึกษาของ Chang JS และคณะ⁹ ที่พบว่าสารสกัดจากพลูควายับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงหลายชนิด สารสกัดจากพลูควาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเหล่านั้นได้ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 478 ถึง 662 $\mu\text{g/mL}$ นอกจากนี้ หากเปรียบเทียบผลการทดลองในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิดแล้วจะพบว่าเซลล์ HL-60 มีการตอบสนองต่อสารสกัดหยาบจากพลูควาได้ดีกว่าเซลล์ Molt4 โดยเฉพาะสารสกัดหยาบจากส่วนใบ

จากการศึกษาของ Kim SK และคณะ⁷ พบว่าสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ได้แก่ aristolactam A, aristolactam B, piperolactam A, norcepharadione B, cepharadione B, และ splendidin มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งหลายชนิดในหลอดทดลอง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารในกลุ่มอัลคาลอยด์อาจเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม ยังมีสารออกฤทธิ์อีกหลายกลุ่มในสารสกัดพลูควา และมีฤทธิ์ในการแสดง

ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อเพื่อวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิดนี้

จากผลการทดลองยังพบว่าสารสกัดหยาบจากพลูควา ทั้งส่วนใบ และต้นไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMCs แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากพลูควาทั้งสองส่วนไม่มีผลในการทำลายเซลล์ PBMCs ที่ใช้เป็นตัวแทนของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติในกระแสเลือดและไขกระดูก ดังนั้นจึงเป็นผลดีหากจะนำสารสกัดหยาบจากพลูควาไปทำการศึกษาต่อ และพัฒนาเป็นส่วนประกอบของยาเคมีบำบัดในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวต่อไป เนื่องจากสารสกัดหยาบแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์เม็ดเลือดปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนใบพลูความีแนวโน้มกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMCs คงเห็นได้จากการที่เซลล์ PBMCs มีอัตราการมีชีวิตเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5) จึงเป็นไปได้ที่จะศึกษาต่อให้ทราบถึงกลไกของสารสกัดหยาบจากส่วนใบในการกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMCs เนื่องจากเซลล์เหล่านี้เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย หากสามารถทราบกลไกและนำมาใช้อย่างถูกต้องก็สามารถนำสารสกัดจากส่วนใบพลูความาใช้ประโยชน์ได้อีกทางหนึ่งด้วย

การวิจัยครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นถึงผลของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของพลูควาในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด HL-60 และ Molt4 โดยเปรียบเทียบผลกับการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติในกลุ่ม PBMCs ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากพลูความีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงทั้งสองชนิด แต่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMCs ที่ความเข้มข้นเดียวกัน จึงเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดจากพลูควา โดยเฉพาะส่วนของใบพลูความาทำการทดสอบต่อไปเพื่อหาสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ และนำไปพัฒนาเป็นยารักษาเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว หรือใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิดอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิจัยที่ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2552 นอกจากนี้คณะผู้ทำวิจัยขอขอบคุณแขนงวิชาต่างๆ ในภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่อุปกรณ์เครื่องมือ และสารเคมีที่จำเป็นสำหรับการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. International Agency for Research on Cancer World Health organization. Cancer in Thailand. Vol. II, 1992-1994, IARC Technical Report No. 34. Bangkok, Thailand: IARC Library Cataloguing in Publication Data; 1999.
2. Anuchapreeda S, Limtrakul P, Thanarattanakorn R, Sittpreechacharn S, Chanarat P. Inhibitory effect of curcumin on *WT1* gene expression in patient leukemic cells. Arch Pharm Res 2006; 29 (1): 80-7.
3. Anuchapreeda S, Thanarattanakorn R, Sittpreechacharn S Chanarat P, Limtrakul P. Curcumin inhibits *WT1* gene expression in human leukemic K562 cells. Acta Pharmacologica Sinica 2006; 27 (3): 360-6.
4. Anuchapreeda S, Tima S, Duangrat C, Limtrakul P. Effect of pure curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin on *WT1* gene expression in leukemic cell lines. Cancer Chemother Pharmacol 2008; 62: 585-594.
5. จารีย์ บันสิทธิ์ และคณะ. ผักคาวตอง. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2546.
6. Hayashi K, Kamiya M, Hayashi T. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus and HIV. Planta Med 1995; 61 (3): 237-41.
7. Kim SK, Ryu SY, No J, Choi SU, Kim YS. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. Arch Pharm Res 2001; 24 (6): 518-21.
8. Tang YJ, Yang JS, Lin CF, et al. *Houttuynia cordata* Thunb extract induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. Oncol rep 2009; 22 (5): 1051-6.
9. Chang JS, Chiang LC, Chen CC, Liu LT, Wang KC, Lin CC. Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. minor (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb. Am J Chin Med 2001; 29 (2): 303-12.