

638.96

76217

8.2

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

“ฤทธิ์การต้านมะเร็งของนมผึ้ง”

“The anticarcinogenic effect of royal jelly”

งบประมาณประจำปี 2543

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผศ.ดร.ภญ. รุ่งตะวัน สุภาพผล

อาจารย์ พรรณี หนูชื้อตรง

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผศ.นพ. อธิคม สุภาพผล

ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๑๕๖๕๗

สารบัญเรื่อง

สารบัญเรื่อง	2
สารบัญภาพ	4
กิตติกรรมประกาศ	6
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	7
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	7
บทนำ	8
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	8
- วัตถุประสงค์	9
- ขอบเขตการวิจัย	9
- ผลที่คาดว่าจะได้รับ	9
การทบทวนวรรณกรรม	10
- นมผึ้งคืออะไร	10
- โปรตีนในนมผึ้ง	10
- การแปรรูปนมผึ้งและการต้านการแพ้	12
- ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของนมผึ้ง	12
- ฤทธิ์อื่นไม่พึงประสงค์ของนมผึ้ง	14
- ข้อคิดในการใช้นมผึ้ง	14
- การตรวจสอบความปราศจากเชื้อของเซลล์	15
- Sulforhodamine B (SRB) method	17
ระเบียบวิธีวิจัย	18
- ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	18
- สถานที่ทำการวิจัย	18

✓ ระยะเวลาดำเนินการวิจัย	18
- เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	18
- วัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์	19
- สารเคมี	20
✓ - วิธีดำเนินการวิจัย	21
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	28
- การสกัดนมผึ้ง	28
- การตรวจสอบความปราศจากเชื้อของเซลล์	28
- การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	31
- การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ	34
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	46
- บทสรุป	46
- ข้อเสนอแนะ	47
บรรณานุกรม	48
ภาคผนวก	58

สารบัญภาพ

ภาพ 1	ภาพตัวอย่างของ 24-well plate ที่แสดงผลการทดสอบความปราศจากเชื้อของเซลล์ เพื่อศึกษาว่าเซลล์ที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการปลอดจากการติดเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียหรือไม่	30
ภาพ 2	ภาพตัวอย่าง 96-mirowell plate ที่แสดงการย้อมสี โปรตีนภายในเซลล์ด้วยวิธี SRB เพื่อศึกษาว่าเซลล์ยังคงทำหน้าที่ตามปกติหรือไม่	36-37
ภาพ 3	กราฟแสดงค่า % การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและความเข้มข้นของ ellipticine (n = 9)	38
ภาพ 4	กราฟแสดงค่า % การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและความเข้มข้นของ doxorubicin (n = 9)	38
ภาพ 5	กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้นของนมผึ้งและสารสกัดจากนมผึ้งชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านม	39
ภาพ 6	กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้นของนมผึ้งและสารสกัดจากนมผึ้งชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาในเซลล์มะเร็งช่องปาก	40
ภาพ 7	กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้นของนมผึ้งและสารสกัดจากนมผึ้งชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาในเซลล์มะเร็งตับ	41

- ภาพ 8 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้น
ของนมผึ้งและสารสกัดจากนมผึ้งชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาใน
เซลล์มะเร็งปอด 42
- ภาพ 9 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้น
ของนมผึ้งและสารสกัดจากนมผึ้งชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาใน
เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ 43
- ภาพ 10 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้น
ของนมผึ้งและสารสกัดจากนมผึ้งชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาใน
เซลล์ melanoma 44
- ภาพ 11 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้น
ของนมผึ้งและสารสกัดจากนมผึ้งชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาใน
เซลล์ไคโลมิกโต 45

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณเป็นอย่างสูงต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้โอกาสคณะผู้วิจัยเสนอโครงการวิจัยและได้รับการพิจารณาให้รับทุนอุดหนุนการวิจัยในปีงบประมาณ 2543 จำนวน 300,000 บาท (สามแสนบาทถ้วน)

คณะผู้วิจัยได้ใช้ความวิริยะอุตสาหะอย่างเต็มที่เพื่อให้การวิจัยในครั้งนี้สำเร็จตรงตามวัตถุประสงค์ที่ได้ขอทุนไว้ และใคร่ขอถือโอกาสนี้แสดงความขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.ดร.ภญ. รุ่งตะวัน สุภาพผล
อาจารย์ พรรณี หนูเชื้อตรง
ผศ.นพ. อธิคม สุภาพผล

บทคัดย่อ

นมผึ้งเป็นอาหารเสริมที่เคยมีรายงานการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง เมื่อนำนมผึ้งและสารสกัดนมผึ้งด้วยน้ำ เอทานอล คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน มาทดลองศึกษาฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิดด้วยวิธีการย้อมสี sulforhodamine B โดยแปรขนาดความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ไปจนถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ก็พบว่านมผึ้งไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองเลย แต่รายงานในอดีตกล่าวไว้ว่านมผึ้งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองโดยทำให้ก้อนเนื้อมะเร็งลดขนาดลงได้ จึงอาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ของนมผึ้งต้องอาศัยกระบวนการบางอย่างในร่างกาย หรือฤทธิ์ต้านมะเร็งอาจผ่านกระบวนการด้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

Abstract

Royal jelly is the health food contained anticarcinogenic effect *in vivo*. The whole royal jelly and extracts from which (water, ethanol, chloroform and hexane extracts), 10-500 microgram, did not show this effect *in vitro* to variety of cancer cell lines via sulforhodamine B method. The previous reports showed anticarcinogenic activity *in vivo*, the tumor sizes were reduced. It might due to some metabolizing process in the body or antioxidative activity *in vivo*.

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันมีการนำนมผึ้งมาใช้เป็นอาหารเสริมกันอย่างแพร่หลาย โดยที่ยังไม่มีหลักฐานการวิจัยทางการแพทย์อย่างแน่ชัด เพียงแต่อาศัยหลักการที่ว่าผึ้งงานนำนมผึ้งมาเลี้ยงผึ้งนางพญาตลอดชีวิต ทำให้ผึ้งนางพญามีคุณสมบัติพิเศษมาก ๆ ต่างจากผึ้งงานทั่วไปที่มีโอกาสได้รับนมผึ้งเพียง 3 วันแรกของชีวิตเท่านั้น แต่หลักฐานทางการแพทย์สำหรับนมผึ้งถือว่ายังน้อยมาก โดยเฉพาะความสามารถในการต้านมะเร็งซึ่งน้อยมาก^(๑) จนไม่สามารถยืนยันได้แน่นอนว่ามีฤทธิ์ต้านหรือใช้รักษามะเร็งได้จริง ๆ หรือไม่ ในขณะที่อุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งเพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย การกล่าวอ้างว่านมผึ้งสามารถต้านมะเร็งได้ทำให้มีผู้บริโภคจำนวนมากเชื่อถือและซื้อหามารับริโภคโดยอาศัยความเชื่อแต่โบราณ

การค้นคว้าวิจัยทางการแพทย์ปัจจุบันเพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งของนมผึ้งจะช่วยตอบคำถามดังกล่าวข้างต้นได้เป็นอย่างดี กล่าวคือหากนมผึ้งมีความสามารถต้านมะเร็งจริง จะจำเพาะต่อมะเร็งชนิดใดหรือไม่ มีผลต่อเซลล์ปกติหรือไม่ มีกลไกการออกฤทธิ์เป็นอย่างไร แต่หากนมผึ้งไม่สามารถต้านมะเร็งได้จริงก็จะเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคคือไม่ต้องเสียทรัพย์โดยไม่จำเป็น และมุ่งรักษาทางการแพทย์สมัยใหม่เสียตั้งแต่แรกก่อนที่จะสูญเสียโอกาสทองไป เพราะมะเร็งในระยะเริ่มแรกหลายชนิดสามารถรักษาให้หายขาดได้หากรีบไปพบแพทย์

วัตถุประสงค์อีกประการหนึ่งของโครงการวิจัยนี้คือการทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้นของการนำนมผึ้งมาใช้ เนื่องจากปัจจุบันมีผู้นิยมนำนมผึ้งมารับริโภคเป็นอาหารบำรุงสุขภาพหรืออาหารเสริม (health food) กันมาก การทดลองว่านมผึ้งปลอดภัยต่อเซลล์ปกติจะทำให้การบริโภคนมผึ้งเป็นไปด้วยความมั่นใจยิ่งขึ้น

ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงน่าจะเป็นประโยชน์ต่อผู้นิยมบริโภคนมผึ้งไม่ว่าผลการวิจัยจะเป็นไปในทางบวกหรือลบก็ตาม แต่คณะผู้วิจัยก็มั่นใจในระดับหนึ่งว่านมผึ้งน่าจะมีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ แต่อาจเป็นกลไกโดยตรงที่สามารถพิสูจน์ได้ในโครงการวิจัยนี้หรืออาจเป็นกลไกโดยอ้อมที่ต้องมีการพิสูจน์ในระดับสูงต่อไป

วัตถุประสงค์

- (1) เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็งชนิดต่าง ๆ ของนมผึ้ง
- (2) ทดสอบความเป็นพิษของนมผึ้งต่อเซลล์ปกติ

ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยนี้ใช้นมผึ้งชนิด freeze-dried (whole royal jelly) ที่ผลิตในประเทศไทย และสารสกัดจากนมผึ้งมาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในห้องปฏิบัติการกับเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ รวมทั้งทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- (1) เพื่อยืนยันว่านมผึ้งมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งจริงหรือไม่ และสามารถต้านมะเร็งทั่ว ๆ ไปได้หรือไม่ รวมทั้งจำเพาะต่อเซลล์บางชนิดเท่านั้น
- (2) สามารถยืนยันได้ว่านมผึ้งมีความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติหรือไม่ อย่างไร เพราะมีผู้ใช้นมผึ้งเป็นอาหารเสริมในการบำรุงร่างกายตามปกติกันอย่างแพร่หลาย
- (3) เป็นการริเริ่มการวิจัยแนวใหม่ของนมผึ้งทางด้านโรคมะเร็งในโครงการนมผึ้ง ซึ่งในโครงการเดิมมีเพียงโรคเบาหวาน โรคกระเพาะอาหาร โรคความดันโลหิต และโรคตับ งานวิจัยนี้จึงน่าจะช่วยให้นมผึ้งมีการประยุกต์และนำมาใช้ได้หลากหลายยิ่งขึ้น

การทบทวนวรรณกรรม

นมผึ้งคืออะไร

นมผึ้งจัดเป็นหนึ่งในอาหารเสริมบำรุงสุขภาพ (healthy food) หลาย ๆ ชนิดที่มีการค้นคว้าวิจัยกันอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน⁽¹⁻⁴⁾ นมผึ้ง (royal jelly) มีลักษณะเป็นครีมเหลว ข้น สีขาวนวล รสฝาด และเผ็ดเล็กน้อย สร้างมาจากต่อมใต้คอหอย (hypopharyngeal gland) และต่อมน้ำลายใต้ขากรรไกร (mandibular salivary gland) ของผึ้งงานที่มีอายุเฉลี่ยประมาณ 5-15 วัน ที่เรียกว่า ผึ้งพยาบาล ผึ้งงานใช้นมผึ้งเลี้ยงตัวอ่อนของผึ้งนางพญาจนเติบโตไปตลอดชีวิต⁽⁵⁻⁸⁾

แม้ว่าประสิทธิภาพของนมผึ้งจะไม่ได้ได้รับการยืนยันอย่างเป็นทางการจากวงการแพทย์ก็ตาม อีกทั้งกลไกการออกฤทธิ์ก็ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างชัดเจน แต่เนื่องจากการที่นมผึ้งถูกนำมาใช้เลี้ยงตัวอ่อนของผึ้งนางพญา ทำให้ผึ้งนางพญามีลักษณะที่โดดเด่นกว่าผึ้งวรรณะอื่น เช่น ขนาดโตกว่า สวยงามกว่า อายุยืนนานกว่าผึ้งทั่วไป 10-20 เท่า สามารถออกไข่ในวันหนึ่ง ๆ ได้มากถึง 2,000 ฟอง เป็นเวลาติดต่อกันทุกวัน นานประมาณ 10 เดือนใน 1 ปี ผลต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้นมผึ้งถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งที่รับประทานเป็นอาหารเสริม (supplement food) บำรุงร่างกาย (health tonic) ตลอดจนนำมาผสมในเครื่องสำอางบำรุงผิวพรรณ⁽⁵⁻⁸⁾

โปรตีนในนมผึ้ง

ส่วนประกอบของนมผึ้งนับได้ว่ามีสารที่เป็นประโยชน์มากมายต่อร่างกาย เช่น คาร์โบไฮเดรต 10-12 % โปรตีน 14-15 % ไขมัน 3-5 % เกลือแร่ และวิตามินหลายชนิด รวมทั้งพบสารสำคัญอีกหลายชนิดเช่น royalisin, acetylcholine, insulin-like peptide, sebatic acid และฮอร์โมนเพศชาย เป็นต้น⁽⁹⁻²²⁾

สารสำคัญชนิดหนึ่งซึ่งมีรายงานมาตั้งแต่อดีตว่า มีความสำคัญที่สุดในนมผึ้งคือ 10-hydroxy-2-decenoic acid สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เครื่องมือ high pressure liquid chromatography (HPLC) เป็นสารที่พบเฉพาะในนมผึ้งเท่านั้น ใช้เป็นดัชนีบ่งบอกคุณภาพของนมผึ้ง โดยถือว่านมผึ้งที่มีคุณภาพดีควรจะต้องมีกรดไขมันนี้อยู่มาก⁽⁹⁻²²⁾

สารอาหารสำคัญอีกประเภทหนึ่งในนมผึ้งที่มีผู้ศึกษากันไว้มาก่อนข้างมากนอกจากกรดไขมันคือโปรตีน โปรตีนหลายชนิดในนมผึ้งได้รับความสนใจจากนักวิจัยมาจนถึงระดับที่มีการ clone ยีนที่สังเคราะห์โปรตีนในนมผึ้งและศึกษาโครงสร้างโดยละเอียดของโปรตีนเหล่านั้น⁽²³⁻²⁹⁾ ปัจจุบันมีการศึกษาโปรตีนในนมผึ้งไว้หลายชนิด ได้แก่

(1) *Major royal jelly proteins (MRJPs)* เป็นกลุ่มโปรตีนที่พบในนมผึ้ง มีปริมาณสูงประมาณ 82-90 % ของโปรตีนในนมผึ้ง มีกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) ในปริมาณสูง ปัจจุบันพบโปรตีนในกลุ่มนี้ 5 ชนิด คือ MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4 และ MRJP5⁽³⁰⁻³¹⁾

(2) *Royal jelly protein-1 (RJP-1)* ในอดีตที่ผ่านมามักเชื่อกันว่าสารสำคัญในนมผึ้งคือ 10-hydroxy-2-decenoic acid เป็นธรรมชาติบ่งชี้ถึงคุณภาพและความสดใหม่ (freshness) ของนมผึ้ง แต่เมื่อต้นปี ค.ศ. 2001 นี้ Kamakura และคณะได้นำเสนอโปรตีนชนิดใหม่ในนมผึ้งมีชื่อว่า royal jelly protein-1 (RJP-1) น้ำหนักโมเลกุล 57,000 สำหรับเป็น marker ตัวใหม่ที่ใช้บอกความสดใหม่ของนมผึ้ง RJP-1 มีคุณสมบัติเป็น monomeric glycoprotein ที่เสื่อมสภาพได้เมื่อทดลองเก็บในสถานะที่มีอุณหภูมิต่ำหรือสูงเกินไป กล่าวคือหากทดลองเก็บรักษานมผึ้งที่แปรอุณหภูมิตั้งแต่ 4 ไปจนถึง 50 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน จะพบว่า RJP-1 เสื่อมสภาพไปแล้ว ขณะที่ 10-hydroxy-2-decenoic acid และวิตามินอีกหลายตัวยังคงสภาพอยู่ดีตามเดิม⁽³²⁾

RJP-1 มีคุณสมบัติพิเศษอีกประการหนึ่งคือ สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ DNA ของเซลล์ได้ ในขณะที่นมผึ้งที่เก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลานาน 7 วัน ซึ่ง RJP-1 เสื่อมสภาพไปแล้วจะไม่สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ DNA ได้ ทำให้เกิดแนวความคิดที่ว่า RJP-1 อาจมีบทบาทช่วยให้เกิดการซ่อมแซมระดับหรือมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ได้⁽³³⁾

(3) *Royalisin* เป็นโปรตีนในนมผึ้งที่พบว่า มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียอย่างรุนแรง ได้จากการนำนมผึ้งมาผ่านกระบวนการ acid extraction, gel filtration และ reverse-phase high pressure liquid chromatography ประกอบด้วยกรดอะมิโน 51 โมเลกุลที่มี disulfide link ภายในโมเลกุล 3 แห่ง น้ำหนักโมเลกุล 5,523 มีคุณสมบัติเป็น amphipathic protein สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดกรัมบวก แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียชนิดกรัมลบ⁽²⁰⁾

(4) *Neopterin* เป็นโปรตีนที่พบในตัวของสิ่งมีชีวิต และนมผง บทบาททางสรีรวิทยาที่สำคัญคือ เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) เร่งให้เกิดการตายแบบ apoptosis ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในลักษณะ chain breaking antioxidant และประเด็นที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือ พบ neopterin ในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสและตรวจพบโปรตีนนี้ได้ในการแสดงเลือดและปัสสาวะ สันนิษฐานว่าเกิดมาจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งสันนิษฐานว่าจะนำโปรตีนชนิดนี้มาใช้เป็น marker หรือ indicator ของ malignant diseases บางชนิด⁽³⁴⁾

การแพ้และอาการแพ้

เนื่องจากนมผงมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบอยู่มาก ดังนั้นข้อควรระวังเป็นอย่างยิ่งในการบริโภคนมผงคือเรื่องของอาการแพ้ (allergic reaction) อุบัติการณ์ที่มีรายงานการพบค่อนข้างบ่อยมากของนมผงคือ การเกิดหลอดลมหดรัด (bronchospasm) และอาการหอบหืด (asthma) สันนิษฐานว่าการแพ้จะผ่านกลไกของ IgE-mediated hypersensitivity reaction⁽³⁵⁻⁴⁵⁾

ในทางตรงกันข้ามก็มีรายการด้านการแพ้ของนมผงไว้เช่นกัน พร้อมกับมีสมมุติฐานไว้ว่าการยับยั้งอาการแพ้ของนมผงผ่านทางกลไกของการลดการหลั่ง histamine จาก mast cell และลดปริมาณ antigen-specific IgE ในกระแสเลือด อาการของภาวะภูมิแพ้จึงดีขึ้น นอกจากนี้นมผงยังมีคุณสมบัติพิเศษในการเป็น immunomodulatory property โดยกระตุ้นการสังเคราะห์ antibody และเร่งกระบวนการของ immunocompetent cell proliferation⁽⁴⁶⁻⁴⁷⁾

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของนมผง

รายงานวิจัยเก่า ๆ มักมุ่งความสนใจไปที่ฤทธิ์ของสาร 10-hydroxy-2-decenoic acid และรายงานผลของนมผงจากสารนี้ไว้หลายประการเช่น มีฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด สามารถต้านสารกัมมันตรังสี และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾

ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกและเซลล์มะเร็งของนมผงนับว่าอยู่ในความสนใจของผู้บริโภคจำนวนมากนับแต่อดีตกาล งานวิจัยครั้งแรกที่รายงานความสามารถในการต้านเซลล์มะเร็งของนมผงเกิดขึ้นเมื่อประมาณ 40 ปีมาแล้ว ในปี

ค.ศ. 1959 Townsend และคณะทำการผสมนมผึ้งกับเซลล์มะเร็ง leukemia ก่อนที่จะปลูกลงในหนูทดลอง ผลปรากฏว่าสามารถหยุดยั้งการเจริญของเซลล์ leukemia หลังจากฉีดเข้าไปในหนูทดลองได้อย่างสมบูรณ์ ครั้นเมื่อทำการสกัดแยกนมผึ้งออกเป็นส่วน ๆ ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ กัน ก็พบว่าฤทธิ์การต้านมะเร็งน่าจะมาจากกรดไขมันที่ชื่อ 10-hydroxy-2-decenoic acid อย่างไรก็ตามมีรายงานสรุปไว้ว่าทั้งนมผึ้งและ 10-hydroxy-2-decenoic acid สามารถต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งหรือเซลล์เนื้องอกบางชนิดได้⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾

Tamura และคณะ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของนมผึ้งในการต้านการเจริญของเนื้องอกชนิดอื่นที่ปลูกถ่ายลงในหนูทดลอง เช่น Sarcoma-180 solid tumor พบว่าสามารถต้านการเจริญของเซลล์เนื้องอกได้ประมาณ 50 % รวมทั้งบางชนิดป้องกันการเจริญของเนื้องอกนี้ได้ประมาณ 50 % เช่นกัน⁽⁵²⁾ ขณะเดียวกันก็มีรายงานการวิจัยซึ่งทำในประเทศไทยในปี ค.ศ. 1998 ที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกลงในหนูทดลอง และพบว่านมผึ้งทำให้น้ำหนักของก้อนเนื้องอกลดลงได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม⁽⁵³⁾

ปัจจุบันการค้นคว้าวิจัยนมผึ้งมีความหลากหลายมากยิ่งขึ้นกว่าในอดีตและยังมีความเป็นวิทยาศาสตร์มากขึ้นด้วย ดังเช่นที่ในประเทศรัสเซียมีความพยายามนำนมผึ้งเข้ามาใช้กับผู้ป่วยหลายกลุ่ม เช่น ตา หู คอ จมูก⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁾ มีรายงานการนำ apitherapy โดยนำ apitherapeutic complex (คือ bee venom และผลผลิตอีกหลายชนิดจากผึ้งรวมทั้งนมผึ้ง) มาใช้กับผู้ป่วยโรคปอดเรื้อรังชนิด non-specific pulmonary diseases (ChNPD) ถึง 104 ราย พบว่าทำให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น สันนิษฐานว่าบทบาทนี้ของนมผึ้งผ่านกลไกการกระตุ้นต่อมหมวกไต⁽⁵⁶⁾ ในสหรัฐอเมริกามีการพยายามนำนมผึ้งมาใช้ร่วมกับอาหารเสริมสุขภาพชนิดอื่น ๆ เพื่อบำบัดอาการและทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วย chronic fatigue syndrome ดีขึ้น⁽⁵⁷⁾

คุณสมบัติเด่นอีกอย่างหนึ่งของนมผึ้งคือ การลดไขมันในหลอดเลือด ผู้ป่วยที่บริโภคนมผึ้งในขนาด 50-100 มิลลิกรัมต่อวัน จะช่วยลด cholesterol ในกระแสเลือดได้ 14 % และลดไขมัน (total serum lipid) ในเลือดได้ถึง 10 %⁽⁵⁸⁾ ในหนูทดลองก็พบว่านมผึ้งขนาด 700 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถลด cholesterol ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังเพิ่มปริมาณ high density lipoprotein (HDL) อีกด้วย⁽⁵⁹⁾

นอกจากนี้ นมผึ้งยังมีฤทธิ์ด้านการอักเสบและทำให้บาดแผลหายเร็วกว่าปกติ⁽⁶⁰⁾ เร่งการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของตัวอ่อนแมลงบางชนิด⁽⁶¹⁾ และยังช่วยในการเก็บรักษา (cryopreservative) ตัวอ่อนของหนู (mouse embryo)⁽⁶²⁻⁶³⁾

ฤทธิ์อื่นไม่พึงประสงค์ของนมผึ้ง

อาการแพ้เป็นฤทธิ์อื่นไม่พึงประสงค์หลักของนมผึ้ง นอกจากอาการแพ้แล้ว ยังมีรายงานบางฉบับกล่าวถึงพิษของนมผึ้งไว้แต่นี้น้อยมากเช่น การมีเลือดออกจากอาการลำไส้ใหญ่อักเสบ (haemorrhagic colitis)⁽⁶⁴⁾ กระเพาะอาหารและลำไส้เล็กอักเสบ (gastroenteritis)⁽⁶⁵⁾ เป็นต้น

ข้อคิดในการใช้นมผึ้ง

นมผึ้งยังคงเป็นอาหารเสริมที่มีอยู่ในท้องตลาดประเทศไทย และมีผู้นิยมบริโภคกันมาก ก่อนอื่นต้องทำความเข้าใจกันเสียก่อนว่านมผึ้งมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบอยู่พอสมควร และการรับประทานโปรตีนหรือหาพิวด้วยผลิตภัณฑ์ใด ๆ ก็ตามที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบอาจก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ ดังนั้นผู้บริโภคบางรายจึงอาจเกิดการแพ้ได้ ปฏิกริยาตอบสนองต่อการแพ้จะรุนแรงแตกต่างกันออกไปแล้วแต่บุคคล มีตั้งแต่เพียงผื่นคัน หรือมากขึ้นเรื่อย ๆ ไปจนถึงหลอดลมหดและเกิดการช็อกได้ รายงานการเสียชีวิตของผู้ป่วยเกิดจากการใช้ผลิตภัณฑ์นมผึ้งชนิดฉีด การรับประทานไม่ทำให้เกิดอาการแพ้ที่รุนแรงหรือแก้ไขไม่ได้ แต่หากมองโดยภาพรวมก็ถือว่ามีความเสี่ยงต่ำมาก สำหรับรายงานความเป็นพิษในด้านอื่นถือว่าน้อยมาก ๆ

รายงานวิจัยบางฉบับกล่าวถึงการที่นมผึ้งอาจเป็นบ่อเกิดหรือสาเหตุของโรคที่ติดมากับผึ้ง แต่ก็ถือได้ว่าไม่น่าจะเป็นสิ่งที่ต้องกังวลเท่าใดนัก เนื่องจากคุณสมบัติของนมผึ้งเองสามารถฆ่าเชื้อโรคได้อยู่แล้ว และยังไม่เคยมีรายงานการติดเชื้อในลักษณะที่มาจากผึ้งเลย⁽⁶⁶⁻⁶⁷⁾

การบริโภคนมผึ้งด้วยวิธีรับประทานในขนาดไม่มากนัก เช่น ครั้งละ 1-2 แคปซูล (แคปซูลละประมาณ 350 มิลลิกรัม) วันละ 1-2 ครั้ง จึงน่าจะปลอดภัยในระดับหนึ่ง หากเกิดอาการแพ้ให้หยุดรับประทานทันที สำหรับผู้ที่มีโรคประจำตัวอยู่ (โดยเฉพาะอาการภูมิแพ้) ควรต้องระมัดระวังการบริโภคนมผึ้งมากกว่าปกติ หากมีความประสงค์

จะรับประทานนมผงจริง ๆ ก็ควรจะเริ่มต้นจากขนาดต่ำ ๆ ก่อน เช่น วันละ 1 แคปซูล เป็นต้น

การตรวจสอบความปราศจากเชื้อของเซลล์

เซลล์ที่จะนำมาใช้ในการวิจัยจำเป็นต้องมีการทดสอบความปราศจากเชื้อของเซลล์เสียก่อน เพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์นั้นสะอาดและปราศจากการติดเชื้อใด ๆ จริง ไม่มีการปนเปื้อน (contamination) ของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผลการวิจัยที่ได้จึงจะน่าเชื่อถือ

เซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงกันโดยทั่วไปสามารถเกิดการติดเชื้อได้หลายประเภท เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และที่สำคัญคือ mycoplasma mycoplasma เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อที่ก่อให้เกิดผลเสียอย่างรุนแรงในระดับเซลล์มากมาย ที่สำคัญได้แก่ การยับยั้งการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ทำให้โครโมโซมแตกหัก (chromosome aberration) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงลักษณะการติดเชื้อไวรัส จึงมีความจำเป็นต้องทดสอบการติดเชื้อ mycoplasma ก่อนที่จะนำเซลล์ไปใช้ในการวิจัยต่าง ๆ ⁽⁶⁸⁻⁷¹⁾

การตรวจเชื้อ mycoplasma มีได้หลายวิธี เช่น การใช้เทคนิค radioisotopic, เอนไซม์, DNA fluorescence stain, immunofluorescence, uridine/uracil ratio, การ cultivation บน agar และเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เป็นต้น ในแต่ละเทคนิคก็จะมีข้อจำกัดต่าง ๆ กัน เช่น การ cultivation บน agar ต้องใช้เวลานานและไม่สามารถตรวจสอบเชื้อบางตัวที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อ เช่น *M. hyorhinis* ได้ เทคนิค DNA fluorescence staining ก็ไม่สามารถตรวจพบเชื้อบางชนิดได้เช่นกัน และต้องใช้เครื่องมือพิเศษที่จำเป็นต้องมีผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางอีกด้วย ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคบางอย่างมาใช้สะดวกมากขึ้นได้แก่ MycoTect assay ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้เครื่องมือยุ่งยาก ไม่ต้องมีผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทาง และสามารถตรวจเชื้อที่ครอบคลุมเชื้อที่พบได้บ่อยในการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเฉพาะเชื้อ mycoplasma รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียและไวรัสส่วนใหญ่ได้อีกด้วย ⁽⁷²⁻⁷⁶⁾

หลักการของ MycoTect assay อาศัยคุณสมบัติของ mycoplasma ที่มีเอนไซม์สำคัญคือ adenosine phosphotrylase (AP) ซึ่งจะพบได้ยากมากในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เอนไซม์ AP ทำหน้าที่เปลี่ยน substrate คือ 6-methylpurine deoxyriboside

(6-MPDR) ซึ่งเป็นสาร analog ของ adenosine ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ไปเป็นสารสองชนิดคือ 6-methylpurine และ 6-methylpurine riboside ที่เป็นพิษต่อเซลล์และทำให้เซลล์ตาย ดังนั้นเทคนิคของ MycoTect assay จึงเริ่มต้นที่การเลี้ยง mycoplasma-free indicator cell line คือ 3T3 cell ใน 24-well plate กับอาหารเลี้ยงเซลล์ตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ต่อจากนั้น 24 ชั่วโมงจะเติมสาร substrate 6-MPDR หลังจากนั้น 3 วันจะย้อมสี indicator cell ด้วย crystal violet⁽⁷⁶⁻⁸¹⁾

การแปลผลหลังการย้อมสี crystal violet จึงใช้วิธีสังเกตการติดสีม่วง หากเซลล์ติดสีม่วงที่พื้น well อย่างสม่ำเสมอหมายความว่า เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ตามปกติ นั่นคือไม่มีการติดเชื้อ mycoplasma หาก well ติดสีม่วงไม่สม่ำเสมอหรือติดสีจางมากหรือน้อยมาก แสดงว่ามีการติดเชื้อ mycoplasma เกิดขึ้น ทำให้เซลล์บางเซลล์จะตายไปจึงไม่มีการติดสีม่วง การตายของเซลล์เกิดจากการเอนไซม์ AP ใน mycoplasma เปลี่ยนสาร substrate 6-MPDR เป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์คือ 6-methylpurine และ 6-methylpurine riboside สำหรับ negative control ควรจะเป็นชั้น monolayer ที่เป็นแผ่นต่อเนื่องกันตลอดพื้น well และ positive control ควรติดสีม่วงจางมากหรือไม่สม่ำเสมอ⁽⁷⁶⁻⁸¹⁾

วิธีนี้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ mycoplasma ได้ถึง 97.7 % ของ mycoplasma ที่พบได้บ่อยในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่น *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini*, *A. laidlawii*, *M. fermentans*, *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. buccale*, *S. mirum* และ *M. pirum* ผลจากการทดสอบความสามารถในการทดสอบ mycoplasma อยู่ในระดับเดียวกับ conventional method อื่น ๆ ที่ใช้กันมาแต่เดิม เช่น DNA fluoresconce method (คือ Hoechst stain) รวมทั้งยังมีประสิทธิภาพดีกว่าอีกหลาย ๆ วิธีอีกด้วย⁽⁷²⁻⁷⁶⁾

ข้อควรระวังในการทำ MycoTect assay คือ (1) อาหารเลี้ยงเซลล์และ serum ที่ใช้ในการเลี้ยง indicator cell จะต้องปราศจากการติดเชื้อจาก mycoplasma (2) ยาปฏิชีวนะที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์อาจทำให้เกิด false negative เนื่องจากยาปฏิชีวนะไปยับยั้งการเจริญของ mycoplasma ได้⁽⁷⁶⁻⁸¹⁾

ยาปฏิชีวนะที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์มีวัตถุประสงค์มิให้อาหารเลี้ยงเซลล์เกิดติดเชื้อ ในกรณีมีเทคนิคการทำที่ปราศจากเชื้อเป็นอย่างดีและโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื่อน้อยก็ไม่จำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งถือเป็นการดี แต่หากจะใส่ยาปฏิชีวนะลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ก็ไม่ผิดแต่อย่างใด ยังคงอยู่ในเกณฑ์ที่การวิจัยทั่วไปรับได้ สำหรับ

ประเทศไทยมีอากาศร้อนชื้นซึ่งเหมาะต่อการติดเชื้อในอาหารเลี้ยงเซลล์ คณะผู้วิจัยจึงเห็นควรใส่ยาปฏิชีวนะลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา โดยใส่ในขนาดต่ำสุดเท่าที่เป็นไปได้ สาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่งที่ค่อนข้างจำเป็น ต้องใส่ยาปฏิชีวนะก็คืออุปกรณ์การเลี้ยงเซลล์ก็คือ ตู้ laminar air flow และตู้บคาร์บอนไดออกไซด์เป็นครุภัณฑ์ที่ใช้ร่วมกันหลายคนหลายโครงการวิจัย จึงสมควรต้องป้องกันการติดเชื้อไว้ก่อน

Sulforhodamine (SRB) method

Sulforhodamine B (SRB) เป็นสี anionic dye ประเภท aminoxanthene dye ที่ให้สีชมพูเมื่อจับกับโปรตีน จึงใช้ในการย้อมสีโปรตีนของเซลล์ได้เช่นเดียวกับ Coomassie brilliant blue, bromophenol blue และ naphthol yellow S ผลจากการทดลองใช้สีหลาย ๆ ชนิดมาย้อมโปรตีนภายในเซลล์เพื่อศึกษา cytotoxicity พบว่า SRB มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดคือ ให้สีเข้มชัดเจน มี signal-to-noise ratio สูง ใช้เวลาในการทดลองไม่นาน ในปัจจุบันนิยมนำ SRB มาใช้ย้อมสีโปรตีนเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารต่าง ๆ กันมาก⁽⁸²⁻⁹⁰⁾

กระบวนการย้อมสีโปรตีนด้วย SRB เริ่มต้นด้วยการตรึง (fix) เซลล์ด้วย trichloroacetic acid ก่อน แล้วจึงย้อมสีด้วย SRB SRB จะจับกับโปรตีนของเซลล์ให้สีชมพูเข้ม สีชมพูเข้มบ่งบอกให้ทราบว่าโปรตีนของเซลล์อยู่ในสภาพดี แสดงว่าเซลล์นั้นยังอยู่ในสภาพที่ทำหน้าที่ได้ตามปกติ หากเซลล์ตายไปแล้วด้วยฤทธิ์จากสารทดสอบ (เช่น สารสมุนไพร หรือ ยา เป็นต้น) ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะปรากฏเป็นสีชมพูจาง ๆ หรือไม่ปรากฏสีชมพูให้เห็นเพราะโปรตีนภายในเซลล์เสื่อมสภาพ (denature) ไปหมดแล้ว⁽⁹¹⁾

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ใช้ในการวิจัยนี้คือ เซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell line) ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เซลล์ไคลิงปกติ (Vero cell) เซลล์มะเร็งเต้านม (BCA 474 cell) เซลล์มะเร็ง melanoma (A 375 cell) เซลล์มะเร็งตับ (Hepatoma G2) เซลล์มะเร็งปอด (Chago cell) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW cell) เซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB cell) และ เซลล์ fibroblast (3T3 cell)

นมผึ้งในโครงการวิจัยนี้ได้มาจากการนำนมผึ้งสดมาทำให้แห้งด้วยความเย็นโดยผ่านกระบวนการ freeze-dried แล้วเก็บในช่องแช่แข็ง (freezer) จนกว่าจะต้องการใช้ วิธีการนี้จะทำให้ส่วนของน้ำในนมผึ้งลดหายไปประมาณสองในสามและได้นมผึ้งในรูปแบบผงแห้งที่มีความคงตัวสูง

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการของภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23, กรุงเทพฯ 10110

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

กุมภาพันธ์ 2543 - พฤษภาคม 2544

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
เครื่องนึ่งปราศจากเชื้อ (autoclave)
เครื่องประมวลผล (microcomputer)
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)
เครื่องระเหยแห้งด้วยความเย็น (freeze-drier)
เครื่องปั่นผสม (vortex)

ตู้ปราศจากเชื้อ (laminar airflow hood)
 ตู้บคาร์บอนไดออกไซด์ควบคุมอุณหภูมิ (carbondioxide incubator)
 กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope)
 อ่างน้ำชนิดควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
 ปัมสุญญากาศ (vacuum pump)
 เครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (rotatory vacuum evaporator)
 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบไหลวน (circulating pump)

วัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

autopipette ขนาดต่าง ๆ
 pipette tip ขนาดต่าง ๆ
 pipette tip rack
 eppendorf tube
 eppendorf tube rack
 glass test tube
 glass test tube with screw cap
 test tube rack
 quartz cuvette
 ขวดแก้ว (Duran) ขนาดต่าง ๆ
 autoclaved tape
 aluminium foil
 24-well tissue cultured plate
 96-well tissue cultured plate
 tissue cultured petridish
 tissue cultured flask

สารเคมี

นมผึ้ง

ethanol, (Merck)

chloroform, (Merck)

hexane, (Merck)

sodium chloride, (Merck)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), (Gibco)

Minimum Essential Medium (MEM), (Gibco)

RPMI 1640, (Gibco)

fetal bovine serum (FBS), (Gibco)

sodium bicarbonate, (Merck)

pen G sodium, (Gibco)

streptomycin, (Gibco)

ellipticine, (Sigma)

doxorubicin, (Sigma)

sodium hydroxide, (Merck)

sulforhodamine B (SRB), (Sigma)

trichloroacetic acid, (Merck)

tris buffer, (Merck)

5 % gas carbondioxide, (TIG)

formaldehyde, (Merck)

adenine phosphorylase (AP), (Gibco)

6-methylpurine deoxyriboside (6-MPDR), (Gibco)

crystal violet, (Merck)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดนมผึ้ง สกัดนมผึ้งด้วยตัวทำละลาย (solvent) ต่าง ๆ 4 ชนิด คือ น้ำ ethanol chloroform และ hexane ดังต่อไปนี้

1.1 การสกัดด้วย ethanol chloroform และ hexane เป็นการสกัดนมผึ้งด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่าง ๆ กันดังนี้

1.1.1 นำนมผึ้งที่บดละเอียด 100 กรัมใส่ใน volumetric flask (ชนิดจุกแก้ว) ขนาด 2 ลิตร เติม hexane ประมาณ 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทุก ๆ 15-20 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองแยก hexane filtrate ไปเก็บไว้ นำกากไปแช่ต่อใน hexane อีกครั้งหนึ่งเขย่าให้เข้ากันทุก ๆ 15-20 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองแยก hexane filtrate ไปเก็บรวมไว้กับของเดิม นำกากไปแช่ใน hexane ต่อไป ทำเช่นนี้นานประมาณ 3 วัน (หากกรอง filtrate ในตอนเย็นให้นำกากไปแช่ใน hexane ใหม่ค้างคืนในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ. และกรองแยก hexane filtrate ในเวลาเช้า) เก็บรวบรวม hexane filtrate ทั้งหมดไประเหยแห้งในเครื่อง rotatory evaporator จะได้ hexane extract ที่มีลักษณะคล้ายไข-มันเป็นก้อน ๆ สีขาวเหลือง หนักประมาณ 3.5 กรัม นำกากไปใช้ในข้อ 1.1.2

1.1.2 นำกากนมผึ้งในข้อ 1.1.1 มาแช่ใน chloroform ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.1.1 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายจาก hexane เป็น chloroform หลังจากนำ chloroform filtrate ทั้งหมดไประเหยแห้งในเครื่อง rotatory evaporator จะได้ chloroform extract ที่มีลักษณะขุ่นหนืดสีเหลืองเข้มคล้ำเล็กน้อย หนักประมาณ 18 กรัม นำกากส่วนนี้ไปใช้ในข้อ 1.1.3

1.1.3 นำกากนมผึ้งในข้อ 1.1.2 มาแช่ใน ethanol ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.1.1 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายจาก hexane เป็น ethanol หลังจากนำ ethanol filtrate ทั้งหมดไประเหยแห้งในเครื่อง rotatory evaporator จะได้ ethanol extract ที่มีลักษณะขุ่นหนืดสีเหลืองเข้มคล้ำเล็กน้อย หนักประมาณ 20 กรัม

1.2 การสกัดด้วยน้ำ นำนมผึ้งใหม่ 100 กรัมมาละลายน้ำ 1 ลิตร กรองผ่านกระดาษกรองธรรมดา แล้วนำ filtrate ที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยความเย็นโดยการผ่านเครื่อง freeze-drier จะได้ผงสีเหลืองอ่อนลักษณะร่วนที่ละลายน้ำได้ดี หนักประมาณ 15 กรัม

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์ในโครงการวิจัยนี้มี 3 ชนิด คือ RPMI 1640 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) และ Minimum Eagle Medium (MEM) แต่ละชนิดมีลักษณะเป็นอาหารผงแห้งกึ่งสำเร็จรูป จำหน่ายเป็นซอง แต่ละซองสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ 1 ลิตร การเตรียมเป็นไปในลักษณะเดียวกันคือ เทผสมผงอาหารลงในน้ำกลั่นสำหรับเตรียมยาฉีด (sterile water for injection) ละลายให้เข้ากันดี เติมยาปฏิชีวนะ penicillin 50,000 unit และ streptomycin 100 มิลลิกรัม ปรับ pH เป็น 7.2 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

ต่อจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทำให้ปราศจากเชื้อ โดยการกรองผ่านชุดกรองปราศจากเชื้อที่มีกระดาษกรองชนิด cellulose acetate ขนาด pore size 0.22 ไมครอน เฉพาะขั้นตอนการกรองนี้จะต้องทำใน laminar air flow hood เพื่อให้อาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ในสภาวะปราศจากเชื้อ และทุกครั้งที่เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์จะต้องแบ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ประมาณ 3-5 มิลลิลิตรใส่ในขวดปราศจากเชื้อ (tissue cultured flask) หรือ plate ปราศจากเชื้อ (tissue cultured petridish) ขนาดเล็ก แล้วนำไปอบในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 37 °C. นานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง หากไม่มีการติดเชื้อจึงจะนำอาหารเลี้ยงเซลล์นั้นไปใช้เลี้ยงเซลล์ได้ สิ่งที่ต้องระวังว่าอาหารเลี้ยงเซลล์เกิดการติดเชื้อคืออาหารเลี้ยงเซลล์ขุ่น เมื่อนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นแบคทีเรียแปลกปลอมเต็มไปหมด

อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อที่เตรียมได้นี้จะนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C. เมื่อต้องการใช้จึงจะเติม fetal bovine serum ให้มี % ตามที่ต้องการ

3. เซลล์ โครงการวิจัยใช้เซลล์ปกติ 2 ชนิดและเซลล์มะเร็งจำนวน 6 ชนิด มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ คือ

3.1 เซลล์มะเร็งเต้านม (BCA cell) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Medium (MEM) ที่มี 5 % fetal bovine serum

3.2 เซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB cell) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) ที่มี 5 % fetal bovine serum

3.3 เซลล์มะเร็งตับ (Hepatoma G2 cell) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 5 % fetal bovine serum

3.4 เซลล์มะเร็งปอด (*Chago cell*) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 5 % fetal bovine serum

3.5 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (*SW cell*) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 5 % fetal bovine serum

3.6 เซลล์มะเร็ง *melanoma* (*A 375 cell*) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 5 % fetal bovine serum

3.7 เซลล์ไตลิงปกติ (*Vero cell*) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Medium (MEM) ที่มี 5 % fetal bovine serum

3.8 เซลล์ *fibroblast* จากหนู (*3T3 cell*) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco modified Eagle's Medium (DMEM) ที่มี 10 % fetal bovine serum

เซลล์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการต้องเลี้ยงอย่างน้อย 3 passages จึงจะนำไปทำการทดลองต่าง ๆ ได้ ปกติจะเลี้ยงเซลล์ใน tissue cultured petridish ขนาดผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร การ passages เซลล์ทำได้โดยล้างผิวหน้าเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS) ก่อน เติม sterile trypsin solution (0.05 % trypsin และ 0.01 % EDTA ใน PBS) 1.5 มิลลิลิตร อบเซลล์ในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ 3 นาที ดูดเซลล์ที่ร่อนหลุดจากพื้น plate และกระจายตัวใน trypsin solution ออกมาใส่ sterile centrifuge tube ขนาด 10 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ที่ติด plate ออกมาด้วย PBS เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 5 % fetal bovine serum 5 มิลลิลิตรลงใน centrifuge tube เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ trypsin นำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูด supernatant ทิ้งไป เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 5 % fetal bovine serum แล้วแบ่งลงใน tissue cultured petri-dish อันใหม่ อาจทิ้งเซลล์ไปบ้างหากเซลล์มีมากเกินไป ที่สำคัญคือกระบวนการทั้งหมด (ยกเว้นการปั่น) ต้องทำใน laminar airflow hood เพื่อให้เซลล์ passage ต่อไปยังอยู่ในสภาพที่ปราศจากเชื้อ

4. การเตรียมสารละลายและสารสกัดจากนมผึ้ง

4.1 การเตรียมสารละลายนมผึ้งและสารสกัดจากนมผึ้ง นำนมผึ้งในรูปผง freeze-dried แห้งหรือสารสกัดจาก hexane chloroform และ ethanol แต่ละชนิดมาละลายใน dimethylsulfoxide (DMSO) ก่อน ต่อจากนั้นจึงทำการเจือจางด้วย 10 %

DMSO ในน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้น 10, 100, 200, 300 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ต้องระวังมิให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์สูงเกิน 0.5 % DMSO และต้องใช้ 10 % DMSO เป็น control เพื่อยืนยันว่า 10 % DMSO ไม่มีผลบดเบียน cytotoxicity ของสารสมุนไพรต่อเซลล์ชนิดต่าง ๆ

4.2 การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำของนมผึ้ง นำผงแห้งนมผึ้งในข้อ 1.2 มาละลายน้ำ จะให้สารละลายที่ไม่ข้นหนืดมากนัก และเตรียมสารสกัดที่มีความเข้มข้น 10, 100, 200, 300, 500 และ 700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5. การตรวจสอบความปราศจากเชื้อของเซลล์ ในโครงการวิจัยนี้ใช้วิธีที่พัฒนาให้สะดวกและรวดเร็วที่เรียกว่า MycoTect assay ขั้นตอนการตรวจสอบคือ

5.1 การเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบ การทดสอบว่าเซลล์ได้มีการติดเชื้อ mycoplasma หรือไม่ จะต้องนำเซลล์นั้นมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 passage ก่อนการตรวจสอบ วิธีเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ทำได้โดยหลังจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากยาปฏิชีวนะผ่านไป 2 passage แล้ว ให้เลี้ยงเซลล์ไปประมาณ 3-4 วัน คุณเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ 1.0 มิลลิลิตร มาเป็นตัวอย่างทดสอบ พยายามอย่าให้มีเซลล์ติดมาในอาหารเลี้ยงเซลล์มากนัก ไม่ควรเกิน 100-1,000 เซลล์ หากจำเป็นให้กำจัดเซลล์ที่ปนมาด้วยการปั่นที่ 750 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้ควรนำมาทำการทดสอบ mycoplasma ในวันเดียวกัน หรือหากจำเป็นต้องทดสอบในรุ่งขึ้นก็อาจเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ +2 ถึง +8 °ซ. แต่หากต้องเก็บไว้นานควรเก็บในช่องแช่แข็งที่ -5 ถึง -20 °ซ.

5.2 MycoTect assay ก่อนการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ตัวอย่างมาทำการทดสอบ จะต้องเลี้ยงเซลล์ indicator cell ซึ่งในที่นี้ใช้ 3T3 cell ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี 10 % fetal bovine serum และปราศจากยาปฏิชีวนะใน 24-well plate เสียก่อน โดยแต่ละ well ควรมีเซลล์ประมาณ 3×10^4 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 1.5 มิลลิลิตร นำ 24-well plate ไปเข้าตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ทิ้งไว้ให้เซลล์เกาะติดพื้น well ประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วเติมสารต่าง ๆ ดังนี้

- negative control well ที่ 19, 20 และ 21 เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 0.2 มิลลิลิตร

well ที่ 7 และ 13 เติมเฉพาะเอนไซม์ AP 1 มิลลิโมลาร์ (ใน PBS) จำนวน 200 ไมโครลิตร

well ที่ 8 และ 14 (เติมเฉพาะ substrate คือ 6-MPDR 1 มิลลิโมลาร์ (ใน PBS) จำนวน 50 ไมโครลิตร ภายหลังเข้าตู้อบแล้ว 24 ชั่วโมง)

- positive control คือ well ที่ 9 และ 15 เติมเฉพาะเอนไซม์ AP 1 มิลลิโมลาร์ (ใน PBS) จำนวน 200 ไมโครลิตร (แล้วเติมเฉพาะ substrate คือ 6-MPDR 1 มิลลิโมลาร์ (ใน PBS) จำนวน 50 ไมโครลิตร ภายหลังเข้าตู้อบแล้ว 24 ชั่วโมง)

- unknown sample คือ well ที่ 1-3, 4-6, 10-12, 16-18 และ 22-24 เติมตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ที่เก็บมาจากเซลล์ที่ต้องการทดสอบว่าติดเชื้อ mycoplasma หรือไม่ (โดย 2 well แรกของแต่ละตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์คือ 1-2, 4-5, 10-11, 16-17 และ 22-23 ใส่สาร substrate คือ 6-MPDR จำนวน 50 ไมโครลิตร ภายหลังเข้าตู้อบแล้ว 24 ชั่วโมง)

นำ 24-well plate ไปเข้าตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากเข้าตู้อบ 24 ชั่วโมง เติม 1 มิลลิโมลาร์ 6-MPDR จำนวน 50 ไมโครลิตรลงใน well หมายเลข 8, 14, 9, 15, 1-2, 4-5, 10-11, 16-17 และ 22-23 แล้วนำ 24-well plate กลับไปเข้าตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 37 °ซ. ต่ออีก 72-96 ชั่วโมง จนเซลล์ใน negative control well เจริญมาติดกันดี (confluent) ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากทุก well ให้หมด ระวังอย่าไปรบกวนชั้น monolayer ของเซลล์ 3T3 เติม 0.2 % crystal violet (ใน 10 % phosphate buffer formalin) จนเกือบเต็ม well ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ดูสารละลาย crystal violet ออก ล้าง well ด้วยน้ำกลั่น จนน้ำล้าง wellใสสะอาดดี

6. การเตรียมเซลล์ในนมผึ้งและสารสกัดจากนมผึ้ง นำเซลล์แต่ละชนิดมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติก่อนทำการวิจัยอย่างน้อย 1 สัปดาห์ หรือ 3 passages แต่ละ

well มีเซลล์ประมาณ 1×10^3 เซลล์ในปริมาตร 190 ไมโครลิตร เติมน้ำละลายนมผงหรือสารสกัดจากนมผงในข้อ 4.1 และ 4.2 จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงในเซลล์ (cell suspension) ที่เพิ่งใส่ใน well เลย ออบเซลล์ในตู้อบ (CO_2 incubator) ที่ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจึงนำเซลล์ไปผ่านกระบวนการย้อมสีด้วย SRB

7. การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง อาศัยการย้อมสีโปรตีนภายในเซลล์ด้วยวิธี sulforhodamine B (SRB) method เริ่มจากการนำ 96-microwell plate มาตรึงเซลล์ด้วยการเติม 50 % trichloroacetic acid 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 60 นาที ล้างออกด้วยน้ำ 5 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง เติม 0.4 % (wt/vol) sulforhodamine B (ที่ละลายใน 1 % acetic acid) 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างสีที่มีได้ทำปฏิกิริยา (unbound dye) ออกด้วย 1 % acetic acid 4 ครั้ง เปิด plate ทิ้งให้แห้งสนิท แล้วละลายสี (ส่วน bound dye) ด้วย 10 มิลลิโมลลาร์ tris base pH 10.5 เขย่าให้เข้ากันดีเป็นเวลา 5 นาที นำมาอ่านผลการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (microplate reader) ที่ 564 นาโนเมตร ทั้งนี้ในการตรวจสอบแต่ละครั้งจะต้องมีการย้อมสีเซลล์ 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

7.1 *zero day control* คือ well ที่จะต้องย้อม SRB method โดยไม่ต้องใส่ตู้อบ (ดังข้อ 6) ที่ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพียงอบในตู้อบที่ 37°C เพื่อบริหารให้เซลล์เกาะติดพื้น well ประมาณ 3 ชั่วโมงก็นำไปย้อมสีได้เลย

7.2 *negative control* คือ well ที่มี 10 % DMSO อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยไม่มีนมผงหรือสารสกัดจากนมผงอยู่เลย และจะย้อม SRB method หลังจากอบเซลล์ในตู้อบ (ดังข้อ 6) ที่ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

7.3 *positive control* คือ ellipticine ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ doxorubicin 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.625 และ 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจะย้อม SRB method หลังจากอบเซลล์ในตู้อบ (ดังข้อ 6) ที่ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

7.4 *sample* คือ well ที่เติมนมผงหรือสารสกัดจากนมผง และนำไปย้อม SRB method หลังจากอบเซลล์ในตู้อบ (ดังข้อ 6) ที่ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับนมผงและสารสกัดจากนมผงทุก fraction จะทำซ้ำ 5 ครั้ง ในแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

8. การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ นำเซลล์ปกติมาศึกษาด้วยวิธี sulforhodamine B (เช่นเดียวกับข้อ 7 ที่ศึกษาในมะเร็งชนิดต่าง ๆ) ในเซลล์ไตลิงปกติ และแปรขนาดของนมผึ้งในลักษณะเดียวกันคือ ตั้งแต่ต่ำสุดประมาณ 10 ไปจนถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี zero day control, negative control, positive control และ sample เช่นเดียวกันกับในข้อ 7



ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การสกัดนมผึ้ง

สารสกัดนมผึ้งส่วน hexane ให้สารที่ลักษณะคล้ายก้อนไขมันสีขาวเหลือง ส่วนอีก 2 fraction คือ สารสกัด ethanol และสารสกัด chloroform มีลักษณะขุ่นหนืดสีเหลือง ขุ่นคล้ายเล็กน้อย ทั้งนี้สารสกัดในส่วนของ hexane จะมีปริมาณน้อยกว่าสารสกัดในส่วนอื่น ๆ มาก

ปกติการสกัดจะใช้น้ำหรือ ethanol เพียงชนิดเดียวเท่านั้นเพราะสารทำละลายทั้งสองมี polarity ใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจาก ethanol extract มีความขุ่นหนืดสูง การนำไปใช้จะมีปัญหาในเรื่องความข้นของอาหารเลี้ยงเซลล์ คณะผู้วิจัยจึงทำการสกัดนมผึ้งด้วยน้ำเพียงอย่างเดียว ให้สารสกัดเป็นของแข็งลักษณะร่วนสีเหลืองอ่อน ๆ และสามารถลดปัญหาเรื่องความหนืดในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำให้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดได้จากนมผึ้งความเข้มข้นสูงขึ้นได้

การตรวจสอบความปราศจากเชื้อของเซลล์

วิธีการตรวจสอบการปราศจากเชื้อจะต้องนำเซลล์ที่ต้องการตรวจสอบมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 สัปดาห์ (หรือ ผ่านการ passage มาแล้วในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ครั้ง) ก่อนทำการทดสอบ แล้วเก็บเฉพาะส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 2 มิลลิลิตร ใน plate เลี้ยงเซลล์มาเป็นตัวอย่างในการทดสอบ สาเหตุที่ต้องใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากยาปฏิชีวนะก็เนื่องจากการให้เชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่อาจมีอยู่แสดงตัวออกมาได้อย่างเต็มที่

ในการทดสอบแต่ละครั้ง 24-well plate 1 อันสามารถวิเคราะห์ได้ 5 ตัวอย่าง สำหรับภาพ 1 เป็นตัวอย่าง 24-well plate ที่มีการทดสอบดังนี้

- | | |
|--------------------|--|
| - well 1, 2 และ 3 | ใส่ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์มะเร็งตับ |
| well 4, 5 และ 6 | ใส่ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์มะเร็งปอด |
| well 10, 11 และ 12 | ใส่ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์มะเร็งเต้านม |
| well 16, 17 และ 18 | ใส่ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ |
| well 22, 23 และ 24 | ใส่ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์มะเร็ง melanoma |

โดย 2 well แรกของแต่ละตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์คือ 1-2, 4-5, 10-11, 16-17 และ 22-23 ใส่สาร substrate คือ 6-MPDR ดังนั้นหากตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์มีการติดเชื้อมีเอนไซม์ AP ไปเปลี่ยน substrate 6-MPDR เป็น 6-methylpurine และ 6-methylpurine riboside ที่เป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์จะตายไป เมื่อย้อมสี crystal violet well ก็จะไม่ติดสีม่วงเข้ม แต่ผลการตรวจสอบปรากฏว่า well เหล่านี้ติดสีม่วงเข้มชัดเจน แสดงว่าในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่มีการติดเชื้อ

ใน well สุดท้ายของตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดคือ 3, 6, 12, 18 และ 24 จะไม่เติม substrate 6-MPDR ดังนั้นแม้ว่าจะมีหรือไม่มีการติดเชื้อ well เหล่านี้ก็ต้องย้อมติดสีม่วงเข้ม เนื่องจากไม่มี substrate ก็จะไม่เกิด 6-methylpurine และ 6-methylpurine riboside ที่เป็นพิษต่อเซลล์

- well 7 และ 13 เติมเฉพาะเอนไซม์ AP ดังนั้น well นี้ไม่มี substrate ก็จะไม่เกิด 6-methylpurine และ 6-methylpurine riboside ที่เป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์ก็ไม่เป็นอันตรายคือยังคงติดสีม่วงเข้ม

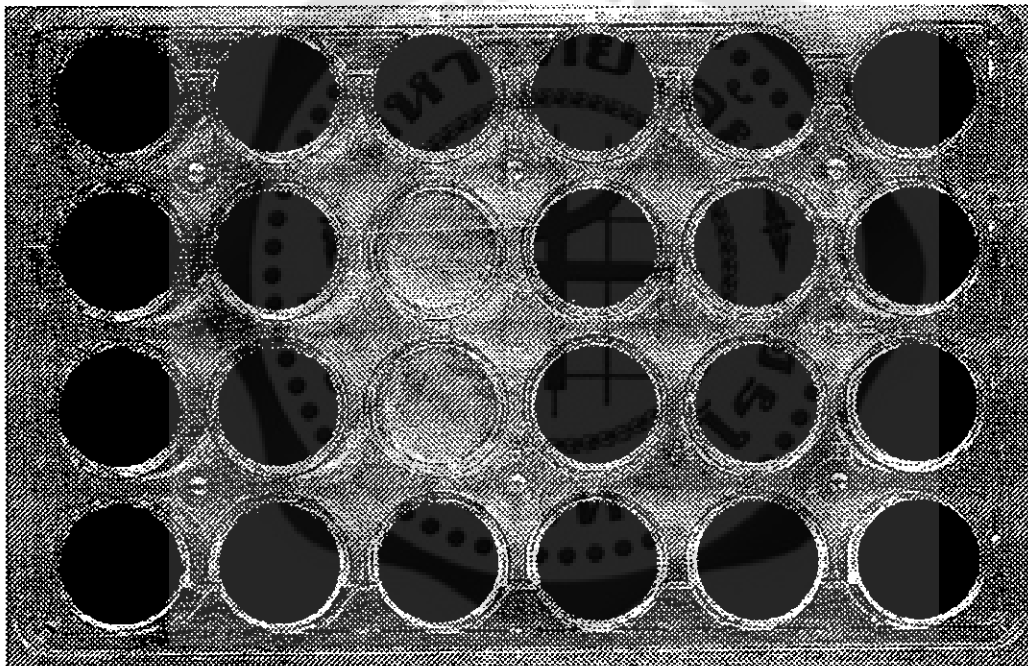
- well 8 และ 14 เติมเฉพาะ substrate 6-MPDR ดังนั้น well นี้ไม่มีเอนไซม์ ก็จะไม่เกิด 6-methylpurine และ 6-methylpurine riboside ที่เป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์จึงยังคงติดสีม่วงเข้ม

- well 9 และ 15 จะเติมทั้ง substrate 6-MPDR และเอนไซม์ AP ดังนั้น well นี้ก็จะเกิด 6-methylpurine และ 6-methylpurine riboside ที่เป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์ตายและไม่ติดสีม่วงหลังการย้อม well นี้มีวัตถุประสงค์ทำเป็น positive control

- well 19, 20 และ 21 เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ธรรมดาที่ใช้เลี้ยง 3T3 cell จึงไม่ควรเกิด 6-methylpurine และ 6-methylpurine riboside ที่เป็นพิษต่อเซลล์ พื้น well ควรย้อมติดสีม่วงเข้ม well นี้มีวัตถุประสงค์ทำเป็น negative control

ผลจากภาพ 1 แสดงให้เห็นว่า negative control ให้ผลเป็นลบคือติดสีม่วงเข้มสำหรับ positive control ให้ผลเป็นบวกคือติดสีม่วงใส ตรงกับที่ควรจะเป็น แสดงว่าระบบดังกล่าวสามารถทำนายการติดเชื้อของตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่จะนำมาทดสอบได้ ส่วน well 3, 6, 12, 18, 24 ก็ให้ผลลบคือติดสีม่วงเข้มตามที่ควรจะเป็น ดังนั้นการที่ well 1, 2, 4, 5, 10, 11, 16, 17, 22 และ 23 ให้ผลลบ แสดงว่าตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่นำมาทดสอบปราศจากการติดเชื้อจริง

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24



ภาพ 1 ภาพตัวอย่างของ 24-well plate ที่แสดงผลการทดสอบความปราศจากเชื้อของเซลล์ เพื่อศึกษาว่าเซลล์ที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการปลอดจากการติดเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียหรือไม่

ภาพบน แสดงหมายเลขของแต่ละ well

ภาพล่าง แสดงผลการทดสอบความปราศจากเชื้อของเซลล์

ในการวิจัยจริงทำการทดสอบ 3 ครั้งกับตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ทุกชนิดที่ใช้ในโครงการวิจัย แต่ครั้งทำเป็น duplicate ครั้งแรกทำเมื่อเริ่มต้นโครงการวิจัยในราวเดือนมิถุนายน 2543 ครั้งที่สองในราวเดือนธันวาคม 2543 และครั้งที่สามในเดือนมิถุนายน 2544 เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่นำมาใช้ปราศจากการติดเชื้อตลอดระยะเวลาของโครงการวิจัย การทดสอบทุกครั้งพบว่าตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ทุกชนิดในโครงการวิจัยติดสีม่วงเข้มที่พื้น well อย่างสม่ำเสมอ แสดงว่าเซลล์ที่นำมาใช้ในห้อยปฏิบัติการไม่มีติดเชื้อเลย โดยเฉพาะเชื้อ mycoplasma ที่จะเป็นอันตรายต่อเซลล์

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์อาศัยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากการย้อมสีด้วยวิธี SRB โดยการทดสอบสารแต่ละตัวจะต้องแปรความเข้มข้นของสารไปในช่วงต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 ไปจนถึง 200 หรือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการตัดสินใจว่าจะแปรความเข้มข้นไปจนถึงสูงสุดที่เท่าไรก็แล้วแต่วัตถุประสงค์ ในห้อยปฏิบัติการที่ต้องการวิจัยแบบ screening สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งมักจะใช้ขนาดสูงสุดที่ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากสารที่สามารถต้านมะเร็งที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้ถือว่าขนาดสูงเกินไป ไม่เหมาะต่อการนำไปใช้จริงทางคลินิก เนื่องจากสารในขนาดสูง ๆ จะเกิดฤทธิ์ข้างเคียงหรือฤทธิ์อื่นไม่พึงประสงค์ต่อเซลล์ปกติอย่างมากมาย แต่หากเป็นการวิจัยที่มุ่งศึกษาขนาดการต้านมะเร็งของสารหนึ่ง ๆ ก็อาจจะแปรความเข้มข้นสูงสุดมากกว่า 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้

ในโครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาขนาดการต้านมะเร็งของนมผึ้ง ก็สามารถแปรความเข้มข้นสูงสุดมากกว่า 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ แต่ก็จะต้องมีความจำกัดในเรื่องของความหนืด ซึ่งคณะผู้วิจัยแก้ไขด้วยการสกัดจากน้ำโดยตรง

การทดสอบแต่ละครั้งจำเป็นต้องมี positive control เพื่อให้แน่ใจว่าระบบการตรวจสอบถูกต้อง โดยใช้ยาต้านมะเร็ง 2 ชนิด คือ ellipticine และ doxorubicin ผลการวิจัยในภาพ 3 แสดงให้เห็นว่า ยาต้านมะเร็งทั้ง 2 ชนิดนี้มีค่า 50 % inhibition dose (ID_{50}) ไม่เกิน 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งตรงกับที่ตำราทางเภสัชวิทยากล่าวไว้ว่ายาทั้งออกฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ขนาดต่ำเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร⁽⁹²⁾ ทั้งนี้สามารถเลือกใช้ตัวใดตัวหนึ่งในการทดสอบแต่ละครั้งได้ ปกติ positive control ที่ใช้ในการตรวจสอบคือ ellipticine ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ doxorubicin 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.625 และ 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลังจากนำ 96-microwell plate ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 564 นาโนเมตรแล้ว จะได้ค่าการดูดกลืนแสงของ well ที่เป็น 10 % DMSO สูงมากประมาณ 1.7-2.5 ซึ่งตามปกติการวัดค่าการดูดกลืนแสงจะต้องเป็นตามกฎ Beer's law คือ ค่าการดูดกลืนแสงจะต้องอยู่ในช่วง 0.2-0.8 จึงจะเชื่อถือได้ แต่สำหรับกรณีของสี SRB นี้ได้มีการวิจัยทดสอบแล้วว่าค่าการดูดกลืนแสงที่สูงมากจนถึง 2.0-2.5 ในการวัดปริมาณโปรตีนเช่นนี้ ก็ยังคงมีคุณสมบัติ linearity และเชื่อถือได้⁽⁸²⁻⁹¹⁾ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดสอบสามารถนำมา plot กราฟได้ 2 ลักษณะดังต่อไปนี้

(1) ค่าการดูดกลืนแสงหรือ absorbance (แกน Y) และค่าความเข้มข้นของสารในอาหารเลี้ยงเซลล์ (แกน X) โดยค่าการดูดกลืนแสง ณ ความเข้มข้นใด ๆ จะต้องลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ zero day control (ซึ่งจะต้องทำทุกครั้งที่ทดสอบ) เสียก่อน เพื่อหักล้างค่าโปรตีนหรือการเจริญที่มีอยู่เดิมในระยะแรกก่อนทำการทดสอบ

(2) ค่า % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์หรือ % growth inhibition (แกน Y) และค่าความเข้มข้นของสารในอาหารเลี้ยงเซลล์ (แกน X) กราฟที่ได้จะมีลักษณะกลับกับในข้อ (1) กล่าวคือ เมื่อค่าการดูดกลืนแสงมากแสดงว่ามีโปรตีนมาก นั่นคือการเจริญเติบโตยังคงดีอยู่ ค่า % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์จะมีค่าต่ำ ในทางกลับกันเมื่อค่าการดูดกลืนแสงต่ำแสดงว่ามีโปรตีนน้อย นั่นคือการตายของเซลล์ ค่า % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ก็จะมีค่าสูง ค่า % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สามารถคำนวณอย่างละเอียดได้ดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned} \% \text{ การยับยั้งการเจริญเติบโต} &= \frac{(A(0 \mu\text{g/ml}) - A(\text{zero day})) - (A(x \mu\text{g/ml}) - A(\text{zero day}))}{A(0 \mu\text{g/ml}) - A(\text{zero day})} \times 100 \% \\ &= \frac{A(0 \mu\text{g/ml}) - A(x \mu\text{g/ml})}{A(0 \mu\text{g/ml}) - A(\text{zero day})} \times 100 \% \end{aligned}$$

โดย ABS(0 µg/ml)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 10 % DMSO
ABS(zero day)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงใน well ของ zero day control
ABS(x µg/ml)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ x ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต้องการหา % การยับยั้งการเจริญเติบโต

ทั้งนี้ค่าการดูดกลืนแสงจะต้องคิดในลักษณะเดียวกับข้อ (1) คือ ค่าการดูดกลืนแสง ณ ความเข้มข้นใด ๆ จะต้องลบออกด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ zero day control (ซึ่งจะต้องทำทุกครั้งที่ทดสอบ) เสียก่อน เพื่อหักล้างค่าโปรตีนหรือการเจริญที่มีอยู่เดิมในระยะแรกก่อนทำการทดสอบ

วิธีการอ่านค่าที่ 50 % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์อย่างง่าย ๆ ด้วยการพิจารณาจากกราฟในข้อ (1) ก็คือ ณ ความเข้มข้นที่ค่าการดูดกลืนแสงลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของค่าการดูดกลืนแสง $A(0 \mu\text{g/ml}) - A(\text{zero day})$ จะเป็นค่าที่ 50 % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์

หากต้องการทราบค่า 50 50 % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์อย่างละเอียดก็ plot กราฟในข้อ (2) คือ ค่า % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์หรือ % growth inhibition (แกน Y) และค่าความเข้มข้นของสารในอาหารเลี้ยงเซลล์ (แกน X) แล้วหาสมการเส้นตรงที่เหมาะสมมาคำนวณค่าที่ 50 % inhibition ได้

หลังจากนำเซลล์มาข้อมสีโปรตีนภายในเซลล์ด้วยวิธี SRB method พบว่า มีข้อสรุปสำคัญอยู่ 2 ประเด็น คือ

(1) ยาด้านมะเร็ง (known anticancer drug) ที่ใช้เป็น positive control ในการทดสอบนี้คือ ellipticine และ doxorubion ซึ่งมี effective concentration ที่ 50 % (EC_{50}) คือ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งของประชากรเซลล์มะเร็งทั้งหมด ประมาณ 1.0-2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาด้านมะเร็งนี้จะข้อมติดสีชมพูของ sulforhodamine B งามาก (ค่าการดูดกลืนแสงต่ำ) ดังแสดงในภาพ 2 หากให้ยาด้านมะเร็งในความเข้มข้นสูง ๆ เช่น ellipticine 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ doxorubicin 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพ 2 เป็นการยืนยันได้ว่า

ระบบการทดสอบเชื่อถือได้ เพราะยาต้านมะเร็งสามารถด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งได้จริง คือทำให้เซลล์มะเร็งตายและโปรตีนภายในเซลล์เสื่อมสภาพไป

กราฟในภาพ 3 และ 4 แสดงให้เห็นถึงความสามารถของ ellipticine และ doxorubicin ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม สำหรับผลการทดสอบการต้านเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ ก็ให้ผลไปในทางเดียวกัน

(2) หลังจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีนมผงและสารสกัดนมผงจาก ethanol chloroform และ hexane ที่แปรขนาดที่ 10, 100, 200, 300 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดนมผงจากน้ำที่ความเข้มข้น 10, 100, 200, 300, 500 และ 700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร well ที่ใส่นมผงและสารสกัดจากนมผงจะให้สีชมพูเข้ม เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงปรากฏว่าให้ค่าใกล้เคียง control well คือ well ที่ไม่มีนมผงและสารสกัดจากนมผงอยู่เลย (0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังแสดงในกราฟภาพ 5-10 แสดงว่าโปรตีนภายในเซลล์ยังอยู่ในสภาพปกติ ดังนั้นเซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่มิได้ตายไปแต่อย่างใด จึงหมายความว่านมผงและสารสกัดจากนมผงไม่มีด้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง การวิจัยในส่วนนี้ได้ทำการทดสอบผลของนมผงและสารสกัดจากนมผงแต่ละขนาดของแต่ละเซลล์ถึง 5 ซ้ำก็ยังยืนยันผลเช่นเดิมทุกครั้งคือ เซลล์ติดสีชมพูเข้มหลังการย้อมด้วยสี sulforhodamine B ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง control well และเมื่อคำนวณ % การยับยั้งการเจริญแล้วให้ค่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วย ANOVA

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

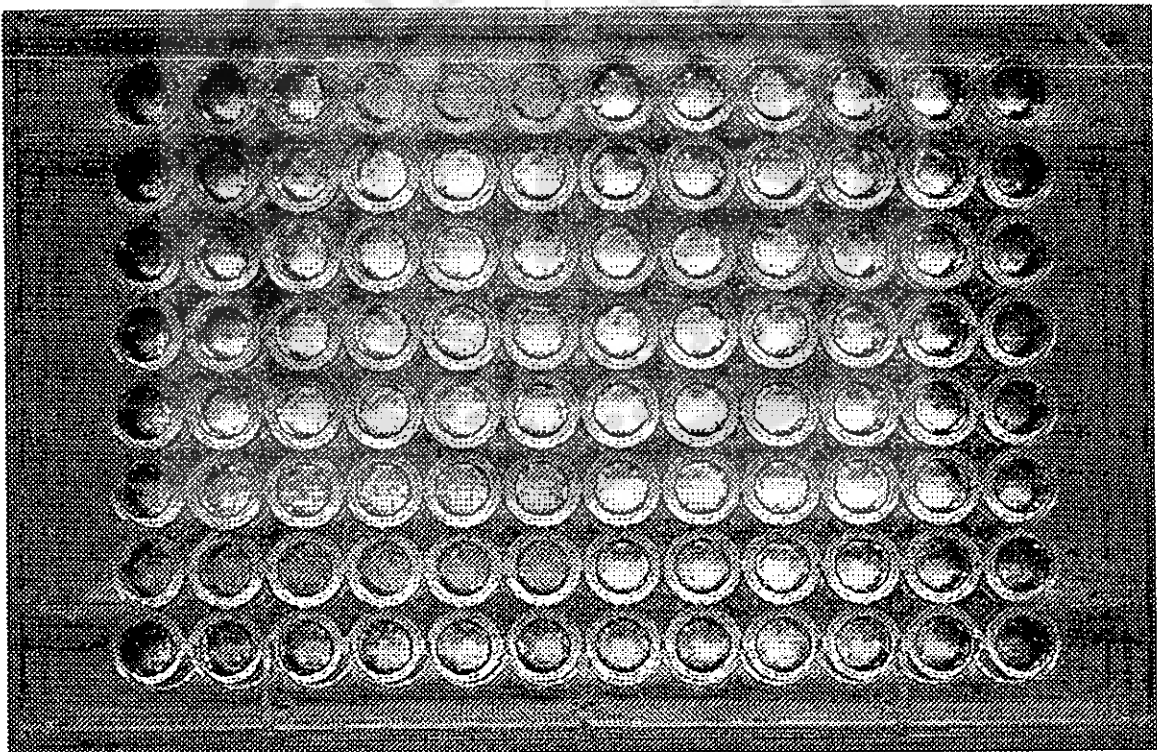
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของนมผงหรือสารสกัดจากนมผงถือว่าเป็นการตรวจสอบว่านมผงและสารสกัดจากนมผงมีความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติหรือไม่ เซลล์ที่สามารถหาได้ในปัจจุบัน ใช้กันอย่างแพร่หลาย และถือว่าใกล้เคียงกับคนมากที่สุดคือ เซลล์จากไตลิงปกติ (Vero cell)

นมผงและสารสกัดทั้ง 4 fraction จากน้ำ ethanol chloroform และ hexane ที่แปรขนาดตั้งแต่ 10 ไปจนถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีฤทธิ์ลดการเจริญของเซลล์ปกติคือเซลล์จากไตลิงปกติ (Vero cell) แต่อย่างใด การย้อมสีโปรตีนด้วยวิธี SRB ยังคงให้สีชมพูปกติที่มีค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control well

จึงกล่าวได้ว่าการนำนมผึ้งมาบริโภคมีความปลอดภัยในเบื้องต้นคือไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อโปรตีนของเซลล์ ซึ่งโปรตีนของเซลล์เป็นครรชนี่บ่งชี้ว่าเซลล์ยังทำงานได้ตามปกติ



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96



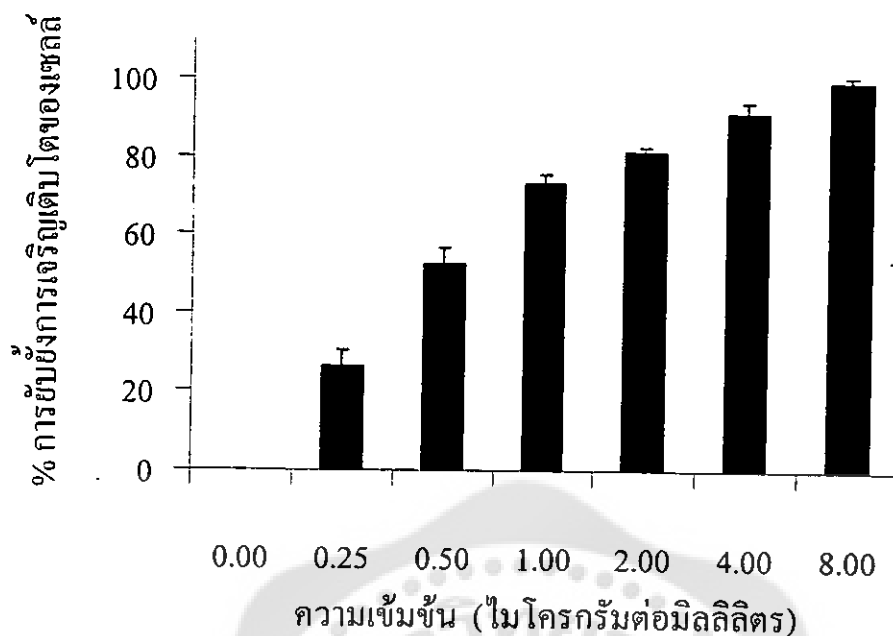
ภาพ 2 ภาพตัวอย่าง 96-mirowell plate ที่แสดงการย้อมสีโปรตีนภายในเซลล์ด้วยวิธี SRB เพื่อศึกษาว่าเซลล์ยังคงทำหน้าที่ตามปกติหรือไม่

แสดงตำแหน่ง well และสารที่ใส่ในแต่ละ well โดยมีสัญลักษณ์ดังต่อไปนี้

DMSO	คือ	dimethylsulfoxide
E	คือ	ellipticine
D	คือ	doxorubicin
RJ	คือ	นมผงชนิด freeze-dried ละลายน้ำ
RW	คือ	สารสกัดนมผงด้วยน้ำ
RE	คือ	สารสกัดนมผงด้วย ethanol
RC	คือ	สารสกัดนมผงด้วย chloroform
RH	คือ	สารสกัดนมผงด้วย hexane

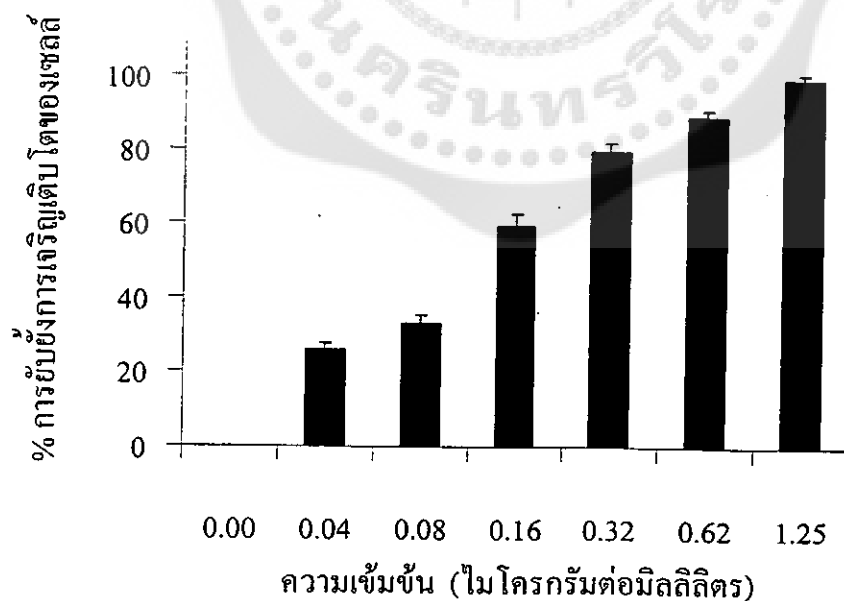
1-3 (10 % DMSO)	4-6 (D 1.25 µg/ml)	7-9 (RH 10 µg/ml)	10-12 (RC 10 µg/ml)
13-15 (E 0.04 µg/ml)	16-18 (D 0.04 µg/ml)	19-21 (RH 100 µg/ml)	22-24 (RC 100 µg/ml)
26-27 (E 0.08 µg/ml)	28-30 (D 0.08 µg/ml)	31-33 (RH 200 µg/ml)	34-36 (RC 200 µg/ml)
37-39 (E 0.16 µg/ml)	40-42 (D 0.16 µg/ml)	43-45 (RH 300 µg/ml)	46-48 (RC 300 µg/ml)
49-51 (E 0.32 µg/ml)	52-54 (D 0.32 µg/ml)	55-57 (RH 500 µg/ml)	58-60 (RC 500 µg/ml)
61-63 (E 0.625 µg/ml)	64-66 (D 0.625 µg/ml)	67-69 (RW 10 µg/ml)	70-72 (RW 300 µg/ml)
73-75 (E 1.25 µg/ml)	76-78 (D 1.25 µg/ml)	79-81 (RW 100 µg/ml)	82-84 (RW 500 µg/ml)
85-87 (RJ 10 µg/ml)	88-90 (RJ 200 µg/ml)	91-93 (RW 200 µg/ml)	94-96 (RW 700 µg/ml)

การยับยั้งการเจริญเติบโตของ *ellipticine*

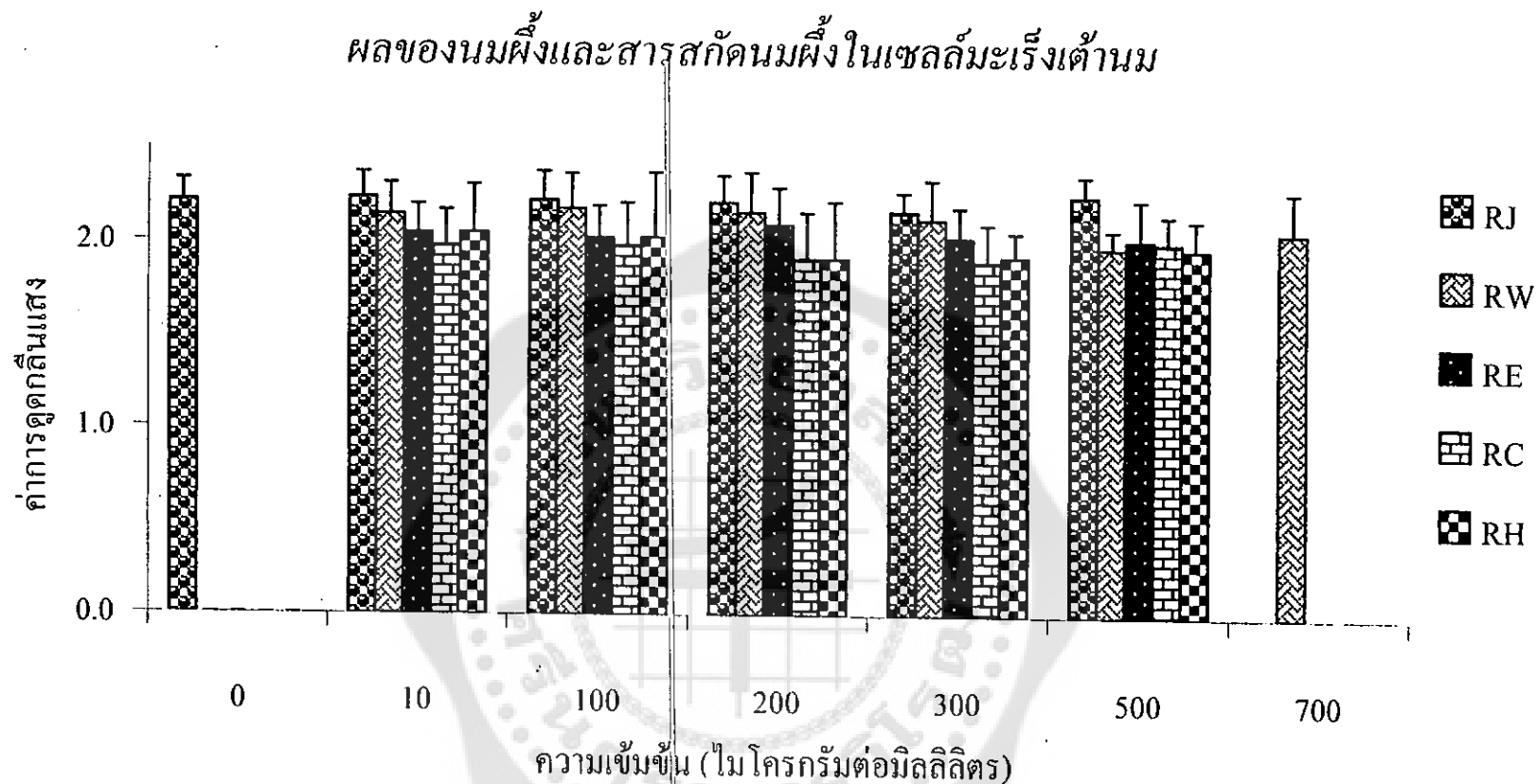


ภาพ 3 กราฟแสดงค่า % การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและความเข้มข้นของ *ellipticine* (n = 9)

