

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้นำเซลล์เมลานوماของมนุษย์ มาใช้ในการทดลอง ซึ่งเซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ที่พบในผิวหนังชั้นอีพิเดอร์มิส (epidermis) ของร่างกาย เนื่องจากเซลล์สามารถเพาะเลี้ยงได้ในหลอดทดลอง แบ่งตัวได้ไม่สิ้นสุดสามารถเลี้ยงได้อย่างต่อเนื่อง จึงได้นำเซลล์ชนิดนี้มาศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell Growth) และทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำ (*Lagetroemiaspeciosa* (L.) Per.) และยางเลือดมังกร (*Croton Lechleri* Muell. Arg) ต่อการเจริญของเซลล์

### 4.1 ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์

การศึกษาการเจริญของเซลล์เพื่อหาจำนวนเซลล์เมลานوماที่เหมาะสมในงานหลุม โดยเลี้ยงเซลล์เมลานوماที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$  และ  $4 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ในอาหารชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสมของผสมซีรัมลูกวัว 10 % ในงานหลุม 6 หลุม (6-well plate) เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญและนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์และหาเวลาที่เซลล์สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของจำนวนเซลล์ตั้งต้นจากกราฟการเจริญของเซลล์ (growth curve)

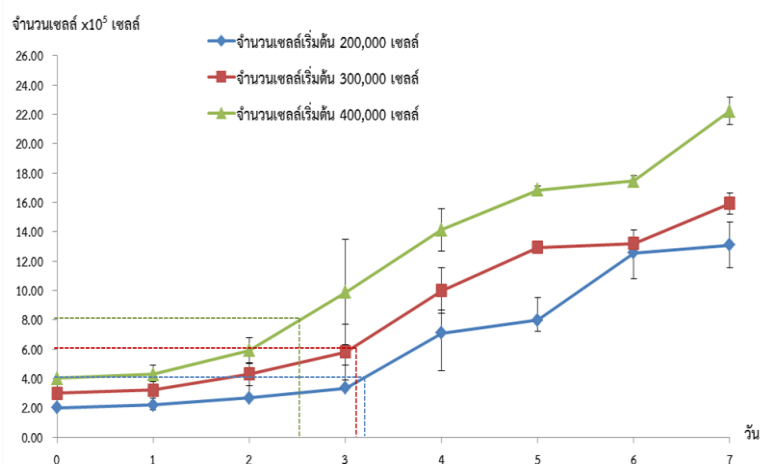
จากตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าการเจริญของเซลล์ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  เซลล์ พบว่าหลังจากวันที่ 3 จำนวนเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องวันที่ 4, 5, 6 และ 7 มีจำนวนเซลล์เจริญเพิ่มขึ้นเป็น  $7.10 \pm 2.56 \times 10^5$ ,  $7.97 \pm 0.74 \times 10^5$ ,  $12.56 \pm 1.77 \times 10^5$  และ  $13.10 \pm 1.57 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ สำหรับจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $3 \times 10^5$  เซลล์ หลังจากวันที่ 3 จำนวนเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องวันที่ 4, 5, 6 และ 7 มีจำนวนเซลล์เจริญเพิ่มขึ้นเป็น  $9.98 \pm 1.56 \times 10^5$ ,  $12.93 \pm 0.10 \times 10^5$ ,  $13.21 \pm 0.26 \times 10^5$  และ  $15.93 \pm 0.71 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ และที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $4 \times 10^5$  เซลล์ หลังจากวันที่ 2 จำนวนเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องวันที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 มีจำนวนเซลล์เจริญเพิ่มขึ้นเป็น  $9.88 \pm 3.60 \times 10^5$ ,  $14.13 \pm 1.45 \times 10^5$ ,  $16.84 \pm 0.27 \times 10^5$ ,  $17.47 \pm 0.36 \times 10^5$  และ  $22.23 \pm 0.94 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตเป็นเวลา 7 วัน

จำนวน เซลล์มีชีวิต* ( $\times 10^5$ )	จำนวนเซลล์เริ่มต้นต่อหลุม		
	$2 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$4 \times 10^5$
1 วัน	2.20±0.36	3.22±0.56	4.27±0.63
2 วัน	2.68±0.71	4.30±0.79	5.91±0.87
3 วัน	3.33±0.00	5.80±1.91	9.88±3.60
4 วัน	7.10±2.56	9.98±1.56	14.13±1.45
5 วัน	7.97±0.74	12.93±0.10	16.84±0.27
6 วัน	12.56±1.77	13.21±0.26	17.47±0.36
7 วัน	13.10±1.57	15.93±0.71	22.23±0.94

