

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเมลาโนมาA375 ของสารสกัดจากบองขาว
และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร



นางสาวนิษฐา สุขเลิศ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CYTOTOXIC EFFECT OF *COLOCASIA GIGANTEA* EXTRACT AND GOLD
NANOPARTICLE ON MELANOMA A375 CELL LINES.



Miss Kanidta Sooklert

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเมลาโนมา
A375 ของสารสกัดจากบอนขาวและอนุภาคทองคำ
ระดับนาโนเมตร

โดย

นางสาวชนิษฐา สุขเลิศ

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราคูสัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. แพทย์หญิง ปาจรีย์ ลิลิตการตกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. ขจี บิลกศิริ)

ชนิษฐา สุขเลิศ : การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเมลาโนมา A375 ของสารสกัดจากบอนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Cytotoxic effect of *Colocasia gigantea* Extract and Gold Nanoparticle on Melanoma A375 Cell Lines) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. นพ. ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์, อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร.ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 51 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มุ่งศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากบอนขาว (*Colocasia gigantea* Hook f.) ต่อเซลล์มะเร็งและรูปแบบการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้น รวมทั้งทำการศึกษาฤทธิ์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรซึ่งมีการนำมาใช้เป็นตัวนำยาเข้าสู่เซลล์ ในการทดลองนี้นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาใช้ร่วมกับสารสกัดจากบอนขาว โดยทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 แบ่งการทดลองเป็นกลุ่มที่ทำการทดสอบด้วยสารสกัดจากบอนขาว กลุ่มที่ทดสอบด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์โดยใช้เทคนิค MTT colorimetric assay และศึกษารูปแบบการตายของเซลล์โดยการย้อมสี annexin V และ propidium iodide และศึกษาผลด้วยกล้อง confocal microscope และเครื่อง flow cytometer เปรียบเทียบผลกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ผลจากการทดลองพบว่าทั้งสารสกัดจากบอนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ลดลง และเมื่อนำสารสกัดจากบอนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาใช้ร่วมกันพบว่าอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ลดลงมากกว่าการใช้สารสกัดจากบอนขาว หรืออนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพียงอย่างเดียว ส่วนการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 มีรูปร่างเปลี่ยนจากทรงกระสวยเป็นทรงกลม ซึ่งเป็นลักษณะที่แสดงถึงว่าการตายของเซลล์ และการศึกษารูปแบบการตายของเซลล์พบว่าเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้ส่วนมากมีการติดสีย้อมที่แสดงถึงว่าเซลล์มีรูปแบบการตายเป็นแบบอะพอพโทซิส

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนิสิต ชนิษฐา สุขเลิศ

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก

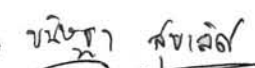
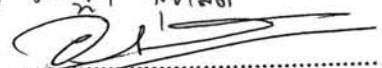
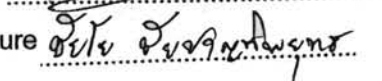
ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5274755030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : *Colocasia gigantea* / Gold Nanoparticle / Melanoma A375

KANIDTA SOOKLERT : Cytotoxic effect of *Colocasia gigantea* Extract and Gold Nanoparticle on Melanoma A375 Cell Lines. ADVISOR : Amornpun Sereemasun, M.D., Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. CHAIYO CHAICHANTIPYUTH, Ph.D. 51 pp.

Colocasia gigantea Hook f. ("Bon Khao" in Thai) is a traditional herb widely found in every region of Thailand. It has been regarded as a useful folk medicine with varied medicinal properties. This study aims to evaluate the cytotoxic effect of *C. gigantea* extract and gold nanoparticles toward A375 melanoma cell line. The effect of gold nanoparticles was studied together with *C. gigantea* extract since previous studies have reported the use of gold nanoparticles as a carrier to help deliver drug molecules into cells. MTT colorimetric assay was used in this study to assess percentage cell viability of the melanoma cells following treatments with *C. gigantea* extract, gold nanoparticles and their mixture (*C. gigantea* extract + gold nanoparticles) for 24 hours. Morphology of the melanoma cells was observed under light microscope. In addition, the mechanism of cell death was also studied by staining with annexin V and propidium iodide and analyzing under confocal microscope as well as with flow cytometer. The experimental result shows that *C. gigantea* extract, AuNPs and their mixture exhibit cytotoxic effect toward the melanoma cell line with statistical significance. The mixture of AuNPs and *C. gigantea* was found to be more effective than the mere treatment with AuNPs or *C. gigantea* extract of the same concentration alone. Following all treatments, the cells' shape was also altered from a spindle-like shape to a more rounded one. From the analysis of flow cytometer results and confocal images, the major mechanism of cell death following all treatment conditions is by means of apoptosis.

Field of Study : <u>Medical Science</u>	Student's Signature 
Academic Year : <u>2010</u>	Advisor's Signature 
	Co-advisor's Signature 

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้อย่างสมบูรณ์เพราะได้รับคำแนะนำทั้งทางด้านวิชาการ ความเอื้อเฟื้อเพื่อดำเนินเครื่องมือ วัสดุดิบ และสถานที่สำหรับการทำงานวิจัย อีกทั้งยังได้รับความช่วยเหลือแนะแนวทางในการทำวิจัยจากผู้ทรงคุณวุฒิในด้านต่างๆเป็นอย่างดีได้ด้วยความกรุณาของผู้มีพระคุณ ดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของงานวิจัยนี้ ให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในหลายสิ่งหลายอย่างจนกระทั่งงานนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ท่านอื่นๆ ทั้งในและนอกภาควิชากายวิภาคศาสตร์ที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ เพื่อเตรียมความพร้อมในการทำวิทยานิพนธ์อย่างมีคุณภาพ

ขอขอบคุณนายชฎานนท์ งามเบญจวงศ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย การเก็บรวบรวมข้อมูล และให้คำแนะนำในหลายๆเรื่อง

ขอขอบคุณนางสาวณัฐนิชา ห่วงงาม ที่ให้ความช่วยเหลือเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณนางสาวนารีธร อุดมทองสุข นางสาวชุลีปราง แตนลาดแก้ว นายธีระเดช ชมหวาน นายมงคล พงษ์สุชาติ ที่คอยให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือ และคอยให้คำแนะนำที่ดีเสมอ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว “สุขเลิศ” ที่เลี้ยงดู ให้โอกาส ให้คำแนะนำ สนับสนุน และเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
คำถามของการวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
คำสำคัญ.....	3
รูปแบบการวิจัย.....	3
ผลและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
บอนขาว.....	4
นาโนเทคโนโลยี.....	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	9
พืชตัวอย่าง.....	9
การสกัดสาร.....	9
การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	11
การตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้.....	12
การเพาะเลี้ยงเซลล์เมลานوما A375.....	13
การศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์.....	14
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์.....	15
การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์.....	17
ลำดับขั้นตอนการวิจัย.....	18
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	20
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	21
การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	21

สารสกัดจากบอขนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลง	23
รูปร่างลักษณะของเซลล์.....	24
ผลของสารสกัดจากบอขนขาว.....	25
ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	26
ผลของสารสกัดจากบอขนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	27
ผลการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์.....	27
ผลของสารสกัดจากบอขนขาว.....	29
ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยโซเดียมโบโรไฮไดรด์..	30
ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยโซเดียมซิเตรท.....	31
ผลของโซเดียมซิเตรทต่อเซลล์เชื้อสายชนิดต่างๆ.....	32
ผลของสารสกัดจากบอขนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	33
การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์.....	34
ผลการศึกษาารูปแบบการตายของเซลล์ภายใต้กล้อง confocal microscope....	35
การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer.....	37
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	37
อภิปรายผลการวิจัย.....	43
สรุปผลการวิจัย.....	44
ข้อเสนอแนะ.....	45
รายการอ้างอิง.....	48
ภาคผนวก.....	51
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชในวงศ์ Araceae.....	5
2	วัสดุนาโน (nanomaterial) ที่นำมาประยุกต์ใช้ในด้านชีววิทยาและด้าน การแพทย์ ที่บริษัทต่างๆผลิตขึ้นและจำหน่าย.....	7
3	แสดงการแปลผลรูปแบบการตายของเซลล์จากการติดสีย้อม.....	17



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบอนขาว.....	5
2	Flow diagram แสดงการเตรียมการสกัดสารจากต้นบอนขาว.....	10
3	แสดงเครื่องบดพืช (a) และเครื่องระเหยสาร (b).....	10
4	แสดงการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	11
5	แสดงเครื่อง UV/Vis spectrophotometer.....	12
6	แสดงอุปกรณ์และเครื่องใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์.....	13
7	แสดงกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่ใช้ในการถ่ายภาพเซลล์.....	14
8	แสดงเครื่อง spectrophotometer ที่ใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง.....	15
9	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์มีชีวิตกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร.....	16
10	แสดงเครื่องที่ใช้ศึกษารูปแบบการตายของเซลล์.....	17
11	แสดงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม.....	18
12	แสดงขั้นตอนการศึกษาผลของสารสกัดจากบอนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็ง A375.....	19
13	แสดงผลจากการทดสอบอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	21
14	แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ A375 หลังจากได้รับสารสกัดจากบอนขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	23
15	แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ A375 หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	24
16	แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ A375 หลังจากได้รับสารสกัดจากบอนขาว, อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	25
17	แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ A375 หลังจากบ่มด้วยสารสกัดจากบอนขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทดสอบด้วยวิธี MTT colorimetric assay.....	27
18	แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ A375 หลังจากบ่มด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ใช้ sodium borohydride เป็น stabilizer ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทดสอบด้วยวิธี MTT colorimetric assay.....	28
19	แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ A375 หลังจากบ่มด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่ใช้ trisodium citrate dihydrate เป็น stabilizer ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทดสอบด้วยวิธี MTT colorimetric assay.....	29

ภาพที่		หน้า
20	แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ A375, C33, SiHa และ THP1 หลังจากบ่มด้วยสารละลาย trisodium citrate dihydrate นาน 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบด้วยวิธี MTT colorimetric assay.....	30
21	แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ A375 หลังจากบ่มด้วยสารสกัดจากบอนขาวอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และสารสกัดจากบอนขาวที่ผสมรวมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร แล้วทดสอบด้วยวิธี MTT colorimetric assay.....	31
22	แสดงการติดสีของเซลล์ A375 หลังจากย้อมด้วย Annexin V และ Propidium iodide ภายใต้กล้อง confocal microscope.....	33
23	แสดง two-parameter dot plot ของการตายของเซลล์ A375 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากบอนขาว และ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	34


 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

DNA = Deoxyribonucleic acid

RNA = Ribonucleic acid

PEI = Polyethylenimine

VEGF = Vascular endothelial growth factor

DI = Deionized Water

TEM = Transmission electron microscope

MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

OD = Optical Density



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

บอนขาว (*Colocasia gigantea* Hook.f) เป็นพืชในสกุล (genus) *Colocasia* และอยู่ในวงศ์ (family) *Araceae* มีชื่อเรียกอื่นๆ เช่น กระดาดขาว ออกติบ หรือคูน เป็นต้น ลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นสั้นป้อม แต่ใบขนาดใหญ่มาก ใบเป็นรูปไข่แกมรูปหัวใจ ปลายใบกลม โคนใบเว้า เป็นรูปหัวใจ ยาวได้ถึง 180 เซนติเมตร สีเทาอ่อน หรือเขียวอมขาว เนื้อใบบาง ก้านใบใหญ่ สีอ่อน ยาวประมาณ 120 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อหลายช่อ ลักษณะเป็นแท่งยาว กลิ่นหอม สีขาวหรือสีส้ม พบได้ทั่วไปในเขตร้อนทวีปเอเชีย ส่วนในประเทศไทยพบได้ทุกภาค (ลีนา ผู้พัฒนาพงศ์, 2522)

บอนขาวเป็นพืชที่พบได้มากในประเทศไทย ปลูกได้ง่าย เจริญเติบโตรวดเร็วชาวบ้านนิยมปลูกเพราะสามารถนำมาประกอบอาหารได้ โดยทั่วไปคนไทยนิยมนำบริเวณส่วนของก้านใบมาประกอบอาหาร เช่น แกงบอน และมีความเชื่อว่าบอนขาวมีสรรพคุณทางยาหลายอย่าง เช่น ลำต้นใต้ดิน สุมเป็นถ่าน ใช้แก้พิษไข้ พิษตานซาง ลำต้นใต้ดินสดใช้รักษาแผล กัดฝ้า กัดหนอง แก้โรคเกาต์ตามข้อ ภาคเหนือใช้ผลสดฝนกับน้ำผึ้งกินละลายเสมหะ (พะเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ, 2546) และยังพบว่ามิงงานวิจัยที่ทำการศึกษาคูณสมบัติของสารสกัดจากพืชในสกุลเดียวกับบอนขาว เช่น การศึกษาสารสกัดของเผือก (*Colocasia esculenta*) ซึ่งเป็นพืชต่างชนิดกับบอนขาวแต่จัดอยู่ในสกุลเดียวกัน พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย (Wei *et al.*, 2010) ต้านเชื้อรา (Masui *et al.*, 1989) ต้านการสร้างเมลานิน (Kim *et al.*, 2010) และที่น่าสนใจคือมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง (Brown *et al.*, 2005)

ปัจจุบันความรู้เรื่องฤทธิ์ของบอนขาวในแง่การนำมาประยุกต์ใช้เป็นยาสมุนไพรเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านที่ยังไม่มีงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ยืนยันผลในการนำสารสกัดจากบอนขาวมารักษาโรค งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะดูฤทธิ์ของสารสกัดจากบอนขาว เพื่อนำมาศึกษาว่ามีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่นที่อยู่ในสกุลเดียวกันกับบอนขาวหรือไม่ โดยเลือกศึกษาในเซลล์มะเร็งผิวหนัง

อีกด้านหนึ่ง ในยุคปัจจุบันมีการประยุกต์นำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และทางการแพทย์เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคเพิ่มขึ้นอย่างแพร่หลาย นาโนเทคโนโลยีเป็นเทคโนโลยีประยุกต์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจัดการ การสร้างวัสดุที่มีขนาดเล็กมากในระดับนาโนเมตร เทียบเท่ากับระดับอนุภาคของโมเลกุลหรืออะตอม รวมถึงการออกแบบหรือการใช้เครื่องมือสร้างวัสดุที่มีขนาดเล็กมาก หรือการจัดเรียงอะตอมและโมเลกุลในตำแหน่งที่ต้องการได้อย่างถูกต้องแม่นยำ (Roco *et al.*, 2003; Powell และ Kanarek, 2006a, 2006b) ทำให้โครงสร้างของวัสดุที่ได้มีคุณสมบัติที่พิเศษขึ้นทั้งทางด้านฟิสิกส์ เคมีและชีวภาพ ทำให้มีประโยชน์อย่างมากในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ทั้งทางด้านอุตสาหกรรม เทคโนโลยีคอมพิวเตอร์ เทคโนโลยีชีวภาพ และทางการแพทย์ ซึ่งวัสดุนาโนมีหลายชนิด ได้แก่ ท่อนาโน เส้นใยนาโน และอนุภาคนาโน เป็นต้น

อนุภาคนาโนของธาตุโลหะ เช่น ทองคำ เงิน แพททินัม เป็นกลุ่มหนึ่งของวัสดุนาโนที่มีการนำมาใช้มากในทางการแพทย์ ซึ่งวัสดุเหล่านี้เป็นอนุภาคที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตร และมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่พิเศษขึ้น เช่น การมีสีที่จำเพาะที่ช่วงคลื่นต่างๆ เมื่อขนาดของอนุภาคนาโนเปลี่ยนแปลงไป มีพื้นที่ผิวมากขึ้น มีความสามารถในการนำไฟฟ้า มีคุณสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Smith *et al.*, 2006) ดังนั้นจึงถูกนำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์ โดยติดฉลากด้วยสารชีวโมเลกุล หรือยาต่างๆ ตัวอย่างการศึกษา เช่น การนำอนุภาค palladium และ platinum มาใช้เป็น catalysts (Narayanan *et al.*, 2005) การพัฒนา glucose sensors โดยใช้ silver nanoparticles (Aslan *et al.*, 2004) และที่นิยมอย่างแพร่หลาย คือ การนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (gold nanoparticle; AuNPs) มาใช้ในการนำส่งยา (Han *et al.*, 2007) เพื่อรักษาโรคต่างๆ

ในอดีตที่ผ่านมา มีการนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาศึกษาฤทธิ์ในการนำส่งยา รักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (6-Mercaptopurine) พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีคุณสมบัติทำให้ยาเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น โดยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะไปเพิ่ม intracellular transport จึงช่วยลดปริมาณยาที่ผู้ป่วยต้องรับประทานและทำให้เกิดผลข้างเคียงของยาลดน้อยลง (Podsiadlo *et al.*, 2008) แต่จากการศึกษาที่ผ่านมา ยังไม่เคยมีการศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากบอนขาว หรืออนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และยังไม่เคยมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งเมื่อมีการนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาใช้ร่วมกับสารสกัดจากบอนขาวมาก่อน ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนหัวของบอนขาวที่มีต่อเซลล์มะเร็ง โดยดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ความเป็นพิษต่อเซลล์ และรูปแบบการตายของเซลล์ รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวในการตอบสนองต่อการใช้สารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

คำถามของการวิจัย (Research Question)

สารสกัดจากบอนขาว และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้หรือไม่ และหากสารสกัดจากบอนขาว และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้จะมีรูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งเป็นแบบใด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

- 1.1 เพื่อการศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากบอนขาว
- 1.2 เพื่อการศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
- 1.3 เพื่อการศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
- 1.4 เพื่อศึกษารูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาว, อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และเซลล์มะเร็งที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

คำสำคัญ (Key Word)

Colocasia gigantea

Gold Nanoparticle

Melanoma A375

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research)

ผลและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Expected Benefits and Application)

การศึกษานี้ทำให้ได้ความรู้เกี่ยวกับผลของสารสกัดจากบอนขาว และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็ง และรูปแบบการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้มาพัฒนาหาแนวทางในการรักษาโรคมะเร็ง หรือโรคอื่นๆให้มีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้นต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บอนขาว (*Colocasia gigantea* Hook.f)

บอนขาวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Colocasia gigantea* Hook.f เป็นพืชในวงศ์ Araceae มีชื่ออังกฤษว่า Giant Elephant's Ears และชื่ออื่นๆที่เรียกตามภูมิภาคได้แก่ คุณ(อีสาน) ตูน (เหนือ) ออกดิบ(ใต้) กระดาดขาว(กาญจนบุรี) กะเอาะขาว (ชุมพร) บอน (ประจวบคีรีขันธ์) หัวคุณ(กลาง)พบได้ทั่วไปในเขตร้อนทวีปเอเชีย ส่วนในประเทศไทยพบได้ทุกภาค เป็นไม้ที่ชอบสภาพชุ่มชื้น งามงามได้ตลอดปีถ้ามีน้ำเพียงพอ ขยายพันธุ์โดยการแยกหน่อ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชในวงศ์ Araceae เป็นพืชอวบน้ำ ล้มลุก ขนาดกลางหรือขนาดใหญ่ มีหัวใต้ดินเป็นแบบ corm, tuber หรือ rhizome ทุกส่วนของลำต้นมักมีน้ำยางคั้นสีใส ซึ่งเมื่อถูกลมจะเปลี่ยนสีน้ำตาลแดง ชอบขึ้นอยู่ในที่ร่มชื้น มีน้ำแฉะ บางชนิดเป็นพืชน้ำ ลำต้นมีลักษณะเป็นหัวอยู่ใต้ดิน มักสะสมสารพวกแป้งไว้มากและมียางคั้นเป็นเมือกปะปนอยู่ ใบเป็นใบเดี่ยวหรือใบประกอบ รูปใบแบบ hastate, sagittate หรือ cordate ขึ้นมาจากหัวใต้ดินหรือลำต้นตอนเหนือดิน ใบมีขนาดใหญ่ ก้านใบยาว และมีเนื้อเยื่อก้านใบเป็นเยื่อพรุน ช่อดอกเป็นแบบ spadix มีกาบประดับขนาดใหญ่ ดอกย่อยมีขนาดเล็ก อาจมีเพศเดี่ยวหรือสองเพศครบ ถ้าเป็นดอกเพศเดี่ยวจะไม่มีกลีบ ถ้าเป็นดอกเพศครบมีกลีบรวมเป็นกาบเล็กๆ 4-6 อัน อาจแยกกันหรือติดกัน เกสรตัวผู้มี 2 หรือ 4 หรือ 8 อัน ก้านเกสรเชื่อมติดกันตอนโคนหรือตลอดก้าน บางชนิดเกสรอาจลดรูปรวมกันเหลือเพียง 1-2 อัน ดอกตัวผู้มักอยู่ตอนครึ่งบนของช่อดอก เกสรตัวเมียมีรังไข่ 1 อันภายในมี 1-3 ห้องเชื่อมติดกัน รังไข่เป็นแบบ superior มีเมือค้ำไขน้อย เมล็ดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในเยื่อเมือก albuminous หรือ axalbuminous ฤดูออกดอก-ผล ไม่จำกัดเวลา ตัวอย่างของพืชในวงศ์นี้ดังแสดงใน ตารางที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชในวงศ์ Araceae

ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์
ว่านน้ำ	<i>Acorus calamus</i> Linn.
บุก	<i>Amorphophallus campanulatus</i> Bl.
บอนเขียว	<i>Colocasia antiquorum</i> .
เผือก	<i>Colocasia esculenta</i> Schoott.
บอนขาว, กระดาดขาว	<i>Colocasia gigantean</i> Hook. f.
ว่านเขียวหมื่นปี	<i>Dieffenbachia seguone</i> Schott.
เสนห์จันทร์แดง	<i>Homalomena rubescens</i> Kunth.
ผักหนาม	<i>Lasia spinosa</i> Thw.
จอก, จอกผักกาด	<i>Pistia stratiotes</i> Linn.
บอนแก้ว	<i>Typhonium roxburghii</i> Schott.
อุตุพิศ	<i>Typhonium trilobatum</i> Schott.

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบอนขาวเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นสั้นป้อม แต่ใบขนาดใหญ่มาก ใบเป็นรูปไข่แกมรูปหัวใจ ปลายใบกลม โคนใบเว้าเป็นรูปหัวใจ ยาวได้ถึง 180 ซม. สีเทาอ่อน หรือเขียวอมขาว เนื้อใบบาง ก้านใบใหญ่ สีอ่อน ยาวประมาณ 120 ซม. ดอกออกเป็นช่อหลายช่อ ลักษณะเป็นแท่งยาว กลิ่นหอม สีขาวหรือสีส้ม ปลายช่อดอกเป็นรูปกรวยสั้นๆ ดอกเพศผู้อยู่ตอนบน มีจำนวนมาก ดอกเพศเมียอยู่ตอนล่างและมีจำนวนน้อย ระหว่างกลางคั่นด้วยดอกไม่มีเพศ ก้านช่อดอกยาวได้ถึง 30 ซม. ช่อดอกมีกาบหุ้ม กาบยาวกว่าช่อดอก และแบ่งเป็น 2 ตอน ตอนล่างโอบเป็นท่อ สีเขียว ยาวประมาณ 5 ซม. ตอนบนเป็นรูปเรือสีขาว ยาว 7.5 ถึง 13 ซม. ผลมีกลิ่นหอมนำมารับประทานได้



รูปที่ 1: แสดงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบอนขาว

สรรพคุณของบอนขาวแตกต่างกันตามส่วนต่างๆที่นำมาใช้ ได้แก่หัวใต้ดินนำมาสูมไฟเป็นถ่านใช้แก้อิษไข้ พิษร้อนเชื้องซึม พิษตาลทราง หัวใต้ดินสดใช้แก้อโรคเถาดานในท้อง รักษาแผลสด กัดฝ้า หมอพื้นบ้านทางภาคเหนือใช้หัวสดหรือแห้งฝนกับน้ำผึ้ง ใช้ลดเสมหะ รักษาแผล กัดฝ้า กัดหนอง น้ำกัดเท้า เป็นต้น (เพยาร์ เหมือนนวงษ์ญาติ, 2546)

การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากบอนขาวยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้แต่เคยมีการศึกษาพืชในสกุลเดียวกันกับบอนขาวไว้แล้วดังนี้ คือ

Brown *et al.* (2005) ศึกษาสารสกัดจากเผือก (*Colocasia esculenta*) พบว่ามีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง

Wei *et al.* (2010) ศึกษาสารสกัดจากเผือก (*Colocasia esculenta*) พบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

และ Kim *et al.* (2010) ศึกษาสารสกัดจากบอนเขี้ยว (*Colocasia antiquorum*) พบว่ามีฤทธิ์ต้านการสร้างเมลานิน

นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology)

นาโนเทคโนโลยีเป็นเทคโนโลยีประยุกต์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจัดการการสร้างวัสดุที่มีขนาดเล็กมากในระดับนาโนเมตรเทียบเท่ากับระดับอนุภาคของโมเลกุล หรืออะตอม การออกแบบ หรือการใช้เครื่องมือสร้างวัสดุที่มีขนาดเล็กมากรวมถึงการจัดเรียงอะตอมและโมเลกุลในตำแหน่งที่ต้องการได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ(American Society of Testing and Materials [ASTM], 2006) ซึ่งการใช้นาโนเทคโนโลยีทำให้สามารถผลิตวัสดุนาโนได้หลากหลายชนิดและวัสดุนาโนเหล่านี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ ดังนี้

- Fluorescent biological labels
- Drug and gene delivery
- การตรวจหาเชื้อโรค
- การตรวจหาโปรตีน
- การตรวจหา DNA
- Tissue engineering
- การทำลายเซลล์มะเร็งโดยอาศัยความร้อน (hyperthermia)
- Separation and purification of biological molecules and cells
- MRI contrast enhancement

ในปัจจุบันพบว่ามีบริษัทหลายแห่งได้ผลิตและจำหน่ายวัสดุนาโนที่สามารถนำมาใช้ทางการแพทย์ได้ ดังตารางที่ 2 (Salata *et al.*, 2004)

ตารางที่ 2 แสดงถึงวัสดุนาโน (nanomaterial) ที่นำมาประยุกต์ใช้ในด้านชีววิทยาและด้านการแพทย์ ที่บริษัทต่างๆผลิตขึ้นและจำหน่าย

Company	Major area of activity	Technology
Advectus Life Sciences Inc.	Drug delivery	Polymeric nanoparticles engineered to carry anti-tumour drug across the blood-brain barrier
Alnis Biosciences, Inc.	Bio-pharmaceutical	Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery
Argonide	Membrane filtration	Nanoporous ceramic materials for endotoxin filtration, orthopaedic and dental implants, DNA and protein separation
BASF	Toothpaste	Hydroxyapatite nanoparticles seems to improve dental surface
Biophan Technologies, Inc.	MRI shielding	Nanomagnetic/carbon composite materials to shield medical devices from RF fields
Capsulation NanoScience AG	Pharmaceutical coatings to improve solubility of drugs	Layer-by-layer poly-electrolyte coatings, 8–50 nm
Dynal Biotech		Magnetic beads
Eiffel Technologies	Drug delivery	Reducing size of the drug particles to 50–100 nm
EnviroSystems, Inc.	Surface disinfectant	Nanoemulsions
Evident Technologies	Luminescent biomarkers	Semiconductor quantum dots with amine or carboxyl groups on the surface, emission from 350 to 2500 nm
Immunicon	Tracking and separation of different cell types	magnetic core surrounded by a polymeric layer coated with antibodies for capturing cells
KES Science and Technology, Inc.	AiroCide filters	Nano-TiO ₂ to destroy airborne pathogens
NanoBio Corporation	Pharmaceutical	Antimicrobial nano-emulsions
NanoCarrier Co., Ltd	Drug delivery	Micellar nanoparticles for encapsulation of drugs, proteins, DNA
NanoPharm AG	Drug delivery	Polybutylcyanoacrylate nanoparticles are coated with drugs and then with surfactant, can go across the blood-brain barrier
Nanoplex Technologies, Inc	Nanobarcodes for bioanalysis	
Nanoprobes, Inc.	Gold nanoparticles for biological markers	Gold nanoparticles bio-conjugates for TEM and/or fluorescent microscopy
Nanosphere, Inc.	Gold biomarkers	DNA barcode attached to each nanoprobe for identification purposes, PCR is used to amplify the signal; also catalytic silver deposition to amplify the signal using surface plasmon resonance
NanoMed Pharmaceutical, Inc.	Drug delivery	Nanoparticles for drug delivery
Oxonica Ltd	Sunscreens	Doped transparent nanoparticles to effectively absorb harmful UV and convert it into heat
PSiVida Ltd	Tissue engineering, implants, drugs and gene delivery, bio-filtration	Exploiting material properties of nanostructured porous silicone
Smith & Nephew	Acticoat bandages	Nanocrystal silver is highly toxic to pathogens
QuantumDot Corporation	Luminescent biomarkers	Bioconjugated semiconductor quantum dots

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัสดุนาโนชนิดหนึ่งที่มีนิยมนำมาใช้อย่างแพร่หลาย คืออนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เป็นอนุภาคของโลหะหนักที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตร มีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดี สามารถเร่งปฏิกิริยาและไม่เป็นพิษต่อร่างกาย จากคุณสมบัติเหล่านี้จึงทำให้มีการนำอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น การนำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์โดยติดฉลากอนุภาคด้วย antibody หรือ DNA/RNA เพื่อช่วยในการตรวจหาสารชีวโมเลกุลต่างๆในร่างกาย ได้แก่ การตรวจหา antigen หรือ DNA/RNA เป้าหมาย, ใช้เป็นตัวพายาหรือยีนเข้าสู่เซลล์ เพื่อเป็นการรักษาโรคได้ (Daniel และ Astruc, 2004)

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการนำส่งยาและยีน (Drug and gene delivery systems) ทั้งนี้ Letsinger *et al.* (1999) ได้นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรติดกับ Polyethylenimine (PEI) เพื่อใช้เป็น non-viral vector ในการนำ plasmid DNA เข้าสู่ monkey kidney (COS-7) cells จากการทดลองพบว่าประสิทธิภาพในการ transfect ดีขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้ PEI เพียงอย่างเดียว และยังมีการนำอนุภาคทองคำในระดับนาโนเมตรมาใช้ในการนำส่งยาและรักษาโรคต่างๆดังนี้

Koide *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้, เซลล์มะเร็งกระเพาะและเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่า อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยเป็นตัวที่ไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ในช่วง S phase, G2 to M phase, และ M phase

Mukherjee *et al.* (2007) ได้นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาติดกับ anti-VEGF antibody เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis พบว่าเมื่อใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรร่วมกับ anti-VEGF antibody จะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้มากกว่าการใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร หรือ anti-VEGF antibody เพียงอย่างเดียว

Patra *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในการฆ่าเซลล์ มะเร็งปอด พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรสามารถเหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์มะเร็ง

และ Podsiadlo *et al.* (2008) นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาศึกษาฤทธิ์ในการนำส่งยารักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (6-Mercaptopurine) พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีคุณสมบัติทำให้ยาเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น โดยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะไปเพิ่ม intracellular transport จึงช่วยลดปริมาณยาที่ผู้ป่วยต้องรับประทานและทำให้เกิดผลข้างเคียงของยาลดน้อยลง

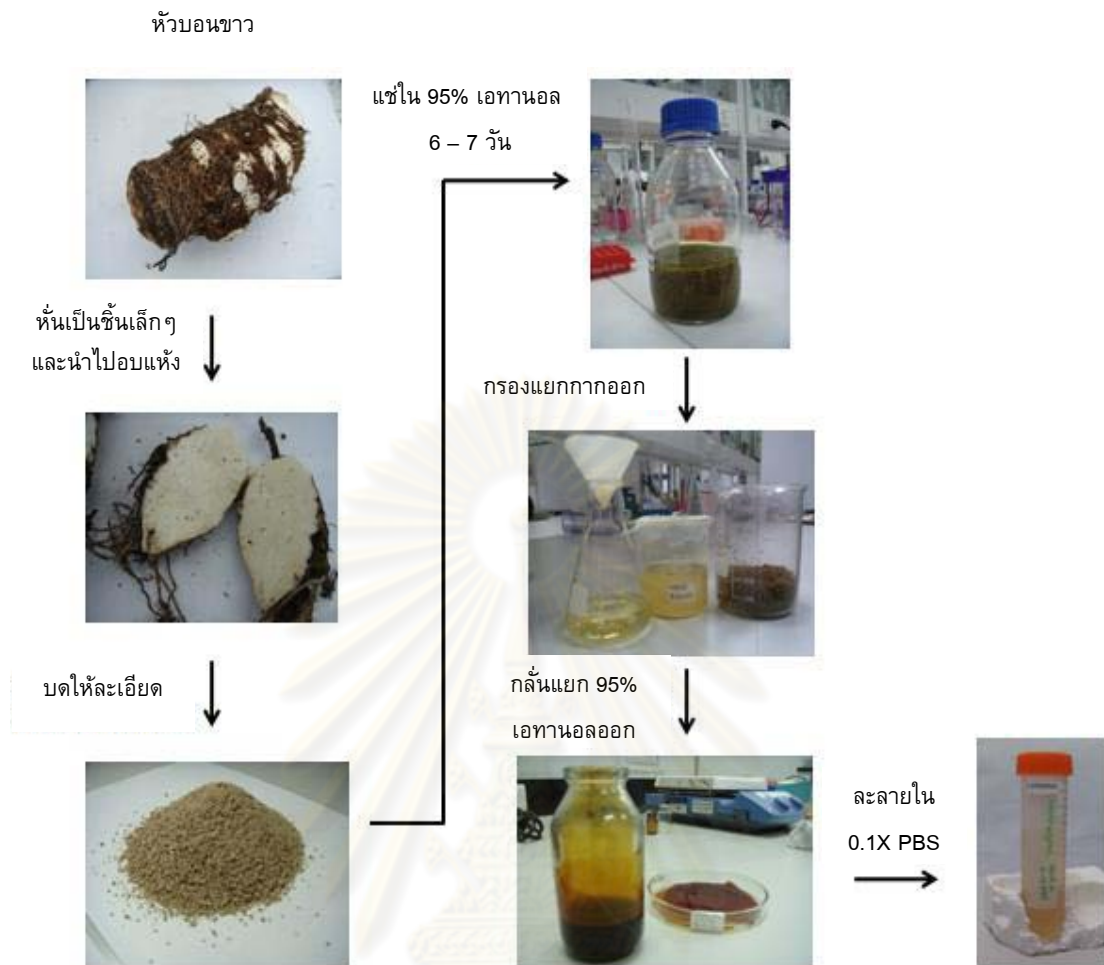
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

พืชตัวอย่าง

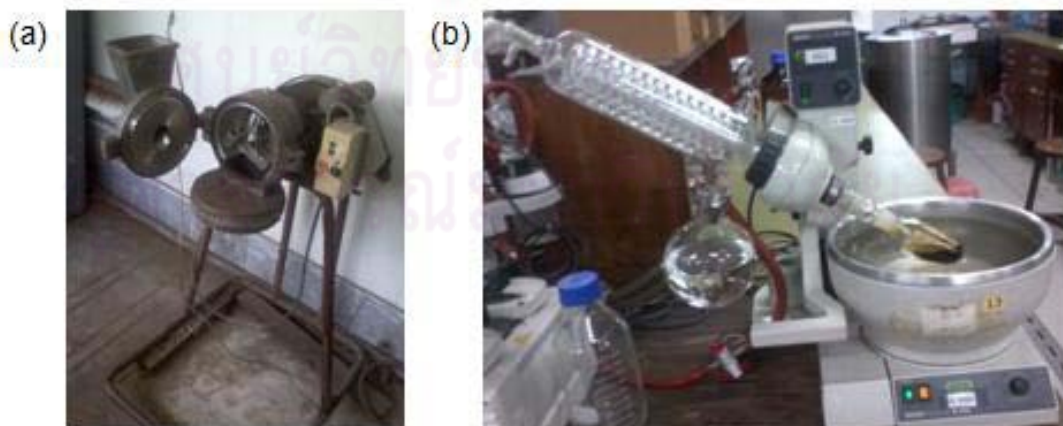
ส่วนหัวของบอนขาวเก็บจาก อ. บ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร ได้ตรงกับตัวอย่างเลขที่ 013425 (BCU) นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปอบแห้งแห้งประมาณ 1-2 วัน จากนั้นนำมาบดให้ละเอียด และนำไปสกัดด้วย 95% เอทานอล (Ethanol)

การสกัดสารจากบอนขาว

บอนขาวที่ผ่านการอบแห้งแล้วนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดพืช จากนั้นสกัดโดยการนำมาแช่ใน 95% เอทานอล ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 6-7 วัน เมื่อครบเวลานำมากรองแยกกากออกโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 11 ไมโครเมตร และกลั่นแยก 95% เอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสาร (rotary evaporator) จะได้สิ่งสกัดในเอทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้มาชั่งน้ำหนัก และละลายใน 0.1X phosphate buffered saline (PBS) โดยเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 2: Flow diagram แสดงการเตรียมการสกัดสารจากต้นบอนขาว



รูปที่ 3: แสดงเครื่องบดพืช (a) และเครื่องระเหยสาร (b)

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยใช้ **trisodium citrate**

ล้างเครื่องแก้วทุกชิ้นและ magnetic bar ด้วย aqua regia ($\text{HCl} : \text{HNO}_3 = 3:1$) หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำ DI และทำให้แห้ง ปิดเตาสารละลาย 1% hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ใส่ในขวดที่มีน้ำ Milli Q อยู่ ต้มสารละลายบน hot plate stirrer โดยใช้ magnetic bar ช่วยกวนตลอดเวลา เมื่อสารละลายเดือดเติม 1% trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) อย่างรวดเร็ว สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำเงินเข้ม (deep blue) ต้มต่ออีกประมาณ 30 นาที สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดง (wine red) ทิ้งไว้ให้เย็น เก็บอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้ในภาชนะป้องกันแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้จะมีลักษณะเป็นสารละลายสีแดง จากนั้นจำเป็นที่จะต้องมีการนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ที่ขึ้นมาขึ้นไปตรวจสอบเพื่อวัดคุณสมบัติเฉพาะตัวของอนุภาคก่อนที่จะนำมาใช้ในการศึกษา

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยใช้ **sodium borohydride**

ล้างเครื่องแก้วทุกชิ้นและ magnetic bar ด้วย aqua regia ($\text{HCl} : \text{HNO}_3 = 3:1$) หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำ DI และทำให้แห้ง ปิดเตาสารละลาย 1% hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ใส่ในขวดที่มีน้ำ Milli Q 24 มิลลิลิตร และใช้ magnetic bar ช่วยกวนตลอดเวลา จากนั้นค่อยๆหยด sodium borohydride (NaBH_4) ลงไปจนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีแดง (wine red) ทิ้งไว้ให้เย็น เก็บอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้ในภาชนะป้องกันแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4: แสดงการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

การตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้

นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้ไปตรวจสอบคุณสมบัติตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

- Transmission electron microscope (TEM) ที่ 100 กิโลโวลท์ :
เพื่อหาขนาดอนุภาค, ตรวจสอบรูปร่าง และดูการกระจายของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
- UV-vis spectroscopy ที่ 520 นาโนเมตร : เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสง

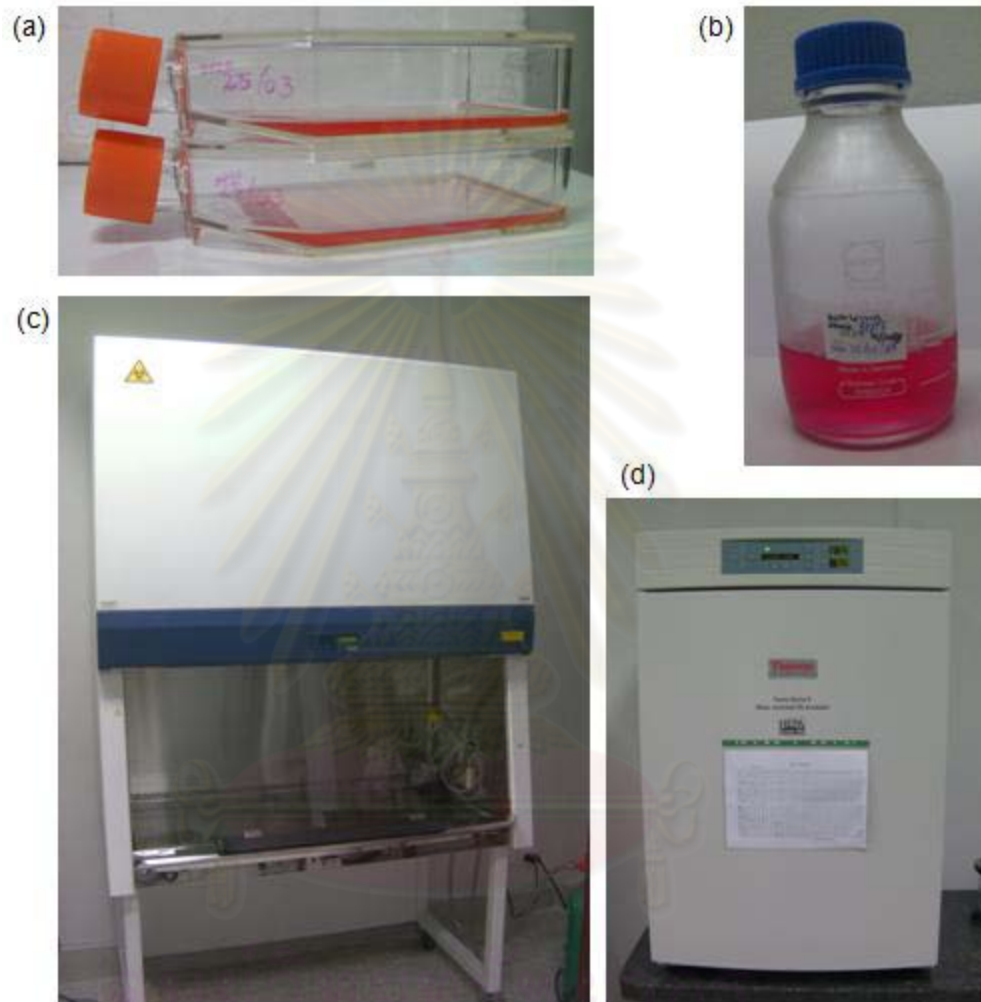


รูปที่ 5: แสดงเครื่อง UV/Vis spectrophotometer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) ที่เติม NaHCO_3 (2.7 g), 10% fetal bovine serum และ 1% antibiotic โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO_2



รูปที่ 6: แสดงอุปกรณ์และเครื่องใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

- (a) ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์
- (b) อาหารเลี้ยงเซลล์
- (c) ตู้ปลอดเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์
- (d) ตู้บ่มเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

การศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์

ศึกษาโดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ โดยนำเซลล์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อเปรียบเทียบรูปร่างของเซลล์ปกติ (เซลล์ในกลุ่มควบคุม) กับเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาว และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ซึ่งโดยปกติแล้วเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 เป็นเซลล์ที่ยึดเกาะอยู่กับพื้นผิว และมีรูปร่างเป็นทรงกระสวย หากเซลล์มีการตายเกิดขึ้น จะส่งผลให้เซลล์มีการหลุดลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และรูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงเป็นทรงกลม



รูปที่ 7: แสดงกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่ใช้ในการถ่ายภาพเซลล์

ศูนย์วิจัยทางการแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

ศึกษาโดย MTT assay เป็นการศึกษาศามารถในการมีชีวิตและการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่ง MTT assay เป็น enzymatic assay สามารถใช้ในตรวจวัด enzyme activity ของ mitochondrial dehydrogenase ที่ได้จากเซลล์ที่มีชีวิต ขณะที่เซลล์ตายไม่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ จากหลักการของ MTT assay คือ การใช้ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; MTT สารที่มี สีเหลืองเป็นสารตั้งต้น ของปฏิกิริยา และสามารถถูกตัดด้วย mitochondrial dehydrogenase ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ คือ formazane ซึ่งเป็นสารสีม่วงที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงต้องละลายด้วย DMSO แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นั้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตรอด ขั้นตอนแรก ถ่ายอาหารทิ้งแล้วเติมสารละลาย MTT 350 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายสารละลาย MTT ทิ้ง แล้วเติม สารละลาย DMSO/glycine buffer 1 มิลลิลิตรต่อหลุม แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำมาคำนวณเป็นร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์



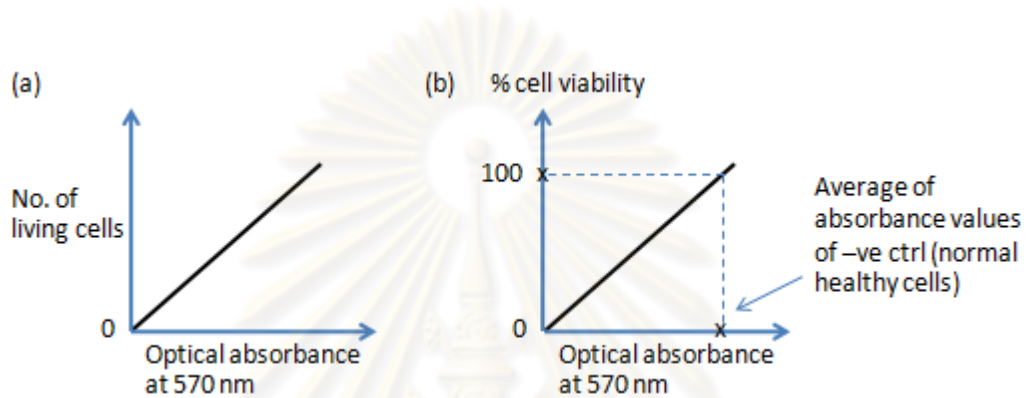
รูปที่ 8: แสดงเครื่อง spectrophotometer ที่ใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง

การคำนวณหาร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability)

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{OD treatment}}{\text{OD control}} \times 100$$

OD treatment = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้รับสาร

OD control = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์

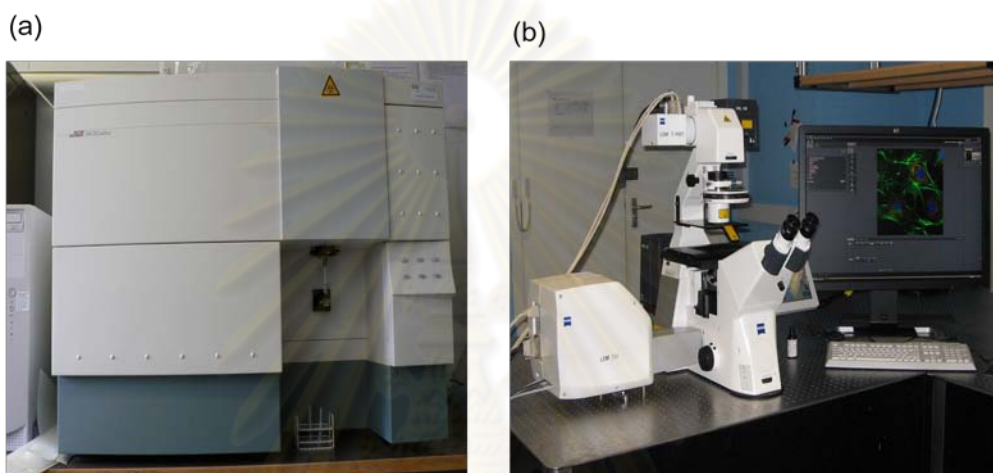


รูปที่ 9: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์มีชีวิตกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (a) และความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (b)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์

ศึกษาโดยการย้อมสีชิ้นส่วนที่มีการแตกสลายของ DNA ด้วย propidium iodide และ ย้อมหา phosphatidylserine บนผิวเซลล์ด้านนอกด้วย annexin V ขั้นตอนแรกทำการเก็บเกี่ยว เซลล์โดยวิธี trypsinization ล้างเซลล์ที่ได้ด้วย PBS เย็น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม annexin V และ propidium iodide ในที่มีเวลานาน 15 นาที จากนั้นจึงนำมาศึกษากด้วยกล้อง confocal microscope และเครื่อง flow cytometer โดยแปลผลที่ได้จากการติดสีย้อมดังแสดงตารางที่ 3



รูปที่ 10: แสดงเครื่องมือที่ใช้ศึกษารูปแบบการตายของเซลล์

- (a) flow cytometer
- (b) confocal microscope

ตารางที่ 3 แสดงการแปลผลรูปแบบการตายของเซลล์จากการติดสีย้อม

	Annexin V	propidium iodide
Live cell	-	-
Early apoptotic cell	+	-
Late apoptotic cell	+	+
Necrotic cell	-	+

ลำดับขั้นตอนการวิจัย

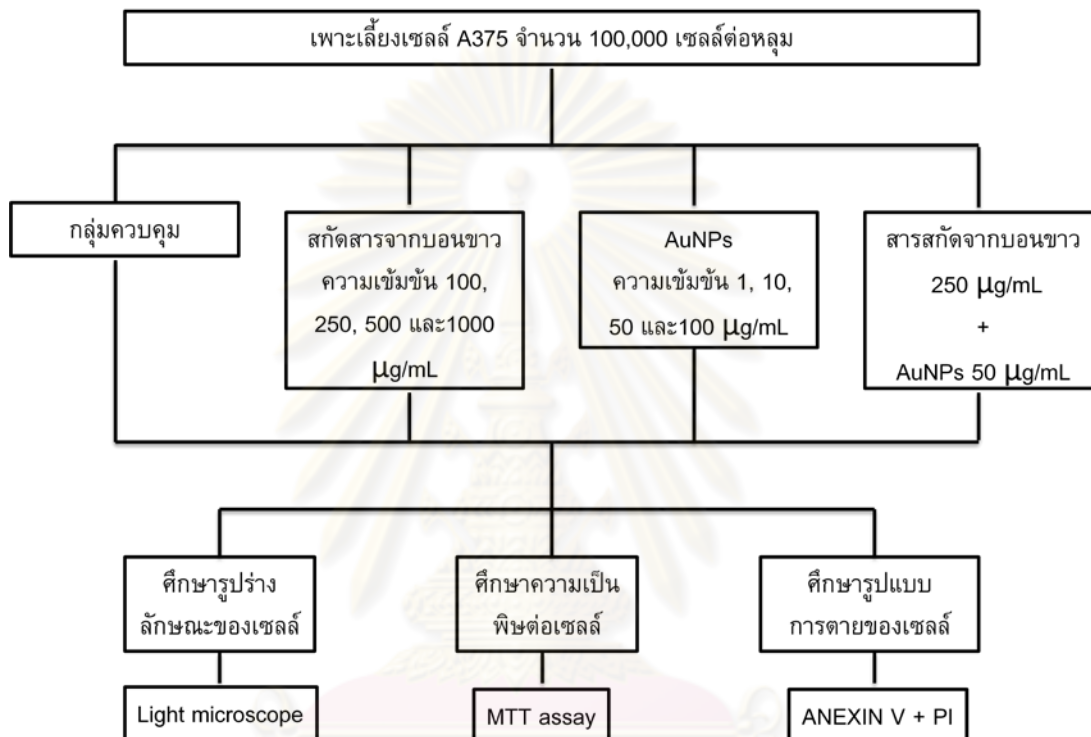
เลี้ยงเซลล์จำนวน 10^5 เซลล์ ในอาหารปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม (24 well plate) จากนั้นบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแบ่งการทดลองเป็น 4 กลุ่ม

1. กลุ่มควบคุม คือกลุ่มเซลล์ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ตามปกติ
2. กลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากบอขนขาวที่ความเข้มข้น 100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. กลุ่มเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
4. กลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากบอขนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร



รูปที่ 11: แสดงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม

ปมเลี้ยงเซลล์กับสารสกัดจากบอนขาว และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ด้วยการย้อมสี annexin V และ propidium iodide โดยขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น แสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 12: แสดงขั้นตอนการศึกษาผลของสารสกัดจากบอนขาว และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็ง A375

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

วิเคราะห์ข้อมูลเป็นค่า mean±SD โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว: One-Way Anova เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ทดลองกับกลุ่มควบคุม และใช้ Post Hoc Tests แสดงค่าสถิติสำหรับทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบจับคู่พหุคูณ (Multiple Comparison) โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16 โดยความแตกต่างจะมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อมีค่า p-value ≤ 0.05



ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

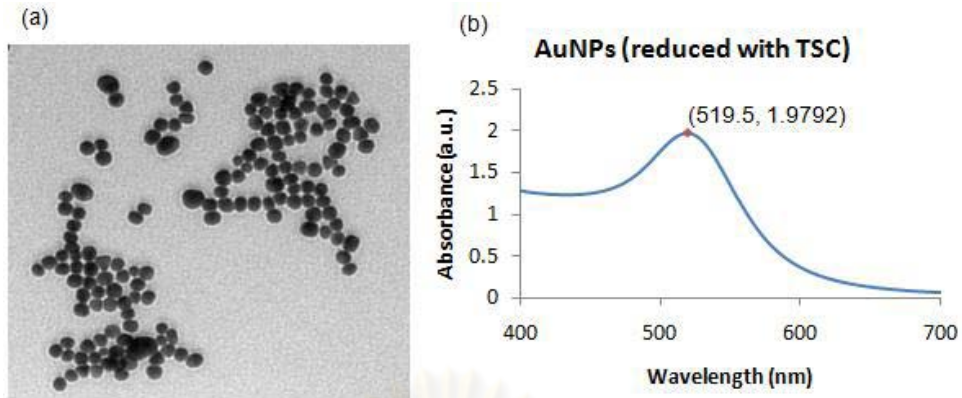
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Gold Nanoparticle; อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร)

คุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษานี้ ถูกตรวจสอบโดยใช้เครื่อง Transmission Electron Microscopy (TEM) และ UV-Vis Spectrophotometer พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีลักษณะเป็นเม็ดกลมเล็ก อยู่กระจายตัวกัน และมีขนาดอนุภาคที่เท่าๆกัน ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคอยู่ที่ 10-15 นาโนเมตร ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความยาวคลื่นต่างๆ จะพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยใช้ sodium borohydride มี maximum absorption peak อยู่ที่ 520 นาโนเมตร และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยใช้ trisodium citrate มี maximum absorption peak อยู่ที่ 519.5 นาโนเมตร ซึ่งค่านี้มีความสัมพันธ์กับสีแดงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เราสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งถ้าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ เช่น เกิดการรวมกลุ่มกันของอนุภาคจะทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนไป คือเปลี่ยนจากสีแดงไปเป็นสีม่วง ซึ่งก็จะสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงด้วยเช่นกัน ผลดังแสดงในรูปที่ 13

นอกจากนี้การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรแต่ละครั้งต้องมีการนำไปตรวจสอบคุณสมบัติก่อนนำมาใช้เสมอ ซึ่งผลที่ได้พบว่าคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ทำการสังเคราะห์ในแต่ละครั้งมีค่าเหมือน หรือใกล้เคียงกันทุกครั้ง ซึ่งแสดงถึงว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ขึ้นมาใช้ในแต่ละการทดลองนั้นมีคุณสมบัติที่ไม่แตกต่างกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

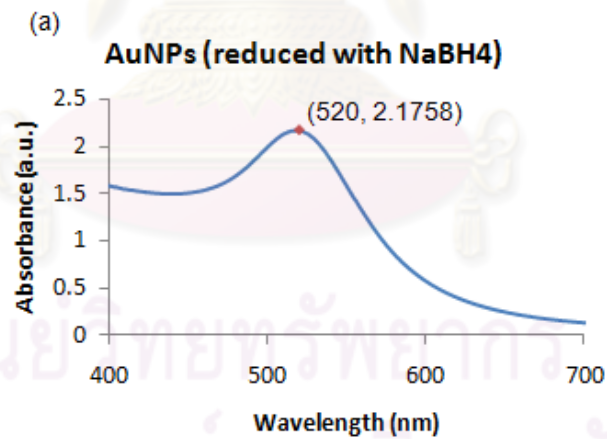


รูปที่ 13: แสดงผลจากการทดสอบอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยใช้

trisodium citrate (TSC)

(a) ผลจากการทดสอบอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

(b) ผลของการวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความยาวคลื่น 519.5 นาโนเมตร



รูปที่ 14: แสดงผลจากการทดสอบอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยใช้

sodium borohydride

(a) ผลของการวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความยาว

คลื่น 520 นาโนเมตร

2. สารสกัดจากบอขนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของเซลล์

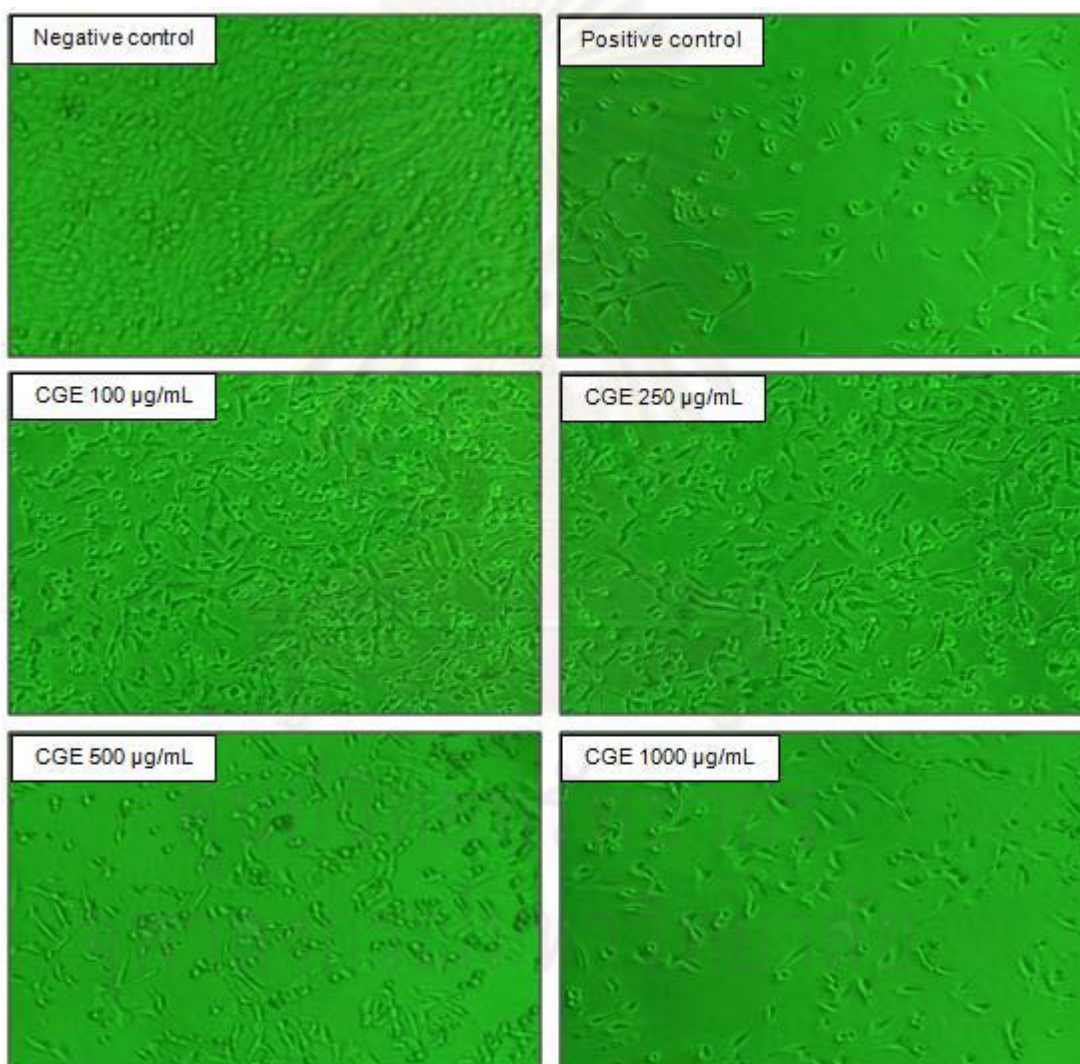
ทำการศึกษาและถ่ายภาพการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของเซลล์หลังจากได้รับสารสกัดจากบอขนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (treated cells) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ตามปกติ (control cells)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1 ผลของสารสกัดจากบอนขาว

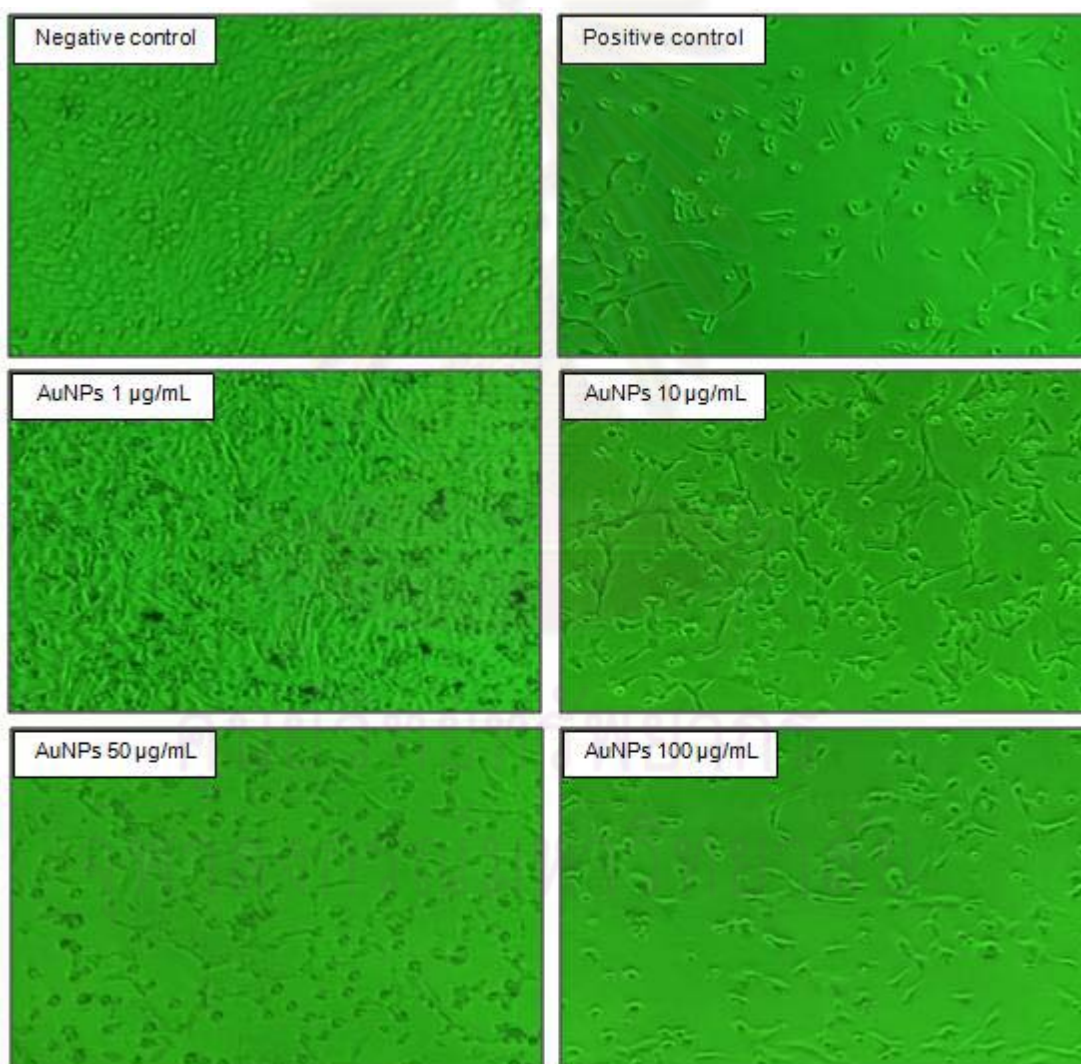
การศึกษาเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาวที่ความเข้มข้น 100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาวมีจำนวนของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์น้อยกว่าในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้รูปร่างของเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงจากรูปทรงกระสวยเป็นทรงกลม ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งชี้ถึงว่ามีการตายของเซลล์เกิดขึ้น โดยลักษณะที่เกิดขึ้นเช่นนี้จะเกิดมากเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากบอนขาวเพิ่มมากขึ้น และเกิดมากที่สุดเมื่อใช้สารสกัดจากบอนขาวความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 15: แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 หลังจากได้รับสารสกัดจากบอนขาว ที่ความเข้มข้น 100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

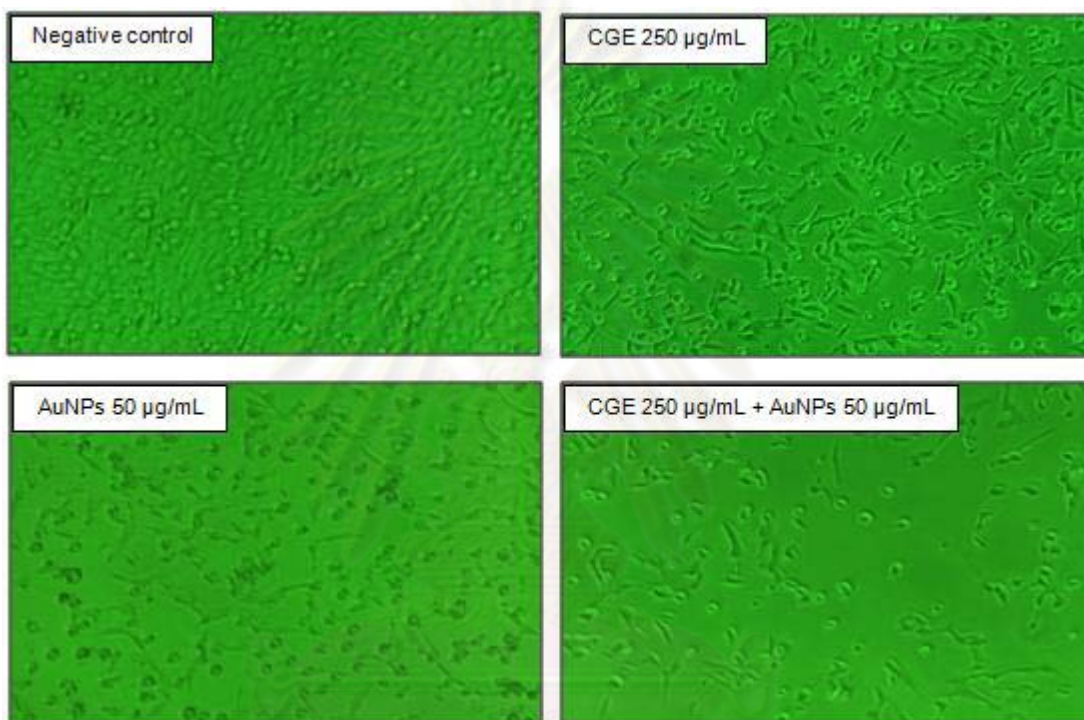
การศึกษาเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าผลเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาว คือมีจำนวนของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์น้อยกว่าในกลุ่มควบคุม และรูปร่างของเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงจากรูปทรงกระสวยเป็นทรงกลม ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งชี้ถึงว่ามีการตายของเซลล์เกิดขึ้น โดยลักษณะที่เกิดขึ้นเช่นนี้จะเกิดมากเมื่อความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพิ่มมากขึ้น และเกิดมากที่สุดเมื่อใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 16: แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ A375 หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 ผลของสารสกัดจากบอนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

การศึกษาเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาว อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และสารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์น้อยกว่าในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาว หรืออนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้รูปร่างของเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงจากรูปทรงกระสวยเป็นทรงกลม ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งชี้ถึงว่ามีการตายของเซลล์เกิดขึ้น



รูปที่ 17: แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 หลังจากได้รับสารสกัดจากบอนขาว, อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

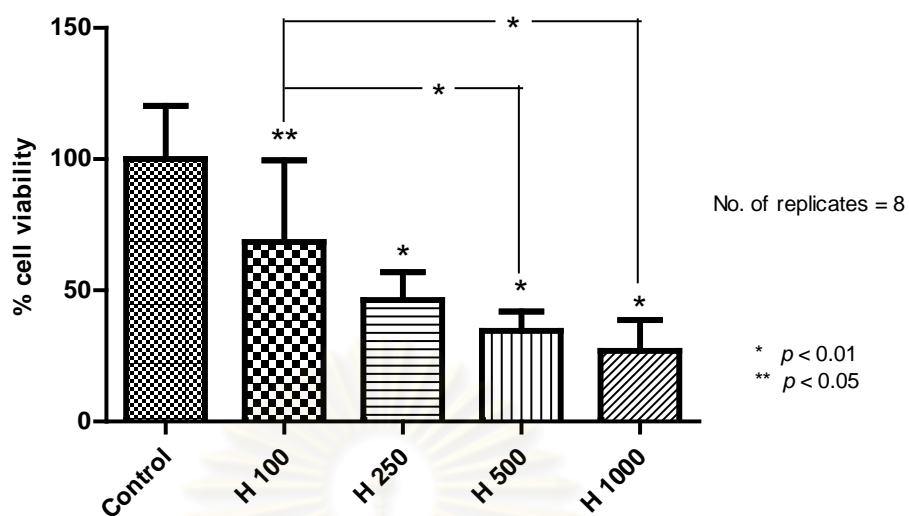
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability)

จากการทดสอบผลของสารสกัดจากบอนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ด้วยวิธี MTT assay แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ โดยเทียบให้เซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ตามปกติและไม่ได้รับสารสกัดจากบอนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร มีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 100

3.1 ผลของสารสกัดจากบอนขาว

เมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ด้วยสารสกัดจากบอนขาวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากบอนขาว 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงจาก 100 ± 20.30 เป็น 68.45 ± 31.09 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ด้วยสารสกัดจากบอนขาวที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์จะลดลงไปอีกเป็น 46.32 ± 10.58 , 34.61 ± 7.28 และ 26.98 ± 11.68 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างลักษณะของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่พบว่าเมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ด้วยสารสกัดจากบอนขาวที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปจะทำให้จำนวนเซลล์มีชีวิตมีแนวโน้มลดลง

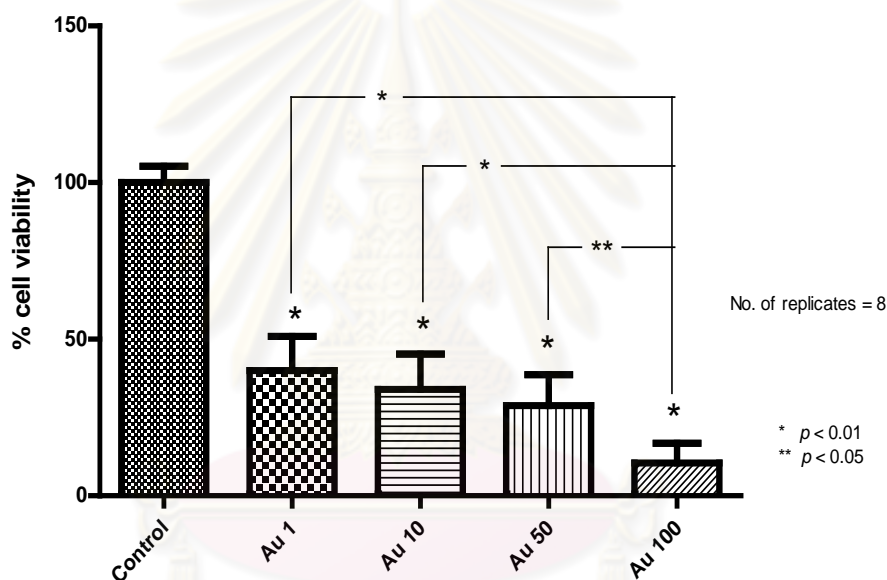


รูปที่ 18: แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 หลังจากได้รับสารสกัดจากบองขาวที่ความเข้มข้น 100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทดสอบด้วยวิธี MTT assay

- Control = กลุ่มควบคุม
- H 100 = สารสกัดจากบองขาวความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- H 250 = สารสกัดจากบองขาวความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- H 500 = สารสกัดจากบองขาวความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- H 1000 = สารสกัดจากบองขาวความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยใช้ sodium borohydride

เมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยใช้ sodium borohydride เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงจาก 100 ± 5.19 เป็น 39.97 ± 10.95 และเมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์จะลดลงไปอีกเป็น 33.96 ± 11.24 , 28.76 ± 9.93 และ 10.49 ± 6.31 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ



รูปที่ 19: แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยใช้ sodium borohydride ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทดสอบด้วยวิธี MTT assay

Control = กลุ่มควบคุม

Au 1 = อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

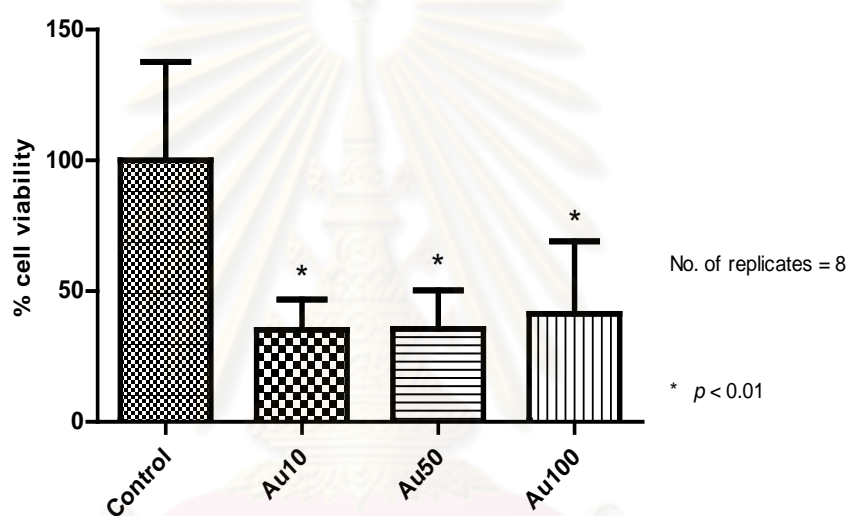
Au 10 = อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Au 50 = อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Au 100 = อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยใช้ trisodium citrate

เมื่อป้อนเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยใช้ trisodium citrate dihydrate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงจาก 100 ± 37.69 เป็น 35.23 ± 11.51 , 35.53 ± 14.80 และ 41.32 ± 27.75 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการลดลงของร้อยละการมีชีวิตของเซลล์นั้นไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เลือกใช้ในการทดลองนี้



รูปที่ 20: แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยใช้ trisodium citrate ที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทดสอบด้วยวิธี MTT assay

Control = กลุ่มควบคุม

Au 10 = อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

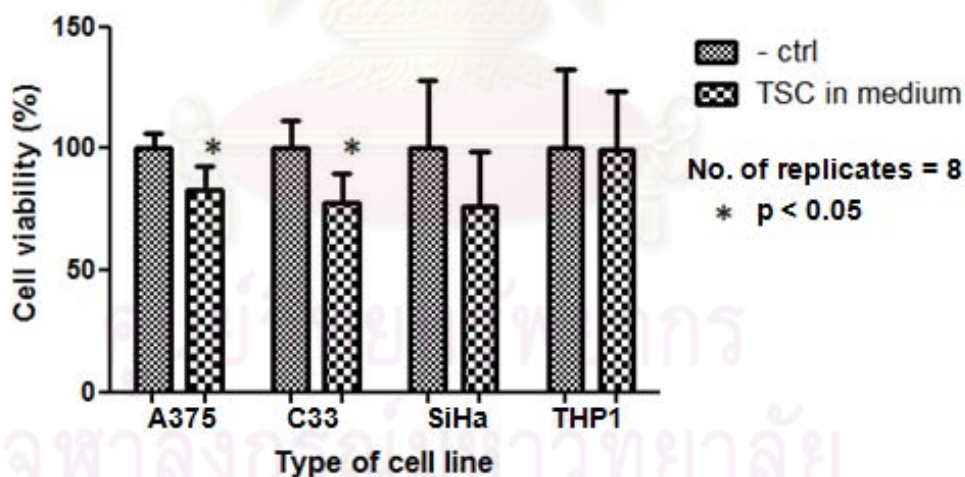
Au 50 = อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Au 100 = อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4 ผลของ trisodium citrate ต่อเซลล์เชื้อสายชนิดต่าง ๆ

จากการทดสอบผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยใช้ trisodium citrate พบว่ามีฤทธิ์ทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบว่าสารที่มีฤทธิ์ลดร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 นั้นเป็นผลมาจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร หรือเป็นผลจาก trisodium citrate ที่ใช้เป็นตัวรีดิวซ์ นอกจากนี้ยังทำการทดสอบในเซลล์เชื้อสายชนิดอื่น เช่น เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33, เซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว THP1 เพื่อดูผลของ trisodium citrate ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ในเซลล์เชื้อสายชนิดต่าง ๆ กันอีกด้วย

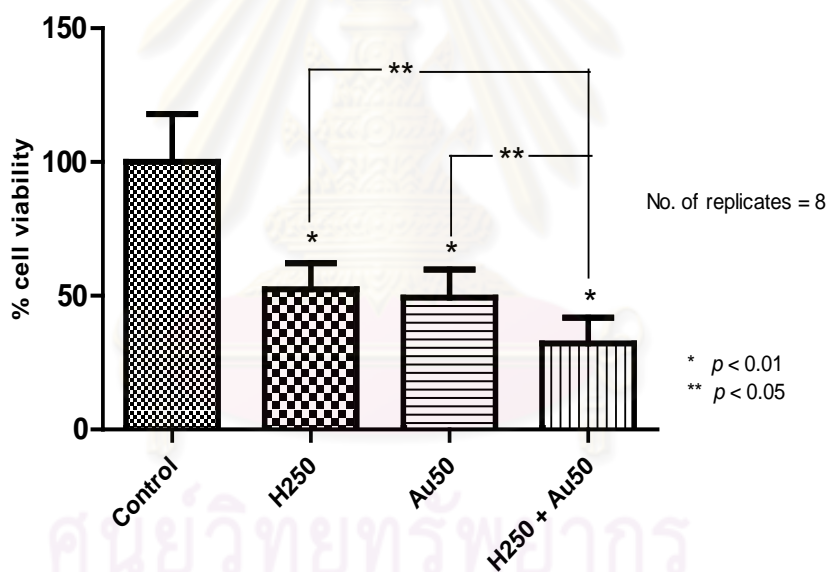
จากผลการทดลองที่ได้พบว่า trisodium citrate มีความสามารถในการลดร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33 โดยเมื่อมีการบ่มเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดข้างต้นด้วยสารละลาย trisodium citrate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เชื้อสายทั้งสองชนิดนี้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมจาก 100 ± 6.61 เป็น 83.12 ± 9.69 และ จาก 100 ± 11.72 เป็น 78 ± 11.75 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ ส่วนเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว THP1 มีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 21: แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ A375, C33, SiHa และ THP1 หลังจากได้รับสารละลาย trisodium citrate นาน 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบด้วยวิธี MTT assay

3.5 ผลของสารสกัดจากบอนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

เมื่อปมเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ด้วยสารสกัดจากบอนขาว, อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และสารสกัดจากบอนขาวที่ผสมรวมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่เมื่อได้รับสารสกัดจากบอนขาวเพียงอย่างเดียวจะทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงจาก 100 ± 17.92 เป็น 52.48 ± 9.72 ส่วนกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพียงอย่างเดียวทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเช่นกัน โดยลดลงมาเป็น 49.28 ± 10.57 และเมื่อนำสารทั้งสองมาใช้ร่วมกันเพื่อต้องการดูผลในการเสริมฤทธิ์กันพบว่าการที่เซลล์ได้รับสารสกัดจากบอนขาวที่ผสมรวมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ในกลุ่มนี้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยลดลงมาเป็น 32.15 ± 9.64 และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาว หรือกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพียงอย่างเดียว ก็พบว่ามียุทธการมีชีวิตของเซลล์ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน



รูปที่ 22: แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 หลังจากได้รับสารสกัดจากบอนขาว, อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และสารสกัดจากบอนขาวที่ผสมรวมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร แล้วทดสอบด้วยวิธี MTT assay

- | | |
|---------------|---|
| Control | = กลุ่มควบคุม |
| H 250 | = สารสกัดจากบอนขาวความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร |
| Au 50 | = อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร |
| H 250 + Au 50 | = อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร |

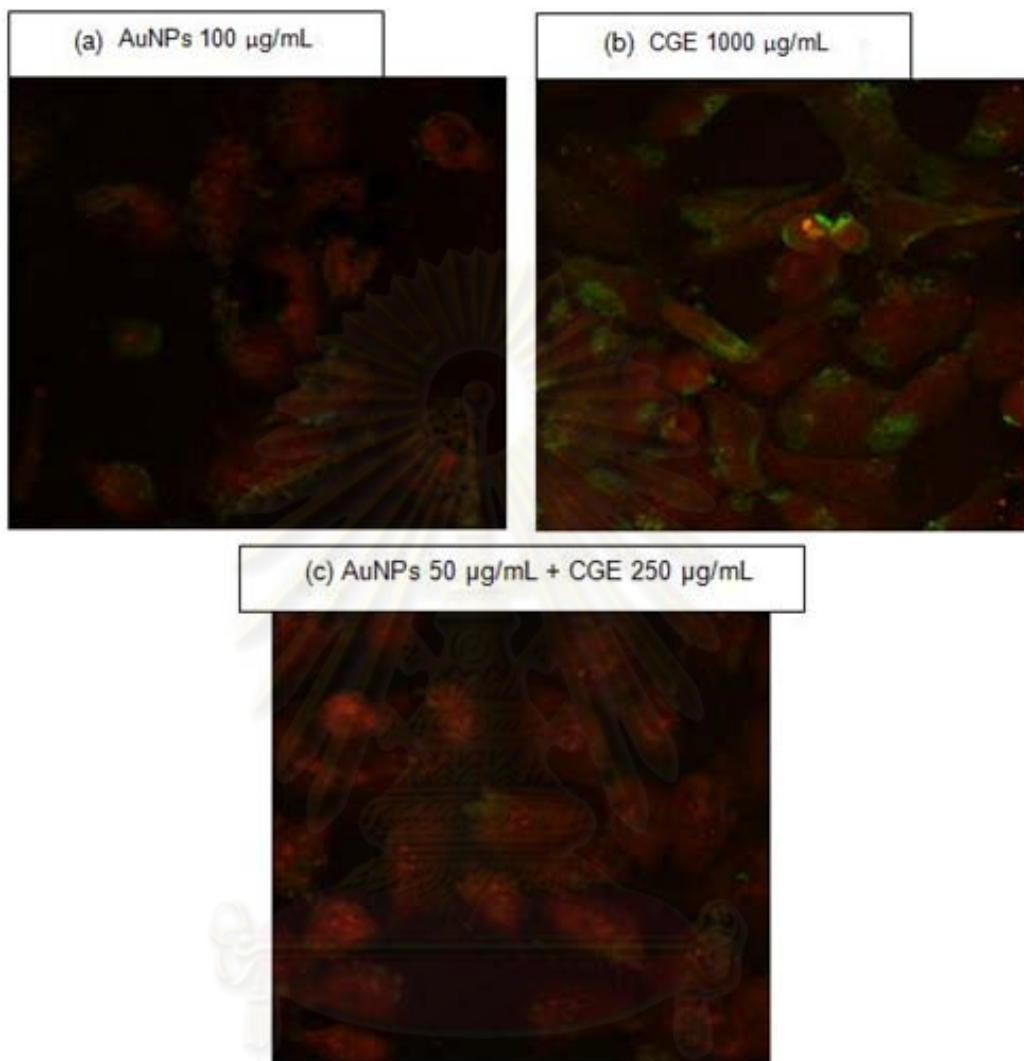
4. การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์

ในการศึกษาได้ใช้สารสกัดจากบอขนขาว และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับทดสอบกับเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ด้วยการย้อมสี Annexin V และ Propidium iodide แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้อง confocal microscope และเครื่อง flow cytometer



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1 ผลการศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ภายใต้กล้อง confocal microscope



รูปที่ 23: แสดงการติดสีของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 หลังจากย้อมด้วย Annexin V และ Propidium iodide และศึกษาภายใต้กล้อง confocal microscope

- เซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
- เซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาว
- เซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

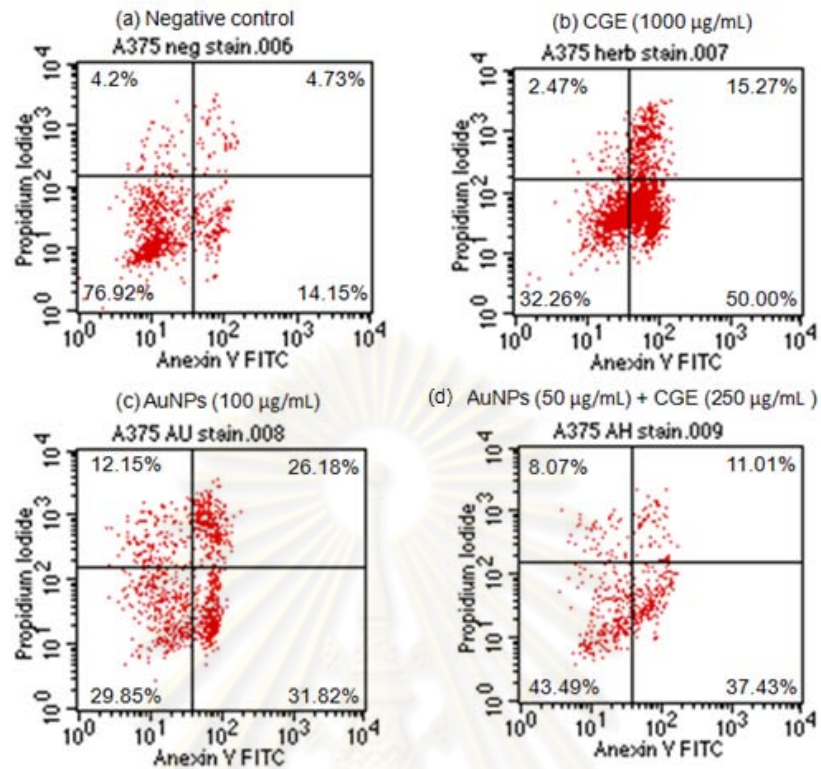
จากรูปที่ 23 (A-C) จะเห็นได้ว่าเซลล์ส่วนใหญ่มีการติดสีย้อมทั้งสี ของ Annexin V และ Propidium iodide ซึ่งแสดงถึงว่าเซลล์ส่วนใหญ่ในการทดลองนี้มีรูปแบบการตายของเซลล์เป็นแบบอะพอพโทซิสในระยะท้าย

4.2 การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากบอนขาว และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรสามารถชักนำให้เซลล์ส่วนใหญ่ในการทดลองนี้มีการตายแบบอะพอพโทซิส โดยดูจากช่องบนและล่างขวาของ two-parameter dot plot ทั้งนี้ผลจากเครื่อง flow cytometer ระบุร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสพบว่าในกลุ่มควบคุมมีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส 18.88% ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาว และ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร มีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส 65.27% และ 58% ตามลำดับ และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรพบว่ามี การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส 48.44%



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24: แสดง two-parameter dot plot ของการตายของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากบอนขาว และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยช่องซ้ายล่าง คือ เซลล์ที่มีชีวิต ส่วนช่องซ้ายบน คือเซลล์ที่ตายแบบนีโครซิส และช่องขวาทั้งบนและล่าง คือ เซลล์ที่ตายแบบอะพอโทซิส

- (a) กลุ่มควบคุม
- (b) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาว
- (c) กลุ่มที่ได้รับ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
- (d) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 โดยใช้สารสกัดจากบอนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยศึกษาระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาว กลุ่มที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ตามปกติ พบว่าสารสกัดจากบอนขาวสามารถออกฤทธิ์ลดอัตราการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ได้ และประสิทธิภาพในการลดอัตราการมีชีวิตของเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Brown *et al.* (2005) ที่ทำการศึกษาเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ YIT (colon cancer cell line) โดยใช้ *Colocasia esculenta* ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกับบอนขาว (*Colocasia gigantea*) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาของ Luo *et al.* (2007) โดยศึกษาพืช *Typhonium divaricatum* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับบอนขาว พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก Pro-01, เซลล์มะเร็งเต้านม Bre-04 และเซลล์มะเร็งปอด Lu-04 ซึ่งเป็นการสนับสนุนผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้ว่าสารสกัดจากบอนขาวจัดได้ว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้

แม้ว่าในการศึกษานี้จะยังไม่ทราบว่ายังมีองค์ประกอบส่วนใดของสารสกัดหยาบที่ได้จากบอนขาวที่ทำหน้าที่เป็นสารออกฤทธิ์ (active compounds) แต่มีความเป็นไปได้ว่าอาจเป็นสารในกลุ่ม flavonoid ซึ่ง Leong *et al.* (2010) ได้ทำการสกัดแยก flavonoid จาก *Colocasia esculenta* ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกับบอนขาว พบว่ามีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระและการศึกษาของ Lai *et al.* (2010) ที่ทำการทดสอบสาร pheophorbide ที่สกัดได้จาก *Typhonium flagelliforme* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับบอนขาว พบว่ามีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง และเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งมีการตายแบบอะพอพโทซิส อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถกล่าวได้ว่าสารใดในสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นสารออกฤทธิ์ให้มีการตายของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 จนกว่าจะมีการสกัดแยกสารองค์ประกอบต่างๆที่อยู่ในสารสกัดหยาบมาทำการศึกษาคูณลักษณะ โครงสร้างทางเคมี และการออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งต่อไป

จากผลการศึกษาเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ในกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ซึ่งในการศึกษานี้ใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ด้วยตัวรีดิวซ์ 2 ชนิด ได้แก่ โซเดียมซิติเรต และโซเดียมโบโรไฮไดรด์ ผลที่ได้พบว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ในกลุ่มนี้มีค่าลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ *Patra et al.* (2007) ที่ได้ศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ด้วยโซเดียมซิติเรตต่อการเปลี่ยนแปลงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปอด A549 พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีฤทธิ์ทำให้ ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปอด A549 ลดลง และการศึกษาของ *Thakor et al.* (2011) ที่ได้ศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีฤทธิ์ในการลดร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ ทั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa และเซลล์มะเร็งตับ HepG2

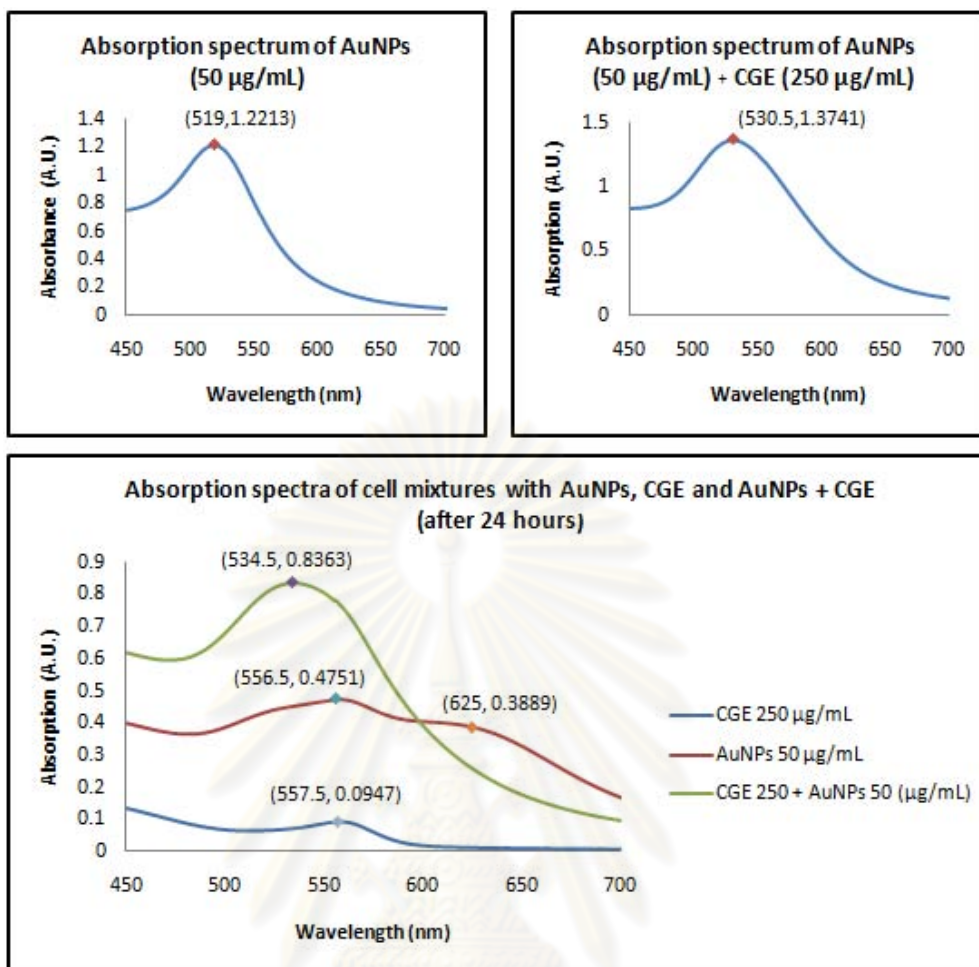
แม้ว่าในการศึกษานี้จะไม่สามารถบอกได้ถึงกลไกที่ทำให้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลฆ่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ได้นั้น แต่มีการศึกษาของ *Patra et al.* (2010) ที่ทำการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายผ่านทางกลไกที่กระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) อันเป็นสาเหตุให้เกิดความเสียหายต่อสารพันธุกรรม (DNA damage) และมีการตายของเซลล์เกิดขึ้นในที่สุด

การศึกษาค้นคว้าของตัวรีดิวซ์ที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งทำการทดลองโดยดูผลของ trisodium citrate ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 และเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ เช่น เซลล์มะเร็งปากมดลูก (SiHa และ C33) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (THP1) อีกด้วย เพื่อยืนยันว่าผลในการลดร้อยละการมีชีวิตของเซลล์นั้นเป็นผลมาจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร จากผลการทดลองพบว่า trisodium citrate ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว THP1 ส่วนในเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 พบว่า trisodium citrate มีผลทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลง 17% สอดคล้องกับการศึกษาของ *Bhatnagar et al.* (1998) ที่พบว่า trisodium citrate มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งผิวหนัง B16/F10 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรพบว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงมากถึง 35% ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการลดลงของร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ ในการศึกษารังนี้ เป็นผลมาจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นส่วนใหญ่

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากบอชขาว ร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เนื่องจากมีหลายการศึกษาที่นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาใช้นำส่งยาเข้าสู่เซลล์ โดยในการทดลองนี้เลือกใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากบอชขาวความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากสารผสมระหว่างอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรกับสารสกัดจากบอชขาวที่ความเข้มข้นสูงกว่าที่เลือกใช้ในการทดลองนี้มีผลทำให้อนุภาคของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเกิดการรวมตัวกัน และมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป ค่าการดูดกลืนแสง (maximum absorption peak) ของสารสกัดจากบอชขาว อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และสารผสมระหว่างสารสกัดจากบอชขาวกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 25



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25: แสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง (maximum absorption peak) ของสารสกัดจากบองขาว อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และสารผสมระหว่างสารสกัดจากบองขาวกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

เมื่อใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรลงในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI) อยู่ และนำสารละลายนั้นมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (maximum absorption peak) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเคลื่อนจาก 519 นาโนเมตร เป็น 625 นาโนเมตร ซึ่งแสดงถึงว่าอนุภาคของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเกิดการรวมตัวกันทำให้มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไปในอีกกรณีหนึ่ง อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ผสมรวมกับสารสกัดจากบองขาวมีค่าการดูดกลืนแสงเคลื่อนเพียงเล็กน้อย คือจาก 530.5 นาโนเมตร เป็น 534.5 นาโนเมตร จากผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงในครั้งนี้ก็กล่าวได้ว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ผสมรวมกับสารสกัดจากบองขาวนั้นมีความเสถียรมากกว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพียงอย่างเดียวในสภาวะที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารองค์ประกอบบางอย่างในสารสกัดจากบองขาวช่วยให้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีเสถียรภาพมากขึ้น

จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงมากกว่าการใช้สารสกัดจากบอนขาว หรืออนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพียงอย่างเดียวซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Podsiadlo *et al.* (2008) ที่ทำการทดลองใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรนำส่งยารักษา มะเร็งเม็ดเลือดขาว (6-Merceptopurine) พบว่าสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K-562 ได้มากกว่าการใช้ยา 6-Merceptopurine เพียงอย่างเดียว การที่ผลเป็นดังนี้อาจมีสาเหตุมาจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรทำปฏิกิริยาต่อสารสกัดจากบอนขาวทำให้มีส่วนช่วยในการนำส่งสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากบอนขาวซึ่งมีฤทธิ์ในการลดร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น จึงส่งผลให้มีความสามารถในการลดร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ได้มากกว่าการใช้สารสกัดจากบอนขาว หรืออนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพียงอย่างเดียว

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยต้องการทราบว่า การตายของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ที่ได้รับสารสกัดจากบอนขาว อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และสารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีรูปแบบการตายแบบอะพอพโทซิสหรือไม่ เนื่องจากรูปแบบการตายของเซลล์ในลักษณะนี้เซลล์จะยังคงรักษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และไลโซโซมไว้ได้ ดังนั้นสารต่างๆที่อยู่ในเซลล์รวมถึง lysosomal enzyme จะไม่ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ ซึ่งหากสารสกัดจากบอนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีความเป็นพิษต่อเซลล์และเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสจะส่งผลให้ไม่เกิดภาวะการอักเสบและไม่เกิดการกระตุ้นให้เนื้อเยื่อข้างเคียงเกิดความเสียหาย ซึ่งต่างจากการตายของเซลล์แบบนิโครซิส (Alberts *et al.*, 2008)

วิธีการตรวจหารูปแบบการตายของเซลล์แบบ apoptosis มีหลายวิธี ในงานวิจัยนี้เลือกศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเปลี่ยนแปลงของ phospholipids ที่เยื่อหุ้มเซลล์ และการแตกสลายของ DNA โดยใช้การย้อมสี annexin V และ propidium iodide ทำการศึกษาผลด้วยกล้อง confocal microscope และเครื่อง flow cytometer เนื่องจากเป็นวิธีที่วัดผลได้ง่าย ได้ผลการทดลองทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ และสามารถบอกถึงระยะในการเกิด apoptosis ได้ (Huerta *et al.*, 2007)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากบองขาว อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และสารสกัดจากบองขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส จะเห็นได้จากลักษณะการย้อมติดสีแดงของ propidium iodide ซึ่งเป็นการย้อมติดสาย DNA ที่แตกหัก และการย้อมติดสีเขียวของ annexin V บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นการย้อมติด phosphatidylserine (PS) ซึ่งเป็นสารฟอสโฟไลปิด ที่โดยสภาวะปกติแล้วจะอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้านใน แต่ระหว่างการเกิดอะพอพโทซิสจะเกิดความไม่สมดุลของสารฟอสโฟไลปิดที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ phosphatidylserine เกิดการเคลื่อนย้ายที่อยู่จากภายในเยื่อหุ้มเซลล์ออกสู่ภายนอก ทำให้สามารถจับกับ annexin V ซึ่งเป็นโปรตีนที่อาศัยแคลเซียมในการจับกับ phosphatidylserine ในขณะที่เกิดอะพอพโทซิสได้ (van Genderen *et al.*, 2008)

การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ที่ได้รับสารสกัดจากบองขาว พบว่าเซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Brown *et al.* (2005) ที่ทำการศึกษาเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ YTT (colon cancer cell line) โดยใช้ *Colocasia esculenta* ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกับบองขาว (*Colocasia gigantea*) พบว่ามีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Lai *et al.* (2008) โดยศึกษาพืช *Typhonium flagelliforme* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับบองขาว พบว่ามีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งปอด NCI-H23 เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส เหตุผลที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดที่ใช้ทดสอบกับเซลล์เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งมีสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด สารบางชนิดที่อยู่ในสารสกัดหยาบอาจไปมีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบอะพอพโทซิสได้ ดังเช่นสาร pheophorbide ที่สกัดได้จากพืชในวงศ์เดียวกันกับบองขาว (Lai *et al.*, 2009)

งานวิจัยของ Pan *et al.* (2007) ทำการทดลองพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มีการตายแบบอะพอพโทซิส และงานวิจัยของ Patra *et al.* (2007) ทำการทดลองพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลทำให้เซลล์มะเร็งปอด A549 มีการตายแบบอะพอพโทซิสได้เช่นเดียวกัน ซึ่งสนับสนุนผลการศึกษาในครั้งใหม่ที่พบว่าเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ในกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีรูปแบบการตายแบบอะพอพโทซิส ทั้งนี้มีการศึกษาของ Mukherjee *et al.* (2005) และ Bhattacharya *et al.* (2004) พบว่าการที่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งมีการตายแบบอะพอพโทซิสได้นั้นเนื่องมาจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีคุณสมบัติในการต้านการเจริญแบบผิดปกติของเส้นเลือดฝอย (antiangiogenic) โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ vascular endothelial growth factor หรือ VEGF ซึ่งเป็น angiogenic factor ชนิดหนึ่งที่มีหน้าที่เป็นสารกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ เมื่อเซลล์มะเร็งขาดหลอดเลือดนำส่งอาหารและออกซิเจน อาจมีผลทำให้ก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กลงและลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้

สรุปผลการวิจัย

1. สารสกัดจากบอนขาวมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 คือทำให้เซลล์ที่เกาะบนพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์น้อยลง รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนจากทรงกระสวยเป็นทรงกลม และทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์ลดน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
2. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 คือทำให้เซลล์ที่เกาะบนพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์น้อยลง รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนจากทรงกระสวยเป็นทรงกลม และทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์ลดน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
3. เมื่อใช้สารสกัดจากบอนขาวร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร พบว่าสารทั้งสองชนิดนี้มีฤทธิ์เสริมกัน
4. ทั้งสารสกัดจากบอนขาว อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และสารสกัดจากบอนขาวที่ผสมร่วมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ส่วนใหญ่ในการทดลองนี้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส



ศูนย์วิทยพัทยาการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าสารสกัดจากบอนขาวและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 แต่ยังมีสิ่งที่น่าสนใจที่ยังไม่ได้ทำการศึกษา ที่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต ดังต่อไปนี้

1. หาสารออกฤทธิ์ (active compounds) ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารสกัดจากบอนขาว
2. ทำการทดลองในเซลล์มะเร็งเชื้อสายชนิดอื่นๆ
3. ทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง (in vivo) หรือทำการศึกษาในเนื้อเยื่อที่นำออกมาจากสิ่งมีชีวิต (ex vivo)
4. ทดสอบคุณสมบัติของสารผสมระหว่างอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรและสารสกัดจากบอนขาวว่าทำปฏิกิริยาต่อกันอย่างไร
5. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากบอนขาว และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่มีต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 หรือเซลล์มะเร็งเชื้อสายชนิดอื่นๆ
6. ศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ ด้วยวิธีอื่นๆ เช่นตรวจหาชิ้นส่วนที่เกิดจากการแตกสลายของสารพันธุกรรม (DNA fragmentation) ด้วยวิธี TUNEL assay หรือทำการตรวจหา caspase activity
7. ทำการศึกษาว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และสารสกัดจากบอนขาวเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านทางกลไกใด

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เพชรวิ เหมือนนวงษ์ญาติ. พันธุ์ไม้ที่ใช้เป็นสมุนไพรและอาหาร. จุลสารสวนพฤกษศาสตร์
โรงเรียน 8 (พฤษภาคม-มิถุนายน 2546) : 6-7.

ลีนา ผู้พัฒนาพงศ์, สมุนไพรไทย ตอนที่ 2 กรุงเทพฯ: นิเวศธรรมดาการพิมพ์, 2522: 180.

ภาษาอังกฤษ

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*. 5 ed. New York: Garland Science; 2008, p.1115-1116.

Aslan, K., Zhang, J., Lakowicz, JR., and Geddes, CD. Saccharide sensing using gold and silver nanoparticles--a review. *J Fluoresc.* 2004 ;14(4):391-400.

ASTM E. "Terminology for Nanotechnology." *ASTM International*, 2006. 2456-06.

Bhatnagar, V., Srirangam, A., and Abburi, R. In vitro modulation of proliferation and melanization of melanoma cells by citrate. *Mol Cell Biochem.* 1998;187(1-2):57-65.

Bhattacharya, R., et al. Gold Nanoparticles Inhibit VEGF165-Induced Proliferation of HUVEC Cells. *Nano Letters.* 2004;4(12):2479-2481.

Brown, CA., Reitzenstein, EJ., Liu, J., and Jadus, RM. The Anti-Cancer Effects of Poi (*Colocasia esculenta*) on Colonic Adenocarcinoma Cells In Vitro. *Phytotherapy research.* 2005;19:767-71.

Daniel, MC., and Astruc, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev.* 2004;104(1):293-346.

Han, G., Ghosh, P., De, M., and Rotello, V. Drug and gene delivery using gold nanoparticles. *NanoBioTechnology.* 2007;3(1):40-5.

Huerta, S., Goulet, EJ., Huerta-Yepe, S., and Livingston, EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res.* 2007;139(1):143-156.

Kim, KH., Moon, E., Kim, SY., and Lee, KR. Lignans from the tuber-barks of *Colocasia antiquorum var. esculenta* and their antimelanogenic Activity. *J Agric Food Chem.* 2010; 28;58(8):4779-85.

Koide, T., Kojima, T., and Kamei, H. Antitumor effect of gold as revealed by growth suppression of cultured cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm.* 1998 ;13(3):189-92.

- Lai, CS., Mas, RH., Nair, NK., Majid, MI., Mansor, SM., and Navaratnam, V. Typhonium flagelliforme inhibits cancer cell growth in vitro and induces apoptosis: an evaluation by the bioactivity guided approach. *J Ethnopharmacol.* 2008 ;118(1):14-20.
- Lai, CS., Mas, RH., Nair, NK., Mansor, SM., and Navaratnam, V. Chemical constituents and in vitro anticancer activity of Typhonium flagelliforme (Araceae). *J Ethnopharmacol.* 2010;127(2):486-494.
- Leong, A., Kinjo, Y., Tako, M., Iwasaki, H., Oku, H., and Tamaki, H. Flavonoid glycosides in the shoot system of Okinawa Taumu (*Colocasia esculenta* S.). *Food Chemistry.* 2010;119(2): 630-635.
- Letsinger, RL., Mirkin, CA., Elghanian, R., Mucic, RC., and Storhoff, JJ. Chemistry of Oligonucleotide-Gold Nanoparticle Conjugates. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. 1999;144(1):359 - 362.
- Luo, Y., et al. A novel mannose-binding tuber lectin from Typhonium divaricatum (L.) Decne (family Araceae) with antiviral activity against HSV-II and anti-proliferative effect on human cancer cell lines. *J Biochem Mol Biol.* 2007;40(3):358-367.
- Masui, H., Kondo, T., and Kojima, M. An Antifungal compound, 9,12,13-Trihydroxy-(E)-10-Octadecenoic acid, from *Colocasia Antiquorum* inoculated with *Ceratocystis Fimbriata*. *Phytochemistry.* 1989;28:2613-5.
- Mukherjee, P., et al. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clin Cancer Res.* 2005;11(9):3530-3534.
- Mukherjee, P., et al. Potential therapeutic application of gold nanoparticles in B-chronic lymphocytic leukemia (BCLL): enhancing apoptosis. *J Nanobiotechnology.* 2007;5:4.
- Narayanan, R., and El-Sayed, MA. Catalysis with transition metal nanoparticles in colloidal solution: nanoparticle shape dependence and stability. *J Phys Chem B.* 2005 7;109(26):12663-76.
- Pan, Y., et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small.* 2007;3(11):1941-1949.
- Patra, HK., Banerjee, S., Chaudhuri, U., Lahiri, P., and Dasgupta, AK. Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2007;3(2):111-119.
- Patra, H., Dasgupta, A., Sarkar, S., and Biswas, I. Chattopadhyay A. Dual role of nanoparticles as drug carrier and drug. *Cancer Nanotechnology.* 2010;1-1

- Podsiadlo, P., Sinani, VA., Bahng, JH., Kam, NW., Lee, J., and Kotov, NA. Gold Nanoparticles enhance the anti-leukemia action of a 6-mercaptapurine chemotherapeutic agent. *Langmuir*. 2008;15;24(2):568-74.
- Powell, MC., and Kanarek, MS. Nanomaterial health effects--part 1: background and current knowledge. *WMJ*. 2006 ;105(2):16-20.
- Powell, MC., and Kanarek, MS. Nanomaterial health effects--Part 2: Uncertainties and recommendations for the future. *WMJ*. 2006 ;105(3):18-23.
- Roco, MC. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr Opin Biotechnol*. 2003 ;14(3):337-46.
- Salata, O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology*. 2004;30;2(1):3.
- Smith, JE., Wang, L., and Tan, W. Bioconjugated silica-coated nanoparticles for Bioseparation and bioanalysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2006;25(9):848-55.
- Thakor, AS., et al. Oxidative stress mediates the effects of Raman-active gold nanoparticles in human cells. *Small*. 2011;7(1):126-136.
- van Genderen, HO., Kenis, H., Hofstra, L., Narula, J., Reutelingsperger, CP. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(6):953-963.
- Wei, SL., Musa, N., and Wee, W. In vitro antimicrobial activities of *Colocasia esculenta* extract against *Vibrio* spp. – short communication. *Agricultura*. 2010;7, No 1:5-7.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Rotary Evaporator (IKA: RV 10 digital V)
2. Biohazard Laminar Flow (greentechplus)
3. Microcentrifuge (Labnet, LioLab)
4. Vortex mixer (LioLab)
5. Microtip (Sarstedt, Germany)
6. Microtube (Treff, Switzerland)
7. Centrifugetube (Corning)
8. pH meter (BEC Thai)
9. Light microscope (Olympus: model BX41)
10. Spectrophotometer (Biorad: model smart Spec™ 3000)
11. CO₂ incubator (ThermoForma)
12. Autoclave (Selecta: model presoclave 75)
13. Ethanol 99.9% (Merck)
14. Apoptosis detection Kit (BD)
15. RPMI medium (Gibthai)
16. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (USB)
17. Dimethyl sulfoxide (Bio Basic INC.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารเคมี

1. Phosphate buffer saline (1X PBS) (10 mM sodium phosphate, dibasic (Na_2HPO_4), pH

7.4 และ 0.14 M sodium chloride (NaCl)

1.1 ชั่ง Na_2HPO_4 (MW=141.982) 1.42 g และ NaCl (MW=58.44) 8.18 g

1.2 ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml

1.3 ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ 1000 ml

2. Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)

2.1 ใส่ Sodium bicarbonate 2 g ลงในขวดที่มีผงอาหาร RPMI อยู่

2.2 เติมน้ำ MiliQ 800 ml

2.3 ปรับ pH ด้วย Hydrochloric acid

2.4 กรอง และเติม antibiotics 10 ml Fetal bovine serum 100 ml

3. MTT solutions

3.1 เตรียม stock solution 5 mg/ml MTT solution

3.1.1 ชั่ง MTT 50 mg แล้วละลายใน PBS 10 ml

3.1.2 แบ่งใส่หลอดขนาดเล็กหลอดละ 1 ml แล้วเก็บที่ 4°C ได้นาน 1 เดือน

3.2 เตรียม working solution 0.5 mg/ml MTT solution

3.2.1 นำ stock solution 5 mg/ml MTT solution ที่ 4°C มา 1 ml แล้วใส่ในหลอดที่มี serum free medium อยู่ 9 ml ผสมให้เข้ากัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชนิษฐา สุขเลิศ เกิดเมื่อวันที่ 27 มกราคม พ.ศ. 2529 ณ จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต(กายภาพบำบัด) จาก คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2551 ซึ่งปัจจุบันกำลังศึกษาอยู่ในระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตรการแพทย์ แขนงวิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย