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