รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

สารกลายพันธุ์ในสะตอ, ลูกเหรียง และลูกเนียง
(Mutagens in *Parkia speciosa*, *Parkia timoriana* and *Archidendron Jiringa*)

โดย

ประภาส นพประดิษฐ์

จันทิภา ปุรินทราภิบาล

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุน
จาก
เงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปี 2535

สมอ
QK495.S
63
ป46
2536

1293
#88634

บทคัดย่อ

อาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งที่อาจเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็ง สถิติของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารมีอัตราเฉลี่ยสูงในภาคใต้ การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในพืชพื้นเมืองที่นิยมบริโภค 3 ชนิด คือ สะตอ *(Parkia speciosa)*, ลูกเหรียง *(Parkia timoriana)* และลูกเนียง *(Archidendron jiringa)* โดยการวัดฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Salmonell typhimurium* (Salmonella mutation assay, pre-incubation technic) ที่ถูกกระตุ้นโดยสารทดสอบ พบว่า สารสกัดด้วยน้ำของสะตอและลูกเนียงมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์อย่างอ่อนทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ TA100 กลายพันธุ์ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีการเร่งปฏิกิริยาชีวเคมี สารสกัดของลูกเหรียงมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์อย่างชัดเจน ทำให้แบคทีเรียทั้งสายพันธุ์ TA98 และ TA100 กลายพันธุ์ในสภาวะที่ไม่มีการเร่งปฏิกิริยาชีวเคมี และทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ TA100 กลายพันธุ์ในสภาวะที่มีการเร่งปฏิกิริยาชีวเคมี

สะตอ - วิจัย
ลูกเหรียง - วิจัย
ลูกเนียง - วิจัย

สมอ.
เลขหมู่ QK495.S63 ว146 2536
เลขทะเบียน 018267
2/6 ก.ค. 2536

คำนำ

มะเร็งเป็นโรคร้ายที่ปัจจุบันยังไม่มีการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการศึกษาสาเหตุของการเกิดมะเร็งพบว่า ส่วนหนึ่งเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารก่อมะเร็ง เช่น aflatoxins พบว่ามีปนเปื้อนในกระเทียม, พริกแห้ง และถั่วลิสง สารประกอบไนเตรทและไนไตรท์ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของสารประกอบ N-nitroso compounds ที่เป็นสารก่อมะเร็งที่รุนแรงชนิดหนึ่ง มีพบปนเปื้อนในปลาหมัก, กุ้งแห้ง และกะปิ และการบริโภคอาหารบางชนิดที่มีสารก่อมะเร็งเป็นองค์ประกอบโดยธรรมชาติ เช่น พบว่ามี hydrazine ในเห็ดบางชนิด (false moral), safrole ในพริกไทย, gossypol ในน้ำมันเมล็ดฝ้าย, quercetin และ tannins ในพืชหลายชนิด

จากสถิติการพบผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารมีอัตราเฉลี่ยสูงในบริเวณภาคใต้ของประเทศเมื่อเปรียบเทียบกับมะเร็งชนิดอื่น ๆ จึงเป็นไปได้ว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างอาหารพื้นเมืองบางชนิดของภาคใต้กับอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง ดังนั้นคณะผู้วิจัยเห็นว่าการตรวจหาสารกลายพันธุ์ในสะตอ, ลูกเหรียง และลูกเนียง ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองที่นิยมบริโภคกันมากจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เพื่อจะได้ข้อมูลเกี่ยวกับสารเป็นพิษในสิ่งแวดล้อมที่มีอยู่ในอาหารที่คนไทยบริโภค ซึ่งเป็นประโยชน์และสมควรจะเผยแพร่เพื่อให้ประชาชนได้คำนึงถึงอันตรายที่อาจเกิดขึ้น และจะได้หาทางหลีกเลี่ยงและป้องกันอย่างถูกต้องและเหมาะสม ทั้งจะได้ข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปศึกษาถึงอิทธิพลของสารกลายพันธุ์ในอาหารที่บริโภคกับการเป็นมะเร็งที่อวัยวะต่าง ๆ

สมอ
QK495.S
63
ป46
2536

วิธีดำเนินการวิจัย

1. *อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี*

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่

Minimal glucose agar ประกอบด้วย 2% glucose, 10% Vogel-Bonner medium และ 1.5% agar

2.5% Oxoid #2 nutrient broth

Vogel-Bonner medium ประกอบด้วย 0.2% $MgSO_4.H_2O$, 2% Citric acid, 10% K_2HPO_4, 3.5% $NaNH_4Hpo_4.H_2O$

Top agar ประกอบด้วย 0.5mM Biotin-Histidine.HCl และ soft agar (0.5% NaCl, 0.6% agar) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 11

1.2 สารละลายสำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ TA98 และ TA100

0.1M Histidine.HCl

1mM Biotin

0.1% Ampicilin

0.1% Crystal violet

1.3 สารละลายสำหรับกระตุ้นและเตรียมเอนไซม์จากตับหนู

2% Sodium phenobarbital

1% 5,6-benzoflavone

0.15M KCl

1.4 สารละลายสำหรับศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

0.2M Phosphate buffer pH 7.4

0.4M $MgCl_2$-1.65M KCl

1M Glucose-6-phosphate

0.1M NADPH , 0.1M NADH

0.5mg% 2-aminoanthracene(2AA), 0.1mg% Furylfuramide(AF-2)

2. *การเก็บตัวอย่างและการสกัดสารที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์*

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ สะตอ, ลูกเหรียงและลูกเนียง เก็บตัวอย่างโดยการซื้อจากตลาดสด อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ตัวอย่างที่ได้ถูกนำไปล้างให้สะอาดและอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วบดให้ละเอียด นำผงตัวอย่าง 25 กรัม ไปเติมน้ำ 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำกรองที่ได้ไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสชั้นบนไปทำให้แห้ง ชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ละลายผงสกัดตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อนทำการทดลอง

3. *การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์*

ใช้วิธีดัดแปลงจากวิธีของ Ames และคณะ และ Matsushima และคณะ ดังนี้

สารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ overnight culture ของแบคทีเรียสายพันธุ์ TA98 หรือ TA100 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายผสม S9 0.5 มิลลิลิตร เขย่าและอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นจึงเติม top agar 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วเทลงบน minimal glucose agar นำไปบ่มที่ตู้อบ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนโคโลนีของ *Salmonella typhimurium* ที่กลายพันธุ์

การศึกษาในสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นเมตะบอลิสึมโดยระบบเอนไซม์จะเติม phosphate buffer pH 7.4 แทนสารละลายผสม S9

4. *การแปลผลฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์* ดูจาก dose response curve

5. *ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย* ดูได้จากการตอบสนองต่อ 2AA และ AF-2

6. *การชักนำให้หนูผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการกระตุ้นเมตะบอลิสึม*

เตรียมโดยวิธีของ Matsushima และคณะ ดังนี้

ใช้หนูขาวเพศผู้น้ำหนักประมาณ 180-200 กรัมและกระตุ้นโดยการฉีด phenobarbital sodium ความเข้มข้น 30mg/kg ของน้ำหนักหนูโดยการฉีดเข้าช่องท้องในเช้าวันที่หนึ่ง ในเช้าวันที่สอง สามและสี่ ฉีด phenobarbital sodium เข้มข้น 60 mg/kg ของน้ำหนักหนูและบ่ายวันที่สาม ฉีด 5,6-benzoflavone ความเข้มข้น 80 mn/kg ของน้ำหนักหนู ในเวลากลางคืนของวันที่สี่ งดอาหารหนู 12 ชั่วโมงก่อนฆ่าหนูในวันที่ห้า หนูที่ถูกกระตุ้นจะได้รับน้ำและอาหารตามปกติ

7. *การเตรียม S9 fraction*

เตรียมโดยวิธีของ McCann และคณะ ดังนี้

ในวันที่ห้าของการกระตุ้นฆ่าหนูโดยวิธีดึงคอและแยกเอาตับออกมา ชั่งน้ำหนักตับที่ได้ล้างให้สะอาดด้วย 0.15M KCl ที่เย็น ใส่ตับหนูลงในบีคเกอร์ที่มี 0.15M KCl ประมาณ 3 เท่าโดยปริมาตรตัดตับเป็นชิ้นเล็ก ๆ บดให้ละเอียดด้วย polytron homogenizer นำไปปั่นที่ 9000xg นาน 10 นาที เก็บสารละลายชั้นบนแบ่งใส่ในหลอดพลาสติกเล็ก ๆ เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ผลการทดลอง

1. *การเตรียมสารสกัดสะตอ ลูกเนียงและลูกเหรียง*

สามารถเตรียมสารสกัดสะตอ ลูกเนียงและลูกเหรียงได้ในปริมาณเฉลี่ย Ø.23,Ø.14.และ Ø.21 มิลลิกรัม จากตัวอย่าง 1 กรัมตามลำดับ

2. *ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดสะตอ*

สารสกัดสะตอไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีการกระตุ้นเมตะบอลิสม (ตารางที่ 1) แต่กลับมีฤทธิ์อย่างอ่อนทำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน TA100 เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 16 มิลลิกรัม และพบว่าสารสกัดสะตอที่ความเข้มข้น 32 มิลลิกรัมมีฤทธิ์เป็นพิษอย่างอ่อนต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบ

3. *ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดลูกเนียง*

สารสกัดลูกเนียงมีฤทธิ์ทำให้ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA100 กลายพันธุ์ในสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นเมตะบอลิสม และการกลายพันธุ์จะเด่นชัดขึ้นเมื่อศึกษาในสภาวะที่มีการกระตุ้นโดยระบบเอนไซม์ (ตารางที่ 2) สารสกัดลูกเนียงที่ความเข้มข้น 3Ø มิลลิกรัมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบ

4. *ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดลูกเหรียง*

จากตารางที่ 3 พบว่า สารสกัดลูกเหรียงที่ความเข้มข้น 2Ø มิลลิกรัมมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์อย่างชัดเจนต่อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA100 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีการกระตุ้นโดยระบบเอนไซม์ การตอบสนองของเชื้อเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบ (รูปที่ 1) และพบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์อย่างอ่อนต่อเชื้อสายพันธุ์ TA98 โดยไม่มีการกระตุ้นเมตะบอลิสม อย่างไรก็ตามพบว่า สารสกัดลูกเหรียงมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเชื้อแบคทีเรียเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 3Ø มิลลิกรัม

ตารางที่ 1 ผลของสารสกัดสะตอต่อการกลายพันธุ์ของ *Salmonella typhimurium*

Amount (mg/plate)	Revertant colonies (His^+)/plate			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0	33±2.6	43±4.8	136±18.4	141±10.7
1	30±3.7	37±6.8	134±11.8	131±12.0
2	34±4.9	41±9.1	127±13.6	134±8.5
4	35±4.6	48±17.6	152±30.5	172±11.5
16	53±13.5	64±10.3	220±35.2	228±51.5
32	54±3.4	39±5.7[t]	242±18.9	239±7.8
AF-2(0.1ug)	669±9.4	-	-	-
AF-2(0.02ug)	-	-	811±63.4	-
2AA(0.5ug)	-	936±82.0	-	946±70.0

ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง 2 การทดลอง โดยไม่หักลบ SR (Spontaneous revertants)

t : toxic effect

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดลูกเนียงต่อการกลายพันธุ์ของ *Salmonella typhimurium*

Amount (mg/plate)	Revertant colonies (His^+)/plate			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0	46±2.8	48±4.9	140±13.6	136±3.7
1	40±5.8	48±8.0	134±9.9	138±9.5
2	53±9.1	61±7.9	159±16.3	158±12.9
4	56±8.8	70±23.0	188±42.7	201±15.7
20	58±14.5	41±11.2	258±17.0	288±18.1
30	t	t	t	t
AF-2(0.1ug)	615±62.1	-	-	-
AF-2(0.02ug)	-	-	984±40.8	-
2AA(0.5ug)	-	784±70.0	-	802±70.0

ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง 2 การทดลอง โดยไม่หักลบ SR (Spontaneous revertants)

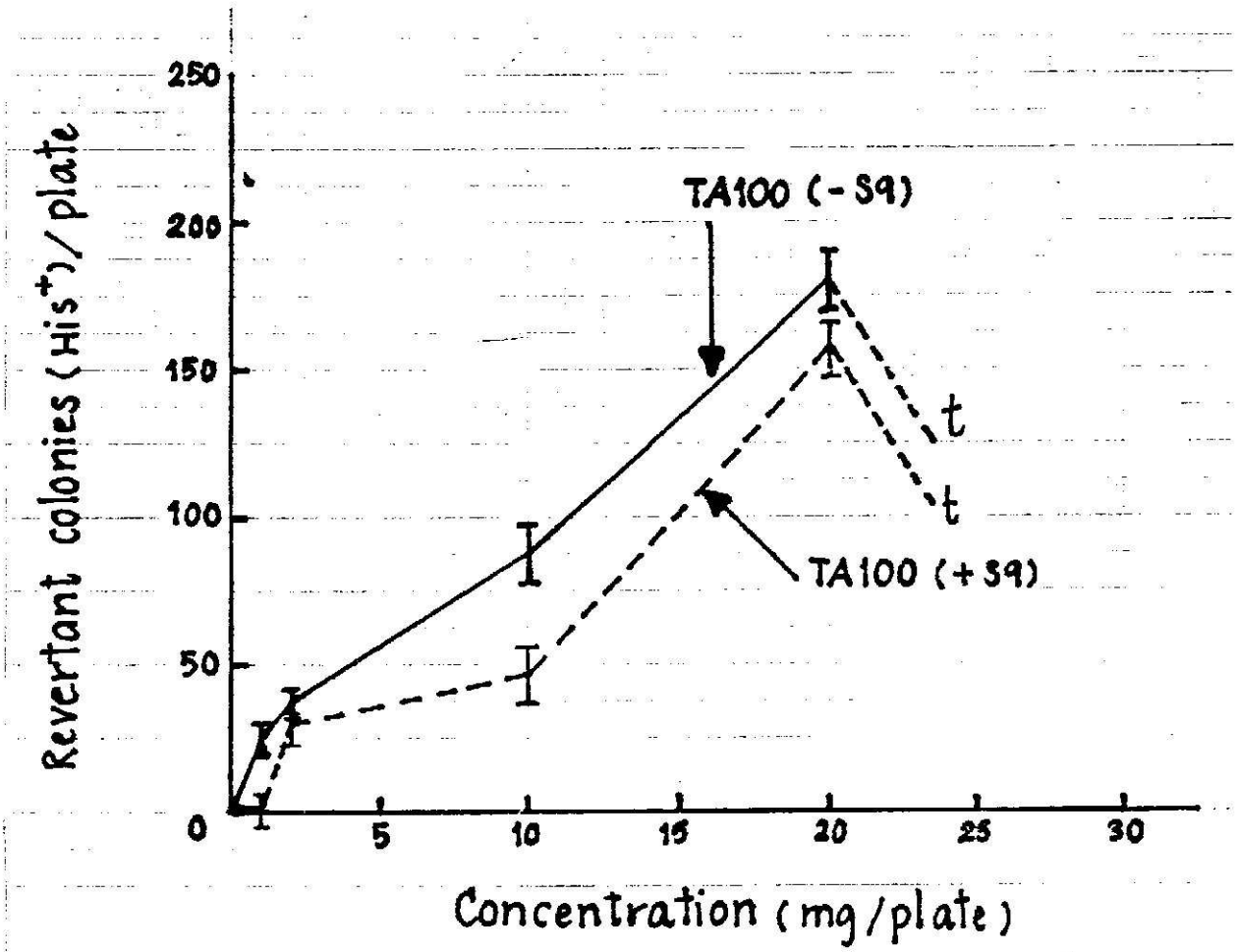
t : toxic effect

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดลูกเหรียงต่อการกลายพันธุ์ของ *Salmonella typhimurium*

Amount (mg/plate)	Revertant colonies (His^+)/plate			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0	32±1.5	43±3.6	119±10.4	132±7.4
1	37±7.5	41±8.0	142±12.1	129±11.0
2	37±6.2	42±11.2	155±8.8	163±16.0
10	46±8.2	48±7.9	207±22.8	178±23.1
20	63±8.2	55±9.4	298±19.0	290±18.8
30	t	t	t	t
AF-2(0.1ug)	676±67.7	-	-	-
AF-2(0.02ug)	-	-	860±105.4	-
2AA(0.5ug)	-	881±29.0	-	807±9.0

ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง 2 การทดลอง โดยไม่หักลบ SR (Spontaneous revertants)

t : toxic effect



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของ *S. typhimuruim* สายพันธุ์ TA100 กับสารสกัดลูกเหรียงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

t : toxic effect

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สารสกัดสะตอและลูกเนียงที่ความเข้มข้น 16-32 และ 20 มิลลิกรัม ตามลำดับ มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์อย่างอ่อนเมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA100 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีการเติมเอนไซม์ใน S9 fraction จากตับหนูที่ถูกชักนำโดย 5,6-benzoflavone และ Phenobarbital sodium ส่วนสารสกัดลูกเหรียงมีฤทธิ์กระตุ้นการกลายพันธุ์ของ TA100 อย่างชัดเจนที่ความเข้มข้นประมาณ 10-20 มิลลิกรัม และมีฤทธิ์ต่อการกลายพันธุ์ของ TA98 ในสภาวะที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโดยระบบเอนไซม์เช่นกัน เมื่อถูกกระตุ้นโดยสารสกัดลูกเหรียงที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม

ดังนั้นฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ที่พบในสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) ทั้ง 3 ชนิดนี้ จึงเป็นผลจากสารก่อกลายพันธุ์โดยตรง (direct mutagen) และโดยอ้อม (indirect mutagen) ที่ปรากฏอยู่ในสารสกัด ซึ่งส่วนใหญ่แล้วมีฤทธิ์ทำให้ *S. typhimurium* กลายพันธุ์โดยก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ดีเอ็นเอแบบ base-pair substitution

เนื่องจากสารสกัดทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์เป็นพิษต่อแบคทีเรียเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นประมาณ 30 มิลลิกรัมหรือมากกว่า ทำให้ไม่สามารถศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารตัวอย่างเหล่านี้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างเด่นชัดเป็นไปตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นหรือไม่ ดังนั้นจึงควรทำการสกัดเอาสารที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียออกไป ก่อนที่จะทดสอบหาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสะตอ ลูกเนียงและลูกเหรียงในแบคทีเรียหรือสัตว์ทดลองต่อไป

หนังสืออ้างอิง

Ames, B.N., McCann, J., and Yamasaki, E.(1975) "Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test" Mutat. Res., 31 : 347 - 364

Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., and Sawamura, M. (1980) "Factors modulation mutagenicity in microbial tests" In Norporth, K.H., and Garner, R.C. (eds.), Short-term test systems for detecting carcinogens, 273 - 285, Springer-Verlag, Berlin