

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบผลอ่อนมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเซลล์มะเร็งตับ
มะเร็งปากมดลูกและฮิวแมนเคอราตินไนไซต์เซลล์
BIOLOGICAL ACTIVITY OF *CARISSA CARANDAS* LINN. YOUNG FRUIT EXTRACT
ON HEPG2, HELA AND HUMAN KERATIONCYTE CELLS HACAT

นนุช กำลั้งแพทย์^{1,*}, อติศรี เจริญพานิช¹ และ ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร²
Nongnuch Gumlungpat^{1,*}, Adisri Charoenpanich¹ and Panupun Limpachayaporn²

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

² ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

¹Department of Biology Faculty of Science, Silpakorn University

²Department of Chemistry Faculty of Science, Silpakorn University

Received: 10 March 2020

Revised: 23 June 2020

Accepted: 4 December 2020

บทคัดย่อ

มะม่วงหาวมะนาวโห่เป็นผลไม้พื้นบ้านของคนไทยที่ให้ความสนใจมากขึ้นเนื่องจากมีประโยชน์ต่อร่างกายและสามารถนำมารักษาโรคได้ เพื่อให้การมะม่วงหาวมะนาวโห่มาใช้ในทางการแพทย์อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นจึงได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบผลอ่อนของมะม่วงหาวมะนาวโห่ในชิ้นน้ำต่อเซลล์ HepG2, HeLa และ HaCaT กิจกรรมการวิจัยสารต้านอนุมูลอิสระถูกกำหนดโดย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay ผลการวิจัยพบว่า IC₅₀ เท่ากับ 88.05 ± 0.06 µg/mL และ 0.25 ± 0.28 mg/mL ตามลำดับ และงานวิจัยนี้ยังได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของ มะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 mg/mL กับเซลล์ทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 24, 48 ชั่วโมง จากนั้นหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์โดยใช้การทดสอบด้วยวิธี MTT assay พบว่าเซลล์ HepG2 0.01-1.00 mg/mL ทุกช่วงเวลามีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับในการทดสอบกับเซลล์ Hela พบว่าความเข้มข้น

* ผู้ประสานงาน: นนนุช กำลั้งแพทย์

อีเมล: nuch_nongnuch@hotmail.com

0.05-1.00 mg/mL เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนเซลล์ HaCaT พบว่าความเข้มข้น 0.01 mg/mL มีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับ การควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่า สารสกัดหยาบอ่อนของมะม่วงหาวมะนาวโห่มีการตอบสนองความเป็นพิษต่อเซลล์ต่างกัน ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสารสำคัญเพื่อใช้ในการป้องกันโรคต่างๆ รวมทั้งโรค มะเร็งต่อไป

คำสำคัญ: มะม่วงหาวมะนาวโห่, มะเร็งตับ, มะเร็งปากมดลูก, ฮิวแมนเคอราติโนไซด์เซลล์

Abstract

Carunda fruit was local fruit which Thai people pay more attention lately because it has health benefits and can be used to treat diseases. In order to make more effective medical uses of carunda fruit, the biological activities of the rough extract of the unripe carunda fruit in aqueous layer on HepG2, HeLa and HaCaT cells were examined. The antioxidant research activity was determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay. The results reveal that the IC_{50} were at $88.05 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ and $0.25 \pm 0.28 \text{ mg/mL}$ respectively. In addition, this research also tested the effects of carunda fruit at concentrations of 0, 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 and 1.00 mg/mL with all 3 cell types for 24 and 48 hours. The cell survival rate was determined afterward by using the MTT assay method. It was found that when comparing to the controls, HepG2 cells of 0.01-1.00 mg / mL at all intervals had a statistically significant decrease in cell survival ($P<0.05$). In testing with Hela cells, 0.05-1.00 mg /mL concentrations for 48 hours had a statistically significant decreased in cell survival ($P<0.05$). The HaCaT cells at the concentration of 0.01 mg/mL had lower survival rate than 50% compared to the controls ($P<0.05$). It was found that the rough extract of the unripe carunda fruit had different cytotoxic responses which may be useful

in the development of important substances for use in the prevention of various diseases including cancer in the future

Keywords: *Carissa carandas* Linn., HepG2cell, HeLa cell, Human keratinocyte cell

บทนำ

มะเร็งเป็นโรคร้ายแรงที่เป็นสาเหตุในการเสียชีวิตเพิ่มสูงขึ้นในทุกปีที่เกิดจากเซลล์ร่างกายที่มีความผิดปกติในการควบคุมการแบ่งเซลล์ ทำให้ไม่สามารถควบคุมการแพร่กระจายของเซลล์ได้ จึงมีความพยายามที่จะค้นหาที่สามารถใช้ในการรักษาเซลล์มะเร็งที่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติน้อยที่สุด ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในการต่อต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งมีการริเริ่มนำมาใช้เมื่อประมาณ 25 ปีก่อน จากรายงานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (NATIONAL CANCER INSTITUTE) ในปี 1990 พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นของยาต้านมะเร็ง (anti-cancer drug screening test) โดยใช้ร่วมกับการวัด metabolic activity ของเซลล์ เช่น การวัด 3, [4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay หรือ Sulforhodamine B (SRB) Assay (Rubinstein et al., 1990, Senthilraja & Kathiresan, 2015) ซึ่งวิธีดังกล่าวยังคงมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เพื่อทดสอบหาสารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้

มะม่วงหาวมะนาวโห่ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Carissa carandas* Linn. (เกษตรดิถีพัล, 2020) เป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการดูแลสุขภาพและรักษาโรค ป้องกันการเกิดโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง มะเร็ง ระวังปวด ด้านการอักเสบ แก้ไข้ รักษาโรคตับ ฯลฯ (Sharma et al., 2007; Bhaskar & Balakrishnan, 2009) *C. carandas* มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงประกอบด้วย สารโพลีฟีนอลิก (polyphenolic) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ฟลาโวนอน (flavanone) วิตามินซี อัลคาลอยด์ (alkaloid) ซาโปนิน (saponin) และ แทนนิน (tannins) (Kubola et al., 2011; Itankar et al., 2011; Gupta et al., 2014; SimLa et al., 2013; สกฤตกานต์ สิมลา และคณะ, 2556; วชิราภรณ์ ผิวล่อง และคณะ, 2556) และยังพบว่าในผลอ่อนสามารถพบวิตามินซีสูงสุด (Pewlong et al., 2013)

เนื่องจาก *C. carandas* มีสารต้านอนุมูลอิสระจำนวนมากจึงทำให้มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด Caov-3 และเซลล์มะเร็งปอดจากสารสกัดจากใบ *C. carandas* ด้วยโคลโรฟอร์มได้เป็นอย่างดี (Sulaiman, n.d.) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสาร carandinol จากใบซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ triterpene เมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) การสร้างภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) สารต่อต้านไกลเคชัน (antiglycation) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สามารถก่อความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง HeLa, PC-3 และ 3T3 แต่จะมีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งคอมดลูก (HeLa) มากที่สุด (Begum et al., 2013) และยังพบว่าสารสกัด aqueous ethanolic fruit extract (AEE) ของ *C. carandas* ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella Pneumonia* ยับยั้งการเจริญของเซลล์ HeLa ได้ถึง 34% (David & Karekalammanavar, 2015) ส่วนสารสกัดจากรากมีฤทธิ์ในการรักษาเซลล์ตับจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) จากการได้รับสาร CCL₄ และยาพาราเซตามอล (Hegde & Joshi, 2009) อย่างไรก็ตามยังขาดการศึกษาถึงผลที่ชัดเจนของ *C. carandas* ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง และความเป็นพิษที่อาจส่งผลข้างเคียงกับเซลล์ปกติเพื่อนำไปสู่การพัฒนาและนำ *C. carandas* มาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง

งานวิจัยในครั้งนี้ต้องการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบผลอ่อนของ *C. carandas* ในชั้นน้ำโดยตรงต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro*) เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งสองชนิดคือ เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มปากมดลูก (Hela) นอกจากนี้ยังศึกษาถึงระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (HaCaT) เนื่องจาก HaCaT เป็นเซลล์ต้นกำเนิดซึ่งสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อของร่างกาย

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้มีดังนี้ Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), 0.25% Trypsin EDTA (1X), Trypan blue, MTT, DMSO, HEPES, KH₂PO₄, MgCl₂·6H₂O, NaHCO₃ และ NaOH

การเตรียมสารสกัดชิ้นน้ำจากผลอ่อน *Carissa carandas* Linn

เตรียมสารสกัดโดยนำผลอ่อน *C. carandas* ชั่งน้ำหนัก 4.4 กิโลกรัม ปั่นละเอียด แห้ในเอทานอล 5.5 ลิตร นำไปใส่ไว้ใน Erlenmeyer flask แห้ทิ้งไว้ 1 คืน กรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ครั้ง แยกกากออก นำไปใส่ไว้ใน Erlenmeyer flask ปิดฝาด้วย par film แล้วปิดทับด้วยกระดาษลอติอีกครั้ง จากนั้นนำส่วนที่เป็นกากมาแช่ไว้ในเอทานอล 2,600 mL อีกครั้ง ทิ้งไว้อีก 1 วัน หลังจากนั้นนำมากรองจะได้สารละลายนำไปรวมกับครั้งแรก นำสารละลายที่กรองได้มาระเหยด้วยตัวทำละลายภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสได้สารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในชิ้นน้ำ (ณพัชร บัวฉวน, 2561)

การเตรียมสารสกัด *C. carandas* สำหรับทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง

อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) มี 0% Fetal Bovine Serum (FBS) ไม่มี antibiotic เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.50, 1.00 mg/mL, Doxorubicin 5 μ M (กลุ่มควบคุมเชิงบวก) และกลุ่มควบคุมไม่มีสารสกัดเป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ กรองด้วย Syringe Filters ขนาด 0.22 μ m.

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

สารสกัด *C. carandas* ละลายในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0, 3.90, 7.81, 15.62, 31.25, 62.50, 125, 250, 500 และ 1,000 μ g/mL เตรียมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.004% w/v. ใน methanol 95% ปริมาตร 100 mL การทดสอบ DPPH ใช้สารสกัด *C. carandas* ความเข้มข้น 50 μ L/หลุม และเติม 0.004% w/v DPPH 150 μ L/หลุม ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และนำไปหาค่า % inhibition (IC_{50}) of DPPH activity = $A-B/A \times 100$ (ดัดแปลงจาก Sarma et al., 2015) หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS ด้วยวิธี probit analysis

การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ American Type Culture Collection (ATCC) HeLa (ATCC® CCL-2) HepG2 (ATCC® HB-8065™) และ HaCaT (CLS: 300493) จำนวนเซลล์ 2×10^4 cells/well ในถาด 96 หลุม ที่มีอาหาร DMEM (Dulbecco Modified Eagle medium) 10% Fetal bovine serum (FBS) และ 1% Penicillin streptomycin solution โดยบ่มเซลล์

ในตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO₂ ความชื้นสัมพัทธ์ 95% ที่อุณหภูมิ 37° เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (เรณู เวชัชต์พิมลม, 2540)

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด *C. carandas* ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง HepG2 และ HeLa และความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์ผิวหนัง HaCaT

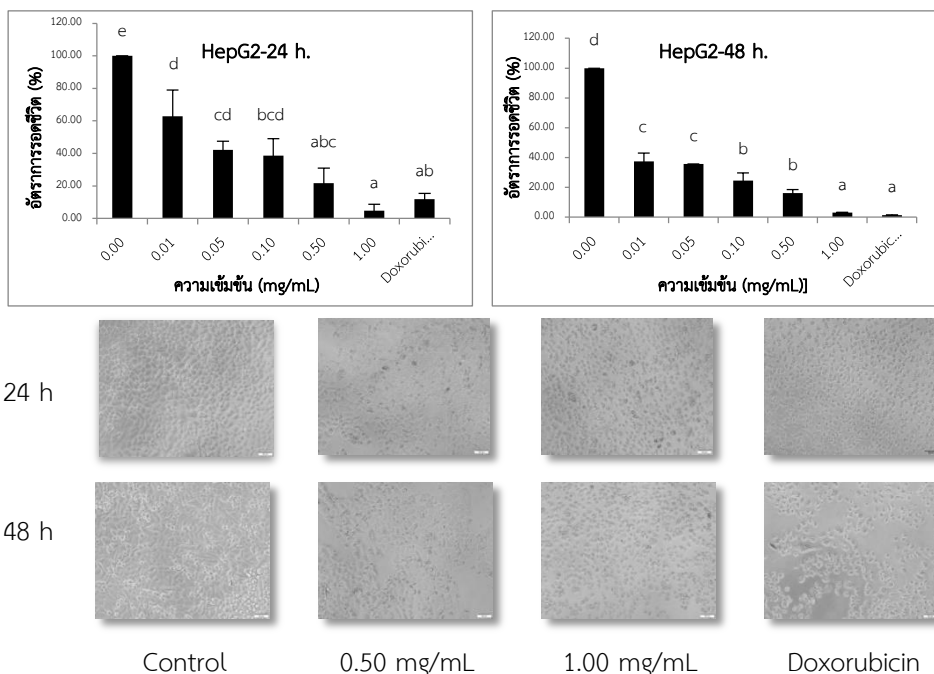
การทดสอบสารสกัด *C. carandas* ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.50, 1.00 mg/mL, Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 5 µM เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก กลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดเป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ และหลุมที่เป็น Blank (ไม่มีเซลล์) ในอาหาร DMEM 0% FBS หลุมละ 200 µl บ่มเซลล์ในตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO₂ ความชื้นสัมพัทธ์ 95% ที่อุณหภูมิ 37° เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นวัดเมตาบอลิซึมของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ทันทีด้วยเครื่อง microplate reader (BIO-RAD) คำนวณหาร้อยละของเซลล์มีชีวิตโดยเทียบกับกลุ่มควบคุม และ % cell viability = (ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ/ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม) X 100 และนำไปวิเคราะห์ probit analysis ด้วยโปรแกรม SPSS ด้วยวิธี Duncan (Gupta, 2014)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 88.00±0.06 µg/mL ซึ่งมีค่า IC₅₀ ต่ำกว่าการศึกษาของ Bhaskar & Balakrishnan, (2009) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดจากรากจาก *C. carandas* ในชั้นน้ำด้วยวิธี DPPH พบว่ามีค่า IC₅₀ เท่ากับ 216.18 µg/mL

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำต่อเซลล์ HepG2, HeLa, และ HaCaT ด้วยวิธี MTT assay เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.20, 1.41 และ 0.58 mg/mL ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งในการทดลองของ Sulaiman et al. (2008) พบว่าสารสกัดจากผลดิบ *C. carandas* ด้วยเฮกเซน และคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 2.942 µg/mL และ 8.422 µg/mL ส่วนในการทดลองของ เกสรี กลิ่นสุคนธ์ (2560) พบว่าสารสกัด *C. carandas* จากผลดิบมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 41.29±0.42 mg/mL สารสกัดจากใบ *C. carandas* ด้วยคลอโรฟอร์มมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 7.702 µg/mL (Sulaiman et al., 2012 และ kumar et al., 2013)

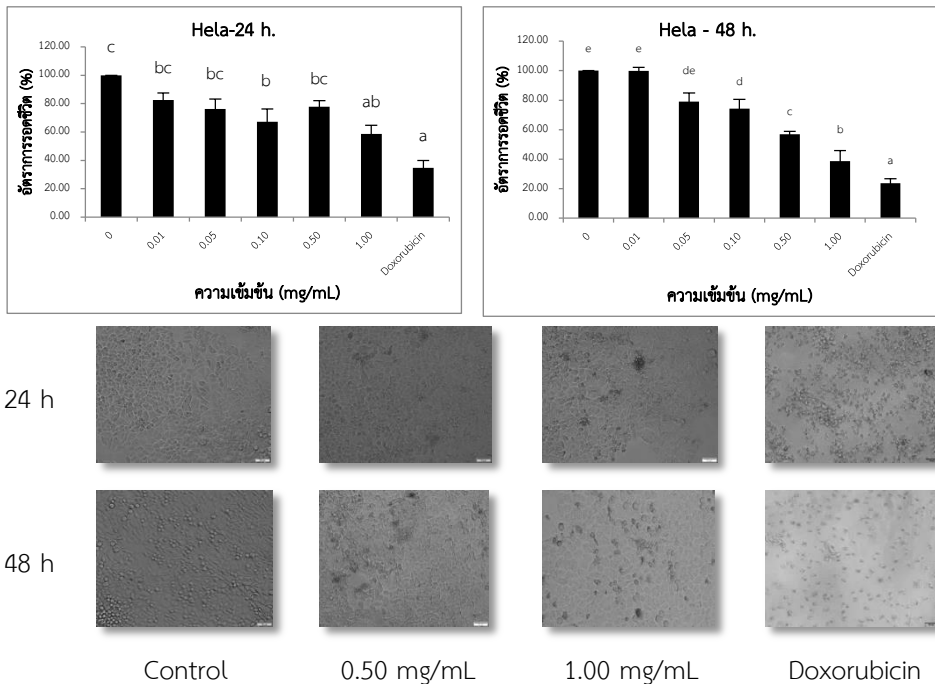
ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำต่อ HepG2 cell การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในส่วนสกัดชั้น ในการยับยั้งเซลล์ HepG2 ที่ความเข้มข้น 0.01-1.0 mg/mL จากนั้นตรวจสอบอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay โดยใช้ยา Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 5 μ M เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก พบว่าเมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดทุกความเข้มข้นส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HepG2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 62.87, 42.27, 38.66, 21.62, 4.74 และ 11.94% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gupta et al. (2014) ที่ศึกษาสารสกัดจากผลของ *C. carandas* ในชั้นเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa, MCF-7, MG-63 และ HepG2 และสารสกัดจากใบ *C. carandas* ในชั้นเอทานอลมีทำให้เซลล์ HepG2 มีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือ $67 \pm 80\%$ ที่ความเข้มข้น 200 μ g/mL (Wachiraporn et al., 2013)



รูปที่ 1 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำต่อ HepG2 cell การมีชีวิตของเซลล์และรูปร่างเซลล์ที่ 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง (a, b, c, d แสดงความแตกต่างทางสถิติ ANOVA $p < 0.05$)

เมื่อทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สารสกัดทุกความเข้มข้นส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HepG2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมีค่าเท่ากับ 37.36, 35.63, 24.60, 16.15, 3.05 และ 1.35% ตามลำดับ อาจสังเกตได้ว่าพบการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองช่วงเวลา และยังพบว่าลักษณะรูปร่างของ HepG2 cell ที่เกิดการตายมีลักษณะหดสั้น และหลุดออกจากพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงใกล้เคียงกับในกลุ่มควบคุมเชิงบวก Doxorubicin (รูปที่ 1)

ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำต่อ HeLa cell การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำในการยับยั้งเซลล์ HeLa ความเข้มข้น 0.01-1.0 mg/mL เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay โดยใช้ยา Doxorubicin ความเข้มข้น 5 μ M เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ในกลุ่มทดลองที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.01, 0.05 และ 0.50 mg/mL เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม โดยอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือ 58% ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1.00 mg/mL (รูปที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sulaiman et al. (2012) และ kumar et al. (2013) ที่ศึกษาการทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง โดยใช้สารสกัดจากใบ ผลดิบ และผลสุก พบว่าสารสกัดจากใบด้วย chloroform สามารถต้านการทำงานของเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด Caov-3 ได้เป็นอย่างดี สารสกัดจากใบ *C. carandas* ด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด Caov-3 (human ovarian carcinoma) สารสกัดผลดิบด้วยเฮกเซน และคลอโรฟอร์ม สามารถต้านการทำงานของเซลล์มะเร็งปอดได้ และยังมีที่ยืนยันว่าสารสกัดจากใบของ *C. carandas* สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ (Sabira et al., 2013 และ Pewlong et al., 2014)



รูปที่ 2 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาดผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำต่อ HeLa cell การมีชีวิตของเซลล์และรูปร่างเซลล์ที่ 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง (a, b, c, d,e แสดงความแตกต่างทางสถิติ ANOVA $p < 0.05$)

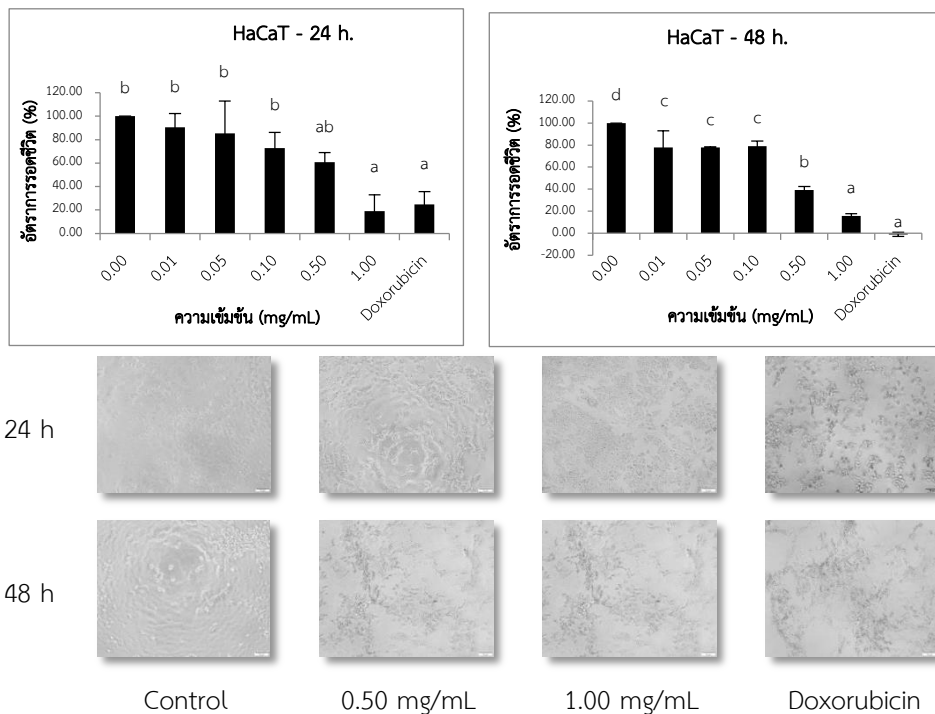
เมื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตที่ 48 ชั่วโมง พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของ HeLa cell ลดลงตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1.00 mg/mL อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือ 38% (รูปที่ 2)

อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ พบว่าเซลล์ ยังคงรูปร่างของเซลล์เยื่อหุ้มและการยึดเกาะกับพื้นผิว แตกต่างจากในกลุ่มควบคุมเชิงบวก Doxorubicin ซึ่งเซลล์มีลักษณะหดสั้นและตายหลุดออกจากพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามในกลุ่มที่ทดสอบสารสกัดที่ 1.00 mg/mL ทั้งสองช่วงเวลาพบเซลล์ที่กำลังแบ่ง เซลล์น้อยกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน สังเกตจากจำนวนเซลล์ทรงกลมที่ลอยอยู่ด้านบนของกลุ่มเซลล์ (รูปที่ 2)

ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาดผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำต่อเซลล์ ผิวน้ำเคราติโนไซต์ (HaCaT)

ทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดหยาดผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำในเซลล์ HaCaT ความเข้มข้น 0.01-1.0 mg/mL เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay โดยใช้ยา Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 5 μ M เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก พบว่าเมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในกลุ่มทดลองความเข้มข้นของสารสกัด 0.01-0.50 mg/mL มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือ 19.11% ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1.00 mg/mL เซลล์เกิดการตาย โดยมีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกับเซลล์กลุ่มที่ได้รับยา Doxorubicin มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 24.75% (รูปที่ 3)

เมื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.01-0.10 mg/mL ไม่มีความแตกต่างกันแต่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ระหว่าง 77.88-79% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hegde & Joshi (2009) พบว่าสารสกัดจากรากของ *C. carandas* ด้วยเอทานอลโดยให้ทางปากไม่เป็นพิษต่อหนูแรท อีกทั้งยังสามารถป้องกันเซลล์ตับจากการทำลายของคาร์บอนเตตระคลอไรด์ และพาราเซตามอล และยังเพิ่มระดับกรดยูริก glutathione เอนไซม์ superoxide dismutase catalase และโปรตีนในเลือดของหนูแรทได้ ส่วนความเข้มข้น 0.50 mg/mL มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อัตราการรอดชีวิต 39.11% ส่วนความเข้มข้น 1.00 mg/mL และ Doxorubicin มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อัตราการรอดชีวิต 15.57 และ -1.15% ตามลำดับ



รูปที่ 3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำต่อเซลล์ผิวหนังเคราติโนไซต์ (HaCaT) การมีชีวิตของเซลล์และรูปร่างเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง (^{a, b, c, d} แสดงความแตกต่างทางสถิติ ANOVA $p < 0.05$)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของสารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการทดสอบที่เพิ่มขึ้นมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก และยังพบว่าทั้งสองช่วงเวลาเซลล์เกิดการตายหลุดลอกเป็นกลุ่มคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 3)

เปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าช่วงเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดในช่วงความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 mg/mL ส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ HepG2 แต่ไม่ส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ HeLa และเซลล์ผิวหนัง HaCaT ($p < 0.05$) (รูปที่ 3) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด

ตารางที่ 1 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์และค่า IC_{50}

ความเข้มข้น ของสารสกัด	Cell line					
	HepG2		HeLa		HaCaT	
	% cell viability	IC_{50} (mg/mL)	% cell viability	IC_{50} (mg/mL)	% cell viability	IC_{50} (mg/mL)
0.00 mg/mL	100.00		100.00		100.00	
0.01 mg/mL	37.36		82.58		90.45	
0.05 mg/mL	35.63		76.31		85.41	
0.10 mg/mL	24.60	0.17	67.32	1.38	72.66	0.25
0.50 mg/mL	16.15		77.91		60.77	
1.00 mg/mL	3.05		58.53		19.11	
Doxorubicin	1.35		34.78		24.75	

พบว่าเซลล์ HepG2 และเซลล์ HaCaT มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่าเซลล์ HeLa โดยสารสกัด *C.carandas* มีฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์ HepG2 ได้ดีที่สุดมีค่า $IC_{50} = 0.17 \pm 0.12$ mg/mL และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ในระดับปานกลางมีค่า $IC_{50} = 0.25 \pm 0.28$ mg/mL มีการยับยั้งเซลล์ HeLa ได้น้อยที่สุดมีค่า $IC_{50} = 1.38 \pm 0.08$ mg/mL (ตารางที่ 1)

