รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดขมิ้นอ้อยและพลู

(Study of Antimutagenicity from *Curcuma zedoaria* and *Piper betal*)

โดย

จันทิมา บุรินทราชัยกุล

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุน

จาก

เงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปี 2534

สมอ
QK99.5
จ63
2535
จ.1

M039-399

#93485

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

พืชสมุนไพรหลายชนิดใช้ปรุงเป็นยารักษาโรคมะเร็ง การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ในพืชสมุนไพร 2 ชนิด คือ ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*) และพลู (*Piper betel*) โดยวิธีการวัดฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* (Salmonella mutation assay, pre-incubation technic) ที่ถูกกระตุ้นการกลายพันธุ์โดยสารก่อมะเร็งมาตรฐาน พบว่า ขมิ้นอ้อยและพลูไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีการเร่งปฏิกิริยาชีวเคมี ขมิ้นอ้อยมีฤทธิ์ปานกลางในการด้านการก่อกลายพันธุ์ของเชื้อทดสอบที่ถูกชักนำการกลายพันธุ์ด้วย 2AA และไม่พบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ในพลู

ขมิ้นอ้อย - วิจัย
พลู - วิจัย

สมอ
เลขหมู่ QV99:5 จ63 ส2367 ค. 1
เลขทะเบียน 017013
27 มี.ค. 2535

คำนำ

เนื่องจากโรคมะเร็งเป็นโรคที่เกิดขึ้นได้ง่าย เปอร์เซ็นต์ของอัตราการตายค่อนข้างสูงและมีรายงานทางการแพทย์พบว่าสถิติการพบผู้ป่วยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคอื่น ๆ นักวิจัยหลายกลุ่มมีความพยายามที่จะค้นหาตัวยารักษาโรคมะเร็งซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่หาได้ง่าย ราคาถูกและมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์สูงมาใช้ในการรักษาควบคู่ไปกับการรักษาด้วยวิธีอื่น และเนื่องจากการรักษาโรคมะเร็งของคนไทยสมัยก่อนเป็นการนำสมุนไพรบางชนิดมาต้ม กิน พอกหรือทา ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่าขมิ้นอ้อยและพลูซึ่งเป็นสมุนไพรที่ใช้ปรุงเป็นยารักษาโรคมะเร็ง น่าจะมีคุณค่าในการศึกษาฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปประกอบการศึกษาและสกัดสารออกฤทธิ์จากสมุนไพรนั้น ๆ ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ทางการแพทย์ต่อไปในอนาคต

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 สารละลายสำหรับศึกษาฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์

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. *การเก็บตัวอย่างและการสกัดสารที่มีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์*

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ขมิ้นอ้อยและพลู เก็บตัวอย่างโดยการซื้อขมิ้นอ้อยจากร้านขายยาสมุนไพรในตลาดน้อยนนทบุรี จ.นนทบุรี และปากคลองตลาด กรุงเทพมหานคร ซื้อพลูจากตลาดสด อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ตัวอย่างที่ได้ถูกนำไปล้างให้สะอาดและบดละเอียดแล้วนำไปต้มให้เดือดในน้ำกลั่น(อัตราส่วนตัวอย่างต่อน้ำกลั่นเท่ากับหนึ่งต่อสิบ) นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำกรองที่ได้ไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำน้ำใสที่ได้ไปทำให้แห้ง เมื่อต้องการทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ ละลายผงสกัดตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ

3. *การทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์*

ใช้วิธีดัดแปลงจากวิธีของ Ames และคณะ และ Matsushima และคณะ ดังนี้

สารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ TA98 หรือ TA100 0.1 มิลลิลิตร สารละลายผสม S9 0.5 มิลลิลิตร สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 2AA(0.5ug) เขย่าและอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศา นาน 20 นาที จากนั้นจึงเติม top agar 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วเทลงบน minimal glucose agar นำไปเก็บที่ตู้อบ 37 องศา เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนโคโลนีของ *Salmonella typhimurium* ที่เกิดขึ้น

กรณีศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จะไม่เติมสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานและการศึกษาในสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นเมตะบอลิสมโดยระบบเอนไซม์จะเติม phosphate buffer pH 7.4 แทนสารละลายผสม S9

4. *การแปลผลฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์* ดูจาก dose response curve

5. *การก่อกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย*

ดูได้จากการตอบสนองต่อสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ 2AA, NaN_3 และ AF-2

6. *การชักนำให้หนูผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการกระตุ้นเมตะบอลิสม*

เตรียมโดยวิธีของ Matsushima และคณะ ดังนี้

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

7. *การเตรียม S9 fraction*

เตรียมโดยวิธีของ McCann และคณะ ดังนี้

ในวันที่ห้าของการกระตุ้นฆ่าหนูโดยวิธีผิงคอและแยกเอาตับออกมา ชั่งน้ำหนักตับที่ได้ล้างให้สะอาดด้วย 0.15M KCl ที่เย็น ใส่ตับหนูลงในบีกเกอร์ที่มี 0.15M KCl ประมาณ 3 เท่าโดยปริมาตรตัดตับเป็นชิ้นเล็ก ๆ บดให้สะเอียดด้วย polytron homogenizer นำไปปั่นที่ 9000g เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายชั้นบนแบ่งใส่ในหลอดพลาสติกเล็ก ๆ เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศา

ผลการทดลอง

1. *การเตรียมสารสกัดขมิ้นอ้อยและพลู*

สามารถเตรียมสารสกัดขมิ้นอ้อยและพลูได้ในปริมาณเฉลี่ย 43.5 และ 61 มิลลิกรัม จากตัวอย่าง 1 กรัมตามลำดับ

2. *ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดขมิ้นอ้อยและพลู*

สารสกัดขมิ้นอ้อยและพลูไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีการกระตุ้นเมตะบอลิสม (ตารางที่ 1 และ 2) สารสกัดขมิ้นอ้อยที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมและสารสกัดพลูที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมกลับมีฤทธิ์เป็นพิษอย่างอ่อนและรุนแรงต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบตามลำดับ

3. *ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดขมิ้นอ้อยและพลู*

สารสกัดขมิ้นอ้อยมีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของ *S. typhimurium* ทั้ง TA98 และ TA100 ในสภาวะที่มีการกระตุ้นเมตะบอลิสมและถูกชักนำโดยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 2AA (รูปที่ 1 และ 2) ประสิทธิภาพในการยับยั้งเห็นได้ชัดเจนเมื่อใช้สารสกัดขมิ้นอ้อย 5 มิลลิกรัมขึ้นไป และมีฤทธิ์การยับยั้งมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 10 มิลลิกรัม อย่างไรก็ตามยังพบความเป็นพิษของสารสกัดขมิ้นอ้อยที่มีต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบบางเล็กน้อย เมื่อใช้สารสกัด 10 มิลลิกรัม ส่วนการศึกษาที่สภาวะไม่มีการกระตุ้นโดยระบบเอ็นไซม์กับ TA98 และ TA100 ที่ถูกชักนำด้วย AF-2 และ NaN_3 ตามลำดับพบว่าสารสกัดขมิ้นอ้อยไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ (ตารางที่ 3)

สารสกัดพลูไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของ TA98 และ TA100 ทั้งที่มีและไม่มีการกระตุ้นเมตะบอลิสมเมื่อใช้สารก่อมะเร็ง 2AA, AF-2 และ NaN_3 เป็นตัวชักนำการก่อกลายพันธุ์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ผลของสารสกัดมิ้นอ้อยต่อการกลายพันธุ์ของ **S. typhimurium**

mg/plate		TA98		TA100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
CZ1	10.0	43±3	49±2	110±8	162±16
	5.0	42±4	44±2	123±5	194±9
	1.0	43±3	48±2	193±8	249±6
	0.5	39±4	50±2	181±6	194±6
CZ2	10.0	37±1[t]	30±3[t]	104±16[t]	151±5[t]
	5.0	54±6	44±1	125±6[t]	201±12
	1.0	61±2	35±2	223±7	183±14
	0.5	47±0	51±4	199±19	187±1
	0.1	46±7	47±2	205±17	183±8
	SR	47±2	47±5	182±13	200±10
AF-2	0.1 (µg)	850±46	-	-	-
	0.02 (µg)	-	-	1092±48	-
NaN_3	1.4 (µg)	-	-	729±4	-
2AA	0.5 (µg)	-	920±21	-	1214±52

ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งโดยไม่หักลบ SR (Spontaneous revertants)

AF-2 : 3-furylfuramide

NaN_3 : Sodium azide

2AA : 2-aminoanthracene

t : toxic effect

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดพลูต่อการกลายพันธุ์ของ S. typhimurium

mg/plate		TA98		TA100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
PB1	6.0	27±3[t]	39±6[t]	97±15[t]	153±7[t]
	3.0	54±4	37±5	250±10	151±9
	1.0	46±3	41±2	208±18	159±9
	0.5	44±2	41±3	187±9	156±4
	SR	40±3	39±4	183±17	145±4
PB2	6.0	t	t	t	t
	4.0	t	44±1	t	181±7
	1.0	45±2	42±6	204±5	183±7
	0.5	41±3	39±3	187±14	169±12
	SR	38±2	46±1	179±6	182±5
AF-2	0.1 (µg)	776±21	-	-	-
	0.02 (µg)	-	-	1022±45	-
NaN_3	1.4 (µg)	-	-	729±4	-
2AA	0.5 (µg)	-	742±28	-	876±44

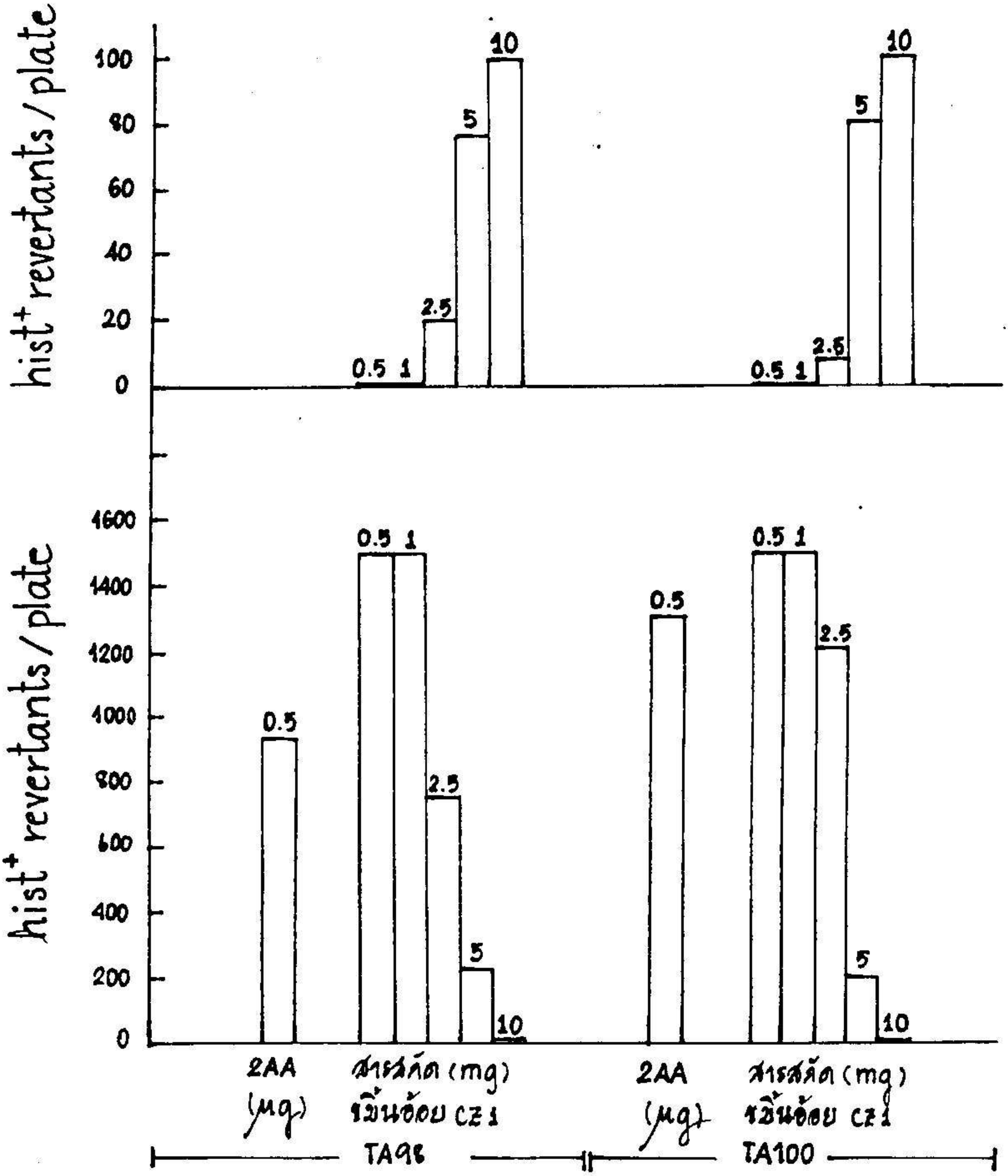
ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งโดยไม่หักลบ SR (Spontaneous revertants)

AF-2 : 3-furylfuramide

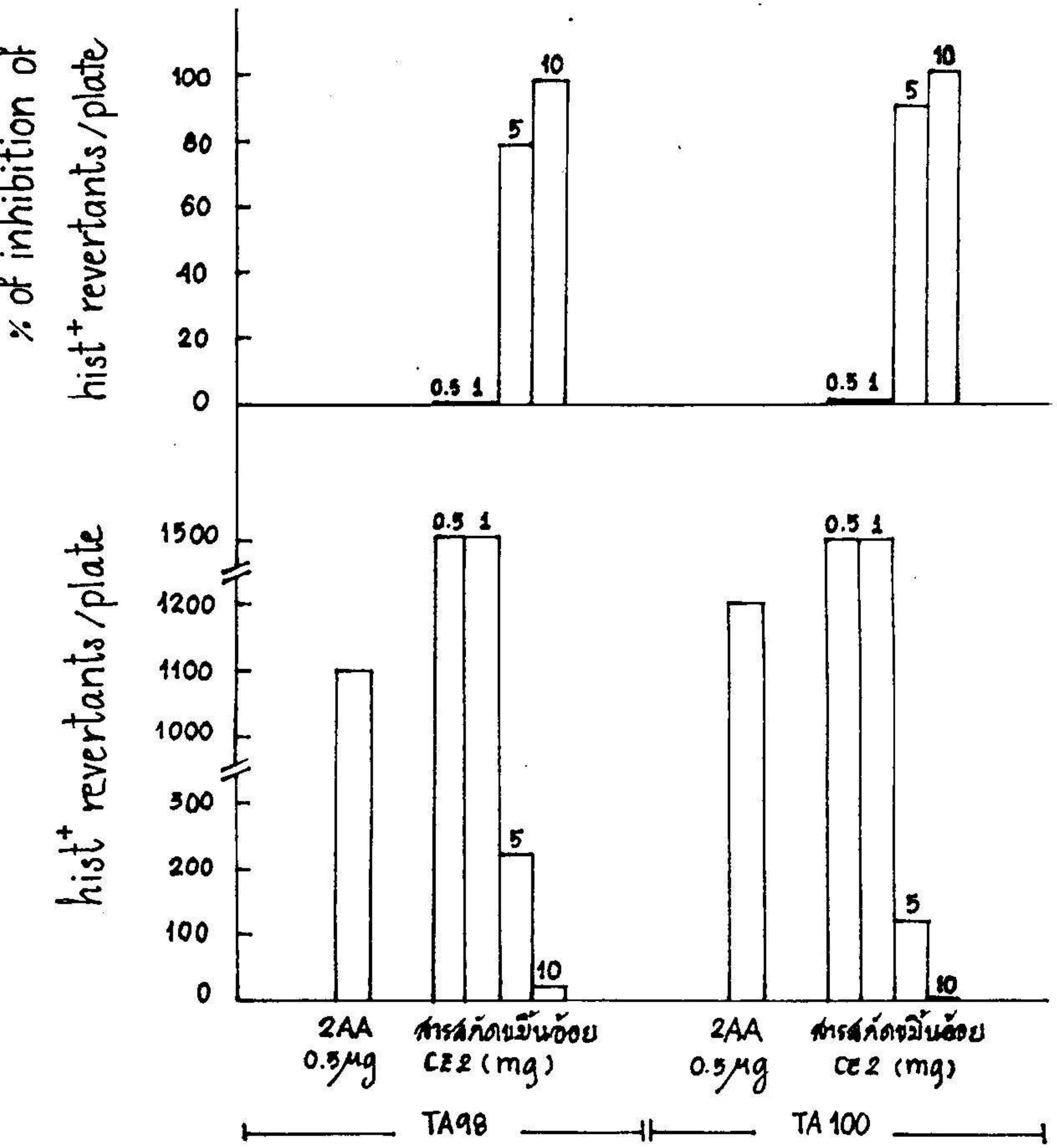
NaN_3 : Sodium azide

2AA : 2-aminoanthracene

t : toxic effect



รูปที่ 1 ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดเมล็ดข้าวต่อ TA98 และ TA100 ที่ถูกชักนำด้วย 2AA ฤทธิ์การยับยั้งคำนวณเทียบกับการกลายพันธุ์ที่ชักนำโดย 2AA คิดเป็น 100% ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบ spontaneous revertants (SR)



รูปที่ 2 ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดขมิ้นอ้อย CZ2 ต่อ TA98 และ TA100 ที่ถูกชักนำด้วย 2AA ฤทธิ์การยับยั้งคำนวณเทียบกับการกลายพันธุ์ที่ชักนำโดย 2AA คิดเป็น 100% ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและหักลบ spontaneous revertants

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดมันอ้อยและพลูก่อ TA98 และ TA100 ที่ถูกชักนำด้วย AF-2 และ NaN_3

mg/plate		TA98	TA100
	SR	38±2	46±1
AF-2	0.0001	776±21	-
NaN_3	0.0014	-	751±16
CZ1	1.0	740±35	-
	2.5	721±24	770±10
	5.0	769±24	733±25
	10.0	528±36[t]	735±7
CZ2	0.5	729±33	692±35
	1.0	743±21	712±26
	5.0	747±25	649±25[t]
	10.0	647±15[t]	600±20[t]
PB1	0.5	718±33	691±42
	1.0	726±23	752±24
	4.0	715±9	735±37[t]
PB2	0.5	740±28	765±14
	1.0	758±16	729±17
	4.0	t	t

ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งโดยไม่นับลบ SR

t : toxic effect

AF-2 : 3-furylfuramide

NaN_3 : sodium azide

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สารสกัดชั้นอ่อยและพลูที่ความเข้มข้นต่าง ๆไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีการเปลี่ยนแปลงโดยระบบเอนไซม์ ซึ่งเป็นการยืนยันผลการทดลองในลักษณะเดียวกันนี้ของ Nagabhushan, M.,*et.al.* ที่พบว่าสารสกัดจากพลูไม่มีผลก่อกลายพันธุ์ใน *S. typhimurium*

สารสกัดพลูไม่มีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ เมื่อทดสอบกับ TA98 และ TA100 ที่ถูกกระตุ้นการกลายพันธุ์โดยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน AF-2, NaN_3 และ 2AAโดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดพลูสูงถึง 4 มิลลิกรัม

อย่างไรก็ตามมีรายงานของ Nagabhushan,M.,*et.al.* พบว่าสารสกัดพลูมีฤทธิ์ยับยั้งการกลายพันธุ์ของ *S. typhimurium* ต่อสารก่อกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็งบางชนิดเช่น benzo(a)pyrene และ DMBA

เฉพาะสารสกัดชั้นอ่อยเท่านั้นที่มีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ที่ถูกชักนำด้วย 2AA ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีผลก่อกลายพันธุ์โดยตรงต่อเชื้อทดสอบ แต่จะออกฤทธิ์เป็นสารก่อกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็งเมื่อถูกเปลี่ยนแปลงโดยระบบเอ็นไซม์ในไมโครโซม (microsome) เสียก่อน

ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดชั้นอ่อยไปมีบทบาทในระยะการเปลี่ยนแปลงของสารก่อกลายพันธุ์โดยระบบเอนไซม์ไปอยู่ในรูปที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ การที่จะสรุปได้อย่างแน่นอนนั้นยังต้องมีการทดลองเพิ่มเติมกับสารก่อกลายพันธุ์อื่น ๆที่มีลักษณะของกลายก่อกลายพันธุ์โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงด้วยระบบเอ็นไซม์เช่นกัน แล้วจึงจะมีการแยกหาสารประกอบที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์เพื่อนำไปศึกษาในสัตว์ทดลองต่อไป

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

Nagabhusham, M., Amonkar, A.J., D'Souza, A.V., and Bhide, S.V. (1987) "Non mutagenicity of betel leaf and its antimutagenic action against environmental mutagens" Neoplasma, 34(2) : 159 - 167