SUT 1-104-52-12-05

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ต้านของแมงลักคาต่อโปรแกรมการตายของเซลล์สายพันธุ์

Effects of Mintweed (*Hyptis suaveolens*) Extracts on Apoptosis of Cell Lines

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT 1-104-52-12-05

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ต้านของแมงลักคาต่อโปรแกรมการตายของเซลล์สายพันธุ์

Effects of Mintweed (*Hyptis suaveolens*) Extracts on Apoptosis of Cell Lines

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์. ดร. กรกช อินทราพิเชฐ

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี ปีงบประมาณ 2552

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2560

บทคัดย่อ

สารสกัดแมงลักคา (*Hyptis suaveolens*, mintweed) ซึ่งมี คุณสมบัติเป็นสาร antioxidants สามารถกำจัด free radicals การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์วิเคราะห์สารสกัดเพื่อตรวจหา (1) คุณสมบัติ lipid peroxidation inhibition ต่อ oxidation ของ polyunsaturated fatty acid (2) cytotoxicity ต่อเซลล์สายพันธุ์มะเร็งของคน และ เซลล์ปกติของคน (3) ปัจจัยโปรตีนที่ทำให้เกิด apoptotic induction ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งของคน และ เซลล์ปกติของคน

Lipid peroxidation inhibition

สารสกัดใบแมงลักคาแสดงคุณสมบัติ lipid peroxidation inhibition ต่อ Fe (II)-induced lipid peroxidation ของ phosphatidylcholin ซึ่งเป็น polyunsaturated fatty acid ส่วนประกอบสำคัญชนิดหนึ่งในเยื่อเซลล์ สารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทธานอล (MLE/e) inhibit ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และสาร antioxidant มาตรฐาน Catechin 3 เท่า MLE/e มีค่า IC_{50}, 24 ชม.ที่ 5.43 ± 0.37 μg/mL สารสกัดใบแมงลักคาด้วยน้ำ (MLE/w) มีค่า IC_{50} 17.45 ± 0.21 μg/mL ใกล้เคียงกับ IC_{50} ของ Catechin ซึ่งเท่ากับ 17.92 ± 0.18 μg/mL ส่วนสารสกัดเมล็ดแมงลักคามีศักยภาพ inhibit ต่ำกว่าสารสกัดใบแมงลักคาอย่างมีนัยสำคัญ MSE/e มีค่า IC_{50} 35.95 ± 1.78 μg/mL และ MSE/w มีค่า IC_{50} 725.48 ± 17.81 μg/mL

Cytotoxicity to T lymphocyte leukemia cell line - Jurkat cells และ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

วิเคราะห์ cytotoxicity ของสารสกัดแมงลักคาต่อการเจริญ/ตายของเซลล์ที่ 24 ชม ด้วย Alamar Bleu (AB) assay สารสกัดใบแมงลักคามีพิษ cytotoxicity ต่อเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาว human T lymphocyte leukemia Jurkat cells แต่ไม่มีพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของคน peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ความรุนแรงของพิษขึ้นกับความเข้มข้น (dose dependent)

Cytotoxicity ต่อ Jurkat cells ของ MLE/e ต่ำกว่าของ Catechin 1.63 เท่า พิษของ MLE/w ต่ำกว่า Catechin 2.68 เท่า ศักยภาพของ cytotoxicity, IC_{50} ที่ 24 ชม ของสารสกัดใบและเมล็ดต่อ Jurkat cells เรียงลำดับดังนี้ MLE/e, 553.52 ± 14.00 μg/mL > MLE/w, 912.06 ± 16.86 μg/mL > MSE/e,

2385.95 ± 81.28 µg/mL > MSE/w, 5813.45 ± 111.25 µg/mL ในขณะที่ IC_{50} ของ Catechin เท่ากับ 339.74 ± 14.55 µg/mL

Cytotoxicity ของ MLE และ MSE ต่อ PBMCs ต่ำมาก และต่ำกว่าพิษของ Catechin อย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าแสดงฤทธิ์แบบ dose dependent ศักยภาพ IC_{50} ที่ 24 ชม ของสารสกัดทั้งหมดดังนี้ MLE/w, 1140.52 ± 06.05 µg/mL > MLE/e, 1356.17 ± 136.78 µg/mL > MSE/e, 2920.68 ± 155.38 µg/mL > MSE/w, 5813.45 ± 111.25 µg/mL ส่วน Catechin มีค่า IC_{50} 647.00 ± 12.76 µg/mL

Apoptotic induction

สารสกัดใบแมงลักคาชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ Jurkat cells และ PBMCs แบบ Apoptosis ซึ่งตรวจได้จากการเปลี่ยนแปลงของ nucleus ที่พองเป็นพู (nuclear blebbing) โดยการย้อมด้วยสี Hoschst 33258 ตรวจการแตกหักของสารพันธุกรรม DNA โดย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนปัจจัยบางชนิดที่เกี่ยวข้องในกลไก apoptosis ได้แก่ Caspace-9, Bcl-2 และ Bax โดย Western blotting ด้วย immuno detection

พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 400 µg/mL MLE/e และที่ 800 µg/mL MLE/w แสดงประสิทธิภาพตัด nucleus ออกเป็นส่วนๆ ให้อยู่ในถุง nuclear blebbing และ ทำให้ nucleosomes หักออกเป็นแต่ละหน่วย/ท่อน ปรากฏเป็นขั้นบันได (DNA ladder) ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ Western ที่พบการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นของ Caspase-9, Bcl2 และ Bax

ดังนั้น สารสกัดแมงลักคาโดยเฉพาะสารสกัดใบมี antioxidants ที่มีคุณสมบัติเป็น lipid peroxidation inhibitor ในปฏิกิริยา oxidation ของ fatty acids ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีในการป้องกันการทำลายไขมันส่วนประกอบหลักของเยื่อชีวภาพของเซลล์ สารสกัดใบแมงลักคามีฤทธิ์ cytotoxicity ต่อเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของคน แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของคน นอกจากนี้สารสกัดใบแมงลักคาสามารถชักนำให้สร้างปัจจัยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เซลล์สายพันธุ์มะเร็งตายแบบ apoptosis แต่ไม่ชักนำในเซลล์ปกติ สารสกัดใบแมงลักคาจึงควรได้รับการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในประเด็นอื่นๆ อีก เพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์นำสารสกัดไปพัฒนาเป็นสารป้องการเกิดมะเร็งหรือเป็นยารักษามะเร็งต่อไปในอนาคต

Abstract

The purposes of this research were to determine (1) lipid peroxidation inhibition property on polyunsaturated fatty acids, (2) cytotoxicity on a human cell line and human normal cells, and apoptotic proteins which were to induce apoptosis in both human cell line and human normal cells.

Lipid peroxidation inhibition

Mintweed leaf extracts were found to process lipid peroxidation inhibition in Fe (II)-induced lipid peroxidation of phosphatidylcholin, the polyunsaturated fatty acid which is one of the principal fat components in cell membrane. Leaf ethanol extract (MLE/e) was more potent in lipid peroxidation inhibition than water extract and antioxidant standard, Catehin, by 3 fold. The IC_{50} at 24 h of MLE/e was 5.43 ± 0.37 μg/mL and of MLE/w was 17.45 ± 0.21 μg/mL which was merely equal to of Catechin, 17.92 ± 0.18 μg/mL. The mintweed seed extracts were significant less potent than the leaf extracts. The IC_{50} of MSE/e was 35.95 ± 1.78 μg/mL and of MSE/w was 725.48 ± 17.81 μg/mL.

Cytotoxicity to T lymphocyte leukemia cell line - Jurkat cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Cytotoxicity of mintweed extracts was analysed by observing the viability/death of the cells at 24 hours by Alamar Bleu (AB) assay. The leaf extracts were cytotoxic to human T lymphocyte Jurkat cells, but not to human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The level of cytotoxic potency was dose dependent fashion.

Cytotoxicity of MLE/e to Jurkat cells lower then of Catechin 1.63 fold. The MLE/w cytotoxicity was less than Catechin's 2.68 fold. Cytotoxic efficacy of all extracts determined by IC_{50} at 24 hours was arranged as MLE/e, 553.52 ± 14.00 μg/mL > MLE/w, 912.06 ± 16.86 μg/mL > MSE/e, 2385.95 ± 81.28 μg/mL > MSE/w, 5813.45 ± 111.25 μg/mL. While the IC_{50} of Catechin was 339.74 ± 14.55 μg/mL.

Cytotoxicity of both MLE and MSE extracts were very low and much lower than of Catechin, significantly. Although, the toxicity was dose dependent. The potency of all extracts was arranged as MLE/w, 1140.52 ± 06.05 μg/mL > MLE/e, 1356.17 ± 136.78 μg/mL > MSE/e, 2920.68 ± 155.38 μg/mL >

MSE/w, 5813.45 ± 111.25 µg/mL. The Catechin's IC_{50} was 647.00 ± 12.76 µg/mL.

Apoptotic induction

MLEs were able to induce apoptotic death in Jurkat cells and PBMCs analyzed by the nuclear morphological changes. The nuclear blebbing appearance was observed by Hoschst 33258 staining. DNA fragmentation was investigated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The apoptotic factor proteins, Caspace-9, Bcl-2 and Bax, were analysed by Western blotting followed by immuno detection.

It appeared that the lowest effective concentrations at 400 µg/mL MLE/e and at 800 µg/mL MLE/w were able to cut nucleus in to nuclear blebbing and nicked nucleosomes into pieces which appeared as DNA ladder on PAGE. These evidences were concurred with the Western blot analysis which showed the up-regulation of Caspase-9, Bcl2 and Bax.

Therefore, mintweed extracts particularly MLEs contained antioxidants with property of lipid peroxidation inhibition in fatty acid oxidation. This property was good for preventing the damage of fat, the principal component of biological membrane. MLEs processed cytotoxic property causing death to human T lymphocyte leukemia cell line, but not to normal mononuclear white blood cells. Moreover, MLEs were able to induce apoptotic death to the cell line, but the normal cells. Thus, mintweed could be more studied to obtain elaborate scientific data so that it could be developed as cancer prevention agent or cancer drug in the future.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค
สารบัญ ..... จ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญภาพ ..... ซ

บทที่

1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 3
1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ 3
1.5 ประโยชน์ของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ 4
เอกสารอ้างอิง 4
2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
2.1 คำนำ 5
2.2 อนุกรมวิธานของแมงลักคา 7
2.3 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Antioxidant activity) 7
2.4 ฤทธิ์ต้านการก่อเนื้องอก/มะเร็ง(Tumour/cancer prevention) ของแมงลักคา 8
เอกสารอ้างอิง 9
3 ฤทธิ์ยับยั้งออกซิเดชันของไขมัน และ ความเป็นพิษต่อเซลล์สายพันธุ์และเซลล์ปกติ 12
3.1 คำนำ 12
3.2 วัตถุประสงค์ 14
3.3 อุปกรณ์และวิธีการ 14
3.3.1 การเก็บตัวอย่างพืชและการเตรียมสารสกัด 14
3.3.2 การเตรียม peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) 15
3.3.3 Cell culture สำหรับ Jurkat cells 15
3.3.4 Lipid peroxidation (LPO) 15
3.3.5 Cytotoxicity test 17

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.3.6 Statistical analysis ……...……...	17
	3.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ ……	18
	3.4.1 Lipid peroxidation inhibition ……..……..……	18
	3.4.2 Cytotoxicity ของสารสกัดแมงลักคา ……..……	20
	3.4.2.1 Cytotoxicity ต่อ T lymphocyte leukemia cell line – Jurkat cells ..	20
	3.4.2.2 Cytotoxicity ต่อ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)	22
	3.5 สรุปผลการทดลอง ……	25
	เอกสารอ้างอิง ……..	26
4	การชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาว	30
5	สรุปผลการทดลอง	45
ประวัติผู้วิจัย ……..		47

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่			หน้า
3.1	Lipid peroxidation inhibition by mintweed (H. sauveolens) leaf and seed extracts and catechin on phosphatidylcholine liposomes by TBARS assay. Data were mean ± SD., (n = 3).	…	19
3.2	Cytotoxic effects of mintweed leaf and seed extracts on Jurkat cells (human T lymphocyte leukemia cells) determined by Alarma blue (AB) assay at 24 h. Percent viability of treated cells and IC50 (µg/mL) at 24 h were present. Data were mean ± S.D., (n= 3).	…	21
3.3	Cytotoxic effects of mintweed (H. sauveolens) leaf and seed extracts on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) determined by Alarma blue assay at 24 h. Percent viability of treated cells and IC50 (µg/mL) at 24 h were present. Data were mean ± S.D., (n= 3).	…	23

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่			หน้า
2.1	*Hyptis suaveolens* (L.) Poit. A, plant tree. B, seeds	.....	6
3.1	Radical chain reaction, forming a more stable radical species which can be metabolized and excreted.	.....	12
3.2	Mechanism of lipid peroxidation	.....	13
3.3	Normal lymphocyte separation by Histopaque-1077	…..	15
3.4	Thiobarbituric acid reaction กับ MDA ผลผลิตจาก lipid peroxidation	.....	16
3.5	Resazurin and resorufin structures. Nonreduced Alamar blue correspond to resazurin and reduced Alamar blue to resorufin	.....	17
3.6	Figure 3.6 Comparison between the cytotoxicity (IC50, 24 h) of mintweed extracts on Jurkat cells (human T lymphocytes leukemia cells) and PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) at 24 h (n = 3). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract; CA, catechin. (** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).	.....	24

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งเป็นกลุ่มของโรคที่เกิดจากการเจริญเติบโตและการกระจายของเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้จนได้กลุ่มเซลล์เป็นเนื้องอก พัฒนาเป็นมะเร็งในที่สุด อาจเป็นผลให้ผู้เป็นมะเร็งถึงแก่ความตายได้ มะเร็งเกิดจากทั้งปัจจัยภายนอก เช่น บุหรี่ สารเคมี รังสี และเชื้อโรค จากปัจจัยภายใน เช่น การกลายพันธุกรรม ฮอร์โมน เงื่อนไขภูมิคุ้มกัน และ การกลายพันธุ์จากกระบวนการเมทาโบลิซึม ปัจจัยเหล่านี้มีปฏิกิริยาร่วมกันหรือเป็นลำดับเพื่อกระตุ้นให้เกิดมะเร็ง (carcinogenesis) มะเร็งเป็นสาเหตุต้นๆ ของการตายของคนในประเทศกำลังพัฒนาด้านเศรษฐกิจและเป็นสาเหตุรองของการตายของคนในประเทศที่พัฒนาแล้ว ข้อมูลกรณีมะเร็งอุบัติใหม่ (ผู้ป่วยใหม่) ทั่วโลกในปี ค.ศ. 2008 ประมาณ 12.7 ล้านราย 5.6 ล้านรายพบในประเทศกำลังพัฒนาด้านเศรษฐกิจและ 7.1 ล้านรายพบในประเทศที่พัฒนาแล้ว ในจำนวนนี้ผู้ป่วยมะเร็งตายไปประมาณ 7.6 ล้านราย หรือประมาณ 21,000 คนต่อวัน ผู้ป่วยมะเร็งอยู่ในประเทศกำลังพัฒนาด้านเศรษฐกิจตาย 4.8 ล้านคน และในประเทศที่พัฒนาแล้วตาย 2.8 ล้านคน มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุด 23% และตายมากที่สุด 14%) ในหญิง มะเร็งปอดพบมากที่สุด 17% ของรายใหม่ทั้งหมด และตายถึง 23% ประมาณการปี ค.ศ. 2030 ภาระผู้ป่วยมะเร็งทั่วโลกจะเป็น 21.4 ล้านคน และจะมีผู้ตาย 13.2 ล้านคน ภาระจากมะเร็งจึงเพิ่มขึ้นในประเทศกำลังพัฒนาด้านเศรษฐกิจเนื่องจากการประชากรเพิ่มจำนวนมากขึ้น ประชากรมีอายุมากขึ้น การรับวิถีการดำรงชีพที่มีความสัมพันธ์กับมะเร็ง เช่น การสูบบุหรี่ ไม่ออกกำลัง และการรับประทานอาหารแบบตะวันตก นอกจากนี้การตายของเด็กและการตายจากโรคติดเชื้อในประเทศกำลังพัฒนาด้านเศรษฐกิจลดลง (American Cancer Society, 2011; Jemal, et. al, 2011)

ในกลุ่มประเทศอาเซียน ในปี ค.ศ. 2008 ประมาณการมะเร็งรายใหม่มากกว่า 700,000 ราย ในจำนวนนี้ตาย 500,000 ราย พบมากที่สุดเป็นมะเร็งปอด 98,143 ราย มะเร็งเต้านม 86,842 ราย ๖ และ มะเร็งตับ 74,777 ราย มะเร็งที่ทำให้ผู้ป่วยตายมากที่สุดคือ มะเร็งปอด 85,772 ราย มะเร็งตับ 69,115 ราย และมะเร็งลำไส้ใหญ่ 44,280 ราย (Kimman, M., Norman, R., Jan, S., Kingston,. And Woodward, M., 2012) สำหรับประเทศไทย ปี ค.ศ. 2008 ผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ 123,800 ราย ตาย 85,000 ราย (Cancer Index, 2012)

อะพอพโทซิส (apotosis) เป็นการตายของเซลล์แบบหนึ่งซึ่งเป็นแบบที่เซลล์ถูกกำหนด (programed cell death) โดยการทำงานของพันธุกรรมให้ฆ่าตัวตาย (suicide) เป็น

ปรากฏการณ์ที่จำเป็นระหว่างพัฒนาการของคัพภะตัวอ่อนในมดลูกของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงรวมทั้งคน และเป็นภาวะปกติเมื่อเซลล์มีความผิดปกติไม่พึงประสงค์ เช่น เซลล์มะเร็ง เซลล์นั้นๆ จะถูกกำจัดโดยโปรแกรมฆ่าตัวตาย หรือการกำจัดเซลล์ไม่พึงประสงค์อื่นๆ apoptosis จึงมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพและโรคต่างๆ apotosis มีกระบวนการ ปัจจัยและขั้นตอนปฏิกิริยาชีวเคมีของสารที่เกี่ยวข้องเป็นวิถีของสารโปรตีนหลายๆ ชนิด ซึ่งถูกกำหนดและเป็นผลผลิตของพันธุกรรม ถ้าปัจจัยโปรตีนที่เกี่ยวข้องเหล่านั้นบกพร่องจากพันธุกรรม apoptosis จะล้มเหลว เป็นผลให้เซลล์ร้ายเหล่านี้ไม่ถูกกำจัด และ มีชีวิตเป็นเซลล์อมตะ สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้เรื่อย กลายเป็นกลุ่มเซลล์เนื้อร้าย และเป็นมะเร็ง (carcinogenesis) ในที่สุด (Lowe, S.W. and Lin, A.W., 2000; Renehan, A.G., Booth, C., and Potten, C.S., 2001; Sjostrom, J. and Bergh, J. 2001; Elmore, S., 2007)

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อน มีพืชพรรณหลากหลาย ประกอบกับคนไทยมีการใช้สมุนไพรด้วยภูมิปัญญาพื้นบ้านในการบำรุงร่างกายและรักษาอาการและโรคต่างๆ สืบทอดกันมาในท้องถิ่นเป็นเวลานาน อีกทั้งรัฐบาลได้ส่งเสริมให้มีการวิจัยศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรทางวิทยาศาสตร์ เพื่อแสวงหาสารสกัดธรรมชาติจากพืชสมุนไพรต่างๆ ที่สามารถใช้เป็นทางเลือกการแพทย์ (alternative medicine) ในการป้องกันและรักษาโรค เพื่อประชาชนสุขภาพดีถ้วนหน้า การป้องกันและรักษาโรคมะเร็งจากผลผลิตธรรมชาติ (plant natural product for tumor/cancer prevention) เป็นทางเลือกอย่างหนึ่งที่จะสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษาด้วยสารเคมีและรังสีที่มีราคาสูง จะช่วยลดการนำเข้าสารเคมีและยาจากต่างประเทศ ทำให้ประชาชนไทยพึ่งตัวเองได้ ส่งผลดีต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาวิจัยเพิ่มคุณค่าให้แก่พืชสมุนไพรที่เป็นวัชพืช ในการวิจัยนี้คือ แมงลักคา (Mintweed – *Hyptis suaveolens*) ซึ่งพบเจริญแพร่หลายข้างทางและพบทั่วไปในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในพื้นที่รกร้าง ริมทางและถนนหลวงทั่วไปในจังหวัดนครราชสีมาและในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแมงลักคาต่อการตายของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งในการทดลอง (*in vitro*) จึงสำคัญต่อวิจัยการป้องกันการเกิดมะเร็งในชีวิต (*in vivo*) ของคนในขั้นวิจัยต่อไป นอกจากนี้ การศึกษานี้จึงเป็นการนำวัชพืชแมงลักคามาศึกษาวิจัยพัฒนาให้มีมูลค่าเพิ่ม ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพคนไทย และยังสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้ประสงค์จะศึกษาวิจัยฤทธิ์ของสารสกัดแมงลักคา ในด้านพิษต่อการตายของเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับเซลล์สายพันธุ์/เซลล์มะเร็ง โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อเป็นข้อมูล

ขั้นต้นนำสู่การพัฒนาการวิจัยฤทธิ์ของสารสกัดแมงลักคาต่อเนื้องอกในสัตว์ทดลองและต่อเซลล์มะเร็งในคนในขั้นตอนต่อไป โดย

1) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแมงลักคาต่อ Apoptosis ด้าน Nuclear morphological change และ DNA fragmentation ของเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับเซลล์สายพันธุ์/เซลล์มะเร็ง
2) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแมงลักคาต่อ Apoptotic proteinsในเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับเซลล์สายพันธุ์/เซลล์มะเร็ง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้ใช้สารสกัดใบสกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยแอลกอฮอลที่อุณหภูมิต่ำระหว่าง 60-80^{o}C ในประเด็นต่อไปนี้

1) คุณสมบัติ antioxidant และ toxicity ของ phyochemicals ในสารสกัดเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการทดลองขั้นต่อไป
2) ฤทธิ์ของสารสกัดต่อ apoptosis โดยวิเคราะห์ Nuclear morphological change และ DNA fragmentation ศึกษาด้วยเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับเซลล์สายพันธุ์/เซลล์มะเร็งโดยการเพาะเลี้ยง และ
3) ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงของ Apoptotic proteins ที่ชักนำ Apoptosis ซึ่งเป็น Genotoxicity ของเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับเซลล์สายพันธุ์/เซลล์มะเร็ง

1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

การทดลองที่ 1 วิเคราะห์ Properties ของสารสกัดแมงลักคา

1) สกัดใบและเมล็ดแมงลักคาด้วยน้ำและ 70% alcohol ที่ 60-80^{o}C
2) วิเคราะห์ Antioxidant activity ของสารสกัด โดย lipid peroxidation inhibition methods
3) วิเคราะห์ cytotoxicity ของสารสกัดต่อเซลล์สายพันธุ์มะเร็งและเซลลปกติของคน โดย Alamar blue assay

<u>การทดลองที่ 2 ศึกษาฤทธิ์ต่อ Apoptosis ในเซลล์ปกติและเซลล์สายพันธุ์/เซลล์มะเร็ง</u>

1) เพาะเลี้ยงเซลล์ปกติ 24 ชั่วโมง treat ด้วยสารสกัดหลายความเข้มข้น ที่ 37^{o}C เป็นเวลานานตามกำหนดของการศึกษา/วิเคราะห์
2) ศึกษา Nuclear morphological change: เก็บเซลล์ที่ 6-12 ชั่วโมง ย้อม nucleus ของเซลล์ด้วยสี Hoechst dye และสังเกตจำนวน apoptotic cells ด้วย fluorescent inverted microscope
3) ศึกษา DNA fragmentation: เก็บเซลล์ที่ 3-6 ชั่วโมง lyse cells สกัดและตกตะกอน DNA แล้วแยก DNA fragment (ladder) ใน 2% agarose gel electrophoresis

4) วิเคราะห์ Apoptotic protein factors: เก็บเซลล์ที่ 6-12-24 ชั่วโมง lyse เซลล์ วัดปริมาณโปรตีน แยกโปรตีนด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ detect ด้วย Western blotting และ antibody ต่อ apoptotic proteins เช่น cspace-9, Bcl-2, และ Bax

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ผลการวิจัยนี้สามารถศึกษาต่อเพื่อพัฒนาสารสกัดแมงลักคาให้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพเชิงพาณิชย์ และพัฒนาเป็นยาป้องกันและรักษามะเร็งได้
2) จดสิทธิบัตรผลงานวิจัย
3) เป็นต้นแบบนำสู้การศึกษาหาพืชสมุนไพรและเครื่องเทศอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็ง
4) สร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่แมงลักคา ส่งเสริมการการใช้เพื่อสร้างเสริมสุขภาพ และส่งเสริมให้เพาะปลูกสร้างรายได้เสริมให้เกษตรกร
5) ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ในรูปของนักศึกษาบัณฑิตได้ไม่น้อยกว่า 1 คน
6) ได้ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติจำนวน 1 เรื่อง

เอกสารอ้างอิง

American Cancer Society. (2011). Global cancer facts & figures, 2nd edition. American Cancer Society, 60 pp.

Cancer Index. (2012). Available at http://www.cancerindex.org/Thailand.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 35(4): 495-516.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Globla cancer statistics. Ca Cancer J Clin. 61:69-90.

Kimman, M., Norman, R., Jan, S., Kingston,. And Woodward, M. (2012). The burden of cancer in member countries of the association OF Southeast Asian Nations (ASEAN). Asain Pacific J Cancer Prev, 13:411-420.

Lowe, S.W. and Lin, A.W. (2000). Apoptosis in cancer. Carcinogenesis. 21(3): 485-495.

Renehan, A.G., Booth, C., and Potten, C.S. what is apoptosis, and why is it important? BMJ. 322:1536-1538.

Sjosrom, J. and Bergh, J. (2001). How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. BMJ. 322:1538-1539.

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คำนำ

พืชสังเคราะห์สาร secondary metabolites หลายชนิด เช่น phenolics, flavonoids, terpenoids และ alkaloids (Birt, Hendrich, and Wang, 2001; Reddy, Odhav, and Bhoola, 2003) เพื่อป้องกันตัวเองจากสารปฏิกิริยาออกซิเจน (reactive oxygen species – ROS) ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อโรค รังสี และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่นความเย็น ความแห้งแล้ง ความเค็มและมลพิษอื่นๆ (Grassmann, Hippeli, and Elstner, 2002) พบว่าพืชผัก ผลไม้ที่มนุษย์บริโภคเป็นอาหารในชีวิตประจำวันและสมุนไพรหลายชนิดมีสารออกฤทธิ์เป็น antioxidant กำจัด ROS ไม่ให้เกิดระหว่าง normal cell metabolism นั่นคือป้องกันการทำลาย lipids, proteins, nucleic acids และเซลล์ (Heinonen, Meyer, and Frankel,1998; Ames, Shigenaga, and Hagen, 1993) และ ต่อต้านการเกิดเนื้องอก (antitumor) ทำให้เซลล์ที่ร่างกายไม่ต้องการตาย (apoptosis) เป็นยับยั้งก่อนการเกิดเนื้องอกและมะเร็ง anti-inflammattion และ เสริมภูมิคุ้มกัน ผลไม้ประเภท berry เช่น strawberry ผลิตสาร antioxidants ในปริมาณสูง (273 mg gallic acid equivalents/100 g fruit) และมีฤทธิ์ ยับยั้งการเพิ่มปริมาณเซลล์มะเร็งตับของคน ($HepG_2$) (Meyers, Watkins, Pritts, and Liu, 2003) ส่วนองุ่นมีสารสำคัญคือ resveratrol ซึ่งเป็น polyphenolic compound ธรรมชาติ สามารถชักนำให้ glioma cells U251 ของคนซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งของ glia cells ตายอะพอพโทซิส (apotosis) (Jiang, et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีพืชในเขตร้อนอีหลายชนิดรวมทั้งในประเทศไทยที่มีฤทธิ์ antioxidation, anti-cell proliferation, antitumor และชักนำ apoptosis ในเซลล์หลายชนิดของหนูและของคน เช่น ขมิ้น (curcumin) (Choudhuri, et al. 2002; Sa and Das, 2008) เข็ม (Latha and Panikkar, 1998) และ Acanthus (christmas holly (Babu, Shylesh, and Padikkala, 2002)

แมงลักคา (mintweed, desert lavender, chan) (*Hyptis suaveolens*) เป็นวัชพืชในประเทศเขตร้อนทั่วไป เช่น ในไทย พบมากในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และในประเทศในทวีปอัฟริกา เป็นพืชอาหารประเภทเครื่องเทศในประเทศในเอเชียใต้ ประเทศในทวีปอัฟริกา

แมงลักคาเป็นพืชล้มลุกและเป็นไม้พุ่มเตี้ย ในตระกูลมินท์ (Lamiaceae) มีกลิ่น (aromatic) แรง ต้นสูงได้ถึง 3 เมตร ลำต้นสี่เหลี่ยม และมีขน ใบรูปไข่ออกตรงข้ามกัน ใบยาว 2.5-10 เซนติเมตร ฐาน

ใบรูปหัวใจ ดอกเป็นกลุ่ม กลีบฐานดอกมีฟันคล้ายขน 5 ซี่ กลีบดอกสีม่วงเข้ม มีกลีบในดอกสีม่วง 2 กลีบ (Figure 2.1)

Figure 2.1 *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. A, plant tree. B, seeds.

Source of Figure 2.1, A: Author;

Figure 2.1, B: http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=HYSU3#

มีการใช้แมงลักคารักษาอาการหลายอย่างแบบดั้งเดิม (conventional therapy) เช่น ใช้เป็นสารกระตุ้นประสาท (stimulant) ขับลม (carminative) ขับเหงื่อ (sudorific) และ ขับน้ำนม (lactagoue) ใช้ฉีดลดอาการบวม (catarrhal condition) ใช้ใบรักษามะเร็งและเนื้องอก น้ำคั้นจากใบแก้อาการกล้ามเนื้อกระตุก (antispasmodic) และแก้อาการไขข้ออักเสบ (antirheumatic) อาการปวดกระเพาะ (stomachach) แก้ไข้ เมล็ดใช้แก้กระหาย (allay thirst) แก้ท้องผูก (constipation) น้ำของแมงลักคาต้านการฝังตัวอ่อนในหนู (http://www.mpbd.info/plants/hyptis-suaveolens.php) สารสกัดใบแมงลักสามารถยับยั้งการเจริญของโรคจากเชื้อแบคทีเรียของปลานิล/ทับทิม (Malar, Sushna, Johnson, Janakiraman, and Ethal, 2012) สารสกัดใบแมงลักคาแสดงฤทธิ์ต้านท้องร่วง (Shaikat, Hossain, and Azam, 20012) ลดอาการบวมในหนูเมาส์ (Grassi, et. al., 2006) และช่วยซ่อมแซมบาดแผลโดยทำให้เยื่อบุผิวปิดบาดแผลเร็วขึ้น (Shenoy, Patil, and Kumar, 2009)

2.2 อนุกรมวิธานของแมงลักคา (Taxonomy of mintweed)

ชื่อสามัญ chan, Chinese mint, horehound, hyptis, mint weed, mintweed, pignut, wild spikenard

แมงลักคาเป็นพืชดอกในสกุล Punicaceae มีลำดับขั้นอนุกรมวิธานดังนี้

Taxonomic Hierarchy ของ *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.

Kingdom	Plantae -- Planta, plantes, plants, Vegetal
Subkingdom	Tracheobionta -- vascular plants
Division	Magnoliophyta -- angiospermes, angiosperms, flowering plants, phanérogames, plantes à fleurs, plantes à fruits
Class	Magnoliopsida -- dicots, dicotylédones, dicotyledons
Subclass	Asteridae
Order	Lamiales
Family	Lamiaceae -- menthes, mints
Genus	Hyptis Jacq. -- bushmint, hyptis
Species	Hyptis suaveolens (L.) Poit. -- pignut, wild spikenard, mintweed

Source:
http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32534

2.3 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น (Antioxidant activity)

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของแมงลักคา: พฤกษเคมี คือสารเคมีจากพืช ซึ่งพืชสังเคราะห์ขึ้นเพื่อป้องกันพืชเองและผู้บริโภค นักวิจัยคาดว่ามีสารพฤกษเคมีประมาณ 40,000 ชนิด สารต้านออกซิเดชั่นเป็นสารที่เกิดโดยธรรมชาติในพืชที่ใช้ป้องกันพืชจากอนุมูลอิสระ (free radicals) ซึ่งเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่ไม่เสถียรที่ปฏิกิริยาสูง รบกวนการทำงานของเซลล์ อนุมูลอิสระมีมากมายจากมลพิษ สารเสริมอาหาร (additives) สารกำจัดศัตรูพืช (pesticides) สารกำจัดแมลง (insecticides) ควันบุหรี่ ฯลฯ อนุมูลอิสระทำลายส่วนประกอบของเซลล์ รวมทั้ง DNA/RNA ซึ่งนำสู่การเกิดมะเร็งได้ ซึ่งหลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากพืช Hiptis spp รวมทั้งแมงลักคาพันธุ์ *Hyptis suaveolens* มีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidants (Nantitanon, Chowwanapoonpohn, and Okonogi, 2007; Gavani and Paarakh, 2008; Ghaffari, Ghassam, and Prakash, 2012; Ghaffari, Ghassam, Nayaka, Kini, and Prakash, 2014; Priyadharshini, and Sujatha,

2013) เนื่องจากในสารสกัดแมงลักคามีสารประกอบ alkaloids, flavonoids, phenols, terpenes และ steros (Agarwal and Varma, 2013; Sharma, Roy, Anurag, Gupta, and Vipin, 2013; Okoye and Chukwu, 2014) นอกจากนี้ยังพบว่า resveratrol จากองุ่นและพืชอื่นๆ เช่น ถั่ว มีคุณสมบัติ antioxidation และช่วยป้องกันมะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) (Pezzuto, 2008; Seeni, et al., 2008)

2.4 ฤทธิ์ต้านการก่อมะเร็ง/มะเร็งของแมงลักคา (Tumour/cancer prevention)

ฤทธิ์ต้านการก่อมะเร็ง/มะเร็งของแมงลักคา: มะเร็งเป็นเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่ไม่สามารถควบคุมได้ มะเร็งจึงทำลายเนื้อและอวัยวะปกติจนอาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ สารสกัดจากพืชหลายชนิดนอกจากมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นแล้วมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งด้วย เช่น สารสกัดจากใบต้นลีลาวดี *Plumeria acuminate* (Periyasamy, Gupta, Mazumder, Gebrelibanos, and Sintayehu, 2013) ใบชาดำ (Arindam Bhattacharyya, Tathagata Choudhuri, Suman Pal, Sreya Chattopadhyay, Goutam K.Datta, Gaurisankar Sa and Tanya Das, 2003) ใบพุดชา Zizyphus (Hassan, A.I. and Abdel-Gawad, E.I., 2010) และ *Lactuca serriola* (prickly lettuce) (Mona Alshathly, and Eman Elsharkawy, 2014) มีฤทธิ์ลดขนาดเนื้องอก Ehrlich ascites carcinoma (EAC) ในหนูเมาส์ นอกจากนี้ โปรพอลิส (propolis) จากรังผึ้งก็สามารถลดขนาดของ EAC (Badr, Edrees, Abdallah, El-Deen, Neamat-Allah, et al., 2011)

สารสกัดส่วนลำต้น (aerial part) ของแมงลักคา *H. suaveolens* มีศักยภาพเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องท้อง (Ehrlich ascites carcinoma / spontaneous murine mammary adenocarcinoma) ทำให้เซลล์ตายด้วยอัตราสูง DNA ของเซลล์แตกหัก (Gurunagarajan and Pemaiah, 2011) และ สารสกัดพืชใน family Lamiaceae หรือ genus Hyptis spp เหมือนกัน เช่น มีพิษต่อเซลล์เนื้องอกและเซลล์มะเร็ง สาร hyptoside จาก *H. verticillata* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว adult T-cell leukemia (ALT) (Hamada, Whire, Nakshima, Oiso, Fujita, Okamura, Iwagawa and Arima, 2012) และมีหลักฐานของ สารสกัดจาก *H. dilatata* มีพิษต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายสายพันธุ์ของคน [MDA-MB-231 (human breast cancer), PC-3, (human prostate cancer), MCF7 (human breast cancer), HT-29 (human colon cancer)] และของหนู บ4T1 (mouse mammary cancer), and RAW-267 (mouse leukemic monocyte macrophage cell line)] (Taylor, Arsenak, Abad, Fernández, Milano et al., 2013) แต่ในทางตรงข้าม สารสกัดของ *H pectinate* กระตุ้นการเจริญใหม่ของตับปกติของหนูแรทหลังการตัดตับออกบางส่วน (partial hepatectomy) (Melo, Silva, Melo, Antoniolli, Roberta, et al., 2006)

เอกสารอ้างอิง

Agarwal, K. and Varma, R. (2013). Antioxidant activity and phytochemical analysis of *Hyptis suaveolens* (*L*.) Poit. J Adv Phar Edu & Res. 3(4):541-549.

Alshathly, M. and Elsharkawy, E. (2014). Inhibition of Ehrlich ascites carcinoma by *Lactuca serriolain* Swiss albino mice. J Chem Chem Eng. 8:66-71.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:7915-7922.

Babu, B.H., Shylesh, B.S., and Padikkala, J. (2002). Tumour reducing and anticarcinogenic activity of *Acanthus ilicifolius* in mice. J. Ethopharma. 79:27-33.

Badr, M.O.T., Edrees, N.M.M., Abdallah, A.A.M., El-Deen, N.A.M.N., Neamat-Allah, A.N.F., et al. (2011). Anti-tumour effects of Egyptian propolis on Ehrlich ascites carcinoma. Vet Italiana. 47(3):341-350.

Bhattacharyya, A., Choudhuri, T., Pal, S., Chattopadhyay, S., Datta, G.K., et al. (2003). Apoptogenic effects of black tea on Ehrlich's ascites carcinoma cell. Carcinogenesis. 24(1):75–80.

Birt, D.F., Hendrich, S., and Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids. Pharma & Therapeutics 90:157-177.

Choudhuri, T., Pal, S., Agwarwal, M.L., Das, T. and Sa, G. (2002). Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. FEBS Latters. 512:334-340.

Gavani, U. and Paarakh, P.M. (2008). Antioxidant activity of *Hyptis suaveolens* Poit. Int J Pharmacol. 4(3):227-229.

Ghaffari, H., Ghassam, B.J., and Prakash, H.S. (2012). Hepatoprotective and cytoprotective properties of *Hyptis suaveolens* against oxidative stress-induced damage by CCl_4 and H_2O_2. Asain Pacific J Trop Med. 868-874., doi:10.1016/S1995-7645(12)60162-X.

Ghaffari, H., Ghassam, B.J., Nayaka, S.C., Kini, K.R., and Prakash, H.S. (2014). Antioxidant and neuroprotective activities of *Hyptis suaveolans* (L.) Poit. Against oxidative stress-induced neurotoxicity. Cell Mol Neurobiol. 34:323-331)

Grassi, P., Reyes, T.S.U., Sosa, S., Turelia, A., Hofer, O., and Zitterl-Eglseer, K. (2006). Anti-inflammatory activity of two diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. Z Naturforsch. 61c: 165-170.

Grassmann, J., Hippeli, S., and Elstner, E. (2002). Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. Plant Physiol 40:471-478.

Gurunagarajan, S. and Pemaiah, B. (2011). Comparative studies on cytotoxic effect of *Hyptis suaveolens* Poit. And *Leonotis nepeatefolia* R.Br. against EAC cells. J Pharm Res. 4(4):1222-1224.

Hamada, T., Whire, Y., Nakshima, M., Oiso, Y., Fujita, M.J., Okamura, H., Iwagawa, T., and Arima, N. (2012). The bioassay-guided isolation of growth inhibitors of adult T-cell leukemia (ATL), from the Jamaica plant *Hyptis verticillata*, and NMR characterization of hyptoside. Molecules. 17:9931-9938.

Hassan, A.I. and Abdel-Gawad, E.I. (2010). Effect of Zizyphus leaves extract on mice suffering from Ehrlich ascites carcinoma. Nature Sci. 8(11):234-244.

Heinonen, M., Meyer, A.S., and Frankel, E.N. (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. J. Agric. Food Chem. 46:4107-4112.

Jiang, H., Zhang, L., Kuo, J., Kuo, K., Gautam, S.C., et al. (2005). Resveratrol-induced apoptosis death in human U251 glioma cells. Mole Cancer Ther. 4(4):554-561.

Latha, P.Q. and Panikkar, K.R. (1998). Cytotoxic and antitumour principles from *Ixora coccinea* flowers. Cancer Letters 130:197-202.

Malar, R.J.J., Sushna, S.L., Johnson, M., Janakiraman, N., and Ethal, R.J.J. (2012). Bio-efficacy of the leaves extracts of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit against the fish pathogens. Int J Life Sci & Phar Res. 2(1):128-133.

Melo, G.b., Silva, R.L., Melo, V.A., Antoniolli, A.R., Roberta, P., et al. (2006). Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. Acta Cirurgica Brasileira. 21(S1):33-36.

Meyer, B.N., Watkins, C.B., Pritts, M.P., and Liu, R.H. (1982). Brine shrim: A convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica 45:31-34.

Nantitanon, W., Chowwanapoonpohn, S., and Okonogi, S. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Hyptis suaveolans* essential oil. Sci Pharm. 75:35-46.

Natural Resources Conservation Service. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. United State Department of Agriculture. Available online at http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=HYSU3#

Okoye, E.I. and Chukwu, P.I. (2014). Extraction and preliminary structural elucidation of alkaloid and flavonoid in *Hyptis suaveolens*. J Med Plants Res. 2(4):45-49.

Pezzuto, J.M. resveratrol as an inhibitor of carcinogenesis. Pharma Biol. 46(7-8):443-573.

Periyasamy, G., Gupta, M., Mazumder, U.K., Gebrelibanos, M. (2013). Antioxidant and antitumor activity of *Plumeria acuminata* in Ehrlich ascites carcinoma bearing Swiss albino mice. British J Pharm Res. 3(4):671-685.

Priyadharshini, S.D. and Sujatha, V. (2013). Antioxidant and cytotoxic studies on two compounds isolated from *Hyptis suaveolens* leaves. Int J Pharm Pharm Sci. 5(4):283-290.

Reddy, L., Odhav, B., and Bhoola, K.D. (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. Pharma & Therapeutics 99:1-13.

Sa, G. and Das, T. (2008). Anti cancer effects if curcumin: cycle of life and death. Cell Division. 3:1-14.

Seeni, A., Takahashi, S., Takeshita, K., Tang, M., Sugiura, S., et al. (2008). Suppression of prostate cancer growth by resveratrol in the transgenic rat for adenocarcinoma of prostate (TRAP) model. Asian Pacific J Cancer Prev. 9:7-14.

Shaikat, Z.H., Hossain, T., and Azam, G. (2012). Phytochemical screening and antidiarrhoel activity of *Hyptis suaveolens*. Int J App Res Nat Prod. 5(2):1-4.

Sharma, P.P., Roy, R.K., Anurag, Gupta, D., and Vipin, K.S. (2013). Hyptis suaveolens (L.) poit: A phyto-pharmacological review. Pint J Chem Pharm Sci. 4(1):1-11.

Shenoy, C., Patil, M.B., and Kumar, R. (2009). Wound healing activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). Int J Pharm Tech Res. 1(3):737-744.

Taylor, P., Arsenak, M., Abad, M.J., Fernández, A., Milano, B., et al. (2012). Screening of Venezuelan medicinal plant extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines. Phytother Res. 27:530-539, DOI: 10.1002/ptr.4752.

บทที่ 3

ฤทธิ์ยับยั้งออกซิเดชันของไขมัน และ ความเป็นพิษต่อเซลล์สายพันธุ์และเซลล์ปกติ

Lipid peroxidation inhibition and Cytotoxicity to cell line and normal cells

3.1 คำนำ

Phenolic compounds พบมีทั่วไปในพืชและเป็นส่วนสำคัญของอาหารสำหรับคน มีตั้งแต่เป็นสารโมเลกุลเดียวจนถึงสารโพลิเมอร์น้ำหนักโมเลกุลสูง ผลไม้ พืช ผัก และเครื่องดื่มเป็นแหล่งหลักของ phenolic compounds สำหรับคน phenolic compounds มีคุณสมบัติ antioxidant activity ซึ่งขึ้นกับโครงสร้างของสาร โดยเฉพาะ จำนวนและตำแหน่งของ hydroxyl groups และธรรมชาติของ aromatic rings พบว่าในสารสกัดใบแมงลักคาและเมล็ดแมงลักคามีสาร phenolic compounds ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วย DPPH scavenging activity และ Ferric reducing ability power (FRAP) แสดงคุณสมบัติเป็น antioxidant (กรกช อินทราพิเชฐ, 2558)

คุณสมบัติ anti-oxidation ของ phenolic compounds เช่น กำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavengers) ที่เกิดภายในเซลล์มีชีวิต เช่น hydroxide radicals และ reactive oxygen species (ROS) อื่นๆ จากกระบวนการหายใจ เช่น superoxide (O_2^-) และ peroxide (O_2^{2-}) ROS ทำความเสียหายต่อ DNA โปรตีน และ ไขมันของเยื่อเซลล์ (cell membrane) และเยื่อหุ้มส่วนประกอบของเซลล์ประเภท organelles ROS จึงมีบทบาทสำคัญต่อการแก่ (aging) แม้ว่าในเซลล์มีเอ็นไซม์ superoxide dismutase และ catalase เปลี่ยน superoxide และ peroxide ให้เป็น oxygen และน้ำ แต่ไม่มีเอ็นไซม์ต้าน hydroxide radical ดังนั้นการเติม free radical scavengers จึงสามารถป้องกันเซลล์จาก ROS โดยทำให้ free radicals เสถียร แล้วถูกกำจัดทิ้ง (Figure 3.1) (Soderberg, 2015) และ Phenolic compounds สามารถยับยั้ง lipid peroxidation

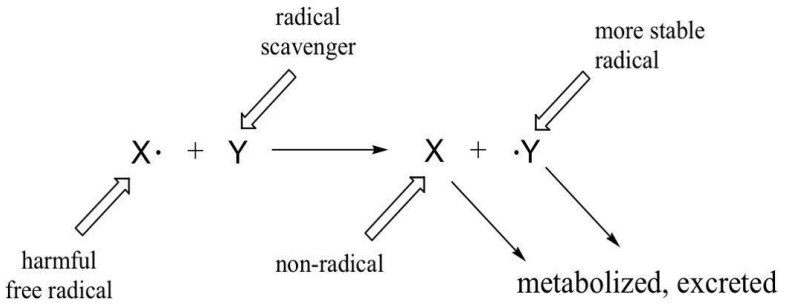

Figure 3.1 Radical chain reaction, forming a more stable radical species which can be metabolized and excreted. (Soderberg, 2015)

Lipid peroxidation

lipid peroxidation เป็น oxidative degradation (เสีย electrons) ของไขมันซึ่งเป็นสารประกอบหลักของเยื่อชีวภาพ (biological membrane) กระบวนการ lipid peroxidation เกิดได้เองในร่างกายโดยธรรมชาติในปริมาณไม่มาก ซึ่งส่วนมากเป็นอิทธิพลของ reactive oxygen species (ROS) เช่น hydroxyl radical, hydrogen peroxide เป็นต้นหรือเกิดจากปฏิกิริยาของเซลล์ phagocytes กระบวนการ lipid peroxidation เกิดเมื่อ oxidants เช่น free radicles หรือ ROS เข้าทำปฏิกิริยากับ carbon-carbon double bond โดยเฉพาะ polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ของ fatty membrane (Mylonas and Kouretas, 1999) และ plasma lipids (Yoshida, Ito, Shimakawa, and Niki, 2003) และเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (self-propagating chain reaction) (Figure 3.2)

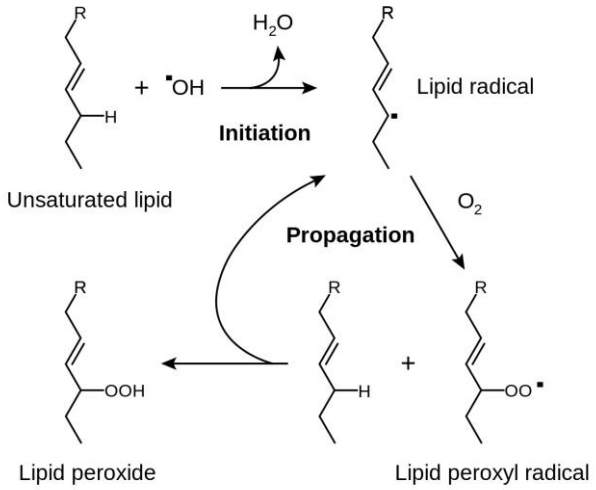

Figure 3.2 Mechanism of lipid peroxidation
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lipid_peroxidation.svg)

การทำร้าย membrane lipid และผลผลิตที่เกิดจาก lipid peroxidation นี้เป็น cytotoxicity ยับยั้ง gene expression ทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อตาย (Ayala, Muñoz, and Argüelles, 2014) แม้ว่าในเซลล์มีเอนไซม์ catalase, superoxide dismutase และสารไม่ใช่เอนไซม์ซึ่งได้แก่ vitamins A และ E ทำหน้าที่เป็นกลไกต่อต้าน oxidants โดยธรรมชาติได้ระดับหนึ่ง จึงทำให้เกิด lipid peroxidation ได้ แต่ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ของกระบวนการ แม้ว่าจะเกิด lipid peroxidation เพียงไม่กี่โมเลกุลก็สามารถทำลายเนื้อเยื่อได้อย่างมีนัยสำคัญ และเป็นสาเหตุของโรคหลายโรค เช่น atherosclerosis, asthma, Parkinson's disease, kidney (Mylonas and Kouretas, 1999), arthritis (Saxena, 2014), cerebral ischemia (Fuchs,

Perez-Pinzon, and Dave, 2014), Alzheimer's disease (Petursdottir, et al., 2007) และ aging (Rinnerthaler, et al., 2015)

Cytotoxicity

การตรวจหาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ *in vitro* เพื่อจำแนกหาโมเลกุลและกลไกที่เกี่ยวข้อง การตรวจหาสามารถดำเนินการได้หลายวิธี เช่น หาผลต่อจำนวนเซลล์ การมีชีวิตรอดของเซลล์ การแบ่งตัวของเซลล์ ส่วนเทคนิกการตรวจวัดอาจใช้ การวัด ATP, MTT, neutral red membrane integrity/LDH release, macromolecular synthesis และ glutathione depletion เป็นต้น (Hamid et al., 2004) ในการวิจัยนี้ใช้ Alamar blue ซึ่งเป็น oxidation-reduction indicator ที่เปลี่ยนสี fluorescence จากน้ำเงินเป็นแดง เทคนิกนี้ใช้ตรวจความมีชีวิต การเคลื่อนย้าย และการบุกรุกของ choriocarcinoma cells ผ่าน fibronectin-coated filters (Al-Nassirry, et al., 2007) และในการทดลองนี้ใช้ Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ และ Human T lymphocyte leukemia cells (Jurkat cells) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ต้นแบบ

3.2 วัตถุประสงค์

การวิจัยนี้ประสงค์ (1) ศึกษาคุณสมบัติ antioxidant ในสารสกัดแมงลักคา *Hyptis sauveolens* ต่อการยับยั้ง lipid peroxidation ซึ่งเป็น oxidative degradation ของไขมัน และ (2) ศึกษาพิษของสารสกัด *H. sauveolens* ต่อเซลล์ปกติและเซลล์สายพันธุ์มะเร็ง

3.3 อุปกรณ์และวิธีการ

3.3.1 การเก็บตัวอย่างพืชและการเตรียมสารสกัด

เก็บแมงลักคาซึ่งเป็นวัชพืชพบทั่วไปในพื้นที่ภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและพื้นที่ข้างเคียงบริเวณรอบมหาวิทยาลัย การจำแนกชนิดของแมงลักคาตามอนุกรมวิธานโดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร. ประนอม จันทรโณทัย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาขอนแก่น เก็บใบแมงลักคาระหว่างเดือนตุลาคม ล้างใบแมงลักคาด้วยน้ำสะอาดและตากแห้งด้วยแสงแดด ส่วนเมล็ดแมงลักคาเก็บช่วงเดือนมกราคม เตรียมสกัดเมล็ดโดยแช่เมล็ดในน้ำสะอาด ตั้งทิ้งไว้จนเมือกของเมล็ดบวมนิ่ม จึงกำจัดเมือกทิ้ง ตากเมล็ดที่ปราศจากเมือกให้แห้งในอากาศ แยกบดใบและเมล็ดแมงลักคาที่ตากแห้งแล้วในโถบดไฟฟ้า (electric blender)

สกัดผงบดของใบและเมล็ดด้วยเครื่องสกัด Soxhlet extraction apparatus (Buchi Instruments, Switzerland) ใช้ผงบด 50 กรัมในน้ำ หรือ 70% ethanol (v/v) 500 ml นาน 24 ชั่วโมง กรองสารสกัดและทำให้เข้มข้นในเครื่องระเหย rotary evaporator (Buchi Instruments, Switzerland) จากนั้นทำให้

สารสกัดแห้งเป็นผงโดย lyophilization ที่ -50°C (Freeze-zone 12 Plus, Labconco Corporation, Missouri, USA) เก็บผงสกัด lyophilized extract ที่ –20°C จนกว่าจะใช้ทดลอง

3.3.2 การเตรียม peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

เลือดของคนสุขภาพดีซึ่งได้รับอนุเคราะห์จากสภากาชาดไทย สาขาจังหวัดนครราชสีมา ทำเลือดเจือจางใน phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 g (1:1) หยดลงบน Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ซึ่งเป็น density gradient ปั่นเหวี่ยงที่ 400xg ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แยกชั้นฝ้าขาวของเซลล์เม็ดเลือดขาว PBMCs ประมาณ 0.5 cm ระหว่าง ชั้น plasma และ Histipaque-1077 (Figure 3.3) ล้าง PBMCs 3 ครั้งด้วย PBS เก็บเซลล์โดยปั่นที่ 250xg 10 นาที จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ใน complete RPMI 1640 medium (Gibco, New York, USA) ค้างคืนเพื่อให้monocytes และ platelets เกาะติดผิวขวดเลี้ยง แล้วเก็บ lymphocytes ที่ลอยแขวนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

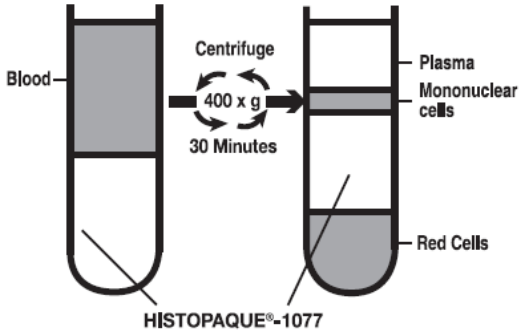

Figure 3.3 Normal lymphocyte separation by Histopaque-1077 (Hofman et al., 1982).

3.3.3 Cell culture สำหรับ Jurkat cells

Human T lymphocyte leukemia cells, Jurkat E6-1 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea). เพาะเลี้ยงใน RPMI 1640 medium ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS), 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin (สารเพาะเลี้ยงเซลล์จาก Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 95% humidified atmosphere และ 5% CO_2 ที่ at 37°C

3.3.4 Lipid peroxidation (LPO)

วิเคราะห์หาปริมาณ oxidative stress ด้วย ที่ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay โดยตรวจวัด peroxidation ซึ่งผลิต free radical ที่เข้าทำปฏิกิริยากับไขมัน ได้ผลผลิต malondiadehyde (MDA) และ MDA นี้ทำปฏิกิริยากับ Thiobarbituric acid (TBA) ที่อุณหภูมิ 90-100°C ได้ MDA-TBA adduct เป็นสารสี (chromogen) ซึ่งวัดความเข้มสีได้ด้วย spectrophotometer ที่ 530-540

nm หรือวัดด้วย spectrofluorometer ที่ excitation wavelength 530 nm และ emission wavelength 550 nm (Figure 3.4) (Oakes and Van Der Kraak, 2003)

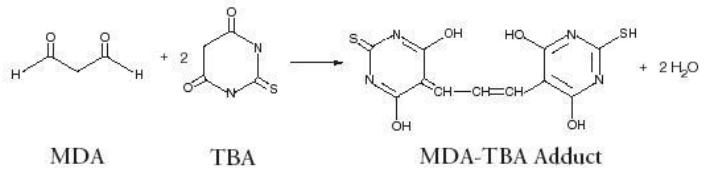

Figure 3.4 Thiobarbituric acid reaction กับ MDA ผลผลิตจาก lipid peroxidation (Gerard-Monnier, 1997).

ในการวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ TBARS assay โดยใช้เหล็ก (Fe^{2+}) ชักนำ peroxidation และใช้ถุงไขมัน phosphatidylcholine liposome เป็นสารตั้งต้น ดำเนินตามวิธีการของ Gonzalez-Paramas et al. (2004) และปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ใช้สารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ใส่ใน reaction mixture ที่มี mM KCl, 0.2 mM $FeCl_3$, และ 1 mg/mL of phosphatidylcholine liposome (final concentration, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) เริ่มปฏิกิริยา peroxidation โดย ใส่ 0.05 mM sodium L-ascorbate ใน 0.4 mL (final concentration & final volume) บ่มที่ 37°C 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.4 mL 20% trichloroacetic acid (TCA), 0.01% butylated hydroxytoluene (BHT), 0.25 N HCl และ 0.4 mL 0.8% thiobarbituric acid (TBA) บ่มที่ 80°C นาน 30 นาที ได้สารละลายสีชมพู ทำให้เย็นด้วยน้ำ และปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm นาน 10 นาที วัดผลผลิตที่ 535 nm ใช้ Fe^{2+} และ L-ascorbate induced liposome เป็น control และ un-induced liposome เป็น blank และใช้ catechin เป็น antioxidant standard คำนวณการยับยั้ง LPO ของสารสกัดจาก malondialdehyde (MDA) ที่เกิดขึ้นจากสมการข้างล่าง การทดลองทำ triplicate และดำเนินการซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหาค่า inhibitory concentration 50 (IC_{50})

$$\%\ LPO\ inhibition = \left(\frac{A\ control - A\ sample}{A\ control} \right) \times 100$$

$A_{control}$ และ A_{sample} เป็นค่าดูดแสงของ control และ ตัวอย่าง

วิเคราะห์ข้อมูลด้วย ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test เพื่อหา significant differences ระหว่างกลุ่มที่ $p < 0.05$

3.3.5 Cytotoxicity test

ในสารละลาย Alamar blue (AB) มี Resazurin เป็น active ingredient และ non-toxic สีฟ้า ซึ่งเมื่อซึมเข้าเซลล์จะถูก reduced เป็น Resorufin สารสีแดงและเรืองแสงสูง (Figure 3.5) การวิเคราะห์ cytotoxicity ด้วย Alamar blue assay ใช้เทคนิคนี้ตาม Berntsen et al. (2010) และปรับเปลี่ยนเล็กน้อย

PBMCs ($1x10^5$ cells/well) และ Jurkat cells ($2.5x10^4$ cells/well) เลี้ยงใน 96-well black clear bottom plate (Costar, Corning Inc., NY, USA) ใส่สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในปริมาตร 100 µL/well บ่ม 24 ชม ใส่ 10 µL AB (final 10% v/v AB) บ่มต่อ 4 ชม วัดสารละลายเรืองแสงด้วย spectrofluorometer (Spectra MAX Gemini EM, Molecular devices, California, USA) ที่ excitation wavelength ที่ 540 nm และ emission wavelength ที่ 590 nm ใช้ Catechin และ Ascorbic acid เป็นสาร positive control และ ใช้ 0.2% (v/v) DMSO เป็น negative control และ well ที่ไม่มี cells เป็น blank และวิเคราะห์ triplicate และดำเนินการซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณ % cell viability ดังนี้

$$\%\ Cell\ viability\ =\ \frac{Fluorecence\ of\ sample\ -Fluorecence\ of\ blank}{Fluorecence\ of\ control-Fluorecence\ of\ blank}\times\ 100$$

วิเคราะห์ 50% cell viability (IC_{50}) จากกร๊าฟ % cell viability กับความเข้มข้นของสารสกัดด้วย Probit analysis Cytotoxicity ตัดสินจาก mean cell vitality ของสารสกัดและสารควบคุม

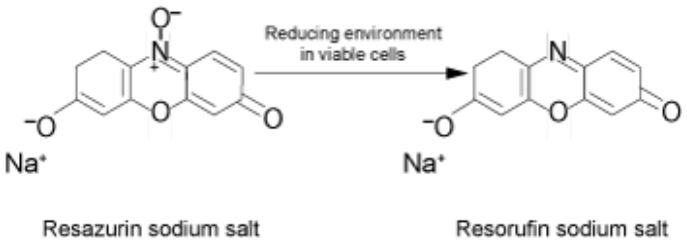

Figure 3.5 Resazurin and resorufin structures. Nonreduced Alamar blue correspond to resazurin and reduced Alamar blue to resorufin (O'Brien et al., 2000).

3.3.6 Statistical analysis

วิเคราะห์ข้อมูลโดย one-way ANOVA และ Duncan's multiple range tests ด้วย SPSS program ความแตกต่างระหว่าง mean ของกลุ่มสารสกัดและกลุ่มสารควบคุมพิจารณาเป็น unpaired student t' test และความแตกต่างเป็นนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$.

3.4 ผลการทดลองและ วิจารณ์ผล

3.4.1 Lipid Peroxidation Inhibition

Antioxidant capacity ของสารสกัดแมงลักคาวิเคราะห์ด้วย TBARS assay โดยวัดปริมาณของ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยา Fe (II)-induced peroxidation ของ phosphatidylcholin liposome (polyunsaturated fatty acids) MDA จับกับ thiobarbituric acid (TBA) ได้สารสี MDA-TBA adduct ที่วัดความเข้มสีได้ พบว่าสารสกัดใบแมงลักคา (MLE) แสดงคุณสมบัติยับยั้ง lipid peroxidation ได้ดีกว่า สารสกัดเมล็ดแมงลักคา (MSE) และเทียบประสิทธภาพ lipid peroxidation inhibition กับสาร Catechin ซึ่งเป็นสาร antioxidant มาตรฐาน ฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทธานอล (-/e) ยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (-/w) และขึ้นกับความเข้มข้น (dose dependent) ประสิทธิภาพ lipid peroxidation inhibition เรียงตามลำดับได้ดังนี้ MLE/e > MLE/w = Catechin > MSE/e > MSE/w

สารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทธานอล (MLE/e) แสดง lipid peroxidation inhibition ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50}, 24 ชม. ที่ 5.43 ± 0.37 μg/mL (Table 3.1) รองลงมาคือสารสกัดใบแมงลักคาด้วยน้ำ (MLE/w) มีค่า IC_{50} 17.45 ± 0.21 μg/mL ซึ่งประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารควบคุม Catechin ที่มีค่า IC_{50} 17.92 ± 0.18 μg/mL ส่วนสารสกัดเมล็ดแมงลักคาแสดง lipid peroxidation inhibition ได้น้อยกว่าสารสกัดใบ สารสกัดเมล็ดด้วยเอทธานอล (MSE/e) มีค่า IC_{50} 35.95 ± 1.78 μg/mL ซึ่งยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดเมล็ดด้วยน้ำ (MSE/w) ประมาณ 20 เท่า MSE/w มีค่า IC_{50} 725.48 ± 17.81 μg/mL

ดังนั้น ในสารสกัดใบแมงลักคามี antioxidants ที่ยับยั้ง Fe (II)- induced lipid peroxidation ได้สูงกว่าสารสกัดเมล็ด ฤทธิ์ขึ้นกับความเข้มข้น (dose dependent) และยังพบว่าคุณสมบัตินี้สอดคล้องกับความเข้มข้นทั้งหมดของ antioxidants หรือ ferric reducing ability power (FRAP) และประสิทธิภาพต่อ free radicals ($DPPH^{\bullet}$) scavenging ของสารสกัดใบแมงลักคาที่แสดงฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดเมล็ดแมงลักคา (กรกช อินทราพิเชฐ, 2558) นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์นี้ยังสอดคล้องกับผลของสารสกัดใบแมงลักคาที่สามารถยับยั้ง Fe (II)-induced lipid peroxidation ในสมองหนูนอกตัวสัตว์ (*in vitro*) ซึ่งในสมองเป็นเนื้อเยื่อ/อวัยวะที่มี polyunsaturated fatty acid สูงมาก แสดงว่าสารในใบแมงลักคาสามารถป้องกันปฏิกิริยา peroxidation ในสมองได้ (Oboh, (2008) และ ผลของสารสกัดแมงลักคาทั้งต้นยับยั้ง CCl_4-induced lipid peroxidation ใน tissue homogenate ของตับหนูแรท (Pradeep, et al., 2011; Ghaffari, Ghassam, and Prakash, 2012) ยังมีหลักฐานว่าหนูเมาส์ที่ได้รับสารสกัดใบของ *H. spicigera* พืชในวงค์เดียวกับ *H. suaveolens* ปริมาณ lipid peroxidateion ในตับลดลง (Aja, et al., 2015) นอกจากนี้ ยังมีสารสกัดอีกหลายพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้ง Fe (II)-induced lipid peroxidation อาทิเช่น สารสกัดใบ ของ *Rumex vesicarius* L. สามารถยับยั้ง lipid peroxidation ใน liver homogenate ของไก่

Table 3.1 Lipid peroxidation inhibition by mintweed (*H. sauveolens*) leaf and seed extracts and catechin on phosphatidylcholine liposomes by TBARS assay. Data were mean ± SD., (n = 3).

Sample	Conc.(µg/mL)	% inhibition	IC_{50} (µg/mL), 24 h.
MLE/e	2	5.95 ± 5.51	5.43 ± 0.37[a]
	4	27.02 ± 5.30	
	6	56.23 ± 9.17	
	8	87.08 ± 1.26	
MLE/w	5	10.84 ± 0.92	17.45 ± 0.21[a]
	10	22.90 ± 0.65	
	15	41.33 ± 0.17	
	20	59.63 ± 1.08	
MSE/e	10	9.59 ± 6.50	35.95 ± 1.78[b]
	20	27.79 ± 4.13	
	40	51.98 ± 3.21	
	60	73.58 ± 1.82	
MSE/w	200	10.54 ± 1.13	725.48 ± 17.81[c]
	400	28.97 ± 0.99	
	600	39.08 ± 0.99	
	800	57.07 ± 2.37	
Catechin	10	7.76 ± 2.50	17.92 ± 0.18[a]
	15	25.12 ± 2.00	
	20	59.25 ± 0.84	
	25	97.48 ± 0.37	

Different letters within the same column were significantly different ($p < 0.05$). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract.

(Prasad and Ramakrishnan, 2011) สารสกัดส่วนเหนือดินของ *Hertia cheirifolia* ยับยั้ง lipid peroxidation ต่อ linoleic acid (Kada, et al., 2016) สารสกัดใบมะม่วง (Mangifera indica) ยับยั้ง lipid peroxidation ในไข่ไก่ และ homogenates ของสมองและตับ (Badmus, et al., 2011) สารสกัดพืชหลายชนิดจาก Amazon ซึ่งใช้เป็นยาพื้นบ้าน *Brownea rosademonte*, *Piper glandulosissimum*, *Piper krukoffii*, *Piper putumayoense*, *Solanum grandiflorum*, and *Vismia baccifera* ยับยั้ง lipid peroxidation ใน microsomes จากตับหนูแรท (Lizcano, et al., 2012) และ สารสกัดจาก *Metasequoia*

glyptostroboides ยับยั้ง Fe (III)-induced lipid peroxidation ได้ (Bajpai, et al., 2014) จากหลักฐานที่กล่าวมา แสดงให้เห็นว่า สารสกัดแมงลักคามีสารประกอบสำคัญคือสารประกอบ phenolics มีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidant และมีฤทธิ์ยับยั้ง oxidation ต่อไขมันสารสำคัญในเยื่อเซลล์ (cell membrane) มีชีวิต ซึ่งนำสารสกัดแมงลักคาโดยเฉพาะจากไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันการเกิดโรคหรือรักษาอาการผิดปกติต่างๆ ในมนุษย์ได้ และถนอมอาหารที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ

3.4.2 Cytotoxicity ของสารสกัดแมงลักคา

3.4.2.1 Cytotoxicity ต่อ T lymphocyte leukemia cell line - Jurkat cells

Jurkat cells เป็นเซลล์ T lymphocyte ซึ่งเป็นอมตะ ผลิต interleukin 2 มีประโยชน์สำหรับศึกษา human T lymphocyte leukemia cells พบว่าสารสกัดใบแมงลักคาสามารถยับยั้งการเจริญของ Jurkat cells ได้มากกว่า (ตายมากกว่า) สารสกัดเมล็ดแมงลักคา และโดยเฉพาะสารสกัดด้วยเอทธานอลแสดงความเป็นพิษดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของทั้ง 4 สารสกัดขึ้นกับความเข้มข้นของสาร (dose dependent) ประสิทธิภาพความเป็นพิษของสารสกัดต่อ Jurkat cells ดังนี้ MLE/e > MLE/w > MSE/e > MSE/w ค่า IC_{50} ที่ 24 ชม. เรียงตามลำดับดังนี้ 553.52 ± 14.0; 912.06 ± 16.86; 2,385.95 ± 81.28; และ 5,813.45 ± 111.25 µg/mL ในขณะที่ IC_{50} ของ Catechin เท่ากับ 339.74 ± 14.55 µg/mL (Table 3.2)

ประสิทธิภาพความเป็นพิษต่อ Jurkat cells แสดงเป็นค่า inhibition concentration 50 (IC_{50}) ที่ 24 ชม.ของสารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับสารควบคุมมาตรฐาน Catechin ดังนี้

Extract	**IC_{50} (µg/mL), 24 h.**	**Cytotoxicity c/f Catechin (fold)**
MLE/e	553.52 ± 14.07	< 1.63
MLE/w	912.06 ± 16.86	< 2.68
MSE/e	2,385.95 ± 81.28	< 7.02
MSE/w	5,813.45 ± 111.25	< 17.11
Catechin	339.74 ± 14.55	

Table 3.2 Cytotoxic effects of mintweed leaf and seed extracts on Jurkat cells (human T lymphocyte leukemia cells) determined by Alarma blue (AB) assay at 24 h. Percent viability of treated cells and IC_{50} (µg/mL) at 24 h were present. Data were mean ± S.D., (n= 3).

Extract	Conc.	Jurkat	
	(µg/mL)	% viability	IC_{50} (µg/mL), 24 h.
MLE/e	200	92.45 ± 2.00	
	400	79.59 ± 3.25	553.52 ± 14.07[c]
	600	49.15 ± 3.00	
	800	8.95 ± 1.30	
MLE/w	600	66.08 ± 2.10	
	800	53.99 ± 7.40	912.06 ± 16.86[d]
	1000	49.35 ± 7.70	
	1200	32.54 ± 2.43	
MSE/e	1500	66.17 ± 0.90	
	2000	55.19 ± 1.80	2,385.95 ± 81.28[e]
	2500	47.55 ± 0.72	
	3000	39.99 ± 3.70	
MSE/w	2000	72.01 ± 0.31	
	4000	62.93 ± 0.60	5,813.45 ± 111.25[f]
	6000	48.42 ± 0.70	
	8000	35.52 ± 0.80	
Catechin	200	65.48 ± 2.30	
	300	54.63 ± 1.50	339.74 ± 14.55[b]
	400	42.18 ± 3.25	
	500	33.46 ± 1.23	

Statistical analysis was performed by ANOVA. Different letters within the same column were significantly different ($p < 0.05$). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract. Catechin was standard control.

ดังนั้นสารสกัดใบแมงลักคาแสดงศักยภาพความเป็นพิษต่อ Jurkat cells ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์มะเร็งได้สูงมากกว่าสารสกัดเมล็ด และพิษใกล้เคียงกับสาร antioxidant standard Catechin ทั้งนี้อาจ

เนื่องจากในสารสกัดใบแมงลักคามีสารประกอบ total phenolic compounds และ total flavonoids มากกว่าในสารสกัดเมล็ดแมงลักคา (ประมาณ 3 เท่า) (กรกช อินทราพิเชฐ, 2558) และสอดคล้องกับ antioxidant activity โดย lipid peroxidation inhibition ของสารสกัดใบแมงลักคาที่สูงกว่าสารสกัดเมล็ดแมงลักคาประมาณ 7 เท่า (Table 3.1)

3.4.2.2 **Cytotoxicity to peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)**

สารสกัดแมงลักคาทั้งจากใบและเมล็ดแสดงความเป็นพิษยับยั้งการเจริญของ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติในทำนองคล้ายกับฤทธิ์ต่อ Jurkat cells แต่ระดับความรุนแรงของ cytotoxicity ต่อ PBMCs น้อยกว่าต่อ Jurkat cells แม้ว่าสารสกัดใบด้วยน้ำ MLE/w แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMCs มากกว่าสารสกัดเมล็ดด้วยน้ำ MSE/w และขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด (dose dependent) และพิษน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับพิษของสารมาตรฐาน Catechin (Table 3.3) สังเกตุได้ว่าสารสกัดแมงลักคาด้วยเอทธานอลทั้งใบและเมล็ดไม่ยับยั้งแต่มีแนวโน้มกระตุ้นการเจริญของ PBMCs

ประสิทธิภาพความเป็นพิษยับยั้งการเจริญของ PBMCs ดังนี้ MLE/w > MLE/e > MSE/e > MSE/w และค่า inhibition concentration 50 (IC_{50}) ที่ 24 ชม. ของสารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารควบคุม Catechin สรุปได้ดังนี้ (Table 3.3) และ cytotoxicity ของ MLE/e และ MLE/w ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

Extract	**IC_{50} (µg/mL), 24 h**	**Cytotoxicity c/f Catechin (fold)**
MLE/e	1,356.17 ± 136.78	< 2.10
MLE/w	1,140.52 ± 06.05	< 1.76
MSE/e	2,920.68 ± 155.38	< 4.51
MSE/w	5,813.45 ± 111.25	< 17.57
Catechin	647.00 ± 12.76	

ระดับความรุนแรงความเป็นพิษของสารสกัดใบแมงลักคาต่อเซลล์ PBMCs น้อยกว่าพิษต่อ Jurkat cells ประมาณ 2 เท่า หรือ PBMCs ที่ได้รับสารสกัดแมงลักคาตายน้อยกว่า Jurkat cells และตายน้อยกว่าจากพิษของ Catechin ประมาณ 1.7-2.0 เท่า ทั้งนี้ MLE/e แสดงพิษต่อเซลล์ต่ำกว่า MLE/w เล็กน้อย (Table 3.2 และ 3.3)

ประสิทธิภาพ cytotoxicity (IC_{50}, 24 ชม)ของ สารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคาด้วยตัวทำละลายเอทธานอลและน้ำต่อ Jurkat cells และ PBMCs เปรียบเทียบได้ดังใน Figure 3.6

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Table 3.3 Cytotoxic effects of mintweed (*H. sauveolens*) leaf and seed extracts on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) determined by Alarma blue assay at 24 h. Percent viability of treated cells and IC_{50} (µg/mL) at 24 h were present. Data were mean ± S.D., (n= 3).

Extract	Conc.	PBMCs	
	(µg/mL)	% viability	IC_{50} (µg/mL), 24 h.
MLE/e	200	140.50 ± 9.50	
	400	125.36 ± 0.70	1,356.17 ± 136.78[a]
	600	115.92 ± 2.50	
	800	89.93 ± 0.43	
MLE/w	600	93.09 ± 2.00	
	800	81.90 ± 3.30	1,140.52 ± 6.05[a]
	1000	61.18 ± 0.30	
	1200	44.24 ± 1.34	
MSE/e	1500	142.34 ± 4.80	
	2000	133.50 ± 3.00	2,920.68 ± 155.38[b]
	2500	128.47 ± 3.40	
	3000	119.69 ± 5.00	
MSE/w	2000	107.23 ± 2.00	
	4000	86.34 ± 0.50	11,366.26 ± 266.28[c]
	6000	79.72 ± 2.00	
	8000	71.31 ± 0.80	
Catechin	200	106.00 ± 2.50	
	300	99.23 ± 6.50	647.00 ± 12.76[a]
	400	82.35 ± 0.60	
	500	67.91 ± 0.80	

Statistical analysis was performed by ANOVA. Different letters within the same column were significantly different ($p < 0.05$). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract. Catechin was standard control.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

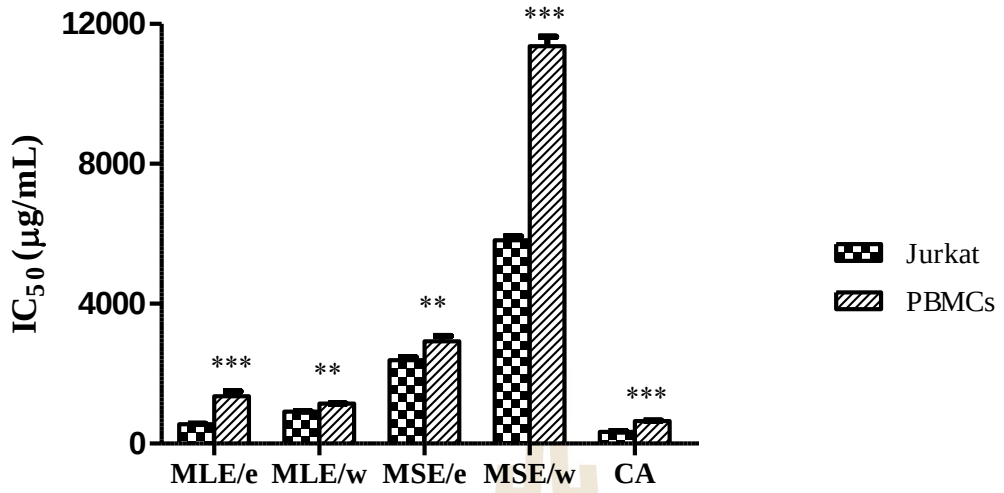

Figure 3.6 Comparison between the cytotoxicity (IC_{50}, 24 h) of mintweed extracts on Jurkat cells (human T lymphocytes leukemia cells) and PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) at 24 h (n = 3). MLE/e, mintweed leaf ethanolic extract; MLE/w, mintweed leaf water extract; MSE/e, mintweed seed ethanolic extract; MSE/w, mintweed seed water extract; CA, catechin. (** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

Extract	Cytotoxicity to Cells	Fold
MLE/e	Jurkat cells > PBMCs	2.45
MLE/w	Jurkat cells > PBMCs	1.25
MSE/e	Jurkat cells > PBMCs	1.22
MSE/w	Jurkat cells > PBMCs	1.90
Catechin (standard)	Jurkat cells > PBMCs	1.90

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดแมงลักคามีฤทธิ์ cell death/cytotoxicity ต่อเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้มากกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของคน โดยเฉพาะสารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทธานอลทำให้เซลล์สายพันธุ์ตายได้ใกล้เคียงกับฤทธิ์ของสาร antioxidant มาตรฐาน Catachin ส่วนสารสกัดเมล็ดแมงลักคามีฤทธิ์ cytotoxicity ต่อเซลล์มะเร็งได้น้อยเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน และ ต่อเซลล์ปกติได้น้อยมากแม้ต้องใช้สารสกัดปริมาณมาก ฤทธิ์ของสารสกัดทั้งหมดเป็นแบบ dose dependent

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ยังไม่พบหลักฐานอื่นที่แสดงว่าสารสกัดแมงลักคา (*Hyptis suaveolens*) มีคุณสมบัติเป็นพิษต่อเซลล์สายพันธุ์มะเร็งและเซลล์ปกติ แต่มีหลักฐานแสดงว่า triterpene ในสารสกัดรากของ *Salvia buchananii* พืชในวงศ์ Lamiaceae วงศ์เดียวกับแมงลักคามีศักยภาพความเป็นพิษต่อเซลล์สายพันธุ์มะเร็ง Jurkat cells ได้สูงกว่า Hela cells และ MCF7 cells (Beladjila, et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีผลการวิจัยของสารสกัดพืชอีกหลายชนิดแสดงความเป็นพิษต่อ Jurkat cells อาทิเช่น สารสกัดของ *Parinari cratellifolia* (Mukanganyama, Dumbura, and Mampuru, 2012) *Solanum nigrum* (Gabrani et al., 2012) *Convolvulus arvensis* (Saleem, et al., 2014) *Triumfetta welwitschii* ซึ่งใช้ในการรักษาไข้และท้องร่วงใน Zimbabwe (Moyo and Mukanganyama, 2015) *Lantana ukambensis* (Sawadogo, 2015**)** ดังนั้นการวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาครั้งแรกที่แสดงให้เห็นถึงศักยภาพความเป็นพิษของสารสกัดแมงลักคาต่อเซลล์มะเร็ง จึงเสนอให้มีการศึกษาวิจัยสารสกัดแมงลักคาในประเด็นอื่นๆ ต่อไปอีกเพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมจนสามารถพัฒนาเป็นสารป้องกันการเกิดมะเร็งและพัฒนาเป็นยารักษามะเร็ง

3.5 สรุปผลการทดลอง

สารสกัดแมงลักคามีคุณสมบัติ lipid peroxidation inhibition ต่อ Fe (II)-induced lipid peroxidation ของ phosphatidylcholin liposome (polyunsaturated fatty acids) สารสกัดใบด้วยเอทธานอล MLE/e แสดงประสิทธิภาพ lipid peroxidation inhibition ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน Catechin ถึง 3 เท่า ในขณะที่สารสกัดใบด้วยน้ำ MLE/w ยับยั้งได้ใกล้เคียงกับ Catechin ส่วนสารสกัดเมล็ดมีประสิทธิภาพ lipid peroxidation inhibition ได้ค่อนข้างต่ำ จึงน่าจะนำสารสกัดใบแมงลักคาทั้ง MLE/e และ MLE/w ไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมหรือยาใช้ประโยชน์ในการรักษาอาการของหลายโรคที่เกิดจากผลกระทบของ reactive oxygen species (ROS) จากผลผลิตของ lipid oxidation ของไขมันในเซลล์หรือเนื้อเยื่อของคน หรือพัฒนาเป็นสารถนอมอาหารจาก lipid oxidation ป้องกันการเหม็นหืนและยืดการเก็บอาหารให้นานมากขึ้น สารสกัดใบแมงลักคามีฤทธิ์ cytotoxicity ยับยั้งการเจริญของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของคน Jurkat cells แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของคน peripheral blood mononuclear cells

แมงลักคาจึงเป็นวัชพืชในประเทศไทย (ประเทศอินเดียและอัฟริกาใช้เป็นพืชสมุนไพร) ที่น่าสนใจศึกษาเพิ่มเติมในอีกหลายประเด็นเพื่อให้ได้หลักฐานทางวิทยาศาสตร์มาสนับสนุนให้มีการพัฒนาใช้ให้เป็นประโยชน์ทางเภสัช การแพทย์และอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Aja, P.M., Odeh, C.O., Uraku, A.J., and C. E. Offor, C.E. (2015). Evaluation of antioxidant activities of ethanol leaf extracts of *Cymbopogon citratus* and *Hyptis spicigera* in mice exposed to *Plasmodium berghei*. Int J Curr Microbiol App Sci. 4(2):382-393.

Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., and Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. Hu Reprod. 22(5):1304-1309. doi:10.1093/humrep/dem011.

Ayala, A., Muñoz, M.F., and Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Vol. 2014, ID 360438, 31 pp. http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438

Badmus, J.A., Adedosu, T.O., Fatoki, J.O., Adegbite, V.A., Adaramoye, O.A., et al. (2011). Lipid peroxidation inhibition and antiradical activities of some leaf fractions of Mangifer indica. Acta Poloniae Pharma-Drug Res. 68(1):23-29.

Bajpai, V.K., Sharma, A., Kang, S.C., and Baek, K-H. (2014). Antioxidant, lipid peroxidation inhibition and free radical scavenging efficacy of a diterpenoid compound sugiol isolated from *Metasequoia glyptostroboides*. Asian Pacific J Trop Med. pp. 9-15.

Balasundram, N., Sundram, K., and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 99: 191–203.

Beladjila, K.A., Cotugno, R., Berrehal, D., Kabouche, Z., De Tommasi, et al. (2017). Cytotoxic triterpenes from *Salvia buchananii* roots. Nat Prod Res. Pp 6. Available online at https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1365072

Berntsen, P., Park, C.Y., Rothen-Rutishauser, B., Tsuda, A., Sager, T.M., et al., (2010). Biomechanical effects of environmental and engineered particles on human airway smooth muscle cells. J Royal Society Interface. 7:S331-S340.

Fuchs, P., Perez-Pinzon, M.A., and Dave, K.R. (2014). Cerebral Ischemia in Diabetics and oxidative stress (chap. 2): *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants.* Elsevier, pp 15-23. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405885-9.00002-4

Gabrani, R., Jain, R., Sharma, A., Sarethy, I.P., Dang, S., and Gupta, S. (2012). Antiproliferative effect of *Solanum nigrum* on human leukemic cell lines. Ind J Pharm Sci. 74(5):451-453. DOI: 10.4103/0250-474X.108421

Gerard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Regnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.C. and Chaudiere, J. (1997). Reactions of N-Methyl-2-phenlindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals: analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. Chem Res Toxicol. 11:1176-1183.

Ghaffari, H., Ghassam, B.J., and Prakash, H.S. (2012). Hepatoprotective and cytoprotective properties of *Hyptis suaveolens* against oxidative stress-induced damage by CCl_4 and H_2O_2. Asain Pacific J Trop Med. pp. 868-874.

Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R. and Bullock, P. (2004). Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. Toxicol In Vitro. 18(5):703-710.

Hofman, F.M., Kanesberg, B., Smith, D., Garrison, D. and Sevier, E.D. (1982). Stability of T and B-cell numbers in human peripheral blood. Am J Cli Pathol. 77(6):710-713.

Kada, S., Bouriche, H., Senator, A., Demirtas, I., Tevfik Ozen, T., et al. (2016). Protective activity of *Hertia cheirifolia* extracts against DNA damage, lipid peroxidation and protein oxidation. Pharma Biol. 55(1):330-337; http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1261907

Lizcano, L.J., Viloria-Bernal, M., Vicente, F., Berrueta, L.A., Gallo, B., et al. (2012). Lipid oxidation inhibitory effects and phenolic composition of aqueous extracts from medicinal plants of Colombian Amazonia. Int. J. Mol. Sci.13:5454-5467; doi:10.3390/ijms13055454.

Moyo, B. and Mukanganyama, S. (2015). Antiproliferative activity of *T. welwitschii* extract on Jurkat T cells *in vitro*. BioMed Res Inter. Volume 2015, Article ID 817624, 10 pages. Available online at http://dx.doi.org/10.1155/2015/817624.

Mylonas C. and Kouretas D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. In Vivo. 13(3):295-309.

Mukanganyama, S., Dumburu, S., and Mampuru, L. (2012). Anti-proliferative effects of plant extracts from Zimbabwean medicinal plants against human leukaemia cell lines. Afr J Plant Sci Biotechnol. 6(1):14-20.

Oakes, K.D. and Van Der Kraak, G.J. (2003). Utility of the TBARS assay in detection oxidative stress in white sucker (*Catostomu commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. Aqua Toxicol. 63:447-463.

Oboh, G. (2008). Polyphenol extracts from *Hyptis suaveolens* leaves inhibit Fe^{2+}-induced lipid peroxidation in brain. Int J Biomed Pharma Sci. 2(1):41-46.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. and Pognan, F. (2000). Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell toxicity. Eur J Biochem. 267:5421-5426.

Petursdottir, A.L., Farr, S.A., Morley, J.E., Banks, W.A., and Skuladottir, G.V. (2007). Lipid peroxidation in brain during aging in the senescence-accelerated mouse (SAM). Neurobiol. 28(8):1170-1178, DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.033.

Pradeep, V., Nivethetha, M., Radhika, J., Jothi, G., and Brindha, P. (2011). Role of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit in maintaining the antioxidant status in carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in albino rats. J Cell Tissue Res. 11(1):2563-2566.

Prasad, P.S.H. and Ramakrishnan, N. (2011). *In votro* lipid peroxidation assay of *Rumex vesicarius* L. int J Pharma Pharma Sci. 4, suppl 1:368-370.

Rinnerthaler, M., Bischof,J., Streubel, M.K., Trost, A., and Richter, K. (2015). Oxidative Stress in Aging Human Skin. Biomolecules. *5*:545-589, doi:10.3390/biom5020545

Saleem, M., Qadir, M.I., Ahmad, B., Saleem, U., Naseer, F., et al. (2014). Cytotoxic effect of ethanol extract of *Convolvulus arvensis* L (Convolvulaceae) on lymphoblastic leukemia Jurkat cells. Trop J Pharma Res. 13(5):705-709.

Sawadogo, W.R., Cerella, C., Al-Mourabit, A., Moriou, C., Teiten, M.-H., et al. (2015). Cytotoxic, antiproliferative and pro-apoptotic effects of 5-Hydroxyl-6,7,31,41,51-Pentamethoxyflavone isolated from *Lantana ukambensis*. Nutrients. 7:10388-10297.

Saxena, R. (2014). Arthritis as a Disease of Aging and Changes in Antioxidant Status (chap 5): In Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. Academic Press, pp 49-59. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405933-7.00005-6

Soderberg, T. (2015). Section 17.2: Radical chain reactions. In Organic Chemistry With a Biological Emphasis: Radical reactions (Chap 17). Retrieved August 12, 2015, from http://chemwiki.ucdavis.edu

Yoshida, Y., Ito, N., Shimakawa, S., and Niki, E. (2003). Susceptibility of plasma lipids to peroxidation. Biochem Biophys Res Comm. 305:747–753.

กรกช อินทราพิเชฐ (2558) บทที่ 3 พฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และ ความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิต ใน รายงานวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นและต้านการเจริญเซลล์มะเร็งของแมงลักคา Antioxidant activities and anti-cancer cell proliferation of mintweed. SUT 1-104-48-24-01.

บทที่ 4

การชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

Apoptotic induction in human T lymphocyte leukemia cells (Jurkat cells)

3.1 คำนำ

จากผลการวิเคราะห์ในบทที่ 3 ยืนยันได้ว่าสารสกัดใบแมงลักคามีศักยภาพของสาร antioxidants ที่มีคุณสมบัติ lipid peroxidation inhibition โดยสามารถยับยั้ง Fe (II)-induced lipid peroxidation ของ polyunsaturated fatty acid ได้ดีกว่าสารสกัดเมล็ดแมงลักคา และ antioxidant standard และสารสกัดใบแมงลักคามีฤทธิ์เป็นสาร cytotoxic agents สามารถทำให้เซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat cells ไม่เจริญ/ตาย แต่ไม่มีผล cytotoxicity ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ PBMCs ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปัจจัยชักนำการตายแบบอะพ็อพโตซิส (apoptotic induction) จึงวิเคราะห์เฉพาะฤทธิ์ของสารสกัดใบแมงลักคาต่อ apoptotic induction ใน Jarkat cells ซึ่งได้รับการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ จึงขอเสนอบทความนี้เป็นส่วนหนึ่งในรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย

3.2 วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์หากลไกที่เป็นสาเหตุชักนำการตายของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน human T lymphocyte leukemia - Jurkat cells ตายแบบ apoptosis หลังได้รับสารสกัดใบแมงลักคาหลายความเข้มข้น โดยวิเคราะห์

1) Cell morphology ดู chromatin condensation และ nuclear fragmentation
2) DNA fragmentation
3) Apoptotic proteins ทำสำคัญ – Caspace-9, Bcl-2 และ Bax

อุปกรณ์และวิธีการ, ผลการทดลองและ วิจารณ์ผล, สรุปผลการทดลอง, และ เอกสารอ้างอิง
ในบทความเรื่อง

“**Cytotoxicity and apoptotic induction on mintweed (Hyptis suaveolens L. Poit) leaf extracts on human T-leukemia cell line, Jurkat cells**”

World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 3 (3): 304-317. ISSN 2278 – 4357, 2014

WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES

Volume 3, Issue 3, 304-317. Research Article ISSN 2278 – 4357

CYTOTOXICITY AND APOPTOTIC INDUCTION OF MINTWEED (HYPTIS SUAVEOLENS L. POIT) LEAF EXTRACTS ON HUMAN T-LEUKEMIA CELL LINE, JURKAT CELLS

Sumalee Musika[1] and Korakod Indrapichate[1]*

[1]Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand.

Article Received on
07 February 2014,
Revised on 05 March 2014,
Accepted on 25 March 2014

***Correspondence for Author**
Dr. Korakod Indrapichate
Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

ABSTRACT

Mintweed, *Hyptis suaveolens* L. Poit, leaf ethanolic and water extracts (MLE/e and MLE/w) were investigated for cytotoxic effect and apoptotic cell death induction in human T-leukemia cell line, Jurkat cells. The cytotoxicity was evaluated by Alamar blue assay and the apoptosis was detected for nuclear blebbing by Hoechst 33258 staining, DNA fragmentation by SDS-PAGE and related apoptotic protein expression by Western blot analysis. MLE/e and MLE/w significantly reduced the viability of Jurkat cells in concentration dependent manner with IC_{50} values of 553.52 ± 14.07 and 912.06 ± 16.86 µg/ml, respectively. The cell nuclei and nucleosome breakages were detectable as nuclear blebbing and ladders of DNA fragments. Concurrently, Western analysis demonstrated that MLE/e and MLE/w up-regulated Caspase-9, Bcl-2 and Bax expressions. In addition, MLE/e was likely to enhance the growth of normal peripheral blood mononuclear cells, PBMCs, at lower concentrations with IC_{50} value of 1,356.17 ± 136.78 µg/ml. This study is the first report on the cytotoxic and the apoptotic properties of the mintweed extracts on T lymphocyte leukemia. This can be further studied and clinically developed for immunomodulative agents and cancer preventive and therapeutic drugs.

Key words: Cell proliferation, Nuclear blebbing, DNA fragmentation, Apoptotic proteins.

INTRODUCTION

Cancer is a disease of worldwide importance as it is the leading cause of death. It is a complex disease and closely related to the abnormality of the intracellular transduction of signaling system [1]. Successful cancer treatments by anticancer drugs have been evident, but

effective therapeutic agents act at molecular level for many cancer types are awaiting for identification and development [2]. Naturally occurring chemopreventive agents can induce apoptosis of cancer cells without side effects. Thus, actively novel phytochemicals are of interest to search and apply for cancer prevention and cure [3]. Mintweed, *Hyptis suaveolens* L. Poit, belongs to the family Lamiaceae and it is aromatic. It is native to tropical America and now it is considered a worldwide weed [4]. In Thailand, this plant is locally named "maeng lak kha". It is a fast-growing perennial herb which is found in dense clumps along roadsides, in over-grazed pastures and around stockyards. Almost all parts of mintweed are used in traditional medicine for treatment of various symptoms such as gastrointestinal disorders, respiratory tract infections, colds, pain, fever, cramps, and skin diseases [5]. Its leaves have been utilized as a stimulant, carminative, sudorific, galactogogue, and as a cure for parasitic cutaneous disease [6]. It was also reported to possess anti-HIV [7], antiparasitic activity [8]. The plant also possessed antimicrobial [9], antifungal [10], antiplasmodial [4, 11], antinociceptive [12], antidiarrhoeal [13], anti-hyperglycemic [14], anti-inflammatory [15], and anticancer activities [16]. Mintweed extracts comprised of alkaloids, glycoside, saponin, tannins and flavonoids as major active constituents [13], sabinene, limonene, biclyclogermacrene, β-phellandrene and 1,8-cineole [17], 1,8-cineole, (E)-caryophyllene, spathulenol [18]. The extracts also exhibited insecticidal activity against rice weevils, *Stitophilus oryzae* [19] and mosquitoes, *Aedes aegypti* [20].

However, there are no mechanisms of mintweed extracts acting on cytotoxicity and apoptosis of cancer cell lines available. Thus, the present study aimed to investigate the actions of mintweed leaf ethanolic and water extracts on viability and apoptotic induction in Jurkat human cancer cell line.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Alamar blue, Hoechst 33258 and SeeBlue® Plus2 prestained standard were purchased from Invitrogen (California, USA). Histopaque-1077, ribonuclease A, bovine pancreas, acrylamide, and bis-acylamide were purchased from Sigma-Aldrich Company Ltd. (St. Louis MO, USA). Dimethylsulfoxide (DMSO) and formaldehyde were obtained from Amresco (Ohio, USA). Phenol: chloroform: isoamyl (25:24:1) solution and Super Signal West Pico chemilluminesence substrate were from Thermoscientific (Lillinos, USA). Proteinase K, agarose, and Lambda DNA/Hind III marker were purchased from Promega (Wisconsin,

USA). Ethidium bromide was purchased from Bio-Rad (California, USA). Bovine serum albumin (BSA), fraction V and TEMED were from BDH Chemicals (Yorkshire, England). Protease inhibitor cocktail was from Roche (Mannheim, Germany). All antibodies were obtained from Santa-Cruz Biotechnology (California, USA). Nitrocellulose membranes were obtained from Amersham Biosciences (Vienna, Austria). RPMI 1640, penicillin-streptomycin, Hepes and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco (New York, USA).

Plant extraction

Mintweed, *H. suaveolens*, leaves were collected on Suranaree University of Technology campus, Nakhon Ratchasima, Thailand, in October 2008. The plant was kindly identified by Professor Dr. Pranom Chantaranothai, Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand and the voucher specimens were in the Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand. The leaves were washed, sun dried, ground into fine powder. Fifty grams of the leaf powder were extracted in 500 mL of 70% ethanol or water in Soxhlet extraction apparatus for 24 h. The extract was filtered, evaporated (Buchi Instruments, Switzerland) and lyophilized into powder (Freeze-zone 12 plus, Labconco Corporation, Missouri, USA) and then stored at -20°C until used. The powder extract (MLE/e and MLE/w) was dissolved in 0.2% DMSO in RPMI 1640.

Cell culture

Human T lymphocyte leukemia cell line, Jurkat E6.1, was purchased from Cell Line Services (Eppelheim, Germany). Whole blood from healthy donors was a kind gift from the Blood Bank of the Thai Red Cross Society, Nakhon Ratchasima. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by density-gradient centrifugation in Histopaque-1077 at 400g for 30 min at room temperature. The PBMCs in the opaque interface were transferred into a 15-ml conical centrifuge tube, washed in PBS, pH 7.4, and collected by centrifugation at 250g for 10 min. the Jurkat cells and the PBMCs were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin under a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 at 37°C.

Cell growth and viability

Cell viability was determined by Alamar blue (AB) assay as described by Berntsen et al. [21] with slight modification. Jurkat cells of $2.5x10^4$ cells/well and PBMCs of $1x10^5$ cells/well were cultured in a 96-well plate, black clear bottom (Costar, Corning Incorporated, NY,

USA) and treated with varying concentrations of mintweed leaf ethanolic and water extracts (MLE/e and MLE/w) at 100 µl/well. After incubation for 24 h, 10 µl of AB was added and incubated for 4 h. The fluorescence of the assayed solution was measured at excitation wavelength at 540 nm and emission wavelength at 590 nm in spectrofluorometer (Spectra MAX Gemini EM, Molecular Devices, California, USA). Vehicle control of 0.2% (v/v) DMSO in culture medium was used as a negative control. Blank was set using wells without cells and subtracted as background from each sample. The experiments were performed in three replicates and the percentage of cell viability was calculated as following:

$$\%\ Cell\ viability\ = \frac{Fluoresence\ of\ sample\ - Fluoresence\ of\ blank}{Fluoresence\ of\ control - Fluoresence\ of\ blank} \times\ 100$$

The percentage of cell viability was plotted against various concentrations of the extracts. The concentration of the extracts effectively inhibits 50% of cell viability (IC_{50}) was determined.

Nuclear morphological observation

Cell nuclear morphological change was observed using the method of Chen et al. [22]. Jurkat cells of 2.5×10^4 cells/well were cultured in a 96-wells plate and incubated with different concentrations of MLE/e and MLE/w for 24 h. The cells were washed twice with PBS, pH 7.4, fixed with 4% formaldehyde for 20 min at room temperature and then washed with PBS. The cells were stained with 10 µg/ml of Hoechst 33258 in PBS containing 0.1% triton x-100 and left in the dark at 37°C for 30 min. The cells were washed with PBS, observed and then photographed immediately under the inverted fluorescence microscope (Olympus IX51 with Digital Camera DP50 and View Finderlite Program, Olympus Corporation, Japan).

DNA fragmentation

DNA fragmentation was observed as described by Itoh et al. [23] with slight modification. Jurkat cells, $1x10^6$ cells/well, were cultured in a 6-well plate and treated with the extracts. The cells were harvested by centrifugation at 700g and lysed with lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1M NaCl, 1 mM EDTA, and 1% SDS. 100 µg/ml Proteinase K was added and incubated at 56°C for 4 h. DNA was extracted twice with equal volume of phenol: chloroform: isoamyl (25:24:1) solution. The upper layer was collected, to which 3M sodium acetate was added at a 1:10 (v/v) ratio and then precipitated with 2.5 volume of absolute ethanol and kept in -20°C, overnight. DNA pellet was collected by centrifugation at 14,000g,

4°C for 30 min, washed twice with cold 70% ethanol and then dried. DNA was resuspended in Tris-EDTA (TE) buffer containing 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA. DNA of 5 µg was mixed with 100 µg/ml RNase A and incubated at 37°C for 30 min. Loading dye was added to samples at the ratio of 1:5 (v/v). DNA fragments were separated on a 1.5% agarose gel electrophoresis at constant voltage of 70 V for 90 min. The DNA gel was stained with ethidium bromide and the DNA pattern was visualized under UV light, and photographed.

Western blot analysis

Jurkat cells, $4x10^6$ cells, were treated with the extracts, incubated for 12 and 24 h. The cells were harvested, washed twice with PBS and lysed with lysis buffer containing 50 mM Tris, pH 8, 150 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5 mM PMSF, and protease inhibitor cocktail for 30 min on ice. The cell lysate was collected by centrifugation at 16,000g, 4°C for 30 min. The lysate protein was quantified by Bradford assay [24]. The lysate protein (40 µg) was separated on 12% SDS-PAGE gels at constant voltage of 120 V for 150 min and then electrically transferred onto a nitrocellulose membrane at 400 mA, 4°C for 4 h. The blot was blocked with BSA solution (BSA of 3% for Caspase-9 and 5% for Bcl-2, Bax and actin) containing 0.1% Tween-20 in Tris-buffered saline (TBST) for 1 h at room temperature. The blot was washed with TBST and incubated with the primary antibodies against anti-mouse Bcl-2, Bax (1:1000) or Caspase-9 (1:500) in TBST containing BSA for 3 h at room temperature. Then, the blot was washed thrice in TBST and incubated with the secondary goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:10000) in TBST-BSA for 1 h at room temperature. The blot was washed thrice with TBST and twice with TBS, incubated in chemilluminescent detection solution for 5 min and then autoradiographed on X-ray films.

RESULTS

Cytotoxicity of mintweed leaf extracts on Jurkat cells and PBMCs

The cytotoxic effects of mintweed leaf ethanolic and water extracts (MLE/e & MLE/w) on Jurkat cells and PBMCs proliferation were determined by Alamar blue assay for 24 h. MLE/e treatment at 200 µg/ml and higher concentrations reduced the viability of Jurkat cells in a dose dependent manner. On the contrary, 200 µg/ml MLE/e activated the proliferation of PBMCs as compared to the growth of Jurkat cells and the control. The number of PBMCs gradually declined as increasing the amount of MLE/e (Figure 1, A). At highest concentration of MLE/e, 800 µg/ml, the reduction of Jurkat cells was approximately 11 fold of the control,

but the proliferation of PBMCs was merely equal to the control. The IC_{50} values of MLE/e at 24 h on Jurkat cells and PBMCs were 553.52 ± 14.07 and 1,356.17 ± 136.78 µg/ml, respectively. The proliferative reduction of MLE/w on both cell types was required higher concentration than MLE/e and exhibited as concentration dependence (Figure 1, B). However, the cytotoxic reduction on Jurkat cells was slightly higher than that on PBMCs. The IC_{50} values of MLE/w, 24 h, on Jurkat cells and PBMCs were 912.06 ± 16.86 and 1,140.52 ± 6.05 µg/ml respectively. Thus, both MLE/e and MLE/w inhibited the viability of Jurkat cells, the human T-leukemia cells. MLE/e was likely to stimulate the growth of PBMCs as opposed to MLE/w which significantly inhibited the growth of PBMCs (Figure 2, A and B).

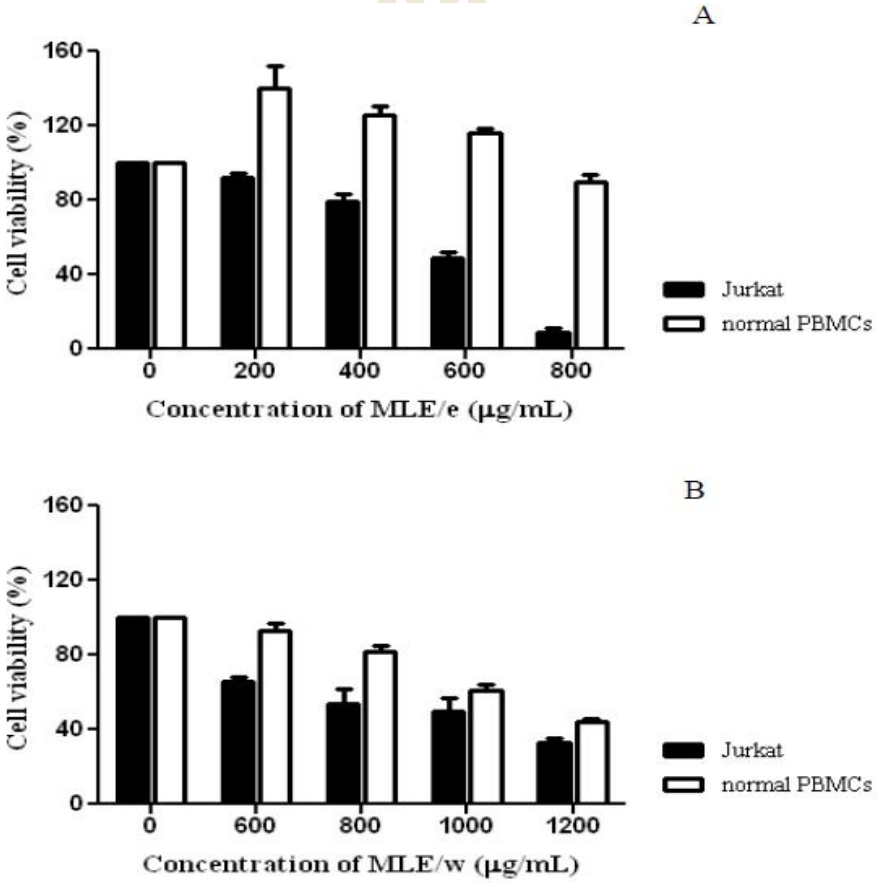

Figure 1. Cytotoxic effect of mintweed leaf extracts on human leukemia T cells (Jurkat cells) and normal peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) evaluated by Alamar blue assay for 24 h. (A), the effects of MLE/e on Jurkat cells and PBMCs. (B), the effects of MLE/w on Jurkat cells and PBMCs. Data were means of % cell viability ± SD, n = 3.

Apoptotic effect of mintweed leaf extracts on Jurkat cells

To obtain cell morphological changes as a result of apoptotic induction by mintweed leaf extracts, Jurkat cells treated with MLE/e and MLE/w were stained with Hoechst 33258.

Chromatin condensation and nuclear fragmentation caused nuclear blebbing were observed (arrows in Figure 2, B-D and F-H). MLE/e effectively induced nuclear blebbing in Jurkat cells at approximately twice lower concentration than MLE/w. The lowest effective concentration of MLE/e was 400 µg/ml (Figure 2, B) and of MLE/w was 800 µg/ml (Figure 2, F).

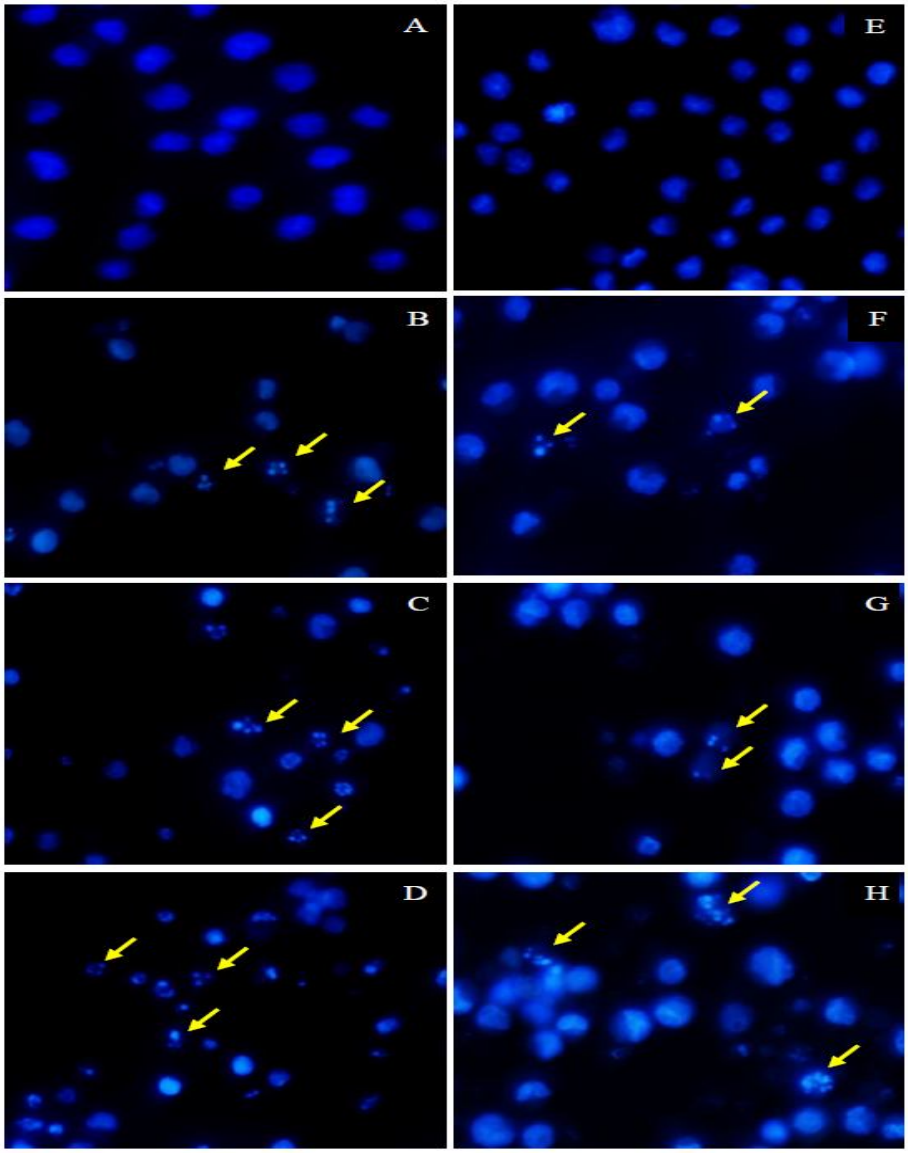

Figure 2. Apoptotic effect of mintweed leaf extracts on Jurkat cells at 24 h. The apoptotic cells were arrowed. A and E, control; B, MLE/e 400 µg/ml; C, MLE/e 600 µg/ml; D, MLE/e 800 µg/ml; F, MLE/w 800 µg/ml; G, MLE/w 1,000 µg/ml; H, MLE/w 1,200 µg/ml. The results were from three independent experiments (magnification 400x).

DNA fragmentation in Jurkat cells

DNA fragmentation of cells indicates the apoptotic cell death. Mintweed leaf extracts were able to induce DNA fragmentation in Jurkat cells in dose- and time-dependent manner

(Figure 3). MLE/e was required less amount but more intense in DNA fragmentation than MLE/w (Figure 3, A and C). MLE/e at 400 µg/ml produced few DNA fragments or nucleosomes at 24 h. The more extract the more DNA band intensity was appeared and DNA smearing was observed at 800 µg/ml MLE/e treatment (Figure 3, A).

MLE/w, from 800 µg/ml to 1,200 µg/ml, showed similar DNA band profiles as produced by MLE/e, but much less intensity (Figure 3, C). In addition, the nucleosomes were early detected at 6 h of 600 µg/ml MLE/e treatment as compared to 1,000 µg/ml MLE/w treatments (Figure 3, B and D).

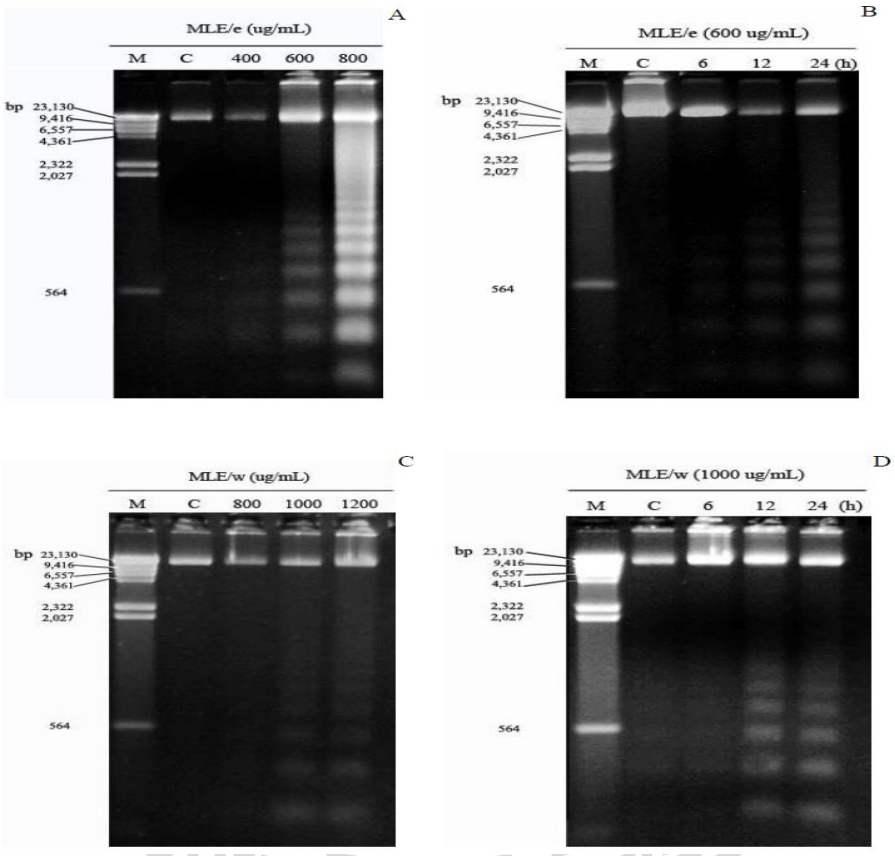

Figure 3. DNA fragmentation in Jurkat cells induced by minweed leaf extracts with varying concentrations and times. DNA fragments were separated on 1.5% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. Each band indicates a nucleosome of a chromosome. A, MLE/e treatment at 400-800 µg/ml, 24 h; B, 600 µg/ml MLE/e treatment at 6-24 h; C, MLE/w treatment at 800-1200 µg/ml, 24 h; and D, 1,000 µg/ml MLE/w treatment at 6-24 h; M, marker; C, control. The results were from three independent experiments.

Western blot analysis for Caspase-9, Bcl-2 and Bax

Cell apoptosis is mechanically regulated by a numbers of proteins including Caspase and Bcl-2 protein families. Thus, to make certain that the mintweed leaf extracts induced apoptosis in

human leukemia T cells, besides the reduction in cell viability and DNA breakage, the expression of somes related apoptotic proteins, i.e., Caspase-9, Bcl-2 and Bax were observed. MLE/e at 400 µg/ml induced Caspase-9 and Bax at 12 h and Bcl-2 at 24 h (Figure 4, A). However, 600 µg/ml MLE/e at 24 h incubation markedly abolished the expression of Caspase-9, Bcl-2 and Bax.

MLE/w was required two fold of MLE/e concentration to induce these proteins (Figure 4, B). MLE/w did not affect the expression of Caspase-9 at 12 h, but intensely affected at 24 h incubation. The expression of Bcl-2 was not affected by MLE/w treatment throughout the incubation periods, Bax was notably induced at 12 h and dramatically increased at 24 h.

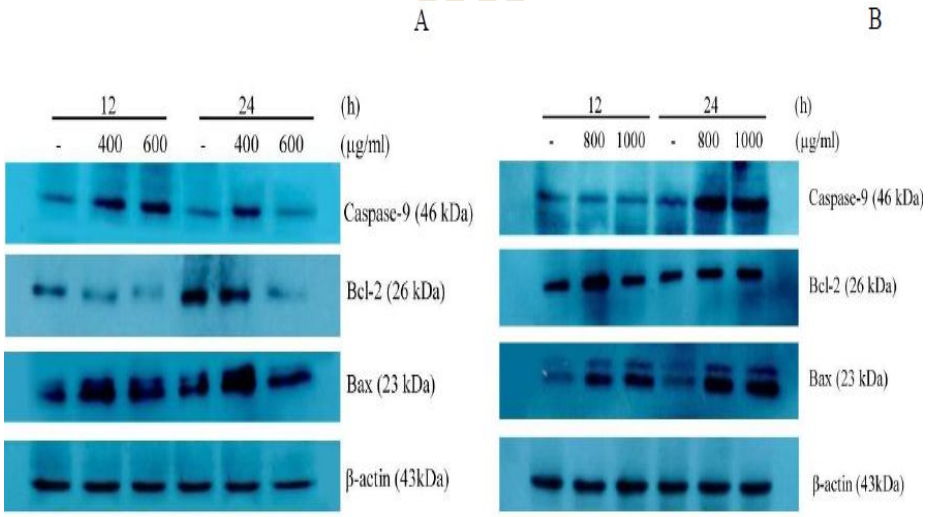

Figure 4. Western blot analysis for the effect of mintweed leaf extracts on the expression of Caspase-9, Bcl-2 and Bax in Jurkat cells. The cell lysate, 40 µg, was separated on 12% SDS-PAGE and immunobloted. A, MLE/e treatment at 400 and 600 µg/ml. B, MLE/w treatment at 800 and 1000 µg/ml. Two independent experiments were performed. β-actin was used as protein loading control.

DISCUSSION

Mintweed (*Hyptis suaveolens*) is widely used in folk medicine in Latin American and Asian countries. Its leaf extracts were separated for the active compounds. Diterpenoid was determined and tested for the activities of anti-inflammation [5], antiplasmodium [4], and wound healing [25]. The aerial part ethanolic and hexane extracts [26] and the leaf hexane extract [27] of this plant possessed gastroprotective activity.

Our study is the first report demonstrated that mintweed leaf ethanolic and water extracts were able to inhibit the growth and induced the apoptotic death of human T-cell leukemia cell line, Jurkat cells, evident by cell nuclear blebbing and DNA fragmentation. Western blot

analysis showed that the extracts up-regulated Caspase-9, Bcl-2 and Bax expression. These results concurrently agreed with and supported by previous evidences that Caspase-9, an initiator for apoptoic execution and linked protein to mitochondrial death [28, 29, 30, 31]; Bcl-2, a regulator for the permeabilization of mitochondrial outer membrane [32, 33, 34]; and Bax, an apoptotic regulator and a Bcl-2 antagonist inducing the release of cytochrome c from mitochondia [35, 36] synchronously induced apoptotic cell death.

Interestingly, our study demonstrated that mintweed leaf ethanolic extract (MLE/e) was likely to activate the proliferation of normal peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which could benefit to immunomodulation. This finding was corresponding to the stimulatory effect of the arial part water extract of *H. suaveolens* on the proliferation of PBMCs and the enhancement of NK cell activity [37]. Oppositely, our study demonstrated that MLE/e of this plant was cytotoxic and induced DNA fragmentation in Jurkat cancer cell line, which was supported by the growth inhibition of Ehrlich Ascites carcinoma cells [16]. Menthol and linalool isolated from leaf ethyl acetate extract of *H. suaveolens* inhibited the growth of human breast cancer cells (MCF-7) [38]. In addition, a novel compound (lignan-related agent) obtained from the ether/water extract of the aerial part of *H. verticillata* was reported that it was highly cytotoxic to Jurkat cells and adult T-cell leukemia cell line, S1T, and induced expression of apoptotic proteins, Caspase-3, Caspase-9 and Bax [39]. The methanolic extract of *H. verticillata* also inhibited the growth and induced the apoptosis of S1T cells [40]. Therefore, it is suggested that mintweed *Hyptis suaveolens* extracts are selectively beneficial to both abnormal cancer and normal human cells depeding on the extract solvents which could pulled out different phytochemicals for different purposes.

CONCLUSION

The present study demonstrated that both mintweed (*Hyptis suaveolens*) leaf ethanolic and water extracts possessed potent cytotoxic and apoptotic effects on T lymphocyte cancer cell line, Jurkat cells. The cell viability was significantly decreased. The cytotoxic IC_{50} values of MLE/e and MLE/w were 553.52 ± 14.07 and 912.06 ± 16.86 µg/ml, respectively. The apoptotic characteristics were detectable as cell nuclear blebbing, DNA fragmentation and up-regulation of Caspase-9, Bcl-2 and Bax proteins. The leaf ethanolic extract was likely to enhance the growth of normal immunological cells. Thus, mintweed ought to be further studied and searched for different active phytochemicals for immunomodulation and cancer prevention and therapy.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was financially supported by Suranaree University of Technology, Thailand. We gratefully thank Professor Dr. Pranom Chantaranothi for identification of mintweed.

REFERENSCES

1. Wolf B, Brischwein M, Lob V, Ressler J, Wiest J. Cellular signaling: Aspects for tumor diagnosis and therapy. Biomed Eng/Biomedizinische Technik, 2007; 52(1): 164-168.
2. Fang Z, Liao P-C, Yang Y-L, Yang F-L, Chen Y-L, Lam Y, Hua K-F, Wu S-H. Synthesis and biological evaluation of polyenylpyrrole derivatives as anticancer agents acting through caspases-dependent apoptosis. J Med Chem, 2010; 53(22): 7967-7978.
3. Watanapokasin R, Jarinthanan F, Nakamura Y, Sawasjirakij N, Jaratrungtawee A, Suksamrarn S. Effects of α-mangostin on apoptosis induction of human colon cancer. World J Gastroenterol, 2011; 17(16): 2086-2095.
4. Chukwujekwu JC, Smith P, Coombes PH, Mulholland DA, van Staden J. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. J Ethnopharmacol, 2005; 102(2): 295-297.
5. Grassi P, Urias Reyes TS, Sosa S, Tubaro A, Hofer O, Zitterl-Eglseer K. Anti-inflammatory activity of two diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. Z Naturforsch, 61c, 2006; 61: 165-170.
6. Mandal SM, Mondal KC, Dey S, Pati B R. Antimicrobial activity of the leaf extracts of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Indian J Pharm Sci, 2007; 69(4): 568-569.
7. Kunkongkapan S, Sriwanthana B, Chavalittumrong P, Warachit P. Efficacy and safety of *Hyptis suaveolens* extract in HIV-infected individuals: A preliminary study. Lanna Public Health J, 2007; 3(3): 255-262.
8. Nayak PS, Nayak S, Kar DM, Das P. In vitro anthelmintic activity of whole plant extracts of *Hyptis suaveolens*. Intern J Curr Pharm Res, 2010; 2(2): 50-51.
9. Nantitanon W, Chowwanapoonpohn S, Okonogi S. Antioxidant and antimicrobial activities of *Hyptis suaveolens* essential oil. Sci Pharm, 2007; 75: 35-46.
10. Zollo PHA, Biyiti L, Tchoumbougnang F, Menut C, Lamat G, Bouchet Ph. Aromatic plants of tropical central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. Flavour and Fragrance J, 1998; 13(2): 107-114.
11. Ziegler HL, Jensen TH, Christensen J, Staerk D, Hagerstrand H, Sittie AA, Olsen CE, Staalso T, Ekpe P, Jaroszewski W. Possible artifacts in the in vitro determination of

antimalarial activity of natural products that incorporate into lipid bilayer: Appearent antiplasmodial activity of dehyroabientinol, a constituent of *Hyptis suaveolens*. Planta Medica, 2002; 68(6): 547-549.

12. Santos TC, Marques MS, Menezes IAC, Dias KS, Silva ABL, Mello ICM, Carvalho ACS, Cavalcanti SCH, Antoniolli AR, Marçal RM. Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. Fitoterapia. 2007; 78: 333-336.
13. Shaikat ZH, Hossain T, Azam G. Phytochemical screening and antidiarrhoeal activity of *Hyptis suaveolens*. Inter J Appl Res Nat Prod, 2012; 5(2):1-4.
14. Mishra SB, Verma A, Mukerjee A, Vijayakumar M. Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. Asian Pac J Trop Med, 2011; 4(9): 689-693.
15. Mahesh S.Comparison of antiinflammatory activity of diclofenac sodium with leaf essential oils of *Hyptis suaveolens* Poit. The Antiseptic, 2001; 98(3): 90.
16. Gurunagarajan S, Pemaiah B. Comparative studies on cytotoxic effect of *Hyptis suaveolens* Poit. and *Leonotis nepeatefolia* R.Br. against EAC cell lines. J Pharm Res, 2011; 4(4): 1222-1224.
17. Azevedo NR, Campos IFP, Ferreira HD, Portes TA, Santos SC, Seraphin JC, Paula JR, Ferri PH. Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. Phytochem, 2001; 57(5): 733-736.
18. Oliveira MJ, Campos IFP, Oliveira CBA, Santos MR, Souza PS, Santos SC, Seraphin JC, Ferri PH. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. Biochem Syst Ecol, 2005; 33(3): 275-285.
19. Buatone S, Indrapichate K. (2011). Protective effects of mintweed, kitchen mint and kaffir lime leaf extracts against rice weevils, *Stitophilus oryzae* L., in stored, milled rice. Inter J Agric Sci, 2011; 3(3): 133-139.
20. Yongkhamcha B, Indrapichate K. Insecticidal efficacy of mintweed, yam bean and celery seed extracts on *Aedes aegypti* L. Inter J Agric Sci, 2012; 4(3): 207-212.
21. Berntsen P, Park CY, Rothen-Rutishauser B, Tsuda A, Sager TM, Molina RM, Donaghey TC, Alencar AM, Kasahara DI, Ericsson T, Millet EJ, Swenson J, Tschumperlin DJ, Butler JP, Brain JD, Fredberg JJ, Gehr P, Zhou EH. Biomechanical effects of environmental and engineered particles on human airway smooth muscle cells. J R Soc Interface, 2010; 7: S331-340.

22. Chen Z, Wu Q, Chen Y, He J. Effects of betulinic acid on proliferation and apoptosis in Jurkat cells and its in vitro mechanism. J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci], 2008; 28(6): 634-638.
23. Ito G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, Nomura M, Jie J, Ito K. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. Am J Pathol, 1995; 146(6): 1325-1331.
24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976; 72(1): 248-254.
25. Shenoy C, Patill MB, Kumar R. Wound Healing Activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). Int.J. Pharm Tech Res, 2009; 1(3): 737-744.
26. Jesus NZT, Falcão HS, Lima GRM, Caldas Filho MRD, Sales IRP, Gomes IF, Santos SG, Tavares JF, Barbosa-Filho JM, Batista LM. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae), amedicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. J Ethnopharmacol, 2013; 150: 982-988.
27. Vera-Arzave C, Antonio LC, Arrieta J, Cruz-Hernández G, Velázquez-Méndez AM, Reyes-Ramírez A, Sánchez-Mendoza ME. Gastroprotection of suaveolol, Isolated from *Hyptis suaveolens*, against ethanol-induced gastric lesions in Wistar rats: Role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryls. Molecules, 2012; 17: 8917-8927.
28. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL. Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW. Differential requirement for Caspase 9 in apoptotic pathways *in vivo*. Cell, 1998; 94: 339-352.
29. Kuida K, Haydar TF, Kuan C-Y, Gu Y,Taya C, Karasuyama H, Su MS-S, Rakic P, Flavell RA. Reduced apoptosis and cytochrome c–mediated Caspase activation in mice lacking Caspase 9, Cell, 1998; 94: 325-337.
30. Kuida K. Molecules in focus Caspase-9. Inter J Biochem Cell Biol, 2000; 32: 121-124.
31. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. Mol Cell Biochem, 2011; 351:41-58.
32. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev, 1999; 13: 1899-1911.
33. Dejean LM, Martinez-Caballeroa S, Manonb S, Kinnally KW. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. et Biophysica Acta, 2006; 1762: 191-201.

34. Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria-specificity in membrane targeting for death. Biochimica Biophysica Acta, 2011; 1813: 532-539.
35. Zhang H, Cowan-Jacob SW, Simonen M, Greenhalf W, Heim J, Meyhack B. Structural basis of BFL-1 for its interaction with BAX and its anti-apoptotic action in mammalian and yeast cells. J Biol Chem, 2000; 275: 11092-11099.
36. Pawlowski J, Kraft AS. Bax-induced apoptotic cell death. PNAS 2000; 97: 529-531.
37. Sriwanthana B, Treesangsri W, Boriboontrakul B, Niumsakul S, Chavalittumrong P. *In vitro* effects of Thai medicinal plants on human lymphocyte activity. Songklanakarin J. Sci. Technol, 2007; 29 (Suppl. 1): 17-28.
38. Priyadharshini SUD, Sujatha V, 2013. Antioxidant and cytotoxic studies on two known compounds isolated from *Hyptis suaveolens* leave. Inter J Pharma and Pharm Sci, 2013; 5(4): 283-290.
39. White Y, Hamada T, Yoshimitsu M, Nakashima M, MIHO Hachiman M, Kozako T, Matsushita K, Uozumi K, Suzuki S, Kofune H, Furukawa T, Arimai N. Novel cytotoxic isolated from Jamaican *Hyptis verticillata* Jacq induces apoptosis and overcomes multidrug resistance. Anticancer Res, 2011; 31: 4251-4258.
40. Hamada T, White Y, Nakashima M, Oiso Y, Fujita MJ, Okamura H, Iwagawa T, Arima N. The bioassay-guided isolation of growth inhibitors of adult T-cell leukemia (ATL), from the Jamaican plant *Hyptis verticillata*, and NMR characterization of hyptoside. Molecules, 2012; 17: 9931-9938.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 Lipid peroxidation inhibition

สารสกัดใบแมงลักคาด้วยเอทธานอล (MLE/e) ยับยั้ง lipid peroxidation ใน Fe (II)-induced lipid peroxidation ที่ IC_{50}, 24 ชม. เท่ากับ 5.43 ± 0.37 μg/mL ซึ่งดีกว่าสารมาตรฐาน Catechin ที่มีค่า IC_{50} 17.92 ± 0.18 μg/mL สารสกัดใบแมงลักคาด้วยน้ำ (MLE/w) มีประสิทธิภาพยับยั้งได้เท่ากับสารมาตรฐาน มีค่า 17.45 ± 0.21 μg/mL ส่วนสารสกัดเมล็ดแมงลักคาเป็น lipid peroxidation inhibitors ที่ค่อนข้างอ่อนถึงอ่อนมาก MSE/e มีค่า IC_{50} 35.95 ± 1.78 μg/mL และ MSE/w มีค่า IC_{50} 725.48 ± 17.81 μg/mL

ดังนั้น MLE/e และ MLE/w จึงเป็น lipid peroxidation inhibitors ที่มีศักยภาพสูงในการป้องกันไขมันในเยื่อเซลล์และเยื่อชีวภาพของ organelles อื่นในเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากสาร oxidants

5.2 Cytotoxicity

5.2.1 Cytotoxicity to T lymphocyte leukemia cell line - Jurkat cells

MLE/e และ MLE/w แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) สายพันธุ์มะเร็งเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน Jurkat cells โดยยับยั้งการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงตามความเข้มข้นของสารสกัด หรือ dose dependent ในขณะที่ MSE/e และ MSE/w แสดงความเป็นพิษต่ำกว่ามาก ประสิทธิภาพของสารสกัดทั้ง 4 เรียงตามลำดับดังนี้ MLE/e > MLE/w > MSE/e > MSE/w โดยมีค่า IC_{50} ที่ 24 ชม. 553.52 ± 14.0; 912.06 ± 16.86; 2,385.95 ± 81.28; และ 5,813.45 ± 111.25 μg/mL เรียงตามลำดับ ในขณะที่สารมาตรฐานมีค่า IC_{50} 339.74 ± 14.55 μg/mL

MLE/e และ MLE/w มีพิษ cytotoxicity น้อยกว่าสารมาตรฐาน Catechin 1.63 และ 2.68 เท่าตามลำดับ

5.2.2 Cytotoxicity to peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

MLE/e และ MLE/w แสดงฤทธิ์ cytotoxicity ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของคน PBMCs สูงกว่าฤทธิ์ของ MSE/e และ MSE/w ฤทธิ์ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิดเป็นแบบ dose dependent ประสิทธิภาพของ

cytotoxicity เรียงลำดับดังนี้ MLE/w > MLE/e > MSE/e > MSE/w และค่า IC_{50} ที่ 24 ชม.ดังนี้ 1,140.52 ± 06.05; 1,356.17 ± 136.78; 2,920.68 ± 155.38; 5,813.45 ± 111.25 µg/mL ทั้งนี้ cytotoxicity ของ MLE/e และ MLE/w ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ Catechin มีค่า IC_{50} 647 ± 12.76 µg/mL

ระดับความแรงของพิษ cytotoxicity ของสารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคาต่อ PBMCs ต่ำมากเมื่อเทียบกับพิษของสารมาตรฐาน Catechin และเทียบกับพิษสารสกัดเหล่านี้ต่อ Jurkat cells ยิ่งกว่านั้นสารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคาด้วยเอทธานอลมีแนวโน้มกระตุ้นการเจริญของ PMBCs

สรุปได้ว่า สารสกัดใบแมงลักคามีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidants แสดงบทบาทเป็น inhibitors ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของ lipid oxidation ซึ่งให้ผลผลิต reactive oxygen species (ROS) ทำลาย DNA, โปรตีน และ ไขมัน ในเซลล์ ไขมันเป็นสารประกอบหลักสำคัญของเยื่อเซลล์และเยื่อชีวภาพของ organelles ทุกชนิดในเซลล์สิ่งมีชีวิต สารสกัดแมงใบลักคามีฤทธิ์ด้าน cytotoxicity ยับยั้งการเจริญหรือทำให้เซลล์สายพันธุ์มะเร็งเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนตาย แต่ไม่มีพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติของคน จากหลักฐานการวิจัยนี้จึงสมควรศึกษาวิจัยสารสกัดใบแมงลักคาใน primary tumor/cancer cells ปัจจัยอื่นๆ รวมทั้งศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหรือคนจนสามารถทำเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันการเกิดมะเร็งหรือเป็นยารักษามะเร็งในคนต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2548

ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยี เพื่อนร่วมงาน และ ขอบคุณเป็นพิเศษสำหรับนางสาวสุมาลี มุสิกา ผู้ช่วยวิจัยที่ได้ช่วยงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงอย่างดียิ่ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ ดร. กรกช นามสกุล อินทราพิเชฐ
2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้

   สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

   อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

   โทรศัพท์ 044-22-4296 โทรสาร 044-22-4633
4. ประวัติการศึกษา

   พ.ศ. 2515 ปริญญาตรี วท.บ. (สัตววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   พ.ศ. 2520 ปริญญาโท วท.ม. (กายวิภาคศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล

   พ.ศ. 2533 ปริญญาเอก Ph.D. (Molecular Biology) Lehigh University, Bethlehem, Pennsylvania, USA.
5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญ

   Molecular cell Biology (cell proliferation and cell apoptosis) และ Plant-based insect pest biological control

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี