บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ในสารสกัดขมิ้นชัน

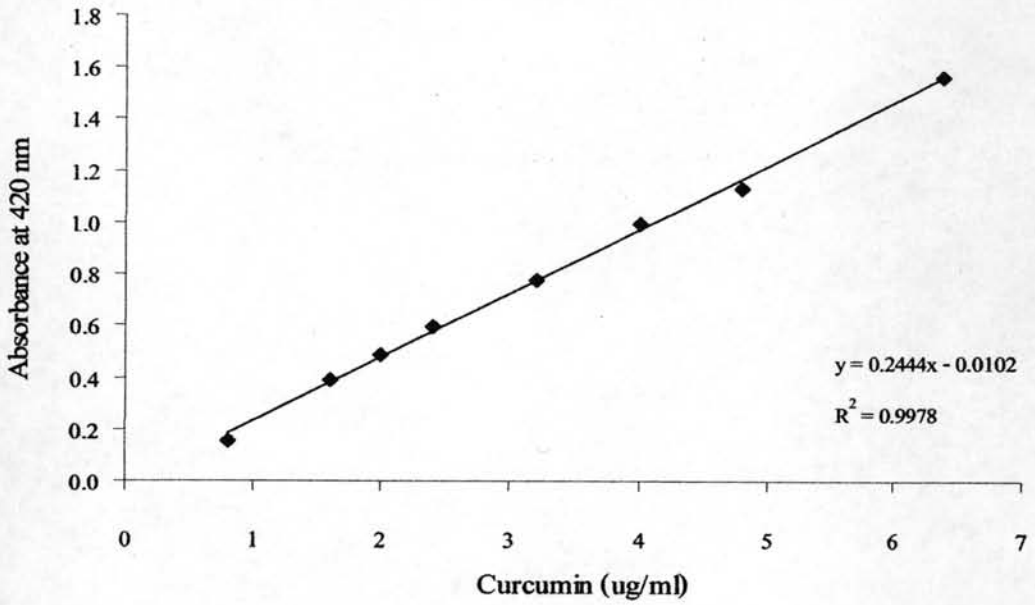
วัดปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ในสารสกัดขมิ้นชันอย่างหยาบที่สกัดด้วย 80% เอธานอล เพื่อตรวจสอบคุณภาพของสารสกัดขมิ้นชัน ปริมาณของเคอร์คิวมินอยด์ในสารสกัดขมิ้นชันต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก เมื่อคำนวณเป็นเคอร์คิวมิน (ปราณี ชวลิตธำรง และคณะ, 2544)

นำสารสกัดขมิ้นชันมาละลายด้วยสารเตตระไฮโดรฟูแรน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยเมธานอล แล้วจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตราฐานเคอร์คิวมิน แสดงดังภาพที่ 12 และคำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ในรูปของเคอร์คิวมินจากน้ำหนักสารสกัดขมิ้นชัน เนื่องจากเคอร์คิวมินอยด์ประกอบด้วยเคอร์คิวมินมากที่สุด (94%) ดังนั้น จึงถือว่าเคอร์คิวมินเป็นตัวแทนของสารในกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโมเมตร ของสารสกัดขมิ้นชันเท่ากับ 0.74±0.062 เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเคอร์คิวมิน พบว่า สารสกัดขมิ้นชันมีปริมาณเคอร์คิวมิน เท่ากับ 3.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเคอร์คิวมินในสารสกัด มีวิธีการคำนวณดังนี้ ในขั้นตอนการเตรียมสารสกัดก่อนทำการวัดหาปริมาณเคอร์คิวมิน ได้นำสารสกัดขมิ้นชันจำนวน 300 มิลลิกรัม มาละลายในสารเตตระไฮโดรฟูแรน 10 มิลลิลิตร ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัดในขณะนี้เท่ากับ 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้น เจือจางสารสกัดขมิ้นชันด้วยเมธานอลในอัตราส่วน 1:25 ความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชัน เท่ากับ 1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วจึงเจือจางสารสกัดขมิ้นชันมาเจือจางด้วยเมธานอลอีกครั้งในอัตราส่วน 1:50 ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชัน เท่ากับ 0.024 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือ 24 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จากกราฟมาตรฐานเคอร์คิวมิน สารสกัดขมิ้นชันมีปริมาณเคอร์คิวมิน เท่ากับ 3.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชัน เท่ากับ 24 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้น มีปริมาณของเคอร์คิวมินอยด์ในสารสกัดขมิ้นชัน ร้อยละ 12.75 โดยน้ำหนัก

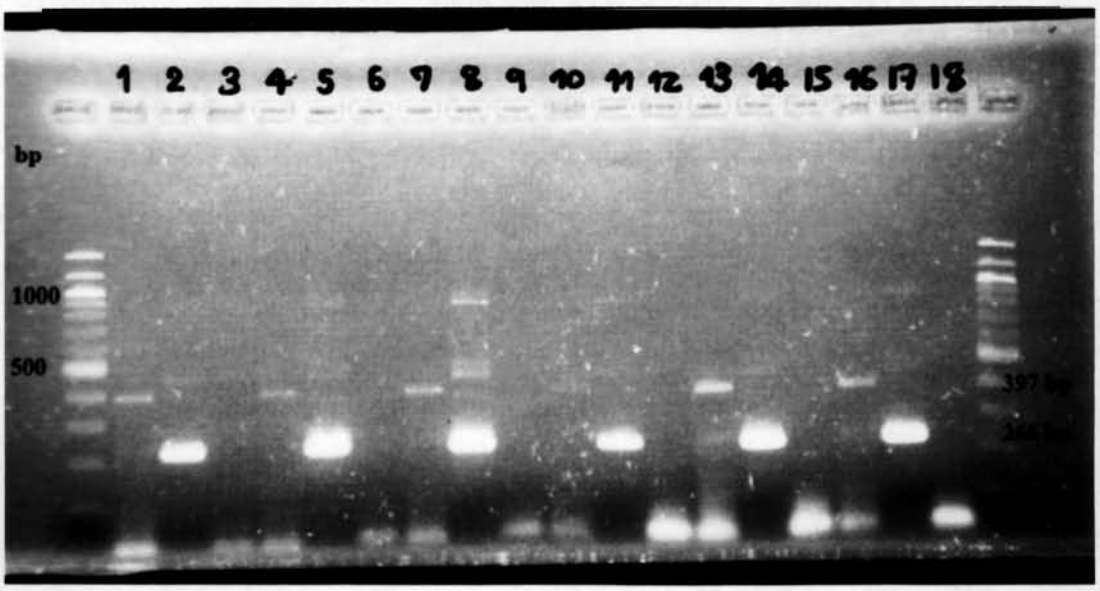


ภาพที่ 12 แสดงกราฟมาตรฐานเคอร์คิวมิน โดยนำสารมาตรฐานเคอร์คิวมินมาเจือจางด้วยเมธานอล เพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 0.8, 1.6, 2.0, 2.4, 3.2, 4.0, 4.8 และ 6.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานเคอร์คิวมินแต่ละความเข้มข้น แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานเคอร์คิวมิน

4.2 การคัดเลือกเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย

คุณสมบัติของเซลล์ที่ต้องการใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ ต้องเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ RAGE ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนสูง มีความสามารถในการลุกลามสูง และการแสดงออกของ RAGE ต้องมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการลุกลามของเซลล์ ดังรายงานก่อนหน้านี้ (Bhawal et al., 2005; Hirata et al., 2003; Kuniyasu et al., 2001; Takada et al., 2001) แต่เนื่องจากผู้วิจัยหาเซลล์เหล่านั้นไม่ได้ จึงคัดเลือกจากเซลล์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการของคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ SW480 และ HT-29 เซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa เซลล์มะเร็งตับ HepG2 เซลล์มะเร็งกล่องเสียง HEp2 และเซลล์หนังกำพร้า HaCaT โดยนำเซลล์มะเร็งทั้งห้าชนิดและเซลล์ปกติ 1 ชนิด ศึกษาการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR และใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase (บริษัท Invitrogen) และใช้ GAPDH primers เป็นตัวควบคุมภายใน

พบว่า เซลล์ทั้งหมดมีการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA แสดงดังภาพที่ 13 ดังนั้น ผู้วิจัยจึงตัดสินใจเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน RAGE มากที่สุด โดยระดับการแสดงออกของยีน RAGE ได้จากการเทียบสัดส่วนระหว่างความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน RAGE ต่อความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน GAPDH ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมภายใน จากเกณฑ์ดังกล่าว ผู้วิจัยจึงเลือกเซลล์มะเร็งลำไส้ SW480 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa มาใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ เนื่องจากมีการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA มากที่สุด เมื่อเทียบกับเซลล์อื่นๆ ที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์



ภาพที่ 13 แสดงการคัดเลือกเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย โดยนำเซลล์มะเร็งลำไส้ SW480 และ HT-29 เซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa เซลล์มะเร็งตับ HepG2 เซลล์มะเร็งกล่องเสียง HEp2 และเซลล์หนังกำพร้า HaCaT มาศึกษาการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR และใช้ GAPDH primers เป็นตัวควบคุมภายใน นำผลผลิต RT-PCR ของเซลล์ทั้งหกมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน 2.5% อะกาโรสเจล ระดับการแสดงออกของยีน RAGE ได้จากการเทียบสัดส่วนระหว่างความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน RAGE ต่อความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน GAPDH ช่องหมายเลข 1, 4, 7, 10, 13 และ 16 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน RAGE (ขนาด 397 bp) จากเซลล์ HepG2, HEp2, HT-29, HaCaT, SW480 และ HeLa ตามลำดับ ช่องหมายเลข 2, 5, 8, 11, 14 และ 17 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน GAPDH primers (ขนาด 266 bp) จากเซลล์ HepG2, HEp2, HT-29, HaCaT, SW480 และ HeLa ตามลำดับ และช่องหมายเลข 3, 6, 8, 12, 15 และ 18 แสดงผล negative control จากปฏิกิริยาของ RT-PCR ที่ไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase ของเซลล์ HepG2, HEp2, HT-29, HaCaT, SW480 และ HeLa ตามลำดับ เพื่อยืนยันว่าอาร์เอ็นเอตัวอย่างจากแต่ละเซลล์ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอ

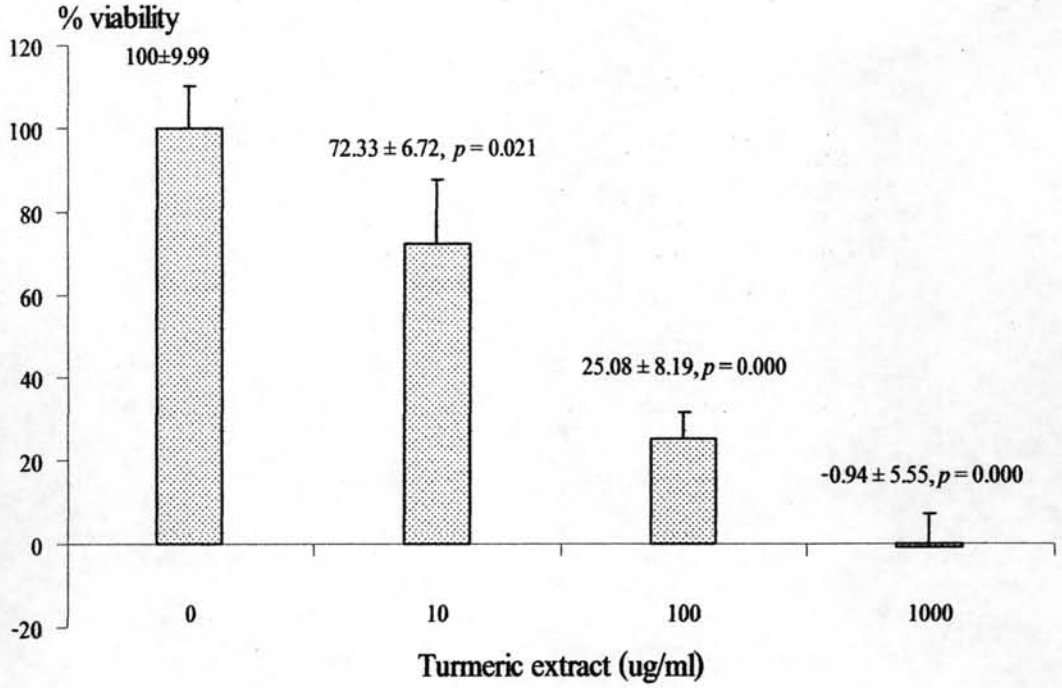
4.3 ฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในเซลล์มะเร็ง HeLa และเซลล์มะเร็ง SW480 ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay หรือ MTS assay (บริษัท Promega corporation) หาจำนวนเซลล์มีชีวิตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

