

บทที่ 4

ผลการศึกษาวิจัย

4.1 รายละเอียดของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่นำมาทดสอบ

รายชื่อพืชสมุนไพรที่นำมาสกัด ส่วนของพืชที่นำมาสกัด วิธีการสกัด และปริมาณสกัด (extract yield) แสดงในตารางที่ 4.1 โดยสารสกัดหยาบแต่ละชนิดถูกสกัดด้วยวิธีการทั้ง 2 แบบ คือ สกัดโดยเมทานอล และ ไดคลอโรมีเทน ยกเว้นสารสกัดหยาบสมุนไพรแบบเมทานอลของเห็ดถั่งเช่าที่ไม่มีตัวอย่างสารสกัดหยาบ

4.2 ผลการคัดเลือกสารสกัดหยาบด้วยวิธี MTT assay

การคัดเลือกสารสกัดหยาบสมุนไพรโดยใช้วิธี MTT assay การทดสอบหาค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย dichloromethane ให้ผลดังตารางที่ 4.2 และการทดสอบหาค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย methanol ให้ผลดังตารางที่ 4.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.1 รายละเอียดของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่นำมาทดสอบ

ลำดับที่	พืชสมุนไพรที่นำมาสกัดหยาบ	ส่วนที่นำมาสกัด	Extract yield (%)	
			dichloromethane	methanol
1	ก้องแกบเครือ	ใบ	0.21	4.29
2	ดีหมี	ใบ	0.49	6.85
3	โตไม่รู้ล้ม	ทั้งต้น	0.48	3.67
4	ตัวเหลือง	กิ่ง	0.23	11.51
5	ตีนสูงคอย	หัวใต้ดิน	0.10	22.54
6	เปล้าเลือด	หัวใต้ดิน	0.54	11.51
7	ฝาง	ผล	0.17	9.49
8	เพกา	กิ่ง	0.60	4.10
9	มะเดื่อปล้อง	ผล	0.53	2.42
10	ไม้แดง	ใบ	0.39	11.69
11	รางจืด	ใบ	1.5	5.30
12	รางจืดแดง	ใบ	0.40	3.63
13	ละหุ่งแดง	ใบ	0.55	9.49
14	สีพันคนทา	ใบ	0.44	16.42
15	เห็ดถั่งเช่า	ทั้งต้น	0.78	ไม่มีตัวอย่าง
16	อ้อยขม	ใบ	0.20	7.46

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

ตารางที่ 4.2 ค่า IC₅₀ ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย dichloromethane

สารสกัดหยาบ สมุนไพร	IC ₅₀ (µg/ml)±SD		SI	p value
	Primary chondrocyte	SW1353		
ก้องแแถบเครือ	564.85 ± 68.16	627.26 ± 102.76	0.901	0.430
ดีหมี	376.75 ± 42.60	443.83 ± 59.07	0.849	0.186
โตไม้รัฐส้ม	216.20 ± 13.54	412.02 ± 5.03	0.525	0.000*
ตีวเหลือง	454.50 ± 41.20	758.06 ± 33.50	0.600	0.001*
ตีนชู้ดอย	382.70 ± 8.20	9.74 ± 0.36	39.292	0.000*
เปล้าเลือด	628.30 ± 85.70	1890.70 ± 415.2	0.332	0.007*
ฝาง	371.42 ± 1.75	456.91 ± 56.48	0.813	0.059
เพกา	473.76 ± 16.80	509.12 ± 46.38	0.931	0.282
มะเดื่อปล้อง	421.20 ± 5.04	358.90 ± 28.98	1.174	0.021
ไม้แดง	37.03 ± 20.80	70.97 ± 1.26	0.522	0.048*
รางจืด	578.60 ± 46.10	578.13 ± 37.75	1.001	0.990
รางจืดแดง	448.90 ± 6.50	318.12 ± 85.71	1.411	0.058
ละหุ่งแดง	517.30 ± 18.40	531.78 ± 102.4	0.973	0.821
สีพันคนทา	545.20 ± 48.25	849.32 ± 29.07	0.642	0.001*
เห็ดถั่งเช่า	465.40 ± 12.99	384.30 ± 1.13	1.211	0.000*
อ้อยขม	366.88 ± 6.60	173.40 ± 78.72	2.116	0.013*

SI = Selectivity Index

เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ระหว่างค่า IC₅₀ ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่ทดสอบในเซลล์กระดูกอ่อนปกติและเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน

ตารางที่ 4.3 ค่า IC₅₀ ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย methanol

สารสกัดหยาบ สมุนไพร	IC ₅₀ (µg/ml)±SD		SI	P value
	Primary chondrocyte	SW1353		
ก้องแกบเครือ	487.18 ± 5.67	799.60 ± 18.90	0.609	0.000*
ดีหมี	419.04 ± 64.06	465.05 ± 52.43	0.901	0.390
โตไม้รู้อุ้ม	73.45 ± 14.15	<10	7.345	0.001*
ตัวเหลือง	665.97 ± 51.86	535.01 ± 91.00	1.245	0.096
ตีนชั่งคอย	<10	<10	-	-
เปล้าเลือด	646.5 ± 15.76	1692.3 ± 448.68	0.382	0.016*
ฝาง	237.05 ± 182.85	593.3 ± 10.14	0.400	0.028*
เพกา	357.78 ± 155.6	490.49 ± 104.68	0.729	0.288
มะเคือปลั่ง	226.5 ± 3.99	233.38 ± 3.40	0.971	0.860
ไม้แดง	348.33 ± 0.72	482.8 ± 141.63	0.721	0.175
รางจืด	320.98 ± 7.25	426.54 ± 21.50	0.753	0.001*
รางจืดแดง	297.6 ± 90.42	399.74 ± 103.77	0.744	0.268
ละหุ่งแดง	488.42 ± 99.36	612.5 ± 81.29	0.797	0.169
สีฟันคนทา	585.60 ± 6.72	1052.23 ± 21.89	0.557	0.000*
เห็ดถั่งเช่า	NA	NA	NA	-
อ้อยขม	457.56 ± 48.30	329.06 ± 64.12	1.391	0.050*

SI = Selectivity Index, NA = not available

เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ระหว่างค่า IC₅₀ ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่ทดสอบในเซลล์กระดูกอ่อนปกติและเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน

จากผลการทดสอบหาค่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบสมุนไพรด้วยวิธี MTT assay พบว่า ผลการทดสอบในเซลล์กระดูกอ่อนปกติ สารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย dichloromethane ที่ให้ค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุดคือ ไม้แดง และสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย dichloromethane ที่ให้ค่า IC_{50} ที่สูงที่สุดคือเปล้าเลือด ผลการทดสอบในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน สารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย dichloromethane ที่ให้ค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุดคือ ดินสूंคดย และสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย dichloromethane ที่ให้ค่า IC_{50} ที่สูงที่สุดคือเปล้าเลือด เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างเซลล์สองชนิดพบว่า สารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย dichloromethane ของดินสूंคดย, มะเดื่อปล้อง, อ้อยขมและเห็ดถั่งเช่ามีค่า IC_{50} ของเซลล์กระดูกอ่อนปกติที่สูงกว่าค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดสอบ สารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย methanol ในเซลล์กระดูกอ่อนปกติ ที่ให้ค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุดคือ ดินสूंคดย และสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย methanol ที่ให้ค่า IC_{50} ที่สูงที่สุดคือตัวเหลือง ผลการทดสอบในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน สารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย methanol ที่ให้ค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุดคือ ดินสूंคดย เช่นเดียวกับในเซลล์กระดูกอ่อนปกติ และสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย methanol ที่ให้ค่า IC_{50} ที่สูงที่สุดคือเปล้าเลือด เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างเซลล์สองชนิดพบว่า สารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วย methanol ของโคไม้รัฐลัม และอ้อยขม มีค่า IC_{50} ของเซลล์กระดูกอ่อนปกติที่สูงกว่าค่า IC_{50} ของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการทดสอบดังกล่าว ได้ทำการแบ่งสารสกัดหยาบสมุนไพรออกเป็น 4 กลุ่ม โดยตัดสินจากค่าความเป็นพิษของสารและค่าความจำเพาะของสาร หรือ selectivity Index (SI) โดย 1) กลุ่มแรกคือกลุ่มที่ให้ผลดีและมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน (potentially cytotoxicity) กล่าวคือ มีค่า IC_{50} ในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนน้อยกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าความจำเพาะของสารที่มากกว่าหรือเท่ากับ 3 ($SI > 3$) (high selectivity) ได้แก่ สารสกัดหยาบ dichloromethane ของดินสूंคดย และสารสกัดหยาบ methanol ของโคไม้รัฐลัม อย่างไรก็ตามผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบสมุนไพรส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มที่สอง 2) คือกลุ่มที่ให้ผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนในระดับปานกลาง (moderate cytotoxicity) คือมีค่า IC_{50} ในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนระหว่าง 100 ถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า SI มากกว่าหรือเท่ากับ 3 ($SI > 3$) (high selectivity) หรือ SI น้อยกว่า 3 ($SI < 3$) (less selectivity) ได้แก่ สารสกัดหยาบ dichloromethane ของเห็ดถั่งเช่า, สารสกัดหยาบ dichloromethane ของโคไม้รัฐลัม และสารสกัดหยาบ methanol ของรางจืด กลุ่มที่สาม 3) คือกลุ่มที่ให้ผลยับยั้งเพียงเซลล์ปกติ มีค่า IC_{50} ในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนมากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แก่ สารสกัดหยาบทั้ง dichloromethane และ methanol ของเปล้าเลือด และสารสกัดหยาบ methanol ของสีฟันคนทา กลุ่มสุดท้าย 4) คือกลุ่มที่ให้ผลยับยั้งเซลล์

ทั้งสองชนิด มี IC_{50} ทั้งในเซลล์กระดูกอ่อนปกติและเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนน้อยกว่า 100 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ได้แก่ สารสกัดหยาบ dichloromethane ของไม้แดง และสารสกัดหยาบ methanol ของ ตีนสั้วคอย การแบ่งสารสกัดหยาบสมุนไพรดังกล่าวจะนำมาพิจารณาคัดเลือกสารที่จะนำไปทดสอบ ด้วยวิธี flow cytometry ต่อ

จากการนำค่า IC_{50} มาคำนวณผลทางสถิติเปรียบเทียบปัจจัยทั้งสามอย่าง คือ ชนิดของเซลล์ วิธีการสกัด และชนิดของสมุนไพรพบว่าปัจจัยเรื่องชนิดของสมุนไพรและชนิดของเซลล์เป็นปัจจัยที่ทำให้ผลการทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปัจจัยเรื่องวิธีการสกัดไม่ได้เป็นปัจจัยที่ทำให้ผลการทดสอบมีความแตกต่างกัน

4.3 ผลการทดสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส โดยชุดทดสอบ Muse® Caspase-3/7

จากผลการทดสอบอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT ได้คัดเลือกสารสกัดหยาบสมุนไพรจำนวน 9 ชนิด คือ สารสกัดหยาบ dichloromethane ของ เห็ดถั่งเช่า, ตีนสั้วคอย และรางจืด และสารสกัดหยาบ methanol ของ ตีนสั้วคอย, มะเดื่อปล้อง, ไม้แดง, รางจืด, รางจืดแดง และอ้อยขมเพื่อนำมาทดสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส โดย Muse® Caspase-3/7 assay โดยเลือกสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สามารถละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ ไม่มีตะกอนเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการอุดตันท่อในเครื่อง flow cytometry ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในการทดสอบคือ ความเข้มข้นที่ IC_{50} ของสารสกัดหยาบแต่ละชนิด ซึ่งมีค่าตามตารางที่ โดยความเข้มข้นที่ใช้จะเป็นเลขจำนวนเต็มเพื่อความสะดวกในการใช้เปิดตู้ดูดสารมาใช้ในการทดสอบ ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบแสดงในตารางที่

4.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.4 แสดงความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบใน flow cytometry โดยความเข้มข้นนี้เป็น IC₅₀ ของสารแต่ละชนิด

สารสกัดหยาบ	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่นำมาทดสอบ (µg/ml)	
	Primary chondrocyte	SW1353
ดินสूंคดย dichloromethane	383	10
ดินสूंคดย methanol	10	10
มะเดื่อปล้อง methanol	227	233
ไม้แดง methanol	348	483
รางจืด dichloromethane	579	578
รางจืด methanol	321	427
รางจืดแดง methanol	298	400
เห็ดถั่งเช่า dichloromethane	465	384
อ้อยขม methanol	458	329

ผลการทดสอบหาค่าร้อยละของเซลล์มีชีวิต (percentage of living cell) แสดงในภาพที่ 4.1 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์สองชนิด พบว่าสารสกัดหยาบสมุนไพรส่วนใหญ่ทำให้เซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนมีปริมาณเซลล์มีชีวิตน้อยกว่าเซลล์กระดูกอ่อนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นผลการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบ dichloromethane ของดินสूंคดยและเห็ดถั่งเช่าที่มีร้อยละของเซลล์มีชีวิตในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนสูงกว่าเซลล์กระดูกอ่อนปกติอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่ามีเพียงสารสกัดหยาบ methanol ของอ้อยขมที่ไม่ทำให้อ้อยขมของเซลล์มีชีวิตในเซลล์ทั้งสองชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อเปรียบเทียบร้อยละของเซลล์มีชีวิตระหว่างสารสกัดหยาบสมุนไพรต่างชนิดกันในเซลล์กระดูกอ่อนปกติ พบว่าร้อยละของเซลล์มีชีวิตที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรต่างชนิดกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ยกเว้นสารสกัดหยาบ dichloromethane ของเห็ดถั่งเช่าและสารสกัดหยาบ methanol ของไม้แดงที่แตกต่างจากสารสกัดหยาบชนิดอื่นอย่างไม่มีนัยสำคัญ โดยร้อยละของเซลล์มีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนปกติมีค่าสูงสุดเมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดหยาบ methanol ของดินสूंคดย และค่าต่ำสุดเมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดหยาบ methanol ของรางจืด

เมื่อเปรียบเทียบร้อยละของเซลล์มีชีวิตระหว่างสารสกัดหยาบสมุนไพรต่างชนิดกันในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน พบว่าร้อยละของเซลล์มีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนมีค่าสูงสุดเมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดหยาบ dichloromethane ของดินสूंคดย และค่าต่ำสุดเมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัด

หายาบ methanol ของรังจี๊ด จากค่าร้อยละของเซลล์มีชีวิตจะพบว่าสารสกัดหายาบ methanol ของรังจี๊ด มีความเป็นพิษต่อทั้งเซลล์กระดูกอ่อนปกติและเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน

สารสกัดหายาบส่วนใหญ่ให้ผลการทดสอบร้อยละของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสสูงกว่าเซลล์กระดูกอ่อนปกติ ยกเว้นผลของสารสกัดหายาบ dichloromethane ของดินสूंคดยและเห็ดถั่งเช่า การเปรียบเทียบการตายแบบอะพอพโทซิสระหว่างเซลล์สองชนิดเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหายาบสมุนไพรชนิดเดียวกันพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือร้อยละของการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนสูงกว่าเซลล์กระดูกอ่อนปกติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหายาบ dichloromethane ของเห็ดถั่งเช่า ดินสूंคดย และรังจี๊ด และสารสกัดหายาบ methanol ของดินสूंคดย ไม้แดง รังจี๊ดและรังจี๊ดแดง และพบว่าร้อยละของการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนสูงกว่าเซลล์กระดูกอ่อนปกติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหายาบ methanol ของมะเดื่อปล้อง มีเพียงผลการทดสอบด้วยสารสกัดหายาบ methanol ของอ้อยขมที่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

จากผลการทดสอบที่แสดงในภาพที่ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบร้อยละของการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์กระดูกอ่อนปกติ ระหว่างสารสกัดหายาบสมุนไพรต่างชนิดกัน พบว่าค่าร้อยละสูงที่สุดในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหายาบ methanol ของไม้แดง และค่าร้อยละต่ำที่สุดในเซลล์กระดูกอ่อนปกติที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหายาบ methanol ของรังจี๊ด

จากผลการทดสอบที่แสดงในภาพที่ 4.3 ผลการทดสอบหาร้อยละของเซลล์ที่เกิดการตายแบบเนโครซิส พบว่ามีเพียงผลของสารสกัดหายาบทั้ง dichloromethane และ methanol ของรังจี๊ดที่มีร้อยละของการตายแบบเนโครซิสในเซลล์กระดูกอ่อนปกติสูงกว่าเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ร้อยละของการตายแบบเนโครซิสมีค่าสูงที่สุดในเซลล์กระดูกอ่อนปกติเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหายาบ dichloromethane ของรังจี๊ด ส่วนสารสกัดหายาบทั้ง dichloromethane และ methanol ของดินสूंคดย สารสกัดหายาบ methanol ของไม้แดงและมะเดื่อปล้อง และสารสกัดหายาบ dichloromethane ของเห็ดถั่งเช่าให้ผลการตายแบบเนโครซิสของเซลล์ทั้งสองชนิดในระดับปานกลาง

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบตามการแบ่งกลุ่มสารสกัดหายาบสมุนไพรตามค่า IC_{50} และค่า SI แล้วนำไปทดสอบต่อด้วย flow cytometry พบว่า สารสกัดหายาบที่อยู่ในกลุ่มแรก (กลุ่มที่ให้ผลดีและมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน) คือ สารสกัดหายาบ dichloromethane ของดินสूंคดย เมื่อทดสอบด้วย flow cytometry พบว่ามีผลทำให้เซลล์กระดูกอ่อนปกติมีร้อยละของเซลล์มีชีวิตน้อยกว่าเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนและเซลล์กระดูกอ่อนปกติมีร้อยละการตายแบบอะพอพโทซิสมากกว่าเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน ในขณะที่สารสกัดหายาบสมุนไพรในกลุ่มที่สอง ได้แก่ สารสกัดหายาบ

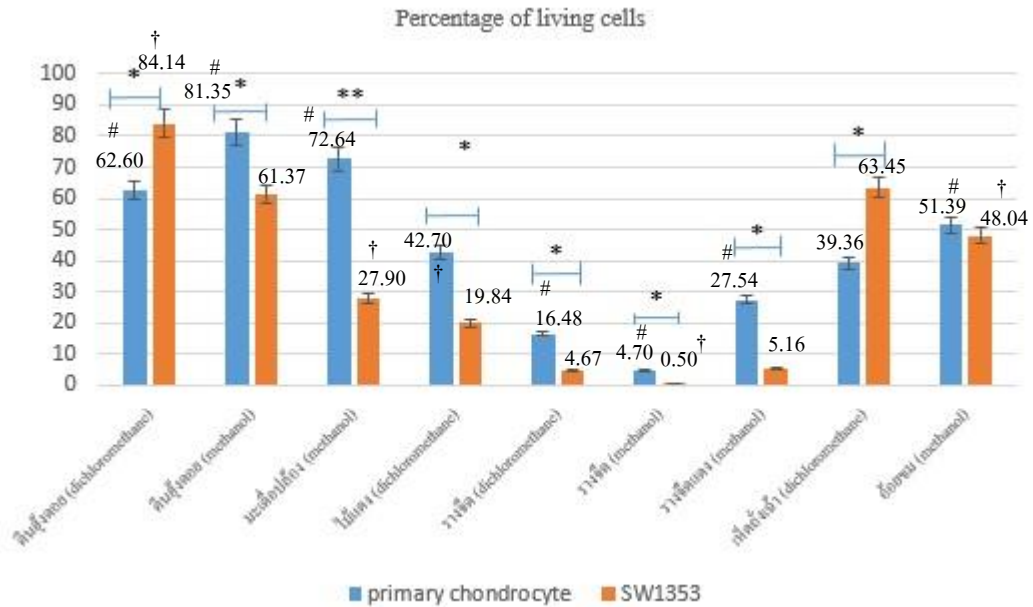
dichloromethane ของเห็ดถั่งเช่า, สารสกัดหยาบ dichloromethane ของรางจืด, สารสกัดหยาบ methanol ของรางจืด, สารสกัดหยาบ methanol ของรางจืดแดง, สารสกัดหยาบ methanol ของไม้แดง, สารสกัดหยาบ methanol ของมะเดื่อปล้องและสารสกัดหยาบ methanol ของอ้อยขม ในแง่ของเซลล์มีชีวิตและการตายแบบอะพอพโทซิส สารสกัดหยาบเกือบทุกชนิดให้ผลการทดสอบ flow cytometry ที่สอดคล้องกับผลของ MTT คือทำให้เซลล์กระดูกอ่อนปกติมีร้อยละการมีชีวิตมากกว่าเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน เซลล์กระดูกอ่อนปกติมีร้อยละการตายแบบอะพอพโทซิสน้อยกว่าเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนในระดับปานกลางถึงสูง ยกเว้นสารสกัดหยาบ dichloromethane ของเห็ดถั่งเช่าซึ่งมีผลต่อเซลล์กระดูกอ่อนปกติมากกว่าเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน ส่วนสารสกัดหยาบสมุนไพรในกลุ่มที่สี่ คือ สารสกัดหยาบ methanol ของดินสุมืดกลับให้ผล flow cytometry ที่ค่อนข้างดี คือ มีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนปกติมากกว่าเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน เซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนมีการตายแบบอะพอพโทซิสมากกว่าเซลล์กระดูกอ่อนปกติและมีการตายของเซลล์แบบเนโครซิสดำกว่าร้อยละ 1 ซึ่งอาจเป็นเหตุมาจากการแบ่งกลุ่มครั้งแรกสารสกัดหยาบ methanol ของดินสุมืดที่นำมาทดสอบมีการลดความเข้มข้น และความเข้มข้นต่ำสุดที่นำมาทดสอบคือ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผลการทดสอบมีค่า IC_{50} ของเซลล์ทั้งสองชนิดต่ำกว่า 10 แปลว่า สารสกัดหยาบที่นำมาทดสอบมีความเข้มข้นสูง เมื่อนำมาทดสอบการตายของเซลล์ด้วย flow cytometry จึงใช้สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งน่าจะมีความเหมาะสมต่อการทดสอบมากกว่า และเนื่องจาก flow cytometry สามารถแบ่งชนิดของเซลล์ได้อย่างละเอียดกว่าจึงสามารถทดสอบได้ว่าสารสกัดหยาบดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนค่อนข้างดี ดังนั้นหากต้องการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดหยาบ methanol ของดินสุมืดต่อไปควรลดความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่จะนำมาทดสอบให้ต่ำกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดสอบโดยวิธี MTT ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบ methanol ของดินสุมืดถูกจัดให้เป็นสารสกัดหยาบสมุนไพรที่เป็นพิษต่อทั้งเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนและเซลล์กระดูกอ่อนปกติ ในขณะที่สารสกัดหยาบ dichloromethane ของดินสุมืดถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มสารสกัดที่ให้ผลดีในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนและมีความจำเพาะเจาะจงสูง เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี flow cytometry กลับให้ผลว่าสารสกัดหยาบ methanol ของดินสุมืดสามารถกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนได้มากกว่าในเซลล์กระดูกอ่อนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อีกผลการทดสอบที่น่าสนใจคือ สารสกัดหยาบ methanol ของมะเดื่อปล้องให้ผลที่ดีในการกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนโดยส่งผลต่อการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์กระดูกอ่อนปกติน้อยกว่าและส่งผลต่อการตายแบบเนโครซิสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ในการทดสอบครั้งนี้มีการทดสอบด้วยสารที่สกัดด้วยวิธีต่างกัน 2 ชนิดคือ dichloromethane และ methanol ซึ่งผลการทดสอบจากในขั้นตอน MTT assay หลังจากนำมาคำนวณทางสถิติแล้วพบว่า ปัจจัยเรื่องวิธีการสกัดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 63% ซึ่งถือว่าต่ำมาก จึงสรุปว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ) ในขณะที่เมื่อนำสารสกัดหายาที่คัดเลือกแล้ว 9 ชนิด ได้แก่ สารสกัดหายา dichloromethane ของดินฮั้งคอย, สารสกัดหายา methanol ของดินฮั้งคอย, สารสกัดหายา methanol ของมะเดื่อปล้อง, สารสกัดหายา methanol ของไม้แดง, สารสกัดหายา dichloromethane ของรางจืด, สารสกัดหายา methanol ของรางจืด, สารสกัดหายา methanol ของรางจืดแดง, สารสกัดหายา dichloromethane ของเห็ดถั่งเช่า และสารสกัดหายา methanol ของอ้อยขม ซึ่งในจำนวนนั้นมีสารสกัดหายาที่สกัดด้วยทั้ง dichloromethane และ methanol คือ สารสกัดหายาดินฮั้งคอยและรางจืด เมื่อทดสอบด้วย flow cytometry เปรียบเทียบร้อยละการตายแบบอะพอพโทซิสของสารสกัดหายาดินฮั้งคอยและรางจืด พบว่า ผลการทดสอบด้วยสารสกัดหายา dichloromethane และ methanol มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งในสารสกัดหายาดินฮั้งคอยและรางจืด แสดงให้เห็นว่าปัจจัยเรื่องวิธีการสกัดส่งผลต่อการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสอย่างมีนัยสำคัญ

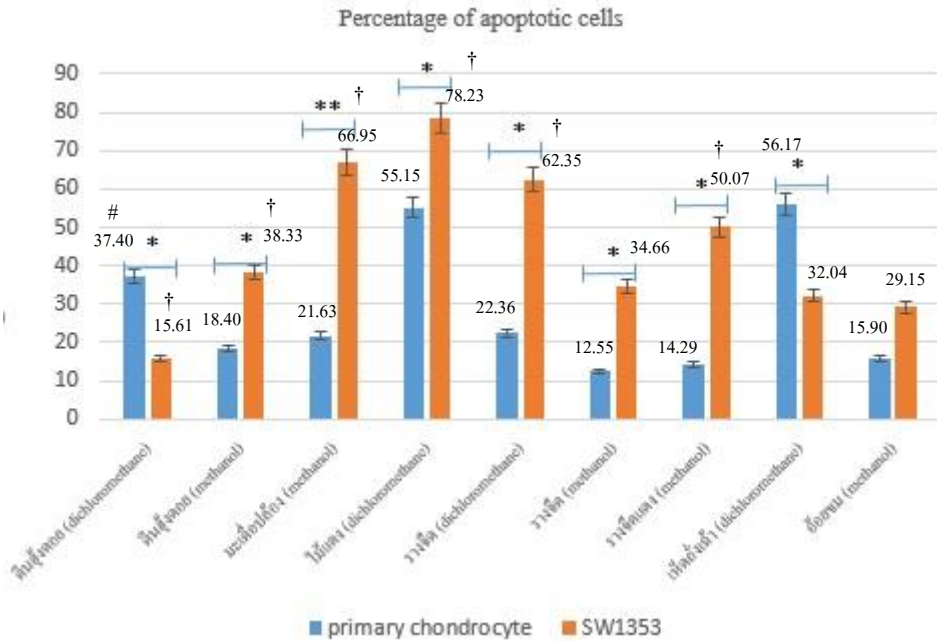


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.1 แสดงร้อยละของเซลล์มีชีวิต (percentage of living cell) พร้อมสัญลักษณ์แสดงความแตกต่างทางสถิติ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$ ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%) เมื่อเปรียบเทียบเซลล์กระดูกอ่อนปกติและเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรชนิดเดียวกัน ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.001$ ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 99%) เมื่อเปรียบเทียบเซลล์กระดูกอ่อนปกติและเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรชนิดเดียวกัน # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบเซลล์กระดูกอ่อนปกติที่ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรต่างชนิดกัน † แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรต่างชนิดกัน

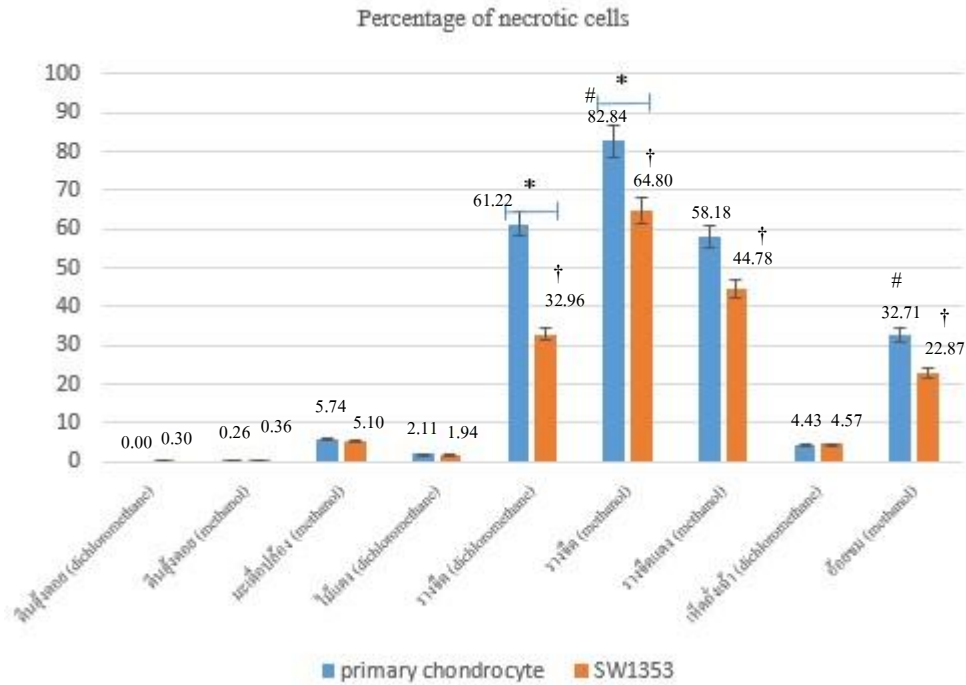
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.2 แสดงร้อยละของเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิส (percentage of apoptotic cell)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$ ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%) เมื่อเปรียบเทียบเซลล์กระดูกอ่อนปกติและเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรชนิดเดียวกัน ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.001$ ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 99%) เมื่อเปรียบเทียบเซลล์กระดูกอ่อนปกติและเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรชนิดเดียวกัน # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบเซลล์กระดูกอ่อนปกติที่ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรต่างชนิดกัน † แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรต่างชนิดกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.3 แสดงร้อยละของเซลล์ที่เกิดการตายแบบเนโครซิส (necrosis)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$ ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%) เมื่อเปรียบเทียบเซลล์กระดูกอ่อนปกติและเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรชนิดเดียวกัน # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบเซลล์กระดูกอ่อนปกติที่ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรต่างชนิดกัน † แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรต่างชนิดกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved