



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการรอดชีวิต การเจริญเป็น
โคโลนี การเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์
ชนิด SW-620

(Effects of *Centella asiatica* (ECa233) on the inhibition of cell viability, colony formation,
migration and invasion in SW-620 human colorectal cancer cells)

โดย

นสภ.ปญญโญ	ช้อยแก้ว	56210017
นสภ.ปิยฉัตร	ถิอทอง	56210090
นสภ.พัชรภรณ์	อสิพงษ์	56210091
นสภ.ณัฐธินิชา	เหรียญทอง	56210158

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
บัณฑิต

ปีการศึกษา 2560

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการรอดชีวิต การเจริญเป็น
โคโลนี การเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์
ชนิด SW-620

(Effects of *Centella asiatica* (ECa233) on the inhibition of cell viability, colony formation,
migration and invasion in SW-620 human colorectal cancer cells)

โดย

นสภ.ปัญญไญ	ย่อยแก้ว	56210017
นสภ.ปิยฉัตร	ถือทอง	56210090
นสภ.พัชรภรณ์	อสิพงษ์	56210091
นสภ.ณัฐฐนิชา	เหรียญทอง	56210158

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
บัณฑิต

ปีการศึกษา 2560

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ สุวิศิษฐ์ แม้นเหมือน อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้คำแนะนำแนวทางการศึกษาค้นคว้าที่ถูกต้อง ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน ให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้าน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ภญ.ดร.มยุรี ตันตีสิริระ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการสนับสนุนช่วยเหลือสนับสนุนสารสกัดบัวบก (ECa233) กรุณาให้ความรู้และให้คำปรึกษาในการเขียนรูปเล่ม ตลอดจนช่วยตรวจสอบ และแก้ไขผลงาน ทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและกรุณาให้คำชี้แนะในด้านต่างๆ แก่ข้าพเจ้า และสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา และขอขอบคุณเพื่อนร่วมโครงการวิจัยที่ทำปฏิบัติการร่วมกันในทุกขั้นตอนของงานวิจัย และคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของโครงการวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูตเวทิตาแด่ บพทรี นูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้คณะผู้จัดทำประสบความสำเร็จในการทำโครงการวิจัยไปได้ด้วยดี

นางสาวบุญญิญา ย้อยแก้ว

นางสาวปิยฉัตร ถือทอง

นางสาวพัชรภรณ์ อธิพงษ์

นางสาวณัฐฐนิชา เจริญทอง

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2560

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการรอดชีวิต, การเจริญเป็นโคโลนี, การเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ ชนิด SW-620

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ.ปญญญา ย้อยแก้ว รหัสนิสิต 56210017
2. นสภ.ปิยฉัตร ถือทอง รหัสนิสิต 56210090
3. นสภ.พัชรภรณ์ อธิพงษ์ รหัสนิสิต 56210091
4. นสภ.ณัฐธิดา เจริญทอง รหัสนิสิต 56210158

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. อาจารย์ สุวิศิษฐ์ แม้นเหมือน
2. รศ.ภญ.ดร.มยุรี ตันตีสิริระ

บทคัดย่อ

เนื่องจากปัจจุบันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นสาเหตุการตายอันดับ 2 ของประชากรโลก ยา 5-fluorouracil เป็นยาที่ใช้เป็นทางเลือกแรกในการรักษา ซึ่งมีผลต่อเซลล์มะเร็งและเกิดผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติได้ ดังนั้นการคิดค้นวิจัยสมุนไพรเพื่อนำมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษามะเร็งจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างมาก ดังนั้นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ได้จากพืชสมุนไพรจึงเป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการรักษามะเร็ง อย่างไรก็ตามต้องมีการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชสมุนไพร เพื่อนำมาพัฒนาสำหรับใช้รักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักต่อไป ดังนั้นโครงการวิจัยฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการรอดชีวิต การยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนี การยับยั้งการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 เพื่อบรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวจึงทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยวิธีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ได้แก่ เทคนิค MTT assay เทคนิค Colony formation assay เทคนิค Wound healing (scratch assay) เทคนิค Matrigel invasion assay และศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดบัวบก ECa233 ต่อเซลล์ปกติไฟโบรบลาสต์ เพื่อตรวจสอบความปลอดภัยของสารสกัดบัวบก ECa233 โดยในแต่ละการศึกษานำผลมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มซึ่งเป็นการเปรียบเทียบวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-way ANOVA) จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 มีฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง โดยมี

ความสัมพันธ์แบบ dose and time-dependent manners หลังการทดสอบที่ 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง และ สารสกัดบัวบก ECa233 พบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งการรอดชีวิตในเซลล์ปกติและการลุกลามของเซลล์มะเร็งเพียง เล็กน้อย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็ง และมีฤทธิ์การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นควรมีการศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยเมื่อใช้ร่วมกับการรักษาแผนปัจจุบัน เพื่อพัฒนาการใช้ สารสกัดบัวบก ECa233 ต่อไป

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2017

: Effects of *Centella asiatica* (ECa233) on the inhibition of cell viability, colony formation, migration and invasion in SW-620 human colorectal cancer cells

By

- | | |
|------------------------------|-------------|
| 1. Miss. Punyo Yoykaew | ID 56210017 |
| 2. Miss. Piyachat Thuetong | ID 56210090 |
| 3. Miss. Patchraporn Asipong | ID 56210091 |
| 4. Miss. Nathanicha Riantong | ID 56210158 |

Advisor:

1. Mr. Suwisit Manmuan
2. Associate Professor. Dr. Mayuree H. Tantisira

Abstract

Recently, colorectal cancer (CRC) is a cause of secondary population death in the world. 5-Fluorouracil is the first-line therapy for CRC patients, although 5-FU have great efficacy but it can affect normal cell subsequently increasing of resulting side effects. Therefore, development of new natural products for alternative-therapy is importantly needed for the treatment of CRC. The objective of this study was to investigate the effect of standardized extract of *Centella asiatica* (ECa233) on inhibition of cell viability, colony formation, migration and invasion in SW-620 human colorectal cancer cells and study of toxicity on fibroblasts cell to detect safety of ECa233. To achieve the purpose, we use MTT assay, colony formation assay, wound healing (scratch assay) and Matrigel invasion assay to demonstrate pharmacological activities. Data in each group were calculated and expressed as mean and standard deviation (mean $\pm$ SD). One-way ANOVA test was used in comparing data from more than two groups. These results demonstrated that ECa233 can inhibit cell viability on CRC in a dose and time-dependent manners after 24, 48, 72 and 96 h of treatment. ECa233 while inhibition of colony formation and migration of CRC were significantly demonstrated small effect on normal cell and invasion of CRC. Therefore, we suggest to study efficacy and safety of combination therapy with conventional medicine to develop ECa233 in the future.

Major Advisor.....

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่	
1. บทนำ	
1.1 ความที่เป็นมา และความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง	3
1.3 สมมติฐานของการทดลอง	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการทดลอง	3
1.5 ขอบเขตของการทดลอง	4
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทบทวนวรรณกรรม	5
2.1.1 พยาธิสภาพของโรค การวินิจฉัย การรักษา ระบาดวิทยา ของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์	5
2.1.2 การศึกษาสารสกัดจาก <i>Centella asiatica</i> (ECa233)	9
2.1.2.1 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ ECa233	9
2.1.2.2 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ ECa233	11
2.1.3 การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง	12
2.1.3.1 กระบวนการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็ง	12
2.1.3.2 การทำงานของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases 9 (MMP-9)	14

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
2.1.3.3 การทำงานของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases 2 (MMP-2)	15
2.1.3.4 การทำงานของเอนไซม์ Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)	16
3. วิธีดำเนินการวิจัย	17
3.1 สารบริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์	17
3.2 อุปกรณ์	17
3.3 สารเคมี	18
3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย	19
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	24
3.6 ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย	25
4. ผลการศึกษาวิจัย	26
4.1 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิตของ-เซลล์มะเร็ง โดยเทคนิค MTT cell viability assay	26
4.2 ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็ง โดยเทคนิค Colony formation assay	33
4.3 ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง โดยเทคนิค Wound healing-assay (Scratch assay)	35
4.4 ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็ง โดยเทคนิค Matrigel invasion assay	41

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
5. สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	43
5.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล	43
5.2 ข้อเสนอแนะ	45
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	50

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1-1 แสดงการแบ่งระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ A,B,C staging	8
ก-1 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์ปกติ	49
ก-2 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ของมนุษย์ วัดผลที่เวลา 24 ชั่วโมง	50
ก-3 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ของมนุษย์ วัดผลที่เวลา 48 ชั่วโมง	51
ก-4 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ของมนุษย์ วัดผลที่เวลา 72 ชั่วโมง	52
ก-5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ของมนุษย์ วัดผลที่เวลา 96 ชั่วโมง	53
ก-6 แสดงจำนวนการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233	54
ก-7 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233	54
ก-8 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233	55
ก-9 แสดงเปอร์เซ็นต์การลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	56
ก-10 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ที่เวลาเริ่มต้น เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233	56
ก-11 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233	57

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ก-12 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233	57

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1-1 แสดงพยาธิวิทยาการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในมนุษย์	7
1-2 แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัด ECa233	10
1-3 แสดงกระบวนการเคลื่อนที่และลูกกลมของเซลล์มะเร็ง	12
1-4 แสดงการทำงานของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases 9 (MMP-9)	14
4-1 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์ปกติ	26
4-2 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก วัดผลที่เวลา 24 ชั่วโมง	27
4-3 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก วัดผลที่เวลา 48 ชั่วโมง	28
4-4 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก วัดผลที่เวลา 72 ชั่วโมง	30
4-5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก วัดผลที่เวลา 96 ชั่วโมง	31
4-6 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก วัดผลที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง	32
4-7 แสดงฤทธิ์ของสารสกัด ECa233 ในการยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็ง ลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	33
4-8 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เมื่อทดสอบด้วยสารสกัด ECa233 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	34
4-9 แสดงฤทธิ์ของสารสกัด ECa233 ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนักที่เวลาเริ่มต้น	35
4-10 แสดงฤทธิ์ของสารสกัด ECa233 ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนักที่เวลา 24 ชั่วโมง	36
4-11 แสดงฤทธิ์ของสารสกัด ECa233 ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนักที่เวลา 48 ชั่วโมง	37
4-12 แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ที่เวลา 24 ชั่วโมง	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-13 แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ที่เวลา 48 ชั่วโมง	39
4-14 แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	40
4-12 แสดงการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อให้ ECa233 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	41
4-13 แสดงเปอร์เซ็นต์การลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ที่เวลา 48 ชั่วโมง	42

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นสาเหตุการตายอันดับสองของประชากรโลก และมีการลุกลามของเซลล์มะเร็งเกิดจากการที่เซลล์มีความผิดปกติของยีนจึงทำให้เซลล์เจริญเติบโตผิดปกติซึ่งอยู่นอกเหนือการควบคุมของร่างกาย ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์รอบข้างจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้อย่างปกติ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อใกล้เคียงหรืออวัยวะที่อยู่ไกลออกไป โดยผ่านทางกระแสเลือด (blood metastasis) หรือน้ำเหลือง (lymphatic metastasis) ในปัจจุบันการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ได้นำยาเคมีบำบัดสูตรดั้งเดิม (conventional chemotherapy) คือ 5-fluorouracil, irinotecan, oxaliplatin และยาเคมีบำบัดที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น (targeted therapy) คือ bevacizumab, cetuximab ซึ่งสามารถนำมาใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดสูตรดั้งเดิม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษา แต่อย่างไรก็ตามยาเคมีบำบัดสูตรดั้งเดิมยังคงนำมาใช้เป็นยาตัวเลือกแรก (first-line treatment) โดย 5-fluorouracil เป็นยาที่นำมาใช้รักษามะเร็งร่วมกับยาด้านมะเร็งตัวอื่นๆ ซึ่งการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดสูตร FOLFOX regimen เป็นการรักษาด้วยยา 3 ชนิด คือ 5-fluorouracil, leucovorin และ oxaliplatin โดยจะใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก⁽¹⁾ เนื่องจาก 5-fluorouracil (5-FU) เป็นยาหลักที่ใช้เป็นยาอันดับแรกในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก จากการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับยา 5-FU โดยวิธีการให้ยาเข้าหลอดเลือดดำโดยตรงภายในระยะเวลาสั้นๆ (intravenous bolus) ต่อมาได้รับยา 5-FU เข้าหลอดเลือดดำด้วยอัตราเร็วคงที่ (continuous infusion) พบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับ 5-FU เพียงตัวเดียวมีอัตราการตอบสนอง (response rates) เป็น 7-8% ซึ่งเป็นอัตราการตอบสนองต่อยาที่ต่ำ อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยที่ได้รับ 5-FU+leucovorin (LV) แบบเข้าหลอดเลือดดำด้วยอัตราเร็วคงที่ พบว่าอัตราการตอบสนองต่อยาเป็น 16% ซึ่งสูงกว่าการให้ยา 5-FU เพียงตัวเดียว เมื่อทำการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro* studies) พบการดื้อต่อยา 5-FU ซึ่งมีกลไกต่างกันระหว่างการให้ยาแบบ intravenous bolus และ continuous infusion จากการศึกษาพบว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ thymidylate synthase หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ thymidylate synthase มีความสัมพันธ์กับการดื้อของยา 5-FU เมื่อใช้ยาในระยะเวลาสั้น (short term exposure) แต่เมื่อใช้ยา 5-FU ในระยะยาว (long term exposure) ไม่ทำให้เกิดการดื้อต่อยา 5-FU และพบว่าการใช้ leucovorin ทำให้ยา 5-FU ยับยั้งเอนไซม์ thymidylate synthase ได้เพิ่มขึ้น และเพิ่มการทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับ 5-FU ดังนั้นเมื่อใช้ 5-FU ร่วมกับ leucovorin ให้ผลการรักษาที่ดีกว่าการใช้ 5-FU ตัวเดียว

ในปัจจุบันนี้การให้ยา 5-FU โดยวิธีให้ยาเข้าหลอดเลือดดำโดยตรงภายในระยะเวลาสั้นๆ (intravenous bolus) และแบบเข้าหลอดเลือดดำด้วยอัตราเร็วคงที่ (continuous infusion) ไม่ใช่เป็นทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่แพร่กระจาย (mCRC) ในระยะยาว ดังนั้นการรักษาเริ่มต้น (first line treatment) จะใช้ 5-FU ร่วมกับ leucovorin และสามารถให้ 5-FU ร่วมกับ oxaliplatin หรือ 5-FU ร่วมกับ irinotecan เป็นการรักษารอง (second line treatment) การใช้ยา 5-FU ในขนาดสูงทำให้เกิดการดื้อยาแบบผันกลับได้ (reverses resistance) จึงไม่แนะนำให้ใช้ยาในขนาดสูง ดังนั้นการใช้ 5-FU ร่วมกับ oxaliplatin หรือ irinotecan ให้ผลทางการรักษาที่ดีกว่า และ ลดการดื้อยาได้ดีกว่า⁽²⁾ และผลที่เกิดขึ้นจากการใช้ยา 5-FU มีผลต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเร็ว ดังนั้นการพัฒนายาเคมีบำบัดชนิดใหม่จึงมีความจำเป็นอย่างมาก โดยใช้สารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ได้จากพืชสมุนไพรเป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการพัฒนายาต้านมะเร็ง จึงจำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชสมุนไพร เพื่อนำมาพัฒนาในการใช้รักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักต่อไป โดยพบว่าในประเทศไทยมีลักษณะภูมิอากาศแบบร้อนชื้นจึงพบต้นบัวบก (*Centella asiatica*) ขึ้นโดยทั่วไปในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเป็นพืชสมุนไพรไทยในตำรับอายุรเวท ซึ่งคนไทยนิยมบริโภคบัวบกมาเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของบัวบก เป็นการเพิ่มคุณค่าสมุนไพรไทย และส่งเสริมเศรษฐกิจของประเทศไทยจากการใช้พืชสมุนไพรในท้องถิ่นอีกทั้งเป็นประโยชน์แก่วงการแพทย์ในการศึกษาต่อยอดในอนาคต จากการศึกษา ECa233 เป็นสารที่สกัดมาจากบัวบก (*Centella asiatica*) ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์สมานแผล ฤทธิ์ลดความกังวล ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท ฤทธิ์ต้านสารออกซิเด้นท์ ฤทธิ์ปกป้องหัวใจ และ ฤทธิ์ลดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในสมอง⁽³⁾

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการรอดชีวิตและการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620
2. เพื่อศึกษาถึงความปลอดภัยของสารสกัดบัวบก ECa233 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620

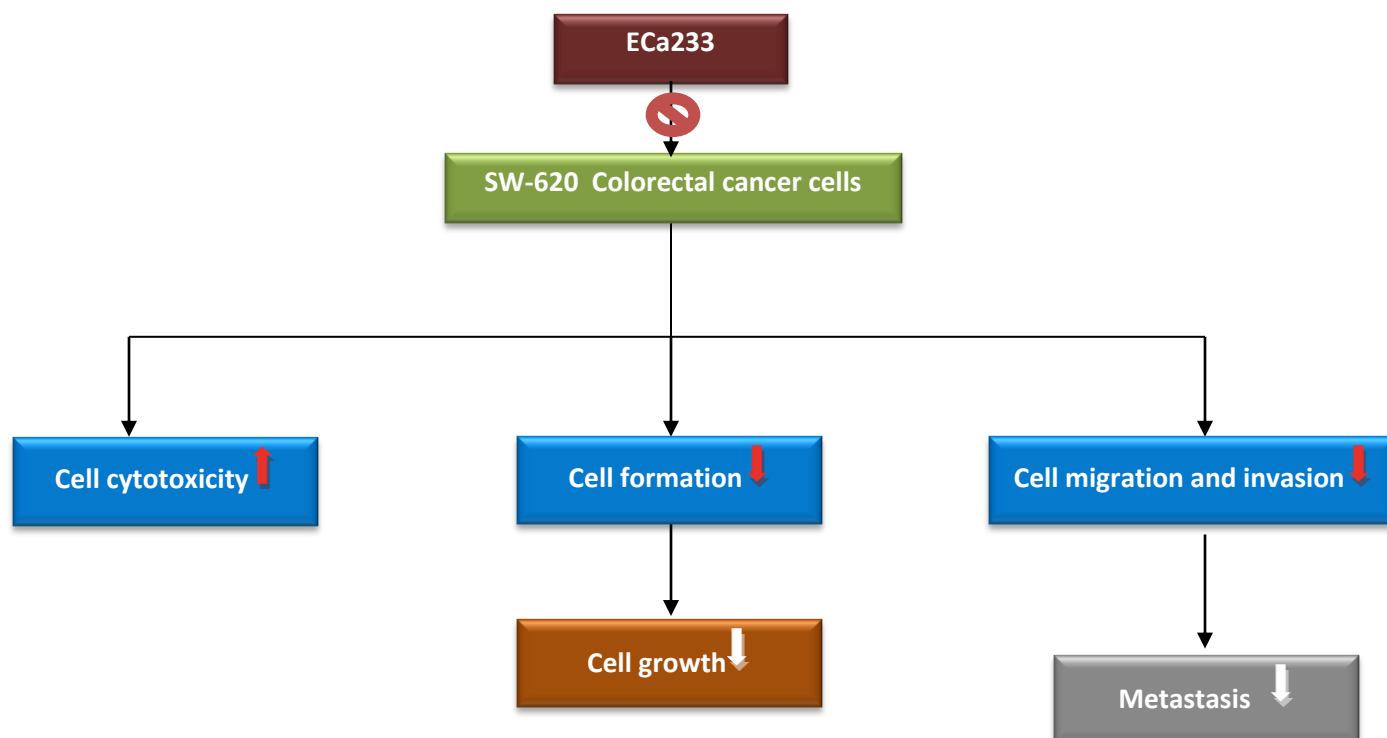
สมมติฐาน

คาดว่าสารสกัดบัวบก ECa233 มีฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิต, การเจริญเป็นโคโลนี, การเคลื่อนที่, การลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 ได้ และสารสกัดบัวบก ECa233 น่าจะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อให้ทราบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดบัวบก ECa233 มีผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์
2. เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับความปลอดภัยของสารสกัดบัวบก ECa233 มากขึ้น
3. เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิจัยต่อยอดในสัตว์ทดลองและในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในอนาคต
4. มีการพัฒนาสมุนไพรไทยมาใช้ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์และนำมาพิจารณาเป็นการรักษาทางเลือก (Alternative therapy) ในอนาคต
5. เพื่อเพิ่มมูลค่าพืชสมุนไพรไทยและส่งเสริมการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจในประเทศไทย

ขอบเขตของการทดลอง



บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทบทวนวรรณกรรม

2.1.1 พยาธิสภาพของโรค การวินิจฉัย การรักษา ระบาดวิทยา โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์

ลำไส้ใหญ่ประกอบด้วยชั้นกล้ามเนื้อ 4 ชั้นหลักๆ คือ ชั้นเยื่อเมือก (mucosa) ชั้นใต้เยื่อเมือก (submucosa) ชั้นกล้ามเนื้อ (muscular layer) และชั้นนอกสุดเป็นเยื่อหุ้ม serosa โดยในชั้น submucosa จะเป็นชั้นของระบบน้ำเหลือง ชั้น muscularis เป็นชั้นกล้ามเนื้อที่มีหน้าที่ทำให้ลำไส้ใหญ่บีบตัว จึงเกิดการเคลื่อนไหว เยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่ (epithelial) จะประกอบด้วยเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ซึ่งบริเวณเยื่อบุผิวนี้นี้จะมีการสร้างเซลล์ทดแทนทุก 4-8 วัน โดยการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่จะเกิดในกระบวนการสร้างเยื่อบุผิวทดแทนถ้าได้รับสารก่อมะเร็ง (carcinogen) จะกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวมากจนไม่สามารถควบคุมได้และทำให้เป็นมะเร็งในที่สุด การเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่จะเป็นแบบ multi-step เริ่มจากเซลล์ปกติเปลี่ยนเป็น adenomas และเป็น carcinomas ในที่สุด

ลำไส้ใหญ่ เป็นอวัยวะส่วนปลายของระบบทางเดินอาหาร มีลักษณะเป็นท่อนกลวง ผนังมีความยืดหยุ่นสูง ทำหน้าที่เก็บกักเศษอาหารที่ผ่านกระบวนการดูดซึมสารอาหารจากลำไส้เล็กในผู้ใหญ่ ลำไส้ใหญ่จะมีความยาวประมาณ 150 เซนติเมตร ส่วนต้นของลำไส้ใหญ่จะกว้างกว่าส่วนปลาย แบ่งออกเป็น 5 ส่วน ได้แก่ cecum เป็นส่วนต้นของลำไส้ใหญ่ที่ต่อจากลำไส้เล็กส่วนปลาย ileum อยู่ทางด้านขวาของร่างกาย มี ileocecal valve ป้องกันการไหลย้อนกลับของอาหารสู่ลำไส้เล็กได้ต่อ ileocecal valve มีไส้ติ่งอยู่ ลำไส้ใหญ่ส่วนขาขึ้น (ascending colon) ยาวประมาณ 15 เซนติเมตร ลำไส้ใหญ่ส่วนแนวขวาง (transverse colon) ยาวประมาณ 45 เซนติเมตร ลำไส้ใหญ่ส่วนขาลง (descending colon) ยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ลำไส้ใหญ่ส่วนคดเคี้ยว (sigmoid colon) ยาวประมาณ 45 เซนติเมตร และลำไส้ตรงยาวประมาณ 12 เซนติเมตร ลักษณะทางพยาธิสภาพของมะเร็งลำไส้ใหญ่ ร้อยละ 98 เป็นชนิด adenocarcinoma ที่เหลือเป็นชนิด carcinoid หรือ lymphoma ผู้ป่วยจะมาพบแพทย์ด้วยอาการต่างๆกัน ขึ้นกับตำแหน่งของก้อนมะเร็ง ซึ่งการรักษาจะแตกต่างกัน

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นสาเหตุการตายอันดับสองของประชากรโลก รองจากมะเร็งปอด ถึงแม้จะพบอุบัติการณ์ต่ำกว่ามะเร็งชนิดอื่น แต่มีอัตราการตายที่สูงกว่า เนื่องมาจากการตรวจคัดกรองโรคยังไม่มีประสิทธิภาพดีพอ ทำให้ผู้ป่วยมาพบแพทย์เมื่อมีการดำเนินไปของโรครุนแรงแล้ว และขาดวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพในประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ.2553-2555 พบว่าโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เป็นมะเร็งที่พบ

บ่อยเป็นอันดับสามในผู้ชายและพบบ่อยเป็นอันดับห้าในผู้หญิง อุบัติการณ์ของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในประเทศไทยที่พบมากที่สุดคือในบริเวณจังหวัดชลบุรีและกรุงเทพมหานครและพบน้อยที่สุดที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี⁽⁴⁾ ส่วนใหญ่จะเกิดโรคนี้นี้ในคนอายุมากกว่า 50 ปี ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ (histology) ที่พบบ่อย คือ Adenocarcinoma และมีแนวโน้มว่าอุบัติการณ์ของโรคนี้นี้กำลังเพิ่มขึ้นทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆทั่วโลก โดยพบว่าอุบัติการณ์ที่สูงที่สุดในโลก พบในผู้ชายที่อาศัยอยู่ในเมือง Hiroshima ประเทศญี่ปุ่น โดยสาเหตุของการมีอุบัติการณ์และอัตราการตายที่เพิ่มขึ้น คาดว่าน่าจะมาจากการเปลี่ยนแปลงวิถีการดำเนินชีวิตที่รับประทานอาหารที่มีไขมันจากสัตว์มากขึ้นและรับประทานอาหารที่มีใยอาหาร (fiber) ลดลง ปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักได้แก่ อายุมากกว่า 50 ปี, ประวัติครอบครัวและพันธุกรรม, สูบบุหรี่และความอ้วนหรือน้ำหนักตัวเกิน เป็นต้น การป้องกันทำได้โดยทำการคัดกรอง (screening) อย่างสม่ำเสมอ, ออกกำลังกายและรักษาน้ำหนักตัวให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ, รับประทานอาหารที่มีใยอาหารสูง เช่น ผัก ผลไม้, งดสูบบุหรี่และหลีกเลี่ยงการดื่มแอลกอฮอล์ หากปฏิบัติตัวตามวิธีข้างต้นจะช่วยลดอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักได้

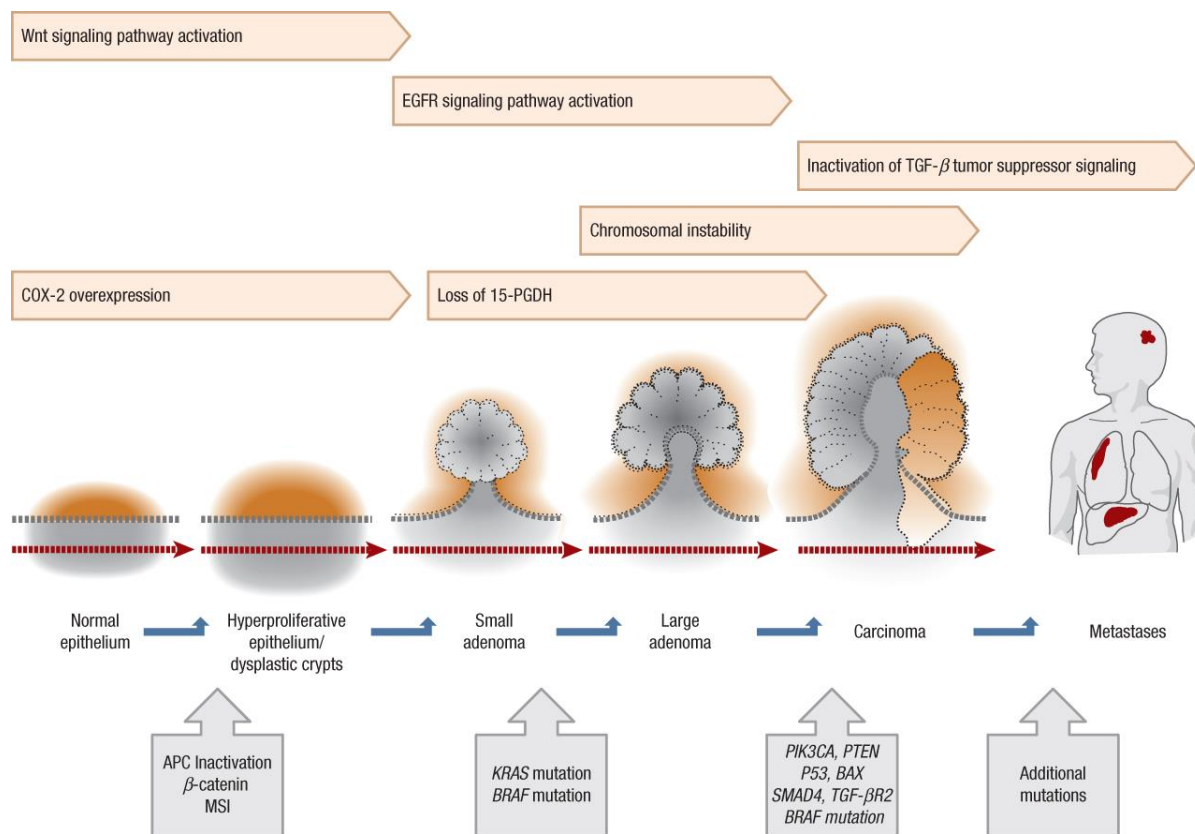
มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักแบ่งเป็น 4 รูปแบบ คือ ลักษณะเจริญเป็นก้อน (fungating) ลักษณะเจริญเป็นแผล (ulcerating) ลักษณะตีบแคบ (stenosing) และ ลักษณะบีบรัด (constrictive) ซึ่งมีลักษณะเป็นวงรอบลำไส้ใหญ่ ตำแหน่งที่เกิดส่วนใหญ่จะพบบริเวณ sigmoid colon และ rectum โดยมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่เกิดด้านขวาจะมีรอยโรคเป็นก้อนและเจริญเข้าไปในช่องทางเดินอาหารและมักโตตามแนวยาวของลำไส้ใหญ่ มะเร็งลำไส้ใหญ่ที่เกิดด้านซ้ายจะมีรอยโรคเป็นแผลมักเจริญเข้าไปในผนังลำไส้ใหญ่และโตตามแนวขวางรอบลำไส้ใหญ่ โดยเซลล์มะเร็งที่พบบ่อยคือ เซลล์ชนิด adenocarcinoma การกระจายของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเกิดขึ้นได้หลายวิธี แต่ที่สำคัญได้แก่

1. การลุกลามเฉพาะที่ Dukes พบว่าการลุกลามเฉพาะที่จะเกิดหลังจากการเจริญเติบโตที่เยื่อผิวของผนังลำไส้ใหญ่ จากนั้นลุกลามในแนวขวางทำให้เกิดรอยโรคเป็นวงอาจทะลุออกนอกลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดเป็นซ้ำเฉพาะที่หลังการรักษา

2. การแพร่กระจายทางน้ำเหลือง ค.ศ.1930 Dukes ให้ข้อสรุปเกี่ยวกับการแพร่กระจายทางน้ำเหลืองของมะเร็งลำไส้ใหญ่ส่วนทวารหนักว่า เส้นทางการแพร่กระจายเริ่มจากการกระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองรอบๆลำไส้ใหญ่ (perirectal node) ในระดับใกล้เคียงกับก้อนมะเร็งแล้วกระจายขึ้นไปตามต่อมน้ำเหลืองรอบเส้นเลือด (superior hemorrhoidal) แล้วกระจายไปสู่ส่วนบน โอกาสพบการแพร่กระจายข้ามลำดัดขึ้น (skip metastasis) เกิดได้น้อยมาก

3. การแพร่กระจายทางเลือด โดยจะแพร่ผ่านหลอดเลือดดำที่นำเลือดกลับเข้าสู่หัวใจและจะแพร่กระจายจากลำไส้ใหญ่ไปยังตับมากที่สุด

4. การฝังตัวของเซลล์มะเร็ง จะเกิดเมื่อเซลล์มะเร็งมีการหลุดออก (tumor shedding) จากก้อนมะเร็งเดิม แล้วไปฝังตัวและโตที่บริเวณอื่น สำหรับมะเร็งลำไส้ใหญ่เมื่อเซลล์มะเร็งหลุดจะแทรกผ่านผนังลำไส้ใหญ่ออกไปเยื่อบุผิวด้านนอก แล้วไปฝังตัวที่เยื่อช่องท้อง



Source: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM: *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, Ninth Edition: www.accesspharmacy.com
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

ภาพที่ 1-1 แสดงพยาธิวิทยาการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในมนุษย์

รูปภาพจาก. Davis LE, Sun W, Medina PJ. Chapter 107. Colorectal Cancer. In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey L. eds. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 9e New York, NY: McGraw-Hill; 2014.

ระบบการแบ่งระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (staging system) มีอยู่หลายระบบ แบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆได้ดังนี้ 1. Duke classification 2. Austratian clinico-pathological staging (ACPS) 3. TNM staging โดยระบบที่มีความสำคัญและเป็นระบบที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ Duke classification ซึ่งใช้ความลึกใน

การลุกลามของเซลล์มะเร็งและการแพร่กระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียงและอวัยวะอื่นเป็นเกณฑ์ในการแบ่งระยะโรค

ตารางที่ 1-1 แสดงการแบ่งระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ A,B,C staging

ระยะ	ลักษณะอาการ
stage A	การเจริญของเซลล์มะเร็งจำกัดอยู่ในผนังทวารหนัก
stage B	การเจริญของเซลล์มะเร็งขยายออกนอกทวารหนัก แต่ยังไม่แพร่กระจายไปตามน้ำเหลือง
stage C	การเจริญของเซลล์มะเร็งมีการแพร่กระจายที่เกี่ยวข้องกับต่อมน้ำเหลือง
stage C1	แพร่กระจายเฉพาะบริเวณต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง
stage C2	แพร่กระจายที่ต่อมน้ำเหลืองและกระจายไปตามหลอดเลือด

ตารางจาก; กษยา ตันติผลาชีวะ จว, จิรวัดน์ พัฒนอรุณ และคณะ ตำรามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก 2554;l:66-67

ระบบการแบ่งระยะของโรคแบบ TNM ซึ่งใช้จำนวนของต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียงที่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งมาเป็นเกณฑ์ ซึ่งจะต้องทำการตรวจจากชิ้นเนื้อและการผ่าตัด⁽⁵⁾

การวินิจฉัยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ มีทั้งวินิจฉัยจากอาการผู้ป่วยและการตรวจคัดกรองเบื้องต้น โดยการตรวจคัดกรองเบื้องต้นมักใช้วิธีการวินิจฉัยด้วยการส่องกล้องตรวจลำไส้ใหญ่ (colonoscopy) และสวนแป้งตรวจลำไส้ใหญ่ (air contrast barium enema) หากกรณีไม่มีปัจจัยเสี่ยงส่วนบุคคลและครอบครัว แนะนำให้ตรวจเลือดที่อยู่ในอุจจาระ (fecal occult blood test) ทุกปี และการส่องกล้องตรวจลำไส้ใหญ่ส่วนขาด (sigmoidoscopy) ทุก 3-5 ปี ในผู้ป่วยอายุตั้งแต่ 50 ขึ้นไป

การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในปัจจุบันมี 4 วิธีหลักในการรักษา ได้แก่ การผ่าตัด การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด การฉายรังสี และการรักษาแบบเซลล์ภูมิคุ้มกันบำบัด โดยการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการรักษา ปัจจุบันมีการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักระยะแพร่กระจายด้วยการใช้ยาเคมีบำบัดชนิดเดียว และยาเคมีบำบัดแบบผสมผสาน ในส่วนการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในระยะแพร่กระจายด้วยยาเคมีบำบัดชนิดเดียวนั้น ยา 5-FU เป็นยาเดี่ยวที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย และเป็น

ยาเคมีบำบัดตัวแรกที่นิยมนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดย 5-FU เป็นที่รู้จักตั้งแต่ปี พ.ศ. 2500 (ค.ศ.1957) มีฤทธิ์ Anti-metabolite⁽⁶⁾ ยา 5-FU มีกลไกยับยั้งเอนไซม์ Thymidylate synthase (TS) โดยที่ยา 5-FU จะออกฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเนื้อเยื่อปกติ และในทางคลินิกการตอบสนองต่อยา 5-FU จะแตกต่างกันในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่แต่ละราย แม้ว่าจะมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Thymidylate synthase (TS) เหมือนกัน⁽⁷⁾ ถ้าให้ 5-FU ในขนาดสูงผู้ป่วยส่วนใหญ่มักเกิดผลข้างเคียง ได้แก่ เยื่อเมือกอักเสบ อูจาระร่วง และ เม็ดเลือดขาวต่ำ⁽⁸⁾ โดยพบปัญหาในการใช้ยา 5-FU คือการเกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยาและการดื้อต่อยา จึงมีการพัฒนาการรักษาแบบผสมผสาน (combination therapy) โดยใช้สารสำคัญในพืชสมุนไพรซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งร่วมกับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ซึ่งสารสกัดจากพืชสมุนไพรจะมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาเคมีบำบัด โดยจะต้องศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ความปลอดภัยและพิษวิทยาของสารสำคัญที่สกัดจากพืชสมุนไพรก่อนการนำมาใช้ งานวิจัยนี้จึงเห็นถึงความสำคัญในการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดบวบก ECa233 เพื่อพัฒนาไปสู่การรักษาแบบผสมผสานด้วยสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อไปในอนาคต

2.1.2 การศึกษาสารสกัดจาก *Centella asiatica* (ECa233)

2.1.2.1 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดบวบก ECa233

มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงสมุนไพรจากบวบก (*Centella asiatica*) ชื่อสารที่สกัดได้ คือ ECa233 จากการศึกษาของ รศ.ภญ.ดร.มยุรี ดันตสิริระ และคณะ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีการรายงานว่าสารสกัด ECa233 มีฤทธิ์เร่งการสมานแผล ทั้งในบาดแผลกรีดด้วยของมีคมและแผลไฟไหม้ เมื่อนำไปทดลองแก้ไขสภาวะการบกพร่องของการเรียนรู้และทางความจำ โดยใช้วิธีปิดกั้นหลอดเลือดที่ขึ้นไปเลี้ยงสมองชั่วคราวเพื่อให้หนูทดลองเกิดอาการเรียนรู้ช้าและลืม แล้วทดสอบด้วยการป้อนสารสกัดติดต่อกัน 90 วัน พบว่าหนูทดลองมีการเรียนรู้ที่ดีขึ้นจนใกล้เคียงกับหนูทดลองปกติมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ได้ด้วย⁽⁹⁾ และจากการศึกษาของ Narumol Ruamsuk, Thitima Pengsuparp และ Suree Jianmongkol มีการรายงานว่าสารสกัดบวบก ECa233 และ asiaticoside (ATS) ในการให้ร่วมกันกับ Vinblastine (VBL) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งพบว่าเมื่อให้ยา ร่วมกับ ECa233 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้⁽¹⁰⁾

ECa233 เป็นสารสกัดจากบวบก (*Centella asiatica*) โดยประกอบด้วย triterpenoids ไม่น้อยกว่า 80% และอัตราส่วนระหว่าง madecassoside และ asiaticoside เป็น 1.5 ± 0.5 สารสกัดบวบก ECa233 เป็นสารสกัดที่มีสีขาวถึงขาวอมเหลือง มีการศึกษาในสัตว์ทดลอง (Preclinical evaluation) พบว่าสารสกัดบวบก ECa233 มีฤทธิ์ปกป้องทางเดินอาหาร (gastro-protective effect) มีฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้ (learning) ความจำ (memory) และมีการศึกษาการใช้ สารสกัดบวบก ECa233 แบบใช้ภายนอก (topical application) ในการ

สมานบาดแผลจากรอยผ่า (incision) และแผลไฟไหม้ (burn wounds) ซึ่งมีส่วนประกอบหลัก คือ triterpenoids และมีฤทธิ์ทางชีววิทยา (biological effects) คือ ฤทธิ์ในการปกป้องตับ (hepatoprotective) ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด (hypoglycemic) ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (anti-tumor) โดย madecassoside และ asiaticoside เป็นสารกลุ่ม triterpenes ชนิด ursane-type มีรายงานการศึกษาพบว่า มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacological effects) ซึ่งสาร madecassoside และ asiaticoside ไม่ทำให้เกิดพิษที่ความเข้มข้นสูง และ triterpenoids มีการละลายน้ำต่ำ (low solubility) ค่าครึ่งชีวิตต่ำ (short half-life) และมีค่าชีวประสิทธิผลต่ำ (poor bioavailability) จึงเป็นข้อจำกัดในการนำสาร triterpenes มาใช้เป็นยา ต้องมีการปรับปรุงคุณสมบัติทางยา เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางคลินิก⁽¹¹⁾

มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดบัวบก ECa233 แสดงถึงฤทธิ์คลายกังวล (anxiolytic effect) โดยศึกษาในหนู mice ที่มีภาวะ acute immobilization และ chronic immobilization stress พบว่าให้ผลทางการรักษา⁽³⁾ ในการศึกษาการเกิดพิษของสารสกัดบัวบก ECa233 พบว่าเมื่อให้สารสกัดบัวบก ECa233 โดยวิธีการกิน (oral administration) ขนาด 10.0 g/kg ในหนู mice พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 ไม่ทำให้เกิดพิษและเกิดการตายภายในระยะเวลา 14 วันที่ทดสอบ เมื่อทำการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้กลุ่มทดลองได้รับ สารสกัดบัวบก ECa233 โดยวิธีการกิน (oral administration) ขนาด 10, 100, และ 1,000 mg/kg/day เป็นระยะเวลา 90 วัน และพบว่าหนู rat เพศเมียที่ได้รับสารสกัดบัวบก ECa233 ขนาด 1,000 mg/kg/day มีค่า white blood cell สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน (internal organs) ไม่พบอุบัติการณ์การเกิดพยาธิสภาพเมื่อเพิ่มขนาดของสารสกัดบัวบก ECa233 จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าขนาดสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ 10.0 mg/kg ไม่ทำให้เกิด acute toxicity และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการเกิด sub-chronic toxicity เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองในหนู rat ในการให้สารสกัดบัวบก ECa233 ขนาด 10-1,000 mg/kg⁽¹²⁾



ภาพที่ 1-2 แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดบัวบก ECa233

รูปภาพจาก; http://www.research.chula.ac.th/web/rs_news/2551/N011_9.htm

มีการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากบัวบก *Centella asiatica* (ECa233) ในรูปแบบยาป้ายปาก ในการรักษาแผลร้อนในที่ปากโดยศึกษาในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่มีแผลร้อนในที่ปากจำนวน 24 คน จากการสุ่ม แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม โดยใช้สารสกัดบัวบก ECa233 แบบป้ายปากเปรียบเทียบกับ placebo โดยให้ป้ายที่ปากวันละ 3 ครั้ง (หลังอาหารเช้า หลังอาหารเที่ยง และก่อนนอน) เป็นเวลา 10 วัน โดยวัดผลจาก จำนวนแผลร้อนในที่ ขนาด และระดับความเจ็บปวด (pain score) พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 สามารถลด ขนาดของแผลร้อนในที่ได้ดีกว่า placebo อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถลดค่าเฉลี่ยคะแนนระดับความ เจ็บปวด (pain score) ได้ดีกว่า placebo อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ายา ป้ายปากที่มีส่วนประกอบจากสารสกัดบัวบก ECa233 มีความปลอดภัย ประสิทธิภาพในการลดความเจ็บปวด และลดขนาดแผลร้อนในที่ ซึ่งสามารถพัฒนาต่อยอดในการนำสารสกัดบัวบก ECa233 มาใช้ในการรักษาแผล ร้อนในที่ได้อีกในอนาคต⁽¹²⁾

2.1.2.2 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ ECa233

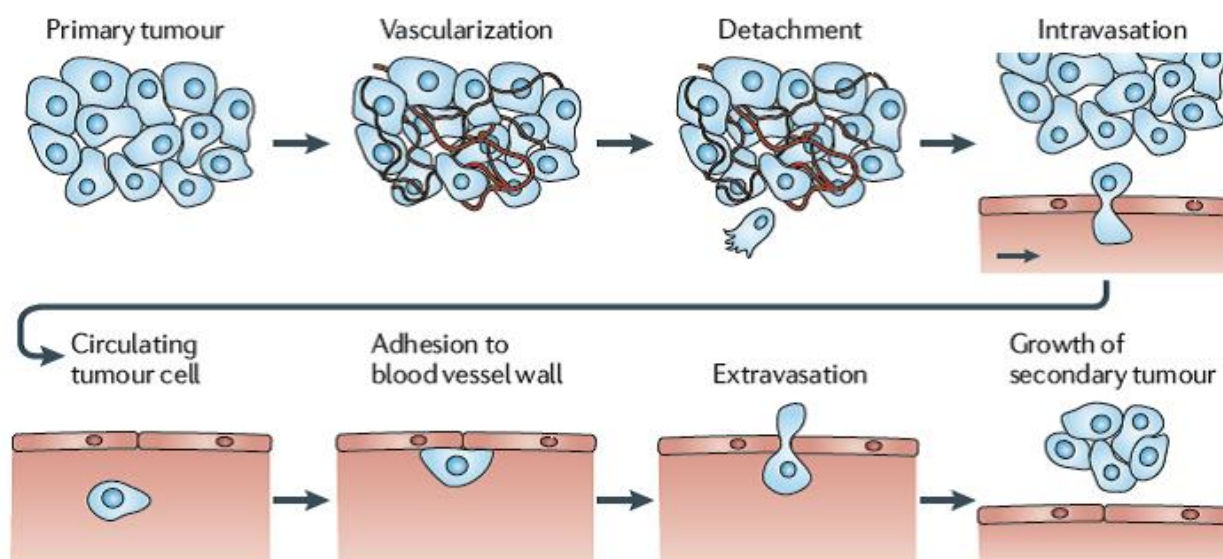
จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) ของสารสกัดบัวบก (*Centella asiatica*) ECa233 ในหนู Rat ของ Anukunwithaya T, Tantisira MH และคณะ พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 ซึ่งเป็นสารสกัดมาตรฐานของบัวบก (*Centella asiatica*) พบว่ามีผลต่อระบบประสาทและมีความ ปลอดภัย ซึ่งสารสำคัญที่พบในสารสกัดบัวบก ECa233 ได้แก่ madecassoside และ asiaticoside ซึ่งเป็น สารประกอบในกลุ่ม triterpenoid glycoside ซึ่งการศึกษานี้ได้ทำการทดลองในหนูโดยการให้สารสกัดบัวบก ECa233 ทางการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำหรือกินในปริมาณตั้งแต่ 50 ถึง 200 mg/kg หลังจากหนูทดลอง ได้รับสารสกัดบัวบก ECa233 ไปแล้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมงจะทำการวัดระดับความเข้มข้นของสาร madecassoside และ asiaticoside ในเลือด ในเนื้อเยื่อ ในปัสสาวะและอุจจาระ พบว่าสารทั้งสองตัวมีการดูด ซึมที่รวดเร็วภายใน 5-15 นาที หลังจากการให้แบบกิน แต่มีค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) ที่ต่ำ พบว่าน้อย กว่า 1% และพบว่าสารทั้งสองตัวใช้เวลานานในการกระจายตัวเข้าสู่สมอง กระเพาะอาหารและผิวหนังโดยจะ ใช้เวลา 1-4 ชั่วโมง ในการกระจายตัว และพบว่าสารทั้งสองตัวส่วนใหญ่จะกำจัดออกในรูปแบบไม่เปลี่ยนแปลง (unchange form) หลังจากการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำและกำจัดออกทางอุจจาระหลังจากการกิน⁽¹³⁾

จากการศึกษาการเปรียบเทียบ pharmacokinetics ระหว่าง madecassoside และ asiaticoside จาก การสกัดบัวบก ECa233 ในหนูทดลอง ของ Patcharaporn Hengjumrut, Mayuree H.Tantisira และคณะ โดยได้ทำการศึกษาความทน (tolerance) ต่อการให้สารสกัดบัวบก ECa233, ระดับความเข้มข้นของสารสกัด บัวบก ECa233 ในกระแสเลือดที่ระยะเวลาต่างๆ (plasma concentration-time profiles) และค่าชีว ประสิทธิผล (oral bioavailability) การกระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อ (tissue distribution) กระบวนการเผาผลาญ

(metabolism) และการกำจัดออกจากร่างกาย (excretion) จากผลการศึกษาพบว่าหนูสามารถทนต่อการให้ สารสกัดบัวบก ECa233 ไม่พบการเกิดพิษและการเปลี่ยนแปลงค่าเอนไซม์ตับ ได้แก่ Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT) ผลของระดับความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 ในกระแสเลือดที่ระยะเวลาต่างๆ (plasma concentration-time profiles) และค่าชีวประสิทธิผล (oral- bioavailability) พบว่าสารทั้งสองตัวมีการดูดซึมที่รวดเร็ว โดยจากการตรวจเลือดภายใน 5 นาที และมี ค่า bioavailability มีค่าต่ำมาก ผลของ tissue distribution พบว่ามีการกระจายตัวได้อย่างรวดเร็ว โดยกระจายตัวได้มากในตับ ไต หัวใจ และปอด จากผล metabolism และ excretion พบว่าสารทั้งสองตัวกำจัดออกทางปัสสาวะ ในรูป unchange form น้อยกว่า 2% และกำจัดออกทางอุจจาระในรูป metabolites 80-90%⁽¹⁴⁾

2.1.3 การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Cancer Metastasis)

2.1.3.1 กระบวนการเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็ง



ภาพที่ 1-3 แสดงกระบวนการเคลื่อนที่และลุกลามของเซลล์มะเร็ง

รูปภาพจาก; Wirtz, D., K. Konstantopoulos, et al. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. Nature Reviews Cancer 11(7): 512-522. (2011)

ความสามารถของเซลล์มะเร็งในการแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆ เป็นสาเหตุหลักในการเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง ซึ่งโดยปกติแล้วเซลล์มะเร็งจะเกิดในบริเวณใดบริเวณหนึ่ง เมื่อเซลล์มะเร็งมีการแพร่กระจายไปยัง

บริเวณอื่นๆ ทำให้ยากต่อการควบคุม ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า Metastasis โดยเซลล์มะเร็งจะถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย กระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเกิดขึ้นหลายขั้นตอน โดยเซลล์มะเร็งจะเคลื่อนที่เข้าไปในระบบน้ำเหลืองและระบบเลือด และแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆ ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กระบวนการหลักคือ

1. Metastasis initiation เป็นกระบวนการที่เซลล์สลาย extracellular matrix (ECM) และ basement membranes ซึ่งประกอบด้วย collagen IV, laminin, entactin และ heparan sulfate proteoglycans โดยเกิดผ่านสองกระบวนการ คือ adhesion และ matrix dissolution

1.1 Adhesion โดยปกติแล้ว Epithelial cells จะทำหน้าที่ให้เซลล์เชื่อมติดกัน เช่น tight junctions, adherens junctions และ desmosomes โมเลกุลที่ทำให้ภายในเซลล์เชื่อมติดกัน เช่น E-Cadherin การเกิดกระบวนการ metastasis ทำให้เซลล์เกิดการหลุดออกจาก epithelium และเกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ cell adhesion components ทำให้สูญเสีย E-Cadherin ส่งผลให้เซลล์หลุดออกจากกัน

1.2 Matrix dissolution เซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น และมีการสลาย ECM ซึ่งเอนไซม์ที่สำคัญคือ Matrix metalloproteinases (MMPs) มีคุณสมบัติเป็น collagenase, gelatinase, stromelysin และ proenzyme ส่งผลต่อการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ถูกควบคุมโดย endogenous MMP inhibitors ได้แก่ α_2 macroglobulin และ tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) ความไม่สมดุลกันของ MMPs และ MMP inhibitors ทำให้ MMPs เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการสลาย ECM และยังส่งผลต่อการกระตุ้นให้สร้างหลอดเลือดที่ผิดปกติทั้งขนาด รูปร่าง การจัดเรียงตัว องค์ประกอบ การเจริญเติบโตและคุณสมบัติทั่วไปของหลอดเลือด โดยเฉพาะ MMP-9 ส่งผลให้เซลล์มะเร็งแพร่กระจายและลุกลามไปเนื้อเยื่ออื่นได้

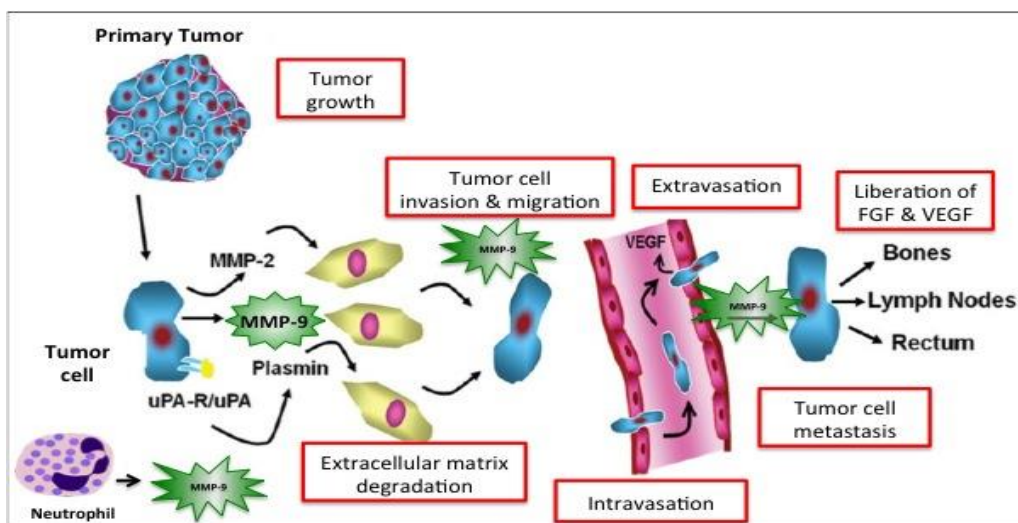
2. Metastatic dissemination กระบวนการนี้เกิดจากเซลล์มะเร็งเคลื่อนที่เข้าระบบเลือดและน้ำเหลือง มีการหลบหนีจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีการยึดเกาะกับโมเลกุลที่ผิวเซลล์ของผนังของหลอดเลือด และไปเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดการตอบสนองน้อยลง

3. Metastatic colonization กระบวนการนี้เกิดจากเซลล์มะเร็งออกจากระบบเลือดโดยใช้เอนไซม์ย่อยผนังหลอดเลือดและบุกรุกเนื้อเยื่อบริเวณนั้น หรือในบางกรณีเซลล์มะเร็งอาจเพิ่มจำนวนก่อน และบุกรุกเซลล์ผนังหลอดเลือดและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพื่อแทรกตัวเข้าไปยังอวัยวะใหม่ ทำให้มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างต่อเนื่อง⁽¹⁵⁾

เอนไซม์ Matrix metalloproteinase (MMPs)

บทบาทของเอนไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs) ในการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เกิดขึ้นได้หลายขั้นตอน คือ การสลาย basement membrane และแพร่เข้าไปใน stroma ทำให้เซลล์มะเร็งเข้าไปในระบบเลือดและน้ำเหลืองแพร่ไปยังอวัยวะอื่นๆ ทำให้เซลล์มะเร็งมีการเพิ่มจำนวนและสร้างหลอดเลือดในอวัยวะอื่นๆ ซึ่งการเกิด invasion คือ เกิดการสลาย extracellular matrix (ECM) เช่น collagen, proteoglycans, fibronectin, laminin และ glycoproteins⁽¹⁶⁾ ซึ่งเอนไซม์ MMPs ที่ประกอบไปด้วยสังกะสี (zinc) และ แคลเซียม (calcium) เป็นเอนไซม์ที่ใช้สลายสารจำพวกโปรตีน⁽¹⁶⁾ โดยย่อย ECM รวมทั้ง collagen, laminin, fibronectin, vitronectin, elastin และ proteoglycans⁽¹⁷⁾ เอนไซม์ MMPs เป็นเอนไซม์ที่มีส่วนสำคัญต่อการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยแบ่งเป็นหลาย subgroups ตามโครงสร้างและหน้าที่ เช่น collagenases, stromelysins และ stromelysin-like, matrilysins, gelatinases และ membrane-type MMPs (MT-MMPs) โดยเอนไซม์ Gelatinases มี 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ MMP-2 (gelatinase A) และ เอนไซม์ MMP-9 (gelatinase B) มีบทบาทสำคัญในการสลาย collagen type IV และ gelatin ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของ ECM การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดเซลล์มะเร็งและทำให้เซลล์มะเร็งมีการแพร่กระจายจากการศึกษาทางห้องทดลองและทางคลินิก⁽¹⁶⁾

2.1.3.2 การทำงานของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases 9 (MMP-9)



ภาพที่ 1-4 แสดงการทำงานของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases 9 (MMP-9)

Successive MMP-9 mediated biological events leading to cancer metastasis

รูปภาพจาก; <http://www.calypsobiotech.com/site/en/science-a-medicine/mmp-9-in-ibd-and-metastatic-cancers/>

เอนไซม์ Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) เป็นเอนไซม์ชนิด gelatinase B มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดมะเร็งในมนุษย์ จากการศึกษาในหนูทดลองพบว่า เอนไซม์ MMP-9 มีผลเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด และจากการศึกษาในมนุษย์พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ MMP-9 ที่สร้างมาจากเซลล์มะเร็ง โดยเอนไซม์ MMP-9 มีการเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองของมนุษย์ เมื่อเซลล์มะเร็งมีการสร้างเอนไซม์ MMP-9 จะส่งผลทำให้เซลล์มะเร็งมีการเคลื่อนที่และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ได้ โดยมีกลไกสำคัญคือ เอนไซม์ MMP-9 จับกับ CD44 เกิดกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์โดยทำให้เกิด signaling activities เอนไซม์ MMP-9 จับกับ integrins อย่างจำเพาะ⁽¹⁸⁾ เอนไซม์ MMP-9 สลาย ECM และหลัง activating growth factors เช่น transforming growth factor (TGF), macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), insulin like growth factor (IGF) และ fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR-1) ส่งผลให้เกิดการสร้างหลอดเลือด ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเคลื่อนที่และแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

2.1.3.3 การทำงานของเอนไซม์ Matrix metalloproteinases 2 (MMP-2)

เอนไซม์ Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) เป็นเอนไซม์ชนิด gelatinase A ซึ่งมีผลในการย่อยสลาย collagen type IV, gelatin และ extracellular matrix อื่นๆ จากการศึกษา colorectal cancer (CRC) พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของ MMP-2 ในเลือดและน้ำเหลือง ซึ่งเอนไซม์ MMPs ใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการแพร่กระจายของ CRC โดยที่เซลล์มะเร็งมี integrins ทำหน้าที่ในการยึดเกาะเซลล์ และมี MMPs ย่อยสลายโปรตีน การศึกษาพบว่า มีการจับกันของ $\beta 1$ integrins กับ MMP-2 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของ CRC โดยที่ MMP-2 ไปสลาย $\beta 1$ integrins กระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่และลดการเกาะกันของเซลล์⁽¹⁹⁾ จากการศึกษาพบว่า MMP-2 จับกับ $\alpha \nu \beta 3$ บนผิวของเซลล์ของหลอดเลือดที่สร้างใหม่และมีการสลาย collagen และ กระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่⁽²⁰⁾

TIMPs มีหน้าที่คือ ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ที่สลายโปรตีนและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs จากการศึกษาพบว่า TIMPs มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลง การเจริญเติบโต การเคลื่อนที่ การแพร่กระจาย การสร้างหลอดเลือด และการตายของเซลล์ ซึ่งเป็นผลมาจาก TIMPs จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs⁽²⁰⁾ โดย TIMPs มีทั้งหมด 4 ชนิดคือ TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 และ TIMP-4 โดยปลายโมเลกุลของ N-terminal และ C-terminal มี cysteine 6 โมเลกุล ซึ่งปลายโมเลกุล N-terminal จับกับเอนไซม์ MMPs และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs ส่วนปลายโมเลกุลของ C-terminal ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ pro-MMPs โดยจับกันแบบจำเพาะโดย TIMP-2, TIMP-3 หรือ TIMP-4 จับกับ pro-MMP-2 และ TIMP-1 หรือ TIMP-3 จับกับ MMP-9⁽²¹⁾ โดย TIMP-2 มีความจำเพาะในการยับยั้ง MMP-2 ซึ่ง TIMPs สามารถยับยั้งเอนไซม์ MMPs ได้ทั้งหมด แต่มีประสิทธิภาพแตกต่างกัน โดย TIMP-1 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-1,

MMP-3, MMP-7 และ MMP-9, TIMP-2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง MMP-2 มากกว่า, TIMP-3 ยับยั้งเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9, TIMP-4 ยับยั้งเอนไซม์ MT1-MMP และ MMP-2

2.1.3.4 การทำงานของเอนไซม์ Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)

TIMP-1 มีผลลดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์โดยมีผลต่อ G1 ของ cell cycle และมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์ โดย TIMP-1 จับกับ CD63 ซึ่งมีผลไปจับกับ $\beta 1$ integrins กลายเป็น TIMP-1-CD63-integrin $\beta 1$ complex ทำให้เกิดการกระตุ้น focal adhesion kinase (FAK), PI3-K และ ERK pathways, มีผลยับยั้งเอนไซม์ MMPs ใน hepatic stellate cells⁽²¹⁾ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-9, MMP-7 และ MMP-3 ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการย่อยสลาย ECM จากการศึกษาพบว่า การที่เนื้อเยื่อเกิดรอยแผล, เกิดพังผืดในปอด, โรคไตจากเบาหวาน มีความสัมพันธ์กับการสลาย ECM ที่เพิ่มขึ้น โดยจะพบการเพิ่มขึ้นของ TIMP-1 ใน mesangial cells ของคนที่เป็นโรคไตจากเบาหวาน ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ TIMP-1 สัมพันธ์กับการสลาย ECM ที่ลดลงของ mesangial cells⁽²²⁾

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองสำหรับทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนี ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเคลื่อนที่ ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการลุกลาม และศึกษาถึงข้อมูลความปลอดภัยของสารสกัดบัวบก ECa233 ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620

1.สารบริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์

สารบริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดสอบคือ สารสกัดบัวบก ECa233 ได้จากบัวบก ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ภญ.ดร.มยุรี ตันติสิระ

2.อุปกรณ์

- 1.1 24-well plate
- 1.2 96-well plate
- 1.3 Tip micropipette ขนาด 10, 100, 1,000 μ l
- 1.4 Microcentrifuge tube
- 1.5 Serological pipette
- 1.6 Conical tube
- 1.7 Cell culture flask
- 1.8 Tips
- 1.9 ตู้บ่ม (Incubator) (SL SHEL LAB[®])
- 1.10 Laminar flow (Airstream DUO[®])
- 1.11 Autopipettes ขนาด 10, 100 และ 1,000 μ l (SWIFT PET[®])
- 1.12 เครื่อง Refrigerated Centrifuge (MPW[®] รุ่น MPW-260 R)
- 1.13 กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS[®] รุ่น CKX 41)
- 1.14 ถุงมือ
- 1.15 กระดาษทิชชู
- 1.16 สมุดบันทึก
- 1.17 ปากกา permanent

3.สารเคมี

3.1 Trypsin-EDTA

3.2 RPMI media

3.3 Fetal bovine serum

3.4 Penicillin-Streptomycin

3.5 70 % Ethanol

3.6 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.7 Crystal violet

3.8 Amphotericin B (Fungizone[®])

วิธีการดำเนินการวิจัย

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620

โดยจะต้องมีเซลล์ที่มีชีวิตไม่น้อยกว่า 95%



ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก (ECa233) ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักและเซลล์ไฟโบรบลาสต์



วิธีการดำเนินการวิจัย (ต่อ)

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 ใน flask T25 ใน RPMI-1640 medium ที่มี 10% heat inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂, 95% humidity ใน incubator โดยเซลล์ที่นำมาใช้ในการทดสอบ ต้องมีเซลล์ที่มีชีวิตไม่น้อยกว่า 95% จากการตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมสี 0.4% trypan blue

เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิด MRC-5 ใน flask T25 ใน DMEM medium ที่มี 10% heat inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂, 95% humidity ใน incubator

2. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค MTT assay

การศึกษาเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี MTT cell viability assay โดยอาศัยหลักการที่ว่าเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) มีเอนไซม์ mitochondria reductase ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงสาร MTT ที่มีสีเหลืองให้อยู่ในรูป formazan crystal ซึ่งเป็นผลึกสีม่วงและทำการละลาย formazan crystal ด้วยสารละลาย DMSO และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm

2.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด SW-620 ใน 96-well plate ที่ density 5,000 cells/well ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂, 95% humidity ใน incubator

2.2 ปิเปต media ที่ และเติมสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้นต่างกัน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 25, 50 และ 100 µg/ml โดยมีเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย RPMI media เป็น control

2.3 เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

2.4 เติมสารละลาย MTT ใน PBS solution ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 10 µl ลงใน 96-well plate จากนั้นบ่มเซลล์ต่อภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂, 95% humidity ต่อเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

2.5 ปิเปต supernatant ที่ และเติม absolute DMSO ปริมาตร 100 µl ลงใน 96-well plate

2.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm

2.7 คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิต โดยใช้สูตร

$$\text{เมื่อ \% Cell viability} = \frac{(OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}})}{(OD_{\text{control}} - OD_{\text{blank}})} \times 100\%$$

$$\% \text{ Cell toxicity} = 100 - \% \text{ cell viability}$$

OD_{control} = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย RPMI media

OD_{sample} = OD ที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3. การศึกษาถึงความปลอดภัยของสารสกัดบัวบก ECa233 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยใช้เทคนิค MTT assay

เพื่อศึกษาถึงข้อมูลความปลอดภัยของสารสกัดบัวบก ECa233 ในเซลล์ปกติ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนานำสารสกัดบัวบก ECa233 ในการนำไปใช้ต่อไป

3.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ MRC-5 ใน 96-well plate ที่ density 5,000 cells/well ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂, 95% humidity ใน incubator

3.2 ปิเปิด media ที่ และทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, และ 100 µg/ml

3.3 บ่มเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 เติมสารละลาย MTT solution และบ่มเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

3.5 ดูด media ที่ และเติม absolute DMSO เพื่อละลาย formazan crystal

3.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm

4. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Colony formation assay

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ต่อการยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งหรือความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งจาก single cell เป็น large colony

4.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งจำนวน 5,000 cells/well ใน 24-well plate ใน complete RPMI media

4.2 บ่มเซลล์ต่อภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂, 95% humidity เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

4.3 เติมสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 30, 40, 50 µg/ml

4.4 บ่มเซลล์ต่อภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂, 95% humidity เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

4.5 ปิด media ที่มีสารทดสอบทิ้ง

4.6 เลี้ยงเซลล์ต่อใน complete RPMI 1640 เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อสังเกตการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์เป็นโคโลนี

4.7 ทำการ fix เซลล์ด้วย acetic acid : methanol ในอัตราส่วน 1:3 เป็นระยะเวลา 15 นาที

4.8 ทำการย้อมเซลล์ด้วย 0.5 % crystal violet เป็นระยะเวลา 30 นาที

4.9 นับจำนวนเซลล์โดยใช้กล้อง light microscope ที่กำลังขยาย 10x

5. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Wound healing assay (Scratch assay)

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง โดยทำให้ cell monolayer เกิดรอยแผล จากนั้นทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 และวัดความกว้างของ wound หรือจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่มายังบริเวณ wound เปรียบเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น (time 0)

5.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ใน 24-well plate จนกระทั่งเซลล์เจริญเป็น monolayer และได้ 100% confluent

5.2 ใช้ plastic pipette tip ขนาด 200 µl ในการ scratch เพื่อทำให้เกิด wound

5.3 ล้างเซลล์ด้วย serum free media จำนวน 2 ครั้ง

5.4 เลี้ยงเซลล์ใน RPMI 1640 media + 1% FBS + penicillin/streptomycin ในสถานะที่มีสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

5.5 วัด %Cell migrated ด้วยกล้อง invert microscope ที่กำลังขยาย 10x โดยวัดที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากการเติมสารทดสอบ

5.6 คำนวณ % open wound area

6. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Matrigel invasion assay

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งผ่าน invasion chamber ที่มีขนาดความกว้าง 8 μm ที่ถูก coated ด้วย matrigel ที่ทำหน้าที่เสมือนชั้น basement membrane ซึ่งเซลล์มะเร็งที่สามารถเคลื่อนที่ผ่านชั้น matrigel มายังบริเวณ lower chamber ได้ แสดงว่ามี การหลั่งเอนไซม์ proteases เพื่อมาทำลายชั้น matrigel จากนั้นจึงวัดจำนวนเซลล์ที่บริเวณด้านล่างของ invasion chamber

6.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ใน 24-well plate ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.2 ปิเปต media ทั้ง และเติมสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 30, 40 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ โดยมี RPMI 1640 media เป็น control

6.3 บ่มเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

6.4 ทำการ coat invasion chamber ด้วย matrigel เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง

6.5 Trypsinize เซลล์และปิเปตเซลล์ปริมาตร 500 μl ที่ความหนาแน่น 1.0×10^5 cell/ml ลงบน upper chamber ที่วางบน 24-well plate ในขณะที่ด้านล่างของ chamber จะประกอบด้วย RPMI 1640 media ที่มี 10 % FBS ปริมาตร 500 μl

6.6 บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

6.7 นำเซลล์ที่อยู่ด้านบนของ chamber ออกโดยใช้ cotton swab

6.8 Fix cell ที่เคลื่อนที่ผ่าน matrigel ด้วย 4% formaldehyde

6.9 ย้อมเซลล์ด้วยสี crystal violet

6.10 นับเซลล์ 25 random fields โดยใช้กล้อง invert microscope

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสถิติ GraphPad Prism 6 ออกแบบการทดสอบด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 กับฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 กับกลุ่มควบคุม หลังทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ

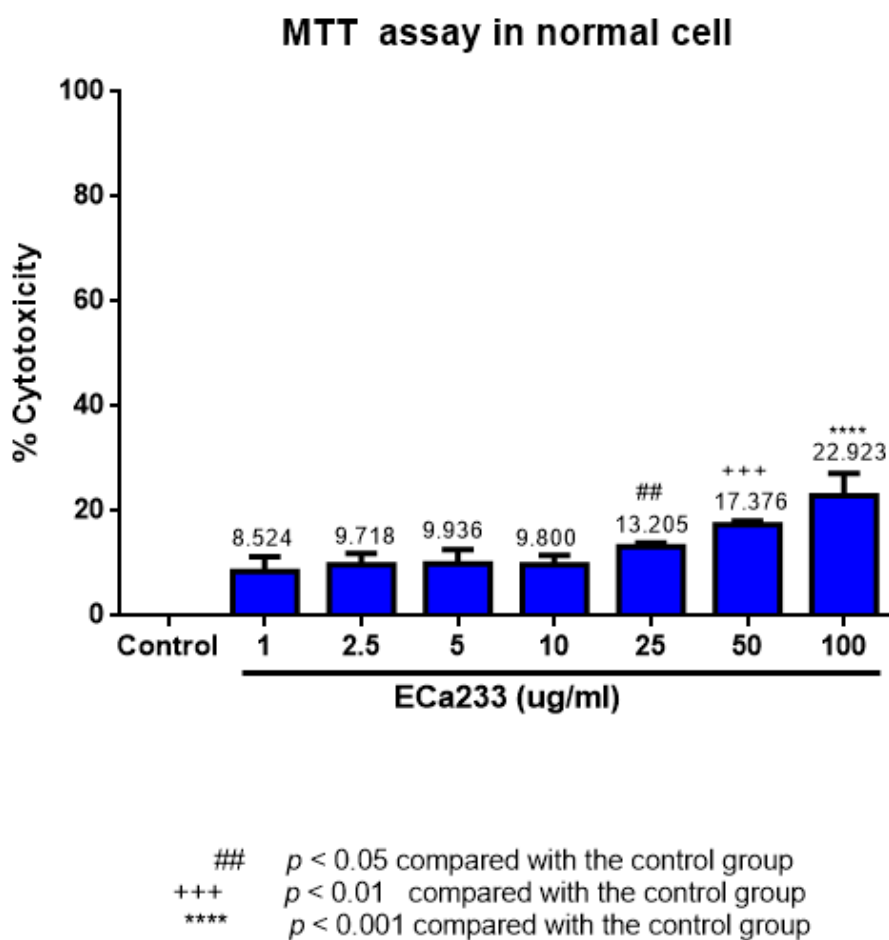
ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ลำดับ	ขั้นตอนการดำเนินงาน	เดือน											
		ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
1	ทบทวนวรรณกรรม												
2	เขียนโครงร่างงานวิจัย												
3	ทำการศึกษาในห้องทดลอง												
4	วิเคราะห์และแปลผลข้อมูล												
5	อภิปรายและสรุปผลการวิจัย												
6	การเขียนรายงานและการเผยแพร่ผลงาน												

บทที่ 4

ผลการวิจัย

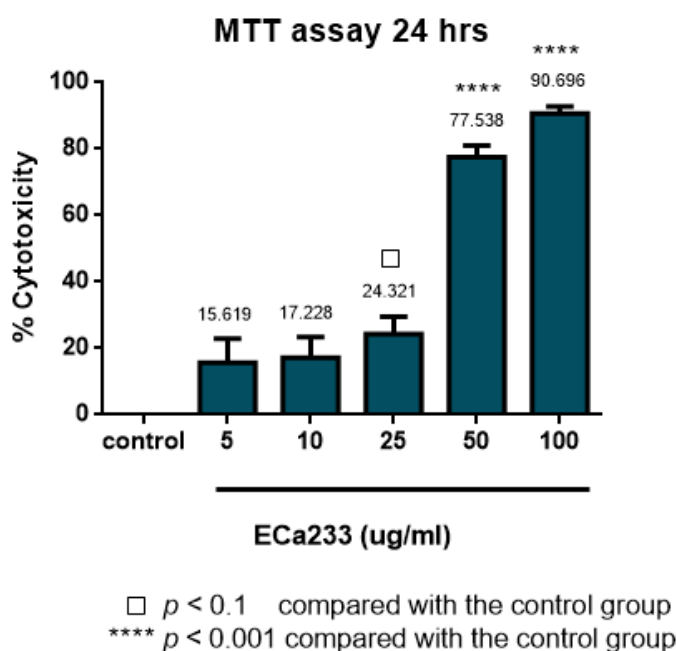
4.1 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งของสารสกัดบัวบก ECa233 ในเซลล์ปกติไฟโบร بلاสต์ชนิด MRC-5 โดยใช้เทคนิค MTT assay



ภาพที่ 4-1 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์ปกติ

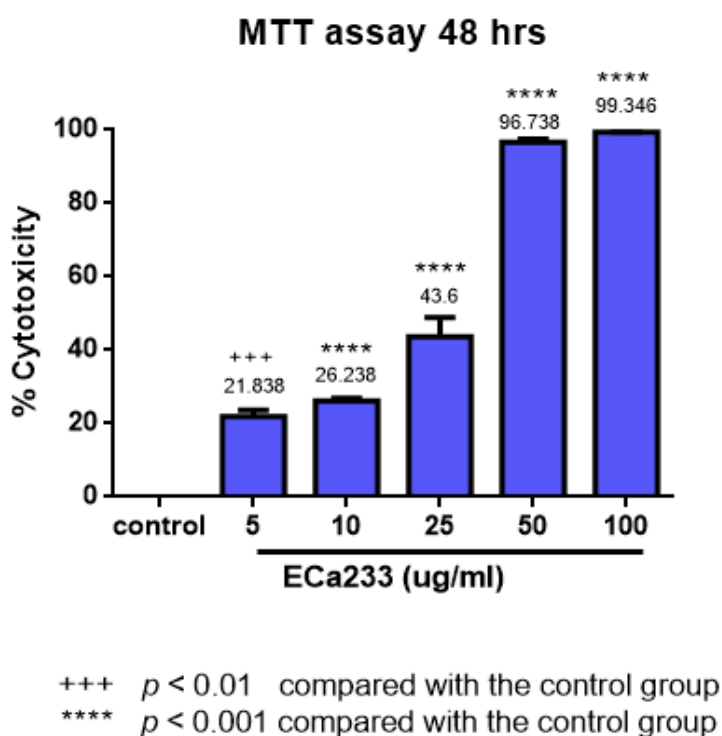
จากภาพที่ 4-1 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 โดยใช้เทคนิค MTT assay พบว่าเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์ปกติได้ $8.524 \pm 2.773 \%$, $9.718 \pm 2.276\%$, $9.936 \pm 2.675 \%$ และ $9.800 \pm 1.817 \%$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม

ควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 เป็น 25 µg/ml พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์ปกติได้ 13.205 ± 0.712 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p < 0.05$) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 เป็น 50 µg/ml พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์ปกติได้ 17.376 ± 0.804 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ($p < 0.01$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 เป็น 100 µg/ml พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์ปกติได้ 22.923 ± 4.337 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.001 ($p < 0.001$)



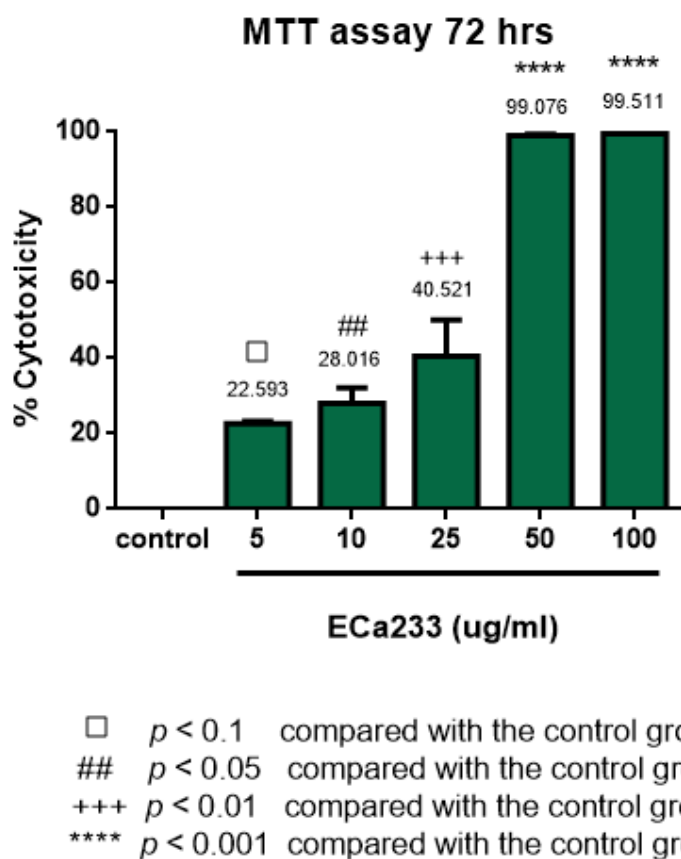
ภาพที่ 4-2 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก วัดผลที่เวลา 24 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4-2 แสดงผลการศึกษากฎพิษวิทยาการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 จากสารสกัดบัวบก ECa233 โดยใช้เทคนิค MTT assay เมื่อวัดผลที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ $15.619 \pm 7.244 \%$ และ $17.228 \pm 6.180 \%$ ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 เป็น 25 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ $24.321 \pm 5.250 \%$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.1 ($p < 0.1$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 เป็น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ $77.538 \pm 3.478 \%$ และ $90.696 \pm 2.090 \%$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.001 ($p < 0.001$) เมื่อคำนวณค่า Inhibitory concentration at 50 % (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 43.659 $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่ 4-3 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก วัดผลที่เวลา 48 ชั่วโมง

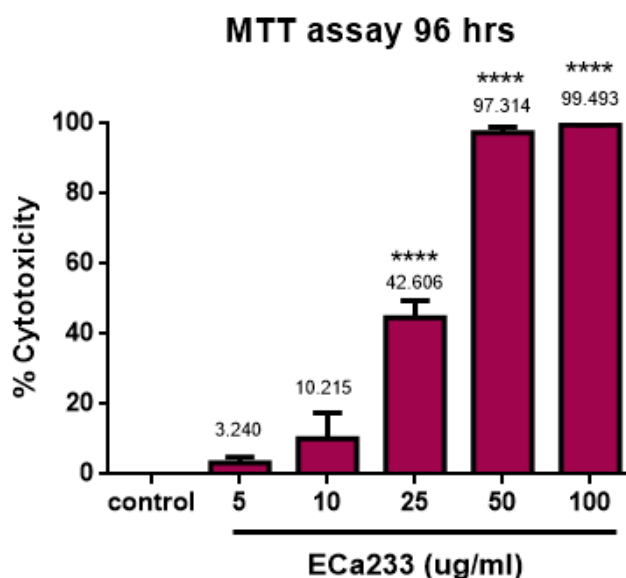
จากภาพที่ 4-3 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 จากสารสกัดบัวบก ECa233 โดยใช้เทคนิค MTT assay เมื่อวัดผลที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml พบว่าสามารถยับยั้งการรอดชีวิตเซลล์มะเร็งได้ 21.838 ± 1.882 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ($p < 0.01$) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 เป็น 10, 25, 50 และ 100 µg/ml พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ 26.238 ± 0.691 %, 43.600 ± 5.341 %, 96.738 ± 0.799 % และ 99.346 ± 0.083 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.001 ($p < 0.001$) เมื่อคำนวณค่า IC_{50} มีค่าเท่ากับ 29.405 µg/ml



ภาพที่ 4-4 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก วัดผลที่เวลา 72 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4-4 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 จากสารสกัดบัวบก ECa233 โดยใช้เทคนิค MTT assay เมื่อวัดผลที่เวลา 72 ชั่วโมงพบว่าเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ 22.593 ± 0.709 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.1 ($p < 0.1$) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด บัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของ เซลล์มะเร็งได้ 28.016 ± 4.081 % เมื่อเปรียบเทียบกับควบคุมพบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p < 0.05$) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ 40.521 ± 9.564 % เมื่อ

เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ($p < 0.01$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 เป็น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ $99.076 \pm 0.285 \%$ และ $99.511 \pm 0.061 \%$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.001 ($p < 0.001$) เมื่อคำนวณค่า IC_{50} มีค่าเท่ากับ 28.966 $\mu\text{g/ml}$

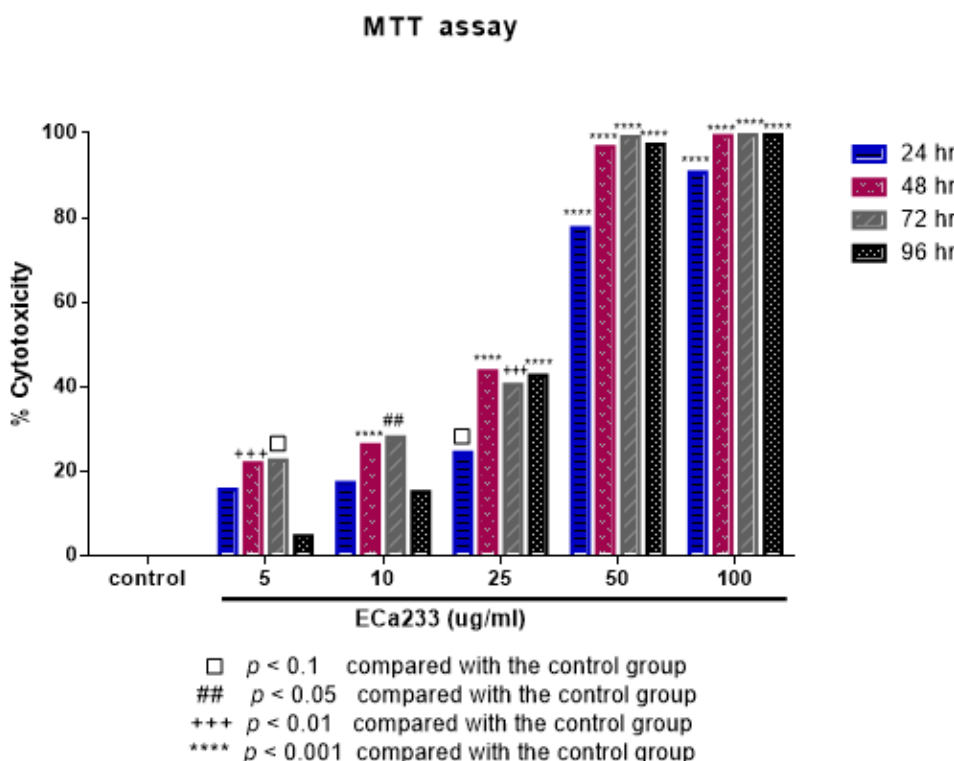


**** $p < 0.001$ compared with the control group

ภาพที่ 4-5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก วัดผลที่เวลา 96 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4-5 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 จากสารสกัดบัวบก ECa233 โดยใช้เทคนิค MTT assay วัดผลที่เวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ $3.240 \pm 1.599 \%$ และ $10.215 \pm 7.327 \%$ ตามลำดับ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 เป็น 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 สามารถ

ยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ $42.606 \pm 4.920 \%$, $97.314 \pm 1.587 \%$ และ $99.493 \pm 0.188 \%$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.001 ($p < 0.001$) เมื่อคำนวณค่า IC_{50} มีค่าเท่ากับ $37.459 \mu\text{g/ml}$



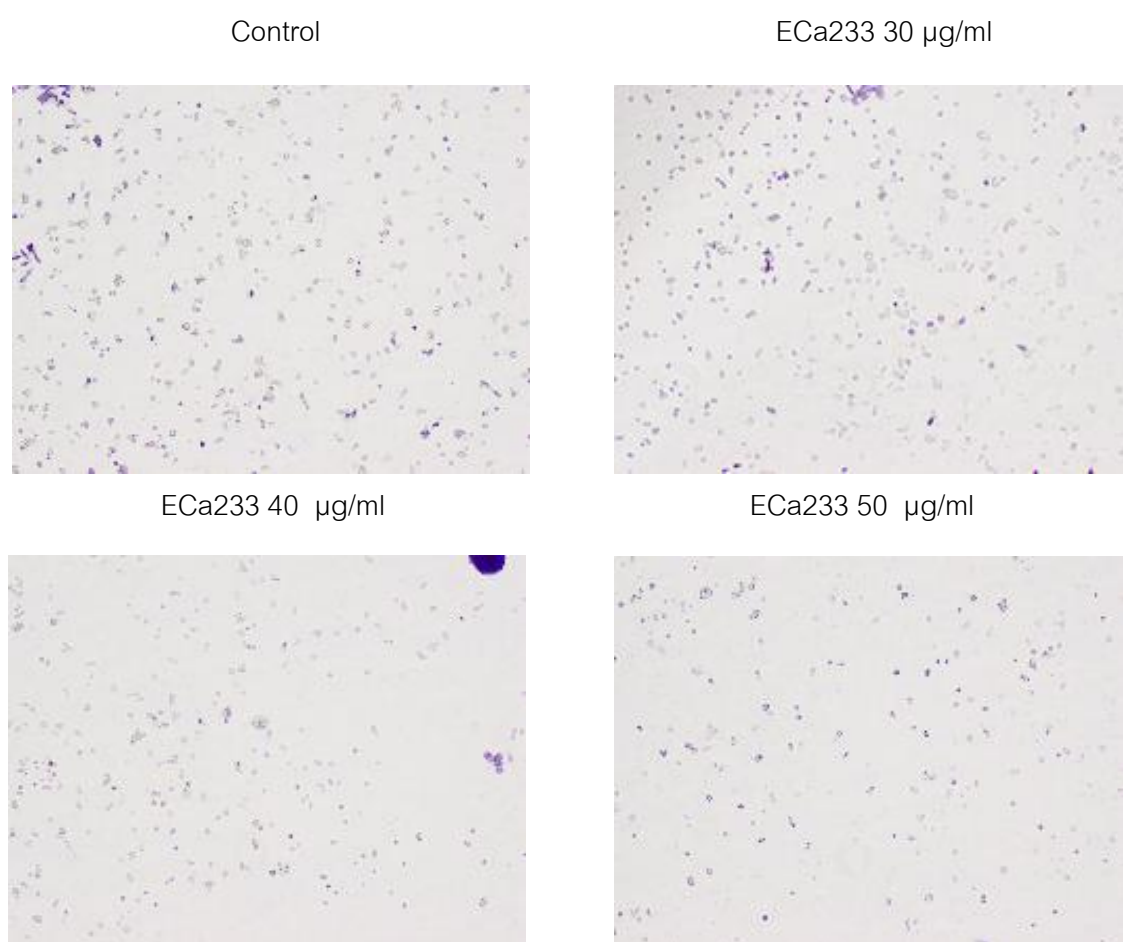
ภาพที่ 4-6 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก วัดผลที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4-6 แสดงผลการศึกษาดูฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 จากสารสกัดบัวบก ECa233 โดยใช้เทคนิค MTT assay พบว่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 ที่เพิ่มมากขึ้นและเพิ่มระยะเวลาหลังการทดสอบที่มากขึ้น (dose and time-dependent manners)) เมื่อคำนวณค่า IC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ $43.659 \mu\text{g/ml}$, ค่า IC_{50} ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ

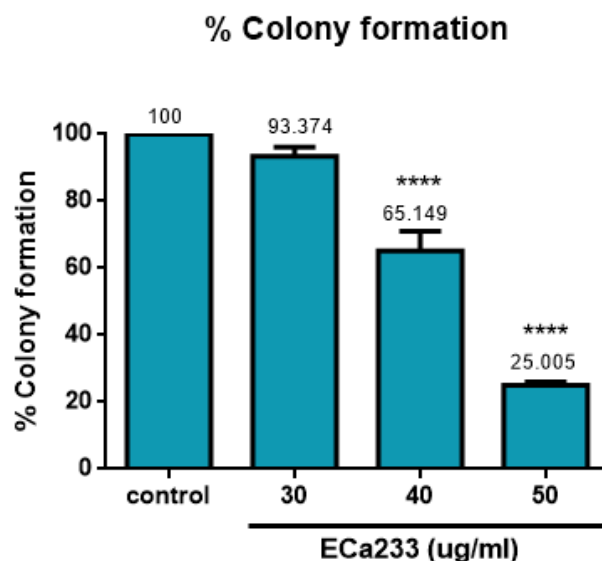
29.405 $\mu\text{g/ml}$, ค่า IC_{50} ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 28.966 $\mu\text{g/ml}$ และ ค่า IC_{50} ที่เวลา 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 37.459 $\mu\text{g/ml}$

4.2 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Colony formation assay

Colony formation assay



ภาพที่ 4-7 แสดงฤทธิ์ของสารสกัด ECa233 ในการยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ที่กำลังขยาย 10X



**** $p < 0.001$ compared with the control group

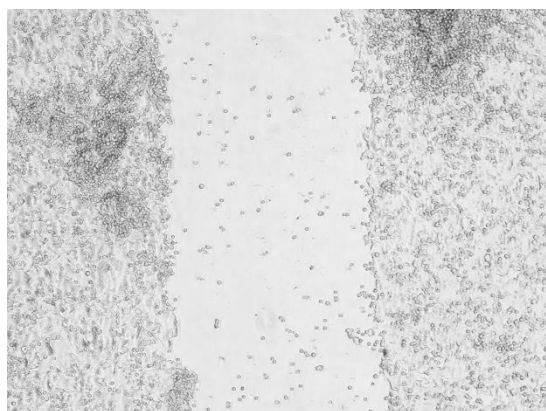
ภาพที่ 4-8 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเมื่อทดสอบด้วยสารสกัด ECa233 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากภาพที่ 4-8 แสดงผลการศึกษากิจกรรมของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Colony formation assay พบว่าเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/ml}$ เปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นโคโลนีเท่ากับ 93.374 ± 2.717 % เมื่อทดสอบสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ เปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นโคโลนีเท่ากับ 65.149 ± 5.891 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p < 0.05$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดบัวบก ECa233 เป็นความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ เปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นโคโลนีมีค่าเท่ากับ 25.005 ± 0.997 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.001 ($p < 0.001$)

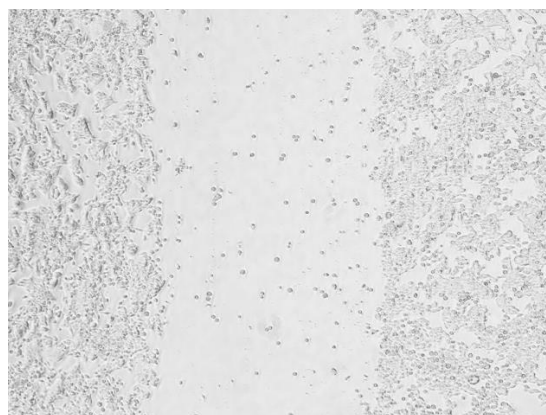
4.3 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Wound healing assay (Scratch assay)

Scratch assay

Control



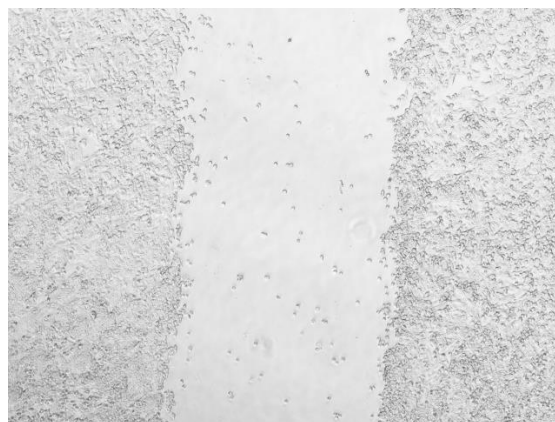
ECa233 30 μ g/ml



ECa233 40 μ g/ml



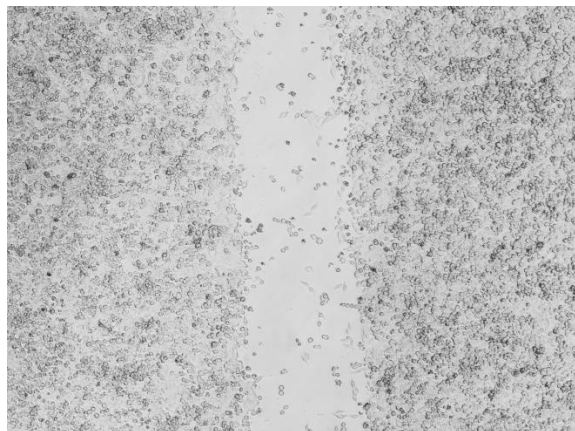
ECa233 50 μ g/ml



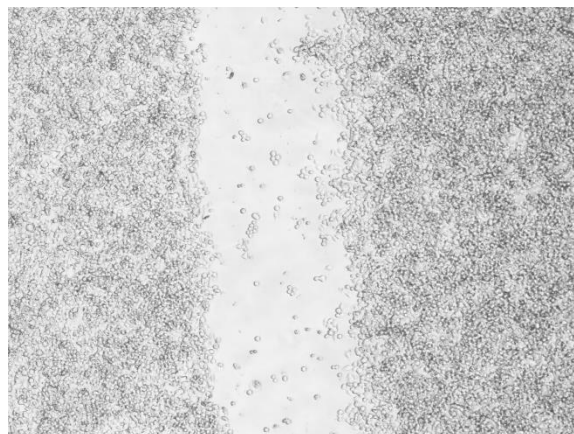
ภาพที่ 4-9 แสดงการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เวลาเริ่มต้น เมื่อให้ ECa233 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่กำลังขยาย 10X

Scratch assay

Control



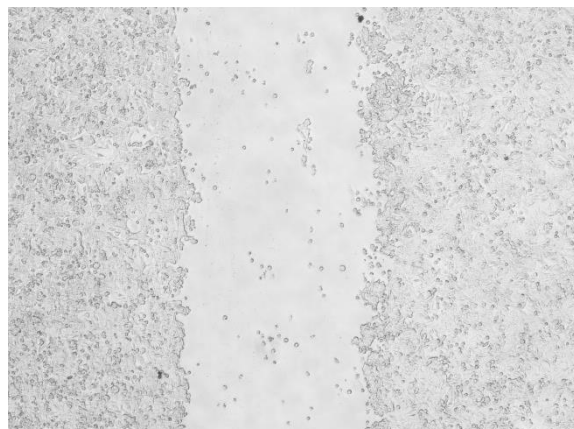
ECa233 30 µg/ml



ECa233 40 µg/ml



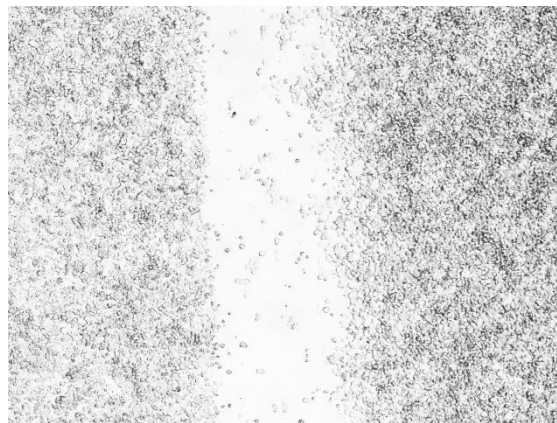
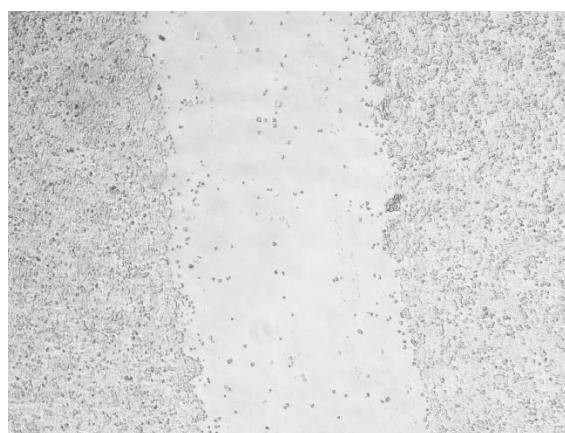
ECa233 50 µg/ml



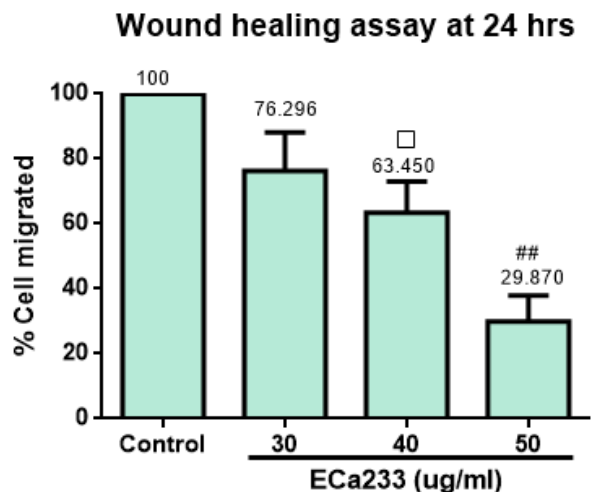
ภาพที่ 4-10 แสดงการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อให้ ECa233 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่กำลังขยาย 10X

Scratch assay

Control

ECa233 30 $\mu\text{g/ml}$ ECa233 40 $\mu\text{g/ml}$ ECa233 50 $\mu\text{g/ml}$ 

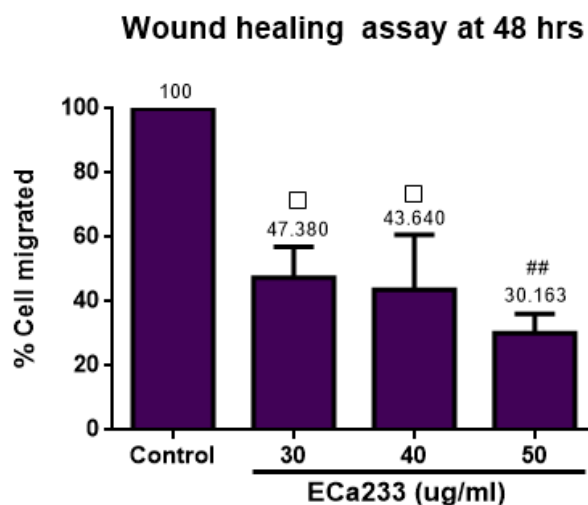
ภาพที่ 4-11 แสดงการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อให้ ECa233 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่กำลังขยาย 10X



□ $p < 0.1$ compared with the control group
 ## $p < 0.05$ compared with the control group

ภาพที่ 4-12 แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เวลา 24 ชั่วโมง

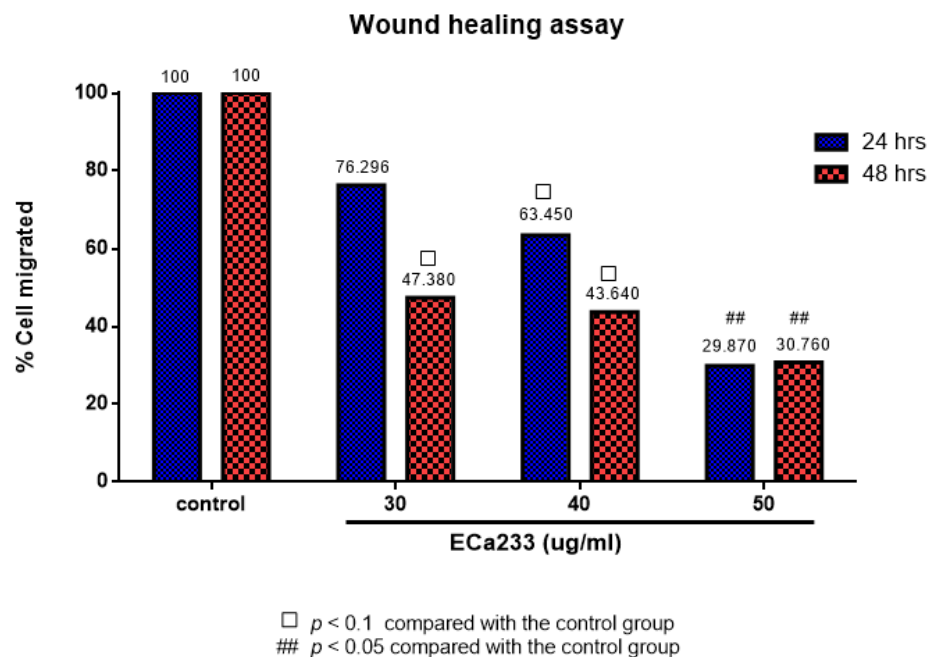
จากภาพที่ 4-12 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Wound healing assay (Scratch assay) จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (% cell migrated) ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 30 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งมีค่าเท่ากับ $76.296 \pm 17.575 \%$ และ $63.450 \pm 6.607 \%$ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 เป็น 50 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งมีค่าเท่ากับ $29.870 \pm 8.014 \%$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p < 0.05$)



□ $p < 0.1$ compared with the control group
 ## $p < 0.05$ compared with the control group

ภาพที่ 4-13 แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เวลา 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4-13 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Wound healing assay (Scratch assay) จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (% cell migrated) ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 30 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักมีค่าเท่ากับ 47.380 ± 9.664 % และ 43.640 ± 17.134 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.1 ($p < 0.1$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 เป็น 50 $\mu\text{g/ml}$ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งมีค่าเท่ากับ 30.163 ± 6.000 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p < 0.05$)



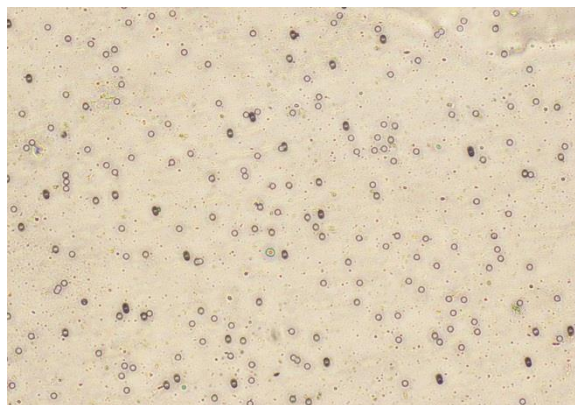
ภาพที่ 4-14 แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4-14 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์หลังการทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 30, 40 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ เทียบที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 เพิ่มขึ้นสามารถลดจำนวนของเซลล์มะเร็งที่เคลื่อนที่มายังบริเวณ wound โดยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งมายังบริเวณ wound ได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก ECa233 เพิ่มมากขึ้นและระยะเวลาหลังการทดสอบที่นานขึ้น (dose and time-dependent manners) สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้มากขึ้น

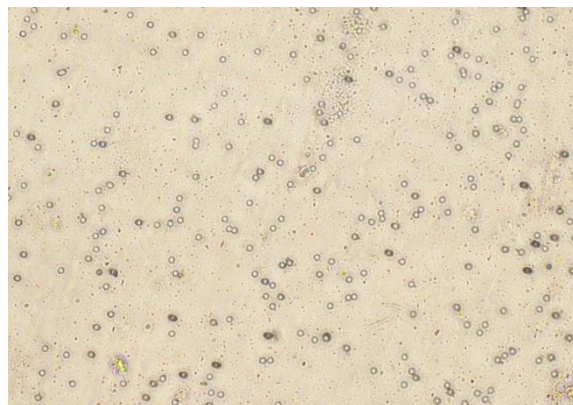
4.4 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และ
ทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Matrigel invasion assay

Matrigel invasion assay

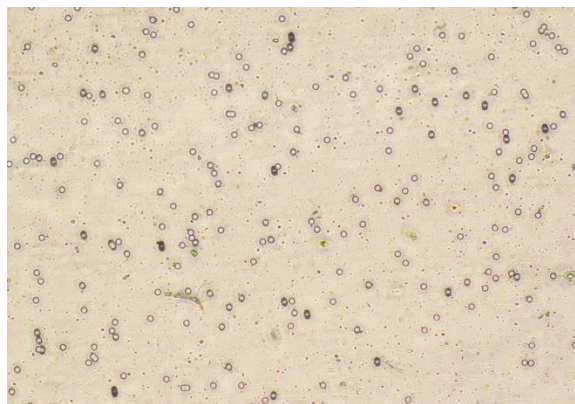
Control



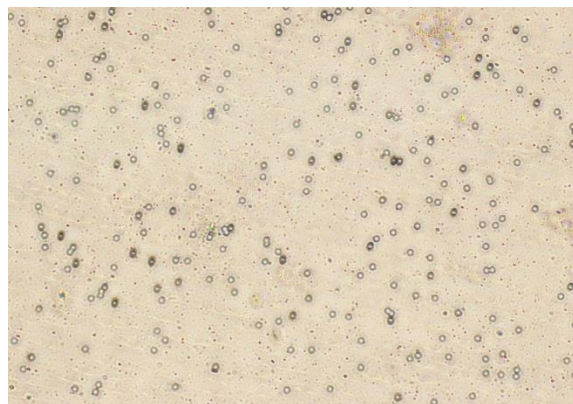
ECa233 30 μ g/ml



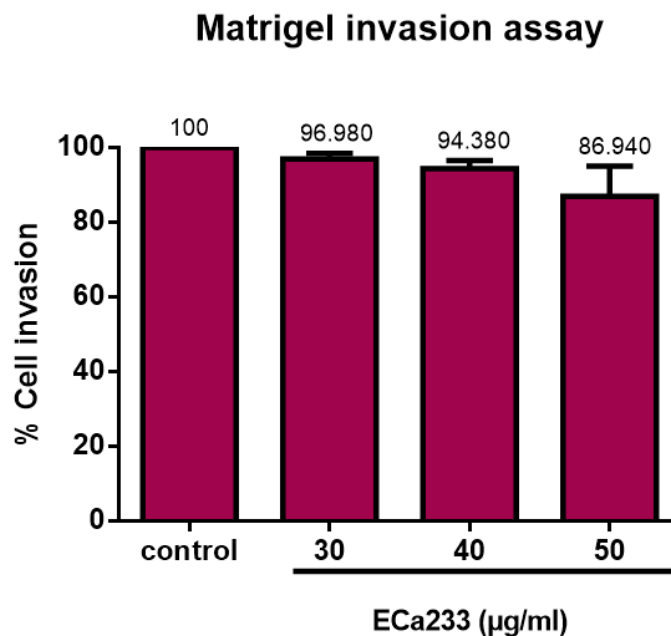
ECa233 40 μ g/ml



ECa233 50 μ g/ml



ภาพที่ 4-15 แสดงการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อให้ ECa233 ที่
ความเข้มข้นต่างๆ ที่กำลังขยาย 10X



ภาพที่ 4-16 แสดงเปอร์เซ็นต์การลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เวลา 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4-16 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Matrigel invasion assay จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์การการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (% cell invasion) เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 30, 40 และ 50 µg/ml มีค่าเท่ากับ 96.980 ± 1.470 %, 96.980 ± 2.139 % และ 86.940 ± 3.740 % ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดบัวบก ECa233 มีฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก แต่เมื่อนำเปอร์เซ็นต์การลุกลามของเซลล์มะเร็งมาเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

บัวบก (*Centella asiatica*) เป็นพืชสมุนไพรโบราณที่ใช้มานาน สารที่เป็นองค์ประกอบหลักของบัวบก คือ สารกลุ่ม triterpenoid glycosides ได้แก่ madecassoside และ asiaticoside จากข้อมูลการศึกษาวิจัยของนักวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้พัฒนาสารสกัดมาตรฐานบัวบก (standardised extract of *Centella asiatica*) ที่ชื่อว่า ECa233⁽¹²⁾ ที่ประกอบด้วย madecassoside และ asiaticoside ในสัดส่วน 1.5 (± 0.5) : 1 มีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดบัวบกมากมาย เช่น ฤทธิ์สมานแผล ฤทธิ์กระตุ้นการเรียนรู้และเพิ่มความจำ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ลดการซึมเศร้า ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านมะเร็ง Faridah Hussin⁽²⁶⁾ และ คณะ ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก (*Centella asiatica*) ที่มีผลต่อการทำลายดีเอ็นเอ (DNA damage) การตายของเซลล์ (apoptosis) และการแสดงออกของยีน (gene expression) ใน เซลล์มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) พบว่าสารสกัดบัวบกมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ โดยทำให้เกิดกระบวนการ apoptosis จากงานวิจัยของ Suboj Babykutty⁽³⁰⁾ และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจาก *Centella Asiatica* (Linn) ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด Apoptosis ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ผลของการศึกษาพบว่าสารสกัดจาก *C. asiatica* เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิด Apoptosis จึงมีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมในมนุษย์ และจากการศึกษาของ Frederico Pittella⁽²⁵⁾ และ คณะ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก (*Centella asiatica*) ในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และการยับยั้งการรอดชีวิต (Cytotoxic Activities) พบว่า สารสกัดบัวบกมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมในมนุษย์ (human breast cancer) ชนิด MDA-MB 231 มะเร็งผิวหนังเมลาโนมาในหนู (mouse melanoma) ชนิด B16F1 และ เนื้องอกในสมองของหนู (rat glioma)⁽²⁷⁾ แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดบัวบก ECa233 ยังไม่เพียงพอ ดังนั้นวัตถุประสงค์โครงการวิจัยนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการรอดชีวิต การเจริญเป็นโคโลนี การเคลื่อนที่และการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งของสารสกัดบัวบก

ECa233 ในการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค MTT assay เมื่อทดสอบด้วยสารสกัด ECa233 ทำการวัดผลที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่าสารสกัด ECa233 สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ ภายหลังการทดสอบด้วยสารสกัดบวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดบวบก ECa233 สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดบวบกเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาหลังการทดสอบที่นานขึ้นโดยมีความสัมพันธ์แบบ dose and time-dependent manners เมื่อคำนวณค่า IC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีค่าเท่ากับ 43.659 $\mu\text{g/ml}$, ค่า IC_{50} ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 29.405 $\mu\text{g/ml}$, ค่า IC_{50} ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 28.966 $\mu\text{g/ml}$ และ ค่า IC_{50} ที่เวลา 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 37.459 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดบวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, และ 100 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดบวบก ECa233 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดบวบก ECa233 มีความจำเพาะในการยับยั้งเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ ผลการศึกษาที่ได้แสดงถึงศักยภาพในการนำสารสกัดบวบก ECa233 ในการนำไปใช้รักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักต่อไปในอนาคต จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบวบก ECa233 ในการยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Colony formation assay ซึ่งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งแสดงถึงการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์โดยพิจารณาจากการรวมกลุ่มของ single cell เป็น large colony เมื่อทดสอบด้วยสารสกัด ECa233 พบว่าสารสกัดบวบก ECa233 สามารถยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด ECa233 มากขึ้น พบว่าเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 40 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเจริญและรวมกลุ่มกันเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นถึงความสามารถของสารสกัดบวบก ECa233 ในการลดการเจริญและรวมกลุ่มกันของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก จากผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบวบก ECa233 ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Wound healing assay (Scratch assay) เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบวบก ECa233 วัดผลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบวบก ECa233 สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพกล่าวคือ เมื่อทำการวัดผลที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากการทำให้

เกิดแผล (wound) และทำการทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233 ที่ความเข้มข้น 40 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อทำการวัดผลที่เวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 30, 40 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในทุกความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด ECa233 ความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีแนวโน้มเป็นไปในทางเดียวกันในทุกช่วงเวลาที่วัดผล กล่าวคือมีความสัมพันธ์แบบ dose and time-dependent manners ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก ECa233 ในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Matrigel invasion assay เมื่อทดสอบด้วยสารสกัด ECa233 วัดผลที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อทดสอบสารสกัด ECa233 ที่ความเข้มข้น 30, 40 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดการลุกลามของเซลล์มะเร็งได้มากขึ้น แต่เมื่อนำมาทดสอบทางสถิติพบว่าเปอร์เซ็นต์การลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

สรุปได้ว่า ผลของสารสกัดบัวบก ECa233 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการรอดชีวิต, ยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนี และ ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ชนิด SW-620 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่มีฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเพียงเล็กน้อย โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าสารสกัดบัวบก ECa233 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์ปกติ (normal cell) ชนิด MRC-5 ดังนั้นสารสกัดบัวบกจึงไม่มีพิษต่อเซลล์ปกติ อย่างไรก็ตาม ควรมีการทดสอบความปลอดภัยและความเป็นพิษในการนำสารสกัดบัวบก ECa233 มาใช้จริงในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในมนุษย์เนื่องจากการศึกษานี้ทำการศึกษาในห้องทดลอง และควรมีการศึกษารูปแบบของสารสกัดบัวบกในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆเพิ่มเติม

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยเมื่อใช้ร่วมกับการรักษาแผนปัจจุบัน เพื่อพัฒนาการใช้สารสกัด ECa233 ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Tsai Y-J, Lin J-K, Chen W-S, Jiang J-K, Teng H-W, Yen C-C, et al. Adjuvant FOLFOX treatment for stage III colon cancer: how many cycles are enough? SpringerPlus. 2016;5(1):1318.
2. Wang W, Guo W, Li L, Fu Z, Liu W, Gao J, et al. Andrographolide reversed 5-FU resistance in human colorectal cancer by elevating BAX expression. Biochemical Pharmacology. 2016;121:8-17.
3. Zhou M, Zhang R-H, Wang M, Xu G-B, Liao S-G. Prodrugs of triterpenoids and their derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry. 2017;131:222-36.
4. W.Imsamran AC, S.Wiangnon. et al. Cancer in Thailand. 2015;VIII:29.
5. กษยา ตันติผลาชีวะ , จิรวัดน์ พัฒนอรุณ และคณะ ตำรามะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก 2554;I:66-67.
6. Shirasaka T, Taguchi T. [Timeline from discovery of 5-FU to development of an oral anticancer agent S-1 and its drug concept]. Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy. 2006;33 Suppl 1:4-18.
7. Rustum YM. Thymidylate synthase: a critical target in cancer therapy? Frontiers in bioscience : a journal and virtual library. 2004;9:2467-73.
8. Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guérin-Meyer V, Delva R, Lortholary A, Genevieve F, et al. Correlation Between Uracil and Dihydrouracil Plasma Ratio, Fluorouracil (5-FU) Pharmacokinetic Parameters, and Tolerance in Patients With Advanced Colorectal Cancer: A Potential Interest for Predicting 5-FU Toxicity and Determining Optimal 5-FU Dosage. Journal of Clinical Oncology. 1999;17(4):1105.
9. Kulthong K, MHT, NN, Apipalakul K, SC, et al. Effects of the standard extract of Centella asiatica (ECa233) on rat hepatic cytochrome P450. 2009:91-100.

10. Ruamsuk N, * TP, aSJ. Potentative effects of standardized extract of *Centella asiatica* on vinblastine-induced cell death. *Thai Journal of Pharmacology*. 2010;32:69-71.
11. Chivapat S, PC, Tantisira aMH. Acute and sub-chronic toxicity of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233. 2011:55-64.
12. Wanasuntronwong A, Tantisira MH, Tantisira B, Watanabe H. Anxiolytic effects of standardized extract of *Centella asiatica* (ECa 233) after chronic immobilization stress in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 2012;143(2):579-85.
13. Anukunwithaya T, Tantisira MH, Tantisira B, Khemawoot P. Pharmacokinetics of a Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233 in Rats. *Planta medica*. 2016.
14. Hengjumrut P, Anukunwithaya T, Tantisira MH, Tantisira B, Khemawoot P. Comparative pharmacokinetics between madecassoside and asiaticoside presented in a standardized extract of *Centella asiatica*, ECa233 and their respective pure compound given separately in rats. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 2017:1-10.
15. Levin PBaB. *World Cancer Report 2008*:115-7.
16. Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncology reports*. 2009;21(5):1323-33.
17. Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. *Genes & Diseases*. 2015;2(1):26-34.
18. Mehner C, Hockla A, Miller E, Ran S, Radisky DC, Radisky ES. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget*. 2014;5(9):2736-49.

19. Said AH, Raufman J-P, Xie G. The Role of Matrix Metalloproteinases in Colorectal Cancer. *Cancers*. 2014;6(1):366-75.
20. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Seminars in cancer biology*. 2010;20(3):161-8.
21. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1803(1):55-71.
22. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biology*. 2015;44–46:247-54.
23. Tang XL, Yang XY, Jung HJ, Kim SY, Jung SY, Choi DY, Park WC, Park H.. *Biol Pharm Bull*. Faridah Hussin, Sima Ataollahi Eshkoor, Asmah Rahmat, Fauziah Othman and Abdah Akim. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Cytotoxic and anti-tumour properties of certain taxa of *The centella asiatica* juice effects on DNA damage, apoptosis and gene expression in hepatocellular carcinoma (HCC) 2014; 14(32): 2009; 32(8).
24. Pittella F, Dutra RC, Junior DD, Lopes MT, Barbosa NR.. *Int J Mol Sci*. Antioxidant and cytotoxic activities of *Centella asiatica* (L) Urb. 2009; 10(9).
25. T anvi, Poonam Dogra, Nilanjan Ghosh, Chandrashekar VM, Rajendra S.V. AQUEOUS EXTRACT OF AERIAL PARTS OF CENTELLA ASIATICA ARRESTS CELL CYCLE AT G0/G1 ON COLORECTAL CANCER CELL LINES 2016; 15(2): . www.journalofpharmaceuticalresearch.org (accessed 20 September 2017).

26. Suboj Babykutty, Jose Padikkala et al. (2009) 'African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines ', Apoptosis Induction of Centella Asiatica on Human Breast Cancer Cells, 6(1), pp. 9-16.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

วิธีการเตรียม RPMI 1640 stock solution (Incomplete media) ปริมาตร 1 ลิตร

- RPMI 1640 powder 10.4 g
- NaHCO_3 1.5 g
- ddH₂O ปริมาตร 950 ml

ปรับ pH ที่ 7.2 ด้วย 1 M HCL และ NaOH

เติม ddH₂O จนได้ปริมาตร 1 ลิตร

นำไปกรองโดยใช้หัวกรองขนาด 0.2 ไมครอนเมตร

วิธีการเตรียม Complete RPMI 1640 media ปริมาตร 100 ml

1. Incomplete media ปริมาตร 89 ml
2. Fetal bovine serum ปริมาตร 10 ml
3. Penicillin/Streptomycin ปริมาตร 1 ml

วิธีการเตรียม 10x Phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 1 ลิตร

- NaCl 80.65 g
- KCl 2 g
- KH_2PO_4 2 g
- Na_2HPO_4 11.5 g
- ddH₂O 900 ml

ปรับ pH ที่ 7.4 ด้วย 1 M HCl หรือ NaOH

เติม ddH₂O จนได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไป sterile ด้วย autoclaving

วิธีการ sub-culture เซลล์มะเร็ง SW-620

1. ใช้ปิเปตขนาด 5 ml ดูด media เก่าออกจาก flask T25
2. ใช้ micropipette ขนาด 1 ml ดูด PBS ปริมาตร 2 ml แล้วเติมลงใน flask

3. ดูด PBS ออกจาก flask
4. เติม Trypsin-ETDA ปริมาตร 1 ml ลงใน flask
5. นำ flask ใส่ที่ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C ปริมาณ 1-2 นาที
6. ใช้มือเคาะ flask เพื่อให้เซลล์หลุดจาก flask
7. นำไปส่องกล้อง เพื่อสังเกตการณ์การหลุดเกาะของเซลล์จาก flask
8. เติม RPMI 1640 media + 10% FBS (complete media) ปริมาตร 2 ml ลงใน flask เพื่อ inactivate การทำงานของ trypsin โดยใช้ micropipette ขนาด 1 ml
9. ใช้ปิเปตขนาด 5 ml ดูด media ออกทั้งหมดและเติมลงใน tube ขนาด 15 ml
10. นำ tube ไป centrifuge ที่ 6000 rpm ประมาณ 5 นาที
11. เท media ออกจาก tube ทั้งหมด (สังเกตการณ์ตกตะกอนของเซลล์บริเวณส่วนล่างของ tube)
12. เติม complete media ปริมาตร 1 ml และใช้ micropipette ดูดขึ้น-ลง จนเห็นเซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ
13. เติม complete media ลงใน flask ปริมาตร 5 ml + fungizone ปริมาตร 5 μ l
14. ใช้ micropipette ขนาด 100 μ l ดูดเซลล์จาก tube ลงใน flask ปริมาตร 100 μ l
15. นำ flask ไปใส่ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37°C

ผลการทดลอง การศึกษาการยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก
ของมนุษย์ โดยใช้เทคนิค MTT assay

ตารางที่ ก-1 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์ปกติ

Test compounds	N1	N2	N3	Average (% Cytotoxicity)
Control	0	0	0	0
ECa233 1 ug/ml	14.06575114	5.946180556	5.562322371	8.524751357
ECa233 2.5 ug/ml	12.85892634	5.295138889	11.00284206	9.718969098
ECa233 5 ug/ml	15.27257595	6.944444444	7.592367032	9.936462474
ECa233 10 ug/ml	6.242197253	10.9375	12.22086886	9.800188704
ECa233 25 ug/ml	14.39866833	13.28125	11.93666261	13.20552698
ECa233 50 ug/ml	18.97627965	16.71006944	16.44336175	17.37657028
ECa233 100 ug/ml	31.54390345	19.44444444	17.78319123	22.92384638

ตารางที่ ก-2 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ วัดผลที่เวลา 24 ชั่วโมง

Test compounds	N1	N2	N3	Average (% Cytotoxicity)
Media	0	0	0	0
ECa233 5 ug/ml	23.443709	22.26776	1.1477762	15.6197484
ECa233 10 ug/ml	19.86755	26.36612	5.4519369	17.2285356
ECa233 25 ug/ml	32.847682	14.754098	25.394548	24.3321093
ECa233 50 ug/ml	72.715232	84.289617	75.609756	77.5382017
ECa233 100 ug/ml	89.139073	88.114754	94.835007	90.696278

ตารางที่ ก-3แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ วัดผลที่เวลา 48 ชั่วโมง

Test compounds	N1	N2	N3	Average (% Cytotoxicity)
Media	0	0	0	0
ECa233 5 ug/ml	25.376182	18.955334	21.185372	21.8389627
ECa233 10 ug/ml	27.321582	24.953858	26.439681	26.2383737
ECa233 25 ug/ml	33.147034	46.917682	50.735603	43.6001063
ECa233 50 ug/ml	95.593293	96.345515	98.276587	96.738465
ECa233 100 ug/ml	99.183147	99.44629	99.411517	99.3469847

ตารางที่ ก-4 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ วัดผลที่เวลา 72 ชั่วโมง

Test compounds	N1	N2	N3	Average(% Cytotoxicity)
Media	0	0	0	0
ECa233 5 ug/ml	21.254643	22.861	23.665	22.5935521
ECa233 10 ug/ml	21.419728	35.478	27.152	28.01661733
ECa233 25 ug/ml	23.029303	55.968	42.569	40.52183546
ECa233 50 ug/ml	98.534874	99.193	99.502	99.07640136
ECa233 100 ug/ml	99.401568	99.521	99.613	99.51154797

ตารางที่ ก-5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ วัดผลที่เวลา 96 ชั่วโมง

Test compounds	N1	N2	N3	Average (% Cytotoxicity)
Media	0	0	0	0
ECa233 5 ug/ml	3.428055931	5.927152318	0.396554082	3.240
ECa233 10 ug/ml	24.58276951	5.529801325	0.533296869	10.215
ECa233 25 ug/ml	44.8579161	35.97682119	53.01517845	42.60651962
ECa233 50 ug/ml	97.92512404	94.55298013	100	97.31493577
ECa233 100 ug/ml	99.47376334	99.40397351	100	99.49372759

ผลการทดลอง การศึกษาการยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยใช้เทคนิค Colony formation assay

ตารางที่ ก-6 แสดงจำนวนการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233

Test compounds	N1	N2	N3	Number of Colonies
Control	566	526	516	536
ECa233 30 ug/ml	485	511	502	516
ECa233 40 ug/ml	275	378	387	345
ECa233 50 ug/ml	130	128	143	134

ตารางที่ ก-7 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233

Test compounds	N1	N2	N3	Average (% Colony formation)
Control	100	100	100	100±0
ECa233 30 ug/ml	85.689	97.148	97.286	93.374±2.717
ECa233 40 ug/ml	48.586	71.863	75	65.149±5.891
ECa233 50 ug/ml	22.968	24.334	27.713	25.005±0.997

ตารางที่ ก-8 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233

ความเข้มข้น ECa233 ($\mu\text{g/ml}$)	% Colony formation
Control	100
ECa233 30 $\mu\text{g/ml}$	93.374
ECa233 40 $\mu\text{g/ml}$	65.149
ECa233 50 $\mu\text{g/ml}$	25.005

ผลการทดลอง การศึกษาการยับยั้งการลุกลามในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก
ชนิดโดยใช้เทคนิค Matrigel invasion assay

ตารางที่ ก-9 แสดงจำนวนการลุกลามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เมื่อทดสอบด้วยสาร
สกัดบัวบก ECa233

Concentration	N1	N2	N3	Average
Control	217	210	224	217
ECa233 30 µg/ml	212	208	211	210
ECa233 40 µg/ml	198	207	209	204
ECa233 50 µg/ml	209	196	189	198

ผลการทดลอง การศึกษาการยับยั้งการเคลื่อนที่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก
ของมนุษย์ชนิด SW-620 โดยใช้เทคนิค Wound healing assay (Scratch assay)

ตารางที่ ก-10 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ที่
เวลาเริ่มต้น เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233

Test compounds	N1	N2	N3	% Mean counting
Control	100	100	100	100
ECa233 30 (µg/ml)	100	56	53.65	69.88333333
ECa233 40 (µg/ml)	72.42	100	54.58	75.66666667
ECa233 50 (µg/ml)	26.51	100	100	75.50333333

ตารางที่ ก-11 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233

Test compounds	N1	N2	N3	% Mean counting
Control	100	100	100	100
ECa233 30 (µg/ml)	65	63.89	100	76.2966667
ECa233 40 (µg/ml)	44.87	68.5	76.98	63.45
ECa233 50 (µg/ml)	30.3	43.53	15.78	29.87

ตารางที่ ก-12 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดบัวบก ECa233

Test compounds	N1	N2	N3	% Mean counting
Control	100	100	100	100
ECa233 30 (µg/ml)	45.08	31.91	65.15	47.38
ECa233 40 (µg/ml)	25.85	27.17	77.9	43.64
ECa233 50 (µg/ml)	18.33	34.35	37.81	30.76