

1. ชื่อโครงการ ฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมและต้านอนุมูลอิสระในเซลล์เพาะเลี้ยงของสารสกัดจากพืชสกุลพริกไทย

2. คณะนักวิจัย

หัวหน้าโครงการ: ผศ.ดร.พจนพร ไกรดิษฐ์ (Potchanapond Graidist)
 สัดส่วนที่ทำการวิจัย: 50%
 หน่วยงาน: หน่วยวิจัยชีววิทยาของมะเร็งและเนื้องอก ภาควิชาชีวเวชศาสตร์
 คณะแพทยศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
 โทรศัพท์: 074-451180, 074-451180
 โทรสาร: 074-429584

ผู้ร่วมโครงการ: ผศ.ดร.เยาวภา สุขพรมมา (Yaowapa Sukpondma)
 สัดส่วนที่ทำการวิจัย: 20%
 หน่วยงาน: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
 โทรศัพท์: 074-288449
 โทรสาร: 074-558841

ผู้ร่วมโครงการ: น.ส.ฐาปนาวรรณ นาสมยนต์ (Tapanawan Nasomyon)
 สัดส่วนที่ทำการวิจัย: 20%
 หน่วยงาน: หน่วยวิจัยชีววิทยาของมะเร็งและเนื้องอก ภาควิชาชีวเวชศาสตร์
 คณะแพทยศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
 โทรศัพท์: 074-451180, 074-451184
 โทรสาร: 074-429584

ผู้ร่วมโครงการ: น.ส.พันธ์วศรี แสงสุวรรณ (Phanvasri Saengsuwan)
 สัดส่วนที่ทำการวิจัย: 10%
 หน่วยงาน: ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์
 วิทยาเขต หาดใหญ่
 โทรศัพท์: 074-451180, 074-451184
 โทรสาร: 074-429584

3. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภท ทั่วไป ประจำปี 2555

4. บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

Abstract

To examine whether seven species of plants of genus *Piper* possess anti-cancer effects, one normal breast (MCF-12A), one normal fibroblast (L929), and three breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-468 and MDA-MB-231) were used to test cytotoxicity effects over

a period of 72 h using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. All dried plants were first extracted with methanol and dichloromethane, and then the effective extract were isolated and purified by column chromatography techniques. The effective pure compounds were selected for Western blot analysis to detect apoptotic proteins. The results showed that ethanol and dichloromethane extracts of *Piper retrofractum*, *Piper betle*, especially *Piper nigrum*, exhibited strong effect on MDA-MB-468 cells. Then, *P. nigrum* was further separated and purified, and gave a two effective pure compounds namely 5'-desmethoxyyatein and piperlonguminine. These both pure compounds, 5'-desmethoxyyatein and piperlonguminine demonstrated a highly cytotoxic effect with IC50 values of 1.18 ± 0.10 and 1.63 ± 0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on MCF-7 cells, respectively and lower cytotoxicity against L929 cells with IC50 values of 16.54 ± 0.89 and 18.79 ± 0.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Moreover, 5'-desmethoxyyatein induced apoptotic proteins including p53, caspase 7, caspase 8, bax and cytochrome C at 24, 48, 72, 72, and 72 hours, respectively. Moreover, piperlonguminine also induced p53, caspase 7, caspase 8, bax and cytochrome C at 24, 72, 48, 48, and 72 hours, respectively. Both pure compounds inhibited topoisomerase II and Bcl2 at 24 hours. These results indicate that 5'-desmethoxyyatein and piperlonguminine from *P. nigrum* exhibited cytotoxic activity against breast cancer cells and lower toxicity against normal fibroblast cells, and the action involved in the induction of apoptosis.

Combination of piperine and other compounds from *Piper sp.* with another plants has been reported the anti-inflammation and anti-oxidative stress as the medicinal properties in many types of animal model. In this report, the cytotoxicity, anti-nitric oxide production and anti-oxidative stress of 5 samples extracted from *P. nigrum* including CP2 (crude extract without piperine), piperine, pellitorine, piperlonguminine and 5'-desmethoxyyatein were determined in RAW 264.7 macrophage cells. Piperine and CP2 showed the half maximal cytotoxicity (CC_{50}) which determined by MTT assay at 158.56 μM and 60.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The non-cytotoxic concentration of piperine, pellitorine, CP2, piperlonguminine and 5'-desmethoxyyatein were not more than 20 μM , 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. After the 24 hours of exposure, all samples could not protect from cell dead induced by hydrogen peroxide. In the present of lipopolysaccharide (LPS), 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CP2 inhibited the production of nitric oxide at 40.82% and 59.36% which determined by Griess reagent. In conclusion, anti-nitric oxide production was found in CP2 sample and the anti-oxidative stress could not be found in all samples. It will be important to further elucidate the active compound in CP2 and the cellular mechanisms before using in the clinical phase.

บทคัดย่อ

ศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งของพืชสกุล *Piper* จำนวน 7 ชนิด โดยศึกษาในเซลล์เต้านมปกติจำนวน 1 ชนิด (MCF-12A), เซลล์ปกติไฟโบรบลาสต์จำนวน 1 ชนิด (L929) และเซลล์มะเร็งเต้านมจำนวน 3 ชนิด (MCF-7, MDA-MB-468 และ MDA-MB-231) ด้วยวิธี MTT assay ทำโดยการนำตัวอย่างแห้งของพืชมาแช่ในตัวทำละลายได้แก่ เมทานอล หรือ ไดคลอโรมีเทน จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์กับเซลล์ นำพืชที่มีฤทธิ์ไปแยกสกัดและทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ดีไปทดสอบการเกิดอะพอพโทซิสด้วยวิธี Western blot analysis จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลและไดคลอโรมีเทนที่ได้จาก *Piper retrofractum* และ *Piper betle* ให้ผลที่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดจาก *Piper nigrum* ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ MDA-MB-468 ได้ดีที่สุด จากนั้นจึงนำ *P. nigrum* มาแยกสารบริสุทธิ์ต่อ และได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ 5'-desmethoxyatein และ piperlonguminine ซึ่งสารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดนี้มีความเป็นพิษสูง ต่อเซลล์ MCF-7 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.18 ± 0.10 และ 1.63 ± 0.10 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และมีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ L929 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.54 ± 0.89 and 18.79 ± 0.73 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสาร 5'-desmethoxyatein สามารถเหนี่ยวนำโปรตีนที่ทำให้เกิดอะพอพโทซิสได้แก่ p53, caspase 7, caspase 8, bax และ cytochrome C ที่เวลา 24, 72, 48, 48, และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนสาร piperlonguminine สามารถเหนี่ยวนำโปรตีนที่ทำให้เกิดอะพอพโทซิสได้แก่ p53, caspase 7, caspase 8, bax และ cytochrome C ที่เวลา 24, 72, 48, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ และสารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดสามารถยับยั้ง topoisomerase II และ Bcl2 ที่เวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า 5'-desmethoxyatein และ piperlonguminine จาก *P. nigrum* สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้ดี และมีความเป็นพิษน้อยกับเซลล์ปกติไฟโบรบลาสต์ และทำให้เซลล์ตายผ่านทางกระบวนการอะพอพโทซิส

ตำรับยาสมุนไพรที่ประกอบด้วย piperine และพืชในสกุลพริกไทย (Genus *Piper*) มีรายงานถึงฤทธิ์ทางด้านการแพทย์หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการ ยับยั้งการอักเสบ และรักษาสมดุลความเครียดออกซิเดชันในสัตว์ทดลอง ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร CP2 (สารสกัดหยาบที่ไม่มี piperine), piperine, pellitorin, piperlonguminine และ 5'-desmethoxyatein ในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในภาวะที่มี lipopolysaccharide (LPS) และการป้องกันการตายของเซลล์ในภาวะเครียดออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำโดย hydrogen peroxide ในเซลล์ RAW 264.7 macrophage เป็นเซลล์ทดสอบ ผลการศึกษาพบว่า piperine และ CP2 มีค่าเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ด้วย MTT assay ที่ความเข้มข้น 158.56 μM และ 60.59 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และช่วงความเข้มข้นของ piperine, pellitorine, CP2, piperlonguminine และ 5'-desmethoxyatein ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่นำมาใช้ในการทดสอบไม่ควรมากกว่า 20 μM , 8 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ และ 2 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในการทดสอบฤทธิ์ป้องกันการตายของเซลล์ในภาวะเครียดออกซิเดชันโดย hydrogen peroxide เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าไม่มีสารใดมีฤทธิ์ดังกล่าว ในขณะที่พบสารสกัดหยาบ CP2 เพียงตัวอย่างเดียวที่แสดงผลยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ โดยสามารถยับยั้งได้ 40.82% และ 59.36%

ตามลำดับ จากการทดลองสรุปได้ว่า ไม่พบฤทธิ์ด้านการตายของเซลล์ทดสอบในภาวะเครียดออกซิเดชัน และมีเพียงตัวอย่าง CP2 เพียงตัวอย่างเดียวที่พบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะหาสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์และศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ก่อนที่จะศึกษาในคนต่อไป

5. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

5.1 บทนำ

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในระดับประเทศและระดับโลก มีรายงานอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งทั่วโลกในปี พ.ศ. 2543 พบผู้ป่วยโรคมะเร็งจำนวน 22.4 ล้านคน เป็นผู้ป่วยรายใหม่จำนวน 10.1 ล้านคน มีผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งปีละ 6.2 ล้านคน หรือ 12% ของสาเหตุการตายทั้งหมด คาดว่าในปี พ.ศ. 2563 ทั่วโลกจะมีผู้ป่วยรายใหม่จำนวน 15.6 ล้านคน และจะเสียชีวิตจำนวน 10 ล้านคน (Garcia *et al.*, 2007) จากการสรุปข้อมูลในปี พ.ศ. 2550 โรคมะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดในเพศหญิง โดยพบ 40 คน ต่อประชากร 100,000 คน (จิริชูด้า ปัทมดิลก, 2552) ปัจจัยเสี่ยงของโรคมะเร็งเต้านมมีหลายประการ แต่ที่เป็นสาเหตุหลักมักจะเกี่ยวข้องกับฮอร์โมน เช่น ฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกายที่มากเกินไป อายุที่เริ่มมีรอบเดือนเร็ว (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 12 ปี) วัยหมดประจำเดือนช้า (มากกว่า 45 ปี) และการใช้ยาคุมกำเนิด (Dumitrescu and Cotarla, 2005; Osuch *et al.*, 2010; Hsieh *et al.*, 2006; Heimdal *et al.*, 2002) ผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคมะเร็งเต้านมเนื่องจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของฮอร์โมนตัวนี้สามารถสร้างอนุมูลอิสระซึ่งสามารถทำลายสารพันธุกรรม (DNA) ได้ (Liehr, 2000) การทำลายสารพันธุกรรมส่งผลให้การผ่าเหล่าเกิดขึ้น ถ้าการผ่าเหล่านี้นั้นเกิดขึ้นในบริเวณของยีนที่ควบคุมวัฏจักรและการตายของเซลล์ เซลล์จะมีการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติไป นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะ oxidative stress มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็ง ซึ่งสาร nitric oxide ที่ผลิตจากกระบวนการอักเสบเรื้อรังเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่มีผลให้เกิดภาวะ oxidative stress

ในปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งเต้านมใช้การฉายรังสีและเคมีบำบัดซึ่งผู้ป่วยมักได้รับผลข้างเคียงจากการรักษา อาจมีความรุนแรงเล็กน้อยคือคลื่นไส้ อาเจียน ไปจนถึงมีความรุนแรงมากคือเกิดภาวะโลหิตจาง (CancerHelp UK, 2011) นอกจากนี้ก่อนเนื้อมะเร็งมักติดต่อยาที่ใช้ในการรักษาและมีผลต่ออัตราการรอดตายน้อย (Raguz and Yague, 2008) จึงได้มีความพยายามที่จะหาสารที่สกัดจากพืชมาเป็นอีกช่องทางหนึ่งในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง ยาต้านมะเร็งส่วนใหญ่พัฒนามาจากสารประกอบจากธรรมชาติ การศึกษาทางระบาดวิทยาแสดงให้เห็นว่าสารประกอบจากธรรมชาติจากผักและผลไม้บางชนิดสามารถเพิ่มอัตราการเกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งได้ (Hirano *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1996; Chiao *et al.*, 1995) โดยยาที่ใช้ในการต้านมะเร็งซึ่งพัฒนามาจากสารธรรมชาติ เช่น etoposide, paclitaxal และ vinblastine เป็นต้น

Piper nigrum L. (พริกไทย) เป็นสมุนไพรตัวหนึ่งที่อยู่ในวงศ์ *Piperaceae* ที่นำมาใช้ในการแพทย์เป็นระยะเวลาไม่น้อยกว่า 2000 ปีก่อน คริสตศักราช ระบุว่าพริกไทยเป็นพืชที่สามารถนำมารักษาโรคได้หลายชนิด เช่น โรคท้องร่วง ปวดหู ผลเรื้อรัง โรคหัวใจ ไล่เลื้อน เสียงแหบ อาหารไม่ย่อย แผลงักต้อย นอนไม่หลับ ปวดข้อ โรคตับ โรคปอด ผิในปาก แดกผา ผื่นผุ และปวดฟัน (Srinivasan, 2009) จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่าพริกไทยมีคุณสมบัติหลายอย่าง ได้แก่ เพิ่มการหลั่งของน้ำลาย กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ amylase เอนไซม์ในตับอ่อนและลำไส้เล็ก อีกทั้งเพิ่มการหลั่งของน้ำดีและช่วยในการดูดซึมอาหารให้ดีขึ้น (Glatzel, 1968; Platel and Srinivasan, 2000; Platel and Srinivasan, 2004) นอกจากนี้ยังเป็นสาร antioxidant สามารถยับยั้งการเกิด oxidative stress เช่น ยับยั้ง superoxide และ hydroxyl radicals อีกทั้งยังยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (Khajuria *et al.*, 1998; Mittal and Gupta, 2000;