\*ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

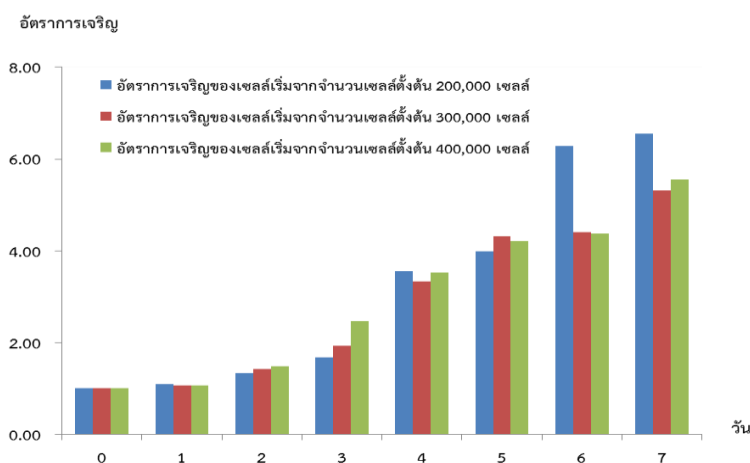
เมื่อนำข้อมูลค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้มาสร้างกราฟเพื่อหาเวลาที่เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของจำนวนเซลล์ตั้งต้น (doubling time) พบว่าเซลล์เริ่มต้นที่จำนวน  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$  และ  $4 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม เซลล์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าเป็น  $4 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ใช้เวลา 76.27, 73.15 และ 60.66 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.1 และมีค่าเฉลี่ยการเจริญของเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าที่เวลา  $70.03 \pm 8.26$  ชั่วโมง



ภาพที่ 4.1 การเจริญเติบโตของเซลล์เมลานوما (growth curve) ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์คำนวณจากสามารถทดลอง เริ่มจากจำนวนเซลล์ตั้งต้น 200,000 , 300,000 และ 400,000 เซลล์

เมื่อดูอัตราการเจริญของเซลล์จากค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็นเวลา 7 วัน แสดงดังภาพที่ 4.2 พบว่าที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$  และ  $4 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม มีอัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นทุกวันแสดงให้เห็นว่าการทดลองเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด

ดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % เป็นสถานะที่มีความเหมาะสมที่จะเลี้ยงเซลล์ให้เจริญขึ้นได้ โดยที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  และ  $3 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม มีอัตราการเจริญของเซลล์เป็นสองเท่าหลังวันที่ 3 ในขณะที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $4 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม มีอัตราการเจริญของเซลล์เป็นสองเท่าหลังวันที่ 2 และพบว่าเซลล์ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$  และ  $4 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกันในวันที่ 4 และวันที่ 5 คือมีอัตราการเจริญของเซลล์ประมาณสามเท่าในวันที่ 4 และสี่เท่าในวันที่ 5 แต่ในวันที่ 6 แต่วันที่ 7 ของการเลี้ยงเซลล์พบว่าที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม มีอัตราการเจริญสูงกว่าอัตราการเจริญของจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $3 \times 10^5$  และ  $4 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม อย่างเห็นได้ชัด โดยพบว่าที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $3 \times 10^5$  และ  $4 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม มีเซลล์ตายบางส่วน คิดเป็น 10% อันเนื่องมาจากเซลล์มีจำนวนมากและอาหารไม่เพียงพอกับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น และพื้นที่ที่จะให้เซลล์เจริญไม่เพียงพอ สำหรับเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม พบว่าเซลล์กระจายตัวบนหลุมได้เหมาะสม ไม่หนาแน่นหรือน้อยจนเกินไป เนื่องจากมีพื้นที่เหมาะสมที่ทำให้เซลล์เจริญได้ดี และมีจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมกับปริมาณอาหาร ดังนั้นที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม จึงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีความเหมาะสมที่จะนำไปศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อไป



ภาพที่ 4.2 อัตราการเจริญของเซลล์เมลาโนมาเริ่มจากจำนวนเซลล์ตั้งต้น 200,000, 300,000 และ 400,000 เซลล์ เป็นเวลา 7 วัน

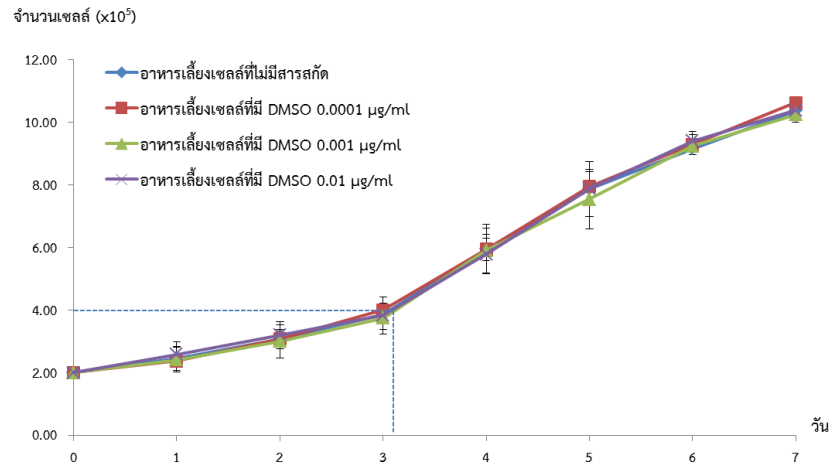
#### 4.2 ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์เมลาโนมาในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดจากอินทนิลน้ำ

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อการเจริญของเซลล์ สารอินทนิลน้ำที่นำมาทดสอบอยู่ในรูปผงถูกละลายด้วยตัวทำละลายดีเอ็มเอสโอ (DMSO, Dimethylsulfonyloxide) จึงต้องมีการทดสอบฤทธิ์ของดีเอ็มเอสโอต่อการเจริญของเซลล์ด้วย โดยจำนวนเซลล์ที่เลือกใช้ในการทดสอบครั้งนี้คือ  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม เซลล์ถูกเลี้ยงใน 3 สถานะคือ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % โดยไม่มีสารสกัด ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น

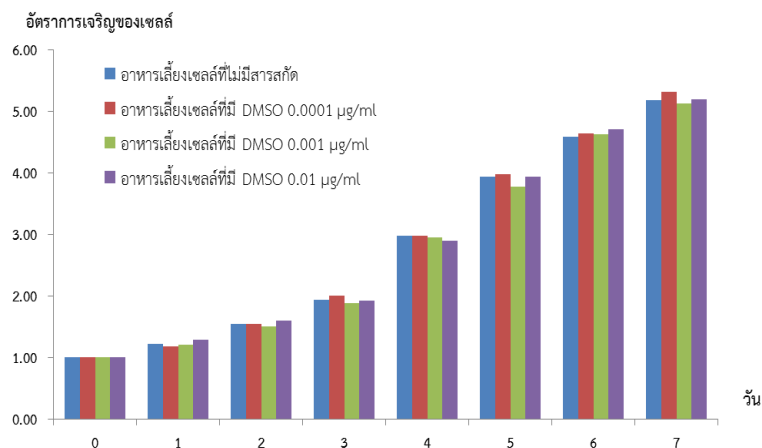
0.0001, 0.001 และ 0.01% และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ในจานหลุม 6 หลุม (6-well plate) เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญของเซลล์ นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตทุกวัน

#### 4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารตีเอ็มเอสโอต่อการเจริญของเซลล์

จากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดตีเอ็มเอสโอผสมซีรัมลูกวัว 10 % โดยไม่มีสารสกัด และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีตีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.001, 0.01% พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยเซลล์ที่อยู่ในหลุมที่ไม่มีสารสกัดพบว่า เซลล์มีการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นหลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ เมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนครบ 7 วัน มีจำนวนเซลล์เป็น  $2.45 \pm 0.38 \times 10^5$ ,  $3.08 \pm 0.26 \times 10^5$ ,  $3.87 \pm 0.13 \times 10^5$ ,  $5.95 \pm 0.80 \times 10^5$ ,  $7.87 \pm 0.88 \times 10^5$ ,  $9.16 \pm 0.19 \times 10^5$  และ  $10.37 \pm 0.25 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ เซลล์ที่อยู่ในหลุมที่มีตีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.0001% พบว่าเซลล์มีจำนวนเพิ่มเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนครบ 7 วันมีจำนวนเซลล์เป็น  $2.37 \pm 0.13 \times 10^5$ ,  $3.08 \pm 0.31 \times 10^5$ ,  $4.00 \pm 0.22 \times 10^5$ ,  $5.95 \pm 0.36 \times 10^5$ ,  $7.95 \pm 0.47 \times 10^5$ ,  $9.29 \pm 0.31 \times 10^5$  และ  $10.63 \pm 0.13 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ เซลล์ที่อยู่ในหลุมที่มีตีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.001% พบว่าเซลล์มีจำนวนเพิ่มเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นหลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนครบ 7 วันมีจำนวนเซลล์เป็น  $2.41 \pm 0.40 \times 10^5$ ,  $3.00 \pm 0.54 \times 10^5$ ,  $3.75 \pm 0.38 \times 10^5$ ,  $5.91 \pm 0.72 \times 10^5$ ,  $6.54 \pm 0.95 \times 10^5$ ,  $9.25 \pm 0.13 \times 10^5$  และ  $10.25 \pm 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ และเซลล์ที่อยู่ในหลุมที่มีตีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.01% พบว่าเซลล์มีจำนวนเพิ่มเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นหลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ และเมื่อเลี้ยงเซลล์จนครบ 7 วันมีจำนวนเซลล์เป็น  $2.58 \pm 0.40 \times 10^5$ ,  $3.20 \pm 0.44 \times 10^5$ ,  $3.83 \pm 0.59 \times 10^5$ ,  $5.79 \pm 0.64 \times 10^5$ ,  $7.87 \pm 0.87 \times 10^5$ ,  $9.41 \pm 0.31 \times 10^5$  และ  $10.38 \pm 0.38 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างของเวลาที่เซลล์ใช้ในการเจริญเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าในเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในหลุมที่ไม่มีสารสกัดกับหลุมที่มีตีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงภาพที่ 4.3 และจากภาพที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหารโดยไม่มีสารสกัดและในอาหารที่มีตีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.001, 0.01% เซลล์มีการเจริญ มีจำนวนและอัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน แสดงว่าตีเอ็มเอสโอไม่มีผลรบกวนต่อการเจริญของเซลล์ จึงสามารถใช้ตีเอ็มเอสโอเป็นตัวทำละลายอินทนิลน้ำในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อการเจริญของเซลล์ได้ และการที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นหลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับที่ได้ศึกษาการเจริญเป็นสองเท่าของเซลล์เมลาโนมาที่จะนำมาทดสอบ (growth curve) แสดงว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่นำมาศึกษาคือ  $2 \times 10^5$  เซลล์ และสภาวะที่ศึกษามีความเหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ได้



ภาพที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ดีเอ็มเอสโอ 0.0001, 0.001 และ 0.01 % เป็นเวลา 7 วัน

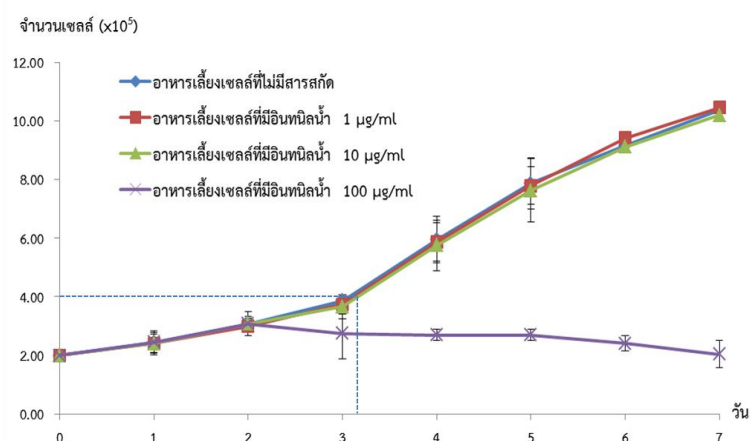


ภาพที่ 4.4 อัตราการเจริญของเซลล์ที่นับได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ดีเอ็มเอสโอ 0.0001, 0.001 และ 0.01 % เป็นเวลา 7 วัน

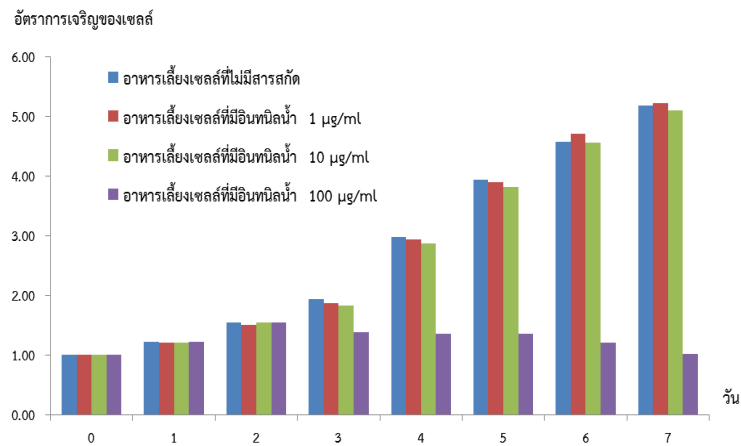
#### 4.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำต่อการเจริญของเซลล์

จากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % โดยไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยเซลล์ที่อยู่ในหลุมที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นหลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนครบ 7 วันมีจำนวนเซลล์เป็น  $2.41 \pm 0.31 \times 10^5$ ,

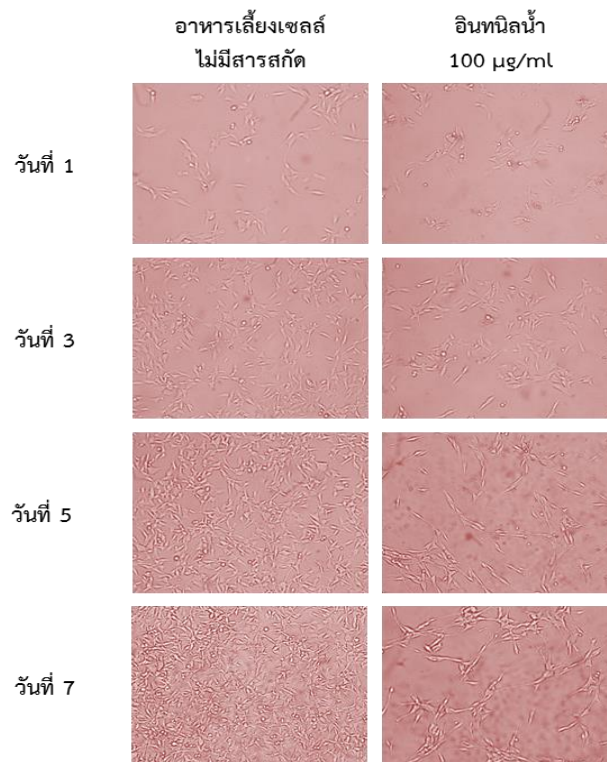
$3.00 \pm 0.15 \times 10^5$ ,  $3.75 \pm 0.33 \times 10^5$ ,  $5.87 \pm 0.66 \times 10^5$ ,  $7.79 \pm 0.64 \times 10^5$ ,  $9.41 \pm 0.14 \times 10^5$  และ  $10.45 \pm 0.14 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ และเซลล์ที่อยู่ในหลุมที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นหลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนครบ 7 วันมีจำนวนเซลล์เป็น  $2.41 \pm 0.38 \times 10^5$ ,  $3.08 \pm 0.40 \times 10^5$ ,  $3.66 \pm 0.40 \times 10^5$ ,  $5.75 \pm 0.87 \times 10^5$ ,  $7.63 \pm 1.08 \times 10^5$ ,  $9.12 \pm 0.13 \times 10^5$  และ  $10.20 \pm 0.19 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหารโดยไม่มีสารสกัดกับในอาหารที่มีอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเซลล์มีการเจริญและมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน แสดงว่าอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ และไม่พบความแตกต่างของเวลาที่เซลล์ใช้ในการเจริญเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในหลุมที่มีและไม่มีสารสกัด แต่พบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 และ 2 เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนเป็น  $2.45 \pm 0.07 \times 10^5$  และ  $3.08 \pm 0.19 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ แต่ในวันที่ 3 เริ่มพบเซลล์ตาย ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 พบว่าจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ  $2.75 \pm 0.87 \times 10^5$ ,  $2.70 \pm 0.19 \times 10^5$ ,  $2.70 \pm 0.19 \times 10^5$ ,  $2.41 \pm 0.26 \times 10^5$  และ  $2.04 \pm 0.47 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และจากภาพที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าเซลล์มีอัตราการเจริญลดลงอย่างชัดเจน แสดงว่าสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อการเจริญของเซลล์คือทำให้เซลล์เริ่มตายในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์และพบว่าเซลล์มีการเจริญน้อยกว่าโดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในหลุมที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารอินทนิลน้ำ ดังแสดงในภาพที่ 4.7 และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างการเจริญของเซลล์ในหลุมที่มีอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเทียบกับในหลุมที่ไม่มีสารสกัดด้วย One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.037$ )



**ภาพที่ 4.5** ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรั่มลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำ 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.6 อัตราการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดอินทิน้ำ 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.7 เซลล์เมลานอมาที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดอินทิน้ำ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับกำลังขยาย 200 เท่า

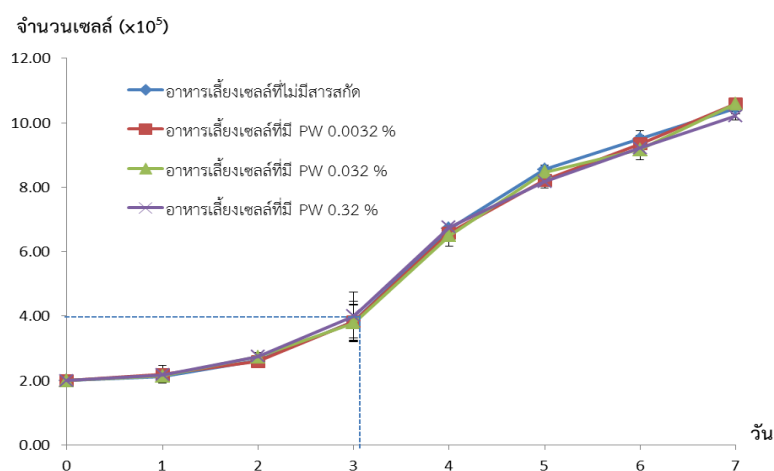
#### 4.3 ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์เมลานินมาในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีสารยางเลือดมังกง

การทดสอบฤทธิ์ของยางเลือดมังกงต่อการเจริญของเซลล์ ยางเลือดมังกงที่นำมาศึกษาละลายอยู่ในตัวทำละลายโพรเพนไดออลต่อน้ำ ในอัตราส่วน 1:1 (PW, Propanediol : Water) จึงต้องมีการทดสอบฤทธิ์ของ PW ต่อการเจริญของเซลล์ด้วย โดยจำนวนเซลล์ที่เลือกใช้ในการทดสอบครั้งนี้คือ  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม เซลล์ถูกเลี้ยงใน 3 สภาวะได้แก่ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % โดยไม่มีสารสกัด และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี PW ที่ความเข้มข้น 0.0032, 0.032, 0.32% และเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียางเลือดมังกงที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในจานหลุม 6 หลุม (6-well plate) เป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตทุกวัน

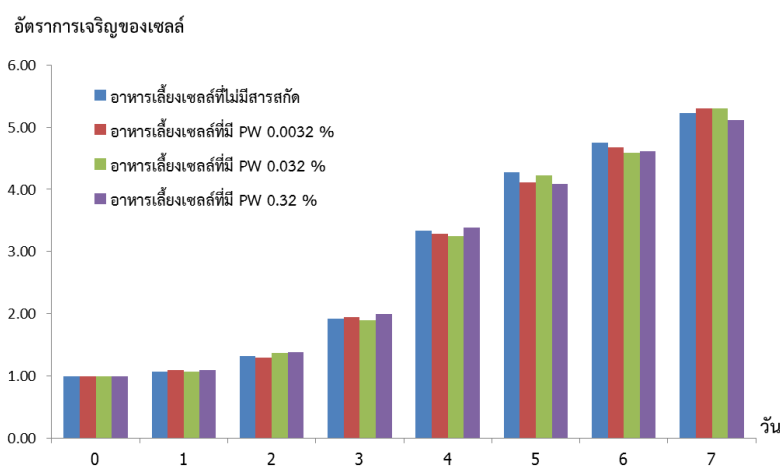
##### 4.3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของโพรเพนไดออล (PW) ต่อการเจริญของเซลล์

จากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % โดยไม่มีสารสกัด และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี PW ที่ความเข้มข้น 0.0032, 0.032, 0.32% พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยเซลล์ที่อยู่ในหลุมที่ไม่มีสารสกัด พบว่าเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น หลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนครบ 7 วัน มีจำนวนเซลล์เป็น  $2.13 \pm 0.13 \times 10^5$ ,  $2.63 \pm 0.13 \times 10^5$ ,  $3.84 \pm 0.61 \times 10^5$ ,  $6.69 \pm 0.08 \times 10^5$ ,  $8.51 \pm 0.18 \times 10^5$ ,  $9.50 \pm 0.25 \times 10^5$  และ  $10.38 \pm 0.18 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ เซลล์ที่อยู่ในหลุมที่มี PW ที่ความเข้มข้น 0.0032% พบว่าหลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ จำนวนเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนครบ 7 วัน มีจำนวนเซลล์เป็น  $2.19 \pm 0.27 \times 10^5$ ,  $2.57 \pm 0.08 \times 10^5$ ,  $3.83 \pm 0.52 \times 10^5$ ,  $6.63 \pm 0.18 \times 10^5$ ,  $8.26 \pm 0.18 \times 10^5$ ,  $9.34 \pm 0.26 \times 10^5$  และ  $10.51 \pm 0.18 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ เซลล์ที่อยู่ในหลุมที่มี PW ที่ความเข้มข้น 0.032% พบว่าหลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ จำนวนเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนครบ 7 วัน มีจำนวนเซลล์เป็น  $2.14 \pm 0.24 \times 10^5$ ,  $2.73 \pm 0.13 \times 10^5$ ,  $3.79 \pm 0.59 \times 10^5$ ,  $6.69 \pm 0.08 \times 10^5$ ,  $8.51 \pm 0.18 \times 10^5$ ,  $9.17 \pm 0.19 \times 10^5$  และ  $10.57 \pm 0.09 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ เซลล์ที่อยู่ในหลุมที่มี PW ที่ความเข้มข้น 0.32% พบว่าวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ จำนวนเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนครบ 7 วัน มีจำนวนเซลล์เป็น  $2.17 \pm 0.14 \times 10^5$ ,  $2.75 \pm 0.13 \times 10^5$ ,  $4.00 \pm 0.76 \times 10^5$ ,  $6.75 \pm 0.00 \times 10^5$ ,  $8.07 \pm 0.09 \times 10^5$ ,  $9.21 \pm 0.36 \times 10^5$  และ  $10.13 \pm 0.00 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหารโดยไม่มีสารสกัดและในอาหารที่มี PW ที่ความเข้มข้น 0.0032, 0.032, 0.32% เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น มีจำนวนและอัตราการเจริญของเซลล์ใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 4.8 และ 4.9 แสดงว่า PW ไม่มีผลรบกวนต่อการเจริญของเซลล์ และพบว่าเซลล์มีการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นหลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับที่ได้ศึกษาการเจริญเป็นสองเท่าของเซลล์เมลานินมาที่จะนำมาทดสอบ (growth curve) แสดงว่าจำนวนเซลล์

เริ่มต้นที่นำมาศึกษาคือ  $2 \times 10^5$  เซลล์ และสถานะที่ศึกษามีความเหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ได้ และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างการเจริญของเซลล์ในหลุมที่มี PW ที่ความเข้มข้น 0.0032, 0.032, 0.32% เทียบกับในหลุมที่ไม่มีสารสกัดด้วย One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าไม่แตกต่างกัน ( $p=0.969, 0.972, 0.965$ )



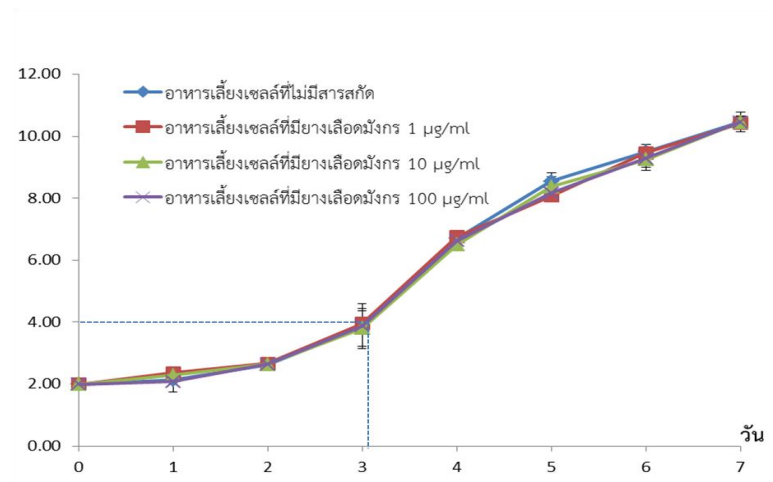
ภาพที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี PW ที่ความเข้มข้น 0.0032, 0.032, 0.32% เป็นเวลา 7 วัน



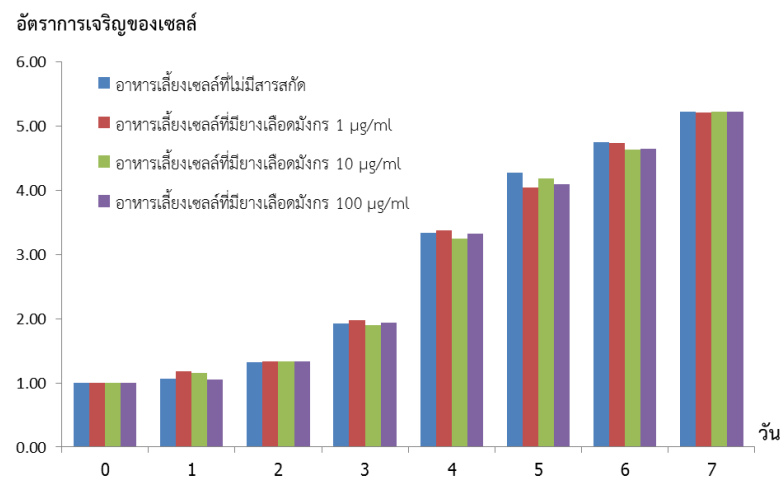
ภาพที่ 4.9 อัตราการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี PW ที่ความเข้มข้น 0.0032, 0.032, 0.32% เป็นเวลา 7 วัน

#### 4.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของยางเลือดมังกรต่อการเจริญของเซลล์

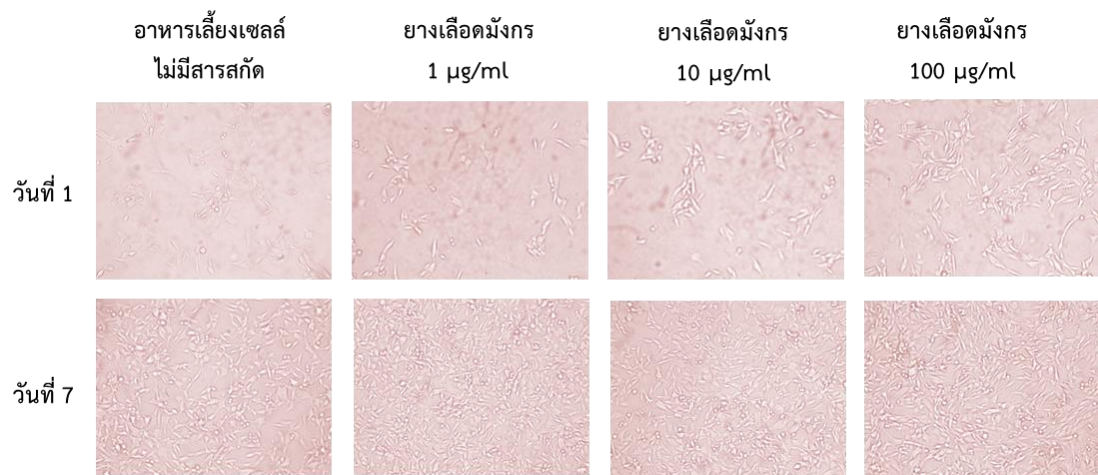
จากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % โดยไม่มีสารสกัด และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียางเลือดมังกรที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยพบว่าการเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่มียางเลือดมังกรที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนครบ 7 วัน มีจำนวนเซลล์เป็น  $2.36 \pm 0.34 \times 10^5$ ,  $2.67 \pm 0.14 \times 10^5$ ,  $3.96 \pm 0.73 \times 10^5$ ,  $6.69 \pm 0.08 \times 10^5$ ,  $8.00 \pm 0.00 \times 10^5$ ,  $9.46 \pm 0.38 \times 10^5$  และ  $10.26 \pm 0.18 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ เซลล์ในหลุมที่มียางเลือดมังกรที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าหลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ จำนวนเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนครบ 7 วัน มีจำนวนเซลล์เป็น  $2.29 \pm 0.19 \times 10^5$ ,  $2.65 \pm 0.10 \times 10^5$ ,  $3.80 \pm 0.58 \times 10^5$ ,  $6.57 \pm 0.09 \times 10^5$ ,  $8.13 \pm 0.18 \times 10^5$ ,  $9.25 \pm 0.25 \times 10^5$  และ  $10.38 \pm 0.18 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ และเซลล์ในหลุมที่มียางเลือดมังกรที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าหลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงเซลล์ จำนวนเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนครบ 7 วัน มีจำนวนเซลล์เป็น  $2.09 \pm 0.08 \times 10^5$ ,  $2.65 \pm 0.10 \times 10^5$ ,  $3.88 \pm 0.65 \times 10^5$ ,  $6.69 \pm 0.08 \times 10^5$ ,  $8.07 \pm 0.09 \times 10^5$ ,  $9.29 \pm 0.32 \times 10^5$  และ  $10.26 \pm 0.18 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหารโดยไม่มีสารสกัดและในอาหารที่มียางเลือดมังกรที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น มีจำนวนและอัตราการเจริญของเซลล์ใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 4.10, 4.11 และ 4.12 แสดงว่า โพรเพนไดออกไซด์ไม่น่าจะมีผลรบกวนต่อการเจริญของเซลล์ และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างการเจริญของเซลล์ในหลุมที่มียางเลือดมังกรที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับในหลุมที่ไม่มีสารสกัดด้วย One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าไม่แตกต่างกัน ( $p=0.992, 0.968, 0.959$ )



ภาพที่ 4.10 ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียางเลือดมังกร 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.11 อัตราการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % ที่ไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำ 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.12 เซลล์เมลานوماที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มผสมซีรัมลูกวัว 10 % โดยไม่มีสารสกัดและในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียางเลือดมังกร ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ กำลังขยาย 200 เท่า