รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินคุณสมบัติของสารประกอบพอลิฟีนอลจากใบชาขลู่ในการส่งเสริมปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

Assessment of pro-oxidant activity of polyphenolic compounds in *Pluchea indica* leaves in relating to their cytotoxicity toward cancer cells

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ผาณตา เอี้ยวซิโป

นางสาว รสสุคนธ์ พูลบุตร

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๓

มหาวิทยาลัยบูรพา

สัญญาเลขที่ SC๐๕/๒๕๖๓

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินคุณสมบัติของสารประกอบพอลิฟีนอลจากใบชาขลู่ในการส่งเสริมปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

Assessment of pro-oxidant activity of polyphenolic compounds in *Pluchea indica* leaves in relating to their cytotoxicity toward cancer cells

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ผาณตา เอี้ยวซิโป

และ

นางสาว รสสุคนธ์ พูลบุตร

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

แม้ว่าการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดจะมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเซลล์มะเร็งทั้งชนิดก้อนและมะเร็งในระบบเลือด แต่ผลข้างเคียงที่ได้จากการได้รับจากยาเคมีบำบัดนั้นทำให้เกิดความทุกข์ทรมานกับผู้ป่วยและอาจเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิต การค้นหาสารจากธรรมชาติที่มีการออกฤทธิ์อย่างจำเพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็ง น่าจะเป็นทางเลือกที่ช่วยแก้ปัญหาข้างต้นได้ จากงานวิจัยก่อนหน้าที่ได้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำจากใบชาขลู่ (*Pluchea indica* (L.) Less. ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาต่อเนื่องถึงชนิดและฤทธิ์ของสารสำคัญที่พบในสารสกัดและเปรียบเทียบกับผลที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง ผลจากการทดสอบพบว่า สารสำคัญที่พบในปริมาณมากที่สุดในสารสกัดขลู่ คือ 4,5-di-caffeoylquinic acid (4,5-diCQA) ซึ่งเมื่อนำสารนี้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก C-33A และเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 162 ± 6.34 และ 171 ± 5.22 µM ตามลำดับ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero ต่ำกว่า (IC_{50} มากกว่า 200 µM) นอกจากนี้ ยังได้ทำการตรวจสอบระดับของอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) ภายในเซลล์มะเร็งทั้งสอง พบว่า เซลล์มะเร็งที่ได้รับสารทดสอบจะมีระดับ ROS เพิ่มสูงขึ้น 182.96 ± 15.04% และ 237.24 ± 52.35% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ Vero จะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ผลจากการทดลองนี้จึงเป็นข้อสรุปในเบื้องต้นว่า สาร 4,5-diCQA นี้ น่าจะสามารถนำไปเป็นสารตั้งต้นในการพัฒนายาต้านมะเร็งเต้านมหรือปากมดลูกที่มีประสิทธิภาพและลดอาการข้างเคียงให้กับผู้ป่วยได้

<u>คำสำคัญ</u> : สารสกัดจากใบชาขลู่, *Pluchea indica*, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง, 4,5-di-caffeoylquinic acid, ROS

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากโครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่สัญญา SC๐๕/๒๕๖๓ และได้รับการสนับสนุนจากหน่วยบริการนวัตกรรมทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (SIF-IN-55300056)

ทางผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย มา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีการดำเนินการวิจัย	7
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	11
ผลผลิต	18
บรรณานุกรม	19

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิคจากการทดสอบด้วยวิธี Folin-ciocalteu	11
4.2	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero หลังได้รับสาร 4,5-di-CQA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	15
4.3	ระดับ ROS ภายในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C-33A เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero	16

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลที่พบในสารสกัดจากชาใบขลู่ 13
4.2 ค่า IC_{50} (μM) ของสาร 4,5-di-CQA ต่อเซลล์ทดสอบทั้ง 6 ชนิด 15

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและสรุปความเป็นมาของโครงการฯ

โรคมะเร็งเป็นโรคที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตมากเป็นอันดับหนึ่งในกลุ่มของโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง และจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของโลก แม้ว่าการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดจะมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเซลล์มะเร็งทั้งชนิดก้อนและมะเร็งในระบบเลือด แต่ผลข้างเคียงที่ได้จากการได้รับจากยาเคมีบำบัดนั้นทำให้เกิดความทุกข์ทรมานกับผู้ป่วยและอาจเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ (Ohe, 2002; Nair & Gongora, 2016) อีกทั้งยังพบว่า เซลล์มะเร็งสามารถพัฒนาให้ดื้อต่อยาเคมีบำบัดได้หลังได้รับยาไปแล้วระยะหนึ่งด้วย ดังนั้น จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องค้นหายาเคมีบำบัดชนิดใหม่ขึ้นมาใช้ควบคู่หรือทดแทนยาเคมีตัวเดิมเพื่อแก้ปัญหานี้ และเนื่องจากสารจากธรรมชาติสามารถหาได้ง่าย ต้นทุนต่ำ และมีรายงานว่ามีผลข้างเคียงต่ำกว่าสารสังเคราะห์ (Huang et al., 2017) การใช้สารจากธรรมชาติที่ออกฤทธิ์อย่างจำเพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็งโดยไม่กระทบต่อการเจริญของเซลล์ปกติ จะช่วยลดอาการไม่พึงประสงค์ที่จะเกิดขึ้นกับผู้ป่วยในระหว่างการรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัดนี้ได้ ซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราความสำเร็จในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งและลดภาระของภาครัฐในด้านสาธารณสุขลง

ขลู่ (*Pluchea indica* (L.) Less.) เป็นสมุนไพรที่พบได้บริเวณป่าชายเลนของประเทศเขตร้อน และมีการปลูกในเชิงเศรษฐกิจเพื่อจำหน่ายเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ เช่น ชาใบขลู่ ที่มีการผลิตและจำหน่ายโดยวิสาหกิจชุมชนหลายแห่งของประเทศไทย รวมถึงกลุ่มวิสาหกิจชุมชนของภาคตะวันออก ในเขตเทศบาลตำบล บ่อ อำเภอ ขลุง จังหวัดจันทบุรี ขลู่เคยถูกรายงานว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านอักเสบ และฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (Srisook et al., 2012; Cho et al., 2012; Buapool et al., 2013; Kao et al., 2015; Petchlert et al., 2016) อีกทั้งยังเป็นแหล่งของสารประกอบพอลิฟีนอลมากมาย เช่น Caffeic acid, Chlorogenic acid, Quercetin Luteolin, Apigenin และ Kaempferol เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่เคยถูกรายงานว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและน่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ที่ช่วยให้ขลู่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ (Karakas et al., 2016; Indradi et al., 2017) แต่ยังไม่พบการยืนยันผลในเซลล์สิ่งมีชีวิต นอกจากนี้สารสกัดน้ำจากรากขลู่เคยถูกรายงานว่ามีคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa โดยการเพิ่มระดับอนุมูลอิสระ ในเซลล์มะเร็งนี้ (เป็น pro-oxidant) แต่ยังไม่ได้มีการระบุถึงชนิดของสารออกฤทธิ์ดังกล่าว (Cho et al., 2012) และผลการวิจัยก่อนหน้านี้ในปีที่แล้ว เราพบว่า สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำจากใบขลู่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ และแสดงความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง (พสธร มุตะพัฒน์, 2562; อานัน มีจอม, 2562; ผลงานวิจัยรอตีพิมพ์) จึงเป็นที่มาของความคิดว่า ในสารสกัดจากใบขลู่นี้น่าจะมีสารองค์ประกอบที่สามารถออกฤทธิ์ได้อย่างจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง โดยไม่กระทบต่อเซลล์ปกติ และจากการที่ใบขลู่เป็นส่วนที่พบสารประกอบฟีนอลสูงที่สุดในขลู่ (Normala & Suhaimi, 2011) ซึ่งสารประกอบฟีนอลจากพืชอื่นๆ เช่น gallic acid และ curcumin หรือสารอื่นอย่าง vitamin C เคยมีรายงานว่ามีการแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง โดยสารเหล่านี้จะแสดงคุณสมบัติได้ 2 บทบาท กล่าวคือ เป็น pro-oxidant ในเซลล์มะเร็ง (เพื่อฆ่าเซลล์มะเร็ง) และสามารถเป็น anti-oxidant ในเซลล์ปกติ (ปกป้องเซลล์ปกติ ไม่ให้เซลล์เกิดความเสียหายที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง) (Park, 2013; Malik & Mukherjee, 2014; Badhani et al., 2015) ดังนั้น จากแนวโน้มที่น่าจะเป็นไปได้นี้

งานวิจัยชิ้นนี้จึงสนใจที่จะค้นหาสารประกอบพอลิฟีนอลจากใบขลู่ที่สามารถออกฤทธิ์ในลักษณะดังที่กล่าวมาข้างต้นได้

และเพื่อเป็นการส่งเสริมสมุนไพรที่ผลิตและจัดจำหน่ายโดยวิสาหกิจชุมชนในภาคตะวันออกของไทย งานวิจัยชิ้นนี้จึงใช้ใบขลู่ที่จำหน่ายอยู่ในรูปของชาใบขลู่ จากวิสาหกิจชุมชน เขตเทศบาลตำบลบ่อ อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี มาทำการสกัดสาร ถึงแม้ว่าผลวิจัยก่อนหน้าของเราจะแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ที่ดีกว่า แต่การสกัดใบชาขลู่ด้วยน้ำก็มีความใกล้เคียงกับวิถีการบริโภคชา ดังนั้นในงานวิจัยชิ้นนี้ ผู้วิจัยจะใช้ทั้งสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำ เพื่อเป็นตัวแทนของทั้งวิถีการปรุงยาแบบชาวบ้านที่นิยมใช้แอลกอฮอล์และวิธีการดื่มชาที่ใช้น้ำร้อน มาทำการวิเคราะห์ปริมาณของสารที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอล และนำสารกลุ่มนี้มาทดสอบฤทธิ์ในการส่งเสริมให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจน (Reactive oxygen species, ROS) ในเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก เปรียบเทียบกับผลที่เกิดขึ้นในเซลล์ปกติ โดยมุ่งหวังว่าจะค้นพบสารจากใบขลู่อย่างน้อย 1 ชนิดที่สามารถออกฤทธิ์เป็นได้ทั้งสารที่ส่งเสริมและสารที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในบริบทของเซลล์ที่ต่างกัน เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เบื้องต้นในการนำสารชนิดนี้ไปต่อยอดในการใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดต่อไป (ซึ่งงานวิจัยต่อยอดนี้ผู้วิจัยวางแผนขอทุนจากหน่วยงานภายนอก และต้องการผลวิจัยจากงานชิ้นนี้เป็นผลเบื้องต้นเพื่อสนับสนุน)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมาย เพื่อค้นหาสารประกอบพอลิฟีนอลจากใบขลู่ที่สามารถออกฤทธิ์เป็นสารก่ออนุมูลอิสระ (pro-oxidant) ในเซลล์มะเร็ง แต่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ในเซลล์ปกติ ซึ่งจะส่งผลให้การออกฤทธิ์มีความจำเพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็ง และลดอาการข้างเคียงไม่พึงประสงค์ซึ่งเป็นข้อด้อยของยาเคมีบำบัดที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน อีกทั้งจะเป็นงานวิจัยที่จะผลักดันการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรไทยที่ปลูกได้ในภาคตะวันออกด้วย โดยแบ่งวัตถุประสงค์ของงานออกเป็นข้อย่อย ดังนี้

๑. เพื่อตรวจสอบปริมาณและสัดส่วนของสารประกอบพอลิฟีนอลที่พบในสารสกัดเอทานอลจากใบชาขลู่และเปรียบเทียบผลกับสารสกัดน้ำจากใบชาขลู่

๒. เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังได้รับสารประกอบพอลิฟีนอลจากใบขลู่ โดยจะใช้สารประกอบพอลิฟีนอลที่พบได้ในปริมาณสูงจากใบขลู่มาทดสอบ และเปรียบเทียบกับผลจากเซลล์ปกติ

๓. เพื่อตรวจสอบระดับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์มะเร็งหลังได้รับสารประกอบพอลิฟีนอลจากใบขลู่ และเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากเซลล์ปกติ โดยจะใช้สารประกอบพอลิฟีนอลที่พบได้ในปริมาณสูงจากใบขลู่มาทดสอบ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ใบชาขลู่แห้งจากวิสาหกิจชุมชน เขตเทศบาลตำบลบ่อ อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี จะถูกนำมาบดเป็นผงและสกัดสารด้วยเอทานอลและน้ำกลั่น จากนั้น สารสกัดทั้งสองชนิดจะถูกนำไปตรวจสอบเพื่อหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลด้วยวิธี folin-ciocalteu และนำไปวิเคราะห์ปริมาณและสัดส่วนขององค์ประกอบด้วยเทคนิค Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (qNMR) จากนั้นจะนำสารประกอบพอลิฟีนอลชนิดที่พบว่ามีปริมาณมากในสารสกัดใบชาขลู่มาตรวจสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT assay กับเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม 2 ชนิด คือ MDA-MB-231 และ MCF-7 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก 3 ชนิด คือ HeLa SiHa และ C33A เปรียบเทียบผลที่ได้กับเซลล์ปกติ (Vero) สุดท้ายจะทำการตรวจสอบระดับ ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งที่ได้รับสารประกอบพอลิฟีนอลจากใบชาขลู่ โดยใช้เทคนิคการย้อมเซลล์ด้วย 2',7' –dichlorofluorescin diacetate (DCFDA) วิเคราะห์ผลด้วย fluorescent microscopy ทำการเปรียบเทียบกับผลที่ได้ในเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero และเปรียบเทียบกับยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษามะเร็งทั้งสองชนิด ได้แก่ Doxorubicin และ Cisplatin

บทที่ 2
การสำรวจเอกสารที่เกี่ยวข้อง (literatures review)

โรคมะเร็งจัดเป็นกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-Communicable diseases หรือ NCDs) ที่สำคัญและกำลังคุกคามชีวิตและสุขภาพของประชากรทั่วโลก ซึ่งสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจให้กับหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย จากข้อมูลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติและกระทรวงสาธารณสุขพบว่า ชนิดของมะเร็งที่มีสถิติการพบผู้ป่วยรายใหม่และเสียชีวิตสูงสุดเป็นอันดับต้นๆ ในปี 2560 ที่ผ่านมา ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งตับและท่อน้ำดี มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก มะเร็งปอด และมะเร็งปากมดลูก

แม้ว่าการรักษามะเร็งจะถูกพัฒนาขึ้นหลากหลายวิธีตามความหลากหลายของชนิดมะเร็งและระยะของโรค ซึ่งวิธีเคมีบำบัดก็เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยม เนื่องจากยาเคมีบำบัดที่ใช้อยู่นั้นมีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้สูงและสามารถใช้ได้กับมะเร็งหลากหลายรูปแบบ ทั้งมะเร็งชนิดก้อนและมะเร็งในระบบเลือด แต่ด้วยข้อจำกัดของการใช้ยาเคมีบำบัดที่มักพบว่าก่อให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วย เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ผมร่วง หรือรุนแรงจนถึงขั้นไตวาย หัวใจล้มเหลว เป็นต้น (Ohe, 2002; Nair & Gongora, 2016) ซึ่งเป็นผลมาจากการออกฤทธิ์แบบไม่จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งของยาเคมีบำบัด ทำให้ผู้ป่วยเกิดความกลัวต่อการเข้ารับการรักษา ผู้ป่วยในกลุ่มนี้ส่วนหนึ่งจึงใช้สมุนไพรเป็นทางเลือกในการรักษา เนื่องจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมักพบว่ามีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากกว่าสารสังเคราะห์ (Huang et al., 2017) รวมทั้งผู้ป่วยมีความคุ้นเคยกับพืชสมุนไพรใกล้ตัวมากกว่า อย่างไรก็ตาม สมุนไพรจำนวนไม่น้อยที่มีการกล่าวอ้างสรรพคุณว่าสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้โดยไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์หรือข้อมูลทางการแพทย์มารองรับ ซึ่งการรับประทานสมุนไพรเหล่านี้แบบไม่ถูกวิธี อาจทำให้เกิดการลุกลามของโรคจนไม่สามารถรักษาได้และผู้ป่วยเสียชีวิตในที่สุด ดังนั้น เพื่อเป็นการสนับสนุนการใช้สมุนไพรของไทยและการเพิ่มคุณค่าให้กับพืชพรรณในประเทศ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้ความรู้ทางวิทยาศาสตร์มาพิสูจน์สรรพคุณทางยาของสมุนไพรต่างๆ รวมถึงศึกษากลไกการออกฤทธิ์และรูปแบบการให้ยาสมุนไพรที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัด เพื่อลดอาการที่ไม่พึงประสงค์ของยาเคมีบำบัด ตลอดจนการศึกษาต่อยอดเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์จากสมุนไพร ซึ่งในอนาคตอาจใช้เป็นต้นแบบในการผลิตยาต้านมะเร็งเพื่อทดแทนการนำเข้ายาจากต่างประเทศได้

ขลู่ (Khlu) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pluchea indica* Less. เป็นพืชในวงศ์ Compositae (Asteraceae) มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม สูงประมาณ 0.5-2 เมตร พบได้ตามธรรมชาติในป่าชายเลนของประเทศเขตร้อน รวมถึงประเทศไทย ใบขลู่จะมีสีเขียวตลอดปีและถูกนำมาบริโภคเป็นผักลวกจิ้มน้ำพริก ใส่ยำหรือแกงเผ็ด และด้วยกลิ่นหอมละมุน รสหวาน ฝาดเล็กน้อยของใบขลู่ทำให้มีการนำมาแปรรูปทำเป็นชาใบขลู่ ดื่มแบบชาสมุนไพร ซึ่งปัจจุบันมีการปลูกต้นขลู่ในเชิงเศรษฐกิจเพื่อนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่าย ภายใต้โครงการสนับสนุนวิสาหกิจชุมชนของสำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน) ในหลายจังหวัด เช่น สมุทรสงคราม เพชรบุรี นครราชสีมา อุดรธานี จันทบุรี และระยอง เพื่อให้ผลิตชาขลู่ที่มีคุณภาพสูงและถูกสุขลักษณะ(http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/227/ใบขลู่-ประโยชน์-โทษ-ฤทธิ์-ความเป็นพิษ/)

ก่อนหน้านี้ คณะผู้วิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของชาใบขลู่และได้ศึกษากันมาอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่า สารสกัดน้ำจากชาใบขลู่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและต้าน

อักเสบในหลอดทดลอง (Srisook et al., 2012) สารสกัดเอทานอลจากใบขลู่มีฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 และในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำการอักเสบด้วย carrageenan (Buapool et al., 2013) มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ได้ (Petchlert et al., 2016) และเมื่อไม่นานมานี้ สารสกัดจากชาใบขลู่มีการรายงานว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินและเอนไซม์ CYP2A13 ที่ย่อยสลายสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitrosa-mino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ในคน (Boonruang et al., 2017) นอกจากนี้ ยังมีการรายงานถึงฤทธิ์ของใบขลู่และส่วนอื่นๆ ของขลู่จากคณะผู้วิจัยในประเทศอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านอักเสบและการปวด (antinociceptive) ฤทธิ์ต้านวัณโรค และฤทธิ์ต้านพิษงู (Viperu russellii) (Andarwulan et al., 2010; Rosilda et al., 2008; Mohamad et al., 2011; Goyal & Aggarwal, 2013) เป็นต้น

สำหรับฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากขลู่ มีรายงานว่าสารสกัดจากรากหรือรากผสมใบขลู่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสมองชนิด GBM8401 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกชนิด NPC-TW 01 และ NPC-TW 04 ได้ (Cho et al., 2012; Kao et al., 2015) และเมื่อปีที่ผ่านมา ทีมวิจัยของเราได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากใบชาขลู่ ซึ่งพบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลและที่สกัดด้วยน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ทั้งมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งเต้านมซึ่งเป็นกลุ่มของมะเร็งที่พบมากในสตรีไทย โดยเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 เป็นเซลล์มะเร็งที่ถูกยับยั้งได้มากที่สุด มีค่า IC_{50} ของสารสกัดเท่ากับ 130 และ 175 µg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดทั้งสองชนิดจากใบชาขลู่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero ค่อนข้างต่ำ โดยมีค่า IC_{50} ของสารสกัดเท่ากับ 388 และ 311 µg/mL ตามลำดับ(ผลงานรอตีพิมพ์; พสธร มุตะพัฒน์, 2562; อานัน มีจอม, 2562) ซึ่งทำให้เกิดความคิดต่อยอดว่า ในสารสกัดขลู่นี้น่าจะมีสารองค์ประกอบบางตัวที่มีการแสดงฤทธิ์อย่างจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง และมีความน่าสนใจที่จะศึกษาในเชิงลึก จึงเป็นที่มาของงานวิจัยในครั้งนี้

จากงานวิจัยก่อนหน้าที่เคยมีการรายงานว่าใบขลู่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูง และพบสารอีกหลายชนิด เช่น Caffeic acid, Chlorogenic acid, Quercetin Luteolin, Apigenin และ Kaempferol เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้เคยมีการพิสูจน์แล้วว่ามีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและป้องกันการเกิดมะเร็งได้ รวมถึงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Shukla & Gupta, 2010; Ye et al., 2010; Chen & Chen, 2013; Suriyaphan, 2014; Karakas et al., 2016; Cook et al., 2016; Boonruang et al., 2017) ดังนั้น จึงมีแนวโน้มเป็นอย่างมากที่สารประกอบฟีนอลเหล่านี้จะใช้กลไกในการออกฤทธิ์เป็นได้ทั้ง pro-oxidant ในเซลล์มะเร็ง แต่เป็น anti-oxidant ในเซลล์ปกติ ซึ่งส่งผลให้ใบขลู่สามารถออกฤทธิ์ได้อย่างจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งและไม่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงไม่พึงประสงค์จากการใช้สารนี้ในผู้ป่วยมะเร็ง อย่างไรก็ตาม ยังขาดการทดลองทางวิทยาศาสตร์มายืนยันแนวความคิดนี้

ดังนั้น เพื่อเป็นการสนับสนุนและเพิ่มมูลค่าให้กับชาใบขลู่ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของไทยและผลิตขึ้นเองจากวิสาหกิจชุมชนของจังหวัดจันทบุรี งานวิจัยชิ้นนี้จะทำการสกัดสารจากใบขลู่ที่จำหน่ายในรูปชาใบขลู่ ด้วยตัวทำลาย 2 ชนิด คือ สกัดด้วยน้ำร้อนตามวิธีการชงชาดื่ม และสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลเทียบได้กับวิธีปรุงยาพื้นบ้าน มาทำการวิเคราะห์ปริมาณของสารที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอล และนำสารกลุ่มนี้มาทดสอบฤทธิ์ในการส่งเสริมให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจน (Reactive oxygen species, ROS) ในเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก ซึ่งเป็นชนิดของมะเร็งที่พบมากโดยเฉพาะในสตรีไทย เปรียบเทียบกับผลที่เกิดขึ้นในเซลล์ปกติ และเปรียบเทียบกับยาเคมีบำบัดที่ใช้ในมะเร็งทั้งสองชนิด

(doxorubicin และ cisplatin) เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เบื้องต้นในการนำสารชนิดนี้ไปต่อยอดในการใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดต่อไป โดยองค์ความรู้ที่ได้จะช่วยเพิ่มคุณค่าให้กับชาใบขลู่ ผลักดันให้เป็นสินค้าประจำถิ่นหรือสินค้าส่งออกได้ ตลอดจนเป็นการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ ช่วยกระตุ้นการเพาะปลูกในท้องถิ่นและกระตุ้นเศรษฐกิจในระดับชุมชนเพื่อชุมชนยั่งยืนในอนาคต

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

๓.๑ การสกัดสารจากชาใบขลู่

ใบชาขลู่ที่ซื้อจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชน เขตเทศบาลตำบลบ่อ อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี และจะถูกนำมาเตรียมสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอล ตามวิธีดังต่อไปนี้

๓.๑.๑ การเตรียมสารสกัดน้ำจากใบชาขลู่

การสกัดใบชาขลู่ด้วยน้ำร้อนจะทำตามวิธีที่รายงานไว้ใน Srisook et al. (2012) โดยต้มผงชาที่บดละเอียดในน้ำร้อนเป็นเวลา 30 นาที ในอัตราส่วนผงชา 1 กรัม ต่อน้ำ 10 มิลลิลิตร จากนั้นจะกรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 1 และนำกากชามาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง สารสกัดที่ได้จะถูกนำไประเหยแห้งเพื่อเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) และเครื่อง freeze dryer ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้และจดบันทึกไว้

๓.๑.๒ การเตรียมสารสกัดเอทานอลจากใบชาขลู่

ผงใบชาขลู่จะถูกนำมาห่อด้วยผ้าขาวบางแล้วนำไปแช่ในสารละลายเอทานอลในอัตราส่วนผงชา 1 กรัม ต่อเอทานอล 10 มิลลิลิตร แช่ไว้เป็นเวลา 5 วัน กรองสารสกัดที่ได้ แล้วนำกากชาเดิมมาสกัดซ้ำด้วยเอทานอลอีก 2 รอบ ทำการระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และเครื่อง freeze dryer ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้และจดบันทึกไว้

๓.๒ การเลี้ยงเซลล์ไลน์

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดทำการสั่งซื้อมาจากบริษัท American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม 2 ชนิด (MDA-MB-231 และ MCF-7) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก 3 ชนิด (HeLa SiHa และ C33A) รวมทั้งเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero จะถูกเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่ผสม 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) เลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีความชื้นและคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

๓.๓ การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ด้วยวิธี Folin-ciocalteu

นำสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำจากใบชาขลู่ปริมาตร 25 µL ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 100 µL จากนั้นเติมสารละลาย Folin ปริมาตร 30 µL แล้วทำการบ่มเป็นเวลา 6 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นเติม 7% (w/v) Na_2CO_3 ปริมาตร 250 µL ลงไปผสม และทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 600 µL ทำการบ่มต่อเป็นเวลา 90 นาที ในที่มืด เมื่อครบเวลาให้ทำการปิเปตสารมาใส่ใน 96-well plate หลุมละ 150 µL จำนวน 3 หลุมและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค และรายงานในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมของสารสกัด

๓.๔ การตรวจสอบชนิดและสัดส่วนปริมาณของสารประกอบพอลิฟีนอลที่มีอยู่ในสารสกัดจากใบชาขลู่

สารสกัดจากใบชาขลู่จะถูกนำมาวิเคราะห์หาสัดส่วนร้อยละของสารองค์ประกอบที่เป็นสารในกลุ่มพอลิฟีนอลด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR) โดยจะอ้างอิงข้อมูลจากงานวิจัยอื่นที่เคยรายงานชนิดของสารประกอบพอลิฟีนอลที่พบในใบขลู่ เช่น luteolin apigenin quercetin เป็นต้น (Andarwulan et al., 2012; Suriyaphan, 2014; Boonruang et al., 2017) นำมาเป็นสารมาตรฐานที่จะใช้ในการค้นหาและคำนวณหาสัดส่วนร้อยละของสารประกอบพอลิฟีนอลแต่ละชนิดในสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำจากใบชาขลู่ สารประกอบพอลิฟีนอลที่พบว่ามีสัดส่วนปริมาณมากที่สุดในสารสกัดเอทานอลหรือสารสกัดน้ำจากใบชาขลู่จะถูกเลือกเพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติต่อไป

๓.๕ การตรวจสอบความเป็นพิษของสารต่อการเจริญของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay (Iawsipo et al., 2018)

เซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ทั้ง 6 ชนิด จะถูกเลี้ยงใน 96-well plate ตามสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงก่อนเริ่มทดสอบ จากนั้นจะทำการบ่มด้วยสารทดสอบ (สารสกัดเอทานอล สารสกัดน้ำ หรือสารประกอบพอลิฟีนอล รวมทั้งยาเคมีบำบัดที่ใช้เป็น positive control) ผสมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการ (ทำอย่างละ 4 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ; สารสกัดจะใช้เข้มข้น 0-400 µg/mL สารประกอบพอลิฟีนอลและยาเคมีบำบัดจะใช้ความเข้มข้น 0-4 µM) บ่มเซลล์ไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อครบกำหนดเวลาจะเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลาย MTT 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำเซลล์กลับไปบ่มในตู้บ่มเซลล์ต่ออีก 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจะนำมาละลายผลึกสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO 200 µl ต่อหลุม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรด้วย microplate reader แสดงผลที่ได้ในรูปเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งคำนวณจาก (ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ/ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ) X 100 เมื่อกำหนดให้การรอดชีวิตของเซลล์ที่

สภาวะที่ไม่มีสารสกัดเท่ากับ 100% ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วรายงานผลความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบแต่ละชนิดด้วยค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50%)

๓.๖ การตรวจสอบระดับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ

เซลล์จำนวน 75,000 เซลล์จะถูก seed ลงแต่ละหลุมใน 96-well plate ไว้ข้ามคืน จากนั้นทำการบ่มด้วยสารประกอบพอลิฟีนอลจากใบขลู่ (ชนิดที่พบว่ามีปริมาณมากในสารสกัด) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBS buffer 2 ครั้งแล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารที่ไม่ผสม FBS บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเปลี่ยนเป็นอาหารที่ผสมด้วยสีย้อม 2',7' –dichlorofluorescin

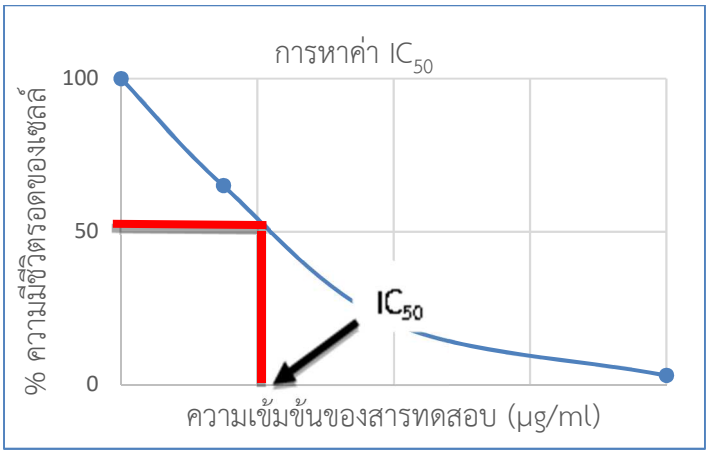
diacetate (DCFDA) เข้มข้น 15 μM บ่มต่ออีก 30 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS buffer สุดท้ายเติม PBS buffer ลงไป 200 μL แล้วนำไปวัดระดับฟลูออเรสเซ้นต์ที่เปล่งออกมาด้วย Fluorescent spectrophotometer (Ex 504 /Em 529 nm) ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำผลที่ได้มา normalized ด้วยค่า % cell viability และเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ

๓.๗ การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการทดลองที่แสดงจะเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ด้วย one-way ANOVA (analysis of variance) และวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Tukey Honestly (HSD) โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

๓.๘ วิธีการประเมินผล / สังเคราะห์ข้อมูล

เนื่องจากคุณสมบัติของสารที่ต้องการจากงานวิจัยชิ้นนี้คือ สารประกอบพอลิฟีนอลจากใบชาขลู่ที่มีคุณสมบัติแสดงความเป็นพิษแบบจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านมหรือเซลล์มะเร็งปากมดลูก แต่ไม่แสดงความเป็นพิษกับเซลล์ปกติ โดยตรวจสอบผ่านกลไกเบื้องต้นที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมหรือต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ดังนั้น การประเมินผลจะวิเคราะห์จากข้อมูล 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่หนึ่ง จะประเมินความเป็นพิษจากค่า IC_{50} ของสารทดสอบ โดยจะเลือกสารที่ให้ค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งต่ำกว่าค่าที่ได้จากเซลล์ปกติอย่างน้อย 2 เท่า หรือสารประกอบพอลิฟีนอลที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในเซลล์มะเร็งลดลงต่ำกว่า 50% ในขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้นเดียวกันนี้กับเซลล์ปกติจะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 80%



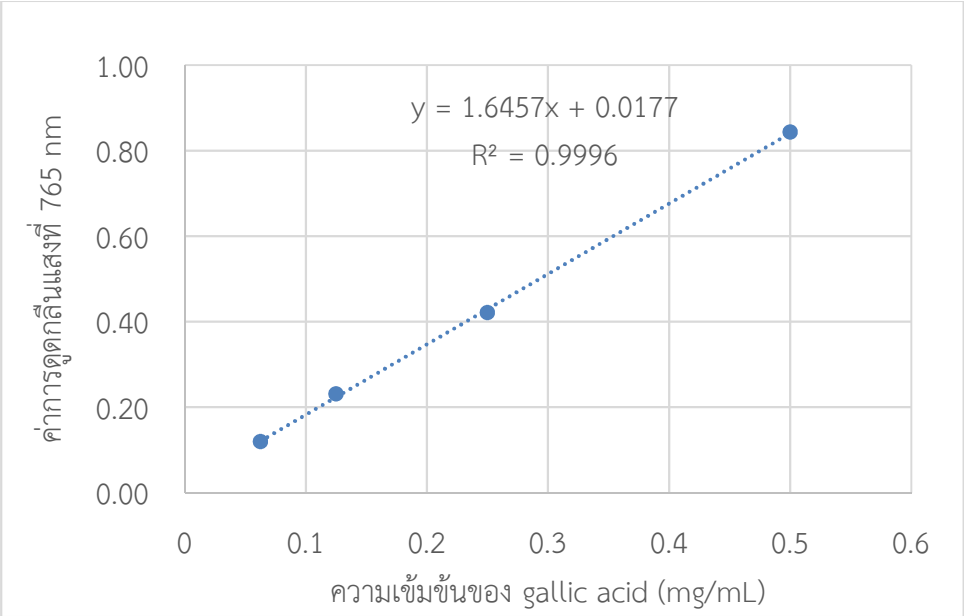
สำหรับการประเมินในส่วนที่สอง จะประเมินจากระดับ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยสารประกอบพอลิฟีนอลจากใบขลู่ที่ต้องการ จะต้องเป็นสารที่ทำให้ปริมาณ ROS ในเซลล์มะเร็งนั้นสูงขึ้นเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้รับสาร ในขณะที่สารต้องลดหรือไม่เพิ่มปริมาณ ROS ในเซลล์ปกติ (การไม่เพิ่ม ROS จะทำให้ไม่เกิดการตายของเซลล์ปกติ ซึ่งจะลดผลข้างเคียงในการรักษาผู้ป่วยได้ และหากสารนี้ช่วยลดอนุมูลอิสระได้จะยิ่งดี เพราะจะช่วยปกป้องเซลล์ปกติไม่ให้พัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ เป็นการลดอัตราการเป็นโรคมะเร็งได้นั่นเอง)

ในการทดสอบทั้งหมดจะมีการทำเปรียบเทียบกัน ดังนี้ 1) เปรียบเทียบผลของสารสกัดระหว่างสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำ 2) เปรียบเทียบผลของสารประกอบพอลิฟีนอลจากขลู่และยาเคมีบำบัดที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน และ 3) เปรียบเทียบผลที่ได้ในเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ โดยจะใช้สถิติมากำหนดนัยสำคัญของความแตกต่างที่เกิดขึ้นในการเปรียบเทียบนี้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ด้วยวิธี Folin-ciocalteu

สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำจากใบชาขลู่ถูกนำมาทดสอบเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมด้วยวิธี Folin-ciocalteu เทียบค่ากับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค (ภาพที่ 4-1) พบว่า สารสกัดเอทานอลจากใบชาขลู่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเท่ากับ 200.85 ± 13.20 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมของสารสกัด ในขณะที่ สารสกัดน้ำจากใบชาขลู่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม มากกว่าสารสกัดเอทานอล เท่ากับ 271.31 ± 31.81 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมของสารสกัด จากผลจะเห็นได้ว่า สารสกัดชาใบขลู่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิดนี้ มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลค่อนข้างสูง โดยก่อนหน้านี้ได้มีการเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลที่พบในใบขลู่และใบชาเขียว พบว่า ใบขลู่นั้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงกว่า (Widyawati et al., 2017) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงบทบาทที่สำคัญของสารประกอบฟีนอลที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากชาใบขลู่



ภาพที่ 4-1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิคจากการทดสอบด้วยวิธี Folin-ciocalteu

4.2 ผลการตรวจสอบชนิดและสัดส่วนปริมาณของสารประกอบพอลิฟีนอลที่มีอยู่ในสารสกัดจากใบชาขลู่

ชนิดของสารประกอบฟีนอลในสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำจากใบชาขลู่ ได้ถูกตรวจสอบด้วย ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR โดยใช้สารมาตรฐานตามข้อมูลจากงานวิจัยที่ถูกตีพิมพ์ก่อนหน้า โดยสารมาตรฐานที่

ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบครั้งนี้ มีทั้งสิ้น 10 ชนิด ได้แก่ Apigenin, Luteolin, Quercetin, Kaempferol, กลุ่ม mono-caffeoylquinic acid (CQAs) 3 ชนิด ได้แก่ Chlorogenic acid, Neochlorogenic acid, Cryptochlorogenic acid), และกลุ่ม di-caffeoylquinic acid (di-CQAs) อีก 3 ชนิด ได้แก่ 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA และ 3,5-di-CQA

ผลจากการตรวจสอบพบว่า ไม่สามารถตรวจพบสารมาตรฐานเหล่านี้ในสารสกัดทั้งสองชนิดเลย ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก ข้อจำกัดของการละลายสารที่ทำให้ไม่สามารถเตรียมสารให้มีความเข้มข้นสูงมาก ๆ ได้ หรือปริมาณสารแต่ละชนิดมีสัดส่วนที่น้อยเกินไปเมื่อเทียบกับชนิดของสารที่มีมากในสารสกัดหยาบ หรืออาจเป็นไปได้ว่า สารที่มีปริมาณมากเป็นสารประกอบฟีนอลชนิดอื่นที่ไม่ใช่กลุ่มสารที่ถูกรายงานไว้และถูกเลือกมาทดสอบ

ดังนั้น ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการสกัดแยกส่วนสารสกัดออกไป 3 ส่วนสกัดย่อย ได้แก่ ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยน้ำ รวมทั้งได้นำส่วนสกัดย่อยทั้งสามไปตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ซึ่งพบว่า ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุดในสารสกัดหยาบทั้งสองชนิด รองลงมาคือส่วนสกัดย่อยน้ำ และส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ตามลำดับ จากนั้นจึงนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท ไปตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลด้วยเทคนิค NMR อีกครั้ง ได้ผลดังตารางที่ 4-1 ซึ่งสรุปได้ว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากสารสกัดหยาบทั้งสองชนิด มีชนิดของสารประกอบฟีนอลที่เหมือนกัน คือ Quercetin, Chlorogenic acid และ 4,5-di-CQA โดยสารที่พบในสัดส่วนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ สาร 4,5-di-CQA ซึ่งพบได้มากที่สุดในส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากทั้งสองสารสกัดหยาบ (5.51% และ 3.22%) ดังนั้น สาร 4,5-di-CQA จะถูกนำมาใช้ในการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 4-1 ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลที่พบในสารสกัดจากชาใบขลู่

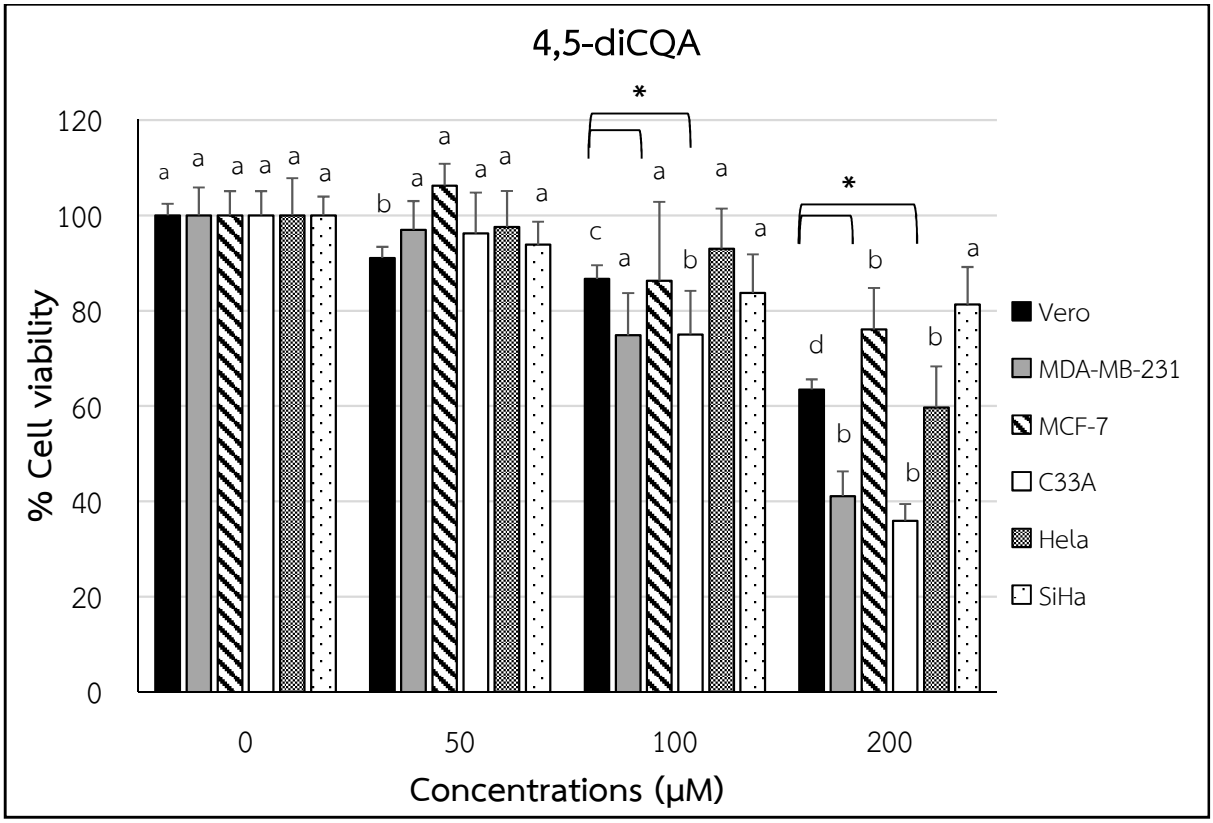
ชนิดสารสกัด	**ปริมาณสารที่ใช้ (mg)**	**ชนิดของสารที่พบ**	**ปริมาณที่พบ** (ใน 650µl ของตัวทำละลาย)	**คิดเป็นสัดส่วน (w/w, %)**
สารสกัดหยาบน้ำ	21.5	ไม่พบ	N/A	N/A
ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของสารสกัดหยาบน้ำ	30	Quercetin	3.981 mM (0.782 mg)	2.61%
		Chlorogenic acid	1.698 mM (0.391 mg)	1.30%
		3,5-diCQA	1.778 mM (0.597 mg)	1.99%
		4,5-diCQA	4.928 mM (1.654 mg)	5.51%
สารสกัดหยาบเอทานอล	20	ไม่พบ	N/A	N/A
ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของสารสกัดเอทานอล	30	Quercetin	1.905 mM (0.374 mg)	1.25%
		Chlorogenic acid	2.207 mM (0.508 mg)	1.69%
		4,5-diCQA	2.876 mM (0.965 mg)	3.22%

N/A = ไม่สามารถนำมาคำนวณได้

4.3 ผลการตรวจสอบความเป็นพิษของสารต่อการเจริญของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

จากการตรวจสอบผลของสาร 4,5-di-CQA ที่มีต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero ด้วยวิธี MTT พบว่า สาร 4,5-di-CQA สามารถลดการรอดชีวิตของเซลล์ทดสอบได้ และความเป็นพิษของสารจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ (ภาพที่4-2) ค่า IC_{50} ของสารที่มีต่อเซลล์ทดสอบแสดงดังตารางที่ 4-2 โดยในกลุ่มของเซลล์มะเร็งปากมดลูก เซลล์ C-33A เป็นเซลล์ที่ตอบสนองต่อสารได้ดีที่สุด มีเซลล์รอดชีวิตเพียง 35.93% เมื่อได้รับสารที่ความเข้มข้น 200 µM สำหรับเซลล์ในกลุ่มของมะเร็งเต้านม เซลล์ MDA-MB-231 จะเป็นเซลล์ที่ตอบสนองต่อสารได้ดีที่สุด ซึ่งมีเซลล์ 41.08% ที่รอดชีวิตจากการได้รับสารที่ความเข้มข้น 200 µM

อย่างไรก็ตาม พบว่า สาร 4,5-di-CQA มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero ด้วย โดยที่ความเข้มข้นของสาร 200 µM เซลล์ Vero มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 63.45% ซึ่งหากเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารที่เกิดขึ้นต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งแล้ว จะพบว่า สาร 4,5-di-CQA นั้น สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเซลล์มะเร็งปากมดลูก C-33A และเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ได้มากกว่าเซลล์ Vero นั่นคือ สารแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งชี้ให้เห็นถึงแนวโน้มของสาร 4,5-di-CQA ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมะเร็งทั้งสองชนิดได้ และในขณะเดียวกันก็ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติต่ำกว่า



ภาพที่ 4-2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero หลังได้รับสาร 4,5-di-CQA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษ (a-d) ที่แตกต่างกันบนกราฟแท่งแสดงถึงการลดของการมีชีวิตรอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มเซลล์ชนิดเดียวกันที่ได้รับสารสกัดเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด และ * แสดงถึงการลดลงของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งที่ความเข้มข้นเดียวกัน (p<0.05) (n=9)

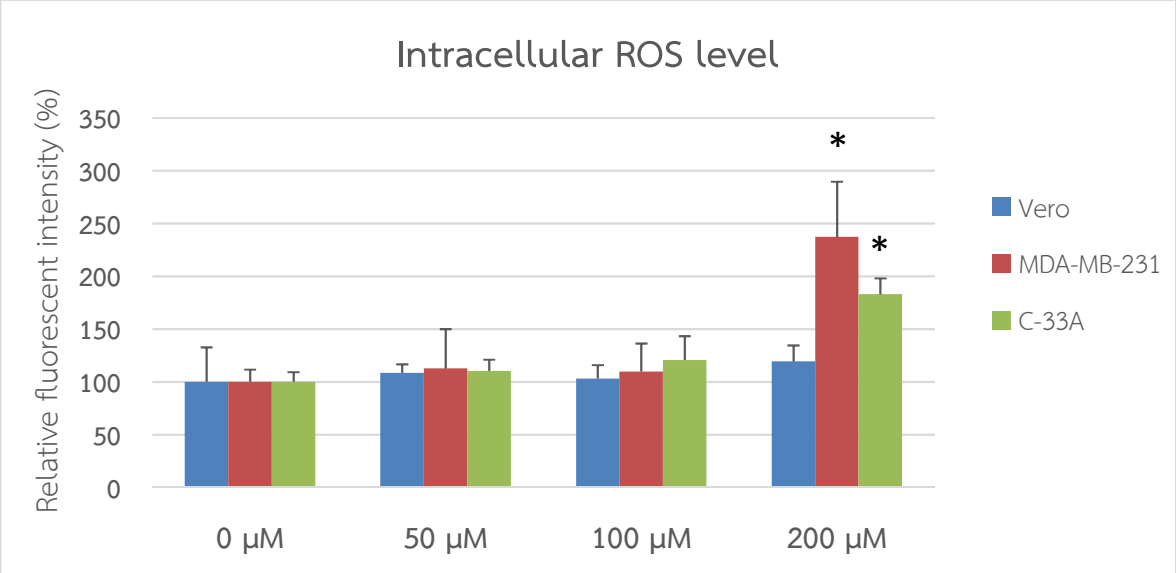
ตารางที่ 4-2 ค่า IC_{50} (μM) ของสาร 4,5-di-CQA ต่อเซลล์ทดสอบทั้ง 6 ชนิด

เซลล์ทดสอบ	IC_{50} (μM)
Vero	>200
MDA-MB-231	171 ± 5.22
MCF-7	>200
C-33A	162 ± 6.34
HeLa	>200
SiHa	>200

4.4 ผลการตรวจสอบระดับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ

เพื่อเป็นการตรวจสอบกลไกการสร้างความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร 4,5-di-CQA ว่าเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงระดับ reactive oxygen species (ROS) หรือไม่ เซลล์มะเร็งปากมดลูก C-33A และเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 จึงได้ถูกนำไปบ่มกับสาร 4,5-di-CQA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบระดับ ROS ที่มีอยู่ในเซลล์ ด้วยเทคนิค DCFDA staining เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero

ผลการตรวจสอบพบว่า เซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดมีระดับ ROS ภายในเซลล์สูงขึ้นหลังได้รับสารทดสอบ 4,5-di-CQA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ โดยที่ความเข้มข้น 200 µM เซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 และ เซลล์มะเร็ง C-33A มีระดับ ROS ภายในเซลล์เท่ากับ 237.24 ± 52.35% และ 182.96 ± 15.04% ตามลำดับ อีกทั้ง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ Vero พบว่า เซลล์ Vero นั้นมีปริมาณของ ROS ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (119.22% ที่ความเข้มข้นของสารทดสอบเท่ากับ 200 µM) ซึ่งแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นของปริมาณ ROS ภายในเซลล์นี้ แปรผันตามเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ลดลงหลังได้รับการทดสอบ (ภาพที่ 4-2) แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มอนุมูลอิสระภายในเซลล์น่าจะเป็นหนึ่งในกลไกที่สาร 4,5-di-CQA ใช้เพื่อสร้างความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสามารถส่งผลให้เกิด oxidative stress ในเซลล์มะเร็ง จนนำไปสู่การที่เซลล์มะเร็งไม่สามารถรอดชีวิตในที่สุด



ภาพที่ 4-3 ระดับ ROS ภายในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C-33A เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง Vero หลังได้รับสารทดสอบ 4,5-di-CQA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค DCFDA staining

บทบาทในการเป็นสาร prooxidant ของสารสกัดน้ำจากรากขลู่ ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress ได้ถูกแสดงให้เห็นมาก่อนหน้านี้จากงานวิจัยของ Cho และคณะ (2012) โดยพบว่า ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL สารสกัดน้ำจากรากขลู่ สามารถเพิ่มการเกิด malondialdehyde peroxidation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ และเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis ได้โดยผ่านทางการทำงานของโปรตีน p53 แต่ยังไม่ได้ทำการศึกษาหาสารองค์ประกอบในสารสกัดรากของขลู่ที่เกี่ยวข้องในบทบาทนี้

สารองค์ประกอบจากใบขลู่นั้น ได้เคยถูกศึกษาและรายงานไว้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Andarwulan *et al.,* 2010; Boonruang *et al.,* 2017; Vongsak, *et al*., 2018; Ruan *et al.,* 2019) ซึ่งสารเหล่านี้บางชนิดได้เคยถูกพิสูจน์ว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างเช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านอักเสบ ต้านมะเร็ง เป็นต้น (Lee, *et al*., 2018; Vongsak, *et al*., 2018; Zeng *et al*., 2021)

งานวิจัยชิ้นนี้ เป็นงานวิจัยแรกที่ได้แสดงให้เห็นถึงสารสำคัญในสารสกัดจากชาใบขลู่ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก ผ่านทางกลไกการเพิ่มระดับของ ROS ภายในเซลล์ และจากการที่สารสกัดจากขลู่และสารบริสุทธิ์ 4,5-di-CQA นั้น ได้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง สะท้อนให้เห็นถึงการที่สารทดสอบนี้จะสามารถช่วยลดอาการข้างเคียงไม่พึงประสงค์ที่จะเกิดขึ้นกับผู้ป่วยในขณะที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดได้ อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการวิจัยนี้เป็นเพียงผลทดสอบเบื้องต้น ซึ่งควรมีการทดสอบฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์เพิ่มเติม เพื่อให้สามารถนำไปพัฒนาและใช้ประโยชน์กับผู้ป่วยมะเร็งได้จริงในอนาคต

ผลผลิต (Output)

- Iawsipo, P., Poonbud, R., Somtragool, N. 2021. Ethanolic extract from *Pluchea indica* tea leaves suppresses cervical cancer cell growth by promoting ROS production. *Proceedings of The 8th Burapha University International Conference on Interdisciplinary Research (BUU2021)*. 2nd - 4th September 2021. Virtual conference. Unpublished manuscript, Burapha university, Chonburi, Thailand.

- Iawsipo, P., Poonbud, R., Somtragool, N., Mutapat, P., Meejom, A. (2021). *Pluchea indica* tea-leaf extracts exert anti-cancer activity by inducing ROS-mediated cytotoxicity on breast and cervical cancer cells. Manuscript submitted for publication.

บรรณานุกรม

พสธร มุตะพัฒน์. (2562). ผลของสารสกัดน้ำจากชาใบขลู่ที่มีต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก. ปริญญานิพนธ์ หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี) ปีการศึกษา 2561. มหาวิทยาลัยบูรพา. 72 หน้า.

อานัน มีจอม. (2562). ผลของสารสกัดเอทานอลจากใบขลู่ที่มีต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก. ปริญญานิพนธ์ หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี) ปีการศึกษา 2561. มหาวิทยาลัยบูรพา.63หน้า.

Andarwulan, N., Batari, R., Sandrasari, D.A., Bolling, B. and Wijaya, H. (2010), "Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia", *Food Chemistry*, Vol. 121 No. 4, pp. 1231-1235.

Andarwulan, N., Kurniasih, D., Apriady, R.A., et al. (2012). Polyphenols, carotenoids and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. *J Funct Foods*. 4:339-347.

Badhani, B., Sharma, N. & Kakkar, R. (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv*., 35.

Boonruang, S., Prakobsri, K., Pouyfung, P., Srisook, E., Prasopthum, A., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2017). Inhibition of human cytochromes P450 2A6 and 2A13 by flavonoids, acetylenic thiophenes and sesquiterpene lactones from *Pluchea indica* and *Vernonia cinerea*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 1136-1142

Buapool, D., Mongkol, N., Chantimal, J., Roytrakul, S., Srisook, E., Srisook, K. (2013). Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *J Ethnopharmacol*, 146(2):495-504.

Chen, A.Y. & Chen, Y.C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem*. 138(4):2099-107.

Cho, J. J., Cho, C. L., Kao, C. L., Chen, C. M., Tseng, C. N., Lee, Y. Z., Liao, L. J., Hong, Y. R. (2012). Crude aqueous extracts of *Pluchea indica* (L.) Less. inhibit proliferation and migration of cancer cells through induction of p53-dependent cell death. *BMC Complement Altern Med*, 12:265. doi: 10.1186/1472-6882-12-265.

Cook, M.T., Liang, Y., Besch-Williford, C., Hyder, S.M. (2016). Luteolin inhibits lung metastasis, cell migration, and viability of triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer* (Dove Med Press). 9:9-19.

Goyal, P.K. & Aggarwal, R.R. (2013). A review on phytochemical and biological investigation of plant genus *Pluchea*. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 3(4): 3373-3392.

http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/227/ใบขลู่-ประโยชน์-โทษ-ฤทธิ์-ความเป็นพิษ

Huang, C.Y, Ju, D.T, Chang, C.F, Muralidhar Reddy, P., Velmurugan, B.K. (2017). A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. *Biomedicine (Taipei)*. 7(4):23.

Iawsipo, P., Srisook, E., Ponglikitmongkol, P., Somwang, T., Singaed O. (2018). Cytotoxic effects of *Etlingera pavieana* rhizome on various cancer cells and identification of a potential anti-tumor component. *J. Food Biochem*. 42(4); e12540.

Indradi, R.B., Fidrianny, I., Wirasutisna, K.R. (2017). DPPH Scavenging Activities and Phytochemical Content of Four Asteraceae Plants. *Int. J. Pharmacognosy and Phytochem. Res.* 9(6);755-759.

Kao, C.L., Cho, J., Lee, Y.Z., Cheng, Y.B., Chien, C.Y., Hwang, C.F., Hong, Y.R., Tseng, C.N., Cho, C.L. (2015). Ethanolic extracts of *Pluchea indica* induce apoptosis and antiproliferation effects in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Molecules*. 20(6):11508-23.

Karakas, F.P., Cingoz, G.S., & Turker, A.U. (2016). The effects of oxidative stress on phenolic composition and antioxidant metabolism in callus culture of common daisy. *Afr J Tradit Complement Altern Med*., 13(4), 34–41.

Lee, H., Shin, S., Choo, G., Kim, H., Park, Y., Kim, B. ... Jung, J. (2018). Anti-inflammatory effect of quercetin and galangin in LPS stimulated RAW264.7 macrophages and DNCB induced atopic dermatitis animal models. *International Journal of Molecular Medicine*, 41, 888-898.

Malik, P. & Mukherjee, T.K. (2014). Structure-function elucidation of antioxidative and prooxidative activities of the polyphenolic compound curcumin. *Chinese Journal of Biology*. 2014. 396708

Mohamad, S., Zin, N.M., Wahab, H.A., et al. (2011). Antituberculosis potential of some ethanobotanically selected Malaysian plants. *J. Enthamopharmacol*. 133: 1021-1026.

Nair, N., & Gongora, E. (2016). Heart failure in chemotherapy-related cardiomyopathy: Can exercise make a difference?. *BBA clinical*, 6, 69–75.

Normala, H. & Suhaimi, M.I. (2011). Quantification of Total Phenolics in Different Parts of *Pluchea indica* (Less) Ethanolic and Water Extracts. *Pertanika J. Sci. & Technol*. 19(1): 19–24.

Ohe, Y., (2002). Treatment-related death from chemotherapy and thoracic radiotherapy for advanced cancer. *Panminerva Med*. 44(3): 205-12.

Park, S. (2013). The effects of high concentrations of vitamin C on cancer cells. *Nutrients*, 5(9), 3496–3505.

Petchlert, C., Tabtim, R., Apirat, O., Boonbai, R. (2016). Antimutagenic and anti-oxidized LDL properties of *Pluchea indica* tea. *In proceedings of the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 6)*. January 21-23, 2016 at Pullman Raja Orchid Hotel Khonkaen, Thailand. 239-244.

Rosilda, A.H., Erazuliana, A.K., Zuraini, N. (2008). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract of *Pluchea indica* (L) Less. Leaf. *Pharmacogyonline*.2:349-360.

Ruan, J., Yan, J., Zheng, D., Sun, F., Wang, J., Han, L., Zhang, Y. and Wang, T. (2019). "Comprehensive chemical profiling in the ethanol extract of *Pluchea indica* aerial parts by liquid chromatography/mass spectrometry analysis of its silica gel column chromatography fractions", *Molecules*. 24(15): 2784.

Shukla, S. & Gupta, S. (2010). Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res.* 27(6):962-78.

Srisook, E., Buapool, D., Boonbai, R., Simmasut, P., Charoensuk, Y., & Srisook, K. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less herbal tea. *J Med Plants Res*, 6:4077-4081.

Suriyaphan O. (2014). Nutrition, health benefits and applications of *Pluchea indica* (L.) Less leaves. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 41(4):1-10.

Vongsak, B., Kongkiatpaiboon, S., Jaisamut, S. and Konsap, K. (2018). Comparison of active constituents, antioxidant capacity, and **α**-glucosidase inhibition in *Pluchea indica* leaf extracts at different maturity stages. *Food Bioscience*, 25:68-73.

Widyawati, P.S., Werdani, Y.D.W., Setiokusumo, C. and Kartikasari, A. (2017). In vitro antioxidant capacities and antidiabetic properties of *Pluchea* leaves and green tea mixtures at various proportions. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 9(8): 203-208.

Ye, J.C., Hsiao, M.W., Hsieh, C.H., et al. (2010). Analysis of caffeic acid extraction from *Ocimum gratissimum* Linn. by High performance liquid chromatography and its effects on a cervical cancer cell line. *Taiwan J Obstet Gynecol*; 49(3): 266-271.

Zeng, A., Liang, X., Zhu, S., Liu, C., Wang, S., Zhang, Q. ... Song, L. (2021). Chlorogenic acid induces apoptosis, inhibits metastasis and improves antitumor immunity in breast cancer via the NF-**K**B signaling pathway. *Oncology Reports*, 45, 717-727.