

ฤทธิ์ของสารสกัดพญาคาวในการชักนำให้เกิดการตายและฤทธิ์การต้านการลุกลามของเซลล์มะเร็ง
ปากมดลูกมนุษย์



นายเอกพล ขำชื่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูพันธุศาสตร์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Induction of program cell death and anti-metastatic activities of *Houttuynia cordata*
Thunb. extracts in human cervical cancer cells.

Mr. Ekkaphol Kumchuen



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular
Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์ของสารสกัดพญาคาวในการชักนำให้เกิดการตายและ
ฤทธิ์การต้านการลุกลามของเซลล์มะเร็งปากมดลูก
มนุษย์

โดย

นายเอกพล ขำชื่น

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวรธนะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศิริกัลยา ปริมสัน)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร.วรัญญา อรุโณทยานันท์)

เอกพล ขำชื่น : ฤทธิ์ของสารสกัดพลูควาวในการชักนำให้เกิดการตายและฤทธิ์การต้านการลุกลามของเซลล์มะเร็งปากมดลูก มนุษย์ (Induction of program cell death and anti-metastatic activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extracts in human cervical cancer cells.) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.เทวิน เทนคำเนา, 75 หน้า.

ที่มาและความสำคัญ : มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสองของมะเร็งในผู้หญิง ในปี ค.ศ. 2012 มีรายงานผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ประมาณ 528,000 ราย และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 266,000 รายทั่วโลก ทั้งนี้ มีหญิงไทยเสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูกถึง 14 รายต่อวัน การรักษาค่าจะใช้วิธีการผ่าตัดก่อนเนื้อร้ายออก รังสีรักษา เคมีบำบัด การใช้ยาที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง หรือวิธีการเหล่านี้ร่วมกัน โดยขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์มะเร็งและระยะของโรค วิธีการเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายในการรักษาที่สูง และมีผลข้างเคียงมาก จึงได้มีการคิดค้นนำพืชสมุนไพรมาร่วมในการรักษา โดยจะมุ่งเน้นให้มีการลดผลข้างเคียงและลดค่าใช้จ่ายลง นอกจากนี้ อาจใช้พืชสมุนไพรเพื่อการป้องกันมะเร็งชนิดนี้ การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา ฤทธิ์ในการต้านมะเร็งปากมดลูกของสารสกัดพลูควาว ซึ่งเป็นพืชที่พบมากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งในภาคเหนือของประเทศไทย

วิธีการ : นำลำต้นก้านและใบพลูควาวมาล้างน้ำและอบแห้ง จากนั้นนำไปสกัดด้วยวิธี Soxhlet โดยใช้ตัวทำละลายสามชนิดที่แตกต่างกัน แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกได้สารสกัดหยาบออกมา เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกระทั่งทำการทดสอบ โดยทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกมนุษย์ชนิด SiHa ด้วยเทคนิค MTT assay ฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งด้วยเทคนิค Wound healing assay และการวัดปริมาณเอนไซม์ MMP2 ด้วยเทคนิค ELISA รวมทั้งวิเคราะห์รูปแบบการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค Flow cytometry การย้อมสี acridine orange และ Western blot

ผลการทดลอง : พบว่าสารสกัดพลูควาวในส่วนตัวทำละลาย Dichloromethane (DC) ที่ความเข้มข้น 1, 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL และ Absolute Ethanol (ET) ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% อีกทั้ง ระดับความเป็นพิษนั้น ขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสารสกัดพลูควาว และจากผลการทดลองด้วย Flow cytometry พบว่า การตายนั้น มีสาเหตุจากความผิดปกติของไลโซโซม ซึ่งเป็นกระบวนการเกี่ยวข้องกับอพอโตฟาจี จากการติดสีย้อม acridine orange และทดสอบยืนยันโปรตีน LC3 ด้วยเทคนิค Western blot สำหรับฤทธิ์ต้านการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งนั้น พบว่า สารสกัดพลูควาวไม่มีฤทธิ์ต้านการลุกลามของเซลล์มะเร็งปากมดลูก เนื่องจากไม่มีการลดลงของระดับเอนไซม์ MMP-2 และพบว่าสารสกัดพลูควาวในส่วนตัวทำละลาย ET ที่ความเข้มข้น 0.25 µg/mL สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้ 0.08% ที่ 24 ชั่วโมง และ 0.18% ที่ 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับ Control ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สรุปผลการทดลอง : การทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรพลูควาวในการต้านมะเร็งปากมดลูก โดยสารสกัดพลูควาวในส่วนตัวทำละลาย DC และ ET มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกมนุษย์ด้วยการตายของเซลล์มะเร็งนั้น มีสาเหตุจากความผิดปกติของไลโซโซม ซึ่งเป็นกระบวนการเกี่ยวข้องกับอพอโตฟาจี สารสกัดพลูควาวจากทุกตัวทำละลาย ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการลุกลามของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ แต่สารสกัดพลูควาวในส่วนตัวทำละลาย ET ที่ความเข้มข้น 0.25 µg/mL สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ดังนั้น ข้อมูลเหล่านี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อที่จะพัฒนาต่อยอดสารสกัดพลูควาว สำหรับการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกในอนาคต

ภาควิชา เคมีคลินิก ลายมือชื่อ นิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูพันธุศาสตร์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2557

5476661137 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: HOUTTUYNIA CORDATA / AUTOPHAGY / CERVICAL CANCER / PROGRAM CELL DEATH

EKKAPHOL KUMCHUEN: Induction of program cell death and anti-metastatic activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extracts in human cervical cancer cells.. ADVISOR: ASST. PROF. TEWIN TENCOMNAO, 75 pp.

Background : Cervical cancer is the second most common cancer in women. In 2012, there were an estimated 528,000 new cases and 266,000 deaths worldwide. In Thailand, an approximated 14 patients with cervical cancer die per day. Treatments of this disease include surgical, radiotherapy, chemotherapy, drug targeted therapy or combination depending on type and stage of cancer. These treatments are costly and result in various side effects. Therefore, there have been studies on medicinal herbs for preventive and therapeutic applications of cancer as alternative approaches for reductions of both costs and side effects. The present study was aimed at evaluating anti-cervical cancer activities of *Houttuynia cordata* Thunb, a medicinal plant widely found in Southeast Asia including the northern part of Thailand.

Methods : Stems and leaves of *Houttuynia cordata* Thunb were dried and extracted by soxhlet extraction using three different solvents. Crude extracts were evaporated and stored at 20 °C until use. The human cervical cancer cell line, SiHa, was utilized a model in this study. Cytotoxicity test using MTT assay, Wound healing assay, MMP2 ELISA including cell death assay with flow cytometry, acridine orange staining and Western blot were performed.

Results : Our results demonstrated that dichloromethane (DC) fraction of extract at concentrations of 1, 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL and absolute ethanol (ET) fraction of extract at concentrations of 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL had cytotoxicity to SiHa cells in a dose-dependent manner at 95% confidence and flow cytometry analysis confirmed the result of cell death. Acridine orange staining showed positive, thus reflecting the cell death because of an association with lysosomal acidic pathway. Western blot analysis demonstrated the change in LC-3 protein expression, which was related to an induction of autophagy. Finally, extracts had no effect on invasion of SiHa since no decrease in MMP-2 level was observed upon extract treatment. We also found that extract in the fraction of ET at concentration of 0.25 µg/mL could inhibit the migration of cervical cancer cells 0.08 % and 0.18 % at 24 and 48 hours, respectively.

Conclusions : This study showed anti-cervical cancer activities of *Houttuynia cordata* Thunb. since we demonstrated that extracts in the fraction DC and ET had cytotoxic effect and induced cell death by autophagy. Regarding anti-metastasis of this plant, there were no prominent activities of inhibition. These basic data may shed some lights on further developments of *Houttuynia cordata* Thunb. for preventive and therapeutic applications of *Houttuynia cordata* Thunb. against cervical cancer in the future. In order to developing in the strategy of treatment and pharmacological data for drug development in the future.

Department: Clinical Chemistry

Student's Signature

Field of Study: Clinical Biochemistry and Molecular
Medicine

Advisor's Signature

Academic Year: 2014

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ทั้งนี้อันเนื่องมาจากการสั่งสอนของอาจารย์ทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเฉพาะ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทววิน เทนคำเนาวิ ที่กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ไม่ว่าจะเหน็ดเหนื่อยขนาดไหนหรือต้องร่ำบากขนาดไหน อาจารย์ก็พร้อมที่จะฟัง และช่วยเหลือเมื่อเกิดปัญหาขึ้น อีกทั้งรองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการ, อาจารย์ ดร.ศิริกัลยา บริมสัน ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการ และ อาจารย์ ดร.วรัญญา อรุโณทยานันท์ ที่กรุณาเป็นกรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ต้องขอขอบคุณคุณทูนวิชัย 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วันที่ 23 ที่สนับสนุนเรื่องค่าใช้จ่ายต่างๆ ทำให้เกิดการศึกษาค้นคว้าในครั้งนี้ได้ ที่ขาดไม่ได้เลย คือ บิดา มารดา ที่คอยเป็นกำลังใจและช่วยเหลือในทุกๆด้านตลอดระยะเวลาที่ศึกษาและทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา นอกจากนี้ยังมีอีกหนึ่งคนที่คอยเป็นกำลังใจอยู่เบื้องหลังต่างๆ คือ คุณณัฐปภัสร์ วุฒิธรณฤทธิ์ สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณพี่ๆน้องๆในคณะสหเวชศาสตร์ที่คอยช่วยเหลือ จะผลึกต้นจนมาถึงจุดนี้ได้

สารบัญ

หน้า

| | |
|---|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ | ช |
| สารบัญภาพ | 1 |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัยและสมมุติฐาน | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย | 2 |
| 1.4 ข้อยกเว้นของการวิจัย..... | 3 |
| 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 3 |
| 1.6 วิธีการดำเนินการวิจัย..... | 3 |
| 1.7 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework) | 4 |
| บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 5 |
| 2.1 มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) | 5 |
| 2.2 Human papilloma virus (HPV)..... | 6 |
| 2.3 กลไกการติดเชื้อ HPV | 10 |
| 2.4 การตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก..... | 12 |
| 2.6 พลุควา..... | 21 |
| บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย..... | 28 |
| 3.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย | 28 |
| 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย | 29 |

| | |
|---|----|
| 3.3 พิษสมุนไพรมานำมาทดสอบในการวิจัย | 31 |
| 3.4.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด (Cytotoxicity test) | 37 |
| 3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (Wound healing assay) | 42 |
| 3.4.3 การทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดพลาควาต่อการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ด้วยการวัดระดับเอนไซม์ Human Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) | 43 |
| 3.4.4 การทดสอบรูปแบบการชักนำให้เกิดการตายของสารสกัด (Apoptosis detection by flow cytometry) | 46 |
| 3.4.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพลาควาต่อการตายด้วยวิธี Lysosomal degradation ด้วย Acridine orange | 49 |
| 3.4.6 การทดสอบยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดพลาควาในการชักนำให้เกิดการตายแบบ autophagy ด้วยวิธี Western blot analysis | 50 |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง..... | 55 |
| บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง | 67 |
| รายการอ้างอิง..... | 69 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ | 75 |

สารบัญภาพ

| | | |
|-----------|---|----|
| ภาพที่ 1 | แสดงโครงสร้างของมดลูก | 5 |
| ภาพที่ 2 | แสดง TRANSFORMATION ZONE ของปากมดลูก | 6 |
| ภาพที่ 3 | แสดง MAJOR CELL SIGNALING PATHWAY ที่เกิดจาก E5 PROTEIN ของ HPV..... | 8 |
| ภาพที่ 4 | แสดง จีโนมของ HPV..... | 10 |
| ภาพที่ 5 | แสดง การเข้าสู่เซลล์ผิวหนังบริเวณที่เกิดบาดแผลของเชื้อ HPV | 11 |
| ภาพที่ 6 | แสดง การทำ PAP SMEAR..... | 12 |
| ภาพที่ 7 | แสดง ปากมดลูกผล VIA NEGATIVE..... | 14 |
| ภาพที่ 8 | แสดง ปากมดลูกผล VIA POSITIVE..... | 14 |
| ภาพที่ 9 | แสดง ลักษณะของเซลล์แต่ละระยะของ CIN..... | 17 |
| ภาพที่ 10 | แสดง FIGO STAGING OF CERVICAL CANCER..... | 19 |
| ภาพที่ 11 | แสดง บริเวณสำหรับทำ COLD KNIFE CONIZATION..... | 20 |
| ภาพที่ 12 | แสดง APOPTOSIS PATHWAY | 24 |
| ภาพที่ 13 | แสดง โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ AUTOPHAGY | 26 |
| ภาพที่ 14 | แสดง SOXHLET APPARATUS | 31 |
| ภาพที่ 15 | แสดง CHEMICAL STRUCTURE ของ TRYPAN BLUE..... | 36 |
| ภาพที่ 16 | แสดง ตาราง COUNTING CHAMBER..... | 37 |
| ภาพที่ 17 | แสดง REACTION OF MTT ASSAY | 38 |
| ภาพที่ 18 | แสดง 96 WELLS-PLATE และตัวอย่างการเติมสารสำหรับ MTT ASSAY | 40 |
| ภาพที่ 19 | แสดง การจัดกลุ่มของเอนไซม์ MMP ตามตำแหน่งของยีนบนโครโมโซม และ DOMAIN COMPOSITION..... | 45 |
| ภาพที่ 20 | แสดง ขั้นตอนปฏิกิริยา HUMAN MMP2 ELISA KIT (ABCAM) | 46 |
| ภาพที่ 21 | แสดง ผล FLOW CYTOMETRY | 47 |

| | |
|---|----|
| ภาพที่ 22 แสดง CELL VIABILITY ของ SIHA CELLS เมื่อ TREAT ด้วย DMSO 0.01, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 เปอร์เซ็นต์ | 55 |
| ภาพที่ 23 แสดง CELL VIABILITY ของ SIHA CELLS หลัง TREAT ด้วยสารสกัดพญาคาวใน ส่วนตัวทำละลาย PETROLEUM ETHER (PE) | 56 |
| ภาพที่ 24 แสดง CELL VIABILITY ของ SIHA CELLS หลัง TREAT ด้วยสารสกัดพญาคาวใน ส่วนตัวทำละลาย DICHLOROMETHANE (DC)..... | 56 |
| ภาพที่ 25 แสดง CELL VIABILITY ของ SIHA CELLS หลัง TREAT ด้วยสารสกัดพญาคาวใน ส่วนตัวทำละลาย ABSOLUTE ETHANOL (ET) | 57 |
| ภาพที่ 26 แสดง % CELL MIGRATION ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจาก TREAT ด้วยสาร สกัดพญาคาวในส่วนตัวทำละลาย PETROLEUM ETHER (PE) | 58 |
| ภาพที่ 27 แสดง % CELL MIGRATION ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจาก TREAT ด้วยสาร สกัดพญาคาวในส่วนตัวทำละลาย DICHLOROMETHANE (DC) | 59 |
| ภาพที่ 28 แสดง % CELL MIGRATION ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจาก TREAT ด้วยสาร สกัดพญาคาวในส่วนตัวทำละลาย ETHANOL (ET) | 59 |
| ภาพที่ 29 แสดง ผล WOUND HEALING ASSAY หลัง TREAT SIHA CELLS ด้วยสาร สกัดพญาคาว และ CONTROL SIHA CELLS ซึ่งไม่ได้ TREAT ด้วยสารสกัดพญาคาว .. | 60 |
| ภาพที่ 30 แสดง ผลการทดสอบปริมาณ MMP-2 หลังจาก TREAT SIHA CELLS ด้วยสาร สกัดพญาคาวในส่วนตัวทำละลาย PE, DC และ ET | 61 |
| ภาพที่ 31 แสดง ผล FLOW CYTOMETER ของ CONTROL SIHA CELLS..... | 64 |
| ภาพที่ 32 แสดง ผล ACRIDINE ORANGE STAINING ของ SIHA CELLS..... | 65 |
| ภาพที่ 33 แสดง ผล WESTERN BLOT | 65 |

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer) เป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อยหนึ่งในสามลำดับแรกของผู้หญิง ประมาณค่าในปี 2008 มีผู้ป่วยรายรายใหม่ทั่วโลกประมาณ 529,800 ราย มีอัตราการเสียชีวิตสูงถึง 287,000 รายและมากกว่า 85% มักเป็นประเทศที่กำลังพัฒนา [1] ซึ่งคาดการณ์ว่าในปี 2030 จะมีอัตราการเสียชีวิตถึง 410,000 ราย [2] สำหรับในประเทศไทย มะเร็งปากมดลูกพบบ่อยเป็นอันดับที่สองรองจากมะเร็งเต้านม (Breast cancer) การเกิดมะเร็งปากมดลูกมักเป็นผลมาจากการติดเชื้อ Human papilloma virus (HPV) ซึ่งมีมากกว่า 100 ชนิด แต่มีประมาณ 40 ชนิด ที่ติดทางระบบสืบพันธุ์ (genital tract) และชนิดที่พบบ่อยแล้วก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูกในอัตราที่สูงคือ คือ HPV type 16 และ 18 ซึ่งพบสูงถึง 70% ของ case มะเร็งปากมดลูก [3] ซึ่งการรักษา มะเร็งปากมดลูกส่วนใหญ่จะเป็นการใช้รังสีรักษา การผ่าตัดเอาก้อนเนื้อร้ายออก การใช้เคมีบำบัด และการใช้รังสีรักษาร่วมกับเคมีบำบัด [4]

การนำพืชสมุนไพรมาใช้เป็นพืชที่มีส่วนร่วมในการรักษา (complementary medicine) ทำให้ผู้ป่วยฟื้นตัวได้ดีขึ้น ลดการอักเสบ ลดผลข้างเคียงจากการใช้เคมีบำบัด และลดค่าใช้จ่ายในการรักษาซึ่งมีราคาแพงเพื่อให้ผู้ป่วยที่มีรายได้น้อยได้มีโอกาสเข้าถึงการรักษามากขึ้น ทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น ซึ่งพืชสมุนไพร ที่ผู้ทำวิจัยให้ความสนใจคือ พลุคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.) เป็นพืชที่พบบ่อยทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และทางเหนือของประเทศไทย เป็นพืชที่มีราคาถูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลายอยู่แล้วทางภาคเหนือ มาใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวน การชักนำให้เกิดการตายและการลุกลามของเซลล์มะเร็งปากมดลูกมนุษย์ SiHa 45 ซึ่งมี HPV type 16 integration อยู่

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัยและสมมติฐาน

- วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพลูควาวในการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกมนุษย์
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพลูควาวในการยับยั้งการลุกลาม (metastasis) ของเซลล์มะเร็งข้างต้น จากคุณสมบัติยับยั้ง cell migration และ cell invasion.
3. เพื่อทดสอบว่าสารสกัดพลูควาวสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis ได้หรือไม่
4. เพื่อทดสอบว่าสารสกัดพลูควาวสามารถชักนำให้เกิด autophagy ได้หรือไม่
5. เพื่อสนับสนุนให้มีการบริโภคพลูควาวกันอย่างกว้างขวาง เพื่อป้องกันหรือยับยั้งการเกิดมะเร็งปากมดลูกหรือการพัฒนาของมะเร็งปากมดลูก
6. เป็นข้อมูลสำหรับการผลิตและพัฒนายาในอนาคต

- สมมติฐานงานวิจัย

1. สารสกัดพลูควาวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกมนุษย์ได้
2. สารสกัดพลูควาวสามารถยับยั้งการ metastasis ของเซลล์มะเร็งได้
3. สารสกัดพลูควาวสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis ได้
4. สารสกัดพลูควาวสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ autophagy ได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพลูควาวซึ่งได้จากการสกัดโดยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้ตัวทำละลายสามชนิดคือ Petroleum ether (PE), Dichloromethane (DC) และ Ethanol (ET) เพื่อพิสูจน์ว่าสารสกัดพลูควาวในแต่ละตัวทำละลายมีความเป็นพิษ, ความสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ (migration) และการลุกลาม (Invasion) ซึ่งพิจารณาจากความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ matrix metalloproteinase และรูปแบบการชักนำให้เกิดการตายต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกมนุษย์ (SiHa) ที่มีสารพันธุกรรมของ HPV type 16 integration อยู่ ได้หรือไม่ งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาจาก cell culture

1.4 ข้อจำกัดของการวิจัย

1.4.1 การวิจัยครั้งนี้เป็นการทดลองจาก Cell line ซึ่งอาจไม่ได้สะท้อนถึงสภาวะแวดล้อมจริงๆของเซลล์ที่อยู่ในร่างกาย

1.4.2 ปริมาณสารออกฤทธิ์จากสมุนไพรที่ใช้อาจจะเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลที่เก็บ

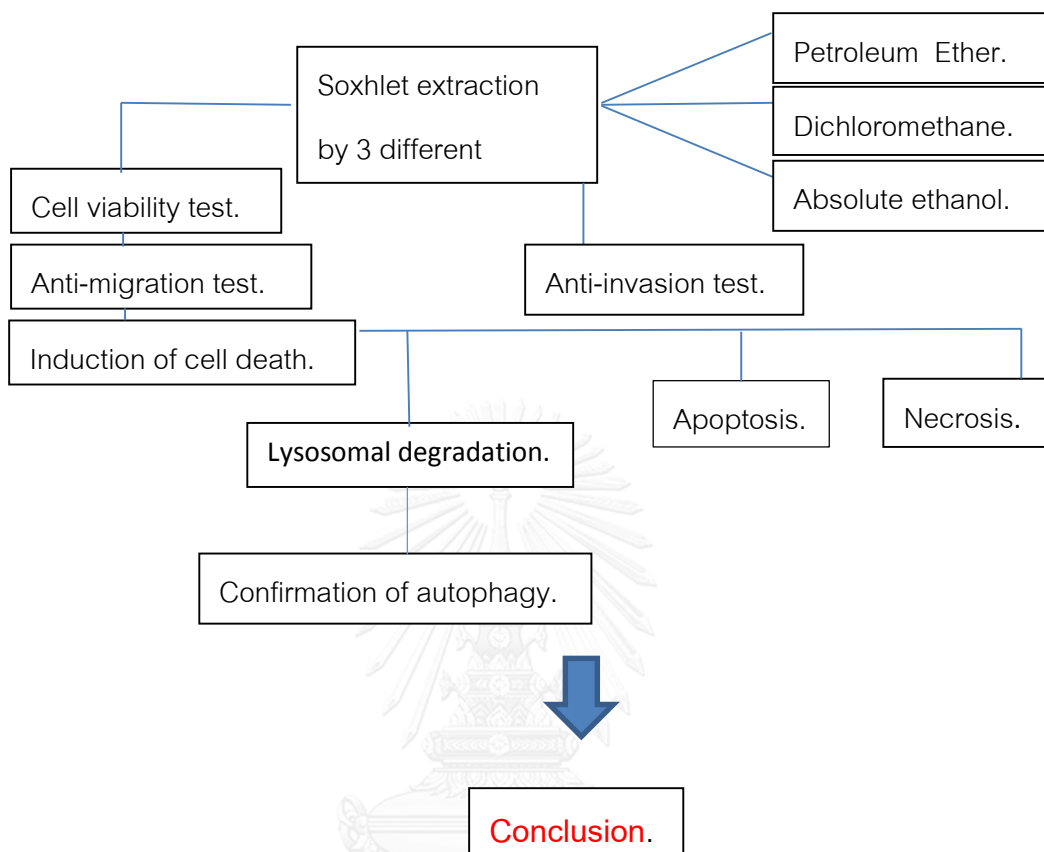
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความเป็นพิษของสารสกัดพลูควาและฤทธิ์ในการยับยั้งและการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกมนุษย์
2. ทราบถึงรูปแบบการชักนำให้เกิดการตายของสารสกัดพลูควาต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกมนุษย์
3. ใช้เป็นพืชสมุนไพรที่มีส่วนร่วมในการรักษา (complementary medicine)
4. สนับสนุนให้มีการบริโภคเป็นพืชสมุนไพรต้านมะเร็ง
5. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนายาในอนาคต

1.6 วิธีการดำเนินการวิจัย

นำพลูควาส่วนใบลำต้นและก้าน มาสกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปขั้วสูง ดังนี้ 1.Petroleum ether (PE), Dichloromethane (DC) และ Ethanol (ET) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ Rotary evaporator ซึ่งจะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ออกมา และนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปละลายด้วยตัวทำละลาย โดยตัวทำละลายที่ใช้คือ Dimethyl sulfoxide (DMSO) นำสารสกัดหยาบที่ละลายได้ไปทดสอบกับเซลล์ SiHa ซึ่งเป็น cell line เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด, ฤทธิ์ในการยับยั้งการ migration, invasion, และฤทธิ์ในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ว่าเป็นแบบ necrosis, apoptosis หรือ autophagy

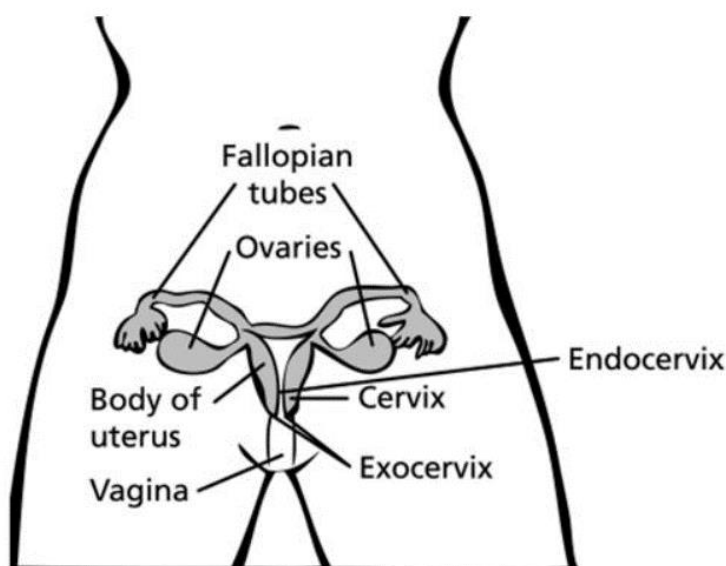
1.7 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer)

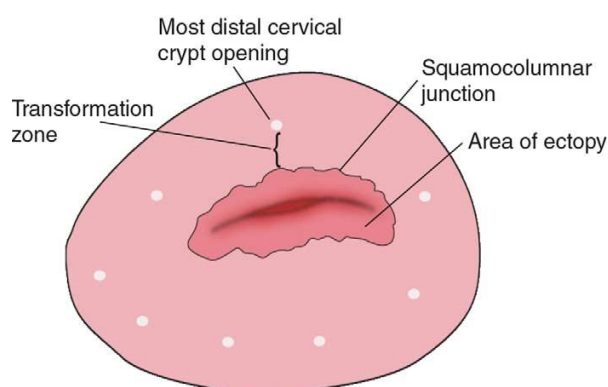
เป็นโรคซึ่งเกิดจากเซลล์บริเวณปากมดลูกเกิดการแบ่งตัวอย่างควบคุมไม่ได้เจริญมากขึ้น ปากมดลูก (cervix) เป็นบริเวณที่อยู่ด้านล่างของมดลูกเชื่อมมดลูกกับช่องคลอด (vagina) บริเวณที่อยู่ด้านในมดลูกเรียกว่า endocervix ซึ่งบุด้วยเซลล์ชนิด glandular cell หรือ columnar epithelium บริเวณที่อยู่ด้านนอกมดลูกเรียกว่า exocervix ซึ่งจะบุด้วยเซลล์ชนิด squamous epithelial cells บริเวณที่เชื่อมต่อระหว่างเซลล์สองชนิดนี้เข้าด้วยกันเรียกว่า Squamocolumnar junction เมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (puberty) จะมีการหลั่งของฮอร์โมนเอสโตรเจนเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เพิ่มการเก็บ glycogen ไว้ใน nonkeratinized squamous epithelium ของ lower genital tract โดย glycogen เป็นแหล่ง carbohydrate ของ lactobacilli ซึ่งเป็น normal flora ในช่องคลอด แบคทีเรียชนิดนี้จะทำให้ช่องคลอดมีสภาวะเป็นกรดมากขึ้น ($\text{pH} < 4.5$). pH ที่น้อยลงนี้จะทำให้ columnar epithelium มีการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็น squamous epithelium ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทนกรดมากกว่า โดยเรียกบริเวณที่เปลี่ยนแปลงไปของเซลล์ columnar epithelium ไปเป็น เซลล์ squamous epithelium ว่า "Transformation zone" พบว่าเป็นบริเวณที่มักจะเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งปากมดลูกมากที่สุด



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของมดลูก

American Cancer Society. Cervical cancer [Internet]. Available from:

<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003094-pdf.pdf>



ภาพที่ 2 แสดง Transformation zone ของปากมดลูก [5]

ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกมีดังนี้คือ

1. การติดเชื้อ Humanpapilloma virus (HPV)
2. การติดเชื้อ Sexual transmitted pathogen อื่นๆ เช่น HIV, HSV-2
3. การสูบบุหรี่
4. การใช้ยาคุมกำเนิดชนิดรับประทานเป็นระยะเวลายาวนาน (oral contraceptives)
5. ภาวะขาดสารอาหาร (nutritional status)
6. ภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Immune status)

ซึ่งพบว่าการติดเชื้อ HPV เป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูกมากที่สุด พบว่ามากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกมีเชื้อ HPV

2.2 Human papilloma virus (HPV)

เป็น long circular double strand DNA virus อยู่ใน Family Papillomaviridae ซึ่งประกอบด้วยสารพันธุกรรม 8,000 bp [6] ไม่มี envelop รูปร่างเป็น icosahedral ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 52-53 nm มีมากกว่า 100 ชนิด แต่มีประมาณ 40 ชนิดที่พบว่าติดเชื้อต่อระบบสืบพันธุ์ (genital tract) ซึ่งชักนำให้เกิด cervical cancer, cervical neoplasia, anogenital

warts และ anogenital cancer อื่นๆต่อไปได้ นอกจากนี้ยังสามารถทำให้เกิด head and neck cancer ได้อีกด้วย [4] สามารถแบ่ง HPV ออกเป็น 3 กลุ่ม ตามความสามารถในการก่อให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูก ดังนี้

1. *High risk group* ได้แก่

HPV-16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73,82 จากการศึกษพบว่า type 16 และ type 18 พบในผู้ป่วย cervical cancer ถึง 70% โดย type 16 พบในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกถึงร้อยละ 50 และ type 18 พบในผู้ป่วยร้อยละ 35 [7]

2. *Probable high risk group* ได้แก่

HPV-26, 53 และ 66

3. *Low risk group* ได้แก่

HPV-6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81 และ CP6108 ซึ่งในกลุ่มนี้มักทำให้เกิด genital warts มากกว่า cervical cancer และ type ที่พบมากที่สุดทำให้เกิด genital warts คือ type 6 และ type 11 ซึ่งพบมากที่สุดและพบรองลงมาตามลำดับ

โดยจีโนมของ HPV สามารถแบ่งออกได้เป็นสามโดเมน(Domain) ได้แก่

1. **Noncoding upstream regulatory region (URR)** คิดเป็นร้อยละ 10 ของจีโนม ซึ่งไม่ได้

ถอดรหัสเป็นโปรตีน แต่เป็นส่วนที่ควบคุม gene expression, replication และ assembly of viral particle

2. **Early region** คิดเป็นร้อยละ 50 ของจีโนม ได้แก่ E1, E2, E4, E5, E6, E7 ซึ่งสามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนได้ดังต่อไปนี้ โดย

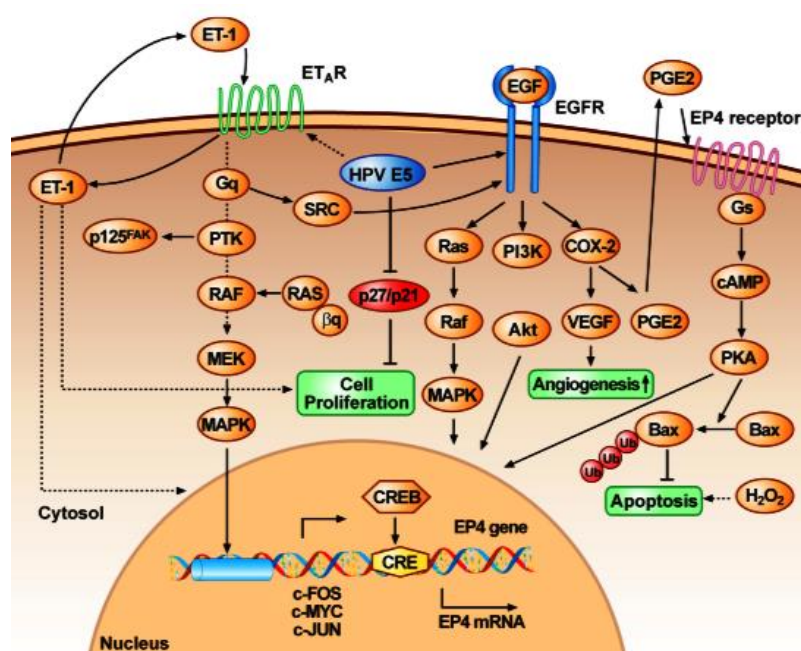
- E1 protein เป็น ATP-dependent helicase โดยจับกับจีโนมไวรัสในบริเวณ origin of replication ซึ่งเป็นตัวเริ่มกระบวนการ DNA replication โดยจะทำงานร่วมกับ E2 [8]

- E2 protein ทำหน้าที่ช่วยในกระบวนการ replication โดย E2 จะช่วยเพิ่มและสนับสนุนการทำงานของ E1 โดยจะจับกับบริเวณ origin of replication เพื่อให้ E1 มาจับได้อีกที่หนึ่ง และเป็นตัวควบคุมกระบวนการ transcription โดยสามารถจับกับ promotor และ URR บนจีโนมของไวรัสได้ ทั้งยังช่วยเพิ่มโดยขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่จับบน promotor และ cellular factor อื่นๆที่มาจับ [9]

- E4 protein หน้าที่ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่ามีการแสดงออกสูงใน late stage ของวงจรชีวิต HPV ซึ่งน่าจะช่วยในการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ออกจาก host cell [8]

- E5 protein เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) จำนวนมาก หน้าที่ของมันเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆมากมาย โดยพบว่า E5 สามารถ

กระตุ้น EGF-R (Epidermal growth factor receptor) ซึ่งเป็น receptor ที่อยู่บน cell membrane ทำให้เกิดการกระตุ้น MAPK pathway, PI3K, ERK1/2, AKT, COX2 นอกจากนี้ E5 ยังกระตุ้น c-jun, c-fos oncogenes expression โดยผ่าน NF1 regulatory element, ลดการแสดงออกของ Fas receptor จากกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ ทำให้กระตุ้นการเกิดกระบวนการ transcription และยับยั้งกระบวนการ apoptosis และยังลดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยลดการแสดงออกของ MHC class I, ลด antigen processing และการนำเสนอของ MHC class II ที่ผิวเซลล์ [10, 11] ดังสรุปไว้ในรูปที่ 3



ภาพที่ 3 แสดง major cell signaling pathway ที่เกิดจาก E5 protein ของ HPV [11]

ซึ่งกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ชักนำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ และจากการที่ไม่พบ E5 mRNA และ protein ใน cervical cancer cells ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่จำเป็นต่อการติดเชื้อในระยะแรก (early infection)

- E6 protein จะจับกับ E6-AP (E6 associated protein) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น specific ubiquitin-ligase for p53 degradation จากนั้น E6-AP จะจับกับ p53 protein ได้เป็น E6-AP-p53 และเกิด

การย่อยสลายต่อไป ซึ่งยีน p53 เป็น tumor suppressor gene ทำให้มันทำหน้าที่ไม่ได้ ส่งผลให้ เซลล์ไม่เกิด apoptosis

E6 +AP \longrightarrow degrade p53 no \longrightarrow apoptosis.

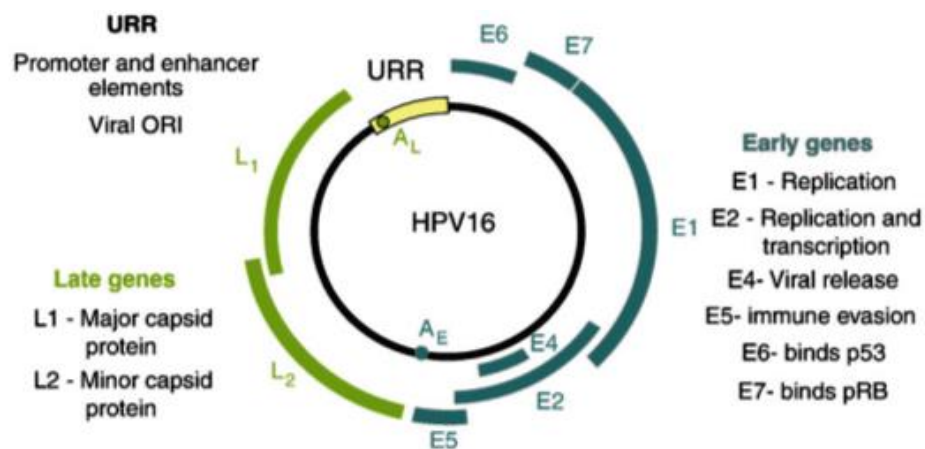
- E7 protein จะจับกับ culin 2 ubiquitin ligase ต่อจากนั้นจะไปจับกับ pRB (Retinoblastoma protein) และเกิดการย่อยสลายโดยกระบวนการ ubiquitination ซึ่ง pRB เป็น tumor suppressor protein จากนั้นจะกระตุ้น E₂F ซึ่งเป็น transcription factor ให้ทำงานได้ (ปกติ pRB จะจับกับ E₂F ทำให้มันไม่สามารถทำงานได้) ทำให้เกิด DNA replication.

E7+ pRB \longrightarrow E₂F \longrightarrow Transcription.

3. Late region คิดเป็นร้อยละ 40 ของจีโนมได้แก่ยีน L1, L2 ซึ่งสามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนได้ ดังนี้

- L1 protein เกี่ยวข้องกับการสร้าง major capsid protein ของไวรัส ซึ่ง major capsid protein ทำหน้าที่ในการจับกับ heparin sulfate proteoglycans (HSPGs) ที่อยู่บน basement membrane ของโฮสต์ ระหว่างขั้นตอนการจับกับเซลล์ของโฮสต์ (Attachment)

- L2 protein เกี่ยวข้องกับการสร้าง minor capsid protein ของไวรัส ซึ่ง minor capsid protein จะถูกย่อยและเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเพื่อใช้จับกับ receptor บน epithelial cell สำหรับการ invade เข้าสู่เซลล์โฮสต์ต่อไป

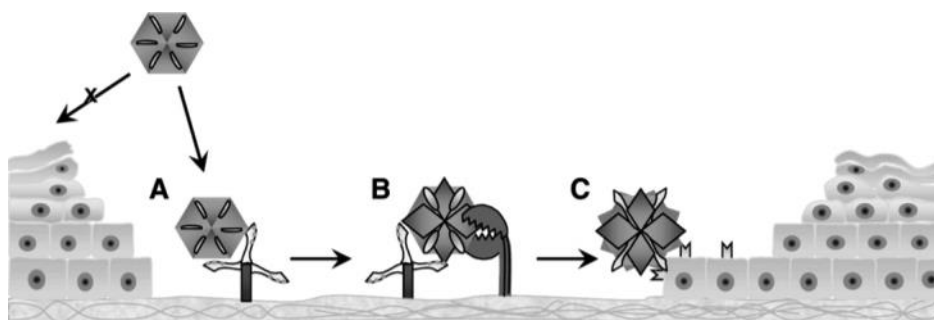


HPV = human papillomavirus; URR = upstream regulatory region; ORI = origin of replication; pRB = retinoblastoma protein.

ภาพที่ 4 แสดง จีโนมของ HPV [12]

2.3 กลไกการติดเชื้อ HPV

HPV เป็นเชื้อไวรัสที่รุกรานเฉพาะเซลล์ผิวหนังเท่านั้น โดยเมื่อเกิดรอยขีดข่วนหรือบาดแผลบริเวณปากมดลูกหรือช่องคลอดจะเป็นทางเปิดให้เชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ได้ เมื่อไวรัสเข้าไปสู่บริเวณบาดแผลแล้วไวรัสจะใช้ส่วนของ L1 จับกับ heparin sulfate proteoglycans (HSPGs) ซึ่งอยู่บน Basement membrane (BM) ของเจ้าบ้าน จากนั้นไวรัสจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างยื่นส่วนของ L2 ออกมา L2 ที่ยื่นออกมาจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ฟิวรีน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างเป็นปกติอยู่แล้วในเซลล์มนุษย์ ทำให้ L2 เปลี่ยนแปลงรูปร่างและสามารถจับกับ receptor บนผิวเซลล์ผิวหนังได้ ซึ่งเซลล์นี้เป็นเซลล์ที่เรียกว่า basal keratinocyte ถือว่าเป็น stem cell ของชั้นผิวหนังอยู่ในส่วนของชั้น epidermis ที่เรียกว่า stratum basale ดังแสดงในรูปภาพที่ 5 ระยะนี้จะพบการแสดงออกของ E1 และ E2 สูง จากนั้นไวรัสจะเข้าสู่เซลล์ basal keratinocyte โดยกระบวนการ endocytic pathway เกิดเป็น early endosome ใช้เวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง และพัฒนาไปเป็น late endosome ใช้เวลาประมาณ 8-12 ชั่วโมง ที่ late endosome นี้ไวรัสจะ uncoat capsid ออกเหลือเพียง L2 genome complex โดยพบว่าการ uncoat เกี่ยวข้องกับ L2 dependent mechanism โดยใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ในการเข้าสู่นิวเคลียส โดยอาศัยการแตกของเยื่อหุ้มนิวเคลียสในระหว่างที่เกิดกระบวนการ mitosis [13]



ภาพที่ 5 แสดง การเข้าสู่เซลล์ผิวหนังบริเวณที่เกิดบาดแผลของเชื้อ HPV [13]

(A) HPV จับกับ HSPG บน BM (B) Furin cleavage เกิดการปล่อย L2 โดยเอนไซม์ฟูริน (C) L2 ที่ถูกปล่อยโดยเอนไซม์ฟูรินสามารถจับกับ receptor บนผิว basal keratinocyte ได้

จากนั้นเกิดกระบวนการ Transcription และ replication แต่เกิดในอัตราที่ต่ำมากประมาณ 50-100 copies/cell หลังจากนั้นไวรัสจะออกจาก cell basal keratinocyte เข้าสู่เซลล์ที่อยู่ในชั้นเหนือกว่า(stratum spinosum และ stratum granulosum) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกิดการ differentiate อย่างสมบูรณ์แล้ว พบว่าไวรัสสามารถเกิด replication ในเซลล์นี้ในอัตราที่สูงอย่างน้อย 1,000 copies/cell และเกิดการประกอบเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ ซึ่งระยะท้ายๆนี้การแสดงออกของ E1, E2 จะหมดไป แต่การแสดงออกของ E6, E7, L1, L2 จะเพิ่มขึ้น [13] และเมื่อใกล้ที่จะปล่อยอนุภาคไวรัสออกจากเซลล์เจ้าบ้าน จะพบการแสดงออกของ E4 ที่สูง จึงคาดว่า E4 จำเป็นต่อการ release ของไวรัส

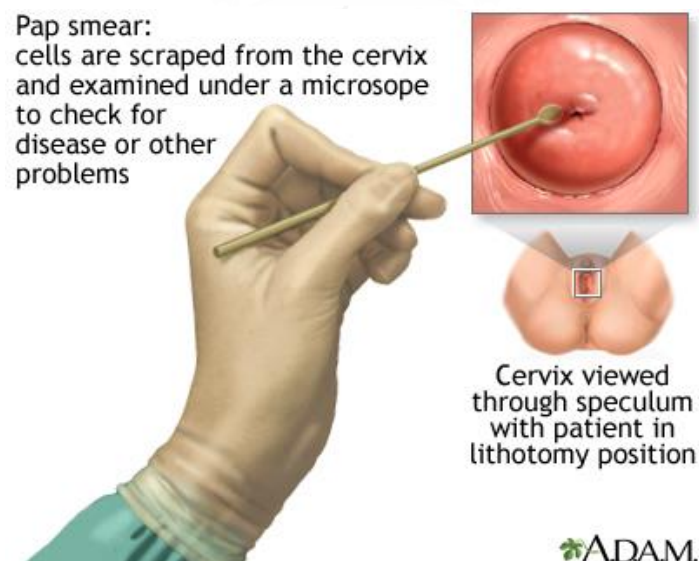
โดยปกติระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้ง cell mediated immune response และ humoral immune response สามารถกำจัดเชื้อไวรัสนี้ได้ แต่ถ้าเกิดการติดเชื้อซ้ำๆเป็นระยะเวลายาวนาน จะทำให้ภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่สามารถตอบสนองต่อไวรัสนี้ได้ เนื่องจากวงจรชีวิตของไวรัส HPV ติดเชื้อเฉพาะเซลล์ผิวหนังในชั้น epidermis ซึ่งอยู่ไกลจากระบบเลือดและน้ำเหลือง, การติดเชื้อไม่เกิดการกระตุ้นการอักเสบหรือการตายของเซลล์ จึงไม่เกิดการกระตุ้นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันดังนั้นจึงสามารถหลบหนีจากการกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกันได้ อีกทั้งตัวไวรัสเองสามารถผลิตโปรตีนต่างๆ เช่น E6, E7 ซึ่งจะไปยับยั้งการส่งสัญญาณของ interferon signaling

pathway และพบว่า langerhan cells ที่อยู่ในชั้นผิวหนัง ซึ่งทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell ไม่สามารถตอบสนองของทางภูมิคุ้มกันต่อ capsid protein ของเชื้อไวรัสได้ นอกจากนี้ high risk HPV ยังทำให้การแสดงออกของ IFN- α gene ซึ่งจำเป็นต่อการตอบสนองของทางภูมิคุ้มกันลดลงด้วย [14] ดังนั้นโปรตีนที่สร้างจาก HPV สามารถทำให้ ตัวมันไม่ตายจากระบวนการ apoptosis หลบหนีจากระบบภูมิคุ้มกัน แบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่มีขีดจำกัดและควบคุมไม่ได้ จนเกิดการพัฒนามากลายเป็นมะเร็งปากมดลูกในที่สุด

2.4 การตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก

2.4.1. การตรวจภายใน (Physical examination) เป็นการตรวจดูลักษณะของ vagina, cervix, uterus, fallopian tube, ovary และ rectum โดยการสอดนิ้วเข้าไปใน vagina แล้ววางอีกมือลงบน lower abdomen เพื่อสัมผัสถึงขนาด รูปร่าง ตำแหน่งของมดลูกและรังไข่ เป็นการตรวจดูก้อนเนื้อหรือสิ่งผิดปกติอื่นๆ

2.4.2. Papanicolaou smear (Pap smear) หรือ Pap test เป็นการตรวจดูความผิดปกติจากลักษณะของเซลล์ที่เก็บจากบริเวณปากมดลูก ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งช่วยในการวินิจฉัยระยะก่อนเป็นมะเร็งหรือระยะที่เป็นมะเร็งได้



ภาพที่ 6 แสดง การทำ Pap smear [Internet]. Available from :

<http://www.drexelmed.edu/home/HealthEncyclopediaArticles/Tests/Papsmear.html>

การเตรียมตัวก่อนทำ Pap smear

- งดเพศสัมพันธ์ 24-48 ชั่วโมงก่อนทำการตรวจ
- ไม่เหน็บยาใดๆในช่องคลอดหรือล้างช่องคลอดก่อนทำการตรวจ 24-48 ชั่วโมง
- ไม่ตรวจในช่วงที่มีประจำเดือน หรือมีการอักเสบของปากมดลูก

2.4.3. HPV DNA test เป็นการตรวจสารพันธุกรรม (DNA) ของเชื้อไวรัส HPV เพื่อที่จะทราบว่าติดเชืชนิดนี้หรือไม่ แล้วถ้าติดเป็น type ไหน ใช้วินิจฉัยร่วมกับ Pap smear เพื่อป้องกันความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นระยะก่อนเป็นมะเร็งหรือระยะที่เป็นมะเร็งปากมดลูก

2.4.4. Colposcopy คือการตรวจปากมดลูกและช่องคลอดโดยใช้กล้องขยายที่เรียกว่า "Colposcopy" ซึ่งมีกำลังขยาย 3.5-30 เท่า มีดวงไฟให้แสงสว่าง เพื่อตรวจหาบริเวณที่ผิดปกติซึ่งไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ใช้ร่วมกับการตัดชิ้นเนื้อ (biopsy) เพื่อทำการตรวจต่อไปทางพยาธิวิทยา แนะนำให้ตรวจเมื่อ

2.4.4.1 ผลการตรวจ Pap smear ให้ผลผิดปกติ

2.4.4.2 ปากมดลูกมีความผิดปกติ มีรอยโรค เช่น มีแผล, มีก้อนเนื้อ เป็นต้น

2.4.4.3 มีเลือดออกผิดปกติระหว่างรอบเดือนที่ไม่สามารถอธิบายสาเหตุได้, เลือดออกหลังจากมีเพศสัมพันธ์

2.4.4.4 ตกขาวเป็นระยะเวลานาน โดยไม่ทราบสาเหตุ

2.4.4.5 ผลการตรวจ Visual inspection using acetic acid (VIA) ให้ผล positive

VIA เป็นการตรวจความผิดปกติของเซลล์โดยใช้ Acetic acid 3-5% ชโลมบนปากมดลูกโดย cotton swab และทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที เซลล์ปกติ (normal squamous epithelium) จะเห็นเป็นสีชมพูซึ่งเป็นสีของปากมดลูก รายงานผลเป็น VIA negative ส่วนเซลล์ที่ผิดปกติเช่น เซลล์มะเร็งหรือเซลล์ระยะก่อนเป็นมะเร็ง (cervical intraepithelial neoplasia : CIN) จะให้ฝ้าขาว รายงานผลเป็น VIA positive การเกิดฝ้าขาวเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ nuclear protein และ cytokeratin ที่เซลล์บริเวณปากมดลูกซึ่งเรียกว่า acetowhite lesion [5] การตรวจวิธีนี้ทำได้ง่าย ใช้ค่าใช้จ่ายต่ำ ไม่ต้องใช้เครื่องมือยุ่งยาก แต่ข้อเสียคือ VIA มีความจำเพาะค่อนข้างต่ำ เซลล์ที่เกิดการอักเสบก็สามารถทำให้เกิด acetowhite lesion ได้อีกทั้งในผู้สูงอายุ transformation zone จะเลื่อนเข้าไปในมดลูก ทำให้ไม่สามารถชโลมด้วย acetic acid ได้ จึงไม่สามารถตรวจพบรอยโรคที่อาจเกิดขึ้น



ภาพที่ 7 แสดง ปากมดลูกผล VIA negative [15]



ภาพที่ 8 แสดง ปากมดลูกผล VIA positive [15]

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Cervical Cancer Screening Guidelines

ตาม American Cancer Society (ACS), American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP), and American Society for Clinical Pathology (ASCP) แนะนำว่า

| Age(years old) | Screening method |
|----------------|---|
| < 21 | No screening recommended |
| 21-29 | Cytology (Pap smear) alone every 3 years. |
| 30-65 | HPV DNA + pap smear every 5 years or pap smear alone every 3 years. |

| | |
|-----|--|
| >65 | No screening recommended if adequate prior screening has been negative and high risk is not present. |
|-----|--|

การรายงานผล Pap smear

มีหลายระบบ เช่น Papanicolaou (Pap) system, Bethesda system (TBS) 2001 ซึ่ง World Health Organization (WHO) แนะนำให้ TBS 2001 เพราะจะให้รายละเอียดมากกว่า *Bethesda system 2001 (TBS 2001)*

Squamous cell

- Atypical squamous cells (ASC)
- Atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US)
- Atypical squamous cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H)
- Low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL)
- Encompassing human papilloma virus, mild dysplasia and cervical intraepithelial neoplasia (CIN I)
- High-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL)
- Squamous cell carcinoma

Glandular cells

- Atypical glandular cells (AGC)
- Specify endocervical, endometrial, or glandular cells not otherwise specified
- Endocervical adenocarcinoma in situ (AIS)
- Adenocarcinoma
- Other (list not comprehensive)
- Endometrial cells in a woman 40 years or older

Pap system. [16]

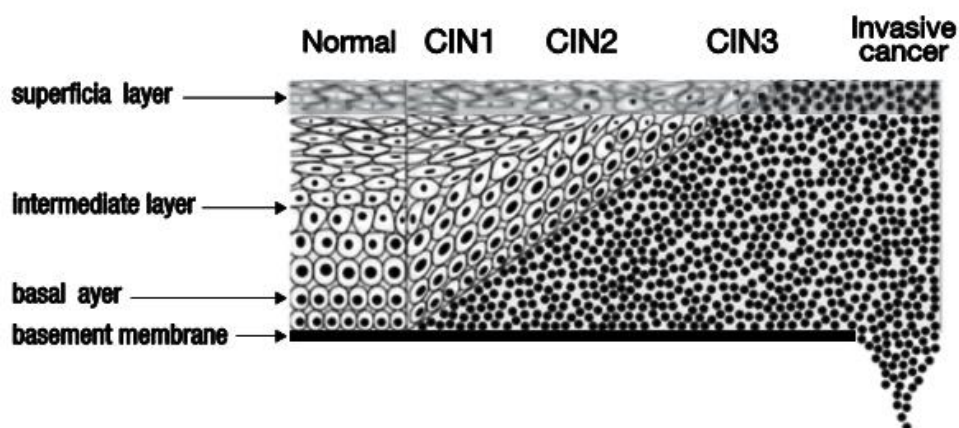
- Class I หมายถึง ผลปกติ

- Class II หมายถึง อาจพบเซลล์ที่มีการอักเสบ แต่ไม่พบเซลล์มะเร็ง
- Class III หมายถึง พบเซลล์ผิดปกติ ซึ่งประกอบด้วยความผิดปกติในระดับ CIN 1 - 2 หรือ
Mild to moderate dysplasia
- Class IV หมายถึง พบเซลล์ผิดปกติในระดับ CIN 3 หรือ Severe dysplasia หรือสงสัยเซลล์มะเร็ง (Carcinoma in situ)
- Class V หมายถึง ตรวจพบเซลล์มะเร็งชนิด Squamous cell carcinoma หรือ Adenocarcinoma

ส่วนการรายงานผลตรวจทาง Colposcopy ถือว่าเป็นการรายงานผลทาง Histology จะรายงานผลเป็นระบบ Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) หรือระยะก่อนเป็นมะเร็งหรือระยะที่เป็นมะเร็ง (Invasive cancer) ซึ่งเซลล์ที่จะตัดสินว่าเป็น CIN จะดูจากความผิดปกติของนิวเคลียสและไซโตพลาซึม โดย นิวเคลียสจะมีขนาดใหญ่ขึ้น, อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมจะสูง ยิ่งถ้าสูงมากก็ยิ่งแสดงว่าเป็น CIN ระดับสูง, เมื่อย้อมสีนิวเคลียสจะติดสีเข้ม (hyperchromasia), เซลล์จะมาอยู่ติดๆกัน (clumping) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ทั่วไปบ่อยๆของ CIN และจะแบ่งระดับของ CIN จากความหนาของชั้นเยื่อเมือกปากมดลูกที่ผิดปกติ (ดังแสดงในรูปที่ 9) โดย CIN แบ่งออกเป็นดังนี้

1. CIN I หรือ mild dysplasia และมีอัตราส่วนระหว่าง nucleus และ cytoplasm (nuclear cytoplasmic ratio) ประมาณ 1/3 ของเยื่อเมือกปากมดลูก (cervical epithelium) พบที่ชั้นล่างๆของเซลล์เยื่อเมือกปากมดลูกซึ่งอยู่ติดกับ basement membrane
2. CIN II หรือ moderate dysplasia พบเซลล์เยื่อเมือกปากมดลูกที่ผิดปกติประมาณครึ่งหนึ่งของชั้นเยื่อเมือก (lower half of the epithelium)
2. CIN III หรือ severe dysplasia พบเซลล์เยื่อเมือกปากมดลูกที่ผิดปกติประมาณเกือบทั้งหมดของชั้นเยื่อเมือก

ระยะมะเร็ง (Invasive cancer) จะพบเซลล์เยื่อเมือกปากมดลูกที่ผิดปกติทั้งหมดของชั้นเยื่อเมือก



ภาพที่ 9 แสดง ลักษณะของเซลล์แต่ละระยะของ CIN [17]

ระยะของมะเร็งปากมดลูก (Staging of cervical cancer)

จะใช้การแบ่งของ International Federation of Obstetricians and Gynaecologists (FIGO) Staging System [21]. ซึ่งแบ่งออกเป็นดังนี้

Stage I เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งจำกัดอยู่ที่ปากมดลูกเท่านั้น แบ่งออกเป็น

Stage IA : พบเซลล์มะเร็งที่ปากมดลูกปริมาณเล็กน้อยซึ่งดูได้จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เท่านั้น โดยพบเซลล์มะเร็ง อยู่ลึกมากที่สุด 5mm กว้างมากที่สุด 7mm ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกเป็นระยะ IA 1 และ IA2 ดังนี้

-Stage IA1 : พบเซลล์มะเร็งลึกมากที่สุด 3mm กว้างมากที่สุด 7mm

-Stage IA2 : พบเซลล์มะเร็งลึกมากกว่า 3 mm แต่ไม่เกิน 5mm และกว้างมากที่สุด ไม่เกิน 7mm

Stage IB : เป็นระยะที่พบรอยโรค(Clinical lesion) ที่บริเวณปากมดลูกโดยมีขนาดมากกว่า Stage IA ซึ่งจะแบ่งย่อยออกเป็นระยะ IB1 และ IB2 ดังนี้

-Stage IB1 : พบรอยโรคมีขนาดไม่เกิน 4 cm

-Stage IB2 : พบรอยโรคมีขนาดมากกว่า 4 cm

Stage II เซลล์มะเร็งลุกลามออกไปนอกปากมดลูก แต่ยังไม่ลุกลามยังไม่ถึงผนังของกระดูกเชิงกราน (Pelvic wall) รวมถึงลุกลามไปที่ช่องคลอดแต่ยังไม่ครอบคลุมทั้งหมดแบ่งออกเป็น

Stage IIA : เซลล์มะเร็งได้กระจายไปที่ช่องคลอดไม่เกินสองในสามส่วน แต่ยังไม่กระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อบริเวณรอบข้างมดลูก

Stage IIB : เซลล์มะเร็งได้แพร่กระจายไปสู่เนื้อเยื่อบริเวณรอบข้างมดลูกแต่ยังไม่ถึงด้านข้างของอุ้งเชิงกราน

Stage III เซลล์มะเร็งลุกลามไปถึงผนังด้านข้างของอุ้งเชิงกราน และรวมถึงเกิดภาวะไตบวมน้ำ (hydronephrosis) หรือ ภาวะที่ไตทำงานไม่ได้ (non-functioning kidney) แบ่งย่อยออกดังนี้

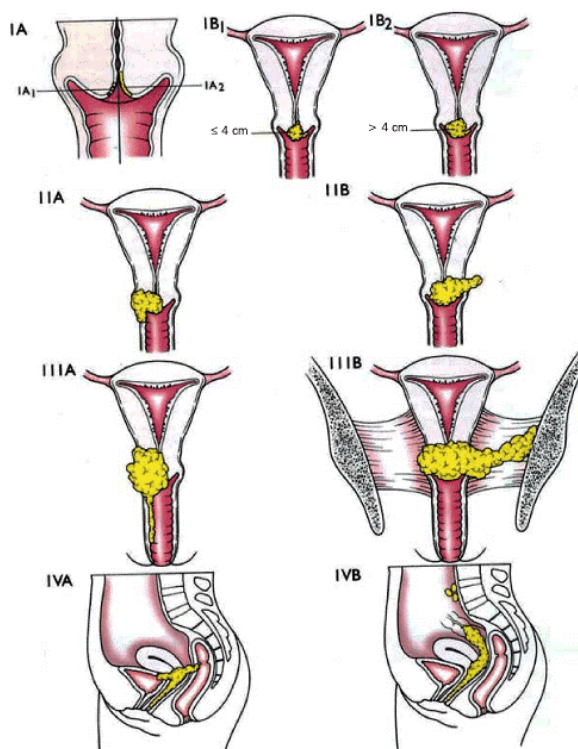
Stage IIIA : เซลล์มะเร็งยังไม่ได้ลุกลามไปที่ผนังด้านข้างของอุ้งเชิงกราน แต่ลุกลามไปที่ช่องคลอดทั้งหมด

Stage IIIB : เซลล์มะเร็งลุกลามไปถึงผนังด้านข้างอุ้งเชิงกราน หรือเกิดภาวะไตบวมน้ำ (hydronephrosis) หรือ ภาวะที่ไตทำงานไม่ได้ (non-functioning kidney)

Stage IV เซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปสู่อุ้งเชิงกราน กระเพาะปัสสาวะ หรือไส้ตรง แบ่งออกเป็นระยะย่อยๆดังนี้

Stage IVA : เซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปที่อวัยวะที่อยู่ติดกับอุ้งเชิงกราน

Stage IVB : เซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปสู่อวัยวะที่อยู่ไกลออกไป



ภาพที่ 10 แสดง FIGO staging of cervical cancer [18]

โดยพบว่าจากระยะที่ตรวจพบ high risk HPV จนถึงระยะ CIN3 ใช้เวลาประมาณ 3-5 ปี และใช้เวลาประมาณ 10-20 ปีในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก

2.5 การรักษาระยะก่อนเป็นมะเร็ง (Cervical intraepithelial neoplasia) และระยะมะเร็งปากมดลูก (Invasive cervical cancer) ได้แก่

1. การจี้เย็น (Cryotherapy) เป็นการให้ความเย็นจากแก๊สไนตรัสออกไซด์ (NO₂) ที่อุณหภูมิ -65 C° ถึง -85 C° หรือแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ที่อุณหภูมิ -60 C° จี้บริเวณปากมดลูกโดยผ่านอุปกรณ์ที่เรียกว่า cryoprobe ซึ่งประกอบด้วยแผ่นโลหะเพื่อนำความเย็น เพื่อให้เซลล์ผิดปกติบริเวณปากมดลูกตายและหลุดออก จึงไม่สามารถนำไปตรวจวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยาต่อไปได้ วิธีการนี้ดีสำหรับรอยโรคที่มีขนาดเล็กไม่เกินขนาดของ cryoprobe ซึ่ง

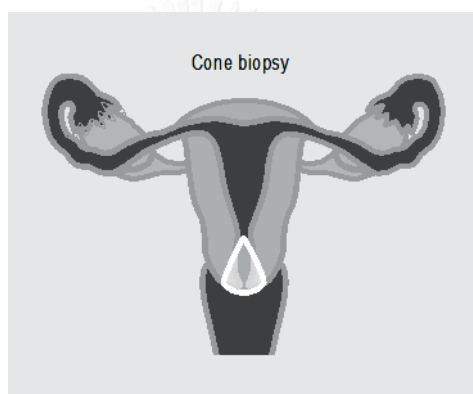
2. การตัดด้วยห่วงไฟฟ้า (Loop electro-surgical excision procedure, LEEP หรือ Large loop excision of the transformation zone, LLEZ)

เป็นการใช้ห่วงไฟฟ้าตัดบริเวณเนื้อเยื่อปากมดลูกที่มีความผิดปกติออก ดีสำหรับรอยโรคที่มีขนาดเล็กมักน้อยกว่า 1 cm ใช้เวลาไม่นาน ผู้ป่วยเจ็บไม่มาก ไม่จำเป็นต้องใช้ยาสลบหรือให้ยาชา

เฉพาะที่ (local anesthesia) กับผู้ป่วย ห่วงไฟฟ้าที่นอกจากจะทำหน้าที่ตัดแล้วยังทำหน้าที่ในการห้ามเลือดที่ออกมาด้วยในเวลาเดียวกัน เนื้อเยื่อที่ถูกตัดออกมาสามารถส่งตรวจทางพยาธิวิทยาต่อไปได้

3. การใช้มีดตัดปากมดลูกออกเป็นรูปกรวย (Cold knife conization)

ซึ่งวิธีการนี้สามารถตัดบางส่วนของ Endocervix และ Exocervix ได้หรือสามารถตัดทั้งหมดของ transformation zone ได้ ซึ่งวิธีการนี้สามารถตัดเป็นบริเวณได้กว้างกว่าวิธีที่กล่าวมาข้างต้น แต่วิธีการนี้ต้องมีการใช้ยาชาเฉพาะที่ (local anesthesia) กับคนไข้ มักใช้เมื่อการรักษาด้วย cryotherapy และ LEEP ไม่ได้ผล เนื้อเยื่อที่ตัดออกมาสามารถส่งตรวจทางพยาธิวิทยาต่อไปได้



ภาพที่ 11 แสดง บริเวณสำหรับทำ Cold knife conization [17]

4. การตัดมดลูก (Hysterectomy) แบ่งออกเป็นหลายรูปแบบตามส่วนของมดลูกและปากมดลูกที่ถูกตัดออกไป เช่น

- Total hysterectomy เป็นการตัดมดลูกและปากมดลูกออกทั้งหมด แต่เหลือรังไข่ทั้งสองข้างไว้
- Subtotal hysterectomy เป็นการตัดมดลูกออก แต่เหลือปากมดลูกเอาไว้
- Total hysterectomy with salpingo-oophorectomy เป็นการตัดมดลูกและปากมดลูกออกทั้งหมด รวมถึงส่วนของรังไข่และท่อนำไข่ทั้งสองข้างออกไปด้วย
- Radical hysterectomy เป็นการตัดมดลูก ปากมดลูก บางส่วนของช่องคลอด รังไข่และท่อนำไข่ รวมถึงเอ็นต่างๆรอบอวัยวะดังกล่าวออกด้วย เป็นต้น

5. Radiotherapy เป็นการใช้รังสีรักษา

6. Chemotherapy เป็นการใช้เคมีบำบัด

7. Chemoradiotherapy หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Chemoradiation เป็นการใช้เคมีบำบัดร่วมกับรังสีรักษา

ซึ่งการจะเลือกว่าจะใช้วิธีไหนในการรักษาและขึ้นอยู่กับระยะของมะเร็ง โดย

- ระยะ Ia1-Ia2 ใช้การผ่าตัด(surgical excision procedure) อย่างเดียวก็เพียงพอ
- ระยะ Ib-IIa ใช้การผ่าตัดหรือใช้เคมีบำบัดร่วมกับรังสีรักษา ขึ้นกับลักษณะและพยาธิสภาพอื่น ๆ ของผู้ป่วย เช่น อายุ, โรคประจำตัว เป็นต้น อีกทั้งขึ้นกับความต้องการในการรักษาของผู้ป่วยด้วย

ระยะ IIb-IV เป็นระยะที่มีการแพร่กระจายของมะเร็งไม่สามารถใช้การผ่าตัดได้แล้ว ต้องใช้รังสีรักษา (radiotherapy) หรือ เคมีบำบัดร่วมกับรังสีรักษา (chemoradiotherapy) [19]

2.6 พลูดาว

มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Houttuynia cordata* Thunb.

อยู่ใน Kingdom : Plantae.

Family : Saururaceae.

Genus : Houttuynia

Species : cordata.

พลูดาวเป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี เป็นพืชประจำถิ่นของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สำหรับประเทศไทยพบมากทางภาคเหนือ เนื่องจากมีกลิ่นคล้ายควาปลาจึงเรียก พลูดาว แต่ก็ยังมีชื่อเรียกต่างมากมาย ตามพื้นเมืองต่างๆ เช่น ควาตอง (ลำปาง, อุตร), ควาทอง (มุกดาหาร, อุตรดิตถ์), ก้านตอง (แม่ฮ่องสอน) สำหรับภาคกลางมักจะเรียก พลูดาว ในงานวิจัยนี้ก็จะใช้คำว่า พลูดาว

พลูดาว มีความสูงประมาณ 15-30 ซม. ลำต้นกลม สีเขียว รากแตกออกตามข้อ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ ใบเป็นรูปหัวใจกว้างประมาณ 4-6 ซม. ยาว 6-10 ซม. ปลายใบเรียวแหลม โคนใบเว้าเป็นรูปหัวใจ ท้องใบจะมีลายเส้นสีม่วงอ่อนๆ ส่วนโคนที่แตะดินจะมีรากงอกออกตามข้อของลำต้น ออกดอกเป็นช่ออยู่ตรงส่วนยอดของต้น ประกอบด้วยดอกเล็กๆ จำนวนติดแน่นเป็นแท่งทรงกระบอกยาวประมาณ 1 นิ้ว มีสีขาวออกเหลือง เป็นพันธุ์ไม้กลางแจ้งที่ชอบขึ้นในดินที่ชื้นแฉะหรือริมน้ำทั่วไป สามารถขยายพันธุ์ด้วยการแยกหน่อและปักชำต้นที่มีราก

สำหรับสรรพคุณในตำรับยาไทย

1. **ต้น** : ใช้รักษาโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจส่วนบน แก้โรคบิด ขับปัสสาวะ ลดอาการบวม น้ำ แก้โรคผิวหนัง ผื่นคัน ผีผุกบัว ผลเปื่อย ติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ
2. **ราก** : ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ
3. **ใบ** : ใช้รักษาโรคผิวหนัง ทวาร กามโรค ทำให้น้ำเหลืองแห้ง แก้ไขข้อ แก้โรคผิวหนัง หัด ยับยั้งการเจริญของยีสต์และเชื้อราในปัสสาวะ [20]

โดยพบว่าส่วนประกอบทางเคมีที่พบส่วนใหญ่แบ่งออกเป็น 6 ชนิดคือ

1. Volatile oils
2. Flavonoid
3. Alkaloids
4. Fatty acid
5. Sterols
6. Polyphenolic acid

และสารเคมีที่พบว่าเป็น major active chemical คือ

1. Chlorogenic acid
2. Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosyl-7-O- β -D-glucopyranoside
3. Quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-7-O- β -D-glucopyranoside
4. Quercetin
5. Rutin
6. Isoquercitrin
7. Quercitrin
8. Hyperin
9. Afzelin
10. Piperolactam A
11. Aristolactam B [21]

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าพลาความีคุณสมบัติ 1. Anti-inflammatory โดยสามารถยับยั้ง enzyme COX-2 ซึ่งเป็นตัวเปลี่ยน Arachidonic acid ให้เป็น Prostaglandin (PE) ซึ่งเป็น mediator ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ [22] 2. Anti-anaphylaxis โดยสามารถยับยั้งการหลั่ง

cytokine ของ Th2-cell เช่น IL-4,-5 ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการแพ้ โดย IL-4 จะกระตุ้น B-cell activation และ isotype switching ส่วน IL-5 จะกระตุ้นการสร้าง isoenzyme [23]

3.Immunostimulatory effect โดยจะเพิ่มจำนวน T-lymphocyte ทั้ง T-helper cell และ Cytotoxic T-cell และเพิ่มการผลิต cytokine ของ T-cell [24] 4. Block NF-kB activation ซึ่งจำเป็นในการ replication ของไวรัส เช่น HIV, influenza A, severe acute respiratory syndrome(SARS), human herpes virus-2 (HSV-2) [25] 5. Anti-oxidation [26] 6. Induction of apoptosis ใน colon cancer [27]

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า พิษสมุนไพรมักจะมีฤทธิ์ในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ program cell death ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญของเซลล์สัตว์ในการพัฒนาการของอวัยวะต่างๆรวมถึงควบคุมสมดุลของร่างกาย เมื่อมีความผิดปกติจะนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆได้ เช่น โรคมะเร็ง, โรคทางระบบประสาท, โรคหัวใจและหลอดเลือด, โรคทางเมแทบอลิซึม เป็นต้น โดย program cell death สามารถแบ่งออกได้ 2 รูปแบบ ได้แก่

1. Apoptosis

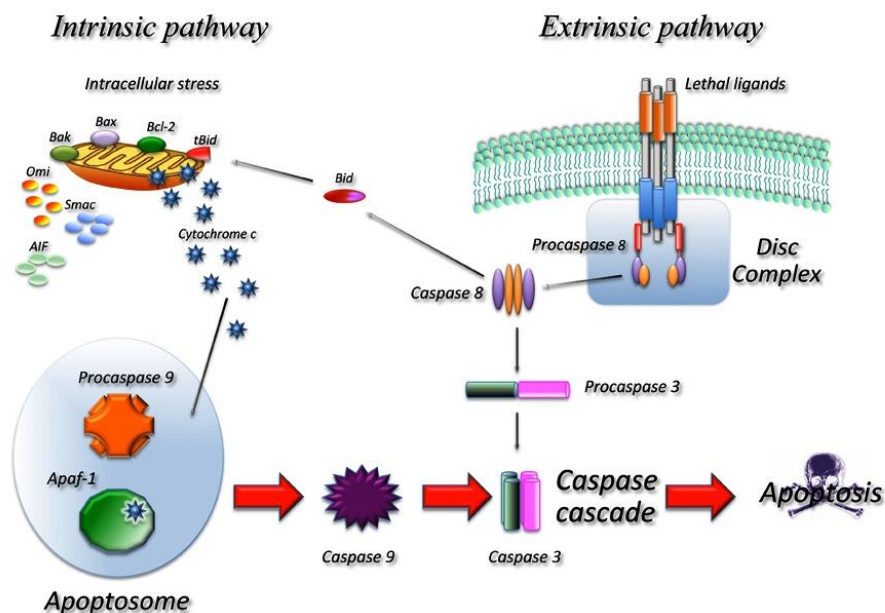
เป็นกระบวนการที่เซลล์ใช้ในการรักษาสมดุลหรือใช้ระหว่งการเกิดการพัฒนากการ เป็นการกำจัดเซลล์ที่เกิดความผิดปกติ เช่น เซลล์ที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างผิดปกติไปจากที่ควรจะเป็น (transformed cell), เซลล์ที่ติดเชื้อ, เซลล์ที่เกิดการบาดเจ็บ และเซลล์ส่วนเกินในระหว่างการพัฒนาเจริญของเนื้อเยื่อ โดย Apoptosis เป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์ที่โปรแกรมไว้แล้วที่เรียกว่า "Program cell death" โดยจะใช้ Caspase (Caspase dependent) ซึ่งเป็น Proteolytic enzyme ในการเกิดปฏิกิริยาเป็นขั้นตอน โดย substrate ของ enzyme caspase จะเป็นพวกโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยึดติดของเซลล์ ได้แก่ cadherins, desmosomes และโปรตีนโครงสร้าง(cytoskeleton) ได้แก่ actin, gelsolin, myosin, tubulin, fodrin เป็นต้น ซึ่งเมื่อเกิดการย่อย (proteolysis)แล้วจะทำให้เซลล์ที่เกิด apoptosis หลุดออกจากโครงสร้างที่เคยยึดติด ยกเว้น substrate ROCK1 เมื่อเกิด proteolysis เกิดรูป active form แล้วจะ phosphorylate myosin light chain จะทำให้เกิด membrane blebbing ต่อไป ลักษณะของเซลล์ที่เกิด apoptosis มีดังนี้

1. เซลล์มีลักษณะนูนออก พองออก (blebbing) 2. ไซโทพลาสซึมหด (cytoplasmic shrinkage)
3. Chromatin condensation 4.mitochondrial fragmentation 5. Nucleus fragmentation 5. Externalization of plasma membrane phosphatidylserine (PS) [28] หลังจากนั้นเซลล์ที่เกิด apoptosis ก็จะถูกกำจัดโดย phagocytic cell เช่น macrophage ซึ่งจะไม่กระตุ้นให้เซลล์หรือ

เนื้อเยื่อเกิดการบาดเจ็บและตายเหมือนการตายแบบ Necrosis โดยสัญญาณที่มากกระตุ้นมาจาก 2 pathway [29] คือ

1. **Extrinsic pathway** เกิดจาก Fas death receptor ที่อยู่บน target cell จับกับ Fas ligand ที่อยู่บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว กระตุ้น adaptor protein และจะไปกระตุ้น procaspase 8,10 ทำให้ไปจับกับ death inducing signal complex(DISC) เกิดการ cleavage procaspase 8,10 ให้เป็น caspase 8,10 กระตุ้น executioner caspase ซึ่งได้แก่ caspase-3,-6,-7 ทำให้เกิด apoptosis ต่อไป ซึ่งสัญญาณจากภายนอกเช่น toxin, growth factor, cytokine, nitric oxide

2. **Intrinsic pathway** เกิดจากการกระตุ้นภายในเซลล์ เซลล์บาดเจ็บ จากภาวะเครียด (stress) เช่น DNA damage, ภาวะขาด oxygen, nutrient เป็นต้น ทำให้ cytochrome C ซึ่งเป็น water soluble components ของ mitochondria ถูกปล่อยออกมาจาก intermembrane space เข้าสู่ cytosol ของ cell ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น Apaf-1 ให้มารวมตัวกันเป็นลักษณะ wheel-like heptamer เรียกว่า apoptosome ซึ่งจะไปกระตุ้น procaspase 9 ให้กลายเป็น caspase 9 กระตุ้น executioner caspase ทำให้เกิด apoptosis ต่อไป



ภาพที่ 12 แสดง apoptosis pathway [30]

2. Autophagy

มาจากคำว่า auto + phagos แปลว่า self-eating เป็นหนึ่งในสอง ของ protein degradation pathway หลัก คือ Ubiquitin-proteasome pathway และ autophagy pathway. เซลล์ต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปเพื่อที่จะมีชีวิตรอด คือ มีสมดุลระหว่างการสร้าง(Biosynthesis) กับ การทำลาย และนำกลับมาใช้ใหม่ ที่เรียกว่า สมดุล (homeostasis) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สำคัญในการ development, differentiation, tissue remodeling และการทำลายส่วนประกอบของเซลล์ที่เสื่อม ที่หมดอายุ นอกจากนี้ยังใช้ในการกำจัดเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย ในระหว่างที่เกิดการกระตุ้น autophagy โดย starvation stress และภาวะเครียดต่างๆ เช่น metabolic stress, anticancer drugs เป็นต้น cytoplasmic contents (protein, organelle) จะถูกนำไปทำลายที่ lysosome เพื่อลดการใช้พลังงานของเซลล์ เซลล์จะได้มีชีวิตรอด ความบกพร่องในการเกิด autophagy ทำให้เกิดโรคต่างๆมากมาย เช่น มะเร็ง, neurodegenerative disease, infectious disease, lysosomal storage disease เป็นต้น autophagy แบ่งเป็น 3 pathway คือ

1. Chaperone mediated autophagy (CMA) คือกระบวนการใช้ chaperon เป็นตัวขนส่งโปรตีนที่จะทำลายไปยัง lysosomal membrane โดยโปรตีนตัวนั้นต้องมี receptor ที่จำเพาะต่อ chaperon คือมี KFERQ motif ในลำดับกรดอะมิโน Chaperon ที่เกี่ยวข้องกับขนส่งคือ Hsp 70 family ที่อยู่ใน cytosol คือ Hsc 70 นอกจากนี้ยังมี Hsp 70 co-chaperon(Hsp40, Hsp90, Hip, Hop) เพื่อควบคุม activity ของมัน ที่ผิวของ lysosome จะมี lysosome-associated membrane type 2(LAMP-2A) receptor เพื่อให้ chaperon จับและมี Hsc 73 ทำหน้าที่ดึงโปรตีนเข้าสู่ lysosome เมื่อขนส่งไปยัง lysosomal membrane แล้ว chaperone จะหลุดออกมา และนำกลับมาใช้ใหม่

2. Macroautophagy เป็นกระบวนการเมื่อเกิด autophagy จะมีการสร้าง membrane ขึ้นมาหุ้ม cytoplasmic contents เรียก membrane นี้ว่า isolation membrane หรือ phagophore กระบวนการสร้างยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะเป็น double membrane เรียกว่า autophagosome โดย outer membrane ของ autophagosome จะ fuse กับ lysosomal membrane ทำให้ autophagosome เข้าไปใน lysosome และถูกย่อยต่อไป กระบวนการสร้าง autophagosome แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนคือ

1. Initiation step

ซึ่งเกี่ยวกับการกระตุ้น ULK1-Atg13-FIP200 complex

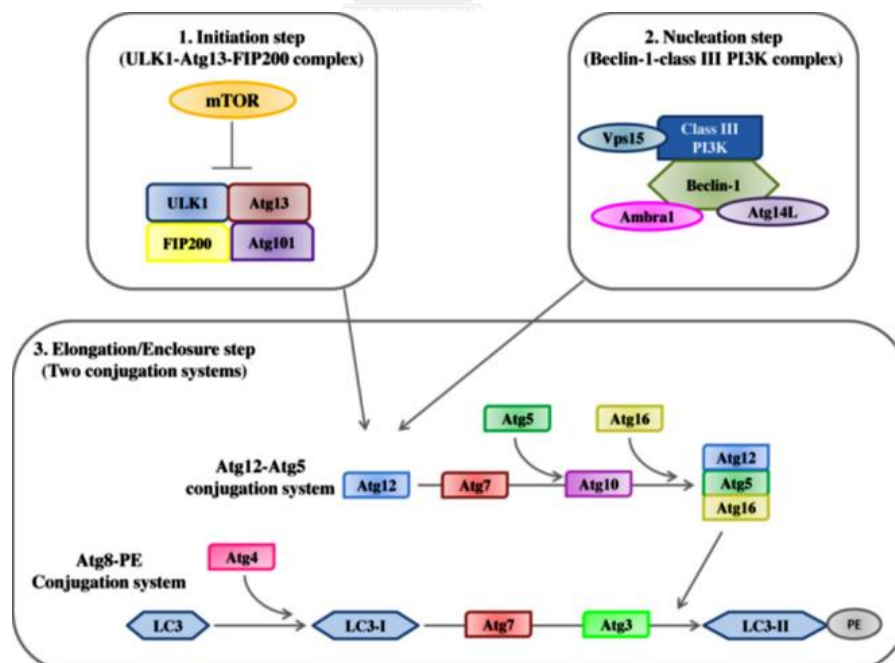
2. Nucleation step [Beclin-1, classIII PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) complex]
3. Elongation/enclosure step โดยจะแบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือ ATG12-ATG5 conjugation system และ ATG8-PE conjugation system [31]

1. ATG12-ATG5 conjugation system

ATG 12 จะจับกับ ATG 5 และไปจับกับ ATG 16 เกิดเป็น complex ATG 12-5-16 ซึ่งจะเคลื่อนที่ไปอยู่บนเมมเบรนของ autophagosome

2. ATG 8-PE conjugation system

ATG8 หรือ protein LC3B หรือ ubiquitin like protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ใน cytosol และจะถูก proteolysis ตัดส่วน c-terminal ออกโดย Atg4 กลายเป็น LC3BI หรือที่เรียกว่า cytosolic form ของ LC3(เป็น post translational modification) เมื่อเกิดการชักนำให้เกิดกระบวนการ autophagy protein LC3B I จะมีการเติม Phosphatidyl ethanolamine(PE) เกิดเป็น LC3BII โดยการทำงานของ E1(like enzyme ATG7) และ E2(like enzyme ATG3 และจะไปจับกับ isolation membrane ทำให้เกิดการสร้างเป็น autophagosome ต่อไป ซึ่งระบบทั้งสองนี้เป็นระบบที่ช่วยทำให้เกิด elongation membrane ของ autophagosome เกิดเป็น autophagosome ที่สมบูรณ์ต่อไป



ภาพที่ 13 แสดง โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ Autophagy [31]

3. **Microautophagy** เป็นการกินโดย lysosome โดยตรงคือ เกิด invagination หรือเกิดการยื่นส่วนของ lysosome ออกไปมีลักษณะคล้ายนิ้ว (finger like protrusion) เข้าไปโอบ cytoplasmic contents เข้ามาโดยตรง ไม่มีการสร้างเป็น autophagosome ก่อน



บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

| | |
|--|---------------------------|
| - (-20) °C Freezer | Sanyo Electric |
| - (-80) °C Freezer | IIShin Lab |
| - (4) °C Refrigerator | Sharp |
| -6 well cell culture plate flat bottom with lid | Corning incorporation |
| -96 well cell culture plate flat bottom with lid | Corning incorporation |
| -Autoradiography films | Thermo scientific |
| -Absorbance photometer | BioTek |
| -Analytical Balances | Mettler Toledo |
| -Auto pipette | GILSON |
| -CO ₂ incubator | Sheldon Manufacturing |
| -Cell Culture Flask (25, 75 cm ²) | Corning incorporation |
| -Centrifuge tube (15, 50 ml) | Corning Incorporation |
| -Disposable Serological pipette (5, 10, 20 ml) | Corning Incorporation |
| -Fluorescence microscope | Olympus |
| -Glassware | Pyrax |
| -Hemocytometer counting chamber | Hausser Scientific |
| -Incubator | Memmert |
| -Inverted microscope | Olympus |
| -Light microscope | Olympus |
| -Liquid Nitrogen Tank | Taylor-Wharton |
| -Membrane filter | Corning incorporation |
| -Multichannel pipette | GILSON |
| -Microcentrifuge tube (1.5 ml.) | Biologix Research company |

| | |
|--|-----------------------------------|
| -Pipette tips (10, 200, 1000 μ L.) | Sorenson TM BioScience |
| -Rotary evaporator | Fisher scientific |
| -Stage micrometer | Gammaco |
| -Syringe (10 mL) | Corning incorporation |
| -Vortex Mixer | FINEPCR |
| -Water Bath | Memmert |
| -Whatman no.1 filter paper | Whatman Limited |
| -Vertical gel electrophoresis system | Bio-Rad |

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

แบ่งออกเป็น

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยง Cell line

| | |
|-----------------------------------|---------|
| -Alpha MEM | Hyclone |
| -Penicillin-Streptomycin Solution | Hyclone |
| -Fetal Bovine Serum (FBS) | Hyclone |
| -EDTA-Trypsin 0.25% (1X) | Hyclone |
| -Phosphate-Buffered Saline (PBS) | Hyclone |

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร

| | |
|-----------------------------|---------------|
| -Petroleum Ether (AR grade) | Sigma-Aldrich |
| -Dichloromethane (AR grade) | Sigma-Aldrich |
| -Ethanol (AR grade) | RCI Labscan |

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ทำ MTT assay

| | |
|--|------------|
| - 3-(4,5-dimethylthianisol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) | Calbiochem |
| -Trypan Blue Stain 0.4% | Invitrogen |
| -Dimethyl Sulphoxide (DMSO) | Merck |

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ทำ Acridine orange staining

| | |
|---|--------------------|
| -Acridine Orange Base | Sigma -Aldrich |
| 3.2.5 สารเคมีที่ใช้ทำ MMP-2 assay | |
| -MMP2- Human ELISA Kit | Abcam [®] |
| 3.2.6 สารเคมีที่ใช้ทำ Apoptosis detection | |
| -Alexa Fluor [®] 488 annexin V and PI for flow cytometry | Invitrogen |
| 3.2.7 สารเคมีที่ใช้ทำ Western blot | |
| -Isopropanol | Merck |
| -85% Phosphoric acid | Merck |
| -Serva Blue G | AppliChem |
| -Nonidet P 40 | Biobasic |
| -Dithiothreitol (DTT) | Biobasic |
| -Phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) | USB |
| -30% Acrylamide and Bis-Acrylamide Solutions | BIO-RAD |
| -Ammonium persulfate | BIO-RAD |
| -Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) | Ajax Finechem |
| -N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) | Sigma -Aldrich |
| -Glycine (Molecular grade) | Merck Millipore |
| -Polyxyethylene-20 sorbitan monolaurate (Tween 20) | Biobasic |
| -Bovine Serum Albumin | Sigma -Aldrich |
| -Rabbit polyclonal antibody (GAPDH) | Cell signaling |
| LC3B (D11) XP [®] Rabbit m Antibody | Cell signaling |
| -SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate | Thermo scientific |
| -Rabbit HRP linked monoclonal antibody | Cell signaling |
| -Kodak BioMak light film | Sigma- Aldrich |
| -Kodak processing chemicals for | Sigma Aldrich |

3.3 พืชสมุนไพรที่นำมาทดสอบในการวิจัย

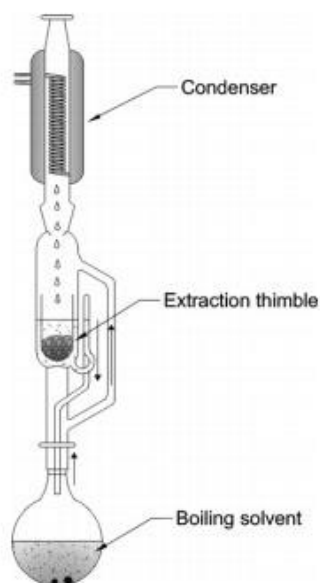
ได้แก่ พลูดาว (*Houttuynia cordata* Thunb.) ซึ่งได้มาจากตลาดในจังหวัดเชียงใหม่ช่วงเดือน พฤษภาคม และได้รับการทดสอบยืนยันว่าเป็นพลูดาวจริง โดยคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชา พฤษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชศาสตราจารย์กสิน สุวะตะพันธ์ โดยมี Voucher number A015285

การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation)

นำพลูดาว (*Houttuynia cordata* Thunb.) ส่วนใบลำต้นและกิ่ง มาล้างให้สะอาดแล้ว นำไปอบที่ hot air oven อุณหภูมิ 50 °C จนแห้ง แล้วนำไปบดโดยใช้เครื่องบดให้ละเอียดเสร็จแล้ว นำไปทำขั้นตอนการสกัด

ขั้นตอนการสกัด (Extraction method)

สกัดโดยใช้ Soxhlet extraction ซึ่งเป็นการสกัดร้อนแบบต่อเนื่อง (hot continuous extraction) โดยอุปกรณ์ที่เรียกว่า “Soxhlet apparatus” ดังรูปที่ 14



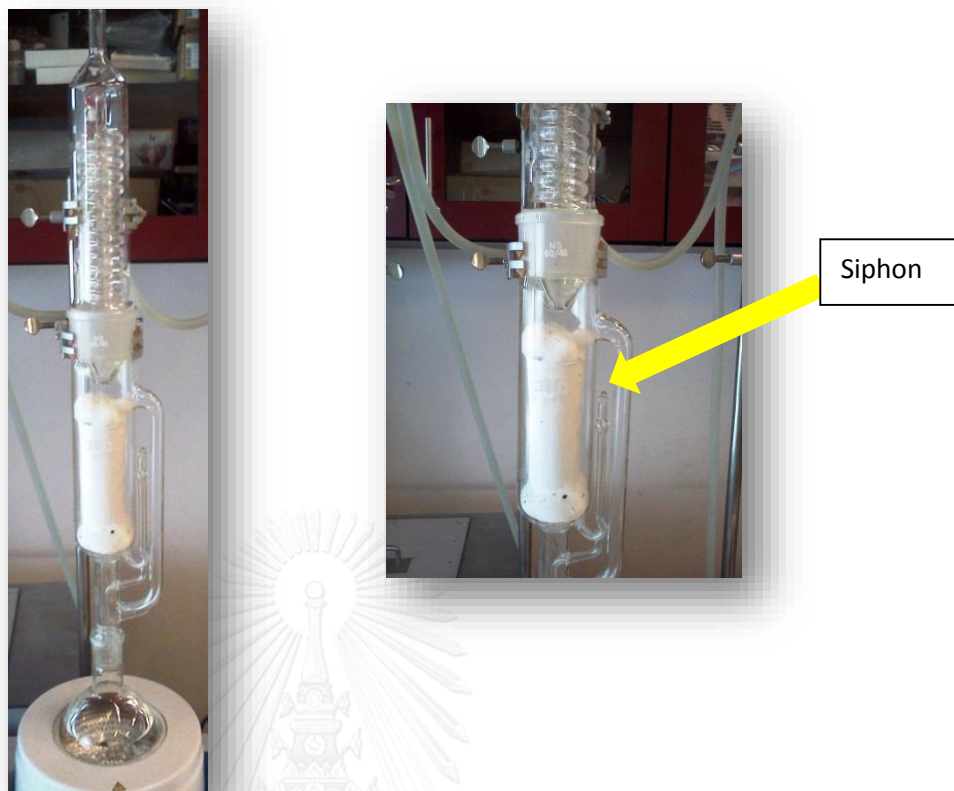
ภาพที่ 14 แสดง Soxhlet apparatus [32]

อาศัยการต้มตัวทำละลายให้ระเหยและเกิดการควบแน่นหยดลงบนสมุนไพรมุ่งที่ต้องการสกัดซึ่งจะใส่ไว้ใน Cellulose extraction thimble ในเครื่อง soxhlet จนปริมาตรของตัวทำละลายขึ้นสูงถึงระดับกาลักน้ำ (ซึ่งในขั้นตอนนี้ตัวทำละลายจะสัมผัสกับสมุนไพรมุ่งที่ต้องการสกัดเกิดการสกัดขึ้น) ก็จะไหลผ่าน siphon ซึ่งเป็นท่อเล็กๆลงสู่ขวดตัวทำละลาย ในขั้นตอนนี้ขวดตัวทำละลายจะมีสารสกัดอยู่ด้วย จากนั้นสารละลายในขวดตัวทำละลายเดิมซึ่งมีสารสกัดก็จะเกิดการระเหยและควบแน่นลงบนสมุนไพรมุ่งที่สกัดและเกิดขั้นตอนต่างๆซ้ำดังเดิมที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเป็นการสกัดแบบต่อเนื่อง ได้ปริมาณสารสกัดมาก โดยใช้ตัวทำละลายน้อย [33] ในการทดลองนี้จะใช้ตัวทำละลายสามชนิด เรียงตามลำดับความมีขั้วน้อยไปมากดังนี้คือ Petroleum ether (PE), Dichloromethane (DC) และ Ethanol (ET)

| | |
|-------------------|----------|
| โดย PE มีจุดเดือด | 30-40 °C |
| DC มีจุดเดือด | 39-42 °C |
| ET มีจุดเดือด | 78 °C |

โดยมีวิธีการดังนี้

1. ชั่งพืชมุ่งที่บั่นไว้ 40 g ใส่ cellulose extraction thimble
2. ตวงตัวทำละลายแรกคือ Petroleum ether 400 mL ใส่ขวดก้นกลม เพื่อให้อัตราส่วนเป็น 40:400=1:10
3. ใส่กระเบื้องลงไป 2-3 ชิ้นเพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรง
4. Set อุปกรณ์ดังรูป



5. สกัดจนกว่าส่วน siphon จะใส โดยใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง
 6. เติตัวทำละลายที่รวมกับสารสกัดที่ได้จากขวดกันกลม ใส่ Duran bottle เก็บไว้ที่ 2-4 °C รอการ evaporation เอาดตัวทำละลายออก
 7. เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น DC และ ET โดยใช้ sample เดิม แล้วทำตามทีกล่าวไว้ข้างต้น
- ก่อนการนำสารจากขวด Duran ใส่ Tube 50 mL ให้ห่อ tube 50 mL ด้วย aluminium foil และชั่งน้ำหนักก่อนใส่สารและหลังจากระเหยตัวทำละลายออกไปแล้ว เพื่อจะได้น้ำหนักของ crude extract นำมาคำนวณ เตรียมความเข้มข้นของสารสกัด**
- หลังจากนี้ให้ทำการระเหยตัวทำละลายทิ้งโดยใช้ เครื่อง Rotary evaporator (miVac)

การระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ เครื่อง Rotary evaporator (miVac)

นำสารสกัดที่มีตัวทำละลายจากขวด Duran bottle ใส่น้ำหนัก 50 mL ประมาณ 30 mL เพราะใส่มากอาจจะล้นได้ แล้วนำเข้าเครื่อง ตั้งอุณหภูมิการระเหยสำหรับ PE และ DC ที่ 30 °C ET ที่ 45 °C เสร็จแล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก ซึ่งได้น้ำหนักดังนี้

- Petroleum Ether (PE) มีน้ำหนักสารสกัดหยาบ 0.53 กรัม

- Dichloromethane (DC) มีน้ำหนักสารสกัดหยาบ 0.23 กรัม
- Absolute Ethanol (ET) มีน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1.07 กรัม

การเตรียม Stock solution ของสารสกัดหยาบ

1. เตรียม Stock solution ความเข้มข้น 100 mg/mL ในแต่ละตัวทำละลาย โดยละลายสารสกัดหยาบเหล่านี้ด้วย DMSO คำนวณด้วยวิธีเทียบบัญญัติไตรยางค์ดังตัวอย่าง

ตัวอย่าง เตรียม Stock solution ของสารสกัดหยาบในส่วนตัวทำละลาย PE ความเข้มข้น 100 mg/mL ดังนี้

สารสกัดหยาบในส่วนตัวทำละลาย PE มีน้ำหนัก 0.52 กรัม = 530 mg

เตรียม 100 mg ใน 1,000 μ L

มี 530 mg ดังนั้นต้องเติม DMSO ลงไป $(530 \times 1000) / 100 = 5,300$ μ L

2. เตรียม Stock solution 100 μ g/mL ด้วยการทำให้ Serial dilution โดยเจือจางด้วย Media

| | |
|--|---------------|
| 100 mg/mL crude extract | มี DMSO 100 % |
| 10 mg/mL crude extract | มี DMSO 10 % |
| 1 mg/mL หรือ 1000 μ g/mL crude extract | มี DMSO 1 % |
| 100 μ g/mL crude extract | มี DMSO 0.1 % |

การเตรียมเซลล์

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองคือ

- SiHa เป็น human squamous cervical cancer cells ที่มี HPV type 16 integrate อยู่

การ sub culture(pass cell)

เป็นการถ่ายเซลล์ จะทำเมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนเต็ม flask 70-80% เพื่อไม่ให้มีเซลล์มากเกินไป เพราะการมีเซลล์มากจะทำให้แย่งสารอาหารกัน เป็นผลให้เซลล์เจริญไม่ดีไม่แข็งแรงหรือตายได้ (Flask ใหญ่คือมีขนาด 75 mm², Flask เล็กคือมีขนาด 25 mm²)

วิธีทำการทดลอง

1. ดูด media ทิ้ง ใส่ 1x PBS จำนวนพอที่จะล้าง แล้ว mix ให้ดี ล้างสองรอบ
2. เติม enzyme trypsin สำหรับย่อยเซลล์ออกจาก flask โดยที่ flask เล็กใช้ 1 mL flask ใหญ่ใช้ 2 mL
3. Incubate 37 °C 2-5 นาที

4. เขย่า flask เบาๆ ให้เซลล์หลุด แล้วใส่ culture media ลงไปเพื่อ neutralize trypsin (flask เล็ก ใช้ 3, flask ใหญ่ใช้ 6 mL)
5. Mix โดยดูดขึ้นลง
6. ดูดทั้งหมดใส่หลอด 15 mL แล้วนำไปปั่น 1500 rpm 5 นาที 25°C
7. เท media ที่เหลือตะกอน แล้วเขย่าให้ตะกอนกระจาย
8. ดูดใส่ flask ที่ใส่ culture media ใหม่ไว้แล้ว (flask เล็กใส่มีเดีย 3 mL, flask ใหญ่ใส่มีเดีย 6 mL)

การแช่แข็งเซลล์ (Freeze cell).

วิธีทำการทดลอง

1. ทำเหมือน sub-culture แต่ขั้นตอนสุดท้ายให้ดูดตะกอนเซลล์ใส่ Freezing media ที่ประกอบไปด้วย DMSO 10% + Serum 90%
2. แช่ที่ 4°C 1 ชั่วโมง เปลี่ยนไปแช่ที่ 20°C 1 วัน และเปลี่ยนต่อไปแช่ที่ -80°C อีกหนึ่งวัน
3. นำเข้าแช่ในถัง Nitrogen เหลว

การละลายเซลล์ (Thawing cell).

วิธีทำการทดลอง

1. Pipette อาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 5 mL ลงในหลอด 15mL (อาหารเลี้ยงเซลล์ควรอุ่นก่อนที่ 37°C)
2. นำเซลล์ออกจากถัง nitrogen เหลว แล้วทำไปบ่มที่ water bath 37°C 2 นาที ให้เซลล์ละลาย ห้ามแกว่งเกิน 2 นาที DMSO อาจทำให้เซลล์ตายได้
3. Pipette เซลล์ลงสู่ หลอดที่มีมีเดียเตรียมไว้แล้ว 15 mL ในข้อหนึ่ง
4. นำไปปั่น 1500 rpm 25°C 5 นาที เพื่อ neutralize DMSO
5. เท media ที่เหลือแต่ตะกอนเซลล์ แล้วเทมีเดียใหม่ลงไป 5 mL
6. เทใส่ culture flask และนำไป incubate ที่ 37°C , 5%CO₂

การนับและคำนวณจำนวนเซลล์

การนับและคำนวณเซลล์มะเร็งจะใช้เครื่องมือที่เรียกว่า "Hemocytometer counting chamber" ซึ่งก่อนนับจะมีการย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue เพื่อเวลานับเซลล์สามารถประเมินค่าจำนวน

เซลล์ที่มีชีวิตก่อนที่จะทำการ seeded เซลล์ได้ โดยค่าเซลล์ที่มีชีวิต (Cell viability) ไม่ควรต่ำกว่า 90% ซึ่งคำนวณจาก

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{Total cell count} - \text{stained cell (Death cell)}}{\text{Total cell count}}$$

โดยสี Trypan blue จะไม่สามารถซึมผ่านเซลล์เมมเบรนของเซลล์ที่มีชีวิตได้ แต่เซลล์ที่ตายเซลล์เมมเบรนจะเสื่อมสลายซึ่งทำให้สามารถซึมเข้าไปได้ จะเห็นเซลล์ตายติดสีน้ำเงินหรือฟ้า เซลล์เป็นคือเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี Trypan blue เป็นอนุพันธ์ของ toluidine ซึ่งชื่อ Trypan blue มาจากความสามาถที่ฆ่าเชื้อ trypanosomes ซึ่งเป็นปรสิตที่ทำให้เกิด sleeping sickness ได้ (http://en.wikipedia.org/wiki/Trypan_blue).



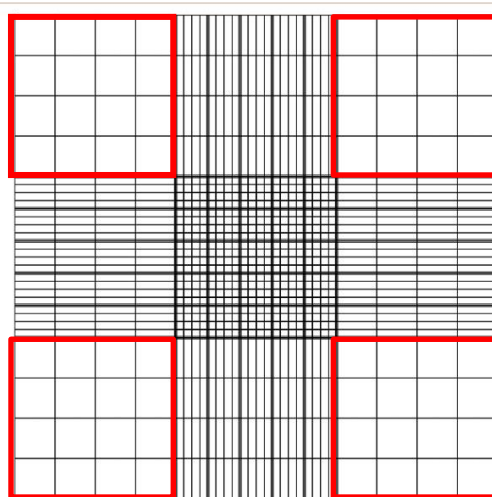
ภาพที่ 15 แสดง Chemical structure ของ Trypan blue.

(http://en.wikipedia.org/wiki/File:Trypan_blue.png)

วิธีการทดลอง

1. ทำเหมือน sub culture จนถึงขั้นตอนที่เจ็ดให้เติม Culture media ลงไปในตะกอนเซลล์ 1 mL (เพื่อเจือจางเซลล์ให้นับจำนวนง่ายขึ้น)
2. ดูด suspension มา 10 μL สี Trypan blue 0.4% มา 90 μL อัตราส่วนเป็น 1:10 (Dilute 10 เท่า)
3. Incubate เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. ดูดใส่ counting chamber นับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Bright field microscope.

5. โดยนับจำนวนสี่ช่องใหญ่ที่ทำกรอบสีแดง ดังแสดงในรูปที่ 17



ภาพที่ 16 แสดง ตาราง counting chamber (กรอบสีแดงคือบริเวณที่นับเซลล์)

6. นำเข้าสู่สูตร

$$\text{จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้} \times \text{Dilution factor}}{\text{จำนวนช่องที่ใช้นับ} \times \text{ปริมาตรของ Chamber}}$$

โดยปริมาตรของ Chamber = $1 \times 1 \times 0.1 = 10^{-4}$ ลูกบาศก์เซนติเมตร

Dilution factor = 10

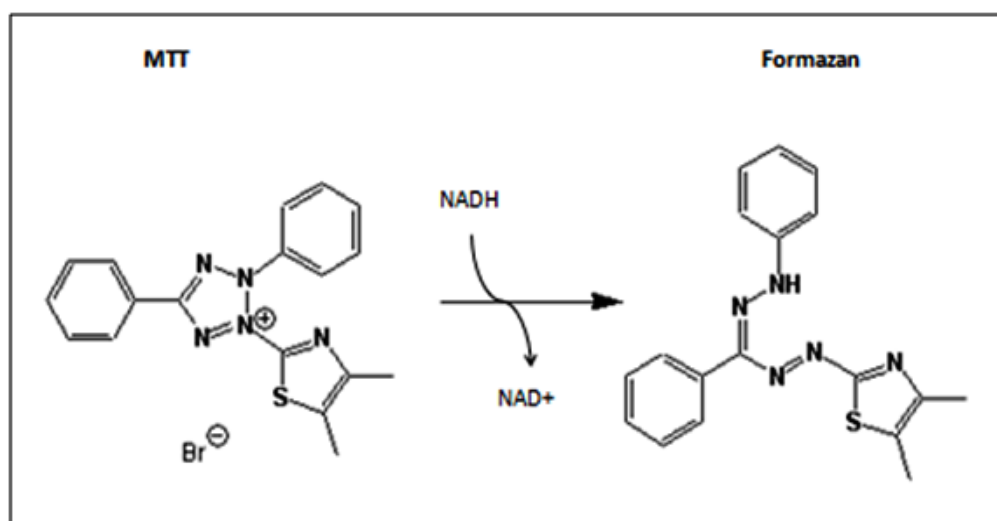
3.4 การทดลองที่ใช้ในการวิจัยหาฤทธิ์ของสารสกัดพลูควา

3.4.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด (Cytotoxicity test)

3.4.1.1 การหาความเป็นพิษของ DMSO ที่ใช้ในการละลายสารสกัดหยาบพลูควา ด้วยวิธี MTT assay

ก่อนทำการทดลองหาฤทธิ์ของสารสกัดพลูควา ต้องมีการละลายสารสกัดพลูควาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ DMSO ซึ่ง DMSO เป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการตาย ดังนั้น ต้องหาความเข้มข้นของ DMSO ที่ใช้ละลายสารสกัด จนความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดมี DMSO อยู่ไม่เกินความเข้มข้นของ DMSO ที่เป็นพิษกับเซลล์ที่ใช้ทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี MTT assay

MTT assay เป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจหา cell viability, proliferation และ cytotoxicity โดยใช้ความสามารถของ enzyme succinate dehydrogenase ที่พบอยู่ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต ในการเปลี่ยน tetrazolium salt (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium salt bromide) ดังแสดงในรูปภาพที่ 2 ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีเหลือง ให้เป็น Formazan ซึ่งมีลักษณะเป็นตะกอนสีม่วง ละลายตะกอนสีม่วงด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น DMSO แล้ววัด O.D. ที่ 550 nm โดย spectrophotometer. Formazan ที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ cell ที่ยังมีชีวิต ดังนั้น cell ที่มีชีวิตมากจะเกิด formazan มาก O.D. ที่วัดได้ก็จะสูง



ภาพที่ 17 แสดง Reaction of MTT assay

(http://2010.igem.org/Image:Freiburg10_MTT_reaction.png).

วิธีการทำการทดลอง

1. Seed cell จำนวน 5,000 cell per well ปริมาตร 135 μ L ลงใน 96 wells- plate และ incubate ไว้ 24 ชั่วโมง
 2. เตรียม DMSO ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายใน 96 well plate เป็น 0.1%, 0.05%, 0.025%, 0.0125%, 0.1% โดย dilute ด้วย culture media
- ตัวอย่างเช่น ต้องการ treat เซลล์ด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายใน well เป็น 0.1%

$$\text{เข้าสู่สูตร } C_1V_1 = C_2V_2$$

หา $C_1 = ?$, $V_1 = 15 \mu\text{L}$ (ปริมาตรที่จะดูดมาจากหลอด Working DMSO), $C_2 = 0.1\%$ (ความเข้มข้น DMSO สุดท้ายที่ต้องการใน well), $V_2 = 150 \mu\text{L}$ (ปริมาตรทั้งหมดใน well ที่ใช้ในการทดลอง) **ดังนั้น** $C_1 = 1\%$ ต้องเตรียมความเข้มข้น DMSO ในหลอด working DMSO ให้มีความเข้มข้น 1% ใส่ลงใน 96 well plate ที่มี solution อยู่ทั้งหมด 150 μL

หา V_1 จะต้องดูด DMSO ความเข้มข้น 100% มาเท่าไร เพื่อที่จะเตรียมเป็นหลอด Working DMSO ความเข้มข้น 1% แล้วใส่ลงใน 96 well plate จะมีความเข้มข้นสุดท้ายกลายเป็น 0.1% โดยจะเตรียมปริมาตรไว้ 1,000 μL ของหลอด Working DMSO

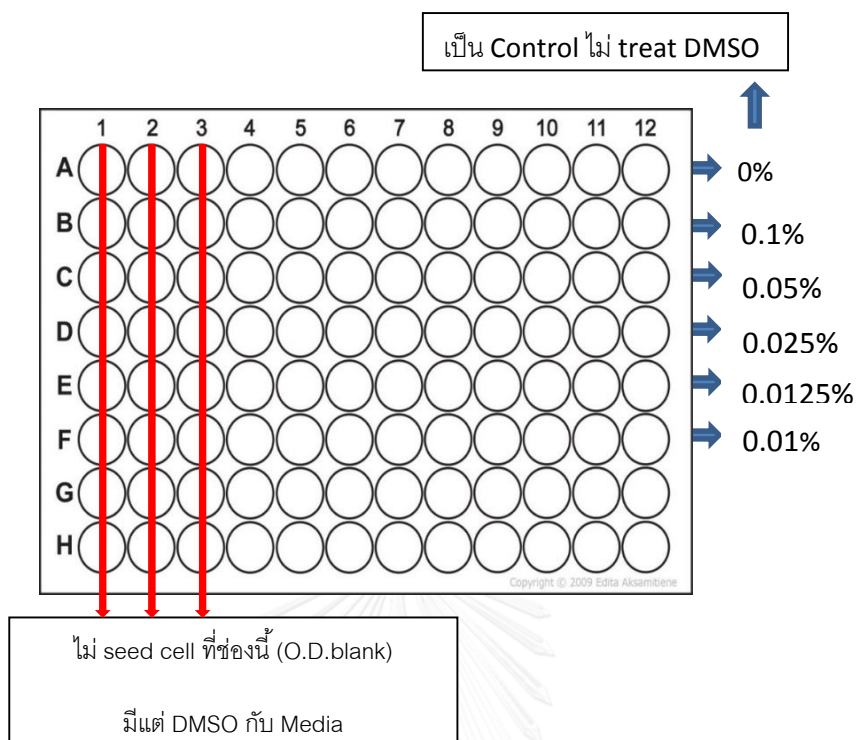
$$\text{เข้าสู่สูตร } C_1V_1 = C_2V_2$$

หา $V_1 = ?$, $C_1 = 1\%$ (ความเข้มข้นในหลอด working DMSO ที่คำนวณได้จากข้างต้น), $C_2 = 0.1\%$ (ความเข้มข้น DMSO สุดท้ายที่ต้องการใน well), $V_2 = 1000 \mu\text{L}$ (ปริมาตรที่ต้องการเตรียม)

ดังนั้น $V_1 = 10 \mu\text{L}$

ดังนั้นดูด DMSO จากขวด DMSO ความเข้มข้น 100% มา 10 μL แล้วใส่ culture media ไป 990 μL จะได้ working DMSO เมื่อดูดลง 96 well plate 15 μL ก็จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ใน 96 well plate เป็น 0.1%

3. ใส่ DMSO ในช่อง A, B, C, D, E, F เรียงตามลำดับความเข้มข้นคือ 0.1%, 0.05%, 0.025%, 0.0125%, 0.1% ตามลำดับ จำนวน 15 μL โดยแถว A ตามแนวนอนจะไม่ใส่สารสกัดพลาสมา ใส่เป็น culture media แทน (เพื่อเป็น negative control) และสาม column แรกจะไม่ seeded cells เพื่อให้เป็น Blank จากนั้น incubate ไว้ 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 18



ภาพที่ 18 แสดง 96 wells-plate และตัวอย่างการเติมสารสำหรับ MTT assay

4. ใส่ MTT reagent จำนวน 15 μL ลงไปทุกหลุม แล้ว incubate ในที่มืด (ในตู้ Carbondioxide incubator) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
5. ดูดส่วนใสทิ้งให้หมด ระวังดูดตะกอน formazan ติดไปด้วย
6. เติม DMSO ลงไปหลุมละ 150 μL และ mix ขึ้นลงให้ตะกอนละลาย
7. บั่น plate ที่ 2000 rpm 10 minutes
8. ดูดใส่ plate ใหม่ แล้ววัด O.D. ที่ 550 nm

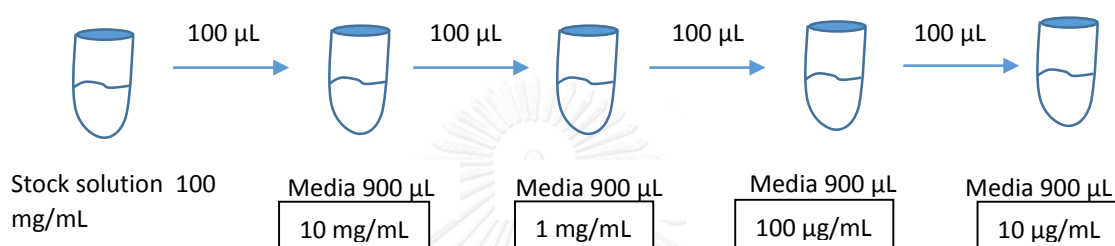
จากการทดลองนี้พบว่า ความเข้มข้นของ DMSO ที่ 0.01% ไม่ทำให้เซลล์ SiHa ตายอย่างมีนัยสำคัญ จึงละลายสารสกัดหยาบด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในการทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดไม่เกิน 0.01%

3.4.1.2 การหาความเป็นพิษของสารสกัดพลูควาในการทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกตายด้วยวิธี MTT assay

วิธีทำการทดลองเหมือนข้อ 3.4.1 การหาความเข้มข้นของ DMSO เพื่อใช้ในการละลายสารสกัด พลูควา ด้วยวิธี MTT assay แต่ขั้นตอนที่ 3 การ treat สารเปลี่ยนจาก DMSO เป็นสารสกัด พลูควาที่ละลายให้ความเข้มข้นสุดท้ายใน 96 well plate เป็น 0, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 $\mu\text{g/mL}$

ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นสารสกัดใน 96 well plate ให้เป็น 2 $\mu\text{g/mL}$

ทำ Serial dilution จาก Stock solution ที่เตรียมไว้ข้างต้น



เข้าสู่สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ หา C_1 คือต้องเตรียมสารสกัดความเข้มข้นเท่าไรให้ลงใน 96 well plate ละ ความเข้มข้นจะกลายเป็น 2 $\mu\text{g/mL}$ โดยจะใช้ V_1 คือ ปริมาตรที่ใช้ในการ treat cell กำหนดเป็น 15 μL , $C_2 = 2 \mu\text{g/mL}$ (ความเข้มข้นสารสกัดสุดท้ายที่ต้องการใน well), V_2 คือปริมาตรรวมสุดท้ายใน 96 well plate กำหนดเป็น 150 μL

$$C_1 \times 15 = 2 \times 150$$

$$C_1 = 20 \mu\text{g/mL}$$

ดังนั้นต้องเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นก่อนลงใน 96 well plate เป็น 20 $\mu\text{g/mL}$ (Working extract)

เข้าสู่สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ อีกรอบ เพื่อหา $V_1 = ?$ (ปริมาตรที่ดูมาเพื่อใช้ในการเตรียมหลอด working extract ให้ความเข้มข้นเป็น 20 $\mu\text{g/mL}$ ที่คำนวณได้ข้างต้น จากหลอด Stock solution ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ ที่เตรียมโดย serial dilution ข้างต้น), $C_1 = 100 \mu\text{g/mL}$ (ความเข้มข้นจากหลอด stock solution ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$), $C_2 = 20 \mu\text{g/mL}$ (ความเข้มข้นในหลอด working extract)

$$100 \times V_1 = 20 \times 200$$

$$V_1 = 40$$

ดังนั้นจึงนำ จากหลอด Stock solution 100 µg/mL มา 40 µL ใส่ลงในหลอดที่มี media 160 µL ก็จะได้ working extract เมื่อเติมลงใน 96 well plate จำนวน 15 µL จะทำให้มีความเข้มข้นของสารสกัดสุดท้ายที่ treat เซลล์ใน 96 well plate เท่ากับ 2 µg/mL

เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของ DMSO เมื่อ treat เซลล์ที่ความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้น ซึ่งคำนวณดังนี้

เข้าสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$0.1\% \times 40 = C_2 \times 200$$

$$C_2 = 0.02\%$$

$$0.02\% \times 15 = C_2 \times 150$$

$$C_2 = 0.002\%$$

ดังนั้นจึงมีความเข้มข้น DMSO 0.002% เมื่อ treat ด้วยสารสกัด ความเข้มข้นสุดท้ายใน 96 well plate 2 µg/mL

3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง (Wound healing assay)

เป็นการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ใน in vitro ซึ่งเลียนแบบกระบวนการ wound healing ตามธรรมชาติ ถ่ายภาพขณะเริ่มต้น และขณะที่เกิด cell migration เพื่อปิดบาดแผล เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่าง cell matrix และ cell-cell interaction ในระหว่างการเกิด cell migration เพื่อปิดบาดแผล [34, 35] ซึ่งมีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

วิธีทำการทดลอง

1. Seeded SiHa cell line ใน six wells plate ที่ concentration 100,000 cells/cm² จำนวน 1,500 µL และ incubate ใน CO₂ incubator จนกระทั่งเซลล์มี confluence 80% โดยเปลี่ยน media ทุกๆสามวัน
2. ใช้ Tip เหลือง (200µL) ชูด cell monolayer ให้เป็นรอยยาว เพื่อสร้างบาดแผล
3. ล้างเซลล์ด้วย 1% PBS และ treat เซลล์ด้วยสารสกัดพลูควาในส่วนตัวทำละลาย PE, DC และ ET จำนวน 500 µL ให้ concentration สุดท้ายใน 6 well plate เป็น 1 µg/mL และ 10 µg/mL สำหรับสารสกัดในส่วนตัวทำละลาย PE และ 0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL สำหรับตัวทำละลาย DC และ ET โดยหลักการคิดการเตรียมความเข้มข้นสำหรับ treat สารสกัดเช่นเดียวกับ MTT ที่อธิบาย

ไว้ข้างต้น (ใช้ noncytotoxic dose ซึ่งได้จาก MTT assay) โดย control เป็นหลุมที่ไม่เติม extract เติมแค่ media

4. วัด distance เริ่มต้นที่เวลา 0 hour, 24 hours และ 48 hours โดยใช้ stage micrometer และโปรแกรมโฟโตซอฟ

5. คำนวณ % Migration rate จาก

$$\frac{\text{Average distance between scratch (day 1 or 2)} - \text{Average distance between scratch (day 0)}}{\text{Average distance between scratch (day 0)}}$$

- ซึ่งหมายความว่า ถ้า % Migration rate ยิ่งสูงแปลว่า อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งมาก ความสามารถของสารสกัดการยับยั้งการ migration ยิ่งน้อย ดังนั้นค่าที่ต่ำยิ่งดี

3.4.3 การทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดพลาสมาต่อการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งด้วยการวัดระดับเอนไซม์ Human Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)

Matrix metalloproteinase

Cancer cells จะถูกล้อมรอบด้วย Extracellular matrix (ECM) ซึ่งประกอบด้วย proteoglycans และ non-proteoglycanic matrix components (collagen, laminin, fibronectin และ elastin.) การที่ cancer cells จะลุกล้ำ (invasion) หรือแพร่กระจาย (metastasis) ได้จะต้องย่อย Extracellular matrix ซึ่งมี proteinase 4 กลุ่มที่รู้จักว่ามีความสามารถย่อยได้ คือ

1. Serine proteinases เช่น trypsin, plasmin, kallikrein.
2. Aspartic proteases.
3. Cystein proteinases.
4. Matrix metalloproteinases (MMPs) หรือ Matrixins. [36]

จากการศึกษาพบว่าโดยทั่วไป cancer cells ใช้ MMPs ในการ invasion และ metastasis โดยเมื่อเทียบกับ normal cell พบว่า cancer cell จะมี expression และ activation ของ MMPs เพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันพบว่าในมนุษย์มี MMPs 23 ชนิด แบ่งตามความสามารถในการย่อย

substrate, การเรียงลำดับของ peptide domain และความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ออกเป็น

6 กลุ่ม คือ

1. Collagenases.
2. Gelatinases.
3. Stromelysins
4. Matrilysins.
5. Membrane-type MMPs
6. Others



Matrix metalloproteinases and their domain composition

| Enzyme | MMP | Chromosomal location (human) | Domain composition | | | | | | | | | | | | | |
|---|--------|------------------------------|--------------------|-----|----|----------|-----|-----|------|-----|------|----|-----|-----|---------|---|
| | | | SS | Pro | CS | RX[R/K]R | Cat | FN2 | Lk 1 | Hpx | Lk 2 | TM | GPI | Cyt | CysR-Ig | |
| Collagenases | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Interstitial collagenase; Collagenase 1 | MMP-1 | 11q22-q23 | + | + | + | - | + | - | ++ | | | | | | | |
| Neutrophil collagenase; Collagenase 2 | MMP-8 | 11q21-q22 | + | + | + | - | + | - | ++ | | | | | | | |
| Collagenase 3 | MMP-13 | 11q22.3 | + | + | + | - | + | - | ++ | | | | | | | |
| Collagenase 4 (Xenopus) | MMP-18 | Not found in humans | + | + | + | - | + | - | ++ | | | | | | | |
| Gelatinases | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gelatinase A | MMP-2 | 16q13 | + | + | + | - | ++ | | + | + | | | | | | |
| Gelatinase B | MMP-9 | 20q11.2-q13.1 | + | + | + | - | ++ | | + | + | | | | | | |
| Stromelysins | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stromelysin 1 | MMP-3 | 11q23 | + | + | + | - | + | - | ++ | | | | | | | |
| Stromelysin 2 | MMP-10 | 11q22.3-q23 | + | + | + | - | + | - | ++ | | | | | | | |
| Matrilysins | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Matrilysin 1 | MMP-7 | 11q21-q22 | + | + | + | - | + | - | - | - | | | | | | |
| Matrilysin 2 | MMP-26 | 11p15 | + | + | + | - | + | - | - | - | | | | | | |
| Stromelysin 3 | MMP-11 | 22q11.2 | (+) | (+) | + | + | + | - | ++ | | | | | | | |
| Membrane-type MMPs | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (A) Transmembrane type | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MT1-MMP | MMP-14 | 14q11-q12 | + | + | + | + | + | - | ++ | | ++ | | - | + | | |
| MT2-MMP | MMP-15 | 15q13-q21 | + | + | + | + | + | - | ++ | | ++ | | - | + | | |
| MT3-MMP | MMP-16 | 8q21 | + | + | + | + | + | - | ++ | | ++ | | - | + | | |
| MT5-MMP | MMP-24 | 20q11.2 | + | + | + | + | + | - | ++ | | ++ | | - | + | | |
| (B) GPI-anchored | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MT4-MMP | MMP-17 | 12q24.3 | + | + | + | + | + | - | ++ | | + | | - | + | - | |
| MT6-MMP | MMP-25 | 16p13.3 | + | + | + | + | + | - | ++ | | + | | - | + | - | |
| Others | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Macrophage elastase | MMP-12 | 11q22.2-q22.3 | + | + | + | - | + | - | ++ | | | | | | | |
| - | MMP-19 | 12q14 | + | + | + | - | + | - | ++ | | | | | | | |
| Enamelysin | MMP-20 | 11q22.3 | + | + | + | - | + | - | ++ | | | | | | | |
| - | MMP-21 | | + | + | + | + | + | - | ++ | | | | | | | |
| CA-MMP | MMP-23 | 1p36.3 | + | + | - | ++ | | | - | - | - | - | - | - | - | + |
| - | MMP-27 | 11q24 | + | + | + | - | + | - | ++ | | | | | | | |
| Epilysin | MMP-28 | 17q21.1 | + | + | + | + | + | - | ++ | | | | | | | |

Groups of MMPs are listed with their trivial names and chromosomal location. SS, signal peptide; Pro, pro-domain; CS, cysteine switch motif; RX[R/K]R, proprotein convertase recognition sequence; FN2, fibronectin type II motif; LK, linker; TM, transmembrane domain; GPI, glycosylphosphatidylinositol anchoring sequence; Cyt, cytoplasmic domain; CysR-Ig, cysteine-rich and Ig domain.

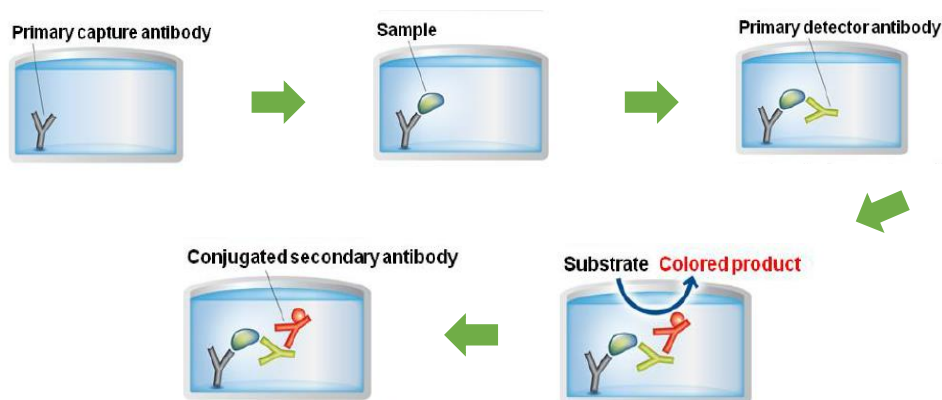
ภาพที่ 19 แสดง การจัดกลุ่มของเอนไซม์ MMP ตามตำแหน่งของยีนบนโครโมโซม และ Domain composition [37]

MMPs ส่วนใหญ่จะถูกสังเคราะห์ออกมาอยู่ในรูป inactive form (ยกเว้น membrane type MMPs จะถูกสังเคราะห์ออกมาในรูป active form) โดยกรดอะมิโน cysteine ในส่วน propeptide domain จะจับกับ Zinc ion (Cys-Zn²⁺) ทำให้อยู่ในรูป inactive form หรือ zymogen ซึ่งต้องมีการทำลายพันธะจึงจะอยู่ในรูป active form ได้ โดยใช้ Chaotropic agents หรือ protease ตัวอื่น ๆ ในการกระตุ้น สำหรับ endogenous inhibitor ของ MMPs ได้แก่ α_2 -macroglobulin และ Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) โดย α_2 -macroglobulin เป็น plasma protein หนัก 725 kDa จะจับ MMPs ไว้ภายในโมเลกุล และถูกกำจัดโดยกระบวนการ endocytosis ส่วน TIMPs จะจับกับบริเวณ active site ของเอนไซม์ทำให้ไม่สามารถทำงานได้

จากการศึกษาพบว่ามะเร็งหลายชนิดมีการ expression ของ MMP-2, MMP-9 ที่สูง และเกี่ยวข้องกับมีนัยสำคัญกับการดำเนินไปของโรคมะเร็ง [38] สำหรับรอยโรคระดับสูงก่อนที่จะพัฒนาเป็นมะเร็งปากมดลูก (human cervical high- grade lesions) และมะเร็งปากมดลูก พบว่ามีการ expression ของ MMP-2 ในอัตราที่สูงและยังสอดคล้องกับการดำเนินไปของโรคมะเร็งปากมดลูกอีกด้วย [39, 40] อีกทั้งในเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa ที่ใช้ในการศึกษา มีงานวิจัยพบว่ามี การ expression ของ MMP-2 ทั้งในระดับ mRNA และระดับ protein ที่สูง [36] จึงนำ MMP-2 มาเป็นตัวแทนของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพลาสมาในการยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ MMP ของ SiHa cells ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ชุดทดสอบ Human MMP-2 ELISA Kit ของบริษัท Abcam โดยใช้หลักการของ ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) โดยมีขั้นตอนสรุปดังนี้

1. ใช้ 96 well plate ที่มี antibody ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ MMP-2 เคลือบอยู่ที่ก้น plate ซึ่งมีในชุดทดสอบ
2. ปิเปต sample ลงไปใน 96 well plate ถ้าใน sample มีเอนไซม์ MMP-2 อยู่ MMP-2 ก็จะไปจับกับ antibody ที่เคลือบไว้
3. Wash ด้วย 1x Wash solution และเติม Biotynylated anti-Human MMP-2 antibody ซึ่งจะจับจำเพาะกับ MMP-2
4. Wash และเติม HRP-conjugated streptavidin
5. Wash อีกครั้ง
6. เติม TMB ซึ่งเป็น substrate ที่จำเพาะกับ HRP จากนั้น HRP จะย่อย TMB เกิดสีขึ้น

7. วัด O.D. ที่ 450 nm สีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ MMP2 ที่มีในตัวอย่าง



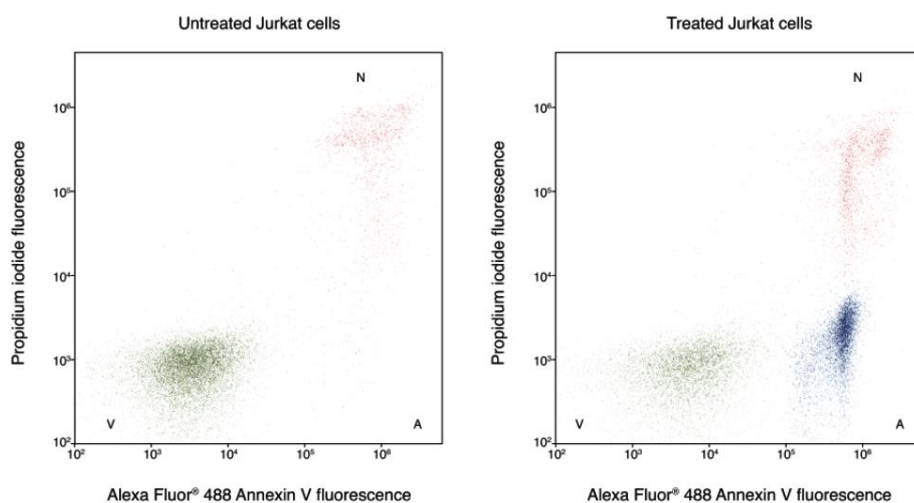
ภาพที่ 20 แสดง ขั้นตอนปฏิกิริยา Human MMP2 ELISA Kit (Abcam)

3.4.4 การทดสอบรูปแบบการชักนำให้เกิดการตายของสารสกัด (Apoptosis detection by flow cytometry)

โดยใช้ชุด kit ของ Invitrogen ที่ชื่อว่า Alexa Fluor 488 annexin V/ Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa Fluor 488 annexin V and PI for flow cytometry

หลักการ

Phosphatidyl serine (PS) เป็น aminophospholipid ซึ่งปกติพบด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ แต่เมื่อเกิด apoptosis. Phosphatidyl serine จะออกมาอยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ จึงอาศัยคุณสมบัตินี้ในการตรวจสอบเซลล์เมื่อเกิด apoptosis โดยในชุด kit นี้จะใช้ Annexin V ซึ่งเป็น Ca^{2+} dependent phospholipid binding protein [41] ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ Alexa Fluor 488 โดย Annexin V มีความสามารถในการจับกับ PS สูง นอกจาก apoptosis จะทำให้ PS ออกมาอยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์แล้ว necrosis ก็สามารถเกิดเช่นกัน จึงมีการใช้สีที่สอง คือ Propidium iodide (PI) ซึ่งเป็นสารประกอบเคมีฟลูออเรสเซนต์ที่มีความสามารถในการจับกับ Nucleic acid โดย PI ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่เกิด early apoptosis ได้ จึงใช้เป็นตัวแยกระหว่าง early apoptotic cells กับ necrotic cells ได้ [42]



ภาพที่ 21 แสดง ผล flow cytometry

ที่ผ่านการ stain ด้วยชุด kit Alexa Fluor 488 annexin V (Invitrogen) บริเวณ V คือ Viable cells, A คือ Apoptotic cells, N คือ Necrotic cells + late apoptosis cells (A) Jurkat cells ที่ไม่ผ่านการ treat ด้วยสาร (B) Jurkat cell ที่ผ่านการ treat ด้วย 10 μ M camptothecin 4 ชั่วโมง (<https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp13241.pdf>)

วิธีทำการทดลอง

ขั้นตอนเตรียมเซลล์สำหรับทดสอบ flow cytometry

1. Seed cell ที่ density 100,000 cells per well ลง 6 wells plate ปริมาตร 1,500 μ L
2. Incubate ที่ 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 72 ชั่วโมง (3 วัน)
3. Treat ด้วยสารสกัดพลูคาว (HCT) ในส่วนตัวทำละลาย Dichloromethane (DC) และตัวทำละลาย Ethanol (ET) โดยกำหนดความเข้มข้นดังนี้

- HCT-DC ให้ความเข้มข้นสุดท้ายใน 6 well plate เป็น 1, 4, 10 μ g/mL ใช้ ปริมาตรที่ treat cells 500 μ L
- HCT-ET ให้ความเข้มข้นสุดท้ายใน 6 well plate เป็น 4, 10 μ g/mL ใช้ ปริมาตรที่ treat cells 500 μ L

(วิธีการคำนวณความเข้มข้นสำหรับการ treat สารสกัดมีหลักการเช่นเดียวกับ MTT assay ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น)

และทำ Negative control โดยไม่เติมสารสกัดพลาสมา แต่เติม culture media ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ลงไป 500 μL

ทำ Positive control โดยใช้ H_2O_2 ความเข้มข้นเมื่อลง well แล้วเป็น 0.05% โดยใช้ปริมาตร 500 μL เช่นกัน

4. จากนั้น incubate ต่อที่ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปทำขั้นตอนการเตรียมสำหรับทำ flow cytometry ต่อไป

ขั้นตอนการเตรียมสำหรับทดสอบ flow cytometry โดยชุด kit

1. Trypsinization เหมือน pass cell ตามปกติ
2. Wash ด้วย Cold 1x PBS
3. เตรียม 1X annexin binding buffer
โดยเติม 5x annexin binding buffer (component C) ลงใน Deionized water 4 mL
4. เตรียม 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ working PI solution
โดยเติม 1 mg/mL PI stock solution (component B) 5 μL ลงใน 1x annexin binding buffer 45 μL ที่เตรียมไว้ข้างต้น
5. ทิ้ง supernatant ที่ได้จากข้อ 1. และเติม 1x annexin binding buffer ลงไป resuspend จำนวน 100 μL
6. เติม Alexa Fluor 488 annexin V (component A) ลงไป 5 μL และเติม 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI working solution ที่เตรียมจากข้อ 3 ลงไป 1 μL
7. Incubate ที่ room temp 15 นาที
8. เติม 1x annexin binding buffer ลงไป 400 μL
9. Mix เบาๆ และวางบนน้ำแข็งทันที
10. Measure fluorescence ที่ 530 nm และ 575 nm โดยใช้ excitation ที่ 488 nm โดยเครื่อง flow cytometer

3.4.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพลูควาต่อการตายด้วยวิธี Lysosomal degradation ด้วย Acridine orange

Acridine orange เป็นสีฟลูออเรสเซนต์ที่มีประจุบวก สามารถซึมผ่านเซลล์เมมเบรน เข้าไปจับกับ DNA ได้ โดยเมื่อจับกับ DNA จะให้แสงสีเขียว เมื่อกระตุ้นด้วยแสงสีน้ำเงิน (ความยาวคลื่น 440-470 nm) นอกจากนี้เมื่อเข้าสู่ organelle ที่มี pH เป็นกรด เช่น lysosome, endosome จะถูก protonate เกิดการเรืองแสงสีแดง เมื่อกระตุ้นด้วยแสงสีน้ำเงิน [43, 44] จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการ screening การเกิด autophagy โดยใช้ย้อม autophagolysosome ซึ่งมี pH เป็นกรด โดยจะเกิดขึ้นเมื่อเกิดกระบวนการ autophagy เท่านั้น

วิธีทำการทดลอง

1. Seed cells ที่ความเข้มข้น 100,000 cells ต่อ 1 well ใน 6-wells plate โดยใส่ cover slip ลงใน well. Well ละหนึ่งอันก่อน seed ปริมาตร 1,500 μ L
2. Incubate 3 วันที่ 5% CO₂ , 37 °C
3. วันที่ 4 treat สารสกัดพลูควาในส่วนตัวทำละลาย absolute ethanol (HCT-ET) และ dichloromethane (HCT-DC) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นดังนี้

- HCT -ET กำหนดความเข้มข้นสุดท้ายใน 6 well plate เป็น 4 μ g/mL และ 10 μ g/mL treat สารสกัดด้วยปริมาตร 500 μ L
- HCT-DC กำหนดความเข้มข้นสุดท้ายใน 6 well plate เป็น 1 μ g/mL และ 10 μ g/mL treat สารสกัดด้วยปริมาตร 500 μ L

(วิธีการคำนวณความเข้มข้นสำหรับการ treat สารสกัดมีหลักการเช่นเดียวกับ MTT assay ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น)

และทำ Negative control โดยไม่เติมสารสกัดพลูควา แต่เติม culture media ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ลงไป 500 μ L

4. วันที่ 5 Acridine orange staining โดยมีขั้นตอนดังนี้
 - 4.1 ดูด media (ซึ่งประกอบด้วย culture media และ crude extract) ออก 500 uL
 - 4.2 ใส่ Acridine orange ที่เตรียมไว้ให้ความเข้มข้นเมื่อลง 6 well plate เป็น 3 μ g/mL ลงไป 500 uL
 - 4.3 Incubate 15 นาที ที่ 5% CO₂ , 37 °C
 - 4.4 ล้างด้วย 1xPBS เอา cover slip ออกมาแล้ววางบนแผ่นสไลด์

4.5 ทาขอบ cover slip ด้วยน้ำยาทาเล็บ แล้วรีบส่องกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ทันที

3.4.6 การทดสอบยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดพลูควาในการชักนำให้เกิดการตายแบบ autophagy ด้วยวิธี Western blot analysis

Western blot เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เริ่มต้นในปี ค.ศ. 1979 ในการตรวจวิเคราะห์หาโปรตีนเป้าหมายจากสิ่งส่งตรวจที่มีโปรตีนหลายชนิดรวมกันอยู่ ซึ่งใช้ทั้งงานด้านวิจัยและงานด้านคลินิก เช่น การตรวจ HIV, Lyme disease, Hepatitis B เป็นต้น โดยวิธีการนี้ประกอบด้วย ขั้นตอนการสกัดโปรตีน, วัดปริมาณโปรตีน, การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่เรียกว่า อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis), การเคลื่อนย้ายโปรตีนไปยังแผ่นเมมเบรน (Electroblotting), การป้องกันการเกิด non-specific binding และการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะในการตรวจจับโปรตีนเป้าหมาย [45, 46] ซึ่งโปรตีนเป้าหมายที่เราจะตรวจสอบครั้งนี้คือ LC3BII โดยโปรตีนชนิดนี้จะเกิดขึ้นเมื่อเกิดกระบวนการ Autophagy เท่านั้น [47]

3.4.6.1 การสกัดโปรตีน

ก่อนการสกัดโปรตีนให้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่จะทดสอบดังนี้

1. Seed cell ที่ความเข้มข้น 1×10^5 cell/well ลงใน 6-well plate จำนวน 3 plate และ incubate ที่ 37°C $5\% \text{CO}_2$ จนกระทั่งมี confluency ประมาณ 70% โดยทำการเปลี่ยน culture media ทุก 2 วัน
2. Treat สารสกัดพลูควาในส่วนตัวทำละลาย DC และ ET ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายใน 6 well plate เท่ากับ $10 \mu\text{g/mL}$ ปริมาตร $500 \mu\text{L}$ นาน 24 ชั่วโมง (ใช้ 1 plate ต่อ 1 ความเข้มข้นสารสกัด) และทำ Negative Control โดยใส่ media แทนสารสกัด

วิธีการทดลองการสกัดโปรตีน

เตรียม Nonidet-P 40 lysis buffer ซึ่งประกอบด้วย

150 mM NaCl , $50 \text{ mM Tris pH } 8.0$, $1\% \text{ NP-40}$ และน้ำกลั่น ผสมกับ $1 \text{ mM Dithiothreitol (DTT)}$ $30 \mu\text{L}$ และ $\text{PMSF } 30 \mu\text{L}$ (ผสมกับ DTT และ PMSF ก่อนใช้เท่านั้น) แช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ $2-8^\circ\text{C}$

1. ล้าง 6-well plate ด้วย cold PBS สองรอบ
2. เติม cold lysis buffer ที่เตรียมไว้ข้างต้น $100 \mu\text{L}$ ต่อ well และขูดเซลล์ด้วย scraper (ล้าง scraper โดยจุ่มลงใน $70\% \text{ alcohol}$ และ PBS ก่อนใช้ทุกครั้ง)
3. คูต solution ทั้งหมดที่ได้จากการขูดข้างต้นลงใน microcentrifuge tube
4. เขย่าโดยใช้ orbital shaker 30 นาที ที่ 4°C

5. Centrifuge 20 นาที 12,000 rpm ที่ 4 °C
6. นำ microcentrifuge tube ออกจากเครื่องและวางลงบนน้ำแข็งทันที
7. ดูด supernatant ใส่ลงใน microcentrifuge tube อันใหม่
8. เก็บที่ -20 °C

3.4.6.2 การวัดปริมาณโปรตีนที่สกัดได้

วัดปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธี Bradford

วิธีทำการทดลอง

1. ปิเปิดโปรตีนที่สกัดไว้ ปริมาตร 2 μL + D.W. 98 μL ลงใน microcentrifuge tube แล้ว mix
2. ปิเปิด Bradford reagent 1,000 μL ลง microcentrifuge tube ในข้อ 1 และ mix
3. Incubate ที่ room temp. 10 นาที
4. ดูด solution จาก microcentrifuge tube มา 150 μL ใส่ลงใน 96 well plate
5. วัด O.D. ที่ 595 nm ด้วย ELISA reader

หมายเหตุ : - Standard protein ใช้ Bovine serum albumin (BSA) ผสมกับน้ำกลั่นให้ความเข้มข้นเป็น 10 mg/mL, 1,000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62.5 $\mu\text{g/mL}$, 31.25 $\mu\text{g/mL}$, 15.63 $\mu\text{g/mL}$, 7.81 $\mu\text{g/mL}$, 3.91 $\mu\text{g/mL}$, 1.95 $\mu\text{g/mL}$

- วิธีทดลองสำหรับ standard ทำเหมือน sample แต่ standard ใช้ปริมาตร 1,000 μL กับน้ำยา Bradford 1,000 μL

- หลังคำนวณความเข้มข้นโปรตีนแล้ว ให้คูณด้วย 50 (dilution factor) เพราะใช้

Sample 2 μL + D.W. 98 μL (1:49 = dilution factor 50)

3.4.6.3 การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis)

การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าต้องมีการใช้เจลที่เรียกว่า SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ซึ่งมีคุณสมบัติในการ denature โปรตีน และทำให้โปรตีนมีประจุเท่ากัน ดังนั้นการแยกโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับมวลโมเลกุล (molecular weight) อย่างเดียว ซึ่งมีวิธีการเตรียมเจلدังนี้

เตรียม 5% stacking gel โดยใช้

| | | |
|-----------------------|------|----|
| - H ₂ O | 2.1 | mL |
| - 30% acrylamide mix | 0.5 | mL |
| - 1.0 M Tris (pH 6.8) | 0.38 | mL |
| - 10% SDS | 0.03 | mL |

| | | |
|---------------------------|-------|----|
| - 10% ammonium persulfate | 0.03 | mL |
| - TEMED | 0.003 | mL |
| เตรียม 15% separating gel | | |
| - H ₂ O | 2.3 | mL |
| - 30% acrylamide mix | 5.0 | mL |
| - 1.5 M Tris (pH 8.0) | 2.5 | mL |
| - 10% SDS | 0.1 | mL |
| - 10% ammonium persulfate | 0.1 | mL |
| - TEMED | 0.004 | mL |

ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งประมาณ 20 นาที

หมายเหตุ เจลจะแข็ง (เกิด polymerization) เมื่อเติม Ammonium persulfate กับ TEMED จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการโหลดโปรตีนลงเจลโดยนำโปรตีนที่ต้องการทดสอบผสมกับ Laemli (Loading dye) ในอัตราส่วน 1:1 และนำไป Incubate ที่ 95-100 °C นาน 5 นาที mix และโหลดลงสู่เจล โดยตั้งความต่างศักย์ 70 V นาน 20 นาที สำหรับ Stacking gel และตั้งความต่างศักย์ 120 V นาน 85 นาที สำหรับ Separating gel

3.4.6.4 การถ่ายโอนโปรตีนที่แยกได้ไปยังแผ่นเมมเบรน (Immunoblotting)

1. เตรียมแผ่น PVDF membrane โดยแช่ลงใน absolute methanol เพื่อทำให้เกิดขั้วไฟฟ้า นาน 5 นาที
2. นำ PVDF membrane แช่ต่อ ใน Transfer buffer ที่เย็น และลอกแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจกออกมาแช่เช่นเดียวกับ PVDF membrane
3. เตรียมชุด Transfer buffer โดยใส่ในตลับประกบ เรียงตามลำดับดังนี้ ฟองน้ำ, กระดาษกรองสามแผ่น, แผ่นเจลจากการทำอิเล็คโทรโฟเรซิสที่แช่ไว้ใน Transfer buffer, PVDF membrane ที่แช่ไว้ใน transfer buffer, กระดาษกรองสามแผ่น, ฟองน้ำ
4. ใส่ตลับลงในแทงค์ โดยหันด้านขั้วลบของตลับเข้าหาด้านขั้วลบของแทงค์และ ด้านขั้วบวกของตลับเข้าด้านขั้วบวกของแทงค์
5. เติม Transfer buffer ที่เย็นลงในแทงค์ให้ท่วมตลับประกบ
6. ปิดฝาแทงค์ และนำไปวางในภาชนะที่ใส่น้ำแข็ง เพื่อหล่อเย็นตลอดขั้นตอนการทำ
7. ตั้งความต่างศักย์ 120 mA นาน 1 ชั่วโมง
8. ครบเวลานำ PVDF membrane แช่ใน TBST-T

3.4.6.5 การป้องกันการเกิด non-specific binding

ป้องกันการเกิด non-specific binding โดยใช้ Non fat dry milk 5% เตรียมโดยใช้ TBS-T 30 mL ผสมกับ Non fat dry milk 1.5 g. จากนั้น

1. เท TBS-T ที่แช่ PVDF membrane ทิ้ง
2. ใส่ 5% Non fat dry milk ที่เตรียมไว้ข้างต้นลงไปแทน
3. Incubate ที่ room temp. พร้อมทั้งเขย่าเบาๆ 1 ชั่วโมง

3.4.6.6 การตรวจจับโปรตีนเป้าหมายโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ (Immuno assay)

โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ 2 ชนิด ชนิดที่หนึ่ง (primary antibody) คือ แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมาย LC3BI และ LC3BII (LC3B rabbit monoclonal antibody) ชนิดที่สองคือ แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติบอดีเป้าหมายแต่ละตัวจะ conjugated ด้วยเอนไซม์ที่สามารถย่อย substrate เกิดแสงขึ้นได้เป็น chemiluminescence detection ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เมื่อครบเวลา 1 ชั่วโมงในขั้น Blocking ให้ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที พร้อมทั้งเขย่าเบาๆ
 2. เตรียมแอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่ dilution 1:1,000 โดยเจือจางด้วย 0.2% BSA ใน TBS-T
 3. Incubate PVDF membrane ด้วยแอนติบอดีที่เตรียมไว้ overnight ในภาชนะที่ใส่น้ำแข็ง
 4. เมื่อครบเวลาให้เท solution ทิ้งและล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
 5. เตรียมแอนติบอดีตัวที่สอง (Anti Rabbit Ig G HRP-linked antibody) ที่ dilution 1:10,000 โดยเจือจางด้วย 0.2% BSA ใน TBS-T
 6. เมื่อล้างแผ่นเมมเบรนเสร็จให้ใส่แอนติบอดีตัวที่สองที่เตรียมไว้ลงไปและ Incubate 1 ชั่วโมงที่ room temp.
 7. เตรียม Substrate โดยผสม substrate peroxide solution กับ Luminol enhancer A ในอัตราส่วน 1:1 (ทำในที่มืด)
 8. นำ PVDF membrane จุ่มลงใน substrate ที่เตรียมไว้ (ทำในที่มืด) ประมาณ 5 นาทีแล้วนำไปทำขั้นตอนการประกบฟิล์ม
- ขั้นตอนการประกบฟิล์ม ดังนี้
1. ใส่ D.W. ลงในถาด 2 ถาด จำนวน 65 mL
 2. เทน้ำยา Fixer 15 mL ใส่ถาดที่หนึ่ง แล้ว mix ให้เข้ากัน
 3. เทน้ำยา Developer 15 mL ใส่ถาดที่สองแล้ว mix ให้เข้ากัน

4. นำ PVDF membrane ที่ชุบ substrate แล้วมาประกบกับแผ่นฟิล์ม
5. นำแผ่นฟิล์มจุ่มลงในถาดน้ำยา Developer จนกระทั่งเห็น band และทำการล้างด้วย D.W. ประมาณ 1 นาที
6. นำแผ่นฟิล์มจุ่มลงในถาดน้ำยา Fixer และทำการล้างด้วย D.W. ประมาณ 1 นาที
7. ตากแผ่นฟิล์มให้แห้ง

3.4.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า P-value น้อยกว่า 0.05 (ระดับความเชื่อมั่น 95%) โดยใช้สถิติ Student's *t*-tests ซึ่งคำนวณโดยโปรแกรม SPSS และแสดงผลเป็นรูป ตาราง และกราฟ ด้วยโปรแกรม Microsoft office excel

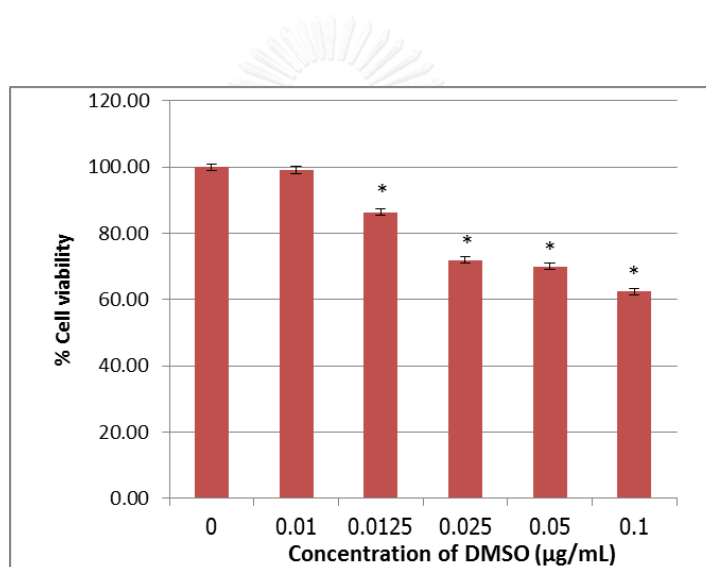


บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด (Cytotoxicity test)

4.1.1 การหาความเป็นพิษของ DMSO ที่ใช้ในการละลายสารสกัดหยาบพลูควา ด้วยวิธี MTT assay

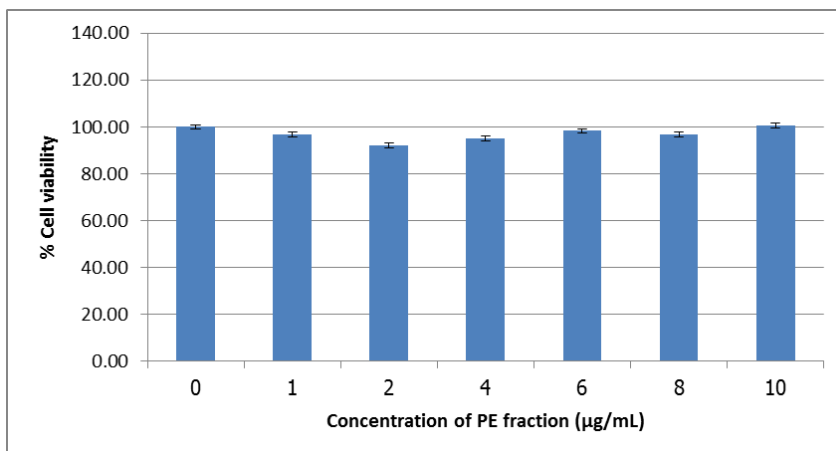
จากการทดลองใช้เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น DMSO 5 ความเข้มข้นคือ 0.01%, 0.0125%, 0.025%, 0.05%, 0.1% treat SiHa cells พบว่าที่ความเข้มข้น DMSO 0.01% มีค่า %Cell viability คือ 99.08 ดังกราฟที่ 1 ซึ่งไม่ทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญจึงละลายสารสกัดหยาบพลูควาโดยให้ความเข้มข้น DMSO ไม่เกิน 0.01% ในการ treat เซลล์ SiHa ในแต่ละการทดลอง



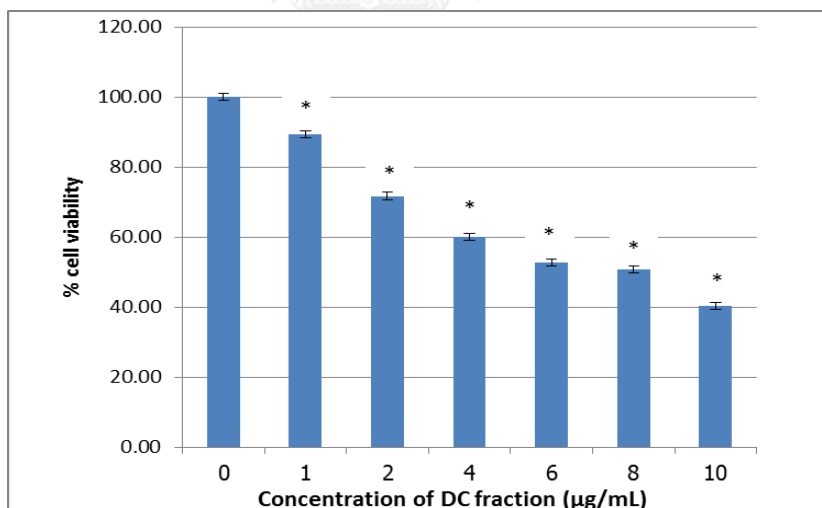
ภาพที่ 22 แสดง cell viability ของ SiHa cells เมื่อ treat ด้วย DMSO 0.01, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เป็นค่าที่ได้จากการทำซ้ำเก้าครั้ง error bar คือค่า S.D.

4.1.2 การทดสอบหาความเป็นพิษของสารสกัดพลูควาด้วยวิธี MTT assay

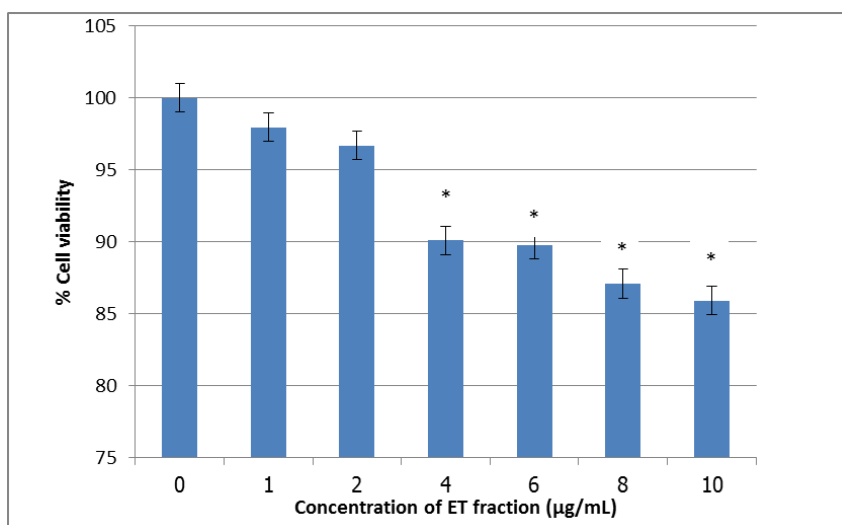
จากการทดสอบด้วยตัวทำละลายสามชนิด คือ Petroleum ether (PE), Dichloromethane (DC) และ Absolute ethanol (ET) ที่ความเข้มข้น 5 ความเข้มข้น คือ 1, 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL พบว่ามีเพียงตัวทำละลาย DC และ ET ที่ทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa ตายอย่างมีนัยสำคัญ ดังภาพที่ 23, 24, 25 และตัวทำละลาย DC มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8 µg/mL



ภาพที่ 23 แสดง Cell viability ของ SiHa cells หลัง treat ด้วยสารสกัดพลูควาในส่วนตัวทำละลาย Petroleum Ether (PE) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เป็นค่าที่ได้จากการทำซ้ำเก้าครั้ง error bar คือค่า S.D.



ภาพที่ 24 แสดง Cell viability ของ SiHa cells หลัง treat ด้วยสารสกัดพลูควาในส่วนตัวทำละลาย Dichloromethane (DC) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เป็นค่าที่ได้จากการทำซ้ำเก้าครั้ง error bar คือค่า S.D.

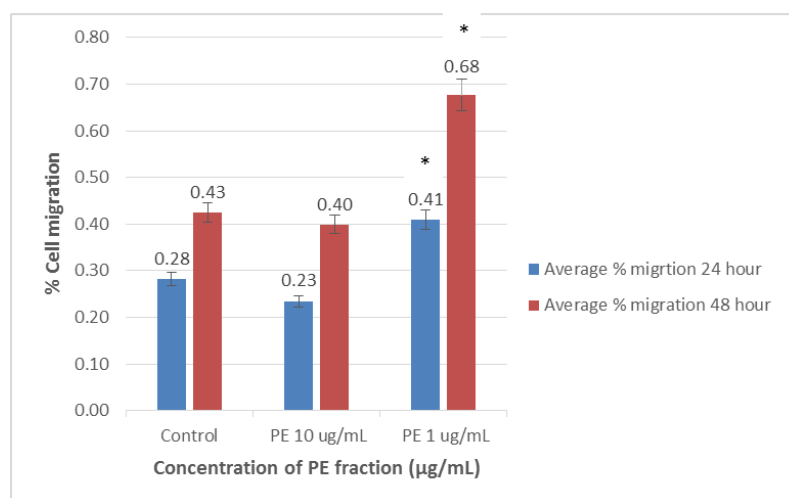


ภาพที่ 25 แสดง Cell viability ของ SiHa cells หลัง treat ด้วยสารสกัดพญาคาวในส่วนตัวทำละลาย Absolute Ethanol (ET) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เป็นค่าที่ได้จากการทำซ้ำเก้าครั้ง error bar คือค่า S.D.

จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากตัวทำละลาย PE แทบไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์เลย สารสกัดจากตัวทำละลาย DC สามารถทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นคือ 1, 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL ซึ่งทำให้เปอร์เซ็นต์ cell viability ลดลงเริ่มต้นที่ 89.45±6.07 เปอร์เซ็นต์ ลงต่ำสุดถึง 50.73±2.08 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจากตัวทำละลาย ET สามารถทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นคือ 4, 6, 8, 10 µg/mL ซึ่งทำให้เปอร์เซ็นต์ cell viability ลดลงเริ่มต้นที่ 97.95±8.32 เปอร์เซ็นต์ ไปยังค่าต่ำสุด 85.95±4.85 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าความสามารถในการชักนำให้เซลล์ตาย สารสกัดหยาบในส่วนตัวทำละลาย DC มีฤทธิ์มากกว่าสารสกัดหยาบในส่วนตัวทำละลาย ET และการตายขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้น (Dose dependent manner)

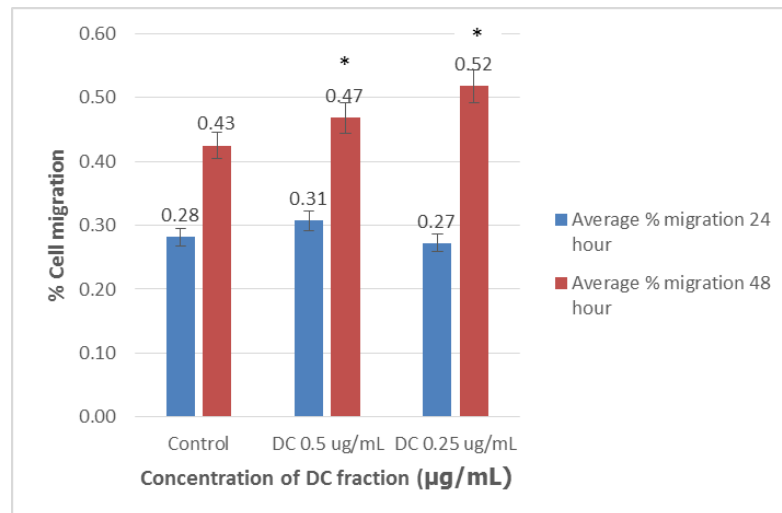
4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง

การทดสอบสารสกัดพลาควาวในส่วนตัวทำละลาย PE พบว่า ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ไม่สามารถยับยั้ง cell migration ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ในทางตรงกันข้ามสามารถเพิ่ม cell migration ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ทั้ง 24 และ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 26

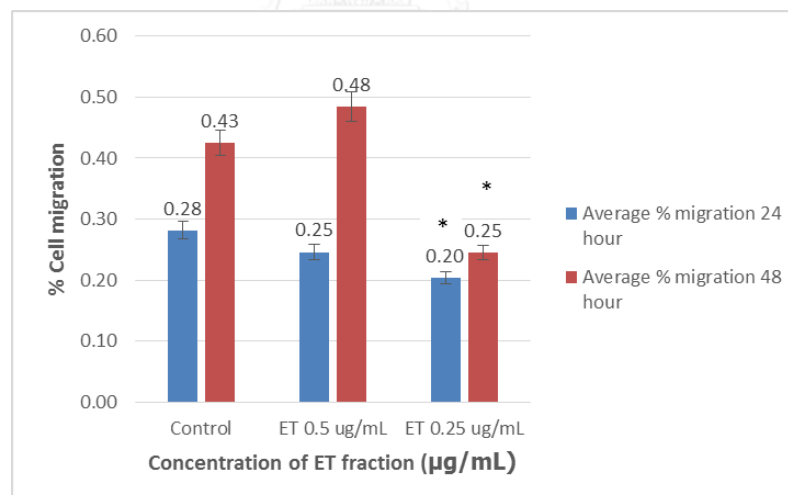


ภาพที่ 26 แสดง % Cell migration ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจาก treat ด้วยสารสกัดพลาควาวในส่วนตัวทำละลาย Petroleum Ether (PE) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เป็นค่าที่ได้จากการทำซ้ำหกครั้ง error bar คือ S.D. ของ % cell migration ทั้งหมด

เช่นเดียวกับการทดสอบสารสกัดในตัวทำละลาย DC พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ไม่สามารถยับยั้ง cell migration ได้ทั้ง 24 และ 48 ชั่วโมงแต่สามารถเพิ่ม cell migration ได้ที่ 48 ชั่วโมงทั้งสองความเข้มข้น ดังแสดงในภาพที่ 27 มีเพียงสารสกัดจากตัวทำละลาย ET ที่ความเข้มข้น 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ที่สามารถยับยั้ง cell migration อย่างมีนัยสำคัญได้ทั้ง 24 และ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 28

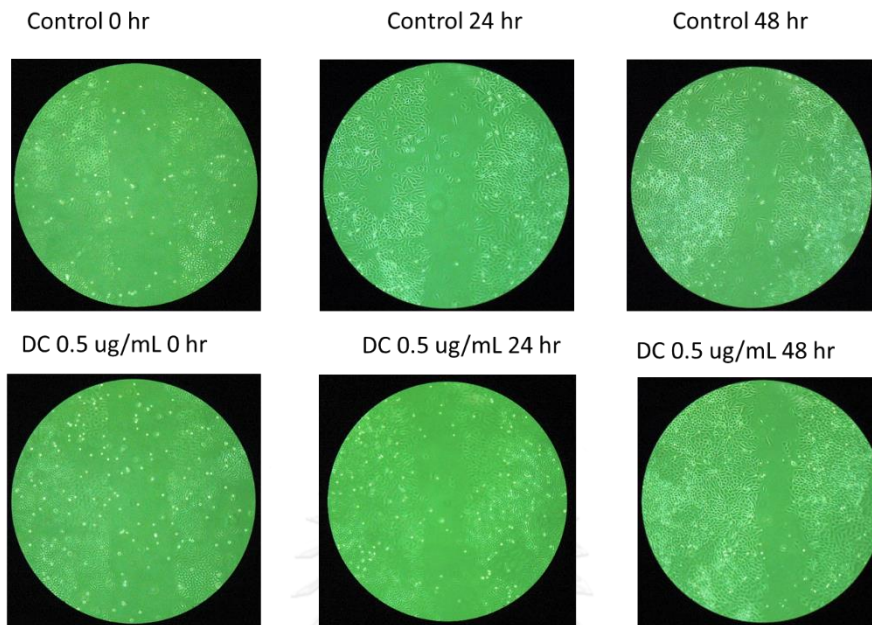


ภาพที่ 27 แสดง % Cell migration ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจาก treat ด้วยสารสกัดพญาคาวโน ส่วนตัวทำละลาย Dichloromethane (DC) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เป็นค่าที่ได้จากการทำซ้ำหกครั้ง error bar คือ S.D. ของ % cell migration ทั้งหมด



ภาพที่ 28 แสดง % Cell migration ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจาก treat ด้วยสารสกัดพญาคาวโน ส่วนตัวทำละลาย Ethanol (ET) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เป็นค่าที่ได้จากการทำซ้ำหกครั้ง error bar คือ S.D. ของ % cell migration ทั้งหมด

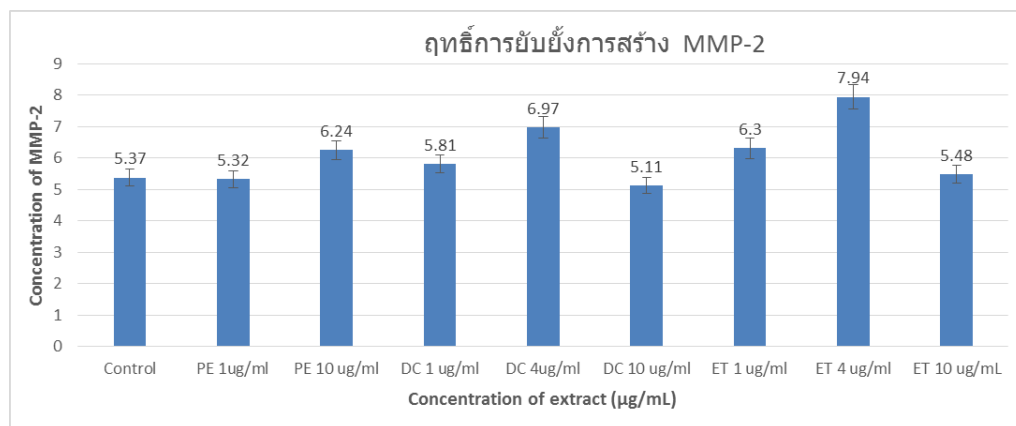
ตัวอย่าง ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ของ Wound healing assay



ภาพที่ 29 แสดง ผล wound healing assay หลัง treat SiHa cells ด้วยสารสกัดพลูคาว และ Control SiHa cells ซึ่งไม่ได้ treat ด้วยสารสกัดพลูคาว

4.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งด้วยการวัดระดับเอนไซม์ Human Matrix metalloproteinase (MMP-2)

จากผลการทดลองในรูปแบบที่ 30



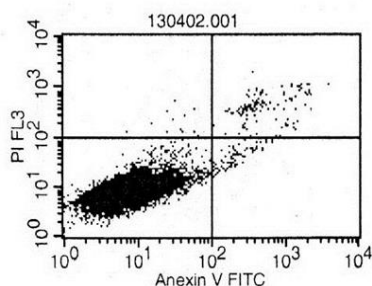
ภาพที่ 30 แสดง ผลการทดสอบปริมาณ MMP-2 หลังจาก treat SiHa cells ด้วยสารสกัดพลูควา ในส่วนตัวทำละลาย PE, DC และ ET ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการทำซ้ำสองครั้ง

จะเห็นว่าไม่มีสารสกัดพลูควาจากตัวทำละลายใดๆมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์ human MMP-2 อย่างมีนัยสำคัญ

4.4 การทดสอบรูปแบบการชักนำให้เกิดการตายของสารสกัด (Apoptosis detection by flow cytometry)

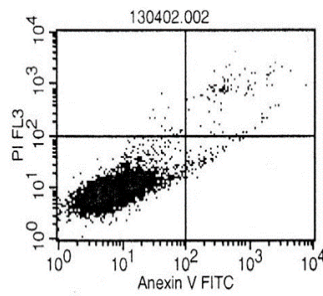
จากการทดลองโดย Flow cytometry ในภาพที่ 30 A และ B คือ Control cells (ไม่ treat ด้วยสารสกัด) มีจำนวน viable cells ประมาณ 98% แสดงว่ากระบวนการทำการทดลองเหมาะสม เซลล์ไม่ได้เกิดการตายเองมากเกินไปจนทำให้การทดลองผิดพลาดได้ C คือ control positive cells ซึ่งเกิดจากการ treat ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 0.5% เพื่อทดสอบว่า Annexin V ไม่ได้เสื่อมสภาพสามารถทดสอบได้และเซลล์สามารถตายได้ด้วย Necrosis + late apoptosis และ early apoptosis ผลการทดลองพบว่าเมื่อ treat ด้วยสารสกัดพลูควาในส่วนตัวทำละลาย DC เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ติดสี PI มากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้น ดังภาพที่ 30 D, E, F แต่ไม่ได้ติด Annexin V อย่างเห็นได้ชัด เช่นเดียวกับการ treat ด้วยสารสกัดพลูควาในส่วนตัวทำละลาย ET ดังแสดงในภาพที่ 30 G, H จากข้อมูลทั้งหมดนี้จึงสรุปว่าเซลล์เกิดการฉีกขาดของเยื่อหุ้มเซลล์จนทำให้สี PI ซึมเข้าไปได้ แต่ไม่ติด annexin V แสดงว่ากระบวนการชักนำให้เกิดการตายเป็นรูปแบบ necrosis

A. Control cell 1



| Gate: No Gate | | Gated Events: 10012 | | | | | |
|---------------|--------|---------------------|---------|--------|------------|--------|------------|
| Quad | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean |
| UL | 13 | 0.13 | 0.13 | 37.17 | 32.40 | 208.32 | 181.81 |
| UR | 133 | 1.33 | 1.33 | 718.01 | 539.62 | 472.86 | 397.63 |
| LL | 9790 | 97.78 | 97.78 | 10.15 | 7.73 | 8.87 | 7.96 |
| LR | 76 | 0.76 | 0.76 | 251.95 | 222.06 | 43.74 | 39.50 |

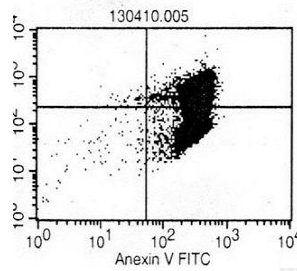
B. Control cells 2



Gate: No Gate

Gated Events: 10016

| Quad | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean |
|------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|
| UL | 16 | 0.16 | 0.16 | 56.54 | 53.28 | 194.98 | 167.07 |
| UR | 107 | 1.07 | 1.07 | 863.59 | 566.75 | 824.80 | 634.44 |
| LL | 9826 | 98.10 | 98.10 | 9.12 | 7.12 | 9.51 | 8.58 |
| LR | 67 | 0.67 | 0.67 | 230.15 | 194.09 | 39.10 | 35.54 |

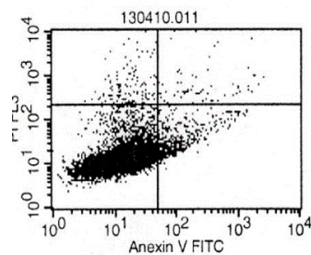
C. H₂O₂ 0.5%

Gate: No Gate

Gated Events: 10450

| Quad | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean |
|------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|
| UL | 43 | 0.41 | 0.41 | 34.60 | 32.04 | 376.82 | 362.43 |
| UR | 5689 | 54.44 | 54.44 | 356.62 | 333.07 | 493.33 | 458.08 |
| LL | 94 | 0.90 | 0.90 | 19.80 | 10.96 | 45.72 | 26.10 |
| LR | 4624 | 44.25 | 44.25 | 322.34 | 301.77 | 83.81 | 74.88 |

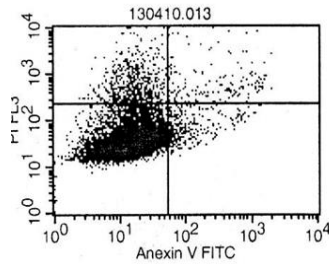
D. DC 1 µg/mL



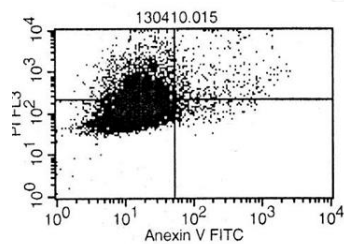
Gate: No Gate

Gated Events: 10006

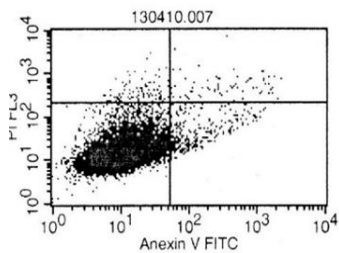
| Quad | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean |
|------|--------|---------|---------|--------|------------|---------|------------|
| UL | 132 | 1.32 | 1.32 | 20.31 | 17.33 | 992.83 | 591.38 |
| UR | 65 | 0.65 | 0.65 | 495.46 | 264.71 | 1185.80 | 630.08 |
| LL | 9304 | 92.98 | 92.98 | 16.12 | 12.99 | 15.14 | 12.19 |
| LR | 505 | 5.05 | 5.05 | 150.44 | 101.24 | 41.03 | 31.11 |

E. DC 4 $\mu\text{g/mL}$ 

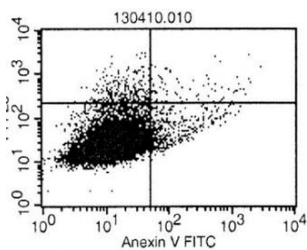
| Gate: No Gate | | Gated Events: 10011 | | | | | |
|---------------|--------|---------------------|---------|--------|------------|---------|------------|
| Quad | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean |
| UL | 637 | 6.36 | 6.36 | 18.60 | 15.94 | 900.03 | 585.59 |
| UR | 165 | 1.65 | 1.65 | 463.33 | 261.73 | 1192.19 | 689.25 |
| LL | 8857 | 88.47 | 88.47 | 16.17 | 13.27 | 42.37 | 35.28 |
| LR | 352 | 3.52 | 3.52 | 139.76 | 95.43 | 75.30 | 63.17 |

F. DC 10 $\mu\text{g/mL}$ 

| Gate: No Gate | | Gated Events: 10021 | | | | | |
|---------------|--------|---------------------|---------|--------|------------|---------|------------|
| Quad | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean |
| UL | 2211 | 22.06 | 22.06 | 19.60 | 16.68 | 859.60 | 560.52 |
| UR | 368 | 3.67 | 3.67 | 325.97 | 176.13 | 1560.73 | 785.29 |
| LL | 7194 | 71.79 | 71.79 | 15.64 | 12.99 | 97.09 | 88.17 |
| LR | 248 | 2.47 | 2.47 | 154.44 | 110.74 | 133.87 | 125.04 |

G. ET 4 $\mu\text{g/mL}$ 

| Gate: No Gate | | Gated Events: 10016 | | | | | |
|---------------|--------|---------------------|---------|--------|------------|--------|------------|
| Quad | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean |
| UL | 97 | 0.97 | 0.97 | 21.68 | 18.49 | 490.02 | 410.20 |
| UR | 71 | 0.71 | 0.71 | 580.39 | 347.75 | 721.99 | 556.60 |
| LL | 9523 | 95.08 | 95.08 | 13.60 | 10.92 | 19.76 | 15.04 |
| LR | 325 | 3.24 | 3.24 | 184.33 | 119.60 | 51.96 | 38.60 |

H. ET 10 $\mu\text{g/mL}$ 

| Gate: No Gate | | Gated Events: 10009 | | | | | |
|---------------|--------|---------------------|---------|--------|------------|--------|------------|
| Quad | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean |
| UL | 313 | 3.13 | 3.13 | 22.47 | 19.35 | 503.47 | 411.51 |
| UR | 81 | 0.81 | 0.81 | 430.29 | 199.49 | 604.16 | 491.97 |
| LL | 9204 | 91.96 | 91.96 | 15.59 | 12.52 | 33.86 | 25.74 |
| LR | 411 | 4.11 | 4.11 | 174.95 | 114.66 | 67.71 | 52.99 |

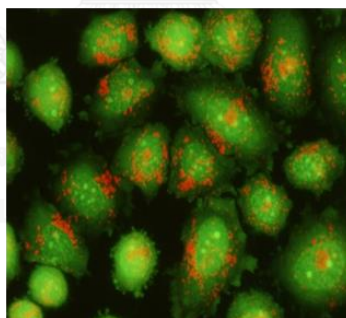
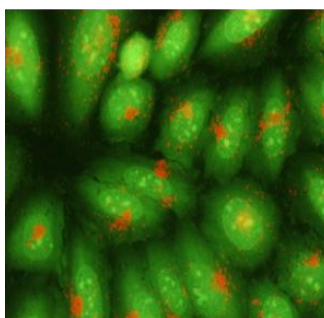
ภาพที่ 31 แสดง ผล flow cytometer ของ Control SiHa cells

(A) คือ Control cells 1 (B) คือ Control cells 2 (C) คือ เซลล์หลัง treat ด้วย H_2O_2 5% (D,E,F) คือเซลล์หลัง treat ด้วยสารสกัดในตัวทำละลาย DC 1, 4 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ (G,H) คือเซลล์หลัง treat ด้วยสารสกัดในตัวทำละลาย ET 4, 10 $\mu\text{g/mL}$

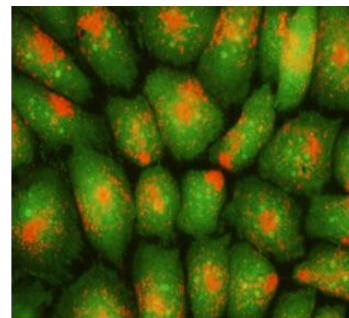
4.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพลาควาต่อการตายแบบ Lysosomal degradation ด้วย Acridine orange

จากผลการทดลองในรูปที่ 21 จะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ control เซลล์ที่ผ่านการ treat ด้วยสารสกัดจะเกิดจุดสีส้มมากกว่า ทั้งจำนวนและการกระจายตัว โดยจุดสีส้มจะเป็นโครงสร้างที่เป็นกรด อาจเทียบได้กับ autophagolysosome ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อเกิดกระบวนการ autophagy และจะเห็นว่าสารสกัดในส่วนตัวทำละลาย DC จะทำให้เกิดจุดสีส้มได้มากกว่า ET และการเกิดจะมากขึ้นตามจำนวนความเข้มข้นที่สูงขึ้น

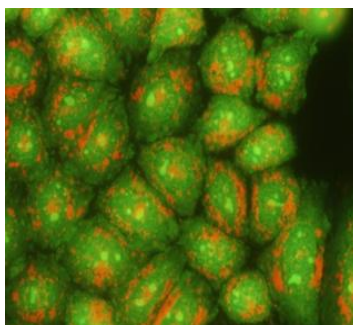
(A) Control (no crude extract) (B) HCT-ET 4 $\mu\text{g/mL}$



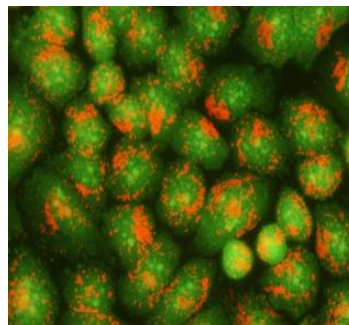
(C) HCT-ET 10 $\mu\text{g/mL}$



(D) HCT-DC 4 $\mu\text{g/mL}$



(E) HCT-DC 10 $\mu\text{g/mL}$

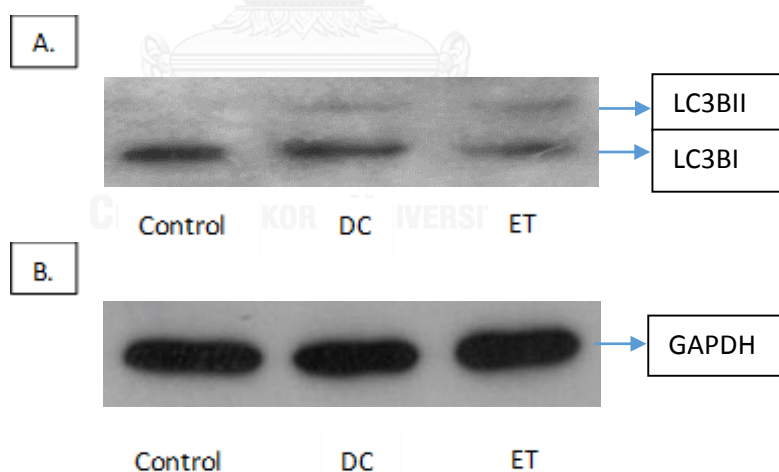


ภาพที่ 32 แสดง ผล Acridine orange staining ของ SiHa cells

(A) Control cell ไม่ treat สารสกัด (B) Treat สารสกัดพลูควาในส่วนตัวทำละลาย ET ความเข้มข้น 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C) Treat สารสกัดพลูควาในส่วนตัวทำละลาย ET ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D) Treat สารสกัดพลูควาในส่วนตัวทำละลาย DC ความเข้มข้น 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (E) Treat สารสกัดพลูควาในส่วนตัวทำละลาย DC ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ภาพที่ได้เป็นตัวแทนของการทดสอบจำนวนสองครั้ง

4.6 การทดสอบยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดพลูควาในการชักนำให้เกิดการตายแบบ autophagy ด้วยวิธี Western blot analysis

หลังจากขั้นตอนการตรวจคัดกรองกระบวนการ autophagy แล้ว เข้าสู่ขั้นตอนการตรวจยืนยัน โดยใช้ Antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน LC3BI และ LC3BII ซึ่งมีขนาดโปรตีน 14 และ 16 kDa ตามลำดับ โดย LC3BII เป็นโปรตีนที่เกิดขึ้นเมื่อเกิดกระบวนการ autophagy เท่านั้น ซึ่งพบว่าเมื่อทำการ treat เซลล์ SiHa ด้วยสารสกัดพลูควาทำให้เกิด band ของโปรตีน LC3BII ขึ้น ดังนั้นกระบวนการชักนำที่ทำให้เกิดการตาย คือ กระบวนการ autophagy ดังแสดงในภาพที่ 32



ภาพที่ 33 แสดง ผล Western blot

(A) คือโปรตีนที่ได้จากการใช้แอนติบอดีต่อ LC3BI และ LC3BII (B) คือโปรตีนที่ได้จากการใช้แอนติบอดีต่อ GAPDH

ผลความเข้มชั้นของ band หลัง normalization ด้วย GAPDH

| control (LC3BI) | DC 10 LC3BI | DC 10 LC3II | ET 10 LC3BI | ET 10 LC3II |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 0.154968113 | 0.213153781 | 0.076135363 | 0.126819529 | 0.074555306 |

พบว่า band LC3BII (Autophagy) เมื่อ treat cell ด้วยสารสกัดพลาสมาในส่วนตัวทำละลาย DC มีความเข้มมากกว่า ET 1.02 เท่า แสดงให้เห็นว่าสารสกัดพลาสมาในส่วนตัวทำละลาย DC มีความแรงมากกว่า ET ที่ความเข้มข้นเดียวกันประมาณ 1 เท่า



บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพลูคาว (*Houttuynia cordata* thumb.) ในการต้านมะเร็งปากมดลูกมนุษย์ ซึ่งกระทำใน cell line (Human squamous cervical cancer cells, SiHa) ที่มี Human Papilloma virus (HPV) type 16 integrate อยู่ในจีโนม โดย HPV type 16 นี้เป็น type ที่พบมากที่สุดในโลกและอยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูงที่จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกเมื่อติดไปแล้ว มาเป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งปากมดลูกในการศึกษา โดยจะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากตัวทำละลาย 3 ชนิดที่มีขั้วแตกต่างกันเรียงตามลำดับความมีขั้วน้อยไปมากคือ Petroleum Ether (PE), Dichloromethane (DC) และ Absolute Ethanol (ET) ถึงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง, ความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่และการลุกลามหรือที่เรียกว่าการแพร่กระจาย (metastasis) และรูปแบบการชักนำให้เกิดการตาย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของยาที่จะพัฒนาต่อไปในอนาคต ผลการทดลองครั้งนี้พบว่า สารสกัดพลูคาวในส่วนตัวทำละลาย DC และ ET สามารถทำให้เซลล์ตายได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% การตายเป็นไปตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้น (dose dependent manner) โดยสารสกัดจากตัวทำละลาย DC มีฤทธิ์ในการทำให้เซลล์ตายมากกว่า ET และมี IC_{50} เท่ากับ 8 $\mu\text{g/mL}$

การทดลองความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง พบว่าความเข้มข้นที่ 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ของสารสกัดในส่วนตัวทำละลาย ET เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญ ทั้ง 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งสารสกัดในส่วนความเข้มข้นอื่นและตัวทำละลายอื่นมีแนวโน้มในการเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง เช่นเดียวกับการทดลองการวัดระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ MMP-2 ที่หลั่งออกมาหลังจาก treat เซลล์ด้วยสารสกัดพลูคาว พบว่า สารสกัดพลูคาวทั้งสามตัวทำละลายไม่มีความสามารถในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ MMP-2 ได้ ในทางตรงกันข้ามกลับเพิ่มปริมาณ MMP-2 แต่ในส่วนตัวทำละลาย DC ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ เห็นได้ชัดว่าสามารถลดปริมาณ MMP-2 ได้ เมื่อเทียบกับ Control แต่การลดลงนี้ไม่ได้เป็นการลดลงอย่างแท้จริง น่าจะเป็นการลดลงเนื่องจากเซลล์ตาย (เห็นได้จากการทดลอง Cytotoxicity test) จึงไม่สามารถผลิต Enzyme MMP-2 ได้ เพราะความเข้มข้น DC 10 $\mu\text{g/mL}$ เป็นความเข้มข้นที่พบว่าทำให้เซลล์มะเร็งตายสูงที่สุดในการทดลอง จึงกล่าวได้ว่าสารสกัดพลูคาวไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปากมดลูกมนุษย์

การทดลองชนิดการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูก พบว่าเมื่อ treat เซลล์ด้วยสารสกัดพลูคาวในส่วนตัวทำละลาย DC และ ET เป็นระยะเวลา 24 ชม จะมีการติดสี PI ได้

มากขึ้น เนื่องมาจากเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการขีดขาด สีจึงซึมผ่านเข้าไปได้ แต่ไม่ติด Annexin V อาจเนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการ treat สาร เกินระยะเวลาที่เกิด apoptosis ไปแล้ว ซึ่งจากการทดลองของ H. Sawai and et al. [48] พบว่า apoptosis จะเกิดช่วง 4-5 ชั่วโมงหลังจาก treat สารที่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจากการทดลองนี้สรุปได้ว่ารูปแบบชักนำให้เกิดการตายที่ 24 ชั่วโมง คือ necrosis นอกจากนี้ได้พบว่ามีกระบวนการอื่นที่เกี่ยวข้องกับการตายคือ autophagy โดยกระบวนการ autophagy นี้เป็นที่ถกเถียงกัน บางการทดสอบ พบว่า autophagy เป็นกระบวนการที่ช่วยสนับสนุนให้เซลล์มะเร็งไม่ตายและดีอียา [49] บางการทดสอบพบว่ากระบวนการ autophagy ช่วยให้เซลล์มะเร็งถูกทำลาย [50] เช่นเดียวกับการทดลองนี้ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีที่ยืนยันได้อย่างแน่ชัด จึงกล่าวได้ว่า ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์มะเร็ง สารเคมีที่ไปกระตุ้นการเกิด autophagy ปัจจุบันมียาเคมีบำบัดหลายชนิดที่กระตุ้นกระบวนการ autophagy เช่น BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, Imatinib, anti-epidermal growth factor receptor (EGFR), Cetuximab, proteasome inhibitors, TNF-related apoptosis inducing ligand, arsenic trioxide เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ผ่านมาทดสอบพิสูจน์ถึงความปลอดภัยในการใช้ ว่าไม่เป็นพิษต่อยีนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม [51] ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งถึงสรรพคุณใช้เป็นพืชในการป้องกันโรค หรือเป็นพืชที่มีส่วนร่วมในการรักษา อีกทั้งข้อมูลในการทดลองยังเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคมะเร็งปากมดลูกในอนาคต

รายการอ้างอิง

1. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. 127(12): p. 2893-917.
2. Mountzios, G., et al., *Developments in the systemic treatment of metastatic cervical cancer*. Cancer Treat Rev, 2013. 39(5): p. 430-43.
3. Lowy, D.R. and J.T. Schiller, *Prophylactic human papillomavirus vaccines*. J Clin Invest, 2006. 116(5): p. 1167-73.
4. Bharadwaj, M., et al., *Chapter 6 - Human Papillomavirus (HPV): Diagnosis and Treatment*, in *Animal Biotechnology*, A.S.V. Singh, Editor. 2014, Academic Press: San Diego. p. 95-120.
5. Carr, K.C. and J.W. Sellors, *Cervical cancer screening in low resource settings using visual inspection with acetic acid*. Journal of Midwifery & Women's Health, 2004. 49(4): p. 329-337.
6. Muñoz, N., et al., *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*. Vaccine, 2006. 24, Supplement 3(0): p. S1-S10.
7. Gariglio, P., et al., *The Role of Retinoid Deficiency and Estrogens as Cofactors in Cervical Cancer*. Archives of Medical Research, 2009. 40(6): p. 449-465.
8. Rampias, T., C. Sasaki, and A. Psyrris, *Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck*. Oral Oncol, 2014. 50(5): p. 356-63.
9. McBride, A.A., *The Papillomavirus E2 proteins*. Virology, 2013. 445(1-2): p. 57-79.
10. DiMaio, D. and L.M. Petti, *The E5 proteins*. Virology, 2013. 445(1-2): p. 99-114.
11. Venuti, A., et al., *Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions*. Mol Cancer, 2011. 10: p. 140.
12. Stanley, M., *Pathology and epidemiology of HPV infection in females*. Gynecologic Oncology, 2010. 117(2, Supplement): p. S5-S10.
13. McBride, A.A., et al., *Hitchhiking on host chromatin: how papillomaviruses persist*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, 2012. 1819(7): p. 820-825.
14. Stanley, M., *Immunobiology of HPV and HPV vaccines*. Gynecol Oncol, 2008. 109(2 Suppl): p. S15-21.

15. Abdel-Hady, E.S., et al., *Screening for cervical carcinoma using visual inspection with acetic acid*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2006. 93(2): p. 118-122.
16. Health, D.o.M.s.M.o.P., *Guideline of cervical cancer screening, diagnosis and treatments in abnormal cervix patients*. 2013. 1: p. 15.
17. *Comprehensive cervical cancer control, a guide to essential practice*. World Health Organization (WHO), 2006: p. 38.
18. Claudia C. Camisãol, S.M.F.B., Karen V.P. Lombardellilll, Maria Célia R. DjahjahIV, Luiz Carlos ZeferinoV, *Magnetic resonance imaging in the staging of cervical cancer*. Radiologia Brasileira, 2007. 40.
19. Kyrgiou, M. and M.I. Shafi, *Invasive cancer of the cervix*. Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine, 2013. 23(11): p. 343-351.
20. Chotianun, I., *Effects of Thai medicinal herb*. Poompanya Publishing Co.,Ltd, 2009: p. 163-166.
21. Nuengchamnong, N., K. Krittasilp, and K. Ingkaninan, *Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of Houttuynia cordata using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay*. Food Chemistry, 2009. 117(4): p. 750-756.
22. Li, W., et al., *Houttuynia cordata, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity*. J Ethnopharmacol, 2011. 133(2): p. 922-7.
23. Lee, J.-S., et al., *Suppressive effects of Houttuynia cordata Thunb (Saururaceae) extract on Th2 immune response*. Journal of Ethnopharmacology, 2008. 117(1): p. 34-40.
24. Lau, K.-M., et al., *Immunomodulatory and anti-SARS activities of Houttuynia cordata*. Journal of Ethnopharmacology, 2008. 118(1): p. 79-85.
25. Chen, X., et al., *Houttuynia cordata blocks HSV infection through inhibition of NF-κB activation*. Antiviral Research, 2011. 92(2): p. 341-345.
26. Tian, L., et al., *A comparative study on the antioxidant activities of an acidic polysaccharide and various solvent extracts derived from herbal Houttuynia cordata*. Carbohydrate Polymers, 2011. 83(2): p. 537-544.
27. Tang, Y.J., et al., *Houttuynia cordata Thunb extract induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in HT-29 human colon adenocarcinoma cells*. Oncol Rep, 2009. 22(5): p. 1051-6.

28. Henry, C.M., E. Hollville, and S.J. Martin, *Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry*. *Methods*, 2013. 61(2): p. 90-7.
29. Alberts et al, *Molecularbiology of the cell (fifth edition)*. Garland Science, 2007. 5: p. 1149-1163.
30. B. Favaloro , N.A., V. Graziano, C. Di Ilio , V. De Laurenzi V, *Role of Apoptosis in disease*. *Aging*, 2012. 4: p. 330-349.
31. Lavallard, V.J., et al., *Autophagy, signaling and obesity*. *Pharmacological Research*, 2012. 66(6): p. 513-525.
32. Zygler, A., M. Słomińska, and J. Namieśnik, 2.04 - *Soxhlet Extraction and New Developments Such as Soxtec*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Academic Press: Oxford. p. 65-82.
33. Sukhdev Swami Handa, S.P.S.K., Gennaro Longo,Dev Dutt Rakesh, *An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants*. *Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies,International Centre for Science and High Technology,ICS-UNIDO*, 2008: p. 23-24.
34. Fronza, M., et al., *Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009. 126(3): p. 463-467.
35. Ruszymah, B.H., et al., *Aqueous extract of Centella asiatica promotes corneal epithelium wound healing in vitro*. *J Ethnopharmacol*, 2012. 140(2): p. 333-8.
36. Schropfer, A., et al., *Expression pattern of matrix metalloproteinases in human gynecological cancer cell lines*. *BMC Cancer*, 2010. 10: p. 553.
37. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. *Cardiovasc Res*, 2006. 69(3): p. 562-73.
38. Roomi, M.W., et al., *In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines, inducers and inhibitors*. *Oncol Rep*, 2010. 23(3): p. 605-14.
39. Araújo Jr, R.F., et al., *Prognostic and diagnostic implications of MMP-2, MMP-9, and VEGF- α expressions in colorectal cancer*. *Pathology - Research and Practice*, 2015. 211(1): p. 71-77.

40. Tsai, S.J., et al., *Overexpression of myeloid zinc finger 1 suppresses matrix metalloproteinase-2 expression and reduces invasiveness of SiHa human cervical cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. 425(2): p. 462-7.
41. Krysko, D.V., et al., *Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis*. *Methods*, 2008. 44(3): p. 205-21.
42. Pietkiewicz, S., J.H. Schmidt, and I.N. Lavrik, *Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining*. *J Immunol Methods*, 2015. 423: p. 99-103.
43. Funakoshi, T., et al., *Lysosome vacuolation disrupts the completion of autophagy during norephedrine exposure in SH-SY5Y human neuroblastoma cells*. *Brain Research*, 2013. 1490(0): p. 9-22.
44. Misirkic, M., et al., *Inhibition of AMPK-dependent autophagy enhances in vitro antiglioma effect of simvastatin*. *Pharmacological Research*, 2012. 65(1): p. 111-119.
45. Jin, S. and R.T. Kennedy, *New developments in Western blot technology*. *Chinese Chemical Letters*, 2015. 26(4): p. 416-418.
46. Saelee, C., V. Thongrakard, and T. Tencomnao, *Effects of Thai medicinal herb extracts with anti-psoriatic activity on the expression on NF-kappaB signaling biomarkers in HaCaT keratinocytes*. *Molecules*, 2011. 16(5): p. 3908-32.
47. Li, Y.-y., et al., *Erlotinib-induced autophagy in epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 2013. 81(3): p. 354-361.
48. Sawai, H. and N. Domae, *Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 411(3): p. 569-73.
49. Xu, Y., et al., *Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells*. *Cancer Letters*, 2012. 314(2): p. 232-243.
50. Chakraborty, D., et al., *[6]-Gingerol induces caspase 3 dependent apoptosis and autophagy in cancer cells: Drug–DNA interaction and expression of certain signal genes in HeLa cells*. *European Journal of Pharmacology*, 2012. 694(1–3): p. 20-29.

51. Kang, C.K., et al., *Evaluation of the genotoxicity of extracts of Houttuynia cordata Thunb.* Am J Chin Med, 2012. 40(5): p. 1019-32.



ภาคผนวก

การเตรียม Reagent สำหรับ Western blot analysis

1. การเตรียม 1X Running buffer (pH8.75) ปริมาตร 1 L

| | | |
|------------------|-------|---|
| - 25 mM Tris | 3.03 | g |
| - 192 mM Glycine | 14.42 | g |
| - 0.1 % SDS | 1 | g |

เติม Milli Q water ให้ครบ 1 L

2. การเตรียม 1X Transfer buffer (8.75) / 1X Tris-Glycine buffer ปริมาตร 1 L

| | | |
|------------------|-------|----|
| - 25 mM Tris | 3.03 | g |
| - 192 mM Glycine | 14.42 | g |
| - 20% Methanol | 200 | mL |

เติม Milli Q water ให้ครบ 1 L

3. การเตรียม 1X TBS-Tween 20 หรือ TBS-T ปริมาตร 1 L

| | | |
|-----------------------------|------|----|
| - 20 mM Tris-HCL, pH 7.5 | 2.42 | g |
| - 150 mM NaCl | 8.76 | g |
| - 1% Tween-20 (เติมก่อนใช้) | 1 | mL |

เติม Milli Q water ให้ครบ 1 L

การเตรียม Working Bradford solution (1X Bradford)

| | | |
|--|-----|----|
| - Distilled water | 425 | mL |
| 95% Ethanol (100% ethanol 14.25 mL + D.W. 0.73 mL) | 15 | mL |
| - 85% Phosphoric acid | 30 | mL |
| - Bradford solution | 30 | mL |

(Bradford solution ประกอบด้วย 95% Ethanol 100 mL + 85% Phosphoric acid 200 mL +

Serva Blue G 350 mg)

เมื่อผสมส่วนผสมทั้งหมดแล้วให้กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บในขวดสีชาที่ 4 °C

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

จบการศึกษาระดับประถมศึกษาจาก โรงเรียนวัดธรรมมงคล

จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจาก โรงเรียนวชิรธรรมสาริต

จบการศึกษาระดับปริญญาตรีจาก คณะสหเวชศาสตร์ เทคนิคการแพทย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

