



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
รหัสโครงการ กภท.41/2563

เรื่อง

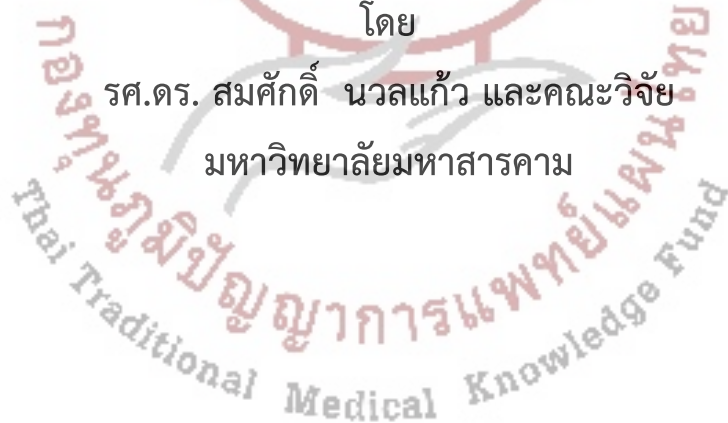
การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และความเป็นพิษ
ของลูกสลอดก่อนและหลังการฆ่าฤทธิ์

Comparison of chemical constituents, pharmacological activities
and toxicity of *Croton tiglium* L. Seed before and after processing

โดย

รศ.ดร. สมศักดิ์ นवलแก้ว และคณะวิจัย

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม



ปีงบประมาณ พ.ศ. 2563

(ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย)

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และความเป็นพิษของลูกสลอดก่อนและหลังการฆ่าฤทธิ์ มีวัตถุประสงค์เพื่อเพื่อศึกษาเปรียบเทียบเอชพีแอลซีโครมาโตแกรมของลูกสลอดก่อนและหลังการแปรสภาพตามวิธีการแพทย์แผนไทย 4 วิธี เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดแยกสารที่เกิดขึ้นหลังการแปรสภาพลูกสลอด เพื่อทดสอบฤทธิ์ระคาย ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ก่อมะเร็ง และความเป็นพิษของลูกสลอดก่อนและหลังการแปรสภาพ เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ก่อมะเร็ง ของสารที่เกิดขึ้นหลังการแปรสภาพลูกสลอด โดยเปรียบเทียบวิธีการแปรสภาพลูกสลอดด้วยวิธีการแพทย์แผนไทย 4 วิธี และคัดเลือกวิธีการแปรสภาพที่สามารถลดปริมาณสาร Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ได้ และเกิดสารใหม่มากที่สุดมาใช้แปรสภาพลูกสลอดเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ การทดสอบฤทธิ์ระคาย ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ก่อมะเร็ง และความเป็นพิษของลูกสลอด ผลการศึกษาพบว่า การแปรสภาพลูกสลอดวิธีที่ 1, 3 และ 4 สามารถลดปริมาณสาร PMA ได้ โดยวิธีที่ 1 ทำให้เกิดสารใหม่มากที่สุด จึงถูกเลือกมาใช้เป็นวิธีการแปรสภาพลูกสลอดในการศึกษาขั้นตอนต่อไป โดยสารใหม่ที่เกิดขึ้นหลังจากการแปรสภาพอาจเป็น 12-O-Octadecadienoylphorbol-13-acetate

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของลูกสลอดก่อนแปรสภาพ ลูกสลอดหลังแปรสภาพ และตำรับยาที่ประกอบด้วยลูกสลอดหลังแปรสภาพ พบว่าตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด มีความปลอดภัย ไม่แสดงความเป็นพิษชนิดเฉียบพลัน

การทดสอบฤทธิ์ระคายในหนูทดลองโดยการเปรียบเทียบระหว่างลูกสลอดก่อนแปรสภาพและลูกสลอดหลังแปรสภาพ พบว่าลูกสลอดก่อนแปรสภาพมีฤทธิ์ในการระคายที่แรงกว่าลูกสลอดหลังแปรสภาพ รวมทั้งพบเซลล์ที่แสดงถึงการอักเสบของเนื้อเยื่อของกระเพาะอาหาร และเซลล์ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งเมือกในลำไส้มากกว่าด้วย

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของลูกสลอดก่อนแปรสภาพ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU100 ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 111.1 ± 4.027 ug/ml รองลงมา คือ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU213 และเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HT-29 ตามลำดับ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของลูกสลอดหลังแปรสภาพ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด Caco-2 ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 103.7 ± 7.194 ug/ml รองลงมา คือ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU100 เซลล์มะเร็งปอดชนิด H2228 ตามลำดับ การเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งลำไส้ชนิด Caco-2 ของลูกสลอดก่อนแปรสภาพ ลูกสลอดหลังการแปรสภาพ และสารที่แยกได้จากสลอดหลังแปรสภาพ พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 156.1 ± 4.33 , 103.7 ± 7.19 และ 98.91 ± 4.02 ug/ml ตามลำดับ โดยสารสกัดทุกชนิดไม่มีพิษต่อเซลล์ปกติ การทดสอบการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็ง (Apoptosis) โดยการกระตุ้นให้เซลล์ Caco-2 ตายแบบ apoptosis พบว่าสารสกัดสลอดหลังแปรสภาพที่ความเข้มข้น 200 ug/ml ทำให้เกิดการตายแบบ early apoptosis และ การตายแบบ late apoptosis มากที่สุด ร้อยละ 18 และร้อยละ 10 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis pathway การทดสอบฤทธิ์ส่งเสริมการเกิดมะเร็งในหลอดทดลอง พบว่าลูกสลอดก่อนแปรสภาพ หลังการแปรสภาพ และสารที่แยกได้จากสลอดหลังแปรสภาพ ไม่ส่งเสริมการเกิดมะเร็ง Caco-2

Abstract

The objective of the research project “Comparison of chemical constituents, pharmacological activities and toxicity of *Croton tiglium* L. seed before and after processing” is to compare the HPLC chromatogram of *C. tiglium* seed before and after 4 processing methods, to isolate chemical compounds occurring after the processing, to test the laxative, anti-cancer and cancer-promoting activities including the toxicity of *C. tiglium* before and after processing. Four Thai traditional processing methods of *C. tiglium* were studied. The processing method that reduced the amount of Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and gave high occurring compound was selected to use for the next experiments. The result showed that processing method 1 was selected in this study. The occurring compound during processing was isolated and identified as 12-O-Octadecadienoylphorbol-13-acetate.

The acute toxicity of *C. tiglium* before and after processing and Thai traditional preparation that includes *C. tiglium* were tested. The result showed no sign of acute toxicity in all samples.

The laxative activity of *C. tiglium* before and after processing was tested in rats. The result showed that *C. tiglium* before processing gave more activity than *C. tiglium* after processing. The *C. tiglium* before processing also showed more cell-related inflammation in the stomach and cell-related mucus secretion in the intestine.

Toxicity to the cancer cell line of *C. tiglium* before and after processing was tested. The result showed that both *C. tiglium* before and after processing were toxic to cancer cell lines. The cytotoxicity test of *C. tiglium* before processing showed that KKU 100 cholangiocarcinoma cells were the most effective at inhibiting the growth with IC_{50} of 111.1 ± 4.027 ug/ml follow by KKU213 cholangiocarcinoma cell and HT-29 colon cancer, respectively. The cytotoxicity test of *C. tiglium* after processing showed that it inhibited the growth of Caco-2 colon cancer cells the most with IC_{50} of 103.7 ± 7.194 ug/ml followed by KKU100 cholangiocarcinoma cells and H2228 lung cancer cells, respectively. Comparison of the growth inhibitory ability of Caco-2 colon cancer of *C. tiglium* before and after processing and the isolated compound showed the IC_{50} of 156.1 ± 4.33 , 103.7 ± 7.19 and 98.91 ± 4.02 ug/ml, respectively. All extracts were non-toxic to normal cells. Apoptosis test in cancer cells by inducing apoptosis of Caco-2 cells showed that *C. tiglium* after processing at a concentration of 200 ug/ml induced early apoptosis and late apoptosis the most, 18% and 10%, respectively, which is consistent with the test results of gene expression related to apoptosis pathway. The carcinogenesis of *C. tiglium* before and after processing and the isolated compound was tested, It was found that all samples does not promote Caco-2 carcinogenesis.