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์พบว่าสารสกัด *C. carandas* ทำให้เซลล์ HepG2 เกิดการตายโดยลักษณะรูปร่างของเซลล์จะหดสั้นใกล้เคียงกับในกลุ่มที่ได้รับยา Doxorubicin ในขณะที่เซลล์ HeLa เซลล์ส่วนใหญ่ยังคงรูปร่างเดิมแต่ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1.00 mg/mL การมีชีวิตของเซลล์ HeLa ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 2) ส่วนในเซลล์ HaCaT เซลล์มีลักษณะเหี่ยวและหลุดออกเป็นกลุ่ม

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำที่ความเข้มข้นสูงๆ มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HepG2 และ HeLa ลดลงเมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบในเซลล์ปกติ HaCaT ที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL 24 ชั่วโมง 0.50 mg/mL 48 ชั่วโมง พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 50%

จะเห็นได้ว่าแม้ความเข้มข้นต่ำที่สุดในการทดลองนี้และใช้ระยะเวลา 48 ชั่วโมงก็ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ปกติได้ 77.90% ดังนั้นหากต้องการนำสารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำไปใช้เพื่อการรักษาควรเลือกใช้ที่ความเข้มข้นต่ำและมีอัตราการตายของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติที่ 50% จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการตอบสนองของเซลล์แต่ละชนิดต่อสารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำ อาจพบการตอบสนองความเป็นพิษต่อเซลล์แตกต่างกัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบในการทดสอบกับเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดพบว่า HepG2 มีความไวต่อการตอบสนองต่อสารสกัดหยาบผลอ่อน *C. carandas* ในชั้นน้ำสูงกว่าเซลล์ HeLa ถึงแม้ว่าผลจากการทดลองในเซลล์ปกติความเข้มข้นต่ำที่สุดและใช้เวลาทดสอบนานที่สุดมีผลทำให้เซลล์ HaCaT เจริญเติบโตลดลงก็ตาม ถึงแม้ว่าจะมีการวิจัยพบว่า *C. carandas* มีสรรพคุณทางการแพทย์แผนโบราณ และมีสารต้านอนุมูลอิสระ สารสำคัญหรือวิตามินต่างๆ ที่นำมาใช้ในการรักษาโรค อย่างไรก็ดีตามก่อนนำสารสกัด *C. carandas* ไปใช้ในทางการแพทย์ ควรมีการศึกษาถึงผลกระทบต่อเซลล์มะเร็ง ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติอื่นๆ ศึกษาระยะเวลาในการใช้เพิ่มเติมเพื่อป้องกันถึงผลกระทบต่อเซลล์ร่างกายส่วนอื่นๆ และควรศึกษาถึงกลไกความเป็นพิษของสารสกัด *C. carandas* ในส่วนอื่นเพิ่มเติมซึ่งจะเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์เพื่อทดแทนการใช้ยาสังเคราะห์ ซึ่งอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็งต่อไป ดังนั้น *C. carandas* จึงควรส่งเสริมทั้งในด้านการเกษตร และการแพทย์เพื่อนำไปสู่การพัฒนาที่ยั่งยืนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศิลปากรที่ได้ทุนอุดหนุนงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คณิสส์ เสี่ยมสุนทร อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- เกษตรดิจิทัล. (2020). ข้อมูลพันธุ์ไม้ระบบฐานข้อมูลดิจิทัล. สืบค้นเมื่อวันที่ 1 ตุลาคม 2560, จาก <https://data.addrun.org/plant/archives/321-carissa-carandas-l>.
- เกสรี กลิ่นสุคนธ์. (2560). ระยะเวลาสุกของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55. วันที่ 31 มกราคม 2560-3 กุมภาพันธ์ 2560. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. หน้า 841-848.
- ณพัชร บัวฉวน. (2561).ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกของเมล็ดและเนื้อมะม่วงไม่รู้โห่. *วารสารวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์ในพระบรมราชูปถัมภ์*, 13(2), 53-63.
- เรณู เวชัชต์พิมลม (2540). *การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์*. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- วชิราภรณ์ ผิวล่อง, สุรศักดิ์สัจจบุนทร, ศิริลักษณ์ สิงห์เพชร และ จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ. (2556). อิทธิพลของระยะเวลาสุกต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของมะม่วงหาวมะนาวโห่. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 44(ฉบับพิเศษ 2), 337-340.
- สกุณกานต์ สิมลา, สุรศักดิ์ บุญแดง และ พัทธี สิริตระกูลศักดิ์. (2556). การประเมินปริมาณสารฟลาโวนอยด์บางประการและกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระใน *Carissa carandas* Linn. *แก่นเกษตร*, 41(ฉบับพิเศษ 1), 602-606.
- Begum, S., Syed, S. A., Siddiqui, B. S., Sattar, S. A., & Choudhary M. I. (2013). Carandinol: First isohopane triterpene from the leaves of *Carissa carandas* L. and its cytotoxicity against cancer cell lines. *Phytochemistry Letters*, 6, 91-95.
- Bhaskar V. H., & Balakrishnan N. (2009). Analgesic, Anti-Inflammatory and Antipyretic Activities of *Pergularia daemia* and *Carissa carandas*, *DARU. Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(3), 168-174.
- David, M., & Karekalammanavar, G. (2015). Spectrographic analysis and in vitro study of antibacterial, anticancer activity of aqueous ethanolic fruit extract of *Carissa carandas* L. *Journal of Advanced Scientific Research*, 6(3), 10-13.

- Gupta, P., Bhatnagar, I., Kim S. K., Verma, A. K., & Shatma, A. (2014). In-vitro cancer cell cytotoxicity and alpha amylase inhibition effect of seven tropical fruit residues. *Asian Pac Journal of Trop Biomed*, 4(2), 665-671.
- Hegde, K., & Joshi, A. B. (2009). Hepatoprotective effect of carissa carandas Linn. root extract against CCl₄ and paracetamol induced hepatic oxidative stress. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(8), 660-667.
- Itankar, P. R., Lokhande, S. J., Verma, P. R., Arora, S. K., Sahu, R. A., & Patil, A. T. (2011). Antidiabetic potential of unripe Carissa carandas Linn. Fruit extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 135, 430-433.
- Kubola, J., Siriamornpun, S., & Meeso, N. (2011). Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. *Food Chemistry*, 126, 972-981.
- Kumar, S., Gupta, P., & Gupta, V. K. L. (2013). A critical review on Karamarda (*Carissa carandas* Linn.) *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, 4(4), 637-642.
- Pewlong, W., Sajjabut, S., Singphet, S., & Eamsiri, J. (2013). Influence of fruit ripening stages on the bioactive compounds of *carissa carandas*. *Agriculture Journal*, 41, 602-606.
- Rubinstein, L. V., Shoemaker, R., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., & Skehan, P. (1990). Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1113-1118.
- Sarma, A., Sarmah, P., Kashyap, D., Dutta, S., & Mahanta, M. (2015). Antioxidant activity and nutraceutical property of the fruits of an Ethano-Medicinal Plant : *Carissa carandas* L. found in Brahmaputra Valley Agro-Climatic Condition. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(2), 55-57.

- Sabira, B., Saqib, A. S., Bina, S. S. Samina, A. S. M., & Iqbal, C. (2013). The evaluation of some phytochemical content and antioxidant activity in *Carissa carandas* L. *Agriculture Journal*, 41(Suppl), 602-606.
- Senthilraja, P., & Kathiresan, K. (2015). *In vitro* cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF -7 cell lines study of Marine Yeast. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(03), 080-084.
- Sharma, A., Reddy, G. D., Kaushik, A., Shanker, K., Tiwari, R. K., Mukherjee, A., & Rao, C. V. (2007) Analgesic and Anti-inflammatory Activity of *Carissa carandas* L. Fruits and *Microstylis wallichii* Lindl Tubers. *Natural Product Sciences*, 13(1), 6-10.
- SimLa, S., Boontang, S., & Siritrakulsak, P. (2013). The evaluation of some Phytochemical content and Antioxidant activity in *Carissa carandas* L. *Agriculture Journal*, 44(2), 337-340.
- Sulaiman, S. F., Teng, W. S., Leong, O. K., Yusof, S. R., & Muhammad, T. S. T. (n.d.). Anticancer study of *Carissa carandas* extracts. Retrieved May 16, 2014 from <http://goo.gl/W2WjSG>.
- Wachiraporn, P., Surasak, S., Jaruratana, E., & Sirilak, C. (2014). Evaluation of Antioxidant activities, Anthocyanins, Total Phenolic Content, Vitamin C Content and Cytotoxicity of *Carissa carandas* Linn. *CMUJ NS Special Issue on Food and Applied Bioscience*, 13(1), 509-517.