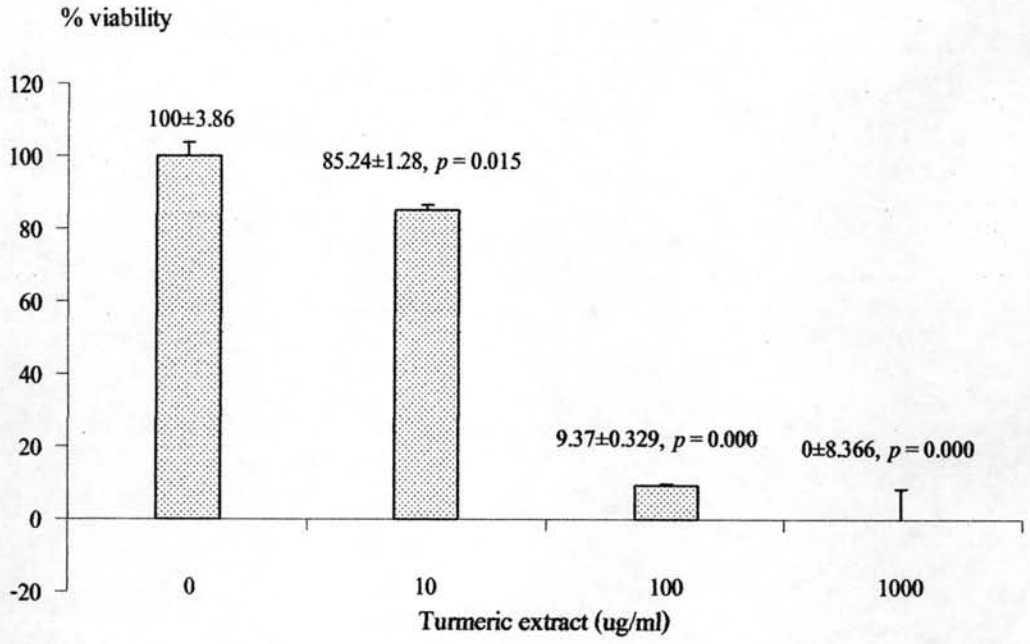
เนื่องจากไม่พบรายงานการทดสอบฤทธิ์สารสกัดขมิ้นชันอย่างหยาบต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยตรง ในตอนแรก ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อดูแนวโน้มว่าสารสกัดขมิ้นชันเริ่มยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ในช่วงความเข้มข้นใดและนำช่วงความเข้มข้นนั้นมาทดสอบในขั้นต่อไป การทดสอบเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือการบ่มเซลล์กับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม

สารสกัดขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็งทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (p = 0.021 และ 0.015 สำหรับเซลล์มะเร็ง HeLa และเซลล์มะเร็ง SW480 ตามลำดับ) และที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิตร เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของเซลล์มะเร็ง HeLa ลดลงเหลือ 25.08±8.19% และของเซลล์มะเร็ง SW480 ลดลงเหลือ 9.37±0.33% ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 14 และ 15

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็งทั้งสองต่อไป



ภาพที่ 14 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันที่เริ่มยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง โดยให้การบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม หาจำนวนเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี MTS นำเสนอเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตในรูปของ mean± S.D. ของการทดสอบซ้ำสามครั้ง ค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

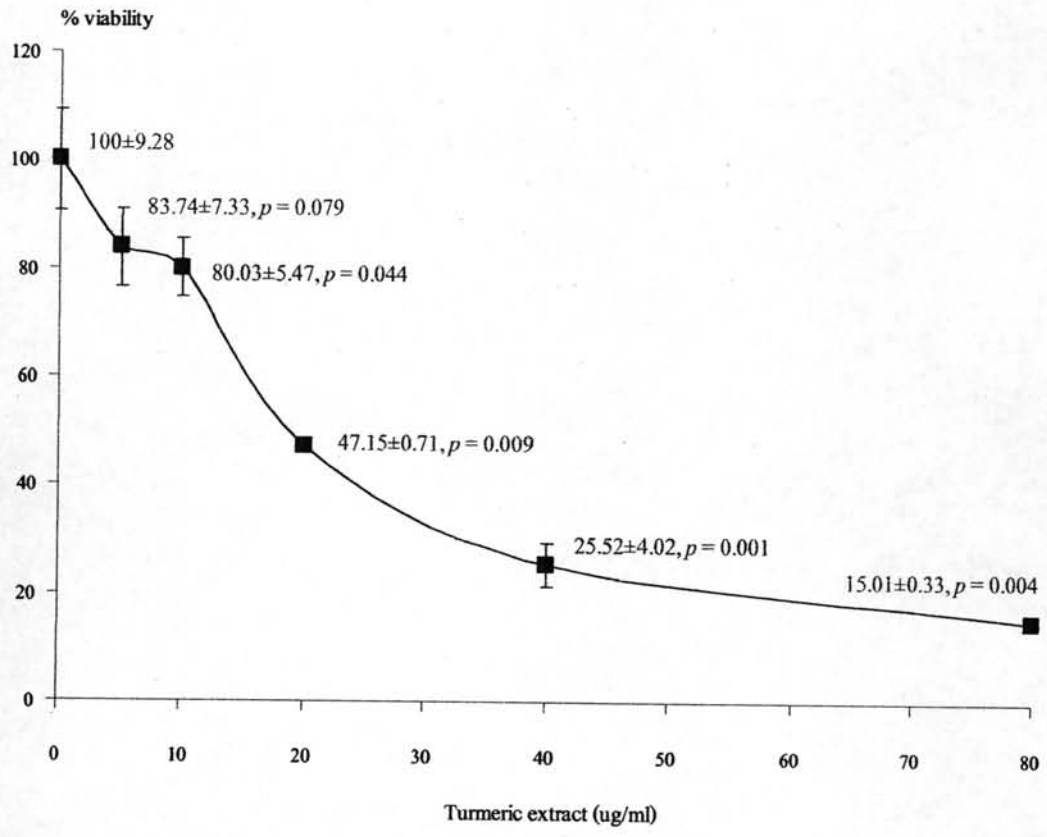


ภาพที่ 15 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันที่เริ่มยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง โดยให้การบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม หาจำนวนเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี MTS นำเสนอเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตในรูปของ mean± S.D. ของการทดสอบซ้ำสามครั้ง ค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

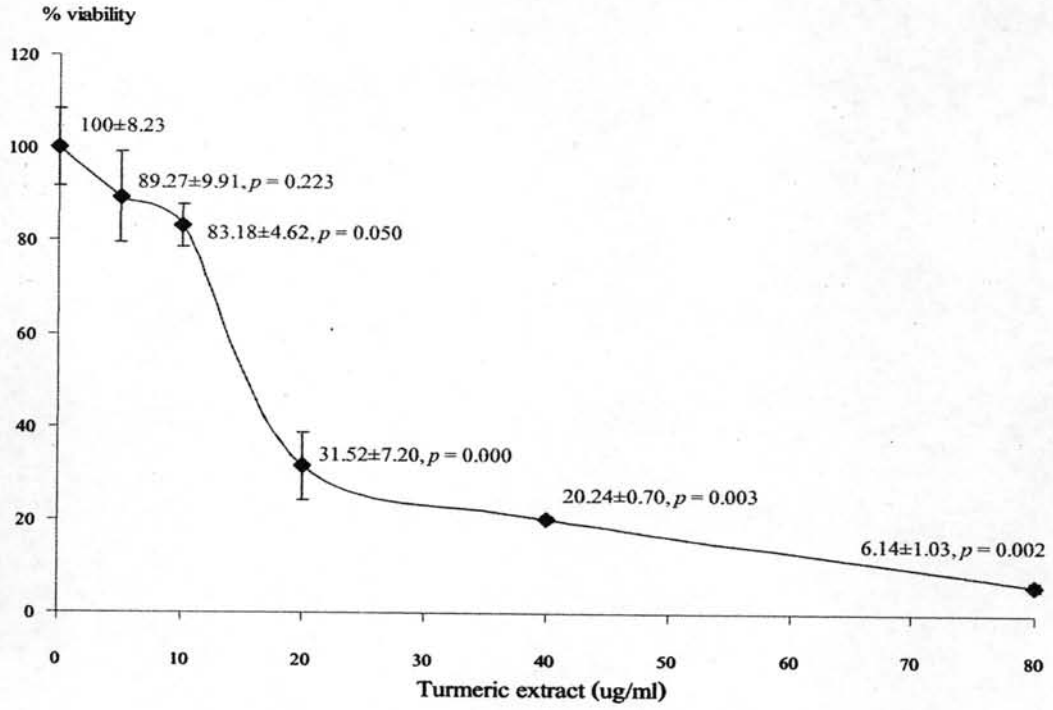
เมื่อทดสอบเซลล์ทั้งสองกับสารละลาย 0.5% DMSO เป็น 48 ชั่วโมง ควบคู่ไปกับการทดสอบเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชัน เพราะความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วย 0.5% DMSO พบว่า เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของเซลล์มะเร็ง HeLa เท่ากับ 90.58±15.44% และของเซลล์มะเร็ง SW480 เท่ากับ 100.16±2.61% ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ค่า p = 0.433 และ 0.955 สำหรับเซลล์มะเร็ง HeLa และเซลล์มะเร็ง SW480 ตามลำดับ) แสดงว่า สารละลาย 0.5% DMSO ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง HeLa และเซลล์มะเร็ง SW480

จากนั้น จึงทำการทดสอบเซลล์ทั้งสองกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง การทดสอบเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม

สารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง HeLa โดยสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง (p = 0.044 และ 0.050 สำหรับการบ่มเซลล์กับสารสกัดเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ) และความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 19.29 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และค่า IC_{50} สำหรับการบ่มเซลล์กับสารสกัดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เท่ากับ 16.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของการทดสอบเซลล์มะเร็ง HeLa กับสารสกัดขมิ้นชัน เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 16 และ 17 ตามลำดับ



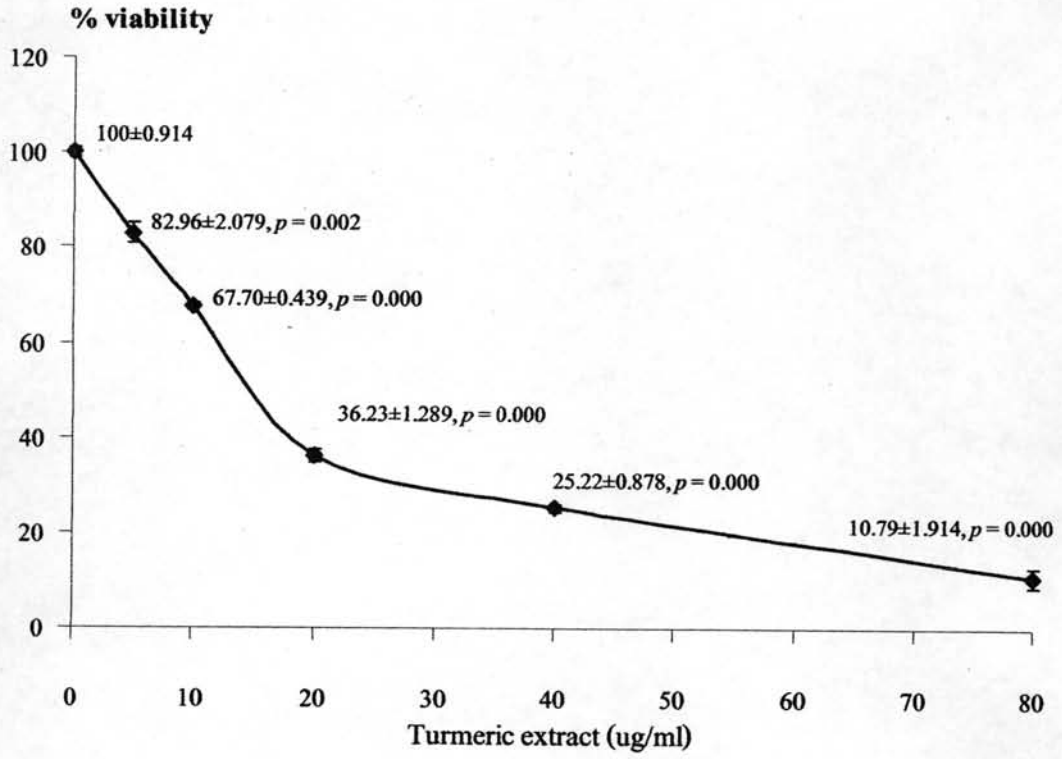
ภาพที่ 16 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้การบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม หาจำนวนเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี MTS นำเสนอเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตในรูปของ mean± S.D. ของการทดสอบซ้ำสามครั้ง ค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



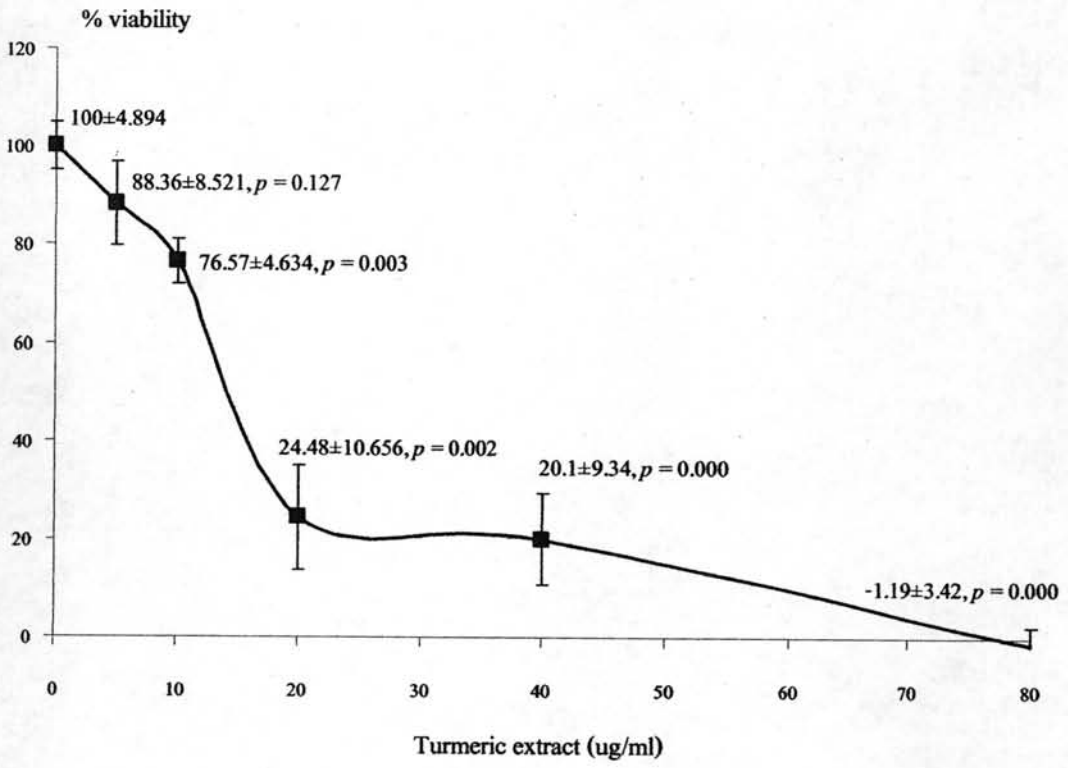
ภาพที่ 17 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยให้การบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม หาจำนวนเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี MTS นำเสนอเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตในรูปของ mean± S.D. ของการทดสอบซ้ำสามครั้ง ค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็ง HeLa กับสารละลาย 0.1% DMSO เป็น 48 และ 72 ชั่วโมง ควบคู่ไปกับการทดสอบเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชัน เนื่องจากความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วยความเข้มข้นของ DMSO ที่น้อยกว่า 0.1% พบว่า เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 87.00±11.41% และเมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เท่ากับ 100.29±7.86% ซึ่งพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ค่า $p = 0.208$ และ 0.967 สำหรับการบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ) แสดงว่า สารละลาย 0.1% DMSO ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง HeLa

สารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง SW480 โดยสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ($p = 0.002$) และที่ความเข้มข้น 10ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ($p = 0.003$) และค่า IC_{50} สำหรับการบ่มเซลล์กับสารสกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 15.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า IC_{50} สำหรับการบ่มเซลล์กับสารสกัดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เท่ากับ 15.62 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของการทดสอบเซลล์มะเร็ง SW480 กับสารสกัดขมิ้นชัน เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 18 และ 19 ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อบ่มเซลล์มะเร็ง SW480 กับสารละลาย 0.1% DMSO เป็น 48 และ 72 ชั่วโมง ควบคู่ไปกับการทดสอบเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชัน พบว่า เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของเซลล์มะเร็ง SW480 เท่ากับ 97.79±5.94% และ 92.99±19.97% สำหรับการบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ค่า $p = 0.586$ และ 0.609 สำหรับการบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ) แสดงว่า สารละลาย 0.1% DMSO ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง SW480



ภาพที่ 18 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้การบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม หาจำนวนเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี MTS นำเสนอเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตในรูปของ mean± S.D. ของการทดสอบซ้ำสามครั้ง ค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



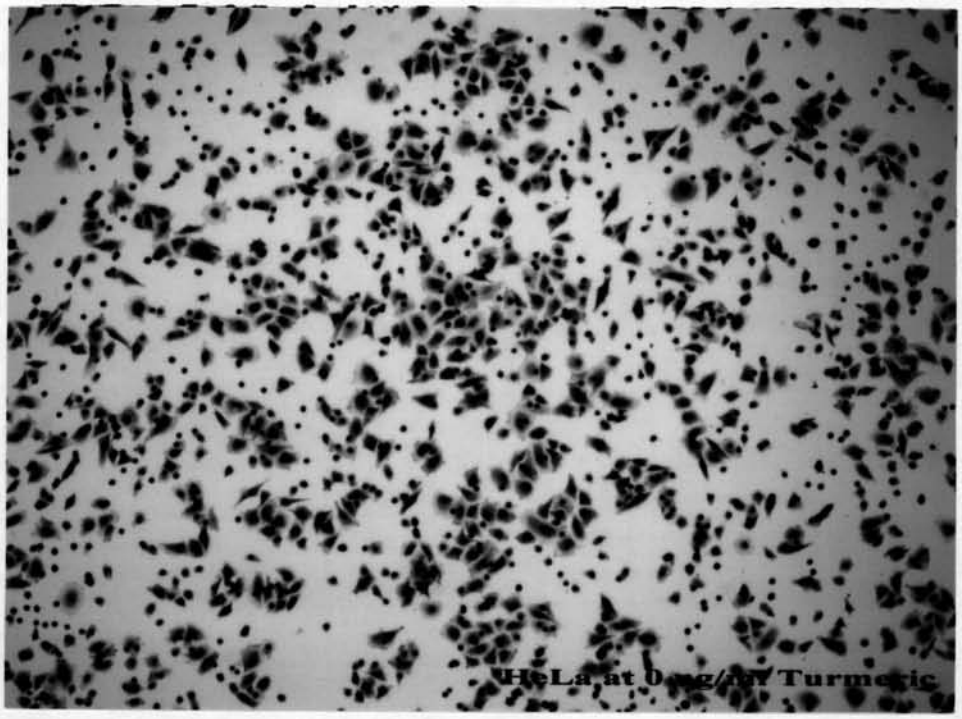
ภาพที่ 19 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยให้การบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม หาจำนวนเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี MTS นำเสนอเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตในรูปของ mean± S.D. ของการทดสอบซ้ำสามครั้ง ค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.4 ฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง

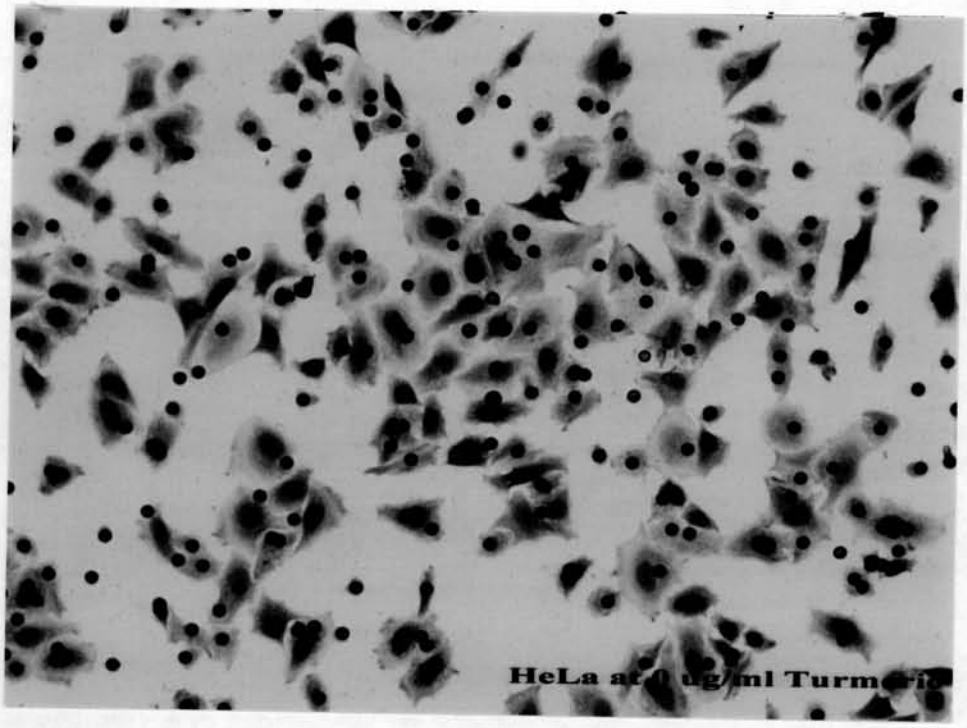
ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง HeLa และเซลล์มะเร็ง SW480 ด้วยเทคนิค matrigel invasion assay

ความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในการทดสอบนี้ ได้จากผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยเลือกค่าความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันที่ไม่เกินค่า IC_{50} ซึ่งถ้าใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงกว่านี้อาจส่งผลให้เซลล์ตายหรือเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันนำมาทดสอบฤทธิ์ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็งทั้งสอง คือ 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

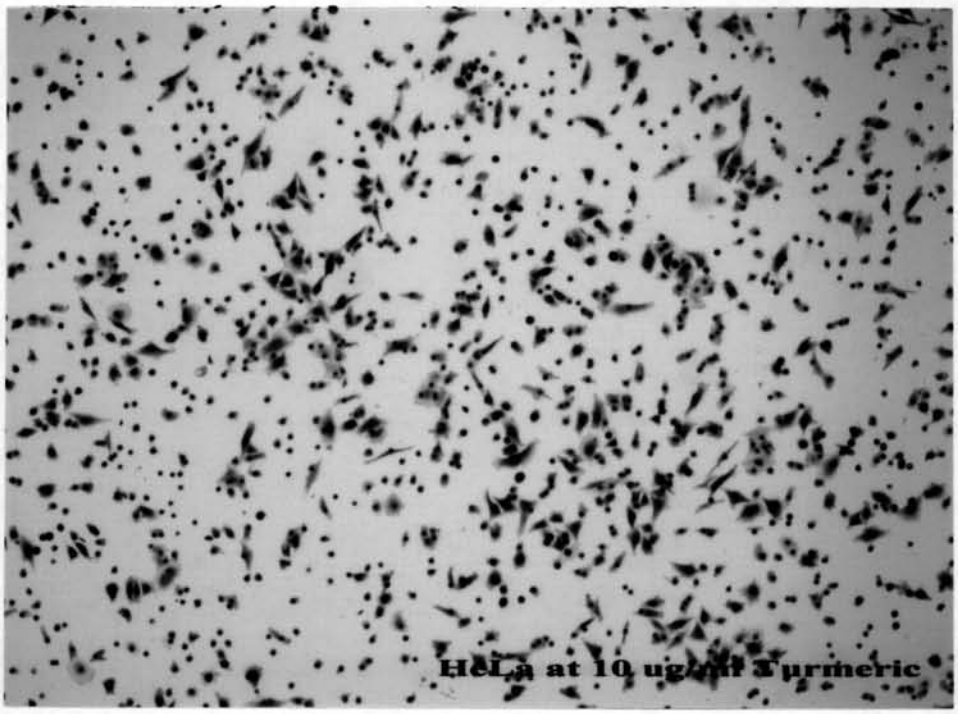
ผู้วิจัยได้ทำการบ่มเซลล์มะเร็ง HeLa กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.2 µg/µl matrigel เคลือบบนเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert (ดังแสดงในบทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ในหัวข้อ "หลักการของ matrigel invasion assay" หน้าที่ 28-29) เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (การบ่มเซลล์กับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม และทดสอบเซลล์กับสารละลาย 0.1% DMSO ด้วย เพื่อทดสอบว่าสารละลาย 0.1% DMSO ส่งผลต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็งหรือไม่ นับจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า สุ่มเลือกนับทั้งหมด 6 ฟิลด์ต่อ insert ภาพของเซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1% DMSO เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 20-27 และเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มะเร็ง HeLa ที่เคลื่อนผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนแสดงดังตารางที่ 5



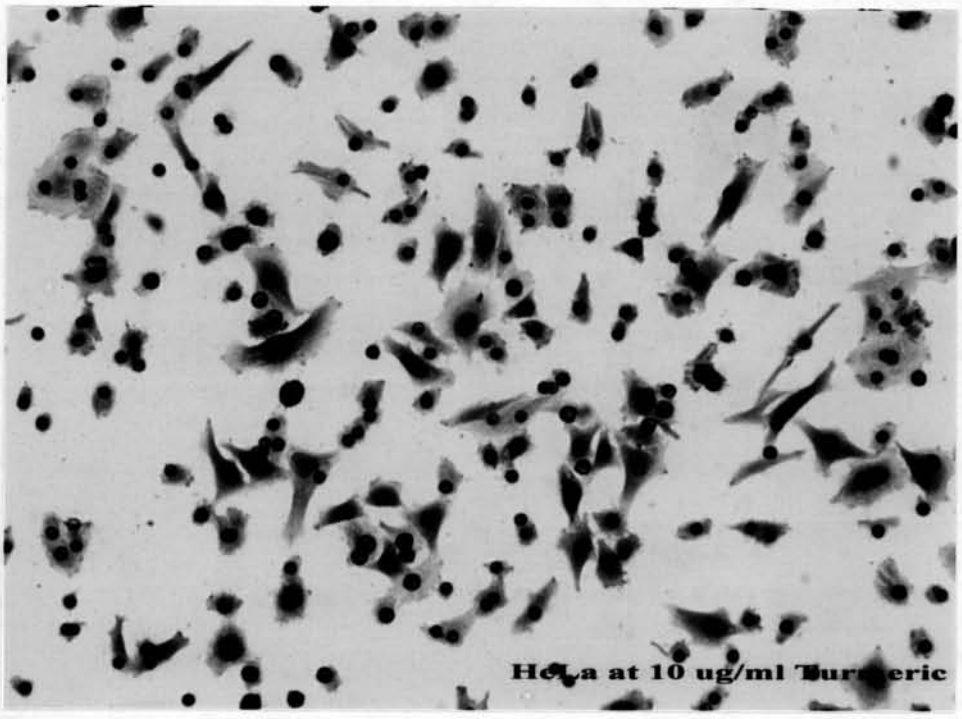
ภาพที่ 20 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง HeLa ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 40 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.2 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert



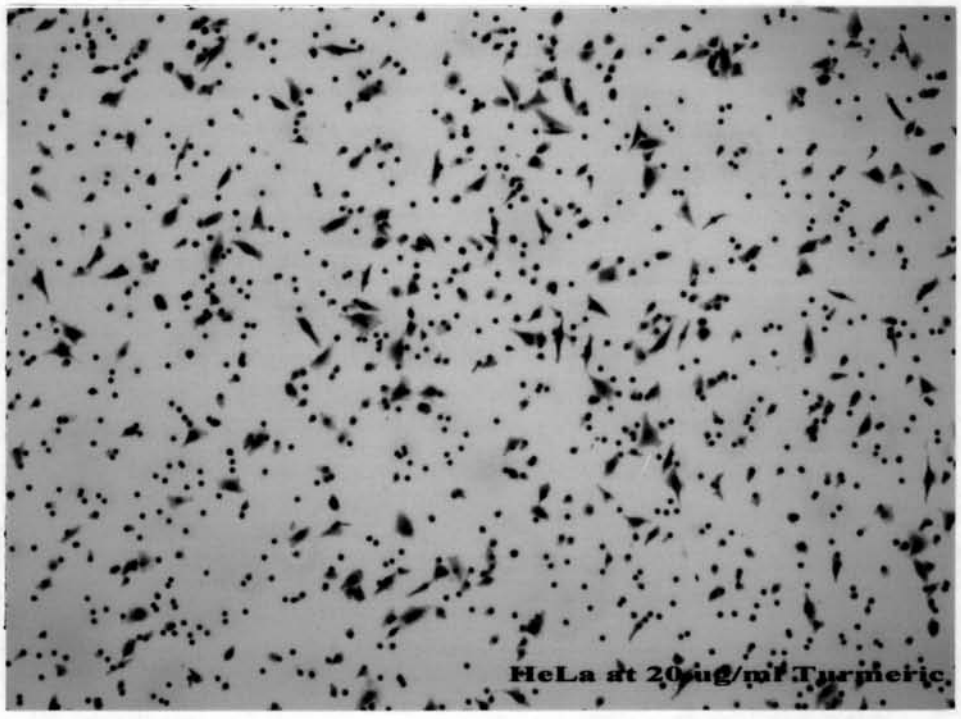
ภาพที่ 21 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง HeLa ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 100 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.2 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert



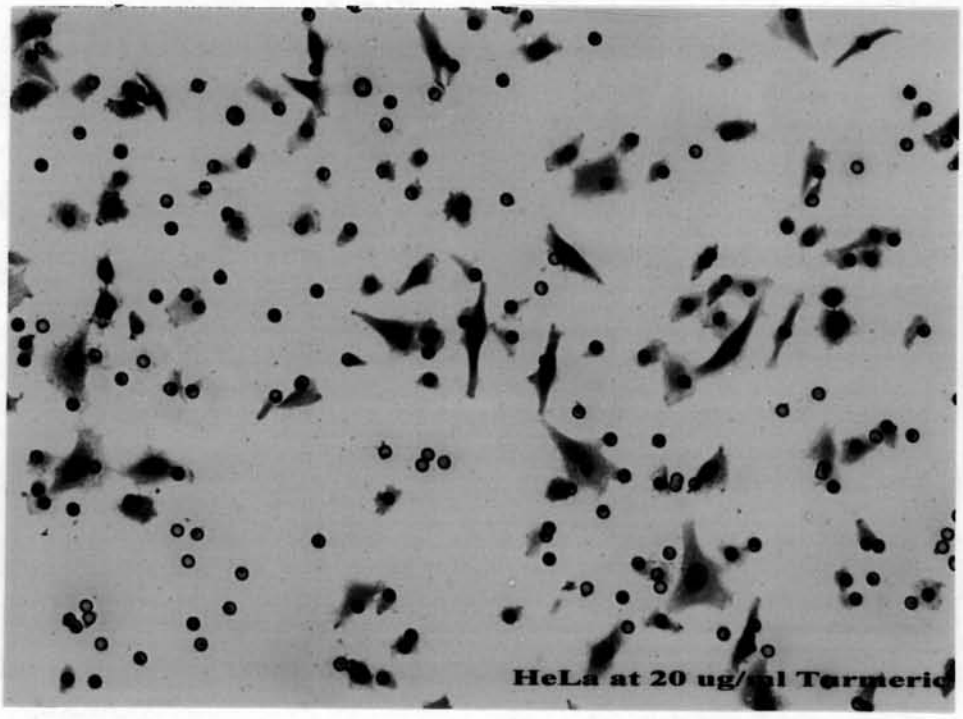
ภาพที่ 22 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง HeLa ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 40 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.2 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert



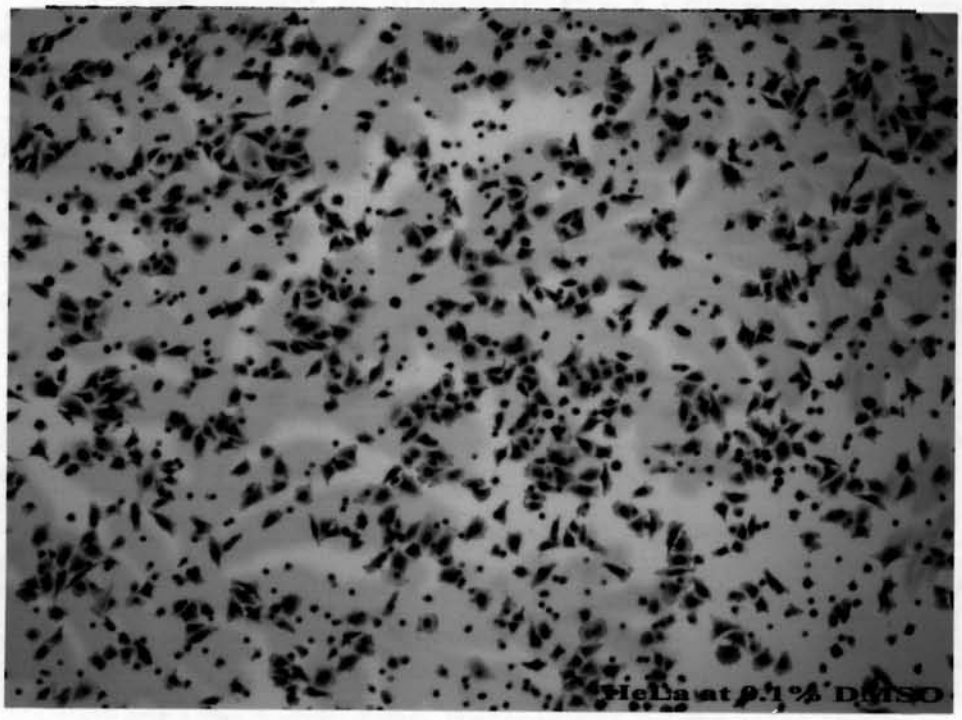
ภาพที่ 23 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง HeLa ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 100 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.2 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert



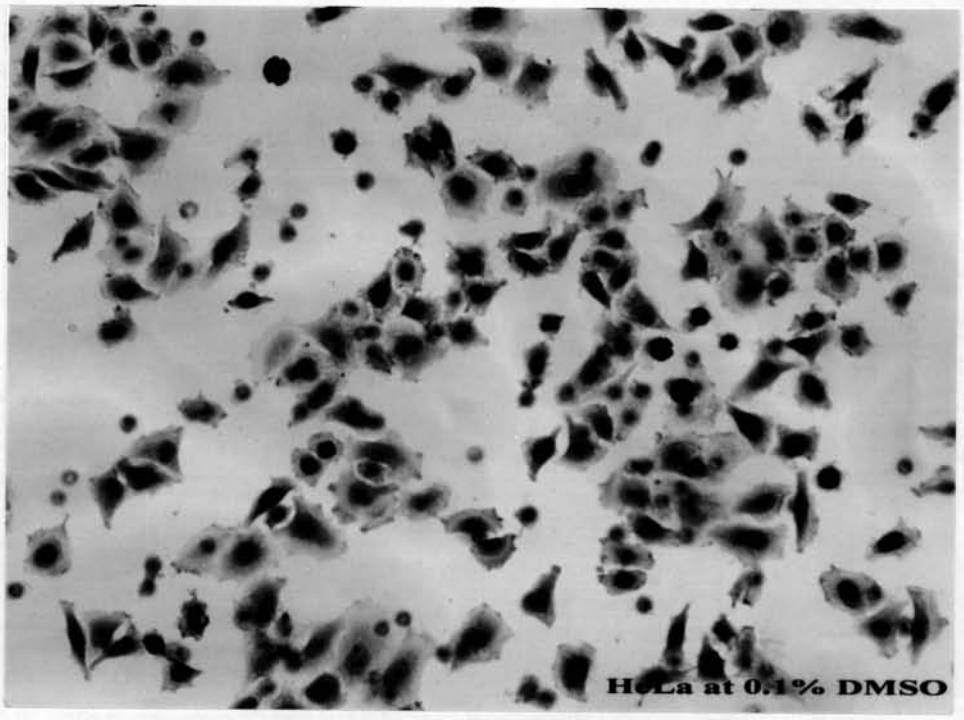
ภาพที่ 24 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง HeLa ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 40 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.2 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert



ภาพที่ 25 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง HeLa ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 100 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.2 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert



ภาพที่ 26 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง HeLa ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 40 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารละลาย 0.1% DMSO เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.2 μg/μl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert เพื่อทดสอบฤทธิ์สารละลาย 0.1% DMSO ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง



ภาพที่ 27 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง HeLa ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 100 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารละลาย 0.1% DMSO เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.2 μg/μl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert เพื่อทดสอบฤทธิ์สารละลาย 0.1% DMSO ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง

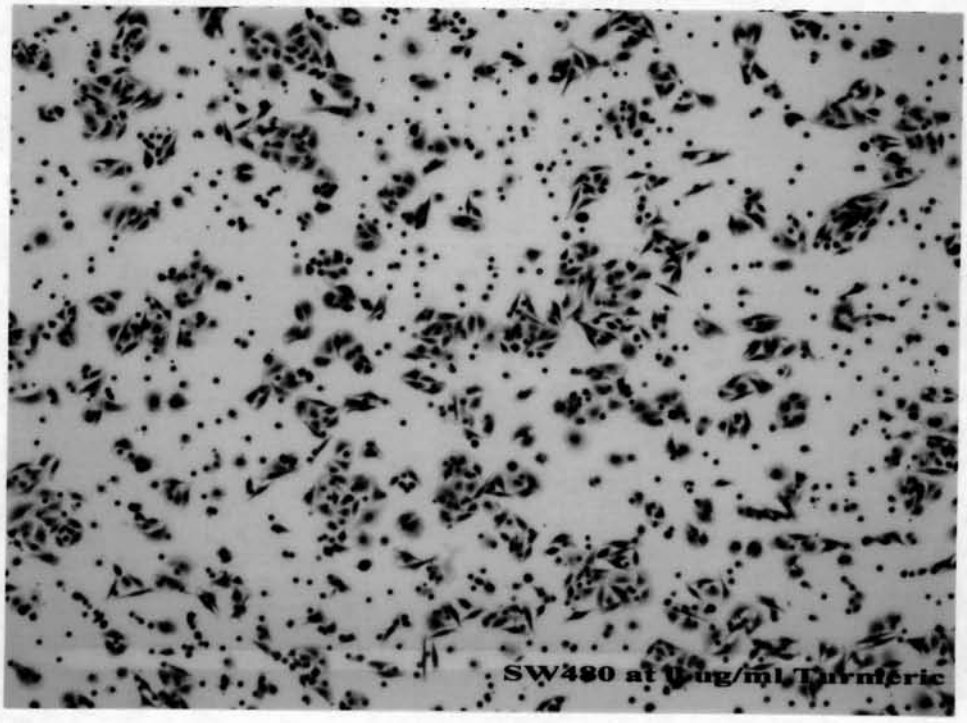
ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มะเร็ง HeLa ที่เคลื่อนผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ในการทดสอบ matrigel invasion assay เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1% DMSO เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.2 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรน นับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่าโดยสุ่มนับทั้งหมด 6 ฟิลด์ต่อ insert ผลการทดสอบแสดงในรูป mean± S.D. ของการทดสอบซ้ำสามครั้งและค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เซลล์มะเร็ง	การทดสอบเซลล์			
	สารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น (µg/ml)			สารละลาย 1% DMSO
	0	10	20	
HeLa	100 ± 3.63%	66.06 ±6.49% (p =0.000)	48.72±3.76% (p =0.000)	94.13± 6.23% (p = 0.131)

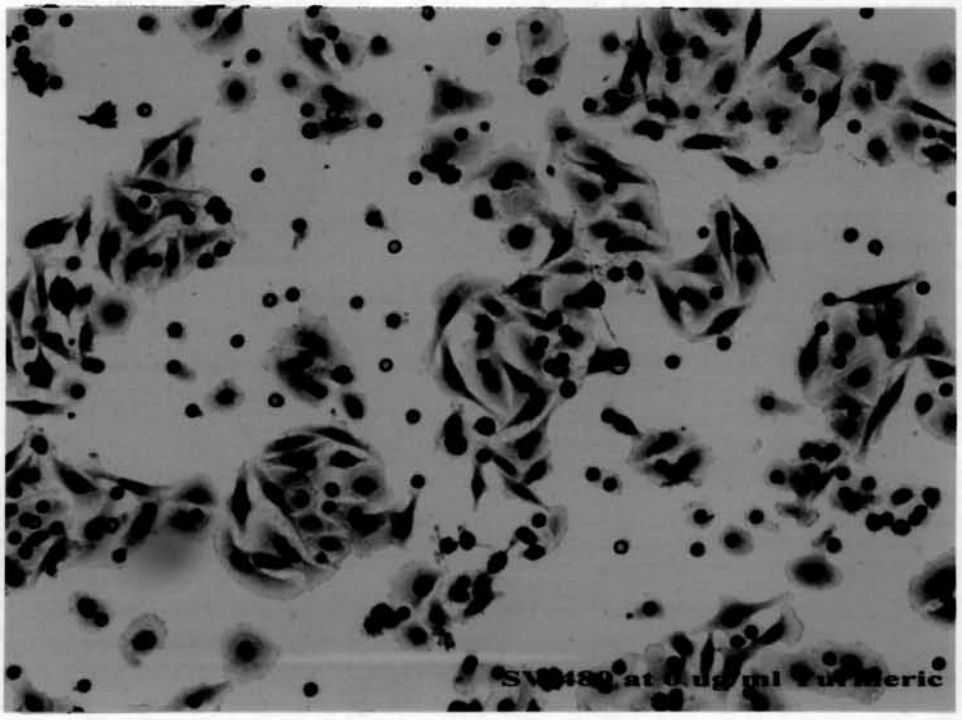
สารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็ง HeLa ตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ต่อมิลลิลิตร ได้อย่างนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p =0.000) โดยที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดขมิ้นชันสามารถยับยั้งการลุกลามได้ถึง 48.72±3.76% (p =0.000) และเมื่อบ่มเซลล์กับสารละลาย 0.1% DMSO ควบคู่ไปกับการทดสอบ พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p = 0.131) แสดงว่าสารละลาย 0.1% DMSO ไม่ส่งผลต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง HeLa

เมื่อทำการทดสอบ matrigel invasion assay กับเซลล์มะเร็ง SW480 ด้วยสภาวะเดียวกันกับที่ทดสอบกับเซลล์มะเร็ง HeLa นั่นคือ การบ่มเซลล์มะเร็ง SW480 กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.2 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert พบว่า ไม่มีเซลล์เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรน แม้แต่เซลล์ที่บ่มกับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน (สารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ก็ไม่พบเซลล์เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนลงมาสู่ด้านล่างของเนื้อเยื่อเมมเบรน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ โดยบ่มเซลล์มะเร็ง SW480 กับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.2 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert แต่เพิ่มเวลาในการบ่มเป็น 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า มีเซลล์เคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนเป็นจำนวนน้อยมากหรือไม่พบเซลล์เลย ต่อมา ผู้วิจัยจึงปรับสภาวะในการทดสอบอีกครั้ง โดยทำการทดสอบเซลล์มะเร็ง SW480 กับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลาย matrigel ที่เคลือบเนื้อเยื่อเมมเบรนจาก 0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ไปเป็น 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (Hollas et al., 1991) และบ่มเซลล์เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า มีเซลล์เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาในการบ่ม ดังนั้น ผู้วิจัยจึงตัดสินใจเลือกทดสอบการลุกลามของเซลล์มะเร็ง SW480 ภายในสภาวะที่มีสารละลาย 0.1 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนและบ่มเซลล์กับสารสกัดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

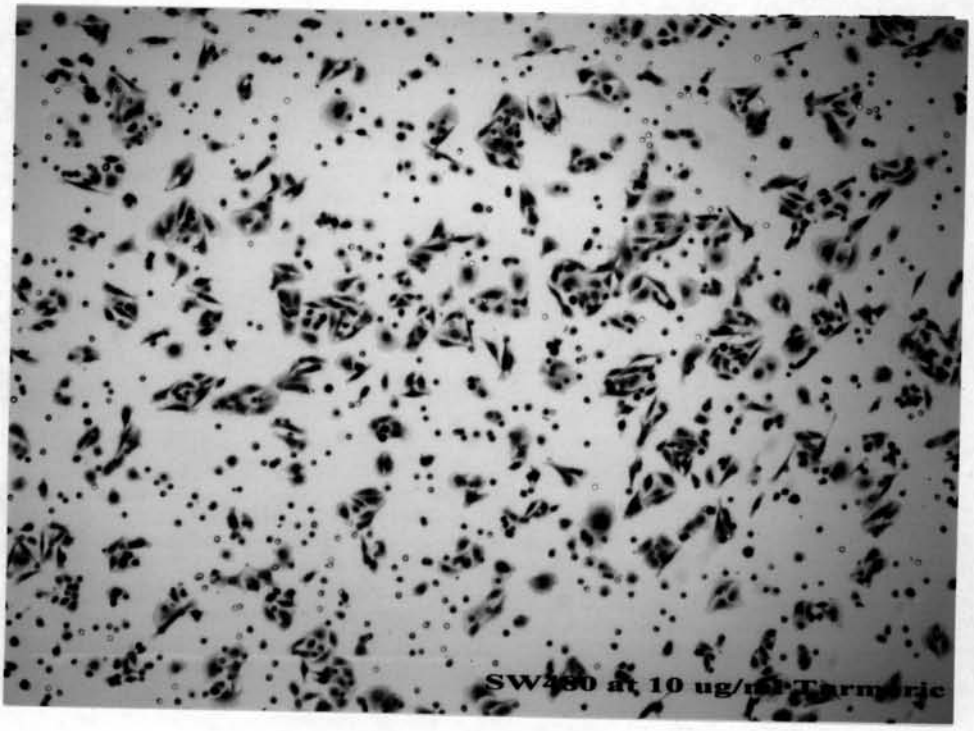
ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบบ่มเซลล์มะเร็ง SW480 กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.1 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ ยังบ่มเซลล์กับสารละลาย 0.1% DMSO ด้วย เพื่อทดสอบผลของสารละลาย 0.1% DMSO ส่งการลุกลามของเซลล์มะเร็ง นับจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า สุ่มเลือกนับทั้งหมด 6 ฟิลด์ต่อ insert ภาพของเซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1% DMSO เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 28-35 และเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มะเร็ง SW480 ที่เคลื่อนผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนแสดงดังตารางที่ 6



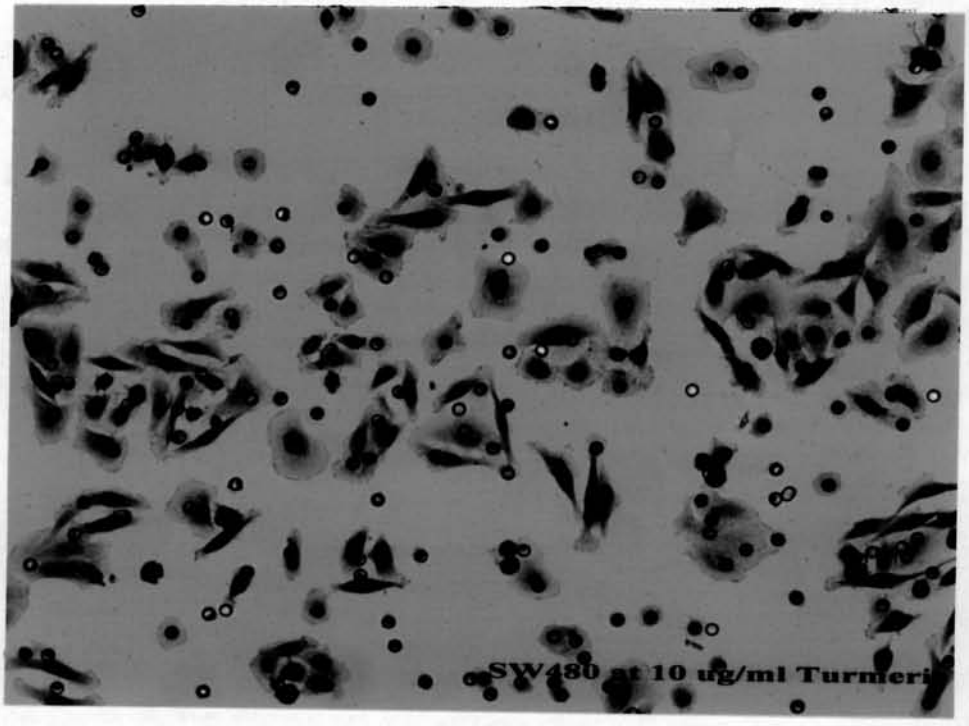
ภาพที่ 28 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง SW480 ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 40 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.1 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert



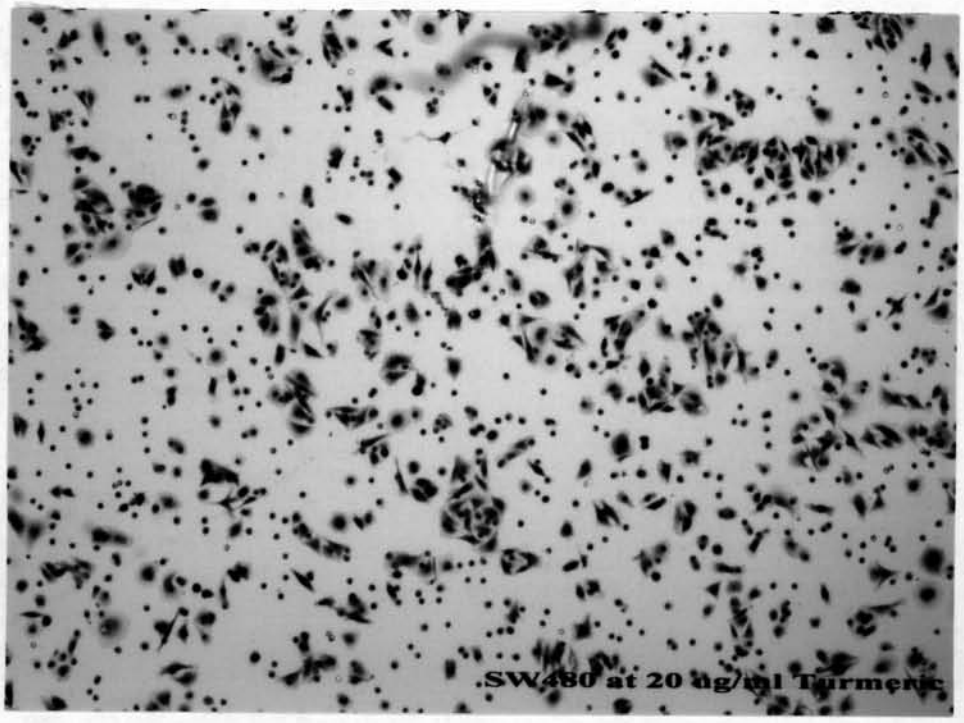
ภาพที่ 29 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง SW480 ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 100 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.1 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert



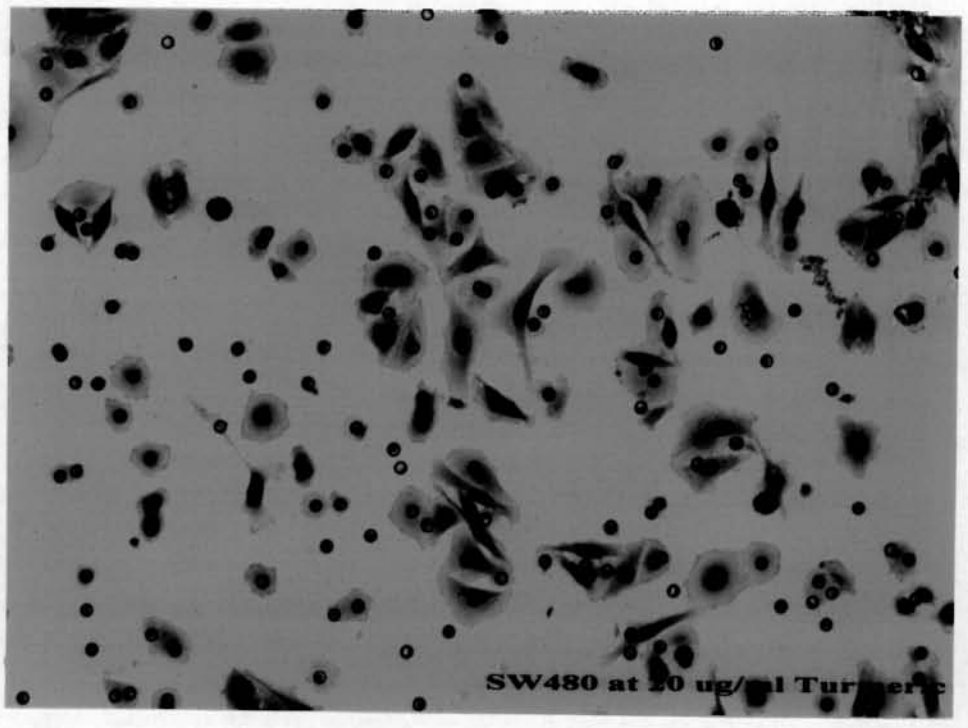
ภาพที่ 30 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง SW480 ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 40 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.1 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert



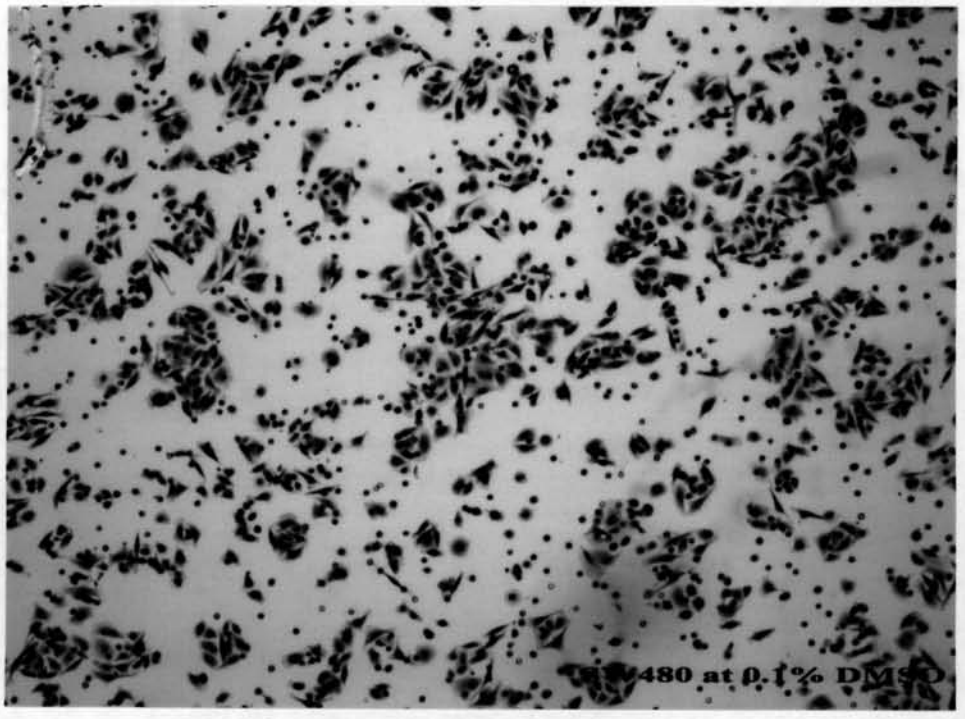
ภาพที่ 31 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง SW480 ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 100 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.1 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert



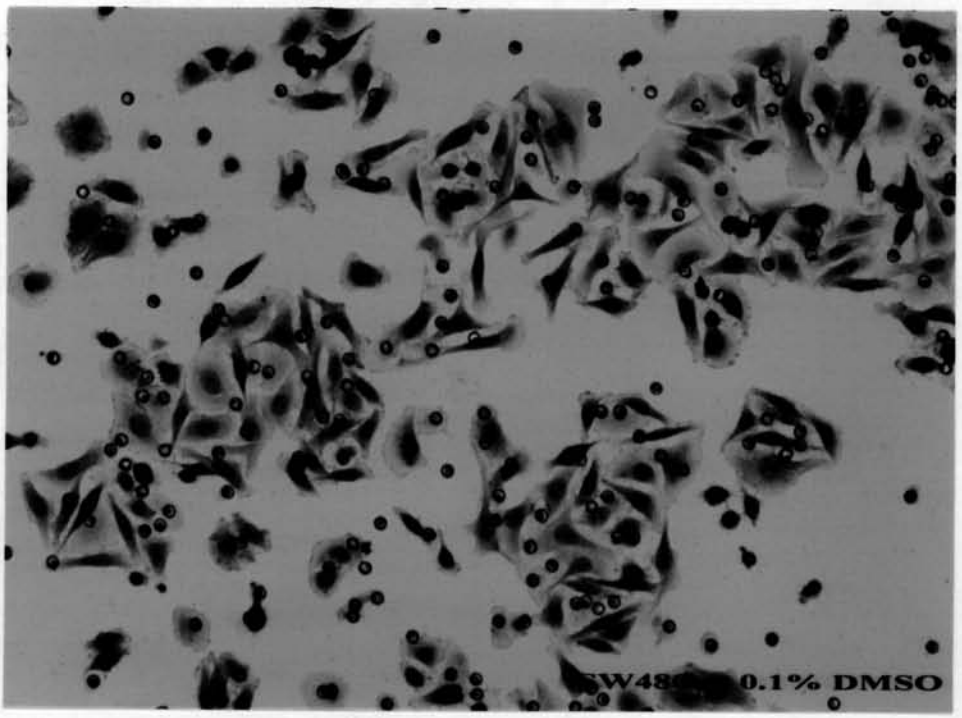
ภาพที่ 32 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง SW480 ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 40 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.1 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert



ภาพที่ 33 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง SW480 ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 100 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.1 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert



ภาพที่ 34 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง SW480 ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 40 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารละลาย 0.1% DMSO เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.1 μg/μl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert เพื่อทดสอบฤทธิ์สารละลาย 0.1% DMSO ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง



ภาพที่ 35 แสดงภาพเซลล์มะเร็ง SW480 ที่เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ที่ขนาดกำลังขยาย 100 เท่า เมื่อบ่มเซลล์กับสารละลาย 0.1% DMSO เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.1 μg/μl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert เพื่อทดสอบฤทธิ์สารละลาย 0.1% DMSO ต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง

ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มะเร็ง SW480 ที่เคลื่อนผ่านเนื้อเยื่อเมมเบรนของ insert ในการทดสอบ matrigel invasion assay เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1% DMSO เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายในระบบของ invasion assay ซึ่งมีสารละลาย 0.1 µg/µl matrigel เคลือบที่เนื้อเยื่อเมมเบรน นับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่าโดยสุ่มนับทั้งหมด 6 ฟิลด์ต่อ insert ผลการทดสอบแสดงในรูป mean± S.D. ของการทดสอบซ้ำสามครั้งและค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เซลล์มะเร็ง	การทดสอบเซลล์			
	สารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น (µg/ml)			สารละลาย 1% DMSO
	0	10	20	
SW480	100±9.97%	84.07±14.91% (p=0.003)	47.02 ±10.37% (p=0.000)	100.01±8.46% (p=0.984)

สารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็ง SW480 ตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ต่อมิลลิลิตร ได้อย่างนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p =0.003) โดยที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดขมิ้นชันสามารถยับยั้งการลุกลามได้ถึง 47.02 ±10.37% (p=0.000) และเมื่อบ่มเซลล์กับสารละลาย 0.1% DMSO ควบคู่ไปกับการทดสอบ ไม่พบความแตกต่างอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p=0.984) แสดงว่าสารละลาย 0.1% DMSO ไม่ส่งผลต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง SW480

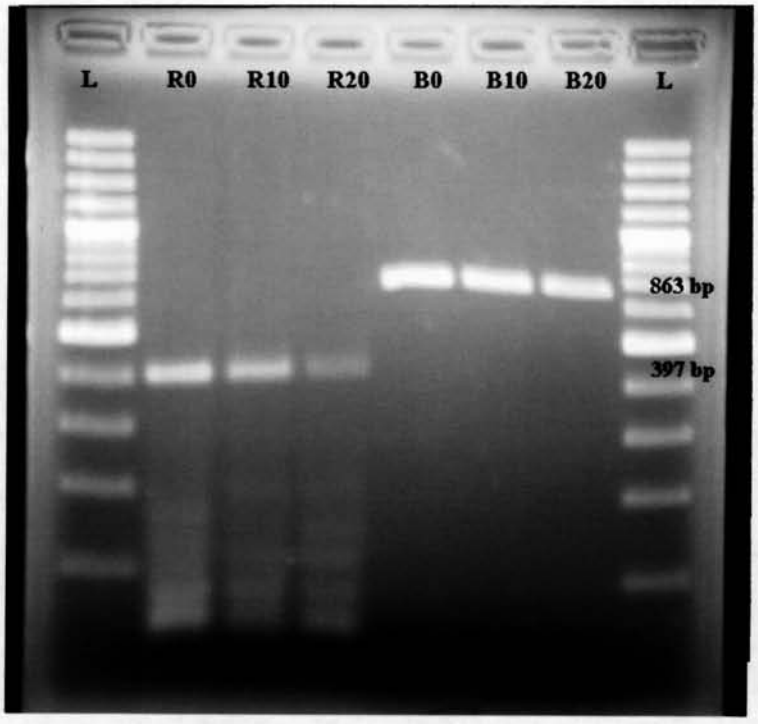
4.5 ฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการแสดงออกยีน RAGE ในระดับ mRNA ของเซลล์มะเร็ง

ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการแสดงออก RAGE ในระดับ mRNA ของเซลล์มะเร็ง HeLa และเซลล์มะเร็ง SW480 ด้วยเทคนิค RT-PCR

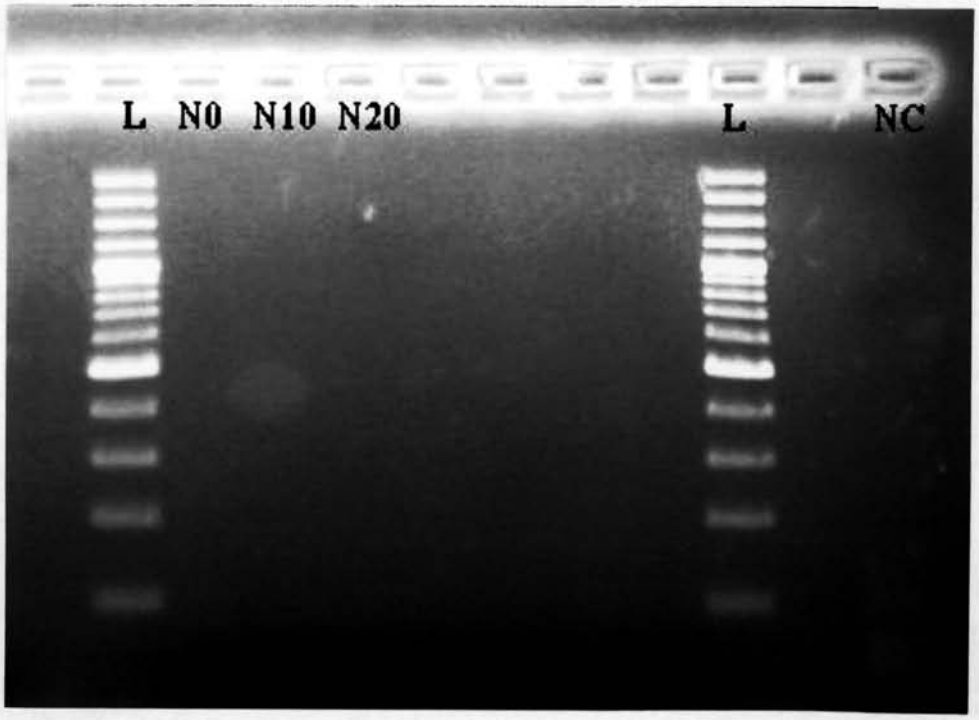
ความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในการทดสอบนี้ อ้างอิงมาจากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการลุกลามของเซลล์มะเร็ง พบว่า ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดขมิ้นชันสามารถยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งทั้งสองได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันที่จะใช้ในการศึกษาในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อการแสดงออกยีน RAGE คือ 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เมื่อบ่มเซลล์มะเร็งทั้งสองกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม แล้วจึงนำเซลล์มะเร็งมาสกัดเพื่อเอาตัวอย่างอาร์เอ็นเอ นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาศึกษาการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยนำอาร์เอ็นเอมาทดสอบกับเอนไซม์ DNase I ก่อนเพื่อกำจัดดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนในตัวอย่างอาร์เอ็นเอ แล้วจึงนำอาร์เอ็นเอมาเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ cDNA และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ β-actin primers เป็นตัวควบคุมภายใน นำผลผลิตของ RT-PCR มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน 2.5% อะกาโรส ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide

เมื่อทำการบ่มเซลล์มะเร็ง HeLa กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดขมิ้นสามารถลดการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA ภาพของผลผลิต RT-PCR ของเซลล์มะเร็ง HeLa ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่น 2.5% อะกาโรส แสดงดังภาพที่ 36 และ 37 ตามลำดับ



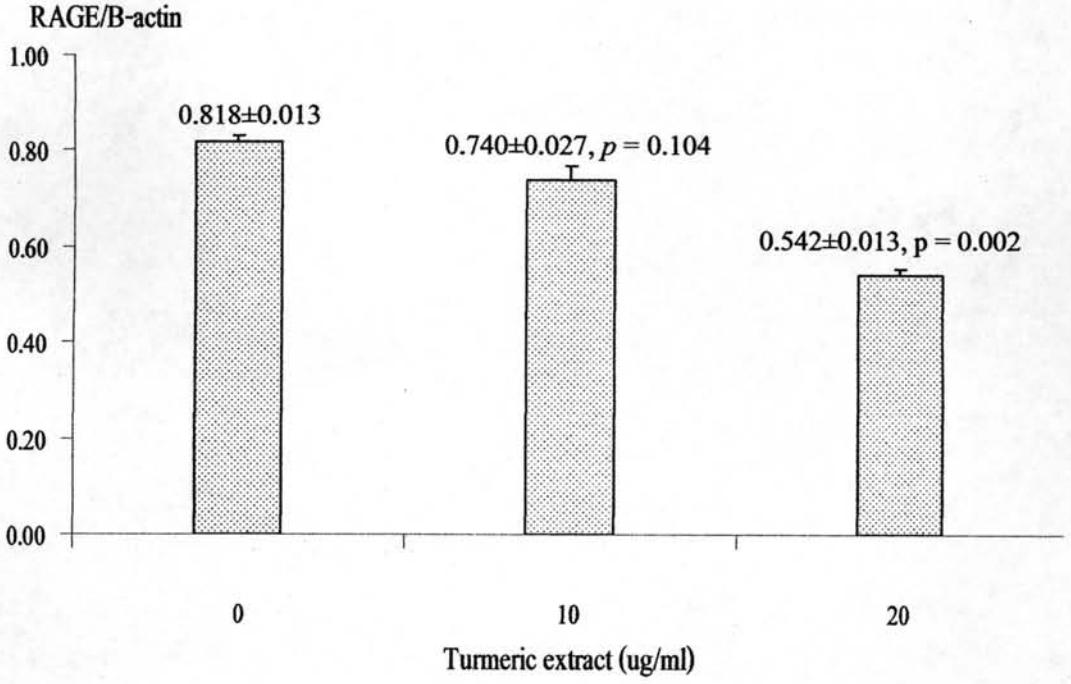
ภาพที่ 36 แสดงผลผลิต RT-PCR ของเซลล์มะเร็ง HeLa ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่น 2.5% อะกาโรส เมื่อทำการทดสอบเซลล์กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงทำการสกัดอาร์เอ็นเอ นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาศึกษาการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ β-actin primers เป็นตัวควบคุมภายใน นำผลผลิต RT-PCR มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าและย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ช่อง L คือ 100 bp DNA ladder ช่อง R0, R10 และ R20 คือ ผลผลิต RT-PCR ของยีน RAGE จากเซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ขนาด 397 bp) ช่อง B0, B10 และ B20 คือ ผลผลิต RT-PCR ของยีน β-actin จากเซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ขนาด 863 bp)



ภาพที่ 37 แสดงตัวควบคุม negative control จากการทำ RT-PCR ของเซลล์มะเร็ง HeLa เพื่อยืนยันว่าตัวอย่างอาร์เอ็นเอไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาของ RT-PCR ของ negative control แตกต่างจากปฏิกิริยาของ RT-PCR ของชุดทดสอบตรงที่ไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase ลงไปในขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA จึงทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ cDNA จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอ และเมื่อนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ β-actin primers (ผลผลิต PCR มีขนาด 863 bp) ก็จะไม่เกิดผลผลิต PCR นอกจากนี้ ต้องทำ negative control ในขั้นตอน PCR ด้วย เพื่อตรวจสอบว่าชุดน้ำยาที่ใช้ในขั้นตอน PCR นี้ ไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาของ PCR ของ negative control แตกต่างจากปฏิกิริยาของ PCR ของชุดทดสอบตรงที่ไม่เติมแม่แบบดีเอ็นเอลงไป แต่ใส่น้ำลงไปแทน ช่อง L คือ 100 bp DNA ladder ช่อง N0, N10 และ N20 คือ negative control ของปฏิกิริยาของ RT-PCR ของเซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ช่อง NC คือ negative control ของปฏิกิริยา PCR

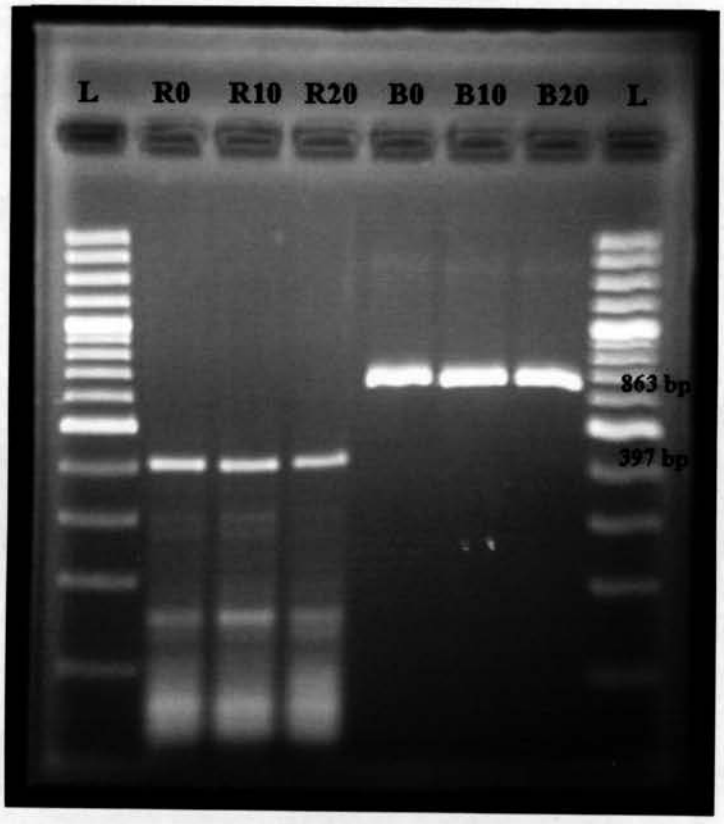
วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา RT-PCR ในเชิงปริมาณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป AlphaImager 2200 ระดับการแสดงออกของยีน RAGE ได้จากการคำนวณในรูปสัดส่วนความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน RAGE ต่อความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน β–actin

หลังจากบ่มเซลล์มะเร็ง HeLa กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HeLa ลดลง และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($p=0.002$) ระดับการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงดังภาพที่ 38

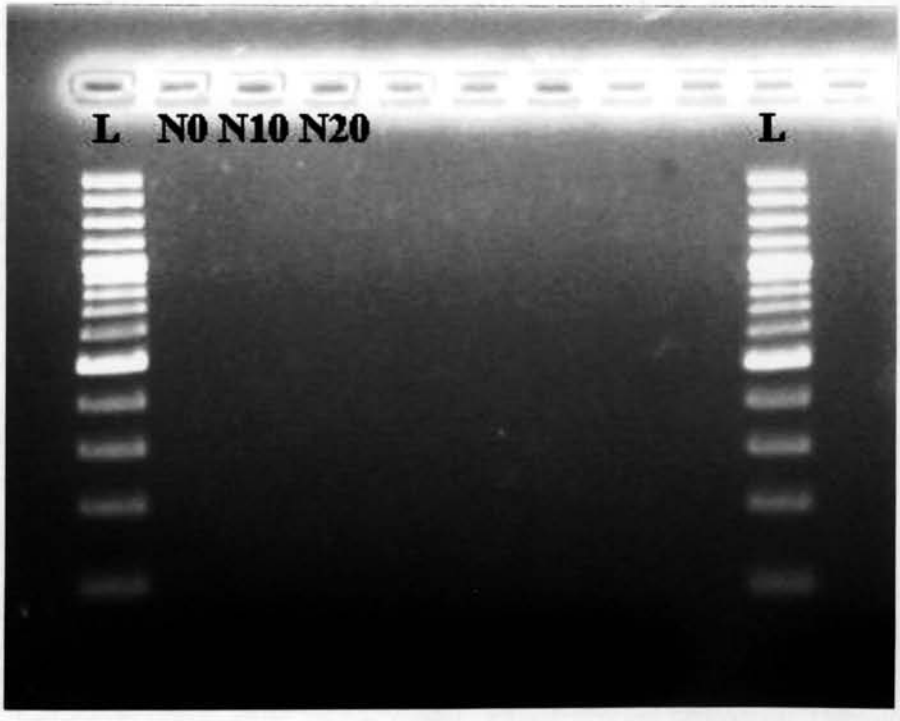


ภาพที่ 38 แสดงระดับการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง HeLa ที่บ่มกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา RT-PCR ในเชิงปริมาณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป AlphaImager 2200 ระดับการแสดงออกของยีน RAGE คำนวณจากสัดส่วนความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน RAGE ต่อความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน β–actin และแสดงในรูป mean±S.D. ของการทดสอบซ้ำสามครั้ง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมคำนวณจาก Student's *t*-test โดยค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลังจากบ่มเซลล์มะเร็ง SW480 กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาศึกษาการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า สารสกัดขมิ้นชันไม่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA ภาพของผลผลิต RT-PCR ของเซลล์มะเร็ง SW480 ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่น 2.5% อะกาโรส แสดงดังภาพที่ 39 และ 40

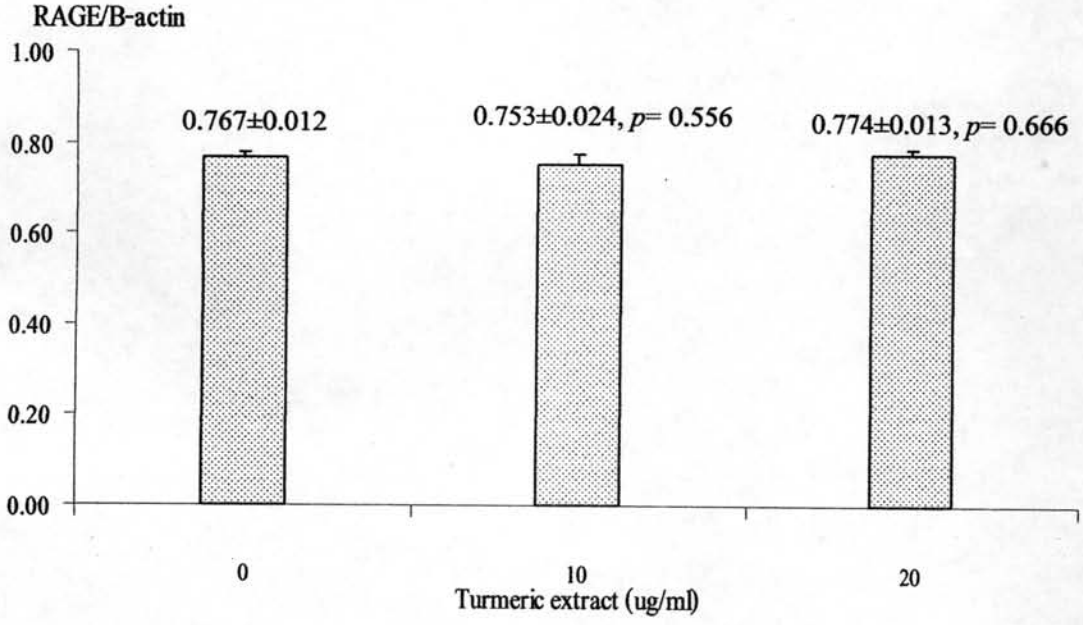


ภาพที่ 39 แสดงผลผลิต RT-PCR ของเซลล์มะเร็ง SW480 ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่น 2.5% อะกาโรส เมื่อบ่มเซลล์กับ 0, 10 และ 20 µg/ml สารสกัดขมิ้นชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อนำอาร์เอ็นเอมาศึกษาการแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ β-actin primers เป็นตัวควบคุมภายใน จากนั้นแยกผลผลิต RT-PCR ด้วยกระแสไฟฟ้าและย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ช่อง L คือ 100 bp DNA ladder ช่อง R0, R10 และ R20 คือ ผลผลิต RT-PCR ของยีน RAGE จากเซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับ 0, 10 และ 20 µg/ml สารสกัดขมิ้นชันตามลำดับ (ขนาด 397 bp) ช่อง B0, B10 และ B20 คือ ผลผลิต RT-PCR ของยีน β-actin จากเซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับ 0, 10 และ 20 µg/ml สารสกัดขมิ้นชันตามลำดับ (ขนาด 863 bp)



ภาพที่ 40 แสดงตัวควบคุม negative control จากการทำ RT-PCR ของเซลล์มะเร็ง SW480 เพื่อยืนยันว่าตัวอย่างอาร์เอ็นเอไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาของ RT-PCR ของ negative control แตกต่างจากปฏิกิริยาของ RT-PCR ของชุดทดสอบตรงที่ไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase ลงไปในขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA จึงทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ cDNA จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอ และเมื่อนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ β-actin primers (ผลผลิต PCR มีขนาด 863 bp) ก็จะไม่เกิดผลผลิต PCR ช่อง L คือ 100 bp DNA ladder ช่อง N0, N10 และ N20 คือ negative control ของปฏิกิริยาของ RT-PCR ของเซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อทำการวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา RT-PCR ในเชิงปริมาณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป AlphaImager 2200 พบว่า เมื่อบ่มเซลล์มะเร็ง SW480 กับสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การแสดงออกของยีน RAGE ในระดับ mRNA ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ค่า p=0.556 และ 0.666 สำหรับการบ่มเซลล์กับสารสกัดที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) ระดับการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงดังภาพที่ 41



ภาพที่ 41 แสดงระดับการแสดงออกของยีน RAGE ในเซลล์มะเร็ง SW480 ที่บ่มกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา RT-PCR ในเชิงปริมาณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป AlphaImager 2000 ระดับการแสดงออกของยีน RAGE คำนวณจากสัดส่วนความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน RAGE ต่อความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน β–actin และแสดงผลในรูป mean±S.D. ของการทดสอบซ้ำสามครั้ง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมคำนวณจาก Student's t test โดยค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

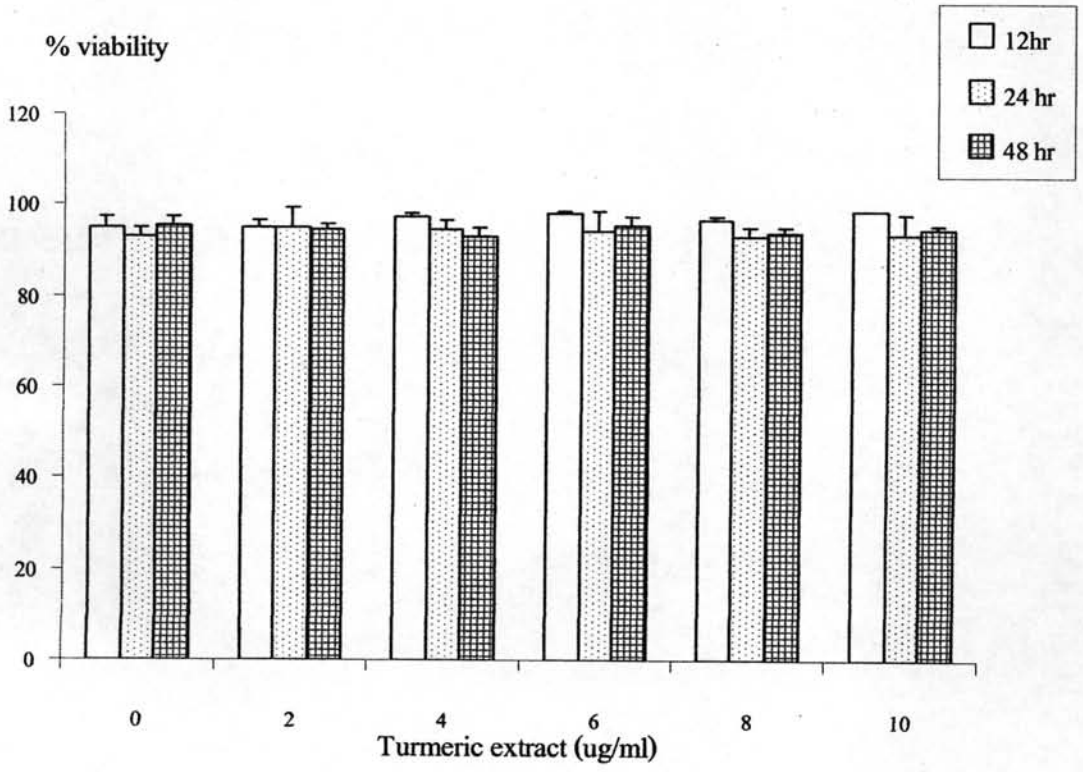
นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเพิ่มเติม โดยบ่มเซลล์มะเร็งทั้งสองกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม เมื่อครบเวลาจึงทำการนับเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue เพื่อหาเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตและดูว่าสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้นดังกล่าวก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์หรือไม่ เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตคำนวณได้จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{ viability} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี} \times 100}{(\text{จำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี trypan blue} + \text{จำนวนเซลล์ที่ติดสี trypan blue})}$$

หลักการตรวจนับเซลล์มีชีวิตโดยวิธีย้อมสี trypan blue

Trypan blue เป็นสีย้อมชนิดหนึ่งที่มีประจุลบ จึงไม่ทำปฏิกิริยากับเซลล์จนกว่าเมมเบรนของเซลล์จะถูกทำลายหรือเกิดความเสียหาย ดังนั้น เซลล์ที่ไม่ติดสี trypan blue จะถือว่าเป็นเซลล์มีชีวิต และเซลล์ที่ติดสี trypan blue ถือว่าเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว (Freshney, 1987)

เมื่อบ่มเซลล์มะเร็ง HeLa กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของเซลล์มะเร็ง HeLa ที่ได้รับการทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่า สารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อบ่มเป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังทำการทดสอบเซลล์กับสารละลาย 0.1% DMSO ควบคู่ไปกับชุดทดสอบด้วย พบว่า สารละลาย 0.1% DMSO ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa เช่นกัน เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของเซลล์มะเร็ง HeLa ที่ได้รับการทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงดังภาพที่ 42 และตารางแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของการทดสอบเซลล์มะเร็ง HeLa กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1% DMSO เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 7

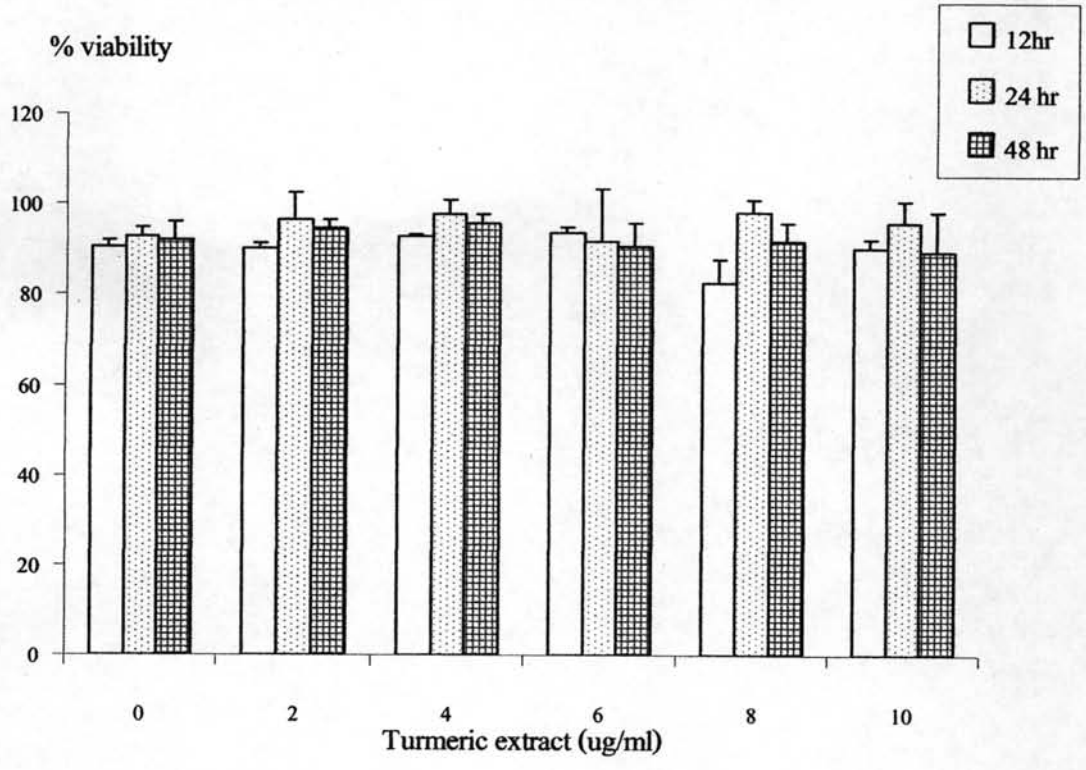


ภาพที่ 42 แสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของเซลล์มะเร็ง HeLa ที่ได้รับการทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม นับเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue เพื่อหาจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย นำเสนอเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตในรูปของ mean± S.D. ของการทดสอบซ้ำสองครั้ง ค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของการทดสอบเซลล์มะเร็ง HeLa กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุมและทดสอบเซลล์กับสารละลาย 0.1% DMSO ควบคู่ไปกับชุดทดสอบเพื่อศึกษาว่า 0.1% DMSO ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์หรือไม่ หาจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายโดยนับเซลล์ที่ด้วยการย้อมสี trypan blue นำเสนอเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตในรูปของ mean± S.D. ของการทดสอบซ้ำสองครั้ง ค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สารที่ใช้ทดสอบกับเซลล์	เวลาที่ใช้ในการบ่มเซลล์กับสาร (ชั่วโมง)		
	12	24	48
สารสกัดขมิ้นชันที่ 0 µg/ml (กลุ่มควบคุม)	94.79±2.53%	93.00±1.98%	95.51±1.67%
สารสกัดขมิ้นชันที่ 2 µg/ml	95.13±1.36% (p =0.998)	95.10±4.31% (p =0.960)	94.72±1.14% (p =0.949)
สารสกัดขมิ้นชันที่ 4 µg/ml	97.53±0.50% (p =0.203)	94.73±1.68% (p =0.984)	92.86±2.24% (p =0.109)
สารสกัดขมิ้นชันที่ 6 µg/ml	98.07±0.47% (p =0.117)	94.00±4.67% (p =0.999)	95.34±2.19% (p =1.000)
สารสกัดขมิ้นชันที่ 8 µg/ml	96.70±0.46% (p =0.454)	93.13±1.92% (p = 1.000)	93.65±1.29% (p =0.375)
สารสกัดขมิ้นชันที่ 10 µg/ml	98.51±0.16% (p =0.075)	93.28±4.63% (p = 1.000)	94.65±0.87% (p =0.928)
สารละลาย 0.1%DMSO	-	94.17±7.88% (p =0.998)	93.65±0.76% (p =0.374)

หลังจากทดสอบเซลล์มะเร็ง SW480 กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของเซลล์มะเร็ง SW480 ที่ได้รับการทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่า สารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็ง SW480 เมื่อบ่มเป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของเซลล์มะเร็ง SW480 ที่ได้รับการทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชัน แสดงดังภาพที่ 43 และตารางแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของการทดสอบเซลล์มะเร็ง SW480 กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1% DMSO เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 8



ภาพที่ 43 แสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของเซลล์มะเร็ง SW480 ที่ได้รับการทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุม นับเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue เพื่อหาจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย นำเสนอเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตในรูปของ mean± S.D. ของการทดสอบซ้ำสองครั้ง ค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 8 แสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตของการทดสอบเซลล์มะเร็ง SW480 กับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปราศจากสารสกัดขมิ้นชัน) เป็นกลุ่มควบคุมและทดสอบเซลล์กับสารละลาย 0.1% DMSO ควบคู่ไปกับชุดทดสอบเพื่อศึกษาว่า 0.1% DMSO ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์หรือไม่ หาจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายโดยนับเซลล์ที่ด้วยการย้อมสี trypan blue นำเสนอเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตในรูปของ mean± S.D. ของการทดสอบซ้ำสองครั้ง ค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สารที่ใช้ทดสอบกับเซลล์	เวลาที่ใช้ในการบ่มเซลล์กับสาร (ชั่วโมง)		
	12	24	48
สารสกัดขมิ้นชันที่ 0 µg/ml (กลุ่มควบคุม)	90.34±1.90%	92.71±1.99%	91.90±4.07%
สารสกัดขมิ้นชันที่ 2 µg/ml	90.22±1.05% (p =1.000)	96.67±5.77% (p =0.947)	94.41±2.05% (p =0.933)
สารสกัดขมิ้นชันที่ 4 µg/ml	92.72±0.63% (p =0.814)	97.83±3.07% (p =0.900)	95.64±1.89% (p =0.730)
สารสกัดขมิ้นชันที่ 6 µg/ml	93.50±1.44% (p =0.636)	91.87±11.32% (p =1.000)	90.44±5.43% (p =0.995)
สารสกัดขมิ้นชันที่ 8 µg/ml	82.34±5.28% (p =0.680)	98.08±2.72% (p =0.882)	91.74±3.96% (p =1.000)
สารสกัดขมิ้นชันที่ 10 µg/ml	90.22±1.97% (p =1.000)	95.59±4.80% (p =.987)	89.37±8.70% (p =0.931)
สารละลาย 0.1%DMSO	-	93.65±3.32% (p =1.000)	91.47±2.39% (p =1.000)

นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบเซลล์กับสารละลาย 0.1% DMSO ควบคู่ไปกับชุดทดสอบด้วย พบว่า สารละลาย 0.1% DMSO ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็ง SW480