โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึง (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิสและการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	ภัทราพร พูลแสวง
เลขประจำตัวนิสิต	6032140123
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึง (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิสและการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

นางสาวภัทราพร พูลแสวง

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

Effects of purple passion vine (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) leaf extract on expression of apoptosis-related genes and viability of cervical cancer cells

Miss Phattraporn Poolsaweang

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Bachelor of Science in Genetics
Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University
Academic year 2020

ชื่อโครงงาน	ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึง (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิสและการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	ภัทราพร พูลแสวง
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

.....รัชนีกร ธรรมโชติ.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ตระกูล)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงงาน	ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึง (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิสและการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	ภัทราพร พูลแสวง
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ปีการศึกษา	2563

บทคัดย่อ

มะเร็งปากมดลูก เป็นมะเร็งที่พบมากในผู้หญิงทั่วโลก แม้ว่าจะมีวิธีการรักษาได้หลากหลายวิธีแต่มักมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ ในขณะที่สารสกัดจากสมุนไพรบางชนิดมีฤทธิ์ต้านทานมะเร็งแต่มีผลข้างเคียงน้อยลง มีรายงานว่าสารสกัดจากใบแปะตำปึง (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) มีความสามารถในการต้านมะเร็งเต้านมและมะเร็งกระดูกได้และอาจส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อย งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ และเทียบระหว่างใบอ่อนและใบแก่ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a และ SiHa และการแสดงออกของยีน *BCL2* และ *BAX* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิส ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบแปะตำปึงจากสามแหล่งคือ ชัยภูมิ ชลบุรี กรุงเทพฯ มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิดแตกต่างกัน โดยสารสกัดจากใบแปะตำปึงมีฤทธิ์ในการลดการมีชีวิตของเซลล์ SiHa ได้มากที่สุดคือสารสกัดจากใบแปะตำปึงอ่อนจากจังหวัดกรุงเทพฯ ซึ่งมีค่า LC_{50} เท่ากับ 625.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากใบแก่จากจังหวัดชลบุรีมีฤทธิ์ลดการมีชีวิตของเซลล์ C33a ได้มากที่สุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 143.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม พบว่าสารสกัดจากใบแปะตำปึงไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *BCL2* และยีน *BAX* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิดอย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปเป็นพื้นฐานของการพัฒนายารักษามะเร็งปากมดลูกต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: มะเร็งปากมดลูก, สารสกัดจากใบแปะตำปึง, การแสดงออกของยีน, อะพอพโทซิส

Title	Effects of purple passion vine (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) leaf extract on expression of apoptosis-related genes and viability of cervical cancer cells
Student name	Phattraporn Poolsaweang
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Rachaneekorn Tammachote
Co-advisor	Assoc Prof. Dr. Sehanat Prasongsuk
Program	Genetics
Department	Botany
Academic year	2020

Abstract

Cervical cancer is one of the most common cancers in women worldwide. Although there are many methods of treatment, there are often undesirable side effects. While some herbal extracts have anti-cancer effects, they have fewer side effects. *Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) extract has been reported to have anticancer activity in breast cancer cells and bone cancer cells, and may cause fewer side effects. This study studied the effects of extract from purple passion vine leaves from different sources: Chaiyaphum, Chonburi, Bangkok and compared young and old leaves, on the viability and the expression of *BCL2* and *BAX* genes related to apoptosis of SiHa and C33a cervical cancer cells. The results showed that extracts from purple passion vine leaves from three sources had different effects on cell viability in both types of cervical cancer cells. The most effective extract in reducing the viability of SiHa cells was obtained from an extract from the young leaves from Bangkok, which had an LC_{50} value of 625.47 μg/mL. The extract from the old leaves from Chonburi had the lowest LC_{50} in C33a cells with the LC_{50} value of 143.43 μg/mL. However, the purple passion vine leaf extract did not significantly change gene expression of *BCL2* and *BAX* genes in C33a and SiHa cells. The information obtained from this study can be used as a basis for future development of cervical cancer drugs.

Keywords: cervical cancer, purple passion vine leaf extract, apoptosis, gene expression

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน และรองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้ความรู้และความช่วยเหลือเกี่ยวกับการทำโครงงานวิทยาศาสตร์เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต ที่เมตตาให้ตัวอย่างเซลล์ในการศึกษาครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนทุนวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ตระกูล กรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คุณปริญญนุช กลิ่นรัตน์ ที่กรุณาตรวจสอบระบุชนิดพันธุ์พืชและนำตัวอย่างแห้งเก็บรักษา ณ พิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิน สุวตะพันธ์ ทำให้ผลการทดลองในงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการ 306 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษางานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่ชาย ที่ให้การสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในทุก ๆ ด้านเป็นอย่างดี

สารบัญ

เรื่อง **หน้า**

บทคัดย่อภาษาไทย ..... **ง**

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... **จ**

กิตติกรรมประกาศ ..... **ฉ**

บทที่ 1 บทนำ **1**

ความเป็นมาและความสำคัญ 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง **3**

มะเร็งปากมดลูก 3

การรักษาโรคมะเร็งปากมดลูก 4

ผลของการสกัดใบแปะตำปึงต่อเซลล์มะเร็ง 5

การตายของเซลล์ 6

กระบวนการอะพอพโทซิส 6

ยีนที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิส 9

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการ **11**

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ดำเนินการ 11

สารเคมีและตัวอย่างที่ใช้ในการดำเนินการ 11

วิธีการดำเนินงาน 12

บทที่ 4 ผลการทดลอง **16**

ระบุชนิดพันธุ์ต้นแปะตำปึง 16

ผลการเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารจากใบแปะตำปึง 16

ผลการทดลองสารสกัดจากใบแปะตำปึงที่มีต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก 19

สรุปผลการทดลองเปอร์เซ็นการมีชีวิตของเซลล์ที่ลดลงครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) 21

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิส 22

บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง **25**

บทที่ 6 เอกสารอ้างอิง **29**

ภาคผนวก ก.....35

ภาคผนวก ข.....36

ภาคผนวก ค.....37

ภาคผนวก ง.....39

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นแปะตำปึง 6
ภาพที่ 2 ลักษณะของเซลล์ระหว่างเกิดกระบวนการอะพอพโทซิส 8
ภาพที่ 3 วิถีอะพอพโทซิส 9
ภาพที่ 4 การทำงานของยีน *BAX* และยีน *BCL2* 10
ภาพที่ 5 ตัวอย่างต้นแปะตำปึง 16
ภาพที่ 6 ตัวอย่างใบแปะตำปึงแห้ง 17
ภาพที่ 7 สารละลายผงใบแปะตำปึงที่สกัดด้วยมาเซอเรชัน 17
ภาพที่ 8 ตัวอย่างสารสกัดที่ได้จากระเหยแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 70 °C 18
ภาพที่ 9 ผลผลิต (% yield ; W/W) ของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากแหล่งต่าง ๆ 18
ภาพที่ 10 การแสดงออกของยีน *BCL2* จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a . 22
ภาพที่ 11 การแสดงออกของยีน *BAX* จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a ... 23
ภาพที่ 12 อัตราส่วนผลการแสดงออกของยีน BAX ต่อการแสดงออกของยีน BCL2 จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a 24
ภาพที่ 13 ผลของสารสกัดจากจังหวัดชัยภูมิต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 39
ภาพที่ 14 ผลของสารสกัดจากจังหวัดชัยภูมิต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง 39
ภาพที่ 15 ผลของสารสกัดจากจังหวัดชลบุรีต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 40
ภาพที่ 16 ผลของสารสกัดจากจังหวัดชลบุรีต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง 40
ภาพที่ 17 ผลของสารสกัดจจังหวัดกรุงเทพต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 41
ภาพที่ 18 ผลของสารสกัดจากจังหวัดกรุงเทพฯต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง 41
ภาพที่ 19 ผลของสารสกัดจากจังหวัดชัยภูมิต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 42

ภาพที่ 20 ผลของสารสกัดจากจังหวัดชัยภูมิต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 42
ภาพที่ 21 ผลของสารสกัดจากจังหวัดชลบุรีต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 43
ภาพที่ 22 ผลของสารสกัดจากจังหวัดชลบุรีต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 43
ภาพที่ 23 ผลของสารสกัดจากจังหวัดกรุงเทพฯ ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 44
ภาพที่ 24 ผลของสารสกัดจากจังหวัดกรุงเทพฯ ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 44

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 1 ผลร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a เมื่อบ่มด้วยสารสกัดจากใบแปะตำปึง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 19
ตารางที่ 2 ผลร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a เมื่อบ่มด้วยสารสกัดจากใบแปะตำปึง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 20
ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบแปะตำปึงที่สามารถลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a ครึ่งหนึ่ง 21
ตารางที่ 4 ปริมาณผลผลิตที่ได้จากการสกัดใบแปะตำปึง 35
ตารางที่ 5 สารเคมีสำหรับการสังเคราะห์ cDNA 37
ตารางที่ 6 สารเคมีสำหรับเทคนิค Real-time PCR 38
ตารางที่ 7 สภาวะที่ใช้สำหรับการวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธีการ Real-time PCR 38

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

มะเร็งปากมดลูก เป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับที่ 2 ของมะเร็งทั้งหมดในผู้หญิงไทย (อรพิน พวกแก้ว และคณะ, 2558) มีสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคได้หลายประการ เช่น การติดเชื้อ Human papillomavirus และการกลายพันธุ์ แม้ว่าจะมีวิธีการรักษาโรคมะเร็งได้หลากหลายวิธีแต่มักมีผลข้างเคียง เช่น การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทำให้เซลล์มะเร็งตาย แต่ขณะเดียวกันยาสามารถออกฤทธิ์ต่อเซลล์ปกติที่มีการแบ่งตัวในอวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกาย เช่น เซลล์ผม เซลล์ไขกระดูก และเซลล์เยื่อบุต่าง ๆ ดังนั้นยาเคมีบำบัดจึงมีผลข้างเคียง เช่น ผมร่วง เม็ดเลือดแดงต่ำ เยื่อบุช่องปากอักเสบ (สมถวิล ลูกรักษ์ และคณะ, 2556) ทำให้เกิดความสนใจเกี่ยวกับสรรพคุณทางยาของสมุนไพรที่มีอยู่ในประเทศไทยที่นิยมนำมารักษามะเร็ง ซึ่งหนึ่งในสมุนไพรที่ได้รับความนิยม คือ ใบของต้นแปะตำปึง

Gynura procumbens (Lour.) Merr. (แปะตำปึง แป๊ะตำปึง หรือ จักรนารายณ์) เป็นพืชวงศ์ Asteraceae เป็นสมุนไพรดั้งเดิมที่มีชื่อเสียงในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย และไทย สามารถเติบโตได้ดีที่พื้นที่ที่มีแสงแดดรำไร (Mou and Dash, 2016) โดยในประเทศไทยมีการใช้ใบแปะตำปึง เป็นวัตถุดิบประกอบอาหารและใช้รับประทานเป็นผักสด โดยเชื่อว่าเป็นพืชที่สามารถรักษาอาการป่วยได้หลายโรค (Kaewseejan, Sutthikhum and Siriamornpun, 2015)

โครงงานนี้ สนใจผลของสารสกัดของใบแปะตำปึงต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยได้เลือกใช้เซลล์ 2 ชนิด คือ เซลล์ C33a ที่เกิดจากกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรเซลล์ ทำให้ยับยั้งการทำงานของ tumor suppressor และยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิส และเซลล์ชนิด SiHa ที่เกิดจากการติดเชื้อ Human papillomavirus (Yee et al.,1985) ซึ่งหากสารสกัดของใบแปะตำปึงมีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ก็อาจจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการอะพอพโทซิส ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญต่อระบบการทำงานในการกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติหรือเสื่อมสภาพ รวมถึงเซลล์มะเร็ง (Malaguarnera., 2004; Zhivotovsky and Kroemer, 2004) ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้หลายชนิด เช่น ยีน *BAX* ซึ่งเป็นยีนที่ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิส และยีน *BCL2* ซึ่งเป็นยีนที่ยับยั้งกระบวนการดังกล่าว (Grace et al., 2003; Klapsinou et al., 2015)

โครงงานวิจัยนี้สนใจศึกษาผลของใบแปะตำปึงต่อการเกิดกระบวนการอะพอพโทซิส โดยวิเคราะห์การมีชีวิตและการแสดงออกของยีน *BCL2* และ ยีน *BAX* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a และ SiHa ซึ่งการศึกษานี้จะเป็นพื้นฐานของการศึกษาผลของใบแปะตำปึงในการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรชนิดนี้ต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึง (*G. procumbens* (Lour.) Merr.) ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับอะพอพโทซิสและการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก
2. ทราบผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งปากมดลูก

มะเร็งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่พบมากที่สุดในพื้นที่ส่วนใหญ่ของโลกเป็นอันดับ 1 (Momenimovahed et al., 2017) และมะเร็งปากมดลูกยังคงจัดอยู่ในกลุ่มโรคที่พบมากทั่วโลก จากข้อมูลในปีค.ศ. 2018 พบว่าอยู่ในอันดับที่ 14 ของมะเร็งทั้งหมดและเป็นอันดับที่ 4 ของผู้หญิงทั่วโลก (Brisson and Drolet, 2019) มีหลายปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งปากมดลูกแต่ปัจจัยสำคัญคือการติดเชื้อ High risk human papillomavirus (HR-HPV) (เจตน์ วันแต่ง, อุษา ถนอมเงิน และวรางคณา อ่อนทรวง, 2557) human papillomavirus (HPV) เป็นหนึ่งในการติดเชื้อไวรัสที่พบบ่อยที่สุดของระบบสืบพันธุ์และทำให้เกิดมะเร็งหลายชนิดทั้งในเพศชายและเพศหญิง (Bergot et al., 2011) รวมทั้งเป็นไวรัสชนิดแรกที่กระตุ้นให้เกิดการก่อมะเร็งที่สัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูก (Wang, Huang and Zhang, 2018) มีหลักฐานบ่งชี้ว่า HR-HPV ยับยั้งการเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสหรือการตายของเซลล์ได้ (Fuentes-González et al., 2013; Rautava and Syrjänen, 2012) โดยมะเร็งปากมดลูกแบ่งออกเป็นระยะดังนี้ (Bhatla et al., 2019)

1. ระยะ I : ตรวจพบความผิดปกติของเซลล์ได้หรือพิสูจน์ได้ว่าเป็นมะเร็งที่บริเวณปากมดลูก แต่ยังไม่แพร่กระจาย แบ่งได้เป็น 7 ระยะย่อย คือ IA1 IA2 IB1 IB2 และ IB3
2. ระยะ II : เซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปนอกมดลูก แต่ยังไม่แพร่กระจายไปยังช่องคลอดส่วนล่างหรือผนังอุ้งเชิงกราน ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ระยะย่อย คือ IIA IIB
3. ระยะ III : เซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปถึงส่วนล่างของช่องคลอดและผนังอุ้งเชิงกรานหรือเกิดภาวะ hydronephrosis ไตไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลืองในอุ้งเชิงกรานและบริเวณหลอดเลือดแดงใหญ่เอเออร์ตา ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ระยะย่อย คือ IIIA IIIB IIIC
4. ระยะ IV : มะเร็งแพร่กระจายไปยังเยื่อบุกระเพาะปัสสาวะ ทวารหนักและอวัยวะข้างเคียงหรือแพร่กระจายไปยังอวัยวะที่อยู่ไกลออกไป ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ระยะย่อย คือ IVA IVB

การรักษาโรคมะเร็งปากมดลูก

การรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดและระยะของโรค ผลข้างเคียงของการรักษาและสุขภาพโดยรวมของผู้ป่วย การเลือกรับการรักษาขึ้นอยู่กับการตัดสินใจของผู้ป่วยและแพทย์ร่วมกัน วิธีการรักษาทั่วไปที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งมีดังนี้ (Cancer.Net Editorial Board. 2019 : online; The American Cancer Society medical and editorial content team. 2020 : online)

1. การผ่าตัด

   การผ่าตัดคือการตัดชิ้นเนื้อบริเวณที่มะเร็งออกไป หากมีการลุกลามมากต้องทำการผ่าตัดมดลูกออกไป ภาวะแทรกซ้อนหรือผลข้างเคียงจากการผ่าตัดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับขอบเขตของมะเร็งและขั้นตอนผ่าตัด อาจมีการติดเชื้อ ส่งผลต่อสมรรถภาพทางเพศ

2. การฉายรังสี

   การรักษาด้วยการฉายรังสีคือการใช้รังสีเอกซ์พลังงานสูงหรืออนุภาคอื่น ๆกำจัดเซลล์มะเร็ง ในมักใช้วิธีการนี้รวมกับเคมีบำบัดในปริมาณต่ำ หลังจากการผ่าตัดหรือร่วมกับการบำบัดโดยใช้ยา ผลข้างเคียงคือ เหนื่อยล้า ผิวหนังบริเวณฉายเปลี่ยนไป ปวดท้อง ลำไส้อุดตัน ผู้ป่วยที่ได้รับรังสีสูญเสียความสามารถในการตั้งครรภ์ ช่องคลอดอาจสูญเสียความยืดหยุ่น ผลข้างเคียงส่วนใหญ่มักหายทันทีฟหลังจากสิ้นสุดการรักษา

3. การบำบัดโดยใช้ยา

   เป็นการใช้ยาเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งโดยให้ยาทางกระแสเลือดซึ่งกระจายได้ทั่วร่างกายโดยมี 3 ประเภท ดังนี้

เคมีบำบัด	ปกติใช้วิธีการนี้เพื่อยับยั้งเซลล์มะเร็งไม่ให้เพิ่มขึ้น ผลข้างเคียงคือ เหนื่อยล้า คลื่นไส้ อาเจียน ผมร่วง และเบื่ออาหาร
การบำบัดแบบตรงจุด	คือ การรักษาที่ยีนเป้าหมาย โปรตีน หรือสภาพแวดล้อมที่ทำให้เกิดมะเร็งการรักษานี้ยับยั้งการเจริญและแพ่กระจายของเซลล์มะเร็ง
ภูมิคุ้มกันบำบัด	คือ การใช้ยาเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในแต่ละบุคคลเพื่อทำลายเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถใช้ในการรักษามะเร็งปากมดลูกที่แพร่กระจายหรือกลับมาเป็นซ้ำได้

ผลของการสกัดใบแปะตำปึงต่อเซลล์มะเร็ง

Gynura procumbens (Lour.) Merr. เป็นพืชวงศ์ Asteraceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กสูงประมาณ 1-3 เมตร ลำต้นอวบและใบเป็นรูปไข่รีหรือรูปใบหอก ดอกมีสีเหลืองยาว 1-1.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 1) (Rahman and Al Asad, 2013) นิยมนำมาบริโภคและมีการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์แล้วว่าปลอดภัยสำหรับการบริโภค (Rosidah, Sadikun and Asmawi, 2008) นอกจากนี้ ยังใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาอาการความดันโลหิตสูง เบาหวาน มะเร็ง รูมาตอยด์ โรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส โรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โรคไต มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Afandi, Sadikun and Ismail, 2014; Iskander et al., 2002; Wong et al., 2015) เป็นต้น

มีงานวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดเอทานอลจากใบแปะตำปึงว่ามีประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งโดยช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งและลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม ในระยะเริ่มต้นในหนูทดลองเพศเมีย ซึ่งเป็นมะเร็งที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของสารก่อมะเร็ง DMBA โดยมีกลไกลดการแสดงออกของเอนไซม์ cytochrome P-450 ซึ่งเหนี่ยวนำให้สารบางชนิดเป็นสารก่อมะเร็งได้ (Afandi et al., 2014; Gofur, Hamid and Listyorini, 2015) สามารถยับยั้งการแพร่กระจายและกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งกระดูกชนิด U2-OS โดยยับยั้ง nuclear factor kappa B (NF-kB) (Wang et al., 2013) ซึ่งมีอิทธิพลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์ (Albensi, 2019) และมีงานวิจัยพบว่าสารสกัดใบแปะตำปึงมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa โดยยับยั้งการเพิ่มจำนวนและเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส (Meiyanto and Septisetyani, 2005) และยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 (Hew, Khoo and Gam, 2013)

องค์ประกอบทางเคมีของสารที่พบในใบแปะตำปึงที่ คือสารประกอบฟีนอลิค เช่น *p*-hydroxybenzoic acid และ syringic acid และสารประกอบฟลาโวนอยด์ เช่น kaempferol และ myricetin (Kaewseejan et al., 2015) นอกจากนี้ยังพบ saponins, tannins, terpenoid และ sterol glycosides (Akowuah, Sadikun and Mariam, 2002; Kaewseejan, Puangpronpitag and Nakornriab, 2012; Zahra et al., 2011)

ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นแปะตำปึง a. ต้นแปะตำปึง (Mou and Dash, 2016) b. ดอกของต้นแปะตำปึง (Lwin and Lwin, 2011)

การตายของเซลล์

การตายของเซลล์ หมายถึง กระบวนการเสื่อมสภาพของเซลล์ที่ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้โดยเกิดจากกระบวนการตามธรรมชาติของเซลล์เก่าและถูกแทนที่ด้วยเซลล์ใหม่หรือเกิดจากปัจจัยต่างๆ เช่น โรค การบาดเจ็บ หรือความผิดปกติภายในเซลล์ (Galluzzi L et al., 2012) ซึ่งรูปแบบการตายของเซลล์สามารถจำแนกได้ตามเกณฑ์ทางสัณฐานวิทยา เช่น การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส การตายแบบเนโครซิส เป็นต้น (Giampietri, Paone and D'Alessio, 2014)

กระบวนการอะพอพโทซิส

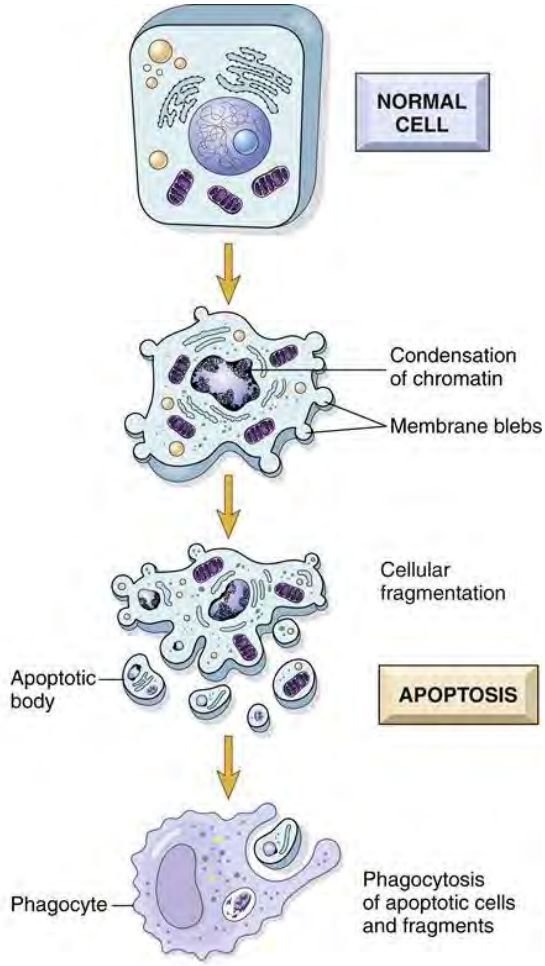
อะพอพโทซิส คือ การตายของเซลล์ที่มีแบบแผน (programmed cell death) ในรูปแบบที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนและโปรตีนหลายชนิดสำหรับการกำจัดเซลล์ต่าง ๆ ที่ไม่ต้องการหรือทำหน้าที่ผิดปกติ (Renehan et al., 2001) และเป็นกระบวนการสำคัญในสภาวะสมดุลของเซลล์การพัฒนาของสิ่งมีชีวิตในแต่ละเซลล์ (Galluzzi et al., 2007) ซึ่งเซลล์ที่กำลังตายจะแสดงให้ถึงการรวมตัวกันของนิวเคลียส ดีเอ็นเอสลายเป็นชิ้นเล็ก ๆ (DNA fragmentation) และเซลล์เกิดการกระจายตัวเป็น apoptotic body เซลล์จะนำเสนอ phosphatidylserine ไว้บนเยื่อหุ้มพลาสมา โดย

มีเซลล์เม็ดเลือดขาวจดจำสัญญาณนี้ (ภาพที่ 2) (Montero and Letai, 2018) โดยมีวิถีอะพอพโทซิส 2 วิถี คือ วิถีภายใน (intrinsic pathway) และวิถีภายนอก (extrinsic pathway) (ภาพที่ 3)

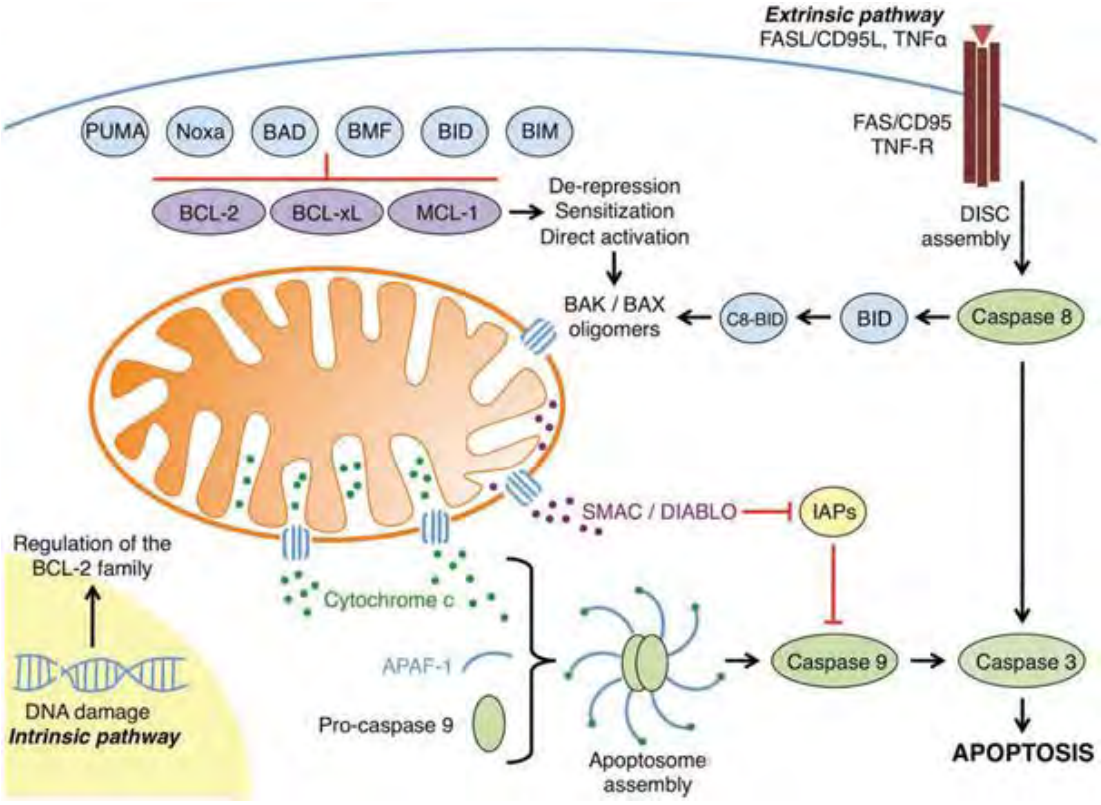
วิถีภายในจะถูกใช้เมื่อเซลล์มีความเสียหายของดีเอ็นเอจากการได้รับรังสีเอกซ์หรือได้รับแสง UV สารเคมีบำบัด อาศัยไมโทคอนเดรียเป็นตัวกลางสำคัญ เมื่อมีสัญญาณจากโปรตีนที่ทำให้เกิดกระบวนการตายส่งสัญญาณไปที่ไมโทคอนเดรีย เกิดการสูญเสียประสิทธิภาพของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียและหลั่งโปรตีนไซโตโครม ซี (Cytochrome C) และโปรตีน SMAC/DIABLO จากช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในและชั้นนอกของไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโตซอล ซึ่งโปรตีนไซโตโครม ซี จับกับ APAF-1 และ Pro-caspase9 เพื่อสร้าง Apoptosome เพื่อกระตุ้น Caspase9 ตามด้วยการกระตุ้นการส่งสัญญาณของ Caspase3 นำไปสู่การเกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส และโปรตีน SMAC/DIABLO ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ IAPs ที่เป็นโปรยับยั้งการทำงานของ Caspase9 ซึ่งเป็นผลจากยีน *BAX BCL2* และ *TP53* เป็นตัวควบคุมวิถีนี้ (Akhtar and Bokhari. 2020 : online; Montero and Letai, 2018)

ส่วนวิถีภายนอกเกิดเมื่อ death receptors (DRs) เช่น tumor necrosis factor receptor (TNFR), Fas receptor, DR3, TNF-related apoptosis-inducing ligand เป็นต้น ถูกกระตุ้นด้วยการจับของลิแกนด์ที่จำเพาะซึ่งประกอบไปด้วย adaptor proteins และ initiator caspase ที่อยู่ภายในไซโทพลาสซึมกลายเป็นสารประกอบโปรตีนเชิงซ้อน Death-inducing signaling complex (DISC) อยู่บนเซลล์เป้าหมาย ทำให้เกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณของ Caspase และนำไปสู่กระบวนการอะพอพโทซิส (ปกป้อง ประยงค์, นาถธิดา วีระปรียากูร และสหพัฒน์ บรัศว์รักษ์, 2550)

โปรตีนกลุ่ม Bcl2 (Bcl2 family proteins) เป็นกลุ่มโปรตีนหลักที่ควบคุมการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสทั้งวิถีภายในและวิถีภายนอก ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มโปรตีนออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มต้านอะพอพโทซิส (Bcl2-like proteins) เช่น BCL2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W และ A-1 กลุ่มส่งเสริมอะพอพโทซิส (BAX-like proteins) เช่น BAX, BAK, BOK และ BIK (Youle and Strasser, 2008) และกลุ่มส่งเสริมการตายของเซลล์ (BH3-only proteins) เช่น BAD, BID, BIM, NOXA และ PUMA ในกลุ่มนี้สามารถยับยั้งกลุ่มต้านอะพอพโทซิสและกระตุ้นกลุ่มส่งเสริมอะพอพโทซิสเพื่อกระตุ้นการตายของเซลล์ (Kuwana et al., 2005)



ภาพที่ 2 ลักษณะของเซลล์ระหว่างเกิดกระบวนการอะพอพโทซิส (Kumar et al., 2010) เมื่อเริ่มกระบวนการอะพอพโทซิสเซลล์จะแสดงถึงการรวมตัวกันของนิวเคลียส (nucleus condensation) และดีเอ็นเอสลายเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นเซลล์เกิดการกระจายตัวเป็น apoptotic body และเซลล์เม็ดเลือดขาวทำหน้าที่กลืนกิน apoptotic body ด้วยกระบวนการฟาโกไซโทซิส

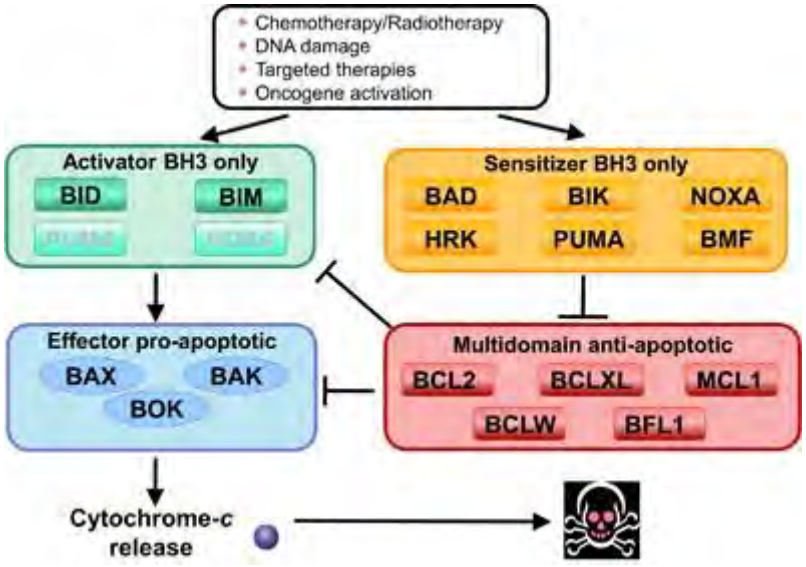


ภาพที่ 3 วิถีอะพอพโทซิส วิถีภายนอก (extrinsic pathway) มี Death receptor จับกับ ligand จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิส และวิถีภายใน (intrinsic pathway) เมื่อเกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการควบคุมกลุ่มยีน *BCL-2* ทำให้ไมโทคอนเดรียหลั่งโปรตีนไซโตโครม ซี (Cytochrome C) (Elkholi, Floros and Chipuk*, 2011)*

ยีนที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิส (Wang et al., 2016)

ยีน *B-cell lymphoma 2* (*BCL2*) เป็นยีนในกลุ่มที่ยับยั้งการตายของเซลล์ในกระบวนการ (anti-apoptotic genes) ซึ่งโปรตีนที่ได้จากยีน *BCL2* ส่วนใหญ่จะอยู่ในเยื่อหุ้มนิวเคลียส เยื่อหุ้มไมโทคอนคอนเดรียและเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม สามารถรักษาเสถียรภาพการทำงานของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียและยับยั้งการถ่ายโอนของโปรตีนที่ทำให้เกิดการตายได้

ยีน *BCL2 associated X* (*BAX*) เป็นยีนในกลุ่มที่ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ (pro-apoptotic gene) ซึ่งโปรตีนที่ได้จากยีน *BAX* ส่วนใหญ่จะอยู่ในไซโตพลาสซึมเมื่อได้รับการกระตุ้น โปรตีนจะถ่ายโอนไปยังไมโทคอนเดรียทำให้ไมโทคอนเดรียมีการทำงานและศักยภาพลดลง และเกิดการปล่อยอะพอพโทติก เฟกเตอร์ (apoptotic factor) ไปยังนิวเคลียส จับกับดีเอ็นเอเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ขึ้น



ภาพที่ 4 ยีน *BAX* ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ (pro-apoptosis) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการปลดปล่อยโปรตีนไซโตโครม ซี (Cytochrome C) และยีน *BCL2* ยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์โดยยับยั้งตัวกระตุ้นและการทำงานของกลุ่มยีนที่ส่งเสริมการเกิดกระบวนการตายของเซลล์ (Montero and Letai, 2018)

เซลล์มะเร็งมีหลากหลายวิธีที่สามารถหลบหลีกการตายของเซลล์ได้ เช่น ยับยั้งการทำงานของโปรตีน Caspase ยับยั้งตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งหรือการควบคุมการเกิดกระบวนอะพอพโทซิสผิดปกติ มีการแสดงออกของยีน *BCL2* มากขึ้นและลดการแสดงออกของยีน *BAX* ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถยับยั้งการเกิดกระบวนการอะพอพโทซิส เพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งและสะสมการกลายพันธ์ต่อไป (Adams and Cory, 1998; Lopez and Tait, 2015) ดังนั้นวิธีหนึ่งในการรักษามะเร็งคือการควบคุมและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วยกระบวนการอะพอพโทซิส และมียาต้านมะเร็งหลายชนิดที่มีเป้าหมายเป็นกระบวนการอะพอพโทซิส สารสกัดที่สามารถชักนำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสหรือสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *BAX* และลดการแสดงออกของยีน *BCL2* (Hassan et al., 2014) จึงเป็นแนวทางสำคัญในการนำสารสกัดมาศึกษาและพัฒนายาสำหรับการรักษาโรคมะเร็งต่อไป

การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเอทานอลจากใบแปะตำปึงที่มีคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการอะพอพโทซิสโดยศึกษาการมีชีวิตของเซลล์และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิสหลังได้รับสารสกัดเอทานอลจากใบแปะตำปึงในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a การศึกษาครั้งนี้อาจเป็นประโยชน์ในการค้นพบการรักษารูปแบบใหม่ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการ

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ดำเนินการ

1. ตู้อบสำหรับอบตัวอย่างใบพืช
2. เครื่องชั่งน้ำหนักสาร (Sartorius BL610 Precision Balance, USA)
3. เครื่องปั่นสำหรับบดตัวอย่างใบพืช
4. กระดาษกรอง (Whatman No.1 filter paper)
5. เครื่องเขย่าสาร รุ่น 3017 (GFL, Germany)
6. ตู้แช่อุณหภูมิ -20 ^{o}C
7. ตู้แช่อุณหภูมิ -80 ^{o}C
8. เครื่องระเหยแอลกอฮอล์รุ่น N-1001V-W (Eyela, USA)
9. ตู้สำหรับเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator)
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
11. Microplate reader (Molecular Devices, USA)
12. ไมโครเพลท 96 หลุม (Corning, USA)
13. ไมโครปิเปต (Gilson, France)
14. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope)
15. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (SpectraMax M3 Microplate reader, Molecular Devices, USA)
16. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich, Zentrifugen D-78532 Tuttlingen, Germany)
17. เครื่อง Real time PCR รุ่น CFX96^{TM} (BIO-RAD, USA)

สารเคมีและตัวอย่างที่ใช้ในการดำเนินการ

1. ตัวอย่างพืชและสารเคมีสำหรับสกัดสารจากใบแปะตำปึง
    1. ใบอ่อนและใบแก่แปะตำปึงสด
    2. 95% ethanol
2. สารเคมีสำหรับใช้ในการเลี้ยงเซลล์
    1. Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO, USA)
    2. Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, USA)
    3. 0.25% (w/v) Trypsin- 0.53 mM EDTA solution (GIBCO, USA)
    4. Phosphate Buffered Saline (PBS) (GIBCO, USA)

5. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (GIBCO, USA)
6. Antibiotic-Actinomycotic (GIBCO, USA)

3. สารเคมีสำหรับการตรวจสอบการมีชีวิต
    1. AlamarBlue (Gold Biotechnology, USA)
    2. Etoposide (Sigma Aldrich, USA)
4. สารเคมีสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ และศึกษาการแสดงออกของยีน
    1. ชุดการสกัดอาร์เอ็นเอ สำเร็จรูป (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Germany)
    2. ชุดน้ำยาสำหรับปฏิกิริยา reverse transcription (cDNA Synthesis,Kit, Biotechrabbit, USA)
    3. ชุดสารเคมีสำหรับ Real-time PCR
        4X CAPITAL^{TM} qPCR Probe Master Mix (Biotechrabbit, USA)
        ไพรเมอร์
        Nuclease-free water

วิธีการดำเนินงาน

1. การเตรียมตัวอย่างและรวบรวมตัวอย่างใบ

จัดซื้อต้นไม้ตัวอย่างจากร้านค้าสมุนไพรในจังหวัดชัยภูมิ ชลบุรี และกรุงเทพฯ นำมาปลูกต่อ ระบุชนิดพันธุ์และนำตัวอย่างแห้งเก็บรักษา ณ พิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิน สุวตะพันธ์ โดย ปริญญานุช กลิ่นรัตน์เป็นผู้ระบุ โดยใช้วิธีอ้างอิงจากหนังสือการเก็บและรักษาตัวอย่างพรรณไม้ (ทวีศักดิ์ บุญเกิดและคณะ, 2530) จากนั้นเก็บตัวอย่างใบอ่อน (ใบที่ 2-3 จากปลายยอด) และใบโตเต็มที่ (ใบที่ 6-7 จากปลายยอด) จากต้นแปะตำปึงจังหวัดกรุงเทพฯ ด้วยตนเองและให้ร้านค้าเก็บตัวอย่างใบอ่อน ใบแก่ต้นแปะตำปึงจังหวัดชัยภูมิ ชลบุรี

2. การสกัดสารจากใบแปะตำปึง

นำใบแปะตำปึงที่รวบรวมได้มาอบที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C (แยกเป็นตัวอย่างใบอ่อน และตัวอย่างใบแก่ และแหล่งที่มาของตัวอย่าง) จนกว่าน้ำหนักคงที่แล้วนำมาบดด้วยเครื่องปั่น นำผงใบที่ได้สกัดด้วยมาเซอเรชัน (Maceration) ด้วยอัตราส่วน 1:3 (ปริมาณผงใบแปะตำปึง :95% เอทานอล ; w/v) หมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที หลังจากนั้นกรองผงใบแปะตำปึงด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วนำผงจากการกรองมาสกัดใหม่ด้วยวิธีการเดิม 1 ครั้ง แล้วเก็บของเหลวในแต่ละครั้งรวมกัน (ดัดแปลงจาก Assa et al., 2014) นำไประเหยแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ

70 °C นำสารที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C จนกว่าน้ำหนักคงที่แล้วเก็บสารที่ได้แช่ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก

เลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a จาก American Type Culture Collection (ATCC) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (v/v) และยาปฏิชีวนะ Antibiotic-Antimycotic 1% (v/v) ภายในตู้เลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37 ºC และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

4. การตรวจสอบผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงต่อการมีชีวิตของเซลล์

นำเซลล์ SiHa และ C33a ใส่ลงใน 96-well plate ให้แต่ละหลุมมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 6,000 เซลล์ บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator) อุณหภูมิ 37°C และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดทั้งหมด 4 ความเข้มข้นช่วง 125 – 1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างน้อย 3 ซ้ำ โดยเจือจางใน DMSO แล้วบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบการมีชีวิตของเซลล์โดยใช้สาร AlamarBlue (Gold Biotechnology, USA) ในการตรวจสอบลงในแต่ละหลุม บ่ม 24 ชั่วโมงแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Molecular Devices, USA) โดยใช้ความยาวคลื่น emission ที่ 570 และ excited ที่ 595 นาโนเมตร ใช้สารละลาย etoposide เป็นสารควบคุมบวก จากนั้นนำเสนอกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (% cell viability) กับความเข้มข้นของสารสกัด โดยใช้สูตร % Viability = (Test OD/ Control OD) x 100 (Rengasamy, 2018) โดยวัดเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ 24 48 ชั่วโมงและคำนวณค่าความเป็นพิษ LC_{50} ที่มีต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก

5. การเตรียมเซลล์มะเร็งปากมดลูกเพื่อนำมาสกัดอาร์เอ็นเอ

เลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (T75 ฟลาสก์) ให้เซลล์มีปริมาณ 80-90% ของภาชนะแล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เตรียมความเข้มข้นที่ LC_{50} ของสารสกัดจากใบแปะตำปึงที่ได้จากการทดลองที่ความเข้มข้น 758.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ SiHa และ 200.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลตรสำหรับ C33a ซึ่งเป็นสารสกัดจากใบแปะตำปึงจังหวัดชัยภูมิ แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เทอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง ใช้ cell scraper ขูดเซลล์เก็บในหลอดทดลองปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำมาใช้สำหรับสกัดอาร์เอ็นเอ

6. ไพรเมอร์สำหรับยีน *BCL2* และ *BAX*

ในการศึกษาผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงที่มีต่อการแสดงออกของยีน ได้ใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน *BCL2 BAX* ที่เป็นยีนเป้าหมายและยีน *GAPDH* สำหรับ reference gene โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ *BCL2*: For 5'- TCGCCCTGTGGATGACTGA – 3'; Rev 5'-CAGAGACAGCC AGGAGAAATCA-3' *BAX*: For 5'-TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC-3'; Rev 5'-TCACCCA ACCACCCTGGTCTT-3'; *GAPDH*: For 5′-GGTCGGAGTCAACGGATTTGG TCG-3'; Rev 5′-CCTCCGACGCCTGCTTCACCAC-3′ ตามที่รายงานโดย Karaliotas et al. (2015) และ Tarze et al. (2007)

7. การสกัดอาร์เอ็นเอ

นำเซลล์จากข้อ 5 มาสกัดอาร์เอ็นเอ โดยล้างคอลัมน์ด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ปริมาตร 30 ไมโครลิตรแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วมากกว่า 8000 g เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้งปรับปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร และใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (Rneasy Mini Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ทางบริษัทแนะนำ หลังจากนั้นเก็บอาร์เอ็นเอในตู้แช่อุณหูมิ -80 ^{o}C

8. การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

นำ RNA ที่สกัดได้มาเป็นแม่แบบในการสังเคราะห์สายคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA) ด้วยชุดน้ำยา cDNA Synthesis Kit (Biotechchrabbit, USA) เริ่มจาก PCR grade water 7 ไมโครลิตร ผสม 5x RT buffer 4 ไมโครลิตร แล้วเติม dNTP Mix (10 ไมโครโมลาร์) 2 ไมโครลิตร ผสม Oligo dT (10 ไมโครโมลาร์) 0.5 ไมโครลิตร ตามด้วย RNase inhibitor 0.5 ไมโครลิตร RevertUP™ Reverse Transcriptase 1 ไมโครลิตร และ RNA template 50 นาโนกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 99 °C เป็นเวลา 6 นาที และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับการทดลองตรวจหาระดับการแสดงออกของยีนต่อไป

9. การตรวจหาระดับการแสดงออกของยีน *BCL2* และ *BAX* ด้วยกระบวนการ Real-time reverse transcription-qPCR (Karaliotas et al., 2015)

เพิ่มปริมาณ DNA ในปฏิกิริยา โดยเริ่มจาก initiation denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกสาย cDNA แล้วตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 วินาที

annealing/extension ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 40 รอบแล้วจึงรักษาอุณหภูมิที่ 4 °C

10. วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *BCL2* และ *BAX*

ศึกษาการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Delta-Delta Ct method) โดยเปรียบเทียบค่า Ct ของยีนเป้าหมาย คือ ยีน *BAX BCL2* และ *GAPDH* เป็น reference gene และคำนวณระดับการแสดงออกของยีนระหว่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ตามสมการของ Livak and Schmittgen, 2001 ดังนี้

$$\text{Fold difference} = 2^{--\Delta\Delta Ct}$$

$$= 2^{-\Delta Ct\ (Test) - \Delta Ct\ (calibrator))}$$

$$= 2^{-[(Ct\ (target,\ test) - Ct\ (ref,\ test)) - (Ct\ (target,\ calibrator) - Ct\ (ref,\ calibrator))]}$$

เมื่อ Ct (target, test) คือ Ct ของยีนเป้าหมายจากเซลล์ที่ได้รับสารทดลอง Ct (ref, test) คือ Ct ของยีนควบคุมจากเซลล์ที่ได้รับสารทดลอง Ct (target, calibrator) คือ Ct ของยีนเป้าหมายจากเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดลอง Ct (ref, calibrator) คือ Ct ของยีนควบคุมจากเซลล์ที่ไม่ได้รับการสารทดลอง

บทที่ 4

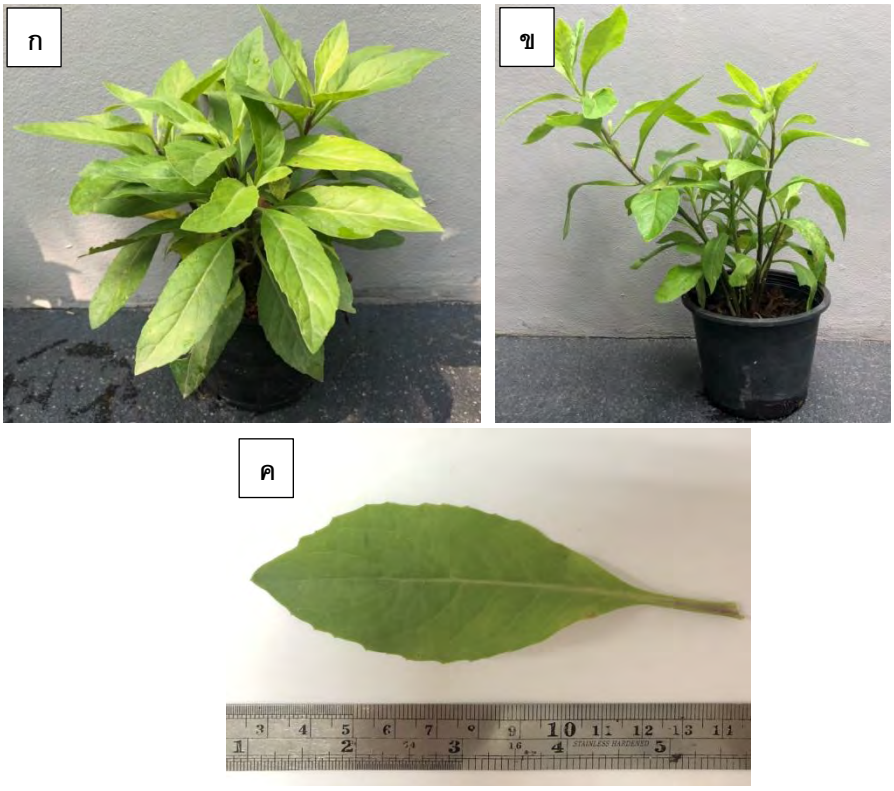
ผลการทดลอง

ระบุชนิดพันธุ์ต้นแปะตำปึง

ระบุชนิดพันธุ์และนำตัวอย่างแห้งเก็บรักษา ณ พิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิน สุวตะพันธ์ โดยคุณปริญญนุช กลิ่นรัตน์ ได้ระบุชนิดพันธุ์เป็น *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. ซึ่งเป็นตัวอย่างต้นไม้จากจังหวัดชัยภูมิ

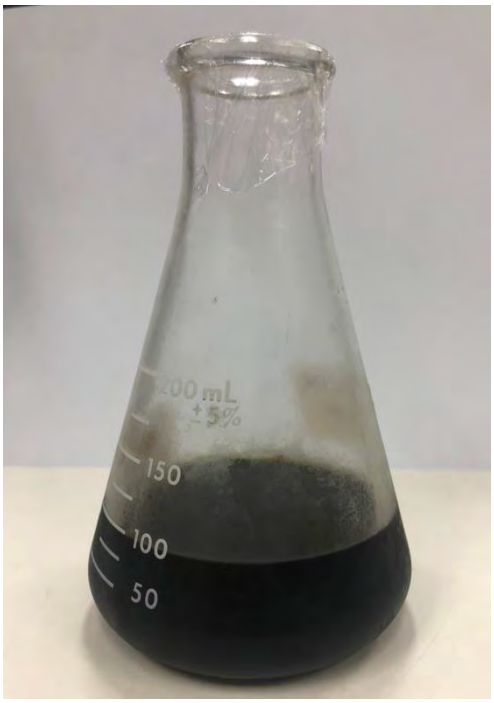
ผลการเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารจากใบแปะตำปึง

รวบรวมตัวอย่างใบจากต้นแปะตำปึง (ภาพที่ 5) นำมาอบด้วยอุณหูมิ 60 °C (ภาพที่ 6 ก.) และนำผงใบ (ภาพที่ 6 ข.) มาสกัดสารด้วยวิธีการมาเซอเรชัน ได้ตัวอย่างสารละลายสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 7) และนำไประเหยแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 70 °C ได้ตัวอย่างสารสกัดทั้งหมด คือ สารสกัดใบแปะตำปึงจังหวัดชลบุรี สารสกัดใบแปะตำปึงจังหวัดชัยภูมิ สารสกัดใบแปะตำปึงจังหวัด ที่มีลักษณะสีเขียวเข้ม กลิ่นฉุน และเหนียวข้น (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 5 ตัวอย่างต้นแปะตำปึง ก) จังหวัดชัยภูมิ ข) จังหวัดชลบุรี ค) ตัวอย่างใบแปะตำปึง

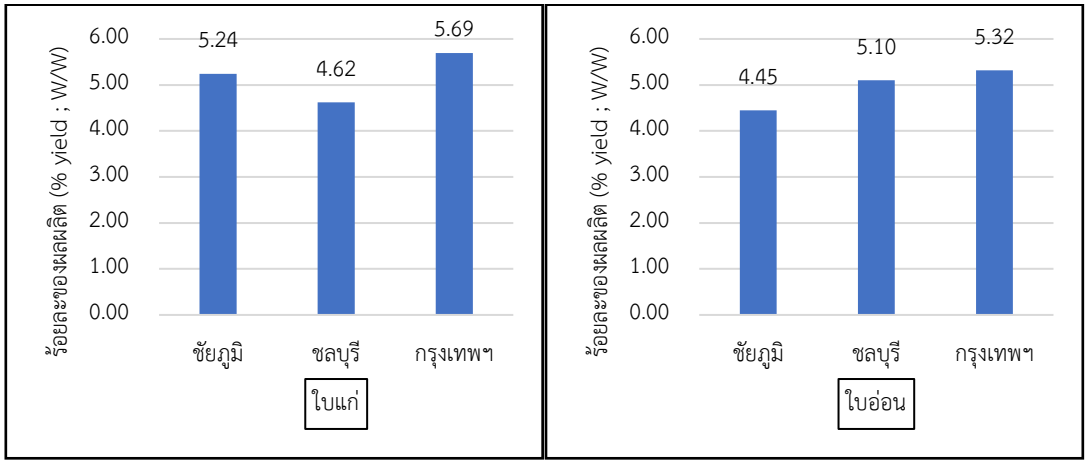
ภาพที่ 6 ตัวอย่างใบแปะตำปึงอ่อนแห้งจังหวัดชัยภูมิ ก) ตัวอย่างใบหลังจากอบที่อุณหภูมิ 60 °C ข) ตัวอย่างใบหลังจากนำมาบดด้วยเครื่องปั่น



ภาพที่ 7 สารละลายผงใบแปะตำปึงที่สกัดด้วยมาเซอเรชัน และกรองผงใบแปะตำปึงด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

ภาพที่ 8 ตัวอย่างสารสกัดที่ได้จากระเหยแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 70 °C

การสกัดใบแปะตำปึงด้วยอัตราส่วนเอทานอล (ปริมาณผงใบแปะตำปึง:95% แอลกอฮอล์ ; w:v) 1:3 โดยใช้วิธีการมาเซอเรชัน พบว่าผลผลิต (% yield ; W/W) จากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนแต่ละจังหวัดอยู่ในช่วง 4.00 – 6.00 % (ภาพที่ 10) โดยใช้ปริมาณผงใบตามตารางที่ 4



ภาพที่ 9 ผลผลิต (% yield ; W/W) ของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากแหล่งต่าง ๆ

ผลการทดลองสารสกัดจากใบแปะตำปึงที่มีต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก

จากการบ่มเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a ด้วยสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนที่ความเข้มข้นช่วง 125 – 1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดจากใบแปะตำปึงมีความสามารถในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ทั้งสองชนิด โดยแสดงผลการลดการมีชีวิตของเซลล์เป็นร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 ผลร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa เมื่อบ่มด้วยสารสกัดจากใบแปะตำปึงโดยแยกใบแก่ ใบอ่อนและแหล่งที่มา เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 125 – 1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	ระยะเวลาบ่ม (ชั่วโมง) / ความเข้มข้น (μg/mL)	ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก					
		125	250	500	750	1000	1250
ใบแก่จากชัยภูมิ	24	109.16	109.22	97.57	-	82.83	-
	48	100.80	96.53	68.23	-	37.96	-
ใบอ่อนจากชัยภูมิ	24	107.80	109.35	111.06	-	98.47	
	48	102.95	102.18	101.94	-	94.30	-
ใบแก่จากชลบุรี	24	-	-	96.61	74.80	2.31	0.93
	48	102.44	76.10	33.85	-	1.64	-
ใบอ่อนจากชลบุรี	24	-	-	107.69	98.97	33.14	0.26
	48	-	-	105.2	92.31	12.92	2.65
ใบแก่จากกรุงเทพ	24	98.39	94.91	78.98	-	48.90	-
	48	94.78	84.68	63.75	-	39.22	-
ใบอ่อนจากกรุงเทพ	24	101.76	97.47	67.60	-	13.62	-
	48	106.96	82.91	59.44	-	14.19	-

ตารางที่ 2 ผลร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a เมื่อบ่มด้วยสารสกัดจากใบแปะตำปึงโดยแยกใบแก่ ใบอ่อนและแหล่งที่มา เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 125 – 1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	ระยะเวลาบ่ม (ชั่วโมง) / ความเข้มข้น (μg/mL)	ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก					
		125	250	500	750	1000	1250
ใบแก่จากชัยภูมิ	24	66.56	53.87	28.81	-	3.39	-
	48	59.17	47.79	27.74	-	0.00	-
ใบอ่อนจากชัยภูมิ	24	58.25	48.30	33.72	-	3.77	-
	48	78.23	48.73	27.44	-	0.95	-
ใบแก่จากชลบุรี	24	52.49	39.69	33.89	-	0.79	-
	48	95.20	76.44	15.88	-	0.00	-
ใบอ่อนจากชลบุรี	24	58.68	55.54	18.48	-	1.09	-
	48	10.09	40.27	7.35	-	1.05	-
ใบแก่จากกรุงเทพ	24	73.60	71.20	52.50	-	14.80	-
	48	82.78	71.27	43.98	-	5.15	-
ใบอ่อนจากกรุงเทพ	24	98.97	87.12	60.79	-	4.43	-
	48	69.11	44.26	25.68	-	1.79	-

สรุปผลการทดลองเปอร์เซ็นการมีชีวิตของเซลล์ที่ลดลงครึ่งหนึ่ง (LC_{50})

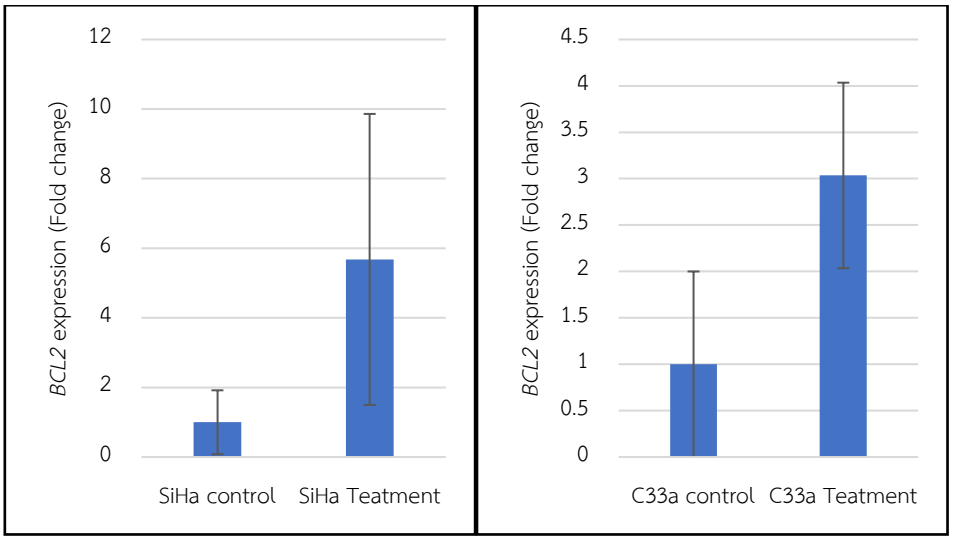
จากผลการทดลองผลการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่บ่มด้วยสารสกัดจากใบแปะตำปึง พบว่าสารสกัดจากใบแปะตำปึงสามารถลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งชนิด SiHa และ C33a ได้ และสามารถหาค่าเปอร์เซ็นการมีชีวิตของเซลล์ที่ลดลงครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) มีเพียงสารสกัดจากใบแปะตำปึงอ่อนจังหวัดชัยภูมิไม่มีความสามารถในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ได้ สำหรับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ค่า LC_{50} ที่ดีที่สุดอยู่ที่ 625.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารสกัดจากใบแปะตำปึงอ่อนจังหวัดกรุงเทพที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และสำหรับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ค่า LC_{50} ที่ดีที่สุดอยู่ที่ 143.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่จังหวัดชลบุรีที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบแปะตำปึงโดยแยกใบแก่ ใบอ่อน แหล่งที่มาและระยะเวลาบ่ม ที่สามารถลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a ครึ่งหนึ่ง

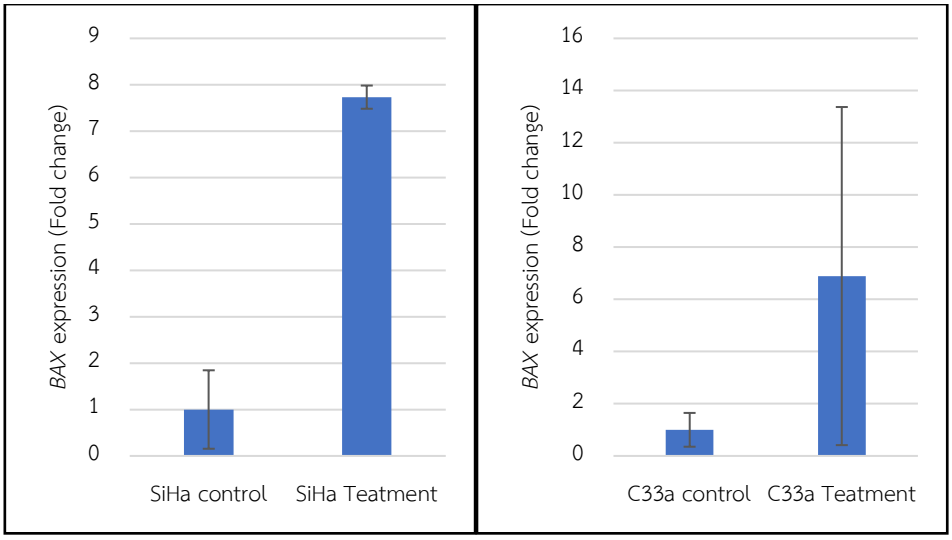
สารสกัดจากใบแปะตำปึง	ระยะเวลาบ่ม (ชั่วโมง)	LC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
		SiHa	C33a
ใบแก่จากชัยภูมิ	24	-	302.55
	48	816.11	223.75
ใบอ่อนจากชัยภูมิ	24	-	240.47
	48	-	330.00
ใบแก่จากชลบุรี	24	831.01	143.43
	48	650.25	440.01
ใบอ่อนจากชลบุรี	24	939.20	230.09
	48	895.86	184.63
ใบแก่จากกรุงเทพฯ	24	989.18	512.28
	48	796.50	477.72
ใบอ่อนจากกรุงเทพฯ	24	661.34	586.66
	48	625.47	259.13

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิส

จากการศึกษาผลการแสดงออกของยีนในเซลล์ชนิด SiHa และ C33a ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่บ่มด้วยสารสกัดจาดใบแปะตำปึงที่ความเข้มข้น LC_{50} ที่ความเข้มข้น 758.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเซลล์ชนิด SiHa และที่ความเข้มข้น 200.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเซลล์ชนิด C33a เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีการ Realtime-PCR พบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *BCL2* และ *BAX* โดยกลุ่มทดลองมีการแสดงออกของยีน *BCL2* มากกว่ากลุ่มควบคุม 5.68 เท่า และ 3.03 เท่าตามลำดับ (ภาพที่ 10) และมีการแสดงออกของยีน *BAX* มากกว่ากลุ่มควบคุม 7.73 เท่า และ 6.89 เท่าตามลำดับ (ภาพที่ 11) และเมื่อคิดวิเคราะห์ทางสถิติด้วย independent sample t-test โดยใช้ Sig. ที่ 0.05 (ความเชื่อมั่นที่ 95%) พบว่าการแสดงออกของยีน *BCL2* และ *BAX* ที่เพิ่มขึ้นในทั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิด ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุม

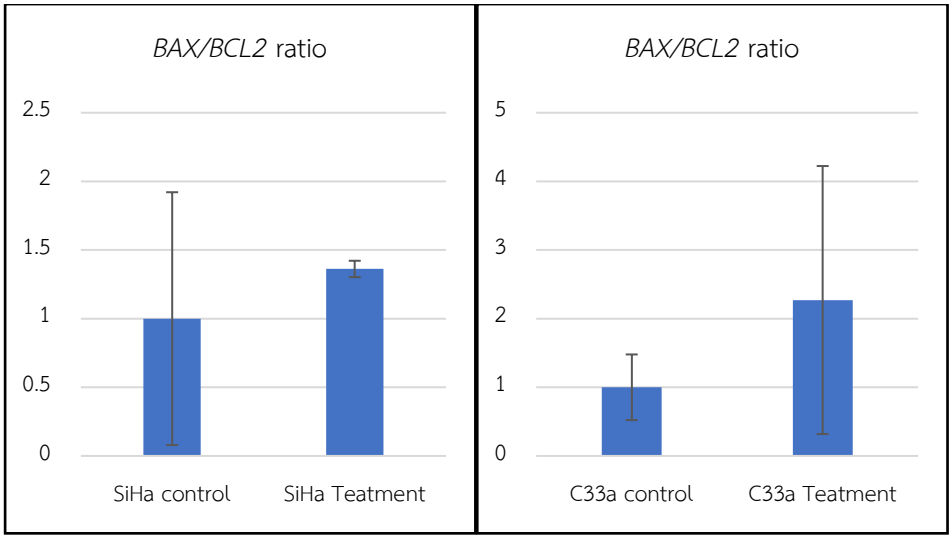


ภาพที่ 10 การแสดงออกของยีน *BCL2* จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a (error bar = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



ภาพที่ 11 การแสดงออกของยีน *BAX* จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a (error bar = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

อัตราส่วนผลการแสดงออกของยีน *BAX* ต่อการแสดงออกของยีน *BCL2* ในเซลล์ชนิด SiHa และ C33a ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง พบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa มีการเพิ่มอัตราส่วนผลการแสดงออกของยีน *BAX* ต่อการแสดงออกของยีน *BCL2* โดยกลุ่มทดลองมีอัตราส่วนมากกว่ากลุ่มควบคุม 1.36 เท่า– และในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a มีอัตราส่วนมากกว่ากลุ่มควบคุม 2.27 เท่า (ภาพที่ 12) และเมื่อคิดวิเคราะห์ทางสถิติด้วย independent sample t-test โดยใช้ Sig. ที่ 0.05 (ความเชื่อมั่นที่ 95%) พบว่าอัตราส่วนผลการแสดงออกของยีน *BAX* ต่อการแสดงออกของยีน *BCL2* เพิ่มขึ้นในทั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิด ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 12 อัตราส่วนผลการแสดงออกของยีน *BAX* ต่อการแสดงออกของยีน *BCL2* จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a (error bar = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สารสกัดจากใบแปะตำปึงมีความสามารถในการชักนำให้เกิดการตายด้วยกระบวนการอะพอพโทซิสได้ เนื่องจากมีการแสดงออกของยีน *BAX* มากกว่าการแสดงออกของยีน *BCL2* และอัตราส่วนผลการแสดงออกของยีน *BAX* ต่อการแสดงออกของยีน *BCL2* ในเซลล์ชนิด SiHa และ C33a ในกลุ่มทดลองมากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งยีน *BAX* เป็นยีนที่ชักนำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสได้และยีน *BCL2* เป็นยีนที่ยับยั้งการเกิดกระบวนการอะพอพโทซิส

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

Gynura procumbens (Lour.) Merr. หรือ แปะตำปึงมักนิยมนำมาบริโภคเป็นสมุนไพรในรักษาโรคต่าง ๆ ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้า นำใบแปะตำปึงมาสกัดด้วยวิธีการมาเซอเรชัน โดยเลือกใช้เอทานอล มาทดสอบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งพบว่าสารสกัดใบแปะตำปึงมีฤทธิ์เป็นพิษสามารถยับยั้งการแพร่กระจายและกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งกระดูกชนิด U2-OS โดยยับยั้ง nuclear factor kappa B (NF-kB) (Wang et al., 2013) ซึ่งมีอิทธิพลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์ (Albensi, 2019) และมีความสามารถในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์มะเร็งเต้านมได้ (Nurulita, Meiyanto and Sugiyanto, 2011) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่สารสกัดจากใบแปะตำปึงมีความสามารถในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งชนิด SiHa และ C33a ได้ ทั้งนี้สารสกัดจากใบแปะตำปึงยังไม่สามารถนำไปประยุกต์สำหรับการนำมาผลิตยารักษามะเร็ง เนื่องจากงานวิจัยนี้ไม่มีการศึกษาผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงต่อการมีชีวิตของเซลล์มนุษย์ปกติ จึงต้องมีการศึกษาต่อไปในเซลล์มนุษย์ปกติชนิดอื่น ๆ เพื่อวิเคราะห์ความปลอดภัยต่อการนำมาประยุกต์เป็นยารักษาต่อไป

โดยสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Hazafa A. et al., 2020; Wahle K. W. et al., 2010) ซึ่งการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดสารจากใบแปะตำปึงจะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากกว่าการสกัดด้วยน้ำ (Afandi et al., 2014) และการใช้เมทานอลนั้นเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงเมื่อเทียบกับเอทานอล (Pohanka, 2016) ซึ่งในการศึกษานี้ การทดลองสกัดใบแปะตำปึงด้วยวิธีมาเซอเรชัน อัตราส่วน 1:3 (ปริมาณผงใบแปะตำปึง:95% แอลกอฮอล์ ; w:v) โดยแยกใบแก่และใบอ่อนแต่ละแหล่ง พบว่าได้ผลผลิตร้อยละประมาณ 4.00 - 6.00 ซึ่งขนาดของผงใบที่เล็กลงและใช้เวลาในการแช่ผงใบเพิ่มขึ้นมีผลต่อการเพิ่มปริมาณผลผลิต (Hainorita H. et al., 2016)

จากผลการทดสอบผลของสารสกัดที่มีต่อเซลล์ปากมดลูกจากใบแปะตำปึงแก่และใบแปะตำปึงอ่อน ที่สกัดด้วยวิธีการมาเซอเรชัน โดยใช้เอทานอลนำมาใช้ทดสอบความเป็นพิษ LC_{50} แก่เซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยวิธี AlamarBlue assay พบว่าสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่จากจังหวัดชัยภูมิมีความสามารถในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และใบแปะตำปึงอ่อนไม่มีผลต่อการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa แสดงว่าอายุของใบมีผลต่อการลดลง

ของเปอร์เซ็นการมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งอายุของใบอาจมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีผลต่อการลดลงของเปอร์เซ็นการมีชีวิตของเซลล์ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากใบตำปึงอ่อนในจังหวัดชลบุรีและกรุงเทพฯ ยังมีความสามารถในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ทั้งนี้ได้มีการศึกษาว่าอายุของใบ ระยะเวลาการเก็บเกี่ยว อุณหภูมิในแต่ละพื้นที่ปลูก ปริมาณธาตุอาหารภายในดิน มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ (ภาวิณี อารีศรีสม และคณะ, 2561; เสาวภา ชูมณี และรุจิรา คุ้มทรัพย์, 2563; Anwar, K. et al., 2017) เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกในพืชส่วนใหญ่จะถูกผลิตขึ้นเมื่อพืชเกิดความเครียด ดังนั้นพืชที่เจอกับปัจจัยดังกล่าวที่ไม่เหมาะสม จะนำไปสู่กลไกการตอบสนองต่อความเครียดของพืช (Ali, 2014) อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับอายุของใบในพืชในแต่ละชนิดซึ่งได้มีการศึกษาก่อนหน้าว่าใบแก่ของมะนาวโห่มีการสะสมปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าใบอ่อน โดยระยะใบแก่เป็นระยะที่ใบมีอายุมาก จึงมีการสะสมสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าใบระยะอื่น ๆ (ภานุวัฒน์ สีพันธ์ และคณะ, 2560) ซึ่งมีความขัดแย้งกับการศึกษาสารประกอบฟีนอลิกใบแบล็กเบอร์รี่ที่ใบอ่อนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด (Wang and Lin, 2000)

ดังนั้นการทดลองสารสกัดจากใบแปะตำปึงแต่ละแหล่งอาจส่งผลต่อสารที่มีผลต่อการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ ด้วยตัวอย่างใบแปะตำปึงจังหวัดชัยภูมิได้ถูกปลูกบนภูเขา ตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรีเป็นตัวอย่างจากโรงเพาะปลูก และตัวอย่างจากจังหวัดกรุงเทพฯเป็นตัวอย่างที่ปลูกเอง จากผลค่า LC_{50} พบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ค่า LC_{50} ที่ดีที่สุดเป็นสารสกัดจากใบแปะตำปึงอ่อนจังหวัดกรุงเทพ และสำหรับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ค่า LC_{50} ที่ดีที่สุดคือสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่จังหวัดชลบุรี สมมติฐานได้ว่าสารสกัดจากใบแปะตำปึงจากจังหวัดกรุงเทพฯและจังหวัดชลบุรี เกิดความเครียดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจากการเพราะปลูกเองซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้มีผลต่อการผลิตสารที่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกภายในพืช ซึ่งต่างจากการปลูกบนภูเขาตามธรรมชาติที่เป็นตัวอย่างจากชัยภูมิ

แม้ว่าสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่จากจังหวัดชัยภูมิมีความสามารถในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ได้มากกว่าสารสกัดจากใบแปะตำปึงอ่อน ด้วยเหตุปัจจัยอายุของใบ ทั้งนี้ปริมาณผงใบที่ใช้สำหรับการสกัดสารนั้นแตกต่างจากปริมาณผงใบจากจังหวัดชลบุรีและกรุงเทพฯ แม้ว่ามีอัตราส่วน 1:3 เท่ากัน โดยขนาดของขวดที่ใช้สำหรับการเขย่าสารมีขนาดเท่ากันซึ่งอาจส่งผลต่อการละลายของสารที่มีผลต่อการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ทำให้สารสกัดจากใบแปะตำปึงอ่อนไม่ส่งผลต่อการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งชนิด SiHa ในการทดลองนี้ได้ และมีเพียงสารสกัดจากกรุงเทพฯที่เก็บตัวอย่างใบสดด้วยตนเองจึงทำให้ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าอายุของใบแก่และใบอ่อนมีผลต่อมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a และ SiHa ได้อย่างชัดเจน

จากผลการทดสอบการมีชีวิตที่สารสกัดจากใบแปะตำปึงจังหวัดชัยภูมิมีความสามารถในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ลงได้ทั้งในใบแก่และใบอ่อน เนื่องจากต้นกำเนิดการเกิดมะเร็งปากมดลูกในทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างกัน โดยมีการศึกษาผลของการใช้ยาเคมีบำบัดต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33a พบว่ามีการลดการมีชีวิตของเซลล์จะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดเซลล์และชนิดของยาเคมีบำบัด (Filippova, M. et al., 2014; Saxena, A. et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้ที่เซลล์ทั้ง 2 ชนิดมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับอะพอพโทซิสหรือกระบวนการตายของเซลล์ จะมีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ของเซลล์ได้เนื่องจากเป็นกระบวนการสำคัญในสภาวะสมดุลจำนวนของเซลล์ ในการทดลองครั้งนี้พบว่าผลการแสดงออกของมีการเพิ่มแสดงออกของทั้งยีน *BCL2* ที่เป็นยีนยับยั้งการเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสและยีน *BAX* ที่เป็นยีนกระตุ้นการเกิดกระบวนการอะพอพโทซิส ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a โดยการยับยั้งเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสของยีน *BCL2* อาจไม่สอดคล้องกับการเกิดกระบวนอะพอพโทซิสเสมอไป ซึ่งมีงานวิจัยผลของโคเคนต่อเซลล์สมองในหนู โดยให้อาหารที่ผสมโคเคนให้กับหนูทดลองที่ตั้งครรภ์ พบว่าเซลล์สมองของลูกหนูเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสและเมื่อทดสอบผลการแสดงออกของยีนพบว่ามีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *BCL2* หลังจากให้อาหารที่ผสมโคเคน (Xiao, D. and Zhang, L., 2008.)

จากผลการแสดงออกของยีน *BAX* และอัตราส่วนการแสดงออกของยีน *BAX* ต่อการแสดงออกของยีน *BCL2* ในกลุ่มทดลองมีการแสดงออกและอัตราส่วนมากกว่ากลุ่มควบคุม แม้ว่าผลการทดสอบทางสถิติไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญ แต่มีแนวโน้มที่ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงมีผลต่อการชักนำการเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสในวิถีภายในได้ ทั้งนี้ในวิถีภายนอกยังไม่สามารถบอกได้เนื่องจากงานวิจัยไม่มีการทดสอบโปรตีนหรือการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีภายนอก เช่น TNF-α ซึ่งเป็นลิแกนด์ที่สามารถจับกับ TNFR ได้

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารสกัดใบแปะตำปึงแก่จากจังหวัดชัยภูมิสำหรับทดลองผลการแสดงออกของยีน เนื่องจากสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่มีความสามารถในการลดการมีชีวิตของเซลล์มากกว่าใบอ่อนในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa แต่มีความสามารถในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ได้ทั้งในใบแก่และใบอ่อน ดังนั้นจึงสนใจสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่จังหวัดชัยภูมิที่อาจมีต่อผลการแสดงออกของยีน *BAX* และ *BCL2* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้การเลือกสารสกัดที่ใช้สำหรับดูการแสดงออกคือ สารสกัดที่มีค่า

LC_{50} น้อยที่สุดหรือมีประสิทธิภาพในการลดการมีชีวิตของเซลล์ได้มากที่สุด เพื่อดูประสิทธิภาพของสารสกัดว่ามีผลต่อการลดหรือเพิ่มการแสดงออกของยีน *BAX* และ *BCL2* อย่างไร

การศึกษาในอนาคตควรใช้เทคนิคอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น ใช้อัตราส่วนอื่น ๆ ในการสกัดสารจากใบแปะตำปึง การใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมทรี (gas spectrophotometry) เพื่อวิเคราะห์ถึงองค์ประกอบของสารและระบุสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในแปะตำปึงที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ รวมถึงควรทำกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ ว่าเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่นอกเหนือจากการทดสอบในครั้งนี้ ควบคุมปัจจัยแวดล้อมสำหรับการปลูกพืชที่นำมาสกัดสาร เพื่อให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารสกัดในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ชัดเจนมากขึ้น และศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิสเพิ่มเติม เช่น *BAK BOK BCL-XL* (Montero and Letai, 2018) เพื่อยืนยันผลของสารสกัดใบแปะตำปึงที่มีต่อยีนที่ทำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิส

บทที่ 6

เอกสารอ้างอิง

เจตน์ วันแต่ง, อุษา ถนอมเงิน และวรางคณา อ่อนทรวง. 2557. การศึกษาการติดเชื้อ HPV สายพันธ์ที่เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกในสตรีที่รับการคัดกรองในโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล. ใน การประชุมวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 22, นครสรรค์ : ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์.

ทวีศักดิ์ บุญเกิด และคณะ. 2530. การเก็บและรักษาตัวอย่างพันธุ์ไม้. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร ฯ : อมรินทร์ พริ้นติ้ง กรุ๊พ จำกัด.

ปกป้อง ประยงค์, นาถธิดา วีระปรียากูร และสหพัฒน์ บรัศว์รักษ์. 2550. อะพอพโทซิส: วิถีและการตรวจวัด. วารสารวิจัยสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 21 : 227-238.

ภานุวัฒน์ สีพันธ์, สกุลกานต์ สิมลา, สุรศักดิ์ บุญแต่ง และชฎาพร เสนาคุณ. 2560. ระยะพัฒนาการต่อปริมาณสารพฤกษเคมีและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในใบมะนาวโห่. แก่นเกษตร 45 : 336-341.

ภาวิณี อารีศรีสม, นรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์, เทิดศักดิ์ โทณลักษณ์, กอบลาภ อารีศรีสม และสัตยา มั่นคง. 2562. ผลของระยะเก็บเกี่ยวต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ในระบบปลูกแบบอินทรีย์และเคมีของบัวบก. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 27 : 904-914.

สมถวิล ลูกรักษ์, แม้นมนา จิระจรัส, สุวรรณี สิริเลิศตระกูล และ จิตประภา คนมั่น. 2556. ชนิดของยารักษามะเร็ง. ใน คู่มือการดูแลตนเองขณะได้รับยาเคมีบำบัด. หน้า 6. กรุงเทพมหานครฯ : โครงการให้ความรู้และสนับสนุนผู้ป่วยมะเร็ง ศูนย์มะเร็ง ศูนย์เพื่อความเป็นเลิศคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี.

เสาวภา ชูมณี และรุจิรา คุ้มทรัพย์. 2563. การหาปริมาณสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและแร่ธาตุจากใบถั่วดาวอินคา. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม 5 : 98-113.

อรพิน พวกแก้ว และคณะ. 2558. ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2558. กรุงเทพมหานครฯ : กลุ่มงานเทคโนโลยีสารสนเทศ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ.

Adams and Cory 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 281 : 1322-1326.

Afandi, A., Sadikun, A. and Ismail, S. 2014. Antioxidant properties of *Gynura procumbens* extracts and their inhibitory effects on two major human recombinant

cytochrome P450s using a high throughout luminescence assay. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 7 : 36-41.

Akhtar and Bokhari. 2021. Apoptosis. Treasure Island (FL) : StatPearls.

Akowuah G, Sadikun A and Mariam A. 2002. Flavonoid identification and hypoglycemic studies of the butanol fraction from *Gynura procumbens*. Pharmaceutical Biology 40: 405–410.

Albensi, B. C. 2019. What is nuclear factor kappa B (NF-**K**B) doing in and to the mitochondrion? Frontiers in Cell and Developmental Biology 7 : 154.

Ali, M. B. 2014. Secondary metabolites and environmental stress in plants: biosynthesis, regulation, and function. Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment : 55-85.

Anwar, K., Rahmanto, B., Triyasmono, L., Rizki, M. I., Halwany, W., and Lestari, F. 2017. The influence of leaf age on total phenolic, flavonoids, and free radical scavenging capacity of *Aquilaria beccariana*. Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences 8 : 129-133.

Assa, J.R., Widjanarko, S.B., Kuanadi, J., and Berhimpon, S. 2014. Antioxidant potential of flesh, seed and mace of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt). International Journal of ChemTech Research 6 : 2460-2468.

Bergot, A. S., Kassianos, A., Frazer, I. H. and Mittal, D. 2011. New approaches to immunotherapy for HPV associated cancers. Cancers 3 : 3461-3495.

Bhatla, N., et al. 2019. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. The International Journal of Gynecology and Obstetrics 145 : 129-135.

Brisson, M. and Drolet, M. 2019. Global elimination of cervical cancer as a public health problem. The Lancet Oncology 20 : 319-321.

Cancer.Net Editorial Board. Cervical Cancer: Types of Treatment [Online]. 2019 Available from : https://www.cancer.net/cancer-types/cervical-cancer/types-treatment [2020, September 9].

Elkholi R., Floros K. V. and Chipuk J.E. 2011. The role of BH3-only proteins in tumour cell development signaling, and treatment. Genes and Cancer 2 : 523-537.

Filippova, M., Filippov, V., Williams, V. M., Zhang, K., Kokoza, A., Bashkirova, S., and Duerksen-Hughes, P. 2014. Cellular levels of oxidative stress affect the response

of cervical cancer cells to chemotherapeutic agents. BioMed Research International 2014

Fuentes-González, A. M., Contreras-Paredes, A., Manzo-Merino, J. and Lizano, M. 2013. The modulation of apoptosis by oncogenic viruses. Virology Journal 10 : 182.

Galluzzi et al., 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. Cell Death and Differentiation 14 : 1237.

Galluzzi et al., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death & Differentiation 19 : 107-120.

Giampietri, Paone and D'Alessio, 2014. Cell death. International journal of cell biology 2014 : 864062.

Gofur, A., Hamid, I. S. and Listyorini, D. 2015. Gene *p53* mutations after the induction of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) and administration of anti-carcinogenesis properties of *Gynura procumbens* in Sprague Dawley rats. Biomedical Engineering 1 : 53-57.

Grace, V. M., Shalini, J. V., Lekha, T. T., Devaraj ,S. and Devaraj, H. 2003. Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Gynecologic Oncology 91 : 51-58.

Hainorita, H., Rahimah, S., Norfahana, A.T., Ramlan, A., Chua, L.S. and Zarani, M.T., 2016. Extraction of *Gynura procumbens* leaves (Sambung Nyawa) with different parameters using maceration process. 6th International Conference on Biotechnology for the Wellness Industry : 131-133.

Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., and Sakuragi, N. 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. BioMed research international 2014

Hazafa, A., Rehman, K. U., Jahan, N., and Jabeen, Z. 2020. The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells. Nutrition and Cancer 72 : 386-397.

Hew, C. S., Khoo, B. Y., and Gam, L. H. 2013. The anti-cancer property of proteins extracted from *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. PLoS One 8 : e68524.

Iskander, M. N., Song, Y., Coupar, I. M. and Jiratchariyakul, W. 2002. Anti-inflammatory screening of the medicinal plant *Gynura procumbens*. Plant Foods for Human Nutrition 57 : 233-244.

Kaewseejan, N., Puangpronpitag, D. and Nakornriab, M. 2012. Evaluation of phytochemical composition and antibacterial property of *Gynura procumbens* extract. Asian Journal of Plant Science and Research 11 : 77-82.

Kaewseejan, N., Sutthikhum, V. and Siriamornpun, S. 2015. Potential of *Gynura procumbens* leaves as source of flavonoid-enriched fractions with enhanced antioxidant capacity. Journal of Functional Foods 12 : 120-128.

Karaliotas, G. I., Mavridis, K., Scorilas, A., and Babis, G. C. 2015. Quantitative analysis of the mRNA expression levels of *BCL2* and *BAX* genes in human osteoarthritis and normal articular cartilage: An investigation into their differential expression. Molecular Medicine Reports 12 : 4514-4521.

Klapsinou, E., et al. 2015. *Bax* and *Bak* expression in cervical smears of women with low and high-risk HPV types: a study of 120 cases. Journal of Cytology 32 : 223

Kumar V. et al. 2010. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia, Saunders.

Kuwana et al., 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. Molecular Cell 17 : 525-535.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods 25 : 402-408.

Lopez and Tait 2015. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. British Journal of Cancer 112 : 957-962.

Lwin, K. M. and Lwin, M. K. T. 2011. *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. Medicinal Plant Series 1 : 1-14.

Malaguarnera, L. 2004. Implications of apoptosis regulators in tumorigenesis. Cancer and Metastasis Reviews 23 : 367-387.

Meiyanto, E. and Septisetyani, E. P. 2005. Antiproliferative activity and apoptosis induction of phenolic fraction *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. leaves ethanolic extract on HeLa cells. Artocarpus 5 : 74-80.

Momenimovahed, Z., Ghoncheh, M., Pakzad, R., Hasanpour, H. and Salehiniya, H. 2017. Incidence and mortality of uterine cancer and relationship with Human Development Index in the world. Cukurova Medical Jounal 42 : 233-40.

Montero, J. and Letai, A. 2018. Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? Cell Death and Differentiation 25 : 56-64.

Mou, K. M. and Dash, P. R. 2016. A comprehensive review on *Gynura procumbens* leaves. International Journal of Pharmacognosy 3 : 167-174.

Nurulita, N.A., Meiyanto, E. and Sugiyanto, S., 2011. Selectivity of ethyl acetate fraction of *Gynura Procumbens* on colon cancer and breast cancer. Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention 2 : 274-280.

Pohanka, M. 2016. Toxicology and the biological role of methanol and ethanol: Current view. Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc 160 : 1

Rahman, M. and Al Asad, S. 2013. Chemical and biological investigations of the leaves of *Gynura procumbens*. International Journal of Biosciences 3 : 36-43.

Rautava, J. and Syrjänen, S. 2012. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. Head and Neck Pathology 6 : 3-15.

Renehan, A. G., Booth, C. and Potten, C. S. 2001. What is apoptosis, and why is it important? BMJ (Clinical research ed.) 322 : 1536-1538.

Rengasamy, G., Venkataraman, A., Priya, N. and Jainu, M. 2018. Cytotoxic and apoptotic potential of *Myristica fragrans* Houtt. (mace) extract oh human oral epidermal carcinoma KB cell lines. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 54 : e18028.

Rosidah, M. Y., Sadikun, A. and Asmawi, M. 2008. Antioxidant potential of *Gynura procumbens*. Pharmaceutical Biology 46 : 616-625.

Saxena, A., Yashar, C., Taylor, D.D. and Gercel-Taylor, C., 2005. Cellular response to chemotherapy and radiation in cervical cancer. American Journal of Obstetrics and Gynecology 192 : 1399-1403.

Tarze A. 2007. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. Oncogene 26 : 2606-2620.

The American Cancer Society. Immunotherapy for Cervical Cancer [Online]. 2020 Available from : https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/treating/immunotherapy.html [2020, September 27]

Wahle, K. W., Brown, I., Rotondo, D., and Heys, S. D. 2010. Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. Bio-Farms for Nutraceuticals : 36-51.

Wang, H., Zhou, J. W., Fu, D. H., Zhou, Y., Cheng, W. Z. and Liu, Z. L. 2013. *Gynura procumbens* ethanolic extract suppresses osteosarcoma cell proliferation and metastasis *in vitro*. Oncology Letters 6 : 113-117.

Wang, Q. et al., 2016. The relationship between the Bcl-2/Bax proteins and the mitochondria-mediated apoptosis pathway in the differentiation of adipose-derived stromal cells into neurons. PloS One 11 : e0163327.

Wang, S. Y., and Lin, H. S. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 : 140-146.

Wang, X., Huang, X. and Zhang, Y. 2018. Involvement of human papillomaviruses in cervical cancer. Frontiers in Microbiology 9 : 2896.

Wong, S. K., et al. 2015. Anti-malarial and anti-inflammatory effects of *Gynura procumbens* are mediated by kaempferol via inhibition of glycogen synthase kinase-3β (GSK3β). Sains Malaysiana 44 : 1489-1500.

Yee, C., Krishnan-Hewlett, I. N. D. I. R. A., Baker, C. C., Schlegel, R. and Howley, P. M. 1985. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. The American Journal of Pathology 119 : 361.

Youle and Strasser. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature Reviews Molecular Cell Biology 9 : 47-59.

Xiao, D. and Zhang, L., 2008. Upregulation of *Bax* and *Bcl-2* following prenatal cocaine exposure induces apoptosis in fetal rat brain. International Journal of Medical Sciences 5 : 295.

Zahra, A. A., et al. 2011. Acute toxicity study and wound healing potential of *Gynura procumbens* leaf extract in rats. Journal of Medicinal Plants Research 5 : 2551-2558

Zhivotovsky, B. and Kroemer, G. 2004. Apoptosis and genomic instability. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5 : 752-762.

ภาคผนวก ก

ผลผลิตที่ได้จากการสกัดใบแปะตำปึง

ตารางที่ 4 ปริมาณผลผลิตที่ได้จากการสกัดใบแปะตำปึง

ชนิดใบแปะตำปึงจากแหล่งต่าง ๆ	ปริมาณผงใบแปะตำปึง (กรัม)	ปริมาณสารสกัด (กรัม)	ร้อยละผลผลิต (w/v)
ใบแก่จากชัยภูมิ	20.08	1.05	5.24
ใบอ่อนจากชัยภูมิ	20.05	0.89	4.46
ใบแก่จากชลบุรี	5.00	0.23	4.62
ใบอ่อนจากชลบุรี	10.03	0.51	5.10
ใบแก่จากกรุงเทพฯ	14.74	0.84	5.96
ใบอ่อนจากกรุงเทพฯ	9.03	0.48	5.32

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

1. ผง Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1 ซอง ผสมน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
2. ชั่งปริมาณผงโซเดียมไฮโดรเจนคาบอเนตเพื่อปรับ pH ลงในขวด
3. นำไปอาหาร DMEM ไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ
4. เก็บไว้ในตู้เย็นสำหรับการเตรียมอาหาร complete DMEM

Complete DMEM

1. แบ่งอาหาร DMEM 89 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. เติม Fetal bovine serum (FBS) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร
3. เติม Antibiotic-Antimycotic ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

การวัดระดับการแสดงออกของยีน

ขั้นตอนการสกัด RNA

1. เตรียมตัวอย่างเซลล์ลงในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร เติม Buffer RLT ปริมาณ 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. เติมเอทานอลปรับปริมาตรให้มีความเข้มข้นเอทานอล 70% ผสมให้เข้ากัน
3. ดูดสารละลายเอทานอลลงในคอลัมน์ 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 g เป็นเวลา 15 วินาที เทสารละลายภายในหลอดทดลองทิ้ง
4. เติม Buffer RW1 ปริมาณ 700 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 g เป็นเวลา 15 วินาที เทสารละลายภายในหลอดทดลองทิ้ง

5 เติม Buffer RPE ปริมาณ 500 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 g เป็นเวลา 15 วินาที แล้วเทสารละลายภายในหลอดทดลองทิ้ง

6. เติม Buffer RPE ปริมาณ 500 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000g เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทสารละลายภายในหลอดทดลองทิ้ง
7. เติม RNase-free water ปริมาณ 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000g เป็นเวลา 1 นาที
8. เก็บสารละลายภายในหลอดทดลองที่อุณหูมิ 80°C และใช้สำหรับในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 5 สารเคมีสำหรับการสังเคราะห์ cDNA

ชนิดสาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
PCR Grade Water		7
5x Reverse Transcriptase Buffer	1x	4
dNTP mix	1 mM	2
Oligo $(dT)_{12-18}$	0.25 mM	0.5
RNase Inhibitor	1 U/μl	0.5
RevertUP™ II Reverse Transcriptase	10 U/μl	1
RNA template	50 – 500 ng	5
	ปริมาตรรวม	20

ตารางที่ 6 สารเคมีสำหรับเทคนิค Real-time PCR

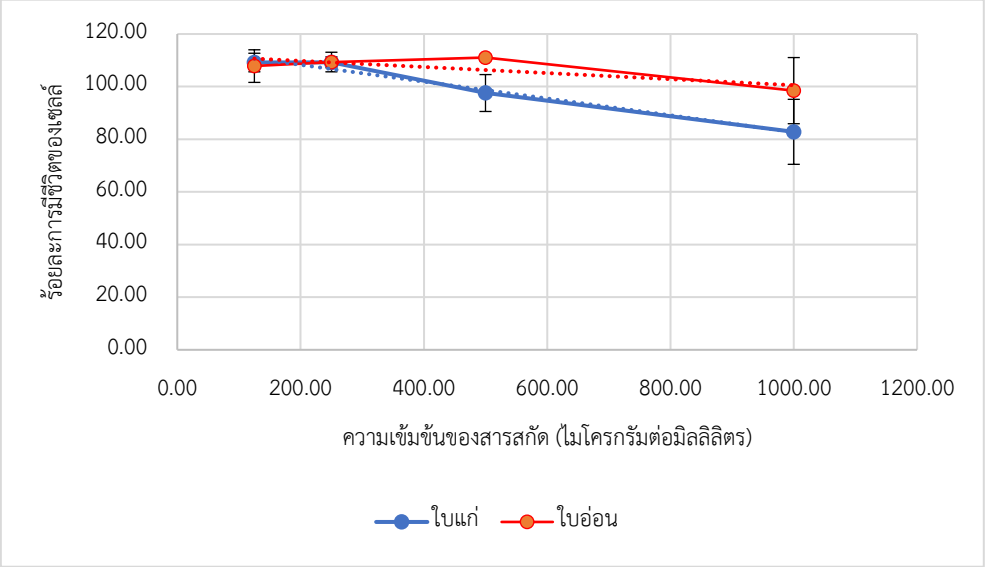
ชนิดของสาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
cDNA	1 – 10 ng	2.0
Forward primer (10 μM)	100 nM	0.4
Reverse primer (10 μM)	100 nM	0.4
4X CAPITAL™ qPCR Probe Master Mix	1x	5.0
Nuclease free water		12.2
	ปริมาตรรวม	20

ตารางที่ 7 สภาวะที่ใช้สำหรับการวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธีการ Real-time PCR

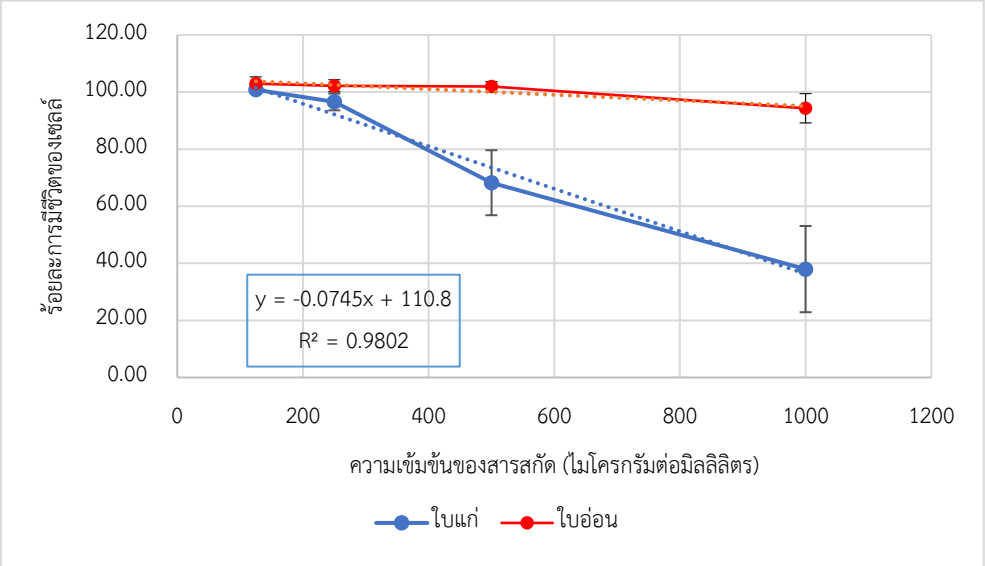
ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวน
Initiation	95	3 นาที	1
Denaturation	95	10 วินาที	40
Annealing/Extension	60	30 วินาที	

ภาคผนวก ง

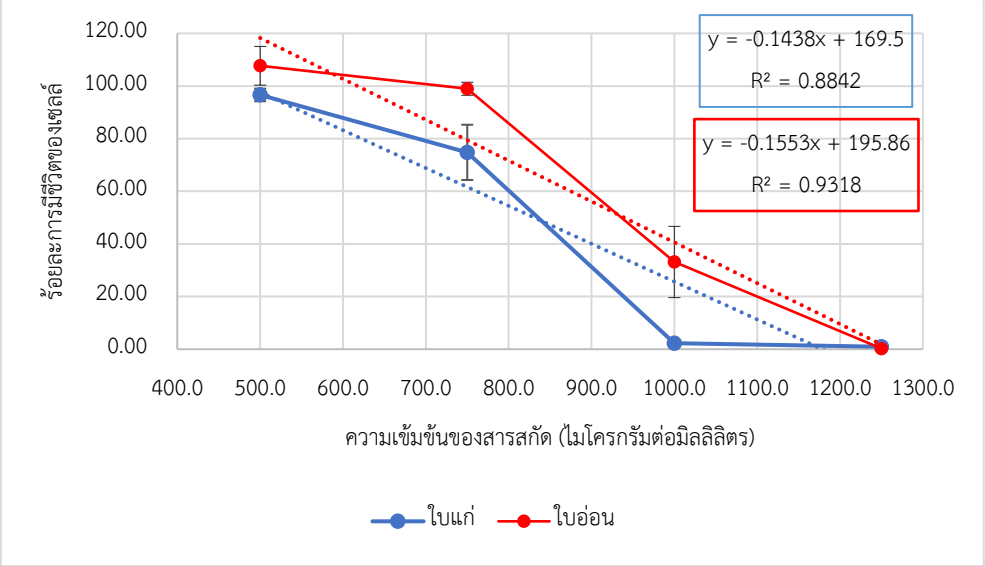
กราฟแสดงผลการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก



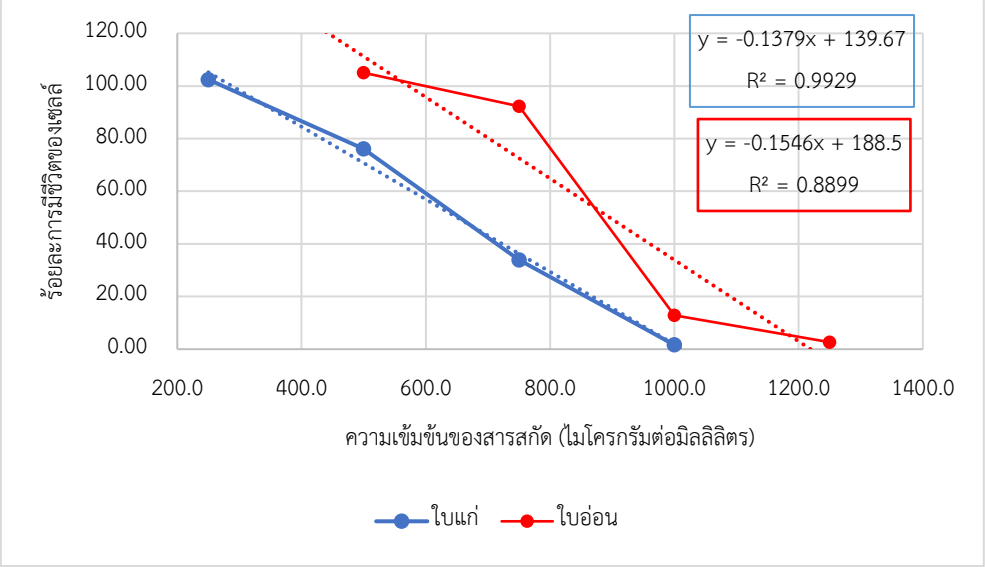
ภาพที่ 13 ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากจังหวัดชัยภูมิต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



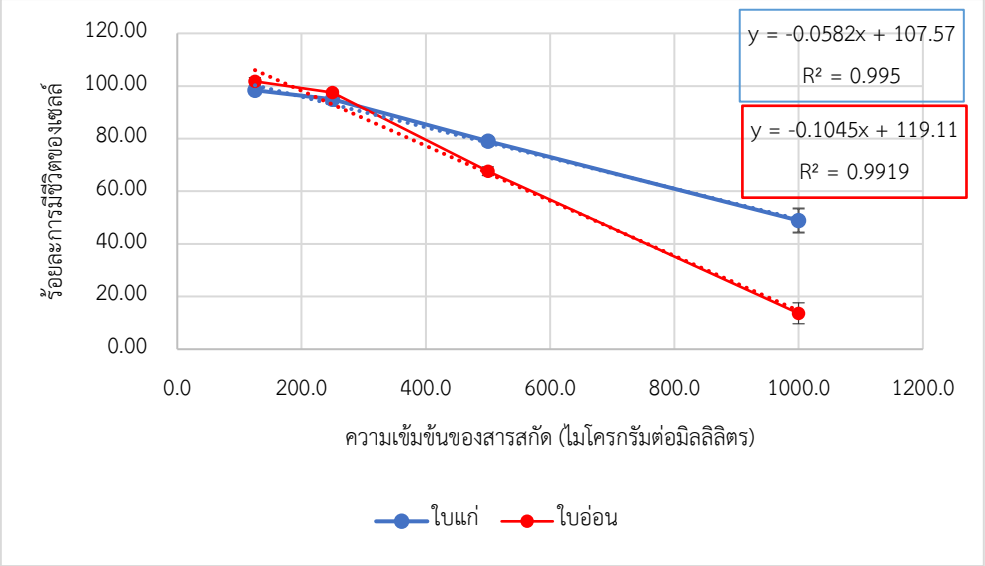
ภาพที่ 14 ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากจังหวัดชัยภูมิต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง



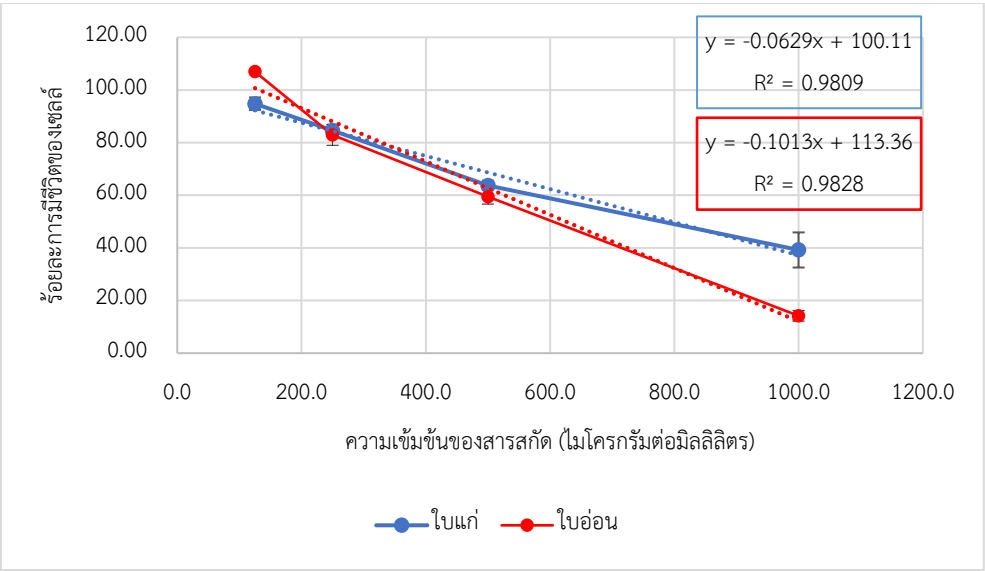
ภาพที่ 15 ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากจังหวัดชลบุรีต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



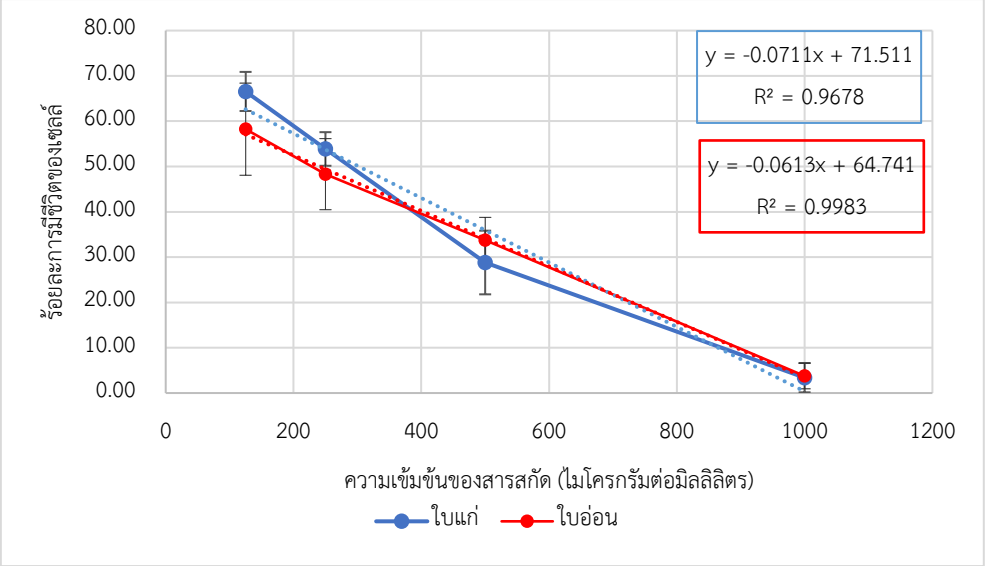
ภาพที่ 16 ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากจังหวัดชลบุรีต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง



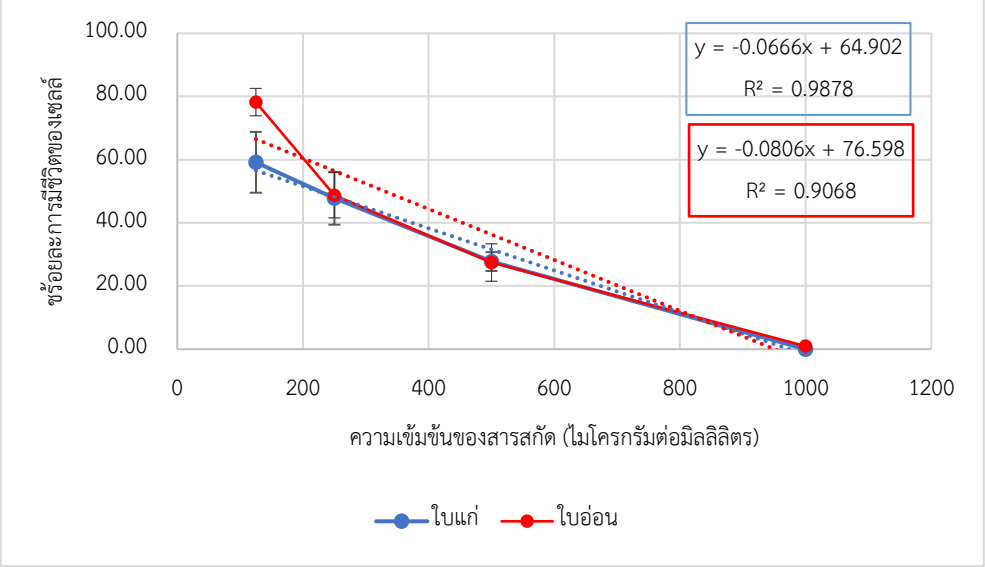
ภาพที่ 17 ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากจังหวัดกรุงเทพต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



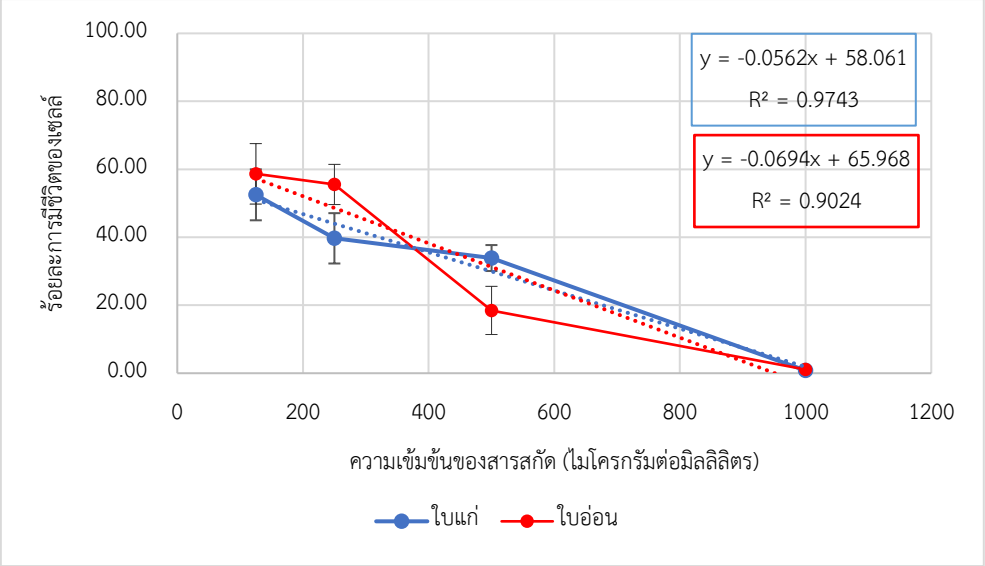
ภาพที่ 18 ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากจังหวัดกรุงเทพต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง



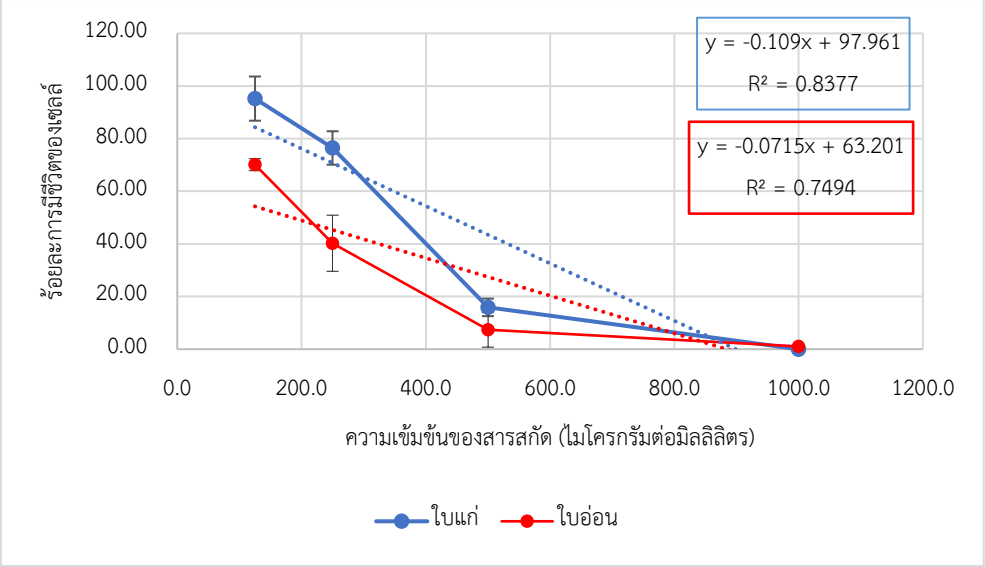
ภาพที่ 19 ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากจังหวัดชัยภูมิต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



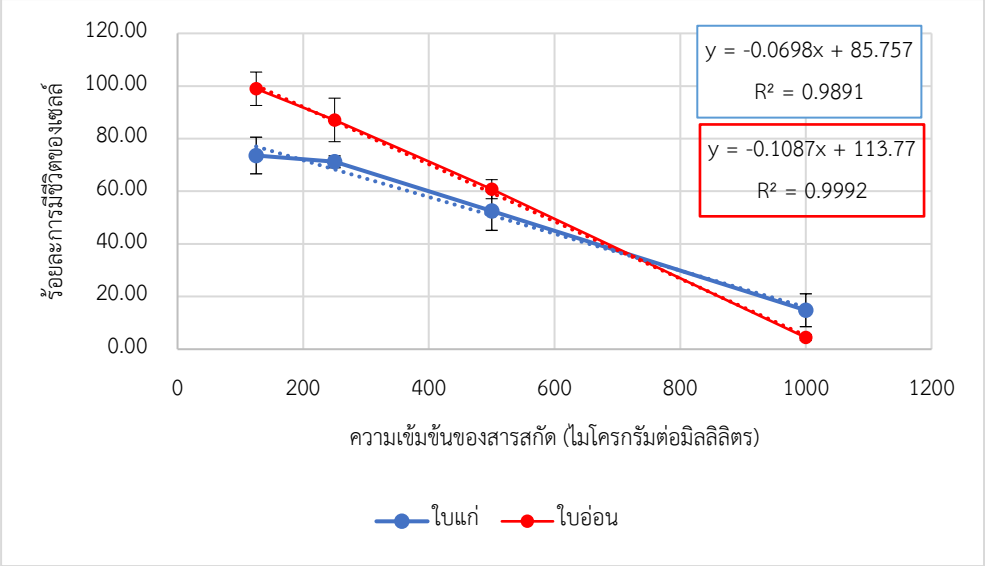
ภาพที่ 20 ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากจังหวัดชัยภูมิต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง



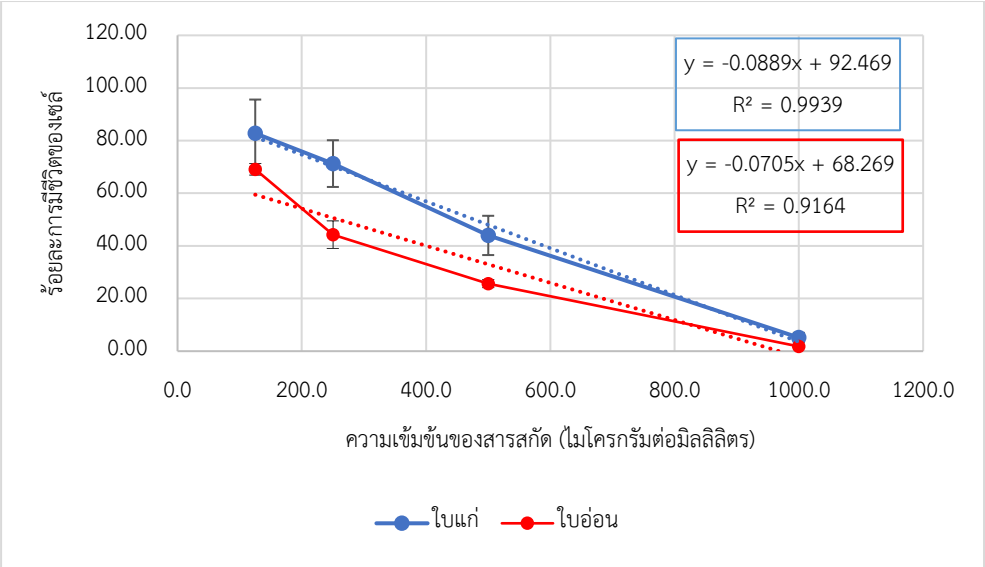
ภาพที่ 21 ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากจังหวัดชลบุรีต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 22 ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากจังหวัดชลบุรีต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 23 ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากจังหวัดกรุงเทพฯต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 24 ผลของสารสกัดจากใบแปะตำปึงแก่และอ่อนจากจังหวัดกรุงเทพฯต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง