

ความเป็นพิษและกลไกการเหนี่ยวนำการตาย แบบ apoptosis โดยสารสกัด
จากเปลือกมังคุดในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

ปริญญานิพนธ์
ของ
พิเชษฐ์ เกียรติพรศักดิ์ดา

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กันยายน 2553

ความเป็นพิษและกลไกการเหนี่ยวนำการตาย แบบ apoptosis โดยสารสกัด
จากเปลือกมังคุดในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

ปริญญานิพนธ์

ของ

พิเชษฐ์ เกียรติพรศักดิ์ดา

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

กันยายน 2553

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ความเป็นพิษและกลไกการเหนี่ยวนำการตาย แบบ apoptosis โดยสารสกัด
จากเปลือกมังคุดในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

บทคัดย่อ
ของ
พิเชษฐ์ เกียรติพรศักดิ์ดา

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กันยายน 2553

พิเชษฐ์ เกียรติพรศักดิ์. (2553). *ความเป็นพิษและกลไกการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis โดยสารสกัดจากเปลือกมังคุดในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก*. ปรินูญานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร.รณิดา วัฒนโกคาสิน, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม.

โรคมะเร็งต่อมลูกหมากเป็นโรคที่พบได้ในผู้ชาย ซึ่งการรักษาโรคมะเร็งต่อมลูกหมากต้องอาศัยเคมีบำบัด ซึ่งมีข้อจำกัด คือ มีค่าใช้จ่ายสูง และมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย ดังนั้นการใช้สารสกัดจากพืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงความเป็นพิษของ สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ซึ่งพบว่า สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด สามารถฆ่า เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 โดยมีค่า IC_{50} ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ พบว่าความสามารถการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด และจากการย้อมนิวเคลียส ด้วย Hoechst 33342 และการทำ gel-electrophoresis แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหดตัวของ chromatin และการแตกหักของชิ้น DNA ซึ่งเป็นรูปแบบของกระบวนการ apoptosis ยิ่งกว่านั้น การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase พบการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 และ caspase-8 ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิด apoptosis จึงเป็นไปได้ว่ากระบวนการเกิด apoptosis ที่พบในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก จากการเหนี่ยวนำของสารสกัดกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด อาจเกิดขึ้นผ่าน death receptor pathway

CYTOTOXICITY AND APOPTOTIC INDUCTION MECHANISM
BY MANGOSTEEN EXTRACT IN PROSTATE CANCER CELLS

AN ABSTRACT
BY
PICHET KIRTTIPORNSAKDA

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Biotechnology
at Srinakharinwirot University
September 2010

Pichet Kirttipornsakda. (2010). *Cytotoxicity and apoptotic induction mechanism by mangosteen extract in prostate cancer cells*. Master thesis, M.S. (Biotechnology). Bangkok : Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Ramida Watanapokasin, Assist. Prof. Dr. Wanlaya Tanechpongta

Prostate cancer is commonly diagnosed in men. Since chemotherapeutic are quite limited due to high cost and side effect , therefore, phytochemical must to choice for prostate cancer therapy . the objective in This project was to studied the effect of xanthone isolated from pericarp of mangosteen(*Garcinia mangostana* Linn.) on cytotoxicity in prostate cancer PC-3 cells. The result show that xanthone induced cytotoxic effect with IC_{50} at 10 μ g/ml. The viability assay showed a time-dose dependent growth inhibitory. Hoechst 33342 nuclear staining and nucleosomal DNA-gel electrophoresis revealed that xanthone could induce nuclear condensation and fragmentation, typically seen in apoptosis. Moreover, confirmatory caspase activity assay showed caspase-3 and caspase-8 activities , then possible to apoptosis mechanism in PC-3 cells to depending death receptor pathway

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ความเป็นพิษและกลไกการเหนี่ยวนำการตาย แบบ apoptosis โดยสารสกัด

จากเปลือกมังคุดในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

ของ

พิเชษฐ์ เกียรติพรศักดิ์ดา

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่.....เดือน กันยายนพ.ศ. 2553

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ประธาน

..... ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.รณิดา วัฒนโกศาติน)

(ดร.นุจรี สุวรรณรัชต์)

..... กรรมการ

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัลยา ธนศพงษ์ธรรม)

(รองศาสตราจารย์ ดร.รณิดา วัฒนโกศาติน)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัลยา ธนศพงษ์ธรรม)

..... กรรมการ

(ดร.เฟื่องฉัตร จรินทร์นันต์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือ แนะนำ และให้ความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร.รมิดา วัฒนโกศาติน อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วลัยยา ธเนศพงศ์ธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ซึ่งกรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.นุจรี สุวรรณราชต์ และ ดร.เฟื่องฉัตร จรินทร์นันต์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในแวดวงวิชาการมากยิ่งขึ้น และขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี และภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้ความเมตตาแก่ข้าพเจ้ามาตลอด

ขอขอบพระคุณ คุณ อังคณา กระจำง และคุณเฟื่องจันทร์ โพธิ์ย้อย นักวิจัยที่กรุณาช่วยเตรียมวัสดุอุปกรณ์ ให้คำแนะนำช่วยเหลือและถ่ายทอดความรู้ และเทคนิคต่างๆ รวมทั้งข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ ซึ่งมีส่วนช่วยให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่น้องและเพื่อนๆทุกคนในห้องปฏิบัติการ cells culture คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับคำแนะนำ ช่วยเหลืออำนวยความสะดวก และให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้า ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและความช่วยเหลือต่างๆ ที่ข้าพเจ้าได้รับทั้งในทางตรงและทางอ้อม

ข้าพเจ้าขอน้อมระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่ได้ให้กำลังใจช่วยเหลือ สนับสนุน และ ชื่นชมในความเพียรพยายามของข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำปริญญานิพนธ์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

คุณค่าและประโยชน์ใดๆที่เกิดขึ้นจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแต่บิดา มารดา ครูอาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

พิเชษฐ เกียรติพรศักดิ์ดา

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	4
ความสำคัญของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
สมมติฐานในการวิจัย.....	6
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
โรคมะเร็ง.....	7
มะเร็งต่อมลูกหมาก.....	8
ยาต้านมะเร็งที่ได้จากสารสกัดธรรมชาติ.....	10
Apoptosis.....	10
มังคุด.....	12
3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
เซลล์มะเร็งและสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด.....	15
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	15
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	15
วิธีดำเนินการทดลอง.....	16
การเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC3.....	16
การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ด้วยวิธี MTT.....	16
การทดสอบความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในการฆ่าเซลล์มะเร็ง.....	17
การศึกษาการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ถูกเหนี่ยวนำ โดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด.....	17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง.....	20
ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3.....	20
ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด.....	21
การศึกษาการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด.....	22
การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส.....	22
การตรวจสอบการแตกหักของ DNA โดยอาศัยเทคนิค agarose gel electrophoresis DNA fragmentation.....	24
การทำงานของเอนไซม์ caspase โดยวิธี Western blotting.....	25
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	26
บรรณานุกรม.....	29
ภาคผนวก.....	34
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	39

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ในปี ค.ศ. 2007.....	8
2 แสดงส่วนผสมพอลิอะครีลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel.....	38

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้าง MTT.....	5
2 ขั้นตอนการเกิด apoptosis.....	6
3 กลไกการเกิด apoptosis.....	12
4 โครงสร้าง xanthone.....	13
5 กราฟผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone ในการฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3.....	20
6 กราฟผลการทดสอบความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone ณ ช่วงเวลาต่างๆ.....	21
7 การศึกษาการเกิด apoptosis โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากPC-3 โดยการย้อมด้วยสี Hoechst ที่ความเข้มข้นต่าง.....	23
8 การตรวจสอบลักษณะการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3.....	24
9 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดี caspase ต่อ Anti-caspase-3.....	25
10 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดี caspase ต่อ Anti-caspase-8.....	25

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในปัจจุบันมะเร็งจัดว่าเป็นโรคที่เป็นปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพที่สำคัญยิ่งโรคหนึ่ง ซึ่งพบว่ามีผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นเป็น 9 ล้านคน และคาดการณ์ว่าจะเพิ่มขึ้นเป็น 15 ล้านคน ในปี พ.ศ. 2563 ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นประชากรในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา (American Cancer Society. 2007) และในประเทศไทย โรคมะเร็งจัดว่าเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สำคัญอีกโรคหนึ่ง (Sriplung H; et al. 2003)

จากรายงานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบว่าจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งในประเทศไทยมีจำนวนเพิ่มขึ้นทุกๆ ปี โดยโรคมะเร็งจัดเป็นโรคที่คร่าชีวิตคนไทยเป็นอันดับต้นๆ (Attasara P. 2006)

โรคมะเร็งเป็นโรคที่เกิดขึ้นได้กับทุกเพศทุกวัย โดยพบว่าการเกิดโรคมะเร็งนั้น เกิดขึ้นได้จากหลายๆปัจจัย เช่น ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอกในร่างกาย เช่น สารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อน ในอาหาร อากาศ เครื่องดื่ม ยารักษาโรค เป็นต้น รวมทั้งการได้รับรังสี เชื้อไวรัส เชื้อแบคทีเรีย และปัจจัยภายในร่างกาย เช่น ความผิดปกติทางพันธุกรรม ความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน และภาวะทุพโภชนา เป็นต้น ซึ่งโรคมะเร็งชนิดเดียวกันอาจเกิดได้จากสาเหตุต่างๆกัน เนื่องจากในแต่ละชุมชนมีสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน และการได้รับปัจจัยเสี่ยงหลายๆอย่างรวมกัน จะทำให้เกิดเป็นโรคมะเร็งได้เร็วขึ้น ส่งผลให้อัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

ในผู้ชายมะเร็งที่พบได้บ่อยได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอดและมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยเฉพาะมะเร็งต่อมลูกหมากมีอัตราการเกิดโรคเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและพบว่าการเกิดโรคมีความสัมพันธ์กับอายุ โดยเริ่มจากอายุ 45 ปีขึ้นไป และจะพบจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมลูกหมากเพิ่มมากขึ้นตามอายุ (จุฑามาศ แอนเนียน. 2550)

มะเร็งต่อมลูกหมากเกิดขึ้นจากการที่เซลล์ในต่อมลูกหมากเกิดการแบ่งตัวมากเกินไปจนกลายเป็นก้อนมะเร็ง ในระยะแรกๆ ผู้ป่วยจะไม่มีอาการของโรคจนเมื่อก้อนมะเร็งโตและลุกลามไปอุดตันท่อปัสสาวะทำให้เกิดอาการปัสสาวะบ่อย เจ็บปวดเวลาถ่ายปัสสาวะ ในระยะท้ายๆ เมื่อมะเร็งเกิดการแพร่กระจาย ผู้ป่วยจะมีอาการปวดกระดูก ปวดตามข้อ ปวดหลัง น้ำหนักลด อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร มีอาการปัสสาวะขัด และมีเลือดปนออกมากับปัสสาวะ (Narayan P. 1995)

การรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งในระยะแรกของการเกิดโรคสามารถรักษาให้หายขาดได้โดยการผ่าตัดหรือการฉายรังสี (radiotherapy) แต่มักไม่ค่อยได้ผลเนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่จะรู้ตัวว่าตนเองเป็นโรคมะเร็งก็ต่อเมื่อมีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะต่างๆ แล้ว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยการรักษาด้วยเคมีบำบัด (chemotherapy) หรือใช้การรักษาด้วยเคมีบำบัดร่วมกับการรักษาวิธีอื่น ยาเคมีบำบัดเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะไปทำลายเซลล์มะเร็ง และทำลายเซลล์ปกติบางส่วน โดยเฉพาะเซลล์ที่มีการเจริญเติบโต และแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เช่น เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร, เส้นผม, เม็ดเลือด เป็นต้น ซึ่งผลข้างเคียงของการรักษาด้วยเคมีบำบัด พบได้หลายอาการ เช่น ผื่นแพ้ คลื่นไส้ อาเจียน มีแผลในปาก ปริมาณเม็ดเลือดลดลง ในผู้ป่วยบางราย อาจพบอาการข้างเคียงที่รุนแรง เช่น มีไข้ หนาวสั่น หายใจลำบาก ปัสสาวะหรืออุจจาระมีเลือดปน ระบบภูมิคุ้มกันโรคลดลง ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อซึ่งอาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ (สุมิตรา ทองประเสริฐ และ สิริกุล นภาพันท์. 2545) โดยความรุนแรงของอาการข้างเคียงจะขึ้นอยู่กับชนิดของยาเคมีบำบัด และปฏิกิริยาตอบสนองต่อยา ของร่างกายผู้ป่วยที่รับยาเคมีบำบัด ซึ่งผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นนั้น ส่งผลให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลายรายไม่ยอมเข้ารับการรักษา ทำให้โรคมะเร็งแพร่กระจายไปเรื่อยๆ และทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในที่สุด

จากปัญหาดังกล่าว ทำให้ปัจจุบันนี้มีการวิจัยหลายชิ้นที่มุ่งเน้น ถึงการใช้ยารักษามะเร็งที่พัฒนาจาก สารสกัดจากธรรมชาติ เช่น จากพืชสมุนไพร ผัก และ ผลไม้ และเนื่องจากประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพ มีพืชหลากหลายชนิด และพืชผัก สมุนไพรไทยถูกนำไปใช้ ในการประกอบอาหารเป็นปกติอยู่แล้ว ซึ่งพืช ผัก และผลไม้ของไทย บางชนิด มีแนวโน้มว่าจะสามารถนำสารที่สกัดได้ไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้ เนื่องจากพืชบางชนิดถูกใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคต่างๆ มาแต่โบราณ การศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากพืช เพื่อพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งจึงเป็นที่น่าสนใจและมีความเป็นไปได้สูง โดยจากผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าพืชที่มีสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ในระดับดี เช่น สาร curcumin, curcuminoid ที่สกัดจากขมิ้นชันมีความสามารถในการต้านมะเร็งได้ (Yegnanarayana R; Sarat AP; & Balwani JH. 1976.; Kuttan R; et al. 1985.; Rafatullah S; et al. 1990.; Mazumder A; et al. 1995) สารสกัด allicin ที่ได้จาก กระเทียม ก็พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ (Ejaz S; Woong L.C; & Ejaz A.2003) สารสกัดจาก ตะไคร้ ใบโหระพา รวมทั้ง กระเพรา ก็พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้ ในสัตว์ทดลอง (Murakami A; et al. 1993)

จากงานวิจัยข้างต้น ชี้ให้เห็นว่าการรักษามะเร็งโดยใช้สารสกัดจากพืชนับเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันเพื่อทดแทนการใช้ยาเคมีบำบัดที่มีพิษต่อร่างกายค่อนข้างสูง ตัวอย่างสารสกัดจากพืชที่ได้มีการนำมาใช้แล้วในปัจจุบัน ได้แก่ Vincristine และ Vinsblastine ที่สกัดได้จากต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) (Chan JD. 1998) ใช้รักษามะเร็งชนิด Hodgkin's lymphoma และ non-Hodgkin's lymphoma ส่วน Taxol ที่สกัดจากต้นยิว (*Taxus*

brevifolia) ก็ถูกนำมาใช้เป็นยารักษามะเร็งปอดและมะเร็งเต้านม (Woo HL; Swenerton KD; & Hoskins PJ. 1996) เป็นต้น

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ให้ความสนใจสารสกัดที่ได้จากมังคุด ซึ่งเป็นผลไม้ที่หาได้ง่ายในประเทศไทย จากรายงานในเบื้องต้นพบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3 โดยอาศัยกระบวนการ apoptosis (Moongkarndi P; et al. 2003) โดยสารสกัดที่พบได้มากในเปลือกมังคุด คือสาร tannin และ xanthone และพบว่า สารกลุ่ม xanthone ที่สกัดได้จากส่วนเปลือกมังคุด มีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง ทั้งการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Linuma M; et al. 1996) (Chaiyasothi T; Reksopha W; & Muonwongyarti P. 1975) เชื้อรา (Mahabusarakum W; Phongpaichit S; & Wiriyaichitra P. 1983) การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Leong LP; & Shui G. 2002) ลดการอักเสบ (Nakatani K; et al. 2002) และยังสามารถ ยับยั้งการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็งลำไส้ DLD-1 โดยอาศัยกระบวนการ apoptosis ผ่าน intrinsic pathway (Matsumoto K; et al. 2003) ได้ เป็นต้น

ดังนั้นสารสกัดกลุ่ม xanthone นี้จึงมีความน่าสนใจและมีความเป็นไปได้สูงที่จะมีผลในการต้านมะเร็งอื่นๆได้ ซึ่งนอกจากการทดสอบฤทธิ์ในการเป็นยาต้านมะเร็งแล้ว ควรศึกษาต่อไปด้วยว่า กลไกในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งนั้นเป็นรูปแบบใด เนื่องจากเป้าหมายของการพัฒนายาต้านมะเร็งนั้น ต้องการให้มีผลกระทบต่อเซลล์ปกติใกล้เคียงน้อยที่สุด ดังนั้นกลไกที่ได้รับความสนใจในปัจจุบันที่ต้องการให้เป็นเป้าหมายของยา คือ การกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายด้วยกระบวนการ apoptosis ซึ่งจะไม่ทำให้เซลล์ข้างเคียงเกิดการอักเสบเหมือนกับที่พบในการตายแบบ necrosis (Studzinski GP. 1995) ซึ่งการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis นั้นเกิดขึ้นได้จาก 2 กลไก คือ mitochondrial pathway หรือ death receptor pathway จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากธรรมชาติมีทั้งที่กระตุ้นผ่านทางกลไก mitochondrial pathway และ death receptor pathway

ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดกลุ่ม xanthone ที่ได้จากเปลือกมังคุด ในการเป็นสารต้านมะเร็งรวมทั้งกลไกที่ทำให้เซลล์มะเร็งตายด้วยกระบวนการ apoptosis โดยเลือกใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากในการทดลอง เนื่องจากเป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่พบได้ในประเทศไทย โดยมีอัตราการเกิดโรคเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก
2. ศึกษากลไกการเกิด apoptosis โดยการเหนี่ยวนำด้วยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

ความสำคัญของงานวิจัย

1. เพื่อนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนายาต้านมะเร็งในอนาคต
2. เพื่อเพิ่มมูลค่าของมังคุด

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก โดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดและหาค่า IC_{50} โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism
2. ศึกษากลไกการเกิด apoptosis โดยดูจากลักษณะจำเพาะที่เกิดขึ้นกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ nucleus การแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) การทำงานของเอนไซม์ caspase

นิยามศัพท์เฉพาะ

PC-3

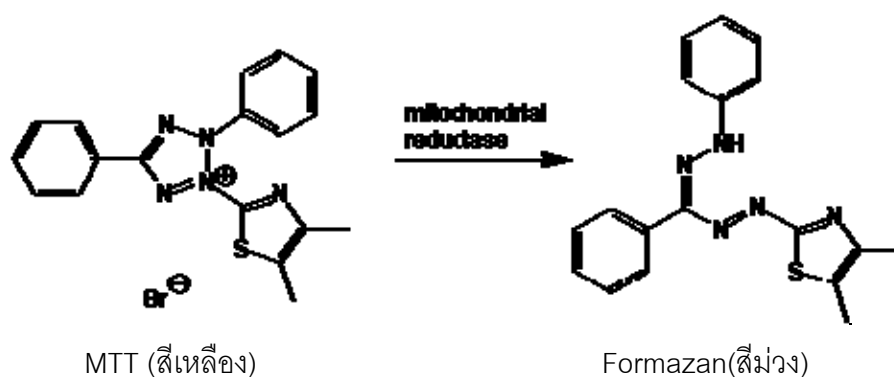
เป็น cell line ของมะเร็งต่อมลูกหมากที่พัฒนามาจากเซลล์ของผู้ป่วยชายอายุ 62 ปี ที่เป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก (human prostate adenocarcinoma) เป็นผลิตภัณฑ์จากสถาบัน ATCC (Cat.No. CRL-1435)

สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

เป็นสารหลักที่พบได้ในเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตต ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่างและเป็นโครงสร้างแกนหลักของสาร mangostin (Anthony C. 1995).

MTT assay

เป็นวิธีที่บอกถึงปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสี (colorimetric assay) จากสีเหลืองของ MTT เป็นผลึก formazan ที่มีสีม่วง โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ mitochondrial reductase ซึ่งจะพบได้ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น (Mosmann T; et al. 1983) โครงสร้าง MTT แสดงดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 โครงสร้าง MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

ที่มา: American Type Culture Collection ATCC Product. 2002.

50% Inhibitory Concentration(IC₅₀)

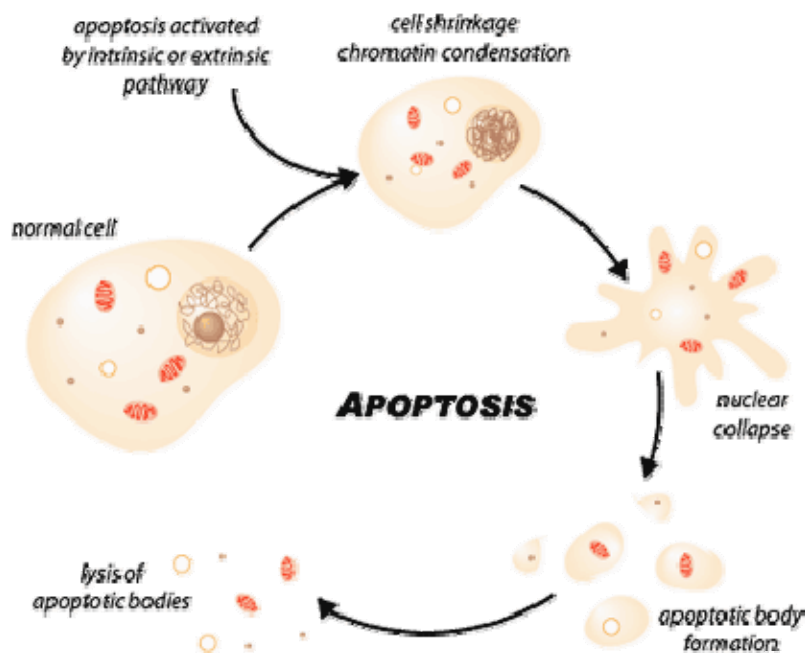
หมายถึงความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50 %

Apoptosis

เป็นปรากฏการณ์การตายของเซลล์เมื่อเซลล์ได้รับความเสียหาย โดยเซลล์จะหดตัว มีการรวมตัวกันแน่นของ chromatin จากนั้นจะเกิด การแตกหักของสาย DNA ในขณะเดียวกัน membrane จะหือยผอลงหุ้มเอา nucleus และ organelles แล้วรวมตัวกันเป็น apoptotic body จากนั้นจะเกิดการสลายตัวหรือถูกจับกินโดย phagocyte หรือ macrophage ซึ่งจะไม่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่อยู่ข้างเคียง (Majno G; & Joris I. 1995) (ภาพประกอบ 2)

Autoradiography

เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ขนาดและจำนวนท่อน DNA หลังจากแยกด้วย Gel electrophoresis โดยทำให้เกิดเป็นภาพเนกาทีฟ บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ ภาพที่เกิดขึ้นเรียกว่า autoradiogram (จินตนา สิรินาวิน; และ ชนินทร์ ลิ้มวงศ์. 2549)



ภาพประกอบ 2 ขั้นตอนการเกิด apoptosis

ที่มา: Yau Philip. (2004). *Apoptosis*. (online)

สมมติฐานในการวิจัย

สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก โดยเกิดการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ผ่าน mitochondrial pathway หรือ death receptor pathway

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคมะเร็ง

มะเร็งเป็นโรคที่มีความผิดปกติในการแบ่งตัวของเซลล์ โดยเซลล์จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและไม่สามารถควบคุมได้ ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาที่สลับซับซ้อนของปัจจัยการก่อโรคหลายๆชนิด ไม่ว่าจะเป็นปัจจัยทางพันธุกรรม สิ่งแวดล้อม หรือสารก่อมะเร็งต่างๆ เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เกิดจากการเผาไหม้ หรือ การสูบบุหรี่ สารพิษในอาหาร และรังสี เป็นต้น (Tannoch IF; & Hill RP. 1998) การเกิดโรคมะเร็งมี 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเรียกว่า initiation เป็นขั้นตอนที่มีการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นมะเร็ง ได้แก่ยีนมะเร็ง (oncogenes) หรือยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญในการควบคุมความสมดุลของการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ ส่งผลทำให้เซลล์มี DNA ที่ผิดปกติเกิดขึ้น ขั้นตอนต่อไปเรียกว่า promotion ในขั้นตอนนี้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นเซลล์ที่มีความผิดปกติของ DNA จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น เซลล์ที่มีความผิดปกติของ DNA นั้นเมื่อผ่านขั้นตอน promotion แล้วเซลล์นั้นจะเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งระยะลุกลาม (progression) ผลลัพธ์สุดท้ายของการลุกลามของโรคมะเร็งคือการแพร่กระจายของเซลล์ผิดปกติ (metastatic phenotype) ไปยังอวัยวะต่างๆ ผ่านทางกระแสโลหิต(Hanahan D; & Weinberg RA. 2000)

เมื่อเซลล์มะเร็งลุกลามเข้าสู่กระแสเลือดแล้วจะเกาะรวมตัวกันเอง (homotypic aggregation) หรือเกาะกับเซลล์อื่น (heterotypic aggregation) ซึ่งการเกาะรวมตัวกันเองหรือเกาะกับเซลล์อื่นนั้น ทำให้เซลล์มะเร็งมีโอกาสรอดชีวิตได้มากขึ้นในระหว่างที่ลอยอยู่ในกระแสเลือด (Gasic GJ. 1984) เมื่อเซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปถึงตำแหน่งใหม่ในร่างกายแล้ว เซลล์มะเร็งจะกระตุ้นให้เกิดเส้นเลือดมาเลี้ยง เซลล์มะเร็งแล้วเริ่มแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นก้อนมะเร็งใหม่ขึ้นมา (Holmgren L; O'Rilly MS; & Folkman J. 1995)

มะเร็งต่อมลูกหมาก

เกิดจากการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผ่านทางกระแสโลหิตเข้าสู่ต่อมลูกหมาก และเมื่อเซลล์มะเร็งแพร่กระจายเข้าสู่ต่อมลูกหมากแล้ว เซลล์มะเร็งจะเริ่มแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเกิดเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก ซึ่งความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมากนั้นจะมีความสัมพันธ์กับอายุ โดยจะพบว่าในผู้สูงอายุจะมีโอกาสเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากมากกว่าวัยรุ่น โดยมะเร็งต่อมลูกหมากมีประมาณการผู้ป่วยรายใหม่สูงขึ้นในอันดับต้นๆ (ตารางที่ 1)

ตาราง 1 แสดงค่าประมาณจำนวนของผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ในปี ค.ศ. 2007

Cancer Type	Estimated New Cases	Estimated Deaths
Bladder	67,160	13,750
Breast (Female -- Male)	178,480 -- 2,030	40,460 -- 450
Colon and Rectal (Combined)	153,760	52,180
Endometrial	39,080	7,400
Kidney (Renal Cell) Cancer	43,512	10,957
Leukemia (All)	44,240	21,790
Lung (Including Bronchus)	213,380	160,390
Melanoma	59,940	8,110
Non-Hodgkin Lymphoma	63,190	18,660
Pancreatic	37,170	33,370
Prostate	218,890	27,050
Skin (Nonmelanoma)	>1,000,000	<2,000
Thyroid	33,550	1,530

ที่มา: American Cancer Society. (2007)

อาการที่พบในผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก

อาการที่สำคัญที่พบได้ในผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก คือ อาการเจ็บ หรือแสบขณะหลังอุจจาระซึ่งมักเป็นอาการบ่งชี้ว่าขนาดต่อมลูกหมากใหญ่ขึ้น หรือมีอาการอักเสบเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังมีอาการอื่นๆ เช่น มีการติดเชื้อในระบบปัสสาวะ มีนิ่วในไต ในระยะแรกยังไม่ปรากฏอาการชัดเจน ต่อมาผู้ป่วยจะถ่ายปัสสาวะลำบาก กลั้นปัสสาวะไม่อยู่ มีเลือดปนมากับปัสสาวะ ปวดหลัง เจ็บอวัยวะหรืออวัยวะบวม (Narayan P. 1995)

การรักษา

ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมลูกหมากมีอยู่ด้วยกัน 3 วิธี ได้แก่

1. การผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออก ซึ่งเป็นวิธีการรักษาที่ใช้เพื่อลดขนาดของก้อนมะเร็ง และสามารถใช้ได้กับมะเร็งเกือบทุกชนิด ยกเว้นมะเร็งเม็ดเลือด แต่พบว่าหลังการผ่าตัดผู้ป่วยอาจมีปัญหาแทรกซ้อนเกิดขึ้น ได้แก่ การเกิดภาวะเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ ปัสสาวะเล็ด หรือมีท่อทางเดินปัสสาวะตีบตัน (จุฑามาศ แอนเนียน. 2550)

2. การใช้รังสีรักษา หรือ การฉายรังสี จะถูกใช้เมื่อการผ่าตัดใช้ไม่ได้ผล ทำโดยการฉายรังสีจากภายนอกผ่านเครื่องฉายรังสีโดยส่งรังสีตรงไปที่ต่อมลูกหมาก แต่การฉายรังสีนั้นส่งผลทำลายเนื้อเยื่อปกติของกระเพาะปัสสาวะและลำไส้ใหญ่ด้วย หรือการฝังแร่ในต่อมลูกหมากทำได้โดยแพทย์จะฝังเม็ดแร่ลงในต่อมลูกหมากประมาณ 70-150 เม็ด ผ่านทางเข็มเข้าสู่ต่อมลูกหมากบริเวณที่อยู่ระหว่างลูกอัณฑะกับช่องทวารหนัก สำหรับอาการข้างเคียงของการรักษาโดยการฝังแร่ในต่อมลูกหมากนั้น จะมีอาการคล้ายกับการฉายรังสีจากภายนอกแต่มีอาการที่รุนแรงกว่า (เรวัณ พันธุวิเชียร; และวรชัย รัตนธรร. 2538)(Porter AT; & Chuba PJ. 2000)

3. การใช้เคมีบำบัด ซึ่งเป็นการรักษาที่จะถูกนำมาใช้ในกรณีที่มะเร็งอยู่ในระยะแพร่กระจายหรืออาจใช้เป็นการรักษาเสริมร่วมกับการผ่าตัด หรือใช้เป็นยาฆ่า ก่อนการผ่าตัด หรือการใช้รังสีรักษา สำหรับการให้ยาเคมีแก่ผู้ป่วย ทำได้โดยให้เป็นยารับประทาน การฉีดสารเคมีเข้าทางกล้ามเนื้อ, กระแสเลือด, ช่องท้อง หรือไขสันหลัง โดยการใช้เคมีบำบัดที่ใช้ในปัจจุบันจะใช้ในรูปของ combination chemotherapy(การให้ยามากกว่าหนึ่งตัวร่วมกัน) เพื่อผลในการรักษาและหลีกเลี่ยงการดื้อยา แต่การใช้เคมีบำบัดนั้นมีข้อควรระวังและผลข้างเคียงที่ส่งผลต่อหลายระบบในร่างกาย เช่นระบบย่อยอาหาร ระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น(Haskell CM. 1985)

ยาต้านมะเร็งที่ได้จากสารสกัดจากธรรมชาติ

การรักษาด้วยการผ่าตัดและการรังสีรักษารวมทั้งการใช้เคมีบำบัด มีผลข้างเคียงที่รุนแรงและนอกจากจะทำลายเซลล์มะเร็งแล้วยังทำลายเซลล์ปกติอีกด้วย ดังนั้นจึงมีงานวิจัยหลายงานที่ศึกษาหายาใหม่ๆ ที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง โดยงานวิจัยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่การนำสารสกัดจากสมุนไพรมาใช้ในการศึกษา ซึ่งอาจเนื่องมาจากสารที่ได้จากธรรมชาติมีอยู่เป็นจำนวนมากและพืชบางชนิดมีสารที่สามารถนำมาใช้ศึกษาเพื่อพัฒนาไปเป็นยาต่อไปในอนาคต สารสกัดจากพืชหลายชนิดได้มีการนำมาศึกษาแล้ว เช่น สารสกัด curcumin จากขมิ้นชัน พบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ โดยการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis (Johnstone RW; Ruefli AA; & Lowe SW. 2002) หรือ น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากตะไคร้หอมก็มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งช่องปาก โดยมีค่า IC_{50} เป็น 0.355 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.166 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Manosroi J; et al. 2006) เป็นต้น ซึ่งมังกุดก็เป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่พบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่างและสารสกัดกลุ่ม xanthone ที่ได้จากเปลือกมังกุดนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้เกิดการตายแบบ apoptosis (Yoshihito N; et al. 2007) และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม SKBR3 ได้โดยอาศัยกระบวนการ apoptosis (Moongkarndi P; et al. 2003) จากงานวิจัยต่างๆ จะเห็นได้ว่ายารักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันจะมุ่งเน้นถึงการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis

Apoptosis

กระบวนการ apoptosis เป็นกลไกสำคัญกลไกหนึ่งที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับอันตราย โดยเมื่อเกิด apoptosis เซลล์จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติ โดยเซลล์จะเกิดการหดตัวและมีการรวมตัวกันของ chromatin (chromatin condensation) จากนั้นจะเกิด nuclear fragment โดยสาย DNA จะถูกย่อยเป็นท่อนสั้นๆ โดย endonuclease ในขณะเดียวกันเซลล์จะค่อยๆ เหี่ยวฝ่อลง เกิด membrane blebbing โดยที่ membrane ไม่แตก แต่จะหดตัวและห่อหุ้มเอาสารต่างๆ ภายในเซลล์ไว้แล้วรวมตัวกันกลายเป็นก้อน เรียกว่า apoptotic body จากนั้นจะเกิดการสลายตัวหรือถูกจับกินโดย phagocyte หรือ macrophage ซึ่งจะไม่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่อยู่ข้างเคียง (Majno G; & Joris I. 1995) สำหรับกลไกการเกิด apoptosis นั้น มีอยู่ 2 pathway ได้แก่ mitochondrial pathway และ death receptor pathway โดยอาศัยการทำงานอย่างเป็นขั้นตอนของ cysteine protease ที่มีชื่อว่า caspase โดย caspase นั้นเดิมจะอยู่ในสภาพที่ไม่ทำงาน (inactive) เรียกว่า procaspase เมื่อมีสัญญาณการเกิด apoptosis เกิดขึ้น procaspase จะมีการตัดเอาส่วนของ prodomain ออกไปแล้วเปลี่ยนเป็น caspase

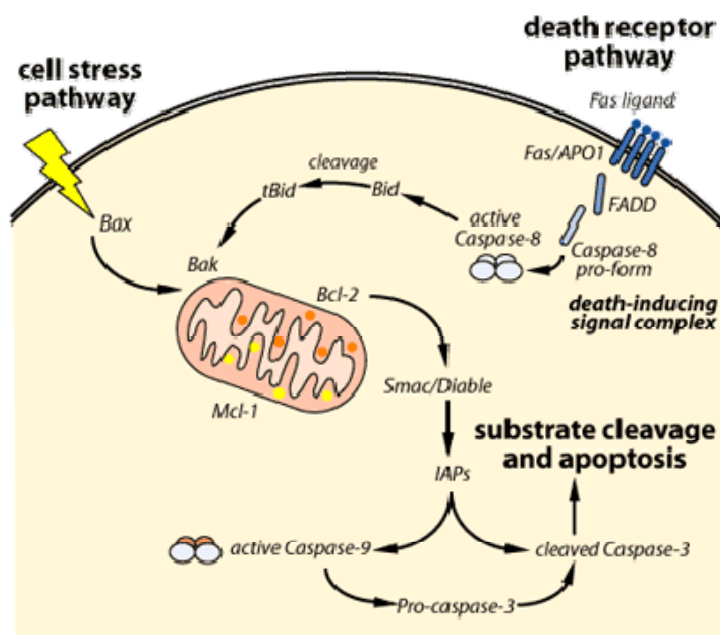
ที่พร้อมทำงาน (active) ซึ่งการกระตุ้น caspase จะเกิดขึ้นอย่างเป็นลำดับ (Adrain C; Creagh EM; & Martin SJ. 2002)

กลไกการเกิด apoptosis โดย mitochondrial pathway

เมื่อ โปรตีนในกลุ่ม Bcl-2 family ซึ่งเป็น proapoptotic ได้รับสัญญาณการเกิด apoptosis จาก สิ่งกระตุ้นต่างๆ แล้ว จะมีการกระตุ้นให้ mitochondria ปล่อย cytochrome c และ proapoptotic protein อื่นๆ ออกมาทาง permeability transition pore (PT pore) จากนั้น cytochrome c จับกับ apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) แล้วเข้ารวมตัวกันกับ procaspase-9 ทำให้ procaspase-9 ตัดเอาส่วนของ prodomain ออกแล้วเปลี่ยนเป็น caspase-9 จากนั้น caspase-9 จะทำการ กระตุ้น procaspase-3 ให้เปลี่ยนเป็น caspase-3 ซึ่ง caspase-3 นั้นเป็น caspase ตัวสุดท้ายที่จะถูกกระตุ้น เพื่อที่จะส่งสัญญาณให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ (Sudhir G. 2001)

กลไกการเกิด apoptosis โดย death receptor pathway

เมื่อมีการกระตุ้นสัญญาณจาก death ligand ซึ่งจะจับกับ receptor บน cell membrane อย่างจำเพาะแล้ว จะทำให้ adaptor protein เข้ารวมตัวกับส่วน cytosolic part ของ receptor รวมทั้ง procaspase-8 กลายเป็น Death-Inducing Signaling Complex (DISC) ส่งผลให้ procaspase-8 เปลี่ยนเป็น caspase-8 ซึ่ง caspase-8 ที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้น caspase-3 เช่นเดียวกันกับ mitochondrial pathway และทำให้เซลล์เกิดการตายขึ้น นอกจากนี้ caspase-8 จะไปกระตุ้น caspase-3 แล้วยังพบว่าใน เซลล์บางชนิด caspase-8 ยังไปกระตุ้นให้ BH3-interacting domain death agonist (Bid) มีการตัดเอา ส่วนของ prodomain ออก กลายเป็น tBid ซึ่ง tBid จะไปกระตุ้น Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม Bcl-2 ทำให้มีการปล่อย cytochrome c ออกจาก mitochondria ได้ จึงทำให้เกิดการกระตุ้นผ่าน death receptor pathway สามารถเชื่อมต่อกับ mitochondrial pathway ได้ (Rao RV; et al. 2001) (ภาพประกอบ 3)



ภาพประกอบ 3 กลไกการเกิด apoptosis

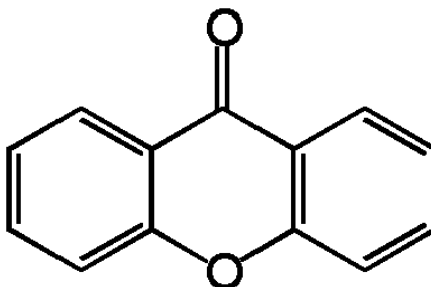
ที่มา: Yau Philip. (2004). *Apoptosis*. (online)

มังคุด (Mangosteen)

มังคุด (mangosteen) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Garcinia mangostana* Linn เป็นพืชในวงศ์ Clusiaceae หรือ Guttiferae นิยมปลูกกันมากในประเทศไทย ซึ่งพบได้ในทุกภาคของประเทศไทยและเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ปรากฏอยู่ในตำรายาไทยและมีสรรพคุณในการบำบัดรักษาโรค ได้แก่ รักษาโรคบิดมูกเลือด แก้แผลเป็นหนอง แผลเปื่อย ช่วยสมานแผล และรักษาอาการท้องร่วง (เทพนม; และคณะ. 2533) มีรายงานว่าในส่วนเปลือกมังคุดมีสารสำคัญ 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม tannin และกลุ่ม xanthone

สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดเป็นรงควัตถุสีเหลือง จัดอยู่ในกลุ่ม flavonoid ซึ่งเป็น secondary metabolite ที่เกิดขึ้นในพืชและสิ่งมีชีวิตบางชนิด (Peres V; Nagem TJ; & Oliveira FF. 2000) โดย สารสกัดกลุ่ม xanthone มีโครงสร้าง แสดงดัง ภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone

ที่มา: Wikimedia commons. (2009). *Xanthone*. (online)

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

สารสกัดกลุ่ม xanthone ได้รับความสนใจ เนื่องจากพบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง ดังต่อไปนี้

1. ฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ทั้ง สายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา penicillin (Mahabusarakam W; Wirirohithra P; & Phongpaichit S. 1986) นอกจากนี้ยังสามารถต้านการเจริญของ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin ที่แยกได้จากผู้ป่วยของ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยมีค่า 90 % Minimum Inhibitory Concentration (MIC_{90}) ต่อเชื้อ เป็น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (Phongpaichit; et al. 1994)

2. ฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ HIV โดยการยับยั้งการทำงานของ HIV-1 protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการตัดสายโปรตีนยาวที่ไวรัสสร้างขึ้นในขั้นตอนการเพิ่มจำนวน เพื่อให้ได้โปรตีนที่สามารถทำงานได้ เช่น โปรตีนที่ทำหน้าเป็นเอนไซม์ หรือโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัส โดยมีค่า IC_{50} เป็น 5.12 ไมโครโมลาร์ และเมื่อสารสกัดกลุ่ม xanthone มีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ นี้จึงเท่ากับยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสด้วย (Chen S; Wan M; & Loh B. 1996)

3. ฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในพืช ได้แก่ เชื้อรา *Fusarium oxysporum*, *Fusarium vasinfectum*, *Alternaria tenuis* และ *Dreschlera oryzae* โดยวิธี Petri-plate bioassay พบว่า xanthone ที่แยกได้จากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราได้ดี โดยสามารถลดการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ถึง 64 % 58% และ 85% ตามลำดับ (Gopalakrishnan G; et al. 1997)

4. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยสามารถลดการเกิด super-oxide anion ได้ถึง 72% (Limei Y; et al. 2007)

5. ฤทธิ์ในการต้านมะเร็งโดยการยับยั้งการแบ่งตัวในเซลล์มะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งตับ มะเร็งปอด และมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยมีค่า 50% Lethal Dose (LD_{50}) อยู่ในช่วง 0.5-5.4 ไมโครกรัม ต่อมิลลิกรัม (Ho CK; et al. 2002) และสารสกัดกลุ่ม xanthone ยังสามารถยับยั้งการแบ่งตัวใน เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด SKBR3 ได้ ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการ ตายแบบ apoptosis ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และการเกิด DNA fragmentation (Moongkarndi P; et al. 2003) ทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ DLD-1 ได้ ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ (Yoshihito N; et al. 2007) นอกจากนี้สารสกัดกลุ่ม xanthone ที่สกัดได้ จากเปลือกมังคุดก็สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว HL-60 เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ ผ่านทาง mitochondrial pathway ซึ่งวัดได้จากการสูญเสีย membrane potential ของ mitochondria ส่งผลให้มีการปล่อย cytochrome C ออกมา (Matsumoto K; et al. 2003)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เซลล์มะเร็งและสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ใช้ในการทดลอง

เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 เป็นผลิตภัณฑ์จากสถาบัน ATCC (Cat.No. CRL-1435)

สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดได้รับจากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำ culture (Horizontal Laminar Airflow Cabinets) บริษัท NUAIRE
2. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์(5% CO₂ Incubator) บริษัท NUAIRE
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ บริษัท INTERNATIONAL EQUIPMENT COMPANY
4. microplate reader บริษัท Thermo ELECTRON CORPORATION
5. เครื่อง electrophoresis บริษัท C.B.S. SCIENTIFIC CORPORATION

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO)บริษัท Sigma
2. Fetal Bovine Serum บริษัท PAA
3. Hank's BSS (1X) บริษัท PAA
4. Hoechst 33342 trihydrochloride, trihydrate บริษัท Invitrogen
5. MTT บริษัท USB
6. RPMI 1640 บริษัท Gibco
7. Trypan blue บริษัท Sigma
8. Phosphate Buffered Saline(PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2
9. Tween 20 เข้มข้น 0.15%
10. น้ำกลั่น

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3

เลี้ยงเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม Fetal Bovine Serum เข้มข้น 10 % ใน culture flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จนเซลล์เจริญเต็ม culture plate แล้วจึงขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยใช้สารละลาย Trypsin / EDTA pH 7.3 (ภาคผนวก ก) ทำให้เซลล์ที่เกาะอยู่กับผิวหน้า culture flask หลุดออกจาก ผิวหน้า culture flask จากนั้นปั่นล้างเซลล์ ที่ 600xg เป็นเวลา 5 นาที และนำมาเลี้ยงดังวิธีการข้างต้น โดยเพิ่มขนาดของ culture flask เป็น 75 ตารางเซนติเมตร เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ด้วยวิธี MTT (Mosmann T; et al. 1983)

ใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 2×10^4 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อหลุมของ 96 well culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ออก แล้วเติมสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดใน อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูด อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ออก แล้วเติม MTT ใน อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วดูด อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ออก จากนั้นเติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาค่า IC_{50} โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 3.03

3. การทดสอบความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในการฆ่าเซลล์มะเร็ง

ใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 2×10^6 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต่อหลุมของ 6 well culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ออก แล้วเติมสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 % เป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบแต่ละช่วงเวลาจึงเก็บเซลล์แล้วนำไปปั่นล้างด้วย 1x PBS (ภาคผนวก ค) ที่ 1,100xg เป็นเวลา 1 นาที ในกรณีที่เซลล์ยังไม่หลุดจากผิวหน้า 6 well culture plate ให้ใช้สารละลาย Trypsin / EDTA pH 7.3 ล้างให้หลุดออกจากผิวหน้า 6 well culture plate แล้วนำไปปั่นล้างดังวิธีการข้างต้น หลังจากนั้นนำเซลล์มาย้อมด้วยสีย้อม trypan blue อัตราส่วน 1:1 นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีฟ้าด้วย hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำค่า IC_{50} ที่ได้จากการทดลองข้อ 2 มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นและเวลาที่ให้ทดสอบ เพื่อที่จะหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ใช้ในการฆ่าเซลล์มะเร็งเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4. การศึกษาการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

4.1 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ นิวเคลียส

ใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 2×10^6 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต่อหลุมของ 6 well culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูด อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ออก แล้วเติมสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดใน อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ความเข้มข้น, 30, 40, และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % แล้วตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ที่ช่วงเวลานั้นๆ แล้วย้อมด้วยสีย้อม Hoechst 33342 (Ramoned BM; & Tomas RP. 2002) (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ในตู้

เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นล้างด้วย 1X PBS จำนวน 2 ครั้ง แล้วจึงตรวจดูรูปร่างลักษณะของนิวเคลียส บนแผ่นสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence

4.2 การแตกหักของ DNA (DNA fragmentation)

ใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 2×10^6 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต่อหลุมของ 6 well culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ออกแล้วเติมสารสกัดยับยั้งกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ความเข้มข้น 20, 30, 40, และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำการเก็บเซลล์ แล้วล้างด้วย 1x PBS 1 ครั้ง โดยปั่นล้างที่ 600xg เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูด supernatant ทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย TE buffer แล้วเติม cold lysis buffer เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้น บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส ซ้ำมคั้น แล้วนำเซลล์มาละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นแยกที่ 1,500xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำเซลล์มาสกัด DNA ด้วย phenol chloroform จากนั้น ล้างเซลล์ด้วย TE buffer (ภาคผนวก ค) แล้วเติม RNase A เพื่อกำจัด RNA จากนั้นบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้น ทำการตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA โดยการอาศัยเทคนิค agarose gel electrophoresis (1.7 % agarose gel) (Shim JS; et al. 2001)

4.3 การทำงานของเอนไซม์ caspase โดยวิธี Western blotting

ใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 1×10^6 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต่อหลุมของ 6 well culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ออกแล้วเติมสารสกัดยับยั้งกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการฆ่าเซลล์มะเร็ง (ค่าความเข้มข้นได้จากการทดลองข้อ 2) บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเก็บเซลล์แล้วล้างด้วย PBS

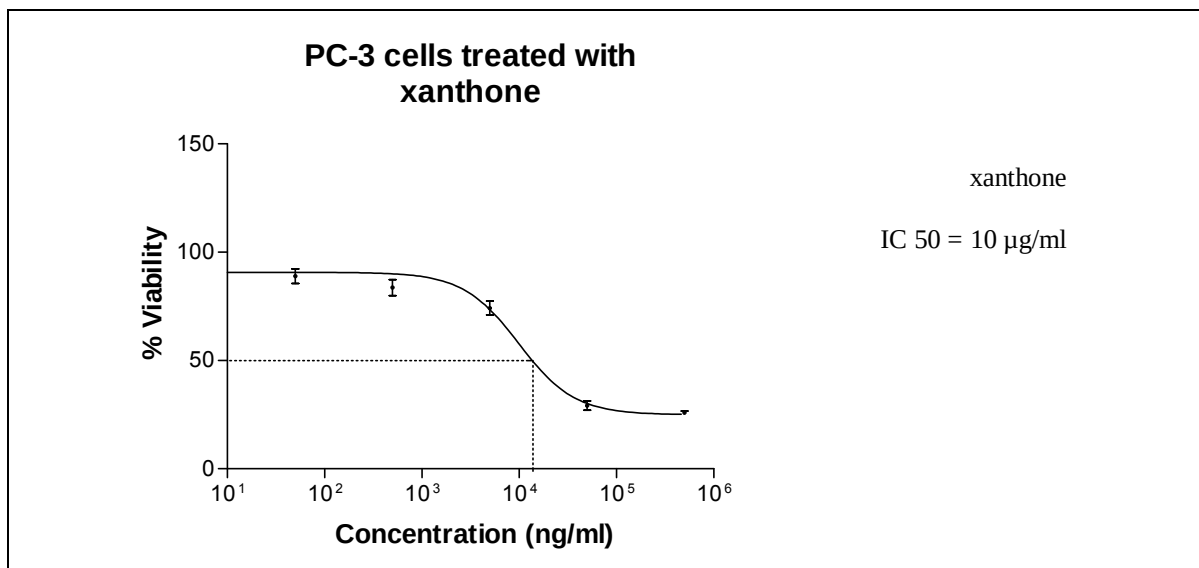
แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยการบด แล้วจึงปั่นแยกที่ 500xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำ supernatant ส่วนหนึ่งมาตรวจดูความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี Bradford อีกส่วนนำไปแยกโปรตีนบน 15% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ผ่านกระแสไฟฟ้า ที่ 130 โวลต์ ย้ายโปรตีนจาก gel ลงสู่ PVDF membrane (Polyvinylidene Fluoride) ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำ PVDF membrane แช่ 5% นมใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS เป็นเวลา 10 นาที PVDF membrane ด้วย anti-caspase-3 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที นำไปปฏิกิริยาใน anti-Mouse IgG,HRP-linked Antibody เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 10,000 ในสารละลาย 2.5% นมใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นตรวจหาแถบโปรตีน โดยอาศัยเทคนิค Autoradiography (Ramonede BM; & Tomas RP. 2002) ในกรณีของ caspase-8 และ caspase-9 ใช้วิธีการเดียวกัน เพียงแต่เปลี่ยน primary Antibody ที่จำเพาะต่อ caspase-8 และ caspase-9

