

ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของสารสกัดจากเปลือกรากหม่อน ANTI-ANGIOGENESIS ACTIVITIES OF MULBERRY ROOT BARK EXTRACTS.

อัจฉรา แก้วน้อย^{1,*}, อ้อมบุญ วลิลิสุต¹, สุรัสวดี ปิยะวิริยะกุล² และ มาลินี เบญพาต¹
Atchara Keawnoi¹, Omboon Vallisuta¹, Suratsawadee Piyaviriyakul²
and Malinee Benbhat¹

¹ ภาควิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

² กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

¹ Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Science and Technology,
Bansomdejchaopraya Rajabhat University.

² Research Division, National Cancer Institute Thailand, Department of Medical Services Ministry
of Public Health.

Received: 12 April 2020

Revised: 16 October 2020

Accepted: 4 December 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่จากเปลือก
รากหม่อน โดยใช้สารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล จากสารสกัดเฮกเซนสามารถ
แยกกรดเบทูลินิกและเบตา-ซิโตสเตอรอล เมื่อนำสารสกัดและสารบริสุทธิ์ไปทดสอบความเป็น
พิษกับ HUVECs cell ได้ค่าความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์คือ 0.1-1.0 µg/ml จึงนำไป
ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ พบว่าในสารสกัดเฮกเซนมีส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ดีกว่า
สารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยให้ค่าร้อยละการยับยั้ง 77.8-93.3 ในขณะที่กรดเบทูลินิก และเบตา-
ซิโตสเตอรอล ให้ค่าร้อยละการยับยั้ง 73-85.8 สารสกัดไดคลอโรมีเทนที่ได้แยกส่วนที่ละลาย
ในเฮกเซนออกไปแล้วให้ค่าร้อยละการยับยั้ง 69.4-86.7 และสารสกัดเมทานอลที่ละลายได้ใน
ไดคลอโรมีเทน (MeOH/CH₂Cl₂) ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ได้ดีที่สุด ให้ค่าร้อยละ
การยับยั้ง 95.4 ดังนั้นฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเส้นเลือดใหม่ของสารสกัดเปลือกรากหม่อนมีกรด
เบทูลินิกและเบตา-ซิโตสเตอรอล เป็นสารออกฤทธิ์ร่วมกับสารอื่นๆ โดยส่วนสกัดที่ให้ฤทธิ์สูงสุด

* ผู้ประสานงาน: อัจฉรา แก้วน้อย

อีเมล: atcharakaewnoi@gmail.com

คือสารสกัดเมทานอลส่วนที่ละลายได้ในไดคลอโรมีเทน ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) แม้ว่าในส่วนสกัดนี้ไม่มี กรดเบทูลินิกและเบตา-ซิโตสเตอรอล แต่สามารถให้การยับยั้งได้ถึง 95.4% ที่ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

คำสำคัญ: สารสกัดเปลือกกรากหม่อน, กรดเบทูลินิก, เบตา-ซิโตสเตอรอล,ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเส้นเลือดใหม่

Abstract

The aim of this study was to examine anti-angiogenesis activity of mulberry root bark extracts using hexane, dichloromethane, and methanol. The hexane extract was able to isolate betulinic acid and β -sitosterol were isolated. When extracts and pure substances were tested for cytotoxicity against HUVECs cell, the concentrations not cytotoxic to cells were in the range of 0.1-1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, therefore these concentrations were used for determination of anti-angiogenesis activity. The sub-fractions of hexane extract gave better activity than the isolated pure compounds. The percentage of inhibition were 77.8-93.3% while betulinic acid and β -sitosterol gave only 73-85.8%. The dichloromethane extract without hexane solubles gave 69.4-86.7 percentage of inhibition. The dichloromethane solubles from methanolic extract ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) gave the best anti-angiogenesis activity or 95.4%. Therefore, the anti-angiogenesis activity of mulberry root bark extracts were due to betulinic acid and β -sitosterol in combination with other substances. The best activity was found with dichloromethane ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) extract at 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in which betulinic acid and β -sitosterol were absent.

Keywords: Mulberry root bark extracts, betulinic acid, β -sitosterol, antiangiogenesis

บทนำ

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นสาเหตุสำคัญของการตายในผู้ป่วยโรคมะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมา (Natalie, 2019) โดยส่วนใหญ่ผลการรักษามักจะไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ผู้ป่วยอาจต้องตายหรือไม่สามารถทนต่อพิษจากยาเคมีบำบัดและทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในที่สุด องค์การอนามัยโลกรายงานว่าผู้ป่วยด้วยมะเร็งผิวหนังทั่วโลก 132,000 คนต่อปี (WHO, 2019) ในปี พ.ศ. 2562 สมาคมโรคมะเร็งอเมริกัน (American Cancer Society, ACS) ได้ประมาณจำนวนผู้ป่วยใหม่ด้วย เมลา โนมา 96,480 ราย (Cancer Facts and Figures, 2019) ประมาณจำนวนผู้ป่วยที่จะเสียชีวิต 7,230 คน ในจำนวนนี้เป็นผู้ชาย 4,740 คน ผู้หญิง 2,490 คน (Hurlbert, 2019).

โดยทั่วไปมะเร็งแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะเริ่มแรก ที่มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ผิดปกติและเกิดเป็นก้อนมะเร็งขึ้น ระยะต่อมาคือระยะแพร่กระจาย เซลล์มะเร็งต้องการเกาะกับเซลล์อื่นที่อยู่ใกล้เคียงในตำแหน่งที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (adhesion) โดยที่เซลล์มะเร็งระยะแพร่กระจายนี้ สามารถผลิตเอนไซม์ Matrix metalloproteinase (MMPs) (Sato, 1994) ซึ่งมีคุณสมบัติย่อยสลาย extracellular matrix และเซลล์มะเร็งจะเคลื่อนย้าย (migration) ไปสู่ตำแหน่งอื่นโดยอาศัยระบบน้ำเหลืองและระบบหมุนเวียนโลหิต ระยะสุดท้ายคือการไปก่อกำเนิดมะเร็งที่ตำแหน่งใหม่ ถ้าเป็นชนิดก้อน (solid tumor) จะเกิด ขบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) เพื่อเป็นการนำสารอาหารและออกซิเจนมาเลี้ยงก้อนมะเร็งให้เจริญเติบโต (Woodhouse et al., 1997) ปัจจุบันยารักษามะเร็งส่วนใหญ่จะมีกลไกการออกฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งระยะที่กำลังแบ่งตัว (antiproliferative drugs) เมื่อนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะลุกลามมักไม่ค่อยได้ผล ทางเลือกใหม่ของการรักษามะเร็งระยะลุกลามที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน คือ การใช้ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง ขบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (antimetastatic drugs) (Lee et al., 2003) หรือทำลายการก่อกำเนิดเส้นเลือดใหม่ (antiangiogenesis) (Nakamura et al., 2003) จึงทำให้มีการค้นคว้าและพัฒนา ยารักษามะเร็งชนิดใหม่ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อขบวนการดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มีบทบาทสำคัญเพราะเป็นแหล่งกำเนิดและต้นแบบของยาใหม่ที่มีกลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกัน และอาจพบพิษข้างเคียงได้น้อยกว่ายาที่ได้จากการสังเคราะห์ (Ogasawa et al., 2001).

หม่อน (*Morus alba* L. ExST) เป็นไม้ขนาดกลางอยู่ในวงศ์ Moraceae (Smitinand, 2014) จากตำราพื้นบ้านมีการใช้เปลือกกรากหม่อน แก้อาการขัดเบา บวมน้ำ และแก้อาการ ไอ ที่มีเสมหะสีเหลือง (Chuakul et al., 1997) มีรายงานว่าสารในกลุ่ม polysaccharide จาก สารสกัดจากเปลือกกรากหม่อน มีฤทธิ์สร้างเสริมภูมิคุ้มกัน (Kim et al., 2000)

แนวคิดในการพัฒนายาใหม่สำหรับรักษามะเร็งมีแนวโน้มที่จะค้นหายาที่ออกฤทธิ์ได้หลายอย่าง (multifunction) (Liby et al., 2007) ดังนั้นยาที่จะนำมารักษาผู้ป่วยด้วย เมลาโนมานั้น นอกจากฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต (antiproliferative) แล้วต้องสามารถฟื้นฟู เซลล์ปกติที่ได้รับพิษจากเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงควรมีสารประกอบที่มีฤทธิ์ antioxidant และ เนื่องจากเมลาโนมา สามารถผลิตเมลานินเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงควรมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง เมลาโนอินด้วย จากการศึกษาสารสกัดเปลือกกรากหม่อนพบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส และสามารถยับยั้งเซลล์เมลาโนมาได้ (อ้อมบุญ ล้วนรัตน์, 2552) เนื่องจาก มะเร็งชนิดก้อน (solid tumor) มีการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) ล้อมรอบก้อนมะเร็ง นั้น เพื่อให้ก้อนมะเร็งเจริญเติบโตมากขึ้นและเพิ่มโอกาสในการกระจายของเซลล์มะเร็ง (Keshet & Ben-Sasson, 1999) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งทดสอบ ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือด ใหม่ของสารสกัดจากเปลือกกรากหม่อนและสารสำคัญ

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดสารจากเปลือกกรากหม่อน

เปลือกกรากหม่อนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ คือ *Morus alba* L. พันธุ์นครราชสีมา 60 (นม.60) อายุ 5 ปีซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากคุณพินัย ห่องทองแดง โครงการอนุรักษ์ พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ต.คลองไผ่ อ.สหัสขันธ์ จ.นครราชสีมา

นำเปลือกกรากหม่อนอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C บดเป็นผงละเอียดขนาดน้อยกว่า 2 มม. จำนวน 3200 กรัม มาสกัดแบบต่อเนื่องด้วยวิธี Soxhlet extraction ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว ต่างกันคือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ตามลำดับโดยใช้ปริมาตรตัวทำละลายแต่ละ ชนิดเท่ากับ 4 ลิตร ระเหยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศ (rotary evaporator) บันทึกน้ำหนักสารสกัดคำนวณร้อยละจากสมการ

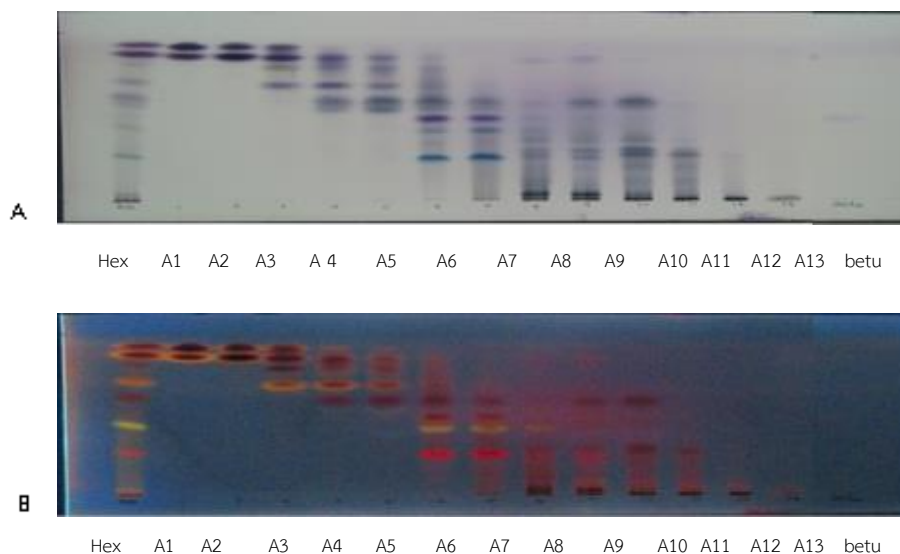
$$(\text{น้ำหนักสารสกัด} \times 100) / \text{น้ำหนักผงกรากหม่อน}$$

การตรวจสอบองค์ประกอบเคมีด้วย TLC

เปรียบเทียบองค์ประกอบเคมีในสารสกัดแต่ละชนิดใช้เทคนิค Thin layer chromatography ด้วยระบบตัวทำละลายระบบที่ 1 เฮกเซน : ไดคลอโรมีเทน : กรดอะซิติก (70 : 30 : 0.3) ซึ่งเป็นระบบตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ สำหรับตรวจสอบสารสกัดเฮกเซน และ สารสกัดไดคลอโรมีเทน และระบบที่ 2 คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ : กรดอะซิติก (52 : 28 : 15 : 15) ซึ่งเป็นระบบตัวทำละลายที่มีขั้วสูง สำหรับสารสกัดเมทานอล ทำการสังเกตและ บันทึกผลภายใต้แสงปกติและ UV366 nm ก่อนและหลังการพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde (Wagner et al., 1996).

การแยกสารบริสุทธิ์

นำสารสกัดเฮกเซน 30 กรัม มาทำการแยกโดยใช้เทคนิค Quick column chromatography โดยใช้ตัวดูดซับเป็น silica gel (NO. 7729, 150 กรัม และ NO. 7734, 300 กรัม) และใช้ Mobile phase แบบ gradient elution อย่างละ 2.2 L คือ เฮกเซน : ไดคลอโรมีเทน (100 : 0 ถึง 0 : 100) ไดคลอโรมีเทน : เอทิล อะซิเตท (100 : 0 ถึง 0 : 100) โดยเพิ่มและลดอัตราส่วนครั้งละ 10 เปอร์เซ็นต์ และ เอทิล อะซิเตท : เมทานอล 100 : 0, 50 : 50 และ 0 : 100) ทำการเก็บ fraction ละ 200 mL จากนั้นทำการรวม fraction ที่มี TLC patterns (Wagner et al., 1996) เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 13 fraction (A1-A13, รูปที่ 1)



รูปที่ 1 TLC patterns ของสารสกัดเฮกเซนที่ผ่านคอลัมน์ครั้งที่ 1 (A1-A13), Hex = สารสกัดเฮกเซน, betu = betulinic acid (Hexane : EtOAc : acetic acid = 80 : 20: 0.3; anisaldehyde spray; A white light; B UV 366)

นำส่วนย่อย A6 และ A7 รวมกัน (2.5 g) มาทำการแยกด้วยเทคนิค column chromatography (คอลัมน์ 2) โดยใช้ stationary phase เป็น silica gel (NO.7734, 300 กรัม) gradient elution ด้วย เฮกเซน : เอทิลอะซิเตท ตั้งแต่ 10:0 จนถึง 0:1 โดยลดเฮกเซนครั้งละ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการเก็บ fraction ละ 50 ml ได้ทั้งหมด 11 fraction (B1-B11) รวม fraction ที่มี TLC patterns เหมือนกันเข้าด้วยกัน นำ B3-B7, B9, B10 ไปทดสอบฤทธิ์ antiangiogenesis

นำส่วน B3-B7 มา 0.9 g แยกด้วยเทคนิค column chromatography (คอลัมน์ 3) โดยใช้ stationary phase เป็น silica gel (NO.7734, 60 กรัม) gradient elution ด้วย hexane : CH_2Cl_2 = 10 : 0 ถึง 0 : 10 เก็บ fraction ละ 20 ml ได้ทั้งหมด 14 fraction คือ C1-C14 จากนั้นนำ fraction C3-C4 มา 80 mg แยกต่อด้วย column chromatography (คอลัมน์ 4) gradient elution ด้วย hexane : EtOAc = 10 : 0 ถึง 9 : 1 เก็บ fraction ละ 10 ml ได้ทั้งหมด 7 fraction (D1-D7) พบว่า D4-D6 เป็นสารบริสุทธิ์ที่มีลักษณะเป็นผงสีขาว

(42 mg) หลังจากการนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค H1 NMR และ C13 NMR พบว่าเป็น เบตา-ซิโตสเตอรอล

เบตา-ซิโตสเตอรอล (β -sitosterol) : มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว, จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 137-138 °C, และมีข้อมูลทาง H1 NMR ที่ 500 MHz ดังนี้ 3.51 (1H, m, H-3), 0.68, 0.80, 0.84, 0.86, 0.96, 1.03 (3H, H-18, H-19, H-21, H-26, H-27, H-29), 5.34 (1H, d, H-6), 0.91-2.31(m, hydrogens อื่นๆ) และข้อมูลทาง C13 NMR ที่ 500 MHz ดังนี้ 37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.3 (C-4), 140.7 (C-5), 121.6 (C-6), 31.8 (C-7), 31.7 (C-8), 51.2 (C-9), 36.5 (C-10), 21.2 (C-11), 39.8 (C-12), 42.6 (C-13), 56.7 (C-14), 24.2 (C-15), 28.2 (C-16), 56.2 (C-17), 11.9 (C-18), 18.7 (C-19), 36.1 (C-20), 19.0 (C-21), 33.9 (C-22), 26.1 (C-23), 45.8 (C-24), 29.1 (C-25), 19.8 (C-26), 19.2 (C-27), 23.0 (C-28), 12.2 (C-29)

นำสาร D10-D11 มา 1 g ละลายด้วย hexane : CH_2Cl_2 = 9 : 1 และนำส่วนที่ไม่ละลาย 0.4 g มาแยกด้วย sephadex LH-20 โดยใช้ Mobile phase เป็น CH_2Cl_2 : MeOH = 1 : 1 ทำการเก็บ fraction ละ 5 ml ซึ่งได้ทั้งหมด 18 fraction (F1-F18) หลังจากตรวจสอบด้วย TLC นำ fraction ที่ F8-F15 มา 0.15 g ล้างด้วย MeOH และนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค preparative TLC โดยใช้ Mobile phase เป็น hexane: ethyl acetate: acetic acid 80:20:1 ได้สารบริสุทธิ์ 60 mg นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค H1 NMR และ C13 NMR พบว่าเป็น กรดเบทูลินิก

กรดเบทูลินิก (Betulinic acid) : มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว, จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 287-289 °C, มีข้อมูลทาง H1 NMR ที่ 500 MHz ดังนี้ 0.77 (3H, s, H-25), 0.84 (3H, s, H-24), 0.96 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-27), 0.99 (3H, s, H-23), 1.71 (3H, s, H-30), 3.03 (1H, m, H-19), 3.20 (1H, m, H-3), 4.63 (1H, s, H-29a), 4.75 (1H, s, H-29b) และข้อมูลทาง C13 NMR ที่ 500 MHz ดังนี้ 38.7 (C-1), 27.4 (C-2), 79.0 (C-3), 38.8 (C-4), 55.36 (C-5), 18.29 (C-6), 34.35 (C-7), 40.71 (C-8), 50.54 (C-9), 37.0 (C-10), 20.8 (C-11), 25.52 (C-12), 38.3 (C-13), 42.4 (C-14), 29.7 (C-15), 32.1 (C-16), 56.2 (C-17), 49.2 (C-18), 46.8 (C-19), 150.3 (C-20), 30.5 (C-21), 37.2 (C-22), 27.9 (C-23), 16.0 (C-24), 15.3 (C-25), 16.1 (C-26), 14.6 (C-27), 109.6 (C-29), 19.3 (C-30)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ ประกอบด้วย การทดลอง 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) ด้วย Resazurin colorimetric Assay (O'Brien et al., 2000)

1.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ HUVECs ด้วยอาหารที่มี 10% fetal bovine serum ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้นสัมพัทธ์ 95%

1.2 ในวันเริ่มการทดลอง (Day 0) ย่อยเซลล์ HUVECs ให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วย trypsin-EDTA ถ่ายเซลล์จำนวน 5,000 เซลล์ ต่อ 1 หลุม ในปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้นสัมพัทธ์ 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3 ในวันที่ 1 ของการทดลอง (Day 1) ละลายสารสกัดที่ต้องการทดสอบใน dimethylsulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 100, 30, 10, 3, 1, 0.3 และ 0.1 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ความเข้มข้นละ 4 หลุม ทำ 2 ซ้ำ ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้นสัมพัทธ์ 95% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.4 ในวันที่ 3 ของการทดลอง (Day 3) เติมสารละลาย resazurin ซึ่งมีสีฟ้าในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมในปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้ที่อุณหภูมิ 37 °C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้นสัมพัทธ์ 95% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

1.5 ทำการวัดปริมาณของสารประกอบ resorufin ซึ่งมีสีชมพู ซึ่งเป็น oxido-reduction indicator จากเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 และ 600 นาโนเมตร วิเคราะห์หาค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรม SigmaPlot (Grad et al., 2019) ทำการวิเคราะห์หาค่าทางสถิติด้วย Student t-test ที่ระดับ $p < 0.05$.

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ โดยวิธี Tube Formation Assay (Arnaoutova et al., 2009, Piyaviriyakul et al., 2011)

2.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ HUVECs ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารช่วยในการเจริญเติบโต 10% fetal bovine serum จากนั้นทำการเพาะให้มีปริมาณเพียงพอต่อการทดสอบ ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้นสัมพัทธ์ 95%

2.2 ทำการย่อยเซลล์ HUVECs ให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วย trypsin-EDTA และนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด จากนั้นผสมเซลล์ที่นับได้กับอาหาร และนำเซลล์จำนวน 50,000 เซลล์ ต่อ 1 หลุม ลงใน 24 well culture plate ซึ่ง pre-coated ด้วย 4 $\mu\text{g/mL}$ Matrigel solution

2.3 เติมสารสกัดหมอนใน dimethylsulfoxide (DMSO) ในความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้แก่ความเข้มข้น 1.0 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 400 ไมโครลิตร โดยจะทำการทดสอบความเข้มข้นละ 4 หลุม ทำ 25% และความชื้นสัมพัทธ์ 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4 ถ่ายภาพของเซลล์ที่เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่หรือ tube formation เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

2.5 วัดความยาวของ tube ที่เกิดขึ้นโดยใช้ Mapmeter CV-9 Jr.

2.6 นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์หาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของสารสกัด โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วย Student t-test ที่ระดับ $p < 0.05$.

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

เปลือกกรากหมอนให้สารสกัดเมทานอล (MeOH) 368.9 กรัม คิดเป็นร้อยละ 11.52 ของน้ำหนักแห้ง ได้สารสกัดไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) และสารสกัดเฮกเซน (hexane) 54.49 กรัมและ 52.52 กรัม คิดเป็นร้อยละ 1.70 และ 1.64 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดไดคลอโรมีเทนด้วย TLC พบว่า มีส่วนขององค์ประกอบที่เหมือนกัน จึงทำการ partition สารสกัดไดคลอโรมีเทนด้วยเฮกเซน โดยการนำสารสกัดไดคลอโรมีเทนมาละลายในสารละลายเมทานอล 60% ปริมาตร 600 มล. ทำการ partition กับเฮกเซนด้วยกรวยแยก ระบายให้แห้ง นำสารสกัดที่ได้ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{hexane}$) ไปรวมกับสารสกัดเฮกเซนที่ได้จากกระบวนการสกัดต่อเนื่อง (soxhlet extraction) ส่วนที่เหลือคือส่วนสกัด $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ และในทำนองเดียวกันนำสารสกัดเมทานอลมาทำการ partition ด้วยไดคลอโรมีเทนโดยการ นำสารสกัดเมทานอล 104 g มาละลายในสารละลายเมทานอล 70% ปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นทำการ partition กับไดคลอโรมีเทน ได้สารสกัดเมทานอลที่ละลายได้ในไดคลอโรมีเทน ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) ส่วนที่เหลือคือส่วนสกัดที่ละลายในเมทานอล MeOH/MeOH และนำไประเหยให้แห้งภายใต้สุญญากาศ

จากสารสกัดเหกเซนสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้คือ กรดเบทูลินิกและเบตา-ซิโตสเตียรอล เมื่อนำสารสกัดและสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ HUVECs cell พบว่า มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ HUVECs โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 3.1-100 $\mu\text{g/mL}$ ขึ้นไป ทำให้ทราบค่าความเข้มข้นที่ไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ HUVECs ของสารสกัดเหกเซน ที่ความเข้มข้น 0.1-1.0 $\mu\text{g/mL}$

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ HUVECs เซลล์ด้วย Resazurin colormetric Assay

ลำดับที่	Sample name	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1	B3-7	57.943
2	B9	55.437
3	B10	10.447
4	β -sitosterol	>100
5	MeOH/ CH_2Cl_2	4.567
6	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$	5.016
7	Betulinic acid	16.9124
8	Blue*	3.1

หมายเหตุ * หมายถึง กลุ่มสารที่ให้สีฟ้ากับ Anisaldehyde spray จากสารสกัดเหกเซน

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่โดยวิธี Tube Formation Assay สารสกัดเหกเซนที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งไม่แสดงความเป็นพิษต่อการเจริญของเซลล์ HUVECs สามารถยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Tube formation) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สารสกัดที่มีค่าการยับยั้งดีที่สุดคือ MeOH/ CH_2Cl_2 ยับยั้งได้ 95.4% ที่ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (รูปที่ 2) และ 95% ที่ความเข้มข้น 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (รูปที่ 3)

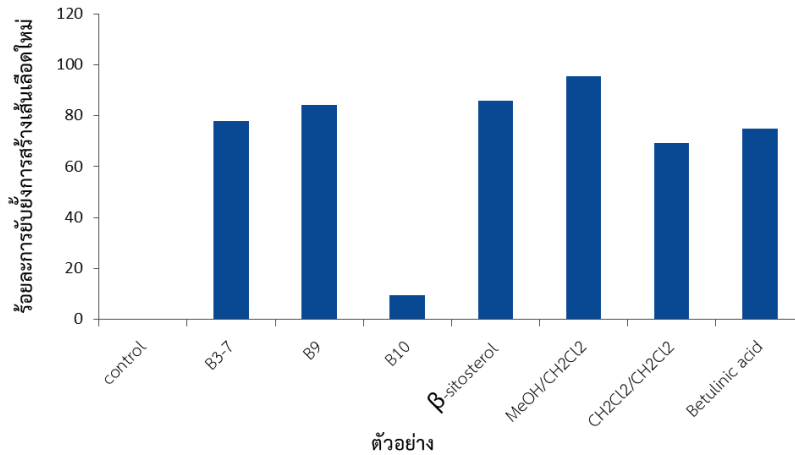
เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่โดยวิธี tube formation assay ของส่วนสกัดและสารที่แยกได้จากเปลือกกรากคือ กรดเบทูลินิกและเบตา-ซิโตสเตียรอล รวม 8 ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างที่

นำมาทดสอบมีฤทธิ์แตกต่างกัน และสามารถแบ่งตัวอย่างตามการออกฤทธิ์ที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นได้เป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 2) คือ

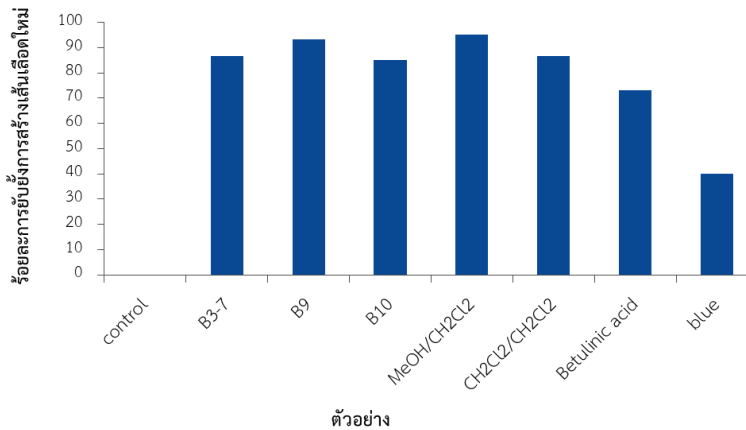
กลุ่มที่ 1 Optimum Concentration คือ ตัวอย่างที่ให้การยับยั้งเท่าเดิมแม้จะเพิ่มความเข้มข้นจาก 0.1 เป็น 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ได้แก่ ส่วนสกัด MeOH/ CH_2Cl_2 และ กรดเบทูลินิก โดยสามารถยับยั้งได้ 95% และ 75% ตามลำดับ ส่วนเบตาซิโตสเตอรอลให้ร้อยละการยับยั้ง 85.8 ที่ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/ml}$ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1.0 $\mu\text{g/ml}$ กลับเพิ่มการสร้างเส้นเลือดใหม่ร้อยละ 138.3

กลุ่มที่ 2 Effective Concentration คือตัวอย่างที่ให้การยับยั้งเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น จาก 0.1 เป็น 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ได้แก่ตัวอย่างส่วนใหญ่ ที่มาจากสารสกัดเฮกเซนของ เปลือกกราก และส่วนสกัด $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ซึ่งเพิ่มการยับยั้งจาก 69.4% เป็น 86.7% เป็นที่น่าสังเกตว่าสาร blue เพิ่มการสร้างเส้นเลือดที่ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ แต่เมื่อเพิ่มเป็น 1.0 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งได้ 40% ทั้งนี้อาจมาจากฤทธิ์ cytotoxic เนื่องจาก ส่วนสกัด $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ มีสาร blue เป็นส่วนประกอบด้วยจึงแสดงว่าการใช้ในรูปแบบสกัด $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ เหมาะสมกว่าการใช้สาร blue นอกจากนี้ส่วนสกัด D9 ซึ่งมี กรดเบทูลินิกและสารอื่นๆ แต่ไม่มีสาร blue ก็ให้ค่าการยับยั้งดีกว่าคือ 84.3% และ 93.3% (ความเข้มข้นจาก 0.1 เป็น 1.0 $\mu\text{g/ml}$)

