บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

การที่ค่า IC_{50} จากการทดสอบในเซลล์กระดูกอ่อนปกติมีค่าสูงกว่าค่า IC_{50} จากการทดสอบในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงถึงความสามารถของสารสกัดหยาบที่นำมาทดสอบชนิดนั้นว่ามีศักยภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน โดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนได้ในขณะที่ส่งผลยับยั้งเซลล์กระดูกอ่อนปกติน้อย ซึ่งเป็นตัววัดประสิทธิภาพของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (anticancer agent) (Bezivin *et al.* 2003; Omoyeni *et al.* 2014) และนอกจากการใช้สถิติในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง IC_{50} ของเซลล์กระดูกอ่อนปกติและเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนแล้ว ในงานวิจัยนี้ได้คำนวณค่า SI ซึ่งใช้ในการเปรียบเทียบและเป็นดัชนีที่ใช้ในการคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนโดยไม่ส่งผลยับยั้งเซลล์กระดูกอ่อนปกติ การคำนวณ SI ได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นดัชนีในการวัดความจำเพาะเจาะจงของสารด้วย (Belcher *et al.* 1966)

ผลการทดสอบมีจุดที่น่าสังเกตหลายจุด จุดแรกคือการทดสอบ flow cytometry ใช้ความเข้มข้นในการทดสอบคือ ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบสมุนไพรแต่ละชนิด แต่พบว่าผลการทดสอบ flow cytometry กลับให้ค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไม่เท่ากับร้อยละ 50 สามารถอธิบายได้คือ วิธีการเก็บเซลล์ที่ใช้ทดสอบ MTT assay เพื่อให้ได้ค่า IC_{50} และวิธีการเก็บเซลล์ที่ใช้ทดสอบ flow cytometry มีวิธีการที่ต่างกัน การเก็บเซลล์เมื่อทดสอบ MTT assay จะมีการทิ้งอาหารเลี้ยงเซลล์และล้าง 96-well plate ด้วย PBS เพื่อไม่ให้สีของอาหารเลี้ยงเซลล์หรือสีของสารสกัดหยาบที่ใช้ทดสอบมีผลต่อการอ่านค่าการดูดกลืนแสง ดังนั้นเซลล์ที่ตายในขณะทดสอบบางส่วนจะเป็นเซลล์ตายที่ลอยอยู่และถูกทิ้งไปพร้อมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ และบางส่วนหลุดออกไปเมื่อถูกชะล้างด้วย PBS ดังนั้น ค่า IC_{50} คือค่าที่วัดจากเซลล์ที่ยังเหลือและเกาะอยู่ใน plate ในขณะที่การเก็บเซลล์ก่อนทำ flow cytometry จะเป็นการเก็บเซลล์ทั้งหมด ทั้งเซลล์ที่ยังคงเกาะอยู่ที่ plate และเซลล์ที่ตายแล้วและลอยอยู่ในอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เลี้ยงเซลล์ทั้งหมดมาปั่นเก็บเฉพาะเซลล์ (ไม่เก็บส่วนสารละลาย) เพื่อนำมาทดสอบ การทดสอบทั้งสองขั้นตอนนี้เป็นการทดสอบที่ไม่ได้ต่อเนื่องกันและคิดย้อนกลับได้ และต้องทำความเข้าใจว่าการทดสอบด้วยวิธี MTT assay เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงจากสีที่คาดว่าจะเกิดขึ้นจากกระบวนการของเซลล์มีชีวิต ไม่ใช่การนับจำนวนเซลล์โดยตรง ดังนั้นการอ่านผลตามผลการทดสอบจากวิธี flow cytometry จะมีความจำเพาะและน่าเชื่อถือมากกว่าการอ่านค่า IC_{50}

จุดสังเกตอีกอย่างหนึ่งในผลการทดสอบคือ จะเห็นได้ว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบสมุนไพรบางชนิดจากการทดสอบ MTT assay เช่น สารสกัดหยาบ dichloromethane ของตีนฮุ้งดอย มีค่า IC_{50} ของเซลล์กระดูกอ่อนปกติสูงกว่า IC_{50} เซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน ซึ่งแปลความหมายตามผลการทดลองได้ว่าสารสกัดหยาบชนิดนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนมากกว่าเซลล์กระดูกอ่อนปกติ แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธี flow cytometry จะพบว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์กระดูกอ่อนปกติกลับมีค่าต่ำกว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระดูก ซึ่งมีผลการทดสอบของสารสกัดหยาบหลายตัวที่ดูแล้วค่า IC_{50} กับร้อยละการมีชีวิตไม่สอดคล้องกัน

จากที่กล่าวไปในข้างต้นคือ ในขั้นตอนการทำ MTT assay ก่อนที่จะใส่สารทดสอบจะมีการทิ้งอาหารเลี้ยงเซลล์และล้างด้วย PBS เหตุการณ์ดังกล่าวจึงสามารถอธิบายได้ว่า ในระหว่างขั้นตอนการล้างด้วย PBS ใน plate ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาบdichloromethane ของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนอาจมีเซลล์ที่ถูกชะหลุดออกไป ทำให้ค่าของ IC_{50} ของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนต่ำกว่าเซลล์กระดูกอ่อนปกติได้

สารสกัดสมุนไพรที่นำมาศึกษาบางชนิดเป็นสารสกัดที่มีการรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบ เช่น โด่ไม่รู้ล้ม พบว่านอกจากโด่ไม่รู้ล้มจะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Tsai and Lin 1998) และช่วยส่งเสริมการหายของแผล (Singh *et al.* 2005) แล้วโด่ไม่รู้ล้มยังมีสาร isodeoxyelephantopin เป็นองค์ประกอบซึ่งสารชนิดนี้ได้รับการรายงานว่าสามารถต้านเซลล์มะเร็งได้โดยไปกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 และหยุดการทำงานของวงจรเซลล์ (Kabeer *et al.* 2014) สอดคล้องกับผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ ผลการทดลองในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดหยาบ methanol ของโด่ไม่รู้ล้มที่นำมาทดสอบในเป็นมีความจำเพาะเจาะจงและพิษต่อเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนอย่างรุนแรง (potential cytotoxicity with high selectivity) ในขณะที่ส่งผลต่อเซลล์กระดูกอ่อนปกตินอ้ยกว่าในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน

ฝางเป็นพืชสมุนไพรอีกชนิดที่มีการรายงานเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (Chu *et al.* 2013) และสามารถยับยั้งสารกลุ่ม matrix metalloproteinase (MMPs) ในกระดูกอ่อนของมนุษย์ (Wu *et al.* 2011; Toegel *et al.* 2012) ซึ่ง MMPs เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทในการจัดโครงสร้างของ extracellular matrix (ECM) (Girard *et al.* 1993) และเกี่ยวข้องกับการพัฒนาและแพร่กระจายของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลล์มะเร็ง โดยมีส่วนช่วยในการสร้างหลอดเลือดใหม่ให้เซลล์มะเร็งด้วย (Ray *et al.* 1994) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าฝางสามารถลดระดับของสารก่อการอักเสบ (pro-inflammatory mediators) ในโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) ได้ (Wang *et al.*2011) แต่จากผลการทดลองในครั้งนี้จากผลของ MTT assay พบว่าสารสกัดหยาบของฝางทั้งสองแบบ (ทั้งที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล) ให้ผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนในระดับปานกลาง (moderate cytotoxicity) คือมีค่า IC_{50} ในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนระหว่าง 100 ถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า SI น้อยกว่า 3 (SI <3) (less selectivity) และมีค่า IC_{50} ในเซลล์กระดูกอ่อนปกติน้อยกว่าเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน ซึ่งผลดังกล่าวแสดงว่าสารสกัดหยาบฝางทั้งสองแบบไม่ได้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน จึงไม่นำมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป

งานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการรายงานว่า ในเห็ดถั่งเช่ามีสาร cordycepin, cordycepic acid และ cordlan ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ยับยั้งการเกิดเนื้องอกและลดการอักเสบ (Gu *et al.* 2007; Patel and Goyal 2012; Yue *et al.* 2013) แต่ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดหยาบของเห็ดถั่งเช่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูกอ่อนปกติมากกว่าเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนโดยที่กระตุ้นการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์กระดูกอ่อนปกติมากกว่าในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากการเตรียมและวิธีการสกัด (การสกัดด้วยน้ำ หรือ aqueous extraction, การสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และการสกัดด้วยเมทานอล) ที่แตกต่างกันอาจทำให้ผลการทดสอบแตกต่างกันได้ ดังนั้นผลการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบของฝางและเห็ดถั่งเช่าจึงยังมีความไม่ชัดเจนและควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมอีก นอกจากนี้แหล่งที่มาของสมุนไพรที่นำมาทดสอบที่แตกต่างกันอาจทำให้ผลการทดลองแตกต่างกันได้ด้วย เนื่องจากสภาพของดินที่ใช้ในการเพาะปลูก อุณหภูมิ การรับแสงแดด ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่มีผลต่อคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ในสมุนไพร (Gu *et al.* 2007) ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้ได้แก้ปัญหาเรื่องผลจากปัจจัยการปลูกต่างฤดูโดยการนำผลผลิตของแต่ละฤดูมาสกัดแล้วจึงนำสารสกัดในส่วนของทั้งปีมารวมกัน

ผลการทดสอบที่น่าสนใจคือ สารสกัดหยาบทั้งแบบไดคลอโรมีเทนและเมทานอลของรางจืด ทำให้เกิดการตายแบบเนโครซิสที่สูงมาก ยิ่งกว่านั้นคือทำให้เซลล์กระดูกอ่อนปกติเกิดการตายแบบเนโครซิสสูงกว่าเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ ทั้ง ๆ ที่มีงานวิจัยมากมายเกี่ยวกับรางจืดว่าเป็นพืชสมุนไพรที่นอกจากจะมีฤทธิ์แก้ปวด (antinociceptive) และลดการอักเสบ (Boonyarikpunchai *et al.* 2014) แล้วยังมีคุณสมบัติในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ (Oonsivilai *et al.* 2008) และลดความเป็นพิษอีกด้วย (Ruangyuttikarn *et al.* 2013) อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการรายงานผลการทดสอบสารสกัดของรางจืดในเซลล์กระดูกอ่อนทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งมาก่อน งานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นงานแรกที่มีการทดสอบสารสกัดหยาบรางจืดในเซลล์กระดูกอ่อนปกติและเซลล์มะเร็ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระดูกอ่อน ในบางกรณีสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่สามารถกระตุ้นการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสอาจมีผลไปกระตุ้นการตายแบบเนโครซิสด้วยเมื่อมีการใช้สารนั้นในความเข้มข้นที่สูง ขึ้นอยู่กับชนิดของการกระตุ้นและความแรงในการกระตุ้นที่ไปมีผลต่อระบบการตายของเซลล์ (death pathway) (Elmore 2007) ในงานวิจัยที่เกี่ยวกับสารต้านเซลล์มะเร็งบางงานได้กล่าวถึงระบบ necrotopic signaling pathway เพื่อกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเช่นกัน (Vandenabeele *et al.* 2010) อย่างไรก็ตามจากผลการทดสอบในครั้งนี้สารสกัดหยาบรางจืดไม่เหมาะสำหรับการนำมาใช้ในการรักษามะเร็ง และยังคงต้องการผลการทดลองที่มารองรับในอนาคต

ในประเทศไทยมีการรวบรวมรายชื่อสมุนไพร รายละเอียดและสรรพคุณของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ไว้หลายแหล่ง แต่ยังไม่มีฐานข้อมูลที่ครอบคลุมสมุนไพรทุกชนิดในประเทศไทย ยังคงมีสมุนไพรบางชนิดที่ไม่มีการรายงานรายละเอียดและการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น มะเดื่อปล้อง ซึ่งเป็นสมุนไพรที่ถูกรายงานการค้นพบใหม่ในประเทศไทยเมื่อปี ค.ศ. 2007 โดย Cornelis C. Berg และ Simon Gardner (Cornelis and Simon 2007) จึงยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับผลของสารสกัดมะเดื่อปล้องพันธุ์ *Ficus thailandica* C.C. Berg & S. Gardner ในแง่การรักษาโรค นอกจากนี้ยังมีรายละเอียดเกี่ยวกับสมุนไพรอีกจำนวนมากที่ยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติม ทั้งด้านความปลอดภัยในการนำไปใช้จริง ประสิทธิภาพทางการรักษาและข้อมูลการศึกษาที่น่าเชื่อถือ

ในการศึกษานี้พบว่าสารสกัดหยาบสมุนไพรบางชนิดที่ไม่เคยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้แสดงผลการทดลองที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อเพื่อให้ค้นพบคุณสมบัติในทางการรักษาที่ชัดเจนมากขึ้น คือ สารสกัดหยาบ methanol ของตีนฮุ้งดอย และมะเดื่อปล้อง แสดงผลที่น่าพอใจ คือ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนได้ในขณะที่ไม่ส่งผลความเป็นพิษต่อเซลล์กระดูกอ่อนปกติ จึงมีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อเพื่อให้ได้สารสกัดสมุนไพรชนิดใหม่ที่สามารถใช้ในการรักษามะเร็งได้ ตีนฮุ้งดอยเป็นสมุนไพรที่พบได้ในเขตเอเชียตะวันออกและในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ตีนฮุ้งดอยทั้งต้นสามารถนำมาใช้เป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการลดไข้ ส่วนรากสามารถนำมาใช้ช่วยสมานแผล ทั้งยังลดปวด ลดการอักเสบ ลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ แก้ไออีกด้วย (Liu *et al.* 2012)

อีกประเด็นที่มีความน่าสนใจคือ ปัจจัยเรื่องวิธีสกัดของสารสกัดหยาบแต่ละชนิด จากผลการทดสอบด้วย MTT assay ที่แสดงให้เห็นว่าปัจจัยเรื่องวิธีสกัดไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ แต่เมื่อมาทดสอบด้วยวิธี flow cytometry (โดยเหลือสารสกัดหยาบที่ใช้ทำการเปรียบเทียบปัจจัยการสกัดมีพียงสารสกัดหยาบตีนฮุ้งดอยและรางจืด) กลับพบว่าปัจจัยการสกัดมีผลต่อร้อยละการตายแบบอะพอพโทซิสอย่างมีนัยสำคัญทั้งในสารสกัดหยาบตีนฮุ้งดอยและรางจืด เมื่อพิจารณาเรื่องปัจจัยด้านการสกัดโดยเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น พบว่า วิธีการสกัด (เช่น สกัดด้วย dichloromethane,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สกัดด้วย methanol หรือ สกัดด้วยน้ำ) จะมีผลต่อสารออกฤทธิ์บางชนิดในสมุนไพรบางอย่าง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ซึ่งมีความแตกต่างกันตามชนิดของสมุนไพร (Au *et al.* 2001) งานวิจัยที่ทดสอบสารสกัดสมุนไพร 15 ชนิดในเซลล์มะเร็งทางเดินอาหารของมนุษย์ (ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ human liver carcinoma cell lines (HepG-2 and SMMC-7721), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร human gastric cancer cell line (BGC-823), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ human colon adenocarcinoma cell lines (LoVo and SW-116) และ เซลล์มะเร็งหลอดอาหาร esophagus adenocarcinoma cell line (CaEs-17) พบว่าผลของสารสกัดที่สกัดด้วยวิธี ethanol ให้ผลดีในการยับยั้งเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้ดีกว่าผลของสารที่สกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ (Sun *et al*. 2007) ในแง่ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีงานวิจัยที่พบว่าสมุนไพรที่สกัดด้วย methanol จะให้ผลการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสมุนไพรที่สกัดด้วย butylated hydroxytoluene (BHT) (Sokmen *et al*. 2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved