หัวข้อวิจัย	การเจริญของเซลล์เมลาโนมาในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มี สารสกัดจากอินทนิลน้ำและยางเลือดมังกร
ผู้ดำเนินการวิจัย	นางสาวณัฐพร บู๊ฮวด และ ดร.ปิยะนุช พรมภมร
ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล
หน่วยงาน	หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
ปี พ.ศ.	2556

อินทนิลน้ำหรือ Queen's Flower เป็นพืชสมุนไพรที่พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และส่วนต่าง ๆ ของพืชสามารถรักษาโรคได้หลากหลาย เช่น โรคเบาหวาน โรคอ้วน นอกจากนี้มีการนำมาใช้ในเครื่องสำอางสำหรับผิวหนังและเส้นผม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนำมาใช้สำหรับผลิตภัณฑ์ปรับสีผิว ต้านริ้วรอย ฝาดสมานผิวและกระตุ้นการเจริญของเส้นผม ยางเลือดมังกรมีแหล่งกำเนิดจากป่าดงดิบอะมาซอน ประเทศเปรู ถูกนำมาใช้แพร่หลายในหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศจีน อินเดีย อินโดนีเซีย มีสารสำคัญหลักคือ สารโพรแอนโธไซยานิดินส์และสารทาสพีน ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ช่วยสมานแผล และกระตุ้นคอลลาเจน มีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในน้ำยาหลังโกนหนวด ครีมทาหลังถูกแสงแดด ลิปสติก รักษาแผลที่เกิดจากสิว และลดรอยเหี่ยวย่น การใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะสัมผัสกับผิวหนังโดยตรง ดังนั้นฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์จึงมีความสำคัญ งานวิจัยนี้จึงศึกษาการเจริญของเซลล์เมลาโนมาที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดจากอินทนิลน้ำ และยางเลือดมังกร โดยเซลล์เมลาโนมาถูกเลี้ยงที่จำนวนเริ่มต้น $2x10^5$, $3x10^5$ และ $4x10^5$ เซลล์ต่อหลุม ในจานหลุม 6 หลุม ในอาหารชนิดดีเอ็มอีเอ็ม ที่มีส่วนผสมของซีรั่มลูกวัว 10 % และถูกทดสอบกับสารอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยางเลือดมังกรความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์ถูกเลี้ยงอยู่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 7 วัน ผลการศึกษาพบว่า เวลาที่เซลล์ใช้ในการเจริญเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า มีค่าเฉลี่ย 70.03±8.26 ชั่วโมง และสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และเวลาที่เซลล์ใช้ในการเจริญเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าไม่แตกต่างกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารโดยไม่มีสารสกัด ส่วนสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้เซลล์เริ่มตายในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ เซลล์มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p=0.037 ($p < 0.05$) และสารดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.001, 0.01% ที่ใช้ละลายสารอินทนิลน้ำ ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ ส่วนยางเลือดมังกรที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และเวลาที่เซลล์ใช้ในการเจริญเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าไม่แตกต่างกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารโดยไม่มีสารสกัด มีค่า p=0.992, 0.968, 0.959 ตามลำดับ ($p > 0.05$) และสารโพรเพนไดออลและน้ำที่ความเข้มข้น 0.0032, 0.032, 0.32% ที่ละลายยางเลือดมังกรไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เช่นกัน ผลจากการวิจัยทำให้ทราบว่าความเข้มข้นของสารที่นำมาใช้มีผลต่อการเจริญของเซลล์ เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้หรือกำหนดความเข้มข้นของสารนี้ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพหรือเครื่องสำอางต่อไป

คำสำคัญ: *Lagerstroemia speciosa, Croton lechleri*, อินทนิลน้ำ เลือดมังกร เซลล์เมลาโนมา

Research Title Growth of melanoma cells in vitro culture with extracts of Queen's flower and Dragon's blood
Researcher Miss Nattaporn Boohuad and Piyanuch Prompamorn, Ph.D.
Research Consultants Asst. Prof. Tasanee Panichakul, Ph.D.
Organization Cosmetic Science Program, Faculty of Science and Technology
Suan Dusit Rajabhat University
Year 2013

Queen's flower is a traditional herbs in South East Asia. Extracts of Queen's flower have been used to treat ailments such as Diabetes and Obesity. Moreover, it has been used in cosmetic products for skincare and haircare as it has anti-oxidant properties to whitening, anti-wrinkles, astringent, and enhance hair growth. Dragon's blood resin originating from Peru amazon rainforest, it has been used widely in many countries including China, India, Indonesia, the main ingredients were proanthocyanidins and taspines which have anti-oxidant, anti-inflammatory, wounds healing and stimulate collagen properties. The products are normally used directly with skin contact. In this study, growth of melanoma cells with Queen's flower extract and Dragon's blood were studied. Results showed that cell numbers $2x10^5$, $3x10^5$ and $4x10^5$ cell per well in 6 well tissue culture plate were cultured in DMEM (dulbecco's modified eagle medium) with 10% of fetal bovine serum at 37 $^{\circ}$C. Queen's flower extracts and Dragon's blood of three concentrations 1, 10 and 100 microgram/ml added in cell cultures were tested 7 days. Results showed that doubling time of cell growth was 70.03±8.26 hour. Queen's flower extracts 1 and 10 microgram/ml and Dragon's blood 1, 10 and 100 microgram/ml have no effects with the cell growth and no difference of doubling time was found between with and without extract. But the one with 100 microgram/ml caused the cells to die on the third day of cultures with the significant value p=0.037 (p<0.05). DMSO (dimethlysulfonyloxide) used as diluent for Queen's flower extract invarious concentrations of 0.0001, 0.001 and 0.01% and Propanediol : Water used as diluent for Dragon's blood invarious concentrations of 0.0032, 0.032 and 0.32% were tested with the cells and results showed no inhibition of cell growth. This study showed the concentration levels of extracts that effect on melanoma cell growth and this is useful to apply for cosmetic product development.

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

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำโครงการวิจัยครั้งนี้อยู่ภายใต้โครงการพัฒนาอาจารย์รุ่นใหม่ในการทำวิจัยและได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.รัชนีย์ อุดมแสงเพ็ชร ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์เมลาโนมาและสถานที่ในการทำวิจัย บริษัท คอสมีเทค จำกัด บริษัทบรอนสันแอนด์จาคอบส์อินเตอร์เนชันแนล จำกัด และบริษัท เบรนน์แท็ก อินกรีเดียนส์ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ ขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล ที่ปรึกษางานวิจัยและกรุณาให้คำแนะนำในด้านต่าง ๆ และเป็นคณะกรรมการในการจัดทำโครงการวิจัยที่สัมฤทธิ์ผลได้ดี ขอบพระคุณหลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิตที่ให้การสนับสนุน และขอขอบคุณผู้มีส่วนร่วมในการจัดทำโครงการวิจัยทุกท่านไว้ ณ ที่นี้ด้วย และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจและผู้ที่เกี่ยวข้องต่อไป

คณะผู้วิจัย
2556

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	
ขอบเขตการวิจัย	2
สมมติฐานการวิจัย	2
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
ผิวหนัง	3
การเลี้ยงเซลล์สัตว์หรือเซลล์มนุษย์ในหลอดทดลอง (In vitro cell culture)	4
ข้อดีและข้อเสียของ Primary cell culture	5
ข้อดีและข้อเสียของ Cell line	5
วิธีการเลี้ยงเซลล์แบบปลอดเชื้อ (Aseptic technique for cell culture)	6
อุปกรณ์เครื่องมือสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์	7
อาหารและน้ำเกลือ (Media and buffer)	10
การปนเปื้อนเชื้อจุลชีพ (Microorganism contamination)	11
การนับจำนวนเซลล์ (Counting cells)	11
เซลล์เมลาโนมา (Melanoma cells)	12
พืชสมุนไพรที่ใช้ในเครื่องสำอาง	13

		หน้า
บทที่ 3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	16
	สารสกัดสมุนไพร	16
	การเพาะเลี้ยงเซลล์เมลาโนมา	16
	การศึกษากราฟการเจริญของเซลล์ (growth curve)	17
	ศึกษาการเจริญของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร-ที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากอินทนิลน้ำและยางเลือดมังกร	17
	การวิเคราะห์ข้อมูล	18
บทที่ 4	**ผลการวิจัย**	19
	ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์	19
	ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์เมลาโนมาในการเพาะเลี้ยง-ในหลอดทดลองที่มีสารสกัดจากอินทนิลน้ำ	21
	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารดีเอ็มเอสโอต่อการเจริญของเซลล์	22
	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อการเจริญของเซลล์	23
	ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์เมลาโนมาในการเพาะเลี้ยง-ในหลอดทดลองที่มีสารยางเลือดมังกร	26
	ผลการทดสอบฤทธิ์ของโพรเพนไดออล (PW) ต่อการเจริญของเซลล์	26
	ผลการทดสอบฤทธิ์ของยางเลือดมังกรต่อการเจริญของเซลล์	27
บทที่ 5	**สรุปผลการวิจัยอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ**	31
	สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	31
	ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้	33
	ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป	33
บรรณานุกรม		34
	บรรณานุกรมภาษาไทย	34
	บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ	34
ภาคผนวก		37
	ภาคผนวก ก การเตรียมสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง	38
	ภาคผนวก ข การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการเจริญของเซลล์	41
ประวัติผู้วิจัย		44

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตเป็นเวลา 7 วัน	20

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ตู้ปลอดเชื้อ (Biohazard hood)	7
2.2	ตู้อบเลี้ยงเซลล์ (CO_2 – incubator) สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสมีส่วนผสมของ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %	8
2.3	ภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ลี้ยงซึ่งมีหลายแบบ เช่น จานหลุม ขวด	8
2.4	ไปเปตต์ (Pipette) สำหรับใช้ดูดอาหารหรือเซลล์ใส่และดูดออกจากภาชนะ	9
2.5	ชุดกรองอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์เพื่อทำให้อาหารปลอดเชื้อก่อนใช้เลี้ยงเซลล์	9
2.6	Autoclave เป็นเครื่องสำหรับใช้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้ออุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ทนความร้อนได้	10
2.7	อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสมของผสมซีรั่มลูกวัว 10 %	11
2.8	Haemocytometer (counting chamber) และ cover slips	12
2.9	เซลล์เมลาโนมา ซี 32 (Melanoma cell C32)	13
2.10	ใบอินทนิลน้ำ	14
2.11	ยางเลือดมังกร	15
4.1	การเจริญเติบโตของเซลล์เมลาโนมา (growth curve) ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์คำนวณจากสามการทดลอง เริ่มจากจำนวนเซลล์ตั้งต้น 200,000 , 300,000 และ 400,000 เซลล์	20
4.2	อัตราการเจริญของเซลล์เมลาโนมาเริ่มจากจำนวนเซลล์ตั้งต้น 200,000, 300,000 และ400,000 เซลล์ เป็นเวลา 7 วัน	21
4.3	ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ดีเอ็มเอสโอ 0.0001, 0.001 และ 0.01 % เป็นเวลา 7 วัน	23
4.4	อัตราการเจริญของเซลล์ที่นับได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ดีเอ็มเอสโอ 0.0001, 0.001 และ 0.01 % เป็นเวลา 7 วัน	23
4.5	ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ทีมีสารสกัดอินทนิลน้ำ 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน	24
4.6	อัตราการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ทีมีสารสกัดอินทนิลน้ำ 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน	25
4.7	เซลล์เมลาโนมาที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับกำลังขยาย 200 เท่า	25

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.8	ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ทีมี PW ที่ความเข้มข้น 0.0032, 0.032, 0.32% เป็นเวลา 7 วัน	27
4.9	อัตราการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ทีมี PW ที่ความเข้มข้น 0.0032, 0.032, 0.32% เป็นเวลา 7 วัน	27
4.10	ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ทีมียางเลือดมังกร 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน	29
4.11	อัตราการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ทีมีสารสกัดอินทนิลน้ำ 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน	29
4.12	เซลล์เมลาโนมาที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10 % โดยไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียางเลือดมังกร ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับกำลังขยาย 200 เท่า	30
ข-1	แสดงการออกแบบการทดลองในการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำ	42
ข-2	แสดงการออกแบบการทดลองในการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ของยางเลือดมังกร	43