การศึกษาผลของสารสกัดจากพริกไทยดำ (piperine) ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง

นางสาวชิรัชนา อาจสัญจร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IN VITRO STUDIES OF PIPERINE'S ANTITUMOR ACTIVITY ON VARIOUS CANCER CELLS

Miss Siratchana Ajsonjorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

502126

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาผลของสารสกัดจากพริกไทยดำ (piperine) ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง
โดย	นางสาว ษิรัชนา อาจสัญจร
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วินัย ดะห์ลัน)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาว์)

ชิรัชนา อาจสัญจร : การศึกษาผลของสารสกัดจากพริกไทยดำ (piperine) ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง. (IN VITRO STUDIES OF PIPERINE'S ANTITUMOR ACTIVITY ON VARIOUS CANCER CELLS) อ. ที่ปรึกษา : อ.ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุล, 83 หน้า.

พิเพอรีนเป็นสารอัลคาลอยด์ พบมากในพืชกลุ่มพริกไทย มีฤทธิ์ในการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและยับยั้งการเจริญของมะเร็งในหนู การศึกษาวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการทดสอบผลของพิเพอรีนต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่างๆ ในหลอดทดลองเป็นครั้งแรก โดยตรวจวัดผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์ด้วย MTS assay จากการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) กล่องเสียง (HEp-2) และปากมดลูก (HeLa) ทนต่อพิเพอรีนได้แม้ในความเข้มข้นที่สูงถึง 200 µg/ml ในขณะที่พิเพอรีนยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (H9) ได้เป็นอย่างดี (IC_{50}=14.7 $\pm$ 2.1 µg/ml) อีกทั้งยังเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย แต่จากการทดสอบใน Jurkat พบว่าพิเพอรีนที่ 20-100 µg/ml ยับยั้งการเจริญได้ใกล้เคียงกัน โดยยังคงมีเซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็น 43.1 $\pm$ 2.85% แต่กลับไม่พบว่าพิเพอรีนเป็นพิษต่อ Jurkat แต่อย่างใด และเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อระยะการเจริญของ Jurkat ผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ (DNA content) เพื่อบ่งชี้ระยะของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ เมื่อทดสอบที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าพิเพอรีนที่ 100 µg/ml ชักนำให้มีเซลล์ในระยะ G_0/G_1 เพิ่มขึ้นจาก 46.55%, 43.79% และ 32.47% ในกลุ่มควบคุมเป็น 56.09%, 62.50% และ 63.53% ตามลำดับ การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยการย้อมด้วย AO/EB พบว่าพิเพอรีนที่ 40 µg/ml ส่งผลให้นิวเคลียสของเซลล์เริ่มหดตัวเป็นก้อนขนาดเล็กที่เวลา 48 ชั่วโมงซึ่งคิดเป็น 1% Apoptotic cells และเมื่อตรวจสอบ PS บนผิวเซลล์ด้วย Annexin V-FITC เพื่อตรวจวัดด้วยโฟลไซโตมิเตอร์พบว่า ณ เวลา 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง พิเพอรีนทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่ชักนำให้เกิด Apoptosis แต่อย่างใด จากการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่าพิเพอรีนยับยั้งการเจริญของ Jurkat โดยการชักนำให้เกิด cell cycle arrest แต่ไม่ชักนำให้เกิด Apoptosis ทั้งนี้คณะผู้วิจัยจะได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมในระดับลึกเพื่อยืนยันการเกิด G_0/G_1 arrest ต่อไป

ภาควิชา เคมีคลินิก ลายมือชื่อนิสิต.....ชิรัชนา อาจสัญจร.....

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ศิริพร ชื้อชวาลกุล

ปีการศึกษา 2550

4877211737 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE
KEY WORD: Piperine / Antitumor activity / Apoptosis

SIRATCHANA AJSONJORN : IN VITRO STUDIES OF PIPERINE'S ANTITUMOR ACTIVITY ON VARIOUS CANCER CELLS. THESIS ADVISOR : LECTURER SIRIPORN CHUCHAWANKUL, PhD., 83 pp.

Piperine, an amide isolated from piper species, was reported to display immunomodulatory and antitumor activity towards mouse carcinomas. Our study is the first to investigate *in vitro* anti-tumor activity of piperine on human tumor cells. Human cancer cells derived from different organs were employed, and their growths affected by piperine were determined by MTS assay. We found that cancer cells derived from colon (HT-29), larynx (HEp-2) and cervix (HeLa) were less sensitive to piperine even at a high concentration tested (200 µg/ml). Interestingly, low concentration of piperine markedly inhibited the proliferation of cancer cells derived from leukocyte, H9 with IC_{50} of 14.7 $\pm$ 2.1 µg/ml. Moreover, piperine from 20-100 µg/ml inhibited Jurkat proliferation with a similar degree observed where cell viability remained at 43.1 $\pm$ 2.85%. On the contrary, piperine did not show any toxicity towards Jurkat at all. Flow cytometric analysis for DNA content after 24, 48 and 72 h indicated that piperine 100 µg/ml induced G_0/G_1 arrest. We found that cells in the G_0/G_1 population increased from 46.55%, 43.79% and 32.47% to 56.09%, 62.50% and 63.53% compare to control. After 48 h treatment, AO/EB staining revealed condensed nuclei cells with 40 µg/ml of piperine exposure, resulting in 1% apoptotic cells. Additionally, Annexin V-FITC staining for PS exposure on Jurkat was determined by flow cytometric analysis. No apoptotic cell was detected after piperine treatments for 3, 6, 9, 12 and 24 h. In conclusion, piperine's anti-tumor effect involved induction of G_0/G_1 arrest but not apoptosis. Nevertheless, further investigation to confirm G_0/G_1 arrest will be performed.

Department	Clinical Chemistry	Student's signature.....
Field of study	Clinical Biochemistry and Molecular Medicine	Advisor's signature.....
Academic year	2007	

กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เกิดขึ้นได้ ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุล ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ในการทำงาน จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณารับเป็นประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทกา โกรานา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดจากพริกไทยดำเพื่อใช้ในงานวิจัยชิ้นนี้

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในภาควิชาเคมีคลินิกและภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณเพื่อนๆ และน้องๆ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาฯ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือต่างๆ

ความดีของการศึกษา และคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่อาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญภาพ.....ญ

บทที่

1 บทนำ.....1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....3
ขอบเขตของการวิจัย.....3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5
พิเพอรีน.....5
คุณสมบัติทั่วไปของพิเพอรีน.....5
ฤทธิ์ต่อระบบย่อยอาหารและการดูดซึม.....6
ฤทธิ์ต่อระบบประสาทและฮอร์โมน.....7
ฤทธิ์ต่อระบบสืบพันธุ์.....7
ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ.....7
ความเป็นพิษ (toxicity) ของพิเพอรีน.....8
ผลของพิเพอรีนต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ.....8
การศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง.....8
การศึกษาวิจัยในมนุษย์.....9
มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia).....9
สาเหตุของมะเร็งเม็ดเลือดขาว.....9
ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว.....10
อุบัติการณ์และระบาดวิทยาของมะเร็งเม็ดเลือดขาว.....11
การรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว.....11

บทที่ หน้า

Human leukemia cell lines....14
ยาต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ใช้ในการทดลอง....14
การเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)....16
วัฏจักรของเซลล์....16
การตายแบบ Apoptosis....18
การตายของเซลล์....18
ตัวควบคุมการเกิด Apoptosis....19
การตรวจสอบการตายแบบ Apoptosis....20
3 วิธีดำเนินการวิจัย....22
เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย....22
เซลล์ที่ใช้ในการทดลองและการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง....25
อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์....25
การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง....26
การเก็บเกี่ยวเซลล์....26
การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ....27
การนับจำนวนเซลล์....27
การตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ชนิดต่างๆ โดย MTS assay....29
การตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ....30
การตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่างๆ....30
การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อ H9 และ Jurkat....31
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์....31
การตรวจวัด Lactate Dehydrogense (LDH) activity....31
การตรวจวัด Cell viability ด้วย Trypan blue dye exclusion method....32

บทที่ หน้า

การศึกษาผลกระทบของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์
ในระยะต่างๆ (Cell cycle Analysis).....33
การศึกษาฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อการเกิด Apoptosis.....34
ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์.....34
ตรวจสอบ DNA Fragmentation โดย
Gel electrophoresis.....35
ตรวจสอบปริมาณ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์
โดยเครื่อง Flow cytometer.....37
การวิเคราะห์ข้อมูล.....38
4 ผลการทดลอง.....39
ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ.....39
ผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของ
เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์.....44
ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity).....45
ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อ H9.....45
ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อ Jurkat.....49
ผลกระทบของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่างๆ.....51
ผลการศึกษาฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อการเกิด Apoptosis.....56
ผลการตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์.....56
ผลการตรวจสอบ DNA fragmentation.....60
ผลการตรวจสอบ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์.....60
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....64

รายการอ้างอิง.....70
ภาคผนวก.....80
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....83

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ		หน้า
2.1	แสดงสูตรโครงสร้างของ Piperine	5
2.2	แสดงสูตรโครงสร้างของ Paclitaxel	14
2.3	แสดงสูตรโครงสร้างของ Camptothecin	15
2.4	แสดงสูตรโครงสร้างของ Actinomycin D	15
2.5	แสดงวัฏจักรของเซลล์	17
2.6	แสดงผลการวิเคราะห์ DNA content โดยการใช้เครื่อง Flow cytometer	18
2.7	แสดงลักษณะการตายแบบ Necrosis และ Apoptosis	19
3.1	แสดงการแยกเม็ดเลือดขาว PBMCs	27
3.2	แสดง Hemocytometer	28
3.3	แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมของเซลล์ทำให้สารประกอบ MTS เปลี่ยนเป็น formazan	29
3.4	แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมของเซลล์ทำให้ tetrazolium salt เปลี่ยนเป็น Formazan salt	32
3.5	แสดงบริเวณเซลล์ในแต่ละระยะ	37
4.1	แสดงผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์มะเร็งกล่องเสียง (HEp-2)	39
4.2	แสดงผลของพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 0.1-100 µg/ml ในการยับยั้งการแบ่งตัวของ H9	40
4.3	แสดงผลของพิเพอรีนความเข้มข้น 5-100 µg/ml ในการยับยั้งการแบ่งตัวของ H9	41
4.4	แสดงผลของพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 0.1-100 µg/ml ในการยับยั้งการแบ่งตัวของ Jurkat	42
4.5	แสดงผลของพิเพอรีนความเข้มข้น 5-100 µg/ml ในการยับยั้งการแบ่งตัวของ Jurkat	43
4.6	แสดงผลของพิเพอรีนในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ	45
4.7	แสดงผลของพิเพอรีนต่อ LDH activity ของ H9	46
4.8	แสดงผลของพิเพอรีนต่อความเป็นพิษของ H9	48
4.9	แสดงผลของพิเพอรีนต่อ LDH activity ของ Jurkat	49

ภาพประกอบ หน้า

4.10 แสดงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ Jurkat.....50
4.11 แสดงผลของพิเพอรีนต่อการเจริญของ Jurkat ในระยะต่างๆ
ที่เวลา เวลา 24 ชั่วโมง.....52
4.12 แสดงผลของพิเพอรีนต่อการเจริญของ Jurkat ในระยะต่างๆ
ที่เวลา เวลา 48 ชั่วโมง.....53
4.13 แสดงผลของพิเพอรีนต่อการเจริญของ Jurkat ในระยะต่างๆ
ที่เวลา เวลา 72 ชั่วโมง.....54
4.14 แสดงผลของพิเพอรีนต่อการเจริญของ Jurkat ในระยะต่างๆ
ที่เวลา เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....55
4.15 ผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat
เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....57
4.16 ผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat
เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....58
4.17 ผลของพิเพอรีนต่อสัณฐานวิทยาของ Jurkat
เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....59
4.18 ผลการตรวจสอบ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์
เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....61
4.19 ผลการตรวจสอบ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์
เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....62
4.20 ผลการตรวจสอบ Phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์
เมื่อบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....63