รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเหง้าเร่วหอม
Investigation of potential anticancer compound from *Etlingera pavieana* rhizome

โดย

ดร. ผาณตา วาณิชวัฒนเดชา

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ศ. ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802355
สัญญาเลขที่ 86/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเหง้าเร่วหอม
Investigation of potential anticancer compound from *Etlingera pavieana* rhizome

โดย

ดร. ผาณตา วาณิชวัฒนเดชา
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ศ. ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

โครงการเสร็จสิ้น มิถุนายน 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 86/2558

ทางผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมีและภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ตลอดจนเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบ และขอขอบคุณ รศ. ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านการจัดหาและเก็บตัวอย่างพืช มา ณ ที่นี่ด้วย

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของคนไทยเป็นอันดับหนึ่ง แม้การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดในปัจจุบันจะมีประสิทธิภาพที่ดีแต่ก็ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยเป็นอย่างมาก การนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งกำลังได้รับความสนใจอย่างมาก พืชสมุนไพรที่นำมาศึกษาในครั้งนี้คือ เร่วหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm. อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งพืชในวงศ์นี้หลายชนิดเคยมีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้ อีกทั้งสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมเคยมีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบด้วย ผลจากการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมและส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ด้วยวิธี MTT กับเซลล์มะเร็ง 7 ชนิด (HepG2, HCT116, MCF-7, MDA-MB-231, C33A, SiHa และ Hela) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง 2 ชนิด (293T และ HaCaT) พบว่าสารสกัดทุกชนิด (ยกเว้นส่วนสกัดย่อยน้ำ) สามารถลดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดและเวลาที่ใช้บ่ม และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุดและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง เมื่อนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทไปแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่า sub-fraction ทั้ง 5 ชนิด (F1-F5) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบได้ โดยที่ความเข้มข้นสารน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 μg/ml และเวลาในการบ่มเท่ากับ 24 ชั่วโมง sub-fraction F1 แสดงความเป็นพิษที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งและไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง ซึ่งเซลล์มะเร็งที่ตอบสนองต่อ sub-fraction F1 ได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A, เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 แสดงให้เห็นว่า sub-fraction F1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลากหลายกลุ่มและเหมาะสมที่จะนำไปแยกหาสารประกอบบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งต่อไป

<u>คำสำคัญ</u> : เร่วหอม ฤทธิ์ต้านมะเร็ง เซลล์มะเร็ง

Abstract

Cancer is the most common cause of death in Thai people. Although chemotherapeutic drugs can treat many types of cancer effectively, they also cause many side effects to patients. The alternative cancer treatment with potential anti-cancer products from medicinal plants is becoming of high interest. In this study, the ethanolic extract of *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm. (Zingiberaceae family) and its fractions (hexane, ethyl acetate and aqueous fractions) were evaluated for their anti-cancer activity in seven different cancer cell types (HepG2, HCT116, MCF-7, MDA-MB-231, C33A, SiHa และ Hela) and compared to two non-cancerous cell lines (293T and HaCaT) by MTT assay. The results revealed that all extracts (except aqueous fraction) could reduce cell viability of cancer cells significantly in dose- and time- dependent manners and the ethyl acetate fraction exhibited the strongest inhibition on cancer cell growth without causing toxic effect to non-cancerous cell lines. Thus, the ethyl acetate fraction was then separated by column chromatography. The obtaining five sub-fractions, F1 to F5, expressed their cytotoxicity to cancer cells in which only the sub-fraction F1 at 50 μg/ml and 24 h of incubation displayed the anti-proliferative capability exclusively towards cancer cells but not the non-cancerous ones. The most three cancer cells sensitive to the sub-fraction F1 were cervical cancer C33A cells, breast cancer MDA-MB-231 cells and colon cancer HCT116 cells indicating that the anti-cancer effect of sub-fraction F1 is not limited to single cancer cell type and this sub-fraction was thus selected for further identifying the active anticancer compounds.

Keywords : *Etlingera pavieana*, anticancer effect, cancer cells

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีการดำเนินการวิจัย	6
ผลการวิจัย	9
อภิปราย และสรุปการทดลอง	22
ผลผลิต	25
บรรณานุกรม	31
ประวัติของหัวหน้าโครงการวิจัย และผู้ร่วมวิจัยของโครงการวิจัย	34

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4-1 ลักษณะทางกายภาพ น้ำหนักของสารที่ได้ และ %yield ของสารสกัดหยาบทั้งสามชนิด	9
4-2 ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม ข่า และขมิ้น ต่อเซลล์ต่างๆ ที่ใช้ทดสอบ	11
4-3 ลักษณะทางกายภาพ น้ำหนักของสารที่ได้ และ %yield ของ sub-fraction แต่ละชนิดจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท	15

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4-1 ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิดต่างๆ ที่สัมผัสกับสารสกัดหยาบจากเหง้าเร่วหอม ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	10
4-2 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อยเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	12
4-3 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	13
4-4 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อยน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	14
4-5 TLC pattern ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (1), sub-fraction F1 (2), sub-fraction F2 (3), sub-fraction F3 (4), sub-fraction F4 (5) และ sub-fraction F5 (6) ที่รันด้วยตัวทำละลาย 0.5% methanol/dichloromethane บันทึกภาพภายใต้แสงยูวี	15
4-6 การมีชีวิตรอดของเซลล์ต่างๆ ที่ได้รับ sub-fraction F1 ที่ความเข้มข้น 25 - 100 µg/ml เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	17
4-7 การมีชีวิตรอดของเซลล์ต่างๆ ที่ได้รับ sub-fraction F2 ที่ความเข้มข้น 25 - 100 µg/ml เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	18
4-8 การมีชีวิตรอดของเซลล์ต่างๆ ที่ได้รับ sub-fraction F3 ที่ความเข้มข้น 25 - 100 µg/ml เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	19
4-9 การมีชีวิตรอดของเซลล์ต่างๆ ที่ได้รับ sub-fraction F4 ที่ความเข้มข้น 25 - 100 µg/ml เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	20
4-10 การมีชีวิตรอดของเซลล์ต่างๆ ที่ได้รับ sub-fraction F5 ที่ความเข้มข้น 25 - 100 µg/ml เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	21

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคมะเร็งจัดเป็นโรคร้ายที่คร่าชีวิตคนไทยเป็นอันดับหนึ่ง โดยมีแนวโน้มผู้เสียชีวิตเพิ่มขึ้นทุกปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 เป็นต้นมา จากข้อมูลสถิติของกระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2554 ที่ผ่านมา พบว่ามีผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 61,082 ราย คิดเป็นอัตราการตาย 95.2 คนต่อประชากร 100,000 คน โดยมะเร็งที่พบว่ามีผู้เสียชีวิตมากที่สุด ได้แก่ มะเร็งตับและท่อน้ำดี มีผู้เสียชีวิตถึง 14,314 คน ตามด้วยมะเร็งปอดและหลอดลม 10,203 คน มะเร็งเต้านม 2,737 คน และมะเร็งปากมดลูก 1,749 คน โรคมะเร็งนอกจากจะทำให้เกิดความทุกข์ทรมานต่อผู้ป่วยจนไปถึงการเสียชีวิตแล้ว ยังเป็นการสูญเสียบุคคลซึ่งอาจเป็นกำลังหลักของครอบครัว สูญเสียเวลาและค่าใช้จ่ายที่มากมายตลอดช่วงเวลาในการรักษา ส่งผลให้ประเทศสูญเสียทรัพยากรบุคคล สูญเสียงบประมาณในการอภิบาลรักษาและนำเข้ายารักษาโรค อันส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศได้ ดังนั้น การป้องกันและรักษาตั้งแต่ระยะเริ่มต้นจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการลดการสูญเสียนี้

ในปัจจุบัน วิธีการรักษาโรคมะเร็ง มีทั้งการฉายรังสี การรักษาด้วยเคมีบำบัด และการผ่าตัดเอาชิ้นเนื้อมะเร็งออกไป ซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง และการรักษาแบบเคมีบำบัดด้วยยาในปัจจุบันก็ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยมาก เช่น ผมร่วง คลื่นไส้ อาเจียน อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร เป็นต้น การนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งกำลังได้รับความสนใจอย่างมากทั้งในคนไทยและชาวต่างชาติ เนื่องจากมีผลข้างเคียงที่น้อยกว่าการใช้สารเคมี เสียค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่า และเป็นการใช้ประโยชน์จากพืชที่หาได้ทั่วไปในเขตชุมชนซึ่งผู้ป่วยและครอบครัวมีความคุ้นเคยเป็นอย่างดี และอาจมีการบริโภคตามคำบอกเล่าต่อๆกันมาอยู่แล้ว การศึกษาวิจัยฤทธิ์ของสมุนไพรในการต้านมะเร็งจึงเป็นการนำเอาความรู้ทางวิทยาศาสตร์เข้าไปสนับสนุนการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรในท้องถิ่น และยืนยันถึงฤทธิ์การรักษาที่มีอยู่จริงในสมุนไพรนั้น เป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับพืชท้องถิ่น สนับสนุนภูมิปัญญาชาวบ้าน เพิ่มความน่าเชื่อถือให้กับตัวยาที่มีอยู่ในสมุนไพรให้เป็นที่ยอมรับในวงกว้าง เป็นการลดการนำเข้ายาแผนปัจจุบันจากต่างประเทศ ช่วยประหยัดงบประมาณให้กับประเทศและอาจเป็นการนำรายได้เข้าสู่ประเทศจากการส่งออกยาสมุนไพรเหล่านี้

เร่วหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm. เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งพืชในวงศ์นี้หลายชนิดเคยมีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้ เช่น ขมิ้น (*Curcuma longa*), กระชาย (*Boesenbergia pandurata*), ขิง (*Zingiber officinale*), *Etlingera velutina*, *Etlingera belalongensis* และ *Zingiber vinosum* เป็นต้น โดยผลวิจัยชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากพืชเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), เซลล์มะเร็งรังไข่ (CaOV3, SKOV3ip1) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela) และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (DU145 และ LNCaP) เป็นต้น รวมทั้งในหนูทดลองด้วย (Sinha D *et al.*, 2012; Debata PR *et al.*, 2013; Lin YG *et al.*, 2007; Mukhopadhyay A *et al.*, 2001; Rahman S *et al.*, 2011; Sabli F *et*

al., 2012; Vinothkumar R *et al.*, 2013) นอกจากนี้ยังมีการแสดงให้เห็นถึงการใช้สารสกัดจากขิงร่วมกับยา gemcitabine ซึ่งพบว่าสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ได้มากกว่าการใช้ยา gemcitabine เพียงอย่างเดียว (Sharma C *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตาม แม้จะมีรายงานฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของพืชในวงศ์นี้ออกมามากมาย แต่ยังไม่เคยมีรายงานถึงฤทธิ์นี้ในเร่วหอมมาก่อน ซึ่งเร่วหอมถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งในภาคตะวันออกของไทย มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน มีกลิ่นหอม เหง้านิยมใช้เป็นเครื่องเทศปรุงอาหารรับประทานในชีวิตประจำวัน ใช้ในการรักษาอาการท้องอืด ขับลม และขับปัสสาวะ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) จากงานวิจัยของ เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข (2551) พบว่า ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ โดยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้สูงในเซลล์แมคโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย LPS และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ค่า IC_{50} = 16.28 ± 9.16 μg/ml) และสามารถยั้บยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 (PGE_2) ลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ได้ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน รวมถึงลดการเคลื่อนที่ของ p65 NF-κB เข้าสู่นิวเคลียสและเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ heme oxygenase-1 (เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2554; Palachot M, 2012) และเนื่องจากกระบวนการอักเสบมีความสัมพันธ์กับการเกิดและการพัฒนาของมะเร็งให้มีความรุนแรงมากขึ้น กล่าวคือ NF-κB สามารถป้องกันการตาย (apoptosis) ของ transformed cell และส่งเสริมให้มะเร็งลุกลาม (invasion) และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นได้ (metastasis) (Greten FR *et al.*, 2004; Yang CR *et al.*, 2005; Luo JL *et al.*, 2004) ไนตริกออกไซด์เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขนาดของก้อนมะเร็ง และสนับสนุนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยส่งเสริมการลุกลามและการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) มายังก้อนมะเร็ง (Rao CV, 2004) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษากลไกของสารประกอบบริสุทธิ์ curcumin จากขมิ้นว่าสามารถยับยั้งการเติบโตของก้อนมะเร็งและการสร้างเส้นเลือดใหม่ในมะเร็งรังไข่ได้โดยผ่านทางการยับยั้งวิถี NF-κB (Lin YG *et al.*, 2007) ซึ่งจากข้อมูลสนับสนุนเหล่านี้ ทำให้คณะผู้วิจัยเห็นว่ามีแนวโน้มเป็นอย่างมากที่สารสกัดจากเร่วหอมจะมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้ และจากการทดสอบเบื้องต้น พบว่าสารสกัดเอทานอลจากเร่วหอมสามารถลดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa และเซลล์มะเร็งเต้านม MCF7 ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาเพิ่มเติมต่อไปอีกในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งตับ มะเร็งปากมดลูกและมะเร็งเต้านม ซึ่งเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดในคนไทย และศึกษาต่อไปจนถึงสารประกอบบริสุทธิ์ (pure compound) ที่มีฤทธิ์ในเร่วหอม รวมทั้งศึกษากลไกระดับโมเลกุลในการต้านเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับยารักษามะเร็งในปัจจุบัน เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ต่อไป อันมีความเป้าหมายในระยะยาวเพื่อนำสารประกอบบริสุทธิ์ที่ได้นั้นมาใช้แทนยาที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ หรือใช้ร่วมกันกับยาแผนปัจจุบันเพื่อให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นการเพิ่มคุณค่าและค่านิยมให้กับการบริโภคสมุนไพรท้องถิ่น อีกทั้งเป็นการกระตุ้นเศรษฐกิจของชุมชนภาคตะวันออกให้หันมาปลูกเร่วหอมเป็นเชิงพาณิชย์มากขึ้นด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอม ซึ่งเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่นิยมนำมาปรุงอาหารบริโภคทั่วไปในภาคตะวันออก เนื่องจากเร่วหอมเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งพืชในวงศ์นี้หลายชนิดพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งในหลอดทดลองและในหนูได้ อีกทั้ง เร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งการอักเสบมีความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับการเกิดและการแพร่กระจายของมะเร็ง ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเร่วหอมในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม และมะเร็งปากมดลูก เนื่องจากมะเร็งทั้งสี่ชนิดนี้พบมากที่สุดในคนไทย แล้วเปรียบเทียบฤทธิ์ที่ได้กับยาที่ใช้รักษามะเร็งในปัจจุบัน

กล่าวโดยสรุป งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูกของสารสกัดจากเหง้าเร่วหอม
2. เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดเร่วหอมกับขมิ้น ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกัน (Zingiberaceae) ที่เคยมีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในงานวิจัยชิ้นนี้ เริ่มต้นคณะผู้วิจัยจะใช้สารสกัดหยาบเอทานอลจากเร่วหอมศึกษาฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 และ MDA-MB-231) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (C33A, SiHa และ Hela) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง (293T และ HaCaT) (รวมทั้งหมด 9 ชนิดของเซลล์ จากมะเร็ง 4 ประเภท) โดยจะทำการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay การทดลองจะทำควบคู่ไปกับสารสกัดจากขมิ้น (*Curcuma longa*) และข่า (*Alpinia galangal*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกัน (Zingiberaceae) ที่เคยมีรายงานแล้วว่ามีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้ จากนั้นจะนำสารสกัดหยาบเอทานอลไปทำการสกัดแยกส่วนต่อด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตต ได้เป็นส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต และส่วนสกัดย่อยน้ำ นำส่วนสกัดย่อยเหล่านี้ไปทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง เพื่อหาส่วนสกัดย่อยที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด เปรียบเทียบฤทธิ์ระหว่างเซลล์มะเร็งกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง และเปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งด้วยกัน ซึ่งเซลล์มะเร็งที่ถูกยับยั้งได้มากที่สุดจะถูกนำไปทดสอบกับสาร pure compound ต่อไป

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติระดับโมเลกุลของเซลล์ร่างกาย โดยมีขั้นตอนในการเกิดโรคหลายขั้นตอนกว่าที่เซลล์ร่างกายปกติจะกลายไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ (multistep carcinogenesis) ซึ่งเริ่มแรกอาจถูกชักนำโดยปัจจัยทางกายภาพภายนอก เช่น สารเคมี รังสี การติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย เป็นต้น แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม (gene) ในเซลล์ร่างกายอย่างถาวร ทำให้เซลล์นั้นมีความผิดปกติในการเจริญเติบโตและแบ่งตัว และเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์ธรรมดากลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด ซึ่งจะสามารถลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงและแพร่กระจายไปยังที่อื่นๆในร่างกาย (metastasis) ตามระบบน้ำเหลืองหรือระบบเลือด จนไปเกิดเป็นเซลล์มะเร็งที่อวัยวะที่อยู่ไกลออกไปได้

การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน มีทั้งการฉายรังสี (radiation therapy) การผ่าตัดเอาชิ้นเนื้อมะเร็งออกไป (surgery) และการรักษาโดยใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) โดยจะเลือกใช้วิธีใดวิธีหนึ่งหรือรักษาหลายวิธีร่วมกันขึ้นกับชนิดและระยะของมะเร็ง ซึ่งความแตกต่างของการใช้เคมีบำบัดกับการรักษาแบบสองวิธีแรกคือ ตัวยาจะสามารถเคลื่อนที่ไปได้ทุกส่วนของร่างกายเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ได้ ในขณะที่การฉายรังสีหรือการผ่าตัดจะเป็นการกำจัดมะเร็งเฉพาะส่วนที่ได้รับการรักษาเท่านั้น ในปัจจุบันมียาเคมีบำบัดที่ผลิตออกมามากกว่า 100 ชนิด ซึ่งยาแต่ละตัวจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน แต่ถึงแม้จะมียารักษามะเร็งอยู่มากมาย การคิดค้นวิจัยเพื่อผลิตตัวยาใหม่ๆ หรือวิธีรักษาแบบใหม่ก็ยังเกิดขึ้นอยู่เรื่อยๆ โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาให้โรคหายขาดหรือบรรเทาอาการให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นและมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น เพิ่มการตอบสนองต่อการรักษา เพิ่มความจำเพาะของตัวยาต่อเซลล์มะเร็ง และมีความมุ่งหวังที่จะให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วยน้อยที่สุด

การนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งกำลังได้รับความสนใจทั้งในคนไทยและชาวต่างชาติ เนื่องจากมีผลข้างเคียงที่น้อยกว่าการใช้สารเคมี เสียค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่า และเป็นการใช้ประโยชน์จากพืชที่หาได้ทั่วไปในเขตชุมชนซึ่งผู้ป่วยและครอบครัวมีความคุ้นเคยเป็นอย่างดี เป็นพืชพื้นบ้านที่รับประทานในชีวิตประจำวันและอาจมีการบริโภคเป็นยารักษาโรคหรือยาบำรุงร่างกายตามคำบอกเล่าต่อๆกันมาอยู่แล้ว สารสกัดจากพืชในวงศ์ Zingiberaceae หลายชนิด ก็มีรายงานการวิจัยว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ เช่น curcumin ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากขมิ้น (*Curcuma longa*) มีฤทธิ์ในต้านอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งต้านมะเร็งหลายชนิดทั้งในหลอดทดลองและในหนู เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก, มะเร็งรังไข่ มะเร็งเต้านม เป็นต้น (Sinha D *et al.*, 2012; Debata PR *et al.*, 2013; Lin YG *et al.*, 2007; Mukhopadhyay A *et al.*, 2001) สาร panduratin A ซึ่งสกัดได้จากกระชาย *(Boesenbergia pandurata)* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29 (Kirana C *et al.*, 2007), สารสกัดจากขิง *(Zingiber officinale)* สามารถต้านเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ MDA-MB-231 ได้ และถ้าใช้ร่วมกับยา gemcitabine จะทำให้กระตุ้นการตายของ

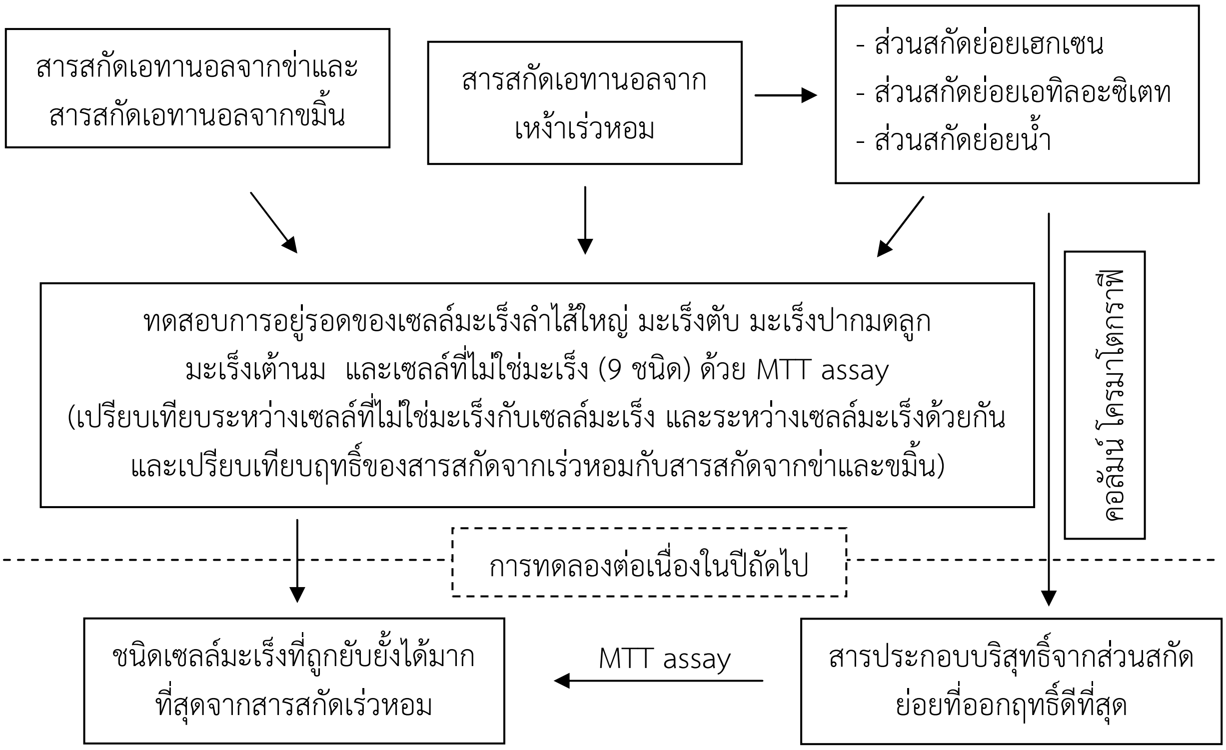
เซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ได้มากขึ้น (Rahman S *et al.*, 2011; Sharma C *et al.*, 2009) ,สาร phenylbutenoid, (±)-*trans*-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-3,4-dimethoxystyryl]cyclohexene (PSC) ซึ่งสกัดได้จาก *Zingiber cassumunar* มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอด A549 (Lee JW *et al.*, 2007) และสารสกัดจาก *Kaempferia galangal* L. (ethyl *p*-methoxycinnamate) กระตุ้นการตาย (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้ เป็นต้น (Liu B *et al.*, 2010)

เร่วหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm. เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้สกุลเดียวกับกาหลาและปุด พบมากในพื้นที่ภาคตะวันออกของไทย เช่น จันทบุรี ระยอง และตราด (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550b) มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบเดี่ยว เรียงสลับ ดอกช่อ แทงจากเหง้า ดอกย่อยสีแดง ทุกส่วนมีกลิ่นหอมแรง เหง้าหรือลำต้นใต้ดินใช้ขับปัสสาวะ แก้ลม และแก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) นอกจากนี้ในพื้นที่ภาคตะวันออกของไทย มีการนำเหง้าของเร่วหอมมาใช้เป็นเครื่องเทศผสมในอาหาร เช่น ก๋วยเตี๋ยวหมูเลียง แกงป่า และผัดเผ็ด ในอดีตเร่วหอมนิยมปลูกเพื่อเป็นพืชสวนครัวและปลูกแซมในสวนผลไม้เพื่อขุดเหง้าจำหน่าย แต่ในปัจจุบัน สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกรมส่งเสริมการเกษตร ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเร่วหอมในเชิงพาณิชย์มากขึ้น เพื่อจำหน่ายเหง้าทั้งในและนอกประเทศ (http://www.kehakaset.com) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าส่วนสกัดจากเหง้าของเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Srisook และ Srisook, 2011) และต้านการอักเสบ โดยส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมยังยั้บยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 (PGE_2) ในเซลล์แมคโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย LPS (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2551) ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมนี้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ได้ ลดการกระตุ้น NF-κB ซึ่งเป็น transcription factor สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ heme oxygenase-1 (Palachot, 2012) และเนื่องจากกระบวนการอักเสบมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งและการพัฒนาของโรคมะเร็งให้มีความรุนแรงมากขึ้น กล่าวคือ NF-κB ป้องกันการตาย (apoptosis) ของ transformed cell และส่งเสริมให้มะเร็งลุกลาม (invasion) และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นได้ (metastasis) (Greten FR *et al.*, 2004; Yang CR *et al.*, 2005; Luo JL *et al.*, 2004) อีกทั้ง ไนตริกออกไซด์ยังเกี่ยวข้องกับเพิ่มขนาดของก้อนมะเร็ง และสนับสนุนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยส่งเสริมการลุกลามและการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) มายังก้อนมะเร็งอีกด้วย (Rao CV, 2004) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษากลไกของ curcumin ในการยับยั้งการเติบโตของก้อนมะเร็งและการสร้างเส้นเลือดใหม่ในมะเร็งรังไข่โดยผ่านทางการยับยั้งวิถี NF-κB (Lin YG *et al.*, 2007) ซึ่งจากข้อมูลสนับสนุนเหล่านี้ ทำให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งด้วยสารสกัดจากเร่วหอม โดยจะเริ่มจากการศึกษาในมะเร็งที่พบมากที่สุดในคนไทย 4 ชนิด แล้วจึงศึกษาลึกลงไปถึงกลไกยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารประกอบบริสุทธิ์ (pure compound) ที่สกัดแยกได้จากเร่วหอมต่อยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโต ยีนควบคุมการตาย ยีนที่ควบคุมวัฏจักรของเซลล์ และยีนในวิถี NF-κB และเปรียบเทียบฤทธิ์กับยารักษามะเร็งในปัจจุบัน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

ภาพรวมของขั้นตอนการวิจัยทั้งหมดแสดงได้ดังแผนภาพด้านล่าง



3.1 การเตรียมพืชสมุนไพร

เหง้าของเร่วหอมจะถูกเก็บจากอำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี เหง้าข่าจะถูกเก็บจากจังหวัดชลบุรี และเหง้าขมิ้นจะถูกเก็บจากจังหวัดระยอง นำเหง้าของเร่วหอม ข่า และขมิ้น มาล้างด้วยน้ำประปาแล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วชั่งน้ำหนักพืชที่ปั่นได้ทั้งหมด

3.2 การสกัดสารจากเหง้าเร่วหอม ข่า และขมิ้น

นำเหง้าแห้งของเร่วหอม ข่า และขมิ้นที่บดละเอียดแล้วมาห่อด้วยผ้าขาวบางแล้วแช่ลงในสารละลายเอทานอลในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 เป็นเวลา 5 วัน กรองสารสกัดที่ได้ แล้วนำห่อของผงเหง้ามาสกัดซ้ำด้วยเอทานอลอีก 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้มาทำการระเหยตัวทำละลายเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศ ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ จากนั้นนำสารสกัดเอทานอลของเหง้าเร่วหอมมาสกัดแยกส่วนด้วยเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ จะได้เป็นส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยน้ำ ตามลำดับ ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและตามด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ ชั่งน้ำหนักส่วนสกัดย่อยที่ได้ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสโดยไม่ให้โดนแสง รอนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อไป

3.3 การสกัดแยกสารประกอบที่มีฤทธิ์จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากเหง้าเร่วหอมด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทได้ถูกนำไปแยกหาสารประกอบบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตามวิธีที่รายงานใน (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) โดยใช้ silica gel เป็นเฟสคงที่และใช้สารผสม methanol และ dichloromethane อัตราส่วน 0.5 : 99.05 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC และทำการรวมสารที่มีแถบสีบน TLC plate เหมือนกันเข้าไว้ด้วยกัน นำไปประเหยแห้งด้วยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและตามด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยวิธี MTT จากนั้นส่วนสกัดย่อย (subfraction) ที่มีฤทธิ์ที่ดีที่สุดจะถูกนำไปทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารโดยเทคนิคสเปกโทรสโคปี และเปรียบเทียบสเปกตรัม NMR ต่อไป

3.4 การเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ศึกษา ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 และ MDA-MB-231) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (C33A, SiHa และ Hela) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง (293T และ HaCaT) เซลล์ทั้งหมดจะถูกเลี้ยงในอาหาร Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) ซึ่งมี 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %

3.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay (Wanichwatanadecha P *et al.*, 2012)

เซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งจะถูกเลี้ยงใน 96-well plate ในสภาวะที่เหมาะสมก่อนทำการทดสอบ 24 ชั่วโมง จากนั้นจะใส่สารทดสอบ ได้แก่ สารสกัดเร่วหอม สารสกัดข่า สารสกัดขมิ้น หรือส่วนสกัดย่อยต่างๆ ของเร่วหอม ซึ่งละลายด้วย DMSO ผสมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการ หลังจากนั้นบ่มเซลล์ไว้ 24 48 หรือ 72 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงที่มีสารละลาย MTT 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X PBS ลงไป นำเซลล์กลับไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสต่ออีก 4 ชั่วโมง จากนั้นละลายผลึกสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย 200 μl DMSO ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก

$$\text{ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารสกัด}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารสกัด}} \times 100$$

โดยจะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ แล้วรายงานผลการยับยั้งมะเร็งของสารสกัดด้วยค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50%)

3.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยเปรียบเทียบแบบ two-tailed student's t-test และ one-way ANOVA โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดสารจากเหง้าเร่วหอม ข่า และขมิ้น

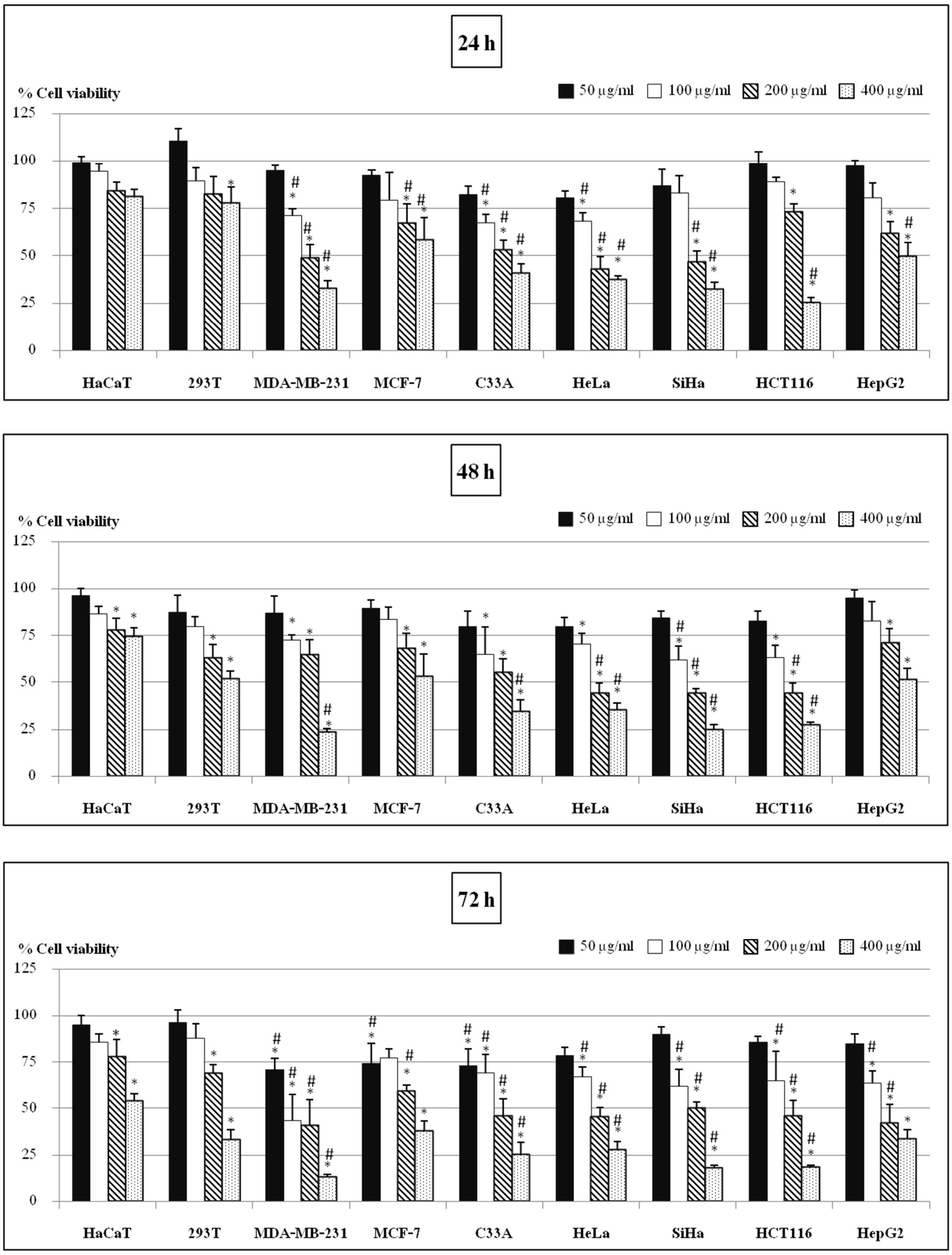
จากการสกัดสารจากเหง้าเร่วหอม ข่า และขมิ้น ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ได้สารสกัดหยาบปริมาณ 167.07 4.24 และ 16.47 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพ และร้อยละน้ำหนักสารที่ได้ (%Yield) ดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ลักษณะทางกายภาพ น้ำหนักของสารที่ได้ และ %yield ของสารสกัดหยาบทั้งสามชนิด

ชนิดของสารสกัด	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสารที่สกัดได้ (กรัม)	%Yield	ลักษณะทางกายภาพ
สารสกัดหยาบข่า	40	4.24	10.6	เหนียวข้น สีน้ำตาล
สารสกัดหยาบขมิ้น	50	16.47	32.94	เหนียวข้น สีส้มปนเหลือง
สารสกัดหยาบเร่วหอม	1877.73	167.07	8.9	เหนียวข้น สีน้ำตาลเข้ม

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบเอทานอล

จากการศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ และเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งด้วยวิธี MTT ที่ได้รับสารสกัดหยาบเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมที่ความเข้มข้น 50-400 µg/ml ที่เวลาบ่ม 3 ช่วงเวลาคือ 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยกำหนดให้การเจริญของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารผสม 0.2% DMSO มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (%cell viability) เท่ากับ 100% ได้ผลดังภาพที่ 4-1 และค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบทั้งสามชนิดต่อเซลล์ชนิดต่างๆ รายงานดังตารางที่ 4-2 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบเอทานอลจากพืชทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ทุกชนิด โดยฤทธิ์จะขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้และระยะเวลาในการบ่ม นั่นคือ การยับยั้งจะเห็นได้ชัดที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นสารสกัดสูงสุด ที่เวลาบ่ม 72 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบทั้งสามชนิด พบว่าสารสกัดจากเหง้าข่ามีฤทธิ์ที่ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากเหง้าขมิ้น และเหง้าเร่วหอม ตามลำดับ โดยเซลล์มะเร็งที่สารสกัดเหง้าข่ายับยั้งได้ดีที่สุดคือ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A (IC_{50} < 10 µg/ml) เซลล์มะเร็งที่สารสกัดเหง้าขมิ้นยับยั้งได้ดีที่สุดคือ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 (IC_{50} < 10 µg/ml) และเซลล์มะเร็งที่สารสกัดเหง้าเร่วหอมยับยั้งได้ดีที่สุดคือ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 (IC_{50} เท่ากับ 82 µg/ml) นอกจากนี้ ยังพบว่าสารสกัดจากเหง้าข่าและขมิ้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง 293T และ HaCaT ด้วย ในขณะที่สารสกัดจากเหง้าเร่วหอมไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง (IC_{50} > 400 µg/ml)



ภาพที่ 4-1 ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิดต่างๆ ที่สัมผัสกับสารสกัดหยาบจากเหง้าเร่วหอมที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

(* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัด (*p*<0.05) และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นเดียวกัน (*p*<0.05))

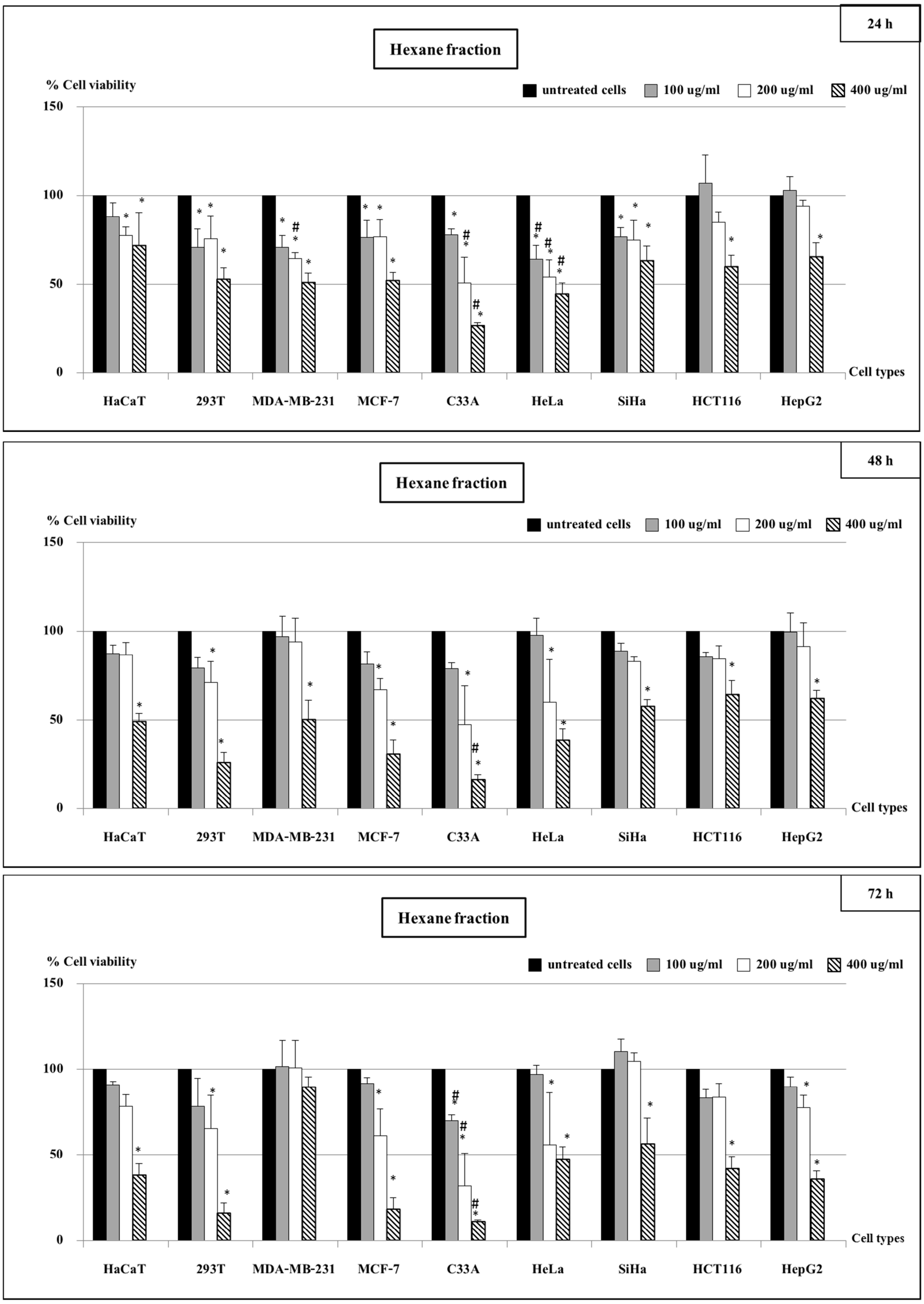
ตารางที่ 4-2 ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม ข่า และขมิ้น ต่อเซลล์ต่างๆ ที่ใช้ทดสอบ

เซลล์	ค่า IC_{50} (μg/ml)								
	สารสกัดหยาบเหง้าเร่วหอม			สารสกัดหยาบเหง้าข่า			สารสกัดหยาบเหง้าขมิ้น		
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.
293T	>400	>400	299	104	52	<10	56	54	46
HaCaT	>400	>400	>400	34	16	<10	46	42	<10
MDA-MB-231	178	268	82	28	38	<10	28	32	<10
MCF-7	>400	>400	272	38	56	26	52	56	44
HCT116	294	152	164	40	52	32	52	48	36
HepG2	376	>400	145	54	56	30	56	38	37
C33A	220	243	170	16	<10	<10	32	32	20
HeLa	160	165	166	80	68	40	56	38	42
SiHa	182	147	192	52	64	32	56	48	40

4.3 ผลการแยกส่วนสกัดย่อยจากสารสกัดหยาบเอทานอลของเหง้าเร่วหอมและฤทธิ์การยับยั้งมะเร็งของส่วนสกัดย่อยต่างๆ

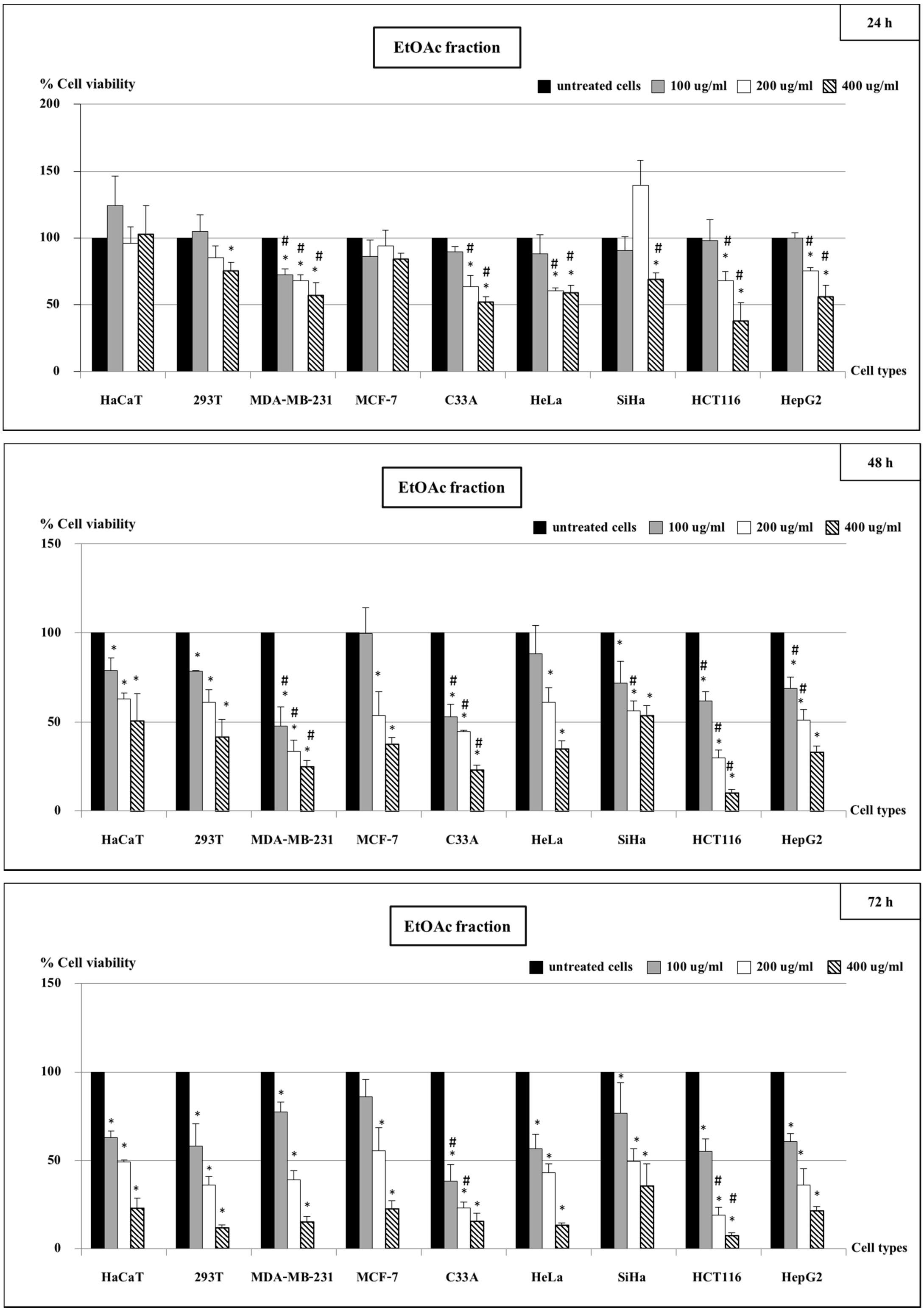
สารสกัดหยาบจากเหง้าเร่วหอมได้ถูกนำมาสกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ได้เป็นส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยน้ำ ตามลำดับ พบว่าส่วนสกัดที่มีปริมาณสูงที่สุดคือ ส่วนสกัดย่อยน้ำ (56.73%) รองลงมาคือ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (19.23%) และส่วนสกัดย่อยเฮกเซน (10.88%) ตามลำดับ

จากผลการทดสอบด้วยวิธี MTT ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100-400 μg/ml เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน โดยฤทธิ์จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของส่วนสกัดย่อยหรือเวลาที่ใช้ในบ่ม ในขณะที่ส่วนสกัดย่อยน้ำไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบทุกชนิด (ภาพที่ 4-2 ถึง 4-4) เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ได้รับส่วนสกัดย่อยเฮกเซนที่ความเข้มข้น 400 μg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A มีชีวิตรอดน้อยที่สุด (%cell viability เท่ากับ 10.91±1.16 %) รองลงมาเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (%cell viability เท่ากับ 35.92±4.82 %) แต่ไม่พบการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 ในขณะที่ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทสามารถลดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งได้ทุกชนิด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ได้ดีที่สุด (%cell viability เท่ากับ 7.56±1.46 %) รองลงมาเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa (%cell viability เท่ากับ 13.67±1.11 %) อย่างไรก็ตาม แม้ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทจะให้ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดีในสภาวะนี้ แต่การได้รับสารที่ความเข้มข้น 400 μg/ml และเวลา 72 ชั่วโมง จะส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งทั้งสองชนิดด้วย โดยเมื่อพิจารณาในทุกช่วงเวลาแล้วจะเห็นได้ว่า การใช้เวลาบ่ม 24 ชั่วโมงเป็นสภาวะที่เหมาะสมกว่า เนื่องจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทยังคงแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ทุกชนิด (ยกเว้นเซลล์ MCF-7) และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT และเซลล์ 293T ดังนั้นส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจะถูกนำไปแยกหาสารประกอบบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีต่อไป

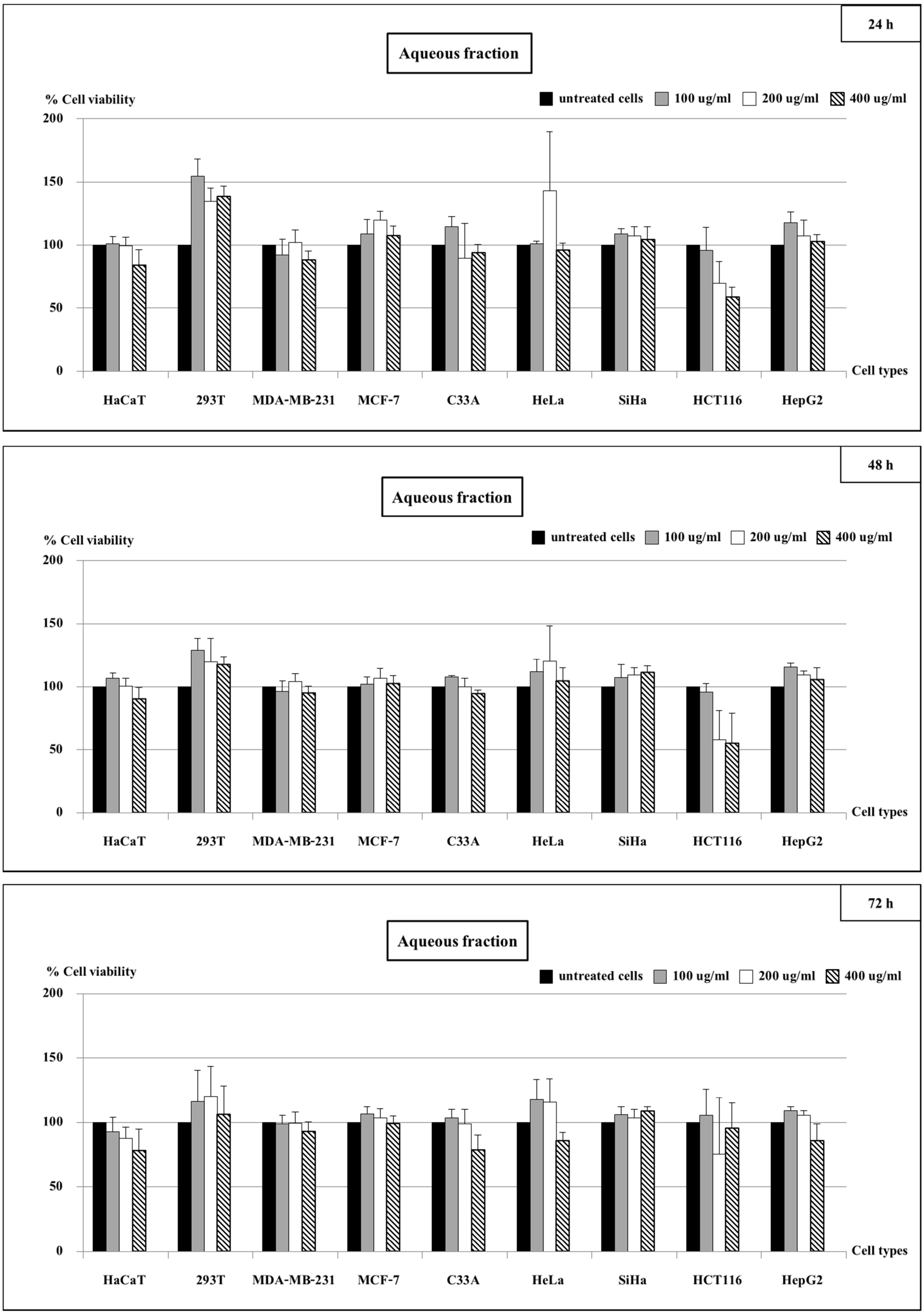


ภาพที่ 4-2 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อยเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

(* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัด (p<0.05) และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นเดียวกัน (p<0.05))



ภาพที่ 4-3 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง
(* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัด (*p*<0.05) และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นเดียวกัน (*p*<0.05))



ภาพที่ 4-4 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อยน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

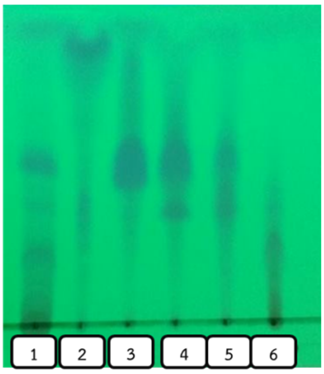
(* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัด (p<0.05) และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นเดียวกัน (p<0.05))

4.4 ผลการแยก sub-fraction ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท

ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทถูกนำมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ 0.5% methanol/dichloromethane เป็นตัวชะ จากนั้น sub-fraction ที่ได้ทั้งหมดจะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย TLC (ภาพที่ 4-5) ซึ่งในท้ายที่สุดจะได้ sub-fraction ทั้งหมดจำนวน 5 sub-fraction คือ sub-fraction F1 F2 F3 F4 และ F5 โดยมีลักษณะทางกายภาพ น้ำหนักของสารที่ได้ และ %yield ของ sub-fraction แต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 4-3 ซึ่งพบว่า sub-fraction F5 มีปริมาณมากที่สุด รองลงมาเป็น sub-fraction F2 F1 F3 และ F4 ตามลำดับ

ตารางที่ 4-3 ลักษณะทางกายภาพ น้ำหนักของสารที่ได้ และ %yield ของ sub-fraction แต่ละชนิดจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท

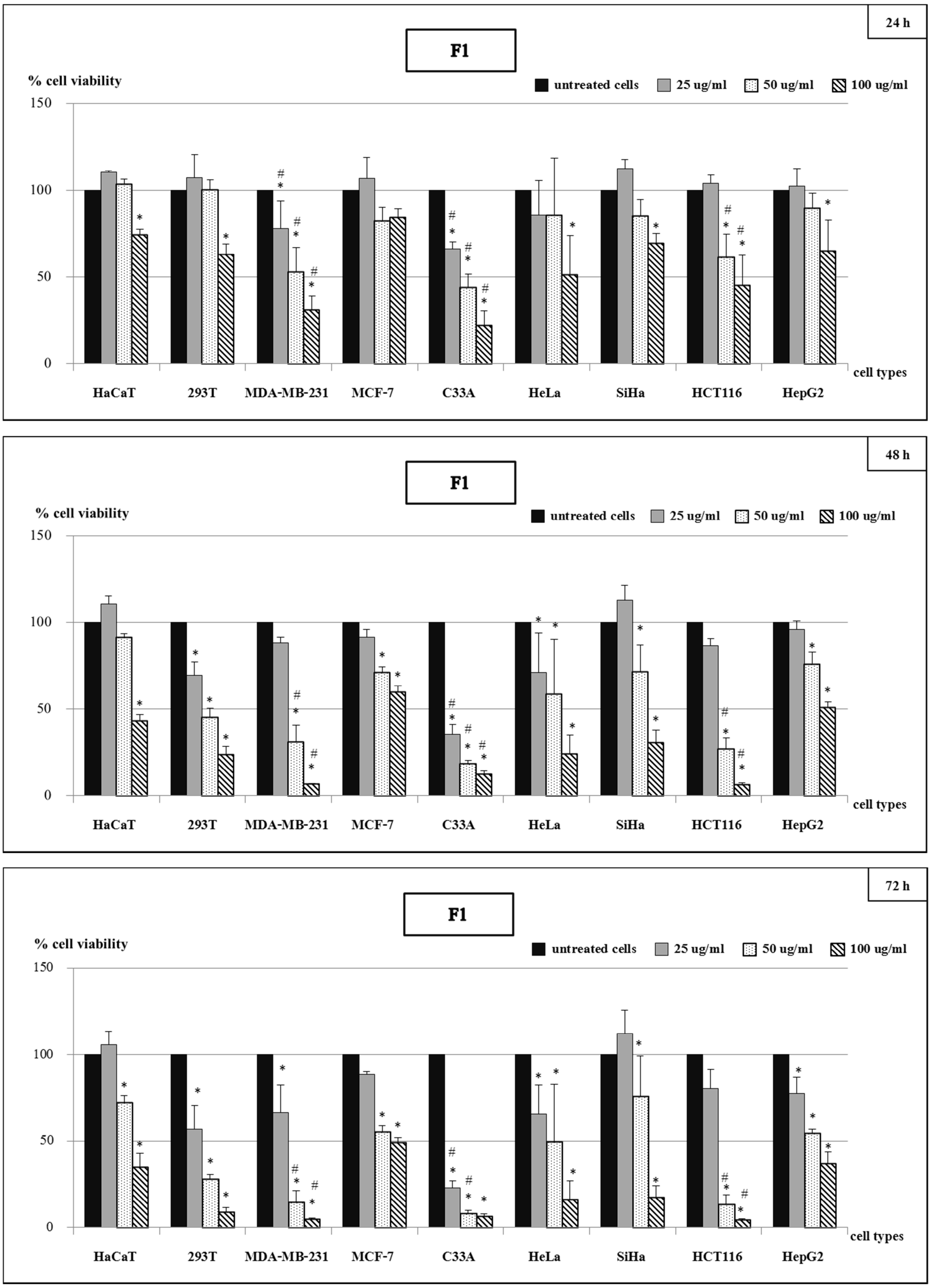
ชนิดของสารสกัด	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	% yield	ลักษณะทางกายภาพ
sub-fraction F1	13	0.13	0.98	เหนียวข้น สีน้ำตาลอมเขียว
sub-fraction F2		0.26	1.97	เหนียวข้น สีน้ำตาล
sub-fraction F3		0.08	0.61	เหนียวข้น สีน้ำตาล
sub-fraction F4		0.07	0.6	เหนียวข้น สีน้ำตาล
sub-fraction F5		5.6	43.03	เหนียวข้น สีน้ำตาลเข้ม



ภาพที่ 4-5 TLC pattern ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (1), sub-fraction F1 (2), sub-fraction F2 (3), sub-fraction F3 (4), sub-fraction F4 (5) และ sub-fraction F5 (6) ที่รันด้วยตัวทำละลาย 0.5% methanol/dichloromethane บันทึกภาพภายใต้แสงยูวี

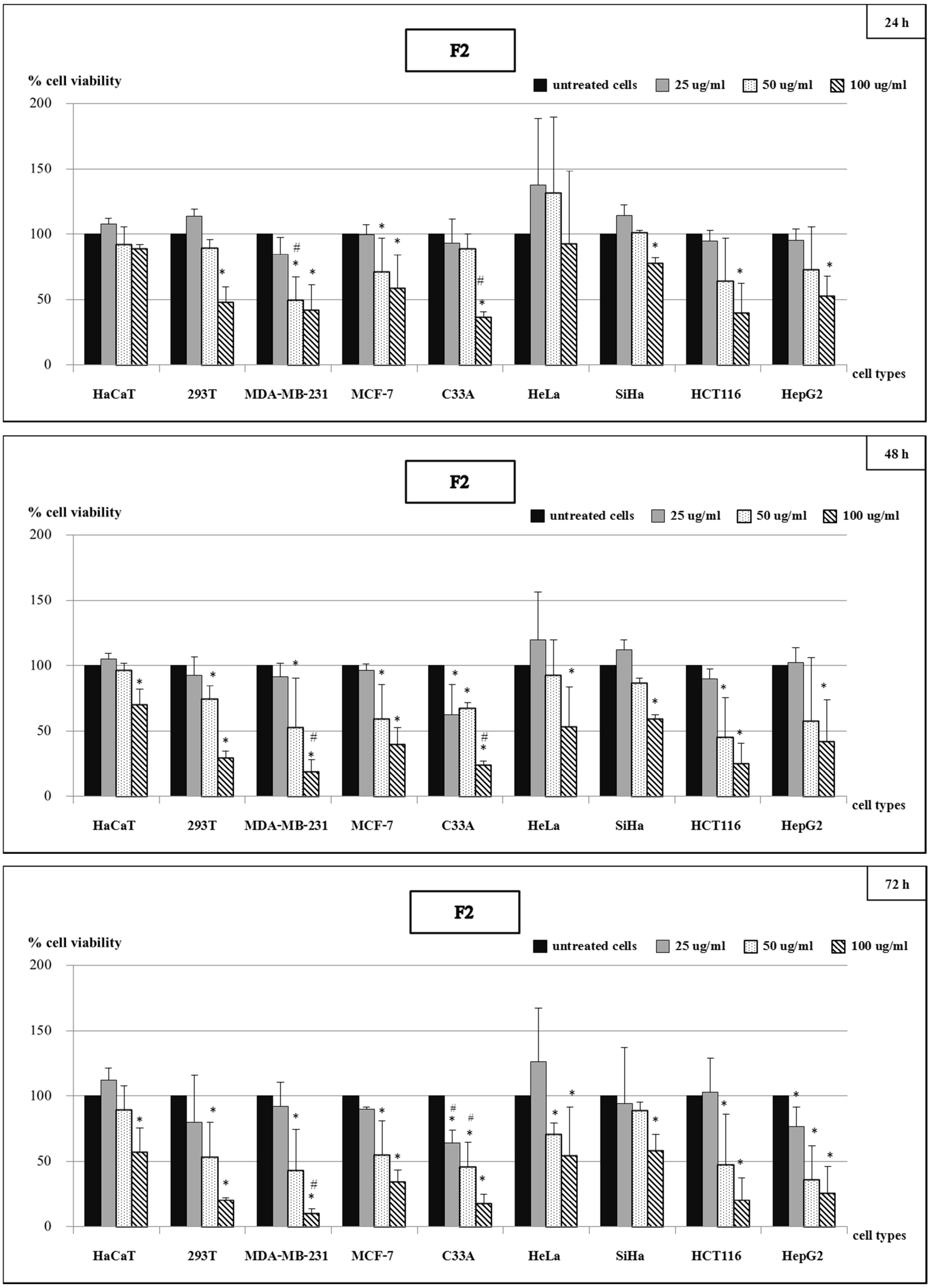
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของ sub-fraction จากส่วนสกัดย่อยเอทิล-อะซิเตท

ผลการทดสอบด้วยวิธี MTT ของ sub-fraction ทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25-100 µg/ml เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง แสดงได้ดังภาพที่ 4-6 ถึง 4-10 ซึ่งพบว่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ต่างๆ จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของ sub-fraction และระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม โดยเมื่อใช้สารที่ความเข้มข้น 100 µg/ml และเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง พบว่า sub-fraction ทั้ง 5 ชนิดจะเป็นพิษต่อทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง โดยเซลล์แต่ละชนิดจะมีระดับการตอบสนองต่อ sub-fraction แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 จะถูกยับยั้งได้ดีที่สุดด้วย sub-fraction F1, F4 และ F3 มีค่า %cell viability เท่ากับ 4.71±0.53, 5.13±0.86 และ 5.55±0.59 ตามลำดับ นอกจากนี้ sub-fraction ทั้ง 3 ชนิดนี้ก็ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน โดยมีค่า %cell viability เท่ากับ 4.16±0.61, 5.32±1.23 และ 5.94±2.15 ตามลำดับ สำหรับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A พบว่า sub-fraction F4 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดนี้ได้ดีกว่า sub-fraction F1 และ sub-fraction F3 เล็กน้อย โดยมีค่า %cell viability เท่ากับ 6.14±2.62, 6.30±1.72 และ 6.86±1.40 ตามลำดับ และในเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 พบว่ามีความไวต่อ sub-fraction F3 มากที่สุด โดยมีค่า %cell viability เท่ากับ 15.18±10.37 รองลงมาคือ sub-fraction F4 และ F2 มีค่า %cell viability เท่ากับ 9.64±2.88 และ 25.43±20.53 ตามลำดับ อย่างไรตาม ผลการทดสอบพบว่า sub-fraction ทั้ง 5 ชนิดนี้ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งด้วยหากใช้ความเข้มข้นสูงและเวลาบ่มที่นาน ซึ่งเมื่อพิจารณาฤทธิ์ของ sub-fraction ทั้งหมดในทุกช่วงเวลา พบว่าที่ 24 ชั่วโมง sub-fraction F1 ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 50 µg/ml ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง แต่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง C33A, MDA-MB-231 และ HCT116 ได้ ดังนั้น sub-fraction F1 จะถูกเลือกเพื่อนำไปแยกหาสารประกอบบริสุทธิ์ต่อไป

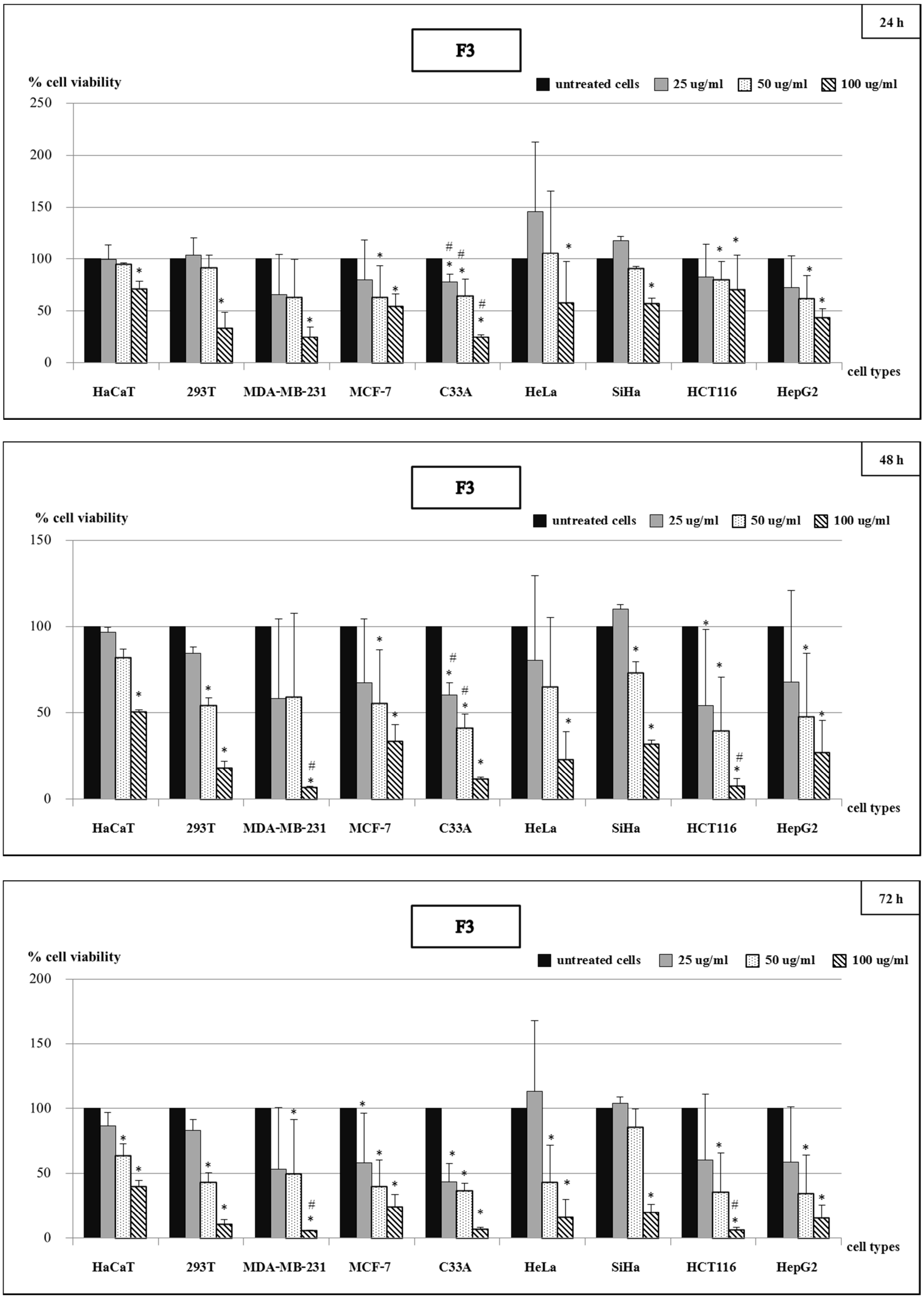


ภาพที่ 4-6 การมีชีวิตรอดของเซลล์ต่างๆ ที่ได้รับ sub-fraction F1 ที่ความเข้มข้น 25 - 100 μg/ml เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

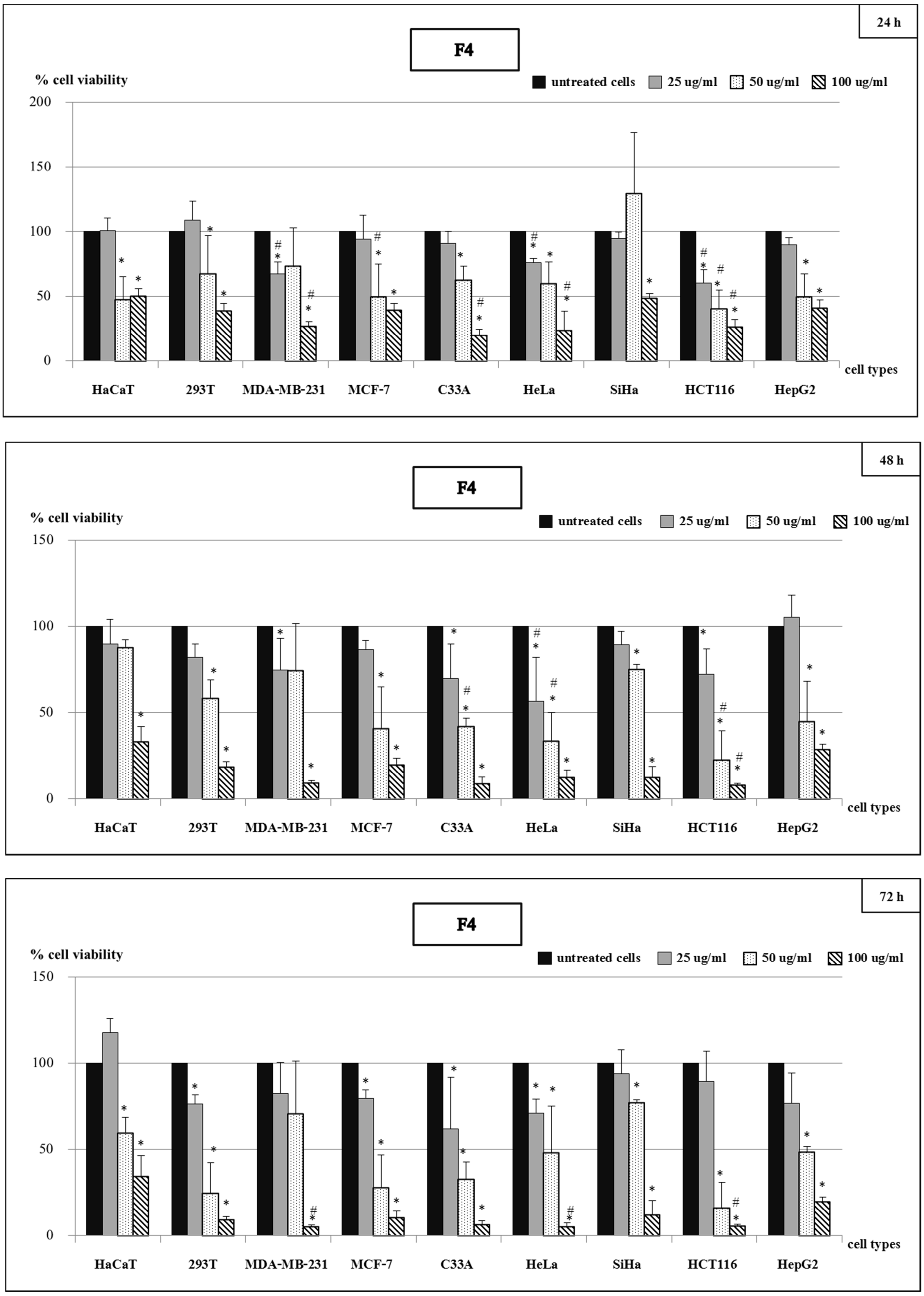
(* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัด (p<0.05) และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นเดียวกัน (p<0.05))



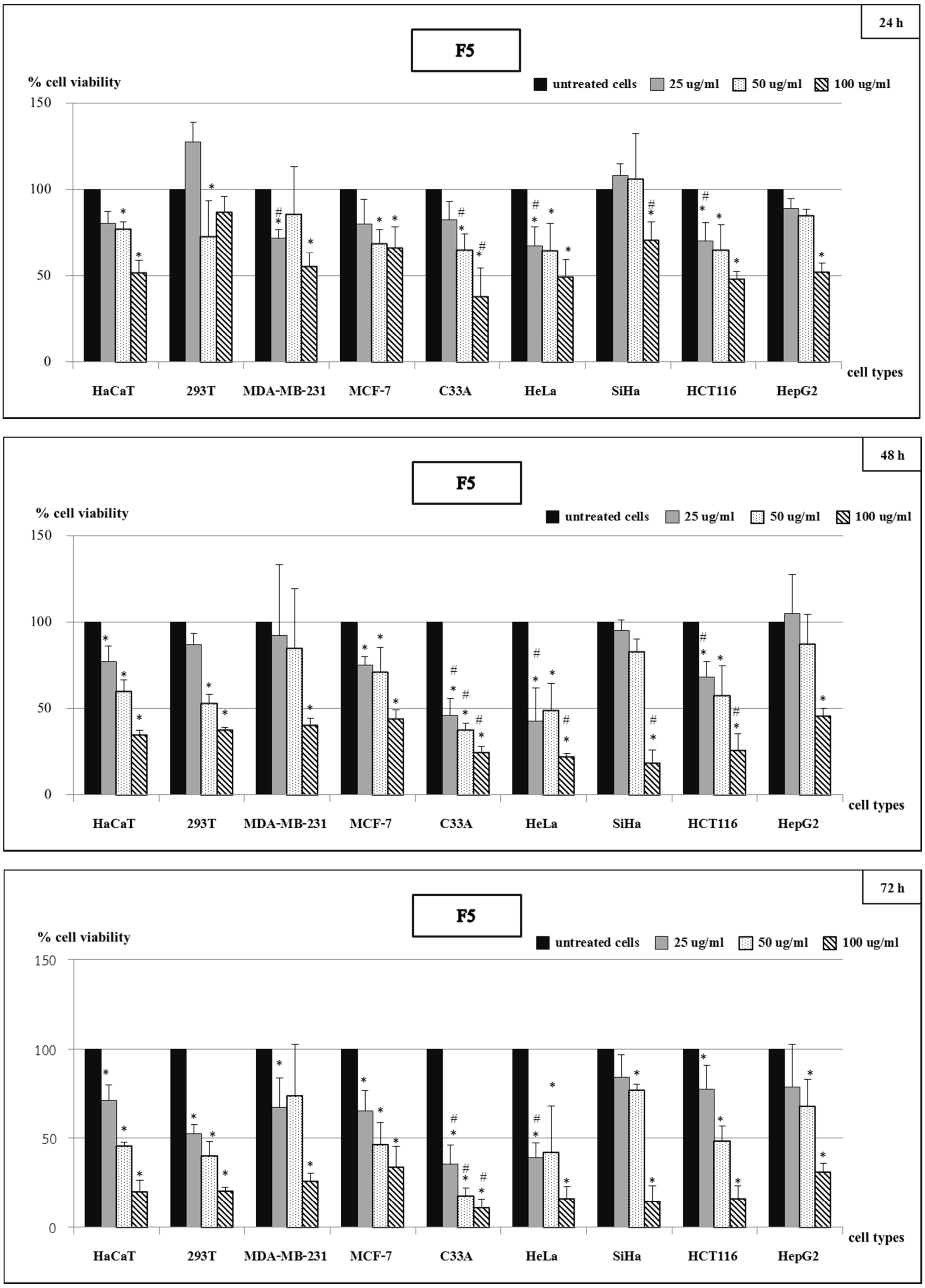
ภาพที่ 4-7 การมีชีวิตรอดของเซลล์ต่างๆ ที่ได้รับ sub-fraction F2 ที่ความเข้มข้น 25 - 100 µg/ml เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง
(* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัด (p<0.05) และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นเดียวกัน (p<0.05))



ภาพที่ 4-8 การมีชีวิตรอดของเซลล์ต่างๆ ที่ได้รับ sub-fraction F3 ที่ความเข้มข้น 25 - 100 μg/ml เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง
(* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัด ($p<0.05$) และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นเดียวกัน ($p<0.05$))



ภาพที่ 4-9 การมีชีวิตรอดของเซลล์ต่างๆ ที่ได้รับ sub-fraction F4 ที่ความเข้มข้น 25 - 100 µg/ml เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง
(* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัด ($p<0.05$) และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นเดียวกัน ($p<0.05$))



ภาพที่ 4-10 การมีชีวิตรอดของเซลล์ต่างๆ ที่ได้รับ sub-fraction F5 ที่ความเข้มข้น 25 - 100 μg/ml เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

(* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัด (p<0.05) และ # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นเดียวกัน (p<0.05))

บทที่ 5
อภิปราย และสรุปการทดลอง

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเหง้าเร่วหอมซึ่งเป็นพืชสมุนไพรและส่วนผสมของเครื่องปรุงอาหารต่างๆ ของชาวจันทบุรีนั้น มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบได้ โดยที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง โดยฤทธิ์จะขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ ความเข้มข้นที่ใช้และระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม

ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของเหง้าเร่วหอมนี้ได้ถูกรายงานไว้ในงานวิจัยของ Tachai และ Nuntawong (2016) ซึ่งได้ทำการสกัดสารจากเหง้าเร่วหอมด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล โดยสกัดแบบต่อเนื่องกันตามลำดับ ซึ่งพบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ชนิด NCI-H187 ได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.33 μg/ml แต่ไม่แสดงฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งช่องปาก KB ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยชิ้นนี้ที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็ง MCF-7 จะถูกยับยั้งได้ก็ต่อเมื่อใช้สารสกัดหยาบเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมที่ความเข้มข้นสูง (ค่า IC_{50} เท่ากับ 272 μg/ml) (ตารางที่ 4-2) นอกจากนี้ สารสกัดจากดอกดาหลา (*Etlingera elatior*) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Etlingera* เช่นเดียวกับเร่วหอมได้เคยถูกรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MDA-MB-231 ได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 173.1 และ 196.2 μg/ml ตามลำดับ (Ghasemzadeh et al., 2015) ซึ่งจะเห็นว่าเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 มีการตอบสนองต่อสารสกัดหยาบจากเหง้าเร่วหอมได้ดีกว่าสารสกัดจากดอกดาหลา แต่จะต่างจากเซลล์ MCF-7 ที่มีการตอบสนองที่ตรงกันข้าม

นอกจากนี้ ในงานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมต่อเซลล์ต่างๆ และเปรียบเทียบฤทธิ์กับสารสกัดจากพืชอีก 2 ชนิดซึ่งอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เช่นเดียวกัน คือ ข่า และขมิ้น (ตารางที่ 4-2) แม้ผลการทดสอบจะแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากพืชอีก 2 ชนิดให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเหง้าเร่วหอม แต่ฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมพบว่าไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งทั้งสองชนิด (293T และ HaCaT) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของเหง้าเร่วหอมที่จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง อันจะเป็นผลดีต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งต่อไปในอนาคต

จากนั้น เมื่อนำส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยน้ำ มาทดสอบฤทธิ์กับเซลล์มะเร็ง พบว่าส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ทุกชนิด โดยจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม ในขณะที่ส่วนสกัดย่อยน้ำไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า สารที่ออกฤทธิ์ในเหง้าเร่วหอมนี้น่าจะไม่ใช่กลุ่มสารที่มีความเป็นขั้วสูงใกล้เคียงกับน้ำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tachai และ Nuntawong (2016) ที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งพบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งจากส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน และไม่พบฤทธิ์จากส่วนสกัดเมทานอลซึ่งมีความเป็นขั้วที่สูงกว่า รวมถึงจากงานวิจัยของ Kumar และคณะ (2004) ที่พบว่าส่วนสกัดย่อยน้ำของสารสกัดหยาบเมทานอลจากพืช *Andrographis paniculata* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้น้อยกว่าส่วนสกัดย่อยอื่นๆ และจากภาพที่ 4-3 แสดงให้เห็นว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 400 μg/ml ที่เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง จะแสดงฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าส่วน

สกัดย่อยเฮกเซน (ภาพที่ 4-2) และไม่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง โดยเซลล์มะเร็งที่มีการตอบสนองต่อส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมากที่สุด 4 อันดับแรก ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 (ยับยั้งได้ 62.33%) เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A (ยับยั้งได้ 48.37%) เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 (ยับยั้งได้ 44.57%) และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 (ยับยั้งได้ 43.38%) ซึ่งจะเห็นได้ว่า ฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งนั้นมีความหลากหลาย กล่าวคือ สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายกลุ่ม อันจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งชนิดต่างๆ ได้ อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะเป็นเซลล์มะเร็งกลุ่มเดียวกันแต่อาจมีการตอบสนองต่อสารสกัดที่แตกต่างกันได้ ดังเช่น เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MDA-MB-231 ที่ให้ระดับการตอบสนองต่อส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4-3) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เซลล์แต่ละชนิดนั้นมีพื้นหลังที่แตกต่างกัน ทั้งในด้านจีโนไทป์ ฟีโนไทป์ และระยะของโรคมะเร็ง เป็นต้น ดังนั้น ในการนำไปประยุกต์ใช้จึงจะต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆ เหล่านี้ร่วมด้วย อีกทั้ง ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทยังคงประกอบไปด้วยสารหลากหลายชนิด จึงเป็นไปได้อีกทางหนึ่งว่า สารที่เป็นตัวออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดนั้นอาจจะเป็นสารคนละชนิดกัน

และเนื่องจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ที่ดีที่สุดต่อเซลล์มะเร็งโดยที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจึงถูกนำไปสกัดแยกเพื่อหาสารที่ออกฤทธิ์ต่อไปด้วยวิธีคอลัมน์โคร-มาโตกราฟี และได้ sub-fraction ออกมาทั้งหมด 5 ชนิด คือ sub-fraction F1, F2, F3, F4 และ F5 ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า sub-fraction ทั้งหมดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบได้ โดยขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้และระยะเวลาในการบ่มเช่นเดียวกันกับส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (ภาพที่ 4-6 ถึง 4-10) อย่างไรก็ตาม ในสภาวะที่ sub-fraction ต่างๆ สามารถลดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด กลับพบว่ามีผลกระทบต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งได้เช่นกัน ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งแต่ยังคงยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ คือ เมื่อใช้ความเข้มข้นสารน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 μg/ml และใช้เวลาในการบ่มเท่ากับ 24 ชั่วโมง ซึ่งที่สภาวะนี้ sub-fraction F1 แสดงความเป็นพิษที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง โดยเซลล์มะเร็งที่ตอบสนองได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A, เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ซึ่งจะเห็นได้ว่า sub-fraction F1 ยังคงแสดงฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลากหลายกลุ่มและเป็นเซลล์กลุ่มเดียวกันกับที่ตอบสนองต่อส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทด้วย ดังนั้น เซลล์มะเร็งในกลุ่มนี้จะถูกนำไปใช้ในการทดสอบกับสารประกอบบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก sub-fraction F1 ต่อไป

5.2 สรุปผลการทดลอง

1. สารสกัดหยาบจากเหง้าเร่วหอมสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231, HepG2, MCF-7, HCT116, HeLa, C33A และ SiHa ได้ โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดและช่วงเวลาที่ใช้ในการทดสอบ

2. สภาวะที่ทำให้สารสกัดหยาบเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมแสดงฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งได้โดยที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง คือ สภาวะที่ใช้เวลาในการบ่มที่น้อย (24 ชั่วโมง) หรือลดความเข้มข้นของสารลงหากต้องใช้เวลาบ่มที่นานขึ้น (72 ชั่วโมง)

3. ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทสามารถลดความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้ดีที่สุดโดยที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง

4. sub-fraction ทั้ง 5 ชนิด (F1 ถึง F5) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบได้ทุกชนิด แต่ sub-fraction F1 จะไม่เป็นพิษต่อที่ไม่ใช่มะเร็ง เมื่อใช้ความเข้มข้นสารน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 μg/ml และใช้เวลาทดสอบที่ 24 ชั่วโมง โดยเซลล์มะเร็งที่ถูกยับยั้งได้แก่ MDA-MB-231, C33A และ HCT116

ผลผลิต (Output)

Wanichwatanadecha P, Srisook E, Ponglikitmongkol M, Somwang T, Singaed O. (2016). Anti-cancer effect of *Etlingera pavieana* rhizome extracts. Proceedings of The 6^{th} International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6). 21^{st} – 23^{rd} January 2016. Khon Kaen, Thailand.

Anti-cancer effect of *Etlingera pavieana* rhizome extracts

Panata Wanichwatanadecha*[a], Ekaruth Srisook[b], Mathurose Ponglikitmongkol[c], Tatiyar Somwang[a], Onanong Singaed[a]

[a]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, Thailand 20131,
[b]Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, Thailand 20131
[c]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand 10400

*panata@buu.ac.th phone +66-38103058 fax +66-38393495

ABSTRACT

The ethanolic extract of *E. pavieana* rhizome and its fractions were evaluated for their anti-cancer activity in four different cancer cell types (HepG2, HCT116, MCF-7, MDA-MB-231) and two non-cancerous cell lines (293T and HaCaT). The MTT assay showed that the ethanolic extract preferentially reduced the proliferation of cancer cells in a dose- and time- dependent manner rather than the non-cancerous ones. Among three fractions, the ethyl acetate fraction exhibited strong inhibition against cancer cell growth and it was thus separated by column chromatography. The obtaining F1 to F5 subs-fractions were subsequently tested for their cytotoxicity. The results indicated the anti-proliferative capability of all five subs-fractions, but only the F1 sub-fraction showed specifically targeted effect against cancer cells. Treatment cancer cells with F1 led to cell morphological change and reduced in colony formation. The bioactive compounds in the F1 sub-fraction are under identifying and the anti-cancer activity of F1- isolated pure compounds will be further investigated.

Keywords: anti-cancer activity, *Etlingera pavieana* rhizome

1. INTRODUCTION

Chemotherapeutic drug resistance of cancer cells is a *major* cause of treatment failure leading to increase the mortality rate of cancer patients. Attempts to search for the new bioactive phytochemical compounds as alternative anti-cancer agents are challenging. Thailand is a tropical country with a high biodiversity of plants. *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. or Reaw-Horm, belonging to Zingiberaceae family, is one of plants generally cultivated in eastern region of Thailand. Traditionally, its rhizome has been used as an ingredient in Moo lieng noodle, a signature dish of Chantaburi province and also used as folk medicine in treating diuresis, fever and flatulence [1]. The extracts of *E. pavieana* rhizome have been shown to exert anti-inflammatory and antioxidant activities [2]. Although the extracts and isolated compounds from many plants in Zingiberaceae family have been reported for their potential to inhibit tumor growth both in *vitro* and *in vivo* such as *Curcuma longa* and *Zingiber officinale* [3-4], nonetheless, there is no report for that of *E. pavieana*. This prompts us to study the anti-proliferative effect of *E. pavieana* rhizome on various types of cancer cell lines and compare to the non-cancerous ones.

2. MATERIALS AND METHODS

Preparation of plant extracts

E. pavieana rhizomes were collected from Khung district, Chantaburi province, Thailand and authenticated by Dr. Benchawan Chewprecha, a plant taxonomist at Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University. After washing with tap water, the fresh rhizomes were cut into small pieces, dried in a hot-air oven at 50°C and homogenized by a blender. Fine powder of rhizomes was extracted with 95% ethanol by maceration and then filtered by a filter paper.

The solvent was removed by rotary evaporation at 42 °C. The crude extract was subsequently partitioned with hexane and ethyl acetate, respectively. The ethyl acetate fraction was then subjected to fractionation by column chromatography using dichloromethane/methanol mixture as a mobile phase. Based on TLC spot pattern analysis, five sub-fractions, F1 to F5, were obtained. DMSO was used as a solvent to dissolve all extracts with the final concentration in the treatment of 0.2% (v/v).

Cell culture

Four human cancer cell lines (hepatoma HepG2, *colorectal carcinoma* HCT116, and breast *adenocarcinoma* MCF-7 and MDA-MB-231), as well as two non-cancerous cell lines (*embryonic kidney* 293T and keratinocyte HaCaT) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FBS and antibiotics at 37 °C in humidified air containing 5% CO_2.

Cell viability assay

Cell viability was determined by MTT assay. Cells were seeded in 96-well plates and treated with various concentrations of extracts as indicated and incubated for 24, 48 or 72 h. MTT assay was performed as previously described [5]. The absorbance at 540 nm was measured and converted to percentage of cell viability of which cells treated with 0.2% DMSO at 24 h was set to 100%. Each experiment was performed in triplicate.

Statistics

The Student's *t* test was used to determine the significant difference between treated and untreated cells of each cell type at $p < 0.05$ and symbolized by an asterisk (*). If the treated cancer cell was significant inhibited, it was then consequently compared to the noncancerous cells at the same treated concentration and symbolized by a sharp sign (#).

3. RESULTS

Cytotoxic effect of *E. pavieana* rhizome crude extract

The effect of ethanolic extract of *E. pavieana* rhizome on cell proliferation was determined by MTT assay. As shown in Figure 1, the extract could suppress cell proliferation of all four cancer cell lines in a dose- and time- dependent manner comparing to cells treated with 0.2% (v/v) DMSO (the black solid line), indicating the anti-tumor activity of *E. pavieana* rhizome extract. As a much lesser effect on 293T and HaCaT cells, the cancer cells are preferentially targeted by the extract for inhibiting growth. The anti-cancer effect was obviously observed when at least 200 µg/mL of extract was used to treat cells for at least 24 h. With 400 µg/mL of extract and 24h of incubation, approximately 50% of each cancer cells died while 80% of non-cancerous cells were alive. However, the cytotoxicity of 400 µg/mL extract towards 293T cells after 72h incubation should be concerned.

Anti-proliferative effect of ethyl acetate fraction and its sub-fractions

The various concentrations of hexane, ethyl acetate and aqueous fractions were examined for their cytotoxicity by using MTT assay at 24h of incubation. Comparing to untreated cells and non-cancerous cells, the dramatic reduction in cell viability was observed in cancer cells exposed to ethyl acetate fraction (except MCF-7) rather than the hexane fraction. In contrast, no significant inhibition in cell proliferation was observed in cancer cells treated with aqueous fraction when comparing to the noncancerous ones (Figure 2).

Due to the strongest activity, the ethyl acetate fraction was consequently subjected to be further sub-fractionated by column chromatography. After TLC analysis, the collected fractions with the same TLC spot pattern were grouped and finally gave the five sub-fractions namely F1, F2, F3, F4 and F5, respectively. All sub-fractions were then assayed for their cytotoxicity by MTT method. Although all five sub-fractions exerted their anti-proliferative effect on cancer cells, four of them, except F1, either generate toxic to HaCaT cells (Figure 3). Therefore, the F1 sub-fraction was selected for further isolation of pure compounds. In addition, the cell morphology of F1-treated cells was also observed under inverted microscope. As shown in Figure 4, the morphology of HCT116 cells treated with F1 sub-fraction for 72h was clearly changed and the cell number was decreased sharply comparing to untreated cells. A dose-dependent reduction in colony formation of F1-treated HCT116 cells was also revealed (data not shown). To date, the identification and isolation of pure compounds of F1 sub-fraction are ongoing in our laboratory and the anti-cancer activity of F1-isolated pure compound will be further investigated.

4. CONCLUSIONS

The anti-cancer activity of *E. pavieana* rhizome was here reported for the first time. All the findings indicated the crude extract of *E. pavieana* rhizome and its containing compounds are the promising agents for cancer therapy.

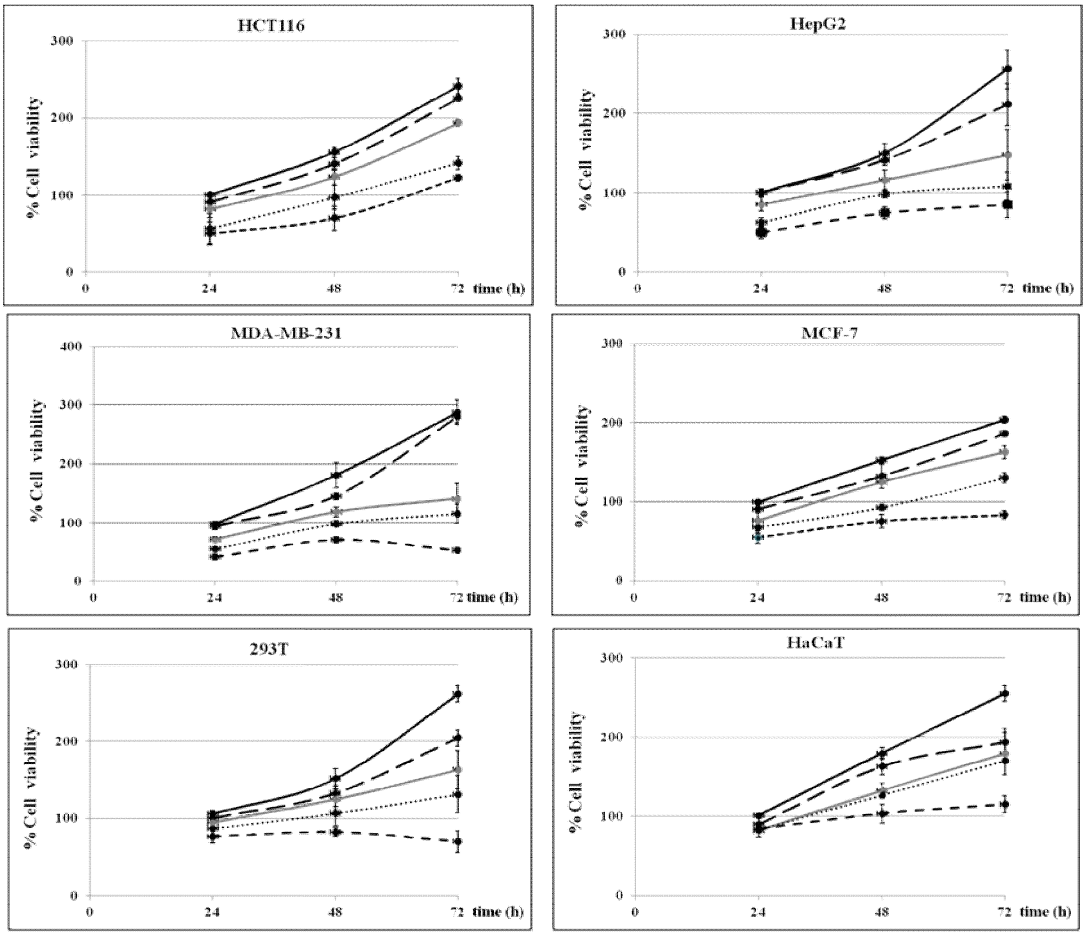


Figure 1. Cytotoxicity of *E. pavieana* rhizome crude extract. The absorbance of converted MTT dye was measured at 540 nm and presented as % cell viability of which 24h-incubated cells was set as 100%. Each line represents the various concentrations of extract;

——— 0.2% DMSO,
— — 50 μg/mL,
——— 100 μg/mL,
.... 200 μg/mL,
- - - 400 μg/mL.

Data are shown as means ± S.D. of two independent experiments, each performed in triplicate.

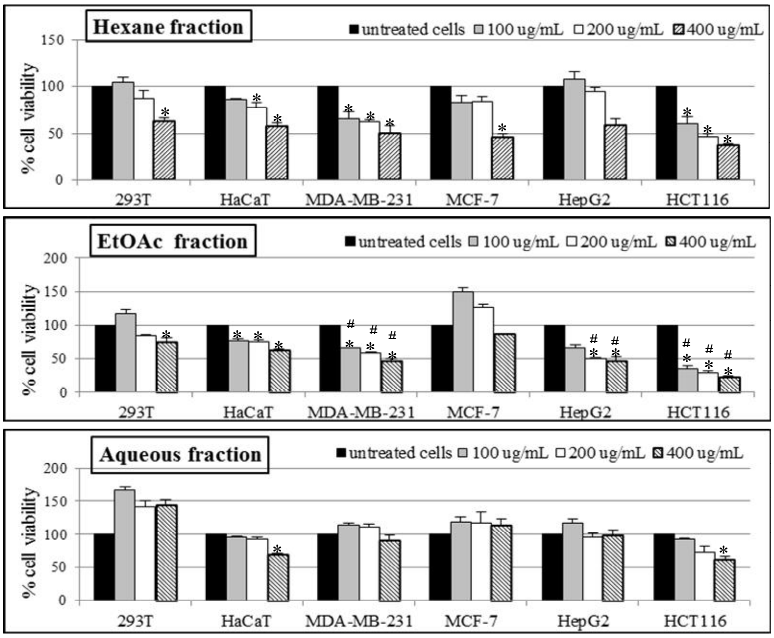


Figure 2. Cell viability under treatment of hexane, ethyl acetate, and aqueous fractions by MTT assay. Cells were exposed to various concentrations of each fraction and incubated for 24 h. The OD_{540} of untreated cells (0.2% DMSO) was set as 100% cell viability. Data are shown as means ± S.D. of two independent experiments, each performed in triplicate. * represents significant growth inhibition of treated cells compared to untreated cells ($p < 0.05$) when # represents significant growth inhibition of cancer cells compared to non-cancerous ones at the same extract concentration ($p < 0.05$).

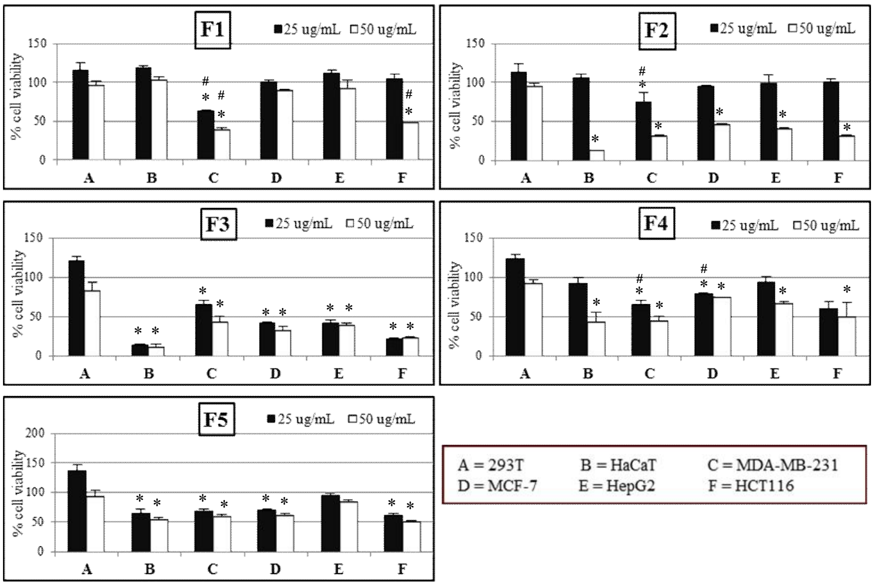


Figure 3. Cytotoxic effect of sub-fractions F1 to F5 by MTT assay. Cells were treated with 25 and 50 μg/mL of each sub-fraction for 24 h. Data are shown as means ± S.D. of two independent experiments, each performed in triplicate. * represents the significant difference between treated and untreated cells ($p < 0.05$) when # represents the significant difference between non-cancerous and cancerous cell lines at the same concentration of extract ($p < 0.05$).

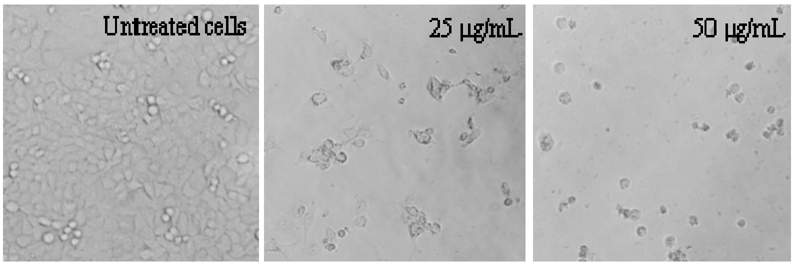


Figure 4. Cell morphology of F1-treated HCT116 cells compared to untreated cells. Cells were treated with 25 and 50 µg/mL F1 sub-fraction for 72 h and observed cell morphological change under inverted microscope. Pictures were taken at total 200X *magnification*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand.

REFERENCES

1. Tachai S, Wangkarn S, Nuntawong N. 2014. Chemical constituents of the rhizome oils of *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Biochem. Syst. Ecol. 57, 410–415.
2. Srisook E, Palachot M, Srisook K. 2012. *In vitro* anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* rhizomes and its compounds in lipopolysaccharide-induced macrophages. Proceedings of the 4th international Conference on Natural Products for Health and Beauty. 28-30 November 2012, Chiang Mai, Thailand.
3. Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, Merritt WM, Han LY, Armaiz-Pena GN, Kamat AA, Spannuth WA, Gershenson DM, Lutgendorf SK, Aggarwal BB, Sood AK. 2007. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway. Clin. Cancer Res. 13(11), 3423-3430.
4. Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H. 1996. Inhibition of Tumor Promotion in SENCAR Mouse Skin by Ethanol Extract of *Zingiber officinale* Rhizome. Cancer Res. 56, 1023-1030.
5. Wanichwatanadecha P, Sirisrimangkorn S, Kaewprag J, Ponglikitmongkol M. 2012. Transactivation activity of human papillomavirus type 16 E6*I on aldo-keto reductase genes enhances chemoresistance in cervical cancer cells. J. Gen.Virol. 93(Pt 5), 1081-1092.

บรรณานุกรม

พงศักดิ์ พลเสนา. (2550a). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณ์ภัณฑ์ ปราจีนบุรี. 301น.

พงศักดิ์ พลเสนา. (2550b). เร่วหอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ "ผลเร่วหอม" ครั้งแรก.หมายเหตุนิเวศวิทยา : บันทึกธรรมชาติหลากเผ่าพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.

สถิติสาธารณสุข 2554 (Public health A.D. 2011). สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข.

เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2551). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ การค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในสมุนไพรจากภาคตะวันออก. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2554). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

Debata PR, Castellanos MR, Fata JE, Baggett S, Rajupet S, Szerszen A, Begum S, Mata A, Murty VV, Opitz LM, Banerjee P. (2013). A novel curcumin-based vaginal cream Vacurin selectively eliminates apposed human cervical cancer cells. Gynecol Oncol. 129(1): 145-153.

Ghasemzadeh A, Jaafar HZ, Rahmat A, Ashkani S. (2015). Secondary metabolites constituents and antioxidant anticancer and antibacterial activities of *Etlingera elatior* (Jack) RM Sm grown in different locations of Malaysia. BMC complementary and alternative medicine. 15(1): 1.

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. Cell. 118(3): 285-296.

Kirana C, McIntosh GH, Record IR, Jones GP. (2007). Anticancer properties of panduratin A isolated from *Boesenbergia pandurata* (Zingiberaceae). J Nat Med. 61: 131–137.

Kumar RA, Sridevi K, Kumar NV, Nanduri S, Rajagopal S. (2004). Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. Journal of ethnopharmacology. 92(2): 291-295

Lee JW, Min HY, Han AR, Chung HJ, Park EJ, Park HJ, Hong JY, Seo EK, Lee SK. (2007). Growth inhibition and induction of G1 phase cell cycle arrest in human lung cancer cells by a phenylbutenoid dimer isolated from *Zingiber cassumunar*. Biol Pharm Bull. 30(8): 1561-1564.

Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, Merritt WM, Han LY, Armaiz-Pena GN, Kamat AA, Spannuth WA, Gershenson DM, Lutgendorf SK, Aggarwal BB, Sood AK. (2007). Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway. Clin Cancer Res. 13(11): 3423-3430.

Liu B, Liu F, Chen C, Gao H. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of ethyl p-methoxycinnamate from *Kaempferia galanga* L. rhizome and its apoptotic induction in human HepG2 cells. Nat Prod Res. 24(20): 1927-1932.

Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. (2004). Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. Cancer Cell. 6(3): 297-305.

Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P, Aggarwal BB. (2001). Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. Oncogene. 20(52): 7597-7609.

Palachot M. (2012). Investigation of anti-inflammatory activity and molecular mechanism of the action of selected zingiberaceae plant extract. Master thesis. Biological science Faculty of Science, Burapha University.

Rahman S, Salehin F, Iqbal A. (2011). In vitro antioxidant and anticancer activity of young *Zingiber officinale* against human breast carcinoma cell lines. BMC Complement Altern Med. 11: 76.

Rao CV. (2004). Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. Mutat Res. 555(1-2): 107-119.

Sabli F, Mohamed M, Rahmat A, Abu Bakar MF. (2012). Cytotoxic Properties of Selected *Etlingera* spp. and *Zingiber* spp. (Zingiberaceae) Endemic to Borneo. Pertanika J. Trop. Agric. Sci. 35(3): 663–671.

Sharma C, Ahmed T, Sasidharan S, Ahmed M and Hussain A. (2009). Use of gemcitabine and ginger extract infusion may improve the efficiency of cervical cancer treatment. African Journal of Biotechnology. 8(24): 7087-7093.

Sinha D, Biswas J, Sung B, Aggarwal BB, Bishayee A. (2012). Chemopreventive and chemotherapeutic potential of curcumin in breast cancer. Curr Drug Targets. 13(14): 1799-1819.

Srisook, K. and Srisook, E. (2011). Evaluation of Antioxidant Capacity of Fractions from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizome. Proceedings of the 3rd International Natural Products for Health and Beauty. (Fulltext, CD version).

Tachai S, Nuntawong N. (2016). Uncommon secondary metabolites from *Etlingera pavieana* rhizomes. Nat Prod Res. 1-5.

Vinothkumar R, Vinothkumar R, Sudha M, Nalini N. (2013). Chemopreventive effect of zingerone against colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. Eur J Cancer Prev. [Epub ahead of print].

Wanichwatanadecha P, Sirisrimangkorn S, Kaewprag J, Ponglikitmongkol M. (2012). Transactivation activity of human papillomavirus type 16 E6*I on aldo-keto reductase genes enhances chemoresistance in cervical cancer cells. J Gen Virol. 93(Pt 5): 1081-1092.

Yang CR, Hsieh SL, Ho FM, Lin WW. (2005). Decoy receptor 3 increases monocyte adhesion to endothelial cells via NF-kappa B-dependent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, and IL-8 expression. J Immunol. 174(3): 1647-1656.

[Online] แหล่งเข้าถึง http://www.kehakaset.com

ประวัติของหัวหน้าโครงการวิจัย และผู้ร่วมวิจัยของโครงการวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ	นางสาวผาณตา วาณิชวัฒนเดชา Ms. Panata Wanichwatanadecha
2. ตำแหน่ง	อาจารย์
3. หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง ชลบุรี 20131 โทรศัพท์ 038-103-058 E-mail: panata@buu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษา	คุณวุฒิ	สาขาวิชา	สถานศึกษา
2553	ปร.ด.	ชีวเคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล
2547	วท.บ.	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

* ได้รับทุนจากโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ตลอดการศึกษา (2544-2553)

5. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

Molecular biology, Biochemistry, Cancer

6. ผลงานตีพิมพ์ (ในช่วงปี ค.ศ. 2012-2016)

1. **Wanichwatanadecha P**, Srisook E, Ponglikitmongkol M, Somwang T, Singaed O. (2016). Anti-cancer effect of *Etlingera pavieana* rhizome extracts. Proceedings of The 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6). 21st – 23rd January 2016. Khon Kaen, Thailand.
2. สิริพร วิลาทอง, กนกพร ก้อนทรัพย์, **ผาณตา วาณิชวัฒนเดชา**. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดเมล็ดและน้ำมันจากเมล็ดตีนเป็ดน้ำ. Proceedings of The 7th National Science Research Conference. 30th – 31st March 2015. Phitsanulok, Thailand.
3. ธติยา สมวัง และ **ผาณตา วาณิชวัฒนเดชา**. การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบตีนเป็ดน้ำและใบตีนเป็ดทราย. Proceedings **of** The 7th National Science Research Conference. 30th – 31st March 2015. Phitsanulok, Thailand.
4. **Wanichwatanadecha P**, Kasempin N, Wilatong S and Khoonthong W (2015). Antibacterial Activity of *Cerbera odollam* Gaertn. Extract against Plant Pathogenic *Xanthomonas*. Proceedings of Pure and Applied Chemistry International Conference 2015 (PACCON2015). 21st – 23rd January 2015. Bangkok, Thailand, p. 501-504.
5. **Wanichwatanadecha P**, Sirisrimangkorn S, Kaewprag J, Ponglikitmongkol M (2012). Transactivation activity of human papillomavirus type 16 E6*I on AKR1C enhances chemoresistance in cervical cancer cells. *J Gen Virol*. 93(1): p. 1081-1092

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 1

1. ชื่อ นายเอกรัฐ ศรีสุข

Mr. Ekaruth Srisook

2. ตำแหน่ง คณบดีคณะวิทยาศาสตร์/ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี 20131

โทรศัพท์ 038-745900 ต่อ 3009

E-mail: ekaruth@buu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ.	คุณวุฒิ	สาขาวิชา	สถานศึกษา
2547	Ph.D.	Chemistry	Inha University, Korea
2539	วท.ม.	อินทรีย์เคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล
2534	วท.บ.	เคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล

5. สาขาที่ชำนาญพิเศษ

Organic synthesis, Medicinal chemistry, Natural products

6. ผลงานตีพิมพ์ (ในช่วงปี ค.ศ. 2012-2016)

1. **Ekaruth Srisook**, Mullika Palachot, and Klaokwan Srisook. *In vitro* anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* rhizomes and its compounds in lipopolysaccharide-induced macrophages. Proceeding of the 4th International Conference on Natural Products for Health and Beauty. Chiangmai,, Thailand, 28-30 November, 2012. pp. 551.329-551.331. ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2555.
2. Mullika Palachot, Klaokwan Srisook, and **Ekaruth Srisook**. Anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. rhizomal extract mediated through heme oxygenase-1 activity. International Journal of Medicinal and Aromatic Plants. (Submitted). ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2554.
3. **Ekaruth Srisook*** and **Klaokwan Srisook**. Inhibitory effect on nitric oxide production of active compounds from *Etlinger pavieana* rhizomes. Natural Product Research. (Manuscript in Preparation). ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2555.
4. Klaokwan Srisook, Doungnapa Buapool, Rattiya Boonbai, Panadda Simmasut, Yaowaluck Charoensuk, **Ekaruth Srisook**. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less herbal tea. Journal of Medicinal Plants Research, 6; 4077-4081.
5. Sirikun Pethuan, Panida Duangkaew, Songklod Sarapusit, **Ekaruth Srisook**, Pornpimol Rongnoparut. Inhibition against mosquito cytochrome P450 enzymes by rhinacanthin-A, -B, and -C elicits synergism on cypermethrin cytotoxicity in *Spodoptera frugiperda* cells. Journal of Medical Entomology. 2012 49(5):993-1000
6. Doungnapa Buapool, Nadtaya Mongkol, Jirapa Chantimal, Sittiruk Roytrakul, **Ekaruth Srisook,** Kloakwan Srisook. Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation.

Journal of Ethnopharmacology. 2013; 4: 495-504. ทุนวิจัยงบจากรายได้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ปี 2554

7. Klaokwan Srisook, Nattaya Nounnang, Yupin Thabthim, and **Ekaruth Srisook**. A comparative study of antioxidant and anti-tyrosinase activities of rhizomes and leaves of *Etlingera pavieana*. Proceeding of the 4th International Conference on Natural Products for Health and Beauty. Chiangmai,, Thailand, 28-30 November, 2012. pp. 551.332-551.335. ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2556.
8. กล่าวขวัญ ศรีสุข, สุดารัตน์ อินทสุวรรณ, กิ่งกาญจน์ วัชระนาวี และ**เอกรัฐ ศรีสุข**. ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารประกอบที่แยกได้จากใบสำมะง่า. Proceeding of the 5th Science Research Conference, University of Phayao, Thailand, 2013, pp. 11-15. ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2555.
9. Phisit Pouyfung, Aruna Prasopthum, Songklod Sarapusit, **Ekaruth Srisook**, Pornpimol Rongnoparut. Mechanism-based Inactivation of Cytochrome P450 2A6 and 2A13 by *Rhinacanthus nasutus* Constituents. Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 2014; 29:75-83.
10. Pawana Buranakit, Klaokwan Srisook, **Ekaruth Srisook** and Karnjana Hrimpeng. Bioassay-guided isolation, characterized and antibacterial activity of isolated compound from *Zingiber mekongense* rhizome. Proceeding of the 1st Joint ACS AGFD – ACS ICSCT Symposium on Agricultural and Food Chemistry, Bangkok, Thailand, 2014, pp. 185-190.
11. กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมาขันธ์, ปริยาภา เกตุกูล, พรสุดา กันแก้ว, **เอกรัฐ ศรีสุข**, กาญจนา หริ่มเพ็ง, เบญจวรรณ ชิวปรีชา, และคำรณ เลียดประถม. (2557). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 19 (ฉบับพิเศษ): 304-311. ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2556.
12. Rattanawadee Kotewong, Panida Duangkaew, **Ekaruth Srisook**, Songklod Sarapusit, Pornpimol Rongnoparut. Structure-function relationships of inhibition of mosquito cytochrome P450 enzymes by flavonoids of *Andrographis paniculata*. Parasitology research. 2014; 113(9): 3381-3392. ทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว)และมหาวิทยาลัยมหิดล
13. Patcharee Klaiwattana, Klaokwan Srisook, **Ekaruth Srisook** and Verapong Vuthiphandchai. Effect of cryopreservation on lipid composition and antioxidant enzyme activity of seabass (*Lates calcarifer*) sperm. Iranian Journal of Fishery Science (Submitted). ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2552.
14. Klaokwan Srisook,*, **Ekaruth Srisook***, Wenuka Nachaiyo, Mingkwan Chan-In, Jitra Thongbai, Karnjanapa Wongyoo, Sasithorn Chawsuanthong, Kanita Wannasri, Sudarat Intasuwan and Kingkan Watcharanawee. (2015). Bioassay-guided fractionation of anti-inflammatory agents from Clerodendrum inerme (L.) Gaertn. leaves and its mechanistic action through the suppression of iNOS and COX-2 pathways in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. Journal of Ethnopharmacology. 165, 94-102. ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2554/2555.
15. Prasopthum A, Pouyfung P, Sarapusit S, **Srisook E**, Rongnoparut P. (2015). Inhibition effects of Vernonia cinerea active compounds against cytochrome P450 2A6 and human

monoamine oxidases, possible targets for reduction of tobacco dependence. Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 30, 174-181.

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นางสาว มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Mathurose Ponglikitmongkol
2. **ตำแหน่งปัจจุบัน** ศาสตราจารย์
3. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

   ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กทม.

   โทรศัพท์ 02-201-5455

   โทรสาร 02-354-7174

   Email: mathurose.pon@mahidol.ac.th
4. **ประวัติการศึกษา**

คุณวุฒิ	ชื่อสถานศึกษา และประเทศ
Doctor of Philosophy (Molecular Biology)	Universite Louis Pasteur, France
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยมหิดล, ประเทศไทย
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย
ประกาศนียบัตร (Biosafety BSL-3)	Emory University, USA

5. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ**

   Biochemistry, Molecular Biology

6. **ผลงานตีพิมพ์ (ในช่วงปี ค.ศ. 2012-2016)**

1. Maneenual K, Ponglikitmongkol M, Reutrakul V and Wanikiat P. Inhibition of Neutrophil chemotaxis and superoxide anion generation by a pure compound from *Artocarpus lakoocha* Roxb. Thai J Pharmacol (2012), 34, 2, 28-36.
2. Wanichwatanadecha P, Sirisrimangkorn S, Kaewprag J and Ponglikitmongkol M. Transcriptional activity of human papillomavirus type16 E6*I on AKRC1 enhances chemoresistance in cervical cancer cells. *J Gen Virol.* (2012) 93: 1081-1092.
3. Chantaren P, Ruamviboonsuk P, Ponglikitmongkol M, Tiensuwan M, Promso S. Major single nucleotide polymorphisms in polypoidal choroidal vasculopathy: a comparative analysis between Thai and other Asian populations. *Clin Ophthalmol*.(2012) 6: 465-71.
4. Sritara C, Charoenphun P, Ponglikitmongkol M, Musikarat S, Utamakul C, Chokesuwattanasakul P, Thakkinstian A. Serum Oncofetal Fibronectin (onfFN) mRNA in Differentiated Thyroid Carcinoma (DTC): Large Overlap between Disease-Free and Metastatic Patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. (2012) 13: 3223-8.
5. Chamutpong S., Ponglikitmongkol M., Charoennitikul W., Mudsri S., Poonswad P. Hybridisation in the wild between the great hornbill (*Buceros bicornis*) and the

rhinoceros hornbill (*Buceros rhinoceros*) in Thailand and its genetic assessment. *Raffles Bulletin of Zoology* (2013), 61(1): 349-358.

6. Sroijak, N., Ponglikitmongkol, M. 17β-Estradiol suppresses MHC class I chain-related B gene expression via an intact GC box. *Biochemistry and Cell Biology*. (2013) 91(2): 102-8. doi: 10.1139/bcb-2012-0072.
7. Kaewprag J, Umnajvijit W, Ngamkham J and Ponglikitmongkol M. HPV16 oncoproteins promote cervical cancer invasiveness by upregulating specific matrix metalloproteinases. *PLoS One* (2013) 8(8): e71611. doi:10.1371/journal.pone.0071611.
8. Pitisuphanont V, Sangthong J, Ponglikitmongkol M. Induction of Id-1 expression correlates with cell nvasion ability of HPV16 but not HPV58 positive cervical cancer cells. Proceedings of the 40^{th} congress on Science and Technology of Thailand (2014), P. 491-495.