

ผลของสารสกัดจากใบมะรุมต่อการต้านเซลล์มะเร็ง squamous cell carcinoma 15

ดรินภ พวงเดช¹ วีรลักษณ์ อุ่นน้อย¹ รุติยา ลือตระกูล¹ กาญจนา อู่สุวรรณทิม^{1,2} พาชื่น โพทัพ^{1,3}

¹หน่วยวิจัยภูมิคุ้มกันระดับเซลล์และโมเลกุล คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

³ภาควิชารังสีเทคนิค คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

Received: February 27, 2020

Revised: June 30, 2020

Accepted: July 15, 2020

บทคัดย่อ

มะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) เป็นพืชสมุนไพรที่นิยมเพาะปลูกสำหรับใช้เป็นอาหาร นอกจากนี้ มะรุมยังมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ด้านสารอนุมูลอิสระ ด้านเชื้อแบคทีเรีย และต้านมะเร็ง ซึ่งโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของคนไทย ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งตับ มะเร็งเต้านม และมะเร็งศีรษะและคอ งานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งของสารสกัดจากใบมะรุมต่อเซลล์มะเร็งศีรษะและคอ (squamous cell carcinoma 15: SCC15 cells) โดยนำสารสกัดจากใบมะรุมที่สกัดด้วย hexane (crude hexane) ทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง SCC15 และเซลล์แมคโครฟาจของคน จากนั้นเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์แมคโครฟาจของคนคือระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์แมคโครฟาจตายเพียงร้อยละ 5 (IC_{50}) และนำมาทดสอบกับเซลล์มะเร็ง SCC15 เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดที่ส่งผลต่อการตายของเซลล์มะเร็ง SCC15 โดยตรวจวิเคราะห์การตายแบบอะพอพโทซิสด้วยชุดทดสอบ Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit ผลการตรวจวิเคราะห์พบว่า สารสกัดจากใบมะรุมสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับยาซิสพลาติน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากผลการศึกษารูปได้ว่าสารสกัดจากใบมะรุมมีคุณสมบัติต้านเซลล์มะเร็ง SCC15 โดยทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งดังกล่าวแบบอะพอพโทซิส ซึ่งจากผลการวิจัยนี้ยังไม่ทราบว่าเป็นสารสกัดที่มีสารออกฤทธิ์ชนิดใดที่มีคุณสมบัติต้านเซลล์มะเร็ง ดังนั้น ควรมีการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากใบมะรุมและศึกษากลไกการต้านมะเร็งเพื่อนำความรู้ไปพัฒนารักษาโรคมะเร็งศีรษะและคอต่อไป

คำสำคัญ: มะรุม เซลล์มะเร็ง SCC15 การตายแบบอะพอพโทซิส

ผู้สนับสนุนงาน:

พาชื่น โพทัพ

หน่วยวิจัยภูมิคุ้มกันระดับเซลล์และโมเลกุล ภาควิชารังสีเทคนิค คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

99 หมู่ 9 ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

อีเมล: pachuenp@nu.ac.th

Anti-cancer effect of *Moringa oleifera* leaf extract on squamous cell carcinoma 15 cells

Daranphop Doungdet¹, Weeraluck Unnoi¹, Thitiya Luetragoon¹, Kanchana Usuwanthim^{1,2},
Pachuen Potup^{1,3}

¹Cellular and Molecular Immunology Research Unit, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University

²Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University

³Department of Radiological Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University

Abstract

Moringa oleifera Lam. is widely cultivated in tropical area for food source. Moreover, it has anti-inflammation, antioxidant, anti-bacterial and anti-cancer properties. Cancer is the first cause of death in Thailand including lung cancer, liver cancer, breast cancer and head and neck cancer respectively. In this study, we aimed to investigate the anti-cancer property of *Moringa oleifera* Lam. leaf extract on head and neck cancer cell line using squamous cell carcinoma (SCC) 15 cells. *M. oleifera* leaves crude hexane extract were tested with SCC15 cells and human macrophages by cytotoxicity assay. A five percent inhibitory concentration (IC_{50}) of macrophages was used to evaluate the anti-cancer activity on SCC15 cells. Cell apoptosis were analyzed by Muse™ Annexin V and Dead Cell Kit. Results showed that the extract could significantly induce cancer cell apoptosis same as cisplatin compare to untreated control ($p < 0.05$). In conclusion, result suggested that *M. oleifera* leaf extracts potentially have anti-cancer property on SCC15 cells. Thus, it should be further identified the bioactive compounds and elucidate the mechanism of anti-cancer activity. The findings imply that *M. oleifera* leaf extract is anti-cancer effect which might develop a new drug for head and neck cancer.

Keywords: *Moringa oleifera* Lam., squamous cell carcinoma 15 cells, apoptosis

Corresponding Author:

Pachuen Potup

Cellular and Molecular Immunology Research Unit,

Department of Radiological Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University

99 Moo 9, Tha Pho Sub-district, Mueang District, Phitsanulok Province 65000, Thailand.

E-mail: pachuenp@nu.ac.th

บทนำ

พืชสมุนไพรหลายชนิดไม่เพียงใช้เป็นอาหารเท่านั้น แต่ยังสามารถใช้ส่วนต่างๆ ในการบรรเทาและรักษาโรค เช่น พืชหลายโรคช่วยบรรเทาอาการไข้ โรคเบาหวาน โรคบิด งูกัด แมลงกัดต่อย และโรคมะเร็ง¹ ขมิ้น ช่วยบรรเทาอาการปวด ด้านการอักเสบ ด้านสารอนุมูลอิสระ และด้านมะเร็ง² เป็นต้น นอกจากนี้พืชดังกล่าวแล้วยังพบว่า มะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) เป็นพืชสมุนไพรอีกหนึ่งชนิดที่มีการใช้เพื่อบรรเทาและรักษาโรค มะรุมเป็นพืชสมุนไพรที่นิยมเพาะปลูกเพื่อใช้เป็นอาหารเนื่องจากเป็นพืชโตเร็ว ปลูกง่ายในเขตร้อน ต้องการอาหารในการเจริญเติบโตน้อย และผลิตใบตลอดทั้งปี นอกจากนี้ประโยชน์ที่ใช้เป็นอาหารแล้ว ยังพบว่ามะรุมยังมีคุณสมบัติต้านมะเร็ง³ จากงานวิจัยในปี ค.ศ. 2015 ศึกษาผลของสารสกัดจากใบ เปลือก และเมล็ดของมะรุมต่อการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้ พบว่า สารสกัดจากใบและเปลือกของมะรุมสามารถลดอัตราการรอดชีวิต การเจริญเติบโต และการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง อีกทั้งสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสทั้งในเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้⁴

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 ของคนไทย และมีอัตราการเสียชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง⁵ จากการศึกษาพบว่าโรคมะเร็งศีรษะและคอ (head and neck cancer) เป็นสาเหตุการตายอันดับ 4 รองมาจากโรคมะเร็งปอด โรคมะเร็งตับ และโรคมะเร็งเต้านม⁶ สาเหตุหลักของการเกิดโรคมะเร็งศีรษะและคอ เกิดจากการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และการสูบบุหรี่⁷⁻⁹ ซึ่งพฤติกรรมดังกล่าวสามารถพบเห็นได้ทั่วไปในประชากรที่อาศัยอยู่ในประเทศไทย นอกจากนี้โรคมะเร็งจะส่งผลกระทบต่อร่างกายผู้ป่วยแล้ว การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันยังส่งผลกระทบต่อเซลล์ทั่วไปในร่างกาย จึงทำให้เกิดผลข้างเคียงจากการรักษาต่อผู้ป่วย เช่น ปวดหน้าอก อาเจียน เส้นผมและขนร่วง น้ำหนักลด ท้องเสีย และอ่อนแรง เป็นต้น¹⁰

เพื่อลดผลข้างเคียงจากการรักษาข้างต้น ดังนั้น การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากใบมะรุมต่อเซลล์มะเร็งศีรษะและคอ squamous cell carcinoma 15 (SCC15 cells) จะทำให้ทราบข้อมูลของสารสกัดจากใบมะรุมต่อการต้านเซลล์มะเร็งศีรษะและคอ SCC15 ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาศึกษาเพื่อการพัฒนาสมุนไพรต่อการรักษามะเร็งต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากใบมะรุมต่อเซลล์มะเร็งศีรษะและคอ squamous cell carcinoma 15 (SCC15 cells) โดยจะศึกษาการตายแบบอะพอพโทซิสด้วยชุดทดสอบ Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Muse® Cell Analyzer

วิธีการศึกษา

การสกัดสารจากใบของมะรุม

ผงใบมะรุมแห้งจำนวน 2 กิโลกรัม ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทชาวละออ จำกัด นำมาหมักด้วย hexane (RCI Labscan, Thailand) ปริมาตร 5 ลิตร เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำสารสกัดมากรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร และนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary evaporator (Heidolph, Germany) กากใบมะรุมที่เหลือจะหมักซ้ำด้วย hexane จำนวน 2 รอบ นำสารละลายมากรองและระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง evaporator ซึ่งจะได้ส่วนที่เป็น crude hexane สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป

ตัวอย่างตัวแทนเซลล์ปกติในร่างกายที่ใช้ศึกษา

ใช้ตัวอย่างเม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจจาก buffy coat ของผู้บริจาคโลหิต ณ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก การศึกษานี้เป็น

ส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยที่ผ่านการรับรองจาก คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ รหัสโครงการ IRB 1013/60

การแยกเซลล์โมโนไซต์

นำตัวอย่างเลือดจาก buffy coat ปั่นด้วยความเร็ว 3,000 rpm 30 นาที เพื่อแยกเม็ดเลือดขาวออกจากเม็ดเลือดแดง จากนั้นนำเม็ดเลือดขาวที่ได้มาเจือจางด้วย Hank's balanced salt solution (HBSS) และเติมลงบน Ficoll-hypaque gradient (Axis-Shield poc, Norway) นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 rpm 30 นาที จากนั้นแยกส่วน PBMC มาปั่นล้างด้วย HBSS ที่ความเร็ว 2,000 rpm 10 นาที resuspend ด้วย HBSS และเติมลงบนน้ำยา percoll gradient (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 rpm 30 นาที แยกโมโนไซต์มาปั่นล้างด้วย HBSS และนำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส CO₂ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 7 วัน จนกระทั่งโมโนไซต์พัฒนาเป็นแมคโครฟาจ (monocyte-derived macrophage) สำหรับใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ปกติในร่างกายเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

การตรวจวัดความบริสุทธิ์ของโมโนไซต์ และแมคโครฟาจ

นำเซลล์โมโนไซต์และแมคโครฟาจที่แยกได้มาปั่นล้างด้วย FACs buffer ที่ความเร็ว 2,000 rpm 5 นาที จากนั้นเติม fluorophore conjugated antibody ต่อ CD14 และ CD16 (BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA) นำไป incubate ที่ 4 องศาเซลเซียสในที่มืด 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นล้างด้วย Phosphate-Buffered Saline (PBS) 3 รอบ resuspend ด้วย PBS และนำตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, IN, USA)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

เป็นการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของยา cisplatin (Sigma-Aldrich, USA) และสารสกัดจากใบมะรุมต่อแมคโครฟาจและเซลล์มะเร็ง SCC15 (ATCC, USA) ปรับความเข้มข้นโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เจือจางแบบ two fold dilution ซึ่งใช้ RPMI-1640 (Gibco life technologies, USA) เจือจางสารสำหรับทดสอบกับแมคโครฟาจ และใช้ DMEM/F12 (Gibco life technologies, USA) เจือจางสารสำหรับทดสอบกับเซลล์มะเร็ง SCC15 จากนั้นนำยา cisplatin ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 100,000 ng/mL และสารสกัดจากใบมะรุมที่ความเข้มข้น 0 ถึง 10,000 µg/mL มาทดสอบกับแมคโครฟาจและเซลล์มะเร็ง SCC15 โดยเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส CO₂ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS เติมน้ำ MTT (Thermo Fisher Scientific, USA) นำไปเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส CO₂ ร้อยละ 5 ในที่มีดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดดูสี MTT ออก เติมน้ำ 100% DMSO เพื่อละลายตะกอนสี และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader (Perkin Elmer, Inc., USA) ที่ความยาวคลื่น 590 nm

การทดสอบสารสกัดจากใบมะรุมต่อ SCC15

นำเซลล์มะเร็ง SCC15 ลงใน 24-well plate จำนวน 1×10^5 cell/well ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และนำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส CO₂ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบมะรุมด้วย DMEM/F12 โดยใช้ความเข้มข้นที่สามารถออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง แต่ไม่เป็นพิษต่อแมคโครฟาจ (IC₅₀) เติมน้ำสารสกัดลงใน 24-well plate ปริมาตรหลุมละ 500 ไมโครลิตร นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส CO₂ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยสภาวะทดสอบประกอบด้วย positive control (cisplatin), negative control

(medium), solvent control (DMSO) และ crude hexane

การตรวจวิเคราะห์การตายแบบอะพอพโทซิสของ SCC15 ด้วยชุดทดสอบ Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit

นำเซลล์มะเร็ง SCC15 ที่ผ่านการ incubate กับสารสกัดจากใบมะรุ้มใส่ลงใน microcentrifuge tube โดยใช้วิธี trypsinization นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 rpm 5 นาที ดูดส่วน supernatant ออก และ resuspend ด้วย DMEM/F12 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Muse™ Annexin V & Dead Cell reagent (EMD Millipore Corp., USA) 100 ไมโครลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนดตรวจวิเคราะห์การตายแบบอะพอพโทซิสด้วยเครื่อง Muse™ Cell Analyzer (EMD Millipore Corp., USA) โดย Muse™ Annexin V & Dead Cell reagent จะประกอบด้วย annexin V และ 7-AAD ในเซลล์มีชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนในระยะ early apoptosis จะติดสีของ annexin V ที่สามารถจับกับ phosphatidylserine ที่ด้านนอกผนังเซลล์ระยะ late apoptosis และ dead cell ผนังเซลล์ถูกทำลายทำให้ 7-AAD สามารถเข้าไปจับกับ DNA ในนิวเคลียสได้

