หัวข้อวิจัย ฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์เมลาโนมาของคน
ผู้ดำเนินการวิจัย ผศ.ดร. ทัศนีย์ พาณิชย์กุล
ดร. ปิยานุช พรมภมร
นางสาว ณัฐพร บู๊ฮวด
หน่วยงาน หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
ปี พ.ศ. 2556

ปัจจุบันสารสกัดจากอินทนิลน้ำหรือตะแบก (Banaba or Queen's flower) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Lagestroemia speciosa* (L.) Pers และ สารสกัดเลือดมังกร (dragon's blood) จาก *Croton lechleri* ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ และวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ในการศึกษาครั้งนี้ จึงศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำและสารสกัดเลือดมังกร ต่อเซลล์เมลาโนมาถูกเลี้ยงในอาหารชนิด ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, dulbecco's modified eagle medium) ที่มี 10 % ของซีรั่มลูกวัว (FBS, fetal bovine serum) ในจานหลุม (96-well tissue culture plate) ที่อุณหภูมิ 37 องศา และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ในการทดสอบใช้จำนวนเซลล์ 4X10^4 เซลล์ต่อหลุมในจานหลุม และทดสอบกับสารสกัดสารสกัดอินทนิลน้ำและสารสกัดเลือดมังกรที่ความเข้มข้น 125 -2000 µg/ml (เจือจางในอัตราส่วน 1:2) และหนึ่งความเข้มข้นของสารสกัดถูกทดสอบต่อเซลล์สี่หลุมเป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง และเซลล์ที่มีชีวิตถูกย้อมด้วยสี Crystal violet นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงของสี (OD, Optical density) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ค่า OD ที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และถูกนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ความเป็นพิษของสารที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (EC_{50}, Effective concentration Inhibit 50% of cell viability) ผลการศึกษาพบว่าค่า EC_{50} ของสารสกัดอินทนิลน้ำ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 400, 230, 150 µg/ml ตามลำดับ และสารสกัดเลือดมังกรที่ละลายด้วยโพรพานิดิออลมีฤทธิ์ความเป็นพิษที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 860, 800, 700 µg/ml ตามลำดับ ผลการวิจัยที่ได้ทำให้ทราบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัด เพื่อเป็นแนวทางในความปลอดภัยที่นำสารสกัดมาใช้ประโยชน์ต่อสุขภาพต่อไป

คำสำคัญ: *Lagerstroemia speciosa*, *Croton lechleri*, การทดสอบพิษ, อินทนิลน้ำ, เลือดมังกร, เซลล์เมลาโน มา

Research Title Cytotoxic activity of compounds from herbal plants against human melanoma cells

Researcher Asst.Prof. Tasanee Panichakul, PhD
Piyanuch Prompamorn, PhD
Nattapon Boohuad, MSc

Organization Program of Cosmetic Science, Faculty of Science and Technology
Suan Dusit Rajabhuat University

Year 2013

Extracts of banaba or queen crape myrtle from *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers and dragon's blood from *Croton lechleri* have been useful in health science and cosmetic science. In this study, the cytotoxicity of extracts from banaba and dragon's blood were tested against a melanoma cell line from human skin. Melanoma cell lines C32 cells were cultured in dulbecco's modified eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in 96-well tissue culture plates. Melanoma cells, the cell numbers of $4X10^4$ cells/well were cultured in each well of 96-well plate overnight at $37^{O}C$ with 5 % CO_2. The concentrations of banaba and dragon's blood extracts were 125 -2000 mg/ml (in ratios of 1:2) and one concentration of each extract was added in quadruplicate wells and incubated for 24, 48, and 72 hours. After that dead cells were washed and the remaining cells were stained with crystal violet and determined the absorbance (OD) by microplate reader at 560 nm. Percentage of cell viability was calculated from OD and the EC_{50} of extracts was the effective concentration that inhibitory 50% of cell viability. After 24, 48, and 72 hour of cytotoxic test, the EC_{50} of banaba were 400, 230, 150 µg/ml respectively. The cytotoxic concentrations, EC_{50} of dragon's blood in propanediol were 860, 800, 700 µg/ml after 24, 48 and 72 hour, respectively. The results indicate the cytotoxic concentration of banaba and dragon's blood against human melanoma cells that is useful for safety in cosmetic products.

Key Words: *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers, *Croton lechleri*, Cytotoxicity, Banaba, Dragon's blood, Melanoma cells

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ขอบคุณ ศ.ตร. รัชนีย์ อุดมแสงเพ็ชร ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้เซลล์เมลาโนมา และใช้ห้องปฏิบัติการสำหรับเลี้ยงเซลล์ ขอบคุณบริษัทบรอนสันแอนด์จาคอบส์อินเตอร์เนชันแนล จำกัด ในความอนุเคราะห์ให้สารสกัดอินทนิลน้ำ บริษัทคอสมีเทค จำกัด ให้สารสกัดเลือดมังกร และบริษัทเบรนน์เท็กอินกรีเดียนส์ (ประเทศไทย) จำกัด ขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยวัณโรค หน่วยวิจัยชีวโมเลกุลทางการแพทย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศษสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องไมโครเพลทรีเดอร์ (microplate reader รุ่น GLOMAX multi detection system) ขอบคุณหลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ในการสนับสนุน และ ขอบคุณผู้ร่วมงานทุกท่าน ที่ช่วยทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จ

คณะผู้วิจัย
2556

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		จ
สารบัญภาพ		ช
บทที่ 1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาและความสำคัญ	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	ขอบเขตการวิจัย	2
	สมมติฐานการวิจัย	2
	คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2	**แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	3
	เนื้อเยื่อชั้นผิวหนัง	3
	เซลล์เมลาโนมา (melanoma cells)	4
	สมุนไพร (Herbs)	5
	การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษ (Cytotoxic test)	7
	กรอบแนวคิดในการวิจัย	8
บทที่ 3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	9
	สารสกัดสมุนไพร	9
	การเพาะเลี้ยงเซลล์	9
	การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษ (cytotoxic test)	9
	การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ตาย	10
	การวิเคราะห์ข้อมูล	10
บทที่ 4	**ผลการวิจัย**	11
	การเลี้ยงจำนวนเซลล์เมลาโนมาที่เหมาะสมในจานหลุม	11
	การทดสอบความเป็นพิษของสารโพรพานิดิออล (propanediol) และดีเอ็มเอสโอ (DMSO)	13

หน้า

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อเซลล์เมลาโนมา 15
การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเลือดมังกรต่อเซลล์เมลาโนมา 18
การตายของเซลล์เมาโนมาเกิดจากฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำและเลือกมังกร 21

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 26
สรุปผลการวิจัย 26
อภิปรายผลการวิจัย 26
ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ 28
ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป 28

บรรณานุกรม 29

ภาคผนวก 33
ภาคผนวก ก คู่มือการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพร
ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง 34

ประวัติผู้วิจัย 41

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตหลังจากถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดอินทนิลน้ำ และสารสกัดเลือดมังกร	23

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	เซลล์เมลาโนมาของคน	5
4.1	การเจริญของเซลล์ที่จำนวนเซลล์ในจาน 96 หลุมเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กลับหัว กำลังขยาย X 200	12
4.2	จำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่ถูกเลี้ยงในจาน 96 หลุม เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง	13
4.3	ฤทธิ์ของดีเอ็มเอสโอ (DMSO) ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมา	14
4.4	ฤทธิ์ของโพรพานิดิออล (P:W, propanediol : water) ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมา	14
4.5	ฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำเจือจางที่อัตราส่วนหนึ่งต่อสิบทดสอบกับเซลล์เมลาโนมาเป็นระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	16
4.6	ภาพเซลล์เมลาโนมาที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีและไม่มีสารสกัดอินทนิลน้ำ กำลังขยาย X 200	17
4.7	ฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำอัตราส่วนหนึ่งต่อสองทดสอบกับเซลล์เมลาโนมา ผลการวิเคราะห์ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ค่า EC_{50} เท่ากับ 400 µg/ml (ลูกศรสีฟ้า) 230 µg/ml (ลูกศรสีแดง)และ 130 µg/ml (ลูกศรสีเขียว) ตามลำดับ B) ฤทธิ์ของสารดีเอ็มเอสโอ (DMSO) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.0125 – 0.2 %	18
4.8	ฤทธิ์ของสารสกัดเลือดมังกรที่อัตราส่วนหนึ่งต่อสิบทดสอบกับเซลล์เมลาโนมาเป็นระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง	20
4.9	ภาพเซลล์เมลาโนมาที่ถูกทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดเลือดมังกร กำลังขยาย X 200	21
4.10	ฤทธิ์ของสารสกัดเลือดมังกรอัตราส่วนหนึ่งต่อสองทดสอบกับเซลล์เมลาโนมา A) ผลการวิเคราะห์ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ค่า EC_{50} = 860 µg/ml (ลูกศรสีฟ้า) 800 µg/ml (ลูกศรสีแดง) และ 700 µg/ml (ลูกศรสีเขียว) ตามลำดับ B) ฤทธิ์ของโพรพานิดิออลต่อน้ำ (P:W) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.4 – 6.4 %	22
4.11	ภาพเซลล์ตายของเซลล์เมลาโนมาจากฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำเซลล์ที่ตายมีลักษณะการตายแบบ อะพอพโตซิส (apoptosis) นิวเคลียสของเซลล์ ขนาดเล็กลง (ลูกศรชี้) กำลังขยาย X 400	24
4.12	ภาพเซลลีตายของเซลล์เมลาโนมาจากฤทธิ์ของสารสกัดเลือดมังกร และสารโพรพานิดิออล เซลล์ที่ตายมีลักษณะการตายแบบ อะพอพโตซิส (apoptosis) นิวเคลียสของเซลล์ ขนาดเล็กลง (ลูกศรชี้) กำลังขยาย X 400	25