บทที่ 4

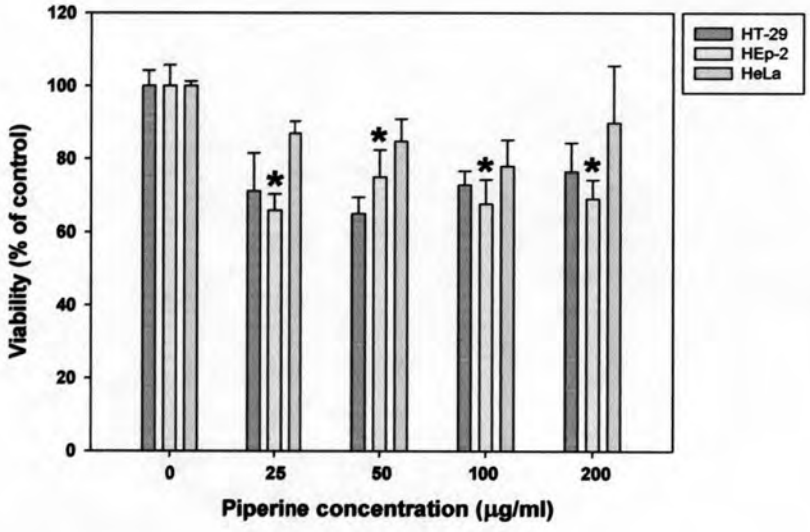
ผลการทดลอง

1. ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ

1.1 พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง

1.1.1 พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ HT-29, HEp-2 และ HeLa ได้เพียงเล็กน้อย

ผลการทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ HT-29, HEp-2 และ HeLa ในหลอดทดลอง ภายหลังการบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และตรวจสอบการเจริญของเซลล์ โดยวิธี MTS assay ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 4.1

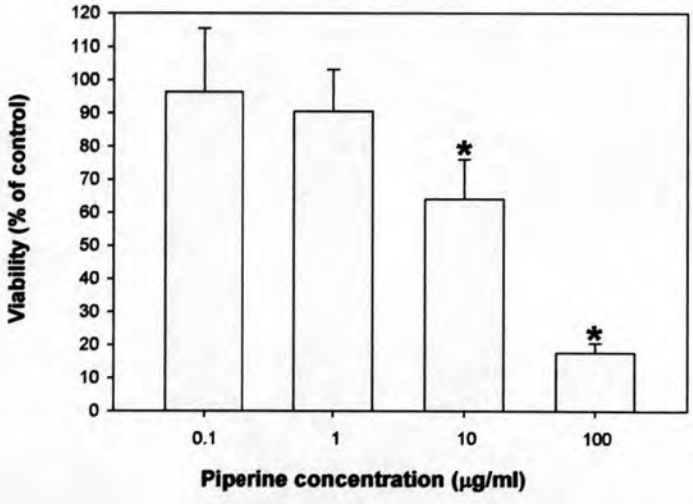


รูปที่ 4.1 แสดงผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ HT-29, HeLa และ HEp-2 เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มีพิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 25-200 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี MTS assay และคำนวนเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีพิเพอรีน ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดลอง 1 ใน 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการทดลองพบว่า พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ HT-29, HeLa และ HEp-2 ได้เพียงเล็กน้อยเมื่อทดสอบด้วยพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 200 µg/ml พบว่ามียังคงมีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 76.4 %, 69.1% และ 89.8 % ตามลำดับ ทั้งนี้พิเพอรีนตั้งแต่ความเข้มข้น 25-200 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ HEp-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อ HEp-2 ไม่ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นแต่อย่างใด

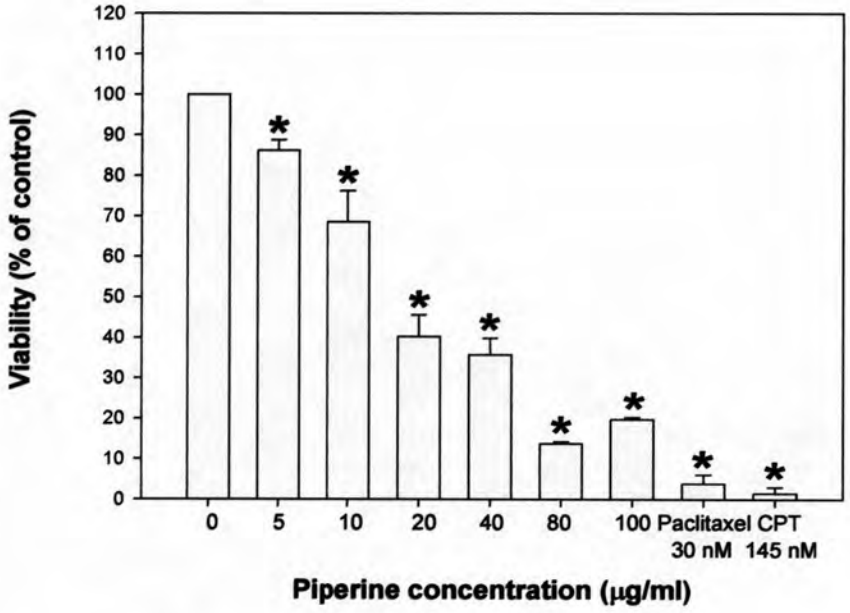
1.1.2 พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ H9 ในหลอดทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1–100 µg/ml ในการยับยั้งการเจริญของ H9 ในหลอดทดลอง โดยบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และตรวจสอบการเจริญของเซลล์ โดยวิธี MTS assay ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 **ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของ** H9 **เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน** 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มีพิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1-100 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเซลล์โดยวิธี MTS assay ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบ 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

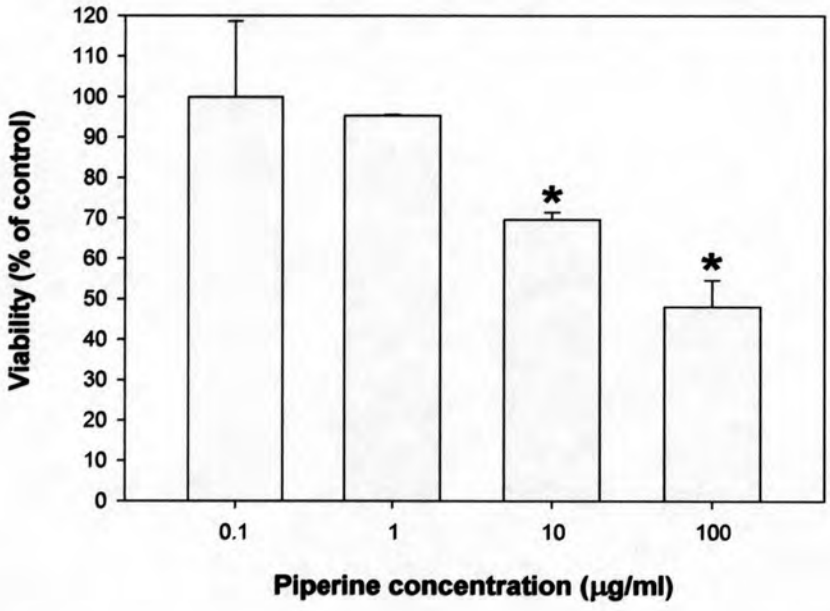
จากการทดสอบใน H9 พบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 100 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ H9 ได้ 17.7 ± 2.9% เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าการยับยั้งการเจริญของ H9 มีลักษะเป็น Dose-dependent effect โดยจะออกฤทธิ์ดีขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.7 ± 2.1 µg/ml ซึ่งเป็นการค้นพบการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นครั้งแรก ทั้งนี้พิเพอรีนที่ความเข้มข้นเพียง 5 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ H9 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 4.3



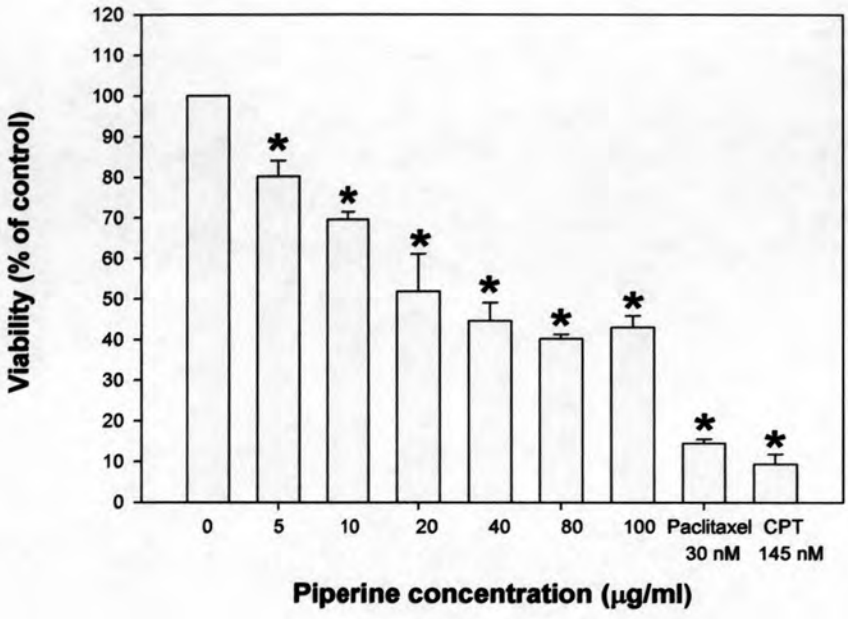
รูปที่ 4.3 ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของ H9 เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5x 10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มีพิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 5-100 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเซลล์โดยวิธี MTS assay ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบ 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ CPT หมายถึง Camptothecin

