



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรสำหรับเป็นสารต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระบบเลี้ยงเซลล์
แบบสองมิติและสามมิติ

Activity of bioactive compounds from medicinal plant as anti-colon
cancer compounds in the 2D and 3D culture system

ชื่อนิสิต นายธรรณัฐชัย แดงแพร **เลขประจำตัว** 5832325423

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

รายงานโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์

ชื่อโครงการ

ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรสำหรับเป็นสารต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระบบเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและสามมิติ

(Activity of bioactive compounds from medicinal plant as anti-colon cancer compounds in the 2D and 3D culture system)

นิสิตในโครงการ

นาย ธรณ์ธัญญ์ แดงแพร

รหัสประจำตัวนิสิต 5832325423

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ


โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ	ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรรอบเป็นสารต้านมะเร็งลาไลใหญ่ในระบบ เลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและสามมิติ
โดย	นายธรรณัณย์ แดงแพร รหัสนิต 5832325423
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ
ปีการศึกษา	2561

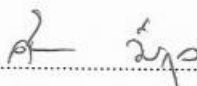
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ศิดา วีรกุล)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์

คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรรักษาเป็นสารต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระบบเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและสามมิติ

ชื่อนิสิต นายธรรณัฐณ์ แดงแพร

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

บทคัดย่อ

มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นมะเร็งที่มีอัตราการตายมากเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก สามารถเกิดได้มากทั้งในเพศชายและเพศหญิง และจะเกิดมากขึ้นเมื่อมีอายุเพิ่มขึ้น โดยในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพที่ให้ผลเสียน้อย การใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการรักษามะเร็งเป็นหนทางใหม่ในการรักษา เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอาจทำลายเซลล์มะเร็งได้อย่างจำเพาะกว่าการใช้เคมีบำบัด โดยในปัจจุบันได้มีวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ ซึ่งเป็นวิธีการเลี้ยงเซลล์ที่สามารถจำลองสภาวะแวดล้อมได้ใกล้เคียงกับเซลล์มะเร็งในร่างกาย โดยมีประโยชน์ในการค้นหาสารต้านมะเร็งชนิดใหม่ การเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติจะเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และระหว่างเซลล์กับ Extracellular matrix (ECM) มีการลดเยื้องความเข้มข้นของสารอาหารและออกซิเจน ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่สามารถจำลองได้ในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ ในการศึกษาครั้งนี้ ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมด 11 สาร (รหัส ASTP40-42, ASTP53-60) ที่ทำให้บริสุทธิ์จากพืช 2 ชนิด *Croton crassifolius* และ *Tiliacora triandra* ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของสารเหล่านี้ต่อเซลล์มะเร็งที่ถูกเลี้ยงแบบสองมิติและสามมิติโดยใช้เซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 โดยผลจากการทำ MTT assay ในการทดสอบผลของสารต่อการอยู่รอดของเซลล์ในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติพบว่ามีทั้งหมด 6 สารที่มีฤทธิ์ทำให้เซลล์มะเร็งตาย (ASTP40-42,57,59,60) และอีก 5 สารที่ไม่มีฤทธิ์ต่อการตายของเซลล์มะเร็ง (ASTP53-56,58) แต่เมื่อนำสารทั้งหมดไปทดสอบต่อในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติด้วยการเลี้ยงใน Ultra-Low Attachment 96-well plate หลังจากได้ spheroid ของเซลล์มะเร็งแล้วจึงนำมาทดสอบด้วยสารสกัดแล้วนำไปย้อมสีนิวเคลียสด้วยสี Hoechst เพื่อดูลักษณะการตายของเซลล์มะเร็ง พบว่ามี 2 สารที่ให้ผลขัดแย้งกับผลการทดลองแบบสองมิติ ได้แก่ สาร ASTP55 ซึ่งจากที่เคยไม่มีฤทธิ์ในการกำจัดมะเร็งที่เลี้ยงแบบสองมิติแต่กลับพบว่ามีฤทธิ์ในการกำจัดเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงแบบสามมิติ และสาร ASTP59 ที่จากเดิมเคยมีฤทธิ์ในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ พบว่ามีฤทธิ์น้อยลงในการเลี้ยงแบบสามมิติ แต่พบว่าสามารถทำให้ความหนาแน่นของ spheroid ลดลงได้ ต่อมาเมื่อดูจากผล ATP assay พบว่า สาร ASTP53 และ ASTP55 สามารถลดการเจริญของเซลล์มะเร็งในการเลี้ยงแบบสามมิติได้จากที่เคยไม่มีผลในการเลี้ยงแบบสองมิติ และผลทั้งหมดนี้ยังชี้ว่าการใช้ระบบเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อาจช่วยให้สามารถค้นพบสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งซึ่งมีแอคทิวิตีต้านมะเร็งใน *in vivo* ได้

Abstract

Colon rectum cancer (CRC) is one of the major cancer-related causes of death around the world. CrC affects in people of all age but mainly the older adults. There is currently no effective treatments that cause few side effects. Natural bioactive compounds are one of the novel options to treat cancer. Because these compounds may show specificity in eliminating cancer cells, unlike chemotherapy. Recently, 3D cultures are the *in vitro* models that mimic *in vivo* tumor microenvironment. and open new way of the discovery of new cancer therapies. 3D cultures involve cell-cell interaction, cell-ECM interaction and have nutrient and O₂ gradient which are lacking in the 2D cultures. In this study, 11 bioactive compounds (code name ASTP40-42, 53-60) which are purified from two medicinal plants *Croton crassifolius* and *Tiliacora triandra* are studied for anti-cancer activity against the colon cancer in 2D and 3D cultures, using SW620 cell lines as a model. The MTT assay revealed that 6 of 11 bioactive compounds (ASTP40-42,57,59,60) showed cytotoxicity against on colon cancer cell lines. In a 3D cultures, SW620 spheroids in 3D cultures using ultra-low attachment 96-well plate were treated by bioactive compounds and stained by Hoechst dye to observe the cytotoxicity. Interestingly, there are 2 out of 11 that showed opposite results between 2D and 3D cultures. First, ASTP55 which was no effect in 2D cultures but It has small effect in 3D cultures. Another is ASTP59 has less effect in 3D cultures compared to 2D cultures but It can interrupt spheroid formation and decrease spheroid density in 3D cultures. Furthermore, ATP assay result showed anti-cancer activity of ASTP53, 55 in 3D cultures. Taken together, the results indicate that using 3D culture system as a tool in the study of activity of bioactive compounds has potential for drug discovery of novel anti-cancer compounds, with anti-tumor activity *in vivo*.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีเนื่องจากความกรุณาของ ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะต่าง ๆ ตลอดจนการกระตุ้นเตือนให้มีความกระตือรือร้นในการทำการศึกษา ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างสูง รวมถึงคำสั่งสอนและคำแนะนำในการนำเสนอและวิธีการการถามตอบคำถาม และยังช่วยปรับปรุงแก้ไขโครงการวิจัยมาตลอดจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยซาบซึ้งมากและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการนี้ และตัวผู้วิจัย

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณเงินทุนสนับสนุนงานวิจัย ที่ได้รับจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ ฝ่ายวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอกราบขอบพระคุณ พี่ ๆ ห้องวิจัย 2015 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่สอนตั้งแต่เทคนิคเบื้องต้นในการทำแลปไปจนถึงสอนและแนะนำวิธีการทำแลปที่แม้จะยุ่งยากก็ยังคงให้ความช่วยเหลือเสมอมา รวมถึงการให้ความช่วยเหลืออื่น ๆ ในการทำแลป คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัวและเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจ และการสนับสนุนแก่ผู้วิจัยเสมอมา ตลอดจนถึงสุดโครงการ

ธรรณันท์ แดงแพร

สารบัญ

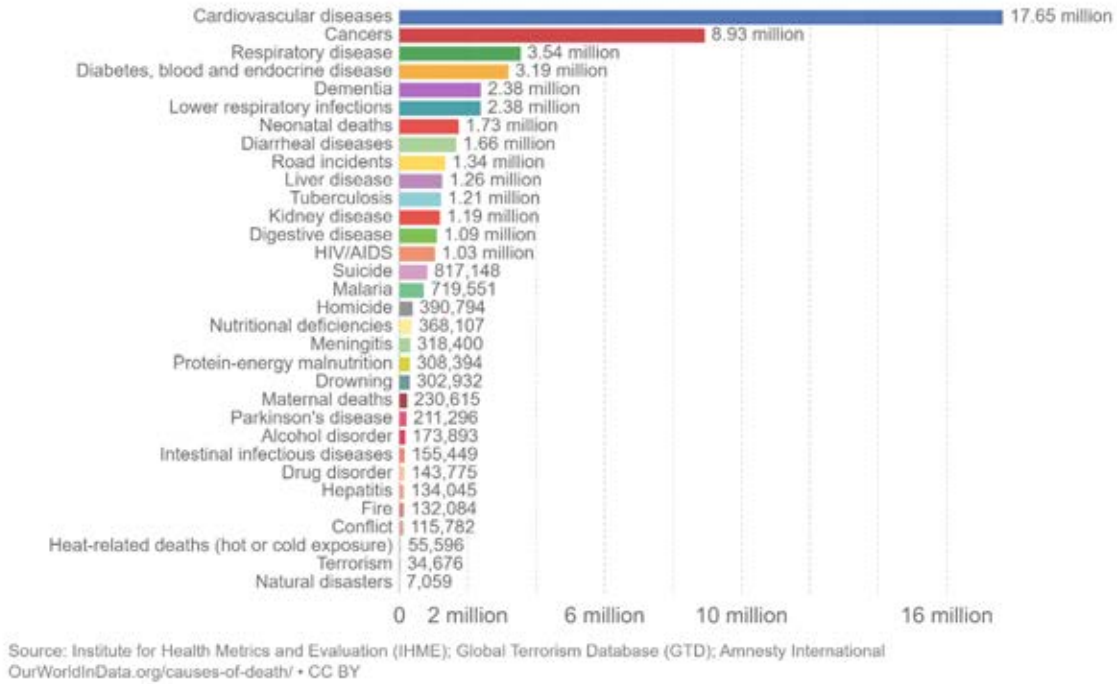
เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
อุปกรณ์ที่ใช้และเคมีภัณฑ์	7
วิธีดำเนินการทดลอง	9
ผลการทดลอง	14
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	32
ภาคผนวก	35
เอกสารอ้างอิง	36

บทที่ 1

บทนำ

โรคมะเร็ง

โรคมะเร็ง (Cancer) เป็นโรคที่เป็นสาเหตุการตายอันดับต้น ๆ ของโลกนี้ โดยมีอัตราการตายเป็นอันดับ 2 จากอัตราการตายทั้งหมดใน Global Burden of Disease Collaborative Network ในพ.ศ. 2559 อย่างที่แสดงในภาพที่ 1.1 และยังเป็นโรคที่มีอัตราการตายอันดับ 1 ในประเทศไทยด้วย มาตั้งแต่พ.ศ. 2542 และมีแนวโน้มของอัตราการตายเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ทุกปี โดยมีอัตราการเกิดมะเร็งในผู้ชายเป็น 156.7 ต่อประชากรหนึ่งแสนคนและอัตราการเกิดมะเร็งในผู้หญิง 138.2 ต่อประชากรหนึ่งแสนคน (Health information unit, 2011) ซึ่งสาเหตุของโรคอาจเกิดได้จากปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ถึงแม้ว่าทุกวันนี้จะมีวิธีการรักษาชนิดใหม่มากมายแต่ก็ยังไม่มียังไม่มีวิธีสามารถรักษาการลุกลามและแพร่กระจายของมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการพัฒนาวิธีที่มีประสิทธิภาพและส่งผลเสียน้อยสำหรับการรักษามะเร็งจึงจำเป็นมาก นอกจากนี้วิธีการบำบัดด้วยเคมีบำบัด (Chemotherapy) ที่เป็นวิธีที่ใช้ในการบำบัดอย่างแพร่หลายในปัจจุบันยังก่อให้เกิดผลกระทบต่อร่างกายทั้งมีความเป็นพิษต่อร่างกายและอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงอื่น ๆ ได้อีกด้วย ดังนั้นวิธีที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายและมีความปลอดภัยสูงกว่าในการรักษามะเร็งคือการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) ที่สกัดมาจากสมุนไพรจากธรรมชาติในการรักษาหรือยับยั้งการเจริญของมะเร็ง ซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีแต่ใช้ฤทธิ์ของสารสกัดที่มีความสามารถในการลดการเจริญ การแพร่กระจายหรืออาจทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งได้ (Hu Wang, et al, 2012) โรคมะเร็งสามารถเกิดได้ทั้งในทุกช่วงอายุแต่จะพบได้มากในผู้ใหญ่ไปจนถึงผู้สูงอายุ โดยโรคมะเร็งนั้นมีสาเหตุมาจากการเพิ่มจำนวนอย่างผิดปกติของเซลล์ที่ผิดปกติภายในร่างกายที่อาจเป็นเซลล์อะไรก็ได้ ซึ่งมะเร็งแต่ละชนิดก็จะมี การตอบสนองและการแสดงออกอันทำให้เกิดการทำงานของร่างกายที่ผิดปกติไปแตกต่างกันไป รวมไปถึงต้องใช้วิธีในการรักษาที่แตกต่างกัน (Cooper GM., 2000)

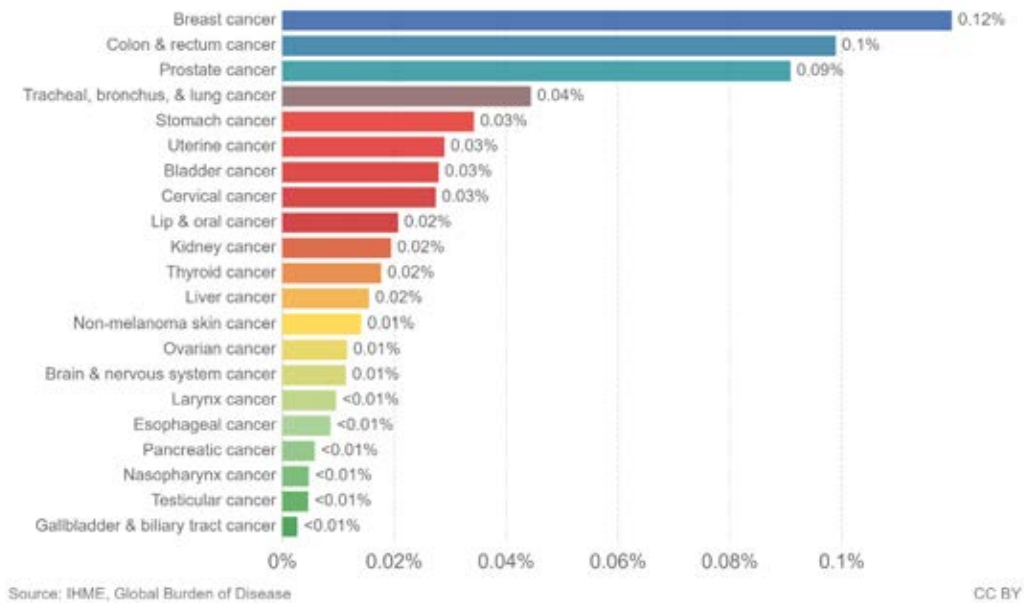


ภาพที่ 1.1 ข้อมูลแสดงจำนวนการตายจากสาเหตุต่าง ๆ (Global Burden of Disease Collaborative Network, 2016)

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colorectal cancer) เป็นหนึ่งในมะเร็งที่มีอัตราการตายสูงเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก โดยมีอัตราการตายมากเป็นอันดับ 2 จากผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังทั้งหมดในพ.ศ. 2559 ดังที่แสดงในภาพ 1.2 เป็นโรคที่สามารถเกิดได้ทั้งในผู้ชายและผู้หญิง อัตราการเกิดโรคมะเร็งยังมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากการที่เซลล์ลำไส้ที่เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนผิดปกติและเจริญเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ อาจมีสาเหตุมาจากการกินอาหารอย่างไม่ถูกสุขลักษณะหรืออาจเกิดจากพันธุกรรมก็ได้ ซึ่งอาการของโรคในช่วงแรกจะไม่มีลักษณะบ่งชี้เฉพาะที่ทำให้ทราบได้ และไม่สามารถทำการตรวจด้วยตนเองได้ ต้องอาศัยการสังเกตอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นหรือความผิดปกติของอุจจาระ การวินิจฉัยโรคสามารถทำได้โดยการตรวจชิ้นเนื้อ ตรวจอุจจาระ แต่ว่าในปัจจุบันยังไม่มีวิธีในการรักษาโรคมะเร็งชนิดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยวิธีการรักษาในปัจจุบันจะใช้วิธีการผ่าตัดเป็นวิธีการรักษาหลักและอาจมีการใช้เคมีบำบัดหรือรังสีรักษาไปด้วย โดยมีปัจจัยที่จะต้องคำนึงถึงหลายอย่างและยากต่อการประเมินระยะของโรคและคาดการณ์การลุกลามของโรคเป็น นอกจากนี้การผ่าตัดรักษายังอาจมีภาวะแทรกซ้อนเช่น ลำไส้อุดตัน ลำไส้แตกทะลุ หรืออาจมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะใกล้เคียงหรือทั่วช่องท้อง ทำให้การรักษาเป็นไปได้

อย่างยากลำบากมากขึ้น และถึงแม้ว่าจะมีการรักษาไปแล้วก็ไม่ได้หายขาดในทันที จึงทำให้ต้องมีการเฝ้าระวังหลังการรักษาและการตรวจอาการของมะเร็งเพิ่มเติมต่อไปอีก เนื่องจากการผ่าตัดไม่สามารถที่จะทำลายเซลล์มะเร็งได้จนหมดจึงจำเป็นต้องใช้วิธีเคมีบำบัดหรือรังสีรักษาในการลดโอกาสที่จะเป็นซ้ำ ซึ่งการใช้เคมีหรือรังสีเป็นวิธีที่รุนแรงกับร่างกาย ไม่ได้ส่งผลกับเซลล์มะเร็งเพียงอย่างเดียวทำให้ไม่สามารถใช้วิธีนี้ในการรักษาผู้ป่วยเป็นระยะเวลานานๆ ได้ เพราะฉะนั้นถึงแม้ว่าจะมีการผ่าตัดลำไส้ออกและการรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัดหรือรังสีรักษาแล้วก็ตาม แต่ถ้าหากยังมีเซลล์มะเร็งหลงเหลือมากพอก็อาจเกิดการกลับมาเป็นซ้ำได้อีกครั้ง (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2015, Shama Virani, et al., 2017, Sarah Cattin, et al., 2018)



ภาพที่ 1.2 สัดส่วนผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดต่างๆจากประชากรทั้งหมด (Global Burden of Disease Collaborative Network, 2016)

สภาวะการเลี้ยงเซลล์มะเร็งแบบสองมิติและสามมิติ

การเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ คือการเลี้ยงเซลล์โดยควบคุมสภาวะให้เซลล์มีการเจริญรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนสามมิติ เซลล์จะมีการสร้าง Extracellular matrix (ECM) มาห่อหุ้ม มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งด้วยกันเอง และระหว่างเซลล์มะเร็งกับสาร ECM มีการลาดเอียงความเข้มข้นของอาหารและออกซิเจน ซึ่งทั้งหมดนี้ทำให้เซลล์ที่เลี้ยงแบบสามมิติสามารถจำลองสภาวะแวดล้อมของเนื้องอกตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะการอยู่รวมกันเป็นกลุ่มได้ดีกว่า โดยที่วิธีเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีดั้งเดิมในปัจจุบันหรือการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติไม่สามารถทำได้ เนื่องจากวิธีเลี้ยงเซลล์แบบดั้งเดิมนี้เป็นวิธีที่ปล่อยให้เซลล์ตกลงไปเกาะอยู่บนพื้นผิววัสดุผิวเรียบที่ใช้เลี้ยงแล้วจึงเจริญแผ่ออกทางด้านข้างดังนั้นเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีนี้จะไม่มีการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งด้วยกันเองหรือระหว่างเซลล์มะเร็งกับ ECM ไม่มีการลาดเอียงความเข้มข้นของออกซิเจน ของอาหาร และมีลักษณะการเจริญเป็นชั้นเดียว (monolayer) จึงทำให้เมื่อนำไปทดสอบยาเซลล์มะเร็งแต่ละเซลล์จะได้รับยาโดยตรง ซึ่งอาจจะทำให้ได้ผลที่แตกต่างไปจากเซลล์มะเร็งในธรรมชาติ ในทางกลับกันการเลี้ยงแบบสามมิติที่สามารถจำลองสภาวะแวดล้อมของเนื้องอกได้ดีกว่าจะทำให้สามารถตรวจผลของยาหรือสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งได้อย่างถูกต้องและแม่นยำกว่าเนื่องจากวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติจะทำให้เซลล์มีการเจริญและรวมตัวกันเป็นทรงสามมิติที่ใกล้เคียงกับในสิ่งมีชีวิต มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์ด้วยกันเองและระหว่างเซลล์กับสารเคลือบเซลล์ มีการลาดเอียงความเข้มข้นของออกซิเจน อาหารและของเสียจากเซลล์ นอกจากนี้วิธีนี้ยังสามารถดูความสามารถในการแพร่ผ่านชั้นสารเคลือบเซลล์ของยาก่อนที่จะไปถึงเซลล์มะเร็งจริงๆได้อีกด้วย (Susan Breslin, et al., 2016, Seema M. Ehsan, et al., 2014, Kunz-Schughart LA, et al., 1998, Yamada KM., Cukierman E., 2007, Sutherland RM., 1988, Pampaloni F, et al., 2007)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชและย่านาง

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใช้ในการศึกษานี้สกัดแยกได้มาจากพืช 2 ชนิดคือ พังคิและย่านางดังรูปที่แสดงในภาพ 1.3 โดยพังคิ หรือ *Croton crassifolius* สามารถสกัดได้เป็นสาร Cyperenoic acid และนำไปสังเคราะห์ได้เป็นสารอนุพันธ์สารใหม่ที่มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายเดิมแต่มีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกันอีก 7 สาร (code name ASTP053-60) โดยพังคิเป็นสมุนไพรที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศจีน ลาว ไทยและเวียดนาม มีการนำมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เช่น อาการปวดท้อง, ปวดข้อ, ดีซ่าน, ข้ออักเสบรูมาตอยด์, รักษาอาการงูกัด (Flora of China, 2004) และมีการนำมาใช้รักษาโรคมะเร็งในประเทศไทย¹³ สำหรับสารที่เหลืออีก 3 สาร ได้แก่ Tiliacorinine, Tiliacrine และ Nortiliacorinine (code name ASTP040-042) สกัดแยกได้มาจาก *Tiliacora*

triandra หรือที่รู้จักกันในชื่อ “ย่านาง” เป็นสมุนไพรที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในประเทศลาวและตอนเหนือของประเทศไทย และได้มีรายงานว่าสารสกัดจากใบย่านางมีปริมาณของ polyphenol สูงและมีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) (Boonyarathanakornkit, et al., 1988, Supatta Chawalitpong, et al., 2018)



ภาพที่ 1.3 แหล่งที่มาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พังคิ (ซ้าย) และย่านาง (ขวา) (MedThai, 2013 และ kapook health, 2013)

การเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่แบบสามมิติ

ในการเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ให้เจริญแบบสามมิติในการทดลองนี้ ได้นำเซลล์ไปเลี้ยงในเพลทชนิดพิเศษแบบ round bottom ที่ได้มีการเคลือบสารป้องกันไม่ให้เซลล์ยึดเกาะที่ผิววัสดุไว้แล้ว ทำให้เซลล์มะเร็งนี้เจริญรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน spheroid แบบสามมิติ ซึ่งในการทดลองแรกได้ทำการ optimize หาสภาวะในการเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุด โดยได้ทำการทดลองเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ต่อ spheroid ปริมาตรของอาหารเลี้ยงปริมาณของ FBS ในอาหาร และระยะเวลาที่ปล่อยให้เซลล์เจริญเป็น spheroid โดยอ้างอิงจากงานวิจัยที่มีการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติในเพลทที่เคลือบสารป้องกันไม่ให้เซลล์เกาะที่มีรายงานมาก่อนหน้าเพื่อให้ได้ spheroid ที่สมบูรณ์และเหมาะสมที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแบบสามมิติต่อไป (Korff and Augustin, 1998; Walzl et al., 2014, Angelika Riedl, et al., 2017)

การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ

ในการทดลองนี้จะนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ถูกเลี้ยงแบบสองมิติเพื่อดูความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยดูจากอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเมื่อได้รับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี MTT assay ที่ 24 ชั่วโมง โดยจะทำซ้ำครั้งที่ 2 สำหรับสารที่มีความเป็นพิษกับเซลล์ แต่สำหรับสารที่ไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์จะนำไปดูความเป็นพิษกับเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ต่อที่ 72 ชั่วโมงเพื่อยืนยันความไม่เป็นพิษของสารต่อไป หลังจากนั้นจึงจะนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้มีการทดสอบในการเลี้ยงแบบสองมิติในขั้นต้นไปแล้ว มาทำการทดสอบต่อในการเลี้ยงแบบสามมิติ นำผลมาเปรียบเทียบหลังย้อมสีดูลักษณะทางกายภาพของนิวเคลียส จากลักษณะทางกายภาพของนิวเคลียสสามารถบ่งบอกถึงการตายของเซลล์ได้ (RICK SAI-CHUEN WU, et al., 2011, Muhammad Shahid Riaz Rajoka, et al., 2018)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาผลเชิงเปรียบเทียบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากสมุนไพรต่อการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ที่เลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและสามมิติ
2. เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของเซลล์โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

รู้ความแตกต่างในการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพระหว่างเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงแบบสองมิติและสามมิติ

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ทิวป์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 0.5, 1.5 มิลลิลิตร
2. หลอด falcon ขนาด 15, 50 มิลลิลิตร
3. Ultra-Low Attachment 96-well plate
4. ปิเปตทิป (pipette tips) ขนาด 0.5-10, 200, 1,000 ไมโครลิตร
5. ไมโครปิเปต ขนาด 2, 20, 200, 1,000 ไมโครลิตร
6. จานเพาะเชื้อ
7. เครื่องชั่งสาร รุ่น L2220 P (Scientific promotion)
8. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 (Tomy, Japan)
9. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น BV-124 (ISSCO)
10. ตู้เย็น (refrigerator) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (MITSUBISHI, Japan)
11. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (SHARP, Japan)
12. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
13. เครื่องทำน้ำแข็ง รุ่น OF 146 (Newton, Thailand)
14. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G560E (Scientific industries, USA)
15. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) รุ่น MMM Medcenter (Inucell)
16. หลอด cryovial ของบริษัท SPL Life Sciences ,Korea
17. เทปปิดแผล Sealing Tape บริษัท Scientific Industries Inc. ,USA
18. ฮีโมไซโตมิเตอร์ บริษัท ISOLAB Laborgerate GmbH, Germany
19. ที่วางหลอดทดลอง (test tube rack)
20. เครื่องอ่านไมโครเพลท รุ่น Anthos 2010 บริษัท Biochrom Ltd, England
21. เครื่องชั่งรุ่น PG6002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
22. อ่างควบคุมอุณหภูมิ บริษัท memmert, Germany
23. กล้องจุลทรรศน์ยี่ห้อ OLYMPUS CKX3-SLP บริษัท OLYMPUS, Japan
24. ขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีฝาปิดตัวกรองขนาด 25 75 ซม² บริษัท Thermo Fisher Scientific,USA
25. ตู้บ่มเซลล์ที่มีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide incubator) รุ่น 311 (Thermo Electron Corporation, USA)

เคมีภัณฑ์

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High glucose medium (DMEM) บริษัท Hyclone, USA
2. Fetal Bovine Serum (FBS) บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
3. Penicillin/Streptomycin บริษัท Gibco Laboratories, USA
4. Sodium pyruvate
5. HEPES
6. Dimethylsulfoxide (DMSO) บริษัท Sigma-Aldrich, England
7. MTT reagent
8. Ethanol
9. Trypsin-EDTA บริษัท Gibco™ Laboratories, USA
10. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; NaCl) EMSURE® บริษัท Merck KGaA, Germany
11. โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride; KCl) EMSURE® บริษัท Merck KGaA, Germany
12. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-Sodium hydrogen phosphate; Na₂HPO₄ EMSURE® บริษัท Merck KGaA, Germany
13. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate; KH₂PO₄) EMSURE® ของบริษัท Merck KGaA, Germany
14. พาราฟอร์มัลดีไฮด์ 4% (Paraformaldehyde)
15. สีย้อมนิวเคลียส hoechst
16. สีย้อมทริปแพนบลู 0.4% (Trypan blue) บริษัท Gibco™ Laboratories, USA

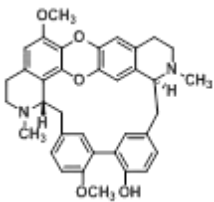
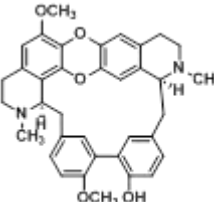
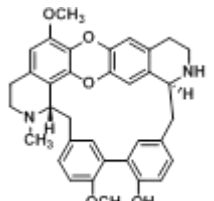
วิธีดำเนินการทดลอง

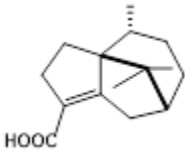
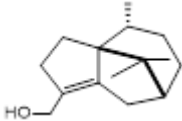
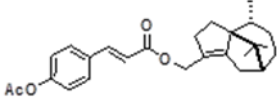
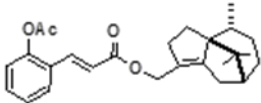
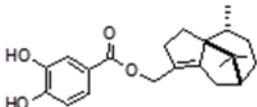
การเลี้ยงเซลล์

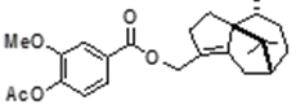
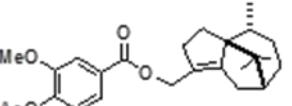
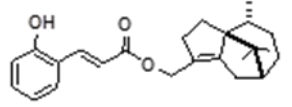
เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ SW620 จะได้จาก American Type Culture Collection (ATCC® CCL-227™, Manassas, VA, USA). เลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High glucose (Hyclone, U.S.A.) (A. Maamer-Azzabi, et al., 2013) ที่ใส่ 10% fetal bovine serum (FBS) ที่มี 1% Pen/Strep และเก็บรักษาในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C 5% CO₂ หลังจากเซลล์เจริญเต็มที่แล้ว จะลอกเซลล์เพื่อนำไปทำการทดลองต่อไปด้วย Trypsin-EDTA (Gibco™ Laboratories, USA)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใช้ในการทดลอง

ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ สุขสำราญ (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง)

ชื่อตัวอย่าง (ชื่อย่อ)	โครงสร้าง/สูตรโครงสร้าง/น้ำหนักโมเลกุล	แหล่งที่มา	ส่วนที่ใช้
Tilliacorinine (ASTP040)	 <p style="text-align: center;">C₃₆H₃₆N₂O₅, 576.26</p>	<i>T. triandra</i>	ราก/ลำต้น
Tiliacorine (ASTP041)	 <p style="text-align: center;">C₃₆H₃₆N₂O₅, 576.26</p>	<i>T. triandra</i>	ราก/ลำต้น
Nortiliacorinine (ASTP042)	 <p style="text-align: center;">C₃₅H₃₄N₂O₅, 562.65</p>	<i>T. triandra</i>	ราก/ลำต้น

ชื่อตัวอย่าง (ชื่อย่อ)	โครงสร้าง/สูตรโครงสร้าง/น้ำหนักโมเลกุล	แหล่งที่มา	ส่วนที่ใช้
Cyperenoic acid (ASTP053)	 $C_{15}H_{22}O_2$, 234.33	<i>C. crassifolius</i>	ราก
Cyperenol (ASTP054)	 $C_{15}H_{24}O$, 220.35	สังเคราะห์จาก cyperenoic acid	-
Cyperenyl 10-O-(4- acetoxyl-trans-cinnamate) or the ester analog 055 (CATC) (ASTP055)	 $C_{26}H_{32}O_4$, 408.53	สังเคราะห์จาก cyperenoic acid	-
Cyperenol 10-O-(2- acetoxyl-trans-cinnamate) or the ester analog 056 (ASTP056)	 $C_{26}H_{32}O_4$, 408.53	สังเคราะห์จาก cyperenoic acid	-
Cyperenol 10-O-(3,4- dihydroxy-trans- cinnamate) or the ester analog 057 (ASTP057)	 $C_{22}H_{28}O_4$, 356.46	สังเคราะห์จาก cyperenoic acid	-

ชื่อตัวอย่าง (ชื่อย่อ)	โครงสร้าง/สูตรโครงสร้าง/น้ำหนักโมเลกุล	แหล่งที่มา	ส่วนที่ใช้
Cyperenol 10-O-(3-methoxy-4-acetoxy-trans-cinnamate) or the ester analog 058 (ASTP058)	 $C_{25}H_{32}O_5$, 412.52	สังเคราะห์จาก cyperenoic acid	-
Cyperenol 10-O-(3,4-dihydroxy-trans-cinnamate) or the ester analog 059 (ASTP059)	 $C_{26}H_{32}O_6$, 440.53	สังเคราะห์จาก cyperenoic acid	-
Cyperenol 10-O-(2-hydroxy-trans-cinnamate) or the ester analog 060 (ASTP060)	 $C_{24}H_{30}O_3$, 366.49	สังเคราะห์จาก cyperenoic acid	-

การทดสอบความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการเลี้ยงแบบสองมิติด้วยวิธี MTT assay

หยอดเซลล์ใน 96-well plate ปริมาณ 10^4 เซลล์ต่อ $100 \mu\text{l}$ ในอาหาร DMEM/10% FBS/1% Pen/Strep แล้วบ่มข้ามคืน หลังจากนั้นเติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ASTP040-42, ASTP053-60 ที่ความเข้มข้นต่าง (0.316, 1, 3.162, 10, 31.62 และ $100 \mu\text{M}$) โดยมี DMSO เป็นชุดควบคุม หลังจากบ่มไว้ 24-72 ชั่วโมง จึงจะนำเซลล์มาตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay โดยการนำเพลทที่ต้องการทดสอบมาเติมสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (5 mg/ml) ลงไป $10 \mu\text{l}$ ต่อหลุม หลังจากนั้นบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO $100 \mu\text{l}$ หลังจากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วยเครื่อง MULTISKAN FC microplate reader (Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA) แล้วนำไปหาค่า cell viability โดยใช้อาหารเปล่าเป็น blank ด้วยสูตร ($\% \text{ cell viability} = ((\text{abs. of treated cells}) - (\text{abs. of blank})) / ((\text{abs. of vehicle cells}) - (\text{abs. of blank})) \times 100$)

การเลี้ยงเซลล์แบบ Spheroid

เริ่มจากทดลองนำเซลล์มาเลี้ยงให้เป็นสามมิติด้วยการหยอดเซลล์ 5000, 10000 และ 20000 เซลล์ต่อหลุมใน Ultra-Low Attachment microplate 6-well plate ใน 2 ml ในอาหาร DMEM/10% FBS 1% Pen/Strep แล้วจึงบ่มที่ 37°C 5% CO_2 หลังจากนั้นจะนำไป optimize วิธีการเลี้ยงใน Ultra-Low Attachment microplate 96-well plate โดยจะหยอดเซลล์ 3000-5000 เซลล์ต่อ spheroid ตามที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (Korff and Augustin, 1998; Walzl et al., 2014) เซลล์จะเกาะกันและหยอดลงใน $100\text{-}200 \mu\text{l}$ ของอาหาร DMEM/5-10% FBS/1% Pen/Strep หลังจากนั้นทิ้งไว้ 1-5 วันให้เซลล์รวมตัวเป็น spheroid สังเกตลักษณะการเจริญเป็น spheroid ของเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการเลี้ยงแบบสามมิติด้วยการย้อมสีนิวเคลียส

หยอดเซลล์ 5000 เซลล์ต่อหลุม ลงใน Ultra-Low Attachment microplate 96-well plate ในอาหาร DMEM 10% FBS 1% Pen/Strep $200 \mu\text{l}$ หลังจากทิ้งไว้ 5 วันให้เซลล์เจริญเป็น spheroid แล้วจึงเปลี่ยนเอาอาหารเก่าออกแล้วใส่อาหารใหม่ที่มีสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไป โดยใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม จากนั้นบ่มใน 37°C 5% CO_2 ไว้ 72 ชั่วโมง แล้วจึงย้าย spheroid ไปไว้ใน 96-well plate อันใหม่แบบ round bottom ด้วยปิเปต P200 ที่ตัดปลายทิวและนำไปลงไฟให้แห้ง หลังจากนั้นจึงนำ spheroid ไปย้อมด้วยสีเพื่อดูลักษณะทางกายภาพของเซลล์มะเร็ง หลังจากเก็บ spheroid มาแล้ว จะนำไปล้างด้วย PBS $500 \mu\text{l}$ แล้วทิ้งไว้ให้เซลล์ตกลงมา 5 นาที

ทั้งหมด 2 ครั้ง จากนั้น เติม 4% paraformaldehyde เพื่อตรึงเซลล์ให้ท้วม spheroid แล้วนำไปบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลา ล้างด้วย PBS อีก 1 ครั้ง ก่อนที่จะเติมสี Hoechst (5 µg/ml) ลงไปพอท้วม spheroid แล้วบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ครบเวลาแล้วจึงล้างด้วย PBS อีก 2 ครั้ง แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ รุ่น OLYMPUS-IX71 (Olympus Life Science, Shinjuku, Tokyo, Japan)

การทดสอบความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการเลี้ยงแบบสามมิติด้วยวิธี ATP assay

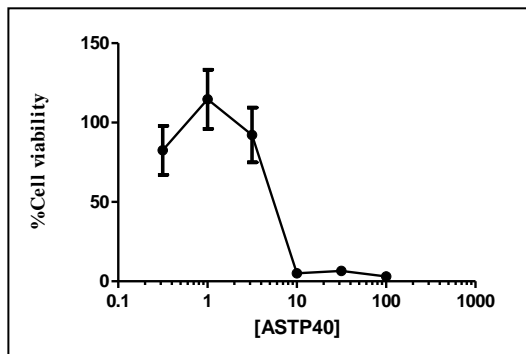
หยอดเซลล์ 5000 เซลล์ต่อหลุม ลงใน Ultra-Low Attachment microplate 96-well plate ในอาหาร DMEM 10% FBS 1% Pen/Strep 200 µl หลังจากทิ้งไว้ 5 วันให้เซลล์เจริญเป็น spheroid แล้วจึงเปลี่ยนอาหารเก่าออกแล้วใส่อาหารใหม่ที่มีสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไป โดยใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม จากนั้นบ่มใน 37 °C 5% CO₂ ไว้ 72 ชั่วโมง แล้วนำไปทำ ATP assay ด้วยวิธี ATPlite 1step Luminescence Assay เริ่มต้นจากการนำเพลทมาปรับปริมาตรของอาหารในหลุมให้เป็น 100 µl หลังจากนั้นเติม substrate solution 100 µl ปิดฝาเพลทแล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 5 นาที พอครบเวลานำไปบ่มต่อในที่มืด 20 นาที หลังจากนั้นผสมของเหลวในหลุมให้เข้ากัน แล้วถ่ายของเหลว 50 µl ลงใน OptiPlate-96 HS ซึ่งเป็นเพลทสำหรับนำไปวัดปริมาณแสงลูมิเนสเซนซ์ แล้วจึงนำไปวัดปริมาณแสงลูมิเนสเซนซ์ที่เกิดขึ้น

บทที่ 3

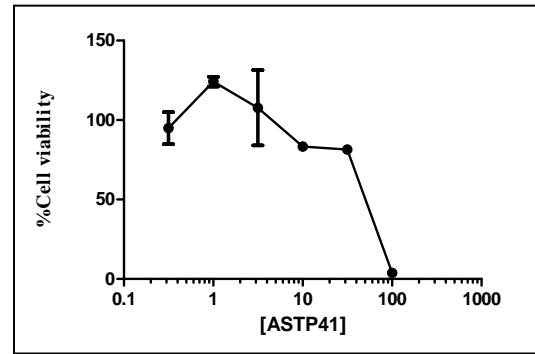
ผลการทดลอง

3.1 ผลของ Cytotoxicity assay ในการเลี้ยงแบบสองมิติด้วยวิธี MTT assay

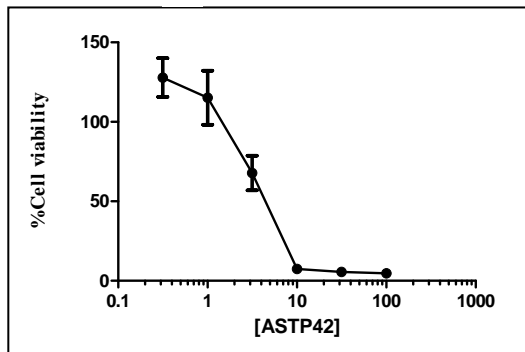
3.1.1 จากผลของการทำ MTT assay จะเห็นว่าสารสกัดจากย่านาง ทั้ง 3 สาร ASTP40-42 มีความเป็นพิษกับเซลล์ทั้งหมด โดยมีค่า IC₅₀ ตั้งแต่ 5.274 μ M จนถึง 48.4 μ M สำหรับสารสกัดจากพังคิ ASTP53-60 พบว่ามีสารที่มีความเป็นพิษกับเซลล์ 2 สาร ได้แก่ ASTP59-60 โดยมีค่า IC₅₀ อยู่ที่ 157.7 และ 92.4 μ M ตามลำดับ แต่สารอื่น ๆ ที่เหลือ ASTP53-58 พบว่าไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์ที่ความเข้มข้นต่ำ



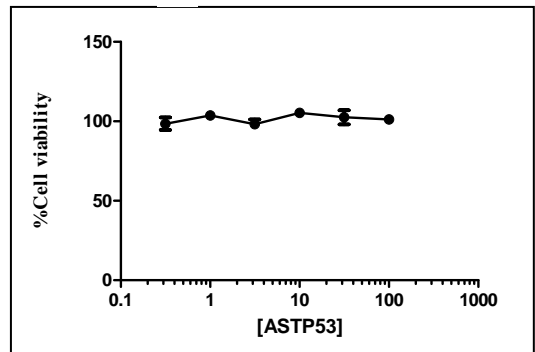
IC₅₀: 5.998 μ M



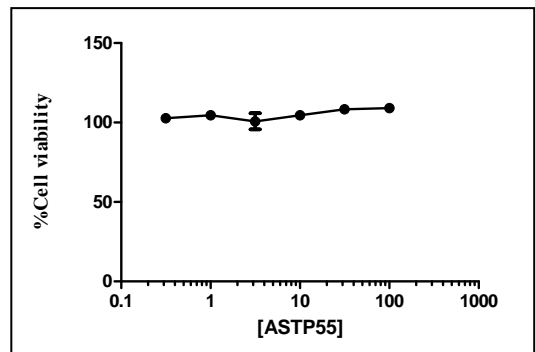
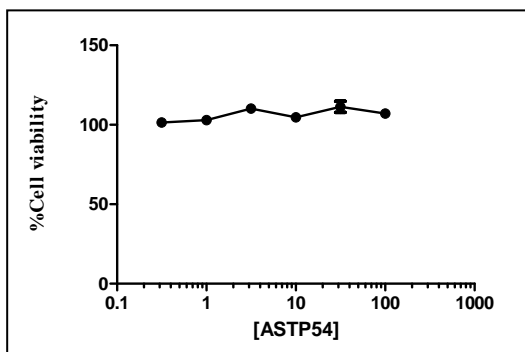
IC₅₀: 48.4 μ M



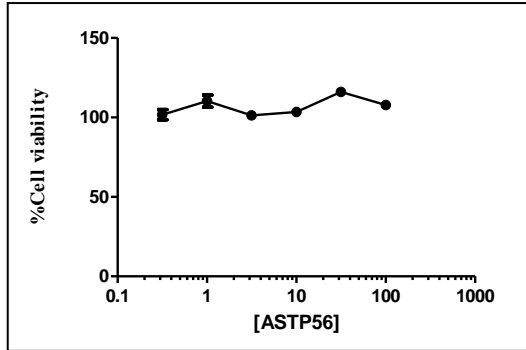
IC₅₀: 5.274 μ M



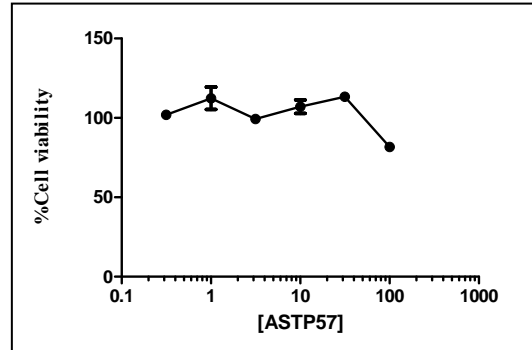
IC₅₀: >100 μ M



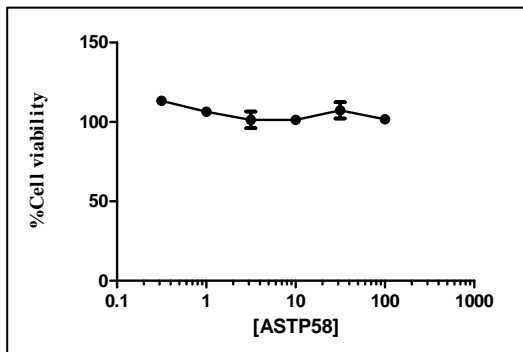
IC50: >100 μ M



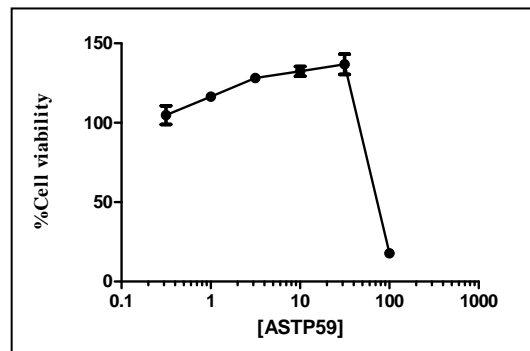
IC50: >100 μ M



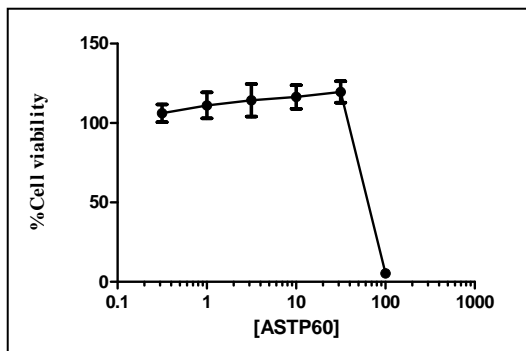
IC50: >100 μ M



IC50: >100 μ M



IC50: >100 μ M

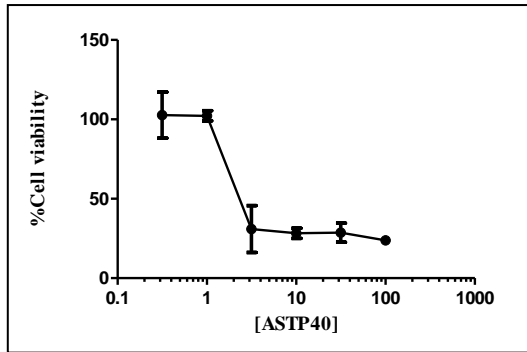


IC50: 157.7 μ M

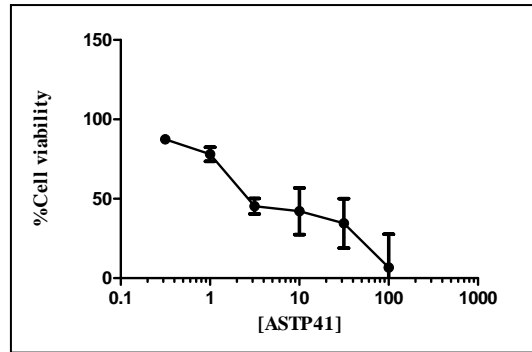
IC50: 97.24 μ M

ภาพที่ 3.1.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเมื่อได้รับสารสกัดจากสมุนไพรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ASTP40-42, 53-60 ด้วยวิธี MTT assay คำนวณด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.03

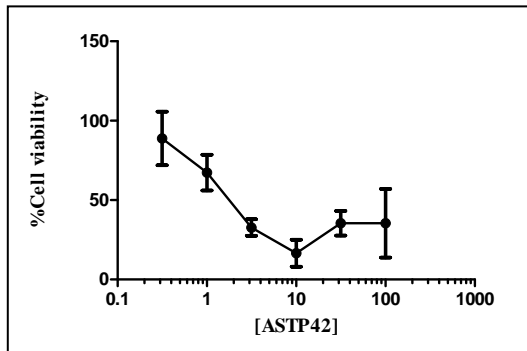
3.1.2 ผลของการนำสาร ASTP40, 41, 42, 59, 60 ไปทำ MTT assay ซ้ำที่ 24 ชั่วโมงอีกครั้ง เพื่อยืนยันความเป็นพิษของสารสกัด ได้ผลว่าสารทั้งหมดที่นำมาทดสอบซ้ำ มีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งจริงๆ โดยมีค่า IC50 ตั้งแต่ 2.212 μM ไปจนถึง 102.3 μM โดยมีค่าของ IC50 ที่แตกต่างกันเล็กน้อย ซึ่งอาจจะเกิดจากการปิดส่วนใสของสารที่มีตะกอนของสารปนมาในปริมาณที่ไม่เท่ากัน เนื่องจากเป็นสารที่มีตะกอนและเหลือปริมาตรของสารน้อย



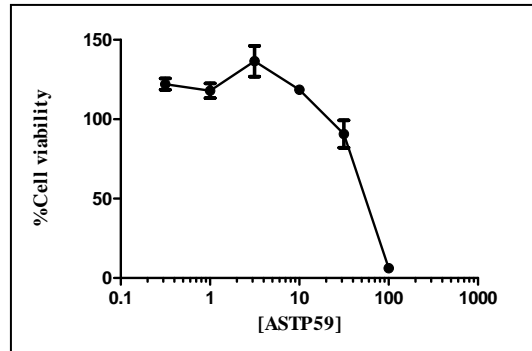
IC50: 4.145 μM



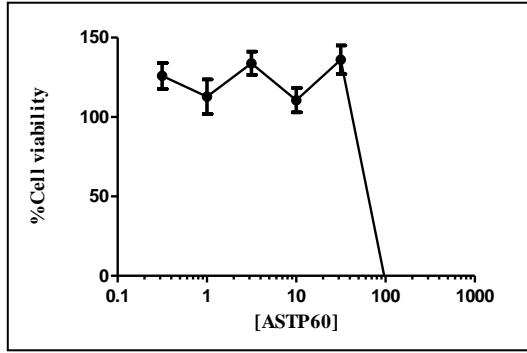
IC50: 4.815 μM



IC50: 2.212 μM



IC50: 76.38 μM



IC50: 102.3 μM

ภาพที่ 3.1.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเมื่อได้รับสารสกัดจากสมุนไพรเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในการทำซ้ำครั้งที่สอง สำหรับสารที่มีความเป็นพิษกับเซลล์ ASTP40-42, 59-60 ด้วยวิธี MTT assay คำนวณด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.03

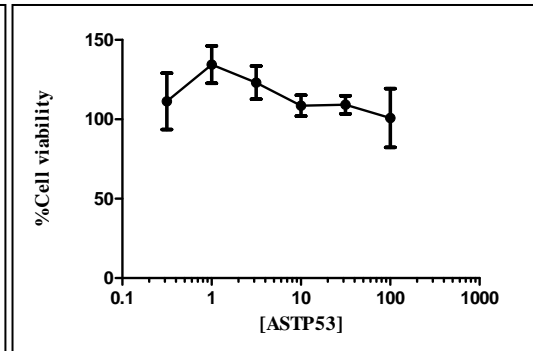
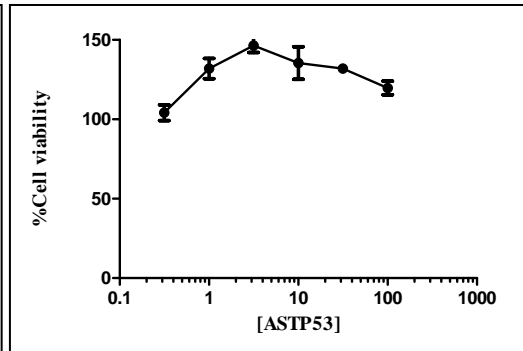
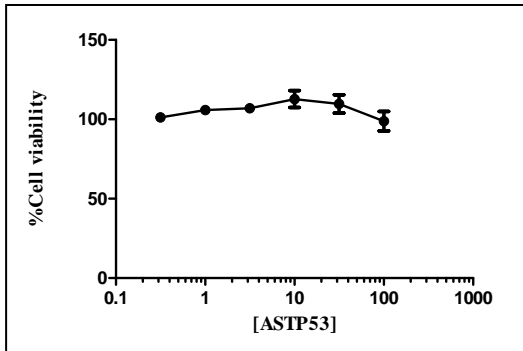
3.1.3 ผลการทำ MTT assay ที่ 72 ชั่วโมง เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารที่ไม่มีความฤทธิ์ในการทดสอบที่ 24 ชั่วโมงในการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่ระยะเวลาสั้นขึ้น ได้ผลว่า มีเพียงสาร ASTP57 เท่านั้น ที่มีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง โดยมีค่า IC50 เฉลี่ยเท่ากับ 222.82 μM ส่วนสาร ASTP53-56,58 พบว่าไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์แม่ในการเลี้ยงเซลล์ที่เวล 72 ชั่วโมงก็ตาม

สาร ASTP53

ซ้ำที่ 1

ซ้ำที่ 2

ซ้ำที่ 3

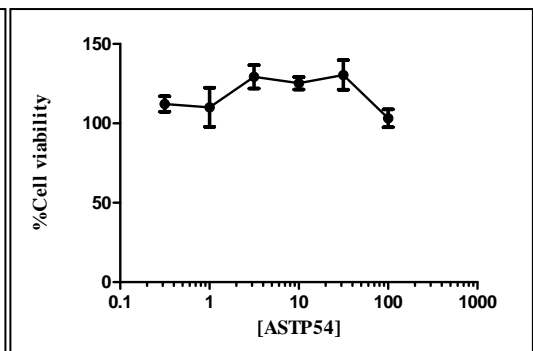
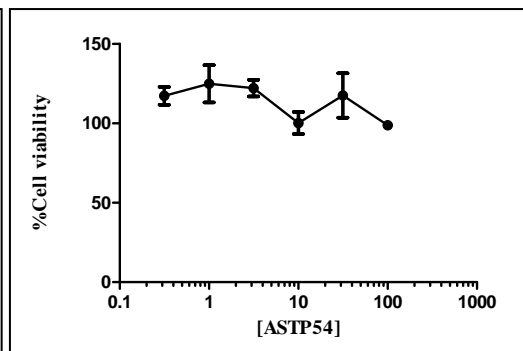
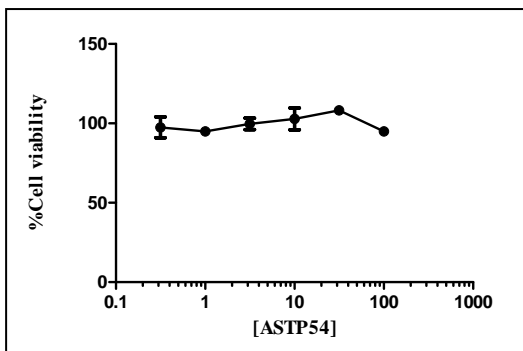


สาร ASTP54

ซ้ำที่ 1

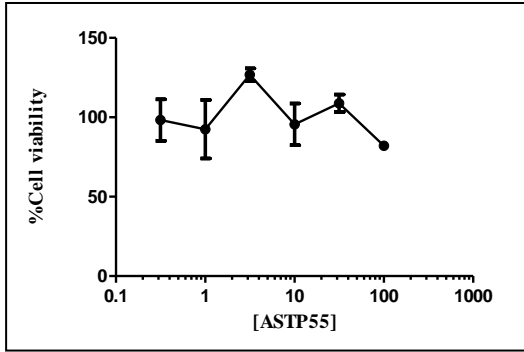
ซ้ำที่ 2

ซ้ำที่ 3

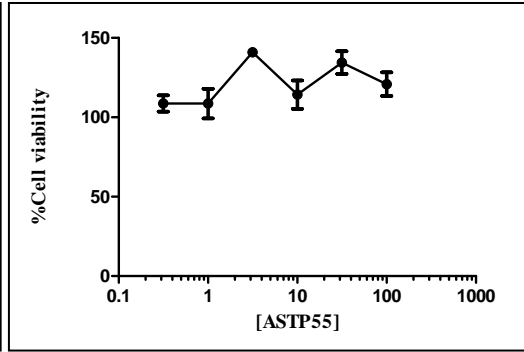


สาร ASTP55

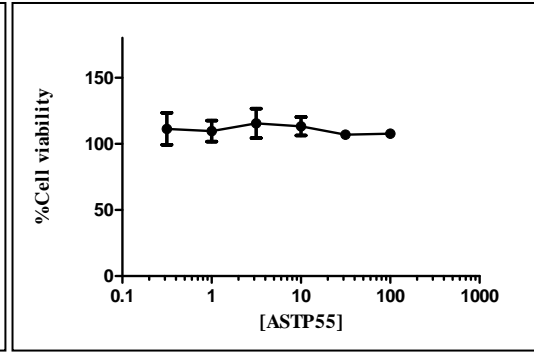
ซ้ำที่ 1



ซ้ำที่ 2

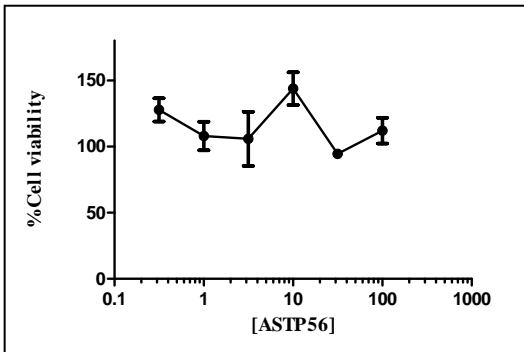


ซ้ำที่ 3

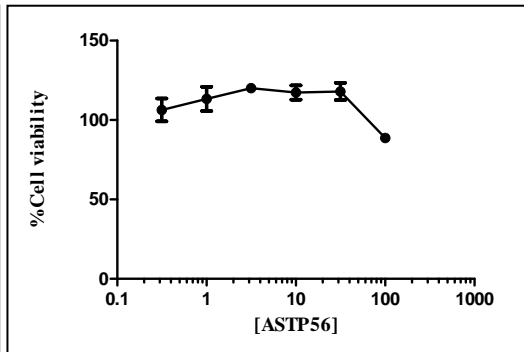


สาร ASTP56

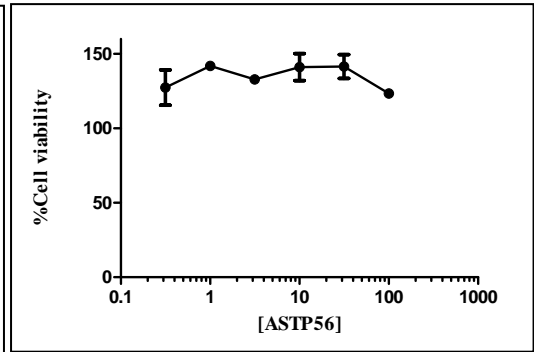
ซ้ำที่ 1



ซ้ำที่ 2

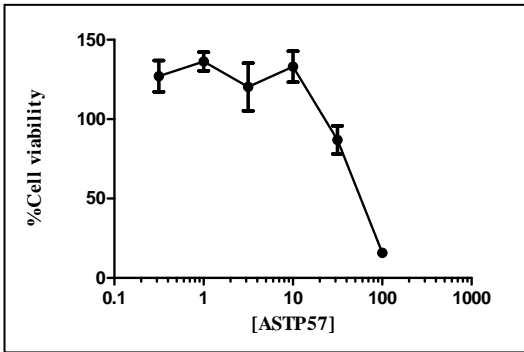


ซ้ำที่ 3

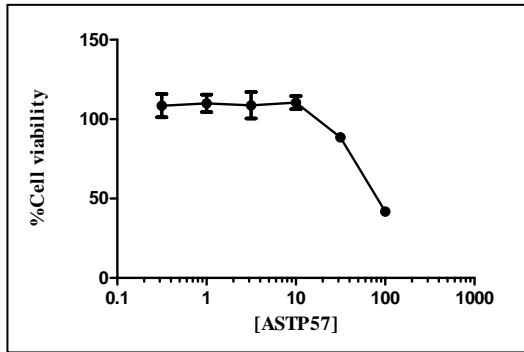


สาร ASTP57

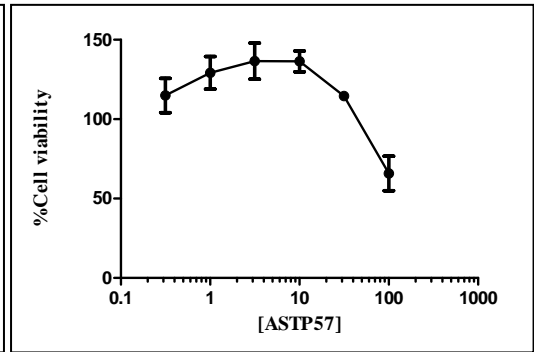
ซ้ำที่ 1



ซ้ำที่ 2

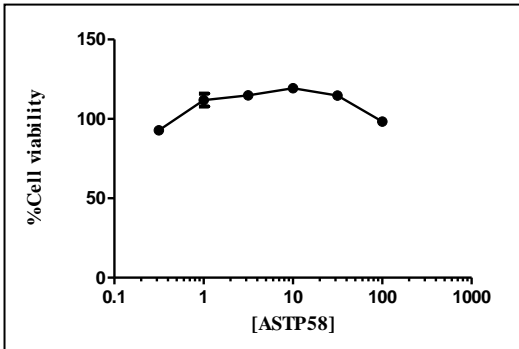


ซ้ำที่ 3

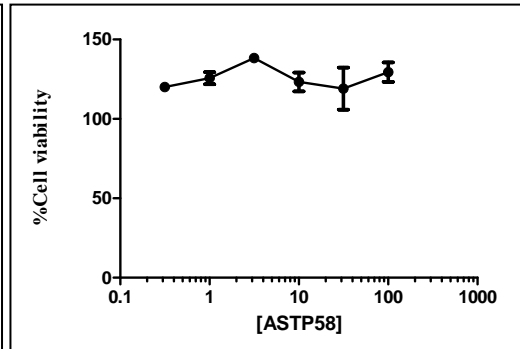


สาร ASTP58

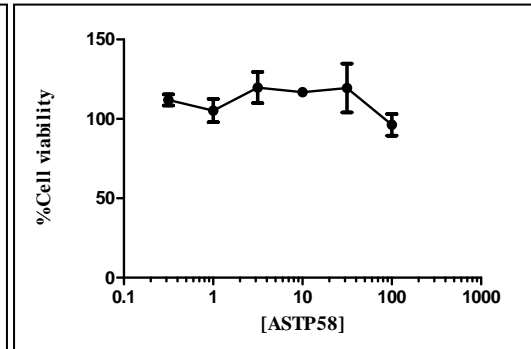
ซ้ำที่ 1



ซ้ำที่ 2



ซ้ำที่ 3

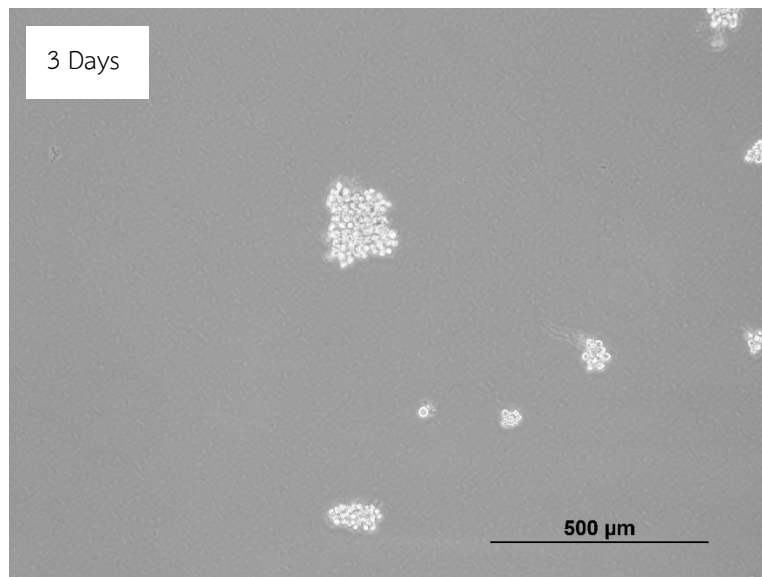


ภาพที่ 3.1.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเมื่อได้รับสารสกัดจากสมุนไพรเป็นเวลา 72 ชั่วโมงทั้งสามซ้ำในสารสกัดที่ไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์ ASTP53-58 ด้วยวิธี MTT assay คำนวณด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.03

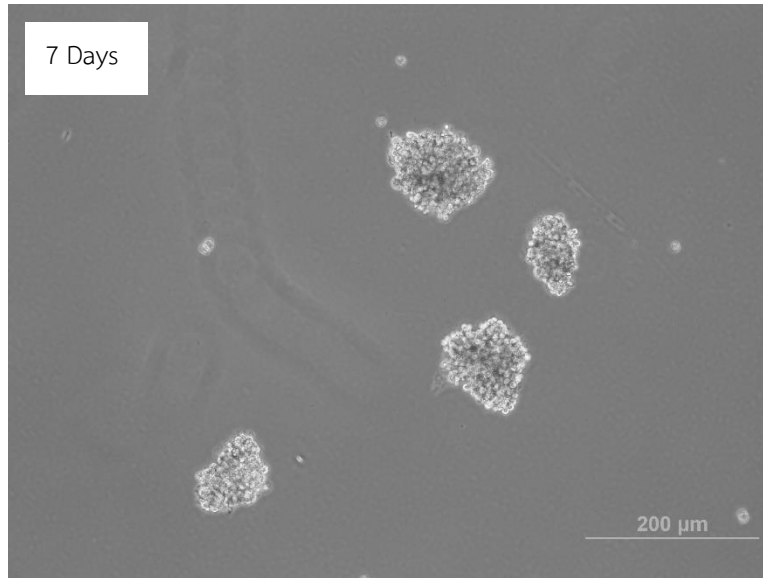
3.2 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งแบบสามมิติโดยการประกอบเป็น spheroid ใน 6-well plate

เริ่มต้นด้วยการทดลองนำเซลล์มะเร็งไปเลี้ยงให้เป็นสามมิติในเพลทที่เคลือบสารป้องกันไม่ให้เซลล์ยึดเกาะ (Ultra-Low Attachment plate) แบบ 6 หลุม ได้ผลว่า หลังจากเลี้ยงได้ 3 วัน (ภาพ A) เซลล์จะมีลักษณะการเจริญรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนขนาดเล็ก แต่ยังไม่หนาแน่นพอ แต่ที่ 7, 14 วัน (ภาพ B,C) กลุ่มเซลล์จะเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีการรวมตัวกันที่หนาแน่นขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะของการเจริญรวมกันเป็น spheroid จากเซลล์มะเร็งอย่างหนาแน่น จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าสามารถนำเซลล์มะเร็งชนิดนี้มาเลี้ยงแบบสามมิติได้

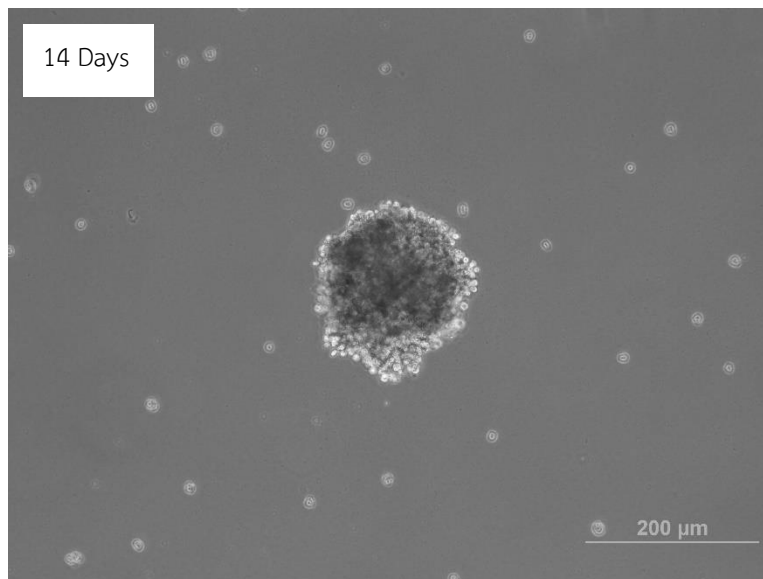
(A)



(B)



(C)

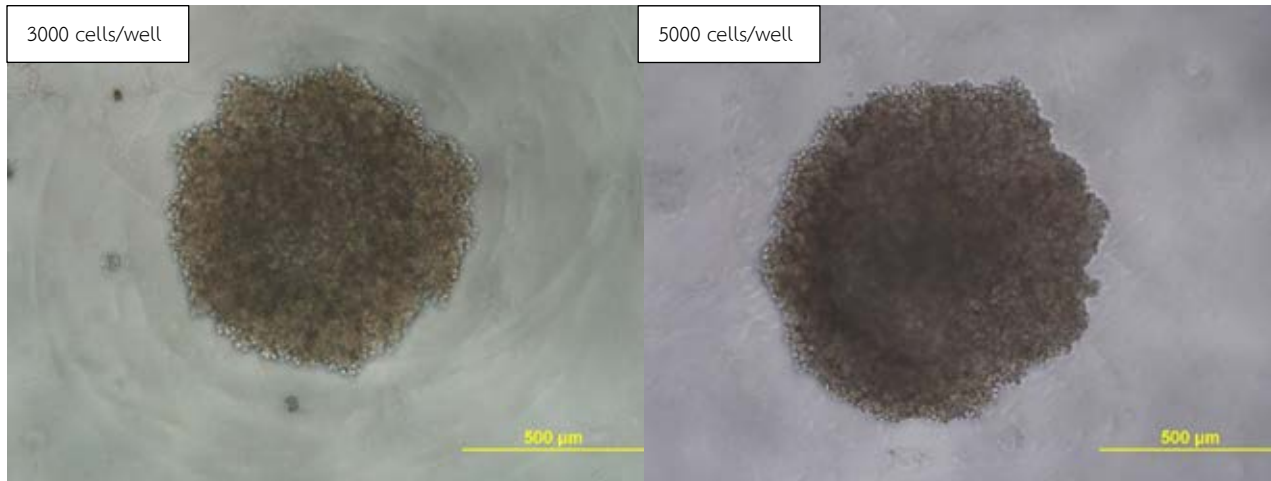


ภาพที่ 3.2 แสดงลักษณะการเจริญเป็น Spheroid หลังจากเลี้ยงใน Ultra-Low Attachment 6-well plate เป็นระยะเวลา (A) 3 วัน, (B) 7 วัน , (C) 14 วัน

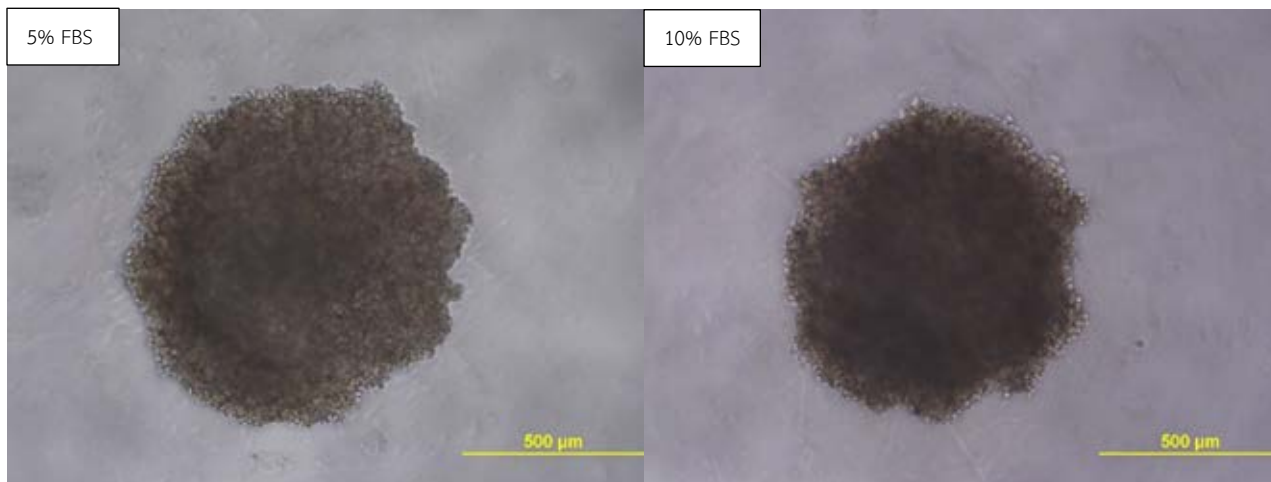
3.3 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งแบบสามมิติโดยการประกอบเป็น spheroid ใน 96-well plate

3.3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง ได้ผลว่า ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5000 เซลล์ จะให้ขนาดของ spheroid ที่ใหญ่กว่า และเหมาะที่จะนำมาทำการทดลองต่อไป และปริมาณอาหารที่ 200 μl จะทำให้เซลล์เจริญรวมกลุ่มกันเป็น spheroid ได้ดีกว่าเทียบกับปริมาณอาหาร 100 μl จะมีเซลล์เจริญออกมารอบ ๆ ของ spheroid จำนวนมาก และที่ปริมาณ FBS 10% มีลักษณะการเจริญรวมตัวกันเป็น spheroid ที่หนาแน่นกว่าปริมาณ FBS 5% ที่จะมีลักษณะของช่องว่างภายใน spheroid มากกว่า และสุดท้าย ระยะเวลาที่เซลล์มีการเจริญเป็น spheroid พบว่าที่ 5 วันเป็นระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่เซลล์จะสามารถเจริญเป็น spheroid ที่มีขนาดและความหนาแน่นเหมาะสมเพียงพอที่จะนำไปทำการทดลองต่อไปได้โดยไม่ทำให้ spheroid เสียหายที่ขณะทำการทดลอง

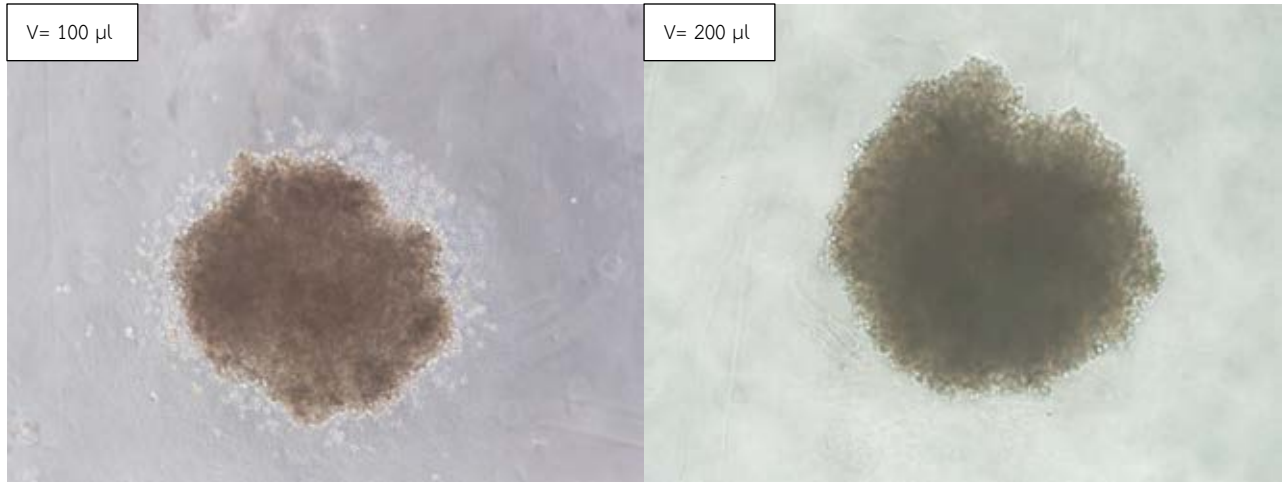
(A) จำนวนเซลล์ต่าง ๆ



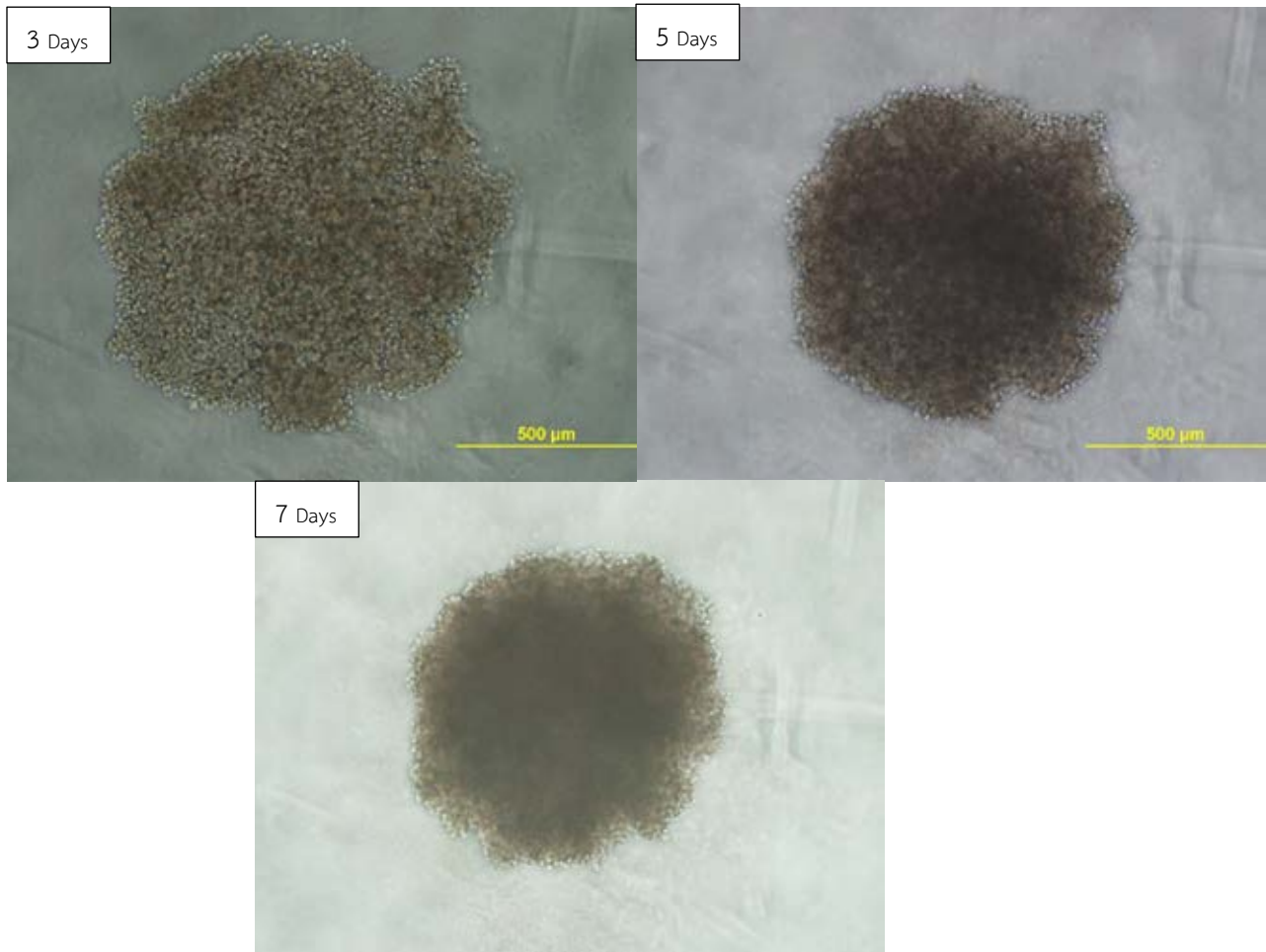
(B) อัตราส่วนของ FBS



(C) ปริมาตรของอาหารในหลุม



(D) จำนวนวัน

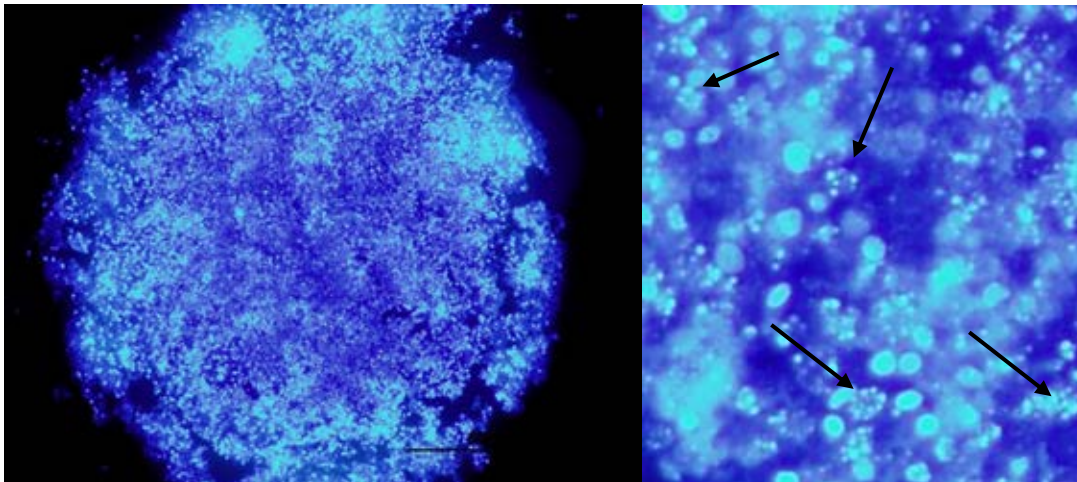


ภาพที่3.3.1 แสดงลักษณะการเจริญรวมตัวกันเป็น spheroid ของเซลล์ SW620 ใน Ultra-Low Attachment 96-well plate หลังจากนำไป vary ปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง โดย (A) จำนวนเซลล์เริ่มต้น, (B) ปริมาณ FBS ในอาหาร, (C) ปริมาตรอาหารต่อหลุม, (D) ระยะเวลาในการเจริญเป็น spheroid

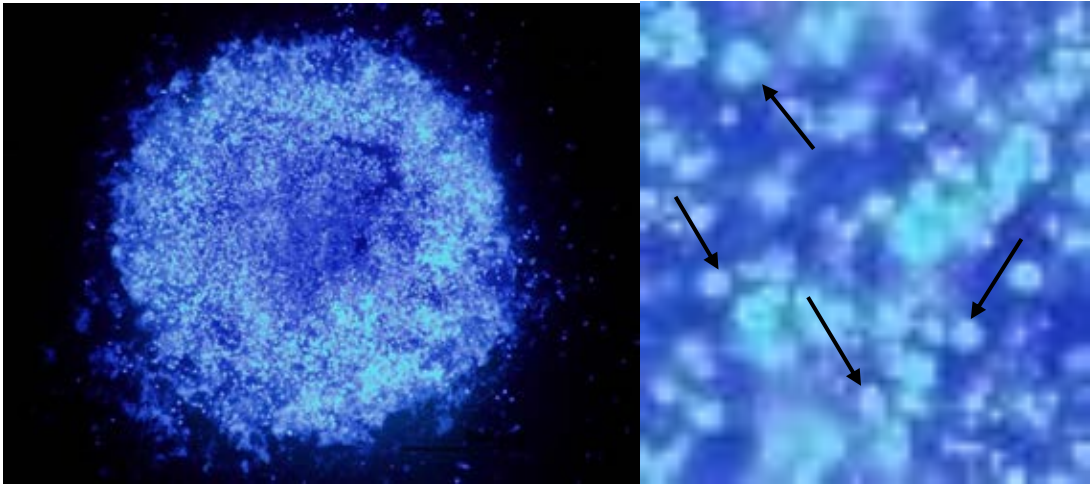
3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการเลี้ยงแบบสามมิติ โดยได้เลือกสารทั้งที่มีฤทธิ์และไม่ฤทธิ์ในการเลี้ยงแบบสองมิติมาทำการทดลองต่อ เนื่องจากในการรายงานก่อนหน้านี้ ได้มีรายงานว่า การเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ ทำให้มีการแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงไปจำนวนมาก (Birgersdotter A., et al., 2005, Cukierman E., 2002) ซึ่งอาจจะมียีนที่เกี่ยวข้องกับกำย่อยสลายสารหรือยาหลาย ๆ ชนิด ทำให้การทดสอบฤทธิ์ของยาหรือสารสกัดในวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติเพียงอย่างเดียว อาจจะทำให้ได้ผลผิดพลาดไปได้ อย่างที่มีรายงานก่อนหน้านี้ว่ามีทั้งสารและยาที่พบว่ามีฤทธิ์ในการกำจัดเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงแบบสองมิติมาก แต่เมื่อนำไปทดสอบระดับสูงขึ้นไปพบว่าไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งจริง ๆ เป็นผลมาจากการแสดงออกที่เปลี่ยนไปของเซลล์มะเร็งมีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีความไวต่อยาหรือสารหลาย ๆ ชนิดเพิ่มมากขึ้น ทำให้ต้องนำสารที่มีฤทธิ์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติมาทำการทดสอบต่อในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ (Jacks T., Weinberg RA., 2002, Birgersdotter A., 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานก่อนหน้านี้ที่เกี่ยวข้องกับความไวที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ (Amatangelo MD., et al., 2013, Nico Jacobi, et al., 2017) เนื่องจากสารเหล่านั้นมีผลต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งด้วยกันหรือต่อเซลล์มะเร็งกับ ECM ทำให้สามารถออกฤทธิ์ได้เฉพาะในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ หรืออาจจะเกิดจากการที่เซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารเหล่านี้เพิ่มขึ้นในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ ทำให้การทดสอบความเป็นพิษของสารในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติเพียงอย่างเดียวอาจทำให้ได้ผลที่ผิดพลาดได้ ทำให้ต้องนำสารที่ไม่มีความเป็นพิษในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติมาทดสอบต่อในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติด้วย และจากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ามีวิธีการทดสอบสารหรือยาโดยการนำมาย้อมนิวเคลียสเพื่อดูลักษณะทางกายภาพที่สามารถบ่งบอกการตายแบบ apoptosis ได้ (RICK SAI-CHUEN WU, et al., 2011, Muhammad Shahid Riaz Rajoka, et al., 2018) จึงได้ทำการทดลองเพื่อดูความเป็นพิษของสารในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติโดยจะดูจากการตายแบบ apoptosis ที่เกิดขึ้น ซึ่งลักษณะการตายแบบ apoptosis จะแสดงให้เห็นเป็นลักษณะของการย้อมติดสีน้ำเงินที่เข้มของนิวเคลียส และมีการแตกของนิวเคลียสเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ จำนวนมาก (RICK SAI-CHUEN WU, et al., 2011) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพ L, M) ได้พบว่า สาร ASTP40-42 (ภาพ A-C) จะมีเซลล์ที่ย้อมติดสีเข้ม และมีลักษณะการตายแบบ apoptosis ตามที่ลูกศรสีดำชี้เกิดขึ้นจำนวนมาก ซึ่งเป็นผลที่เหมือนกับการทดสอบความเป็นพิษของสารในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติโดยในการทดลองก่อนหน้านี้ สารทั้งสามนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เลี้ยงแบบสองมิติสูงมาก แต่สำหรับสาร ASTP57,60 (ภาพ H, K) พบว่ามีลักษณะของเซลล์ที่ย้อมติดสีเข้มเพียงเล็กน้อย และมีลักษณะการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้นบ้างเล็กน้อย ซึ่งผลความเป็นพิษของสารทั้งสองสารนี้ในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติก็ให้ผลใกล้เคียงกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าสาร ASTP57,60 มีความเป็นพิษเล็กน้อยต่อเซลล์ที่เลี้ยง

แบบสองมิติ และสำหรับสารสุดท้ายที่มีรายงานความเป็นพิษในเซลล์ที่เลี้ยงแบบสองมิติ สาร ASTP59 (ภาพ J) พบว่ามีลักษณะการตายเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเป็นผลที่ค่อนข้างขัดแย้งกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าสารนี้มีความเป็นพิษกับเซลล์ แต่ในระหว่างขั้นตอนการทำการทดลอง นอกจากนี้ผู้วิจัยได้พบว่า spheroid ที่ได้รับสารสกัด ASTP59 นี้ จะมีลักษณะการเกาะกันของ spheroid แบบหลวม ๆ ทำให้ spheroid เกิดความเสียหายในขณะที่เคลื่อนย้าย spheroid ในขั้นตอนการย้อมสีนิวเคลียสได้ง่ายเมื่อเทียบกับสารอื่นและชุดควบคุม และต่อมาสำหรับสารที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์ในการเลี้ยงแบบสองมิติ ได้แก่ สาร ASTP53-56, 58 พบว่านอกจากสาร ASTP55 ใน spheroid ที่ได้รับสาร ASTP53,54,56,58 (ภาพ D, E, G, I) แทบไม่มีลักษณะการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้นเลย โดยเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะนิวเคลียสกลม และย้อมติดสีอ่อนตามปกติซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ แต่ที่น่าสนใจคือสาร ASTP55 (ภาพ F) มีมีจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีนิวเคลียสสีเข้มจำนวนมาก และมีลักษณะการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้นมากกว่าชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัด ทั้ง ๆ ที่ในการทดลองก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นแล้วว่าสารนี้เป็นสารที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ถูกเลี้ยงแบบสองมิติแต่กลับให้ผลที่มีแนวโน้มว่าจะมีความเป็นพิษกับเซลล์ที่ถูกเลี้ยงแบบสามมิติ

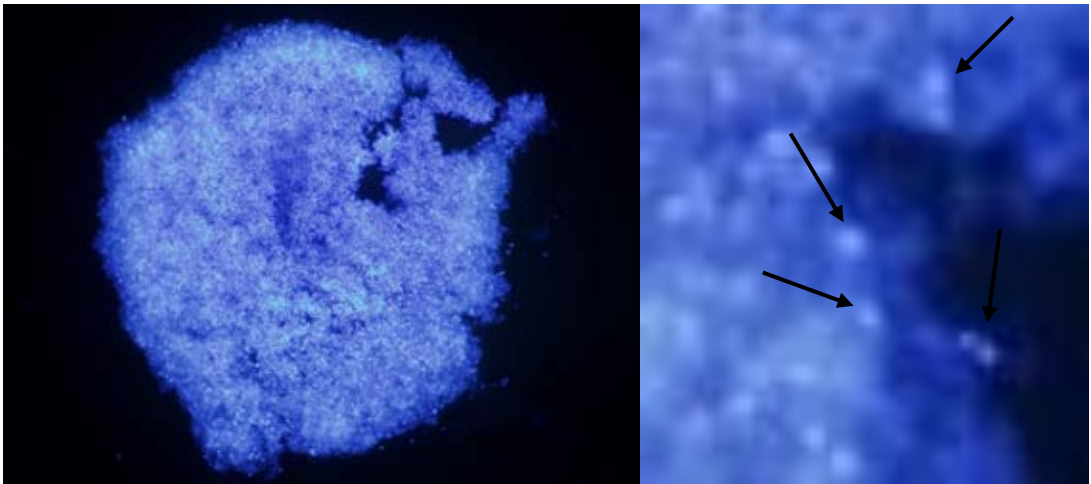
(A)



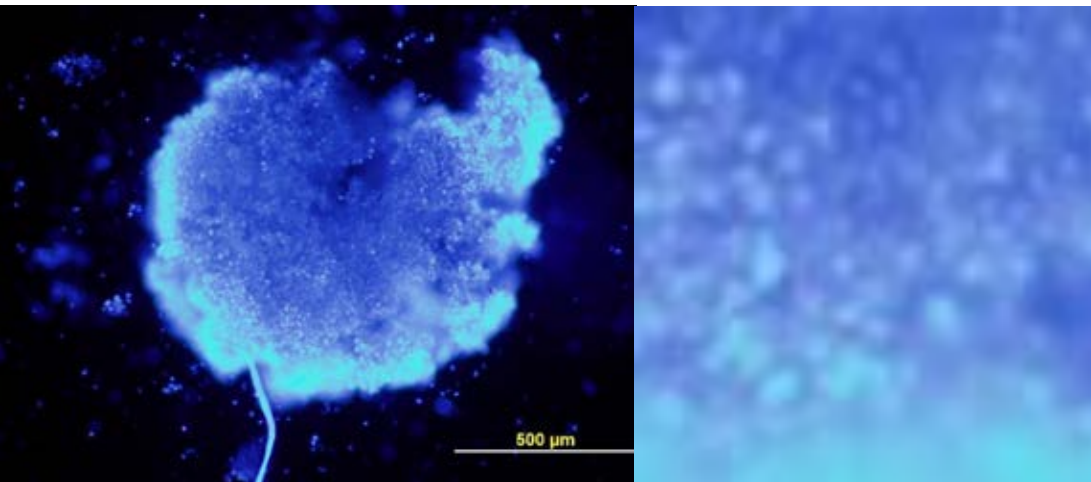
(B)



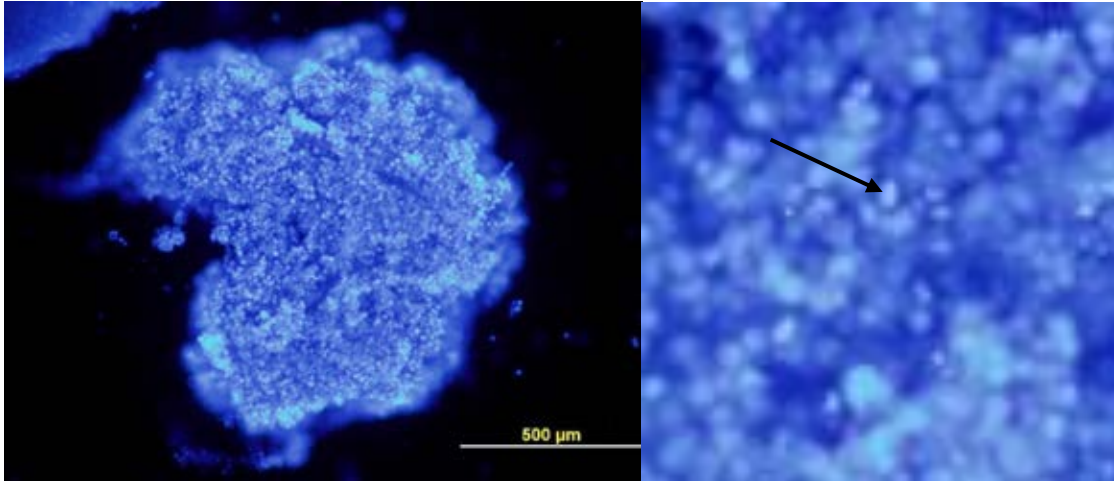
(C)



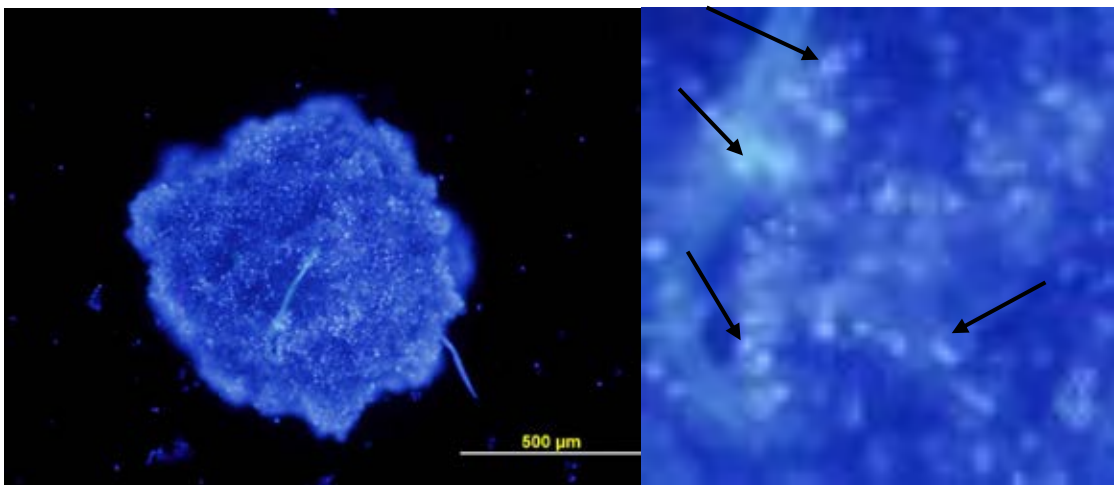
(D)



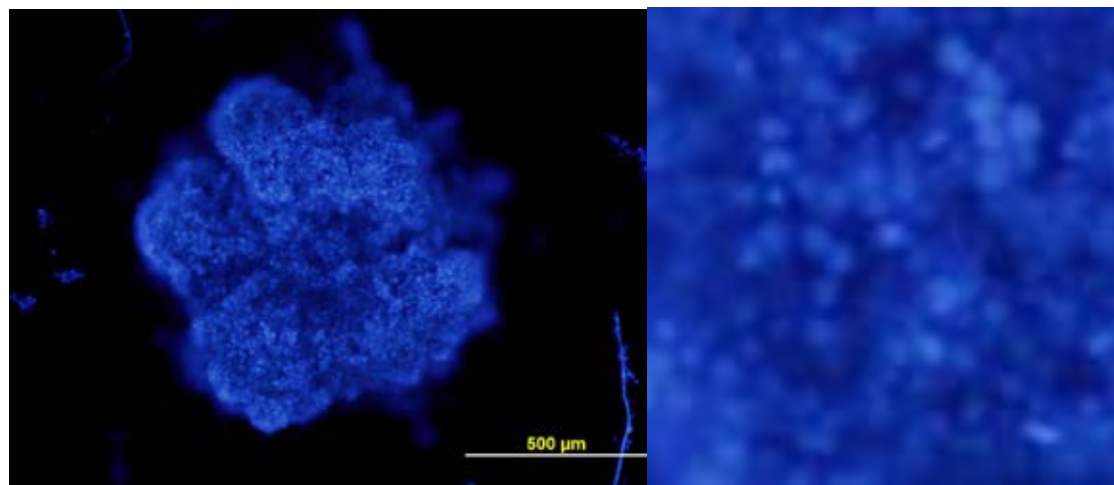
(E)



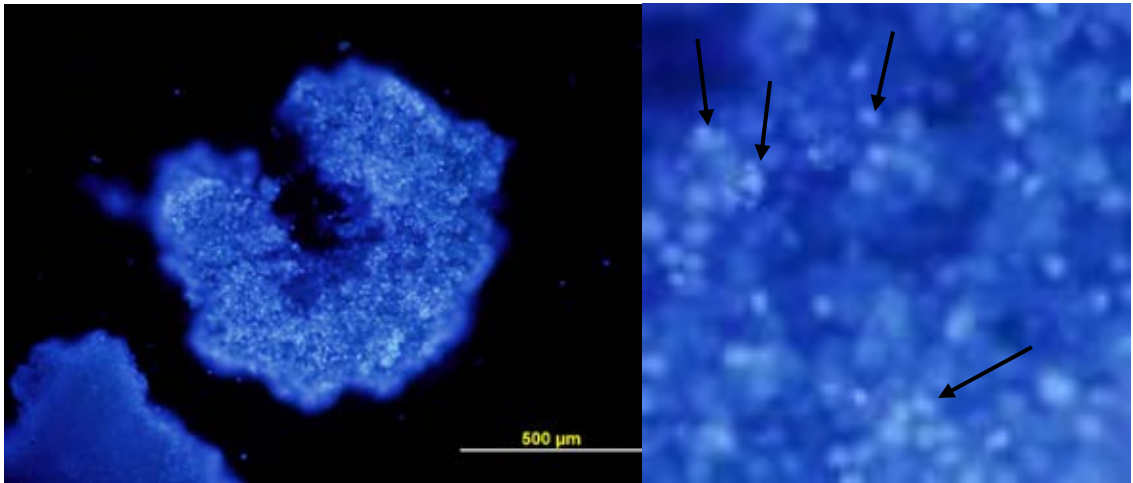
(F)



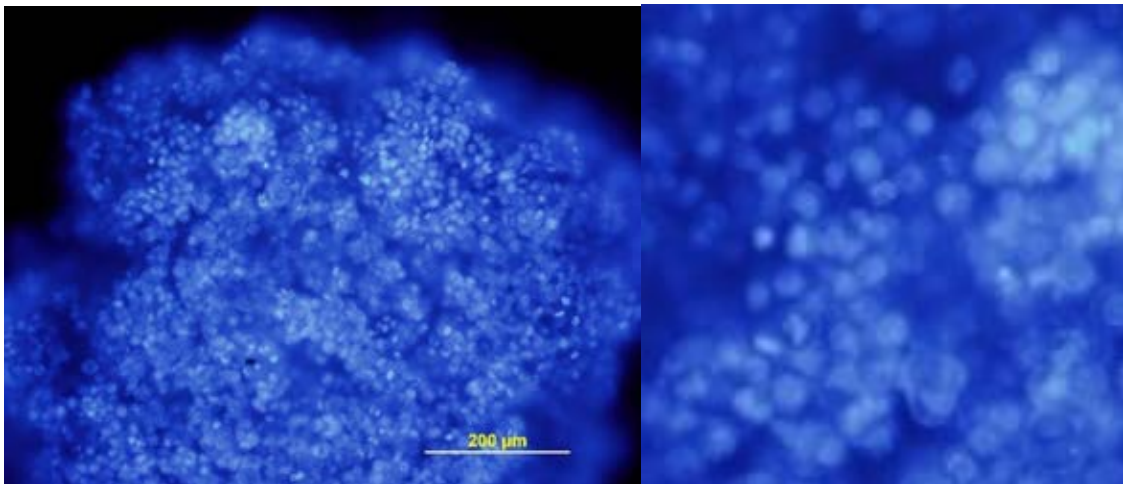
(G)



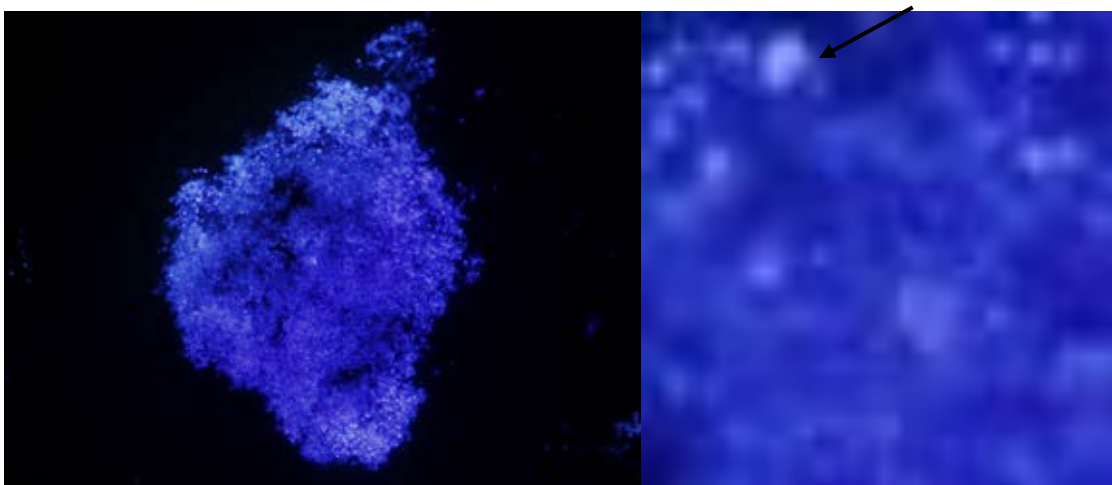
(H)



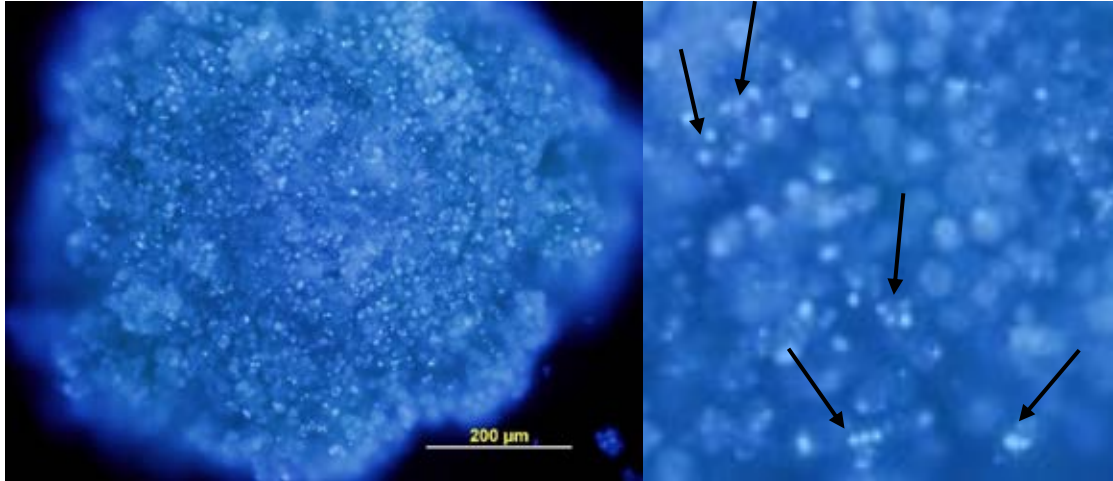
(I)



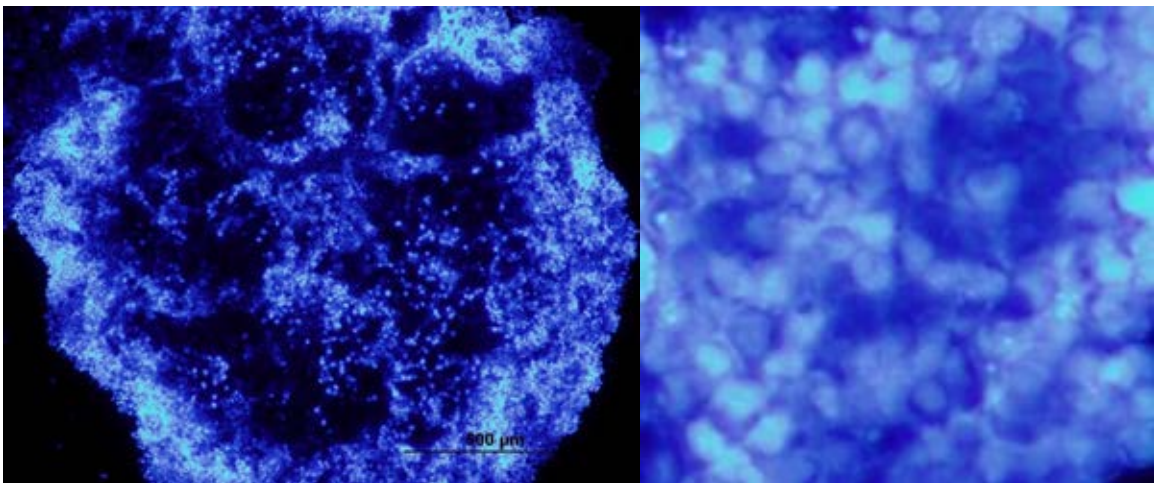
(J)



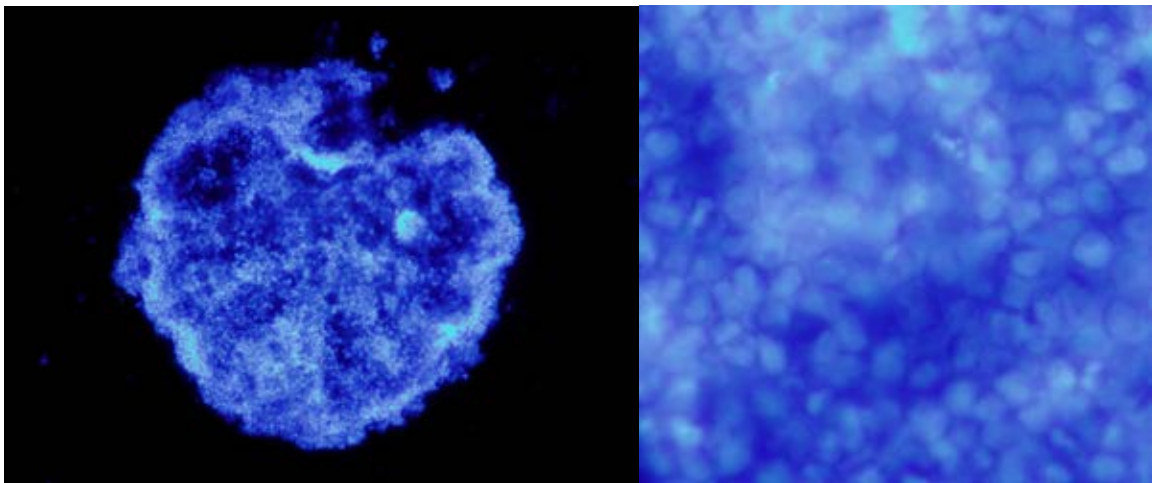
(K)



(L)

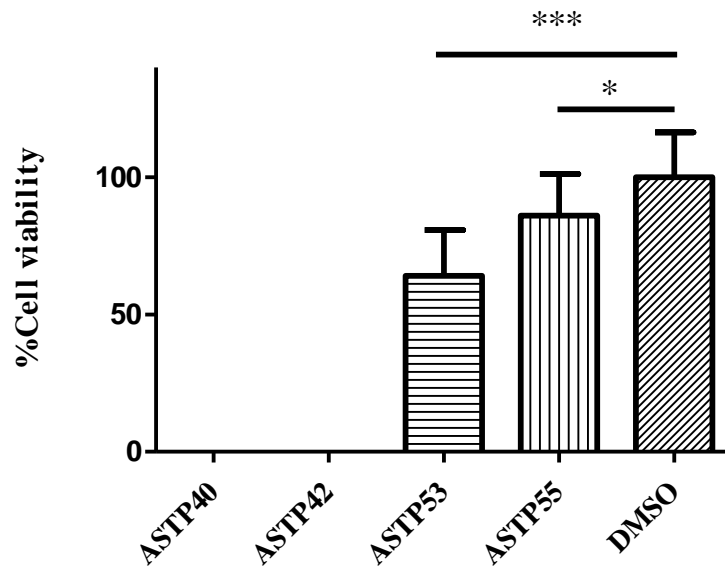


(M)



ภาพที่ 3.3.2 (A) ภาพการย้อมสีนิวเคลียสที่มีการแสดงลักษณะการตายแบบ apoptosis จากงานวิจัยก่อนหน้า (RICK SAI-CHUEN WU, et al., 2011) โดยภาพซ้าย เป็นเซลล์ปกติที่ไม่มีการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้น ส่วนขวา มีลูกครีเหลืองแสดงลักษณะการตายแบบ apoptosis ที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับสารพิษเข้าไป, (B-L) ลักษณะ spheroid ที่ถูกย้อมด้วยสีย้อมนิวเคลียส Hoechst หลังจากได้รับสารสกัดความเข้มข้น 100 μ M เป็นเวลา 3 วัน โดยรูปซ้ายจะแสดงทั้ง spheroid และรูปขวาจะแสดงภาพระยะใกล้และมีลูกครีดำที่แสดงลักษณะเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ที่เกิดขึ้น (B) ASTP40, (C) ASTP41, (D) ASTP42, (E) ASTP53, (F) ASTP54, (G) ASTP55, (GH) ASTP56, (I) ASTP57, (J) ASTP58, (K) ASTP59, (L) ASTP60, (M,N) DMSO

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการเลี้ยงแบบสามมิติด้วยวิธี ATP assay ซึ่งได้เลือกสารไปทำการทดลองทั้งหมด 4 สาร โดยมีสาร ASTP40,42 เป็นตัวแทนสารที่มีความเป็นพิษในการทดลองก่อนหน้าทั้งแบบสองมิติและสามมิติ สาร ASTP53 เป็นตัวแทนสารที่ไม่พบความเป็นพิษในการทดลองก่อนหน้าทั้งแบบสองมิติและสามมิติ และสุดท้าย สาร ASTP55 ที่พบว่าไม่มีความเป็นพิษในการเลี้ยงแบบสองมิติแต่สามารถทำให้มีการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้นในการเลี้ยงแบบสามมิติจากการทดลองก่อนหน้าได้ ผลที่ได้ (ภาพ 3.3.3) สาร ASTP40,42 พบว่าไม่มีปริมาณแสงลูมิเนสเซนซ์ที่บ่งบอกถึงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเกิดขึ้นเลย สำหรับสาร ASTP55 พบว่ามีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นถึงลักษณะการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงแบบสามมิติ แต่ที่น่าสนใจคือสาร ASTP53 ที่ไม่มีความเป็นพิษทั้งในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและสามมิติจากผลการทดลองก่อนหน้า แต่ในการทดลองนี้พบว่าสาร ASTP53 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดน้อยกว่าชุดควบคุมมาก ซึ่งอาจจะเป็นผลจากการลดการเจริญของเซลล์มะเร็ง ทำให้มีปริมาณของ ATP ที่ตรวจวัดได้ลดน้อยลง แต่ไม่ได้ทำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis โดยตรง



ภาพที่ 3.3.3 แสดงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากได้รับสาร ASTP40, 42, 53, 55 และ DMSO ตามลำดับ ทดลองในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติและตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี ATP assay ทำกราฟและวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.03 โดยเครื่องหมาย * หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และ *** หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่ง

สาร	ผลของสาร	
	2D	3D
ASTP40	มีความเป็นพิษสูง	มีความเป็นพิษสูง
ASTP41	มีความเป็นพิษสูง	มีความเป็นพิษสูง
ASTP42	มีความเป็นพิษสูง	มีความเป็นพิษสูง
ASTP53	ไม่มีความเป็นพิษ	สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้
ASTP54	ไม่มีความเป็นพิษ	ไม่มีความเป็นพิษ
ASTP55	ไม่มีความเป็นพิษ	มีความเป็นพิษเล็กน้อย
ASTP56	ไม่มีความเป็นพิษ	ไม่มีความเป็นพิษ
ASTP57	มีความเป็นพิษเล็กน้อยที่ 72 ชั่วโมง	มีความเป็นพิษเล็กน้อย
ASTP58	ไม่มีความเป็นพิษ	ไม่มีความเป็นพิษ
ASTP59	มีความเป็นพิษปานกลาง	มีความเป็นพิษเล็กน้อย
ASTP60	มีความเป็นพิษปานกลาง	มีความเป็นพิษปานกลาง

ตารางที่ 3.4 สรุปผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดในการศึกษานี้

3.4 สำหรับการเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดในการศึกษานี้ โดยจากผลการทดสอบความเป็นพิษของสารในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติพบว่าสาร ASTP53-56,58 ไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง และสาร ASTP57 มีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งเล็กน้อยที่ 72 ชั่วโมง ส่วนสาร ASTP40-42, 59-60 พบว่ามีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง ต่อมาจากการทดสอบความเป็นพิษของสารในการเลี้ยงแบบสามมิติด้วยวิธีการย้อมสีนิวเคลียสและวิธี ATP assay พบว่านอกจากสาร ASTP53,55 ที่ให้ผลว่ามีความเป็นพิษเล็กน้อยถึงปานกลาง สาร ASTP59 มีความเป็นพิษลดลงเล็กน้อย แต่ส่งผลต่อการรวมตัวเป็น spheroid ของเซลล์มะเร็ง สารอื่น ๆ ให้ผลที่สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้าทั้งหมด

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า สารทั้ง 11 สารที่ได้ใช้ในการทดลองนี้ มีทั้งสารที่มีฤทธิ์และไม่มีฤทธิ์ทั้งในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและสามมิติ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลแล้วจะเห็นทั้งสารที่มีฤทธิ์เหมือนกันระหว่างการทดสอบในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและสามมิติ และสารที่ให้ผลต่างกันทั้งในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและสามมิติ โดยมีทั้งสารที่ให้ผลน้อยลงและให้ผลเพิ่มขึ้นในการทดสอบแบบสามมิติ

สำหรับสารที่มีผลการทดลองสอดคล้องกันทั้งในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและสามมิติพบว่า มีทั้งหมด 9 สารจากทั้งหมด 11 สาร ได้แก่ ASTP40,41,42,53,54,56,57,58,60 โดยเป็นสารสกัดจากย่านาง 3 สาร (ASTP40-42) พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่นี้ทั้งในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและสามมิติ ผลจากการทดสอบในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติมีอัตราการตายที่สูงมาก คำนวณออกมาได้เป็นค่า IC50 ที่ต่ำ และผลจากการทดสอบในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติก็มีปริมาณเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ที่สูงมาก และสาร ASTP40,42 ยังแสดงถึงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งน้อยมากในการทดสอบด้วยวิธี ATP assay ซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษที่สูงมากในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ และสำหรับสารสกัดจากผักคี้ ASTP53,54,56,57,58,60 พบว่าสารสกัด ASTP57, 60 ที่มีความเป็นพิษกับเซลล์ในการเลี้ยงแบบสองมิติ ได้ให้ผลที่สอดคล้องกันในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติด้วย ก็คือสามารถทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งได้ ส่วนสำหรับสาร ASTP54,56,58 ที่ไม่มีความเป็นพิษในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติก็ได้ให้ผลที่สอดคล้องในผลการดูลักษณะการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติเช่นเดียวกัน คือไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์ มีจำนวนเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis น้อยมาก

สำหรับสารที่เหลือที่ให้ผลต่างกันในระบบการเลี้ยงแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ ได้แก่ ASTP53, ASTP55 และ ASTP59 ซึ่งสามสารนี้ล้วนเป็นสารอนุพันธ์ย่อยที่ได้จากการนำ ASTP53 ที่สกัดได้มาจากผักคี้ไปสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ โดยสาร ASTP53 จากที่ผลการทดลองความเป็นพิษในการเลี้ยงแบบสองมิติและการย้อมดูนิวเคลียสหลังได้รับสารในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติพบว่าสารนี้ไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง แต่จากผล ATP assay แสดงให้เห็นถึงปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ทำให้ทราบว่าสารนี้สามารถส่งผลให้เซลล์มะเร็งที่เลี้ยงแบบสามมิติมีการเจริญที่ลดลงโดยที่ไม่ได้ส่งผลต่อการตายแบบ apoptosis โดยตรงทำให้ไม่สามารถดูฤทธิ์ของสารนี้จากการย้อมสีนิวเคลียสและดูผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ได้ สำหรับสาร ASTP55 พบว่าจากเดิมที่เคยไม่มีฤทธิ์ในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติทั้งในการทำ MTT assay ที่ 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง แต่เมื่อนำไปทดสอบในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ พบว่าสามารถทำให้มีการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้นได้มากกว่าชุดควบคุมและสารอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด หลังจากนั้นเมื่อยืนยันผลด้วยวิธี ATP assay ก็พบว่าปริมาณ ATP ที่แสดงถึงปริมาณเซลล์

ที่มีชีวิตลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งแสดงว่าสาร ASTP55 นี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงแบบสามมิติ ซึ่งอาจเกิดจากการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติทำให้เซลล์มะเร็งมีเป้าหมายของสารนี้เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการตายของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้นได้ และสำหรับสาร ASTP59 จากเดิมที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ เมื่อนำมาทำการทดสอบในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติพบว่าให้ผลตรงข้ามกัน มีปริมาณเซลล์ที่ตายจากการ apoptosis น้อยลง ซึ่งผลนี้แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติอาจทำให้เซลล์มีความไวต่อสารนี้ลดลง ทำให้สารนี้ไม่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้

จากงานวิจัยก่อนหน้าได้มีรายงานว่า ในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติจะทำให้เซลล์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนไป และมีผลให้มีการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายยาเปลี่ยนไป (Jacks T., Weinberg RA., 2002, Birgersdotter A., 2005) ทำให้เซลล์มะเร็งที่เลี้ยงด้วยวิธีสองมิติอาจมีความไวต่อยาหรือสารบางอย่างที่ต่างจากเซลล์มะเร็งจริง ๆ เพราะฉะนั้นการที่สาร ASTP55 จากที่เคยไม่มีฤทธิ์ในการทดสอบกับเซลล์ที่เลี้ยงแบบสองมิติ แต่กลับมีฤทธิ์ในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติอาจเกิดจากการที่เซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร ASTP55 เพิ่มมากขึ้นในการเลี้ยงแบบสองมิติ ทำให้เมื่อนำมาเลี้ยงแบบสามมิติจึงไม่สามารถย่อยสลายสารนี้ได้ดีเท่าเดิม เป็นผลให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น หรือสาร ASTP55 อาจจะมีกลไกในการยับยั้งมะเร็งผ่านการยับยั้งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของเซลล์ ทำให้เมื่อเซลล์มะเร็งจะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดลดน้อยลงเมื่อถูกเลี้ยงแบบสามมิติ (Nico Jacobi, et al., 2017) สามารถถูกยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์เป็นผลให้เกิดการตายแบบ apoptosis ขึ้นได้ หรืออีกหนึ่งเหตุผลอาจเกิดจากการที่สาร ASTP55 มีการยับยั้งมะเร็งเกี่ยวข้องกับ ECM หรือปฏิสัมพันธ์ต่าง ๆ ทั้งระหว่างเซลล์มะเร็งด้วยกันเองและเซลล์มะเร็งกับ ECM ทำให้สามารถยับยั้งได้ในสภาวะในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ เท่านั้นโดยไม่ส่งผลต่อการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติ (Amatangelo MD., et al., 2013) และจากเหตุผลต่าง ๆ ก่อนหน้าทำให้อาจคาดเดาได้ว่าสาร ASTP53 อีกสารที่มีฤทธิ์เฉพาะในการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ ถึงแม้ว่าไม่พบการตายแบบ apoptosis ในการทดลองย้อมสีนิวเคลียส แต่สามารถลดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลงได้ในการทดสอบ ATP assay ซึ่งอาจเกิดจากการที่สาร ASTP53 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ในการเฉพาะการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ และจากงานวิจัยก่อนหน้า (Chawalitpong, S., et al., 2018) พบว่าสาร ASTP53 นี้สามารถยับยั้งการทำงานของยีนสัญญาณ NF- κ B ได้ ซึ่งเป็นหนึ่งในยีนสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ ทำให้คาดว่าฤทธิ์ของสาร ASTP53 ที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลมาจากการยับยั้งยีนสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเจริญทำให้มีปริมาณเซลล์มะเร็งที่มีชีวิตน้อยกว่าชุดควบคุม และสุดท้ายนี้ สำหรับสาร ASTP59 ที่มีฤทธิ์ลดน้อยลง อย่างแรกอาจจะมีความเสี่ยงจากการที่สาร ASTP59 ทำให้ spheroid ของเซลล์มะเร็งหลวมขึ้น ทำให้คาดเดาได้ว่าที่จำนวนเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ที่น้อยเกินไปอาจเกิดจากการที่เซลล์ที่ตายเหล่านั้นส่วนใหญ่ได้หลุดออกจาก spheroid ระหว่าง

ขั้นตอนการล้างและการย่อยสลายไปแล้ว จึงมีปริมาณของเซลล์ที่ตายใน spheroid น้อยกว่าที่ควรจะเป็น ทำให้ได้ผลที่เป็น false negative ขึ้นมา หรือสาเหตุที่ทำให้สาร ASTP59 มีฤทธิ์ลดลงในการเลี้ยงแบบสามมิติอาจเกิดจากเหตุผลที่ได้กล่าวไปก่อนหน้านี้ถึงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารหรือยาที่เปลี่ยนแปลงไปของเซลล์มะเร็งในสภาวะที่เปลี่ยนแปลงไป, การที่เซลล์มีการลดเอียงความเข้มข้นของยา, การมีปฏิสัมพันธ์ของเซลล์มะเร็งเกิดขึ้นรวมไปถึงอาจจะเป็นผลจากการสร้าง ECM ขึ้นมาของเซลล์มะเร็ง โดยได้มีรายงานก่อนหน้านี้มากมายเกี่ยวกับความดีต่อยาและสารสกัดต่าง ๆ ที่เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ที่เลี้ยงแบบสามมิติที่มาจากสาเหตุต่าง ๆ (Jacks T., 2002 , Jacks T., Weinberg RA., 2002, Birgersdotter A., 2005, Abbott A., 2003) ดังนั้น ในการหาคำตอบที่แน่ชัดว่าการตอบสนองต่อสารสกัดที่เปลี่ยนแปลงไปในการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติและสามมิติจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็ง และกลไกในการยับยั้งมะเร็งของสารทั้งสองชนิดนี้ต่อไป และจากความสามารถในการทำให้ spheroid ของเซลล์มะเร็งหลวมขึ้นของสาร ASTP59 อาจจะสามารถนำไปศึกษาผลของการยับยั้งมะเร็งในด้านอื่นได้ด้วย เนื่องจากเซลล์มะเร็งแบบ solid tumor จะมีการหลั่ง autocrine หรือ paracrine มากระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็งใกล้เคียงด้วยตัวเองอยู่แล้ว (J. H. Walsh, et al., 1991) หรืออาจจะเป็นการหลั่งจากเซลล์ที่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์มะเร็ง เช่น แมคโครเฟจ ที่เจริญร่วมกับเซลล์มะเร็ง ดังนั้น การที่มีความหนาแน่นของ spheroid ลดลง ก็อาจทำให้มี cytokine เหล่านี้ลดลงเป็นผลให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญที่ลดลงด้วย นอกจากนี้การที่ spheroid มีความหนาแน่นลดลงอาจจะทำให้เซลล์ที่มีบทบาทในการกำจัดมะเร็งสามารถแทรกเข้าไปกำจัดมะเร็งได้ง่ายขึ้นอีกด้วย ซึ่งจำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS DMEM (ทั้งหมด 40 ml)

ดีเมม (DMEM)	34.8	ml
ฟีตัล โบวีน ซีรัม (Fetal Bovine Serum)	4	ml
ยาปฏิชีวนะ เพนนิซิลิน/สเตรปโตมัยซิน (Pen/Strep)	0.4	ml
hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	0.4	ml
โซเดียม ไพรูเวท (Sodium pyruvate)	0.4	ml

2. ฟอสเฟส บัฟเฟอร์ ซาลีน (phosphate buffer saline; PBS)ความเป็นกรด-ด่าง 7.4)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8	g
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	g
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na ₂ HPO ₄)	3.63	g
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	0.24	g
น้ำกลั่น	1	L

3) Freezing media (ทั้งหมด 1000 µl)

ฟีตัล โบวีน ซีรัม (Fetal Bovine Serum)	900	µl
DMSO	100	µl

4) 95% Ethanol (ทั้งหมด 100 ml)

Absolute ethanol	95	ml
น้ำกลั่น	5	ml

เอกสารอ้างอิง

1. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการตรวจคัดกรอง วินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ : บริษัท โสสิตการพิมพ์ จำกัด; 2015.
2. Abbott, A. (2003). "Cell culture: biology's new dimension." Nature 424:870–872.
3. matangelo, M., Garipov, A., Li, H., Conejo-Garcia, J. R., Speicher, D., & Zhang, R. (2013). "Three-dimensional culture sensitizes epithelial ovarian cancer cells to EZH2 methyltransferase inhibition." Cell Cycle 12(13): 2113-9.
4. Birgersdotter, A., Sandberg, R., & Ernberg, I. (2005). "Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems." Semin Cancer Biol 15:405–412.
5. Boonyarathanakornkit, L., Che, C. T., Fong, H. H., & Farnsworth, N. R. (1988) "Constituents of Croton crassifolius roots." Planta Med 54(1): 61-63.
6. Breslin, S. and O'Driscoll, L. (2016). "The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance." Oncotarget 7(29): 45745–45756.
7. Cattin, S., Ramont, L., & Rüegg, C. (2018). "Characterization and In Vivo Validation of a Three-Dimensional Multi-Cellular Culture Model to Study Heterotypic Interactions in Colorectal Cancer Cell Growth, Invasion and Metastasis." Front Bioeng Biotechnol 6: 97.
8. Chawalitpong, S., Chokchaisiri, R., Suksamrarn, A., Katayama, S., Mitani, T., Nakamura, S., ... & Charoenphandhu, N. (2018). "Cyperenoic acid suppresses osteoclast differentiation and delays bone loss in a senile osteoporosis mouse model by inhibiting non-canonical NF- κ B pathway." Sci Rep 5625.
9. Chen, Y., Tian, J. L., Wu, J. S., Sun, T. M., Zhou, L. N., Song, S. J., & You, S. (2017). "Biotransformation of cyperenoic acid by *Cunninghamella elegans* AS 3.2028 and the potent anti-angiogenic activities of its metabolites" Fitoterapia 118: 32-37.
10. Cooper, G. M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland: Sinauer Associates.

11. Cukierman, E., Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002). "Cell interactions with three-dimensional matrices." Current opinion in cell biology 14:633–639.
12. Ehsan, S. M., Welch-Reardon, K. M., Waterman, M. L., Hughes, C. C., & George, S. C. (2014). "A three-dimensional in vitro model of tumor cell intravasation." Integr Biol (Camb) 6(6): 603–610.
13. Health information unit. bureau of health policy and strategy, 2011.
14. Jacks, T. and Weinberg R. A. (2002). "Taking the Study of Cancer Cell Survival to a New Dimension." Cell 111:923–925.
15. Jacobi, N., Seeboeck, R., Hofmann, E., Schweiger, H., Smolinska, V., Mohr, T., ... & Önder, K. (2017). "Organotypic three-dimensional cancer cell cultures mirror drug responses in vivo: lessons learned from the inhibition of EGFR signaling." Oncotarget 8(64): 107423–107440.
16. Korff, T. and Augustin, H. G. (1998). "Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation." J Cell Biol 143:1341-52.
17. KUNZ-SCHUGHART, L. A., Kreutz, M., & Knuechel, R. (1998). "Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology." Int. J. Exp. Pathol 79:1–23.
18. Maamer-Azzabi, A., Ndozangue-Touriguine, O., & Breard, J. (2013). "Metastatic SW620 colon cancer cells are primed for death when detached and can be sensitized to anoikis by the BH3-mimetic ABT-737." Cell Death & Disease 4:e801.
19. Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H. (2007). "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue." Nat. Rev. Mol. Cell Biol 8:839–845.
20. Rajoka, M. S. R., Zhao, H., Lu, Y., Lian, Z., Li, N., Hussain, N., ... & Shi, J. (2018). "Anticancer potential against cervix cancer (HeLa) cell line of probiotic Lactobacillus casei and Lactobacillus paracasei strains isolated from human breast milk." Food & Function
21. Singthong, J., Oonsivilai, R., Oonmetta-Aree, J., & Ningsanond, S. (2014). "Bioactive Compounds and Encapsulation of Yanang (Tiliacora Triandra) Leaves." Afr J Tradit Complement Altern Med 11(3): 76–84.

22. Riedl, A., Schlederer, M., Pudelko, K., Stadler, M., Walter, S., Unterleuthner, D., ... & Pfeiffer, D. (2017) "Comparison of cancer cells cultured in 2D vs 3D reveals differences in AKT/mTOR/S6 kinase signaling and drug response." J Cell Sci 130(1):203-218.
23. Virani, S., Bilheem, S., Chansaard, W., Chitapanarux, I., Daoprasert, K., Khuanchana, S., ... & Suwanrungruang, K. (2017). "National and Subnational Population-Based Incidence of Cancer in Thailand: Assessing Cancers with the Highest Burdens." cancers 9(8): 108.
24. Walsh, J. H., Karnes, W. E., Cuttitta, F., & Walker, A. (1991) "Autocrine growth factors and solid tumor malignancy." West J Med 155(2): 152–163.
25. Walsh, J. H., Karnes, W. E., Cuttitta, F., & Walker, A. (2012). "A Simple and Cost Efficient Method to Avoid Unequal Evaporation in Cellular Screening Assays, Which Restores Cellular Metabolic Activity." International Journal of Applied Science and Technology 2:17-21.
26. Walzl, A., Unger, C., Kramer, N., Unterleuthner, D., Scherzer, M., Hengstschläger, M., ... & Dolznig, H. (2014). "The Resazurin Reduction Assay Can Distinguish Cytotoxic from Cytostatic Compounds in Spheroid Screening Assays." J Biomol Screen 19:1047-1059.
27. Wang, H., Oo Khor, T., Shu, L., Su, Z. Y., Fuentes, F., Lee, J. H., & Tony Kong, A. N. (2012). "Plants Against Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Drug ability." Anticancer Agents Med Chem 12(10): 1281–1305.
28. Wu, R. S. C., Wu, K. C., Yang, J. S., Chiou, S. M., Yu, C. S., Chang, S. J., ... & Chung, J. G. (2011). "Etomidate Induces Cytotoxic Effects and Gene Expression in a Murine Sutherland, R. M., Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model." Science 240:177–184.
29. Yamada, K. M. and Cukierman, E. (2007). "Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D." Cell 130:601–610.