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3

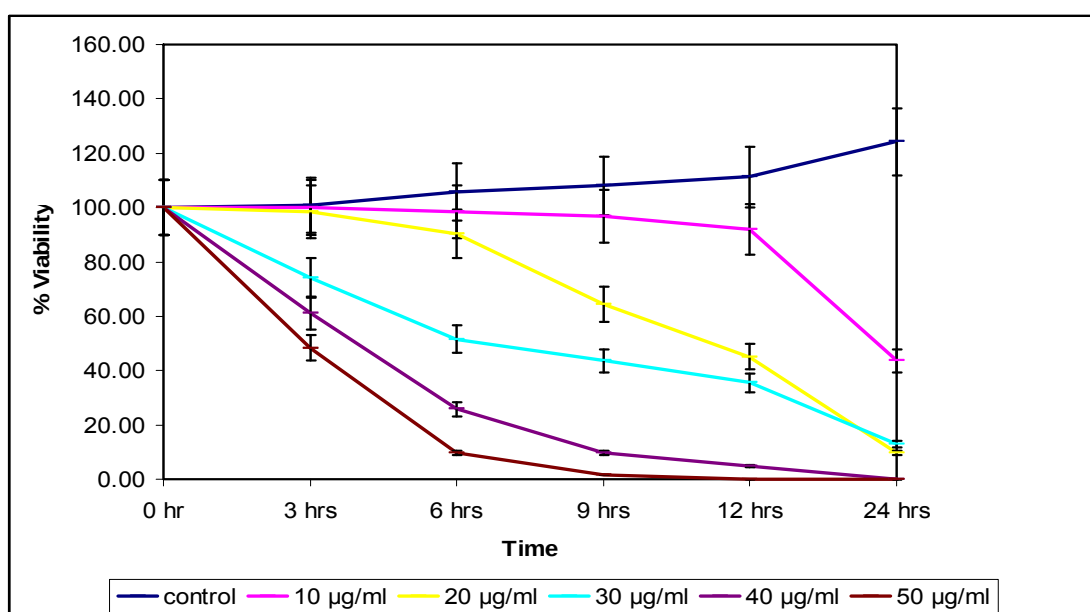
หลังจากทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone พบว่า สามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 โดยมีค่า IC_{50} ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพประกอบ 5) ดังนั้น จึงนำค่า IC_{50} ที่ได้มาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก



ภาพประกอบ 5 กราฟผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone ในการฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ด้วยวิธี MTT (MTT assay) โดยใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 2×10^4 เซลล์ แล้ววัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากนั้น นำค่าการดูดกลืนแสง ที่วัดได้ ไปหาค่า IC_{50} โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 3.03

2. ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

การทดลองเพื่อหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเซลล์มะเร็งพบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone ที่ 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีในช่วงเวลา 3 ถึง 6 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 6) ดังนั้นจึงนำค่า ที่ได้มาศึกษา การเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากที่ถูกฆ่า โดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone



ภาพประกอบ 6 กราฟผลการทดสอบ ความเข้มข้น และเวลาที่เหมาะสม ในการฆ่า เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ณ ช่วงเวลาต่างๆ โดยใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 2×10^4 เซลล์ สารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำเซลล์มาย้อมด้วยสีย้อม trypan blue อัตราส่วน 1:1 นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีฟ้าด้วย hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อที่จะหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ใช้ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง

3. การศึกษาการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

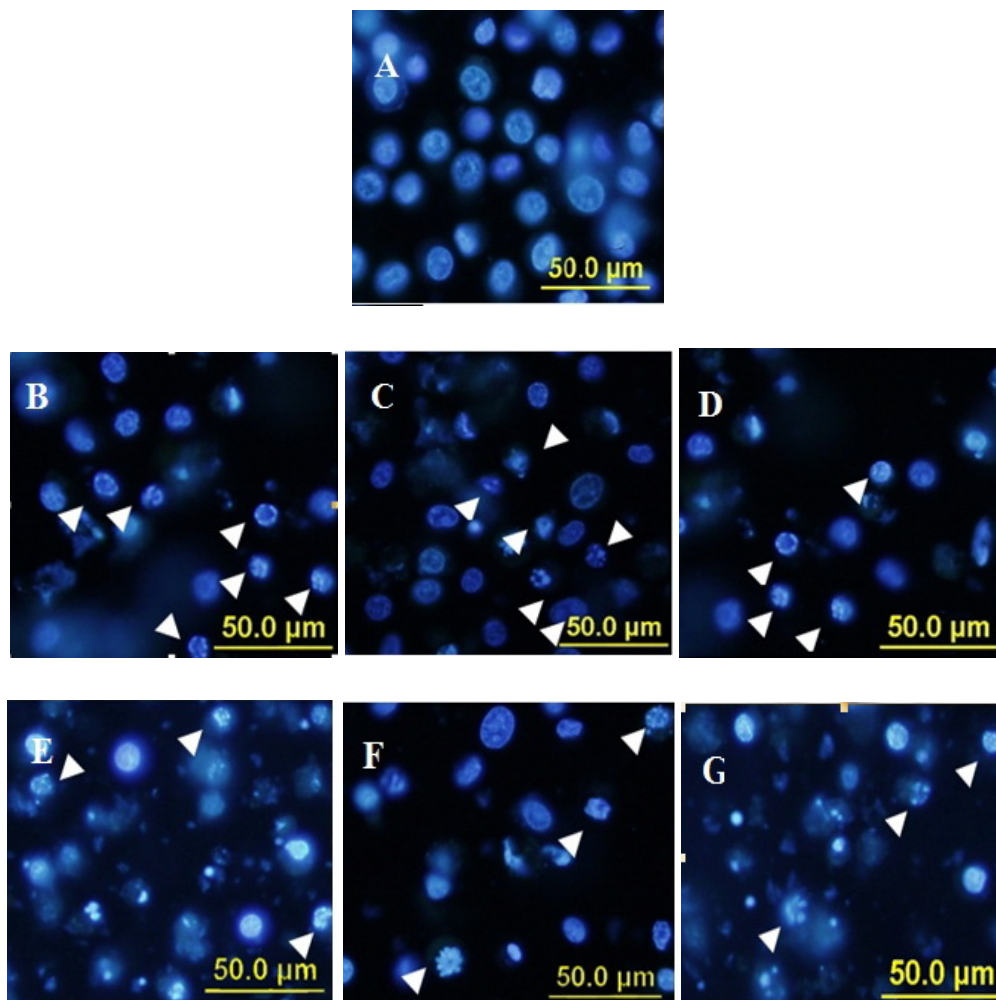
3.1 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ นิวเคลียส

หลังจากบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ได้ 3 ชั่วโมง พบว่า เซลล์มะเร็งเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง รูปร่างของนิวเคลียส ไปในรูปแบบของการเกิด apoptosis โดยนิวเคลียส จะเริ่มมีการหดตัวและมีการรวมตัวกันของ chromatin (chromatin condensation) ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง และมีการรวมตัวกันของ chromatin เป็นจุดๆ ภายในเซลล์ โดย

ความเข้มข้นสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจพบว่า มีเซลล์ที่มีขนาดเล็กลงและมีการรวมตัวกันของ chromatin เป็นจำนวนมาก และเห็นได้ชัดเจน ที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 7B และ 7C) เมื่อเปรียบเทียบกับ เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ไม่ได้รับสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ซึ่งใช้เป็น control (ภาพประกอบ 7A)

ความเข้มข้นสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังสามารถตรวจพบ เซลล์ที่มีขนาดเล็กลงและมีการรวมตัวกันของ chromatin เกิดขึ้น แต่ตรวจพบได้น้อยกว่า ความเข้มข้นสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่เวลา 3 ชั่วโมง ตรวจพบ เซลล์ที่มีขนาดเล็กลงและมีการรวมตัวกันของ chromatin ได้ และ เห็นได้ชัดเจน (ภาพประกอบ 7D) แต่ที่เวลา 6 ชั่วโมง ตรวจพบ เซลล์ที่มีขนาดเล็กลงและมีการรวมตัวกันของ chromatin ได้ลดลง และเห็นได้ไม่ชัดเจน (ภาพประกอบ 7E)

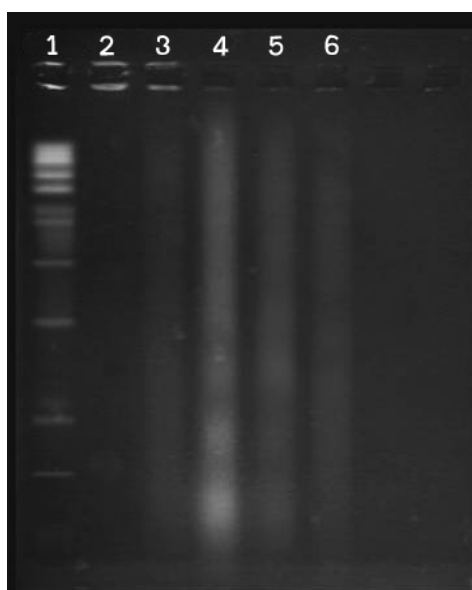
ความเข้มข้นสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจพบ เซลล์ที่มีขนาดเล็กลงและมีการรวมตัวกันของ chromatin เกิดขึ้น แต่ตรวจพบได้ เล็กน้อยและเห็นได้ไม่ชัดเจน (ภาพประกอบ 7B และ 7C)



ภาพประกอบ 7 การศึกษาการเกิด apoptosis โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียส ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 โดยใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 2×10^6 เซลล์ ย้อมด้วยสี Hoechst ที่ความเข้มข้น และ เวลา ดังนี้ (A) Control (B) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 3 ชั่วโมง (C) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6 ชั่วโมง (D) ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 3 ชั่วโมง (E) ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6 ชั่วโมง (F) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 3 ชั่วโมง (G) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 3 ชั่วโมง

3.2 การตรวจสอบการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) โดยอาศัยเทคนิค agarose gel electrophoresis DNA fragmentation

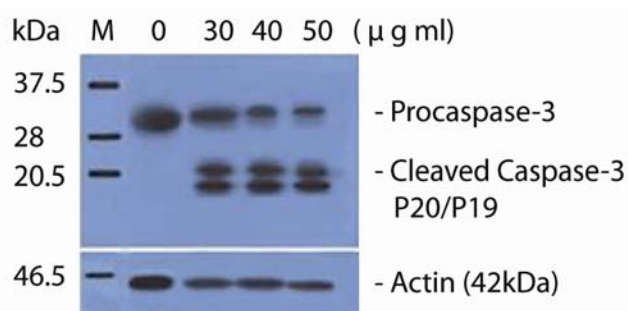
ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ที่สามารถตรวจพบการแตกหักของ DNA ได้ คือความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบการแตกหักของ DNA ได้ชัดเจนที่สุด (ภาพประกอบ 8)



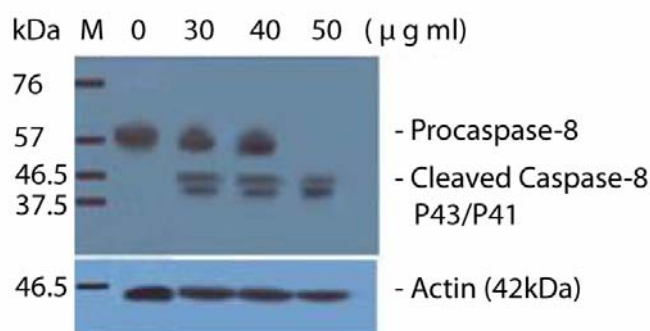
ภาพประกอบ 8 การตรวจสอบการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ซึ่งทำการสกัด DNA ด้วย phenol chloroform จากเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 จำนวนประมาณ 2×10^6 เซลล์ จากนั้นนำมาแยกด้วย agarose gel electrophoresis โดย (1) คือ Marker ซึ่งเป็น 1 kb ladder DNA (2) คือ Control ซึ่งเป็น เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ได้รับ DMSO (3) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (4) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (5) ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (6) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 การทำงานของเอนไซม์ caspase โดยวิธี Western blotting

หลังจากบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด จากเปลือก เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจสอบหาความจำเพาะของโปรตีนต่อ Anti-caspase-3, Anti-caspase-8 และ Anti-caspase-9 โดยวิธี Western blotting ตรวจพบ แแถบโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อ ต่อ Anti-caspase-3 (ภาพประกอบ 9) และ Anti-caspase-8 (ภาพประกอบ 10) แต่ตรวจไม่พบแถบโปรตีนต่อ Anti-caspase-9



ภาพประกอบ 9 การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ใน เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผ่านการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE แล้ว ย้ายโปรตีนจาก gel ลงสู่ PVDF membrane จากนั้น ตรวจหาแถบโปรตีน โดยอาศัยเทคนิค Autoradiography ทำให้เกิดเป็นภาพ บน x-ray film



ภาพประกอบ 10 การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผ่านการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE แล้ว ย้ายโปรตีนจาก gel ลงสู่ PVDF membrane จากนั้น ตรวจหาแถบโปรตีน โดยอาศัยเทคนิค Autoradiography ทำให้เกิดเป็นภาพ บน x-ray film

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone ที่สกัดได้จากเปลือกมังคุด โดยใช้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 เป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ได้ค่า IC_{50} ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากได้ในระดับที่น่าพอใจ และเมื่อนำข้อมูลค่า IC_{50} ข้างต้นมาปรับ เพื่อหาช่วงเวลาที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด พบว่าสารสกัดสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุดที่ช่วงเวลา 3 ถึง 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เนื่องจากในระยะเวลา 3 ถึง 6 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็ว หลังจากเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ถูกเหนี่ยวนำโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด และลดลงอย่างช้าๆเมื่อผ่านช่วงเวลา 6 ชั่วโมง ไปแล้ว ดังนั้น ในการทดลอง จึงนำเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด ที่ความเข้มข้น 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มาตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นโดยคาดว่าลักษณะการตายที่เกิดขึ้นจะเป็นการตายแบบ apoptosis (Majno G; & Joris I. 1995)

ในการตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 โดยการตรวจสอบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส ซึ่งถูกย้อมด้วย Hoechst 33342 พบเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่มีขนาดที่เล็กลง เนื่องมาจากการที่มีการหดตัวของ chromatin ในนิวเคลียส และจับตัวกันแน่นจนกลายเป็นก้อน ซึ่งเป็นผลมาการเหนี่ยวนำของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด โดยการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสในลักษณะดังกล่าวเป็นขั้นตอนแรกๆของกระบวนการ apoptosis ซึ่งในการเปลี่ยนแปลงไปในรูปแบบของการตายแบบ apoptosis ขึ้นต่อไปคือการที่ membrane ของเซลล์จะเกิดการเหี่ยวฝ่อลง (membrane blebbing) และห่อหุ้ม chromatin และสารต่างๆ ในเซลล์ที่หดตัวลงแล้วรวมตัวกันเป็นก้อน (apoptotic body) (Majno G; & Joris I. 1995) โดยพบการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสได้มากที่สุด ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และพบการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสได้บ้างที่ความเข้มข้น 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งเป็นไปได้ว่าที่ความเข้มข้น 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เซลล์มะเร็งถูกกระตุ้นให้มีการตายอย่างรวดเร็ว ทำให้ ณ เวลาเดียวกัน ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบเซลล์เข้าสู่ระยะแรกๆ ของการ

ตายแบบ apoptosis ได้มาก ในขณะที่ความเข้มข้น 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั้น เซลล์ได้เข้าสู่ระยะหลังๆของการตายแบบ apoptosis แล้ว และบางเซลล์ได้ตายและสลายตัวไปแล้ว

ในการตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 โดยการตรวจสอบลักษณะการแตกหักของชิ้น DNA (DNA fragmentation) พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจพบ การแตกหักของ DNA เป็นชิ้นๆ ในลักษณะขั้นบันได (DNA ladder) โดยการแตกหักของชิ้น DNA ที่ตรวจพบ อาจเกิดจากการที่ DNA ถูกย่อยเป็นท่อนสั้นๆ โดย endonuclease (Majno G; & Joris I. 1995) ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งในการเกิด apoptosis ในระยะแรก ซึ่งจะเกิดขึ้นเป็นระยะที่จะเกิดขึ้นพร้อมๆกับการหดตัวของ chromatin โดยที่สาย DNA จะถูก ย่อยให้เป็นสายสั้นๆ โดย endonuclease ในการตรวจสอบจึงอาศัยเทคนิค agarose gel electrophoresis เพื่อแยกเอาสาย DNA ที่ถูกย่อย ออกจากกัน ทำให้เห็นลักษณะที่เรียกว่า DNA ladder บน gel โดยพบ การแตกหักของชิ้น DNA ได้มาก ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบได้เล็กน้อย ที่ความเข้มข้น 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นไปได้ว่าที่ความเข้มข้น 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นเซลล์บางส่วนได้ตายและสลายตัวไปแล้ว จึงไม่สามารถตรวจพบชิ้น DNA ได้

ในการตรวจสอบกลไกการเกิด apoptosis pathway ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 หลังจากถูกกระตุ้นให้เกิด apoptosis โดยสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ cysteine protease ที่มีชื่อว่า caspase (Adrain C; Creagh EM; & Martin SJ. 2002) ซึ่งเป็นโปรตีนจำเพาะ ที่จะพบได้ในขั้นตอนการเกิด apoptosis เท่านั้น โดยอาศัยเทคนิค Western blotting ตรวจพบ ปฏิกิริยาของ caspase-3 ที่จับกับแถบของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็น ขนาดของ procaspase-3 และพบ ปฏิกิริยาของ caspase-3 ที่จับกับแถบของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 19 และ 20 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็น ขนาดของ cleaved caspase-3 โดยที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจพบ ปฏิกิริยาของ caspase-3 ได้มากที่สุด

ปฏิกิริยาของ caspase-8 ที่จับกับแถบของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็น ขนาดของ procaspase-8 และพบปฏิกิริยาของ caspase-8 ที่จับกับแถบของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 43 และ 44 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็น ขนาดของ cleaved caspase-8 โดยที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจพบปฏิกิริยาของ caspase-8 ได้มากที่สุด และที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบเพียงปฏิกิริยาของ caspase-8 แต่ไม่พบปฏิกิริยาของ pro-caspase-8 อาจเป็นไปได้ว่า ณ ที่ความเข้มข้นดังกล่าว กระบวนการเกิด apoptosis เกิดขึ้นอย่าง

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- จินตนา สิรินาวิน; และ ชนินทร์ ลิ้มวงศ์. (2549). ศัพทานุกรมเวชพันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน.
- จุฑามาศ แอนเนียน. (2550). *ต่อมลูกหมากและความผิดปกติอื่นๆ*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ ไกล่หมอ.
- เทพนม เมืองแมน; และคณะ. (2533). *คู่มือสมุนไพรรักษากลุ่มอาการมะเร็ง*. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- เรวัณ พันธุ์เขียว; และ วรชัย รัตนธรร. (2538). *ตำรารักษาโรคมะเร็ง*. กรุงเทพฯ: โฮลิสติก พับลิชชิง.
- สุมิตรา ทองประเสริฐ; และ สิริกุล นภาพันท์. (2545). โรคมะเร็ง: แนวทางการรักษา = Practical Points in Oncology. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: ธนบรรณการพิมพ์.
- Adrain, C.; Creagh, E. M.; & Martin, S.J. (2002). Caspase Cascades in Apoptosis Caspases-their role in cell death and cell survival. Ed. Marek Los and Henning Walczak. *Molecular Biology Intelligence Unit 24*. New York. 41-51.
- Anthony, C. (1995). A review of Mangosteen (*Garcinia mangostana*) Linn. Dweck Data. American Cancer Society. (2007). Cancer Facts and Figures. *Atlanta, Ga: American Cancer Society*.
- Attasara, P. (2006). *Cancer*. National Cancer Institute Department of Medical Service Ministry of Public Health Thailand.
- Chaiyasothi, T.; & Rueaksopaa, V. (1975). Antibacterial activity of some medicinal plants. Undergraduate Special Project Report, *Fac Pharm*, Mahidol Univ.; 109
- Chan, J.D. (1998). Pharmacokinetic drug interactions of vinca alkaloids: summary of case reports. *Pharmacotherapy*, 18(6): 1304-7.
- Chen, S.; Wan, M.; & Loh, B. (1996). Active constituents against HIV-1 protease from *Garcinia mangostana*. *Planta Med.* 62(4): 381-382.
- Chomnawang, M.T.; et al. (2005). Antimicrobial effects of thai medicinal plant against acne-inducing bacteria. *J Ethnopharmacol.* 101(1-3): 330-333.

- Gasic, G.J. (1984). Role of plasma platelets and endothelial cells in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 3: 99-114.
- Gopalakrishnan, G.; et al. (1997). Evaluation of the Antifungal Activity of Natural Xanthenes from *Garcinia mangostana* and their Synthetic Derivatives. *J Nat Prod.* 60(5): 519-52.
- Hanahan, D.; & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.* 100: 57-70.
- Haskell, C.M. (1985). Principles of cancer chemotherapy. In: Haskell, C.M. ed. *Cancer treatment.* 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders :21-42
- Ho, C.K. (2002). Garcinone E, a xanthone derivative, has potent cytotoxic effect Against hepatocellular carcinoma cell lines. *Planta Med.* 68(11):975-9.
- Holmgren, L.; O'Rilly, M.S. ; & Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1: 149-153.
- Johnstone, R.W.; Ruefli, A. A.; & Lowe, S.W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* : 153-164.
- Kuttan, R.; et al. (1985). Potential anticancer activity of tumeric (*Curcumin longa*). *Cancer Lett.* 29(2): 197-202.
- Leong, L.P.; & Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* 76: 69-75.
- Limei Y; et al. (2007). Phenolics from hull of *Garcinia mangostana* fruit and their Antioxidant activities. *Food Chem.* 104:176-181
- Linuma, M.; et al. (1996). Antibacterial activity of xanthone from guttiferaceous plants against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol.* 48(8): 861-865.
- Mahabusarakam, W.; Wiriyaichitra, P.; & Phongpaichit, S. (1986). Antimicrobial Activities of Chemical constituents from *Garcinia mangostana*. Linn. *J Sci Soc Thailand.* 12(4):,239-242.
- Mahabusarakam, W.; Phongpaichit, S.; & Wiriyaichitra, P. (1983). Screening of antifungal of chemicals from *Garcinia mangostana*. *J Sci Technol.* 5(4): 341-342.

- Majno, G.; & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 146(1): 3–15.
- Manosroi, J.; et al. (2006). Principles of surgical oncology. *Cancer medicine*: 651-664.
- Matsumoto, K.; et al. (2003). Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines. *J Nat Prod.* 66(8):1124-1127
- Mazumder, A.; et al. (1995). Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. *Biochem Pharmacol.* 49(8): 1165-1170.
- Mingxin S; et al. (2006). Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. *Cell Biol Int.* 30: 221-226.
- Moongkarndi, P.; et al. (2003). Cytotoxicity assay of hispidulin and quercetin using colorimetric technique. *J Pharm Sci.* 18(2): 25-31.
- Mosmann, T.; et al. (1983). Rapid colorimetric for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immuno Methods.* 65: 55-63.
- Nachshon-Kedmi, M.; Yannai, S.; & Fares F.A.(2004). Induction of apoptosis in human prostate cancer cell line, PC-3, by 3,30'-diindolylmethane through the mitochondrial pathway. *British Journal of Cancer.* 91:1358-1363.
- Nakatani, K.; et al. (2002). Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E₂ synthesis by γ -mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. *Biochem Pharmacol.* 63(1):73-79.
- Narayan P. (1995). Neoplasms of the prostate gland. In: Tanagho, E.A.; Mc, Aninch, J.W. eds. *Smith's General Urology* 14th USA: W.B.Saunders : 392-433.
- Peres, V.; Nagem, T.J.; & Oliveira, F.F. (2000). Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. *Phytochemistry.* 55(7): 683-710.
- Phongpaichit, S.; et al. (1994). Antibacterial activities of extracts from. *Garcinia mangostana* Songklanakarin. *J Sci Technol.* 16(4): 399-405.
- Porter, A.T.; & Chuba, P.J. (2000). Radiotherapy of prostate cancer: Photon and neutron treatments. In *Prostatic disease*. USA. W.B.Saunders : 444-450.

- Ramonede, B.M.; & Tomas, R.P. (2002). Activation of protein kinase C for protection of cells against apoptosis induced by the immunosuppressor prodigiosin. *Biol Pharm.* 63: 463-469.
- Rao, R.V.; et al. (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *J Biol Chem.* 277(26):21836-21842.
- Rafatullah, S.; et al. (1990). Evaluation of turmeric (*Curcumin longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rat. *J Ethnopharmacol.* 29(1): 25-34.
- Rosenberg, S.A. (1989). Principles of surgical oncology. In: Devita, V.T.; Hellman, S.; Rorenberg, S.A. eds. Cancer: principles and practice of oncology. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott: 236-246.
- Sakai, S.; et al. (1993). The Structure of Garcinone E. *Chem Pharm Bull.* 41(5): 958-960.
- Shim, J.S.; et al. (2001). Curcumin-Induced Apoptosis of A-431 Cells Involves Caspase-3 Activation. *J Biochem Mol Biol.* 34(3): 189-193.
- Sriplung, H.; et al. (2003). Cancer in Thailand. Bangkok : Medical Publisher. 3(2): 7-69.
- Studzinski, G. P. (1995). Cell growth and apoptosis: a practical approach. *IRL Press.*
- Sudhir, G. (2001). Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life science.* 69: 2957-2964.
- Tannoch, I.F.; & Hill, R.P. (1998). The basic science of oncology. New York. McGraw-Hill :25
- Woo, H.L.; Swenerton, K.D.; & Hoskins, P.J. (1996). Taxol is active in platinum resistant endometrial adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol.* 19(3): 290-1.
- Yegnanarayana, R.; Sarat, A.P.; & Balwani, J.H. (1976). Comparison of anti-inflammatory activity of various extracts of *Curcumin longa*. *Indian J Med Res.* 64:601-608.
- Yoshihito, N.; et al. (2007). Characterized mechanism of α -mangostin-induced cell death: Caspase-independent apoptosis with release of endonuclease-G from mitochondria and increased miR-143 expression in human colorectal cancer DLD-1 cells. *Bioorg Med Chem* 15:5620-5628

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมีสำหรับการเลี้ยงเซลล์

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI medium)

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose) (Sigma)	3.6	กรัม
โซเดียมไพรวูเวต ($C_3H_3O_3Na$) (Sigma)	1.1	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต($NaHCO_3$) (Sigma)	2.0	กรัม
HEPES(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid, Sigma)	5.9	กรัม
เพนิซิลลิน จี (Penicillin G)(Gibco)	20,000	units
สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)(Gibco)	200.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1,000.0	มิลลิลิตร
กรองด้วย sterilized Millipore membrane 0.22 ไมครอนเมตรเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย Fetal bovine serum เข้มข้น 10 %

RPMI medium (1)	90.0	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum (FBS)(Gibco)	10.0	มิลลิลิตร

3. สารละลายสำหรับชะล้างเซลล์ออกจากผิวหน้าภาชนะเลี้ยงเซลล์

Trypsin / EDTA pH 7.3

Trypsin	0.25	กรัม
EDTA	0.04	กรัม
Hanks' Balomceol salt solution	100.0	มิลลิลิตร
กรองด้วย sterilized Millipore membrane 0.22 ไมครอนเมตรเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส		

4. สารละลายสำหรับแช่แข็งเซลล์ (Preservative RPMI)

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide)(Sigma)	2.0	มิลลิลิตร
RPMI medium (1)	8.0	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum (FBS)	10.0	มิลลิลิตร
เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

ภาคผนวก ข

การเจือจางสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุด

การเตรียมสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมสารสกัดหยาบกลุ่ม xanthone จากเปลือกมังคุดให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย DMSO สำหรับใช้ในการเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆดังนี้

- ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจากความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เจือจางด้วย RPMI media ปริมาตร 398 ไมโครลิตร
- 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจากความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เจือจางด้วย RPMI media ปริมาตร 360 ไมโครลิตร
- 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจากความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เจือจางด้วย RPMI media ปริมาตร 360 ไมโครลิตร
- 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจากความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เจือจางด้วย RPMI media ปริมาตร 360 ไมโครลิตร
- 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจากความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เจือจางด้วย RPMI media ปริมาตร 360 ไมโครลิตร
- 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจากความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เจือจางด้วย RPMI media ปริมาตร 360 ไมโครลิตร

ภาคผนวก ค

สารเคมีและบัฟเฟอร์

1. สารเคมีสำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ด้วยวิธี MTT

การเตรียมสาร MTT (ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)

MTT	5.0	มิลลิกรัม
RPMI medium (1)	10.0	มิลลิลิตร

2. สารเคมีสำหรับการย้อม นิวเคลียส

การเตรียมสีย้อม Hoechst 33342

Hoechst 33342	17.5	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	17.5	ไมโครลิตร

3. สารเคมีและบัฟเฟอร์สำหรับล้างเซลล์

3.1 Phosphate buffer saline (1x PSB) pH 7.4

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

3.2 TE buffer pH 8.0

10 mM Tris	1.0	มิลลิลิตร
1 mM EDTA	1.0	มิลลิลิตร

4. สารเคมีและบัฟเฟอร์สำหรับ SDS-PAGE และ Western blot

4.1 การเตรียม separating gel และ stacking gel สำหรับ SDS-PAGE

4.1.1 การเตรียม separating gel (12% gel)

40% Acrylamide BIS (1.1)	1.5	มิลลิลิตร
Tris-HCl เข้มข้น 1.5 M pH 8.8 (1.2)	1.25	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 % (1.4)	50.0	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	2.17	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 %	25.0	ไมโครลิตร
TEMED	2.5	ไมโครลิตร

4.1.2 การเตรียม stacking gel(4% gel)

40% Acrylamide BIS (1.1)	0.49	มิลลิลิตร
Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	0.63	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 % (1.4)	50.0	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	3.8	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 %	25.0	ไมโครลิตร
TEMED	5.0	ไมโครลิตร

ตารางที่ 4 แสดงส่วนผสมพอลิอะคริลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel

ส่วนผสม	Separating 12% gel		Stacking 4% gel	
40% Acrylamide BIS (1.1)	1.5	มิลลิลิตร	0.49	มิลลิลิตร
Tris-HCl เข้มข้น 1.5 M pH 8.8 (1.2)	1.25	มิลลิลิตร	-	
Tris-HCl เข้มข้น 1.0 M pH 6.8 (1.3)	-		0.625	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 % (1.4)	50	ไมโครลิตร	5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	2.17	มิลลิลิตร	3.8	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 %	25	ไมโครลิตร	25	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร	5	ไมโครลิตร

ผสมและเทอย่างรวดเร็วลงในช่องระหว่างกระจก

4.2 Running buffer(SDS-PAGE Tank buffer)

Tris	12.0	กรัม
ไกลซีน	57.6	กรัม
SDS เข้มข้น 10 % (1.4)	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

4.3 Towbin transfer buffer pH 8.8 สำหรับการวิเคราะห์ Western blot

Tris	3.0	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
เมทานอล	200.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร
ก่อนนำบัฟเฟอร์ไปใช้ต้องนำไปแช่ให้เย็นจัด		

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายพิเชษฐ์ เกียรติพรรคักดา
วันเดือนปีเกิด	22 สิงหาคม 2522
สถานที่เกิด	เขียงราย
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 236 หมู่ที่ 10 ตำบลเวียง อำเภอเขียงของ จังหวัด เขียงราย 57140
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักเทคนิคการแพทย์ ระดับ 5
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	หน่วยตรวจโรคติดเชื้อด้วยวิธีชีวโมเลกุล ฝ่ายคัดกรองจ่ายโลหิต และผลิตภัณฑ์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2545	วท.บ.(เทคนิคการแพทย์) จากมหาวิทยาลัยรังสิต
พ.ศ. 2553	วท.ม.(เทคโนโลยีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