1.1.3 พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ Jurkat ในหลอดทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1–100 µg/ml ในการยับยั้งการเจริญของ Jurkat ในหลอดทดลอง โดยบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และตรวจสอบการเจริญของเซลล์โดยวิธี MTS assay พบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 10 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ Jurkat ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 69.6 ± 1.82% ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของ Jurkat เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มีพิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1-100 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเซลล์โดยวิธี MTS assay ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบ 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 4.5 **ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของ** Jurkat **เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน** 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มีพิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 5-100 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเซลล์โดยวิธี MTS assay ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบ 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ CPT หมายถึง Camptothecin

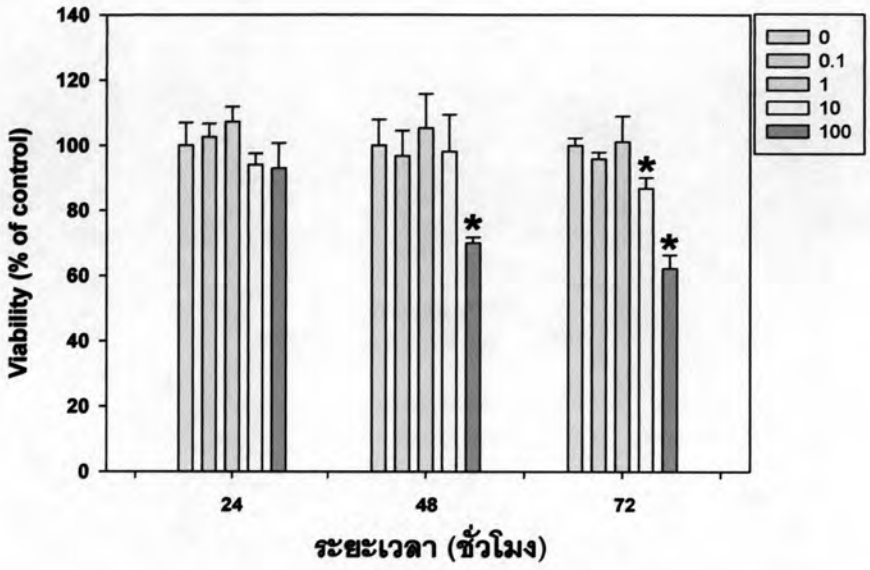
การทดสอบใน Jurkat พบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 5 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ Jurkat ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นตั้งแต่ 20-100 µg/ml ไม่พบว่าการยับยั้งเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยพบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 และ 100 µg/ml ส่งผลให้มีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 51.9 $\pm$ 9.22%, 44.7 $\pm$ 4.50%, 40.3 $\pm$ 1.08% และ 43.1 $\pm$ 2.85% ตามลำดับ ซึ่งการยับยั้งการเจริญของ Jurkat ที่ความเข้มข้น 20-100 µg/ml นั้นไม่แตกต่างกันเมื่อทดสอบค่าทางสถิติ ดังรูปที่ 4.5

1.2 ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์ (Human PBMCs)

1.2.1พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติในหลอดทดลอง

จากการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าพิเพอรีนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้เป็นอย่างดี ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาผลกระทบของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์ (PBMCs) ในสภาวะที่มี mitogen และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีพิเพอรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิต โดยวิธี MTS assay ผลการทดลอง พบว่าพิเพอรีนสามารถยับยั้งการเจริญของ PBMCs ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.6

ทั้งนี้เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ยับยั้งการเจริญของ PBMCs ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 70.0% และ 62.3% ตามลำดับ ในขณะที่พิเพอรีนที่ความเข้มข้น 10 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ PBMCs ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 86.8% พิเพอรีนที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบคือ 100 µg/ml ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ H9 ได้โดยมีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 17.7 $\pm$ 2.9% และยับยั้งการเจริญของ Jurkat ได้โดยมีเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 43.1 $\pm$ 2.85% ซึ่งดีกว่าการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ PBMCs อย่างไรก็ตามการทดลองนี้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น ซึ่งเป็นผลจากการทดสอบในอาสาสมัครผู้ร่วมวิจัยเพียง 1 รายเท่านั้น คณะผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อ PBMCs ในอาสาสมัครเพิ่มเติม และทำการศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อ PBMCs ต่อไป



รูปที่ 4.6 แสดงผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 1 x 10^5 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม โดยกระตุ้นการแบ่งตัวของ PBMCs ด้วย PHA 5 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบด้วยพิเพอรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1-100 µg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี MTS assay และคำนวนเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีพิเพอรีน ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดลองในอาสาสมัคร 1 ราย และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

2.1 พิเพอรีนเป็นพิษต่อ H9

2.1.1 ตรวจสอบความเป็นพิษต่อ H9 โดยการตรวจวัด LDH activity

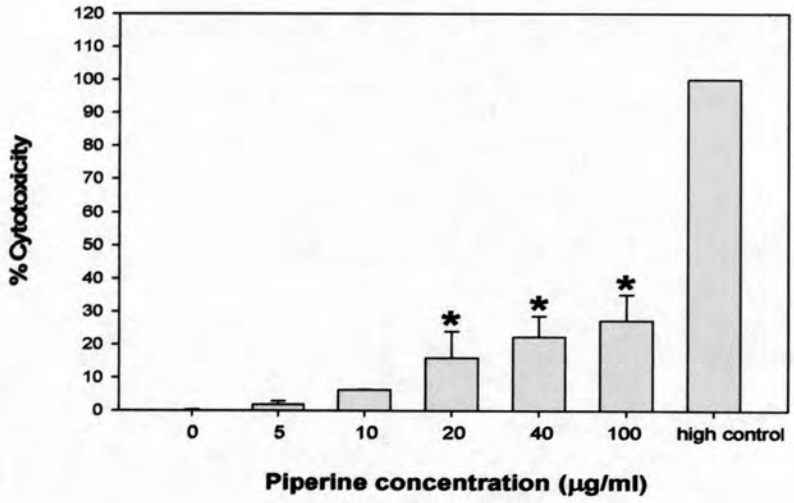
เซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย จะปล่อย LDH ออกมามากขึ้น LDH เป็นเอนไซม์ที่ไปย่อย lactate ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Formazan salt ที่เกิดสี ดังนั้น LDH activity จึงมีค่าแปรผันตามปริมาณ Formazan salt ที่เกิดขึ้น และสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของผลผลิตที่ 492 นาโนเมตรและคำนวณ %cytotoxicity ได้จากสมการ

$$\%\text{cytotoxicity} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{sample}} - \text{Absorbance}_{\text{low control}}}{\text{Absorbance}_{\text{high control}} - \text{Absorbance}_{\text{low control}}} \times 100$$

โดย low control หมายถึง เซลล์ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ

high control หมายถึง เซลล์ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบและถูกทำลายด้วย lysis buffer

จากการทดลองพบว่าพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 100 µg/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์ คิดเป็น 16.0%, 22.3% และ 27.3% cytotoxicity ตามลำดับ โดยเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของพิเพอรีน แสดงว่าพิเพอรีนเป็นพิษต่อ H9 ส่งให้มี LDH activity มากขึ้น ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ผลของพิเพอรีนต่อ LDH activity ของ H9 เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มีพิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบ LDH activity โดยใช้ LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche, เยอรมัน) ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบ 5 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.1.2 **ตรวจสอบความเป็นพิษต่อ** H9 **โดยวิธี** Trypan Blue Exclusion Method

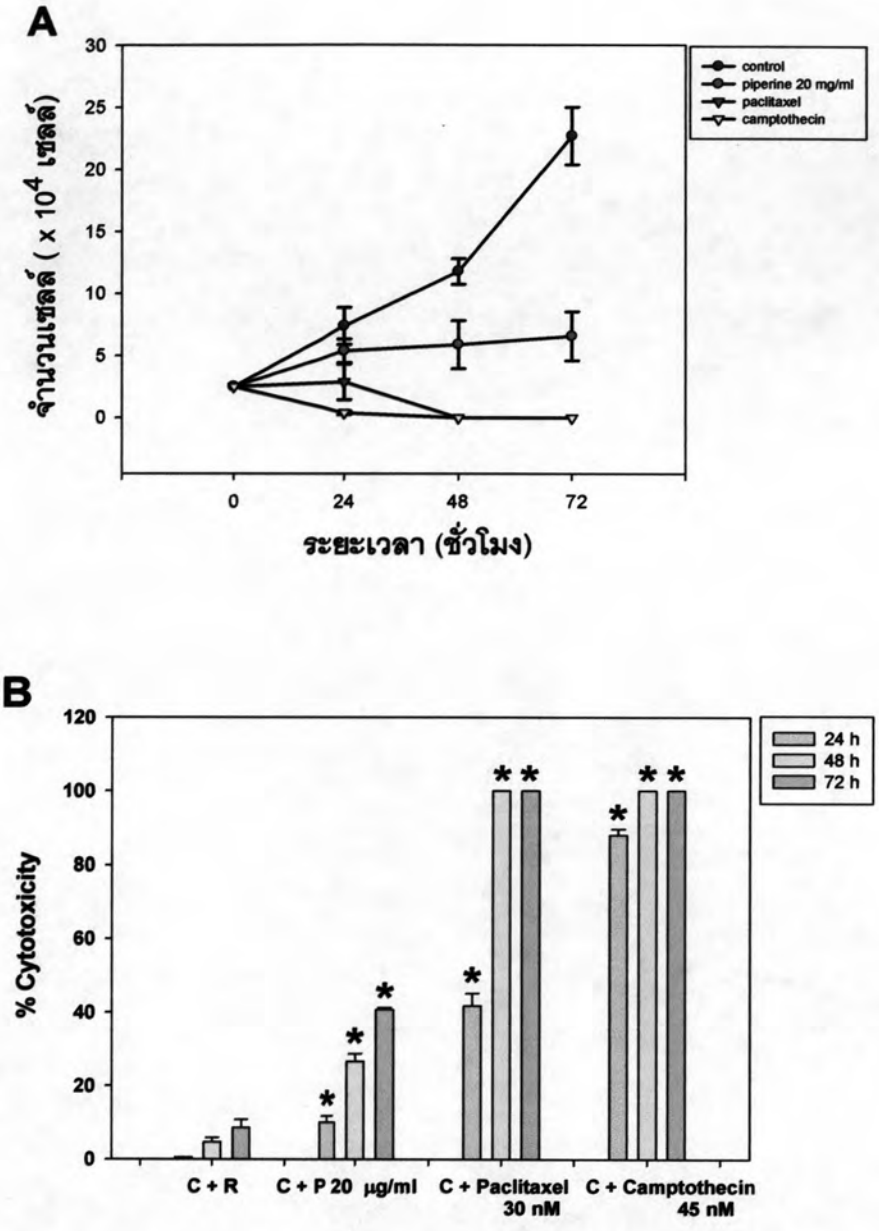
การศึกษาความเป็นพิษของพิเพอรีนต่อ H9 ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะต่างๆ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย trypan blue stain นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ไม่มีชีวิต และคำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%cytotoxicity)

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell/ml) = เซลล์ที่มีชีวิต x dilution factor $x10^4$ cell/ml

$$\text{ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์} = \frac{\text{เซลล์ที่ไม่มีชีวิต}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จำนวน H9 ที่มีชีวิตในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบคิดเป็น $22.7 \pm 2.31 \times 10^4$ เซลล์ ส่วนพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20 µg/ml ส่งผลให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงโดยมีค่าเท่ากับ $6.6 \pm 1.97 \times 10^4$ เซลล์ ยืนยันได้ว่าพิเพอรีนมีผลทำจำนวนเซลล์ลดลง (ดังแสดงในรูปที่ 4.8 A)

เมื่อทดสอบ H9 และพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20 µg/ml เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง พบว่า %cytotoxicity มีค่าเท่ากับ $12.5 \pm 5.19\%$, $26.6 \pm 2.1\%$ และ $40.7 \pm 0.58\%$ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าพิเพอรีนมีความเป็นพิษต่อ H9 เพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น (time-dependent effect) (ดังรูปที่ 4.8 B)

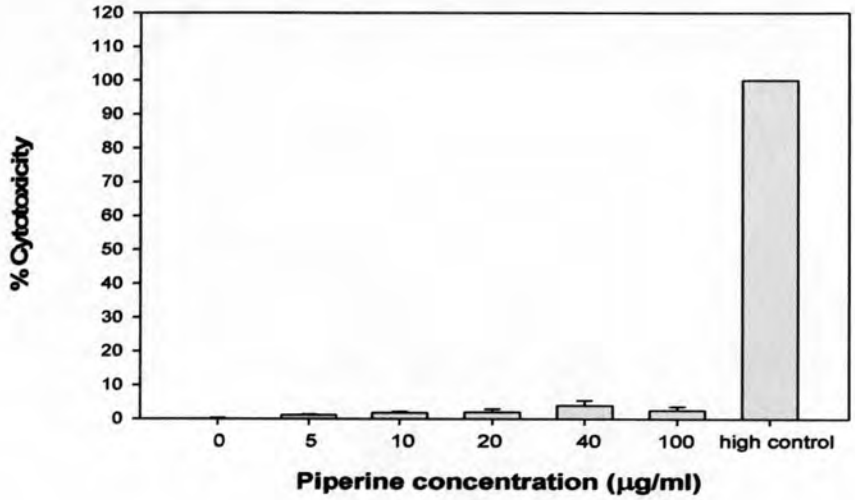


รูปที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบ H9 ในสภาวะต่างๆ ได้แก่ 1) พิเพอรีน 20 µg/ml 2) ยา Paclitaxel 30 nM และ Camptothecin 145 nM (positive control) และ 3) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบใดๆ (negative control) เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบ 4 ครั้ง * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสาคัญทางสถิติ A) แสดงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในสภาวะต่างๆ ภายหลังการทดสอบ B) แสดง % cytotoxicity ในสภาวะต่างๆภายหลังการทดสอบ

2.2 **พิเพอรีนไม่เป็นพิษต่อ** Jurkat

2.2.1 **ตรวจสอบความเป็นพิษต่อ** Jurkat **โดยการตรวจวัด** LDH activity

เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจวัด LDH activity จากการทดลองพบว่า LDH activity มีค่าต่ำแม้ความเข้มข้นของพิเพอรีนจะสูงถึง 100 µg/ml แสดงให้เห็นว่าพิเพอรีนไม่มีความเป็นพิษต่อ Jurkat ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.9



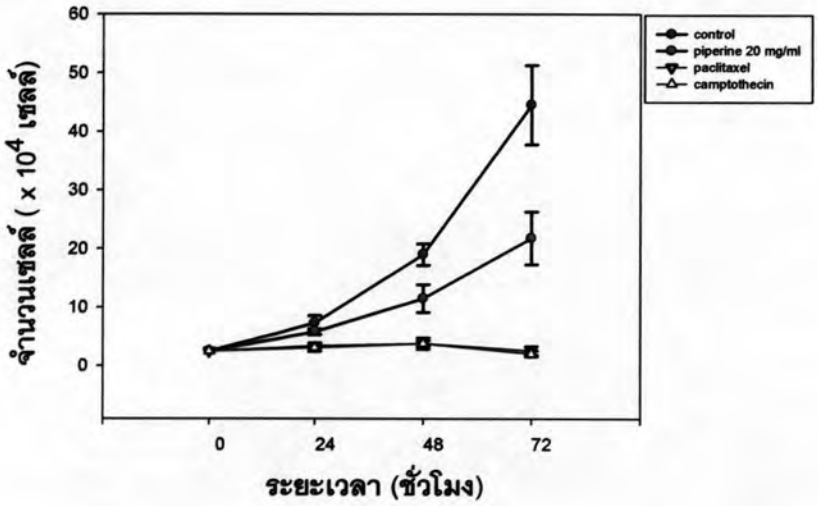
รูปที่ 4.9 **ผลพิเพอรีนต่อระดับ** LDH **ของ** Jurkat **เพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน** 5×10^3 **เซลล์ต่อหลุม** ใน culture plate ขนาด 96 หลุม ในสภาวะที่มีพิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบ LDH activity ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบ 4 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะทำการทดสอบซ้ำ (tripicate) * ค่า $P < 0.05$ **แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ**

2.2.2 **ตรวจสอบความเป็นพิษต่อ** Jurkat **โดยวิธี** Trypan Blue Exclusion Method

ศึกษาความเป็นพิษของพิเพอรีนต่อ Jurkat โดยบ่มเซลล์ที่สภาวะต่างๆ กันเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการย้อมเซลล์ด้วย trypan blue stain และตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ไม่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%cytotoxicity) ดังสมการข้างต้น ผลที่ได้แสดงดังรูป 4.10

จากการทดลองพบว่า เมื่อบ่มเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบและในสภาวะที่มีพิเพอรีน 20 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าเท่ากับ 44.5 ± 6.76% และ 21.8 ± 4.50% ตามลำดับ แสดงว่าพิเพอรีนมีผลทำให้จำนวนเซลล์ลดลง (ดังรูปที่ 4.10)

นอกจากนี้ยังพบว่าในทุกสภาวะการทดสอบ ไม่พบเซลล์ที่ไม่มีชีวิต และมี %Viability เท่ากับ 100 ในทุกสภาวะ แสดงว่าพิเพอรีนมีผลทำให้การเจริญของเซลล์ลดลงโดยมิได้เป็นพิษต่อเซลล์แต่อย่างใด



รูปที่ 4.10 แสดงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ Jurkat ในสภาวะต่างๆ ได้แก่ 1) พิเพอรีน 20 µg/ml 2) ยา Paclitaxel 30 nM และ Camptothecin 145 nM (positive control) และ 3) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบใดๆ (negative control) เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบ 4 ครั้ง * ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปได้ว่า เมื่อทดสอบด้วยพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20 µg/ml จะส่งผลให้จำนวน H9 ลดลง และพิเพอรีนมีความเป็นพิษต่อ H9 ทำให้เซลล์ตายเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามเมื่อทดสอบด้วยพิเพอรีนที่ความเข้มข้นเดียวกันกลับพบว่าจำนวน Jurkat ลดลงแต่พิเพอรีนไม่เป็นพิษต่อ Jurkat แต่อย่างใด เช่นเดียวกับการออกฤทธิ์ของ Paclitaxel และ Camptothecin พบว่ายาทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของ Jurkat ได้ แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์แต่อย่างใด ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาวิจัยผลกระทบของพิเพอรีนต่อกลไกการเจริญของ Jurkat โดยการตรวจสอบผลกระทบของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่างๆ

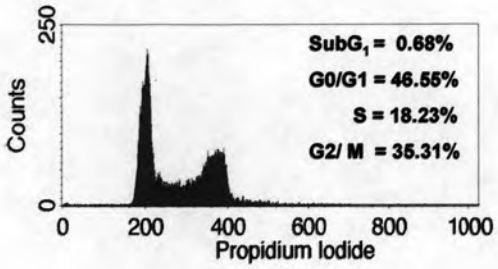
3. ผลกระทบของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่างๆ

จากการทดสอบข้างต้นพบว่าพิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ Jurkat ได้โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการหยุดยั้งการเจริญของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle) ซึ่งตรวจสอบได้โดยการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ (DNA content) ของเซลล์ โดยทำการบ่มเซลล์ในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอและจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะภายหลังการย้อมด้วย Propidium Iodide โดยใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

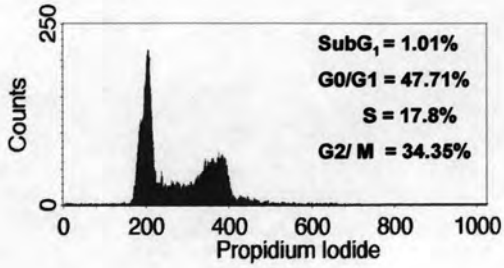
จากการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 และ 100 µg/ml หยุดยั้งการเจริญของ Jurkat ได้ ส่งผลให้เซลล์ในระยะ G_0/G_1 เพิ่มขึ้นเป็น 50.54%, 52.02%, 50.86% และ 56.09% ตามลำดับ เทียบกับ 46.55% ในสภาวะควบคุม (ดังรูปที่ 4.11) เมื่อบ่มเซลล์ครบ 48 ชั่วโมงพบว่า พิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 และ 100 µg/ml หยุดยั้งการเจริญของ Jurkat ได้ ส่งผลให้การเจริญของเซลล์ในระยะ G_0/G_1 เพิ่มขึ้นเป็น 46.05%, 65.57%, 63.11% และ 62.50% ตามลำดับ เทียบกับ 43.79% ในสภาวะควบคุม (ดังรูปที่ 4.12) และเมื่อบ่มเซลล์ครบ 72 ชั่วโมง พบว่าเพอรีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 และ 100 µg/ml ส่งผลให้การเจริญของเซลล์ในระยะ G_0/G_1 เพิ่มขึ้นเป็น 45.49%, 62.63%, 66.26% และ 63.53% ตามลำดับ เทียบกับ 32.47% ในสภาวะควบคุม (ดังรูปที่ 4.13) จะเห็นได้ว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง พิเพอรีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 และ 100 µg/ml หยุดยั้งการเจริญของ Jurkat ไว้ที่ระยะ G_0/G_1 ได้ 13.02%, 30.16%, 33.79% และ 31.06% ตามลำดับ

3.1 ผลของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่างๆ ที่เวลา 24 ชั่วโมง

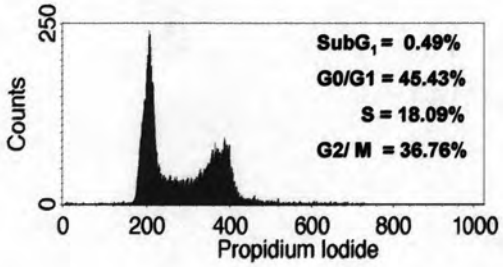
A) control



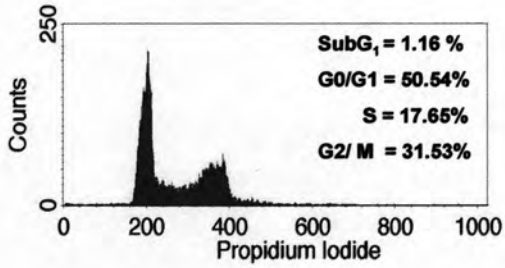
B) 0.2% DMSO



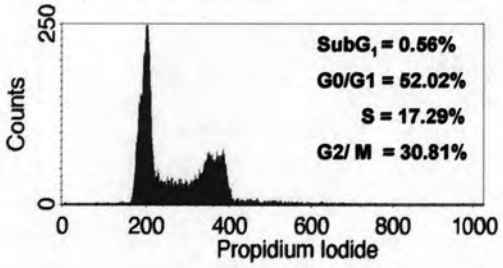
C) 0.5% DMSO



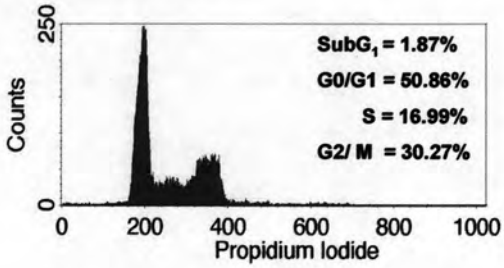
D) พิเพอรีน 20 µg/ml



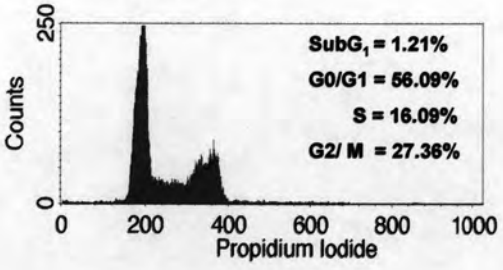
E) พิเพอรีน 40 µg/ml



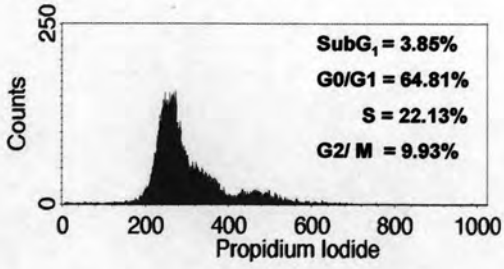
F) พิเพอรีน 80 µg/ml



G) พิเพอรีน 100 µg/ml



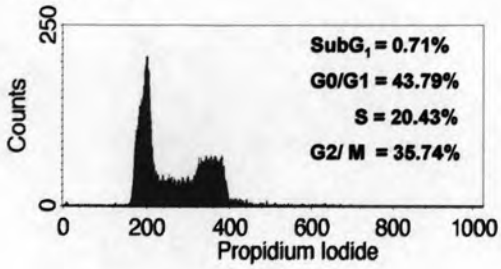
H) Camptothecin 145 nM



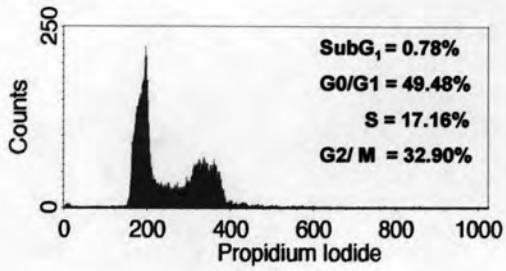
รูปที่ 4.11 แสดงผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยการย้อม propidium iodide และศึกษาจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ผลที่ได้แสดงในรูปของเปอร์เซนต์เซลล์ในแต่ละระยะ จากการทดสอบ 1 ใน 2 ครั้ง

3.2 ผลของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง

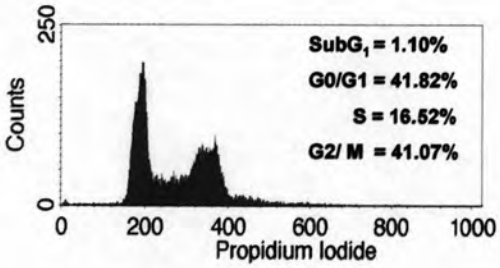
A) control



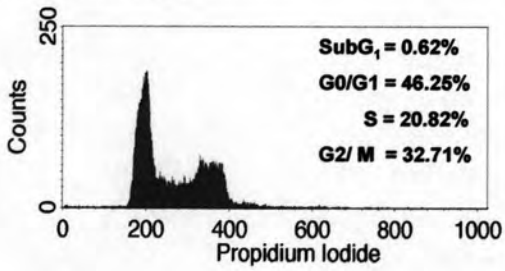
B) 0.2% DMSO



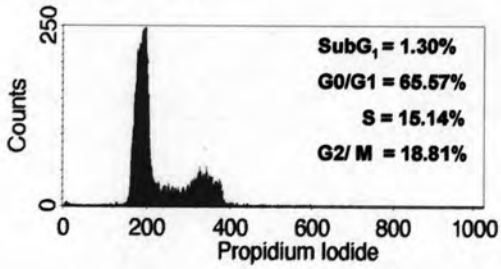
C) 0.5% DMSO



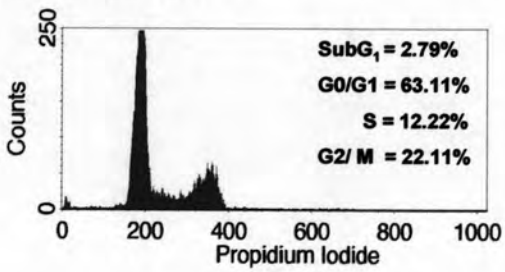
D) พิเพอรีน 20 µg/ml



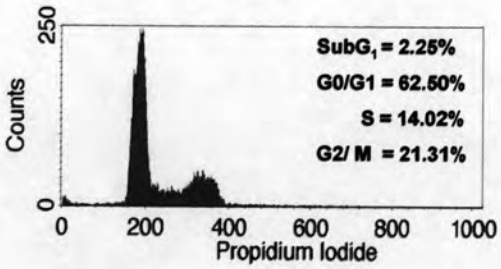
E) พิเพอรีน 40 µg/ml



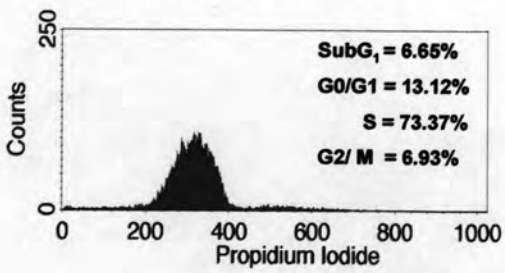
F) พิเพอรีน 80 µg/ml



G) พิเพอรีน 100 µg/ml

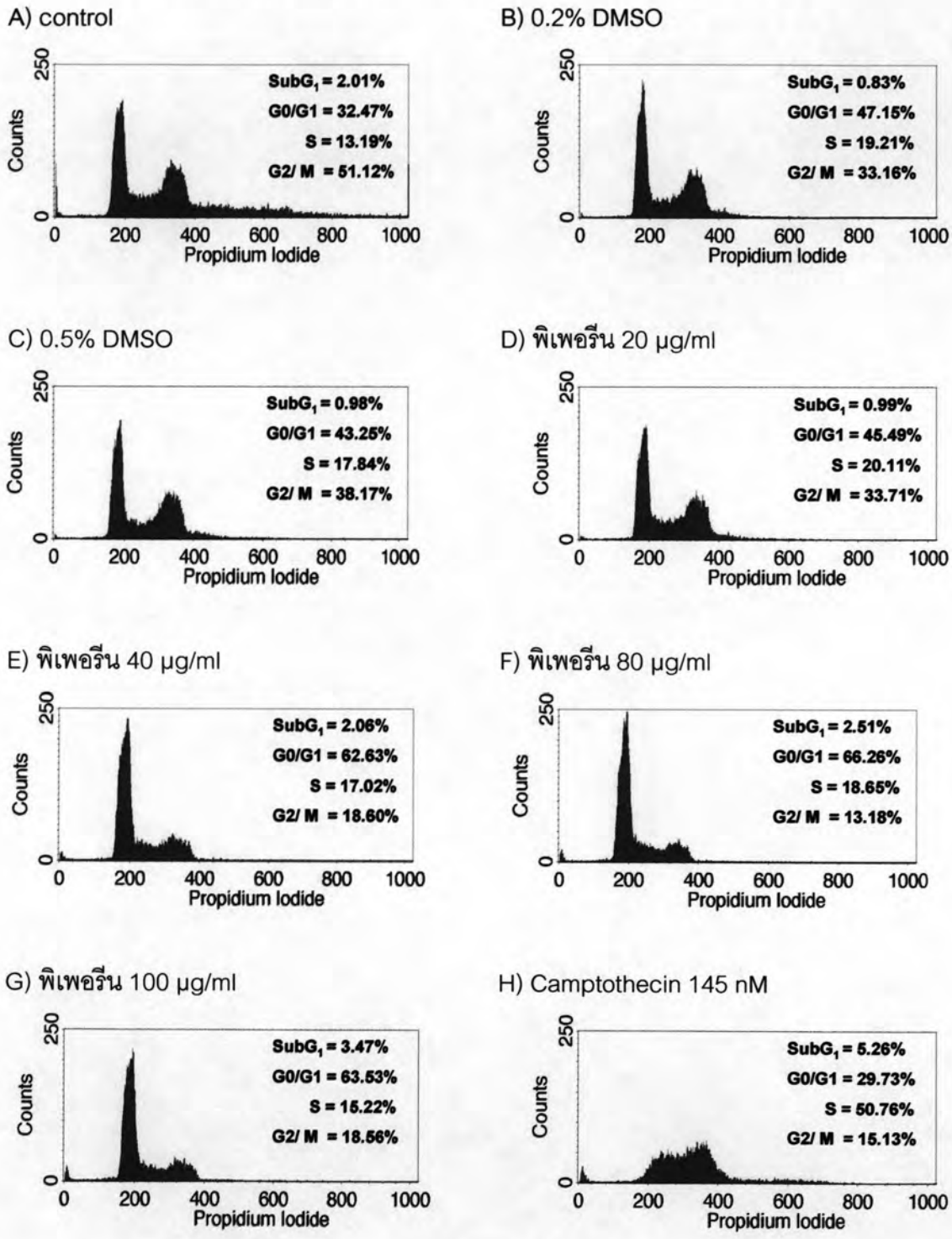


H) Camptothecin 145 nM



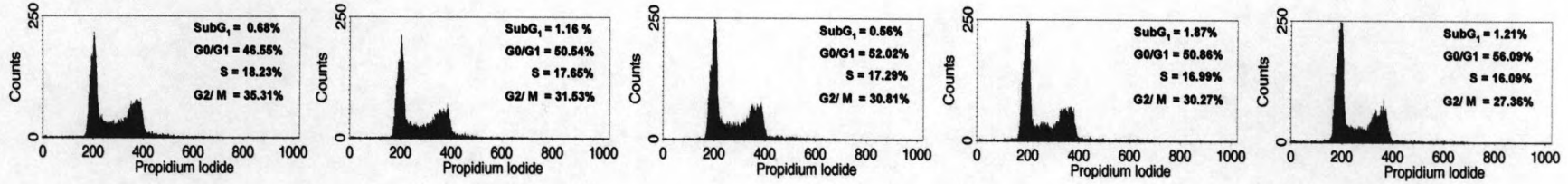
รูปที่ 4.12 แสดงผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยการย้อม propidium iodide และศึกษาจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ผลที่ได้แสดงในรูปของเปอร์เซนต์เซลล์ในแต่ละระยะ จากการทดสอบ 1 ใน 2 ครั้ง

3.3 ผลของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่างๆ ที่เวลา 72 ชั่วโมง

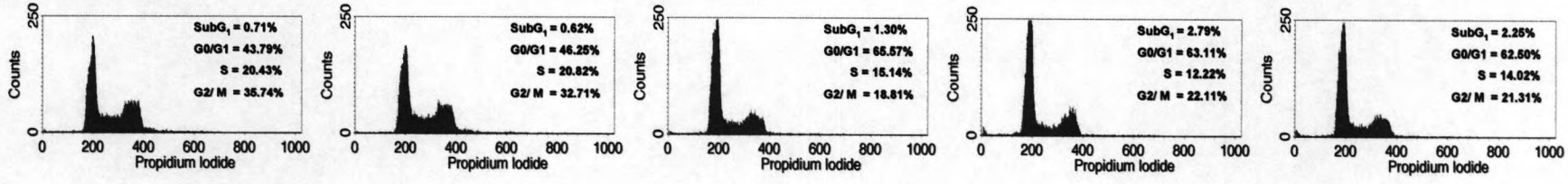


รูปที่ 4.13 แสดงผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยการย้อม propidium iodide และศึกษาจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ผลที่ได้แสดงในรูปของเปอร์เซนต์เซลล์ในแต่ละระยะ จากการทดสอบ 1 ใน 2 ครั้ง

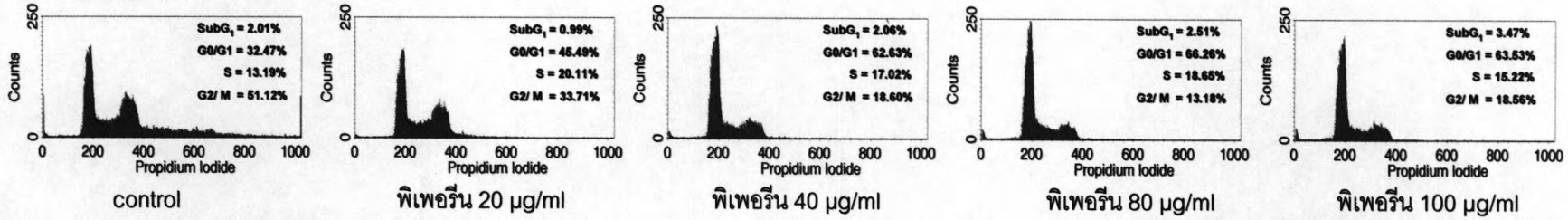
A) 24 ชั่วโมง



B) 48 ชั่วโมง



C) 72 ชั่วโมง



control พิเพอรีน 20 µg/ml พิเพอรีน 40 µg/ml พิเพอรีน 80 µg/ml พิเพอรีน 100 µg/ml

รูปที่ 4.14 แสดงผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยการย้อม propidium iodide และศึกษาจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ เมื่อบ่มเซลล์ในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา A) 24 ชั่วโมง B) 48 ชั่วโมง C) 72 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในรูปของเปอร์เซนต์เซลล์ในแต่ละระยะ จากการทดสอบ 1 ใน 2 ครั้ง

แสดงว่าพิเพอรีนมีผลทำให้เกิดการหยุดชะงักของเซลล์ที่ระยะ G_0/G_1 นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อบ่มเซลล์ด้วยพิเพอรีน 100 µg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มี Apoptotic cells ซึ่งจัดอยู่ในระยะ Sub G_1 เพิ่มขึ้นเป็น 1.20%, 2.25% และ 3.47% ตามลำดับ

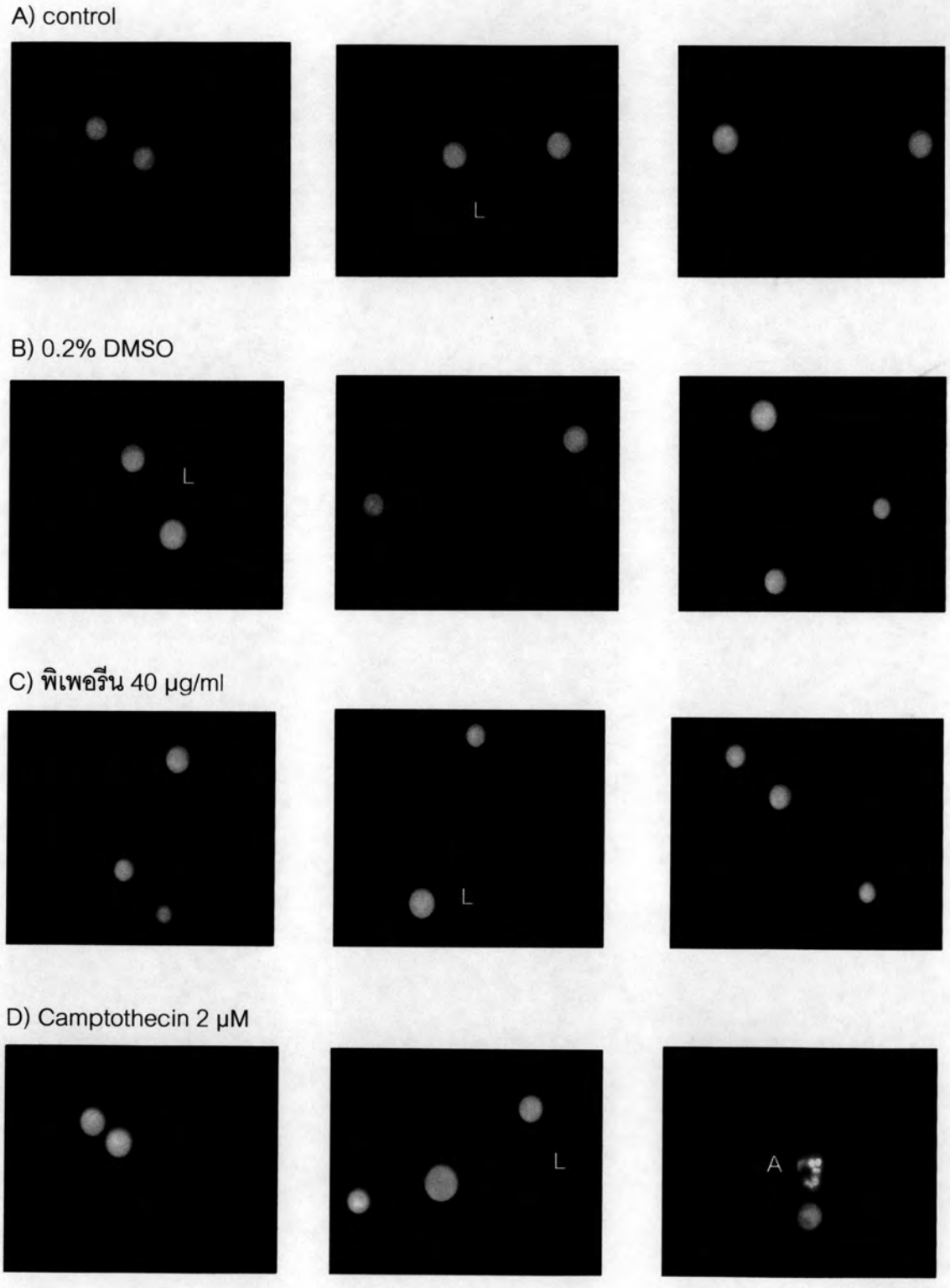
4. ผลการศึกษาฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อการเกิด Apoptosis

4.1 ผลการตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ (Cell morphology) ผ่าน Fluorescent Microscope

การศึกษาผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat ทำได้โดยการย้อมเซลล์ด้วย Acridine orange/Ethidium bromide ภายหลังการบ่มเซลล์ด้วยพิเพอรีนเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบรูปร่างและลักษณะของเซลล์ภายใต้ Fluorescent Microscope จะพบว่า Live cells หรือเซลล์ที่มีชีวิตจะพบนิวเคลียสมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันและย้อมติดสีเขียว (L) Apoptotic cells พบนิวเคลียสมีลักษณะหดเป็นก้อนหรือมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเออยู่ภายใน ย้อมติดสีเขียวหรือส้ม (A) ส่วน Necrotic cells พบนิวเคลียสมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันเหมือนเซลล์ที่มีชีวิต หากแต่ย้อมติดสีส้ม (N)

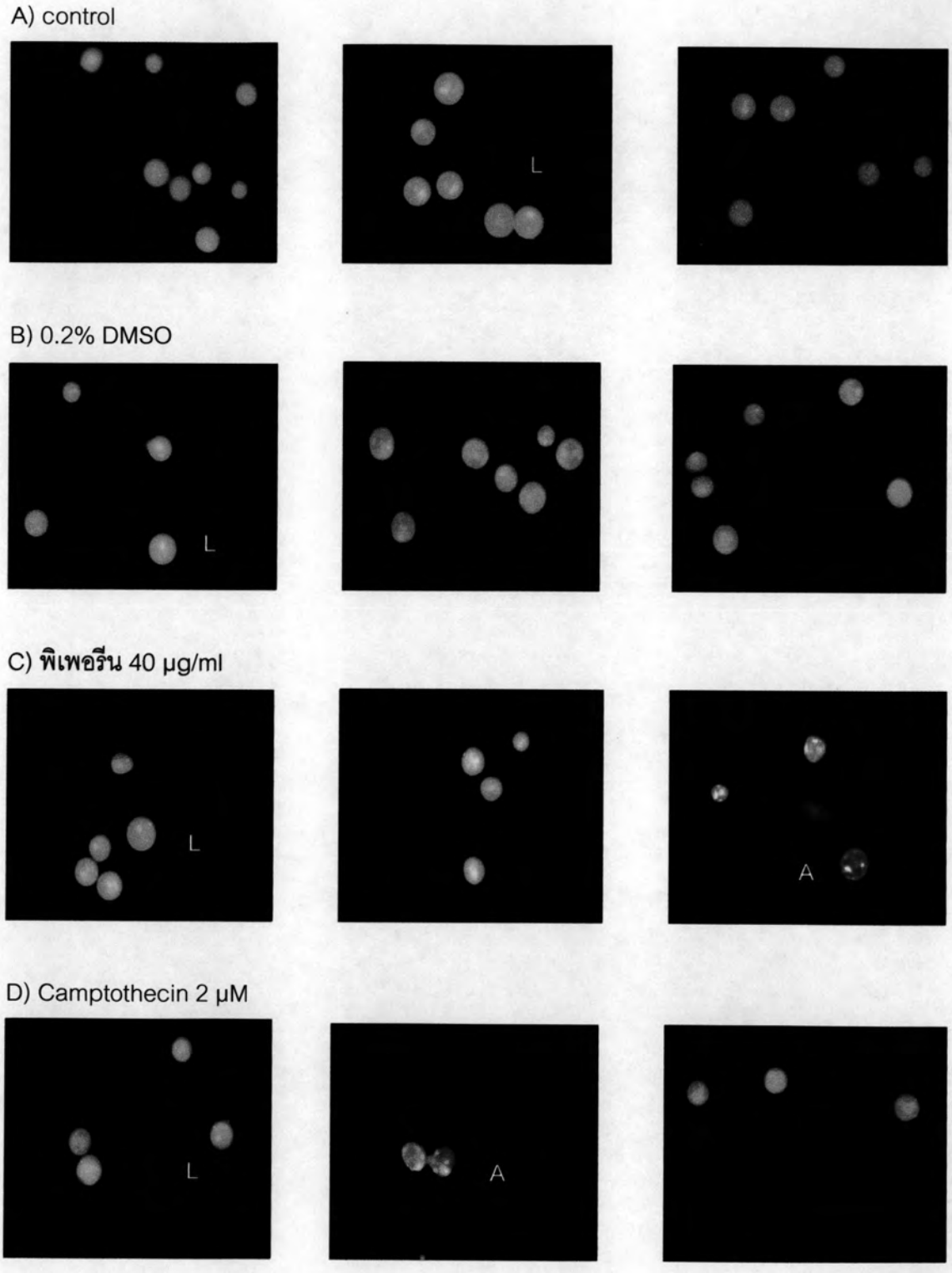
เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยพิเพอรีน 20 µg/ml ไม่พบ Apoptotic cells แต่อย่างใด (ไม่แสดงข้อมูล) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพิเพอรีนเป็น 40 µg/ml ณ เวลา 24 ชั่วโมง ก็ไม่พบ Apoptotic cells เช่นเดียวกัน แต่เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่ามี Apoptotic cells คิดเป็น 1% และ 3% ตามลำดับ (ดังรูปที่ 4.15-4.17)

4.1.1 ผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



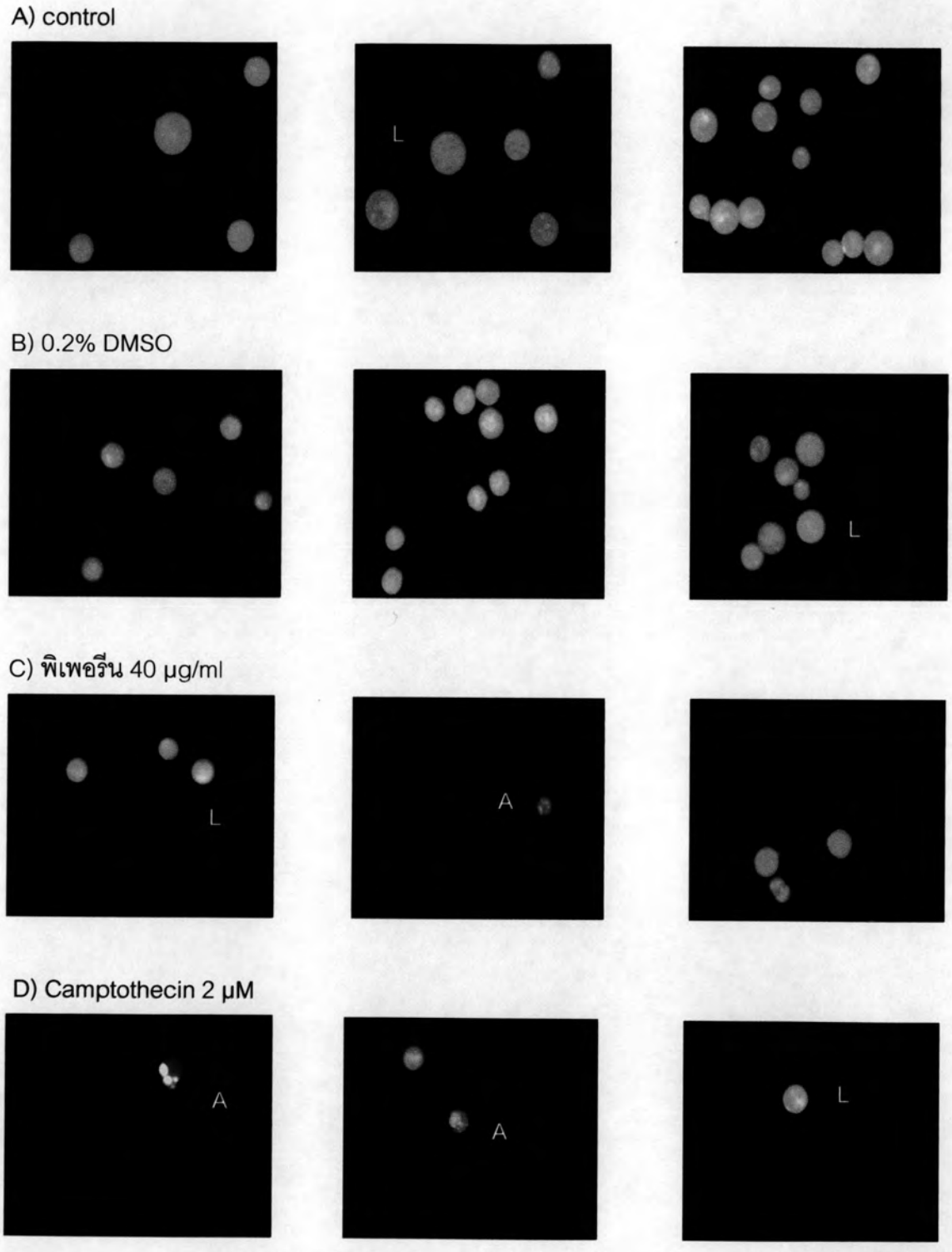
รูปที่ 4.15 แสดงผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat ผ่าน Fluorescent Microscope

4.1.2 ผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.16 แสดงผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat ผ่าน Fluorescent Microscope

4.1.3 ผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



รูปที่ 4.17 แสดงผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat ผ่าน Fluorescent Microscope

4.2 การตรวจสอบ DNA fragmentation โดย Gel electrophoresis

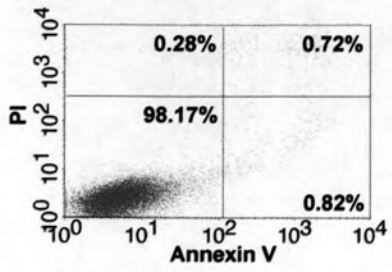
เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการชักนำให้เกิด apoptosis โดยการตรวจสอบการเกิด DNA fragmentation โดย gel electrophoresis เพิ่มเติม ทำการเพาะเลี้ยง Jurkat จำนวน 3×10^6 เซลล์ ในสภาวะที่มี 1) 0.2% DMSO 2) พิเพอรีน 40 µg/ml 3) ยา Camptothecin 2 และ 10 µM (positive control) และ 4) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) เป็นเวลา 6, 12, 18, 24 และ 48 ชั่วโมง สกัดดีเอ็นเอและนำไปตรวจสอบ จากผลการทดสอบ ไม่พบว่ามีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (DNA fragment) ในทุกสภาวะของการทดสอบรวมไปถึง positive control แต่อย่างใด และแม้ว่าจะเพิ่มระยะเวลาและความเข้มข้นของ positive control ในการทดสอบแล้วก็ตาม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเทคนิคหรือชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอ Flexigene DNA kit (QIAGEN, เยอรมัน) ที่เลือกใช้ไม่สามารถตกตะกอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กได้ จึงไม่สามารถตรวจวัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้โดยเทคนิคดังกล่าว ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการปรับเปลี่ยนเทคนิควิธีและน้ำยาที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

4.3 การตรวจสอบ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์

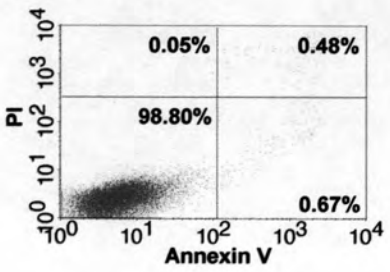
การตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์โดย Annexin V-FITC staining เพื่อยืนยันการเกิด Apoptosis ซึ่งสามารถตรวจสอบได้แม้ในระยะแรกๆ ของการเกิด apoptosis ทำได้โดยการบ่มเซลล์ในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 3, 6, 9, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ย้อมเซลล์ด้วย Annexin V-FITC staining (BD Biosciences, สหรัฐอเมริกา) ตรวจสอบ PS บนผิว Jurkat โดยการตรวจวัดด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ จากผลการทดลองพบว่าพิเพอรีนทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่ชักนำให้เกิด Apoptosis แต่อย่างใด (ดังรูปที่ 4.18-4.20)

4.3.1 ผลการตรวจสอบ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

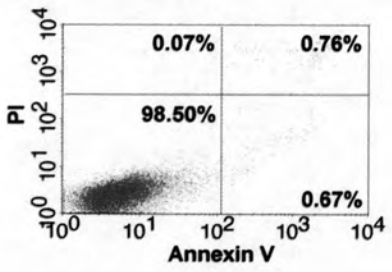
A) control



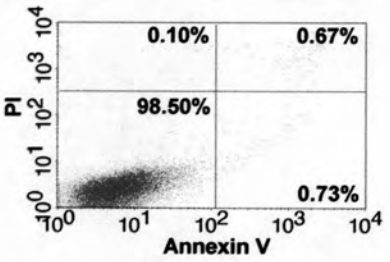
B) 0.5% DMSO



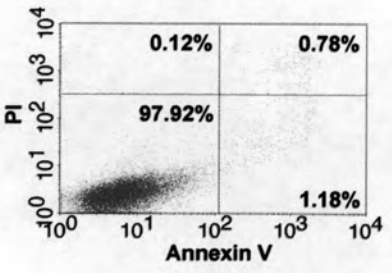
C) พิเพอรีน 20 µg/ml



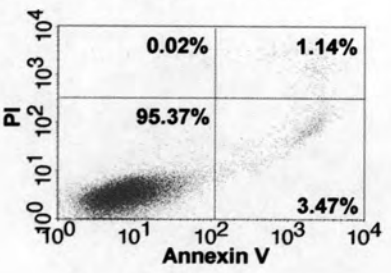
D) พิเพอรีน 40 µg/ml



E) พิเพอรีน 80 µg/ml



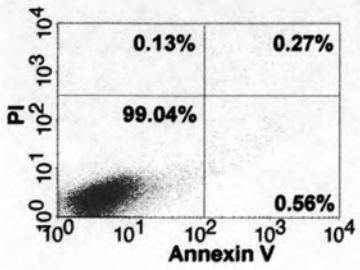
F) Camptothecin 145 nM



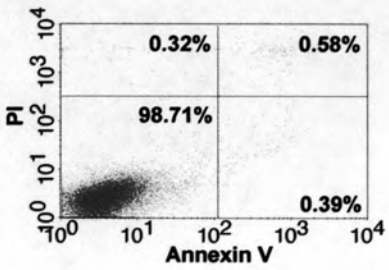
รูปที่ 4.18 แสดงผลการตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์โดย Annexin V-FITC staining

4.3.2 ผลการตรวจสอบ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

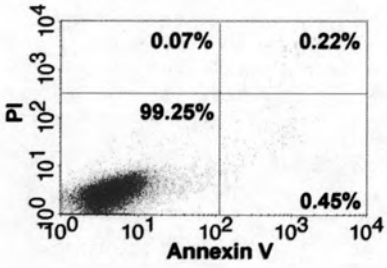
A) control



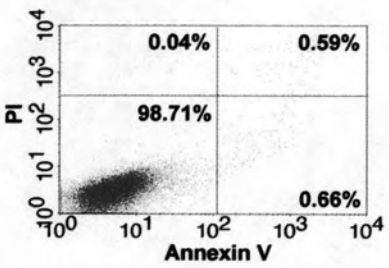
B) 0.5% DMSO



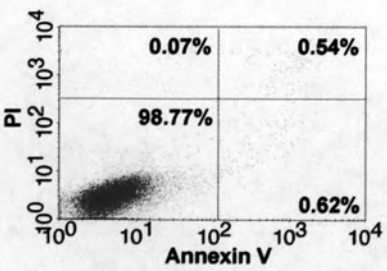
C) พิเพอรีน 20 µg/ml



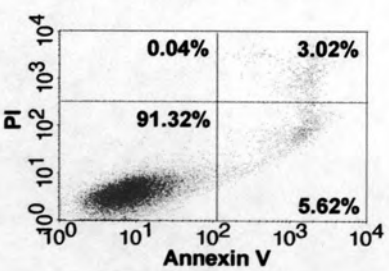
D) พิเพอรีน 40 µg/ml



E) พิเพอรีน 80 µg/ml



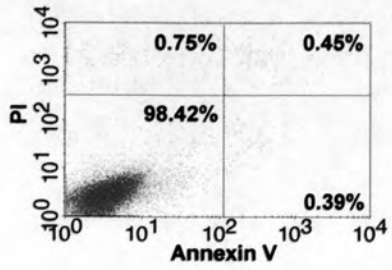
F) Camptothecin 145 nM



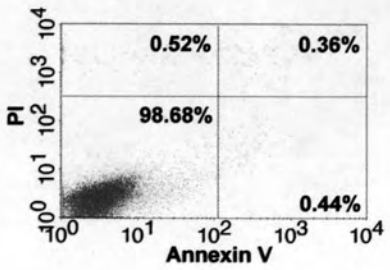
รูปที่ 4.19 แสดงผลการตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์โดย Annexin V-FITC staining

4.3.3 ผลการตรวจสอบ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

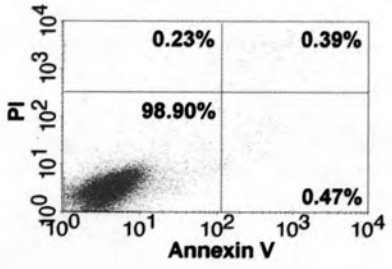
A) control



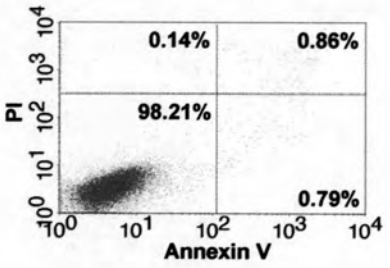
B) 0.5% DMSO



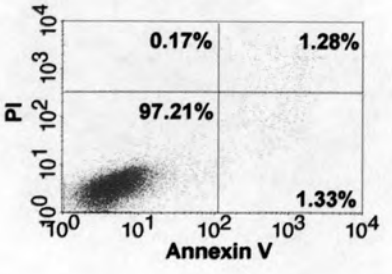
C) พิเพอรีน 20 µg/ml



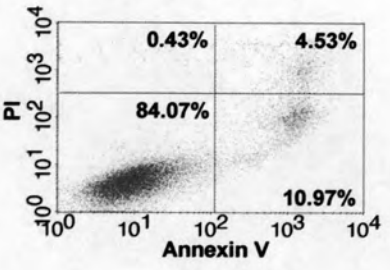
D) พิเพอรีน 40 µg/ml



E) พิเพอรีน 80 µg/ml



F) Camptothecin 145 nM



รูปที่ 4.20 แสดงผลการตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์โดย Annexin V-FITC staining