



ฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29 Cells) ของสาร Candidone Candidone Inhibits Proliferation of Colorectal Adenocarcinoma Cells (HT29 Cells)

กัลยา แสงฉวี¹

จันทนา บุญยรัตน์², ฉวี เย็นใจ³

มงคลพันธ์ ต้นติวชกรกุลธร⁴, พรทิพย์ ไวกุณิ⁵

บทคัดย่อ

อัตราการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ Colorectal adenocarcinoma ยังคงสูงอยู่ในหลายประเทศ โดยเฉพาะในประเทศไทย ซึ่งการรักษาที่มีความหลากหลายรวมถึงการใช้ยาหลายชนิดในการรักษา มะเร็ง อย่างไรก็ตามยังมีปัญหาเรื่องผลข้างเคียงของยาและการดื้อยาของเซลล์มะเร็งในระหว่างการรักษาซึ่งยังเป็นปัญหาในการรักษามะเร็งปัจจุบันการแพทย์ทางเลือกถูกนำมาใช้และเป็นที่ยอมรับกันแพร่หลายซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็งนอกจากนี้ หยีน้ำ *Derris indica* (Lamk) Bennet ยังเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่พบได้ในทางภาคใต้ และถูกนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณสำหรับรักษาเนื้องอกในช่องท้อง และ โรคต่าง ๆ วัตถุประสงค์: 1) เพื่อศึกษาผลของ สารสำคัญจากหยีน้ำต่อการเพิ่มจำนวน ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) สาร Candidone ซึ่งเป็นสารสำคัญจาก *Derris indica* (Lamk) Bennet หรือหยีน้ำต่อกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5- diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) assay จากนั้น ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ผ่าน phase contrast microscope ผลการทดลองพบว่าสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 100 μM ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT29 จากการสังเกต การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งพบว่าเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสาร Candidone มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่ เซลล์เกิด detachment เกิดเซลล์ shrinkage และเซลล์เกิดการตายในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสาร Candidone มีฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

คำสำคัญ: Candidone, มะเร็งลำไส้ใหญ่, การเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง

Abstract

The incidence rate of colorectal adenocarcinoma remains high in numerous countries, especially in Thailand. Many drugs have been used for treatment of cancer. However, side effects from the drugs usage and the resistance of cancer cells during the treatment remain as problems in cancer treatment. Currently, traditional medicine has been widely used as one of the alternatives treatment to cancer therapy. *Derris indica* (Lamk) Bennet is a Thai traditional herb that is widely found in the southern part of Thailand. The herb is usually used as a traditional medicine for treatment of abdominal tumors and other diseases. This study aimed to investigate the effect of candidone, an constituent of *Derris indica* on the proliferation of colorectal adenocarcinoma (HT29). The cell proliferation was determined by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) assay. The cell morphology was observed by phase contrast microscope. This study suggested that candidone was a potential inhibited cell proliferation against HT29 cells at the inhibitory concentration of 100 μM at 24 hrs. The cell morphological changed after the treatment with candidone showed apoptosis changed including detachment, cell shrinkage, and cell death. This study indicated that candidone has inhibitory activity on HT29 cancer cell proliferation.

Keywords: Candidone, HT29, cancer proliferation

^{1,4}คณะเภสัชศาสตร์ สาขาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

²คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ,

⁵คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทนำ

ในปัจจุบันมะเร็งเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์และการเสียชีวิตสูงเป็นอันดับต้นๆของโลก จากการรายงานขององค์การอนามัยโลก พบว่าในปี พ.ศ. 2548 มีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งปีละ 8 ล้านคน และได้มีการคาดการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2583 จะมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งมากกว่า 11 ล้านคน (วีรุฒิ อิมสำราญ, อาคม ชัยวีระวัฒน์ และคณะ 2557) ซึ่งในประเทศไทยนับเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญอย่างยิ่งของคนไทยจากสถิติโรคมะเร็งซึ่งรวบรวมโดยหน่วยทะเบียนมะเร็งต่าง ๆ พบว่าสถิติในภาพรวมของประเทศยังมีอุบัติการณ์ที่สูงดังรายงานในหนังสืออุบัติการณ์โรคมะเร็งในประเทศไทยทั้ง 4 ฉบับ (Vatanasapt, Martin et al. 1993, Deerasamee, Martin et al. 1999, Martin and Pongnikorn 2003 and Khuhaprema, Srivatanakul et al. 2007) กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขได้รายงานสถิติแนวโน้มอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งตั้งแต่ปีงบประมาณ 2548 - 2554 ว่ามีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในแต่ละปี เมื่อจำแนกโรคมะเร็งออกเป็นกลุ่มโรคพบว่า กลุ่มโรคที่มีแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้นเช่น โรคมะเร็งปากมดลูก มะเร็งปอด มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ เป็นต้น

มะเร็ง คือกลุ่มโรคที่เกิดเนื่องจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติที่ DNA หรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ ได้แก่ การที่เซลล์แบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว และมากกว่าปกติ ดังนั้นจึงอาจทำให้เกิดก้อนเนื้อผิดปกติ ถ้าก้อนเนื้อที่ผิดปกตินี้เกิดอยู่ในอวัยวะใดจะเรียกชื่อมะเร็งตามอวัยวะนั้น เช่น มะเร็งปอด มะเร็งสมอง มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งปากมดลูก มะเร็งตับ มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น

มะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นหนึ่งในกลุ่มโรคมะเร็งที่มีอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้น โดยเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุลำไส้ที่บริเวณส่วนปลาย ซึ่งจากสถิติของการเกิดโรคพบว่ามะเร็งชนิดนี้ เป็นสาเหตุการตายในลำดับต้นๆทั้งในเพศชายและเพศหญิง

แนวทางการรักษามะเร็งในประเทศไทยรักษาแบบวิธีผสมผสาน ได้แก่การผ่าตัด (ผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออก รวมทั้งต่อมน้ำเหลืองบริเวณข้างเคียง) การรักษาด้วยรังสี การรักษาโดยใช้ฮอร์โมน เนื่องจากมะเร็งบางชนิดมีความไวต่อการรักษาด้วยฮอร์โมน และการรักษาโดยการเพิ่มภูมิคุ้มกันให้ร่างกายเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งให้หมดจากร่างกาย การรักษาด้วยเคมีบำบัดเป็นวิธีการรักษาอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญในทางคลินิก แต่ข้อเสียที่พบได้บ่อยคือยาเคมีบำบัดมีผลข้างเคียงและอาการไม่พึงประสงค์ต่อเซลล์ปกติที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งโดยเฉพาะเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่าง

รวดเร็ว เช่น เยื่อบุทางเดินอาหาร เส้นผม เม็ดเลือด ในปัจจุบันจึงมีการวิจัยที่มุ่งเน้นที่จะพัฒนาเคมีบำบัดที่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติให้ลดน้อยลงโรคมะเร็งนั้นเป็นโรคที่เกิดจากเซลล์ที่ปกติเกิดการกลายพันธุ์ในระดับยีน และพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง โดยเซลล์มะเร็งนั้นจะมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ เซลล์มีการแบ่งตัวโดยไม่สามารถควบคุมได้ บุกรุกไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงที่อยู่รอบข้าง และแพร่กระจายไปทั่วร่างกายได้จากคุณสมบัติต่าง ๆ นี้ผู้วิจัยได้นำมาเป็นเป้าหมายในการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการศึกษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และโรคมะเร็งตับซึ่งในปัจจุบันยาเคมีบำบัดที่ใช้ส่วนใหญ่มีกลไกยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ในขั้นตอนต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตามยาเคมีบำบัดเหล่านี้ยังไม่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งให้หมดไปได้ทั้งยังก่อให้เกิดผลข้างเคียงมาก ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นในการค้นหาสารใหม่จากแหล่งต่าง ๆ เช่นจากพืช เป็นต้น

Derris indica (Lamk) Bennet หรือ หยีน้ำ เป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น flavone, flavanone, chalcone และ rotenoid compounds สารประกอบเหล่านี้มีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และยังพบว่าสารสำคัญจากเมล็ดของ *D. indica* มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Sribuham, Saraphon et al. 2016) การศึกษาก่อนหน้านี้ยังพบว่าสารสำคัญจากหยีน้ำมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมน้ำดี และเซลล์มะเร็งตับ อย่างไรก็ตามยังไม่ได้ศึกษารายละเอียดถึงระดับโมเลกุล (Decharchochart, Suthiwong et al. 2014) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำสารสำคัญจากหยีน้ำ คือ สาร Candidone มาทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต การเคลื่อนที่และการบุกรุกของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29)

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสำคัญจากหยีน้ำต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29)
2. เพื่อศึกษาผลของสารสำคัญจากหยีน้ำต่อรูปร่าง ลักษณะของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) ด้วยวิธี Phase contrast microscopy

แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

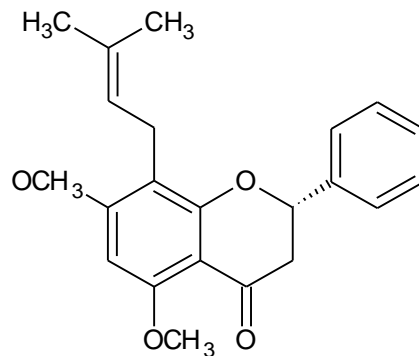
เนื่องจากการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันนั้นก่อให้เกิดผลข้างเคียงค่อนข้างสูงจึงได้มีผู้ทำการศึกษาค้นคว้าของสารสกัดจากธรรมชาติ ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ การบุกรุก การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

หยีน้ำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Derris indica* (Lamk) Bennet เป็นพืชในสกุล *Derris* อยู่วงศ์ Fabaceae

จัดเป็นพืชตระกูลถั่ว มีชื่ออื่นคือ กายี ราโยด (ใต้) ปากี (มลายู - สงขลา) ปารี (มลายู - นราธิวาส) หยีนน้ำมีการกระจายพันธุ์ตามฝั่งแม่น้ำใกล้ทะเล และในป่าชายหาดทางภาคใต้ ในต่างประเทศพบที่อินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มาเลเซีย และอินโดนีเซีย ในประเทศไทย ต้นหยีนน้ำ หรือหยีนทะเล พบได้ตามป่าชายเลนทั้งภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงใต้ Sriburom และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษากฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase และ cytotoxicity ของ flavonoids และ chalcones จาก *Derris indica* เมื่อทำการศึกษา cytotoxicity ต่อเซลล์ epidermoid carcinoma (KB) พบว่า *Derris indica* แสดงฤทธิ์ cytotoxicity ต่อเซลล์ KB โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50 % (IC₅₀) ตั้งแต่ 8–18 µg/ml ในเซลล์ KB Decharchochart และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสำคัญจากผลของ *Derris indica* ต่อมะเร็งท่อน้ำดีและมะเร็งตับ เมื่อ

ทำการศึกษา cytotoxicity ต่อเซลล์ cholangiocarcinoma cell line (M156) และ human hepatoma HepG2 cells พบว่า *Derris indica* แสดงฤทธิ์ cytotoxicity ต่อเซลล์ cholangiocarcinoma cell line (M156) และ human hepatoma HepG2 cells โดยมีสารประกอบ 14 ชนิด ที่ได้จากผลของพืชชนิดนี้ Chalcones 2-4 นั้นแสดงฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (M156) และเซลล์ตับ HepG2

สารสำคัญที่ใช้ในการศึกษาเป็นสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากผลของต้นหยีนน้ำ คือ Candidone (รูปที่ 1) ในการอธิบาย (Decharchochart, Suthiwong et al. 2014) นอกจากนี้สาร Candidone ยังพบในพืช *Tephrosia aequilata* เป็นพืชตระกูลถั่ว อยู่ในวงศ์ Fabaceae (Kuethe, Sandjo et al. 2013) และพบในพืช *Echinops giganteus* (Samuel, Mahesh et al. 2019)



รูปที่ 1 สาร candidone

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ Candidone

Bioassay	Activity	Reference
In vitro antibacterial activity of nineteen selected natural products against multi-drug resistant Gram-negative phenotypes	- Candidone มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดี	Armelle et al., 2015

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ Candidone (ต่อ)

Bioassay	Activity	Reference
In vitro antitumor effects of candidone extracted from <i>Derris indica</i> (Lamk) Bennet in cholangiocarcinoma cells	-Candidone มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (human cholangiocarcinoma (CCA) cells.)	Kurasug, Kukongviriyapan et al. 2018

วิธีดำเนินการ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) จะเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่มีองค์ประกอบของ 10% fetal bovine serum โดยมีการ subculture cell ภายหลังจากการเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ประมาณ 3 – 4 วัน ซึ่งจะมีการถ่ายเซลล์โดยใช้เทคนิค trypsinization

2. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร Candidone จากหยีน้ำที่มีผลกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

เริ่มจากบ่มเซลล์ด้วย Candidone เพื่อทดสอบฤทธิ์โดยเริ่มจากนำเซลล์ออกจากขวดเลี้ยงเซลล์โดย

$$\% \text{cell viability} = \frac{\text{Absorbance of test well}}{\text{Control well}} \times 100$$

สังเกต cell morphology

3. การศึกษาฤทธิ์ของสาร candidone ต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

ใช้ HT29 ในการศึกษา โดยทดสอบดังต่อไปนี้เติมเซลล์ลงใน 96 - well plate ความเข้มข้น 1×10^5 cell ต่อ 1 well โดยแต่ละหลุมมีปริมาตรหลุมละ 100 μ l ใส่สาร Candidone ที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ตามกลุ่มที่แบ่งไว้ แล้วนำไปบ่มต่อในตู้บ่มเพาะเซลล์ตามสภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำเซลล์ไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและลักษณะสัณฐานภายหลังจากการทดสอบฤทธิ์ด้วยสารโดยใช้ Phase contrast microscopy

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

โดยใช้สถิติ independent t – test สำหรับการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน โดยใช้ software IBM SPSS statistics 24 ในการวิเคราะห์ข้อมูล

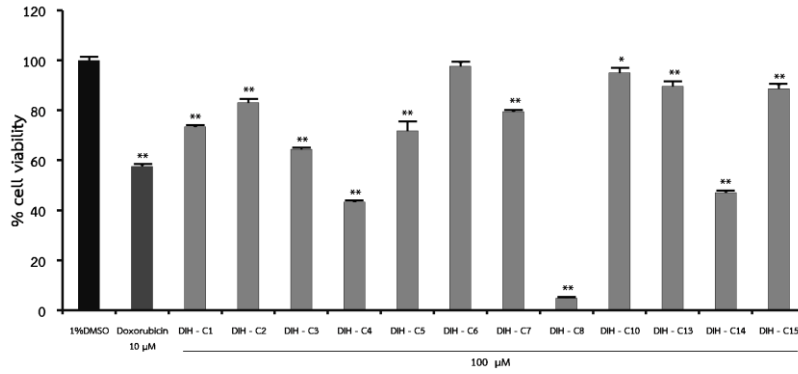
ผลการศึกษา

1. การค้นหาสารสำคัญจากหยีน้ำที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์มะเร็งตับ

การเลือกสารสำคัญจากหยีน้ำที่ได้จากส่วนสกัดหยีบเฮกเซนของผลหยีน้ำที่ให้ฤทธิ์ที่ตีที่สุดในการเหนี่ยวนำ

ใช้เทคนิค trypsinization และนับจำนวนเซลล์เพื่อนำไปเลี้ยงใน 96 – well plate ทดสอบโดยใช้ สารสำคัญ Candidone ความเข้มข้น 1,10,20,30,40,50,60,70,80,90 และ 100 μ M จาก stock solution ของสารที่มีความเข้มข้น 10mM นำมาทดสอบฤทธิ์ cytotoxicity เบื้องต้นกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) และสารมาตรฐาน doxorubicin ที่ความเข้มข้น 10 μ M ที่เตรียมจาก stock solution 10 mg/ml และ dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% v/v ที่เตรียมได้จาก stock solution 100% v/v จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (Microplate reader) คำนวณ %cell viability

ให้เซลล์เกิดการตาย (cytotoxicity effect) ของเซลล์มะเร็งในการทดลองนี้ได้นำสารสำคัญจากหยีน้ำ 12 ชนิด ได้แก่ DIH-C1, DIH-C2, DIH-C3, DIH-C4, DIH-C5, DIH-C6, DIH-C7, DIH – C8, DIH-C10, DIH-C13, DIH-C14 และ DIH-C15 ที่ความเข้มข้น 100 μ M นำมาทดสอบในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดการรอดชีวิตของเซลล์ ด้วยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol – 2 - yl)-2 ,5 - diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) assay ซึ่งในการทดลองใช้ Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 10 μ g/ml เป็นสารมาตรฐานผลการศึกษาพบว่าสาร DIH-C1,DIH-C2, DIH-C3, DIH-C4, DIH-C5, DIH-C7, DIH – C8,DIH - C10, DIH-C13,DIH-C14, DIH-C15 และ Doxorubicin มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 4.1 พบว่าสาร DIH – C8 ที่มีชื่อว่า Candidone มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ที่ดี เมื่อเปรียบเทียบกับสารสำคัญตัวอื่นที่ทดสอบทั้งหมด 12 ชนิดและสารมาตรฐาน Doxorubicin ดังนั้นจึงเลือกสาร Candidone ไปศึกษาในขั้นต่อไป ได้แก่ ศึกษาความเป็นพิษของสาร Candidone ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่โดยการเหนี่ยวนำด้วยสาร Candidone (รูปที่ 2)



ภาพที่ 2 กราฟแสดงผลของการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เมื่อเหนี่ยวนำ

ด้วยสารสำคัญจากหยีน้ำ 12 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100 µM และสารมาตรฐาน

Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 10 µM แสดงข้อมูลด้วยค่า mean ± SD (n=3),

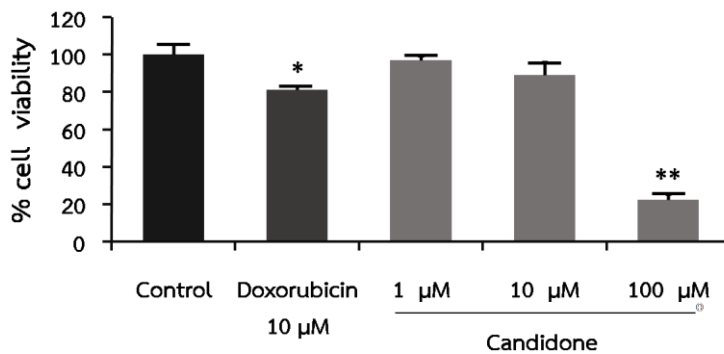
หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ p<0.05,

** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ p<0.01

2. การศึกษาความเป็นพิษของสารสำคัญจากหยีน้ำ Candidone ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสำคัญจากหยีน้ำทั้ง 12 ชนิด ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่าสาร DIH - C8 หรือ Candidone ที่ความเข้มข้น 100 µM มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มากที่สุด ดังนั้นจึงได้เลือกสาร Candidone มาทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งลำไส้

ใหญ่ ซึ่งทำการทดสอบสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 µM และสารมาตรฐาน Doxorubicin 10 µM นำมาทดสอบในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดการรอดชีวิตของเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay ผลการศึกษาพบว่าสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µM ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เนื่องจากร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม และ Candidone ที่ความเข้มข้น 100 µM มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p< 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม และ Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 10 µM มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p< 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 4.3 สำหรับการศึกษาในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (รูปที่ 3)



ภาพที่ 3 กราฟแสดงผลของการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เมื่อเหนี่ยวนำ

ด้วยสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 µM และสารมาตรฐาน

Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 10 µM แสดงข้อมูลด้วยค่า mean ± SD (n=3),

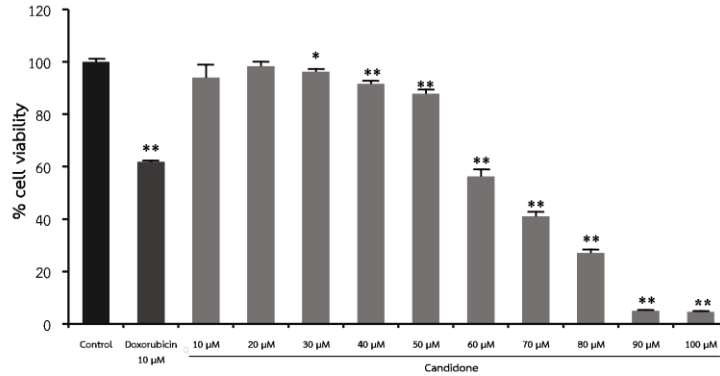
หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ p< 0.05

** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ p<0.01

นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสาร Candidone ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 µM ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ผลการศึกษาพบว่า Candidone ที่ความเข้มข้น 30

μM มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม และ Candidone ความเข้มข้นตั้งแต่ 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μM และ Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 10 μM มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ อย่างมีนัยสำคัญทาง

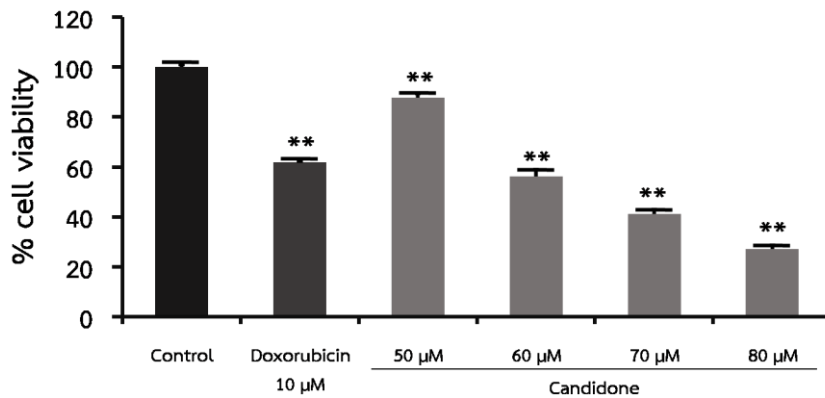
สถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (รูปที่ 4) ซึ่งสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 66.63 μM สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ร้อยละ 50 (รูปที่ 5)



ภาพที่ 4 กราฟแสดงผลของการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เมื่อเห็นยวนำ

ด้วยสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μM และสารมาตรฐาน Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 10 μM แสดงข้อมูล ด้วยค่า mean ± SD (n=3),

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$
** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.01$



ภาพที่ 5 กราฟแสดงผลร้อยละ 50 ของการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29)

เมื่อเห็นยวนำด้วยสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 50, 60, 70, 80 μM และสารมาตรฐาน Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 10 μM แสดงข้อมูลด้วยค่า mean ± SD (n=3),

หมายเหตุ: ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.01$

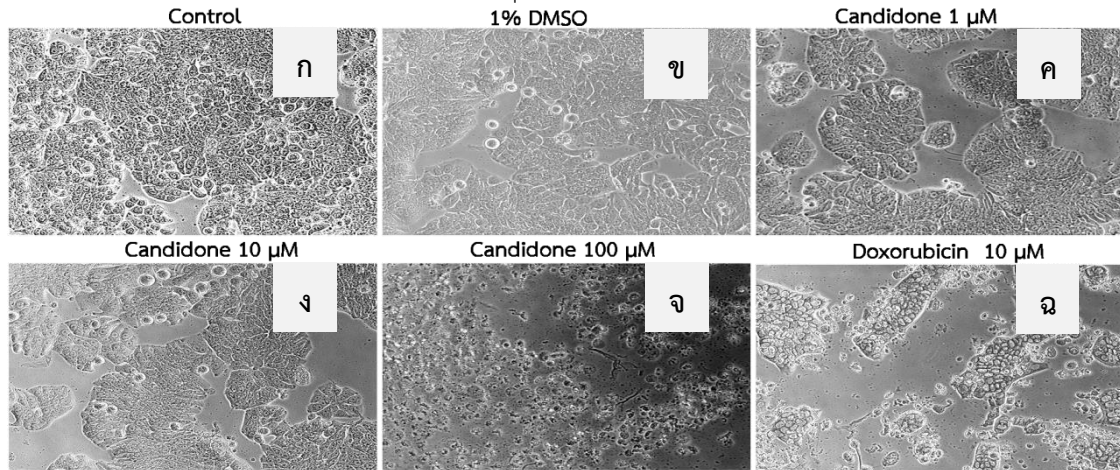
3. การศึกษาฤทธิ์ของสาร Candidone ต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

(Study of cell morphology change by phase contrast microscope)

จากการศึกษาความเป็นพิษของสาร Candidone ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งได้ทำการเห็นยวนำสารสำคัญจากหยีน้ำสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 μM และสารมาตรฐาน Doxorubicin 10 μM ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสังเกตเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase contrast microscope พบว่า เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 100 μM และสารมาตรฐาน Doxorubicin 10 μM มีลักษณะแตกต่างจากเซลล์กลุ่ม

ควบคุมอย่างเห็นได้ชัด คือพบการตายของเซลล์ ซึ่งเซลล์มีลักษณะหดตัวเล็กลง เกิดการฟุ้งตายมีจุดกลมเล็กๆกระจายอยู่รอบเซลล์จำนวนมากและเซลล์มีลักษณะขอบไม่เรียบ (รูปที่ 6)



ภาพที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT-29 เมื่อสังเกตผ่านกล้อง

จุลทรรศน์ชนิด Phase contrast microscope ที่ทดสอบฤทธิ์ด้วยสารสำคัญจาก

หยีน้ำสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 μM : (ก) Control, (ข) 1 % DMSO, (ค) Candidone 1 μM , (ง) Candidone 10 μM , (จ) Candidone 100 μM และ (ฉ) สารมาตรฐาน Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 10 μM

การอภิปรายผล

ในขั้นแรกศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสำคัญจากหยีน้ำในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยสารสำคัญ 12 ชนิด ได้แก่ DIH - C1, DIH - C2, DIH - C3, DIH - C4, DIH - C5, DIH - C6, DIH - C7, DIH - C8, DIH - C10, DIH - C13, DIH - C14 และ DIH - C15 ซึ่งเป็นกลุ่มสาร Chacones และ Flavanones หยีน้ำ *Derris indica* (Lamk) Bennet จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (M156) (Decharchochart, Suthiwong et al. 2014) ไม่พบว่ามีการศึกษาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มาก่อน ซึ่งในการศึกษานี้สารสำคัญทั้ง 12 ชนิด ด้วยวิธี MTT assay ที่ความเข้มข้น 100 μM ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่าสารสำคัญจากหยีน้ำมีความเป็น

พิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ดีที่สุดคือ สาร DIH - C8 หรือ Candidone

Candidone จัดเป็นสารกลุ่ม Flavanones สกัดจากผลแห้งของต้นหยีน้ำ 5.8 kg ได้สาร Candidone yield 90.6 mg หรือ 0.0016 % ซึ่งเป็น Major compound และ สาร Candidone ยังสกัดจากพืช *Tephrosia aequilata* เป็นพืชตระกูลถั่ว อยู่ในวงศ์ Fabaceae กลุ่มสาร flavonoids เป็น natural products สกัดจากรากแห้ง 2 kg สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน/เมทานอล (1:1) แยกโดย โครมาโทกราฟีได้ 11 ชนิดและสาร Candidone yield 10 g โดยทำการทดสอบความเป็นพิษในเซลล์ Human embryonic kidney 293 (HEK-293 cells) พบว่ามีความเป็นพิษในระดับปานกลาง (Samuel et al., 2019) และสกัดจากพืช *Echinops giganteus* ใช้เหง้าแห้ง 100 g สกัดด้วย เมทานอล แยกโดยโครมาโทกราฟี สาร 6 ชนิดได้สาร Candidone yield 15 mg ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว CCRF-CEM และ CEM/ADR5000 cell lines รวมถึงเซลล์ตับอ่อน MiaPaCa-2 พบว่าสารสกัดเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสของเซลล์ผ่านการสูญเสียการทำงานของ MMP และการเพิ่มขึ้นของ ROS (Kuate, Sandjo et al. 2013) จะเห็นได้ว่า สาร Candidone มีแนวโน้มในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และเซลล์มะเร็งตับในการศึกษารังนี้จึงสนใจที่จะนำมาใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงได้นำสารสำคัญจากหยีน้ำสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 μM และสารมาตรฐาน Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 10 μM มาใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่การศึกษาพบว่าสารสำคัญจากหยีน้ำสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 100 μM และสารมาตรฐาน Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 10 μM ที่เวลา 24 ชั่วโมงมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ ทำให้ทราบว่าสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 100 μM น่าจะเป็นสารที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เกิดการตายได้ดีที่สุด

นอกจากนี้ทดสอบความเป็นพิษของสารสำคัญจากหยีน้ำสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μM และสารมาตรฐาน Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 10 μM ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เพื่อทราบถึงความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสำคัญจากหยีน้ำที่สาร Candidone ที่ความเข้มข้น 30 μM มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม และสาร Candidone ความเข้มข้นตั้งแต่ 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μM และ Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 10 μM มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ซึ่งมีร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เท่ากับ 66.63 μM นอกจากนี้ (Sribuhom, Saraphon et al. 2016) มีการศึกษาความเป็นพิษต่อ African green monkey kidney (vero cells) ซึ่งเป็น normal cell พบว่า Candidone ไม่เป็นพิษต่อ normal cell การศึกษาของ (Kurasug, Kukongviriyapan et al. 2018) ได้มีการศึกษาฤทธิ์ cytotoxicity ด้วยวิธี SRB assay โดยทดสอบฤทธิ์ของสาร Candidone ที่ความเข้มข้น 0 - 10 $\mu\text{g/ml}$ โดยทดสอบเป็นระยะเวลา 8 และ 24 ชั่วโมง พบว่าสาร Candidone มีฤทธิ์ cytotoxicity ที่แรงต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีซึ่งแปรผันตามความเข้มข้นของสาร และระยะเวลา (human cholangiocarcinoma (CCA) cell) KKU-M156 และ KKU-M213 วัดผลเป็นร้อยละของการรอดชีวิต (% cell viability) พบว่าสารมีฤทธิ์ cytotoxicity ต่อเซลล์ KUM156 และ KKU-M213 จากการทบทวนวรรณกรรมไม่พบการศึกษาฤทธิ์ของ Candidone ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัญญาณวิทยาของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร Candidone ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ด้วยวิธี MTT assay ที่เวลา 24 ชั่วโมงมีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ดีจึงนำไปสู่การศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญจากหยีน้ำสาร Candidone ที่

มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัญญาณวิทยาของเซลล์มะเร็งลำไส้ เพื่อยืนยันถึงลักษณะการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ที่เกิดขึ้น โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase contrast พบว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสาร Candidone มีลักษณะของเซลล์ที่เกิดการตายซึ่งแตกต่างจากกลุ่มเซลล์ควบคุมอย่างชัดเจนคือ เกิดการหลุดออกของเซลล์จากพื้นผิวที่ยึดเกาะ (detachment) มีการแตกกลุ่มของเซลล์ออกจากกลุ่มใหญ่ เซลล์มีลักษณะหดตัวเล็กกลง (shrunken) ซึ่งแสดงถึงลักษณะการตายของเซลล์เกิดขึ้นใกล้เคียงกับลักษณะการตายแบบ อะพอพโทซิส คือเซลล์หดตัว (cell shrinks) โครมาตินอัดตัวแน่น (chromatin condenser) (ปนัดดา โรจน์พิบูลสถิตย์, 2012)

สรุปและข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้สามารถสรุปผลการทดลองได้ว่า สาร Candidone เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง และมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัญญาณวิทยาของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสำคัญจากหยีน้ำที่มีผลกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งของสารสำคัญ 12 ชนิด ได้แก่ DIH - C1, DIH - C2, DIH - C3, DIH - C4, DIH - C5, DIH - C6, DIH - C7, DIH - C8, DIH - C10, DIH - C13, DIH - C14 และ DIH - C15 ข้อเสนอแนะของการศึกษาในครั้งนี้คือ การศึกษาเพิ่มเติมถึงฤทธิ์ของสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส ผ่าน Intrinsic pathway ควรทำการศึกษาโปรตีนที่ downstream และ upstream เพื่อยืนยันผลให้สมบูรณ์มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2554). รายงานสถิติโรค 2554. พิมพ์ครั้งที่ กรุงเทพมหานครนัยเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมการแพทย์.
2. ปนัดดา โรจน์พิบูลสถิตย์. (2555). “กลไกการตายของเซลล์ในกระบวนการตายของเซลล์”. พิมพ์ครั้งที่ 2. วารสารธรรมศาสตร์เวชสารปีที่ 12.
3. วีรวิทย์ อิมสารานู, อาคม ชัยวีระวัฒน์, สมชาย ณะสิทธิชัย, ปิยวัฒน์ เลาวหุดานนท์, ศุภพร แสงกระจ่าง, พงศธร ศุภอรธกร, รวิรินทร์ อิงศิริโรจน์, จิตราพร ธนบดี, หัสชา ศรีปลั่ง, สุรพล เวียงนนท์ และดลสุข พงษ์นิกร. (2 5 5 7) .โรคมะเร็ง (C a n c e r) .พิมพ์ครั้งที่ 1 กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขนนทบุรี.



4. Ahmed, S. A., S. Hanif and T. Iftkhar (2013). " Phytochemical profiling with antioxidant and antimicrobial screening of *Amaranthus viridis* L. leaf and seed extracts." *Open Journal of Medical Microbiology*3(3): 164.
5. Deerasamee, S., N. Martin, S. Sontipong, S. Sriamporn and H. Sriplung (1999). "Cancer in Thailand. Vol. II 1992-1994."
6. Decharchoochart, P., J. Suthiwong, P. Samatiwat, V. Kukongviriyapan and C. Yenjai (2014). "Cytotoxicity of compounds from the fruits of *Derris indica* against cholangiocarcinoma and HepG2 cell lines." *Journal of natural medicines*68(4): 730-736.
7. Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicologic pathology*35(4): 495-516.
8. Khuhaprema, T., P. Srivatanakul, H. Sriplung, S. Wiangnon, Y. Sumitsawan and P. Attasara (2007). "Cancer in Thailand Vol. IV, 1998-2000." Bangkok: Ministry of Public Health, Ministry of Education5.
10. Kuete, V., L. P. Sandjo, B. Wiench and T. Efferth (2013). "Cytotoxicity and modes of action of four Cameroonian dietary spices ethno-medically used to treat cancers: *Echinops giganteus*, *Xylopi aethiopia*, *Imperata cylindrica* and *Piper capense*." *Journal of ethnopharmacology*149(1): 245-253.
11. Kurasug, B., V. Kukongviriyapan, A. Prawan, C. Yenjai and S. Kongpetch (2018). "Antitumor effects of candidone extracted from *Derris indica* (Lamk) Bennet in cholangiocarcinoma cells." *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*17(7): 1337-1343.
12. Martin, N. and S. Pongnikorn (2003). *Cancer in Thailand, vol. III, 1995-1997*, Bangkok: Bangkok Medical Publisher.
13. Mbaveng, A. T., L. P. Sandjo, S. B. Tankeo, A. R. Ndifor, A. Pantaleon, B. T. Nagdjui and V. Kuete (2015). "Antibacterial activity of nineteen selected natural products against multi-drug resistant Gram-negative phenotypes." *SpringerPlus*4(1): 823.
14. Samuel, V. J., A. R. Mahesh and V. Murugan (2019). "Phytochemical and pharmacological aspects of *Tephrosia* genus: A brief review." *Journal of Applied Pharmaceutical Science*9(03): 117-125.
15. Sribu hom, T., C. Saraphon, P. Decharchoochart, C. Boonyarat and C. Yenjai (2016). "Acetylcholinesterase inhibition and cytotoxicity of flavonoids and chalcones from *Derris indica*." *ScienceAsia*42: 247-251.
16. Vatanasapt, V., N. Martin, H. Sriplung, K. Chindavijak, S. Sontipong and S. Sriamporn (1993). "Cancer in Thailand Vol. I, 1988-1991." Bangkok: IARC Technical Report(16).