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ความแตกต่างของข้อมูลที่ได้จากการทดสอบในแต่ละสถานะวิเคราะห์ด้วยสถิติ one-way analysis of variance (one way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

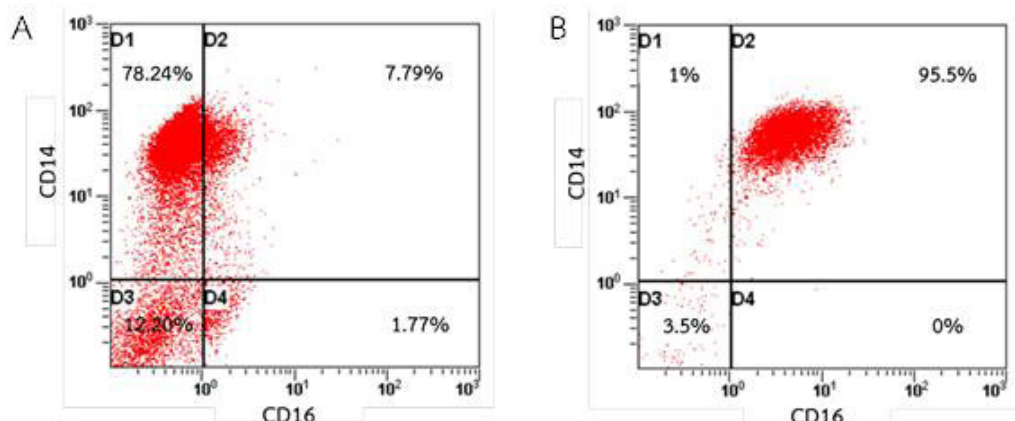
ผลการศึกษา

การทดสอบหาค่าเฉลี่ย และหาร้อยละความมีชีวิตของโมโนไซต์

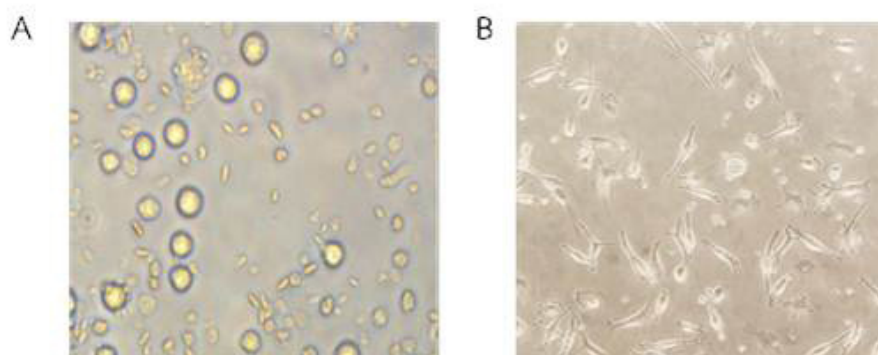
ปริมาณของโมโนไซต์ที่แยกได้ ตรวจวัดโดยอาศัยหลักการการย้อมติดสีเซลล์ที่ไม่มีชีวิตของ trypan blue พบว่ามีปริมาณ 2.48×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร และมีค่าความมีชีวิตร้อยละ 97.63

การทดสอบหาร้อยละการแสดงออกของ CD marker บนผิวเซลล์โมโนไซต์

นำโมโนไซต์มา'y้อมด้วย fluorophore conjugated antibody ต่อ CD14/CD16 โดย CD14 เป็น surface marker ของเซลล์โมโนไซต์ ส่วน CD16 เป็น surface marker ของแมคโครฟาจ จากนั้นตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโมโนไซต์ที่แยกได้ในวันที่ 1 และ 7 ด้วยเครื่อง flow cytometer ผลการตรวจวิเคราะห์พบว่า ความบริสุทธิ์ของโมโนไซต์ที่แยกได้มีการติดสีของ CD14 ร้อยละ 86.03 และ CD16 ร้อยละ 9.56 และความบริสุทธิ์ของแมคโครฟาจในวันที่ 7 มีการติดสีของ CD14 ร้อยละ 96.5 และ CD16 ร้อยละ 95.5 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่าโมโนไซต์ที่แยกในวันแรกมีลักษณะกลม ขนาดเล็ก ส่วนโมโนไซต์ที่พัฒนาเป็นแมคโครฟาจหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน มีลักษณะเป็นกระสวย ขนาดใหญ่ แสดงดังรูปที่ 1 และรูปที่ 2



รูปที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์หาร้อยละความบริสุทธิ์ของโมโนไซต์ที่แยกได้โดยการย้อมด้วย fluorescence conjugated antibody ต่อ CD14/CD16 ในวันที่ 1 (A) และในวันที่ 7 (B) ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer โดย D1 คือ CD14⁺CD16⁻, D2 คือ CD14⁺CD16⁺, D3 คือ CD14⁻CD16⁻ และ D4 คือ CD14⁻CD16⁺



รูปที่ 2 ลักษณะของโมโนไซต์ที่แยกได้จาก buffy coat ในวันที่แรก (A) และลักษณะของโมโนไซต์ที่พัฒนาเป็นแมคโครฟาจหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (40x)

การทดสอบความเป็นพิษต่อแมคโครฟาจ

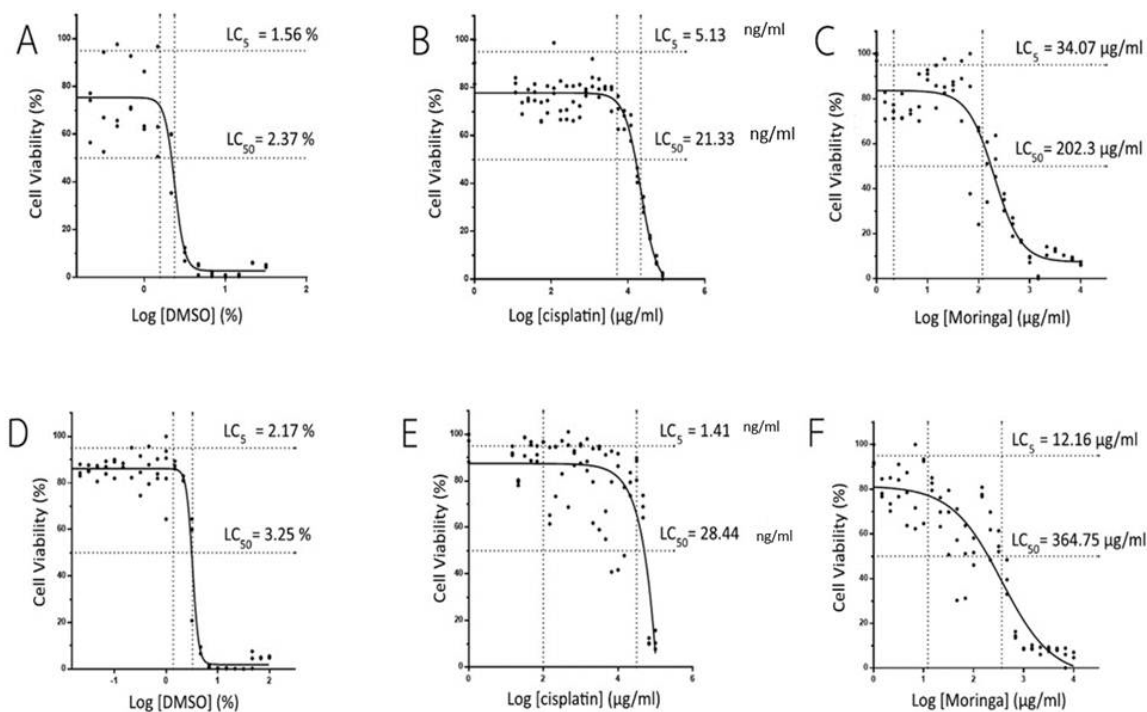
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อแมคโครฟาจของ DMSO พบว่า ความเข้มข้นที่ทำให้แมคโครฟาจมีชีวิตร้อยละ 50 (IC₅₀) มีค่า ร้อยละ 2.37 ± 2.22 และความเข้มข้นที่ทำให้แมคโครฟาจมีชีวิตร้อยละ 95 (IC₉₅) มีค่า ร้อยละ 1.56 ± 1.23 สำหรับ cisplatin และ crude hexane พบว่า ความเข้มข้นที่ทำให้แมคโครฟาจมีชีวิตร้อยละ 50 (IC₅₀) มีค่า 21.33 ± 5.33 ng/mL และ 202.3 ± 8.62 µg/mL ตามลำดับ และความเข้มข้นที่ทำให้แมคโครฟาจมีชีวิตร้อยละ 95 (IC₉₅)

มีค่า 5.13 ± 2.92 ng/mL และ 34.07 ± 4.2 µg/mL ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 3 และตารางที่ 1 งานวิจัยนี้ใช้ค่าความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดที่ทำให้แมคโครฟาจมีชีวิตร้อยละ 95 (IC₉₅) ทดสอบกับเซลล์มะเร็ง SCC15 เพื่อศึกษาการตายแบบอะพอพโทซิส และใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่เป็นตัวทำละลายสารสกัดจากใบมะรุมร้อยละ 0.8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของตัวทำละลายไม่ส่งผลกระทบต่อ การตายของแมคโครฟาจ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง SCC15

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง SCC15 ของ DMSO พบว่า ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีชีวิตร้อยละ 50 (IC_{50}) มีค่า ร้อยละ 3.25 ± 1.48 และความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีชีวิตร้อยละ 95 (IC_{95}) มีค่า ร้อยละ 2.17 ± 1.18 สำหรับ cisplatin และ crude hexane พบว่า ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีชีวิตร้อยละ 50 (IC_{50}) มีค่า 28.44 ± 9.31 ng/mL และ $364.75 \pm$

$18.6 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีชีวิตร้อยละ 95 (IC_{95}) มีค่า 1.42 ± 1.2 ng/mL และ $12.16 \pm 3.25 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 3 และตารางที่ 1 ในงานวิจัยนี้ใช้ความเข้มข้นของ DMSO ที่เป็นตัวทำละลายสารสกัดจากใบมะรุมร้อยละ 0.8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของตัวทำละลายไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการตายของเซลล์มะเร็ง SCC15



รูปที่ 3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อแมคโครฟาจของ DMSO (A), cisplatin (B) และ crude hexane (C) และผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง SCC15 ของ DMSO (D), cisplatin (E) และ crude hexane (F)

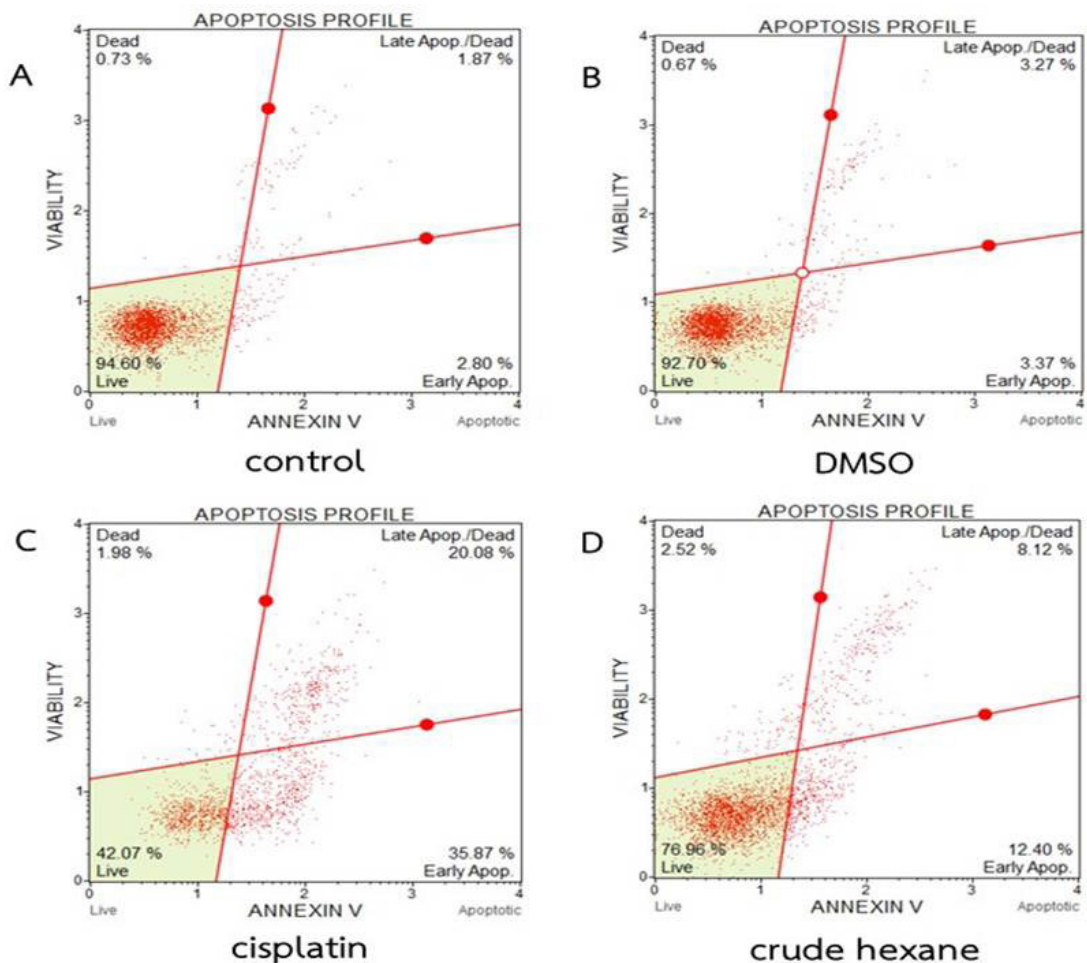
ตารางที่ 1 ค่า IC_5 และ IC_{50} จากการทดสอบความเป็นพิษของ DMSO, cisplatin และ crude hexane ต่อแมคโครฟาจและเซลล์มะเร็ง SCC15 (n=6)

สารทดสอบ	แมคโครฟาจ		SCC15 cells	
	IC_5	IC_{50}	IC_5	IC_{50}
DMSO (%)	1.56 ± 1.23	2.37 ± 2.22	2.17 ± 1.18	3.25 ± 1.48
cisplatin (ng/mL)	5.13 ± 2.92	21.33 ± 5.33	1.42 ± 1.2	28.44 ± 9.31
crude hexane ($\mu\text{g/mL}$)	34.07 ± 4.2	202.3 ± 8.62	12.16 ± 3.25	364.75 ± 18.6

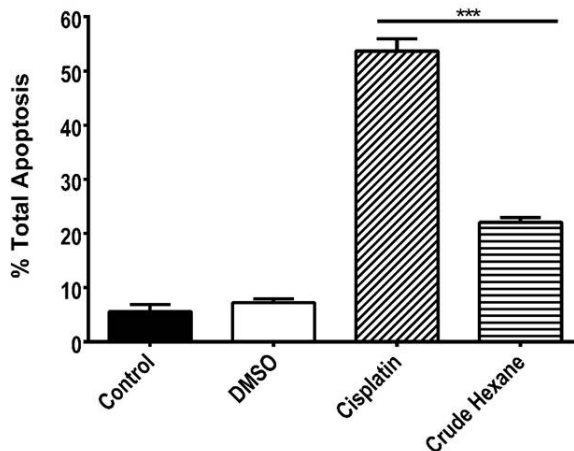
การตรวจวิเคราะห์การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง SCC15

ปรับความเข้มข้นของ DMSO, cisplatin และ crude hexane โดยใช้ค่าความเข้มข้นที่ทำให้แมคโครฟาจมีชีวิตร้อยละ 95 (IC_{95}) และนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็ง SCC15 จากนั้นตรวจวิเคราะห์การตายแบบอะพอพโทซิสด้วยเครื่อง Muse™ Cell Analyzer ซึ่งพบว่าการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง SCC15 ในกลุ่มควบคุม (control) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างเดียวเท่ากับร้อยละ 5.55 ± 2.23 และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง SCC15

ในกลุ่มควบคุมที่เติม DMSO ในปริมาณความเข้มข้นที่เท่ากับความเข้มข้นที่มากที่สุดของ DMSO ที่ใช้ทดสอบ คือ ร้อยละ 0.08 ไม่ต่างกับกลุ่มควบคุมปกติ คือ ร้อยละ 7.21 ± 1.29 หลังทดสอบเซลล์มะเร็ง SCC15 ด้วย cisplatin และ crude hexane มีค่าร้อยละ 53.65 ± 3.25 และ 22.05 ± 1.49 ตามลำดับ จากผลการตรวจวิเคราะห์พบว่าสารสกัดจากใบมะรุมสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง SCC15 เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ($n = 3$) แสดงดังรูปที่ 4 และรูปที่ 5



รูปที่ 4 ผลการตรวจวิเคราะห์การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง SCC15 ที่ทดสอบกับ control (A), DMSO (B), cisplatin (C) และ crude hexane (D)



รูปที่ 5 ผลการตรวจวิเคราะห์การตายแบบอะพอพโทซิส (total apoptosis) ของเซลล์มะเร็ง SCC15

หมายเหตุ :

Control คือ เซลล์มะเร็ง SCC15 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์

DMSO คือ เซลล์มะเร็ง SCC15 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ในสถานะที่มี DMSO

Cisplatin คือ เซลล์มะเร็ง SCC15 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ในสถานะที่มี cisplatin

Crude hexane คือ เซลล์มะเร็ง SCC15 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ในสถานะที่มี crude hexane

*** คือ คำนัยสำคัญ $p \leq 0.001$ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control)

อภิปรายผล

การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากใบมะรุ่โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็ง squamous cell carcinoma 15 cell lines ในสถานะต่างๆ โดยตรวจวิเคราะห์การตายแบบอะพอพโทซิสด้วยเครื่อง Muse™ Cell Analyzer พบว่าผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบมะรุ่ต่อแมคโครฟาจซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ทั่วไปในร่างกายและเซลล์มะเร็ง SCC15 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน (ค่าความเข้มข้นที่ทำให้แมคโครฟาจมีชีวิตร้อยละ 95) สารสกัดสามารถลดร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มะเร็ง SCC15 ลง ในขณะที่ร้อยละความมีชีวิตของแมคโครฟาจยังคงที่ (ร้อยละ 95) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง SCC15 แต่เป็นพิษต่อเซลล์ทั่วไปในร่างกายน้อย และผลทดสอบสารสกัดจากใบมะรุ่กับเซลล์มะเร็งในสถานะต่างๆ พบว่าสารสกัดสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง SCC15 เกิดการตาย

แบบอะพอพโทซิสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) การที่สารสกัดสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส นั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Al-Asmari AK, et al. ที่นำสารสกัดจากใบมะรุ่ด้วย ethanol ทดสอบกับ MDA-MB-231 breast cancer cell lines และ HCT-8 colorectal cancer cell lines พบว่าสารสกัดสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส⁴ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jung IL ที่นำสารสกัดจากใบมะรุ่ด้วยน้ำเย็น ทดสอบกับ A549 lung cancer cell lines พบว่าสารสกัดสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยเพิ่มการแสดงออกของ cleaved caspase 3¹¹ ยังไม่พบรายงานผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะรุ่ต่อเซลล์มะเร็ง SCC15 ซึ่งมีการศึกษาก่อนพบว่าสาร Aloe-emodin จาก *Rheum undulatum* L. สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและชักนำให้เกิด

การตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็ง SCC15¹² อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยยังไม่ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในสารสกัดใบมะรุมด้วยเฮกเซนที่มีความสามารถทำลายเซลล์มะเร็งและกลไกในการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุล ดังนั้น ควรมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมและสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ในใบมะรุม รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติอีกครั้ง โดยนำไปแยกเป็นสารประกอบและนำสารประกอบที่แยกได้ไปศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็ง จนกระทั่งทราบชนิดและคุณสมบัติที่ชัดเจนของสารออกฤทธิ์ในสารสกัด จากนั้นนำไปศึกษาในสัตว์ทดลองและผู้ป่วยโรคมะเร็งศีรษะและคอ เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการต้านมะเร็ง อีกทั้งยังลดผลข้างเคียงจากการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดและพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งศีรษะและคอต่อไป

สรุปผล

สารสกัดจากใบมะรุมมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ squamous cell carcinoma 15 เช่นเดียวกับยา cisplatin ที่ใช้รักษาโรคมะเร็ง จึงเป็นไปได้ที่จะสามารถนำสารสกัดจากใบมะรุมไปรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งศีรษะและคอ ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาในเชิงลึกตลอดจนทดสอบในสัตว์ทดลองและผู้ป่วยโรคมะเร็ง เพื่อให้ได้ข้อมูลคุณภาพและมีความปลอดภัยอย่างแท้จริง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัทชาวละออ จำกัด ที่อนุเคราะห์ฝังใบมะรุมแห้ง กลุ่มงานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ที่ให้ความอนุเคราะห์ buffy coat จากเลือดผู้บริจาคโลหิต และงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

1. Hossain MS, Urbi Z, Sule A, et al. *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees: a review of ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology. *Scientific World Journal* 2014;doi: 10.1155/2014/274905.
2. Aggarwal BB, Surh YJ, Shishodia S, editors. *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*. New York: Springerlink; 2007.
3. Kang Zi Khor, Vuanghao Lim, Emmanuel J Moses, et al. *The in vitro and in vivo anticancer properties of Moringa oleifera*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018;14:1071-243.
4. Al-Asmari AK, Albalawi SM, Athar MT, et al. *Moringa oleifera* as an anti-cancer agent against breast and colorectal cancer cell lines. *PloS one* 2015;10:814.
5. Ministry of Public health. *Public health statistic A.D. 2017*. Nontaburi: Ministry of Public health; 2018.
6. Ferlay J EM, Lam F, Colombot M, et al. *Bray F Global cancer observatory: Cancer today* Lyon, France. International Agency for Research on Cancer 2018. [Internet]. 2018 May [cited 2019 May 10]. Available form: <http://goc.iarc.fr/today/fact-sheets-populations>.

7. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the International head and neck cancer epidemiology consortium. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:777-89.
8. Cristiana Lo Nigro, Nerina Denaro, Anna Merlotti, et al. Head and neck cancer: improving outcomes with a multidisciplinary approach. *Cancer Manag Res* 2017;9:363-71.
9. Wyss A, Hashibe M, Chuang S-C, et al. Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International head and neck cancer epidemiology consortium. *Am J Epidemiol* 2013;178:679-90.
10. Cancer Institute NSW Australian Technology Park: Cancer Institute NSW. Cancer treatment side effects: A guide for Aboriginal Health Workers. Cancer Institute NSW; 2015.
11. Jung IL. Soluble extract from *Moringa oleifera* leaves with a new anticancer activity. *PloS one* 2014;9:954-92.
12. Li Q, Wen J, Yu K, et al. Aloe-emodin induces apoptosis in human oral squamous cell carcinoma SCC15 cells. *BMC Complement Altern Med* 2018;18:296.