

การศึกษาฤทธิ์ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งเยื่อปอดมนุษย์ A549 ของรังสีก้อไอออน
ร่วมกับสารสกัดจากใบย่านาง

Cytotoxic Effects of Ionizing Radiation Combined with Yanang Leaves Extract
on Human Epithelial Lung Carcinoma A549 Cell Line

ฐิติทิพย์ ทิพยมนตรี

อีเมล: 6552003259@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ
สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร.อาริญา สาริกะภูติ

อีเมล: ariya.sar@mfu.ac.th

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

สารสกัดจากสมุนไพรได้รับความสนใจอย่างมากในการพัฒนาเป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพของรังสี เพื่อเพิ่มความไวของเซลล์มะเร็งต่อการรักษาด้วยรังสีให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และมีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ปกติที่ต่ำ งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์มะเร็งเยื่อปอดมนุษย์ A549 เมื่อได้รับการรักษาด้วยรังสีร่วมกับสารสกัดจากใบย่านาง โดยศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเยื่อปอดมนุษย์ A549 ภายหลังจากได้รับการฉายรังสีร่วมกับสารสกัดจากใบย่านาง และศึกษากลไกทางชีววิทยาที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเยื่อปอดมนุษย์ A549 ภายหลังจากได้รับการฉายรังสีร่วมกับสารสกัดจากใบย่านาง ดำเนินการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางด้วยวิธี DPPH assay จากนั้นแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ได้รับการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว 2 Gy กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบย่านางเพียงอย่างเดียว ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids และกลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี จากผลการทดลองพบว่า ฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบย่านางมีบทบาทสองด้าน โดยทำหน้าที่เป็นทั้งสารต้านอนุมูลอิสระและสารเสริมอนุมูลอิสระ ซึ่งผลต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดสูงขึ้น เมื่อใช้ร่วมกับรังสี ฟลาโวนอยด์ช่วยเพิ่มระดับ ROS ในเซลล์ A549 ซึ่งส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีความไวต่อรังสีมากขึ้นและนำไปสู่การตายของเซลล์ในระดับที่มากขึ้น การรักษาแบบผสมนี้ช่วยลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ A549 ลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดใบย่านางอาจทำหน้าที่เป็นสารช่วยเพิ่มความไวต่อ

รังสี (radiosensitizer) ที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถเพิ่มผลลัพธ์ของการฉายรังสีในการรักษามะเร็งปอดได้

คำสำคัญ: ย่านาง, รังสีก่อไอออน, เซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์,ฤทธิ์ของการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Abstract

Herbal extracts have garnered significant attention in the development of radiosensitizers, which enhance the effectiveness of radiation therapy by increasing the sensitivity of cancer cells while maintaining low toxicity to normal cells. This study investigates the response of human lung epithelial cancer cells (A549) treated with radiation in combination with Yanang leaf extract, focusing on cell survival and the biological mechanisms involved. The antioxidant activity of Yanang leaf extract was initially evaluated using the DPPH assay, and samples were then divided into four groups: control, radiation-only (2 Gy), Yanang leaf extract-only (0.05 mg% Flavonoids), and a combination of both treatments. Results showed that Flavonoids in Yanang leaf extract exhibited dual roles as both antioxidants and pro-oxidants, with antioxidant effects increasing at higher extract concentrations. When combined with radiation, flavonoids increased ROS levels in A549 cells, enhancing cancer cell sensitivity to radiation and leading to greater cell death. The combination treatment significantly reduced the survival rate of A549 cells. These findings suggest that Yanang leaf extract may serve as an effective radiosensitizer, enhancing the efficacy of radiation therapy in lung cancer treatment.

Keywords: Yanang, Ionizing Radiation, Human Epithelial Lung Carcinoma Cell, Cytotoxic Effect

บทนำ

รายงานของ American Cancer Society ในปี พ.ศ. 2562 ระบุว่าอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งทั่วโลกมีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ประมาณ 19.3 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งประมาณ 10 ล้านคน (Sung et al., 2021) จากข้อมูลทางสถิติของ World Health Organization ปี พ.ศ. 2563 พบว่า มีผู้ป่วยโรคมะเร็งใหม่ 190,636 ราย โดยในจำนวนนี้มีผู้ป่วยโรคมะเร็งปอด 23,713 ราย คิดเป็น 12.4% ซึ่งเป็นอันดับ 2 ของโรคมะเร็งที่พบบากที่สุด แบ่งเป็นเพศชาย 15,418 ราย และ

เพศหญิง 8,295 ราย นอกจากนี้ยังมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งปอด 20,395 ราย (International Agency for Research on Cancer, 2022) สำหรับอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งปอดในประเทศไทย พบได้บ่อยประมาณร้อยละ 14.1 ของโรคมะเร็งทุกชนิด และเป็นสาเหตุหลักอันดับ 2 ของการเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง คิดเป็นร้อยละ 18.7 รองจากโรคมะเร็งตับ (Reungwetwattana et al., 2020) สถาบันมะเร็งแห่งชาติรายงานไว้ว่า โรคมะเร็งปอดเป็นมะเร็งชนิดที่พบบ่อยเป็นอันดับ 2 ในประชากรเพศชาย และอันดับ 4 ในประชากรเพศหญิง (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, ม.ป.ป.)

โรคมะเร็งปอดแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ มะเร็งปอดปฐมภูมิ (Primary Lung Cancer) ซึ่งเกิดในปอด และมะเร็งปอดทุติยภูมิ (Secondary Lung Cancer) ซึ่งเกิดจากการแพร่กระจายของมะเร็งจากอวัยวะอื่นมายังปอด สำหรับมะเร็งปอดปฐมภูมิ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (Small Cell Lung Cancer: SCLC) และมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก (Non-Small Cell Lung Cancer: NSCLC) ซึ่งชนิดที่พบบ่อยที่สุดคือ NSCLC (Cancer Research UK, n.d.) การรักษาโรคมะเร็งปอดในปัจจุบันมีหลายวิธี ขึ้นอยู่กับระยะของโรค เช่น การผ่าตัด การทำเคมีบำบัด และการฉายแสงหรือรังสีรักษา สำหรับผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะที่ 1 และ 2 มักใช้การผ่าตัดเป็นวิธีหลัก ในขณะที่ผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะที่ 3 และ 4 จะได้รับการรักษาด้วยการฉายรังสีร่วมกับเคมีบำบัด (Nieder et al., 2013)

การรักษาโรคมะเร็งปอดด้วยรังสีรักษาคือการใช้รังสีชนิดที่ก่อไอออน (Ionizing radiation) เพื่อควบคุมหรือทำลายเซลล์มะเร็ง โดยมีวัตถุประสงค์หลักคือการรักษาให้หายขาด (Curative) หรือเพื่อประคับประคองและบรรเทาอาการเจ็บปวดของผู้ป่วย (Palliative) อย่างไรก็ตาม ผลข้างเคียงที่รุนแรงของรังสีต่อเซลล์ปกติทำให้ความสามารถในการใช้รังสีรักษาโรคมะเร็งปอดยังคงมีขีดจำกัด ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเพิ่มพูนความรู้และความเข้าใจในกลไกทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับการใช้รังสีรักษาในการทำลายเซลล์มะเร็งปอด รวมทั้งค้นคว้าวิจัยใหม่ ๆ เพื่อพัฒนาระบบการรักษาโรคมะเร็งด้วยรังสีรักษาให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ปัจจุบันได้มีการพัฒนาสารเพิ่มประสิทธิภาพของรังสีในการทำลายเซลล์มะเร็ง (Radiosensitizer หรือ Radiation Enhancer) ซึ่งสารดังกล่าวมีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาที่ทำให้สารพันธุกรรมและองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์มะเร็งได้รับความเสียหายมากขึ้น ส่งผลให้รังสีมีประสิทธิภาพมากขึ้นในการทำลายเซลล์มะเร็ง (Penninckx et al., 2020)

ทฤษฎีการทำลายเซลล์มะเร็งด้วยรังสีอธิบายถึงการใช้อิทธิพลของรังสีในการเข้าทำลายสารพันธุกรรม (DNA) ภายในเซลล์มะเร็ง เพื่อยุติการเจริญเติบโตและนำไปสู่การตายของเซลล์มะเร็งในที่สุด การเกิดอันตรกิริยาของรังสีกับ DNA ของเซลล์มะเร็งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ (1) การทำอันตรกิริยาโดยตรง (Direct Action): รังสีจะเข้าทำลาย DNA ของเซลล์มะเร็งโดยตรง ส่งผล

ให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเจริญเติบโตหรือซ่อมแซมตนเองได้ และ (2) การทำอันตรายกิริยาโดยอ้อม (Indirect Action): รังสีจะถ่ายเทพลังงานให้กับตัวกลาง ซึ่งในเซลล์จะมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลักถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการฉายรังสีให้กับเซลล์ รังสีจะถ่ายเทพลังงานให้กับน้ำ ทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำ (Water Radiolysis) ซึ่งจะสร้างสารอนุมูลอิสระ (Free Radicals) จำนวนมาก โดย Reactive Oxygen Species (ROS) ที่เกิดขึ้น เช่น Hydroxyl Radical ($\cdot\text{OH}$) และ Superoxide Radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) เป็นโมเลกุลที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง สามารถเข้าทำอันตรายกิริยากับองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น DNA และไมโทคอนเดรีย ส่งผลกระทบโดยตรงต่อการทำงานของเซลล์มะเร็ง จนอาจนำไปสู่การตายของเซลล์หากเซลล์นั้นไม่สามารถซ่อมแซมความเสียหายได้อย่างสมบูรณ์ (Bolos, 2001)

ย่านาง (*Tiliacora triandra*) เป็นพืชสมุนไพรที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน ไม่ว่าจะเป็นราก ใบ หรือเถา โดยเฉพาะรากของย่านางที่ประกอบด้วยสารอัลคาลอยด์ เช่น อัลคาลอยด์ บิสเบนซิลโซควิโนลีน ทิลิโครินีน ทิลิอาโคริน และนอร์ทิลิอาโครินีน (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, ม.ป.ป.) ใบย่านางยังถูกระบุว่าเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ ซึ่งประกอบไปด้วยเบต้าแคโรทีน แทนนินเข้มข้น ไตรเทอร์พีน ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม และธาตุเหล็ก ที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและการก่อกลายพันธุ์ ซึ่งสามารถป้องกันมะเร็งได้ (นิตยา บุญทิม และคณะ, 2556) ทั้งนี้ ใบและรากของย่านางมักถูกนำไปใช้ในการแพทย์พื้นบ้านในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ในเอเชีย เพื่อรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคมาลาเรีย โรคระบบทางเดินอาหาร โรคพิษสุราเรื้อรัง โรคผิวหนัง ความดันโลหิตสูง และไข้ นอกจากนี้ใบย่านางยังมีสารประกอบอัลคาลอยด์ เช่น บิสเบนซิลโซควิโนลีน ทิลิโครินีน (Tiliacoronin) ทิลิอาโคริน (Tiliacoronine) นอร์ทิลิอาโครินีน (Nor-Tiliacoronine) N-oxide Tiliandrine Tetraandrine และ D-isochondendrine นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบย่านาง ซึ่งมีฤทธิ์เป็นพืชต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ฤทธิ์ต้านเชื้อมัยโคแบคทีเรียต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ MDR และฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (Tungmunthum et al., 2018) รายงานเหล่านี้ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของการใช้ย่านางในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด ร่วมกับการฉายรังสี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งปอดให้ดียิ่งขึ้น

งานวิจัยฉบับนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบทางรังสีชีววิทยาที่เกิดขึ้นจากการใช้สารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสีต่อเซลล์มะเร็งปอดมนุษย์ชนิด A549 (adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปอดชนิด non-small cell lung cancer (NSCLC) โดยมุ่งหวังที่จะยกระดับความรู้และความเข้าใจในการใช้รังสีร่วมกับสารสกัดสมุนไพรในการรักษาโรคมะเร็งปอด ทั้งนี้เพื่อนำไปสู่การพัฒนาแนวทางการรักษาโรคมะเร็งปอดที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดผลลัพธ์ทางการรักษาที่ดีขึ้นต่อผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดในอนาคต

วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการทดลองแบบ quantitative analysis, *in vitro* study โดยมีกลุ่มประชากร ดังนี้ (1) ประชากร เซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ A549, (2) ประชากรเป้าหมาย เซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ A549 และ (3) ประชากรกลุ่มควบคุม เซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ A549 ที่ไม่ได้รับสารสกัดใบย่านางและการฉายรังสี โดยที่แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุม (control) กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ได้รับการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบย่านางเพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

เซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ A549 จาก American Type Culture Collection ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Roswell Park Memorial Institute (RPMI) ที่เสริมด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ Fetal Bovine Serum (FBS) และ 1% antibiotic ในตู้บ่มความชื้น (humidified incubator) ควบคุมระดับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศภายในเครื่องที่ 5 เปอร์เซ็นต์

2. การฉายรังสี (Cell irradiation)

การฉายรังสีจากภายนอก (External irradiation) เป็นการฉายรังสีแบบภายนอกร่าง (ex vivo) โดยทำการแบ่งตัวอย่าง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกจะเป็นกลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับรังสี กลุ่มที่สอง จะเป็นกลุ่มที่ถูกฉายรังสีเพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่สาม จะเป็นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี ปริมาณ 2.0 Gy โดยจะใช้ตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่างต่อหนึ่งครั้งของการฉายรังสี

ทำการฉายรังสีเอกซ์แก่เซลล์ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง Linac Accelerators ยี่ห้อ Varian รุ่น Clinac IX ที่มีระดับอัตราปริมาณรังสี 400 monitor unit/minute ที่แผนกรังสีวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยนำเซลล์วางไปที่บริเวณตรงกลาง phantom และทำการฉายรังสีที่ด้านบน (anteroposterior) และด้านล่าง (posteroanterior) ภายหลังจากการฉายรังสีเอกซ์ เซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ A549 จะถูกนำมาเลี้ยงไว้ในตู้บ่มความชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศภายในเครื่องที่ 5 เปอร์เซ็นต์

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านาง ด้วยวิธี DPPH assay

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1 picrylhydrazyl (DPPH) assay ทำโดยนำสารสกัดใบย่านางละลายเจือจางในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ 0-10 mg/% Flavonoid และนำสารสกัดใบย่านางแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 μ L ผสมกับ DPPH ในเมทานอลความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ใน 96-well plate แล้วบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 min

จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สร้างกราฟระหว่างค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดใบย่านางเพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดใบย่านางที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (ค่า IC₅₀)

4. การวัดอัตราการรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดปอดติมนุชย์ด้วยวิธี MTT assay จะทำการแบ่งตัวอย่าง 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่ง เป็นกลุ่มควบคุม (control) คือกลุ่มที่ไม่ได้รับทั้งการฉายรังสีและไม่ได้รับการบำบัดด้วยสารสกัดใบย่านาง กลุ่มที่สอง เป็นกลุ่มที่ได้รับการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว ทำโดยเลี้ยงเซลล์ 300 เซลล์ ใน 6-well plate ไปฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 2.0 Gy กลุ่มที่สาม เป็นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบย่านางเพียงอย่างเดียว ดำเนินการทดลองโดยการเติมสารสกัดใบย่านางที่มีความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids จากนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกลุ่มที่สี่ เป็นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี คือทำการเติมสารสกัดใบย่านางที่มีความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids และนำไปบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 2.0 เกรย์

หลังจากนั้นทำการวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยนำเซลล์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate จากนั้นเติม MTT reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงใน 96-well plate แล้วนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเติม MTT solvent ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงใน 96-well plate และห่อ 96-well plate ด้วยกระดาษฟอยล์ แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง orbital shaker เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader และคำนวณร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์

$$\% \text{Cell viability} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \times 100$$

โดย OD_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ทดสอบ

OD_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ควบคุม

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ใช้โปรแกรม Excel แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) คำนวณค่าทางสถิติโดยใช้ Student T-test และ ANOVA ซึ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ และ $p \leq 0.05$ ให้ถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

1. ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการสารออกฤทธิ์ในสารสกัดใบย่านาง

ผลการตรวจประเมินคุณภาพของสารสกัดใบย่านาง จากการสกัดแบบ water-based extraction พบว่า ส่วนประกอบสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดใบย่านางตั้งต้น(stock solution) คือ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) และมีค่าความเข้มข้นอยู่ที่ประมาณ 99.8 mg%

2. ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางด้วยวิธี DPPH assay

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านาง (Tiliacora triandra) ที่ความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบทางธรรมชาติ โดยใช้ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบแบ่งเป็นระดับต่าง ๆ ได้แก่ 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 mg% Flavonoids จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางสูงขึ้น ทำให้การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 517 nm มีค่าลดลงตามลำดับ รวมถึง สีของสารละลายจะมีความเข้มจางลงตามความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH ที่เกิดขึ้นในสารละลาย

ค่า Inhibitory Concentration (IC) ที่ IC₂₅, IC₅₀ และ IC₇₅ หมายถึง ความเข้มข้นของสารละลายที่สามารถยับยั้งการทำงานของเซลล์หรือสารชีวภาพได้ 25%, 50% และ 74% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการควบคุมที่ไม่ได้รับสารนั้น ค่า IC มักถูกใช้ในการศึกษาทางเภสัชวิทยาและชีวเคมี เพื่อวัดประสิทธิภาพของสารที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือต้านมะเร็ง สำหรับผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ ดังแสดงในตารางที่ 1 ที่แสดงถึงร้อยละของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าค่าความเข้มข้นของสกัดใบย่านางที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ที่ระดับ IC₂₅ มีค่าเท่ากับ 0.05 mg% Flavonoids ที่ระดับ IC₅₀ มีค่าเท่ากับ 1 mg% Flavonoids และที่ระดับ IC₇₅ มีค่าเท่ากับ 7.5 mg% Flavonoids โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางสูงขึ้นที่ประมาณ 10 mg% Flavonoids จะทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระเข้าใกล้ร้อยละ 100 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางเพิ่มขึ้น ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นทำให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น

ตารางที่ 1 ร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางด้วยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 mg% Flavonoids

Yanang extract concentration (mg% Flavonoids)	DPPH radical scavenging activity (%)			Mean	S.D.
	1	2	3		
0	-2.183	-0.294	2.477	0.000	2.344
0.02	21.411	26.700	28.967	25.693	3.878
0.05	14.568	38.371	31.444	28.128	12.243
0.1	24.685	30.101	29.849	28.212	3.057
0.5	33.501	31.612	43.829	36.314	6.576
1	44.416	40.134	65.575	50.042	13.621
5	41.058	45.340	66.499	50.966	13.621
10	91.436	92.695	97.103	93.745	2.976

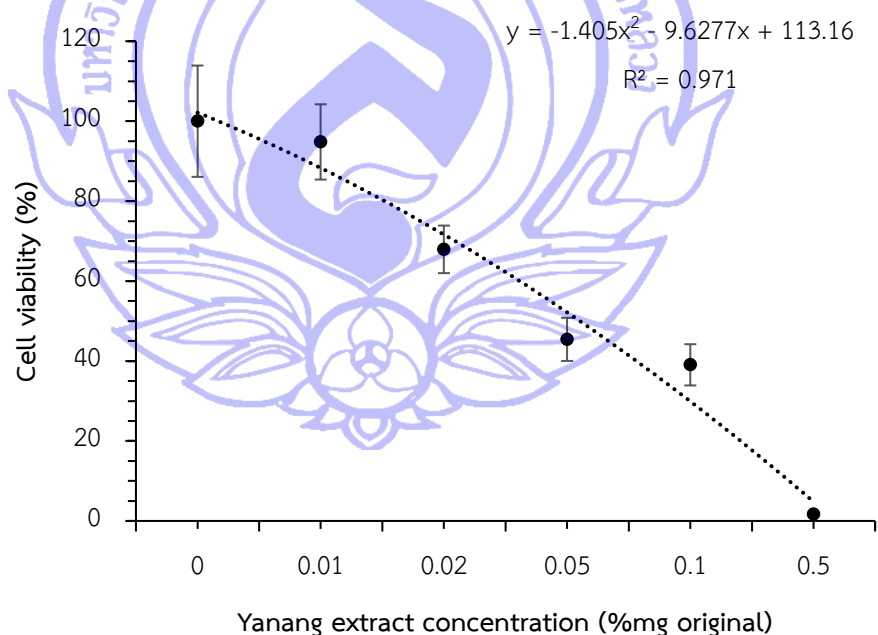
3. ผลการวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ภายหลังจากการได้รับสารสกัดใบย่านาง ร่วมกับการฉายรังสีชนิดก่อกำไอออน ด้วยวิธี MTT assay

จากผลการทดลองในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังจากการได้รับสารสกัดใบย่านางที่ระดับความเข้มข้น 10 mg% Flavonoids ซึ่งบ่งชี้ว่าสารสกัดใบย่านางมีฤทธิ์ต้านมะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นสำหรับการศึกษาผลความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มีการรักษาร่วมกับการฉายรังสี ได้ดำเนินการประเมินผลของความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นที่ 0-0.5 mg% Flavonoids เพื่อจะสามารถประเมินค่า IC50 ที่เหมาะสมต่อการรักษาร่วมกับรังสีต่อไปได้ดีที่สุด

สารสกัดใบย่านางที่ความเข้มข้น 0.02, 0.05, 0.1, และ 0.5 mg% Flavonoids แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด A549 อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางที่ได้รับสูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (IC50) อยู่ที่ประมาณ 0.05 mg% Flavonoids ดังแสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 2 ร้อยละของอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 กับความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางตั้งแต่ 0-100 mg% Flavonoids

Yanang extract concentration (mg% Flavonoids)	Cell viability (%)			Mean	S.D.
	1	2	3		
0	101.896	108.548	105.022	102.694	117.062
10	3.248	3.049	3.049	2.916	3.049
20	3.980	4.446	3.780	3.914	5.111
30	3.581	4.446	4.246	3.980	3.581
40	3.714	3.049	3.980	3.914	3.514
50	3.847	4.113	3.914	3.980	3.780
60	4.778	4.579	4.579	4.712	5.576
70	4.579	4.579	5.177	5.377	4.911
80	4.712	5.310	5.111	5.976	5.510
90	5.111	5.710	6.508	5.909	5.776
100	5.111	5.710	6.508	5.909	5.776



ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านาง 0-0.5 %mg กับร้อยละของอัตราการอยู่รอดของเซลล์

4. ผลการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ภายหลังจากได้รับปริมาณรังสี 2 Gy ร่วมกับสารสกัดใบย่านาง ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids

จากตารางที่ 3 แสดงอัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ระยะเวลา 24 h ภายหลังจากการได้รับปริมาณรังสี 2 Gy ร่วมกับสารสกัดใบย่านาง ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% โดยที่ ช่วงระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมงหลังการฉายรังสีร่วมกับสารสกัดใบย่านาง มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 1.42 ± 0.26

ตารางที่ 3 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ระยะเวลา 24-72 h ภายหลังจากการได้รับปริมาณรังสี 2 Gy ร่วมกับสารสกัดใบย่านาง ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids

Dose of IR (Gy)	Cell viability (%)						Mean	S.D.
	1	2	3	4	5	6		
0	84.336	99.466	98.042	113.884	115.486	88.786	100.000	12.815
2	1.388	1.032	1.388	1.566	1.744	1.388	1.418	0.264

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

จากผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการสารออกฤทธิ์ในสารสกัดใบย่านาง สำหรับสารประกอบ Flavonoids และ สารประกอบ phenolic ชนิดอื่น ๆ เป็นที่รู้จักกันดีในรูปสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิของพืช (plant secondary metabolites) เป็นโครงสร้างแบบวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่ มีการรายงานก่อนหน้านี้ว่าพบสารประกอบฟีนอลิกในพืชที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมากกว่า 8,000 ชนิด ซึ่งสามารถพบได้ในอาหารและยาสมุนไพร โดยส่วนใหญ่พบอยู่ในเซลล์หรือพื้นผิวของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพืช สารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้ คือสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ปรากฏในรูปแบบของ aglycone, glycoside และ methylated derivatives โดยมีการรายงานว่าทั้งฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิกอื่น ๆ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพต้านมะเร็ง ต้านเชื้อแบคทีเรีย ป้องกันหัวใจ ต้านการอักเสบ เสริมระบบภูมิคุ้มกัน ปกป้องผิวจากรังสียูวี (Tungmunthum et al., 2018; Mutha et al., 2021) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาภาพรวมการออกฤทธิ์ของฟลาโวนอยด์ที่ได้จากสารสกัดใบย่านางจาก เพื่อเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรมและการแพทย์ต่อไป

สำหรับผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay จากผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Pavanand et al. (1989) ที่ได้ระบุว่า สารสกัดใบย่านางมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดสารอนุมูลอิสระได้ดีอย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยของ ของ Rattana et al. (2016) พบว่า ใบย่านางมีสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และแทนนิน (tannins) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูง

Liawruangrath and Liawruangrath (2018) รายงานผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ของสารสกัดใบย่านางด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเมทานอลพบว่า แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 4.41 และ 0.39 mg/mL ตามลำดับ สารสกัดใบย่านางด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.87 mg/mL ผลการวิจัยของ Phadungkit et al. (2012) รายงานว่าสารสกัดใบย่านางด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงด้วยค่า IC₅₀ ที่ความเข้มข้น $12.69 \pm 1.02 \mu\text{g/mL}$ จากผลการทดลองข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าการที่ค่า IC₅₀ ของสารสกัดใบย่านางลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งตรงกับการวิจัยของ Phadungkit et al. (2012) ที่กล่าวว่า สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากพืชผักแสดงฤทธิ์ที่แรงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดนั้นที่เพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ภายหลังจากการได้รับสารสกัดใบย่านาง ร่วมกับการฉายรังสีชนิดก่อก่อไอออน ด้วยวิธี MTT assay ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบย่านางมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะเมื่อใช้สารสกัดใบย่านางที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น (Samankul et al., 2023; Kaewpiboon et al., 2014) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าในการแพทย์แผนไทยจะมีการกล่าวถึงคุณสมบัติต้านมะเร็งของสารสกัดใบย่านาง แต่จำนวนการศึกษาทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับสารประกอบและฤทธิ์ต้านมะเร็งในสารสกัดใบย่านางยังคงน้อยมากในปัจจุบัน งานวิจัยของ Phadungkit et al. (2012) รายงานว่า สารสกัดใบย่านางมีสารออกฤทธิ์สำคัญ คือ Oxonanobline ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) อย่างไรก็ตาม สำหรับฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดนั้น มีความเฉพาะเจาะจงกับเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากมะเร็ง และโดยส่วนใหญ่ไม่ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรเหล่านั้น (Nanasombat & Teckchuen, 2009) Liawruangrath and Liawruangrath (2018) ได้รายงานฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดใบย่านาง ซึ่งทำการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากพืชดำเนินการโดยใช้วิธี resazurin microplate assay พบว่า สารสกัดใบย่านางมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปากสายพันธุ์ KB และมะเร็งเต้านมสายพันธุ์ MCF7 โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 41.14 และ 38.26 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะในการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม คือ การศึกษากลไกทางชีววิทยาขั้นสูงที่เกี่ยวข้อง ภายหลังจากการใช้รังสีร่วมกับสารสกัดใบย่านาง โดยใช้เทคนิค Gamma H2AX assay หรือทดสอบการสร้างไมโครนิวเคลียส (micronucleus) เพื่อศึกษาและตรวจสอบความเสียหายของ DNA Double Strand Break ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการได้รับสารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี

รายการอ้างอิง

- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. (ม.ป.ป.). *ย่านาง*. สืบค้นเมื่อ 13 กุมภาพันธ์ 2567 จาก <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=148>
- นิตยา บุญทิม, พรรณเพ็ญ เครือไทย, ชินกฤต สุวรรณศิริ และถกลวรรณ ศิริสวัสดิ์. (2556). รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง การเพิ่มศักยภาพและสรรพคุณของพืชผักสมุนไพรในตำรับยาล้านนา: การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการให้ผลผลิต. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (ม.ป.ป.). *มะเร็งปอด*. สืบค้นเมื่อ 1 มีนาคม 2567 จาก <https://www.nci.go.th/th/Knowledge/downloads/0013.pdf>
- Bolus, N. E. (2001). Basic review of radiation biology and terminology. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 29(2), 67-73.
- Cancer Research UK. (n.d.). *Types of lung cancer*. Retrieved February 11, 2024, from <https://www.cancerresearchuk.org/types>
- International Agency for Research on Cancer. (2022). *Cancer Today*. <https://gco.iarc.fr>.
- Kaewpiboon, C., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T., Phuwapraisirisan, P., & Assavalapsakul, W. (2014). Effect of three fatty acids from the leaf extract of *Tiliacora triandra* on P-glycoprotein function in multidrug-resistant A549RT-eto cell line. *Pharmacognosy Magazine*, 10(Suppl 3), S549.
- Liawruangrath, B., & Liawruangrath, S. (2018). Antioxidant and anticancer activities of the extract from *tiliacora triandra* diels. in Nakhonsawan Province. *วารสารวิจัย มทร. กรุงเทพฯ*, 12(2), 73-78.
- Mutha, R. E., Tatiya, A. U., & Surana, S. J. (2021). Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: An overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7, 1-13.
- Nanasombat, S., & Teckchuen, N. (2009). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *J Med Plants Res*, 3(5), 443-449.
- Nieder, C., Pawinski, A., & Andratschke, N. H. (2013). Combined radio-and chemotherapy for non-small cell lung cancer: Systematic review of landmark studies based on acquired citations. *Frontiers in Oncology*, 3, 176.

- Pavanand, K., Webster, H. K., Yongvanitchit, K., & Dechatiwongse, T. (1989). Antimalarial activity of *Tiliacora triandra* Diels against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Phytotherapy Research*, 3(5), 215-217.
- Penninckx, S., Heuskin, A. C., Michiels, C., & Lucas, S. (2020). Gold nanoparticles as a potent radiosensitizer: A transdisciplinary approach from physics to patient. *Cancers*, 12(8), 2021.
- Phadungkit, M., Somdee, T., & Kangsadalampai, K. (2012). Phytochemical screening, antioxidant and antimutagenic activities of selected Thai edible plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(5), 662-666.
- Rattana, S., Cushnie, B., Taepongsorat, L., & Phadungkit, M. (2016). Chemical constituents and in vitro anticancer activity of *Tiliacora triandra* leaves. *Pharmacognosy Journal*, 8(1).
- Reungwetwattana, T., Oranratnachai, S., Puataweepong, P., Tangsujaritvijit, V., & Cherntanomwong, P. (2020). Lung cancer in Thailand. *Journal of Thoracic Oncology*, 15(11), 1714-1721.
- Samankul, A., Senawong, G., Utaiwat, S., Prompipak, J., Woranam, K., Phaosiri, C., . . . Senawong, T. (2023). *Tiliacora triandra* Leaf Powder Ethanolic Extract in Combination with Cisplatin or Gemcitabine Synergistically Inhibits the Growth of Cholangiocarcinoma Cells In Vitro and in Nude Mouse Xenograft Models. *Medicina*, 59(7), 1269.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.
- Tungmunthum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines*, 5(3), 93.