



## โครงการ

# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	ผลของสารสกัดจากจันทน์เทศ ( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.) ที่มีต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก		
	Effects of extracts from nutmeg ( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.) to cervical cancer cells		
ชื่อนิสิต	นันชวรรณ เสฏฐวิวรรณ	เลขประจำตัวนิสิต	5932123023
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์		
ปีการศึกษา	2562		

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของสารสกัดจากจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) ที่มีต่อ  
เซลล์มะเร็งปากมดลูก

นาย นันทวรรณ เสฏฐวิวรรณ

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

Effects of extracts from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) to  
cervical cancer cells

Mr. Nantawat Satthawiwat

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 2019

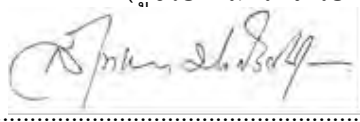
ชื่อเรื่อง	ผลของสารสกัดจากจันทน์เทศ ( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.) ที่มีต่อ เซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิติ	นันทวรรณ เสถียรวิวรรณ
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
ปีการศึกษา	2562

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงการวิทยาสตรนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงการวิทยาสตร

รัชนิกร ธรรมโชติ ..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ)

 ..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

ปฐมวดี ญาณทัสน์จีต ..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัสน์จีต)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ผลของสารสกัดจากจันทน์เทศ ( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.) ที่มีต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิติ	นันทวรรณ เสฏฐวิวรรธน์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
ปีการศึกษา	2562

---

### บทคัดย่อ

มะเร็งปากมดลูก เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักในการเสียชีวิตของผู้หญิงทั่วโลก โดยสาเหตุหลักในการเกิดมะเร็งปากมดลูก คือ การติดเชื้อไวรัสชนิด Human papillomavirus (HPV) การรักษา มะเร็งปากมดลูกในปัจจุบันส่งผลข้างเคียงกับผู้ป่วย จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สมุนไพรในการรักษา มะเร็งมากขึ้น เนื่องจากมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการต่อต้านมะเร็งและส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อย ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาสารสกัดจากเมล็ดจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) เพื่อศึกษาคุณสมบัติ ผลต่อการมีชีวิตและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอะพอพโทซิสโดยศึกษาในเซลล์มะเร็งปากมดลูก 2 ชนิดคือ SiHa และ C33a ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารพบว่าการสกัดเมล็ดจันทน์เทศด้วย 95% เอทานอล อัตราส่วน 1:30 ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือ  $15.40 \pm 1.13\%$  ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในอัตราส่วน 1:10 ให้ค่ามากที่สุดคือ  $29.40 \pm 1.22$  ไมโครกรัมกรดแกลลิก/น้ำหนักแห้ง และ  $58.21 \pm 0.39\%$  ตามลำดับ เมื่อบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 0 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายไปครึ่งหนึ่ง ( $LC_{50}$ ) ในเซลล์ชนิด SiHa และ C33a อยู่ที่ 2.49 และ 3.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า การบ่มเซลล์ C33a ด้วยสารสกัดจากเมล็ดจันทน์เทศลดการแสดงออกของยีน *BCL2* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *BAX* และสารสกัดไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ในเซลล์ SiHa ในการศึกษาครั้งนี้แสดงผลของสารสกัดจากเมล็ดจันทน์เทศที่มีต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ซึ่งอาจนำไปสู่การทดลองในสิ่งมีชีวิตและพัฒนาายาต้านมะเร็งต่อไปในอนาคต

**คำสำคัญ** มะเร็งปากมดลูก จันทน์เทศ อะพอฟโทซิส การแสดงออกของยีน

<b>Title</b>	Effects of extracts from nutmeg ( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.) to cervical cancer cells
<b>Student name</b>	Nantawat Satthawiwat
<b>Program</b>	Genetics
<b>Department</b>	Botany
<b>Advisor</b>	Assist. Prof. Dr. Rachaneekorn Tammachote
<b>Co-advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Sehanat Prasongsuk
<b>Academic year</b>	2019

---

### Abstract

Cervical cancer is one of the leading causes of death in women worldwide. The major cause of cervical cancer is Human papillomavirus (HPV) infection. Current treatments for cervical cancer lead to negative side effects. ,Therefore, medicinal plants have been studied for cancer treatment because they have bioactive compounds that have anti-cancer activity and cause less negative side effects. In this study, extracts from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) seed was analyzed for its properties, effects on cell viability and expression of apoptosis-related gene in two cervical cancer cell lines, SiHa and C33a. The results showed that the highest yield,  $15.40 \pm 1.13\%$ , was achieved when extracted with 95% ethanol at 1:30 ratio. The highest phenolic compound component and antioxidation activity were achieved when extracted at 1:10 ratio, with  $29.40 \pm 1.22 \mu\text{g GAE/gDW}$  and  $58.21 \pm 0.39\%$ , respectively. When cells were incubated with nutmeg extract ranging from 0 to 10 mg/ml for 48 hours, the lethal concentration ( $LC_{50}$ ) in SiHa and C33a were 2.49 and 3.48 mg/ml respectively. Moreover, when C33a cells were treated by nutmeg extract, the expression level of *BCL2*, but not *BAX*, was significantly decreased. The nutmeg extract didn't affect gene expression in SiHa cells. This study showed effects of nutmeg seed

extract to cervical cancer cell viability and gene expression. This information can be further investigated *in vivo* and developed as a new anti-cancer drug.

**Keywords** cervical cancer, nutmeg, apoptosis, gene expression



## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำโครงการวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต ที่เมตตาให้ตัวอย่างเซลล์ในการศึกษาครั้งนี้และที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงการวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการ 306 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงการวิทยาศาสตร์นี้

ขอขอบพระคุณคณะจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้อง ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกด้านอย่างเต็มที่

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ.....	1
การตรวจสอบเอกสารที่เกี่ยวข้อง .....	3
2.1 มะเร็งปากมดลูก.....	3
2.2 วิธีในการรักษามะเร็งปากมดลูก.....	3
2.2.1 การรักษามะเร็งด้วยการแพทย์แผนปัจจุบัน.....	3
2.2.1.1 การผ่าตัด .....	3
2.2.1.2 การฉายรังสี.....	4
2.2.1.3 การรับยาเคมีบำบัด.....	4
2.2.1.4 การได้รับการรักษาอย่างตรงจุด.....	4
2.3 จันทน์เทศกับการรักษามะเร็ง .....	4
2.4 กระบวนการอะพอพโทซิส.....	6
2.4.1 ความหมายของกระบวนการอะพอพโทซิส .....	6
2.4.2 วิถีอะพอพโทซิส .....	7
2.6 ยีนที่เกี่ยวข้อง .....	10
2.6.1 ยีน B-cell lymphoma 2 ( <i>BCL2</i> ).....	10
2.6.2 ยีน BCL2 associated X ( <i>BAX</i> ) .....	10
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงาน .....	11
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ .....	11
3.2 สารเคมีที่ใช้ .....	11

3.3 วิธีดำเนินงาน.....	12
3.3.1 เก็บรวบรวมเมล็ดจันทน์เทศแห้ง .....	12
3.3.2 สกัดสารจากเมล็ดจันทน์เทศ .....	13
3.3.3 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a.....	13
3.3.4 ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้วิธี F-C assay.....	14
3.3.5 ศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH assay.....	14
3.3.6 ศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ .....	15
3.3.7 การเตรียมเซลล์มะเร็งปากมดลูกเพื่อใช้สกัดอาร์เอ็นเอ.....	15
3.3.8 การออกแบบไพรเมอร์.....	15
3.3.9 การสกัดอาร์เอ็นเอ .....	16
3.3.10 การสังเคราะห์ cDNA.....	16
3.3.11 ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยกระบวนการ Real-time reverse transcription PCR... (qRT-PCR) .....	16
3.3.12 วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .....	17
<b>ผลการทดลอง .....</b>	<b>18</b>
4.1 ระบุชนิดพันธุ์จันทน์เทศ .....	18
4.2 ผลการสกัดสารจากเมล็ดจันทน์เทศ.....	19
4.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัด.....	20
4.3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้วิธี F-C assay .....	20
4.3.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH assay.....	21
4.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์.....	22
4.3.1 เซลล์ชนิด SiHa.....	22

4.3.2 เซลล์ชนิด C33a.....	22
4.5 ผลการทดสอบสารสกัดที่มีต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก.....	23
4.5.1 การมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก.....	23
4.5.2 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิส.....	25
<b>อภิปรายผลการทดลอง และสรุปผล .....</b>	<b>28</b>
<b>อ้างอิง .....</b>	<b>30</b>
<b>ภาคผนวก ก .....</b>	<b>36</b>
<b>ภาคผนวก ข .....</b>	<b>38</b>

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 2.1 ลักษณะของต้นจันทน์เทศ	5
ภาพที่ 2.2 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกระบวนการอะพอพโทซิส	7
ภาพที่ 2.3 วิถีอะพอพโทซิส (apoptosis pathway)	9
ภาพที่ 3.1 เมล็ดจันทน์เทศแห้ง	12
ภาพที่ 3.2 ผงเมล็ดจันทน์เทศแห้ง	13
ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างจันทน์เทศ H.B. No.016524	18
ภาพที่ 4.2 ผลผลิต (% yield) ของสารสกัดจากเมล็ดจันทน์เทศที่อัตราส่วนต่างๆ	19
ภาพที่ 4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ( $\mu\text{GAE/gDW}$ ) ในสารที่สกัดจากเมล็ดจันทน์เทศ	20
ภาพที่ 4.4 ฤทธิ์เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (%AA) ในแต่ละอัตราส่วนของสารสกัด	21
ภาพที่ 4.5 เซลล์มะเร็งชนิด SiHa	22
ภาพที่ 4.6 เซลล์มะเร็งชนิด C33a	22
ภาพที่ 4.7 ผลของสารสกัดเมล็ดจันทน์ต่อการมีชีวิตของเซลล์ มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa	23
ภาพที่ 4.8 ผลของสารสกัดเมล็ดจันทน์ต่อการมีชีวิตของเซลล์ มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a	24
ภาพที่ 4.9 การแสดงออกของยีนจากตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูก ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ	26
ภาพที่ 4.10 การแสดงออกของยีนเมื่อทำการเปรียบเทียบในกลุ่มทดสอบ	27

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์และความเข้มข้นของไพรเมอร์	17
ตารางที่ 3.2 สารที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA	39
ตารางที่ 3.3 สารที่ใช้ในการทำ Real-time PCR	39
ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการทำ Real-time PCR	39
ตารางที่ 4.1 สรุปผลการแสดงออกของยีน	27

## บทที่ 1

### บทนำ

มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) เป็นสาเหตุหลักในการเสียชีวิตของผู้หญิงทั่วโลก (Ghim, Basu, and Jenson, 2014) โดยมีรายงานจาก World Health Organization (WHO) International Agency for Research on Cancer (IARC) ว่ามะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตในผู้หญิงเป็นลำดับต้น ๆ พบว่าในปีค.ศ. 2008 มีผู้หญิงทั่วโลกที่ป่วยเป็นโรคมะเร็ง 529,800 รายและเสียชีวิตไป 275,100 ราย สำหรับประเทศที่กำลังพัฒนาพบผู้ที่ป่วยเสียชีวิตจำนวนมากจากมะเร็งปากมดลูกรองจากมะเร็งเต้านม (Torre et al., 2017) สำหรับ HPV Information Centre รายงานว่าประเทศไทยในปี ค.ศ. 2018 มีผู้ป่วยใหม่ป่วยเป็นมะเร็งปากมดลูก 8,622 ราย และมะเร็งปากมดลูกนี้ยังเป็นสาเหตุการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งที่มีอายุช่วง 15-44 ปีเป็นลำดับที่ 2 โดยสาเหตุการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก คือ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น การติดเชื้อไวรัสชนิด Human papillomavirus (HPV) (Stone et al., 2014) และปัจจัยทางพันธุกรรมโดยเกิดจากความผิดปกติของพันธุกรรม เช่น ระดับเมทิลเลชันในสารพันธุกรรม เช่น ยีน *CCNA1* (โชติพร ชเลิศเพ็ชร, อภิวัฒน์ มุทิตรากร และปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต, 2558) ยีน *FAM19A4*, *GHSR*, *PHACTR3*, *PRDM14*, *SST* และ *ZIC1* (Snoek et al., 2019)

ก่อนหน้านี้นี้ มีงานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปากมดลูก เช่น สะเดา (*Azadirachta indica*) (Moga et al., 2018) มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) (Zhu et al., 2013) ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculate*) (Ekalaksananan et al., 2015) และจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) (Thoung et al., 2013) ซึ่งจันทน์เทศเป็นพืชในวงศ์ Myristicaceae สามารถพบได้ทั่วไปในภูมิภาคเขตร้อน เช่น สาธารณรัฐประชาชนจีน มาเลเซีย เวียดนาม และไทย พบได้ทั่วไปในส่วนผสมของอาหารและยา สารสกัดจากจันทน์เทศมีสารประกอบทางชีวภาพที่สามารถต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ และสามารถต้านโรคมะเร็งได้ ซึ่งมีรายงานมาว่า สารสกัดจากเมล็ดจันทน์เทศ มีฤทธิ์เป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของมนุษย์โดยผ่านกระบวนการอะพอพโทซิส (Wukirsari et al., 2016)

กระบวนการอะพอพโทซิส เป็นการทำงานของเซลล์เพื่อควบคุมสมดุลของกระบวนการแบ่งเซลล์ โดยในงานวิจัยนี้จะสนใจไปที่การแสดงออกของยีน *BCL2* เนื่องจากยีนนี้เป็น anti-apoptosis และยีน *BAX* เป็น pro-apoptosis ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมวิถีอะพอพโทซิส คือ เมื่อมีการแสดงออกของยีน *BCL2* ลดลงและยีน *BAX* มีการแสดงออกมากขึ้นส่งผลให้มีการหลั่งของสารที่สามารถชักนำให้เกิดอะพอพโทซิส จากเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียชั้นนอกออกมายังไซโตซอล ในที่สุดจะสามารถชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสได้ (ปกป้อง ประยงค์, นาถธิดา วีระปรียาภูร และสหพัฒน์ บัณฑิตวรวัช, 2550) นอกจากนี้การลดการแสดงออกของยีน *BCL2* สามารถทำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งช่องปากมดลูกชนิด SiHa (Ng, Yazan, and Ismail, 2011) เซลล์มะเร็งช่องปาก (Rengasamy et al., 2018) และการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วน *BAX/BCL2* นำไปสู่กระบวนการอะพอพโทซิส (Zhu et al., 2015) การศึกษานี้สนใจศึกษาการแสดงออกของยีน *BCL2* และ ยีน *BAX* ในเซลล์มะเร็งช่องปากมดลูกชนิด C33a และ SiHa เพื่อศึกษาผลของจันทน์เทศต่อการเกิดกระบวนการอะพอพโทซิส (apoptosis) ซึ่งการศึกษานี้จะเป็นพื้นฐานของการศึกษาผลของจันทน์เทศในการรักษามะเร็งช่องปากมดลูกและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรชนิดนี้

## วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากจันทน์เทศที่มีต่อเซลล์มะเร็งช่องปากมดลูกในด้านกระบวนการอะพอพโทซิส



## บทที่ 2

### การตรวจสอบเอกสารที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 มะเร็งปากมดลูก

มะเร็งปากมดลูกเป็นโรคที่พบมากและนำไปสู่การเสียชีวิตของผู้หญิงทั่วโลกเป็นลำดับที่ 3 (Ferlay et al., 2010) มะเร็งปากมดลูกมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสชนิด high risk human papillomavirus (HR-HPV) มากกว่า 90% (Munoz et al., 2003) โดย The International Federation of Gynecology and Obstetrics หรือ FIGO แบ่งระยะของมะเร็งปากมดลูกออกเป็น 4 ระยะ (Bhatla et al., 2019) คือ

ระยะที่ 0 : เมื่อพบความผิดปกติของเซลล์ภายในปากมดลูก หรือที่เรียกว่า *carcinoma in situ*

ระยะที่ 1 : เมื่อมีการพิสูจน์แล้วว่าเป็นมะเร็งที่ปากมดลูกเท่านั้น

ระยะที่ 2 : เมื่อมะเร็งมีการรุกรานในปากมดลูกยังไม่รุกรานไปที่ผนังเชิงกราน (pelvic wall) หรือไม่รุกรานเกิน 1 ใน 3 ของช่องคลอด (lower third of the vagina)

ระยะที่ 3 : เมื่อมะเร็งรุกรานไปยังผนังเชิงกราน และ/หรือรุกรานไปเกิน 1 ใน 3 ของช่องคลอด และ/หรือรุกรานไปยังอวัยวะอื่น

ระยะที่ 4 : เมื่อมะเร็งปากมดลูกรุกรานไปยังกระเพาะปัสสาวะ ไส้ตรง หรือส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย

#### 2.2 วิธีในการรักษามะเร็งปากมดลูก (Reedy, 2019 : online)

##### 2.2.1 การรักษามะเร็งด้วยการแพทย์แผนปัจจุบัน

การรักษามะเร็งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ระยะและขนาดมะเร็ง อายุของผู้ป่วย และปัจจัยอื่นๆ

วิธีในการรักษามะเร็ง เช่น

##### 2.2.1.1 การผ่าตัด

ข้อดี การผ่าตัดเป็นการตัดชิ้นเนื้อที่เป็นมะเร็งออกไปโดยทำการตัดมดลูกออกไป

ข้อเสีย การผ่าตัดใช้เวลาในการรักษาตัว 4-6 สัปดาห์นอกจากนี้ทำให้สูญเสียโอกาสการมีบุตร

### 2.2.1.2 การฉายรังสี

ข้อดี การฉายรังสีสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้

ข้อเสีย การฉายรังสีมีผลข้างเคียงมาก เช่น ท้องเสีย คลื่นไส้ และมีการเปลี่ยนแปลงของผิวหนัง

### 2.2.1.3 การรับยาเคมีบำบัด

ข้อดี ยาสามารถกระจายได้ทั่วร่างกายซึ่งเหมาะกับมะเร็งระยะรุกราน

ข้อเสีย ยามีผลข้างเคียง เช่น ทำลายเซลล์ปกติ เหนื่อยง่าย ผอมร่วง

### 2.2.1.4 การได้รับการรักษาอย่างตรงจุด

ข้อดี ยามีความจำเพาะกับการรักษา

ข้อเสีย ยามีผลทำให้เหนื่อยง่าย ลดความอยากอาหาร และส่งผลให้ความดันสูง

## 2.3 จันทน์เทศกับการรักษามะเร็ง

สมุนไพรถูกนำมาใช้อย่างยาวนานในการบรรเทาและรักษาโรค มีการค้นพบเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชสมุนไพร โดยเฉพาะสารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง ต้านเชื้อแบคทีเรีย และช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน (Chirathaworn et al., 2007)

จันทน์เทศ (*M. fragrans*) เป็นพืชในวงศ์ Myristicaceae เป็นไม้ยืนต้นไม่ผลัดใบ ต้นจันทน์เทศสามารถสูงได้ตั้งแต่ 5-13 เมตร (ภาพที่ 2.1 a). ดอกของจันทน์เทศมีสีเหลืองอ่อน เป็นทรงระฆังคว่ำ (bell-shaped) เป็นดอกแยกเพศแต่สามารถพบดอกเพศผู้และดอกเพศเมียในต้นเดียวกัน (ภาพที่ 2.1 b) มีลักษณะผลเป็นแบบผลสด (fleshy fruit) (ภาพที่ 2.1 c) ภายในมีเมล็ด ที่มีสีน้ำตาลอมม่วง (purplish-yellow) (ภาพที่ 2.1 d) และมีส่วนหุ้มเมล็ดเรียกว่า รก (mace) มีสีแดงสด (ภาพที่ 2.1 e) (Jaiswal et al., 2009)

องค์ประกอบทางเคมีของจันทน์เทศที่ถูกค้นพบคือสารกลุ่ม alkyl benzene เช่น myristicin, elemicin, safrole และอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่ม terpene, alpha-pinene, beta-pinene, myristic acid และ trimyristin ส่วนเมล็ดจันทน์เทศมีน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ประมาณร้อยละ 10 ซึ่งประกอบด้วยสารกลุ่ม terpene hydrocarbon เช่น sabinene, pinene, limonene และ myrcene เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสารที่เป็นอนุพันธ์ของกลุ่ม terpene และสารกลุ่ม phenylpropanoids (Jaiswal et al., 2009)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของต้นจันทน์เทศ a ต้นจันทน์เทศ, b ดอกของต้นจันทน์เทศ, c ผลสดของต้นจันทน์เทศ, d เมล็ดจันทน์เทศแห้ง, e ลักษณะของรก (mace) หุ้มเมล็ด (ดัดแปลงจาก Asgarpanah and Kazemivash, 2012)

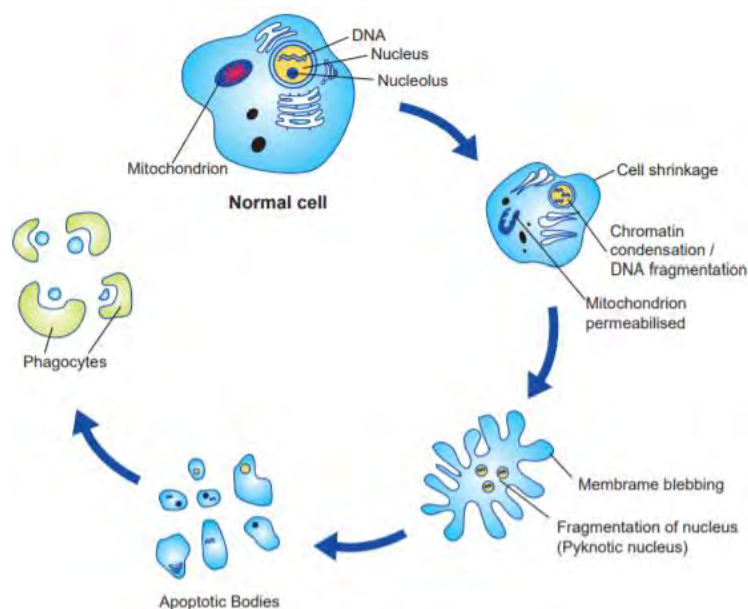
สารสกัดจากเมล็ดจันทน์เทศมีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง (anti-cancer) ในหลอดทดลองโดยได้มีการทดลองกับเซลล์มะเร็งในมนุษย์ 7 ชนิด ได้แก่ มะเร็งสมองส่วนกลางชนิด SF-295 มะเร็งลำไส้ชนิด Colon 502713 และ Colon 205 มะเร็งตับชนิด Hep-2 มะเร็งปอดชนิด A-529 มะเร็งรังไข่ชนิด OVCAR-5 และมะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-5 (Prakash and Gupta, 2013) การชักนำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสเป็นหนึ่งในกระบวนการสำคัญในการต้านเซลล์มะเร็ง โดยสารประกอบในธรรมชาติรวมถึงพืช สามารถชักนำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสและไปกีดขวางวิถีหลายวิถีในเซลล์มะเร็ง (Safarzadeh, Sandoghchian and Baradaran, 2014)

## 2.4 กระบวนการอะพอพโทซิส

### 2.4.1 ความหมายของกระบวนการอะพอพโทซิส

อะพอพโทซิส (apoptosis) เป็นการตายของเซลล์ (programmed cell death) อย่างมีแบบแผนซึ่งมีเอ็นที่มีบทบาทในการในการควบคุมกระบวนการนี้ กระบวนการอะพอพโทซิสที่มีความสำคัญในการรักษาสมดุลของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์อีกทั้งยังมีบทบาทในการพัฒนาของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ โดยเมื่อเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสจะพบลักษณะของเซลล์ดังนี้ (ปกป้อง ประยงค์ และคณะ, 2007)

1. การสูญเสียปริมาตรของเซลล์ (loss of cell volume)
2. การรวมกันของนิวเคลียส (nucleus condensation)
3. การรวมกลุ่มกันของโครมาตินและดีเอ็นเอกลายเป็นชิ้นเล็กๆ (chromatin aggregation and DNA fragmentation) (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะของเซลล์ระหว่างกระบวนการอะพอพโทซิส (ที่มา Guerin et al., 2006)

กระบวนการอะพอพโทซิสส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จะเกิดขึ้นหลังกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling) และกระบวนการที่เอ็นไซม์ caspase เป็นตัวกลาง (caspase-mediated events) ซึ่งถูกควบคุมโดยโปรตีน แบ่งโปรตีนได้เป็น โปรตีนที่ทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ (proapoptotic proteins) และโปรตีนที่ยั้งการเกิดกระบวนการตายของเซลล์ (antiapoptotic proteins) (ปกป้อง ประยงค์ และคณะ, 2007)

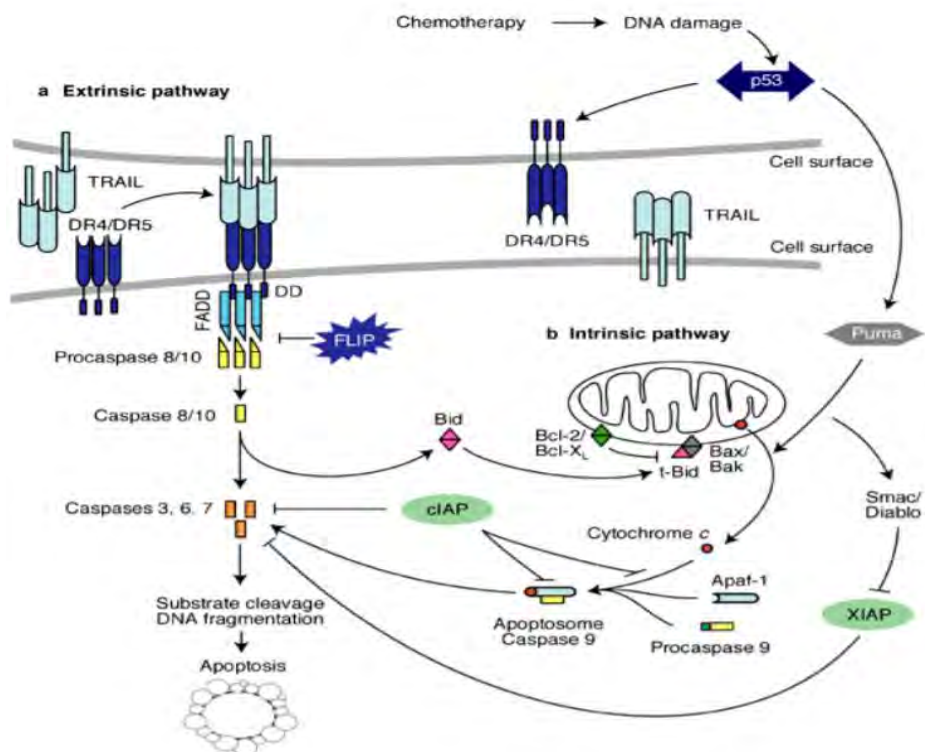
#### 2.4.2 วิธีอะพอพโทซิส

วิธีอะพอพโทซิสมี 2 วิธีในการทำให้เกิดการตายของเซลล์คือ

2.4.2.1 วิธีภายนอก (extrinsic pathway) (ภาพที่ 2.3 a) วิธีนี้เกิดเมื่อตัวรับบนเยื่อหุ้มเซลล์ในกลุ่มของ death receptors เช่น Fas receptor (FasR), Tumor necrosis factor receptor (TNFR) เป็นต้นจับกับลิแกนด์ที่จำเพาะ เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า death-inducing signaling complex (DISC) โครงสร้างนี้จะไปกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ (ปกป้อง ประยงค์ และคณะ, 2007)

2.4.2.2 วิธีภายใน (intrinsic pathway) (ภาพที่ 2.3 b) วิธีนี้มีไมโทคอนเดรียเป็นตัวกลางสำคัญในการเกิดกระบวนการ กล่าวคือเมื่อมีสัญญาณจากโปรตีนที่ทำให้เกิดกระบวนการตายส่งสัญญาณไปที่ไมโทคอนเดรียจะเกิดการหลั่งโปรตีนที่เรียกว่า ไซโทโครม ซี (Cytochrome c) จากช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มชั้นในและชั้นนอกของไมโทคอนเดรียมาที่ไซโตซอล ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอีกหลายชนิด ก่อให้เกิด อะพอพโทโซม (apoptosome) ซึ่งจะส่งสัญญาณเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ในที่สุด (Ashe and Berry, 2003)

ดังนั้นกระบวนการอะพอพโทซิสจึงเป็นกลไกหลักในการกำจัดเซลล์มะเร็งผ่านทางการทำงานโดยควบคุมการแสดงออกของโปรตีนผ่านอะพอพโทติกยีน (apoptotic genes) ที่มีความหลากหลาย (Al-Fatlwi et al., 2015) กลุ่มผู้วิจัยจึงสนใจไปที่ การปลดปล่อยของโปรอะพอพโทติก เฟกเตอร์ (proapoptotic factors) จากไมโทคอนเดรียที่ควบคุมโดยโปรอะพอพโทติก โปรตีน (proapoptotic proteins) และ แอนติอะพอพโทติก โปรตีน (antiapoptotic proteins) (De Giffoni De Carvalho et al., 2019) ซึ่งหนึ่งในกระบวนการพื้นฐานของกลไกอะพอพโทซิสก็คือการลดการทำงานของ *BCL2* และเพิ่มการทำงานของ *BAX* (Mehnath et al., 2018)



ภาพที่ 2.3 วิธีอะพอพโทซิส (apoptosis pathway) a.วิธีภายนอก (extrinsic pathway) เมื่อ death receptor จับกับ death ligand ในภาพคือ DR4/DR5 และ TRAIL ตามลำดับจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิส b.วิธีภายใน (intrinsic pathway) เมื่อมีสัญญาณให้ไมโทคอนเดรียปลดปล่อยไซโทโครม ซี ก่อให้เกิดโครงสร้าง อะพอพโทโซม แล้วทำให้เกิดอะพอพโทซิสในที่สุด (ที่มา ปกป้อง ประยงค์ และคณะ, 2007)

## 2.6 ยีนที่เกี่ยวข้อง (Tzif et al., 2011)

### 2.6.1 ยีน B-cell lymphoma 2 (*BCL2*)

ยีน *BCL2* เป็นยีนในกลุ่มการต้านการตายของเซลล์เมื่อผ่านกระบวนการแปลรหัสพันธุกรรมจะได้โปรตีน *BCL2* ซึ่งสามารถพบโปรตีนนี้ได้ที่ยึดหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรีย ทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์โดยป้องกันการปลดปล่อยของอะพอพโทเจนิคโมเลกุล (apoptogenic molecules) จากไมโทคอนเดรียซึ่งนำไปสู่กระบวนการตายของเซลล์

### 2.6.2 ยีน BCL2 associated X (*BAX*)

ยีน *BAX* เป็นยีนในกลุ่มที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์เมื่อผ่านกระบวนการแปลรหัสพันธุกรรมจะได้โปรตีน *BAX* ซึ่งสามารถเข้าไปในไมโทคอนเดรียแล้วชักนำให้เกิดการปลดปล่อยอะพอพโทเจนิค แฟกเตอร์ (apoptogenic factors) เช่น ไซโทโครม ซี แล้วชักนำให้เกิดการตายในที่สุด

การศึกษารั้วนี้จึงสนใจที่ฤทธิ์ทางชีวภาพของจันทน์เทศที่มีคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการอะพอพโทซิสโดยศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิสหลังได้รับสารสกัดจากเมล็ดจันทน์เทศในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a การศึกษารั้วนี้อาจเป็นประโยชน์ในการค้นพบการรักษารูปแบบใหม่ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก



## บทที่ 3

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงาน

#### 3.1 วัสดุ อุปกรณ์

1. ตู้สำหรับบอบตัวอย่างพืช
2. เครื่องซั่งน้ำหนักสาร
3. กระดาษกรอง (Whatman No.1 filter paper)
4. เครื่องระเหยแอลกอฮอล์ (rotary evaporator)
5. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด P2 (0.2-2  $\mu$ l), ขนาด P20 (2-20  $\mu$ l), ขนาด P100 (10-100  $\mu$ l), ขนาด P200 (20-200  $\mu$ l), ขนาด P1000 (100-1000  $\mu$ l),
6. ไมโครปิเปตทิว (micropipette tip) ขนาด 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l และ 1000  $\mu$ l
7. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope)
8. ตู้สำหรับเลี้ยงเซลล์ (CO<sub>2</sub> incubator)
9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
11. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C
12. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 °C
13. เครื่อง Real-time PCR รุ่น CFX96™ (BIO-RAD, USA)

#### 3.2 สารเคมีที่ใช้

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารจากเมล็ดลูกจันทน์เทศ
  1. เมล็ดลูกจันทน์เทศปริมาณ 5 กิโลกรัม ต.แหลมทราย อ.หลังสวน จ.ชุมพร
  2. 95% Ethanol
2. สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์
  1. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO, USA)
  2. Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, USA)

3. 0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO, USA)
  4. Phosphate Buffered Saline (PBS) (GIBCO, USA)
  5. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (GIBCO, USA)
  6. Antibiotic-Actinomycotic (GIBCO, USA)
  7. AlamarBlue (Gold Biotechnology, USA)
3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA และศึกษาการแสดงออกของยีน
1. ชุดสกัด RNA สำเร็จรูป (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Germany)
  2. ชุด reverse transcription (cDNA Synthesis Kit, Qiagen, Germany)
  3. สารเคมีทำ Real-time PCR (CAPITAL qPCR Green Mix LRox, Biotechrabbit, Germany)

### 3.3 วิธีดำเนินงาน

3.3.1 เก็บรวบรวมเมล็ดจันทน์เทศแห้งระหว่างเดือนเมษายนถึงมิถุนายน พ.ศ.2562 จาก ต.แหลมทราย อ.หลังสวน จ.ชุมพรปริมาณ 5 กิโลกรัม ตัวอย่างเมล็ดดังภาพที่ 3.1 และ 3.2 ระบุชนิดพันธุ์จันทน์เทศจากหนังสือรูปพรรณ Flora of Thailand volume 7 (De Wilde, W.J.J.O., 2002) และทำตัวอย่างจันทน์เทศโดยใช้ตัวอย่างใบแก่ประมาณ 9 ใบที่ติดอยู่กับกิ่งไม้เพื่อเก็บเข้าพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิน สุวตะพันธุ์ โดยอ้างอิงจากหนังสือการเก็บและรักษาตัวอย่างพันธุ์ไม้ (ทวีศักดิ์ บุญเกิด และคณะ, 2530)



ภาพที่ 3.1 เมล็ดจันทน์เทศแห้ง



ภาพที่ 3.2 ผงเมล็ดจันทน์เทศแห้ง

### 3.3.2 สกัดสารจากเมล็ดจันทน์เทศ

นำส่วนของเมล็ดที่เก็บรวบรวมได้มาอบที่อุณหภูมิ 60 °C จนน้ำหนักคงที่แล้วนำมาบดให้ละเอียดดังภาพที่3.2 นำผงที่ได้ไปสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration) ด้วยอัตราส่วน 1:10 1:20 และ 1:30 (ปริมาณผงจันทน์เทศ:95% แอลกอฮอล์ ; w:v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องเขย่า หลังจากนั้นกรองผงจันทน์เทศด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บของเหลวที่ได้ในแต่ละอัตราส่วนแยกกัน แล้วนำผงจากการกรองมาสกัดใหม่อีก 2 ครั้ง แล้วเก็บของเหลวในแต่ละอัตราส่วนรวมกัน (ดัดแปลงจาก Assa et al., 2014) นำไประเหยแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นระยะเวลา 3 วัน เก็บสารที่ได้ในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -20 °C และมีด เพื่อใช้ในครั้งต่อไป

### 3.3.3 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a

เลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a จาก American Type Culture Collection (ATCC) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.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 °C และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

### 3.3.4 ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้วิธี F-C assay

การทดลองนี้ดัดแปลงจาก Pientaweeratch, Panapisal, and Tansirikongkol, 2016 โดยนำสารสกัดทั้ง 3 อัตราส่วน โดยใช้อัตราส่วนละ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 10 %v/v แล้วบ่มเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนตปริมาณ 80 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตร แล้วเขย่าเล็กน้อยหลังจากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 120 นาทีภายใต้อุณหภูมิต้องและปราศจากแสง สารละลายจากตัวอย่างจะมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) จะมีความเข้มข้น 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเสร็จ ปฏิกริยาจะถูกวัดที่ความยาวคลื่น 760 nm สารละลายแบลงค์คือ 1 % DMSO-น้ำกลั่น สารละลายควบคุมบวกคือกรดแกลลิก ปริมาณฟีนอลิกในแต่ละสารละลายตัวอย่างจะถูกคำนวณจากสมการถดถอยเชิงเส้นจากกราฟสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกซึ่งจะแสดงในรูปแบบของ มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิก/กรัมของน้ำหนักแห้งของสารสกัด (mg gallic acid equivalent/gram of dried weight of extract : GAE/gDW)

### 3.3.5 ศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH assay

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 15 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 100  $\mu$ M ในเมทานอลแล้วบ่มเป็นเวลา 30 นาทีภายใต้อุณหภูมิต้องและปราศจากแสง (ดัดแปลงจาก Lin et al., 2014) หลังจากบ่มนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 512 nm สารละลายควบคุมบวกคือ สารละลายกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 1% DMSO-เมทานอล แล้วนำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (Percentage of antioxidant activity (AA%)) ตามสมการ (Choi et al., 2005)

$$AA\% = \left( 1 - \frac{\text{Abs of sample}}{\text{Abs of control}} \right) \times 100$$

Abs of sample คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

Abs of control คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวควบคุม

### 3.3.6 ศึกษาการมีชีวิตของเซลล์

นำเซลล์ SiHa และ C33a ลง 96-well plate โดยให้แต่ละหลุมมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ  $1.2 \times 10^4$  เซลล์ โดยบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ ( $\text{CO}_2$  incubator) อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมสารละลายจันท์เทศที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วตามด้วยสารละลาย cDMEM ปริมาตร 180 ไมโครลิตร แล้วบ่มอีก 48 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบการมีชีวิตของเซลล์โดยใช้สารละลายในการตรวจสอบคือ alamarBlue (Gold Biotechnology, USA) ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่ม 1 ชั่วโมงแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Molecular Devices, USA) โดยใช้ความยาวคลื่นในช่วง emission ที่ 570 และ excited ที่ 600 nm ตามลำดับ ใช้สารละลาย etoposide เป็นสารควบคุมบวก

### 3.3.7 การเตรียมเซลล์มะเร็งปากมดลูกเพื่อใช้สกัดอาร์เอ็นเอ

เลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (T75 flask) ปล่อยให้เซลล์มีปริมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ของภาชนะเลี้ยงเซลล์แล้วจึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เตรียมความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดจันท์เทศมาใช้ในการทดลองโดย เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ใช้ความเข้มข้น 2.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ใช้ความเข้มข้น 3.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 15.3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เทอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง แล้วใช้ cell scraper เพื่อขูดเซลล์แล้วเก็บในหลอดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่  $-20^\circ\text{C}$  เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอต่อไป

### 3.3.8 การออกแบบไพรเมอร์

ใช้ไพรเมอร์ของยีน *BCL2* และ *BAX* ที่ถูกออกแบบโดย Karaliotas and et al., 2015 และยีน *GAPDH* ที่ถูกออกแบบโดย Sintuwanon and Tammachote, 2013 ดังตารางที่ 3.1

### 3.3.9 การสกัดอาร์เอ็นเอ

นำเซลล์ที่ 3.3.7 มาสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัท ชะคอสมันต์ด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วมากกว่า 8000g เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง แต่ปรับปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเก็บ RNA ในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -80 °C

### 3.3.10 การสังเคราะห์ cDNA

นำ RNA ที่สกัดได้มาเป็นแม่แบบในการสังเคราะห์สายคอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอ (cDNA) ด้วยชุด cDNA synthesis kit (biotech rabbit, USA) (ตารางที่ 3.2) เริ่มโดย RNA 50 นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร ต่อ 1 ปฏิกริยา ผสมกับ PCR grade water ปริมาตร 7 ไมโครลิตร แล้วเติม 5x Reverse transcriptase buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมกับ dNTP Mix 2 ไมโครลิตร ผสมกับไพรเมอร์ (Oligo dT) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร แล้วเติม RNase inhibitor และ RevertUP™ II Reverse Transcriptase ปริมาตร 0.5 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 60 นาที และยับยั้งเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 99 °C เป็นเวลา 5 นาที นำไปเก็บที่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ต่อไป

### 3.3.11 ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยกระบวนการ Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) (Karaliotas et al., 2015)

เพิ่มปริมาณ DNA ในปฏิกริยา PCR มีองค์ประกอบดังตารางที่ 3.3 โดยเริ่มจาก Initiation denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกสาย cDNA แล้วตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 วินาที แล้วในขั้น Annealing/Extension ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 40 รอบแล้วจึงรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 4 °C ดังตารางที่

## 3.4

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์และความเข้มข้นของไพรเมอร์

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	ความเข้มข้นของไพรเมอร์	ขนาด (bp)
<i>BCL2</i>	F : TCGCCCTGTGGATGACTGA	10 $\mu$ M	134
	R : CAGAGACAGCCAGGAGAAATCA	10 $\mu$ M	
<i>BAX</i>	F : TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC	10 $\mu$ M	195
	R : TCACCCAACCACCCTGGTCTT	10 $\mu$ M	
<i>GAPDH</i>	F : GAAGGTGAAGTCCGGAGTC	10 $\mu$ M	226
	R : GAAGATGGTGATGGGATTTTC	10 $\mu$ M	

### 3.3.12 วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$

ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วย comparative quantification ด้วยวิธี  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  เปรียบเทียบค่า Ct ของยีนเป้าหมาย คือ ยีน *BAX* และ *BCL2* กับ *GAPDH* เป็น reference gene และคำนวณการระดับแสดงออกของยีนระหว่างเซลล์มะเร็งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ตามสมการของ Livak and Schmittgen, 2001 ดังนี้

$$\begin{aligned}
 \text{Fold difference} &= 2^{-\Delta\Delta Ct} \\
 &= 2^{-(\Delta Ct (\text{test}) - \Delta Ct (\text{calibrator}))} \\
 &= 2^{-[(Ct (\text{target, test}) - Ct (\text{ref, test})) - (Ct (\text{target, calibrator}) - Ct (\text{ref, calibrator}))]}
 \end{aligned}$$

เมื่อ  $Ct (\text{target, test})$  คือ Ct ของยีนเป้าหมายจากเซลล์ที่ได้รับการ treatment  $Ct (\text{ref, test})$  คือ Ct ของยีนควบคุมจากเซลล์ที่ได้รับการ treatment  $Ct (\text{target, calibrator})$  คือ Ct ของยีนเป้าหมายจากเซลล์ที่ไม่ได้รับการ treatment  $Ct (\text{ref, calibrator})$  คือ Ct ของยีนควบคุมจากเซลล์ที่ไม่ได้รับการ treatment

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ระบุชนิดพันธุ์จันทน์เทศ

ระบุชนิดพันธุ์ว่าเป็น *Myristica fragrans* และเก็บตัวอย่างใบไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิณ สุวตะพันธุ์ H.B. No. 016524 (BCU) (ภาพที่4.1)



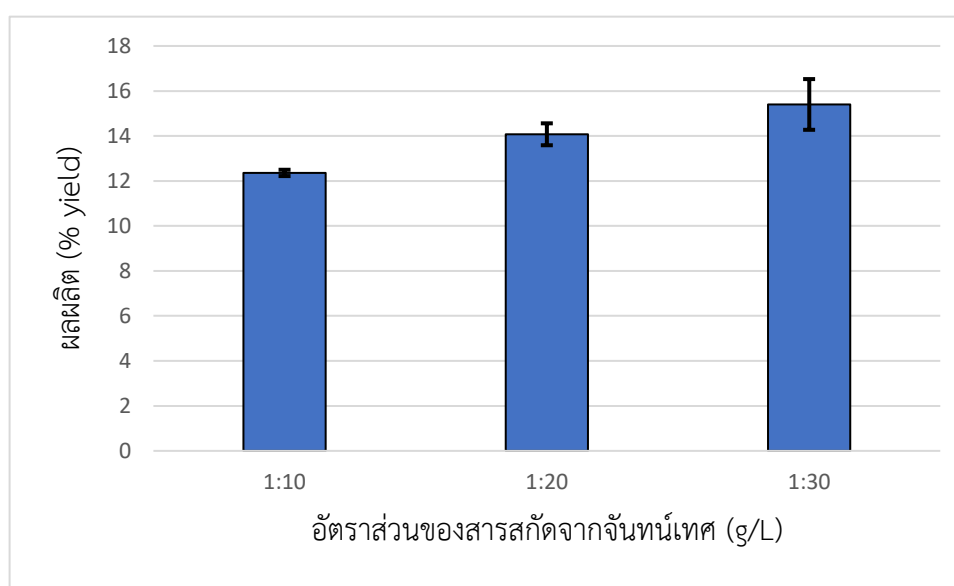
ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างจันทน์เทศ H.B. No.016524

ในพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิณ สุวตะพันธุ์



#### 4.2 ผลการสกัดสารจากเมล็ดจันทน์เทศ

การสกัดเมล็ดจันทน์เทศด้วยอัตราส่วนเอทานอลที่แตกต่างกัน (ปริมาณผงจันทน์เทศ:95% แอลกอฮอล์ ; w:v) คือ 1:10 1:20 และ 1:30 โดยใช้วิธีมาเซอเรชัน (Maceration) พบว่าผลผลิต (% yield) ของอัตราส่วน 1:10 ผลผลิตมีค่า  $12.29 \pm 0.61\%$  อัตราส่วน 1:20 ผลผลิต  $14.07 \pm 0.49\%$  และ 1:30 มีผลผลิต  $15.40 \pm 1.13\%$  (ภาพที่ 4.2)

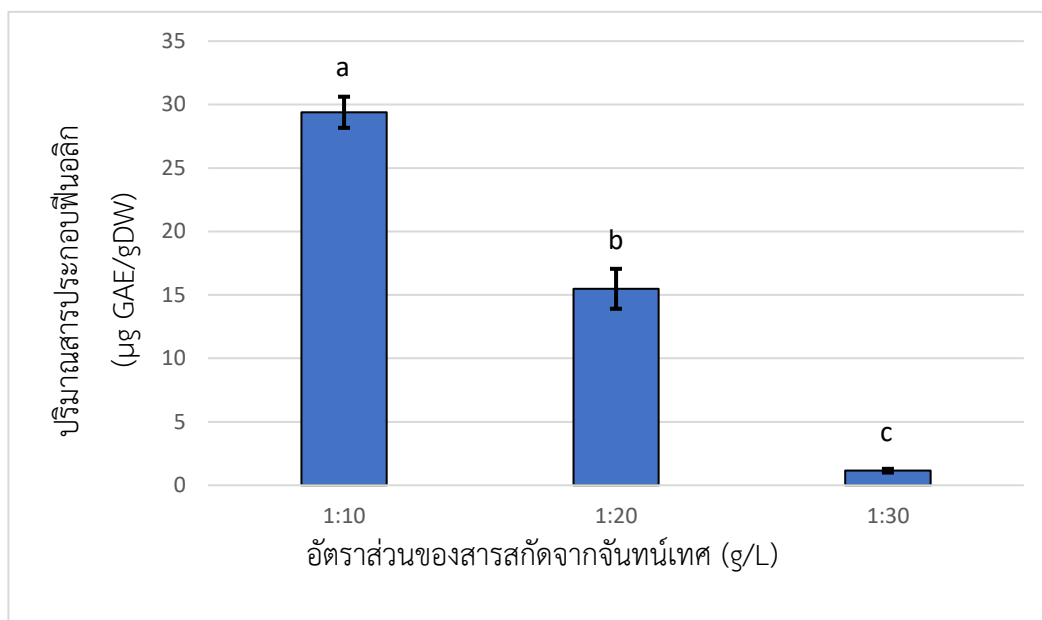


ภาพที่ 4.2 ผลผลิต (% yield) ของสารสกัดจากเมล็ดจันทน์เทศที่อัตราส่วนต่างๆ  
(error bar = standard deviation)

#### 4.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัด

##### 4.3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้วิธี F-C assay

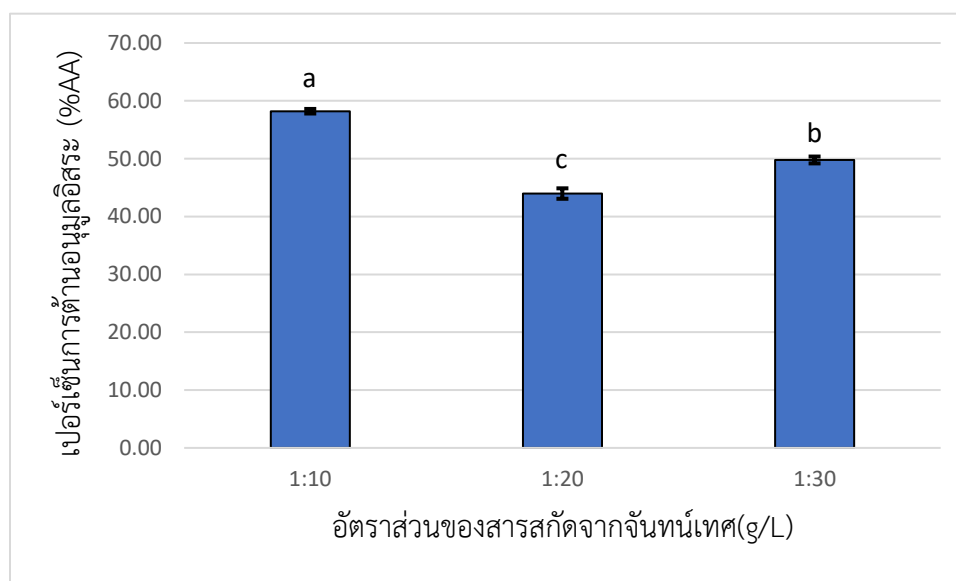
จากการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดจากจันทน์เทศในอัตราส่วน 1:10 มีค่าอยู่ที่  $29.40 \pm 1.22$   $\mu\text{g GAE/gDW}$  ตามด้วยอัตราส่วน 1:20 มีค่าอยู่ที่  $15.48 \pm 1.57$   $\mu\text{g GAE/gDW}$  และอัตราส่วน 1:30 มีค่าอยู่ที่  $1.15 \pm 0.15$   $\mu\text{g GAE/gDW}$  (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ( $\mu\text{g GAE/g DW}$ ) ในสารที่สกัดจากเมล็ดจันทน์เทศ ค่าแต่ละค่าแสดงโดยใช้ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $n=3$ ) และ ตัวอักษรต่างกันคือมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95%

#### 4.3.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH assay

จากการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดจากจันทน์เทศมีช่วงเปอร์เซ็นต์การต้านอยู่ที่  $43.97 \pm 0.90$  จนถึง  $58.21 \pm 0.39\%$  โดยที่อัตราส่วน 1:10 พบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่  $58.21 \pm 0.39\%$  1:20 มีค่า  $43.97 \pm 0.91$  และอัตราส่วน 1:30 มีค่า  $49.78 \pm 0.59\%$  (ภาพที่ 4.4)

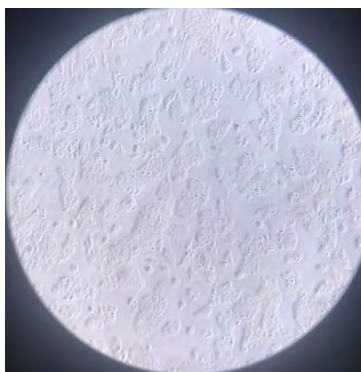


ภาพที่ 4.4 ฤทธิ์เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ(%AA)ในของแต่ละอัตราส่วนของสารสกัดค่าแต่ละค่าแสดงโดยใช้ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $n=3$ ) และ ตัวอักษรต่างกันคือมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95%

#### 4.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์

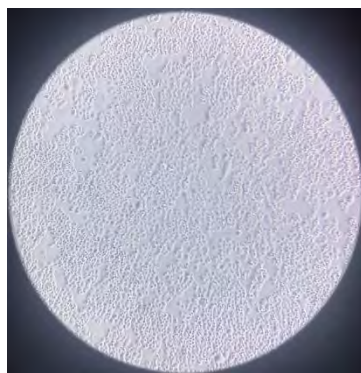
เลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a (ภาพที่ 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ)  
เซลล์ชนิด SiHa เป็นเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส Human papilloma virus (HPV16) ส่วนเซลล์ชนิด  
C33a เป็นเซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัส Human papilloma virus

##### 4.3.1 เซลล์ชนิด SiHa



ภาพที่ 4.5 เซลล์มะเร็งชนิด SiHa ที่กำลังขยาย 20X

##### 4.3.2 เซลล์ชนิด C33a

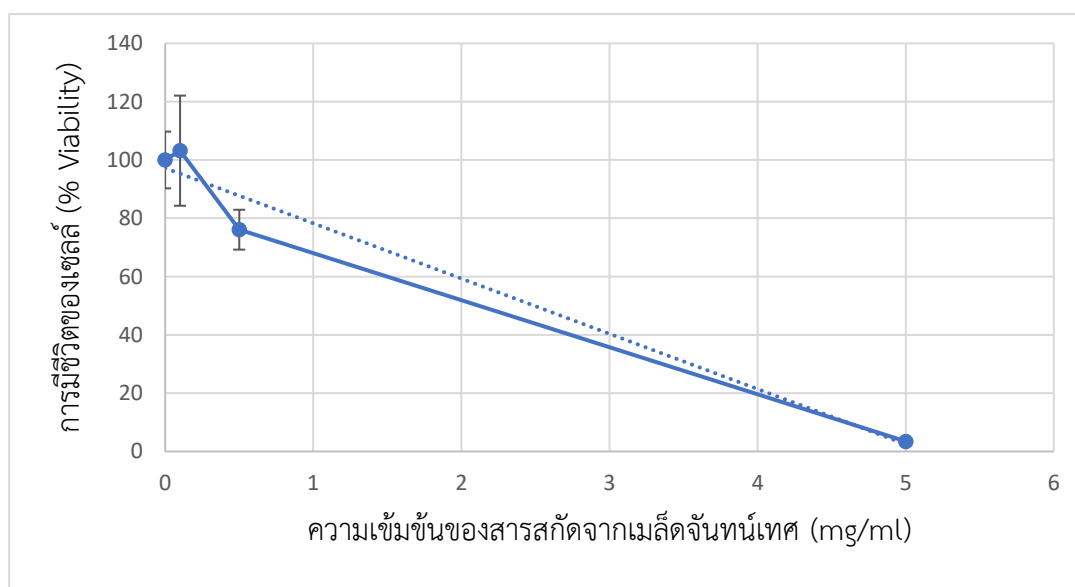


ภาพที่ 4.6 เซลล์มะเร็งชนิด C33a ที่กำลังขยาย 20X

#### 4.5 ผลการทดสอบสารสกัดที่มีต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก

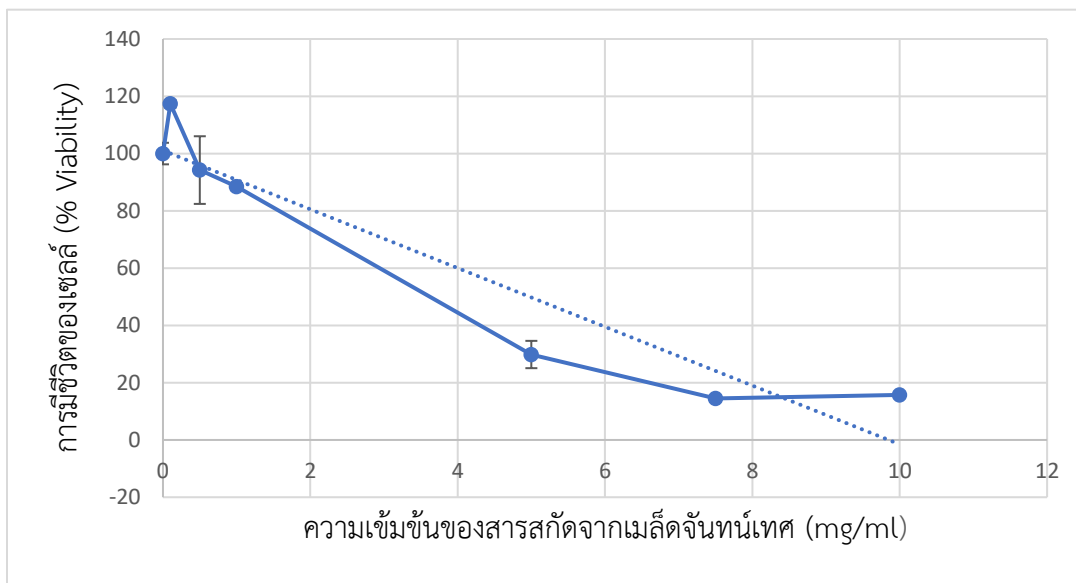
##### 4.5.1 การมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

จากการทดลองบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดจากจันทน์เทศที่ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 1 5 7.5 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ลดลงและมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ลดลงครึ่งหนึ่ง ( $LC_{50}$ ) อยู่ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากจันทน์เทศ 2.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีสมการเส้นตรงคือ  $y = 97.21 - 18.95x$  มีค่า  $R^2$  อยู่ที่ 0.968 (ภาพที่ 4.7) ส่วนเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ลดลงและมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ลดลงครึ่งหนึ่ง ( $LC_{50}$ ) อยู่ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากจันทน์เทศ 3.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีสมการเส้นตรงคือ  $y = 121.75 - 18.67x$  มีค่า  $R^2$  อยู่ที่ 0.835 (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.7 ผลของสารสกัดเมล็ดจันทน์เทศต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa

สมการเส้นตรงคือ  $y = 97.21 - 18.95x$

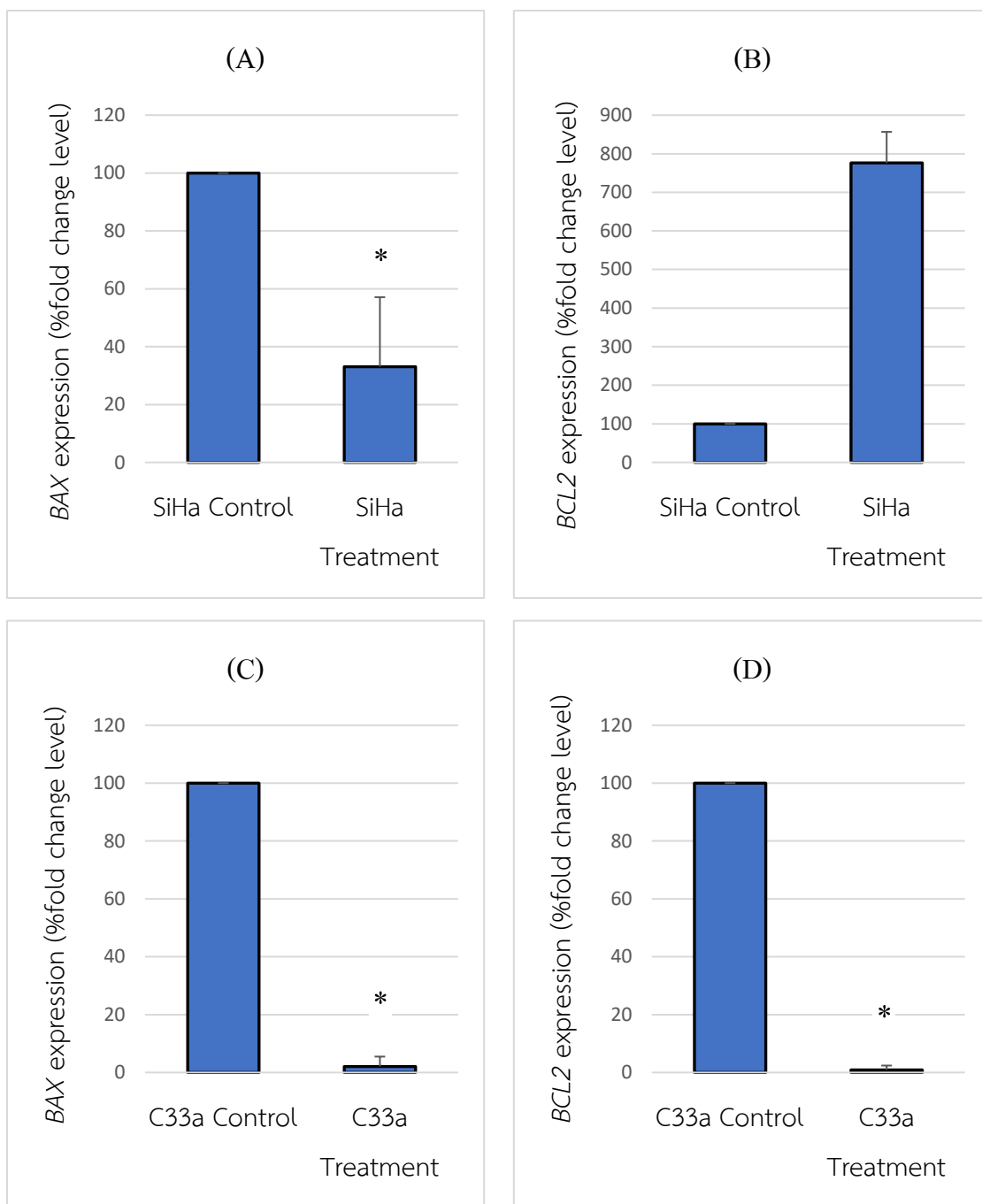


ภาพที่ 4.8 ผลของสารสกัดเมลิ็ดจันทน์เทศต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a

สมการเส้นตรงคือ  $y = 121.75 - 18.67x$

#### 4.5.2 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิส

จากการศึกษาการระดับการแสดงออกของยีนของเซลล์ชนิด SiHa และ C33a ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดจากจันทน์เทศที่ความเข้มข้น  $LC_{50}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยวิธี Real-time PCR การศึกษาในเซลล์ SiHa ที่ได้รับสารสกัดจันทน์เทศ ที่ความเข้มข้น  $LC_{50}$  (2.49 mg/ml) มีการแสดงออกของยีน *BAX* อยู่ที่  $33.1\% \pm 23.6$  ส่วนการแสดงออกของยีน *BCL2* มีการแสดงออก อยู่ที่  $776\% \pm 86.7$  ส่วนการศึกษาในเซลล์ C33a ที่ได้รับสารสกัดจันทน์เทศ ที่ความเข้มข้น  $LC_{50}$  (3.84 mg/ml) มีการแสดงออกของยีน *BAX* อยู่ที่  $2.1\% \pm 3.4$  ส่วนการแสดงออกของยีน *BCL2* มีการแสดงออก อยู่ที่  $0.9\% \pm 1.5$  (ภาพที่ 4.9) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Independent sample t-test โดยใช้ P value ที่ 0.05 พบว่าระหว่างการแสดงออกของยีน *BAX* ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองพบว่า เซลล์ SiHa มีการลดการแสดงออก 0.67 เท่าซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเซลล์ C33a มีการลดการแสดงออก 0.98 เท่าซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *BCL2* ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง พบว่าในเซลล์ SiHa มีการเพิ่มการแสดงออก 6.7 เท่าแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเซลล์ C33a มีการลดการแสดงออก 0.91 เท่าซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.1) เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการแสดงออกของยีน *BAX* และ *BCL2* ระหว่างเซลล์ที่ได้รับการทดสอบพบว่าเซลล์ชนิด SiHa มีการลดการแสดงออกของยีน *BAX* และเพิ่มการแสดงออกของยีน *BCL2* ในเซลล์ชนิด C33a มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *BAX* และลดการแสดงออกของยีน *BCL2* (ภาพที่ 4.10)

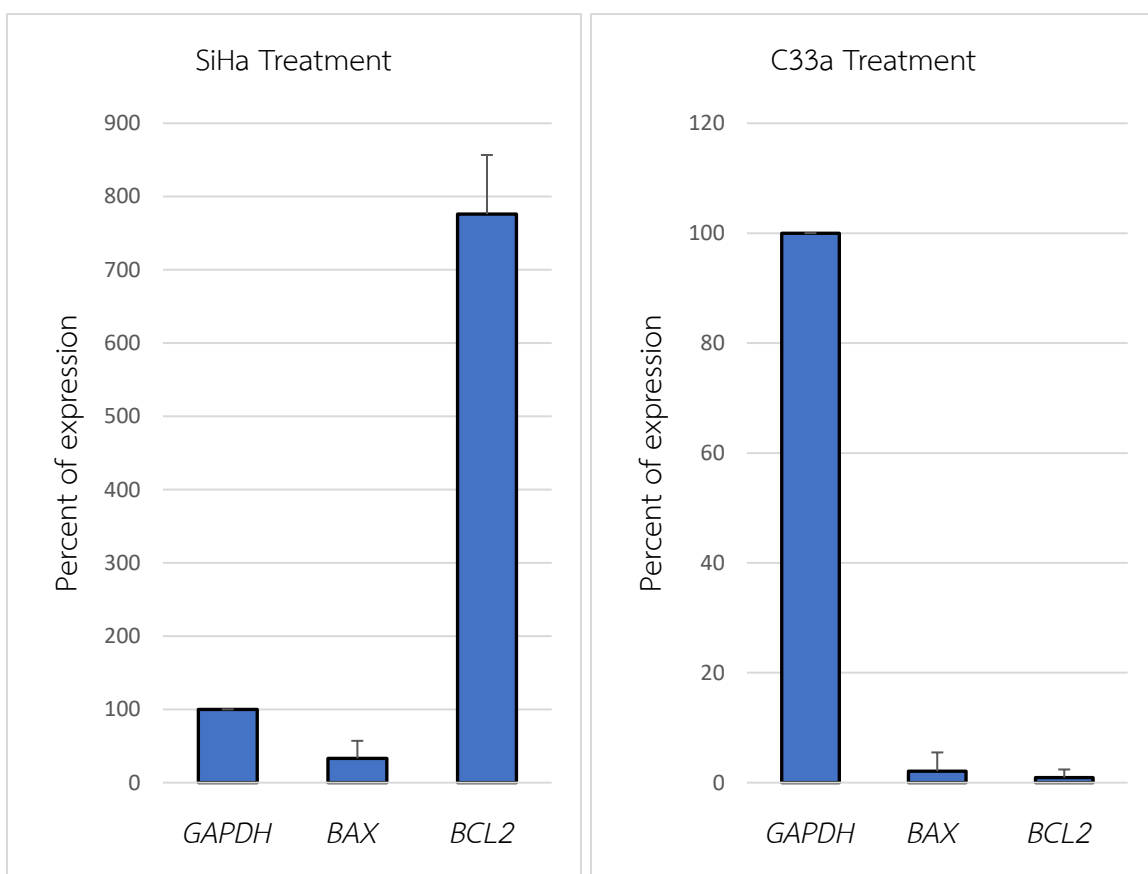


ภาพที่ 4.9 การแสดงออกของยีนจากตัวอย่างเซลล์มะเร็งรังปากมดลูกในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (A) และ(B) ชนิด SiHa (C) และ(D) ชนิด C33a



ตารางที่ 4.1 สรุปผลการแสดงออกของยีน

ชนิดของเซลล์	ยีน	p-value	ทิศทางของการแสดงออก
SiHa	<i>BAX</i>	$P < 0.05$	แสดงออกลดลง 0.67 เท่า
	<i>BCL2</i>	$P > 0.05$	ไม่แตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง
C33a	<i>BAX</i>	$P < 0.05$	แสดงออกลดลง 0.98 เท่า
	<i>BCL2</i>	$P < 0.05$	แสดงออกลดลง 0.91 เท่า



ภาพที่ 4.10 การแสดงออกของยีน เมื่อทำการเปรียบเทียบในกลุ่มทดสอบ

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการทดลอง และสรุปผล

สารสกัดเมล็ดจันทน์เทศด้วยเอทานอลถูกใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ LC<sub>50</sub> (Lethal concentration) แก่เซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยวิธี MTT assay แสดงว่าสารสกัดในครั้งนี้นี้มีความสามารถในการทำให้เซลล์มะเร็งลดลงไปครึ่งหนึ่ง จากงานวิจัยก่อนหน้านี้นี้พบว่าสารสกัดจากจันทน์เทศมีคุณสมบัติในด้านความเป็นพิษแก่เซลล์ (Al-Jumaily and Al-Massody, 2012) นอกจากนี้สารสกัดจากเมล็ดจันทน์เทศถูกใช้ในการทดสอบความเป็นพิษแก่เซลล์มะเร็งทั้ง 7 ชนิดด้วยวิธี SRB assay พบความสามารถของสารสกัดที่เป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50% (Prakash and Gupta, 2013) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่สามารถหาความเข้มข้นของสารสกัดของเมล็ดจันทน์เทศที่ส่งผลต่อความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้

สารสกัดจากต้นพีเวอร์พีว (*Tanacetum parthenium*) มีค่า LC<sub>50</sub> อยู่ที่ 8.42±0.76 µM ในเซลล์ชนิด SiHa และสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) มีค่า LC<sub>50</sub> อยู่ที่ 152.34 และ 142.26 µM ในเซลล์ C33a และ SiHa ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดจากสมุนไพรมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ทำให้เซลล์มะเร็งลดลงไปครึ่งหนึ่ง และสามารถชักนำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ได้ (Al-Fatlawi et al., 2015 และ Ekalaksananan et al., 2015) เหมือนกับสารสกัดจากจันทน์เทศที่ได้ศึกษาในครั้งนี้

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าในเซลล์ชนิด SiHa มีการลดการแสดงออกของยีน BAX และเพิ่มการแสดงออกของยีน BCL2 ซึ่งอาจเกิดจากการที่เซลล์ชนิด SiHa เป็นเซลล์ที่มีการติดเชื้อของไวรัส (HPV16) ซึ่งจะมีการแสดงออกของโปรตีน E6 ทำหน้าที่ยับยั้งโปรตีน p53 ส่งผลให้ไม่มีการแสดงออกของยีน BAX และลดการแสดงออกของยีน BCL2 ให้ผลตรงกันข้ามกับเซลล์ชนิด C33a มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน Bax และลดการแสดงออกของยีน BCL2 ซึ่งอนุมานได้ว่าสารสกัดไปมีผลทำให้เพิ่มการทำงานของโปรตีน p53 ส่งผลให้มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน ยีน BAX และลดการแสดงออกของยีน BCL2 นำไปสู่กระบวนการอะพอพโทซิส (Paul and Kundu, 2017) ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยที่กล่าวว่า สารสกัด Butein จากสมุนไพรจีนมีการลดการแสดงออกของยีน BAX และเพิ่มการแสดงออกของยีน BCL-XL (antiapoptotic gene) ในเซลล์ SiHa ส่วนในเซลล์ C33a พบว่าการเพิ่มแสดงออกของยีน BAX มากกว่า BCL-XL (Yang et al., 2018)

การศึกษาในอนาคตควรใช้เทคนิคอื่นๆเข้ามาร่วมด้วย เช่น การใช้แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี เพื่อวิเคราะห์ถึงองค์ประกอบสาร และหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง รวมถึงควรทำการทดสอบสารสกัดกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกปกติด้วยว่าเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่ นอกจากนี้ควรมีการศึกษาผลของสารต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผ่านกระบวนการ BrdU assay และศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์เพิ่มเติม เช่น *p53* *BAK* และ *XIAP* (ปกป้อง ประยงค์, 2550) เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์

สรุปว่าจากการทดลองสกัดหยาบเมล็ดจันทน์เทศด้วยวิธี maceration พบว่าอัตราส่วน 1:30 (ผงจันทน์เทศ:แอลกอฮอล์) ให้อายุผลได้สูงที่สุด แต่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระพบที่อัตราส่วน 1:10 ให้ผลดีที่สุด เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a พบว่ามีค่า  $LC_{50}$  อยู่ที่ 2.49 และ 3.84 mg/ml ตามลำดับ และจากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิสพบว่าส่งผลให้มีการแสดงออกของยีน *BAX* ลดลง แต่ไม่มีผลต่อยีน *BCL2* ในเซลล์ SiHa และลดการแสดงออกของยีน *BAX* และ *BCL2* ในเซลล์ C33a

## บทที่ 6

### อ้างอิง

- โชติพร ชเลิศเพ็ชร์, อภิวัฒน์ มุทิตรากร และปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต. 2558. กลไกของโปรตีน E7 ของ Human papillomavirus ไทป์ 16 ในการเกิดเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน CCNA1 ในมะเร็งปากมดลูก. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52, กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ทวีศักดิ์ บุญเกิด และคณะ. 2530. การเก็บและรักษาตัวอย่างพันธุ์ไม้. 3. กรุงเทพมหานคร : อมรินทร์ พรินต์ติ้ง กรุ๊ป จำกัด.
- ปกป้อง ประยงค์, นาถธิดา วีระปรียากร และสหพัฒน์ บัณฑิตรักษ์. 2550. อะพอพอโทซิส: วิธีและกาตรวจวัด. วารสารวิจัยสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 21 : 227-238.
- Al-Fatlawi, A.A., et al. 2015. Effects of parthenolide on growth and apoptosis regulatory genes of human cancer cell lines. Pharmaceutical Biology 53 : 104-109.
- Asgarpanah, J., and Kazemivash, N. 2012. Phytochemistry and pharmacologic properties of *Myristica fragrans* Hoyutt. African Journal of Biotechnology 11 : 12787-12793.
- Ashe, P.C., and Berry, M.D. 2003. Apoptotic signaling cascades. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 27 : 199-214.
- 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.
- Bhatla, N., et al. 2019. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. The International Journal of Gynecology & Obstetrics 145 : 129-135.

- De Giffoni De Carvalho, J.T., et al. 2019. Medicinal plants from Brazilian Cerrado: antioxidant and anticancer potential and protection against chemotherapy toxicity. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2019 : 1-16.
- Chirathaworn, C., et al. 2007. *Myristica fragrans* Houtt. Methanolic extract induces apoptosis in human leukemia cell line through *SIRT1* mRNA downregulation. The Journal of Medical Association of Thailand 90 : 2422-2428.
- Choi, Y., Lee S.M., Chun, J., Lee, H.B., and Lee, J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. Food Chemistry 99 : 381-387.
- De Wilde, W.J.J.O., 2002. Myristicaceae. In: Santisuk, T. and Larsen, K. (Ed): Flora of Thailand volume 7 part 4. Prachachon Bangkok. Thailand. pp. 720-777.
- Ekalaksananan, T., et al. 2015. Activity of andrographolide and its derivatives on HPV16 pseudovirus infection and viral oncogene expression in cervical carcinoma cells. Nutrition and Cancer 67 : 687-696.
- Ferlay, J., et al. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. International Journal of Cancer 127 : 2893-2917.
- Ghim, S.J., Basu, P.S., and Jenson, A. 2014. Cervical cancer: etiology, pathogenesis, treatment, and future vaccines. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 3 : 207-214.
- Guerin, M.B., Mckernan, D.P., O'brien, C.J., and Cotter, T.G. 2006. Retinal ganglion cells: dying to survive. The International Journal of Developmental Biology 50 : 665-674.
- Jaiswal, P., Kumar, P., Singh, V.K., and Singh, D.K. 2009. Biological effects of *Myristica fragrans*. ARBS Annual Review of Biomedical Sciences 11 : 21-29.

- Jemal, A., et al. 2011. Global cancer statistics. CA A Cancer Journal for Clinicians 61 : 69-90.
- Kucukgul Gulec, A., Altinterim, B., and Aksu, O. 2012. Determination of lethal concentration (LC50) values of *Cinnamomum zeylanicum* hydrosol on carp fish. Iranian Journal of Fisheries Sciences 12 : 34-44.
- 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.
- Lin, F.J., et al. 2014. HPLC-fingerprints and antioxidant constituents of *Phyla nodiflora*. The Scientific World Journal 2014 : 1-8.
- 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.
- Mehnatha, S., Arjamaa, M., Rajanb, M., Annamalic, G., and Jeyaraja M. 2018. Co-encapsulation of dual drug loaded in MLNPs: Implication on sustained drug release and effectively inducing apoptosis in oral carcinoma cells. Biomedicine & Pharmacotherapy 104 : 661 – 671.
- Moga, M.A., et al. 2018. An overview on the anticancer activity of *Azadirachta indica* (Neem) in gynecological cancers. International Journal of Molecular Sciences 19 : 1-26.
- Munoz, N., et al. 2003. Epidemiologic classification of Human papillomavirus types associated with cervical cancer. The New England Journal of Medicine 348 : 518-527.

- Ng, W.K., Yazan, L.S., and Ismail, M. 2011. Thymoquinone from *Nigella sativa* more potent than cisplatin in eliminating of SiHa cells via apoptosis with down-regulate of Bcl-2 protein. Toxicology in Vitro 25 : 1392-1398.
- Paul-Samojedny, M., et al. 2005. Expression of cell survival/death genes: *Bcl-2* and *Bax* at the rate of colon cancer prognosis. Biochimica et Biophysica Acta 1741 : 25-29.
- Paul, S., Kundu, S. 2017. Induction of apoptosis by fatty acid rich fraction of *Solanum nigum* on cervical cancer. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science 9 : 199-206
- Pientaweeratch, S., Panapisal, V., and Tansirikongkol, A. 2016. Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activities of *Phyllanthus emblica*, *Manilkarazapota* and silymarin: an in vitro comparative study for anti-aging applications. Pharmaceutical Biology 54:9, 1865-1872.
- Prakash, E. and Gupta, D.K. 2013. Cytotoxic activity of ethanolic extract of *Myristica fragrans* (Houtt) against seven human cancer cell lines. Universal Journal of Food and Nutrition Science 1 : 1-3.
- Reedy, G.M. 2019. Cervical cancer. (ออนไลน์) แหล่งที่มา: <https://www.cancer.org/content/cancer/en/cancer/cervical-cancer/references.html#> (14 ตุลาคม 2562)
- 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.

- Safarzadeh, E., Sandoghchian, S., and Baradaran, B. 2014. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. Advance Pharmaceutical Bulletin 4 : 421-427.
- Sintuwanon, E., Tammachote, N., and Tammachote, R. Selection of chondrogenic genes using bioinformatics for gene expression study in synoviocytes from knee osteoarthritis patients. Proceeding of SDNC 2013, Thailand.
- Snoek, B.C., et al. 2019. Cervical cancer detection by DNA methylation analysis in urine. Scientific Report 9 : 3088.
- Stone, S.C., Rossetti, R.A.M., Lima, A.M., and Lepique, A.P. 2014. HPV associated tumor cells control tumor microenvironment and leukocytosis in experimental models. Immunity, Inflammation and Disease 2 : 63-75.
- Thuong, P.T., et al. 2013. Cytotoxic and anti-tumor activities of lignans from the seed of Vietnamese nutmeg *Myristica fragrans*. Pharmacal Research 37 : 399-403.
- Torre, L.A., Islami F., Siegel, R.L., Ward, E.M., and Jemal, A. 2017. Global cancer in women: burden and trends. Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention 26 : 444-457.
- Tzifi, F., et al. 2011. The Role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. Advances in Hematology 2012 : 1-15.
- Wukirsari, T., et al. 2016. Effect of the structure of dietary epoxy lignan on its cytotoxic activity: relationship between the structure and the activity of 7,7'-epoxy lignan and the introduction of apoptosis by caspase 3/7. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 80 : 669-675.



Yang, P.Y., Hu, D.N., Kao, Y.H., Lin, I.C., and Liu, F.S. 2018. Butein induces apoptosis cell death of human cervical cancer cells. Oncology Letter 16 : 6615-6623

Zhu, L., et al. 2015. Curcumin triggers apoptosis via upregulation of *Bax/Bcl-2* ratio and caspase activation in SW872 human adipocytes. Molecular Medicine Reports 12 : 1151-1156.

Zhu, X., Wang, J., Ou, Y., Han, W., and Li, H. 2013. Polyphenol extract of *Phyllanthus emblica* (PEEP) induces inhibition of cell proliferation and triggers apoptosis in cervical cancer cells. European Journal of Medical Research 18 : 46.

## ภาคผนวก ก

### 1. สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1. เตรียมผง Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1 ซอง แล้วเทลงขวดปริมาตร 1000 ml ที่มีน้ำที่ผ่านการautoclave 900 ml เขย่าให้เข้ากัน
2. ชั่งผงโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตปริมาณที่ขึ้นกับสูตรของแต่ละบริษัท ลงในขวดข้อ1
3. ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml
4. นำไปกรองด้วยเครื่องกรอง
5. เก็บเพื่อใช้ต่อไป

### 2. การเตรียม Complete DMEM (100 ml)

1. เติมDMEM จากที่เตรียมไว้ ปริมาตร 94 ml ลงในขวด 100 ml
2. เติม Fetal bovine serum (FBS) ปริมาตร 5 ml ลงในขวดข้อ1
3. เติม Antibiotic-Antimycotic (100x) 1 ml

### 3. Cell trypsinization

- 2.1 เทอาหารเลี้ยงเซลล์(media) เก่าใน flask เลี้ยงเซลล์ทิ้งไป
- 2.2 ล้าง flask ด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline(PBS) 3 ml
- 2.3 เติมสารละลาย trypsin 0.25% 1.5 ml
- 2.4 บ่มที่ 37 °C และ 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 10 นาที
- 2.5 นำ flask มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากเซลล์ไม่หลุดให้เคาะเล็กน้อย ดูดสารละลายที่มีเซลล์อยู่ใส่หลอด 1.5 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 400 rpm 1.30 นาที
- 2.5 ใส่ media ใหม่ ใน flask ใหม่
- 2.6 นำหลอด 1.5 ml หลังจากปั่นเหวี่ยงเทส่วนใสทิ้งไป พร้อมเติม media 1 ml
- 2.7 ใช้ไมโครปิเปต ผสมเซลล์กับ media ให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่ flask ตามต้องการ

### 4. การนับเซลล์โดยใช้ Hemocytometer

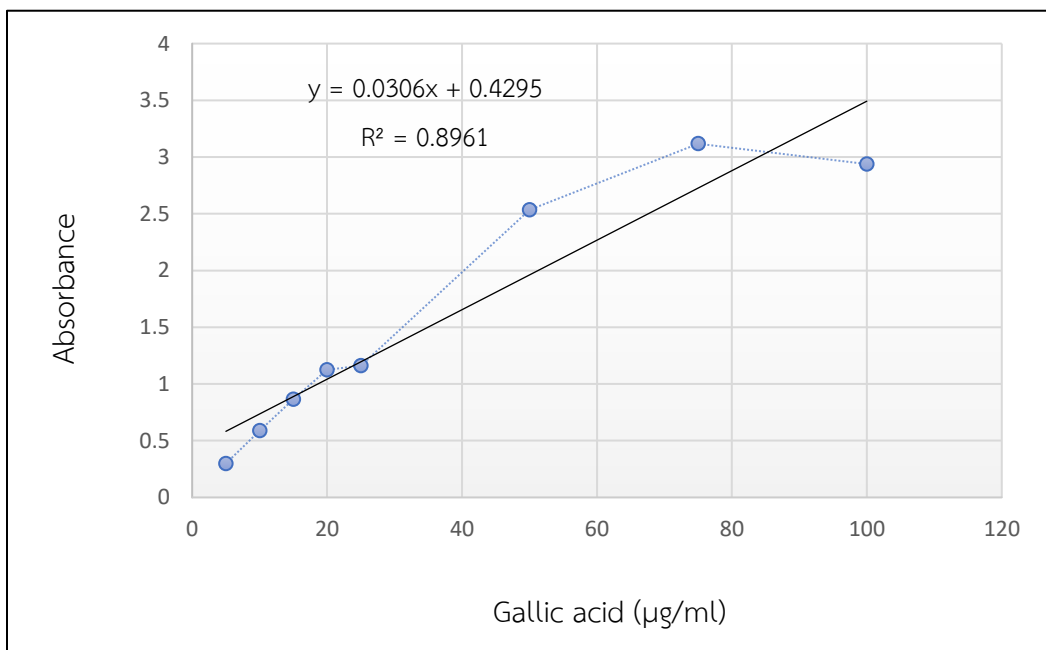
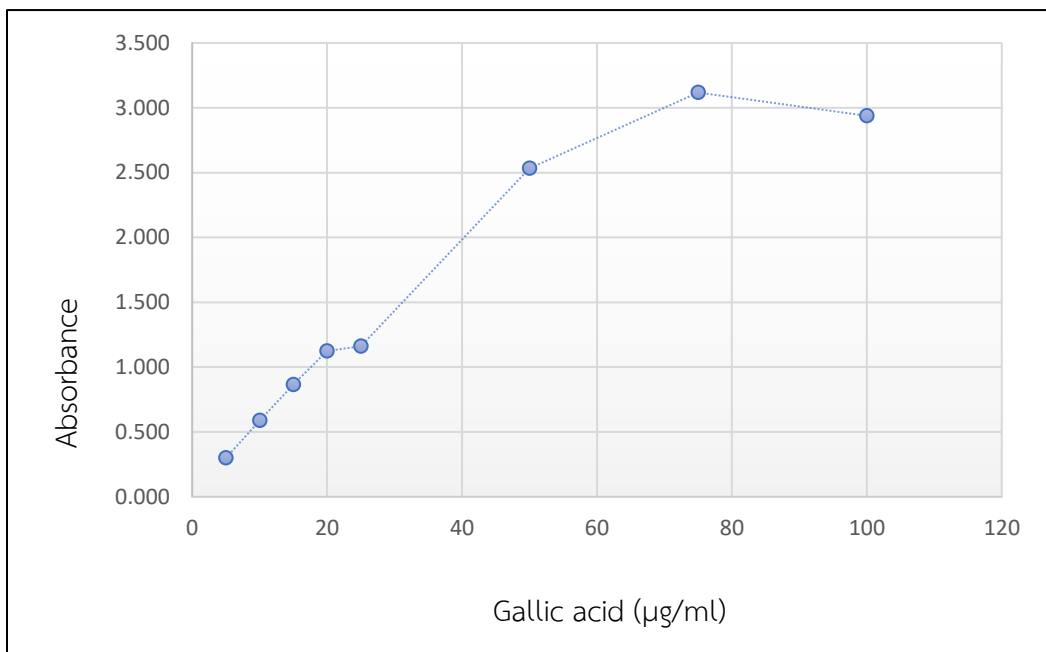
- 3.1 นำสารละลายที่มีเซลล์อยู่ 10 µl ผสมกับสารละลาย trypan blue stain 10 µl
- 3.2 นำสารที่ผสมเข้ากันดีแล้วมา 10 µl ใส่ใน hemocytometer glass
- 3.3 นับจำนวนเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เครื่องนับจำนวน
- 3.4 คำนวณปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร

$$\text{ปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร} \left( \frac{\text{cells}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{จำนวนเซลล์รวมใน 4 ช่อง}}{4} \times 2 \times 10^4$$

- 3.5 คำนวณปริมาณสารละลายที่บรรจุปริมาณเซลล์ที่ต้องการใช้

$$\text{ปริมาณสารละลาย (ml)} = \frac{\text{ปริมาณเซลล์ที่ต้องการ}}{\text{ปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร}}$$

## ภาคผนวก ข



ภาพสารละลายมาตรฐานของ Gallic acid

ตารางที่ 3.2 สารที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA

ชนิดของสาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร( $\mu$ l)
RNA template	500ng	5
RevertUP™ II Reverse Transcriptase	10 U/ $\mu$ l	1
5x Reverse Transcriptase Buffer	1x	4
Oligo (dT) <sub>12-18</sub>	0.25 $\mu$ M	0.5
RNase Inhibitor	1 U/ $\mu$ l	0.5
dNTP Mix	1 mM(each dNTP)	2
PCR Grade Water	-	ปรับให้ได้ปริมาตรรวม 20
	ปริมาตรรวม	20

ตารางที่ 3.3 สารที่ใช้ในการทำ Real-time PCR

ชนิดของสาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร( $\mu$ l)
cDNA	100ng	1.5
10 $\mu$ M Forward primer	100 nM	0.2
10 $\mu$ M Reverse primer	100 nM	0.2
4x CAPITAL qPCR Green Mix	1x	5
Nuclease free water		ปรับให้ได้ปริมาตรรวม 20
	ปริมาตรรวม	20

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการทำ Real-time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ( $^{\circ}$ C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial activation	95	3 นาที	1
Denaturation	95	10 วินาที	40
Annealing/Extension	60	30 วินาที	