

## ผลของ 4F-phenyl pyrazole ในการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก T84

พจนารถ วานิจจะกุล<sup>1\*</sup> ลลิตา ศิริอนันต์<sup>2</sup> ณัฐนรี ศรีสรการณ<sup>1</sup> เปรมยุตา เหมภูมิ<sup>1</sup> และ ปกิต กำบุญมา<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม

<sup>2</sup>สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี จังหวัดนครราชสีมา

<sup>3</sup>สาขาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี จังหวัดนครราชสีมา

### บทคัดย่อ

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 2 และจัดเป็นมะเร็งที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตมากเป็นอันดับ 3 ของโลก การตรวจพบและการเข้าถึงการรักษาที่ล่าช้าและต้นทุนการรักษาที่แพง ส่งผลให้มีอัตราการเสียชีวิตค่อนข้างสูง ในปัจจุบันพืชสมุนไพรไทยได้รับความสนใจในการนำไปพัฒนายาต้านมะเร็งค่อนข้างมาก จึงเป็นพืชสมุนไพรที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีคุณสมบัติในการรักษาโรค โดยเฉพาะสารออกฤทธิ์ [6]-shogaol ที่มีฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งหลายชนิด อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดหลายประการในการใช้ [6]-shogaol เพื่อรักษาเนื่องจากคุณสมบัติโครงสร้างทางเคมีของสาร งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ของสาร [6]-shogaol ได้แก่ PK4F1, PK2ME และ PK4NO2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ชนิด T84 การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก T84 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าสาร PK4F1 หรือ 4F-phenyl pyrazole ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ T84 ได้ใกล้เคียงกับผลของสาร [6]-shogaol และดีกว่าสาร PK2ME และ PK4NO2 นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเกิดโคไลนของเซลล์ T84 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษาผลของ PK4F1 ต่อการอยู่รอดของเซลล์พบว่าสารสามารถลดการอยู่รอดของเซลล์ T84 ได้โดยมีค่า IC<sub>50</sub> อยู่ที่ 16.76 ไมโครโมลาร์ ผลจากการศึกษาด้วย flow cytometer พบว่า PK4F1 ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มจำนวนอะพอพโทติกเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ และจากการศึกษาภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ยังพบว่า PK4F1 เหนี่ยวนำให้เกิด phosphatidylserine exposure การเกาะกลุ่มของโครมาติน (chromatin condensation) และการแตกหักของ DNA ซึ่งเป็นเหตุการณ์สำคัญในกระบวนการอะพอพโทซิส ผลการทดสอบทั้งหมดนี้บ่งชี้ว่าสาร PK4F1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก T84 โดยการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส ดังนั้นสาร PK4F1 จึงมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นยารักษาเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักต่อไป อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น การทดสอบเพื่อศึกษาในเชิงกลไกเกี่ยวกับฤทธิ์ของสาร PK4F1 ยังมีความจำเป็นที่ต้องดำเนินการต่อไปในอนาคต

**คำสำคัญ:** 4F-phenyl pyrazol, เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก, อะพอพโทซิส

\*ผู้นิพนธ์หลัก: podchanart.wan@mahidol.ac.th

วันที่ส่ง: 26 กุมภาพันธ์ 2568

วันที่แก้ไข: 29 เมษายน 2568

วันที่ตอบรับ: 4 มิถุนายน 2568

## 4F-Phenyl Pyrazole Induces Apoptotic Cell Death in T84 Colorectal Cancer Cells

Podchanart Wanitchakool<sup>1\*</sup>, Lalida Sirianant<sup>2</sup>, Nutnaree Srisarakorn<sup>1</sup>, Premyuda Hempoom<sup>1</sup>  
and Pakit Kumboonma<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Microscopy, Faculty of Medical Technology, Mahidol University,  
Nakhon Pathom Province, Thailand

<sup>2</sup>Department of Applied Biology, Faculty of Science and Liberal Arts,  
Rajamangala University of Technology Isan, Nakhon Ratchasima Province, Thailand

<sup>3</sup>Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Liberal Arts,  
Rajamangala University of Technology Isan, Nakhon Ratchasima Province, Thailand

### Abstract

Colorectal cancer is the second most common cancer globally and the third leading cause of cancer death. A delayed diagnosis and high cost of treatment contribute to high mortality. Thai herbs have gained more interest as chemopreventive agents. Ginger is one of the most widely studied herbs composing of many bioactive compounds for treating diseases, including [6]-shogaol. Previous studies have reported that [6]-shogaol exhibited antiproliferative activity against various human cancer cells. However, its therapeutic effects were limited due to physicochemical properties. Therefore, the present study aimed to investigate the antiproliferative activity of [6]-shogaol derivatives including PK4F1, PK2ME and PK4NO<sub>2</sub>, on human colorectal (T84) cancer cells. Morphological analysis of T84 cells under a microscope revealed that PK4F1, or 4F-phenyl pyrazole, exhibited strong antiproliferative effects compared to PK2ME and PK4NO<sub>2</sub>. The morphological changes observed were comparable to those induced by [6]-shogaol. In addition, PK4F1 possessed a tremendous effect on inhibiting colony formation. Cells viability assays showed a reduction in T84 cells viability with an IC<sub>50</sub> of 16.76 μM. Flow cytometry assay showed that treatment with 20 μM of PK4F1 significantly increased apoptotic cell death. Moreover, fluorescence microscopy revealed that PK4F1 could induce phosphatidyl serine exposure chromatin condensation and DNA fragmentation, a hallmark of apoptosis. These findings suggested that PK4F1 inhibited the growth of T84 cells in dose-dependent manner by inducing apoptosis. Therefore, PK4F1 might be a promising candidate for further development as an anti-colorectal cancer agent. Additional studies are required to elucidate its underlying mechanisms.

**Keywords:** 4F-phenyl pyrazole, [6]-shogaol, Colorectal cancer, Apoptosis

\*ผู้เขียนหลัก: podchanart.wan@mahidol.ac.th

Received date: February 26, 2025

Revised date: April 29, 2025

Accepted date: June 4, 2025

## 1. บทนำ

ปัจจุบันโรคมะเร็งจัดเป็นปัญหาต่อระบบสาธารณสุข และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 3 ของประชากรทั่วโลก โดยเฉพาะโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักพบอุบัติการณ์สูงถึงกว่า 100,000 รายต่อปี และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง<sup>(1, 2)</sup> การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักให้หายขาดสามารถทำได้ แต่ทั้งนี้ขึ้นกับระยะของโรค โดยหากตรวจพบตั้งแต่ระยะเริ่มต้น มีโอกาสที่จะรักษาให้หายขาดได้ ปัจจุบันการส่องกล้องลำไส้ใหญ่เพื่อตรวจคัดกรองมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักจึงถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย<sup>(3, 4)</sup> เนื่องจากช่วยให้ตรวจพบรอยโรคก่อนที่จะเป็นมะเร็ง อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์และการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักทั่วโลกยังคงมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี แม้ปัจจุบันความก้าวหน้าทางการแพทย์ในการรักษาโรคมะเร็งจะเพิ่มมากขึ้น จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าประเทศกลุ่มด้อยพัฒนามีอัตราการรอดชีวิตจากโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักน้อยกว่าประเทศในกลุ่มที่พัฒนาแล้ว เนื่องจากปัญหาทางด้านระบบเศรษฐกิจทำให้เกิดข้อจำกัดในการพัฒนาระบบสาธารณสุขภายในประเทศ ส่งผลให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการวินิจฉัยโรคตั้งแต่ระยะเริ่มต้นรวมถึงไม่สามารถเข้าถึงการรักษาได้ เนื่องจากการรักษามีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง นักวิจัยจึงได้พยายามคิดค้นแนวทางอื่น เพื่อให้ผู้ป่วยเข้าถึงการรักษาโรคมะเร็งง่ายขึ้น โดยวิธีการหนึ่งคือการเลือกใช้ยาสมุนไพรในการรักษาโรคมะเร็งเนื่องจากหาได้ง่ายตามธรรมชาติ และราคาไม่แพง

ขิง (*Zingiber officinale*) เป็นหนึ่งในสมุนไพรทางเลือกที่ได้รับความนิยมนำมาศึกษาและพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็ง เนื่องจากขิงเป็นพืชที่หาได้ง่ายตามท้องถิ่น และมีสรรพคุณในการรักษาโรคต่าง ๆ มากมาย รวมถึงโรคมะเร็งด้วย มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบริสุทธิ์จากขิง เช่น สาร [6]-shogaol ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่พบมากในขิง มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโต และฆ่าเซลล์มะเร็งหลายชนิดผ่านการชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส<sup>(5-8)</sup> ซึ่งเป็นกลไกที่กระตุ้นให้เซลล์ตายโดยไม่มีการอักเสบให้เซลล์ข้างเคียงเกิดการอักเสบ<sup>(9)</sup> อะพอพโทซิสจึงเป็นกลไกเป้าหมายของยารักษาโรคมะเร็งที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการใช้สาร [6]-shogaol ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากลักษณะโครงสร้างทางเคมี ที่ทำให้สารมีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย และมีชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) ที่ไม่ค่อยดี จึงต้องมีการดัดแปลงโครงสร้างของสาร [6]-shogaol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ของ [6]-shogaol ที่ได้จากขิง ได้แก่ PK4F1, PK2ME และ PK4NO2 ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด T84 เซลล์ (lung metastasis-derived colon carcinoma) ซึ่งจากการทดลองพบว่า PK4F1 หรือ 4F-phenyl pyrazole มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก T84 ได้ดีที่สุด และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสได้

## 2. วัสดุและวิธีการ

### 2.1 การเตรียมสารสกัด

สารบริสุทธิ์ [6]-shogaol และสารอนุพันธ์ของสาร [6]-shogaol คือ PK4F1, PK2ME และ PK4NO2 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. ปกิต กำบุญมา อาจารย์ประจำสาขาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี โดยสารบริสุทธิ์ [6]-shogaol และสารอนุพันธ์ของสาร [6]-shogaol เป็นสารที่สกัดได้จากเหง้าขิงแล้วทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สกัดได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สารบริสุทธิ์ [6]-shogaol และสารอนุพันธ์ของสาร [6]-shogaol จะถูกนำมาเตรียมเป็นสารละลายด้วยตัวทำละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) และนำไปเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการสำหรับการทดสอบต่อไป

### 2.2 การเพาะเลี้ยง และการเตรียมเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด T84

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด T84 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. นพ. ฉัตรชัย เหมือนประสาทยุทธศาสตร์โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเซลล์ T84 จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA) ที่มีส่วนผสมของ fetal bovine serum เข้มข้นร้อยละ 10 (FBS, Gibco, USA) และ penicillin/streptomycin เข้มข้นร้อยละ 1 (Invitrogen, USA) ภายในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น CO<sub>2</sub> ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน

### 2.3 การทดสอบฤทธิ์ของสาร [6]-shogaol และสารอนุพันธ์ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ T84 ด้วยวิธี colony formation assay

การเปรียบเทียบฤทธิ์ของสาร [6]-shogaol และสารอนุพันธ์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ T84 แบบโคโลนี ทดสอบโดยเตรียมเซลล์ T84 จำนวน  $1 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในภาชนะหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม การทดสอบแบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่หนึ่ง คือ กลุ่มควบคุม เติมน้ำสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, USA) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และกลุ่มที่สอง คือ กลุ่มทดสอบ โดยเติมน้ำสารละลาย คือ [6]-shogaol, PK4F1, PK2ME และ PK4NO2 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เท่ากัน ลงในแต่ละหลุม ตามลำดับ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบทุก ๆ 3 วัน และบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1, 3 และ 7 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนด ถ่ายรูปเซลล์ด้วยกล้อง inverted light microscope (inverted microscope CKX53, Japan) และบันทึกข้อมูล เมื่อสิ้นสุดวันที่ 7 นำเซลล์ไปวิเคราะห์หาค่าด้วยวิธี colony formation assay

การทดสอบฤทธิ์ของสาร PK4F1 ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แบบโคโลนี ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเตรียมเซลล์ T84 จำนวน  $1 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในภาชนะหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม แล้วเติมน้ำสาร PK4F1 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครโมลาร์ ลงในแต่ละหลุม บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเซลล์ไปวิเคราะห์หาค่าด้วยวิธี colony formation assay

หลังจากบ่มเพาะเซลล์ครบตามเวลาที่กำหนด ล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS และตรึงเซลล์ด้วย paraformaldehyde/PBS เข้มข้นร้อยละ 4 จากนั้นย้อมเซลล์ด้วยสี crystal violet เข้มข้นร้อยละ 0.1 ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำสะอาด และนำมานับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่มด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อคำนวณหาค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์แบบโคโลนี (% colony formation) จากนั้นเติม glacial acetic acid เข้มข้นร้อยละ 10 เพื่อละลายสี crystal violet ที่ย้อมติดเซลล์ออกมามีค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปริมาณของเซลล์ที่ย้อมติดสี crystal violet จะบ่งชี้เซลล์ที่มีชีวิตรอด

### 2.4 การทดสอบฤทธิ์ของสาร PK4F1 ต่อการอยู่รอดของเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay

เตรียมเซลล์ T84 จำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร พร้อมกับเติมน้ำสาร PK4F1 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ โดยเซลล์ T84 ในกลุ่มควบคุม จะถูกบ่มด้วยสารละลาย DMSO เข้มข้นร้อยละ 0.1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ T84 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ใส่ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมน้ำสารละลาย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในแต่ละหลุม บ่มต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลาย MTT ที่แล้วเติมน้ำสารละลาย DMSO เพื่อละลายผลึก formazan จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (% cell viability) จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{Abs เซลล์ในหลุมที่มีสารทดสอบ}}{\text{Abs เซลล์ในหลุมควบคุม}} \times 100$$

คำนวณความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์กับความเข้มข้นของสาร PK4F1 เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสาร PK4F1 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>)

### 2.5 การทดสอบฤทธิ์ของสาร PK4F1 ต่อการชักนำให้เซลล์ T84 ตายแบบอะพอพโทซิส

การทดสอบฤทธิ์ของสาร PK4F1 ที่ชักนำให้เซลล์ T84 ตายแบบอะพอพโทซิส ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์เซลล์ในสารละลาย (flow cytometer) เป็นการทดสอบหาการเปลี่ยนแปลงของ phosphatidylserine บนเยื่อหุ้มเซลล์ และ DNA ด้วยการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ Annexin V-FITC และ 7-AAD ตามลำดับ บ่มเพาะเซลล์ T84 ที่ความเข้มข้น  $2.5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในภาชนะหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 12 หลุม แล้วเติมน้ำสาร PK4F1 ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ทั้งหมด ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที ล้าง

ด้วยสารละลายบัพเฟอร์ PBS ก่อนเติมสารละลาย Annexin V binding buffer ที่มีสาร Annexin V-FITC และ 7-AAD และ บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์หาร้อยละการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสและการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer (BD FACSCanto™ II, USA)

## 2.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ T84 ด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์

เตรียมเซลล์ T84 จำนวน  $2.5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรบน glass cover slide โดยนำเซลล์ใส่แต่ละหลุมในถาดหลุมเลี้ยง เซลล์ชนิด 12 หลุม ที่มี glass cover slide วางอยู่ที่ก้นหลุม เติมสาร PK4F1 ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ นำไป บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรึงเซลล์บน glass cover slide ด้วย paraformaldehyde/PBS เข้มข้นร้อยละ 4 (4% PFA) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วย 1X PBS ก่อนนำไปย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ คือ DAPI (5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) PI (5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ Annexin V-FITC (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มเซลล์ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ส่วนเกินออกด้วย 1X PBS แล้วนำเซลล์ไปตรวจสอบด้วยกล้อง fluorescence microscope (Olympus BX51, Japan) และถ่ายรูปบันทึกข้อมูล

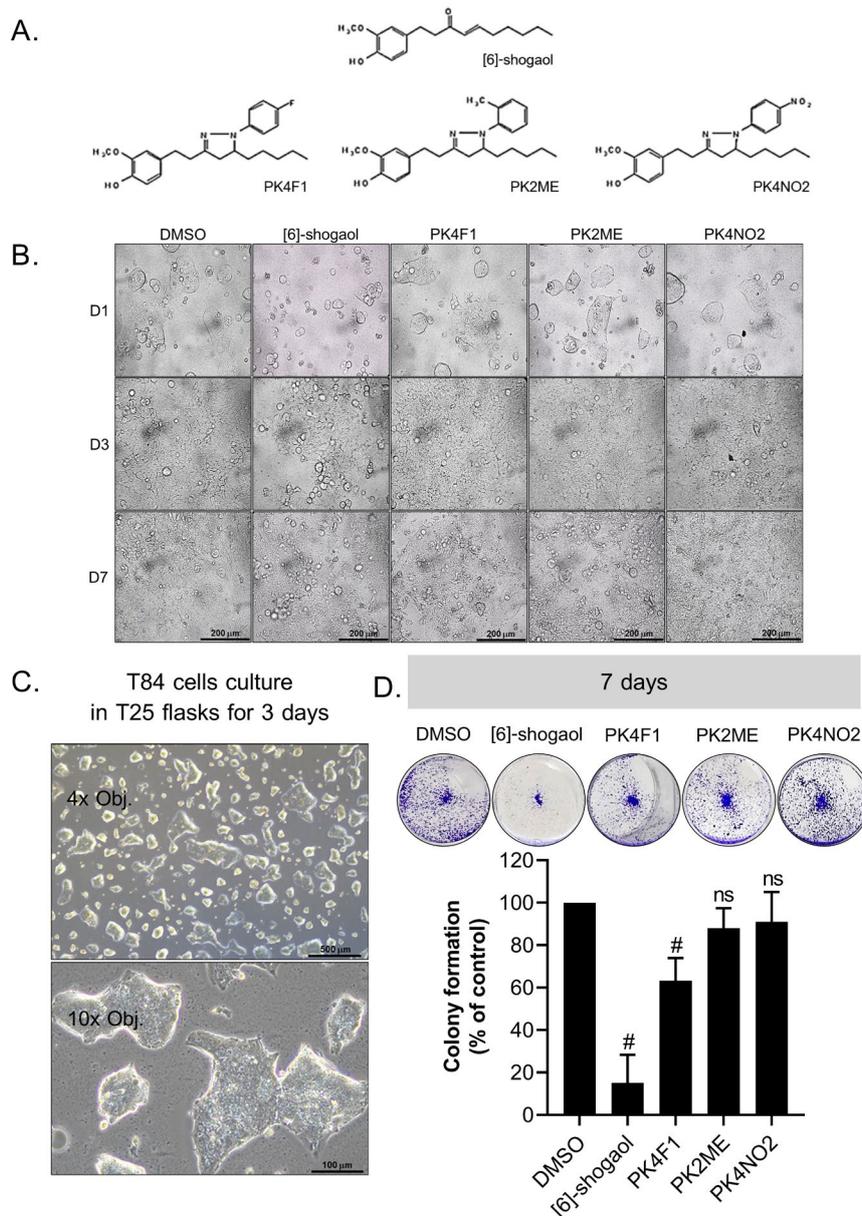
## 2.7 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในแต่ละการทดสอบ นำผลการทดสอบอย่างน้อย 3 ซ้ำมาคำนวณค่า mean  $\pm$  SEM และเปรียบเทียบความแตกต่าง ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองโดยวิธี One-Way ANOVA วิเคราะห์แบบ Turkey's multiple comparison test โดย ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ระหว่างข้อมูลจะถูกพิจารณาที่  $p < 0.05$  โดยจะใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 5.0

## 3. ผลการศึกษา

### 3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ [6]-shogaol และสารอนุพันธ์ของ [6]-shogaol ต่อการเจริญเติบโตของ เซลล์ T84

การทดสอบผลของสารสกัดบริสุทธิ์ [6]-shogaol และสารอนุพันธ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ [6]-shogaol คือ PK4F1, PK2ME และ PK4NO2 ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด T84 โดยการประเมินจากรูปร่างลักษณะของเซลล์ที่ เปลี่ยนแปลงไปด้วยกล้อง inverted light microscope ผลการทดสอบพบว่า สาร [6]-shogaol และสารอนุพันธ์ทั้ง 3 ชนิด มีผลต่อรูปร่าง และการเจริญเติบโตของเซลล์ T84 อย่างชัดเจน เมื่อสังเกตการเจริญเติบโตของเซลล์ T84 พบว่าเซลล์ T84 เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเป็นกลุ่มโคโลนี ที่มีขอบเขตของโคโลนีชัดเจน เกาะพื้นผิวแน่น และขยายแผ่กว้างตามเวลาเพาะเลี้ยงที่ เพิ่มขึ้น (Fig. 1B และ 1C) แต่หลังจากเซลล์ T84 ถูกทดสอบด้วยสารตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด เป็นเวลา 1 วัน กลุ่มโคโลนีของ เซลล์ T84 มีขนาดเล็กลง เซลล์หดตัว (shrinkage) มีขนาดเล็กลง และเริ่มมีเซลล์ขนาดเล็กหลุดลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นที่ น่าสนใจอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบสารตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 7 วันพบว่า สาร PK4F1 มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ T84 มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบของสาร PK2ME และ PK4NO2 และยังให้ผลทดสอบที่ใกล้เคียงกับผลของสาร [6]-shogaol คือ มีเซลล์รูปร่างกลมขนาดเล็กหลุดลอยจำนวนมากในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์ T84 ที่ยังมีชีวิตตรึงอยู่บนพื้นผิวเหลือน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ถูก ทดสอบด้วยตัวทำละลาย DMSO เข้มข้นร้อยละ 0.1 (Fig. 1B) และเมื่อทดสอบด้วย colony formation assay พบว่า หลังจากบ่มเซลล์ T84 กับสารทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดสอบพบว่า ค่าร้อยละของ การเจริญเติบโตเป็นโคโลนีของเซลล์ T84 หลังจากบ่มด้วยสาร [6]-shogaol, PK4F1, PK2ME และ PK4NO2 เทียบกับกลุ่ม ควบคุม (DMSO เข้มข้นร้อยละ 0.1) มีค่าเท่ากับ  $15.19 \pm 7.610$ ,  $63.29 \pm 6.165$ ,  $87.91 \pm 9.569$  และ  $91.00 \pm 14.068$  ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า สาร PK4F1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเป็นโคโลนีของเซลล์ T84 ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ สาร PK2ME และ PK4NO2 (Fig. 1D) จากผลการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงเลือกนำสาร PK4F1 ไปทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์ T84 ต่อไป



**Fig. 1** Effects of [6]-shogaol and Pyrazole derivatives of [6]-shogaol (PK4F1, PK2ME and PK4NO2) on T84 cells. (A) The chemical structure of [6]-shogaol and derivatives (PK4F1, PK2ME and PK4NO2). (B) Morphology of T84 cells after treated with 10  $\mu$ M [6]-shogaol and Pyrazole derivatives of [6]-shogaol for 1, 3 and 7 days as shown in D1, D3 and D7, respectively. Morphology of T84 cells were observed under inverted light microscopy (20X). (C) T84 Morphology was observed under inverted light microscopy (4X and 10X) following culturing in a T25 flask for 3 days. (D) Colony formation was analyzed by crystal violet staining. T84 cells were incubated with [6]-shogaol and derivatives (PK4F1, PK2ME and PK4NO2) at concentration of 10  $\mu$ M for 7 days, The number of T84 colonies were significantly decreased by [6]-shogaol and PK4F1 ( $n = 3$ ). Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. # $p < 0.05$  compared with DMSO-treated cells.

### 3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสาร 4F-phenyl pyrazole (PK4F1) ต่อการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์ T84

จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสาร PK4F1 ต่อการเจริญเติบโตเป็นโคโลนีของเซลล์ T84 ด้วยวิธี colony formation assay พบว่าเมื่อทดสอบด้วยสาร ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน ค่าร้อยละของการเจริญเติบโตเป็นโคโลนีของเซลล์ T84 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทดสอบด้วย DMSO เข้มข้นร้อยละ 0.1 เท่ากับ  $78.41 \pm 7.720$ ,  $59.97 \pm 6.830$ ,  $17.48 \pm 8.740$ ,  $0.00 \pm 0.000$ ,  $0.00 \pm 0.000$  และ  $0.00 \pm 0.000$  ตามลำดับ (Fig. 2A และ 2B) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบหาค่าเชิงปริมาณของเซลล์ที่ย้อมติดสี crystal violet โดยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ  $2.920 \pm 0.4864$ ,  $2.066 \pm 0.4698$ ,  $1.064 \pm 0.3303$ ,  $0.056 \pm 0.0009$ ,  $0.056 \pm 0.0015$  และ  $0.057 \pm 0.0017$  ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทดสอบด้วย DMSO เข้มข้นร้อยละ 0.1 มีค่าเท่ากับ  $3.518 \pm 0.2352$  จะเห็นได้ว่า สาร PK4F1 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ถึง 100 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์ T84 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าสาร PK4F1 สามารถยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์ T84 แบบแปรผันตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น (concentration dependent manner) เป็นการบ่งชี้ว่าสาร PK4F1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์ T84 (Fig. 2)

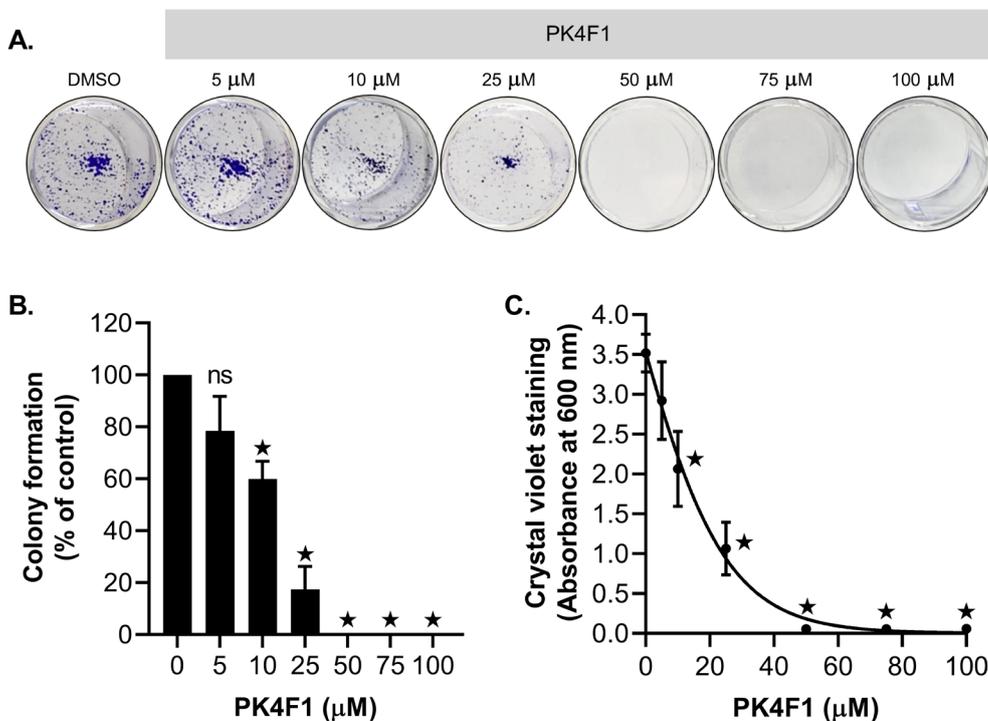
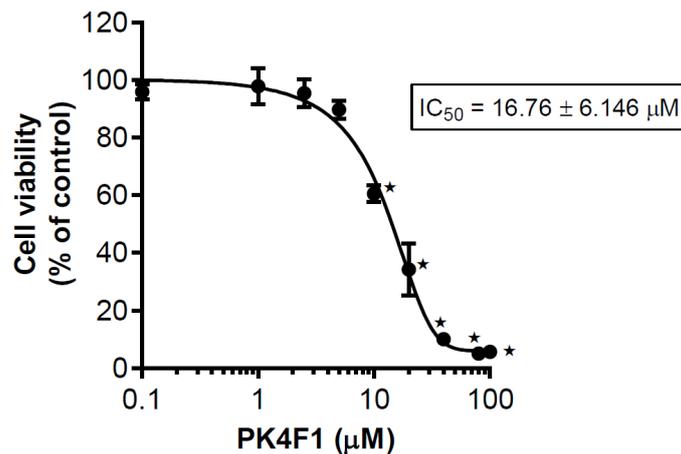


Fig. 2 Cell proliferation of T84 cells was assessed by colony formation assay. Cell proliferation of T84 cells was investigated after treatment with different concentrations (0-100  $\mu$ M) of PK4F1 for 7 days. (A) Colonies were demonstrated by crystal violet staining. (B) The number of T84 colonies and cell viability were significantly decreased by PK4F1 in a dose-dependent manner. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared with DMSO-treated cells.

### 3.3 ฤทธิ์ของสาร PK4F1 ต่อการอยู่รอดของเซลล์ T84

จากการทดสอบฤทธิ์ของสาร PK4F1 ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ T84 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้สารที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ พบการอยู่รอดของเซลล์ที่ร้อยละ  $95.97 \pm 2.718$ ,  $97.85 \pm 6.318$ ,  $95.41 \pm 4.750$ ,  $89.76 \pm 3.125$ ,  $60.53 \pm 2.823$ ,  $34.23 \pm 9.080$ ,  $10.05 \pm 2.337$ ,  $5.02 \pm 0.105$  และ  $5.62 \pm 0.331$  ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO ที่มีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ 100 จาก

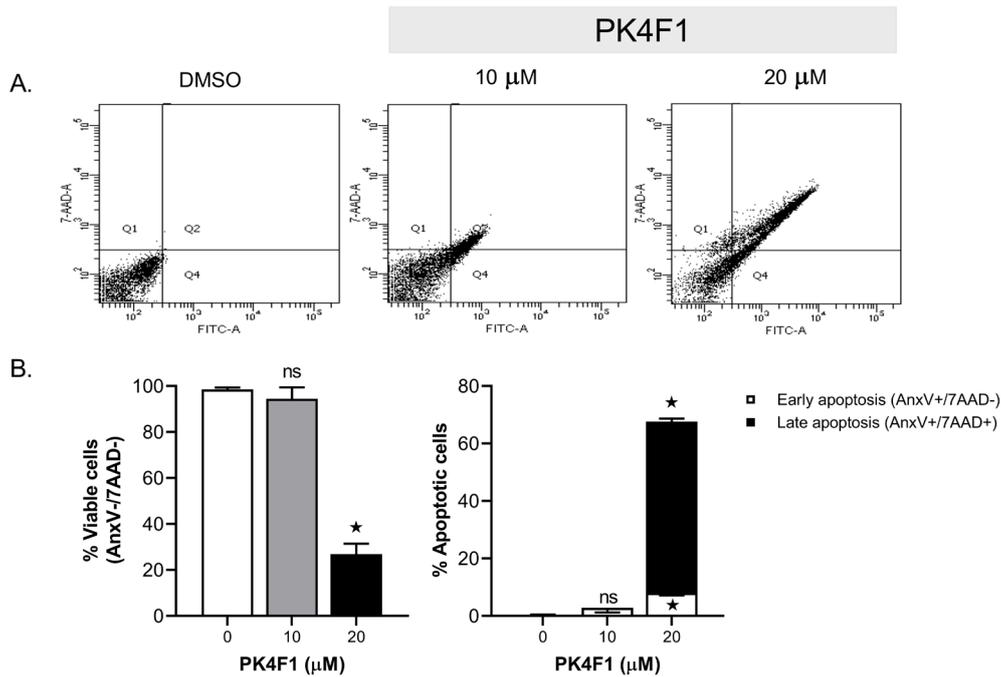
ผลการทดลองพบว่าสาร PK4F1 ที่ความเข้มข้น 0.1 ถึง 5 ไมโครโมลาร์ ไม่มีฤทธิ์ต่อการอยู่รอดของเซลล์ T84 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่สาร PK4F1 ที่ความเข้มข้น 10 ถึง 100 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการอยู่รอดของเซลล์ T84 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO นอกจากนี้จากการทดลองพบว่า PK4F1 มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ T84 แบบแปรผันตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถลดการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง T84 ได้ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) เท่ากับ  $16.76 \pm 6.156$  ไมโครโมลาร์ (Fig. 3)



**Fig. 3** Effect of PK4F1 on cell viability. Cell viability of T84 cells after treatment with PK4F1 was assessed using MTT assay. T84 cells were treated with different concentrations of PK4F1 for 48 hours. Cell viability was demonstrated as a percentage relative to DMSO-treated cells. Data were presented as mean  $\pm$  SEM of 6 independent experiments. \* $p < 0.05$  compared with DMSO-treated cells.

### 3.4 ฤทธิ์ของสาร PK4F1 ในการชักนำให้เซลล์ T84 ตายแบบอะพอพโทซิส

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสาร PK4F1 กับเซลล์ T84 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม Annexin V-FITC ร่วมกับ 7AAD แล้ววิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer เมื่อเซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส Phosphatidylserine ที่อยู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์จะพลิกออกสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งสีย้อม Annexin V-FITC จะสามารถจับ phosphatidylserine บนเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกได้ ผลการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารที่ 20 ไมโครโมลาร์ เซลล์ที่ย้อมติดสี +Annexin V-FITC/-7AAD ซึ่งบ่งบอกถึงเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสในช่วงระยะแรก (early apoptosis) และเซลล์ที่ย้อมติดสี +Annexin V-FITC/+7AAD ซึ่งบ่งบอกถึงการตายของเซลล์ที่เข้าสู่ระยะหลังของอะพอพโทซิส (late apoptosis) ดังแสดงในช่องล่างขวาและช่องบนขวาของ scatter plot ใน Fig. 4A นั้นเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากเมื่อเทียบกับที่ 10 ไมโครโมลาร์ และเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ติดสีย้อม -Annexin V-FITC/-7AAD จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาร PK4F1 ที่ 20 ไมโครโมลาร์ มีผลชักนำให้เซลล์ T84 ตายแบบอะพอพโทซิส โดยมีผลรวมร้อยละของเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสทั้งในช่วงระยะแรก และระยะหลัง (Fig. 4B) เท่ากับ  $68.40 \pm 2.211$  ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



**Fig. 4** Apoptosis analysis of T84 cells using flow cytometry. T84 cells were treated with PK4F1 at 10 and 20  $\mu$ M for 72 h. (A) Representative flow cytometry scatter plots showed increased Annexin V-FITC and 7-AAD staining (Q2 and Q4) with increasing concentrations of PK4F1. (B) percentage of viable cells as indicated by double-negative staining for annexin V-FITC and 7-AAD. Total percentage of cells undergoing apoptosis in early and late apoptosis indicated by +Annexin V-FITC/-7AAD and +Annexin V-FITC/+7AAD. Data were presented as mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \* $p < 0.05$  compared with DMSO-treated cells.

### 3.5 ผลของสาร PK4F1 ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ T84

จากการศึกษาผลของสาร PK4F1 ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ T84 หลังจากถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสด้วยการย้อมด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ DAPI (5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) PI (5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ AnnexinV-FITC (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นตรวจดูรูปร่างของเซลล์และนิวเคลียสที่เปลี่ยนไปด้วยกล้อง fluorescence microscope ผลการทดสอบพบว่า เซลล์ T84 ที่ถูกทดสอบกับสาร PK4F1 ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีขนาดเล็กลง นิวเคลียสย้อมติดสี DAPI เข้มขึ้น แสดงถึงนิวเคลียสที่มีลักษณะแน่นขึ้น (chromatin condensation) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะที่ 20 ไมโครโมลาร์ PK4F1 มีการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะ (hallmark) ของการตายแบบอะพอพโทซิส (Fig. 5) นอกจากนี้ยังพบการติดสีของ Annexin V-FITC บนเยื่อหุ้มเซลล์ T84 เพิ่มมากขึ้น หลังจากถูกทดสอบด้วยสาร PK4F1 ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ถึงการเคลื่อนที่ของ phosphatidylserine จากด้านในออกสู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นอีกหนึ่งลักษณะเฉพาะ ของการตายแบบอะพอพโทซิส (Fig. 5)

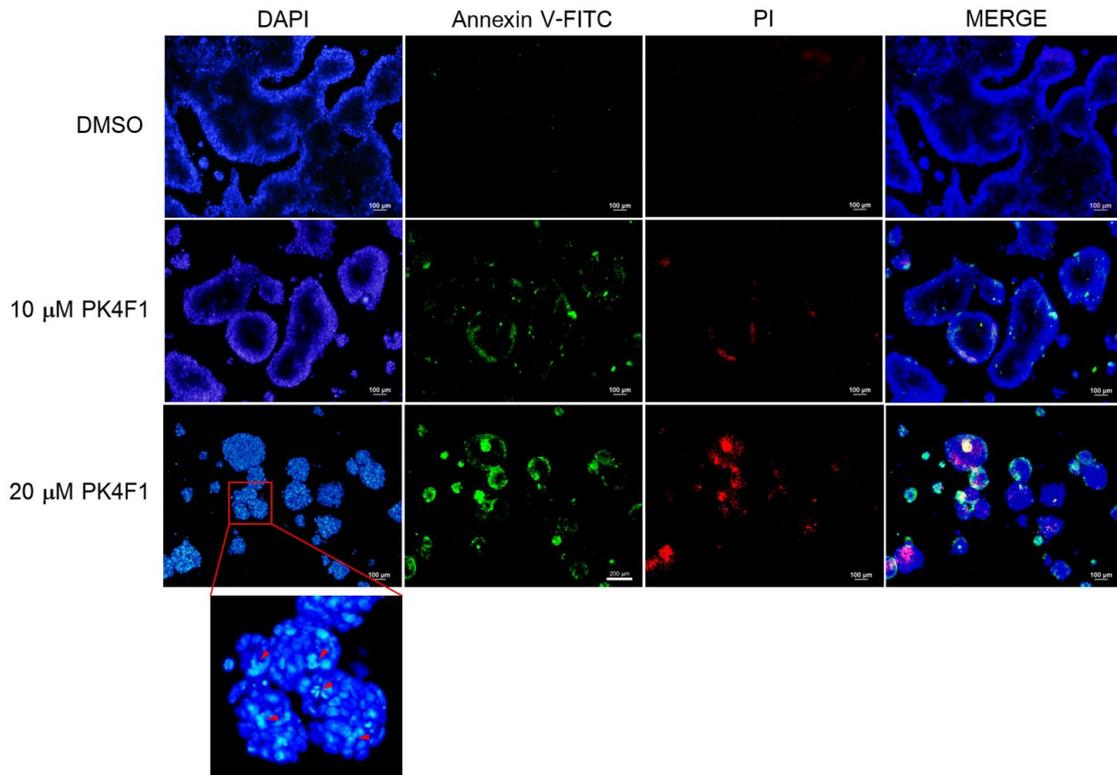


Fig. 5 Fluorescent micrographs of T84 cell apoptosis after 72 h of exposure with PK4F1. T84 cells were stained with DAPI, PI and Annexin V-FITC. Representative photographs of nuclear morphology and phosphatidylserine changes. DNA fragmentation was shown by red head arrows. Phosphatidylserine exposure was indicated by green fluorescence or positive of Annexin V-FITC staining. Dead cells were shown by red fluorescence or positive of PI staining. Images were captured with a fluorescence microscope (Olympus BX51, 100x).

#### 4. วิจารณ์

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักจัดเป็นหนึ่งในโรคมะเร็งที่เป็นปัญหาอันดับต้น ๆ ในระบบสาธารณสุขของไทยรวมถึงหลายประเทศทั่วโลก<sup>(2-4)</sup> ปัจจุบันมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักสามารถรักษาให้หายได้ โดยการรักษาจะเริ่มจากการผ่าตัดเอาลำไส้ส่วนที่เป็นมะเร็งออก และต่อลำไส้ส่วนที่เหลือเข้าด้วยกัน รวมไปถึงการฉายแสง และการให้ยาเคมีบำบัด อย่างไรก็ตามการรักษายังคงใช้เวลา และมีค่าใช้จ่ายในการรักษาที่ค่อนข้างสูง ด้วยเหตุนี้จึงมีความสนใจคิดค้นหาแนวทางการรักษาด้วยวิธีอื่น ๆ เพื่อช่วยให้ผู้ป่วยสามารถเข้าถึงการรักษาได้ง่ายขึ้น การรักษาด้วยสารสกัดจากสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากหาได้ง่ายตามธรรมชาติ และราคาไม่แพง ซึ่งเป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรที่ได้รับความสนใจ และที่ผ่านมามีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดและสารออกฤทธิ์จากขิง เช่น การศึกษาผลของสาร [6]-shogaol ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์หลักที่พบในขิงต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด<sup>(6-8)</sup> โดยสาร [6]-shogaol สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้โดยการชักนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอโทซิส อย่างไรก็ตามสาร [6]-shogaol ยังมีข้อจำกัดจากลักษณะโครงสร้างทางเคมี ที่ส่งผลให้สารมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ และมีชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) ที่ไม่ค่อยดี การดัดแปลงโครงสร้างของสาร [6]-shogaol จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ให้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเพื่อรักษาโรคมะเร็งต่อไป งานวิจัยนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารอนุพันธ์ของ [6]-shogaol ต่อการอยู่รอดและการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก T84 (lung metastasis-derived colon carcinoma)

จากการทดสอบผลของสาร [6]-shogaol และสารอนุพันธ์ของ [6]-shogaol ได้แก่ PK4F1, PK2ME และ PK4NO2 ด้วยการบ่มเซลล์ T84 กับสารทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบลักษณะของเซลล์ T84 ด้วยกล้อง light microscope ในวันที่ 1 และ 3 หลังจากบ่ม โดยในวันที่ 1 พบว่า เซลล์ T84 ที่ถูกบ่มเพาะด้วยสาร PK4F1, PK2ME และ PK4NO2 มีลักษณะเติบโตเป็นโคโลนี แต่โคโลนีมีขนาดเล็ก ขอบเซลล์ขรุขระมากขึ้น และพบเซลล์หดกลม หลุดลอยออกจากพื้นผิวมากขึ้นเมื่อบ่มเซลล์กับสารอนุพันธ์ทั้ง 3 ชนิด นานขึ้นเป็นเวลา 3 วัน นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นว่า จำนวนและขนาดของโคโลนีที่รอดชีวิตหลังถูกทดสอบด้วยสาร PK4F1 มีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกบ่มด้วยสาร PK2ME และ PK4NO2 อีกทั้งผลการบ่มเซลล์ T84 กับสาร PK4F1 ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ T84 ได้ดีที่สุด และออกฤทธิ์ใกล้เคียงกับสาร [6]-shogaol มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารอนุพันธ์ PK2ME และ PK4NO2 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า การเติมหมู่ fluorine ทำให้การออกฤทธิ์ของสารดีขึ้น<sup>(10, 11)</sup> ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าหมู่ fluorine บนโครงสร้างของสารช่วยเพิ่มคุณสมบัติการละลายในไขมัน (lipophilicity) ช่วยให้สารสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ได้ดีขึ้น และหมู่ fluorine ยังเพิ่มความมีขั้วของสาร (polarity) ทำให้สารมีความสามารถในการจับกับเอนไซม์หรือโปรตีนเป้าหมายได้ดียิ่งขึ้น และเป็นที่น่าสนใจว่าการเติมหมู่ fluorine เพิ่มความสามารถในการดึงอิเล็กตรอน (electronegativity)<sup>(12,13)</sup> ทำให้สารมีความคงตัวสูงขึ้น สารทนต่อการสลายตัวได้ดี มีผลต่อ metabolic stability ของสาร ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการดูดซึมยา (bioavailability) เข้าสู่กระแสเลือด<sup>(14)</sup> นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารที่มีการเติมหมู่ fluorine จะมีคุณสมบัติความคงตัวสูง และมีความสามารถในการดูดซึมยาดีกว่าสารที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนต่ำ เช่น สารที่มีการเติมหมู่ methyl หรือ nitro<sup>(15)</sup> หมู่ fluorine ในโครงสร้างของสาร หรือยาบางชนิดมีคุณสมบัติดีขึ้น เช่น ยารักษามะเร็ง Belzutifan และ Sotorasib<sup>(12, 16)</sup> อีกทั้งมีการศึกษามากมายที่รายงานฤทธิ์ของสาร [6]-shogaol ว่าสามารถยับยั้ง และลดจำนวนเซลล์มะเร็งหลายชนิดผ่านการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส<sup>(6-8, 17, 18)</sup> ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาการออกฤทธิ์ของสาร PK4F1 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต และการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ T84 ต่อไป

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบว่าสาร PK4F1 ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต จึงได้ตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ของสาร PK4F1 ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี colony formation assay พบว่า การเจริญเติบโตเป็นกลุ่มก้อนโคโลนีของเซลล์ T84 ลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร PK4F1 บ่งชี้ว่าสาร PK4F1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ T84 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดสอบต่อโดยการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ของสาร 4F-phenyl pyrazole ด้วยวิธี MTT assay เพื่อหาร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ T84 หลังจากบ่มกับสาร PK4F1 ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งพบว่า สาร PK4F1 มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ T84 และพบว่าความเข้มข้นของสารที่ลดการอยู่รอด หรือฆ่าเซลล์มะเร็ง T84 ได้ครั้งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หรือ ค่า IC<sub>50</sub> (50% inhibition concentration) เท่ากับ 16.76 ± 6.156 ไมโครโมลาร์ จึงได้เลือกใช้ความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่า IC<sub>50</sub> คือ 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ ในการทดสอบต่อไป

แม้ว่าจะตรวจพบลักษณะของเซลล์ T84 ที่หดตัว และมีขนาดเล็ก และยื่นยื่นฤทธิ์ของสาร PK4F1 ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ T84 ได้ด้วยวิธี colony formation assay และ MTT assay แล้ว ก็ยังไม่สามารถยืนยันกระบวนการหรือกลไกที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของสาร PK4F1 ในการยับยั้งการเจริญเติบโต หรือฆ่าเซลล์มะเร็ง T84 ได้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับผลของสาร PK4F1 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ชนิด T84, HT29 และ CaCO2 ซึ่งพบว่าสาร PK4F1 ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด และเหนี่ยวนำให้เซลล์ HT29 ตายแบบอะพอพโทซิสอีกด้วย แต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของสาร PK4F1 กับเซลล์ T84 ว่ายับยั้งการเจริญของเซลล์ T84 ผ่านกระบวนการใด<sup>(19)</sup> ผู้วิจัยจึงได้ทดสอบฤทธิ์ของสาร PK4F1 ต่อการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส โดยการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ Annexin V-FITC และ 7-AAD แล้ววัดผลของสาร PK4F1 ต่อการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสด้วยเครื่อง flow cytometer ผลการทดสอบพบว่าสาร PK4F1 เหนี่ยวนำให้เซลล์ T84 ตายแบบอะพอพโทซิส โดยพบร้อยละของการตายส่วนใหญ่แบบ late apoptosis มีค่าเท่ากับ 59.57 ± 1.056 สอดคล้องกับผลการย้อมเซลล์ T84 ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ DAPI, PI และ Annexin V-FITC ซึ่งผลการทดสอบพบว่า เมื่อบ่มเซลล์ T84 กับ PK4F1 ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ นอกจากเซลล์ T84 จะหดตัว (cell shrinkage) แล้ว โครมาตินยังมีการหดเกาะกลุ่มกันแน่น (chromatin condensation) และมีการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) พร้อมทั้งพบเซลล์ย้อมติดสี Annexin V-FITC ที่บ่งชี้ phosphatidylserine exposure ที่ชัดเจนมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า สาร PK4F1 ออกฤทธิ์ฆ่า

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ผ่านการแสดงออกของโปรตีน ANO6 ที่มากขึ้น<sup>(19)</sup> ซึ่งมีรายงานว่า ANO6 เป็นโปรตีนสำคัญที่กระตุ้น phosphatidylserine ให้เคลื่อนย้ายไปอยู่ด้านนอกของผนังเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการหดตัว จนเกิดการสร้าง apoptotic bodies หลุดออกจากตัวเซลล์ และส่งผลให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส<sup>(20, 21)</sup> ทั้งหมดนี้จัดว่าเป็นเหตุการณ์ที่สำคัญหรือ hallmarks ของกระบวนการอะพอพโทซิส ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าสาร PK4F1 ฆ่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ชนิด T84 ให้ตายแบบอะพอพโทซิส ผ่านการแสดงออกของโปรตีน ANO6 เช่นเดียวกัน

ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าสาร PK4F1 ชักนำให้เซลล์ T84 ตายแบบอะพอพโทซิส อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันผลการทดสอบที่ได้ และศึกษาฤทธิ์ของสาร PK4F1 ในการชักนำให้เซลล์ T84 ตายแบบอะพอพโทซิส เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นยารักษาเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักได้ในอนาคต ควรทำการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ศึกษาการแสดงออกของระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิส ตลอดจนศึกษาการแสดงออกของระดับโปรตีน หรือทำการทดสอบอื่นเพิ่มเติม

## 5. สรุป

จากการศึกษานี้สามารถกล่าวได้ว่า สาร PK4F1 หรือ 4F-phenyl pyrazole ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ [6]-shogaol มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด T84 ผ่านการชักนำการตายแบบอะพอพโทซิส ผลการทดลองในครั้งนี้สามารถนำไปสู่การประยุกต์และพัฒนาสารสกัดจากขิงเพื่อใช้ต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยา หรืออาหารเสริมสำหรับผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักต่อไป

## 6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือ จนทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินการจัดทำโครงการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

1. Benson AB, Venook AP, Adam M, *et al.* Colon cancer, Version 3.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. JNatl Compr Cancer Netw 2024; 22(2D): e240029.
2. Sung H, Siegel RL, Laversanne M, *et al.* Colorectal cancer incidence trends in younger versus older adults: an analysis of population-based cancer registry data. Lancet Oncol 2025; 26: 51-63.
3. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, *et al.* Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. Cancers (Basel) 2022; 14: 1732.
4. Eng C, Yoshino T, Ruiz-García E, *et al.* Colorectal cancer. Lancet 2024; 404: 294-310.
5. Chakraborty D, Bishayee K, Ghosh S, Biswas R, Kumar Mandal S, Rahman Khuda-Bukhsh A. [6]-Gingerol induces caspase 3 dependent apoptosis and autophagy in cancer cells: Drug-DNA interaction and expression of certain signal genes in HeLa cells. Eur J Pharmacol 2012; 694: 20-9.
6. Lee SH, Cekanova M, Baek SJ. Multiple mechanisms are involved in 6-gingerol-induced cell growth arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells. Mol Carcinog 2008; 47: 197-208.
7. Radhakrishnan EK, Bava SV, Narayanan SS, *et al.* [6]-Gingerol induces caspase-dependent apoptosis and prevents PMA-induced proliferation in colon cancer cells by inhibiting MAPK/AP-1 Signaling. PLoS One 2014; 9: e104401.
8. Liu C-M, An L, Wu Z, *et al.* 6-Gingerol suppresses cell viability, migration and invasion via inhibiting EMT, and inducing autophagy and ferroptosis in LPS-stimulated and LPS-unstimulated prostate cancer cells. Oncol Lett 2022; 23: 187.



9. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
10. Shah P, Westwell AD. The role of fluorine in medicinal chemistry. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2007; 22: 527-40.
11. Huo T, Zhao X, Cheng Z, *et al.* Late-stage modification of bioactive compounds: Improving druggability through efficient molecular editing. *Acta Pharm Sin B* 2024; 14: 1030-76.
12. Henary E, Casa S, Dost TL, Sloop JC, Henary M. The role of small molecules containing fluorine atoms in medicine and imaging applications. *Pharmaceuticals* 2024; 17: 281.
13. Shah P, Westwell AD. The role of fluorine in medicinal chemistry. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2007; 22: 527-40.
14. Zhang H, Wang Q, Sun C, *et al.* Enhanced oral bioavailability, anti-tumor activity and hepatoprotective effect of 6-shogaol loaded in a type of novel micelles of polyethylene glycol and linoleic acid conjugate. *Pharmaceutics* 2019; 11.
15. Liew SK, Malagobadan S, Arshad NM, Nagoor NH. A review of the structure-activity relationship of natural and synthetic antimetastatic compounds. *Biomolecules* 2020; 10.
16. Kalariya R, Ojha D, Rana S, Rode A, Bhosale R, Yadav JS. Novel fluorinated amino acid derivatives as potent antitumor agents against MCF-7 and HepG2 cells: Synthesis, characterization, *in vitro* assays and molecular docking studies. *Results Chem* 2023; 5: 100954.
17. Phaosiri C, Yenjai C, Senawong T, *et al.* Histone deacetylase inhibitory activity and antiproliferative potential of new [6]-shogaol derivatives. *Molecules* 2022; 27.
18. Jia Y, Li X, Meng X, Lei J, Xia Y, Yu L. Anticancer perspective of 6-shogaol: anticancer properties, mechanism of action, synergism and delivery system. *Chin Med* 2023; 18: 138.
19. Sirianant L, Wanitchakool P, Kumboonma P, Srisarakorn N, Hempoom P, Muanprasart C. Effects of 4f-phenyl pyrazole, a [6]-shogaol derivative, on colorectal adenocarcinoma cell death. *Sci. Asia* 2025; 51: 1-10.
20. Kunzelmann K, Nilius B, Owsianik G, *et al.* Molecular functions of anoctamin 6 (TMEM16F): a chloride channel, cation channel, or phospholipid scramblase? *Pflugers Arch* 2014; 466: 407-14.
21. Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 2010; 468: 834-8.