การยับยั้งการเจริญเติบโตของ *doxorubicin*



ภาพ 4 กราฟแสดงค่า % การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมและความเข้มข้นของ *doxorubicin* (n = 9)



ภาพ 5 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้นของนมผงและสารสกัดจากนมผงชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านม

RJ = นมผง freeze-dried, n = 15

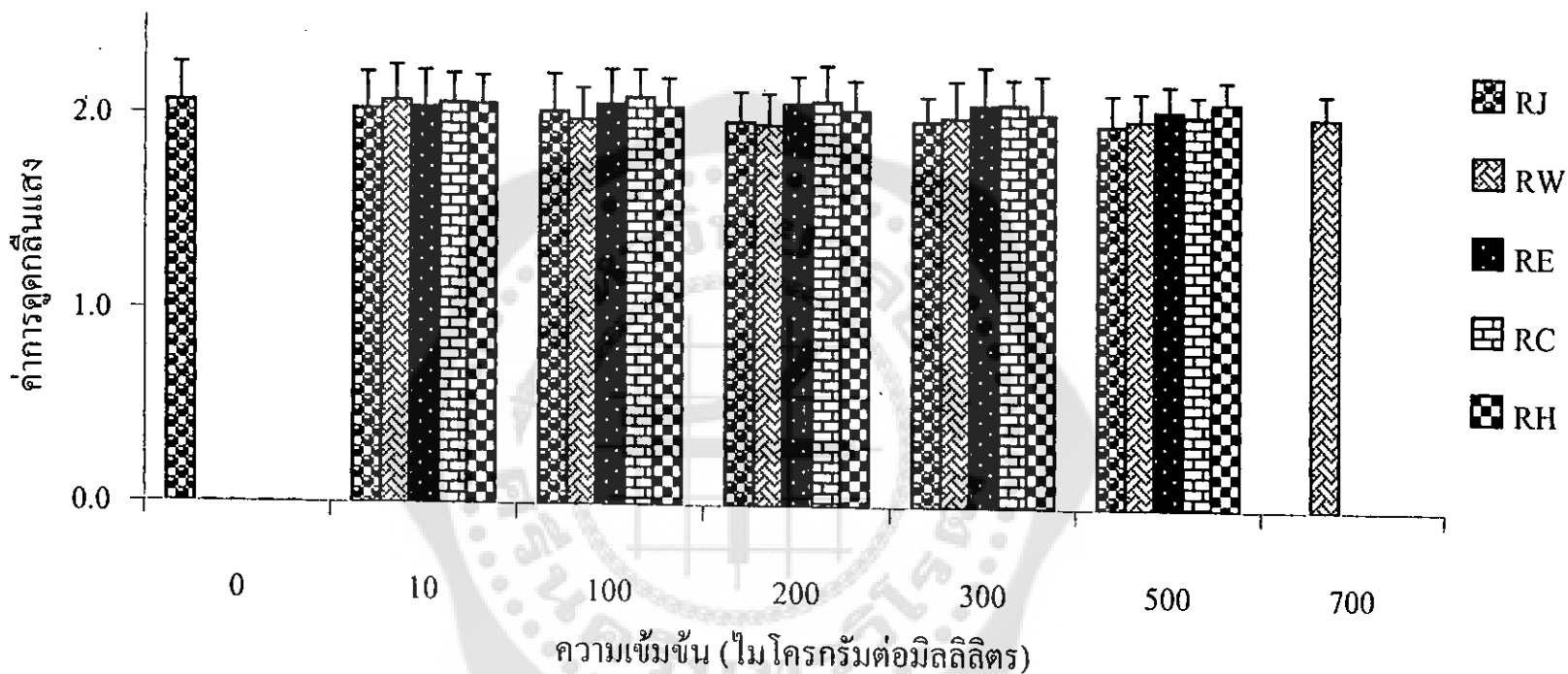
RE = สารสกัดนมผงด้วย ethanol, n = 15

RH = สารสกัดนมผงด้วย hexane, n = 15

RW = สารสกัดนมผงด้วยน้ำ, n = 15

RC = สารสกัดนมผงด้วย chloroform, n = 15

ผลของนมผงและสารสกัดนมผงในเซลล์มะเร็งช่องปาก



ภาพ 6 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้นของนมผงและสารสกัดจากนมผงชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาในเซลล์มะเร็งช่องปาก

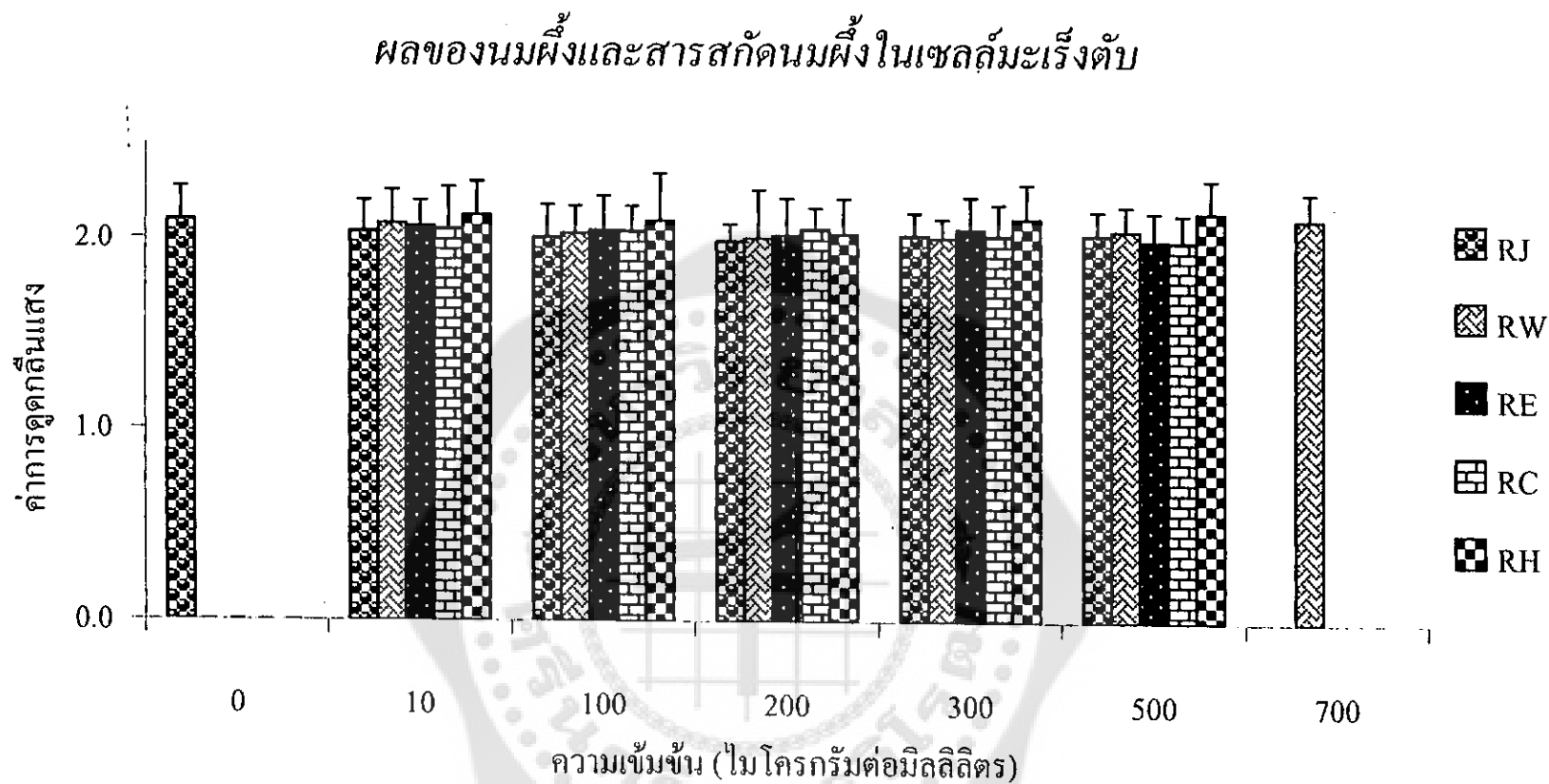
RJ = นมผง freeze-dried, n = 15

RW = สารสกัดนมผงด้วยน้ำ, n = 15

RE = สารสกัดนมผงด้วย ethanol, n = 15

RC = สารสกัดนมผงด้วย chloroform, n = 15

RH = สารสกัดนมผงด้วย hexane, n = 15



ภาพ 7 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้นของนมผงและสารสกัดจากนมผงชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาในเซลล์มะเร็งตับ

RJ = นมผง freeze-dried, n = 15

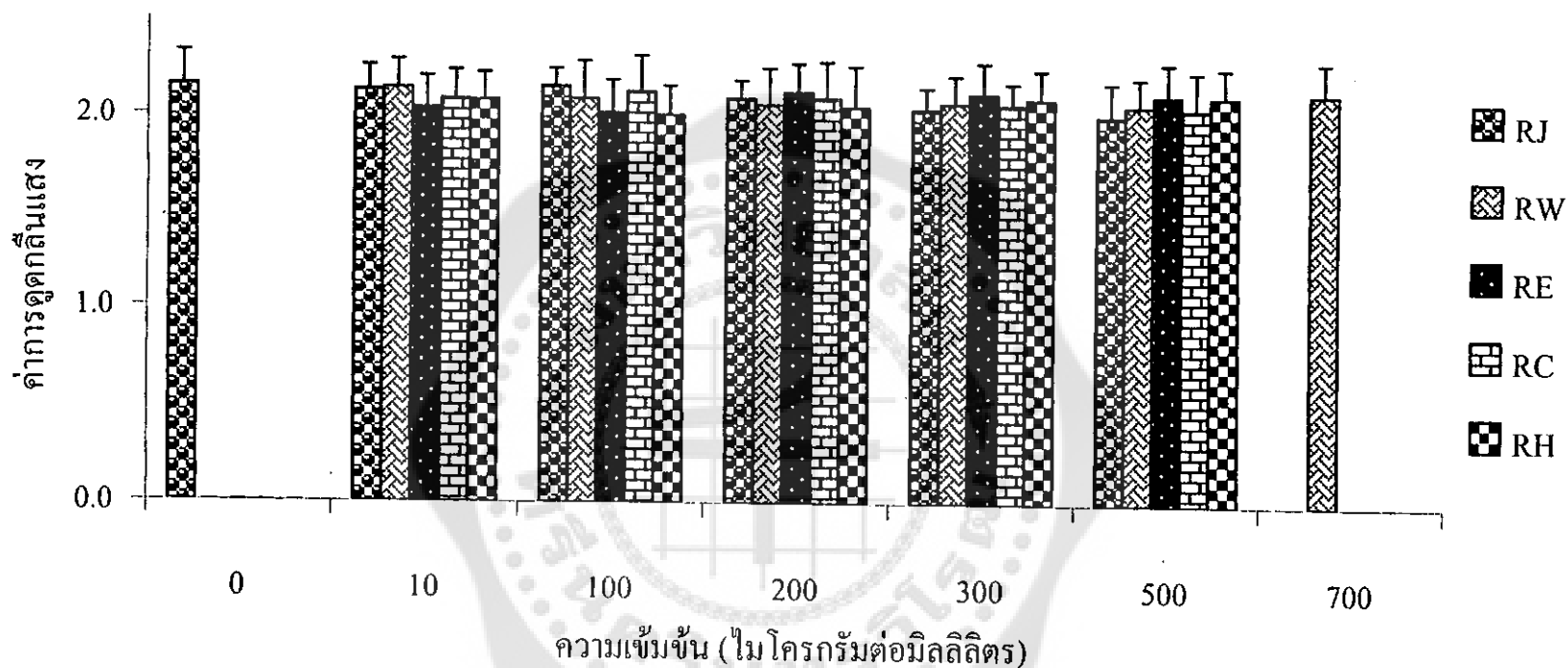
RW = สารสกัดนมผงด้วยน้ำ, n = 15

RE = สารสกัดนมผงด้วย ethanol, n = 15

RC = สารสกัดนมผงด้วย chloroform, n = 15

RH = สารสกัดนมผงด้วย hexane, n = 15

ผลของนมผงและสารสกัดนมผงในเซลล์มะเร็งปอด



ภาพ 8 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้นของนมผงและสารสกัดจากนมผงชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาในเซลล์มะเร็งปอด

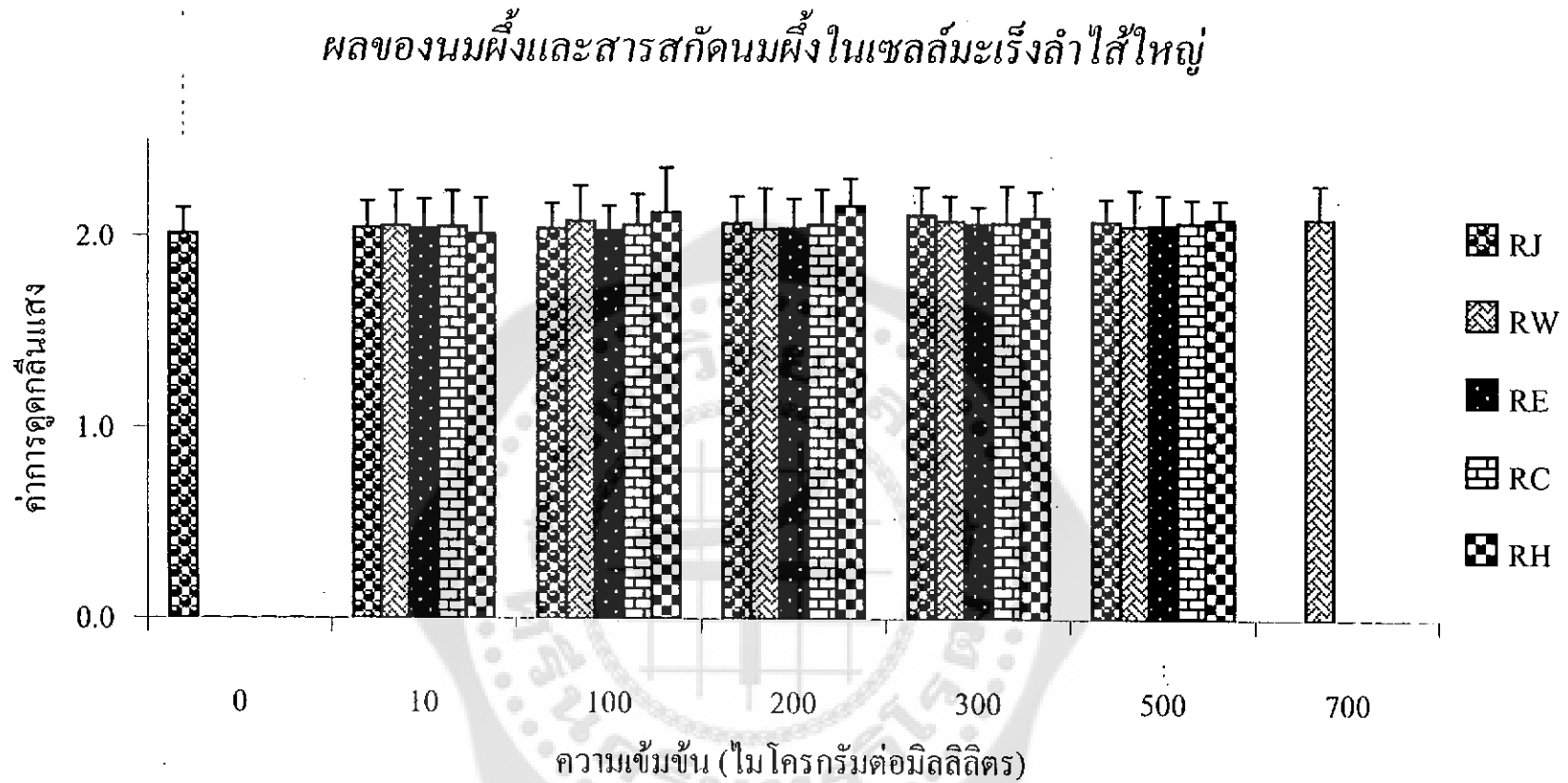
RJ = นมผง freeze-dried, n = 15

RW = สารสกัดนมผงด้วยน้ำ, n = 15

RE = สารสกัดนมผงด้วย ethanol, n = 15

RC = สารสกัดนมผงด้วย chloroform, n = 15

RH = สารสกัดนมผงด้วย hexane, n = 15



ภาพ 9 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้นของนมผงและสารสกัดจากนมผงชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

RJ = นมผง freeze-dried, n = 15

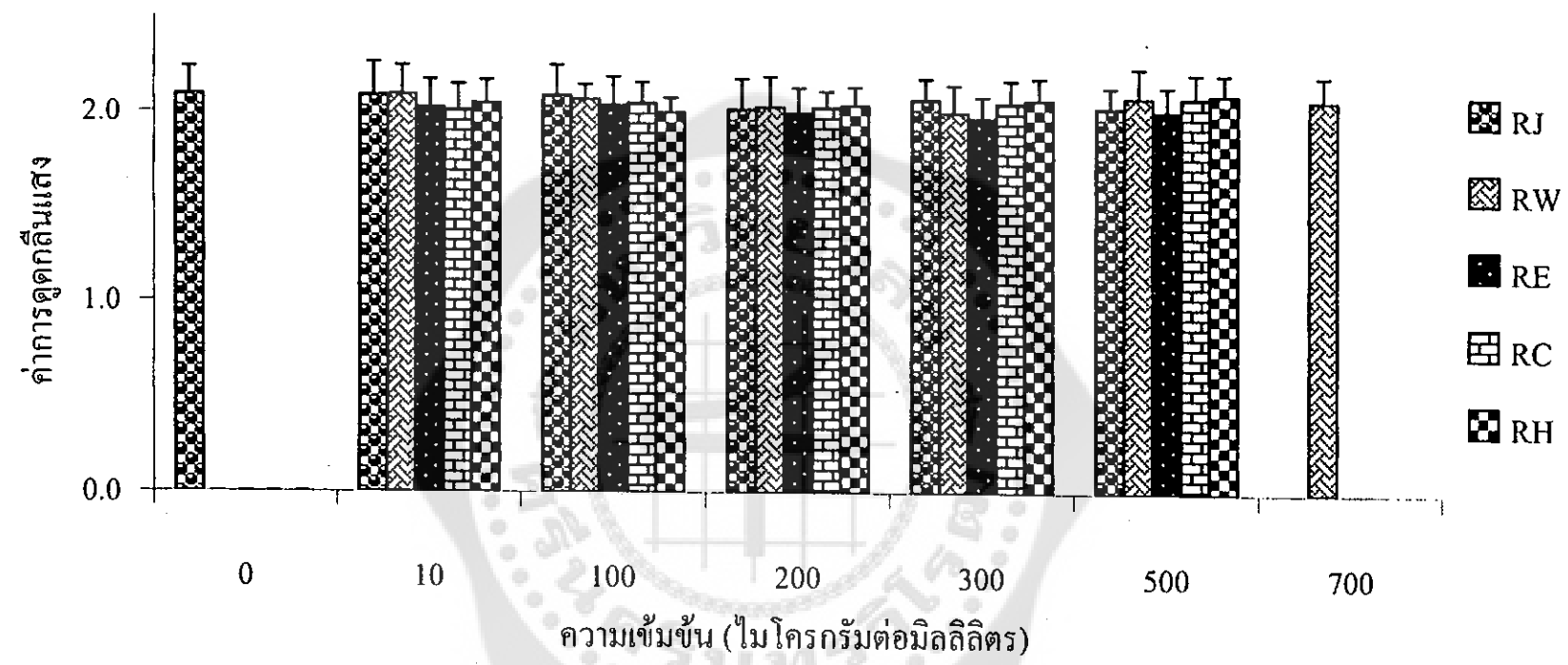
RW = สารสกัดนมผงด้วยน้ำ, n = 15

RE = สารสกัดนมผงด้วย ethanol, n = 15

RC = สารสกัดนมผงด้วย chloroform, n = 15

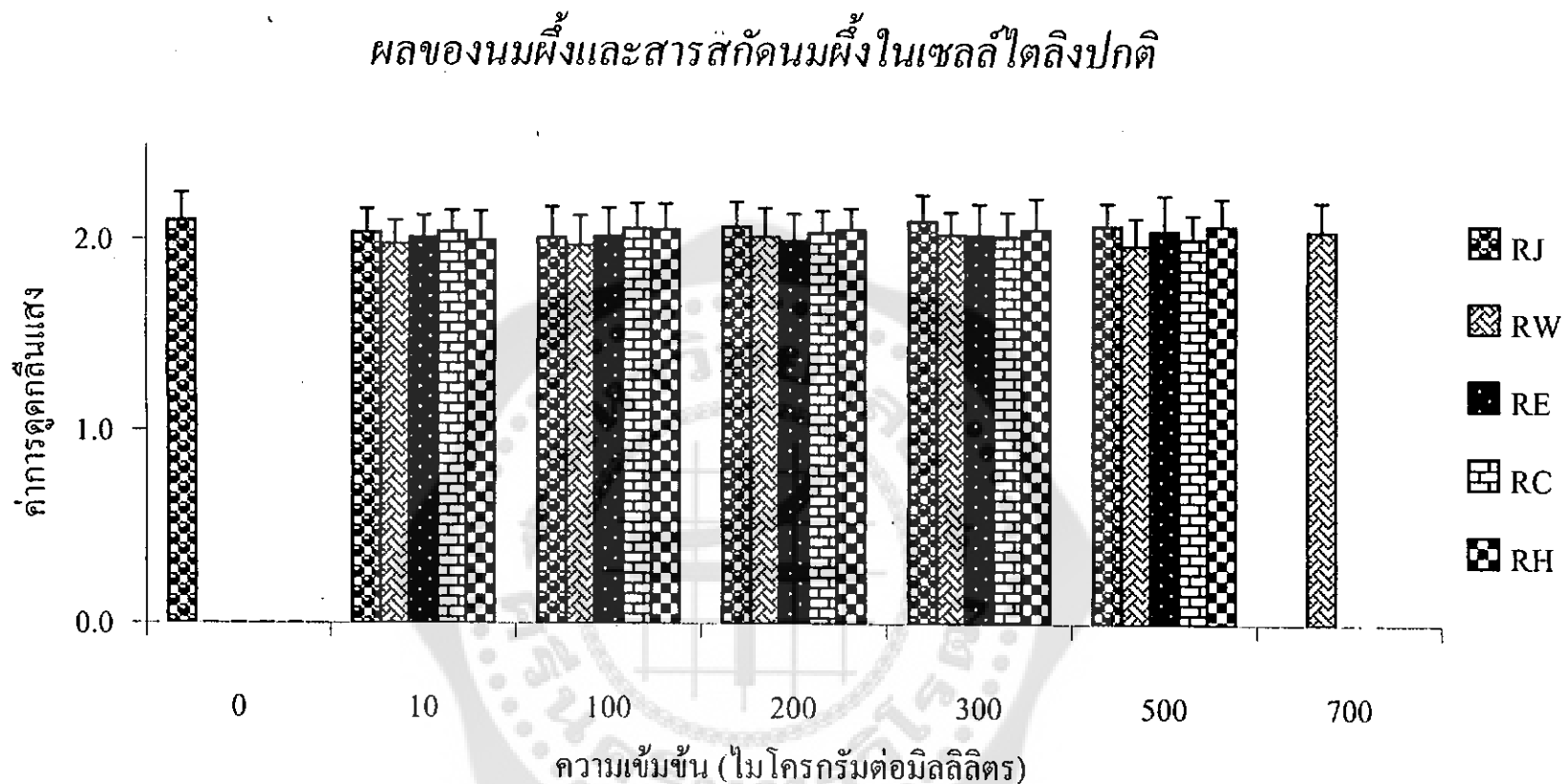
RH = สารสกัดนมผงด้วย hexane, n = 15

ผลของนมผงและสารสกัดนมผงในเซลล์มะเร็ง melanoma



ภาพ 10 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้นของนมผงและสารสกัดจากนมผงชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาในเซลล์ melanoma

- | | |
|--------------------------------------|---|
| RJ = นมผง freeze-dried, n = 15 | RW = สารสกัดนมผงด้วยน้ำ, n = 15 |
| RE = สารสกัดนมผงด้วย ethanol, n = 15 | RC = สารสกัดนมผงด้วย chloroform, n = 15 |
| RH = สารสกัดนมผงด้วย hexane, n = 15 | |



ภาพ 11 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสี SRB และความเข้มข้นของนมผงและสารสกัดจากนมผงชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษาในเซลล์ไตลิงปกติ

RJ = นมผง freeze-dried, n = 15

RW = สารสกัดนมผงด้วยน้ำ, n = 15

RE = สารสกัดนมผงด้วย ethanol, n = 15

RC = สารสกัดนมผงด้วย chloroform, n = 15

RH = สารสกัดนมผงด้วย hexane, n = 15

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

ผลจากการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่า นมผึ้งก็ไม่มีฤทธิ์การต้านมะเร็งเมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ซึ่งค้านกับรายงานฉบับเก่าๆ ที่ยืนยันเอาไว้ว่า นมผึ้งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งในสัตว์ตัวทดลอง (*in vivo*) ประกอบกับมีรายงานการวิจัยล่าสุดในปีที่ผ่านมายืนยันว่า นมผึ้งสามารถลดขนาดของก้อนเนื้องอกในหนูทดลองได้อย่างแน่นอน แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านมะเร็งของนมผึ้งหรือสารสำคัญในนมผึ้งต้องอาศัยกลไกบางอย่างในร่างกายก่อนที่จะทำงานต้านมะเร็งได้ คณะผู้วิจัยจึงสรุปประเด็นสำคัญของการวิจัยไว้ดังนี้

(1) นมผึ้งอาจกระตุ้นกลไกของการสร้างภูมิคุ้มกันให้หลังสารบางชนิด เช่น สารในกลุ่ม cytokine ไปกระตุ้นให้เกิดการยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเซลล์มะเร็งได้ แต่ข้อสันนิษฐานนี้น่าจะเป็นไปได้ยากมาก เนื่องจากการวิจัยนมผึ้งล่าสุดในปีที่ผ่านมาเป็นการลดขนาดของก้อนเนื้องอกในหนู nude mice (ซึ่งไม่มีภูมิคุ้มกันอยู่เลย) ได้⁽⁵³⁾

(2) นมผึ้งอาจต้องการ metabolizing process บางอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่มักจะเกิดในตับ มา modify นมผึ้งหรือสารสำคัญในนมผึ้งให้เปลี่ยนจากรูป inactive เป็น active ข้อสันนิษฐานนี้สามารถยืนยันได้ด้วยการทำวิจัยเพื่อพิสูจน์ความสามารถเอนไซม์ในตับหนูทดลองให้ metabolize นมผึ้ง แล้วนำ metabolized substance มาทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็งอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งคาดว่าวิธีนี้จะมีโอกาสให้ผลบวกมากกว่าในข้อ (1)

(3) นมผึ้งอาจไม่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยตรง แต่จะมีฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ซึ่งมักให้ผลในการป้องกันมะเร็งมากกว่า โดยฤทธิ์ในข้อ (2) และ 3 อาจส่งเสริมซึ่งกันและกันในการต้านมะเร็ง

(4) ในเบื้องต้นสามารถสรุปได้ว่านมผึ้งและสารสกัดจากนมผึ้งมีความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติ การย้อมสีโปรตีนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่ต่างจาก well ของ negative control บอกให้ทราบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์น่าจะยังคงปกติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยเดิมที่รายงานว่านมผึ้งขนาดปกติไม่มีผลทำให้โครโมโซมเปลี่ยนแปลง⁽⁹³⁾

ข้อเสนอแนะ

แม้ว่าผลการศึกษาในโครงการนี้จะไม่ให้ผลบวก แต่ก็ยังไม่สามารถสรุปได้ว่านมผึ้งจะไม่มีผลต้านเซลล์มะเร็ง คณะผู้วิจัยจึงขอเสนอแนะโครงการวิจัยต่อเนื่องไว้เป็น 2 แนวทาง คือ

(1) การศึกษาผลของนมผึ้งต่อเซลล์มะเร็งโดยนำนมผึ้งไปผ่านกระบวนการบางอย่างในร่างกาย เช่น สัมผัสหรือ incubate กับ microsomal enzyme จากตับ เพื่อให้ได้ active metabolite ไปออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง

(2) การศึกษาการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของนมผึ้ง การศึกษาในลักษณะนี้มีหลายระดับ ควรเริ่มต้นตั้งแต่แรกโดยการตรวจสอบว่ามีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือไม่เสียก่อน เช่น ใช้วิธี DPPH assay ต่อจากนั้นจึงนำไปศึกษาการยับยั้งการหลั่งสารอนุมูลอิสระที่หลั่งจากเซลล์ชนิดต่าง ๆ และปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ รวมทั้งกลไกในระดับโมเลกุลว่านมผึ้งออกฤทธิ์ผ่าน messenger ตัวใดบ้าง

คณะผู้วิจัยจึงทดลองใช้วิธี DPPH assay ศึกษาความสามารถของนมผึ้งและสารสกัดจากนมผึ้งในการยับยั้งการดูดกลืนแสงของสารอนุมูลอิสระคือ 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl หรือเรียกย่อ ๆ ว่า DPPH โดยใช้ known antioxidant คือ วิตามินอี และ butylate hydroxy toluene เป็นสาร antioxidant มาตรฐาน ทั้งนี้ทำการทดลองเพียงครั้งเดียว (1 ชั่วโมง) พบว่า นมผึ้งน่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งสารอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง (in vitro) ได้จริง

คณะผู้วิจัยจึงเสนอโครงการวิจัยต่อในเรื่องฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของนมผึ้งและสารสกัดจากนมผึ้ง โดยใช้ชื่อว่า “นมผึ้งกับมะเร็ง (2) : ฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของมะเร็ง” ในงบประมาณรายได้ปี 2543 และได้รับการพิจารณาอนุมัติจากมหาวิทยาลัยในวงเงิน 50,000 บาท ให้ดำเนินโครงการนี้ต่อไป คณะผู้วิจัยได้เริ่มดำเนินงานไปบางส่วนแล้ว และคาดว่านมผึ้งมีฤทธิ์ลดปริมาณสารอนุมูลอิสระได้

บรรณานุกรม

1. Kobayashi N, Unten S, Kakuta H, Komatsu N, Fujimaki M, Satoh K, Aratsu C, Nakashima H, Kikuchi H, Ochiai K and Sakagami H. Diverse biological activities of healthy foods. In Vivo 2001 ; 15 : 17-23.
2. Williams DL. A veterinary approach to the European honey bee (*Apis mellifera*). Vet J 2000 ; 160 : 61-73.
3. Shaw D, Leon C, Kolev S and Murray V. Traditional remedies and food supplements. A 5-year toxicological study (1991-1995). Drug Saf 1997 ; 17 : 342-56.
4. Shimanuki H and Knox DA. Bee health and international trade. Rev Sci Tech 1997 ; 16 : 172-6.
5. สิริวัฒน์ วงษ์ศรี, เพ็ญศรี ตั้งคณะสิงห์. ชีวิตวิทยาของผึ้ง 39-43, 128-131, 2529.
6. Nimmannit U. Royal jelly. Drug Information. Th J Pharm Sci 1988 ; 13 : 85-9.
7. Dayan AD. A note on royal jelly : A critical evaluation. J Pharm Pharmacol 1906 ; 12 : 377-83.
8. สุภาภรณ์ พงศกร Royal jelly (นมผึ้ง) นิตยสารไก่ล้นหม้อ กรกฎาคม 2531 ; 72-3.
9. Lercker G, Capella P, Conte LS and Ruini F. Components of royal jelly : I. Identification of the organic acid. Lipids 1981 ; 16 : 912-9.
10. Townsend GF and Lucas GG. The chemical nature of royal jelly. Biochem J 1940 ; 34 : 1155-62.
11. Nevin W, John HL and Norah CJ. Study on lipid of royal jelly. Biopharm Biophys Acta 1964 ; 84 : 305-15.
12. Barker SA, Foster AB and Lamb DC. Biological origin and configuration of 10-hydroxy-2-decenoic acid. Nature 1959 ; 184 : 634.

