ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่ดื้อยา Adriamycin จากสารสกัดเอทานอลของสาหร่ายสกุล *Sargassum*

Antiproliferative activity of ethanolic extract from *Sargassum* spp. against adriamycin-resistant human small cell lung carcinoma cell line

ศิริกุล โตขำ [1] สมจิตต์ ปาละกาศ [2] กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ [3] และจันทนา ไพรบูรณ์ [1,*]

Sirikul Tokham [1], Somchit Palakas [2], Krongchan Ratanaphadit [3] and Jantana Praiboon [1,*]

[1] Department of Fishery Biology, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, 10900, Thailand

[2] Department of Applied Radiation and Isotopes, Faculty of Sciences, Kasetsart University, Bangkok, 10900, Thailand

[3] Department of Biotechnology, Faculty of Sciences, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

* Corresponding author, e-mail: ffisjtn@ku.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดเอทานอลจากสาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Sargassum* จำนวน 4 ชนิดที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *Sargassum crassifolium*, *S. polycystum*, *S. stolonifolium* (กระบี่) และ *S. stolonifolium* (พังงา) ผลจากการศึกษาพบว่า สาหร่าย *S. stolonifolium* (พังงา) มีปริมาณสารสกัดสูงสุดร้อยละ 6.19 ± 0.13 ของน้ำหนักแห้ง และเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณสารโพลีฟีนอล พบว่า สารสกัดเอทานอลจากสาหร่าย *S. stolonifolium* (กระบี่) มีปริมาณสูงที่สุด (114.24 mg PGE/g extract) และสารสกัดเอทานอลจากสาหร่าย *S. polycystum* มีปริมาณสารฟูโคแซนทินสูงสุด (60.59 ± 3.73 mg/g extract) และเมื่อนำสารสกัดมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ชนิดเซลล์เล็กที่ดื้อยา (GLC_4/Adr) พบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *S. stolonifolium* (กระบี่) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญได้ 50% (IC_{50}) ที่ความเข้มข้น 32.53 ± 2.04 μg/ml จากการศึกษาในครั้งนี้พบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งกับปริมาณสารโพลีฟีนอล แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งกับปริมาณสารฟูโคแซนทินอย่างชัดเจน ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากสาหร่ายสกุล *Sargassum* ที่พบในประเทศไทยมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาทางเลือกในการรักษาโรคมะเร็งต่อไป

คำค้น: ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง, สาหร่ายสีน้ำตาล, *Sargassum*

Abstract

This research was to study of an antiproliferative activity of the ethanolic extracts from 4 species of *Sargassum* found in Thailand (*Sargassum crassifolium*, *S. polycystum*, *S. stolonifolium* (Krabi) and *S. stolonifolium* (Phangnga)). The results showed the highest yield found in

S. stolonifolium (Phangnga) (6.19 ± 0.13 % dwt). Among them, the ethanolic extract from *S. stolonifolium* (Krabi) has the highest polyphenol content (114.24 mg PGE/g extract) and the ethanolic extract from *S. polycystum* has the highest fucoxanthin content (60.59 ± 3.73 mg/g extract). Moreover, the highest antiproliferative activities of against adriamycin-resistant human small cell lung carcinoma cell line (GLC_4/Adr) found in the ethanolic extract from *S. stolonifolium* (Krabi) with an IC_{50} of 32.53 ± 2.04 μg/ml. Moreover, polyphenol content showed positive correlation with antiproliferative activity. However, there are not clearly correlation between fucoxanthin content and antiproliferative activity. These results indicated the ethanolic extract from *Sargassum* spp. found in Thailand had a potential as an alternative source for cancer treatment in the future.

Keywords: anticancer, brown seaweeds, *Sargassum*

บทนำ

ขณะนี้โรคมะเร็งกำลังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่รุนแรงระดับโลก โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของมนุษย์ในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก และมีแนวโน้มการป่วยและเสียชีวิตสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Sriplung *et al*., 2003) การรักษาโรคมะเร็งส่วนใหญ่จะใช้ยาเคมีบำบัด (cancer chemotherapy) ซึ่งยาเคมีบำบัดเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะไปทำลายเซลล์มะเร็ง และทำลายเซลล์ปกติในบางส่วน โดยเฉพาะเซลล์ที่มีการเจริญเติบโต และแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ซึ่งในปัจจุบันยาเคมีบำบัดนั้นได้จากการสังเคราะห์สารทางเคมีและอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยได้ อาทิเช่น คลื่นไส้ อาเจียน การกดการสร้างเซลล์ไขกระดูกทำให้เกิดภาวะซีด ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ นอกจากนี้ยาบำบัดเคมีบางชนิดอาจส่งผลต่อหัวใจ ตับ ไต เป็นต้น (Ehrke, 2003) ด้วยสาเหตุดังกล่าว การแสวงหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และไม่มีผลข้างเคียงหรือมีผลข้างเคียงน้อยต่อผู้ใช้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อใช้ทดแทนยาเคมีบำบัด จึงมีการศึกษาหาสารพฤษเคมีที่คาดว่ามีผลค้างเคียงน้อยกว่ายาเคมีบำบัด (Zandi *et al*., 2010; Merina *et al*., 2012)

สำหรับในประเทศไทยสาหร่ายสกุล *Sargassum* เป็นสาหร่ายสีน้ำตาลที่มีขนาดใหญ่และพบแพร่กระจายมากตามบริเวณตามชายฝั่งของประเทศ และมีความหลากหลายชนิด Noiraksar and Ajisaka (2008) ได้ทำการศึกษาอนุกรมวิธานและจำแนกสาหร่าย *Sargassum* ในอ่าวไทย พบว่าสามารถจัดจำแนกสาหร่ายสกุลนี้ได้ 9 ชนิด ได้แก่ *S. baccularia*, *S. binderi*, *S. cinereum*, *S. crassifolium*, *S. cristaefolium*, *S. longifructum*, *S. oligocystum*, *S. polycystum*, *S. siliquosum*, *S. swartzii* และอีก 1 ตัวอย่างที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ สาหร่ายสกุลนี้มีสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) เช่น ฟลอโรแทนนิน (phlorotannin) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) ฟูโคแซนทิน (fucoxanthin) เป็นกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เมโรเทอร์ปีนอยด์ (meroterpenoids) ฟูคอยแดนส์ (fucoidans) สเตอรอล (sterols)

ไกลโคลิปิด (glycolipid) และโทโคฟีรอล (tocopherols) เป็นต้น (Liu *et al.,* 2012) สารประกอบเหล่านี้มีการนำมาใช้ทางด้านการแพทย์อย่างกว้างขวาง และมีคุณสมบัติในเชิงเภสัชวิทยา เช่น มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งและกระตุ้นอะโพโทซิส (Saengkhae *et al*., 2010) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านไวรัส และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Luo *et al.,* 2010; Liu *et al.,* 2012) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากสาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Sargassum* ในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อย และการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายสกุลนี้เป็นเพียงการนำมาประกอบอาหารของคนเฉพาะกลุ่มในบางท้องถิ่นของประเทศ (Lewmanomont and Ogawa, 1995) อีกทั้งสาหร่าย *Sargassum* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและปริมาณมาก เมื่อถูกคลื่นซัดทำให้ขาดหลุดและถูกกระแสน้ำพัดเกยชายหาด หากมีการนำมาใช้ประโยชน์จะเป็นการเพิ่มคุณค่าให้แก่ทรัพยากร

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Sargassum* จำนวน 4 ชนิดที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *Sargassum crassifolium*, *S. polycystum*, *S. stolonifolium* (กระบี่) และ *S. stolonifolium* (พังงา) ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ชนิดเซลล์เล็กที่ดื้อยา (GLC_4/Adr) เพื่อเป็นการนำทรัพยากรที่มีอยู่มากในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และเพื่อค้นหาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารสกัดจากสาหร่าย

สาหร่าย *Sargassum* จำนวน 4 ชนิด เก็บรวบรวม *S. crassifolium* จากบริเวณหาดทับตะวัน อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา *S. polycystum* จากบริเวณแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี *S. stolonifolium* (กระบี่) จากบริเวณเกาะลันตา อำเภอเกาะลันตา จ.กระบี่ *S. stolonifolium* (พังงา) จากบริเวณหาดปากวีป อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา ในช่วงเดือนเมษายน-พฤษภาคม 2555 โดยเก็บตัวอย่างสาหร่ายทั้งแทลลัส นำสาหร่ายมาทำความสะอาด เพื่อล้างกำจัดทราย ตะกอน เปลือกหอย และอิพิไฟต์สิ่งปลอมปนออกที่เกาะมากับสาหร่ายออกให้หมด สาหร่าย *Sargassum* จะถูกแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งนำมาวิเคราะห์พิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อจำแนกชนิดและอัดแห้งไว้เพื่อยืนยันชนิด และถูกเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (No. of specimen : ST004, ST003, ST006 และ ST005 ตามลำดับ) และส่วนที่สองนำมาใช้ในการสกัด

การเตรียมสารสกัดจากสาหร่าย *Sargassum*

นำสาหร่าย *Sargassum* ที่เตรียมไว้ โดยซับน้ำให้แห้ง แล้วนำไปตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้ได้ขนาดประมาณ 0.5 ซม. แบ่งส่วนหนึ่งนำไปหาความชื้น จากนั้นนำสาหร่ายที่ตัดไว้ไปชั่งน้ำหนัก เติมตัวทำละลาย (โดยใช้ 95% Ethanol) ในอัตราส่วน 1:10 ปิดปากภาชนะอย่างสนิท เขย่าตัวอย่างด้วยเครื่องเขย่าในสภาวะที่ไม่มีแสงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกรองเก็บสารสกัดที่ได้ผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 เก็บสารที่

กรองไว้ในขวดเก็บสาร ที่ทึบแสง จากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 °C สกัดกากซ้ำอีก 2 ครั้ง ด้วยวิธีการเดียวกัน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ทั้ง 3 ครั้ง มารวมกัน นำมาทำแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ในสภาวะทึบแสง ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วจดน้ำหนักแห้งของสารสกัดที่ได้ แล้วชะสารสกัดที่แห้งแล้วด้วย ethanol ปริมาณเล็กน้อย กรองตัวอย่างอีกครั้งด้วย PTFE syringe filter (0.45 μm) เก็บไว้ในขวดสีชา เป่าด้วยไนโตรเจน เพื่อไล่ออกซิเจนออกให้หมด แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด โดยใช้ Folin-Ciocalteu method ตามวิธีของ Athukorala *et al*. (2006) โดยใช้ Phloroglucinol เป็นสารมาตรฐาน เติม 10% Folin's reagent 750 μl ลงในสารตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 6% Na_2CO_3 750 μl บ่มใน incubator ที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm โดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu UV-1700 PharmaSpec, Japan) และคำนวณหาปริมาณโพลีฟีนอลโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยรายงานผลเป็น mg Phloroglucinol equivalent (PGE)/g dwt

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟูโคแซนทิน

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟูโคแซนทินที่สกัดได้จากสาหร่าย โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Hitachi L-7000 HPLC system (Hitachi, Tokyo, Japan)) ประกอบด้วยปั๊ม (L-7100) เครื่องฉีดตัวอย่างสารอัตโนมัติ (autosampler) รุ่น L-7200, PDA : photodiode array spectrophotometric detector รุ่น Water 2996 และโปรแกรม online analysis software (Hitachi HPLC system-5-manager; Model D-7000) สารฟูโคแซนทินในตัวอย่างถูกตรวจสอบโดยใช้ Column C-18 ยี่ห้อ Thermo ODS-2 Hypersil 250x4.6 mm โดยใช้ methanol-acetonitrile (7:3 v / v) เป็น mobile phase ที่อัตราการไหล 1.0 ml/min วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm และประเมินปริมาณสารฟูโคแซนทินโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารฟูโคแซนทินบริสุทธิ์ (purity > 98%) สารฟูโคแซนทินบริสุทธิ์สกัดมาจากสาหร่ายสีน้ำตาล Wakame (*Undaria pinnatifida*) ตามที่อธิบายไว้ใน Noviendri *et al*. (2011)

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษา

เซลล์มะเร็งที่นำมาใช้ในการศึกษา คือ เซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก (human small cell lung cancer) ชนิด GLC_4/Adr ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก Dr. M. Garrigos (DSV/DBJC/SBFM, CEA Saclay, France) โดยเป็นเซลล์มะเร็งที่ได้จากการคัดเลือก โดยการนำเซลล์ต้นแบบมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับความเข้มข้นของยาต้านมะเร็ง Adriamycin เพิ่มขึ้นตามลำดับ จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเซลล์มะเร็งชนิด GLC_4/Adr มีลักษณะที่ปรากฏที่สอดคล้องกับการแสดงออกของโปรตีนดื้อยาแบบหลายขนานชนิด MRP1 (Ziljstra *et al.,* 1987; Meijer *et al.,* 1991; Palakas *et al.,* 2009)

ในการวิจัย ได้เลี้ยงเซลล์มะเร็งที่ใช้งานในอาหาร RPMI1640 with Glutamax ที่มี 10% heat-inactivated fetal bovine serum และยาปฏิชีวนะผสมของ penicillin G (100 หน่วย/มิลลิลิตร) และ streptomycin (100 μg/ml) รวมทั้ง 1% โซเดียมไพรูเวต โดยเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37ºC ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 และความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ร้อยละ 5 ในการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง GLC_4/Adr ได้เติม doxorubicin (1.2 μM) และก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลองได้เลี้ยงในอาหารที่ไม่มี doxorubicin เป็นเวลา 11 วัน และในการศึกษาได้เตรียมเซลล์ให้อยู่ในระยะการเจริญแบบก้าวหน้าก่อนที่จะนำเซลล์มาใช้ในการทดลองต่าง ๆ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด

เซลล์มะเร็ง GLC_4/Adr ถูกเลี้ยงให้อยู่ในระยะการเจริญแบบก้าวหน้า นำไปเลี้ยงในตู้ CO_2 incubator ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37ºC ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารสกัด (0.1- 500 μg/ml) และนำกลับไปเลี้ยงต่อไป เพื่อให้เซลล์สัมผัสสารทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนจะตรวจสอบความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี AlamarBlue assay จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 570 และ 600 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader (Expert Plus Microplate Reader, Biochrome Ltd) นำค่าการดูดกลืนแสงมาวิเคราะห์สัดส่วนของเซลล์ที่รอดชีวิตตามวิธีการของ McBride *et al.* (2005)

ผลการศึกษา

ผลจากการศึกษาปริมาณสารสกัด (% yield) จากสาหร่าย *Sargassum* ทั้ง 4 ชนิด พบว่า สาหร่าย *S. stolonifolium* (พังงา) มีปริมาณสารสกัดสูงสุดร้อยละ 6.19 ± 0.13 ของน้ำหนักแห้ง รองลงมาได้แก่ *S. polycystum*, *S. stolonifolium* (กระบี่) และ *S. crassifolium* มีปริมาณสารสกัดเท่ากับ ร้อยละ 4.68 ± 0.16, 4.26 ± 0.25 และ 2.68 ± 0.03 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Figure 1) และพบว่า สาหร่าย *S. stolonifolium* (กระบี่) มีปริมาณโพลีฟีนอลสูงสุด คือ 4.87 ± 0.24 mg PGE/g dwt รองลงมาได้แก่ *S. stolonifolium* (พังงา) มีปริมาณโพลีฟีนอล เท่ากับ 4.22 ± 0.40 mg PGE/g dwt และ *S. crassifolium* มีปริมาณโพลีฟีนอลซึ่งไม่แตกต่างกันกับ *S. polycystum* (2.11 ± 0.07 และ 1.91 ± 0.13 mg PGE/g dwt) ตามลำดับ (Table 1) และพบว่า *S. polycystum* และ *S. stolonifolium* (กระบี่) มีปริมาณสารฟูโคแซนทินสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 60.59 ± 3.73 และ 55.57 ± 0.90 mg/g extract ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ *S. crassifolium* และ *S. stolonifolium* (พังงา) มีปริมาณสารฟูโคแซนทิน เท่ากับ 42.24 ± 3.33 และ 40.27 ± 2.98 mg/g extract ตามลำดับ (Table 1) ปริมาณสารฟูโคแซนทินเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งของสาหร่าย พบว่า *S. polycystum* มีปริมาณสารฟูโคแซนทินสูงสุดคือ 2.84 ± 0.17 mg/g dwt รองลงมาได้แก่ *S. stolonifolium* (พังงา) และ *S. stolonifolium* (กระบี่) มีปริมาณสารฟูโคแซนทิน คือ 2.49 ± 0.18 และ 2.37

± 0.04 mg/g dwt ตามลำดับ และ *S. crassifolium* มีปริมาณสารฟูโคแซนทินน้อยกว่าชนิดอื่น ๆ คือ 1.13 ± 0.09 mg/g dwt (Table 1)

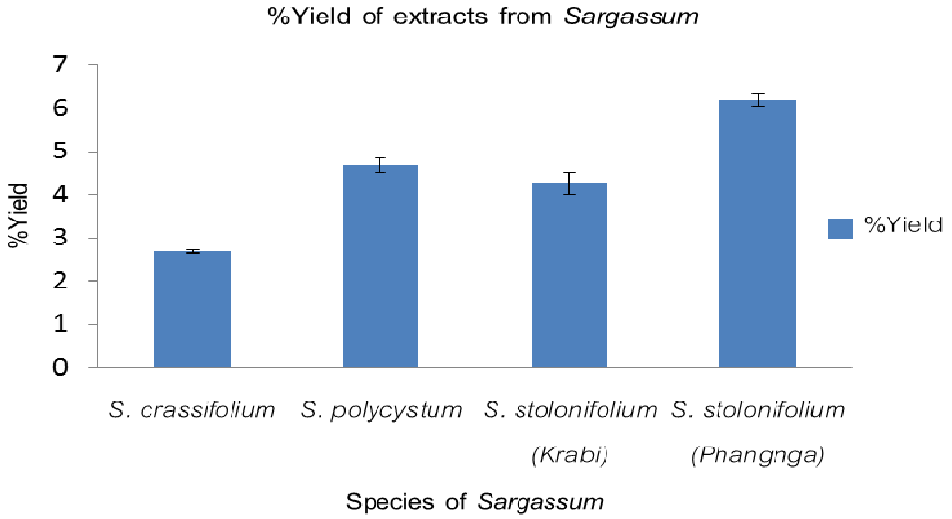

Figure 1 %Yield of extracts from *Sargassum*.

Table 1 Total polyphenol and fucoxanthin contents of extracts from *Sargassum*.

Seaweeds	Total polyphenol		Fucoxanthin	
	(mg PGE/g extract)	(mg PGE/g dwt)	(mg/g extract)	(mg/g dwt)
Sargassum crassifolium	78.86 ± 2.75[b]	2.11 ± 0.07[a]	42.24 ± 3.33[a]	1.13 ± 0.09[a]
S. polycystum	40.82 ± 2.77[a]	1.91 ± 0.13[a]	60.59 ± 3.73[b]	2.84 ± 0.17[c]
S. stolonifolium (Krabi)	114.24 ± 5.65[c]	4.87 ± 0.24[c]	55.57 ± 0.91[b]	2.37± 0.04[b]
S. stolonifolium (Phangnga)	68.20 ± 6.46[b]	4.22 ± 0.40[b]	40.27 ± 2.98[a]	2.49 ± 0.18[b]

All the values are mean ± SD; SD: standard deviation. [a,b,c] Column wise values with different superscripts of this type indicate significant difference ($P < 0.05$).

ผลการทดลอง ความเป็นพิษของสารสกัดต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็กชนิด GLC_4/Adr ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีนดื้อยาแบบหลายขนานชนิด MRP1 พบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *Sargassum* ทุกชนิด สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ ทั้งนี้ เมื่อใช้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เป็นเกณฑ์ในการเปรียบเทียบ พบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *S. stolonifolium* (กระบี่) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญได้ 50% (IC_{50}) ที่ความเข้มข้น 32.53 ± 2.04 μg/ml ในส่วนสารสกัดจากสาหร่าย *S. polycystum S. stolonifolium* (พังงา) และ *S. crassifolium* ใช้สารในที่ระดับความเข้มข้น 68.43 ± 7.06, 204.52 ± 37.28 และ 215.65 ± 1.65 μg/ml ตามลำดับ ในการที่จะยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

Table 2 IC_{50} of extracts from *Sargassum* against adriamycin-resistant human small cell lung carcinoma cell line (GLC_4/Adr).

Seaweeds	The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) (μg/ml)
Sargassum crassifolium	215.65 ± 1.65
S. polycystum	68.43 ± 7.06
S. stolonifolium (Krabi)	32.53 ± 2.04
S. stolonifolium (Phangnga)	204.52 ± 37.28

วิจารณ์ผล

การศึกษาการยับยั้งเซลล์มะเร็งมีความสำคัญในการพัฒนายารักษามะเร็งชนิดใหม่ในอนาคต ซึ่งคุณสมบัติของสารที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง ส่วนใหญ่จะอยู่ในโครงสร้าง 4 แบบ ได้แก่ พอลีคีไทด์ เทอร์ปีน สารประกอบไนโตรเจน และโพลีแซคคาไรด์ (Mayer and Lehmann, 2001) ตามข้อมูลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกาแนะนำสารสกัดที่ดีที่จะนำมาใช้ในการทดแทนยารักษามะเร็งในปัจจุบัน ต้องมีค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งร้อยละ 50 (IC_{50} value) น้อยกว่า 30 μg/ml (Suffiness and Pezzuto, 1990 cited in Praiboon *et al*., 2012) ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากสาหร่ายสกุล *Sargassum* มีศักยภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ และมีปริมาณต่อค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งร้อยละ 50 ซึ่งใกล้เคียงค่ามาตรฐาน และเนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่ดื้อยา Adriamycin (GLC_4/Adr) ด้วยสาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Sargassum* 4 ชนิด (*Sargassum crassifolium*, *S. polycystum*, *S. stolonifolium* (กระบี่) และ *S. stolonifolium* (พังงา) มาก่อน การศึกษาสาหร่าย *Sargassum* ชนิดเดียวกันนี้ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง มีเพียงการศึกษาในเซลล์มะเร็งที่ต่างชนิดกันกับการศึกษาในครั้งนี้ ดังการศึกษาของ Sangkhae *et al.* (2010) ที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วย dichloromethane และ ethyl acetate (1:1) จากสาหร่าย *S. binderi* ที่พบในอ่าวไทย ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) โดยพบว่ามีค่า (IC_{50}) 90 ± 6.35 μg/ml การศึกษาของ Zandi *et al.* (2010) ที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยน้ำเย็นจากสาหร่าย *S. oligocystum* ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ชนิด K562 เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดไมอิลอยด์ (human chronic myelogenous leukemia cells) และเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (Burkitt's lymphoma cells) ชนิด Daudi โดยพบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *S. oligocystum* สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Daudi และ K562 cells ได้ที่ความเข้มข้น 500 และ 400 μg/ml ตามลำดับ

มีรายงานว่าสารสกัดจากสาหร่าย *S. thunbergii S. kjellmaniaun* และ *S. hemiphyllum* สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยสามารถทำให้ร่างกายกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้ดีขึ้น (Itoh *et*

al., 1993; Zhuang *et al.,* 1995; Hwang *et al.,* 2010) จากการศึกษาในครั้งนี้พบความสัมพันธ์ระหว่าง ฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งกับปริมาณสารโพลีฟีนอล ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yuan and Walsh (2006) ที่รายงานว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณสารโพลีฟีนอล โดยการยับยั้งเซลล์มะเร็งจะแปรผันตามปริมาณโพลีฟีนอลในสารสกัด

มีรายงานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟูโคแซนทินต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ดังรายงานของ Peng *et al.* (2011) ที่รายงานว่า สารฟูโคแซนทินที่สกัดจากสาหร่ายสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในมนุษย์ได้ ดังเช่น สารฟูโคแซนทินจากสาหร่าย *Undaria pinnatifida* พบว่า ที่ความเข้มข้น 5 μM สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ส่วนล่างชนิด HCT116, มะเร็งต่อมลูกหมากของมนุษย์ชนิด PC-3 ได้ และที่ความเข้มข้น 10 μM ของฟูโคแซนทิน สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HCT116, PC-3 cells, เซลล์มะเร็งสายสะดือชนิด HUC-Fm และเซลล์มะเร็งลำไส้เล็กชนิด Caco-2 (Kotake-Nara *et al.*, 2005) สารฟูโคแซนทินที่สกัดจากสาหร่าย *Sargassum* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่ IC_{50} = 11.5 μg/ml (Ayyad *et al.,* 2011) และสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ชนิด HL-60 (Ganesan *et al.,* 2011) แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งกับปริมาณสารฟูโคแซนทินอย่างชัดเจน

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สาหร่าย *Sargassum* ที่พบในประเทศไทยมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ และพบว่า *S. stolonifolium* แม้เป็นชนิดเดียวกัน แต่ให้คุณสมบัติที่แตกต่างกัน อันเนื่องมาจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน ซึ่งปัจจัยสิ่งแวดล้อมอาจมีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ดังเช่นการศึกษาของ Chiao-Wei *et al.*, 2011 ที่ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจาก *S. polycystum* ที่เก็บจากสถานที่ที่ต่างกันในช่วงเดือนและปีเดียวกัน พบว่าให้ผลต่างกัน โดย Zubia *et al.* (2008) cited in Chiao-Wei *et al.* (2011) ได้รายงานว่า ปัจจัยสิ่งแวดล้อมนั้น เช่น สัตว์ที่มากินสาหร่ายนั้น ๆ เป็นอาหาร ความเข้มแสง ความลึกของระดับน้ำ ความเค็ม และแร่ธาตุสารอาหาร สามารถมีอิทธิพลต่อศักยภาพของสารฤทธิ์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจมีผลต่อสารในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งหากมีการศึกษาครั้งต่อไปควรศึกษาเก็บข้อมูลปัจจัยสิ่งแวดล้อมของพื้นที่ที่สาหร่ายนั้น ๆ ด้วย การทดลองนี้เป็นการสกัดสารสกัดหยาบโดยใช้เอทานอลเท่านั้น ดังนั้นในหากมีการศึกษาครั้งต่อไปควรที่จะใช้ตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติอื่น หรือทำให้สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น แล้วนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ อาจทำให้สามารถพบสารประกอบที่เป็นประโยชน์เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งต่อไป

สรุปผล

ประเทศไทยมีความหลายหลายของสาหร่าย *Sargassum* หลายชนิด และสารสกัดจากสาหร่าย *S. stolonifolium* (กระบี่) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็กชนิด GLC_4/Adr

โดยสามารถยับยั้งการเจริญได้ 50% (IC_{50}) ที่ความเข้มข้น 32.53 ± 2.04 μg/ml ใกล้เคียงกับข้อมูลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกาแนะนำสารสกัดที่ดีที่จะนำมาใช้ในการทดแทนยารักษามะเร็งในปัจจุบัน ต้องมี IC_{50} value น้อยกว่า 30 μg/ml ซึ่งฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในการทดลองครั้งนี้มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณสารโพลีฟีนอลที่มีในสารสกัด และพบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *S. stolonifolium* (กระบี่) จึงเป็นข้อมูลหนึ่งที่น่าสนใจในการนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็ง

เอกสารอ้างอิง

Athukorala, Y., Kim K.N., and Jeon, Y.J. 2006. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava.* Food. Chem. Toxicol. 44 (7): 1065-1074.

Ayyad, S.E.N., Ezmirly, S.T., Basaif, S.A., Alarif, W.M., Badria, A.F., and Badria, F.A. 2011.

Antioxidant, cytotoxic, antitumor, and protective DNA damage metabolites from the red sea brown alga *Sargassum* sp. Pharmacognosy Res. 3(3): 160–165.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can.J. Biochem. 37: 911-917.

Chiao-Wei, C., Siew-Ling, H., and Ching-Lee, W. 2011. Antibacterial activity of *Sargassum polycystum* C. Agardh and *Padina australis* Hauck (Phaeophyceae). Afr. J. Biotechnol. 10(64): 14125-14131.

Ehrke, M.J. 2003. Immunomodulation in cancer therapeutics. Int. Immunopharmacol. 3: 1105–1119.

Ganesan, P., Noda, K., Manabe, Y., Ohkubo, T., Tanaka, Y., Maoka, T., Sugawara, T., and Hirata, T. 2011. Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. Biochim. Biophys. Acta. 1810: 497–503.

Hwang, P.A., Wu, C.H., Gau, S.Y., Chien, S., and Hwang, D.F. 2010. Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed *Sargassum hemiphyllum*. J. Mar. Sci. Tech. 18 (1): 41-46.

Itoh, H., Noda, H., Amano, H., Zhuaug, C., Mizuno, T., and Ito, H. 1993. Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, expecially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae. Anticancer Res. 13: 2045-2052.

Kotake-Nara, E., Sugawara, T., and Nagao, A. 2005. Antiproliferative effect of neoxanthin and Fucoxanthin on cultured cells. Fish. Sci. 71: 459–461.

Lewmanomont, K., and Ogawa, H. 1995. Common seaweeds and seagrasses of Thailand. Faculty of Fisheries Kasetsart University. pp. 82-83.

Liu, L., Heinrich. M., Myers, S., and Dworjanyn, S.A. 2012. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: A phytochemical and pharmacological review. J. Ethnopharmacol. 142: 591–619.

Luo, H., Wang., B. Yu. C., Qu, Y., and Su, C. 2010. Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China. J. Med. Plants. Res. 4 (18): 2557-2565.

Mayer, A.M.S., and Lehmann, V.K.B. 2001. Marine pharmacology in 1999: Antitumor and cytotoxic compounds. Anticancer Res. 21: 2489-2500.

McBride, J., Ingram, P.R., Henriquez, F.L., and Roberts, C.W. 2005. Development of colorimetric microtiter plate assay for assessment of antimicrobials against *Acanthamoeba*. J. Clin. Microbiol. 43 (2): 629-634.

Meijer, E.G.M., Schilperoort, R.A., Rueb, S., Os-Ruygrok, P.E.V., and Hensgens, L.A.M. 1991. Transgenic rice cell lines and plants: expression of transferred chimeric genes. Plant Mol. Biol. 16: 807-820.

Merina, N., Chandra, K.J., and Jibon, K. 2012. Medicinal plants with potential anticancer activities: A review. Int. Res. J. Pharm. 3 (6): 26-30.

Noiraksar, T., and Ajisaka, T. 2008. Taxonomy and distribution of *Sargassum* (Phaeophyceae) in the Gulf of Thailand. J. Appl. Phycol. 20: 963–977.

Noviendri, D, Jaswir, I., Salleh, H.M., Taher, M., Miyashita, K., and Ramli, N. 2011. Fucoxanthin extraction and fatty acid analysis of *Sargassum binderi* and *S. duplicatum*. J. Med. Plant Res. 5(11): 2405-2412.

Palakas, S., Pakkong, P., and Ratanaphadit, K. 2009. Chemioresistance of an adriamycin-selective human small-cell lung carcinoma cell line. Kasetsart J. (Nat. Sci.). 43 (5): 165-171.

Peng, J., Yuan, J.P., Wu, C.F., and Wang, J.H. 2011. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health. Mar. Drugs. 9: 1806-1828.

Praiboon, J., Bhumiphamon, O., Chiraiart, A., and Akakabe, Y. 2012. Anticancer activities of cold water polysaccharide extracted from *Gracilaria edulis* (S.G. Gmelin) P.C. Silva. KKU Sci. J. 40 (1): 254-264.

Sangkhae, C., Jongaramruong, J., Noiraksar, T., and Plekpia, J. 2010. Antiproliferative and Apoptosis-Inducing Activities of Extracts from *Sargassum binderi* Sonder on Human Cervical Cancer Cells. Burapha Sci. J. 15 (1): 3-12.

Sriplung, H., Khuhaprema, T., Srivatanakul, P., Attasdara, P., Wiangnon, S., and Sumitsawan, Y. 2003. Cancer in Thailand, Bangkok. Medical Publisher. 3 (2): 7-69.

Suffiness, M., and Pezzuto, J.M. 1990. Assays related to cancer drug discovery. *In* K. Hostettman, eds. Method in Plant Biochemistry: Assay for Bioactivity. London: Academic Press. pp. 246-247. cited in Praiboon, J., Bhumiphamon, O., Chiraiart, A., and Akakabe, Y. 2012. Anticancer activities of cold water polysaccharide extracted from *Gracilaria edulis* (S.G. Gmelin) P.C. Silva. KKU Sci. J. 40 (1): 254-264.

Yuan, Y.V., and Walsh, N.A. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts froma variety of edible seaweeds. Food Chem. Toxicol. 44: 1144-1150.

Zandi, K., Ahmadzadeh, S., Tajbakhsh, S., Rastian, Z., Yousefi, F., Farshadpour, F., and Sartavi, K. 2010. Anticancer activity of *Sargassum oligocystum* water extract against human cancer cell lines. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 14 (8): 669-73.

Zhuang, C., Itoh, H., Mizuno, T., and Ito, H. 1995. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (*Sargassum thunbergii*). Biosci. Biotechnol. Biochem. 59: 563–567.

Zijlstra, J.G., De Vries, E.G., Muskiet, F.A., Martini, I.A., Timmer-Bosscha, H., and Mulder, N.H. 1987. Influence of docosahexaenoic acid in vitro on intracellular Adriamycin concentration in lymphocytes and human Adriamycin-sensitive and –resistant small-cell lung cancer cell lines, and on cytotoxicity in the tumor cell lines. Int. J. Cancer. 40: 850-856.

Zubia, M., Payri, C., and Deslandes, E. 2008. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornate* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti French Polynesia. J. Appl. Phycol. 20: 1033-1043. cited in Chiao-Wei, C., Siew-Ling, H., and Ching-Lee, W. 2011. Antibacterial activity of *Sargassum polycystum* C. Agardh and *Padina australis* Hauck (Phaeophyceae). Afr. J. Biotechnol. 10(64): 14125-14131.