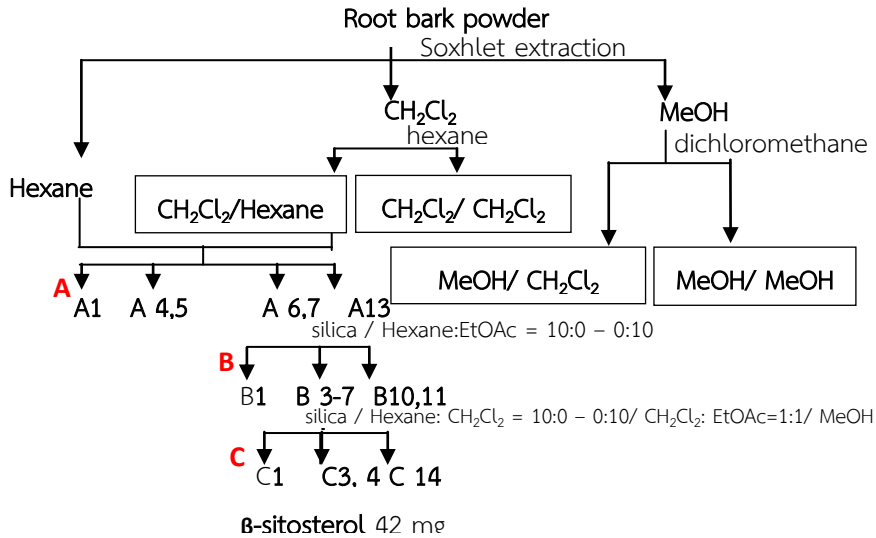
กลุ่มที่ 3 Maximum Concentration คือตัวอย่างที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแล้วให้ผลการยับยั้งลดลงคือ β -sitosterol ซึ่งแยกได้จากสารสกัดเฮกเซน สามารถยับยั้งได้ 85.8% ในความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/ml}$ แต่เมื่อเพิ่มเป็น 1.0 $\mu\text{g/ml}$ กลับเพิ่มการสร้างเส้นเลือดใหม่ 138.3% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่เป็นส่วนผสมของสารหลายชนิดนั้น มีฤทธิ์ดีกว่าสารบริสุทธิ์ เนื่องจาก β -sitosterol เป็นองค์ประกอบหนึ่งในส่วนสกัดรวม B3-B7 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง 77.8% และ 86.7% ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ



รูปที่ 2 ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ โดยวิธี tube formation assay ของสารสกัดจากเปลือกกรากหม่อนที่ความเข้มข้น 0.1 µg/mL



รูปที่ 3 ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ โดยวิธี tube formation assay ของสารสกัดจากเปลือกกรากหม่อนที่ความเข้มข้น 1 µg/mL



รูปที่ 4 แผนผังแสดงภาพรวมสารสกัดและการแยกสาร β-sitosterol

ตารางที่ 2ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์ HUVECs และการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่

No.	Test Sample	IC ₅₀ µg/ml	Antiangiogenesis (Tube formation assay)			
			0.1 µg/ml		1 µg/ ml	
			% reduce	% increase	% reduce	% increase
1	Hexane/(B3-B7)	57.94	77.8	-	86.7	-
2	Hexane/B9	55.44	84.3	-	93.3	-
3	Hexane/B10	10.45	9.3	-	85.0	-
4	β-sitosterol (from hexane)	>100	85.8	-	-	138.3
5	MeOH/CH ₂ Cl ₂	4.57	95.4	-	95	-
6	CH ₂ Cl ₂ /CH ₂ Cl ₂	5.02	69.4	-	86.7	-
7	Betulinic acid (from hexane)	16.91	75	-	73	-
8	Blue compounds	3.10	-	35.2	40	-

หมายเหตุ ตัวอย่างที่ 1-4 และ ตัวอย่างที่ 8 เป็นส่วนสกัดและสารที่แยกได้จากสารสกัดเฮกเซน

ตัวอย่างที่ 5 คือส่วนที่ละลายได้ในไดคลอโรมีเทนจากสารสกัดเมทานอล

ตัวอย่างที่ 6 คือส่วนที่ละลายได้ในไดคลอโรมีเทนจากสารสกัดไดคลอโรมีเทน

สรุปผลการวิจัย

ผลการทดลองครั้งนี้ สนับสนุนการพัฒนาสารสกัดจากเปลือกรากหม่อนในการใช้รักษามะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมาจากสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด คือสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ซึ่งผู้วิจัยได้นำเสนอวิธีการเตรียมส่วนสกัดที่มีฤทธิ์สูง ผ่านการ partition กับตัวทำละลายตามลำดับของการสกัดแบบต่อเนื่องด้วย Soxhlet ร่วมกับการตรวจสอบด้วย TLC ทำให้ได้ข้อมูลวิธีเตรียมส่วนสกัดที่มีฤทธิ์สูงจากสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน และเมทานอล กล่าวคือสารสกัดไดคลอโรมีเทนต้องทำการแยกสารที่ละลายได้ในเฮกเซนออกไป จะสามารถให้การยับยั้งได้สูงถึงร้อยละ 86.7 ส่วนสารสกัดหยาบเมทานอลต้องนำมาแยกเอาเฉพาะส่วนที่ละลายได้ในไดคลอโรมีเทนจะให้การยับยั้งได้สูงถึง ร้อยละ 95 และเนื่องจากปริมาณสารสกัดเมทานอลจากเปลือกรากหม่อนมีปริมาณสูงสุดคือร้อยละ 11.52 จึงน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามวิจัยครั้งนี้ได้เน้นการศึกษาสารสกัดหยาบเฮกเซนซึ่งได้ข้อมูลส่วนสกัดย่อย 3 ชนิดที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ทำให้ได้ส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่สูงถึงร้อยละ 85-93 นอกจากนี้ยังได้แยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่คือ กรดเบทูลินิกและเบตา-ซิโตสเตอรอล ซึ่งเป็นส่วนประกอบในส่วนสกัดย่อยดังกล่าวด้วย แต่สารบริสุทธิ์นี้กลับมีฤทธิ์ด้อยกว่าส่วนสกัด จึงสนับสนุนการใช้สารสกัดสมุนไพรในรูปแบบ enriched fraction มากกว่าการใช้สารบริสุทธิ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยมหิดลให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

อัมมบุญ ล้วนรัตน์. (2552). *การพัฒนาสารสกัดหม่อนที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง* รายงานวิจัย ฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

Arnautova, I., George, J., Kleinman, H. K., & Benton, G. (2009). The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* 12, 267–274.

Chuakul, W., Saralamp, P., Paonil, W., Temsiririrukul, P., & Clayton, T. (1997). *Medicinal plants in Thailand Vol. II*. Siambooks and Publications Co. Ltd, p 103.

- Gad, H.A., Ayoub, I.M., & Wink, M. (2019). Phytochemical profiling and seasonal variation of essential oils of three *Callistemon species* cultivated in Egypt. *PLoS ONE*, 14(7), e0219571. doi.org/10.1371/journal.pone.0219571
- Gheorgheosu, D., Duicu, O., Dehelean, C., Soica, C., & Muntean, D. (2014). Betulinic Acid as a Potent and Complex Antitumor Phytochemical: A Minireview. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 14(7), 936-945.
- Hurlbert, M. (2019) Retrieved July 28, 2019 from /https://www.curemelanoma.org/blog/article/cancer-facts-and-figures-new-2019-numbers-released-by-american-cancer-society
- Keshet, E., & Ben-Sasson, S. A. (1999). Anticancer drug targets: approaching angiogenesis. *J. Clin. Invest*, 11, 1497-1501.
- Kim H. M., Han S. B., Lee C. W., Kim C. Y., Lee E. J., & Huh, H. (2000). Immunomodulating activity of polysaccharide isolated from Mori Cortex Radicis. *Arch Pharm Res*, 23(3), 181-5.
- Lee S. J., Chashi. Y., Sakurai, H., & Saiki, I. (2003). TAC-101 inhibits intrahepatic metastasis of orthotopically implanted murine hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 198, 169-177.
- Liby, K. T., Yore, M. M., & Sporn, M. B. (2007). Triterpenoids and resinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 7, 357-369.
- Nakamura, E. S, Koizumi, K., Yamaura, T., & Saiki, I. (2003). Antitumor angiogenic effect of a matrix metallo-proteinase inhibitors MM 1270. *AnticancerRes*, 23, 411-418.
- Matthews, N. H., Li, W. Q., Qureshi, A. A., Weinstock, M. A., & Cho, E. (2019). *Chapter 1 Epidemiology of Melanoma in Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy [Internet] NCBI Bookshelf*. Retrieved 23 June, 2019 from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK481862/.

- Ogasawa, M., Matsubura, T., & Suzuki, H. (2001). Inhibitory effects of evodiamine on *invitro* invasion and experimental lung metastasis of murine colon cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 20(8), 917-920.
- Piyaviriyakul, S., Shimizu, K., Asakawa, T., Kan, T., Siripong, P., & Oku, N. (2011). Anti-angiogenic Activity and Intracellular Distribution of Epigallocatechin-3-gallate Analogs. *Biol. Pharm. Bull.*, 34(3), 396-400.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., & Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature*, 370, 61-65.
- Smitinand, T. (2014). *Thai Plant Names*, BKF Forest Herbarium, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Revised Edition p.388
- Snitmajaro, N. & Luanratana, O. (2008). A new source of whitening agent from a Thai Mulberry plant and its betulinic acid quantitation. *Nat. Prod. Res.*, 22(9), 727-734.
- WHO. (2019). How common is skin cancer? in Skin cancers. Retrieved 23 June, 2019 from <https://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. (2nd ed.) Berlin:Springer-Verlag
- Woodhouse, E. C., Chuaqui, R. F., & Liotta, L. A. (1997). General mechanism of metastasis. *Cancer Supplement*, 80(8), 1529-1537.