13. Brown WH and Freure RJ. Some carboxylic acids present in royal jelly. Can J Chem 1959; 37: 2042-6.
14. Abdel-Wahab SM, Selim MA, Shehata MM and Mohamed TR. Detection and estimation of neurohormonal substance in honey and royal jelly. Egypt J Pharm Sci 1982 ; 20 : 353-63.
15. Blum MS, Novak AF and Taber S. 10-hydroxy-2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. Science 1959 ; 130 : 452-3.
16. Yatsunami K and Echigo T. Antibacterial action of royal jelly. The XXXth International Apicultural Congress of Apitherapy; 30th. Oct 10-16 ; Nagoya : 1985.
17. Dixit PK and Patel NG. Insulin-like activity in larval foods of the honeybee. Nature 1964 ; 202 : 189-90.
18. O'Conner KJ and Baxter D. The demonstration of insulin-like material in the honeybee, *Apis mellifera*. Comp Biochem Physiol 1985 ; 81B : 755-60.
19. Kramer KJ, Tager HS, Childs CN and Sperirs RD. Insulin-like hypoglycemic and immunological activities in honeybee royal jelly. J Insect Physiol 1977 ; 23 : 293-5.
20. Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M, Yaeshima T, Kawashima T and Kobayashi K. A potent antibacterial protein in royal jelly. J Biol Chem 1990 ; 265 : 11333-7.
21. Genc M and Aslan A. Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly and royal jelly products by column liquid chromatography. J Chromatogr A 1999 ; 839 : 265-8.
22. Bloodworth BC, Harn CS, Hock CT and Boon YO. Liquid chromatographic determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content of commercial products containing royal jelly. J AOAC Int 1995 ; 78 : 1019-23.

23. Kimura Y, Miyagi C, Kimura M, Nitoda T, Kawai N and Sugimoto H. Structural features of N-glycans linked to royal jelly glycoproteins : structures of high-mannose type, hybrid type, and biantennary type glycans. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000 ; 64 : 2109-20.
24. Albert S, Bhattacharya D, Klaudiny J, Schmitzova J and Simuth J. The family of major royal jelly proteins and its evolution. *J Mol Evol* 1999 ; 49 : 290-7.
25. Maleszka R and Kucharski R. Analysis of *Drosophila* yellow-B cDNA reveals a new family of proteins related to the royal jelly proteins in the honeybee and to an orphan protein in an unusual bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 270 : 773-6.
26. Kimura Y, Kajiyama S, Kanaeda J, Izukawa T and Yonekura M. N-linked sugar chain of 55-kDa royal jelly glycoprotein. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996 ; 60 : 2099-102.
27. Kubo T, Sasaki M, Nakamura J, Sasagawa H, Ohashi K, Takeuchi H and Natori S. Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *J Biochem (Tokyo)* 1996 ; 119 : 291-5.
28. Kimura Y, Washino N and Yonekura M. N-linked sugar chains of 350-kDa royal jelly glycoprotein. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995 ; 59 : 507-9.
29. Ohashi K, Natori S and Kubo T. Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *Eur J Biochem* 1997 ; 249 : 797-802.
30. Albert S, Klaudiny J and Simuth J. Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Insect Biochem Mol Biol* 1999 ; 29 : 427-34.

31. Schmitzova J, Klaudiny J, Albert S, Schroder W, Schreckengost W, Hanes J, Judova J and Simuth J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol Life Sci* 1998 ; 54 : 1020-30.
32. Kamakura M, Fukuda T, Fukushima M and Yonekura M. Storage-dependent degradation of 57-kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness. *Biosci Biotechnol* 2001 ; 65 : 277-84.
33. Kamakura M, Suenobu N and Fukushima M. Fifty-seven-kDa protein in royal jelly enhances proliferation of primary cultured rat hepatocytes and increases albumin production in the absence of serum. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 ; 13 : 865-74.
34. Hamerlinck FF. Neopterin : a review. *Exp Dermatol* 1999 ; 8 : 167-76.
35. Lombardi C, Senna GE, Gatti B, Feligioni M, Riva G, Bonadonna P, Dama AR, Canonica GW and Passalacqua G. Allergic reactions to honey and royal jelly and their relationship with sensitization to compositae. *Allergol Immunopathol* 1998 26 : 288-90.
36. Leung R, Ho A, Chan J, Choy D and Lai CK. Royal jelly consumption and hypersensitivity in the community. *Clin Exp Allergy* 1997 ; 27 : 333-6.
37. Harwood M, Harding S, Beasley R and Frankish PD. Asthma following royal jelly. *N Z Med J* 1996 ; 109 : 325.
38. Laporte JR, Ibañez L, Vendrell L and Ballarin E. Bronchospasm induced by royal jelly. *Allergy* 1996 ; 51 : 440.
39. Baldo BA. Allergies to wheat, yeast and royal jelly : a connection between ingestion and inhalation? *Monogr Allergy* 1996 ; 32 : 84-91.
40. Peacock S, Murray V and Turton C. Respiratory distress and royal jelly. *BMJ* 1995 ; 311 : 1472.

41. Thien FC, Leung R, Plomley R, Weiner J and Czarny D. Royal jelly-induced asthma. *Med J Aust* 1993 ; 159 : 639.
42. Leung R, Thien FC, Baldo B and Czarny D. Royal jelly-induced asthma and anaphylaxis : clinical characteristics and immunologic correlations. *J Allergy Clin Immunol* 1995 ; 96 : 1004-7.
43. Roger A, Rubira N, Nogueiras C, Guspi R, Baltasar M and Cadahia A. Anaphylaxis caused by royal jelly. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1995 ; 23 : 133-5.
44. Bullock RJ, Rohan A and Straatmans JA. Fatal royal jelly-induced asthma. *Med J Aust* 1994 ; 160 : 44.
45. Thien FC, Leung R, Baldo BA, Weiner JA, Plomley R and Czarny D. Asthma and anaphylaxis induced by royal jelly. *Clin Exp Allergy* 1996 ; 26 : 216-22.
46. Sver L, Orsolich N, Tadic Z, Njari B, Valpotic I and Basic I. A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1996 ; 19 : 31-8.
47. Oka H, Emori Y, Kobayashi N, Hayashi Y and Nomoto K. Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses. *Int Immunopharmacol* 2001 ; 1 : 521-32.
48. Townsend GF, Morgan JF and Hazlett B. Activity of 10-hydroxydecenoic acid from royal jelly against experimental leukemia and ascitic tumors. *Nature* 1959 ; 183 : 1270-1.
49. Tamura T, Kuboyama N and Fujii A. Studies on mutagenicity of royal jelly. The XXXth International Apicultural Congress of Apitherapy; 30th. 1985 October 10-16 ; Nagoya: 1985.

50. Tamura T, Fujii A and Kuboyama N. Effect of royal jelly on experimental transplantable tumors. The XXXth International Apicultural Congress of Apitherapy; 30th. October 10-16 ; Nagoya: 1985.
51. Townsend GF, Morgan JF, Tolnai S, Hazlett B, Morton HJ and Shuel RW. Studies on the in vitro antitumor activity of fatty acids I. 10-hydroxy-2-decenoic acid from royal jelly. Cancer Research 1960 ; 20 : 503-10.
52. Tamura T, Fujii A and Kuboyama N. Antitumor effects of royal jelly (RJ). Nippon Yakurigaku Zasshi 1987 ; 89 : 73-80.
53. Pongsakorn S, Picha P. Antitumor effect of royal jelly on human cervical cancer transplanted in nude mice. Mahidol Uni J Pharm Sci 1998 ; 25 : 14-21.
54. Ludianskii EA. The use of the products of bee raising in medicine. Feldsher Akush 1989 ; 54 : 36-9.
55. Mozhenkov VP and Miniaeva TG. The use of products from bee raising in ophthalmology and otorhinolaryngology. Med Sestra 1991 ; 50 : 47-51.
56. Masterov GD and Nersesian ON. The role of apitherapy in the combined treatment of patients with chronic nonspecific lung diseases. Lik Sprava 1995 ; 3-4 : 155-8.
57. Morris DH and Stare FJ. Unproven diet therapies in the treatment of the chronic fatigue syndrome. Arch Fam Med 1993 ; 2 : 181-6.
58. Vittek J. Effect of royal jelly on serum lipids in experimental animals and humans with atherosclerosis. Experientia 1995 ; 51 : 927-35.
59. Shen X, Lu R and He G. Effects of lyophilized royal jelly on experimental hyperlipidemia and thrombosis. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 1995 ; 29 : 27-9.

60. Fujii A, Kobayashi S, Kuboyama N, Furukawa Y, Kaneko Y, Ishihama S, Yamamoto H and Tamura T. Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* 1990 ; 53 : 331-7.
61. Saikatsu S, Ikeno K, Hanada Y and Ikeno T. Physiologically active substances in the oral excreta produced by honey bee - effects of royal jelly on silkworm. *Ou Daigaku Shigakushi* 1989 ; 16 : 113-6.
62. Visintin JA, Burkle K, Burich K and Hahn J. Comparative studies of the cryopreservation of mouse embryos with glycerin supplemented with sucrose or royal jelly. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1988 ; 95 : 398-401.
63. Burkle K, Burich K and Hahn J. Preliminary results of cryopreservation of mouse embryos with glycerin and royal jelly. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1987 ; 94 : 548-50.
64. Yonei Y, Shibagaki K, Tsukada N, Nagasu N, Inagaki Y, Miyamoto K, Suzuki O and Kiryu Y. Case report: haemorrhagic colitis associated with royal jelly intake. *J Gastroenterol Hepatol* 1997 ; 12 : 495-9.
65. Murakami K, Fujioka T, Nasu M, Inage T, Nishimiya M, Matsunaga K, Saburi Y and Moriuchi A. A case of eosinophilic gastroenteritis induced by "royal jelly". *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 1994 ; 91 : 1447-50.
66. Fleche C. Risk of disseminating apiary diseases by international movements of bees and their products. *Rev Sci Tech* 1997 ; 16 : 177-86.
67. Fleche C, Clement MC, Zeggane S and Faucon JP. Contamination of bee products and risk for human health : situation in France. *Rev Sci Tech* 1997 ; 16 : 609-19.
68. McGarrity GJ, Murphy DG, and Nichols WW, Eds. *Mycoplasma Infection of Cell Cultures*, Plenum Press, New York (1978).

69. Tully JG and Razin S. Methods in Mycoplasmaology, Volume 1 and 2, Academic Prss, New York (1983).
70. Robinson LB, Wilchelhausen RK, and Roizman B. Contamination of human Cell cultures by pleuropneumonia-like organisms. Science 124 ; 1956 : 1147-8.
71. McGarrity GJ. Detection of Mycoplasmal Infection of Cell Cultures. Advances in Cell Culture, Volume 2 (Maramorosch K., Ed.) Academic Press, New York pp. 99-131 (1982).
72. Barile MF and McGarrity GJ. Isolation of Mycoplasmas from Cell Cultures by Agar and Broth Techniques. Methods in Mycoplasmaology, Volume 2, Diagnostic Mycoplasmaology, (Tully JG and Razin S. Eds.) Academic Press, pp. 159-165 (1983).
73. Chen TR. In situ detection of mycoplasma contamination in cell culture by fluorescent Hoechst 33258 Stain. Exp Cell Res 1977 ; 104, 255-62.
74. Del Guidice RA and Hopps HE. Microbiological Methods and Fluorescent Microscopy for the Direct Demonstration of Mycoplasma Infection of Cell Cultures, (McGarrity GJ, Murphy DG and Nichols WW, Eds.) Plenum Press, New York, pp. 57-69 (1978).
75. Long CW, Del Guidice R, Gardella RS and Hatanka M. Uracil phosphoribosyl transferase activity of mycoplasma and infected cell cultures. In Vitro 11977 ; 3 : 429-33.
76. McGarrity GJ and Carson DA. Adenosine phosphorylase mediated nucleoside toxicity : Applications towards the detection of mycoplasmal infection on mammalian cell Cultures. Exp Cell Res 1982 ; 139 : 199-206.
77. Hatanka M., Del Guidice R and Long C. Adenine formation from adenosine by mycoplasmas : adenosine phosphorylase activity. Proc Natl Acad. Sci (USA) 1975 ; 2 : 1401-5.

78. Thomas MA, Shipmen C, Sandberg JN and Drach JC. Adenosine Phosphorylase activity in a mutant Hep-2 cell line contaminated with *Mycoplasma hyorhinis*. In Vitro 1977 ; 13 : 502-9.
79. Hamet M, Bonissol C and Cartier P. Enzymatic activities on purine and pyrimidine metabolism in nine mycoplasma species contaminating cell cultures. Clin Chim Acta 1980 ; 103 : 15-22.
80. Senesi S, Falcone G, Mura U, Sgarella F and Ipata PL. A specific adenosine phosphorylase distinct from purine nucleoside phosphorylase. FEBS Letters 1976 ; 64 : 353-7.
81. Koszalka GE and Krenitsky TA. Nucleosides from *Leishmania donovani*, pyrimidine ribonucleoside, purine ribonucleoside, and an novel purine 2-deoxyribo-nucleosidase. J Biol Chem 1979 ; 54 : 8181-5.
82. Padron JM, van der Wilt CL, Smid K, Smitskamp-Wilms E, Backus HH, Pizao PE, Giaccone G and Peters GJ. The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening. Crit Rev Oncol Hematol 2000 ; 36 : 141-57.
83. Suh ME, Kang MJ, Yoo HW, Park SY and Lee CO. Synthesis and cytotoxicity of 2-methyl-1-substituted-imidazo [4,5-g] quinoline-4,9-dione and 7,8-dihydro-10H-[1,4]oxazino[3',4':2,3]imidazo[4,5-g]quinoline-5,12-dione derivatives. Bioorg Med Chem 2000 ; 8 : 2079-83.
84. Oosthuizen MM, Nel MJ and Greyling D. Heat shock treated oesophageal cancer cells become thermosensitized against anticancer drugs. Anticancer Res 2000 ; 20 : 2697-703.
85. Janzowaki C, Glaab V, Samimi E, Schlatter J and Eisenbrand G. 5-Hydroxymethylfurfural : assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. Food Chem Toxicol 2000 ; 38 : 801-9.

86. Loberg LI, Engdahl WR, Gauger JR and McCormick DL. Cell viability and growth in a battery of human breast cancer cell lines exposed to 60 Hz magnetic fields. *Radiat Res* 2000 ; 153 : 725-8.
87. Ryu CK, Kang HY, Yi YJ and Lee CO. Cytotoxic activities of 6-arylamino-7-halo-5,8-quinolinediones against human tumor cell lines. *Arch Pharm Res* 2000 ; 23 : 42-5.
88. Kim HM, Oh GT, Han SB, Hong DH, Hwang BY, Kim YH and Lee JJ. Comparative studies of adriamycin and 28-deacetyl sendanin on in vitro growth inhibition of human cancer cell lines. *Arch Pharm Res* 1994 ; 17 : 100-3.
89. Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Beltes P, Geromichalos GD and Kortsaris AH. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers : an in vitro evaluation. *Endod Dent Traumatol* 1998 ; 14 : 182-5.
90. Capozzi I, Clerici K, Cocchietto M, Salerno G, Bergamo A and Sava G. Modification of cell cycle and viability of TLX5 lymphoma in vitro by sulfoxide-ruthenium compounds and cisplatin detected by flow cytometry. *Chem Biol Interact* 1998 ; 113 : 51-64.
91. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenny S and Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990 ; 82 : 1107-12.
92. Calabresi and Chabner BA. Chemotherapy of Neoplastic diseases. In Goodman & Gilman's *The Pharmacological basis of Therapeutics*. Ninth Edition, Hardman JG and Limbird LE, eds, McGraw-Hill, 1996.
93. Settheetham W, Pongsakorn S, Ishida T. A preliminary study of genotoxic effects of royal jelly on human cells *in vitro*. *Srinakharinwirot Res Devel* 1994 ; 40-45.

ภาคผนวก

การเตรียม phosphate buffer saline

PBS เป็น buffer ที่นำมาใช้ในการ passage เซลล์ ประกอบด้วย sodium chloride 8.0 กรัม, potassium chloride 0.2 กรัม, dibasic sodium phosphate (anhydrous) 1.15 กรัม, potassium dihydrogen phosphate 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับให้มี pH 7.4 แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนำไปเข้าตู้ autoclave

การเตรียม 10 % phosphate-buffer formalin (PBF)

ในการเตรียมสารละลาย 10% PBF ประกอบด้วย 37-40 % formaldehyde 100 มิลลิลิตร, dibasic sodium phosphate (anhydrous) 6.5 กรัม และ monobasic sodium phosphate (monohydrate) 4.0 กรัม ละลายและปรับปริมาณเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.0 ± 0.2

การเตรียม 0.2 % crystal violet solution

ละลายสี crystal violet 0.1 กรัม ในสารละลาย 10 % PBF จำนวน 500 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านกระดาษกรองชนิดหยาบ